

猪链球菌血清 2 型抗体 IHA 检测方法的建立及应用

张九州, 郑逢梅, 李乔晶, 姬郭彪, 杨霞, 赵军, 陈陆, 常洪涛, 王新卫, 李欢, 王川庆*
(河南农业大学 禽病研究所, 河南 郑州 450002)

摘要:用猪链球菌血清 2 型 (*Streptococcus suis* serotype 2, SS2) 的荚膜多糖 (Capsular polysaccharide, CPS) 致敏经戊二醛处理过的鸡红细胞, 优化致敏醛化红细胞的抗原量和时间。结果显示, 在 37℃ 条件下 CPS (2.25 mg/L) 致敏鸡红细胞 90 min, IHA 试验在 25℃ 条件下操作, 被检血清 IHA 效价在 1:8 及其以上时判为 SS2 抗体阳性。应用此方法对猪大肠杆菌、副嗜血杆菌、猪肠球菌、SS1、SS7、SS9、金黄色葡萄球菌、沙门菌、巴氏杆菌阳性血清进行检测, 结果表明, SS2 抗体均为阴性。对 1044 份无临床症状的猪血清进行检测, SS2 抗体阳性率为 61.69%。该方法敏感性高, 特异性较强, 可用于大规模 SS2 抗体水平的检测和 SS2 的血清流行病学调查。

关键词:链球菌; 间接血凝试验; 抗体检测

中图分类号: S852.61 文献标志码: A 文章编号: 1005-4545(2013)01-0059-05

Development and application of an indirect hemagglutination assay for detection of antibodies against *Streptococcus suis* serotype 2

ZHANG Jiu-zhou, ZHENG Feng-mei, LI Qiao-jing, JI Guo-biao, YANG Xia, ZHAO Jun, CHEN Lu, CHANG Hong-tao, WANG Xin-wei, LI Huan, WANG Chuan-qing* (Institute of Avian Infection Disease, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: To establish an indirect hemagglutination assay (IHA) for detection of antibodies against SS2, the glutaraldehyde-fixed chicken red blood cells (CRBC) were sensitized by capsular polysaccharide of SS2. The best antigen concentration was 2.25 mg/L. The serum is positive if antibody titre was $\geq 1:16$. The positive sera against *Escherichia coli*, *haemophilus parasuis*, *Enterococcus*, SS1, SS7, SS9, *staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Pasteurella multocida* showed negative reaction to the CPS antigen of SS2 used in IHA. Examination of 1044 serum samples revealed that the positive ratio of antibody against SS2 was 61.69%. These data indicated that the IHA established is sensitive, specific for detecting antibody against SS2.

Key words: *Streptococcus suis*; indirect hemagglutination assay (IHA); antibody detection

* Corresponding author, E-mail: wchuanq@163.com

猪链球菌病 (Swine streptococcosis) 是由致病性猪链球菌 (*Streptococcus suis*, SS) 感染引起的一种人畜共患病, 能引起猪的脑膜炎、关节炎、心内膜炎、中耳炎、支气管炎和中毒休克综合征等^[1-3]。根据荚膜多糖可将 SS 分为 35 个血清型, 即 1~34 型和 1/2 型。其中 SS1、SS2、SS7 和 SS9 对猪的致病

性较强, 尤其是 SS2, 不仅对猪致病性强, 而且能引起人发病和死亡^[4]。自 2005 年 6 月我国四川省资中县发生 SS2 感染人的病例以来, 该病不仅成为造成养猪业严重经济损失的重要原因之一, 而且也成为备受世人关注的公共卫生问题之一。

近几年来, 现代化、规模化和集约化新型猪场的建设得到快速发展, 而猪链球菌病的流行趋势也有增无减, 给迅猛发展的养猪业造成巨大的潜在威胁。因此, 建立快速、灵敏和特异的血清学方法来检测 SS2 抗体不仅对该病的流行病学调查具有重要意义, 而且对临诊诊断、疫苗评价和猪群的免疫检测都具有应用价值。Gottschalk 等^[5-6] 及 Higgins 等^[7]

收稿日期: 2011-05-23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30972187); 国家农业科技成果转化基金资助项目 (011GB2D00007); 河南省科技攻关项目 (0624030030)

作者简介: 张九州 (1986-), 男, 硕士。

* 通讯作者, E-mail: wchuanq@163.com

分别用直接玻片凝集法鉴定 SS,相继确定了血清型 9~22,23~28 及血清型 29~34,但是由于 SS 的某些血清型之间存在交叉反应,在应用上有一定的缺陷。Gottschalk 等^[8]将制备的型特异性抗体血清制成多价协同凝集抗体,用该混合抗血清进行协同凝集试验,鉴定 SS 分离株的血清型。此方法主要用于检测抗原,在临床上首先要做病原分离,比较费时,不适合应用于大规模的抗体检测。Vecht 等^[9]分别建立了 2 个基于 MRP 和 EF 蛋白的双抗体夹心 ELISA。欧瑜等^[10]提纯分离株 HA9801 的 MRP 和 EF 蛋白,制备抗体,建立了斑点 ELISA 和间接 ELISA 方法,而这 2 个蛋白在 SS 其他血清型中也普遍存在,因此该方法不能作为临床诊断 SS2 感染的依据。本试验通过提取 SS2 的荚膜多糖(Capsular polysaccharide,CPS)并测其含量,优化致敏醛化鸡红细胞的条件,建立了检测 SS2 抗体的间接血凝方法。

1 材料与方法

1.1 试验菌株与血清 SS2 菌株 ZMDSC-1 由河南农业大学传染病实验室分离、鉴定和保存;猪大肠杆菌阳性血清、副猪嗜血杆菌阳性血清、沙门菌阳性血清、巴氏杆菌阳性血清、枯草杆菌阳性血清、猪肠球菌阳性血清、SS1、SS2、SS7 和 SS9 阳性血清均由笔者实验室制备和保存;SS2 阴性血清为健康兔血清;待检血清分别采集河南省的 59 个养殖场,血清总数为 1 044 份。

1.2 试剂 Bacto™ Todd Hewitt Broth (THB) 购自 BD 公司,弗氏完全和弗氏不完全佐剂、十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)购自 Sigma 公司。

1.3 动物 新西兰大白兔购自郑州大学医学院实验动物中心,许可证编码:SYXK(豫)2005-0012。

1.4 CPS 的提取及含量测定

1.4.1 CPS 的提取 参照文献^[11]介绍的方法并稍有改动。将保存的 SS2 菌株 ZMDSC-1 先划线接种到绵羊血平板上,37℃培养 18 h,挑取单个菌落接种到 5 mL THB 液体培养基中,37℃、195 r/min 恒温水浴振荡培养过夜,将所得细菌悬液 3 000 r/min 离心 10 min,收集菌体沉淀,用 PBS 液洗 3 遍,然后加入原菌液体积 10% 的细菌裂解液。在冰浴条件下,超声波(功率为 400 W,超声 9 s,间隔 10 s,超声 50 次)破碎所得 SS2 细胞壁。所得溶液 8 000 r/min 离心 5 min,收集上清。于其中加入终浓度为 1% 的 CTAB,充分混匀形成沉淀,离心,收集沉淀

物。沉淀物中加入 CaCl₂ 溶液,使最终浓度为 1 mol/L。摇匀 1 h,使多糖与 CTAB 解离,离心收集上清。加入异丙醇至最终浓度为 50%,4℃静置过夜,离心去核酸沉淀,收集上清。于上述收集液中加入预冷的乙醇至最终浓度为 80%,充分振摇,使多糖沉淀,离心收集沉淀多糖,用无水乙醇及丙酮各洗 2 次以上,此沉淀多糖即为粗提的 CPS。

1.4.2 CPS 含量测定 精确称取于 105℃烘干至恒重的葡萄糖 50 mg,配制成 0.1 g/L 的葡萄糖溶液。分别吸取 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6 mL,各补水至 2.0 mL,加入 8% 的苯酚溶液 1.0 mL 及浓硫酸 5.0 mL,摇匀,室温放置 30 min。在波长 490 nm 处测定吸光度,以 2.0 mL 双蒸水做空白对照。以吸光值 *D* 做横坐标,以葡萄糖浓度为纵坐标,得标准曲线。取制备好的样品溶液 1.0 mL,加水补至 2.0 mL,加入 8% 的苯酚溶液 1.0 mL 及浓硫酸 5.0 mL,摇匀。室温放置 30 min,在波长 490 nm 处测定吸光度,以标准曲线计算样品中多糖含量。

1.5 阳性血清的制备 将提取的 CPS 作为抗原,采用背部皮下多点注射免疫家兔,共免疫 3 次。首免用 0.6 mL CPS 加等量的弗氏完全佐剂;第 3、4 周分别以 0.6 mL CPS 加等量的弗氏不完全佐剂进行二免和三免。三免 1 周后心脏采血,分离血清。

1.6 鸡红细胞的醛化 无菌取健康鸡心脏血,加入到等量灭菌的阿氏液中 4℃静止 2 d。经双层纱布过滤后 3 000 r/min 离心 5 min,弃上清,用 pH7.2 的 PBS 洗 3 遍后配成 25 mL/L 悬液。把细胞溶液和 1% 戊二醛溶液先放在冰浴中冷却到 4℃,按沉积细胞 15 mL 加入 100 mL 1% 戊二醛溶液计算,在冰浴条件下将 1% 戊二醛溶液加到洗过的红细胞中,边加边摇匀。醛化时间选取 1 h,生理盐水洗 3 次,再用生理盐水恢复到原体积。取醛化红细胞(25 mL/L)悬液与等量最佳浓度的荚膜多糖混合,37℃水浴中 60 min,其间轻轻振荡 4~6 次。3 000 r/min 离心 5 min,弃上清,用生理盐水洗 2 次后,配成终浓度为 2.5% 的醛化红细胞悬液,按照 IHA 操作步骤检测阳性血清和阴性血清。

1.7 致敏条件的确定

1.7.1 最适致敏抗原用量的确定 将粗提的 CPS 用 0.15 mol/L PBS(pH6.4)溶液从 1:2 开始倍比稀释至 1:256 共 8 个稀释度。每个稀释度分别与等体积的醛化红细胞(25 mL/L)致敏后,用生理盐水洗涤 3 次,配制成 25 mL/L 的致敏红细胞悬液作为 IHA 抗原。按照 IHA 操作步骤检测阳性血清和阴性血清,呈现最高血凝效价的致敏红细胞所用的

粗提抗原含量即为 IHA 抗原致敏红细胞的最适抗原量。

1.7.2 最适致敏时间的确定 取最佳浓度的 CPS 与等量的醛化红细胞(25 mL/L)悬液,37℃水浴中分别致敏 30、60、90、120 min,其间轻轻振荡数次,3 000 r/min 离心 5 min,弃上清,用生理盐水洗 2 次后,配制成 25 mL/L 的致敏红细胞悬液,按照 IHA 操作步骤检测阳性血清和阴性血清,确定最适致敏时间。

1.8 IHA 的操作步骤 吸取 0.15 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH6.4) 25 μL 于 96 孔 V 型微量反应板孔中,吸取被检灭活血清 25 μL 于反应板的第 1 孔,依次倍比稀释至第 11 孔,每孔加 25 μL 不同多糖浓度抗原致敏红细胞悬液,第 12 孔为空白对照,仅加稀释液。另设下列对照:致敏红细胞加阳性血清、致敏红细胞加稀释液及致敏红细胞加阴性血清。在微型振荡器上轻轻振荡 1 min,使其充分混合,室温孵育 90 min 后观察结果。

1.9 检测结果判定 根据血凝试验的通常判定方法,“++++”表示红细胞 100%凝集,形成一层均匀膜,布满于整个孔底;“+++”表示红细胞 75%凝集,在孔底形成一层薄膜,面积比前者稍小;“++”表示红细胞 50%凝集,在孔底形成薄膜凝集,边缘松散或呈锯齿状;“+”表示红细胞 25%凝集,在孔底呈稀薄、散在、少量的凝集,孔底有小网点;“±”表示红

细胞沉于孔底,但周围不光滑或中心有空斑;“-”表示红细胞完全沉于孔底,呈光滑的圆点。出现++及其以上的血清最高稀释倍数为该血清的 SS2 抗体效价。计算阴性血清 SS2 抗体的平均 IHA 效价,当被检血清 SS2 抗体的 IHA 效价高于阴性血清的平均 IHA 效价时,该份被检血清判为 SS2 抗体阳性。

1.10 特异性、敏感性试验及临床应用 用该 IHA 诊断抗原按上述步骤检测猪大肠杆菌、副猪嗜血杆菌、猪肠球菌、SS1、SS7、SS9、金黄色葡萄球菌、沙门菌、巴氏杆菌阳性血清,观察有无交叉反应。用本方法与琼脂扩散试验(AGPT)同时检测阳性血清,比较其敏感性。对采集到的待检血清进行检测,了解省内不同地区猪群中 SS2 抗体的总阳性率,从血清抗体水平判断 SS2 的流行情况。

2 结果

2.1 葡萄糖标准曲线绘制和 CPS 含量的测定

2.1.1 绘制葡萄糖标准曲线 按照苯酚-硫酸法操作,得到不同的吸光值(表 1),由表 1 得葡萄糖标准曲线(图 1)。葡萄糖标准曲线回归方程为: $D = 0.050 + 0.005X$, D 为吸光度值, X 为多糖含量(mg/L),测定 CPS 溶液在 D_{490} 值为 0.095,由回归方程得到 CPS 的质量浓度为 9 mg/L。

表 1 不同浓度葡萄糖的吸光度

项目	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2	1.4	1.6
葡萄糖浓度/(mg·L ⁻¹)	0	10	20	30	40	50	60	70	80
D 值	0.046	0.104	0.157	0.213	0.276	0.310	0.354	0.411	0.488

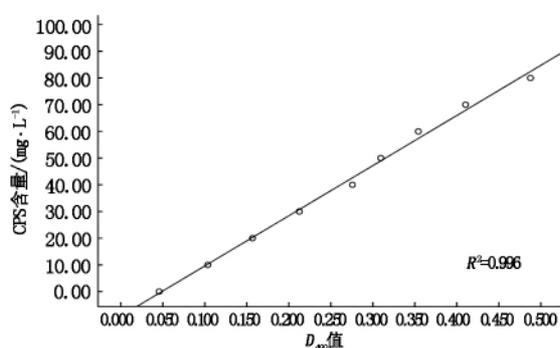


图 1 葡萄糖标准曲线

2.2 IHA 最佳抗原质量浓度的测定 用浓缩抗原小于或等于 1:8 稀释度致敏时(CPS 的质量浓度为 1.125 mg/L),血凝效价不再明显提高,故确定浓缩抗原以 1:8 稀释为最佳致敏浓度。用质量此浓度抗原制备的 2.5%致敏红细胞血凝效价高,且重复效果稳定。

2.3 IHA 最佳致敏时间的选取 结果见表 2。由表 3 可以看出最佳致敏时间为 90 min 时,阳性血清的间接血凝抗体效价最高。

表 2 致敏时间的选择

血凝效价	30 min	60 min	90 min	120 min
阳性血清的间接血凝抗体效价	1:2 ⁶	1:2 ⁸	1:2 ⁹	1:2 ⁸
阴性血清阳性的间接血凝抗体效价	0	0	0	0

2.4 浓缩 CPS 致敏红细胞后的 IHA 检测结果 将抗原按最佳抗原浓度稀释后致敏红细胞,分别检测

SS2 阳性兔血清、SS2 阴性兔血清,空白对照,结果见表 3。

表 3 致敏红细胞后 IHA 检测结果

血清	不同血清稀释度的凝集效果											
	1:2 ¹	1:2 ²	1:2 ³	1:2 ⁴	1:2 ⁵	1:2 ⁶	1:2 ⁷	1:2 ⁸	1:2 ⁹	1:2 ¹⁰	1:2 ¹¹	对照
阳性血清	++	++	++	++	++	++	++	++	++	-	-	-
阴性血清	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

2.5 间接血凝效价判定标准 采集 10 份未免疫的仔猪血清作为阴性血清,10 份用 SS2 疫苗免疫的猪血清作为阳性血清,其中 10 头非免疫猪的 IHA 效价 3 头为 0,6 头效价为 1:2,另外 1 头效价为 1:4;测的免疫猪的 IHA 效价最低为 1:16,因此,当被检猪血清 IHA 效价大于 1:16,血凝强度为 ++,即判定为阳性。

2.6 特异性试验、敏感性试验及临床血清样品的检测 本诊断方法与猪大肠杆菌、副猪嗜血杆菌、肠球菌、SS1、SS7、SS9、金黄色葡萄球菌、沙门菌和巴氏杆菌阳性血清及 SS2 阴性血清的 IHA 效价均小于 1:8。而已知 SS2 免疫阳性血清的 IHA 效价均大于 1:8,两者差异显著 ($P < 0.05$),表明该方法具有很强的特异性。用 AGPT 方法检测阳性的血清的效价为 1:24,效价比 IHA 低 5 个滴度,表明建立的 IHA 检测方法有很好的敏感性。应用此方法对河南省 59 个养殖场采集的 1 044 份猪血清进行 IHA 检测,SS2 抗体阳性 644 份,阳性率 61.69%。

3 讨论

SS 的感染最初是由荷兰的 Jansen 等^[12]和英国的 Field 等^[12,13]报道的。之后,SS 在所有的养猪业发达的国家均有报道。与这种微生物相关的感染在传统饲养和现代化养猪业中均有发生。从发病猪中分离到的 SS 大多属于有限的几个血清型,通常为 1~8 型,其中 SS2 菌株在大多数国家发病猪中都占主导地位^[14]。许多科研工作者都曾对屠宰场屠宰猪 SS 带菌情况进行调查,SS 带菌率为 10%~80%^[15-17]。特别是近年来,一些病毒感染使 SS 的致病性得到增强,特别是一些免疫抑制性的疾病,如猪繁殖与呼吸综合症、圆环病毒病等经常与 SS2 混合感染,给养猪业带来了巨大的安全隐患。因此,建立一种适合广大兽医化验人员使用的简单、快速、经济的检测 SS2 抗体的方法,会对诊断和防制此病提供一种有效的手段。

IHA 试验是一种操作简便、敏感性高、特异性强

的流行病学和辅助诊断的常用方法。IHA 试验致敏红细胞的抗原多为蛋白质和多糖,蛋白质抗原(或抗体)需有另外的成分参加方能致敏于红细胞上,而且只有在合适的条件下才能获得良好的血凝效果。而多糖抗原成分可以吸附于未经任何处理的红细胞上,在抗原致敏红细胞时,多糖抗原相比蛋白质抗原会省略一些步骤。用新鲜细胞做 IHA 试验,不论是致敏的或不致敏的新鲜细胞,保存时间均短,使用之前要临时致敏细胞,很不方便,不仅费时,而且由于不同批次或不同动物个体细胞的差异可造成研究结果的不一致,影响对结果的分析。为克服这些缺点,本试验选取 SS2 CPS 作为抗原,采用经戊二醛固定的细胞做 IHA 试验,经戊二醛固定的细胞,在 4℃ 冰箱中可保存半年以上,而无明显溶血,致敏后的敏感性新鲜细胞没有明显差别,而且醛化细胞可以真空冷冻干燥,制成冻干制剂长期保存。同时,本试验建立的检测方法,做到了对致敏原量化,为保证此方法的重复性、可靠性提供了保障。

本试验通过提取 CPS 来致敏醛化的红细胞,建立的 IHA 方法来检测 SS2 血清抗体,该方法对 SS2 抗体呈现明显的凝集反应,而对阴性血清和猪大肠杆菌、副猪嗜血杆菌、猪肠球菌、SS1、SS7、SS9、金黄色葡萄球菌、沙门菌、巴氏杆菌阳性血清都呈现阴性反应,说明本方法具有良好的特异性。应用 IHA 方法和 AGPT 方法分别对阳性血清进行检测,本方法的敏感性比 AGPT 方法高出 32 倍,表明此方法有很高的敏感性。通过对送检的 1 044 份猪血清的检测,阳性率达到 61.69%,说明 SS2 感染在河南省内流行很普遍。由于此菌是继发感染的主要病原菌,也是一种人兽共患病原菌,能够引起严重的公共卫生问题,所以应该引起人们足够的重视。

参考文献:

- [1] Smith H E, Buijs H, Wisselink H J, et al. Selection of virulence-associated determinants of *Streptococcus suis* serotype 2 by *in vivo* complementation [J]. *Infect Immun*, 2001, 69(3): 1961-1966.

- [2] Madsen L W, Svensmark B, Elvestad K, et al. *Streptococcus suis* serotype 2 infection in pigs; new diagnostic and pathogenetic aspects [J]. J Comp Pathol, 2002, 126(1): 57-65.
- [3] Beineke A, Bennecke K, Neis C, et al. Comparative evaluation of virulence and pathology of *Streptococcus suis* serotypes 2 and 9 in experimentally infected growers [J]. Vet Microbiol, 2008, 128(3/4): 423-430.
- [4] Gottschalk M, Segura M. The pathogenesis of the meningitis caused by *Streptococcus suis*; Unresolved questions [J]. Vet Microbiol, 2000, 76(3): 259-272.
- [5] Gottschalk M, Higgins R, Jacques M, et al. Isolation and characterization of *Streptococcus suis* capsular types 9-22 [J]. J Vet Diagn Invest, 1991, 3(1): 60-65.
- [6] Gottschalk M, Higgins R, Jacques M, et al. Characterization of six new capsular types (23 through 28) of *Streptococcus suis* [J]. J Clin Microbiol, 1991, 29(11): 2590-2594.
- [7] Higgins R, Gottschalk M, Boudreau M, et al. Description of six new capsular types (29-34) of *Streptococcus suis* [J]. J Vet Diagn Invest, 1995, 7(3): 405-406.
- [8] Gottschalk M, Higgins R, Boudreau M. Use of polyvalent coagglutination reagents for serotyping of *Streptococcus suis* [J]. J Clin Microbiol, 1993, 31(8): 2192-2194.
- [9] Vecht U, Wisselink H J, Anakotta J, et al. Discrimination between virulent and nonvirulent *Streptococcus suis* type 2 strains by enzyme-linked immunosorbent assay [J]. Vet Microbiol, 1993, 34(1): 71-82.
- [10] 欧瑜, 陆承平. 检测猪链球菌 2 型毒力相关蛋白的 ELISA 法的建立 [J]. 南京农业大学学报, 2001, 24(2): 94-97.
- [11] 孙焕, 杨宏军, 胡桂学等. 金黄色葡萄球菌荚膜多糖的提取及其多糖含量的测定 [J]. 中国农学通报, 2009, 25(6): 1-4.
- [12] Jansen E J, Van Dorssen C A. Meningoencephalitis bij varkens door *Streptococcus* [J]. Tijdschr Diergeneesk, 1951, 76: 815-832.
- [13] Field H I, Buntain D, Done J T. Studies on piglet mortality. I. Streptococcal meningitis and arthritis [J]. Vet Rec, 1954, 66: 453-455.
- [14] Koldkjaer O, Nielsen G. Haemolytic *Streptococcus* group R infection [J]. Br Med J, 1972, 3(5829): 765.
- [15] Clifton-Hadley F A, Alexander T J. The carrier site and carrier rate of *Streptococcus suis* type 2 in pigs [J]. Vet Rec, 1980, 107(2): 40-41.
- [16] Clifton-Hadley F A, Alexander T J, Enright M R, et al. Monitoring herds for *Streptococcus suis* type 2 by sampling tonsils of slaughter pigs [J]. Vete Rec, 1984, 115(22): 562-564.
- [17] Breton J, Mitchell W R, Rosendal S. *Streptococcus suis* in slaughter pigs and abattoir workers [J]. Can J Vet Res, 1986, 50(3): 338-341.

(上接 58 页)

- [7] Lee J Y, Lim J M, Kim D K, et al. Identification and gene expression profiling of the Pum1 and Pum2 members of the Pumilio family in the chicken [J]. Mol Reprod Dev, 2008, 75: 184-190.
- [8] 盛亚琳. 细胞黏附分子 CD44 与肿瘤关系的研究进展 [J]. 实用医技杂志, 2008, 15(7): 926-928.
- [9] Carre W, Wang X, Porter T E, et al. Chicken genomics resource: sequencing and annotation of 35,407 ESTs from single and multiple tissue cDNA libraries and CAP3 assembly of a chicken gene index [J]. Physiol Genomics, 2006, 25(3): 514-524.
- [10] Wang Yong, Wang Zhenggang, Li Juan, et al. Database for chicken full-length cDNAs [J]. Physiol Genomics, 2007, 28(2): 141-145.
- [11] 李淑玲, 田鹤, 郭敏. 小鼠肾发育中整合素 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ 及 $\alpha 5$ 的表达 [J]. 重庆医科大学学报, 2010, 35(5): 660-662.
- [12] 郭睿, 李喜霞, 王惠珍. 小鼠睾丸特异基因在生精细胞中阶段性表达的定量分析 [J]. 动物学杂志, 2009, 44(1): 39-46.
- [13] 马力群, 窦科峰. 黏附分子 CD44 的研究进展与肝外胆管癌 [J]. 宁夏医学杂志, 2001, 23(1): 60-62.