DOI:10.7499/j.issn.1008-8830.2013.03.008

论著·临床研究

川崎病患儿 FCGR2A 基因单核苷酸多态性的研究

纪玉晓[1,2]　张宏艳[1,2]　林书祥[1]

(1.天津市儿童医院心内科,天津　300074;2.天津医科大学,天津　300070)

[摘　要]　**目的**　探讨中国汉族儿童 FCGR2A 基因 rs1801274 位点单核苷酸多态性(SNP)与川崎病(KD)易感性及静脉注射免疫球蛋白(IVIG)治疗 KD 疗效的关系。**方法**　应用聚合酶链反应(PCR)联合直接基因测序技术对 35 例 KD 患儿和 25 例健康儿童的 FCGR2A 基因 SNP rs1801274 位点进行检测和分析,并将 KD 患儿根据 IVIG 治疗后有无并发冠脉损害(CAL)分为 CAL 和无 CAL(NCAL)两个亚组。**结果**　在研究对象中均检测到 FCGR2A 基因 rs1801274 位点,该位点存在 3 种基因型(AA、AG、GG)。该 SNP 位点的基因型分布及等位基因频率在 KD 组与对照组及 CAL 组与 NCAL 组之间比较差异均有统计学意义($P<0.05$)。其中携带 A 等位基因或 AA 基因型者发生 KD 的危险性大(分别 $OR=3.39$,95% CI:1.53~7.50;$OR=4.93$,95% CI:1.61~15.1);携带基因型 AG 或 G 等位基因使 KD 患儿发生 CAL 的危险性增高(分别 $OR=5.43$,95% CI:1.06~27.8;$OR=4.88$,95% CI:1.44~16.5)。**结论**　FCGR2A 基因 rs1801274 位点 SNP 可能是影响中国汉族儿童 KD 易感性以及 IVIG 治疗 KD 疗效的一个重要因素。　[中国当代儿科杂志,2013,15(3):196-200]

[关　键　词]　FCGR2A 基因;川崎病;冠状动脉损伤;单核苷酸多态性;静脉注射免疫球蛋白;儿童

Single nucleotide polymorphism of FCGR2A gene in Han Chinese children with Kawasaki disease

JI Yu-Xiao, ZHANG Hong-Yan, LIN Shu-Xiang. Department of Cardiology, Tianjin Children's Hospital, Tianjin 300074, *China* (*Zhang H-Y, Email: hongyanzhang@yahoo.com*)

Abstract: Objective　To study the association of FCGR2A gene single nucleotide polymorphism (SNP) rs1801274 with Kawasaki disease (KD) susceptibility and the efficacy of intravenous immunoglobulin (IVIG) therapy in Han Chinese children. **Methods**　Thirty-five KD children and 25 age-and gender-matched healthy children (control group) were enrolled in the study. Polymerase chain reaction (PCR) and gene sequence analysis were applied to detect SNP of FCGR2A gene rs1801274. These KD patients were classified into two subgroups based on the presence of coronary artery lesion (CAL) following IVIG therapy: CAL ($n=13$) and non-CAL ($n=22$). **Results**　FCGR2A gene SNP rs1801274 was detected in all subjects, including three genotypes (AA, AG and GG). For FCGR2A gene SNP rs1801274, there were significant differences in the genotype and allele frequencies between the KD and control groups ($P<0.05$), and significant differences in the genotype and allele frequencies were also found between the CAL and non-CAL subgroups ($P<0.05$). A allele and AA genotype were linked to an increased risk of KD susceptibility (A allele: $OR=3.39$, 95% CI:1.53-7.50; AA genotype: $OR=4.93$, 95% CI:1.61-15.1). Both AG ($OR=5.43$, 95% CI:1.06-27.8) and G allele ($OR=4.88$, 95% CI:1.44-16.5) were linked to an increased risk of CAL in KD children. **Conclusions**　Polymorphism of the FCGR2A gene SNP rs1801274 is one of the important factors probably influencing susceptibility to KD and efficacy of IVIG therapy on KD in Han Chinese children.　[**Chin J Contemp Pediatr, 2013, 15(3):196-200**]

Key words:　FCGR2A gene; Kawasaki disease; Coronary artery lesion; Single nucleotide polymorphism; Intravenous immunoglobulin; Child

经静脉注射免疫球蛋白(intravenous immunoglobulin,IVIG)治疗后,川崎病(Kawasaki disease,KD)患儿合并冠状动脉损害(coronary artery lesion,CAL)的发生率由未经治疗的 15%~25% 下降到 5%,但仍有 10%~30% KD 患儿对 IVIG 治疗不敏感,而且这部分患儿合并 CAL 的发生率明显高于对

[收稿日期]2012-10-29;[修回日期]2013-01-17
[基金项目]天津市卫生局科技基金攻关项目(No.11KG119)。
[作者简介]纪玉晓,女,硕士研究生。
[通信作者]张宏艳,主任医师,教授。

IVIG 治疗敏感的患儿[1]。目前 IVIG 治疗 KD 的机制尚不清楚,可能主要依赖 IgG 的 Fc 片段与各种免疫细胞上的 IgG 的 Fc 受体(FcγR)相互作用而发挥抗炎的作用[2]。FcγRⅡa 是 FcγR 家族中重要的一员,研究发现经 IVIG 治疗后,KD 患儿的 FCGR2A 基因(编码 FcγRⅡa 的基因)表达下调[3-4]。因此 FCGR2A 基因多态性可能会影响 IVIG 治疗 KD 的疗效。另外,有文献报道了 FCGR2A 基因与 KD 易感性之间的关系,但结果不一[5-10]。因此进一步阐述 FCGR2A 基因与 KD 以及 IVIG 治疗 KD 的疗效之间的关系,将有助于 KD 的诊断和个体化治疗,并可为今后 KD 的基因治疗提供一定的思路和依据。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选择 35 例 2010 年 10 月至 2012 年 4 月在天津市儿童医院住院治疗的 KD 患儿,其中男孩 22 例,女孩 13 例,男女之比为 1.7∶1,年龄 2 个月至 6 岁,平均年龄 3.3 ± 1.7 岁。所有 KD 患儿均符合诊断标准[11]。明确诊断后发病 10 d 内均给予 IVIG 单次剂量 2 g/kg 静脉滴注及口服阿司匹林治疗。所有患儿均对 IVIG 治疗敏感[11]。患儿均于 IVIG 治疗前和出院前行超声心动图检查冠状动脉情况,根据有无并发 CAL[12]将患儿分为 CAL 组(13 例)和未并发 CAL(NCAL)组(22 例)。选择同期于该院门诊体检的 25 例健康儿童作为对照组,均排除感染性疾病、心血管疾病、自身免疫性疾病等,并排除既往 KD 病史。其中男 15 例,女 10 例,男女之比 1.5∶1,年龄 5 个月至 8 岁,平均年龄 3.7 ± 1.5 岁。KD 组和对照组年龄、性别差异无统计学意义。全部研究对象均为汉族儿童,相互之间无血缘关系,籍贯为天津及河北省所辖区县。本研究获所有入选儿童家长或监护人知情同意及天津市儿童医院伦理委员会的批准。

1.2 方法

1.2.1 标本采集 采集研究对象外周静脉血 2 mL,加入含 EDTA 抗凝管中,置于 -80°C 冰箱保存用于提取 DNA。

1.2.2 基因组 DNA 提取 应用美国 PROMEGA 公司生产的基因组 DNA 提取试剂盒(CAT. #A7710)提取基因组 DNA,操作流程严格按照试剂盒说明书进行。得到的 DNA 样本置于 -20 ℃冰箱保存备用。

1.2.3 引物设计与合成 参照文献[6]设计引物。上游引物:5′-CTTTCAGAATGGCTGGTGCT-3′,下游引物:5′-TTTGCTGCTATGGGCTTTCT-3′。委托上海生工生物工程技术服务有限公司合成。最终使用浓度为 10 pmoL/μL。

1.2.4 PCR 反应扩增 应用德国 Eppendorf 公司生产的 PCR 扩增仪进行反应。PCR 反应体系体积为 50 μL,含基因组 DNA 4 μL,MasterMix 22 μL,上下游引物各 1.0 μL,ddH_2O 22 μL。PCR 反应条件:94°C 预变性 5 min;94°C 变性 30 s、65°C 退火 30 s、72°C 延伸 1 min,共 10 个循环;然后 94°C 变性 30 s、55°C 退火 30 s、72°C 延伸 1 min,共 22 个循环;最后 72°C 终末延伸 7 min。取 PCR 产物 5 μL 行琼脂糖凝胶电泳,然后在 Tanon3500 型凝胶成像分析系统下进行观察拍照、分析结果。

1.2.5 PCR 产物测序及序列分析 取 366 bp 处扩增条带阳性标本的 PCR 产物 30 μL,委托上海生工生物工程技术服务有限公司进行测序。应用 Chromas 软件分析所获测序结果。利用 NCBI 网站在线 blast 对所获序列进行对比分析。

1.3 统计学分析

运用 SPSS 17.0 软件对数据进行统计学分析。计量资料采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,基因型和等位基因频率采用直接计数法统计。应用拟合优度 χ^2 检验判断 KD 组和对照组基因型频率是否符合 Hardy-Weinberg 平衡。采用 χ^2 检验比较各组之间基因型及等位基因频率,并计算优势比(*OR*)及其 95% 可信区间(95% *CI*)。$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PCR 扩增结果

按上述 PCR 反应体系及条件扩增,FCGR2A 基因 SNP rs1801274 扩增产物片段长度为 366 bp。以 1000 bp Marker 为核酸分子量参照标准,扩增产物的目标条带在 300 ~ 400 bp 之间,符合实验要求。每次 PCR 扩增均设立阴性对照(以 ddH_2O 代替板 DNA)以检测 PCR 结果的可靠性。电泳结果见图 1。

2.2 FCGR2A 基因 SNP rs1801274 基因型的分布

参照 NCBI 网站 SNP rs1801274,利用该网站在线 blast 对所获序列进行对比分析发现,所有研究对象均检测到 SNP rs1801274,基因型为 AA、AG、GG 3 种,如图 2 所示。KD 组中 AA 基因型 23 例,AG 基因型 9 例,GG 基因型 3 例。对照组中 AA 基因型 7 例,AG 基因型 12 例,GG 基因型 6 例。

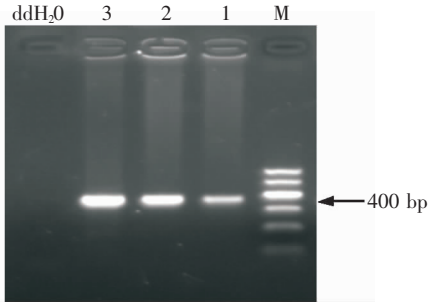

图 1　FCGR2A 基因 SNP rs1801274 扩增产物电泳图

1～3：标本；ddH_2O：阴性对照；M：100 bp Marker。

2.3　KD 组与对照组 FCGR2A 基因 SNP rs1801274 等位基因与基因型频率的比较

KD 组与对照组基因型频率均符合 Hardy-Weinberg 平衡定律（$P > 0.05$），具有群体代表性。FCGR2A 基因 SNP rs1801274 基因型频率和等位基因频率在 KD 组和对照组的差异均具有统计学意义（$P < 0.05$），见表 1。其中等位基因 A 和基因型 AA 使 KD 发生的危险性增加（分别 $OR = 3.39$，95% CI：1.53～7.50；$OR = 4.93$，95% CI：1.61～15.1）。

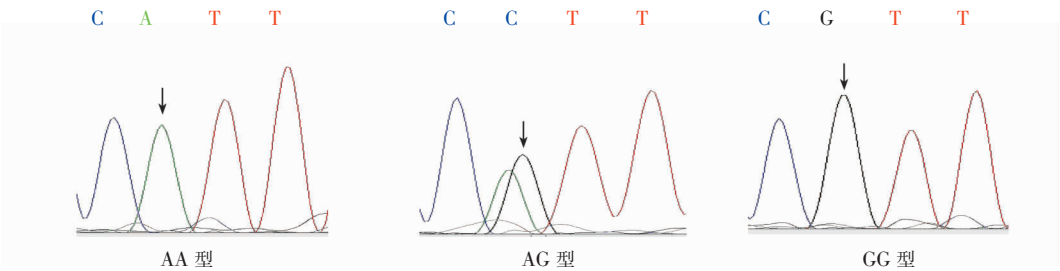

图 2　FCGR2A 基因 SNP rs1801274 基因测序图　箭头所示为多态位点，绿色峰为碱基 A，黑色峰为碱基 G，同时单峰为纯合子基因型，套峰为杂合子基因型。

2.4　KD 患儿中 CAL 与 NCAL 亚组 FCGR2A 基因 SNP rs1801274 基因型和等位基因频率的比较

FCGR2A 基因 SNP rs1801274 基因型与等位基因频率在 CAL 组与 NCAL 组的分布差异具有统计学意义（$P < 0.05$），见表 2。其中基因型 AG 和等位基因 G 使 KD 合并 CAL 发生的危险性增加（分别 $OR = 5.43$，95% CI：1.06～27.8；$OR = 4.88$，95% CI：1.44～16.5）。

表 1　KD 组和对照组 FCGR2A 基因 SNP rs1801274 基因型和等位基因频率分布　［例（%）］

组别	例数	基因型			等位基因	
		AA	AG	GG	A	G
对照组	25	7(28)	12(48)	6(24)	26(52)	24(48)
KD 组	35	23(66)	9(26)	3(9)	55(79)	15(21)
χ^2 值			8.53		9.39	
P 值			0.01		0.003	

表 2　CAL 组与 NCAL 组 KD 患儿 FCGR2A 基因 SNP rs1801274基因型和等位基因频率的分布　［例（%）］

组别	例数	基因型			等位基因	
		AA	AG	GG	A	G
CAL 组	13	5(38)	6(46)	2(15)	16(62)	10(38)
NCAL 组	22	18(82)	3(14)	1(5)	39(89)	5(11)
χ^2 值			6.82		7.13	
P 值			0.03		0.01	

3　讨论

FcγR 是一类与 IgG 的 Fc 片段特异结合的跨膜糖蛋白，属于免疫球蛋白超家族的一员。它们是连接固有免疫与获得性免疫的枢纽，也是连接体液免疫与细胞免疫的桥梁，在维持机体免疫及免疫耐受中起重要作用[13]。人类 Fcγ 可分为 FcγR Ⅰ（CD64）、FcγR Ⅱ（CD32）和 FcγR Ⅲ（CD16）3 类，而每一类还可再分出不同的亚类。FcγR Ⅱa 是 FcγR Ⅱ中的亚类，表达于多种免疫细胞的表面，包括自然杀伤细胞、巨噬细胞以及中性粒细胞。FCGR2A 基因定位于人类染色体 1q23，其多态性位于跨膜结构域的 131 位点（国际通用号为 rs1801274），存在共显性等位基因 A/G，分别编码组氨酸（H）和精氨酸（R）。这种改变极大地影响了 FcγR Ⅱa 与 IgG 的结合力。FcγR Ⅱa 是人唯一有效结合 IgG2 的受体，是保障机体内有效清除免疫复合物的免疫球蛋白受体亚型。FcγR Ⅱa-H131（131 位点为组氨酸残基）能有效地与 IgG2 结合，而 FcγR Ⅱa-R131（131 位点为精氨酸残基）则不能与 IgG2 结合。因而在 IgG2 调理的吞噬作用中，基因型为 AA 个体的吞噬细胞的作用较基因型为 GG 的个体更有效。FCGR2A 基因的多态性使不同个体对 FcγR Ⅱa 介导的免疫反应出现差异，进而影响一系列感染性和自身免疫性疾

病的发生发展[14-16]。

KD 目前已经成为发达国家儿童获得性心脏病的首要原因,并且也是 KD 患儿成年期发生冠状动脉心脏病的危险因素之一[17],但其病因和发病机制仍尚不清楚。遗传因素是导致 KD 发生的一个不容忽视的因素。全基因组层面上寻找与复杂疾病相关的易感基因是近年来人类寻找复杂疾病病因的最有效的方法之一。FCGR2A 基因 SNP rs1801274 为最近的全基因组关联分析研究(GWAS)新发现的与 KD 易感性相关的位点,并且该位点的等位基因 A 被认为是致病的危险因素[7,9],但在台湾人群中却有不一致的报道[8]。另外候选基因的方法对 FCGR2A 基因 SNP rs1801274 与 KD 易感相关性的研究也不尽相同[5-6,10]。研究结果的差异可能与种族差异和遗传异质性有关。本研究发现在 KD 组 FCGR2A 基因 SNP rs1801274 位点 AA 基因型频率等位基因 A 的频率高于对照组,并且等位基因 A 使 KD 发生的危险性增加(OR = 3.39),表明 A 等位基因与 KD 的发生相关。目前 FCGR2A 基因导致 KD 发生的机制尚在研究中,推测其可能的机制是:FcγRⅡa 其胞质区域含免疫受体酪氨酸活化基序(ITAM),属于兴奋性 FcγR。FcγRⅡa 与免疫复合物中的 IgG 结合,激活胞质区 ITAM 转导兴奋信号,使细胞膜上离子通道开放,钙离子内流增加,免疫细胞活化,引起炎性介质如 TNF-α 和白细胞介素等的释放,损伤血管内皮细胞,引起血管炎。携带等位基因 A 的个体由于 FcγRⅡa 能与 IgG2 的结合,可能较携带等位基因 G 的个体产生更强的炎症和免疫反应,从而与 KD 发生相关。

Tsujimoto 等[18]认为中性粒细胞可能是导致 KD 患儿 CAL 发生的效应细胞,IVIG 通过诱导 KD 急性期的中性粒细胞凋亡来降低 CAL 的发生率。与日本 Taniuchi 等[5]的研究一致,本研究也发现经 IVIG 治疗的 KD 患儿中,合并 CAL 患儿与未合并 CAL 患儿基因型与等位基因频率的分布差异均有统计学意义,其中基因型 AG 和等位基因 G 使 KD 并发 CAL 发生的危险性增加 5.43 和 4.88 倍。因此推测其可能的机制是 IVIG 中含有的 IgG2 主要与携带等位基因 A 的个体的 FcγRⅡa 结合,诱导白细胞凋亡或抑制白细胞中细胞因子的产生减弱炎症反应,进而抑制 CAL 的发生。因此 FCGR2A 基因 SNP rs1801274 的多态性影响 IVIG 治疗 KD 的疗效。FCGR2A 基因多态性可能也会影响依赖 IgG 的治疗药物治疗其他疾病的疗效。例如,携带等位基因 G 的风湿性关节炎患者应用 TNF-α 拮抗剂(英夫利昔单抗)治疗预后较好[7]。在 KD 小鼠模型中证实 TNF-α 是诱导冠状动脉炎症和冠状动脉瘤形成的必要条件[19],从而为 TNF-α 阻断剂临床治疗 KD 提供了实验依据。临床研究发现英夫利昔单抗治疗 IVIG 治疗无反应的 KD 患儿有效[20-21]。因此 FCGR2A 基因多态性是否会影响英夫利昔单抗治疗 KD 的疗效值得进一步研究。

综上所述,本研究显示,FCGR2A 基因 SNP rs1801274位点与中国汉族儿童 KD 的发生相关,并且影响 IVIG 治疗 KD 的疗效。因此通过检测 FCGR2A 基因多态性可能会筛查到 KD 易患人群以及 KD 患儿中应用 IVIG 治疗仍并发 CAL 的高危人群,对于 KD 患儿个体化治疗以及应用 IVIG 治疗预后的预测具有重要的意义。目前已发现多种基因的多态性与 KD 易感性相关[22],因此单一的致病基因对疾病的发生的影响可能会比较轻微。同时,由于本研究样本例数偏少,并考虑人群的种族、地区差异以及实验条件的局限性,FCGR2A 基因多态性与 KD 的确切关系尚需要大样本、多中心、反复的研究来进一步证实。

[参 考 文 献]

[1] Wallace CA, French JW, Kahn SJ, Sherry DD. Initial intravenous gammaglobulin treatment failure in Kawasaki disease[J]. Pediatrics, 2000, 105(6): E78.

[2] Kazatchkine MD, Kaveri SV. Immunomodulation of autoimmune and inflammatory diseases with intravenous immune globulin[J]. N Engl Med, 2001, 345(10): 747-755.

[3] 张艳涛,谢利剑,黄敏,沈捷,李锦康. 大剂量丙种球蛋白对川崎病肾上腺髓质素及相关基因表达的影响[J]. 临床儿科杂志,2012,30(1):84-88.

[4] Abe J, Jibiki T, Noma S, Nakajima T, Saito H, Terai M. Gene expression profiling of the effect of high-dose intravenous Ig in patients with Kawasaki disease[J]. J Immunol, 2005, 174(9): 5837-5845.

[5] Taniuchi S, Masuda M, Teraguchi M, Ikemoto Y, Komiyama Y, Takahashi H, et al. Polymorphism of fcgamma riia may affect the efficacy of gamma-globulin therapy in Kawasaki disease[J]. Clin Immunol, 2005, 25(4):309-313.

[6] Biezeveld M, Geissler J, Merkus M, Kuipers IM, Ottenkamp J, Kuijpers T. The involvement of fc gamma receptor gene polymorphisms in kawasaki disease[J]. Clin Exp Immunol, 2006, 147(1): 106-111.

[7] Khor CC, Davila S, Breunis WB, Lee YC, Shimizu C, Wright VJ, et al. Genome-wide association study identifies FCGR2A as a susceptibility locus for Kawasaki disease[J]. Nat Genet, 2011, 43(12): 1241-1246.

[8] Lee YC, Kuo HC, Chang JS, Chang LY, Huang LM, Chen MR, et al. Two new susceptibility loci for Kawasaki disease identified through genome-wide association analysis[J]. Nat Genet, 2012, 44(5): 522-525

[9] Onouchi Y, Ozaki K, Burns JC, Shimizu C, Terai M, Hamada

H, et al. A genome-wide association study identifies three new risk loci for Kawasaki disease[J]. Nat Genet, 2012, 44(5): 517-521.
[10] Shrestha S, Wiener H, Shendre A, Kaslow RA, Wu J, Olson A, et al. Role of activating FcγR gene polymorphisms in Kawasaki disease susceptibility and intravenous immunoglobulin response[J]. Circ Cardiovasc Genet, 2012, 5(3): 309-316.
[11] Newburger JW, Takahashi M, Gerber MA, Gewitz MH, Tani LY, Burns JC, et al. Diagnosis, treatment, and long-term management of Kawasaki disease: a statement for health professionals from the Committee on Rheumatic Fever, Endocarditis, and Kawasaki Disease, Council on Cardiovascular Disease in the Young. American Heart Association[J]. Pediatrics, 2004, 114(6): 1708-1733.
[12] Ayusawa M, Sonobe T, Uemura S, Ogawa S, Nakamura Y, Kiyosawa N, et al. Revision of diagnostic guidelines for Kawasaki disease (the 5th revised edition)[J]. Pediatr Int, 2005, 47(2): 232-234.
[13] van de Winkel JG, Anderson CL. Biology of human immunoglobulin G Fc receptors[J]. Leukoc Biol, 1991, 49(5): 511-524.
[14] Sinha S, Prasad KN, Jain D, Nyati KK, Pradhan S, Agrawal S. Immunoglobulin IgG Fc-receptor polymorphisms and HLA class II molecules in Guillain-Barré syndrome[J]. Acta Neurol Scand, 2010, 122(1): 21-26.
[15] Meziani R, Yamada R, Takahashi M, Ohigashi K, Morinobu A, Terao C, et al. A trans-ethnic genetic study of rheumatoid arthritis identified FCGR2A as a candidate common risk factor in Japanese and European populations[J]. Mod Rheumatol, 2012, 22(1): 52-58.
[16] Yang SK, Jung Y, Kim H, Hong M, Ye BD, Song K. Association of FCGR2A, JAK2 or HNF4A variants with ulcerative colitis in Koreans[J]. Dig Liver Dis, 2011, 43(11): 856-861.
[17] Gordon JB, Kahn AM, Burns JC. When children with Kawasaki disease grow up: Myocardial and vascular complications in adulthood[J]. Am Coll Cardiol, 2009, 54(21): 1911-1920.
[18] Tsujimoto H, Takeshita S, Nakatani K, Kawamura Y, Tokutomi T, Sekine I. Intravenous immunoglobulin therapy induces neutrophil apoptosis in Kawasaki disease[J]. Clin Immunol, 2002, 103(2): 161-168.
[19] Hui-Yuen JS, Duong TT, Yeung RS. TNF-alpha is necessary for induction of coronary artery inflammation and aneurysm formation in an animal model of Kawasaki disease[J]. J Immunol, 2006, 176(10): 6294-6301.
[20] Burns JC, Best BM, Mejias A, Mahony L, Fixler DE, Jafri HS, et al. Infliximab treatment of intravenous immunoglobulin-resistant Kawasaki disease[J]. J Pediatr, 2008, 153(6): 833-838.
[21] Son MB, Gauvreau K, Burns JC, Corinaldesi E, Tremoulet AH, Watson VE, et al. Infliximab for intravenous immunoglobulin resistance in Kawasaki disease: a retrospective study[J]. J Pediatr, 2011, 158(4): 644-649.
[22] Onouchi Y. Molecular genetics of Kawasaki disease[J]. Pediatr Res, 2009, 65(5 Pt 2): 46R-54R.

（本文编辑：邓芳明）

·消息·

新生儿颅脑超声诊断学习班通知

为提高对围产期脑损伤及其他中枢神经系统疾病的诊断水平，充分利用已有的医疗资源，推广颅脑超声检查诊断技术，北京大学第一医院儿科按计划于 2013 年 8 月 27 日至 31 日举办为期 5 天的新生儿颅脑超声学习班。本班属国家级教育项目，授课教师为本科及北京市著名专家教授。学习结束授予 10 学分。主要授课内容包括：中枢神经系统解剖；新生儿不同颅脑疾病超声诊断；新生儿颅脑疾病不同影像学检查方法比较与选择；超声见习。招收学员对象：儿科新生儿专业医师、超声专业医师及技师。学费：1200 元。欲参加者请与我们联系：北京大学第一医院儿科（邮编 100034）王红梅、周丛乐。电话：010－83573461 或 83573213。E-mail：bdyy2002@163.com.。如果需要，我们将寄去正式通知。

北京大学第一医院儿科
2013 年 1 月 15 日