



doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2016.07.012  
http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1005-6947.2016.07.012  
Chinese Journal of General Surgery, 2016, 25(7):1005-1010.

· 基础研究 ·

## 碳水化合物反应元件结合蛋白在肝癌中表达与作用

耿西林, 张煜, 李晖, 郑伟, 张智勇, 海军, 杜立学

(陕西省人民医院 肝胆外科, 陕西 西安 710068)

### 摘要

**目的:** 探讨碳水化合物反应元件结合蛋白(ChREBP)在肝癌(HCC)中的表达与生物学作用。

**方法:** 分别用qRT-PCR、免疫组化、Western blot法检测73例HCC组织与癌旁组织以及多种HCC细胞系与正常肝细胞系中ChREBP的mRNA与蛋白表达;观察siRNA干扰ChREBP表达后,HCC细胞周期、凋亡以及增殖的变化。

**结果:** ChREBP的mRNA与蛋白表达在HCC组织中表达均明显高于癌旁组织、在所有HCC细胞系中均明显高于正常肝细胞系(均 $P<0.05$ )。干扰ChREBP表达后,HCC细胞发生明显 $G_1$ -S期阻滞、细胞增殖明显降低(均 $P<0.05$ ),但细胞凋亡未发生明显变化( $P>0.05$ )。

**结论:** ChREBP在HCC中表达升高,且可能通过调控细胞周期促进HCC细胞的增殖,从而在HCC的发展中起了重要的作用。

### 关键词

癌,肝细胞;抗原,肿瘤相关,碳水化合物;细胞周期;细胞增殖  
中图分类号: R735.7

## Expression of carbohydrate response element binding protein in hepatocellular carcinoma and its functions

GENG Xilin, ZHANG Yu, LI Hui, ZHENG Wei, ZHANG Zhiyong, HAI Jun, DU Lixue

(Department of Hepatobiliary Surgery, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an 710068, China)

### Abstract

**Objective:** To investigate the expression of carbohydrate response element binding protein (ChREBP) and its biological actions in hepatocellular carcinoma (HCC).

**Methods:** The mRNA and protein expressions of ChREBP in 73 specimens of HCC along with its adjacent tissue, as well as different HCC cell lines and normal hepatic cell line were determined by q-PCR, immunohistochemical staining and Western blot analysis, respectively. The changes in cell cycle, apoptosis and proliferation in HCC cells were observed after the siRNA interference of ChREBP2 expression.

**Results:** Both mRNA and protein expressions of ChREBP were significantly increased in HCC tissue compared with tumor-adjacent tissue, and significantly increased in all studied HCC cell lines compared with normal hepatic cell line (all  $P<0.05$ ). After interference of ChREBP2 expression, HCC cells presented significant  $G_1$ /S phase arrest and inhibition of proliferation (both  $P<0.05$ ), but apoptosis showed no significant change ( $P>0.05$ ).

**Conclusion:** ChREBP expression is elevated in HCC, which may probably promote proliferation of HCC cells through cell cycle regulation, and thereby plays an important role in the progression of HCC.

收稿日期: 2016-02-03; 修订日期: 2016-06-14。

作者简介: 耿西林, 陕西省人民医院主治医师, 主要从事肝胆系统恶性肿瘤方面的研究。

通信作者: 杜立学, Email: lixuedu\_xa@163.com

**Key words** Carcinoma, Hepatocellular; Antigens, Tumor-Associated Carbohydrate; proliferation; Cell Cycle; Cell Proliferation  
**CLC number:** R735.7

碳水化合物反应元件结合蛋白(carbohydrate response element binding protein, ChREBP)是重要的调控细胞糖脂代谢的转录因子,可直接转录调控糖酵解与脂肪酸合成关键酶表达<sup>[1-2]</sup>。肿瘤细胞能量代谢发生异常改变,其中糖酵解与脂肪酸合成均异常增强,促进了肿瘤的生长与转移<sup>[3-4]</sup>。目前,多个参与糖酵解与脂肪酸合成的关键分子被证实在肿瘤中表达异常增加,通过不同机制促进了肿瘤发生与进展<sup>[4]</sup>。

考虑到ChREBP是重要的调控糖脂代谢的转录因子,其在肝癌(HCC)中表达是否发生异常改变,在HCC发生进展中的作用均不清楚。本研究首先用qRT-PCR, Western blot及免疫组化染色方法,检测ChREBP在HCC与癌旁组织及HCC细胞系与正常肝细胞中表达,观察ChREBP在HCC中表达是否发生异常改变;其次在siRNA干扰ChREBP表达后,对ChREBP在HCC发生进展中的作用进行初步研究,分别用MTT及流式细胞分析方法,检测干扰ChREBP对HCC细胞增殖,周期与凋亡的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 HCC 细胞系与临床组织标本

**1.1.1 细胞系** 人HCC细胞株SMMC-7402, HepG2, MHCC-97L, MHCC-97H, SK-Hep-1, HUH-7与人正常肝细胞株L-02均购自中科院上海细胞库。细胞常规培养采用含10%胎牛血清(杭州四季青)的DMEM培养液,细胞置于含5%CO<sub>2</sub>培养箱中37℃培养。

**1.1.2 HCC 患者组织标本** 共收集2009年1月—2013年1月在我院行根治性手术切除且临床资料完整的HCC患者石蜡标本共73例,所有患者均经病理诊断确诊为HCC。73例患者中男49例,女24例;年龄29~78岁,平均53岁;肿瘤直径1.2~14.8 cm,平均6.7 cm;HbsAg阳性67例,阴性6例;TNM I/II期51例,III/IV期22例;高、中分化28例,低分化45例;血清AFP<200 μg/L者40例,≥200 μg/L者33例;8例患者合并门

静脉癌栓。

### 1.2 实验步骤与方法

**1.2.1 免疫组织化学染色操作步骤** 石蜡标本切片厚度为4 μm,切片依次经二甲苯脱蜡、梯度酒精水化、柠檬酸热修复、双氧水浸泡与血清封闭后,加入ChREBP抗体(1/250稀释),于4℃孵育过夜,弃去一抗并用PBS洗涤5 min×3次,后滴加即用型MaxVision™(福州迈新生物公司)试剂并于室温下孵育30 min,继续用PBS洗涤5 min×3次,滴加新鲜配制的DAB工作液,在光镜下显色3 min,苏木素复染3 min,自来水冲洗5 min×3次,切片经脱水透明后用树胶封片。最后,在镜下对ChREBP染色结果进行观察与评分。

**1.2.2 免疫组织化学染色结果分析** ChREBP染色强度评分采用半定量法,具体为:分别对显微镜下ChREBP阳性染色细胞所占百分比和强度给予评分。阳性细胞比率:每张切片在5个400倍视野下计数染色阳性细胞所占百分比,<5%计0分,5%~25%计1分,26%~50%计2分,51%~75%计3分,76%~100%计4分。阳性染色强度:阴性计0分,淡黄色计1分,棕黄色计2分,棕褐色计3分。最终阳性等级为阳性细胞比率与阳性染色强度乘积:0分计为阴性(-),1~4分计为弱阳性(+),5~8分计为阳性(++),9~12分计为强阳性(+++)。

**1.2.3 siRNA 干扰 HCC 细胞中 ChREBP 表达** 委托上海吉玛公司合成2个靶向ChREBP的siRNA干扰片段,正义链序列分别为:5'-CCAGAUGCGAGACAUGUUUUU-3'(siChREBP #1)与5'-AAGGCTGTTTCACCTGAGTTCCTGTCTC-3'(siChREBP #1)。无关对照siRNA正义链序列为:5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3'(siCtrl)。

siRNA转染细胞:以3×10<sup>5</sup>个细胞/孔的密度接种SK-Hep-1细胞至6孔板中,细胞于常规条件下过夜培养。利用脂质体lip2000转染试剂为载体进行转染,操作严格按脂质体lip2000说明书中流程进行,具体过程为:将靶向ChREBP的siRNA干扰片段与无关对照片段用不含血清的培养基稀释,同时,将脂质体lip2000用100 μL不含血清培养基稀

释,分别静置5 min,将稀释好的干扰片段与脂质体混合,轻柔混匀并静置25 min。用加样器将100  $\mu$ L的脂质体与siRNA干扰片段的混合液加入6孔板中,细胞置于培养箱中常规培养6 h后换液,培养24 h后收集细胞并进行细胞增殖、周期与凋亡检测。

**1.2.4 qRT-PCR** 分别提取正常肝与HCC细胞株中RNA并反转录为cDNA。检测ChREBP表达的引物序列为:GAAGCCACCCTATAGCTCCC,GAAGCCACCCTATAGCTCCC。actin作为内参,引物序列分别为:TGTGGGCATCAATGGATTTGG,ACACCATGTATTCCGGGTCAAT。用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算各组ChREBP的相对表达水平。

**1.2.5 Western blot** 分别提取正常肝与HCC细胞中总蛋白,BCA蛋白定量,将蛋白与上样缓冲液混合后煮沸10 min,蛋白加入10%的凝胶中,于80~120V电压下电泳约90 min。电泳结束后将凝胶中蛋白转移至PVDF膜,5%BSA室温封闭1.5 h,后加入ChREBP多克隆抗体(13256-1-AP,武汉三鹰生物公司)于4  $^{\circ}$ C孵育过夜,用含0.1%吐温20的PBS洗涤5 min $\times$ 3次,羊抗兔二抗(北京中杉金桥生物公司)室温孵育1.5 h,PBS洗涤5 min $\times$ 3次。最后,将发光液滴加至PVDF膜表面,用ECL发光系统进行图像采集与结果分析。

**1.2.6 细胞增殖检测** 提前对SK-Hep-1细胞进行ChREBP干扰处理,24 h后收集细胞并计数,细胞以 $0.8 \times 10^4$ 个/mL密度接种于96孔板,每孔体积为200  $\mu$ L。每天同一时间点对细胞增殖进行检测,加入事先配置好的MTT工作液20  $\mu$ L(浓度为5 mg/mL),将板子置于37  $^{\circ}$ C孵箱内孵育4 h。吸去上清,每孔加入150  $\mu$ L DMSO,置于摇床室温下振荡10 min,用酶标仪检测各孔在490 nm波长下的吸光值,以时间(天数)为横坐标,以吸光值为纵坐标绘制细胞生长曲线。

**1.2.7 细胞周期与凋亡检测** 提前对SK-Hep-1细胞进行ChREBP干扰处理,24 h后用胰酶消化并收集细胞(胰酶不含EDTA),将细胞用PBS洗3次,分别按细胞周期与凋亡试剂盒(晶美生物公司)操作说明对细胞染色,最后用流式细胞仪对结果进行分析。

### 1.3 统计学处理

采用SPSS 17.0软件进行统计学分析,实验组与对照组间差异显著性比较采用非配对t检验分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。73例HCC组织与癌旁组织中ChREBP表达差异分析采用 $\chi^2$ 检验进行比较。

## 2 结果

### 2.1 ChREBP在HCC组织中的表达

用qRT-PCR方法,在mRNA水平检测ChREBP在HCC患者癌与癌旁组织中表达,结果显示,HCC组织中ChREBP分子mRNA水平明显高于癌旁组织,差异有统计学意义( $P < 0.001$ ) (图1)。

进一步用免疫组化方法,在蛋白水平检测ChREBP在HCC患者癌与癌旁组织中表达,结果显示,ChREBP在HCC组织中染色阳性率为89.0% (65/73),在癌旁组织中染色阳性率为49.3% (36/73);73例患者中ChREBP在HCC组织染色强度高于癌旁组织者79.5% (58/73),ChREBP在HCC组织染色强度与癌旁组织相等者15.1% (11/73),ChREBP在HCC组织染色强度低于癌旁组织者5.5% (4/73)。ChREBP在HCC组织与癌旁组织中染色,阳性染色定位于细胞核(红色箭头所示)(图2A)。统计分析发现,ChREBP在HCC癌组织中染色强度明显高于癌旁组织( $P < 0.05$ ) (图2B)。

### 2.2 ChREBP在HCC细胞系中的表达

分别用qRT-PCR和Western blot方法,比较HCC细胞株SMMC-7402、HepG2、MHCC97L、MHCC97H、SK-Hep-1与人正常肝细胞株L0-2中ChREBP的表达。结果显示,在mRNA与蛋白水平,ChREBP在HCC细胞株SMMC-7402、HepG2、MHCC97L、MHCC97H、SK-Hep-1中表达均高于正常肝细胞系7702(图3)。其中SK-Hep-1细胞中ChREBP蛋白表达水平最高,后续功能研究采用siRNA干扰SK-Hep-1细胞中ChREBP表达后,对ChREBP的生物学功能进行研究。

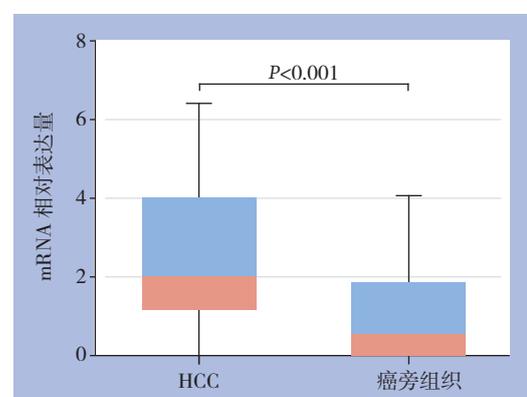


图1 HCC与癌旁组织中ChREBP的mRNA表达  
Figure 1 ChREBP mRNA expression levels in HCC and tumor-adjacent normal tissues

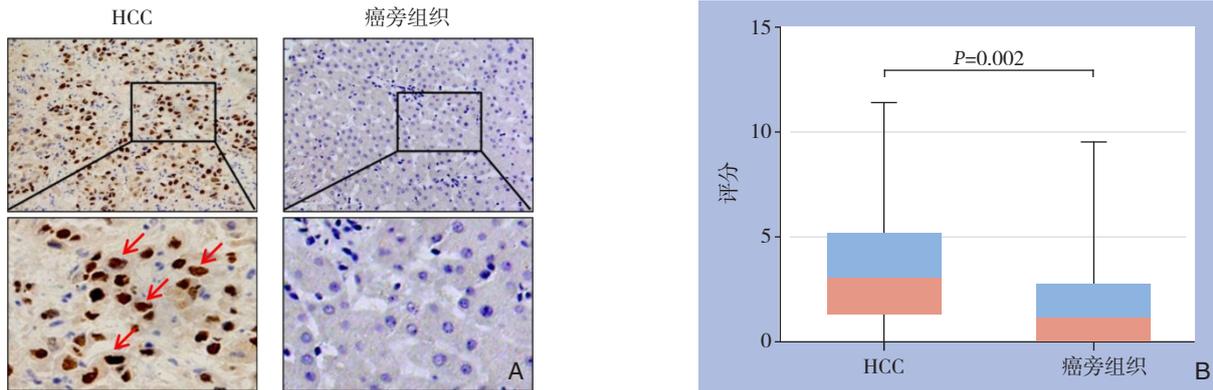


图 2 免疫组化检测 ChREBP 蛋白表达 A: 在 HCC 与癌旁组织中 ChREBP 免疫组化染色 (×400); B: ChREBP 在 HCC 与癌旁组织中表达强度比较

Figure 2 Immunohistochemical staining for ChREBP protein expression A: ChREBP staining in HCC and tumor-adjacent tissues (×400); B: Comparison of ChREBP expression intensities between HCC tissues and their adjacent non-tumor tissues

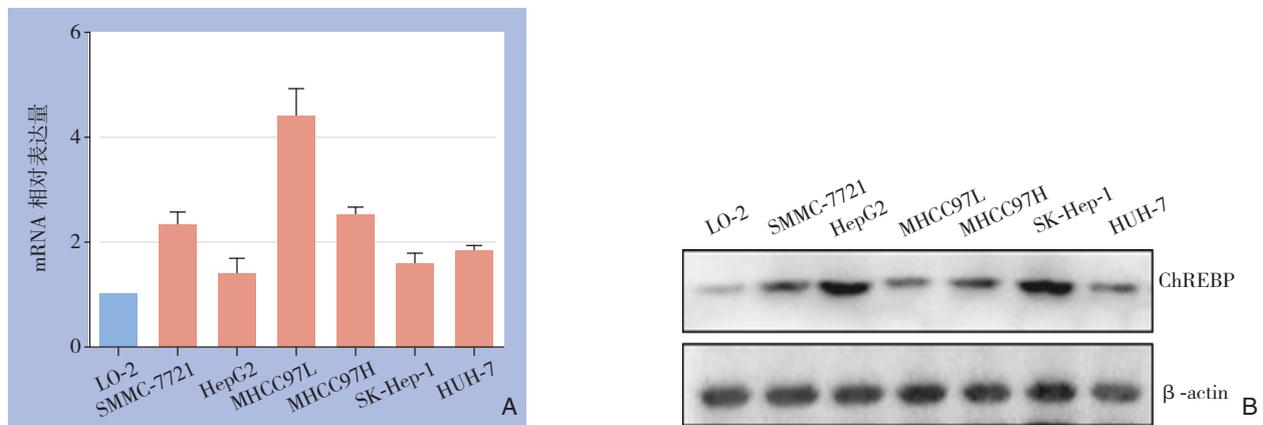


图 3 ChREBP 在正常肝细胞与不同 HCC 细胞系中的表达 A: ChREBP mRNA 表达; B: ChREBP 蛋白表达

Figure 3 ChREBP expressions in normal liver cell line and different HCC cell lines A: mRNA expression level; B: protein expression level

### 2.3 干扰效率检测

用合成的 2 个不同的靶向 ChREBP 的 siRNA 干扰片段 (siChREBP #1、siChREBP #2) 干扰 SK-Hep-1 细胞, 并对其干扰效率进行了鉴定。结果显示: siChREBP #1 (片段 1) 处理 SK-Hep-1 细胞后, ChREBP 表达明显降低, 而 siChREBP #2 处理 SK-Hep-1 细胞后, ChREBP 表达降低不明显 (图 4)。故后续实验中, 均选用 siChREBP #1 进行细胞处理。

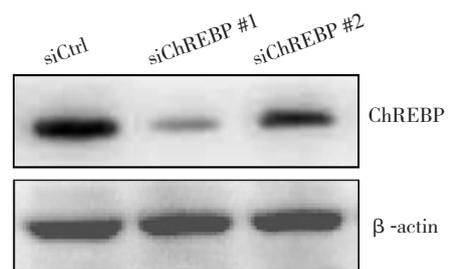


图 4 RNA 干扰效率的 Western blot 鉴定  
Figure 4 Western blot analysis of efficiency of RNA interference

### 2.4 ChREBP 对细胞凋亡与细胞周期的影响

siRNA 干扰 SK-Hep-1 细胞内 ChREBP 表达后, 用流式细胞仪检测细胞凋亡与周期的改变。结果显示, 干扰 ChREBP 后, 细胞凋亡未发生明显改变 ( $P > 0.05$ ) (图 5A), 而细胞周期发生 G<sub>1</sub>-S 期阻滞 ( $P < 0.05$ ) (图 5B)。

### 2.5 ChREBP 对 HCC 细胞增殖的影响

前部分研究显示, siRNA 干扰 ChREBP 表达可使 HCC 细胞发生 G<sub>1</sub>-S 期阻滞, 但不影响细胞周期。提示 ChREBP 可能促进 HCC 细胞增殖。因此, 进一步利用 siRNA 干扰 SK-Hep-1 细胞内 ChREBP 表达后, 用 MTT 法对细胞增殖进行了检测。结果证实, 干扰 ChREBP 后, SK-Hep-1 细胞增殖受到明显抑制 ( $P < 0.05$ ) (图 6)。

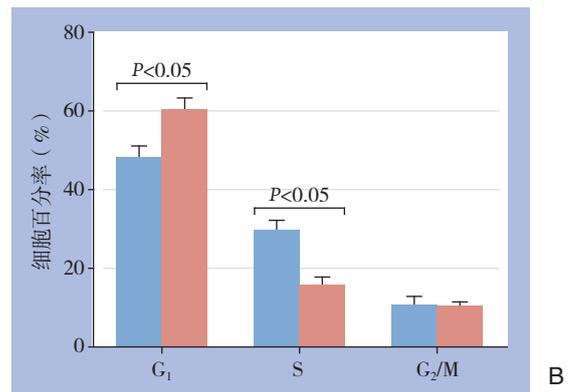
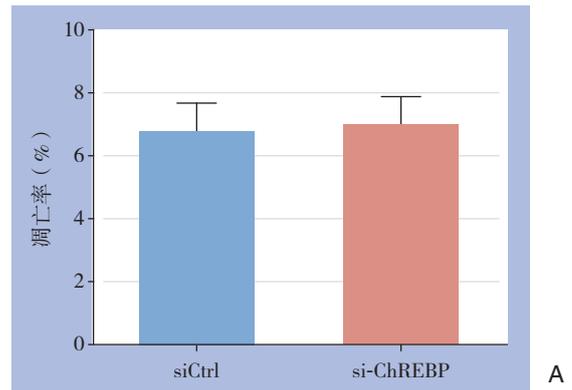
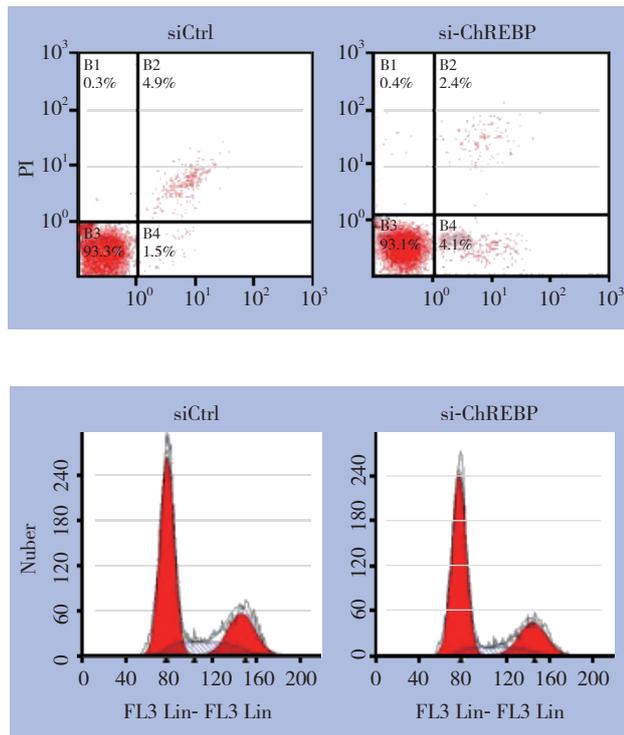


图 5 干扰 ChREBP 对 HCC 细胞凋亡与周期的影响 A: 对细胞凋亡的影响; B: 对细胞周期的影响

Figure 5 Effect of ChREBP interference on apoptosis and cell cycle of HCC cells A: Effect on apoptosis of HCC cells; B: Effect on cell cycle of HCC cells

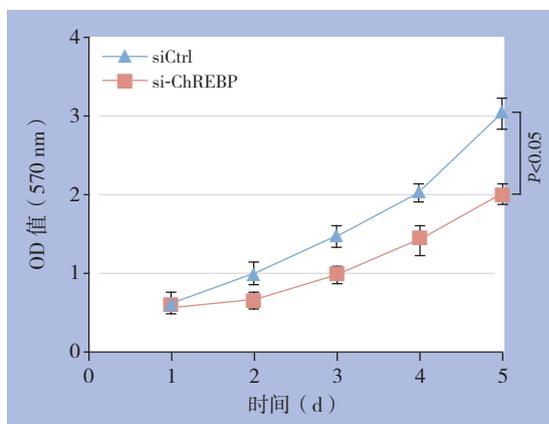


图 6 干扰 ChREBP 对 HCC 细胞增殖的影响

Figure 6 Effect of ChREBP interfere on cell proliferation of HCC cells

### 3 讨论

HCC 是威胁人类健康的重要疾病<sup>[5-6]</sup>, 手术切除仍是最有效的治疗手段<sup>[7-8]</sup>, 此外还包括 TACE 等姑息治疗<sup>[9]</sup>。寻找 HCC 发生发展的关键驱动因子是研究的重点。肿瘤作为一种代谢性疾病已被广泛

接受, 其代谢异常主要表现为糖酵解与脂肪酸合成活性的增强<sup>[10-13]</sup>。ChREBP 最初被发现与丙酮酸激酶 (LPK) 基因启动子区碳水化合物反应元件相结合的蛋白质, 后将其命名为碳水化合物反应元件结合蛋白<sup>[14-16]</sup>。大量研究<sup>[17]</sup>已证实 ChREBP 调控的靶基因主要集中在糖酵解与脂肪酸合成, 进而在糖脂代谢中发挥重要的调控作用。

作为糖酵解与脂肪酸合成调控的关键分子, ChREBP 在肿瘤中表达与作用值得肿瘤研究者关注。然而, ChREBP 在肿瘤中表达与生物学作用研究较少。乳腺癌中研究发现 ChREBP 促进乳腺癌糖酵解表型, ChREBP 表达与乳腺癌转移及患者预后显著相关<sup>[18]</sup>。ChREBP 能促进结肠癌细胞糖酵解与脂肪酸合成, 促进结肠癌细胞 HCT116 的增殖<sup>[19]</sup>。前列腺癌中研究证实, ChREBP 促进雄激素转录活性<sup>[20]</sup>。

本研究首次证实: ChREBP 在 HCC 组织与细胞中表达均异常升高, 利用 siRNA 方法干扰 ChREBP 表达后, 细胞周期发生 G<sub>1</sub>-S 阻滞, 细胞增殖被抑制, 而细胞凋亡无显著变化。提示 HCC 中 ChREBP 高表达可能通过促进糖酵解与脂肪酸合成, 进而

促进HCC生长。糖酵解与脂肪酸合成增强，一方面可通过增加6-磷酸果糖等糖酵解中间产物及细胞膜磷脂成份，为HCC细胞快速增殖所需生物大分子合成提供原料<sup>[21]</sup>。另一方面，通过增加脂代谢中间产物与脂肪酸翻译后修饰，对肝癌细胞增殖和生长信号通路进行正向调控<sup>[22]</sup>。

本研究结果提示，ChREBP异常高表达是促进肝癌恶性进展的主要因素之一，通过siRNA或小分子药物靶向抑制ChREBP表达或可通过抑制HCC细胞增殖而用于HCC临床治疗。本研究将为以肿瘤代谢特征为靶标的HCC靶向治疗提供新的理论支持。

### 参考文献

- [1] Iizuka K. Recent progress on the role of ChREBP in glucose and lipid metabolism[J]. *Endocr J*, 2013, 60(5):543-555.
- [2] Iizuka K, Horikawa Y. ChREBP: a glucose-activated transcription factor involved in the development of metabolic syndrome [J]. *Endocr J*, 2008, 55(4):617-624.
- [3] Martinez-Outschoorn UE, Peiris-Pagés M, Pestell RG, et al. Cancer metabolism: a therapeutic perspective [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2016. [Epub ahead of print]
- [4] Aminzadeh S, Vidali S, Sperl W, et al. Energy metabolism in neuroblastoma and Wilms tumor[J]. *Transl Pediatr*, 2015, 4(1):20-32.
- [5] 周俭, 肖永胜. 肝癌的转化医学研究——从基础到临床[J]. *中国普通外科杂志*, 2016, 25(1):1-5.  
Zhou J, Xiao YS. Translational medical research of hepatocellular carcinoma: from bench to bedside[J]. *Chinese Journal of General Surgery*, 2016, 25(1):1-5.
- [6] De Minicis S, Marzioni M, Benedetti A, 等. 肝细胞癌的新见解: 从实验到临床[J]. *中国普通外科杂志*, 2015, 24(1):1-9.  
De Minicis S, Marzioni M, Benedetti A, et al. New insights in hepatocellular carcinoma: from bench to bedside[J]. *Chinese Journal of General Surgery*, 2015, 24(1):1-9.
- [7] 敖劲, 曾令雯, 刘衡, 等. 原发性肝癌DSA表现与TACE疗效的关系分析[J]. *中国普通外科杂志*, 2016, 25(1):51-56.  
Ao J, Zeng LW, Liu H, et al. Analysis of relationship between DSA findings and efficacy of TACE therapy in primary liver cancer[J]. *Chinese Journal of General Surgery*, 2016, 25(1):51-56.
- [8] 王新青, 卜阳, 于松宁, 等. 精准肝切除治疗原发性肝癌近期疗效的Meta分析[J]. *中国普通外科杂志*, 2016, 25(1):57-67.  
Wang XQ, Bo Y, Yu SN, et al. Short-term efficacy of precise hepatectomy for primary liver cancer: a Meta-analysis[J]. *Chinese Journal of General Surgery*, 2016, 25(1):57-67.
- [9] 郁晓峰, 龚先锋, 张洋, 等. 联合血管切除在手术治疗肝门部胆管癌中作用的Meta分析[J]. *中国普通外科杂志*, 2016, 25(2):162-174.  
Yu XF, Gong XF, Zhang Y, et al. Combined vascular resection in surgical treatment of hilar cholangiocarcinoma: a Meta-analysis [J]. *Chinese Journal of General Surgery*, 2016, 25(2):162-174.
- [10] Romero-Garcia S, Lopez-Gonzalez JS, Báez-Viveros JL, et al. Tumor cell metabolism: an integral view[J]. *Cancer Biol Ther*, 2011, 12(11):939-948.
- [11] Kishton RJ, Rathmell JC. Novel therapeutic targets of tumor metabolism[J]. *Cancer J*, 2015, 21(2):62-69.
- [12] Santos CR, Schulze A. Lipid metabolism in cancer[J]. *FEBS J*, 2012, 279(15):2610-2623.
- [13] Zhang Y, Yang JM. Altered energy metabolism in cancer: a unique opportunity for therapeutic intervention[J]. *Cancer Biol Ther*, 2013, 14(2):81-89.
- [14] Benhamed F, Filhoulaud G, Caron S, et al. O-GlcNAcylation Links ChREBP and FXR to Glucose-Sensing[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2014, 5:230. doi: 10.3389/fendo.2014.00230.
- [15] Filhoulaud G, Guilmeau S, Dentin R, et al. Novel insights into ChREBP regulation and function[J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2013, 24(5):257-268.
- [16] Baraille F, Planchais J, Dentin R, et al. Integration of ChREBP-Mediated Glucose Sensing into Whole Body Metabolism[J]. *Physiology (Bethesda)*, 2015, 30(6):428-437.
- [17] Uyeda K, Yamashita H, Kawaguchi T. Carbohydrate responsive element-binding protein (ChREBP): a key regulator of glucose metabolism and fat storage [J]. *Biochem Pharmacol*, 2002, 63(12):2075-2080.
- [18] Airley RE, McHugh P, Evans AR, et al. Role of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) in generating an aerobic metabolic phenotype and in breast cancer progression[J]. *Br J Cancer*, 2014, 110(3):715-723.
- [19] Tong X, Zhao F, Mancuso A, et al. The glucose-responsive transcription factor ChREBP contributes to glucose-dependent anabolic synthesis and cell proliferation[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(51):21660-21665.
- [20] Wang XL, Wen XF, Li RB, et al. Chrebp regulates the transcriptional activity of androgen receptor in prostate cancer[J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(8):8143-8148.
- [21] Li Z, Zhang H. Reprogramming of glucose, fatty acid and amino acid metabolism for cancer progression. *Cellular and molecular life sciences* [J]. *CMLS*, 2016, 73(2): 377-392.
- [22] Santos CR, Schulze A. Lipid metabolism in cancer[J]. *FEBS J*, 2012, 279(15): 2610-2623.

( 本文编辑 姜晖 )

**本文引用格式:** 耿西林, 张煜, 李晖, 等. 碳水化合物反应元件结合蛋白在肝癌中表达与作用[J]. *中国普通外科杂志*, 2016, 25(7):1005-1010. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2016.07.012

**Cite this article as:** Geng XL, Zhang Y, Li H, et al. Expression of carbohydrate response element binding protein in hepatocellular carcinoma and its functions[J]. *Chin J Gen Surg*, 2016, 25(7):1005-1010. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2016.07.012