

· 临床研究 ·

# 青光眼睫状体炎综合征患者血液中补体系统活化状态的分析

陈文杰 赵军 祝天辉 彭诗茗 黄晓生

518040 深圳市眼科医院 暨南大学附属深圳眼科医院 深圳眼科学重点实验室

通信作者:赵军, Email: doctorzhaojun@163.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.07.015

**【摘要】** **背景** 补体系统的活化参与葡萄膜炎和开角型青光眼的病理过程。青光眼睫状体炎综合征(PSS)的发病具有葡萄膜炎和开角型青光眼的病理特点,其具体病因及其与血清补体水平和活化情况的关系鲜见报道。**目的** 检测 PSS 患者发病时血液中补体活化情况,为探讨 PSS 的发病机制提供依据。**方法** 采用前瞻性病例对照研究方法,纳入 2013 年 12 月至 2015 年 12 月在深圳市眼科医院确诊的 PSS 患者 79 例为 PSS 组,同期纳入深圳市血液中心健康献血者 83 名为正常对照组。采用免疫散射比浊法检测 2 个组受检者血清补体途径中共同的活化成分 C3、经典途径及凝集素途径中共同的活化成分 C4、IgG、IgM 及 IgA 的质量浓度;采用 ELISA 双抗夹心法测定各组受检者血清经典途径标志物补体 C1q、凝集素途径标志物纤维胶凝蛋白 2(FCN2)、替代途径标志物补体 Bb 因子、3 条补体活化途径中的共同活化产物 C3a 及终末期溶解型膜攻击复合物 sC5b-9 的质量浓度;同时分析 PSS 组患者血清 C3a 与 sC5b-9 质量浓度变化的关系。**结果** PSS 组患者血清 C3、C4、C1q、FCN2、C3a、sC5b-9、IgG、IgM 和 IgA 质量浓度明显高于正常对照组,差异均有统计学意义( $Z = -4.743, -2.913, -1.985, -2.620, -2.062, -2.500, -7.010, -6.327, -3.652$ , 均  $P < 0.05$ ); PSS 组患者血清补体 Bb 因子质量浓度为  $13.87(9.24, 32.00) \mu\text{g/ml}$ , 明显低于正常对照组的  $20.51(12.90, 33.50) \mu\text{g/ml}$ , 差异有统计学意义( $Z = -2.515, P = 0.012$ )。PSS 组患者血清 sC5b-9 质量浓度为  $0.41(0.16, 1.32) \mu\text{g/ml}$ , 血清 C3a 质量浓度为  $190.3(81.0, 541.3) \mu\text{g/ml}$ , 二者变化呈明显正相关( $r_s = 0.832, P < 0.001$ )。**结论** PSS 患者活动期补体系统活化,可能是通过补体替代途径和/或经典途径及凝集素途径实现的。

**【关键词】** 开角型青光眼; 综合征; 睫状体炎; 补体活化/生理; 补体活化通路/生理

**基金项目:** 广东省自然科学基金项目(S2013010013464); 深圳市科技研发资金项目(JCYJ20120831154554508)

**Activation of serum complement in Posner-Schlossman syndrome patients** Chen Wenchieh, Zhao Jun, Zhu

Tianhui, Peng Shiming, Huang Xiaosheng

Shenzhen Key Laboratory of Ophthalmology, Shenzhen Eye Hospital, Jinan University, Shenzhen 518040, China

Corresponding author: Zhao Jun, Email: doctorzhaojun@163.com

**[Abstract]** **Background** Activation of serum complement system is involved in the pathological process of uveitis and open angle glaucoma. Pathogenesis and pathological characteristics of Posner-Schlossman syndrome (PSS) are similar to uveitis and open angle glaucoma. However, etiology of PSS remains unelucidated. The activation complement in PSS patients' serum is rarely reported. **Objective** The aim of this study was to investigate the activation of serum complement in PSS patients for PSS pathogenesis. **Methods** A prospective case-controlled study was designed. The peripheral blood samples of 79 PSS patients were collected from Shenzhen Eye Hospital during December 2013 to December 2015, and the peripheral blood samples were obtained from 83 unrelated healthy blood donors as healthy control group. Immuno-scatter turbidimetry was adopted to detect the common activated components in complement pathway in each group including complement C3 (a vital intersection molecule in the three pathways), C4 (the vital molecule both the complement classical and lectin pathways), split products C3a, soluble membrane attack complex (sC5b-9), C1q (complement classical pathway), L-ficolin (complement lectin pathway), complement factor Bb (complement alternative pathway), IgG, IgA and IgM. The correlation between serum C3a content and sC5b-9 content in PSS group was analyzed. The serum contents of fabric binding protein 2 (FCN2) (a marker of serum classical pathway), factor Bb (a marker of complement alternative pathway), C3a (the common activation products of three complement activation pathways), and sC5b-9 were assayed by ELISA. This research protocol was

approved by Shenzhen Eye Hospital and written informed consent was obtained from each PSS patient prior to any medical examination. **Results** Compared with normal control group, the serum levels of C3, C4, C3a, sC5b-9, C1q, FCN2, IgG, IgA and IgM were significantly higher in PSS group ( $Z = -4.743, -2.913, -1.985, -2.620, -2.062, -2.500, -7.010, -6.327, -3.652$ , all at  $P < 0.05$ ). The serum complement factor Bb level was 13.87 (9.24, 32.00)  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in PSS group, which was significantly lower than 20.51 (12.90, 33.50)  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in normal control group ( $Z = -2.515, P = 0.012$ ). Serum C3a content was positively correlated with the serum sC5b-9 content in PSS group ( $r_s = 0.832, P < 0.001$ ). **Conclusions** The serum complement system is activated in PSS patients. Complement alternative pathway, classical pathway and lectin pathway might all be involved in the activative process of complement system.

**[Key words]** Glaucoma, open-angle; Syndrome; Iridocyclitis; Complement activation/ physiology; Complement pathway, activation / physiology

**Fund program:** Natural Science and Technology of Guangdong Province (S2013010013464); Science and Technology Research and Development Program of Shenzhen Municipality (JCYJ20120831154554508)

青光眼睫状体炎综合征 (Posner-Schlossman syndrome, PSS) 于 1948 年由 Posner 和 Schlossman 首次进行详细描述,以反复发作的羊脂状角膜后沉着物 (keratic precipitates, KP)、房角开放和眼压升高为主要特点,一般来说其病程有自限性<sup>[1-2]</sup>。但研究表明,约 28.0% 的 PSS 最终发展成为青光眼,提示 PSS 并非均为良性经过的自限性疾病<sup>[3]</sup>。PSS 病因尚不清楚,目前认为可能与自体免疫性疾病、病原微生物感染、机体外周血管内皮功能失常及变态反应等有关<sup>[4-6]</sup>。近年来研究表明,补体系统的活化参与多种眼部疾病,如年龄相关性黄斑变性、糖尿病视网膜病变及早产儿视网膜病变等的病理过程<sup>[7-9]</sup>。前葡萄膜炎患者血清中补体 C5 水平的明显升高可能是促进病变进展的因素<sup>[10]</sup>。还有研究表明,补体活化参与原发性开角型青光眼的进展<sup>[11-12]</sup>。PSS 具有前葡萄膜炎及原发性开角型青光眼的病理特征,但 PSS 与补体活化的关联性尚不明确。本研究中探讨 PSS 患者发病时血液中补体成分及补体途径的活化情况,为 PSS 的发病机制、临床诊断及治疗提供依据。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

采用前瞻性病例对照研究方法,纳入 2013 年 12 月至 2015 年 12 月在深圳市眼科医院确诊的 79 例 PSS 患者为 PSS 组。同期纳入深圳市血液中心的志愿者 83 名作为正常对照组。PSS 组患者中男 41 例,女 38 例;平均年龄 ( $42.58 \pm 14.26$ ) 岁。正常对照组男 45 名,女 38 名;平均年龄 ( $40.26 \pm 8.98$ ) 岁。PSS 组纳入标准:PSS 发病 1 ~ 5 d;此次发病未用药或者仅自行不规则局部使用非甾体类抗炎及降眼压滴眼液。PSS 组排除标准:有其他眼部疾病或肿瘤性疾病者。正常对照组排除标准:有眼部疾病或其他免疫性疾病者。2 个组间受检者性别构成比及年龄的差异均无统计学意

义 ( $\chi^2 = 0.09, P > 0.05; t = 1.125, P > 0.05$ )。本研究经深圳市眼科医院伦理委员会批准 (批准号: 2013032806),所有受检者均了解本研究情况及目的,并签署知情同意书。

### 1.2 方法

**1.2.1 受检者血清标本的收集、制备和储存** 采集 2 个组受检者的外周血。将外周血标本置于促凝干燥管,室温下放置 1 h,600C 型低速医用离心机 (北京白洋医疗器械公司) 3 000 r/min 离心 5 min,离心半径 11 cm,收集血清,分装至已消毒的 eppendorf 管中,于  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  冰箱中冻存备用,检测时均  $37\text{ }^\circ\text{C}$  下迅速解冻。

**1.2.2 免疫散射比浊法检测受检者血清中补体 C3、C4 及 IgG、IgM 和 IgA 的质量浓度** 将 C3、C4、IgG、IgM 和 IgA 检测试剂 (446450、446490、446400、447610 和 446450,美国 Beckman Coulter 公司) 置于 IMMAGE 800 型特定蛋白分析仪 (美国 Beckman Coulter 公司) 中进行检测。将待检样本血清置于蛋白分析仪中,测定血清中 C3、C4、IgG、IgM 和 IgA 质量浓度。

**1.2.3 ELISA 法测定血清中 C3a、sC5b-9、C1q、补体 Bb 因子和纤维胶凝蛋白 2 的质量浓度** 采用 ELISA 双抗体夹心法进行检测,将血清标本按照说明书规定的稀释浓度、孵育时间及反应温度加入微孔板中反应 2 h;滴加补体特异性反应抗体反应 1 h;滴加辣根过氧化物酶标记二抗反应 0.5 h;加入 TMB 显色液显色,反应 20 min;加入终止液终止反应。用 Model 680 型酶标仪 (日本 BIO-RAD 公司) 测定波长 450 nm 处吸光度 (A) 值。根据 A 值求出稀释后的补体成分的质量浓度,分别乘以各自的稀释倍数,得出实测的补体成分质量浓度。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS 20.0 统计学软件进行统计分析。本研究中测量指标的数据资料经 W 检验不符合正态分布,以  $M(Q_1, Q_3)$  进行描述。2 个组间年龄比较采用独立

样本 *t* 检验, 组间性别构成比采用  $\chi^2$  检验。采用均衡分组两水平研究设计, PSS 组与正常对照组受检者血清 C3、C4、C1q、补体 Bb 因子、纤维胶凝蛋白 2 (ficolin2, FCN2)、C3a、sC5b-9、IgG、IgM 和 IgA 质量浓度的差异比较均采用 Wilcoxon 秩和检验。PSS 组患者血清 C3a 与 sC5b-9 质量浓度相关性采用 Spearman 秩相关分析。P < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组受检者血清中补体及 Ig 质量浓度

与正常对照组受检者比较, PSS 组患者血清中 C3、C4、C1q、FCN2、C3a、sC5b-9、IgG、IgM 及 IgA 质量浓度明显升高, 差异均有统计学意义 (均 P < 0.05); PSS 组患者血清中补体 Bb 因子质量浓度明显低于正常对照组, 差异有统计学意义 (P < 0.05) (表 1)。

表 1 2 个组受检者血清中补体成分及 Ig 质量浓度的比较 [M(Q<sub>1</sub>, Q<sub>3</sub>)]

组别	样本量	C3(g/L)	C4(g/L)	C1q(μg/ml)	补体 Bb 因子(μg/ml)	FCN2(μg/ml)
PSS 组	79	1.88(1.45, 2.14)	0.36(0.26, 0.48)	47.27(39.41, 53.88)	13.87( 9.24, 32.00)	8.30(7.91, 9.38)
正常对照组	83	1.48(1.24, 1.74)	0.30(0.24, 0.36)	42.72(32.86, 53.35)	20.51(12.90, 33.50)	8.10(7.13, 8.61)
Z		-4.743	-2.913	-1.985	-2.515	-2.620
P		0.000	0.004	0.047	0.012	0.009

组别	样本量	C3a(μg/ml)	sC5b-9(μg/ml)	IgG(g/L)	IgM(g/L)	IgA(g/L)
PSS 组	79	190.3(81.0, 541.3)	0.41(0.16, 1.32)	17.20(15.10, 20.90)	1.73(1.25, 2.24)	3.09(2.23, 3.83)
正常对照组	83	140.2(86.4, 231.9)	0.23(0.18, 0.40)	13.30(11.50, 15.20)	0.98(0.66, 1.42)	2.35(1.63, 3.11)
Z		-2.062	-2.500	-7.010	-6.327	-3.652
P		0.039	0.012	0.000	0.000	0.000

注: PSS: 青光眼睫状体炎综合征; FCN: 纤维胶凝蛋白 (Wilcoxon 秩和检验)

### 2.2 PSS 组补体活化产物 C3a 与 sC5b-9 质量浓度的相关性

PSS 组患者血清中 C3a 与 sC5b-9 质量浓度的变化呈明显正相关 ( $r_s = 0.832, P < 0.001$ ) (图 1)。

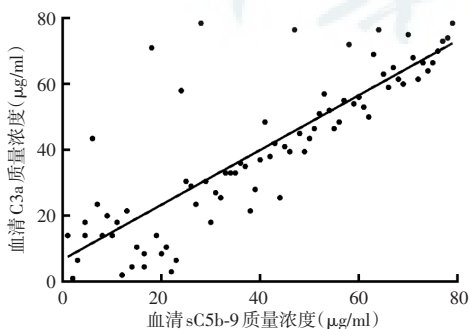


图 1 PSS 组患者血清 C3a 与 sC5b-9 关系的散点图  $r_s = 0.832, P < 0.001$  (Spearman 秩相关分析,  $n = 79$ )

## 3 讨论

PSS 多单眼发病, 好发于中青年; 反复发作时眼压

升高, 同时角膜内皮面出现羊脂状 KP, 无瞳孔后粘连; 高眼压状态时房角呈开放状态; 眼部轻度不适, 无明显眼痛及眼红, 视力无明显下降或轻度下降, 病程较短者无视野及视神经损害的表现<sup>[13-14]</sup>。补体系统参与抗感染免疫过程、调节炎症反应及处理自身抗原等免疫调节作用, 同时还具有凋亡调控和自噬调节等多重作用, 也可引起机体免疫病理的损伤性反应<sup>[15]</sup>。补体系统的激活主要有经典途径、替代途径和凝集素途径。IgM 和 IgG 分别是首次和再次免疫应答的主要抗体, 均具有激活补体经典途径的能力。IgA 是机体黏膜非特异性免疫的主要成分, 具有启动激活补体替代途径的能力。Bardak 等<sup>[16]</sup>报道 Behcet 病性葡萄膜炎患者发病时血清 C3、C4 及 IgA 质量浓度明显升高, 认为血清中 C3、C4 及 IgA 质量浓度的升高在该病的发生和发展中发挥重要作用。本研究中发现, PSS 患者发病时血清 C3、C4、IgG、IgM 和 IgA 质量浓度升高, 提示 PSS 的发生和发展可能与补体系统具有一定的关联。为明确 PSS 发病时患者补体系统的活化情况, 本研究中对补体系统 3 条途径的激活标志物 C1q、补体 Bb 因子、FCN2、C3a 及 sC5b-9 等进行研究。

3 条补体途径活化的启动激活物均不相同, 但都在激活 C3 时汇合, 活化的 C3 裂解产生活性片段 C3a 及 C3b。C3a 具有释放组织因子、提高毛细血管通透性及促使白细胞向炎症部位移行等作用, C3b 参与一系列酶促级联反应, 活化至终末产物, sC5b-9 是 3 条补体途径活化的共同终末产物。血清 C3a 及 sC5b-9 质量浓度反映了补体系统整体活化的程度<sup>[17]</sup>。本研究中发现, 3 条补体活化途径中的共同活化产物 C3a 及补体途径终末产物 sC5b-9 在 PSS 患者血清中质量浓度升高, 并且 C3a 与 sC5b-9 质量浓度的变化呈明显正相关, 说明在 PSS 活动期血清中存在补体系统的活化且到达终末阶段。

补体替代途径主要通过补体 B 因子的裂解产物 Bb 因子与 C3b 结合成 C3 转化酶, 直接启动补体 C3 至 C9 酶促级联反应而发挥非特异性免疫应答效应。在葡萄膜炎动物模型的研究中发现, 其炎症的高峰期存在补体替代途径的活化<sup>[18-19]</sup>。血清补体 Bb 因子质量浓度的降低见于补体经替代途径活化产物的消耗或补体 B 因子缺乏症<sup>[20]</sup>。本研究结果显示, PSS 患者血清补体 Bb 因子质量浓度明显低于正常对照组, 提示 PSS 患者发病时可能存在血液中补体替代途径的活

化。研究表明,在前葡萄膜炎动物模型上阻断血液中补体 B 因子的表达可抑制补体替代途径的激活及特异性 CD4<sup>+</sup>T 细胞的应答,从而明显减轻前葡萄膜炎的炎症反应<sup>[21]</sup>。PSS 患者血液中补体 Bb 因子质量浓度的改变与 PSS 的自限性或复发性是否具有一定的关联性值得进一步研究。

C1q 和 FCN2 分别是经典途径和凝集素途径的激活标志物。C4 是经典途径及凝集素途径共同的活化成分,C3 是 3 条补体途径共同的活化成分。本研究中发现,PSS 患者血清 C1q、FCN2、C4 和 C3 质量浓度水平明显升高,提示机体处于急性反应期,产生的大量补体成分容易掩盖补体活化反应引起的补体成分消耗性降低<sup>[20,22-24]</sup>,因此 PSS 活动期也不能排除血液中补体经典途径和/或凝集素途径的活化,但补体经典途径及凝集素途径是否参与 PSS 的发生和发展仍需进一步验证。PSS 组中 5 例入选前 1 ~ 2 d 局部应用非甾体抗炎药或降眼压滴眼液,鉴于眼局部用药对全身血液指标的影响小,故仍将其纳入 PSS 组。

综上所述,血液中补体系统的活化在 PSS 活动期中的作用机制值得进一步探讨。本研究中报道了 PSS 患者发病时血清中 3 条补体途径的活化情况,可为 PSS 的病因机制研究、诊断及治疗提供重要线索。

## 参考文献

- [1] Posener A, Schlossman A. Syndrome of unilateral recurrent attacks of glaucoma with cyclitic symptoms[J]. Arch Ophthalmol, 1948, 39(4): 517-535.
- [2] Shazly TA, Aljajeh M, Latina MA. Posner-Schlossman glaucomatocyclitic crisis[J]. Semin Ophthalmol, 2011, 26(4-5): 282-284. DOI: 10.3109/08820538.2011.605821.
- [3] Jap A, Sivakumar M, Chee SP. Is Posner-Schlossman syndrome benign? [J]. Ophthalmology, 2001, 108(5): 913-918.
- [4] Shen SC, Ho WJ, Wu SC, et al. Peripheral vascular endothelial dysfunction in glaucomatocyclitic crisis: a preliminary study[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2010, 51(1): 272-276. DOI: 10.1167/iov.09-3849.
- [5] Choi CY, Kim MS, Kim JM, et al. Association between helicobacter pylori infection and Posner-Schlossman syndrome [J]. Eye (Lond), 2010, 24(1): 64-69. DOI: 10.1038/eye.2009.34.
- [6] Rodier-Bonifas C, Cornut PL, Billaud G, et al. Cytomegalovirus research using polymerase chain reaction in Posner-Schlossman syndrome[J]. J Fr Ophtalmol, 2011, 34(1): 24-29. DOI: 10.1016/j.jfo.2010.10.008.
- [7] Gerl VB, Bohl J, Pitz S, et al. Extensive deposits of complement C3d and C5b-9 in the choriocapillaris of eyes of patients with diabetic retinopathy[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2002, 43(4): 1104-1108.
- [8] Langer HF, Chung KJ, Orlova VV, et al. Complement-mediated inhibition of neovascularization reveals a point of convergence between innate immunity and angiogenesis[J]. Blood, 2010, 116(22): 4395-4403. DOI: 10.1182/blood-2010-01-261503.
- [9] Sivaprasad S, Chong NV. The complement system and age-related macular degeneration[J]. Eye (Lond), 2006, 20(8): 867-872.
- [10] Xu D, Hou S, Jiang Y, et al. Complement C5 gene confers risk for acute anterior uveitis[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2015, 56(8): 4954-4960. DOI: 10.1167/iov.15-16645.
- [11] Ren L, Danias J. A role for complement in glaucoma? [J]. Adv Exp Med Biol, 2010, 703: 95-104. DOI: 10.1007/978-1-4419-5635-4\_7.
- [12] Kuehn MH, Kim CY, Ostojic J, et al. Retinal synthesis and deposition of complement components induced by ocular hypertension[J]. Exp Eye Res, 2006, 83(3): 620-628.
- [13] Zhao J, Zhu T, Chen W, et al. Human leukocyte antigens-B and -C loci associated with Posner-Schlossman syndrome in a southern Chinese population[J/OL]. PLoS One, 2015, 10(7): e0132179 [2016-02-15]. http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0132179. DOI: 10.1371/journal.pone.0132179. eCollection 2015.
- [14] 江文珊, 周和政. 青光眼睫状体炎综合征的鉴别诊断[J]. 华南国防医学杂志, 2012, 26(1): 32-35. DOI: 10.3969/j.issn.1009-2595.2012.01.010.
- [15] Jiang WS, Zhou HZ. Differential diagnosis of Posner-Schlossman syndrome[J]. Military Med J South China, 2012, 26(1): 32-35. DOI: 10.3969/j.issn.1009-2595.2012.01.010.
- [16] Skattum L, van Deuren M, van der Poll T, et al. Complement deficiency states and associated infections [J]. Mol Immunol, 2011, 48(14): 1643-1655. DOI: 10.1016/j.molimm.2011.05.001.
- [17] Bardak Y, Aridogan BC. The demonstration of serum interleukin 6-8, tumor necrosis factor-alpha, complement, and immunoglobulin levels in Behçet's disease with ocular involvement[J]. Ocul Immunol Inflamm, 2004, 12(1): 53-58.
- [18] Nilsson B, Ekdahl KN, Mollnes TE, et al. The role of complement in biomaterial-induced inflammation [J]. Mol Immunol, 2007, 44(1-3): 82-94.
- [19] 陶雪莹, 郑仕洁, 雷博. 内毒素诱导小鼠葡萄膜炎视网膜中补体系统的变化[J]. 南方医科大学学报, 2014, 34(8): 1121-1124. DOI: 10.3969/j.issn.1673-4254.2014.08.08.
- [20] Tao XY, Zheng SJ, Lei B. Alternation of retinal complement system in a mouse model of lipopolysaccharide-induced uveitis[J]. J Southern Med University, 2014, 34(8): 1121-1124. DOI: 10.3969/j.issn.1673-4254.2014.08.08.
- [21] 曾斌, 江翠华, 张吉翔. 免疫球蛋白超家族补体受体参与疾病发生的动物模型研究进展 [J]. 医学研究生学报, 2014, 6(27): 648-650. DOI: 10.3969/j.issn.1008-8199.2014.06.022.
- [22] Zeng B, Jiang CH, Zhang JX. Research progress of complement receptors involved in animal models of disease [J]. J Med Postgraduates, 2014, 6(27): 648-650. DOI: 10.3969/j.issn.1008-8199.2014.06.022.
- [23] Morgan BP. Physiology and pathophysiology of complement: progress and trends [J]. Crit Rev Clin Lab Sci, 1995, 32(3): 265-298.
- [24] Manickam B, Jha P, Matta B, et al. Inhibition of complement alternative pathway suppresses experimental autoimmune anterior uveitis by modulating T cell responses [J]. J Biol Chem, 2011, 286(10): 8472-8480. DOI: 10.1074/jbc.M110.197616.
- [25] Lu J, Wu X, Teh BK. The regulatory roles of C1q [J]. Immunobiology, 2007, 212(4-5): 245-252.
- [26] Zhang J, Koh J, Lu J, et al. Local inflammation induces complement crosstalk which amplifies the antimicrobial response [J/OL]. PLoS Pathog, 2009, 5(1): e1000282 [2016-04-15]. http://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1000282. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000282.
- [27] Luz PR, Boldt AB, Grisbach C, et al. Association of L-ficolin levels and FCN2 genotypes with chronic Chagas disease [J/OL]. PLoS One, 2013, 8(4): e060237 [2016-04-10]. http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0060237. DOI: 10.1371/journal.pone.0060237.

(收稿日期: 2016-05-05)

(本文编辑: 尹卫靖)