

- 物应用的争议[J]. 中国实用内科杂志, 2007, 27(2): 110-113
- 2 Nabil AE, Stefan E, Tarja K, *et al.* The development of a 16S rRNA gene based PCR for the identification of *Streptococcus pneumoniae* and comparison with four other species specific PCR assays[J]. *Infectious Diseases*, 2010, 10: 104
- 3 Carvalho Mda G, Tondella ML, McCaustland K, *et al.* Evaluation and improvement of real-time PCR assays targeting *lytA*, *ply*, and *psaA* genes for detection of pneumococcal DNA[J]. *J Clin Microbiol*, 2007, 45(8): 2460-2466
- 4 Llull D, Lopez R, Garcia E. Characteristic signatures of the *lytA* gene provide a basis for rapid and reliable diagnosis of *streptococcus pneumoniae* infections[J]. *J Clin Microbiol*, 2006, 44(4): 1250-1256
- 5 Yang S, Lin S, Khalil A, *et al.* Quantitative PCR assay using sputum samples for rapid diagnosis of pneumococcal pneumonia in adult emergency department patients[J]. *J Clin Microbiol*, 2005, 43: 3221-3226
- 6 朱兵清, 李马超, 徐丽, 等. TaqMan 荧光定量 PCR 检测流感嗜血杆菌和肺炎链球菌方法的建立和应用[J]. *中华检验医学杂志*, 2009, 32(3): 263-267
- 7 Hee KP, Hee JL, Wonyong K. Real-time PCR assays for the detection and quantification of *streptococcus pneumoniae* [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2010, 1; 310(1): 48-53
- 8 Abdeldaim GM, Stralin K, Olcen P, *et al.* Toward a quantitative DNA-based definition of pneumococcal pneumonia: a comparison of *streptococcus pneumoniae* target genes, with special reference to the *Spn9802* fragment[J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2008, 60(2): 143-150
- 9 Yamamoto Y. PCR in diagnosis of infection: detection of bacteria in cerebrospinal fluids[J]. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2002, 9: 508-514
- (收稿: 2011-04-14)
(修回: 2011-05-04)

阿霉素肾病大鼠肾组织乙酰肝素酶表达改变及其对蛋白尿的影响

杨红丽 曹英杰 范亚平 陈晓岚

摘要 目的 观察阿霉素肾病大鼠肾组织乙酰肝素酶(HPA)、硫酸乙酰肝素蛋白多糖(HSPG)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、血小板源性生长因子(PDGF)的表达变化。**方法** 清洁级健康雄性SD大鼠随机分为对照组(NC组)和阿霉素肾病组(AN组),分别观察0、7、14、21、28天的24h尿蛋白定量、0、14、21、28天血清白蛋白、尿素、肌酐、甘油三酯和胆固醇水平以及肾小球HPA、HSPG、bFGF、PDGF表达的改变。**结果** AN组造模后14、21及28天24h尿蛋白定量较同时点NC组及同组前一时间点明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);同时AN组在造模后各观察时间点HPA与PDGF表达显著增多,且随观察时间延长增加,与NC组相比差异有统计学意义($P < 0.05$);AN组在造模后各观察时间点HSPG表达较NC组显著减少,且随观察时间延长降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);bFGF在NC组及AN组各观察时间点表达均未见明显变化($P > 0.05$);HPA表达与HSPG表达呈负相关($r = -0.757$, $P < 0.05$),与PDGF表达及蛋白尿呈正相关($r = 0.899$, $P < 0.05$; $r = 0.868$, $P < 0.05$)。**结论** HPA表达增加导致HSPG水解增多,同时释放出PDGF等因子,肾小球基膜的物理屏障和电荷屏障受损,促进蛋白尿的发生发展。

关键词 阿霉素肾病 蛋白尿 乙酰肝素酶 硫酸乙酰肝素蛋白多糖

Expression Changes of Heparanase and Its Effects on Proteinuria in Adriamycin-induced Nephropathy Rats. Yang Hongli, Cao Yingjie, Fan Yaping, Chen Xiaolan. Department of Nephrology, Affiliated Hospital of Nantong University, Jiangsu 226001, China

Abstract Objective To observe the expression change of heparanase (HPA), heparan sulfate proteoglycan (HSPG), basic fibroblast growth factor (bFGF) and platelet-derived growth factor (PDGF) in rats with adriamycin-induced nephropathy. **Methods** Forty rats were randomly divided into two groups: the normal control group (NC) and the adriamycin nephropathy group (AN), and the latter was induced by intravenous injection of adriamycin. The 24h urine samples were collected at 0, 7, 14, 21, 28 days, and serum and renal tissue samples were collected at 0, 14, 21, 28 days respectively to observe the changes of 24h proteinuria, serum albumin, urea, creatinine, triglyceride, cholesterol and expressions of HPA, HSPG, bFGF, PDGF. **Results** The 24h proteinuria quantities in AN at 14, 21 and 28 days were significant higher than those of NC ($P < 0.05$). Compared to NC, the expressions of HPA and PDGF in AN were increased significantly along with the time prolonged ($P < 0.05$), but the expressions of HSPG were decreased ($P < 0.05$). The expressions of bFGF in two groups were not changed ($P > 0.05$). The expressions of HPA were positively correlated with proteinuria and expres-

作者单位: 226001 南通大学附属医院肾内科 (注: 杨红丽和曹英杰为共同第一作者)

通讯作者: 范亚平, 电子信箱: fanyp19107@medmail.com.cn

sion of PDGF, but negatively correlated with HSPG. **Conclusion** The increased expression of HPA leads to dissociation of HSPG and releasing PDGF, which injured the physical and electrostatic barrier of glomerular basement membrane and promoting the proteinuria.

Key words Adriamycin nephropathy;Proteinuria;Heparanase;Heparan sulfate proteoglycan

乙酰肝素酶(heparanase, HPA)系一种内源性葡糖苷酸内切酶,是体内唯一能特异性地识别细胞外基质主要成分硫酸乙酰肝素蛋白多糖(heparan sulfate proteoglycan, HSPG)中的硫酸乙酰肝素(heparan sulfate, HS)侧链,将后者水解为低分子片段,调节细胞外基质的降解,参与基膜重塑,并释放多种与HS结合的生物活性因子,参与许多生理和病理过程^[1, 2]。近年一些动物实验和临床研究显示 HPA 表达和酶活性异常致肾小球基膜电荷屏障的重要分子基础——HSPG 破坏,肾小球基膜选择性通透性改变及肾小球足细胞和内皮细胞锚定位点丧失,同时释放多种细胞因子,在肾小球疾病蛋白尿的发生中具有重要病理作用^[3-5]。我们采用阿霉素肾病大鼠模型,观察肾小球 HPA 和 HSPG 以及碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)、血小板源性生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)表达的改变,探讨 HPA 在阿霉素肾病模型中的病理作用及其可能致病机制,为临床治疗蛋白尿提供理论基础和作用靶点。

材料与方法

1. 材料:清洁级健康雄性 SD 大鼠、体重 200 ~ 230g,由南通大学实验动物中心提供,注射用阿霉素(浙江海正药业股份有限公司生产,批号 091002),兔抗鼠 HPA 抗体购自美国 Groundwork Biotechnology Diagnosticate 公司,羊抗鼠 HSPG 抗体购自美国 lifespan 公司,兔抗鼠 bFGF 抗体购自英国 Abcam 公司,羊抗鼠 PDGF 抗体购自美国 R&D 公司,生物素化羊抗兔和兔抗羊二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司。
2. 动物分组与实验方法:SD 大鼠适应性喂养 1 周后随机分为对照组(NC 组,20 只)和阿霉素肾病模型组(AN 组,20 只)。AN 组大鼠尾静脉一次性注射阿霉素 5mg/kg,NC 组予等体积生理盐水。注射阿霉素前(0 天)及注射后第 7、14、21、28 天两组大鼠分别单独置代谢笼,收集 24h 尿液,双缩脲比浊

- 法测 24h 尿蛋白定量;第 0、14、21、28 天随机自 NC 组及 AN 组各取 5 只大鼠,3% 水合氯醛麻醉后经下腔静脉取血,离心(3000r/min,5min)分离血清标本,日立 7080 型全自动生化仪检测白蛋白、尿素、肌酐、甘油三酯及胆固醇。取大鼠肾组织用 4% 多聚甲醛固定后待行光镜和免疫组化病理检查。
3. 肾脏组织病理观察及半定量分析:3μm 石蜡组织切片按常规行 HE、PASM 染色。免疫组化按试剂盒说明书操作,3μm 石蜡切片常规脱蜡水化,3% 过氧化氢 20min,高压加热修复抗原,分别滴加兔抗鼠 HPA (1:100)、羊抗鼠 HSPG (1:50)、兔抗鼠 bFGF(1:100)和羊抗鼠 PDGF (1:50)抗体 4℃ 过夜,滴加即用型生物素化羊抗兔或兔抗羊二抗 50μl,湿盒 37℃ 孵育 30min,DAB 显色后中性树胶封片。每只大鼠肾组织切片随机选取 5 个肾小球高倍视野,呈棕黄色颗粒状物质沉积为阳性,应用全自动图像分析系统(江苏捷达科技发展有限公司)扫描分析,计算阳性物质吸光度值。
4. 统计学方法:计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各时间点 AN 组与 NC 组比较采用 *t* 检验,组间均数比较采用单因素方差分析(ANOVA),对有相关趋势的变量采用 Pearson 相关分析,采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据处理,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1. 两组大鼠不同时间点血生化指标的改变:NC 组各时间点血生化指标差异均无统计学意义(*P* > 0.05)。AN 组各观察时间点肌酐水平与 NC 组比较差异无统计学意义(*P* > 0.05);AN 组造模后 28 天尿素水平高于同时间点 NC 组及同组前一时间点,差异有统计学意义(*P* < 0.05);AN 组白蛋白在造模后各观察时间点均低于 NC 组,也低于同组前一时间点,差异有统计学意义(*P* < 0.05);AN 组胆固醇在造模后各观察时间点均高于 NC 组,也高于同组前一时间点,差异有统计学意义(*P* < 0.05);AN 组甘油三酯造模后 21、28 天高于同时间点 NC 组及同组前一时间点,差异有统计学意义(*P* < 0.05)(表 1)。

表 1 NC 组和 AN 组不同时间点血生化指标的变化

组别	天数	肌酐(μmol/L)	尿素 (mmol/L)	白蛋白 (g/L)	胆固醇 (mmol/L)	甘油三酯 (mmol/L)
NC 组	0 天	38.92 ± 2.53	4.78 ± 0.67	28.94 ± 1.25	0.91 ± 0.21	0.49 ± 0.09
	14 天	38.27 ± 2.31	4.74 ± 0.58	29.21 ± 0.93	0.96 ± 0.14	0.48 ± 0.11
	21 天	40.02 ± 1.73	4.83 ± 1.07	29.74 ± 4.05	1.17 ± 0.29	0.53 ± 0.06
	28 天	39.56 ± 2.64	4.89 ± 1.15	30.17 ± 4.37	1.26 ± 0.24	0.55 ± 0.08
AN 组	0 天	39.73 ± 4.66	4.86 ± 0.73	29.51 ± 2.52	0.94 ± 0.19	0.52 ± 0.12
	14 天	38.96 ± 4.66	5.13 ± 0.61	23.82 ± 2.52 ^{ab}	1.81 ± 0.21 ^{ab}	0.59 ± 0.07
	21 天	41.03 ± 3.51	5.02 ± 0.91	18.17 ± 3.56 ^{abc}	3.68 ± 0.82 ^{abc}	2.45 ± 0.46 ^{abc}
	28 天	41.18 ± 5.14	9.86 ± 1.52 ^{abcd}	12.94 ± 0.85 ^{abcd}	8.91 ± 1.34 ^{abcd}	6.12 ± 1.29 ^{abcd}

AN 组与同时间点 NC 组比较,^a*P* < 0.05;与 AN 组 0 天比较,^b*P* < 0.05;与 AN 组 14 天比较,^c*P* < 0.05;与 AN 组 21 天比较,^d*P* < 0.05

2. 两组大鼠 24h 尿蛋白定量的变化:NC 组各时间点 24h 尿蛋白定量差异无统计学意义($P>0.05$)。AN 组造模后 7 天 24h 尿蛋白定量有所增加,但与 NC 组比较差异无统计学意义($P>0.05$);第 14、21 及 28

天时,AN 组 24h 尿蛋白定量较同时间点 NC 组及同组前一时间点明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$)(表 2)。

表 2 NC 组和 AN 组不同时间点 24h 尿蛋白定量的变化 (mg/24h)

组别	0 天	7 天	14 天	21 天	28 天
NC 组	9.87 ± 1.25	10.15 ± 2.06	10.54 ± 1.79	10.66 ± 2.17	10.81 ± 1.56
AN 组	9.94 ± 1.71	11.13 ± 1.68	27.87 ± 2.77 ^{abc}	66.74 ± 3.98 ^{abcd}	110.36 ± 6.72 ^{abcde}

AN 组与同时间点 NC 组比较,^a $P<0.05$;与 AN 组 0 天比较,^b $P<0.05$;与 AN 组 7 天比较,^c $P<0.05$;与 AN 组 14 天比较,^d $P<0.05$;与 AN 组 21 天比较,^e $P<0.05$

3. 免疫组化及半定量分析:NC 组肾小球基膜、系膜细胞及肾小管上皮细胞有 HPA、PDGF 少量表达;AN 组在造模后各观察时间点 HPA 与 PDGF 表达显著增多,且随观察时间延长增加,差异有统计学意义($P<0.05$)。NC 组肾小球基膜、系膜细胞及肾小管

上皮细胞有 HSPG 表达;AN 组在造模后各观察时间点 HSPG 表达较 NC 组显著减少,且随观察时间延长降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。bFGF 在 NC 组及 AN 组各观察时间点表达均未见明显变化($P>0.05$)(表 3,图 1~图 4)。

表 3 NC 组和 AN 组 HPA、HSPG、PDGF 及 bFGF 免疫组化半定量结果(吸光度 A 值)

组别	天数	HPA	HSPG	PDGF	bFGF
NC 组	14 天	1.67 ± 0.14	7.08 ± 0.21	3.97 ± 0.13	1.92 ± 0.11
	21 天	1.79 ± 0.38	7.21 ± 0.17	4.26 ± 0.39	2.13 ± 0.18
	28 天	1.71 ± 0.30	7.73 ± 0.48	5.08 ± 0.45	2.39 ± 0.20
AN 组	14 天	3.27 ± 0.31 ^a	4.96 ± 0.22 ^a	7.69 ± 0.13 ^a	2.09 ± 0.19
	21 天	6.12 ± 0.89 ^{ab}	2.87 ± 0.18 ^{ab}	11.36 ± 0.97 ^{ab}	2.11 ± 0.31
	28 天	11.06 ± 1.72 ^{abc}	1.03 ± 0.15 ^{abc}	16.21 ± 1.25 ^{abc}	2.28 ± 0.26

AN 组与同时间点 NC 组比较,^a $P<0.05$;与 AN 组 14 天比较,^b $P<0.05$;与 AN 组 21 天比较,^c $P<0.05$

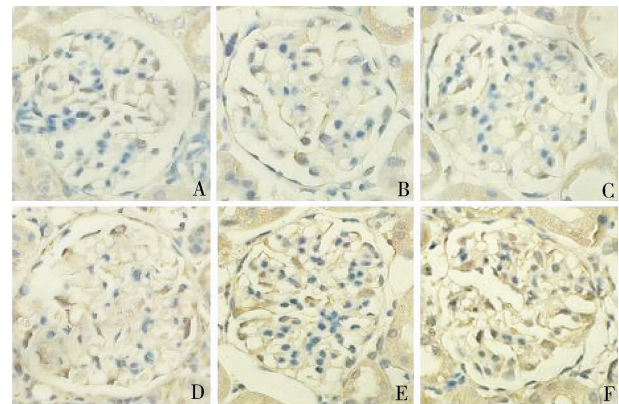


图 1 第 14、21、28 天 NC 组和 AN 组 HPA 表达
(免疫组化, ×400)

A~C. NC 组 14、21、28 天;D~F. AN 组 14、21、28 天;酶标,DAB 显示

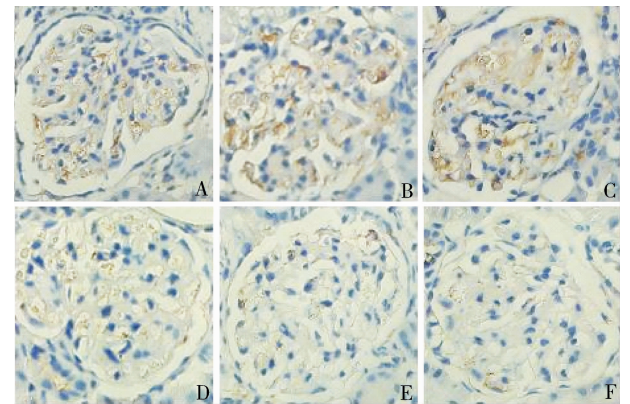


图 2 第 14、21、28 天 NC 组和 AN 组 HSPG 表达
(免疫组化, ×400)

A~C. NC 组 14、21、28 天;D~F. AN 组 14、21、28 天;酶标,DAB 显示

4. AN 组各指标的相关分析:HPA 表达与 HSPG 表达呈负相关($r = -0.757, P<0.05$),与 PDGF 表达及蛋白尿呈正相关($r = 0.899, P<0.05; r =$

$0.868, P<0.05$),与 bFGF 表达无相关性($r = 0.616, P>0.05$)(图 5~图 7)。

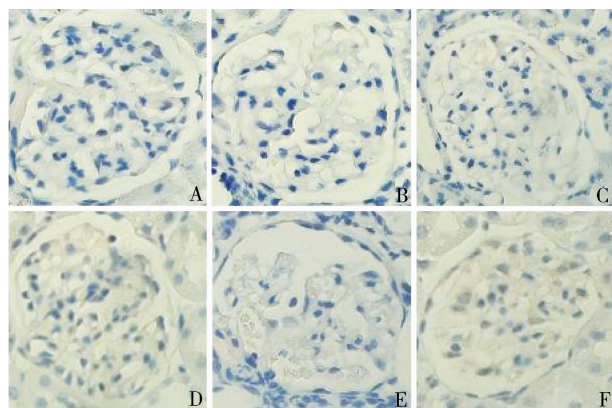


图 3 第 14、21、28 天 NC 组和 AN 组 bFGF 表达
(免疫组化, ×400)

A ~ C. NC 组 14、21、28 天; D ~ F. AN 组 14、21、28 天; 酶标, DAB 显示

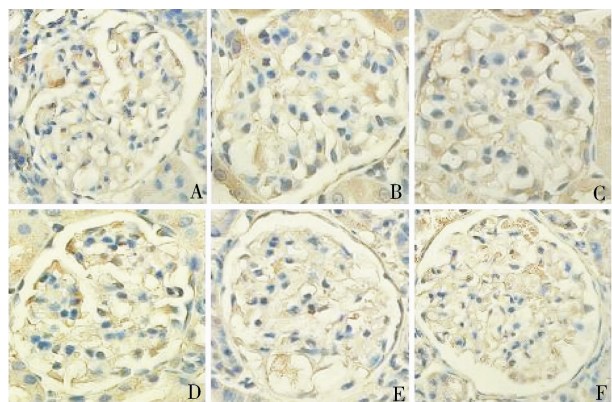


图 4 第 14、21、28 天 NC 组和 AN 组 PDGF 表达
(免疫组化, ×400)

A ~ C. NC 组 14、21、28 天; D ~ F. AN 组 14、21、28 天; 酶标, DAB 显示

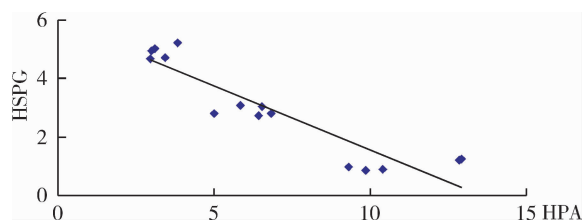


图 5 HPA 与 HSPG 呈负相关

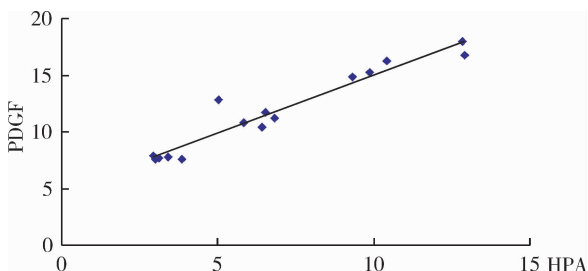


图 6 HPA 与 PDGF 呈正相关

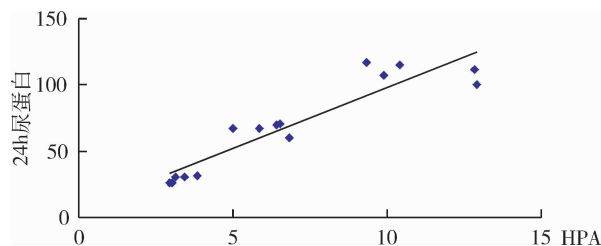


图 7 HPA 与 24h 尿蛋白呈正相关

讨 论

蛋白尿是临床上肾脏疾病最常见的表现,其中以肾小球性蛋白尿最常见,后者主要与肾小球滤过屏障的结构和功能异常有关,肾小球滤过屏障包括有孔的内皮细胞、肾小球基膜以及足细胞。肾小球基膜是由肾小球固有细胞产生的一种特殊的细胞外基质,主要成分是Ⅳ型胶原、层粘连蛋白和 HSPG,后者包括核心蛋白、HS 和葡糖胺聚糖侧链;HS 为肾小球基膜的重要组成成分,其侧链的硫酸根和羧基具有高度的亲水性,对维持肾小球基膜物理屏障及电荷屏障具有重要作用^[6, 7]。HPA 能特异性地将 HS 水解为低分子片段,其表达增加及活性增强导致 HSPG 降解,破坏肾小球基膜滤过屏障的完整性,导致蛋白尿^[1, 2]。Nadir 等还发现 HPA 也是一种凝血功能调节物,在组织因子和因子 VⅡa 存在的情况下可以增加因子 Xa 的生成,促使凝血系统的活化增强 3~4 倍,高凝状态可进一步加剧肾脏病变^[8]。

HS 被 HPA 水解后还能够释放出与其结合的多种生物活性物质包括 bFGF、PDGF 等。bFGF 是肝素结合生长因子超家族成员之一,具有多种生物学活性,对多种脏器具有普遍的致有丝分裂作用、促增殖作用和促分化作用,与靶细胞表面受体结合后可以刺激靶细胞 DNA 合成增加,导致肾小球系膜细胞、壁层上皮细胞及间质纤维细胞分裂增殖和胶原纤维合成,促进新月体形成^[9];研究发现 HPA 表达增加可导致 bFGF 释放增多,并调节 FGF 的生物活性^[1, 10]。PDGF 亦为一种促有丝分裂因子和趋化因子,对巨噬细胞、成纤维细胞等有趋化作用,可促进肾小球系膜细胞、间质成纤维细胞增殖,并刺激转化生长因子-β 表达,导致细胞外基质增生和积聚,促进肾脏纤维化的发生发展^[11, 12]。

阿霉素大鼠模型是经典的肾病模型,既往已有一些对于该模型中 HPA 表达的报道,但鲜有对 HSPG 表达及 HS 结合的细胞因子表达的影响研究。本实验以 5mg/kg 阿霉素尾静脉注射造模,动态观察了第

0、7、14、21、28 天尿蛋白变化,并观察血生化指标及肾脏病理变化以及肾脏组织 HPA、HSPG 与 PDGF、bFGF 表达的改变。结果显示,造模后第 14 天开始 24h 尿蛋白定量进行性升高,并与 HPA 表达呈正相关,与 HSPG 表达呈负相关,同时观察到 AN 组大鼠肾组织 PDGF 表达明显增多,并与尿蛋白呈负相关,提示 PDGF 在 AN 组大鼠模型中具有重要的病理作用;但本实验中 AN 模型大鼠肾组织 bFGF 表达未见显著改变。

HPA 表达增加及活性增强在肾小球疾病蛋白尿发生发展中具有重要病理作用,已有报道 HPA 抑制剂具有抗凝、抗细胞增殖活性,减少炎症细胞浸润,抑制肾素-血管紧张素系统活性,减少蛋白尿,延缓肾纤维化进展,有可能成为治疗肾小球疾病蛋白尿的重要作用靶点^[13,14]。

参考文献

- 1 Van den Hoven MJ, Rops AL, Vlodavsky I, *et al.* Heparanase in glomerular diseases[J]. *Kidney Int*, 2007, 72(5):543-548
- 2 Szymczak M, Kuzniar J, Klinger M. The role of heparanase in diseases of the glomeruli[J]. *Arch Immunol Ther Exp*, 2010, 58(1):45-56
- 3 Wijnhoven TJ, van den Hoven MJ, Ding H, *et al.* Heparanase induces a differential loss of heparan sulphate domains in overt diabetic nephropathy[J]. *Diabetologia*, 2008, 51(2):372-382
- 4 Nasser NJ. Heparanase involvement in physiology and diseases[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2008, 65(11):1706-1715
- 5 van den Hoven MJ, Waanders F, Rops AL, *et al.* Regulation of glomerular heparanase expression by aldosterone, angiotensin II and re-

- active oxygen species[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2009, 24(9):2637-2645
 - 6 Wijnhoven TJ, Lensen JF, Rops AL, *et al.* Anti-proteinuric effects of glycosaminoglycan-based drugs[J]. *Curr Opin Mol Ther*, 2007, 9(4):364-377
 - 7 Harvey SJ, Miner JH. Revisiting the glomerular charge barrier in the molecular era[J]. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2008, 17(4):393-398
 - 8 Nadir Y, Brenner B, Fux L, *et al.* Heparanase enhances the generation of activated factor X in the presence of tissue factor and activated factor V II[J]. *Haematologica*, 2010, 95(11):1927-1934
 - 9 Abuharbeid S, Czubyko F, Aigner A. The fibroblast growth factor-binding protein FGF-BP[J]. *Int J Biochem cell Biol*, 2006, 38(9):1463-1468
 - 10 Patel VN, Knox SM, Likar KM, *et al.* Heparanase cleavage of perlecan heparan sulfate modulates FGF activity during ex vivo submandibular gland branching morphogenesis [J]. *Development*, 2007, 134(23):4177-4186
 - 11 Edovitsky E, Lerner I, Zcharia E, *et al.* Role of endothelial heparanase in delayed-type hypersensitivity[J]. *Blood*, 2006, 107(9):3609-3616
 - 12 Bonner JC. Regulation of PDGF and its receptors in fibrotic diseases[J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2004, 15(4):255-273
 - 13 Gambaro G, Kong NC. Glycosaminoglycan treatment in glomerulonephritis? An interesting option to investigate[J]. *J Nephrol*, 2010, 23(3):244-252
 - 14 Ferro V, Dredge K, Liu L, *et al.* PI-88 and novel heparan sulfate mimetics inhibit angiogenesis[J]. *Sem Thromb Hemost*, 2007, 33(5):557-568
- (收稿:2011-03-21)
(修回:2011-05-17)

血浆内毒素定量检测的临床应用价值探讨及参考值范围的调查

余玲玲 王国胜 杨锦红 刘建平 吴秀继

摘要 目的 探讨血浆内毒素定量检测的临床应用价值,并建立温州健康人群血浆内毒素浓度的参考值范围。**方法** 采用动态浊度法定量检测 242 例不明原因发热(fever of unknown origin, FUO)患者和 252 例健康受检者血浆内毒素浓度,用 SPSS 13.0 软件对其结果进行统计学分析,并采用 95% 可信区间确定其参考值范围。**结果** 发热组血浆内毒素浓度明显高于健康组,其中位数分别为 8.76pg/ml 与 2.07pg/ml,差别有统计学意义($P < 0.05$)。健康受检者男组血浆内毒素浓度虽低于女组,但差别无统计学意义($P > 0.05$);不同年龄段的血浆内毒素浓度虽均有所不同,但差别亦无统计学意义($P > 0.05$);以 95% 可信区间取值,确定健康人群血浆内毒素浓度的参考值范围为 0~4.14pg/ml。**结论** 血浆内毒素浓度的定量检测,可以对 FUO 患者是否存在内毒素血症做出早期判断,从而有助于其病因的快速确定,给临床治疗提供一定的帮助;厂商提供的血浆内毒素浓度参考值范

作者单位:325027 温州医学院附属第二医院(余玲玲、杨锦红、刘建平);温州市龙湾区第一人民医院(王国胜);温州医学院育英儿童医院(吴秀继)