

· 基础论著 ·

HIV与HBV共感染对肝星状细胞纤维化相关基因表达的影响

徐少钦¹ 熊勇² 张红² 陈宇³ 柳叶³ 高国振³

【摘要】目的 探讨人类免疫缺陷病毒(HIV)与乙型肝炎病毒(HBV)共感染对人肝星状细胞纤维化部分相关基因表达的影响。**方法** 人肝星状细胞(HSC LX2)分别与HIV X4株(CXCR4噬性)、HIV R5株(CCR5噬性)、HBV、HIV X4 + HBV和HIV R5 + HBV共同孵育3 d后,采用RT-PCR检测细胞中的前胶原蛋白 $\alpha 1$ (COL1A)、基质金属蛋白酶3 (MMP3)及金属蛋白酶组织抑制物1 (TIMP1)的mRNA表达水平,采用ELISA检测细胞上悬液中相应蛋白含量,结果分别与相应对照样本进行比较。**结果** HIV和HBV共同作用于HSC LX2细胞比HIV或HBV单独作用更能促进COL1A蛋白合成(P 均 < 0.05)。实验组和对照组中MMP3 mRNA和蛋白表达水平差异虽无统计学意义,但实验数据显示,病毒有抑制MMP3基因表达的趋势。HIV、HBV分别作用于HSC LX2细胞可促进TIMP1 mRNA以及TIMP1蛋白表达(P 均 < 0.05)。HIV和HBV共同作用能进一步提高TIMP1 mRNA以及TIMP1蛋白表达(P 均 < 0.05)。**结论** HIV、HBV分别作用于HSC LX2细胞,能促进TIMP1 mRNA以及蛋白的表达。HIV、HBV共同作用于HSC LX2细胞比单一病毒更能促进COL1A蛋白的合成以及TIMP1 mRNA转录和蛋白的合成。

【关键词】 肝炎病毒, 乙型; 人类免疫缺陷病毒; 肝纤维化; 基因表达

Influence of HIV and HBV co-infection on expression of fibrosis-related genes in hepatic stellate cell Xu Shaoqin¹, Xiong Yong², Zhang Hong², Chen Yu³, Liu Ye³, Gao Guozhen³. ¹Department of Infectious Diseases, General Hospital of The Yangtze River Shipping, Wuhan 430010, China; ²Department of Infectious Diseases, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, China; ³College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China

Corresponding author: Xiong Yong, Email: yongxiong64@163.com.cn

【Abstract】Objective To investigate the effects of co-infection with HIV and HBV on the expression of several hepatic fibrogenesis-related genes in hepatic stellate cells (HSC). **Methods** After HSC LX2 cells were cultured with HIV X4, HIV R5, HBV, HIV X4 + HBV and HIV R5 + HBV for 3 days, respectively, the expression of procollagen $\alpha 1$ (COL1A) mRNA, matrix metalloproteinases 3 (MMP3) mRNA and tissue inhibitors of metalloproteinases 1 (TIMP1) mRNA and corresponding proteins were measured by RT-PCR and ELISA, respectively. The results were compared with corresponding reference samples. **Results** The expression level of COL1A protein significantly increased in HIV and HBV co-infection (P all < 0.05), compared to HIV or HBV infected HSC alone. There was no significant difference in MMP3 mRNA and protein expression between control cells and treated cells, but the experimental data showed a tendency to suppress MMP3 gene expression in HSC LX2 cells cultured with virus. HIV/HBV increased TIMP1 mRNA and protein expression in HSC LX2 cells (P all < 0.05). HIV and HBV co-infection furtherly increased the expression levels of TIMP1 mRNA and protein (P all < 0.05), compared to HIV or HBV infected HSC alone. **Conclusions** HIV/HBV can up-regulate the expression level of TIMP1 mRNA and protein in HSC LX2 cells, respectively. HIV and HBV co-infection can significantly promote COL1A protein synthesis and TIMP1 mRNA transcription and protein synthesis than HIV or HBV infection with HSC LX2 cells alone.

【Key words】 Hepatitis B virus; Human immunodeficiency virus; Hepatic fibrogenesis; Gene expression

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2015.06.030

基金项目: 湖北省自然科学基金 (No. 2011CDB528)

作者单位: 430010 武汉市, 武汉长江航运总医院感染科¹; 430071 武汉市, 武汉大学中南医院感染科²; 430072 武汉市, 武汉大学生命科学院³

通讯作者: 熊勇, Email: yongxiong64@163.com.cn

人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)和乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)具有类似的传播途径,因而HIV/HBV合并感染较为常见。据估计,全球有超过4000万HIV感染者,而其中约10%同时伴有HBV慢性感染。HBV慢性感染是慢性乙型肝炎、肝纤维化、肝硬化,乃至肝细胞癌发生的重要原因^[1-2]。HIV对HBV感染的自然史有明显的负面影响。临床上,HIV可增加HBV感染慢性化机率,降低HBV e抗原(hepatitis B e antigen, HBeAg)清除率,增加HBV复制水平和复发率,加大HBV表面抗体(hepatitis B s antibody, HBsAb)消失的可能,增加肝纤维化、肝硬化以及肝细胞癌的发生^[3-4]。

HBV或HCV与HIV双重感染对肝脏的损害要比单纯HIV感染时严重^[5]。双重感染可加重患者的肝功能损害,导致肝脏炎症和纤维化程度增高,增加肝硬化、肝癌发生率。与单独HCV感染者相比,HCV与HIV双重感染者的肝功能衰竭和病死率都显著上升,即使是成功进行了抗HIV治疗的患者^[6]。这一现象在HIV合并HBV患者人群中更为明显^[7]。因此,研究HIV合并HBV对肝纤维化的影响有重要意义。

HIV/HBV合并感染者体内的HIV、HBV可能直接作用于肝脏相关细胞,从而促进肝纤维化、肝硬化等终末期肝病发生^[3, 8]。肝纤维化的细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的多少取决于其生成和降解的平衡动态。当机体处于病理状态下时,细胞外基质会分泌增多。基质金属蛋白酶类(matrix metal proteinases, MMPs)是降解细胞外基质的主要酶,而金属蛋白酶类组织抑制物(tissue inhibitors of MMPs, TIMPs)是MMPs的主要抑制物^[9],同时前胶原蛋白 $\alpha 1$ (procollagen $\alpha 1$, COL1A)也参与了ECM的形成。本研究通过对比HIV、HBV分别以及共同作用于人肝星状细胞系(hepatic stellate cells, HSC)后COL1A、MMP3、TIMP1基因表达水平的变化,初步探讨了HIV和HBV能否直接作用于肝星状细胞并促进纤维化的形成,现报道如下。

材料与方法

一、细胞培养

HSC LX2(购自中南大学湘雅实验中心)培养液为DMEM(Dulbecco's modified eagle medium)溶液(含青霉素、链霉素、10%胎牛血清),细胞置于95%湿度,5% CO₂, 37 °C的培养箱中进行培养,铺板密度为50 000 cell/cm²。

二、病毒制备

1. HIV的制备:武汉大学生命科学院现代化病毒所拥有美国NIH的CXCR4 HIV NL4-3和CCR5 HIV BaL表达质粒。HIV的制备按操作指南转染HEK 293T细胞系,并收集含有HIV的上悬液,56 °C、30 min灭活后分装,-80 °C冻存备用。检测HIV滴度用ELISA法定量p24含量(试剂盒购自中科院武汉病毒所)。

2. HBV的制备:培养HepG2.2.15细胞,收集、分装悬液中HBV,-80 °C冻存备用。用HBV核酸扩增(PCR)-荧光定量检测试剂盒(上海科华)测定HBV DNA含量。

三、RNA样品制备及RT-PCR

人类COL1A、TIMP1、MMP3和甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)引物由上海生工合成,引物设计序列见表1。

HSC LX2细胞收获后,用Trizol(Invitrogen公司)提取总RNA,逆转录得总cDNA,在7300 System Software荧光定量PCR仪(美国应用生物系统公司)中进行PCR反应^[10],定量软件分析PCR结果。用GAPDH mRNA值标化COL1A、TIMP1和MMP3基因的mRNA值。

四、实验方法

1. 将培养的HSC LX2细胞分成8个组:HSC LX2未处理组、加入HIV X4病毒株组、HIV R5组、无HIV病毒的293T细胞上悬液(Neg HIV)组、HBV组、HBV + HIV X4组、HBV + HIV R5组和无HBV病毒的293T细胞上悬液组(Neg HBV),铺板12 h后,按分组要求分别加入所需的病毒(HIV浓度达到8 ng/ml,HBV浓度达到8.0 × 10⁴拷贝/ml)孵

表1 PCR 引物设计序列

基因	正向引物(5'→3')	反向引物(5'→3')
人类 GAPDH	ACAGTCCATGCCATCACTGCC	GCCTGCTTACCACCTTCTTG
人类 TIMP1	TGTTGTTGCTGTGGCTGATAGC	TCTGGTGTCCACGAACCTT
人类 COL1A	CAGCCGCTTCACCTACAGC	TCAATCACTGTCTTGCCCCA
人类 MMP3	GTTCCGCTGTCTCAAGATGA	GGGACAGGTTCCGTGGGTA

注:甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)、前胶原蛋白 $\alpha 1$ (COL1A)、基质金属蛋白酶3(MMP3)、金属蛋白酶组织抑制物1(TIMP1)

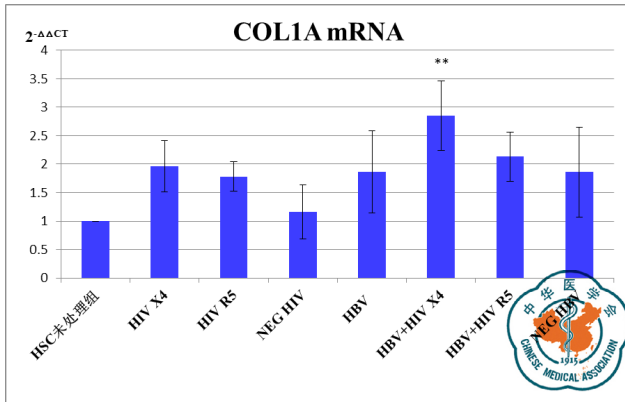


图1 HIV/HBV与HIV作用于HSC LX2对COL1A mRNA表达影响

注: HSC LX2 未处理组、HIV X4 组、HIV R5 组、Neg HIV 组、HBV 组、HBV + HIV X4 组、HBV + HIV R5 组和 Neg HBV 组的 COL1A mRNA 相对含量分别为 1.00 ± 0.00 、 1.96 ± 0.45 、 1.78 ± 0.26 、 1.16 ± 0.47 、 1.86 ± 0.72 、 2.85 ± 0.61 、 2.13 ± 0.43 和 0.86 ± 0.79 ; HBV + HIV X4 与 HBV 组比较, $**P < 0.05$

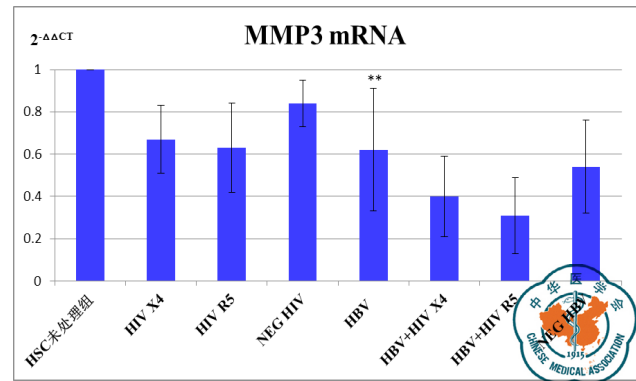


图3 HIV/HBV与HIV作用于HSC LX2对MMP3 mRNA表达影响

注: MMP3 mRNA 相对含量上、各组结果分别为 1.00 ± 0.00 、 0.67 ± 0.16 、 0.63 ± 0.21 、 0.84 ± 0.11 、 0.62 ± 0.29 、 0.40 ± 0.19 、 0.31 ± 0.18 、 0.54 ± 0.22 ; HBV 组和 NEG HBV 组比较, $**P < 0.05$

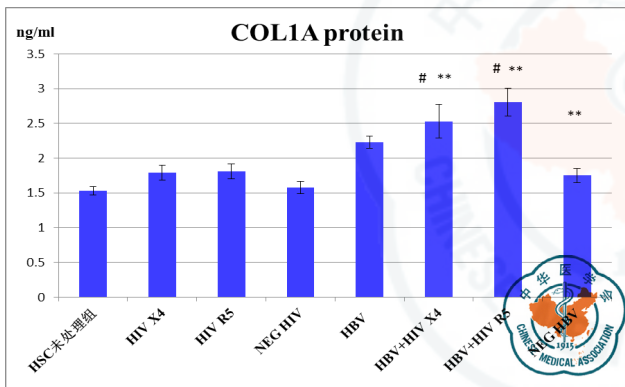


图2 HIV/HBV与HIV作用于HSC LX2对COL1A蛋白表达影响

注: 各分组在细胞悬液中 COL1A 蛋白含量分别为: 1.53 ± 0.06 、 1.79 ± 0.11 、 1.81 ± 0.11 、 0.58 ± 0.09 、 2.23 ± 0.09 、 2.53 ± 0.24 、 2.81 ± 0.20 、 1.75 ± 0.10 。NEG HBV 组、HBV + HIV X4 组、HBV + HIV R5 组分别与 HBV 组比较, $**P < 0.05$; HIV X4 组与 HBV + HIV X4 组比较 $#P < 0.05$ 、HIV R5 组与 HBV + HIV R5 组比较 $#P < 0.05$

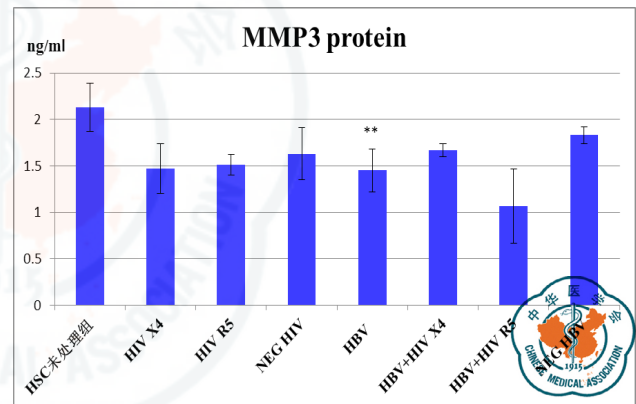


图4 HIV/HBV与HIV作用于HSC LX2对MMP3蛋白表达影响

注: 各组的蛋白结果分别为 2.13 ± 0.26 、 1.47 ± 0.27 、 1.51 ± 0.11 、 1.63 ± 0.28 、 1.45 ± 0.23 、 1.67 ± 0.07 、 1.07 ± 0.40 和 1.83 ± 0.09 ; HBV 组和 NEG HBV 组比较, $**P < 0.05$

结果

一、HIV和HBV单独及共同作用对HSC LX2 COL1A表达影响及对应组比较结果

HSC LX2未处理组, HIV X4组, HIV R5组, Neg HIV组, HBV组, HBV + HIV X4组, HBV + HIV R5组和Neg HBV组的COL1A mRNA相对含量的比较结果为(见图1): HBV + HIV X4与HBV比较 ($P < 0.05$), 结果提示, HBV和HIV X4较HBV单独作用HSC LX2细胞能够促进COL1A mRNA的表达。

对应的细胞悬液中COL1A蛋白含量的比较结果为(见图2): NEG HBV与HBV比较, HBV + HIV X4与HBV比较, HBV + HIV R5与HBV比较, HIV X4与HBV + HIV X4比较, HIV R5与HBV + HIV R5比较, 差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$); 结果显示,

育适当时间后 (3 d) [11-12], 收获细胞和上悬液, 用 RT-PCR检测COL1A、TIMP1、MMP3的 mRNA 表达水平, ELISA检测蛋白水平。结果分别与相对应样本比较。

2. ELISA检测: 用TIMP1、MMP3 (R&D Systems, MN)、COL1A (Bio-Swamp) 蛋白 ELISA测定试剂盒, 检测HSC LX2表达的相应蛋白, 具体步骤按试剂盒里说明书操作。

五、统计学处理

采用SPSS 17.0统计软件包进行分析, 连续性变量的统计描述用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 结果采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

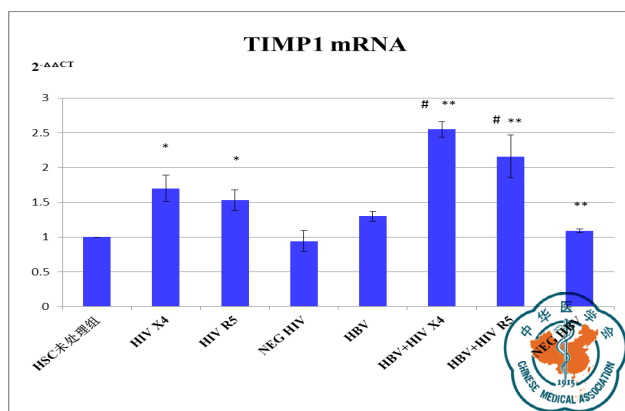


图5 HIV/HBV与HIV作用于HSC LX2对TIMP1 mRNA表达影响

注: 各组在TIMP1在mRNA相对含量结果分别为1.00 ± 0.00、1.70 ± 0.19、1.53 ± 0.15、0.94 ± 0.15、1.30 ± 0.07、2.55 ± 0.11、2.16 ± 0.31和1.09 ± 0.03。HIV X4组、HIV R5组分别与NEG HIV组比较^{*}*P* < 0.05; NEG HBV组、HBV + HIV X4组、HBV + HIV R5组分别与HBV组比较, ^{**}*P* < 0.05; HIV X4与HBV + HIV X4组比较[#]*P* < 0.05、HIV R5与HBV + HIV R5组比较[#]*P* < 0.05

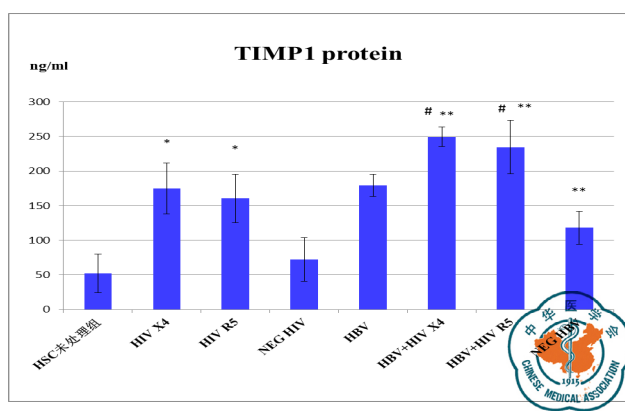


图6 HIV/HBV与HIV作用于HSC LX2对TIMP1蛋白表达影响

注: 各组在蛋白含量上分别为52.52 ± 27.90、174.79 ± 36.76、160.58 ± 34.87、72.06 ± 31.76、178.98 ± 15.97、249.36 ± 14.14、234.58 ± 38.64和118.18 ± 23.82。HIV X4组、HIV R5组分别与NEG HIV组比较^{*}*P* < 0.05; NEG HBV组、HBV + HIV X4组、HBV + HIV R5组分别与HBV组比较, ^{**}*P* < 0.05; HIV X4与HBV + HIV X4组比较[#]*P* < 0.05; HIV R5与HBV + HIV R5组比较[#]*P* < 0.05

HIV和HBV协同作用比HBV或HIV X4/HIV R5单独作用于HSC LX2细胞更能促进COL1A蛋白的合成。

二、HIV和HBV单独及共同作用对HSC LX2 MMP3表达影响及对应组比较结果

MMP3 mRNA相对含量及其蛋白表达的比较结果为(见图3~4): HBV和NEG HBV比较差异具有统计学意义(*P* < 0.05), 其他组间比较差异无统计学意义。

虽然在MMP3的mRNA水平和蛋白表达中, 仅HBV和NEG HBV比较差异具有统计学意义, 而其他各组间比较差异无统计学意义, 符合HBV能促进此细胞肝纤维化相关基因表达的预测, 但实验数据依然显示, 病毒感染有抑制HSC LX2细胞MMP3基因表达的趋势。

三、HIV和HBV单独及共同作用对HSC LX2 TIMP1表达影响及对应组比较

各组TIMP1 mRNA相对含量比较的结果为(见图5): HIV X4, HIV R5分别与NEG HIV比较, NEG HBV与HBV比较, HBV + HIV X4与HBV比较, HBV + HIV R5与HBV比较, HIV X4与HBV + HIV X4比较, HIV R5与HBV + HIV R5比较, 差异均具有统计学意义(*P*均 < 0.05)。

各组蛋白含量比较的结果为(见图6): HIV X4, HIV R5分别与NEG HIV比较, NEG HBV与HBV比较, HBV + HIV X4与HBV比较, HBV + HIV R5与HBV比较, HIV X4与HBV + HIV X4比较, HIV R5与HBV + HIV R5比较, 差异均具有统计学意义(*P*均 < 0.05)。

以上结果提示, HIV和HBV分别及协同作用于HSC LX2细胞, 能促进TIMP1 mRNA转录以及蛋白的合成, 且协同作用更能促进HSC LX2细胞的表达。

讨 论

在本实验研究了HIV和HBV对HSC LX2细胞纤维化相关基因表达的影响; 结果显示, HIV和HBV协同作用于HSC LX2细胞, 能促进COL1A蛋白的合成。HIV和HBV分别及协同作用于HSC LX2细胞, 能促进TIMP1 mRNA转录以及蛋白的合成。虽然各组间在MMP3表达上差异无统计学意义, 但实验数据显示病毒感染有抑制MMP3基因表达的趋势。

HIV能感染人类CD4⁺淋巴细胞、巨噬细胞和树突状细胞, 而不能在肝细胞内复制。但有研究显示, HIV及其包膜gp120蛋白能够诱导肝纤维化相关细胞表面的CCR5或CXCR4受体, 并进一步影响其细胞的信号转导^[13-16], 从而引发一系列连锁反应, 最终导致肝纤维化的发生和进展。

另一方面, 尽管HSC表达CD4水平较为低下, 但HSC也表达HIV协同受体CXCR4, CCR5。因此, HIV进入、感染HSC促进基因表达, 是非CD4和趋化因子结合受体依赖性的。HIV可通过包膜蛋白gp120与HSC表达的CCR5、CXCR4化学趋化因子受体相互作用, 提高HSC的TIMP1, COL1A基因表达^[14]。HIV X4(HIV CXCR4)和HIV R5(HIV CCR5)能侵入、活化HSC LX2和原代HSC细胞株,

诱导COL1A表达和分泌^[15, 17]。同时, HIV感染导致的CD4⁺消耗可改变肝内环境的细胞因子水平, 从而加速肝纤维化的发生^[18]。

多项研究报道, 用灭活的HIV X4、HIV R5和HCV JFH1, 作用于HSC LX2细胞株、Huh 7.5.1细胞株。结果提示, HIV、HCV可分别及协同作用于肝细胞、HSC LX2细胞, 促进纤维化有关蛋白基因COL1A和TIMP1表达, ECM累积增加^[11, 13-16, 18-19], 本实验结果与之类似。

HBV感染的主要靶细胞是肝细胞, HBV虽然不能在HSC细胞里复制合成, 但HBV可短期感染HSC细胞, 并进一步诱导纤维化相关基因和蛋白表达^[20]。此外, 近年有研究表明, HBV感染HSC LX2后, 可在其中复制、表达HBsAg和HBcAg, 进而对HSC LX2繁殖和表达胶原I型蛋白产生促进作用^[12]。而当HIV和HBV同时感染同一细胞时, HBx基因产物可使得HIV逆转录水平提高, HIV复制速度加快^[21-22], 并促进肝纤维化。

上述研究与本实验结果提示, HIV、HBV可直接作用于HSC, 改变纤维化相关基因的表达, 从而促进肝纤维化的发生。此研究结论可部分解释与HBV单一感染者相比HIV/HBV合并感染者肝纤维化进展较快的临床现象。因此, 抑制HIV和HBV复制对防治HIV/HBV合并感染者肝纤维化进展有重要意义。

有关HIV和HBV直接作用于肝星状细胞, 从而改变纤维化相关基因的表达促进肝纤维化发生的具体机制, 有待进一步研究。

参考文献

- Dienstag JL. Drug therapy-hepatitis B virus infection[J]. N Engl J Med, 2008, 359(14): 1486-1500.
- 中华医学会肝病学会, 中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南(2015年版)[J]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2015, 9(5): 570-589.
- Thio CL. Hepatitis B and human immunodeficiency virus coinfection [J]. Hepatology, 2009, 49(5): S138-S145.
- Sulkowski MS. Viral hepatitis and HIV coinfection[J]. J Hepatol, 2008, 48(2): 353-367.
- Herrero Martinez E. Hepatitis B and hepatitis C co-infection in patients with HIV[J]. Rev Med Virol, 2001, 11(4): 253-270.
- Macias J, Berenguer J, Japon MA, et al. Fast fibrosis progression between repeated liver biopsies in patients coinfecting with human immunodeficiency virus/hepatitis C virus[J]. Hepatology, 2009, 50(4): 1056-1063.
- 刘金花, 赵艳, 孙焕芹, 等. HCV对HIV/HCV共感染者病情进展的影响[J]. 临床肝胆病杂志, 2014, 30(6): 501-504.
- 张仁芳, 卢洪洲. HBV合并HIV感染的诊治进展[J]. 中国医师进修杂志, 2007, 30(5): 76-77.
- Cubero FJ, Nieto N. Ethanol and arachidonic acid synergize to activate kupffer cells and modulate the fibrogenic response via tumor necrosis factor alpha, reduced glutathione, and transforming growth factor beta-dependent mechanisms[J]. Hepatology, 2008, 48(6): 2027-2039.
- Lin W, Choe WH, Hiasa Y, et al. Hepatitis C virus expression suppresses interferon signaling by degrading STAT1[J]. Gastroenterology, 2005, 128(4): 1034-1041.
- Lin W, Wu G, Li S, et al. HIV and HCV cooperatively promote hepatic fibrogenesis via induction of reactive oxygen species and NF-kappaB[J]. J Biol Chem, 2011, 286(4): 2665-2674.
- Liu X, Zhu ST, You H, et al. Hepatitis B virus infects hepatic stellate cells and affects their proliferation and expression of collagen type I [J]. Chin Med J(Engl), 2009, 122(12): 1455-1461.
- Rotman Y, Liang TJ. Coinfection with hepatitis C virus and human immunodeficiency virus: virological, immunological, and clinical outcomes[J]. J Virol, 2009, 83(15): 7366-7374.
- Bruno R, Galastri S, Sacchi P, et al. gp120 modulates the biology of human hepatic stellate cells: a link between HIV infection and liver fibrogenesis[J]. Gut, 2010, 59(4): 513-520.
- Hong F, Tuyama A, Lee TF, et al. Hepatic stellate cells express functional CXCR4: role in stromal cell-derived factor-1alpha-mediated stellate cell activation[J]. Hepatology, 2009, 49(6): 2055-2067.
- Lin W, Weinberg EM, Tai AW, et al. HIV increases HCV replication in a TGF-beta1-dependent manner[J]. Gastroenterology, 2008, 134(3): 803-811.
- Tuyama AC, Hong F, Saiman Y, et al. Human immunodeficiency virus (HIV)-1 infects human hepatic stellate cells and promotes collagen I and monocyte chemoattractant protein-1 expression: implications for the pathogenesis of HIV/hepatitis C virus-induced liver fibrosis[J]. Hepatology, 2010, 52(2): 612-622.
- Puoti M, Bonacini M, Spinetti A, et al. Liver fibrosis progression is related to CD4 cell depletion in patients coinfecting with hepatitis C virus and human immunodeficiency virus[J]. J Infect Dis, 2001, 183(1): 134-137.
- Schulze-Krebs A, Preimel D, Popov Y, et al. Hepatitis C virus-replicating hepatocytes induce fibrogenic activation of hepatic stellate cells[J]. Gastroenterology, 2005, 129(1): 246-258.
- Serriere-Lanneau V, Teixeira-Clerc F, Li L, et al. The sphingosine 1-phosphate receptor S1P2 triggers hepatic wound healing[J]. FASEB J, 2007, 21(9): 2005-2013.
- Martin-Vilchez S, Sanz-Cameno P, Rodriguez-Munoz Y, et al. The hepatitis B virus x protein induces paracrine activation of human hepatic stellate cells[J]. Hepatology, 2008, 47(6): 1872-1883.
- 孙洪清, 黄琴, 沈芳, 等. 不同抗HIV治疗方案对HCV与HIV合并感染者丙型肝炎疾病进展的影响[J]. 临床肝胆病杂志, 2014, 29(11): 835-838.

(收稿日期: 2015-02-22)

(本文编辑: 孙荣华)

徐少钦, 熊勇, 张红, 等. HIV与HBV共感染对肝星状细胞纤维化相关基因表达的影响[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2015, 9(6): 841-845.