

doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2015.05.009

论著·临床研究

微阵列比较基因组杂交技术对不明原因智力低下 / 生长发育迟缓患儿的分子诊断

何玺玉 陈晓春 李然 李培 陆爱梅

(军事医学科学院附属医院儿科, 北京 100071)

[摘要] **目的** 分析不明原因智力低下(ID)和(或)生长发育迟缓(DD)患儿潜在的致病性基因组不平衡, 及其与表型的相关性, 探讨高密度微阵列比较基因组杂交技术(array-CGH)在临床分子遗传学诊断中的应用价值。**方法** 采用array-CGH技术对16例ID/DD患儿进行全基因组扫描分析, 并用多重连接探针扩增技术(MLPA)对检出的基因组不平衡异位进行验证。**结果** 16例患儿高分辨G显带核型分析均无异常。6例(38%)患儿存在基因拷贝数异常(CNVs), 其中3例CNVs为正常多态性改变; 1例CNVs涉及4p16.3区域微缺失, 考虑为Wolf-Hirschhorn综合征; 1例CNVs涉及7q11.23区域微缺失, 考虑为Williams-Beuren综合征; 另1例CNVs临床意义不明确, 包含2个重复突变, 该突变与智力低下、脑发育迟缓、特殊面容、隐睾、牙列不齐等有关, 证实该CNVs具有临床意义。**结论** 通过array-CGH技术对不明原因ID/DD患儿进行全基因组扫描, 可为部分患儿明确病因诊断。该技术作为一种高通量、快速的疾病研究手段, 在ID/DD的病因诊断中具有重要的临床意义。

[中国当代儿科杂志, 2015, 17(5): 459-463]

[关键词] 微阵列比较基因组杂交技术; 智力低下; 发育迟缓; 基因组不平衡; 儿童

Molecular diagnosis of children with unexplained intellectual disability/developmental delay by array-CGH

HE Xi-Yu, CHEN Xiao-Chun, LI Ran, LI Pei, LU Ai-Mei. Department of Pediatrics, Affiliated Hospital of Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China (He X-Y, Email: hxyjs2001@aliyun.com)

Abstract: Objective To analyze the potential pathogenic genomic imbalance in children with unexplained intellectual disability (ID) and/or developmental delay (DD) and its association with phenotypes, and to investigate the value of array-based comparative genomic hybridization (array-CGH) in clinical molecular genetic diagnosis. **Methods** The whole genome of 16 children with ID/DD was scanned by the array-CGH for detection of genomic copy number variations (CNVs), and the revealed genomic imbalance was confirmed by multiplex ligation-dependent probe amplification. **Results** G-band karyotyping of peripheral blood cells showed no abnormalities in the 16 children. The results of the array-CGH revealed that 6 (38%) of the 16 patients had genomic CNVs, and 3 cases of CNVs were normal polymorphic changes; 1 CNV was a microdeletion of 4p16.3, which was the critical region for Wolf-Hirschhorn syndrome, and 1 CNV was a microdeletion of 7q11.23, which was the critical region for Williams-Beuren syndrome. Moreover, a CNV was identified with two duplications at 2q22.2 and 15q21.3 in a boy, which proved to have a clinical significance due to its association with ID, brain DD, unusual facies, cryptorchidism, irregular dentition, etc. **Conclusions** Array-CGH allows for the etiological diagnosis in some of the children with unexplained ID/DD. As a high-throughput and rapid tool, it has a great clinical significance in the etiological diagnosis of ID/DD.

[Chin J Contemp Pediatr, 2015, 17(5): 459-463]

Key words: Array-based comparative genomic hybridization; Intellectual disability; Developmental delay; Genomic imbalance; Child

[收稿日期] 2014-09-30; [接受日期] 2014-12-09

[基金项目] 国家科技支撑计划(2013BAI12B00)。

[作者简介] 何玺玉, 男, 硕士, 主任医师, 教授。

智力低下 (intellectual disability, ID) 在亚洲人群的发病率大约为 0.25%~1.3%^[1-2]。ID 和生长发育迟缓 (developmental delay, DD) 问题越来越受到社会关注, 已成为一个非常重要的公共健康问题。导致 ID/DD 的病因复杂, 遗传异常是其重要因素, 但潜在的不明原因的 ID/DD 仍然很多, 大约占 30%~60%^[3-4]。G 显带染色体核型分析作为首选技术已广泛用于染色体异常的检测, 但该方法对于 5 Mb 以下的染色体异常无法识别, 而多重链接探针扩增技术 (multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA) 能检出 5%~10% 不明原因 ID/DD 患儿存在亚端粒区域基因拷贝数变异 (CNVs)^[5], 不适合检测未知的点突变及染色体平衡易位, 临床进一步治疗及受累家庭再生育风险防范仍然困难重重。微阵列比较基因组杂交技术 (array-based comparative genomic hybridization, array-CGH) 突破了传统细胞遗传学方法的许多限制, 已广泛应用于检测不明原因的非综合征性的 ID/DD^[6], 相比较传统的染色体核型分析, array-CGH 能检测到 <5 Mb 的遗传变异^[7]。本研究共收集不明原因的 ID/DD 患儿 16 例, 采用 array-CGH 技术进行全基因组扫描, 以评估不明原因 ID/DD 病例的遗传病因, 为进一步诊治及遗传咨询提供科学依据。

1 资料与方法

1.1 研究对象

研究对象为 2012 年 8 月至 2014 年 1 月来我院儿童遗传咨询门诊或健康门诊就诊的不明原因 ID/DD 患儿 16 例, 根据 ID/DD 诊断及筛查标准^[8], 除外有明确病因的疾病, 如明确的染色体核型异常、遗传代谢性疾病、甲状腺功能异常、颅内肿瘤、中枢神经系统感染、围产期异常导致的缺氧缺血性脑病、已知遗传性综合征和遗传病等。所有患儿均为临床病例, 家属同意参与研究并签署知情同意书, 并获得医院伦理委员会批准。16 例患儿均为汉族, 平均年龄 6 岁 (范围 2 个月至 16 岁), 其中男孩 11 例, 女孩 5 例。

1.2 样本采集及预处理

在受试者安静状态下采集乙二胺四乙酸 (EDTA) 抗凝外周血 2 mL, 离心柱法提取基

因组 DNA, DNA 总量在 50 μ L 以上, 浓度为 100~150 ng/ μ L, -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。

1.3 array-CGH 检测

取患儿基因组 DNA 2 μ g 与参考 DNA 2 μ g, 用 Alu I 和 Rsa I 在 37 $^{\circ}$ C 条件下联合消化 2 h, 进行 DNA 纯化。患儿基因组 DNA 使用欧联红色荧光素 cy5-dCTP 标记, 参照样本 DNA 使用欧联绿色荧光素 cy3-dCTP 标记, 标记后 DNA 用 MicroCon YM-30 进行样本纯化。将上述已纯化标记患儿 DNA 与参照 DNA 等量混合, 加入 50 μ g Cot-IDNA, 再用 95% 乙醇沉淀, 然后使用杂交液 (50% 甲酰胺、10% 硫酸葡聚糖、4% SDS、2*SSC、10 μ g/ μ L 酵母 tRNA) 溶解 DNA 沉淀, 最后将已溶解的 DNA 置于 70 $^{\circ}$ C 变性 10 min 等待杂交。上样到 Oligo244K 芯片上 65 $^{\circ}$ C 杂交炉孵育 40 h, 杂交后使用洗涤缓冲液清洗芯片。使用 Genepix 4200A 扫描仪扫描微阵列芯片并获取杂交信号, 采用 Agilent Feature Extraction 9.1 进行数据提取至 DNA Analytics 3.4 软件进行统计分析, 并依据统计结果设定 DNA 拷贝数变化的判断标准。以上操作步骤可按相应试剂盒说明书进行 (Agilent 公司)。

1.4 MLPA 检测

应用 MLPA P064、P096 亚端粒区检测试剂盒 (MRC-Holland) 验证 array-CGH 检出的 2 例综合征病例, 探针杂交、连接反应及探针扩增均参照试剂盒说明进行, 扩增产物经 Beckman 遗传分析仪 (CEQ8000) 进行毛细管电泳分离, GeneMarker v1.6 软件分析收集到的数据, 得出 MLPA 图谱。

2 结果

2.1 临床表现

16 例患儿中, 6 例 (38%) 患儿有不同的异常的面部特征 (高前额、宽眼距、低鼻梁、厚嘴唇、小下颌等); 6 例 (38%) 伴有其他畸形, 包括先天性心脏病、多指或趾畸形、阴道闭锁、隐睾等。所有患儿均完成了常规染色体 G 显带检查, 均未见明显异常。16 例患儿临床表现见表 1。

2.2 array-CGH 检测结果

6 例 (38%) 患儿存在 CNVs。经比对 DECIPHER 数据库和既往 MR/DD 或 ID/DD 相关 array-CGH 研究报告, 2 例明确病因, 其中 1

例 CNVs 涉及 4p16.3 区域微缺失, 考虑为 Wolf-Hirschhorn 综合征, 另 1 例 CNVs 涉及 7q11.23 区域微缺失, 考虑为 Williams-Beuren 综合征。3 例 CNVs 为正常多态性改变。1 例 CNVs 临床意义不明确, 包含 2 个重复突变, 患儿父母经 array-CGH 检测均未发现相同 CNVs 改变, 考虑为新生突变。经文献查询及表型-基因型分析, 该突变包含 ARHGAP、GTDC1、KYNLU、LRP1B、WDR72 等基因, 与智力低下、脑发育迟缓、特殊面容(高眉弓、低耳位、上睑下垂等)、隐睾、牙列不齐等有关,

证实该 CNVs 具有临床意义。该区域所包含的基因及相关临床表现见表 2 (<https://decipher.sanger.ac.uk/>)。因此, array-CGH 技术为 19% (3/16) 的患儿明确了病因诊断(表 1)。

2.3 MLPA 验证结果

正常人的 MLPA 分析图谱的扩增点范围在 (0.7~1.3) 之间, 小于 0.7 表明拷贝数缺失, 大于 1.3 表明拷贝数扩增, 对 array-CGH 检出的 2 例综合征阳性病例经过验证, 结果与之符合。

表 1 16 例 ID/DD 患儿临床资料及 array-CGH 结果

编号	性别	年龄	临床表现	array-CGH	临床意义
1	男	5 个月	智力落后, 特殊面容, 先心病, 腭裂	46,xy del(4)(p16.3), 71552-2021560, 1.95 Mb	Wolf-Hirschhorn 综合征
2	男	2 岁	智力运动发育落后, 特殊面容, 双侧隐睾	46,xy del(7)(q11.23), 72726578-74339044, 1.61 Mb	Williams-Beuren 综合征
3	男	2.5 岁	智力运动发育落后、牙列不齐	46,xy dup(2)(q22.2), 142531489-143887051, 1.36 Mb dup(15)(q21.3), 53226828-54280813, 1.05 Mb	意义不明
4	男	9 岁	运动发育落后	46,xy dup(15)(q11.1q11.2), 20481702-22784582, 2.3 Mb	正常多态
5	男	3 岁	智力低下, 畸形	46,xy dup(15)(q11.1q11.2), 20481702-22509254, 2.03 Mb	正常多态
6	男	14 岁	智力低下	46,xy dup(12)(q24.33), 132528220-132631660, 0.1 Mb dup(15)(q11.1q11.2), 20575646-22784582, 2.21 Mb	正常多态
7	男	1 岁	智力运动发育落后	阴性	
8	女	3 岁	智力运动发育落后	阴性	
9	女	2 个月	发育落后, 脑发育不良	阴性	
10	女	2 个月	发育迟缓, 阴道闭锁, 多指畸形, 脐导管水肿, 乳房发育偏小	阴性	
11	男	13 岁	特殊面容, 言语不清	阴性	
12	女	12 岁	智力低下, 特殊面容	阴性	
13	女	4 岁	智力低下	阴性	
14	男	16 岁	智力落后, 特殊面容, 外耳畸形, 长下颌关节过伸, 阴囊阴茎大	阴性	
15	男	3 个月	发育迟缓	阴性	
16	男	16 岁	智力运动发育落后, 特殊面容	阴性	

表 2 2 个新生突变区域所包含的基因及相关临床表现

突变位点	包含基因及位点	临床特点
dup2: 142531489-143887051	ARHGAP15(2: 143848931-144525921) GTDC1(2: 144695635-145090135) KYNLU(2: 143635067-143799890) LRP1B(2: 140988992-142889270)	智力低下、脑发育迟缓、高眉弓、低耳位、上睑下垂、隐睾症、肌张力低下、房间隔缺损等
dup15: 53226828-54280813	WDR72(15: 53805937-54055074)	胼胝体发育不良、牙釉质发育不良等

3 讨论

染色体 CNVs 在神经性发育障碍, 如 ID、DD、孤独症、精神分裂症以及其他疑难症等发病机制中起重要作用^[9]。有报道, 在因较小染色体不平衡畸变而引起的 ID、器官畸形和 DD 的群体中, 常规 G 显带核型分析技术的检出率约为 15%~40%^[10]。array-CGH 技术突破了传统细胞遗传学方法的许多限制, 通过对人类全基因组扫描, 可检测染色体非整倍数变异、CNVs 和染色体不平衡异位, 相比较传统的染色体核型分析, array-CGH 具有高通量、高分辨率等优点, 可检出染色体的亚显微缺失和重复突变^[11-13]。国外文献报道, 在针对 ID、多发性先天性畸形等患者的产后遗传诊断中, array-CGH 的检出率为 7%~11%^[14-15], 可检测出 92% 以上常规细胞遗传技术可检测到的基因失衡, 以及 8% 的常规技术和原位杂交技术未能检测到的基因失衡^[15]。本研究利用 array-CGH 技术对不明原因 ID/DD 患儿行全基因组扫描, 发现 6/16 例 (38%) 患儿存在 CNVs 异常, 为 19% (3/16) 的患儿明确了病因诊断。

Wolf-Hirschhorn 综合征又称 4 号染色体短臂末端亚端粒缺失综合征, 约 70% 的患者为新发缺失, 仅 10%~15% 的患者父母为染色体平衡异位携带者^[16-17]。Wolf-Hirschhorn 综合征相对较罕见, 发生率为 1/50 000, 50%~100% 的患儿伴有癫痫, 典型的面部特征为希腊头盔样面容, 宫内或出生后生长发育迟缓、肌张力低下、骨骼畸形、先天性心脏病、听力丧失、泌尿及胃肠道畸形等也较常见^[18-19]。例 1 为 5 个月男婴, 以智力落后、特殊面容、先天性心脏病、腭裂为主诉就诊, 经 array-CGH 分析, 发现染色体 4p16.3 有一约 1.95 Mb 缺失, 该区域的缺失是目前唯一明确的 Wolf-Hirschhorn 综合征致病基因, 因此该患儿 Wolf-Hirschhorn 综合征诊断明确。

Williams-Beuren 综合征是因 7 号染色体长臂近着丝粒端片段 7q11.23 微缺失引起, 以认知缺陷、轻度精神发育不良和主动脉狭窄为主要特点, 还可有特殊面容 (宽前额、低鼻梁、星状蓝色巩膜、长人中、大嘴、下唇突出、尖下巴、牙齿稀小, 又称“精灵脸”)、高钙血症、继发性高血压等表现, 发病率为 1/20 000~1/7 500^[20]。ELN (弹性蛋

白基因) 缺失可导致主动脉发育不良, 进而引起主动脉瓣上狭窄, 是 Williams-Beuren 综合征的特征性改变; GTF2I 基因与认知能力、分离焦虑有关; GTF2IRD1 与视动整合能力有关; 而 GTF2IRD1/GTF2I 基因簇参与面部异形化改变。Williams-Beuren 综合征早期生理表现轻微、不明显, 缺乏典型的临床表现, 初次诊断从 16 个月到 12 岁不等, 平均 5 岁, 由于他们多动、多话及过分友好的性格很容易被人忽略他们的智力问题^[21]。例 2 为 2 岁男性幼儿, 因智力运动发育落后、特殊面容、双侧隐睾就诊, 染色体核型分析无异常, 经 array-CGH 分析, 发现染色体 7q11.23 存在一大一小约 1.61 Mb 微缺失, 该区域存在多个致病基因, 如 CLIP2、ELN、LIMK1、FKBP6、GTF2IRD1/GTF2I 基因簇和 EIF4H 等基因, 均与 Williams-Beuren 综合征有关, 经完善血生化、心脏超声、眼底、视力等相关检查, 发现该患儿还存在主动脉狭窄、高钙血症, 因此患儿诊断 Williams-Beuren 综合征明确, 但体查并未发现患儿心脏各瓣膜区明显病理杂音, 且临床无紫绀等表现, 需定期复查心脏超声及血钙、血压等指标评估病情变化, 及时手术, 延长存活时间。

Mulatinho 等^[22]报道, 在染色体 2q22.1q22.3 区域存在 8 个基因, 包括: HNMT、SPOPL、NXPH2、LOC64702、LRP1B、KYNU、ARHGAP15 和 GTDC1, 并证实该部位的缺失与智力低下、先天性畸形和孤独症等疾病有关。本研究通过比对 DECIPHER 数据库发现染色体 2q22.2 重复区域主要包括 LRP1B、KYNU、ARHGAP15 和 GTDC1 共 4 个基因, Lynn 等^[23]报道, LRP 1B 是儿童肥胖遗传易感基因之一, Timms 等^[24]通过 array-CGH、连锁分析、外显子测序等方法对 3 个精神分裂症家系检测发现, LRP1B 基因系罹患精神分裂症风险相关的新基因。而染色体 15q21.3 重复区域的主要功能基因 WDR72 与胼胝体、牙釉质等发育不良有关。本研究中例 3 患儿就诊时 2.5 岁, 表现为智力运动发育落后、牙列不齐, array-CGH 检测发现染色体存在 2 个不同部位的重复突变, 其包含的多个基因均与其临床表现相符, 故为致病突变, 具有临床意义, 且为新生突变。该患儿年龄尚小, 将来有发生孤独症或精神分裂症等相关疾病的风险, 需要随访观察。

在不明原因 ID/DD 中, 利用 array-CGH 技术能检出致病性 CNVs 约 15%~20%, 该技术目前已作为一线诊断方法用于不明原因 ID/DD 和 (或) 先天性畸形的检测^[25-26]。本研究中致病 CNVs 检出率为 19%, 与 G 显带染色体核型分析相比, 优缺点各异, 这就要求临床医生根据受检者具体情况选择合适的检测手段, 以达到利益最大化目的^[27]。

[参 考 文 献]

- [1] Jeevanandam L. Perspectives of intellectual disability in Asia: epidemiology, policy, and services for children and adults[J]. *Curr Opin Psychiatry*, 2009, 22(5): 462-468.
- [2] Kwok HW, Chui EM. A survey on mental health care for adults with intellectual disabilities in Asia[J]. *J Intellect Disabil Res*, 2008, 52(11): 996-1002.
- [3] Croen LA, Grether JK, Selvin S. The epidemiology of mental retardation of unknown cause[J]. *Pediatrics*, 2001, 107(6): E86.
- [4] Rauch A, Hoyer J, Guth S, et al. Diagnostic yield of various genetic approaches in patients with unexplained developmental delay or mental retardation[J]. *Am J Med Genet A*, 2006, 140(19): 2063-2074.
- [5] Novelli A, Ceccarini C, Bernardini L, et al. High frequency of subtelomeric rearrangements in a cohort of 92 patients with severe mental retardation and dysmorphism[J]. *Clin Genet*, 2004, 66(1): 30-38.
- [6] Shaffer LG, Bejjani BA. Medical applications of array CGH and the transformation of clinical cytogenetics[J]. *Cytogenet Genome Res*, 2006, 115(3-4): 303-309.
- [7] Oostlander AE, Meijer GA, Ylstra B. Microarray-based comparative genomic hybridization and its applications in human genetics[J]. *Clin Genet*, 2004, 66(6): 488-495.
- [8] American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders[M]. Washington, DC: Alllmerican Psychiatric Association, 2000.
- [9] Lee C, Iafrate AJ, Brothman AR. Copy number variations and clinical cytogenetic diagnosis of constitutional disorders[J]. *Nat Genet*, 2007, 39(7 Suppl): S48-54.
- [10] Hulten MA, Dhanjal S, Pertl B. Rapid and simple prenatal diagnosis of common chromosome disorders: advantages and disadvantages of the molecular methods FISH and QF-PCR[J]. *Reproduction*, 2003, 126(3): 279-297.
- [11] Shaffer LG, Bejjani BA, Torchia B, et al. The identification of microdeletion syndromes and other chromosome abnormalities: cytogenetic methods of the past, new technologies for the future[J]. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, 2007, 145C(4): 335-345.
- [12] Dale RC, Grattan-Smith P, Nicholson M, et al. Microdeletions detected using chromosome microarray in children with suspected genetic movement disorders: a single-centre study[J]. *Dev Med Child Neurol*, 2012, 54(7): 618-623.
- [13] Kurian MA. The clinical utility of chromosomal microarray in childhood neurological disorders[J]. *Dev Med Child Neurol*, 2012, 54(7): 582-583.
- [14] Pickering DL, Eudy JD, Olney AH, et al. Array-based comparative genomic hybridization analysis of 1176 consecutive clinical genetics investigations[J]. *Genet Med*, 2008, 10(4): 262-266.
- [15] Park SJ, Jung EH, Ryu RS, et al. Clinical implementation of whole-genome array CGH as a first-tier test in 5080 pre and postnatal cases[J]. *Mol Cytogenet*, 2011, 9(4): 12.
- [16] Hart L, Rauch A, Carr AM, et al. LETM1 haploinsufficiency causes mitochondrial defects in cells from humans with Wolf-Hirschhorn syndrome: implications for dissecting the underlying pathomechanisms in this condition[J]. *Dis Model Mech*, 2014, 7(5): 535-545.
- [17] Cyr AB, Nimmakayalu M, Lonmuir SQ, et al. A novel 4p16.3 microduplication distal to WHSC1 and WHSC2 characterized by oligonucleotide array with new phenotypic features[J]. *Am J Med Genet A*, 2011, 155A(9): 2224-2228.
- [18] Hannelie E, Jasper JS, Ruben S, et al. Wolf-Hirschhorn syndrome facial dysmorphic features in a patient with a terminal 4p16.3 deletion telomeric to the WHSCR and WHSCR 2 regions[J]. *Eur J Hum Genet*, 2009, 17(1): 129-132.
- [19] Hammond P, Hannes F, Suttie M, et al. Fine-grained facial phenotype-genotype analysis in Wolf-Hirschhorn syndrome[J]. *Eur J Hum Genet*, 2012, 20(1): 33-40.
- [20] Martens MA, Wilson SJ, Reutens DC. Research review: Williams syndrome: a critical review of the cognitive, behavioral, and neuroanatomical phenotype[J]. *J Child Psychol Psych*, 2008, 49(6): 576-608.
- [21] Lisa E, Aaron P, Sherly P, et al. An atypical deletion of the Williams-Beuren syndrome interval implicates genes associated with defective visuospatial processing and autism[J]. *J Med Genet*, 2007, 44(2): 136-143.
- [22] Mulatinho MV, de Carvalho Seroo CL, Scalco F, et al. Severe intellectual disability, omphalocele, hypospadias and high blood pressure associated to a deletion at 2q22.1q22.3: case report[J]. *Mol Cytogenet*, 2012, 5(1): 30.
- [23] Lynn M, Shah N, Conroy J, et al. A study of alveolar rhabdomyosarcoma copy number alterations by single nucleotide polymorphism analysis[J]. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2014, 22(3): 213-221.
- [24] Timms AE, Dorschner MO, Wechsler J, et al. Support for the N-methyl-D-aspartate receptor hypofunction hypothesis of schizophrenia from exome sequencing in multiplex families[J]. *JAMA Psychiatry*, 2013, 70(6): 582-590.
- [25] Ahn JW, Mann K, Walsh S, et al. Validation and implementation of array comparative genomic hybridisation as a first line test in place of postnatal karyotyping for genome imbalance[J]. *Mol Cytogenet*, 2010, 15(3): 9.
- [26] Miller DT, Adam MP, Aradhya S, et al. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies[J]. *Am J Hum Genet*, 2010, 86(5): 749-764.
- [27] Shoukier M, Klein N, Auber B, et al. Array CGH in patients with developmental delay or intellectual disability: are there phenotypic clues to pathogenic copy number variants?[J]. *Clin Genet*, 2013, 83(1): 53-65.

(本文编辑: 邓芳明)