

流式细胞技术与 PCR 技术联用筛选 儿童急性淋巴细胞白血病微量残留病标记

帖利军, 顾龙君, 蒋黎敏, 赵金彩, 陈静, 潘慈, 董璐, 陈静, 薛惠良, 汤静燕, 王耀平

(上海交通大学医学院附属上海儿童医学中心血液肿瘤科, 上海 200127)

[摘要] 目的 微量残留病(MRD)监测是儿童急性淋巴细胞白血病(ALL)早期治疗反应中最重要的预后因素之一。目前常用的MRD检测的方法主要有流式细胞术和PCR技术,但单用一种方法均不能为所有的患儿找到合适的监测标记,该研究探讨两种方法联合应用是否能为大多数ALL患儿找到合适的MRD监测标记。方法 联合应用流式细胞术和PCR技术筛选上海儿童医学中心2001年9月至2003年10月126例新发ALL患儿骨髓标本的异常免疫表型及抗原受体基因重排。结果 ①106例B系-ALL患儿骨髓标本用四色流式细胞术进行了MRD免疫表型标记的筛选,其中11例标本未筛选出监测标记,阳性率为89.6%;有1个监测标记的标本为11例(11.6%),至少有两个标记的标本占88.4%。②PCR技术筛选27例ALL骨髓标本抗原受体基因重排,26例至少有一个标记(占96.3%),其中9例(34.6%)骨髓标本只有一个监测标记,17例(65.4%)至少有两个监测标记。在T系-ALL骨髓标本中,以TCRV γ I-J γ 1.3/2.3阳性最多,双等位基因重排发生阳性率较高;系性交叉抗原表达在B系-ALL骨髓标本中表达较高,达57.1%(4/7)。③两种方法联用能为121例(96.0%)的患儿提供合适的筛选指标。结论 流式细胞技术检测异常免疫表型与PCR技术检测抗原受体基因重排联用,可为绝大多数的ALL患儿找到合适的MRD监测指标;在抗原受体基因重排中,存在系性交叉抗原表达及双等位基因重排。

[中国当代儿科杂志,2009,11(4):246-250]

[关键词] 白血病,淋巴细胞,急性;微量残留病;免疫表型;抗原受体基因重排;儿童

[中图分类号] R733.71 [文献标识码] A [文章编号] 1008-8830(2009)04-0246-05

Tandem application of flow cytometry and polymerase chain reaction for choice targets of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia

TIE Li-Jun, GU Long-Jun, JIANG Li-Min, ZHAO Jin-Cai, CHEN Jing, PAN Ci, DONG Lu, CHEN Jing, XUE Hui-Li-ang, TANG Jing-Yan, WANG Yao-Ping. Department of Hematology/Oncology, Shanghai Children's Medical Center, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200127, China (Gu L-J, Email: ljgusemc@hotmail.com)

Abstract: Objective Minimal residual disease (MRD) is one of the most important prognostic factors in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL). Flow cytometry and PCR are two common techniques for examining MRD in ALL. This study aimed to identify MRD targets by tandem application of both techniques in children with ALL. **Methods** From September 2001 to October 2003, 126 children with newly diagnosed ALL were enrolled on the treatment protocol ALL-XH-99. Tandem application of flow cytometry and PCR was performed to identify MRD targets in these patients. **Results** ① Using sets of combined antibodies, immunophenotypic expression of leukemia cells was observed in 95 of 106 B-lineage ALL cases (89.6%). Only one aberrant immunophenotype was observed in 11 cases (11.6%) and most patients with B-lineage ALL (88.4%) expressed at least two suitable targets. ② Using PCR technique, T-cell receptor (TCR) or immunoglobulin gene rearrangements were identified in 26 of 27 patients (96.3%). Two or more monoclonal/ bi-allelic gene rearrangements were identified in 17 cases (65.4%). The majority (70%) of T-lineage ALL cases contained TCRV γ I-J γ 1.3/2.3. Cross-lineage TCR rearrangements were found in 57.1% of cases with B-lineage ALL. ③ Suitable MRD targets of immunophenotypic abnormalities or antigen receptor gene rearrangements were detected in 121 patients (96.0%). **Conclusions** MRD targets were identified using tandem application of flow cytometry and PCR in almost of children with ALL. Cross-lineage TCR rearrangements and bi-allelic gene rearrangements were observed in many patients.

[Chin J Contemp Pediatr, 2009, 11 (4):246-250]

Key words: Leukemia, lymphoblastic, acute; Minimal residual disease; Immunophenotype; Antigen receptor gene rearrangement; Child

[收稿日期]2008-06-06;[修回日期]2008-09-21
[基金项目]上海市重点学科建设基金资助项目(T0204)。
[作者简介]帖利军,女,博士,副主任医师。主攻方向:儿童血液/肿瘤。现在西安交通大学医学院第一附属医院儿科,邮编:710061。
[通讯作者]顾龙君,男,教授,上海交通大学医学院附属上海儿童医学中心血液肿瘤科,邮编:200127。

按危险度进行分层的现代联合化疗方案已使儿童急性淋巴细胞白血病(ALL)的4年无事件生存率(EFS)高达92%^[1],但仍有约10%~20%的ALL患儿复发。其主要原因是缓解时体内仍残留有一定数量的白血病细胞,又称微量残留病(MRD)。目前常用的ALL-MRD检测的方法主要有流式细胞术检测白血病细胞异常的免疫表型及PCR技术检测抗原受体基因重排、融合基因^[2]。但是,单用一种方法检测,均不能为所有的ALL患儿找到合适的监测标记。为了探讨流式细胞术检测白血病细胞异常的免疫表型及PCR技术检测抗原受体基因重排两种方法联合应用是否能为所有ALL患儿找到合适的监测指标,我们对2001年9月至2003年10月上海交通大学医学院附属上海儿童医学中心新诊治的ALL患儿骨髓标本进行了两种方法联合应用筛选MRD标记的研究。

1 材料与方法

1.1 研究对象

自2001年9月1日至2003年10月31日上海交通大学医学院附属上海儿童医学中心进入ALL-XH-99治疗方案的所有行流式细胞术MRD标记筛选的B系-ALL患儿骨髓标本106例,以及同期收治的T-ALL患儿骨髓标本20例。

1.2 仪器设备

流式细胞仪(FACSCalibur Becton Dickinson公司),T-Gradient PCR仪(Biometra Germany),图像分析仪(VO25526 Vilber Lourmat France)。

1.3 主要试剂

淋巴细胞分离液(上海试剂二厂);CD₃₈-FITC, CD₂₁-FITC, CD₆₅-FITC, CD₃₆-FITC, KOR-SA3544-FITC, CD₃₃-FITC(法国Immunotech公司);CD₁₀-PE, anti-TdT-FITC(丹麦Dako公司);CD₃₄-PerCP, CD₁₉-APC, CD₁₅-FITC, CD₄₅-FITC(美国BD公司);抗人IgM-PE(美国Southern Biotechnology Associates公司),QIAamp DNA Mini Kit(美国QIAGEN公司),Taq DNA Polymerase in Storage Buffer B(M1661)(Promega),PCR Nucleotide Mix(C1141)(Promega),引物由上海申能博彩生物有限公司合成。

1.4 方法

骨髓单个核细胞的分离,在15 mL离心管中加入4 mL淋巴细胞分离液;取肝素钠抗凝骨髓4 mL加入2倍体积1×PBS充分混匀,用滴管沿管壁缓慢加于分层液面上,水平离心1 200 r/min,30 min;

离心后取上、中层界面处以单个核细胞为主的白色云雾层狭窄带,包括淋巴细胞和单核细胞。PBS洗2遍,悬浮待用。

1.5 流式细胞术筛选白血病细胞异常免疫表型

抗体组合的筛选:用于检测的抗体组合及具体操作方法见参考文献[3]。

1.6 PCR技术筛选ALL患儿白血病细胞抗原受体基因重排

DNA抽提:取ALL患儿骨髓单个核细胞,按照QIAamp DNA Mini Kit(美国QIAGEN公司)说明书的步骤抽提DNA;紫外分光光度仪测定所取标本DNA的浓度[DNA浓度(μg/mL)=A₂₆₀×50 μg/mL×1/光径×稀释倍数]及纯度(A₂₆₀/A₂₈₀比值为1.7~1.9);PCR技术筛选白血病细胞株抗原受体基因重排,ALL患儿骨髓标本所用引物及扩增产物大小及PCR具体操作方法见参考文献[4],阳性对照为Jurkat细胞株,阴性对照为H₂O。1%琼脂糖及6%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,EB染色,紫外凝胶成像分析系统拍照。

2 结果

2.1 多参数流式细胞术筛选B系-ALL患儿异常免疫表型

在106例用多参数流式细胞术筛选B系-ALL患儿骨髓的MRD标记中,11例骨髓标本未筛选出合适标记,阳性率为89.6%;同期共收治T-ALL患儿25例(当时尚未开展流式细胞术监测T-ALL-MRD),因此共36例患儿骨髓标本不能进行MRD监测,占27.5%。在筛选出标记的B系-ALL标本中,有一个监测指标的患儿标本为11例(11.6%),至少有两个监测指标的患儿骨髓标本占88.4%。其筛选阳性结果流式细胞图见图1。B系-ALL患儿骨髓异常免疫表型有效频率见表1。

2.2 PCR技术筛选白血病细胞患儿抗原受体基因重排

11例应用流式细胞术未筛选出MRD标记的B系-ALL患儿及同期收治的25例T-ALL患儿骨髓标本。由于库存细胞不足的关系,得到7例B系-ALL及20例T-ALL患儿初发骨髓标本,具体筛选结果见表2。应用PCR技术筛选白血病患者抗原受体基因重排,首先是对不同系别的ALL患儿经多种不同引物扩增后,经1%琼脂糖电泳筛选出阳性重排,见图2;阳性抗原受体基因重排经异源二聚体(HD)分析,判断PCR产物为单克隆重排、双等位基因重

排或寡克隆重排,见图3。寡克隆重排一般不作为监测标记。在所有27例用PCR技术筛选抗原受体基因重排的ALL患儿骨髓标本中,9例(34.6%)患儿只有一个监测标记,至少有两个监测标记的患儿为17例(占65.4%)。各抗原受体基因重排的有效频率见表3及表4。在TCR γ 中,双等位基因重排发生阳性率较高。

2.3 流式细胞术及 PCR 技术联合应用筛选 MRD 标记

126例包括106例B系-ALL及20例T-ALL患儿骨髓标本,除1例T-ALL患儿未筛选到合适标记外,121例可找到MRD监测指标,占96.0%。

表1 各种抗体组合在 B 系-ALL 中的有效频率 (%)

抗体组合	有效例数	有效频率	国外报道频率 ^[5]
CD ₃₈ /CD ₁₀ /CD ₃₄ /CD ₁₉	48	45.3	30~50
CD ₄₅ /CD ₁₀ /CD ₃₄ /CD ₁₉	44	41.5	30~50
TdT/CD ₁₀ /CD ₃₄ /CD ₁₉	63	59.4	30~50
CD ₆₆ c/CD ₁₀ /CD ₃₄ /CD ₁₉	33	31.1	10~20
CD ₂₂ /CD ₁₀ /CD ₃₄ /CD ₁₉	11	10.4	20~30
CD ₃₃ /CD ₁₀ /CD ₃₄ /CD ₁₉	0	0	5.0~10
CD ₁₃ /CD ₁₀ /CD ₃₄ /CD ₁₉	1	0.9	10~20
CD ₂₁ /CD ₁₀ /CD ₃₄ /CD ₁₉	2	1.9	5.0~10
TdT/c μ /CD ₃₄ /CD ₁₉	11	10.4	10~20
CD ₆₅ /CD ₁₀ /CD ₃₄ /CD ₁₉	0	0	5.0~10
CD ₅₈ /CD ₁₀ /CD ₃₄ /CD ₁₉	53	50	49

表2 PCR 技术筛选 ALL 患儿抗原受体基因重排

	阳性例数	阴性例数	阳性率(%)
T-ALL	19	1	95
B-ALL	7	0	100
合计	26	1	96.3

表3 各种抗原受体基因重排在 T-ALL 中的有效频率 (%)

抗原受体基因重排	有效例数	有效频率	国外报道频率
V δ 2-D δ 3	0	0	5
D δ 2-D δ 3	1	5	3
V δ 2-J δ 1	2	10	10
D δ 2-J δ 1	0	0	11
V δ 1-J δ 1	6	30	33
V δ 3-J δ 1	1	5	7
V γ I -J γ 1.3/2.3	14	70	60
V γ II -J γ 1.3/2.3	5	25	10
V γ III -J γ 1.3/2.3	8	40	7
V γ IV -J γ 1.3/2.3	1	5	4
V γ I -J γ 1.1	1	5	13

注:国外报道频率为来自 Dr. Tomasz Szczepanski 在 St. Jude Grand Rounds 的报告(题目:Ig and TCR gene rearrangements in childhood ALL immunobiological features and applicability of the detection of minimal residual disease)

表4 各种抗原受体基因重排在 B 系-ALL 中的有效频率 (%)

抗原受体基因重排	有效例数	有效频率	国外报道频率 ^a
V δ 2-D δ 3	0	0	67
D δ 2-D δ 3	0	0	13
V κ I - κ de	2	50	26 ^a
V κ II - κ de	0	0	22 ^a
V κ III - κ de	2	50	20 ^a
V κ IV - κ de	0	0	7 ^a
Intron- κ de	0	0	25 ^a
V γ I -J γ 1.3/2.3	4	57.1	55
V γ II -J γ 1.3/2.3	2	28.6	16
V γ III -J γ 1.3/2.3	0	0	<1
V γ IV -J γ 1.3/2.3	0	0	5
V γ I -J γ 1.1	0	0	18

注:a 示在 IKG-KDE 中的频率。

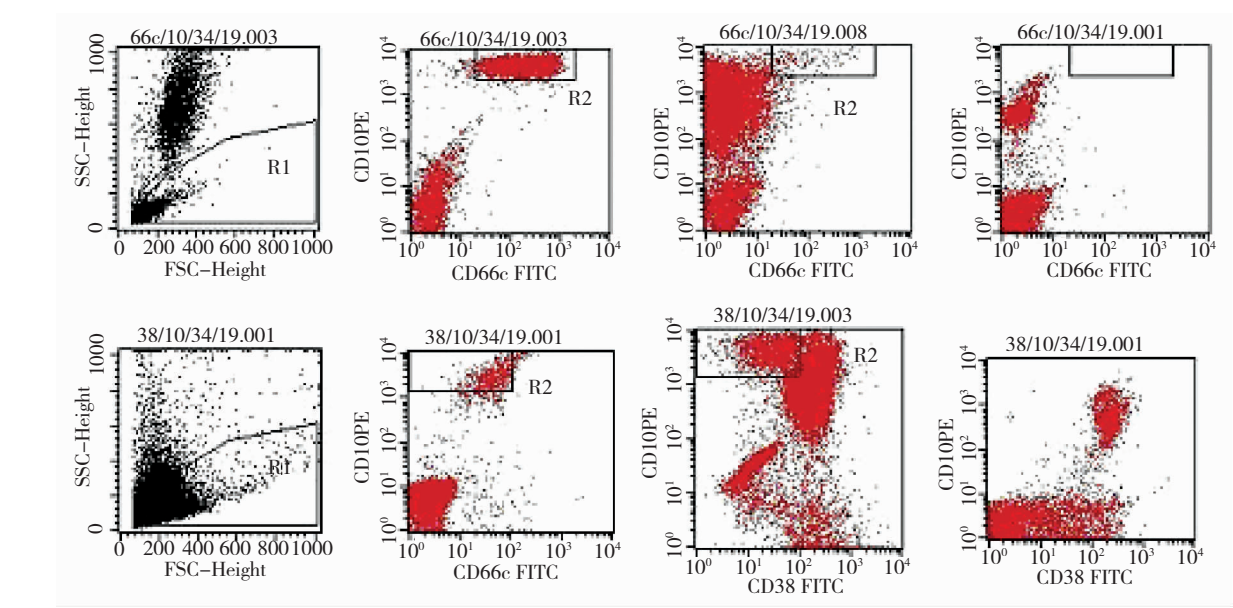


图1 多参数流式细胞术筛选 MRD 标记图

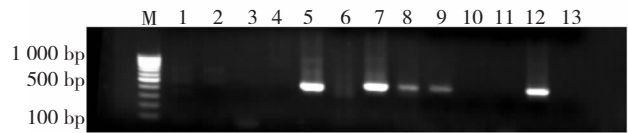


图2 1例 T-ALL 患儿 PCR 筛选 MRD 标记 1%琼脂糖电泳结果 M-marker;1-V δ 2-D δ 3;2-D δ 2-D δ 3;3-V δ 2-J δ 1;4-D δ 2-J δ 1;5-V δ 1-J δ 1;6-V δ 3-J δ 1;7-V γ I-J γ 1. 3/2. 3;8-V γ II-J γ 1. 3/2. 3;9-V γ III-J γ 1. 3/2. 3;10-V γ IV-J γ 1. 3/2. 3;11-V γ I-J γ 1. 1;12-Jurkat cell line;13-H₂O

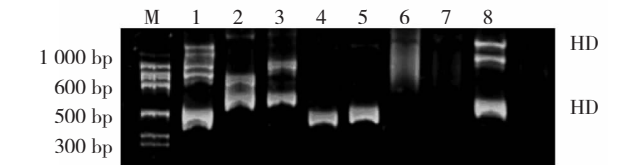


图3 部分患儿 HD 分析结果(6%非变性 PAGE 电泳) M-marker;1-寡克隆重排; 4,5-单克隆重排;2,3,8-双等位基因重排

3 讨论

免疫学方法主要是依据白血病相关的免疫表型如畸变、异常或异位抗原表达即白血病细胞与正常细胞抗原表达量的差异及白血病细胞的异常抗原表型来监测 MRD^[2]。由于正常 B 系祖细胞具有与白血病细胞相似的表型,因此该技术的关键是能够正确区分残留的白血病细胞和正常的造血祖细胞。白血病细胞和正常细胞在抗原表达上的差异主要表现在两方面:①量的差异,白血病细胞表面的 CD₁₉/CD₁₀/CD₃₄的表达量常比正常的 B 系造血干/祖细胞高 10 倍,另外 CD₃₈和 CD₄₅的表达却常明显弱于正常细胞,利用这些抗原表达量的差异这一特性可明确区分白血病细胞和正常细胞;②质的差异,在正常细胞不同时表达的抗原及在正常早期 B 淋巴细胞中极少表达的其他系列抗原,在 B 系-ALL 细胞上表达,即可用来与正常细胞进行区分细胞^[3]。我们利用上述多种抗体组合,可为 89.6%的 B 系-ALL 患儿找到合适的监测指标。但是,有 11 例(占 11.6%)患儿只有一个异常免疫表型指标可以作为 MRD 监测指标。由于在白血病治疗过程中,会发生免疫表型的转换,因此,这部分患儿在以后的监测中可能会出现假阴性结果。为了避免假阴性监测结果,对这部分病人有必要联合采取其他的监测手段。

PCR 技术主要通过检测肿瘤特异序列包括白血病细胞特殊的抗原受体基因重排及染色体易位、融合基因来监测 MRD^[4]。在造血干细胞向淋巴细胞分化过程中,免疫球蛋白(Ig)和 T 细胞受体(TCR)基因的可变区(V)和结合区(J)基因会发生

重排(两个距离较远的片断重新排列并形成新的片断)。这样,每个淋巴细胞就有一个特异的 V-(D)-J 组合编码 Ig 或 TCR 分子的可变区。在 V(D)J 基因接合部 DNA 片断的随机丢失及末端脱氧核糖核酸转移酶介导的 N 区插入会导致 Ig 或 TCR 分子基因接合部序列改变,因此,接合部序列是多种多样的,可作为肿瘤特异性的标志^[6,7]。

通常 TCR 基因重组不仅见于 T-ALL,亦见于 B 系-ALL。IgH,TCR δ ,TCR γ ,TCR β 在 B 系-ALL 的表达率分别为 95%,84%,55%和 33%,而在 T-ALL 的表达率则分别为 14%,68%,91%和 89%,两系相合和系不相关重排可见于几乎所有 ALL^[4]。由于存在克隆演化,因此 PCR 检测 MRD 时均应选择至少两种靶分子^[4,8,9]。在我们所选的抗原受体基因重排中,以 TCRV γ I-J γ 1. 3/2. 3 表达最高,在 T-ALL 患儿的有效频率与国外结果基本相似,由于 B 系-ALL 患儿所筛选的病例数较少,很难比较,但系性交叉抗原表达在 B 系-ALL 患儿较高,达 57.1%(4/7),与国外报道相似。有 9 例(34.6%)患儿只有一个筛选标记,对这部分病人如何避免以后监测过程中由于克隆演化出现假阴性结果,可以增加抗原受体重排基因的种类,如免疫球蛋白重链(IgH)重排^[10]以及国外新近完成的 TCR β 基因重排筛选监测标记^[11]或联用流式细胞技术或 RT-PCR 检测融合基因进行筛选标记。

两种方法联用,我们可以为 96.0%的 ALL 患儿找到监测标记,1 例未筛选出标记的 T-ALL 患儿,亦无我们常规送检的融合基因 BCR/ABL 及 MLL-AF4。最近,我们开展了 MP-FCM 监测 T-ALL-MRD 的工作,此患儿有合适的监测指标。

[参 考 文 献]

[1] Pui CH, Evans WE. Treatment of acute lymphoblastic leukemia [J]. N Engl Med, 2006, 354(2): 166-178.
[2] Campana D. Status of minimal residual disease testing in childhood haematological malignancies[J]. Br J Haematol, 2008, 143(4):481-489.
[3] 徐翀,赵惠君,吴政红,薛惠良,汤静燕,陈静,等. 流式细胞术检测儿童 B 细胞急性淋巴细胞白血病微小残留病[J]. 中华血液病学杂志, 2003, 24(6):295-299.
[4] Pongers-Willems MJ, Seriu T, Stolz F, d'Aniello E, Gameiro P, Pisa P, et al. Primers and protocols for standardized detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using immunoglobulin and T cell receptor gene rearrangements and TAL1 deletions as PCR targets: report of the BIOMED-1 CONCERTED ACTION: investigation of minimal residual disease in acute leukemia[J]. Leukemia, 1999, 13(8):110-118.
[5] Campana D, Coustan-Smith E. Minimal residual disease studies by flow cytometry in acute leukemia[J]. Acta Haematol, 2004,

112(1-2):8-15.

[6] Cazzaniga G, Biondi A. Molecular monitoring of childhood acute lymphoblastic leukemia using antigen receptor gene rearrangements and quantitative polymerase chain reaction technology [J]. Haematologica, 2005, 90(3):382-390.

[7] Van der Velden VH, Hochhaus A, Cazzaniga G, Szczepanski T, Gabert J, van Dongen JJ. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects[J]. Leukemia, 2003, 17(6):1013-1034.

[8] Szczepanski T, Willemse MJ, Brinkhof B, van Wering ER, van der Burg M, van Dongen JJ. Comparative analysis of Ig and TCR gene rearrangements at diagnosis and at relapse of childhood precursor-B-ALL provides improved strategies for selection of stable PCR targets for monitoring of minimal residual disease[J]. Blood, 2002, 99(7):2315-2323.

[9] Szczepanski T, van der Velden VH, Raff T, Jacobs DC, van We-

ring ER, Bruggemann M. Comparative analysis of T-cell receptor gene rearrangements at diagnosis and T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) shows high stability of clonal markers for monitoring of minimal residual disease and reveals the occurrence of second T-ALL[J]. Leukemia, 2003, 17(11):2149-2156.

[10] Neale GA, Coustan-Smith E, Stow P, Pan Q, Chen X, Pui CH, Campana D. Comparative analysis of flow cytometry and polymerase chain reaction for the detection of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia[J]. Leukemia, 2004, 18(5):934-938.

[11] Bruggemann M, van der Velden VH, Raff T, Droege J, Ritgen M, Pott C, et al. Rearranged T-cell receptor beta genes represent powerful targets for quantification of minimal residual disease in childhood and adult T-cell acute lymphoblastic leukemia[J]. Leukemia, 2004, 18(4):709-719.

(本文编辑:吉耕中)

· 病例报告 ·

口服尼美舒利致婴幼儿血尿 2 例

余桂红,李占玲

(宁城县妇幼保健所儿科,内蒙 宁城 024200)

[中图分类号] R969.4 [文献标识码] E [文章编号] 1008-8830(2009)04-0250-01

例 1:患儿,男,8 个月,因肉眼血尿 1 d 入院。患儿于入院前 1 d 因发热、鼻塞,当地诊所给予尼美舒利颗粒 50 mg 口服,未服用其他药物。服药后约 8 h 出现肉眼血尿。入院查体:T 36.8℃,HR 130 次/min,R 32 次/min,体重 10 kg。神清,精神状态可,呼吸平稳,咽充血,双肺、心脏、腹部及神经系统查体均未见异常。实验室检查:WBC 12.0×10⁹/L, RBC 5.0×10¹²/L,Hb 118 g/L,PLT 402×10⁹/L。尿常规:肉眼血尿,尿蛋白++,潜血+++,镜下红细胞满视野。血尿定位提示肾性血尿。肾功能正常。彩超:双肾、输尿管、膀胱未见异常。给予抗感染及支持对症治疗,2 d 后尿常规正常出院。1 周、3 周后复查尿常规均正常。

例 2:患儿,女,17 个月,因肉眼血尿 12 h 入院。患儿于入院前 12 h 因发热,当地诊所测体温 38.7℃,给予尼美舒利颗粒 60 mg 口服,未服用其他药物。服药后约 12 h 出现肉眼血尿。入院时查体:T 36.5℃,HR 126 次/min,R 30 次/min,体重 12 kg。神清,精神状态可,呼吸平稳,咽充血,双肺、心脏、腹部及神经系统查体均未见异常。无血尿家族史。实验室检查:血常规正常。尿常规:肉眼血尿,尿蛋白+,潜血+++,镜下红细胞满视野。血尿定位提示肾性血尿。肾功能、24 h 尿钙、血 IgA 正常。彩超:

双肾、输尿管、膀胱未见异常。给予抗感染及支持对症治疗,3 d 后尿常规正常出院。1 周、4 周后复查尿常规正常。

讨论:尼美舒利是新一代非甾体抗炎二类新药,为磺酰苯胺类非类固醇消炎药,高度选择性的环氧化酶(COX-2)抑制剂^[1]。能消除各种病因引起的发热。临床证实,尼美舒利对炎症引起的发热症状有效率可达 88.0%。尼美舒利的副作用主要有恶心、呕吐、腹泻、便秘、胃痛、消化不良、腹胀、厌食等,还未见致血尿的报道。

以上两例均因发热服用尼美舒利后出现肉眼血尿,同时排除了其他引起血尿的原因,故考虑为尼美舒利所致。尼美舒利婴儿不主张用,儿童常用剂量为每日 5 mg/kg,分 2~3 次服用,本文两例均使用过量。对婴幼儿应用尼美舒利应慎用,尽量应用对乙酰氨基酚及布洛芬等应用时间较长的安全退热药,应用时一定要掌握好剂量及禁忌症。

[参 考 文 献]

[1] 张爱知,马伴吟,邹惊雷.实用儿科药物手册[M].第 2 版.上海:上海科学技术出版社,2006,294.

(本文编辑:吉耕中)

[收稿日期]2008-10-13;[修回日期]2008-11-17
[作者简介]余桂红,女,大学,主治医师。主攻方向:儿童医疗保健。