



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2014.11.011
http://www.zpwz.net/CN/abstract/abstract4099.shtml

· 基础研究 ·

EZH2 和 CBX7 在乳腺癌中的表达及其临床意义

严文君, 冯爱强, 张彦武, 李庆辉

(郑州大学第三附属医院 乳腺一科, 河南 郑州 450000)

摘要

目的: 探讨 zeste 基因增强子同源物 2 (EZH2) 和色素框同源物 7 (CBX7) 在乳腺癌组织中的表达及其临床意义。

方法: 采用 RT-PCR 和免疫组织化学染色 SP 法检测 EZH2 和 CBX7 基因与蛋白在正常乳腺组织、乳腺良性肿瘤组织、乳腺癌组织中的表达。分析乳腺癌组织中两者表达之间的关系, 以及两者表达与乳腺癌临床病理因素的关系。

结果: 正常乳腺组织、乳腺良性肿瘤组织及乳腺癌组织中 EZH2 mRNA 表达量与蛋白表达率依次明显增高, 而 CBX7 mRNA 与蛋白表达率依次明显降低, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$); 乳腺癌组织中 EZH2 和 CBX7 mRNA 与蛋白表达均呈负相关 ($r = -0.414$, $P = 0.008$; $r = -1.000$, $P = 0.015$); 两者的 mRNA 与蛋白表达水平均与淋巴结转移情况及临床分期有关 (均 $P < 0.05$), 而与患者的年龄、绝经状况、肿瘤大小、组织学分级无关 (均 $P > 0.05$)。

结论: 乳腺组织中 EZH2 表达升高、CBX7 表达降低, 两者间的相互作用可能参与了乳腺组织恶性转变及乳腺癌的浸润转移。
[中国普通外科杂志, 2014, 23(11):1512-1516]

关键词

乳腺肿瘤; zeste 基因增强子同源物 2; 色素框同源物 7
中图分类号: R737.9

Expressions of EZH2 and CBX7 in breast cancer and their clinical significance

YAN Wenjun, FENG Aiqiang, ZHANG Yanwu, LI Qinghui

(Department of Breast Surgery, the Third Affiliated Hospital, Zhengzhou University, Zhengzhou 450000, China)

Corresponding author: DU Jialing, Email: 13952787175@163.com

ABSTRACT

Objective: To investigate the expressions of enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) and chromobox homolog 7 (CBX7) in breast cancer tissue and their clinical significance.

Methods: The gene and protein expressions of EZH2 and CBX7 in normal mammary tissues, benign breast tumor tissues and breast cancer tissues were determined by RT-PCR and immunohistochemical staining, respectively. The relationship between EZH2 and CBX7 expressions in breast cancer tissue, and the relations of their expressions with clinicopathologic factors of breast cancer were analyzed.

Results: In normal mammary tissue, benign breast tumor tissue and breast cancer tissue, both EZH2 mRNA expression level and protein expression rate were increased significantly in an increasing order, whereas those of CBX7 showed exactly opposite patterns, and all the differences reached statistical significance.

收稿日期: 2014-05-21; 修订日期: 2014-10-10。

作者简介: 严文君, 郑州大学第三附属医院住院医师, 主要从事乳腺癌基础与临床方面的研究。

通信作者: 冯爱强, Email: 521neverland@gmail.com

(all $P < 0.05$). Both the mRNA and protein expression between EZH2 and CBX7 in breast cancer tissue exhibited a significant negative correlation ($r = -0.414$, $P = 0.008$; $r = -1.000$, $P = 0.015$). Both mRNA and protein expression of EZH2 and CBX7 were significantly related to lymph node metastasis and clinical stage (all $P < 0.05$), but not associated with the age, menstrual status, tumor size or histologic classification of the patient (all $P > 0.05$).

Conclusion: EZH2 expression is increased and CBX7 expression is decreased in breast cancer tissue, and the reciprocity between them may participate in the processes of the malignant transformation of breast tissue as well as invasion and metastasis of breast cancer.

[Chinese Journal of General Surgery, 2014, 23(11):1512-1516]

KEYWORDS Breast Neoplasms; Enhancer of Zeste Homolog 2; Chromobox Homolog 7

CLC number: R737.9

色素框同源物 7 (chromobox homolog 7, CBX7) 和 zeste 基因增强子同源物 2 (enhancer of zeste homolog 2, EZH2) 同属于多梳基因家族 (polycomb group, PcG) 成员, 该家族通过形成多梳蛋白复合物 (PRC) 从表观遗传学的角度介导相应靶基因沉默, 在肿瘤的发生发展、细胞的分化、细胞衰老过程中发挥重要作用。EZH2 与 CBX7 分别参与形成 PRC2 与 PRC1, 促使相应组蛋白甲基化^[1]。研究^[2-3]证明, EZH2 和 CBX7 的表达水平与多种肿瘤的恶性转化及发展、预后相关。本研究旨在探讨 EZH2 和 CBX7 在乳腺癌中的表达水平, 进一步研究其与乳腺癌临床病理特征及其预后间的关系, 了解其在乳腺癌发生发展中的作用。

1 材料与方法

1.1 标本及一般资料

1.1.1 标本 2013 年 8 月—2014 年 1 月在我院手术治疗的女性乳腺癌患者 40 例, 年龄 25~76 岁, 平均年龄 (50.45 ± 9.378) 岁; 其中浸润性导管癌 29 例, 导管内癌 5 例, 髓样癌 3 例, 黏液癌 3 例。乳腺癌临床分期参照乳腺癌 TNM 分期 (2009 年 AJCC 第七版) 标准^[4]进行, I 期 8 例, II 期 25 例, III 期 7 例; 乳腺癌组织学分级参照 2003 年《乳腺癌组织病理学分类》标准^[5]进行, I 级 7 例, II 级 27 例, III 级 6 例。以同期正常乳腺组织 (取癌灶边缘 5~7 cm 经病理学证实正常的乳腺组织) 20 例作为对照, 另取乳腺良性肿瘤组织 20 例。所有组织标本经术后病理学证实, 术前均未行放、化疗及内分泌治疗。所有标本于术中离体 30 min 内取材,

1 份立即置于液氮中, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存, 另 1 份经 10% 福尔马林溶液固定, 石蜡包埋, 切片备用。

1.1.2 试剂 超纯 RNA 提取试剂盒 (Ultrapure RNA Kit) 购自康为世纪公司。CBX7 和 EZH2 及 β -actin 上下游引物均购自金斯瑞生物科技有限公司, CBX7 (175 bp) 引物序列: 上游为: 5'-GCT GGT TTT CCC CTT TTC TC-3', 下游为 5'-AAG CCT CTC TGA AGG GGA AG-3'; EZH2 (179 bp) 引物序列: 上游为: 5'-CCA AGA GAG CCA TCC AGA CT-3', 下游为: 5'-ATT GCC CAC AGT ACT CGA GG-3'; 内参照 β -actin (285 bp) 引物序列: 上游为 5'-GTG GGG CGC CCC AGG CAC CA-3'; 下游为 5'-CTC CTT AAT GTC ACG CAC GAT TTC-3'。ReverTra Ace qPCR RT Master Mix 试剂盒购自 TOYOBO 公司。Faststart universal sybr green master (ROX) 购自罗氏公司。免疫组化染色试剂盒及 CBX7 和 EZH2 抗体购自北京博奥森公司。DAB 显色试剂盒购自 BOSTER 生物有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 RT-PCR 检测 CBX7 和 EZH2 mRNA 的表达 用超纯 RNA 提取试剂盒提取各乳腺组织的总 RNA。对目的序列 CBX7、EZH2 和内参 β -actin 进行 RT-PCR, 按照 TagPCR Kit 试剂盒 (Toyobo Company) 说明进行: $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 min, $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min, $98\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。荧光定量 PCR 仪反应条件: $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min, $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 10 min, $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 15 s, $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 60 s, 40 个循环。RT-PCR 的结果采用相对定量 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 方法计算, 结果以均数 \pm 标准差表示。

1.2.2 免疫组织化学染色 SP 法检测 CBX7 和

EZH2 蛋白的表达 CBX7 抗体和 EZH2 抗体工作浓度均为 1:300。将组织切片常规脱蜡水化, 3% H_2O_2 处理灭活内源性过氧化物酶, 柠檬酸钠微波抗原修复, 血清封闭, 滴加一抗, 4℃过夜。以磷酸盐缓冲液 (PBS) 代替抗体做空白对照, 二氨基联苯胺 (DAB) 显色后, 苏木素复染、水洗、常规脱水透明, 中性树胶封片镜检。EZH2 和 CBX7 蛋白均定位于细胞核, 排除非特异性染色, 在细胞核区域出现清晰棕黄色染色的细胞即为阳性细胞, 采用双盲发对染色结果进行评估, 光学显微镜高倍视野 ($\times 100$) 下随机选取 10 个视野, 以着色细胞数占视野细胞总数的百分比计分: $\leq 10\%$ 的核阳性记为 1 分, 11%~50% 核阳性记为 2 分, 51%~75% 核阳性记为 3 分, $>75\%$ 核阳性记为 4 分; 另外, 根据染色强度进行计分, 阴性无着色为 1 分, 浅黄色为 2 分, 黄色为 3 分, 棕黄色色 4 分, 根据上述两者乘积作为总积分, ≤ 1 分为阴性, >1 分为阳性^[6]。

1.3 统计学处理

采用统计软件 SPSS 17.0 对实验数据进行分析, RT-PCR 结果中两组资料采用 t 检验, 多组资料采用方差分析和秩和检验; 免疫组化结果采用确

切概率法。EZH2 和 CBX7 表达之间行 Pearson 相关分析, 以 $\alpha=0.05$ 为显著性检验水准。

2 结果

2.1 人乳腺癌组织中 EZH2 和 CBX7 的 mRNA 及蛋白表达

正常乳腺组织、乳腺良性肿瘤组织及乳腺癌组织中 EZH2 mRNA 相对表达量依次明显增高, 分别为 1.001 ± 0.074 、 1.557 ± 0.193 、 2.546 ± 0.357 ; CBX7 mRNA 相对表达量依次明显降低, 分别为 0.999 ± 0.034 、 0.953 ± 0.022 、 0.495 ± 0.014 , 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。正常乳腺组织、乳腺良性肿瘤组织及乳腺癌组织中 EZH2 蛋白表达率依次明显增高, 分别为 20.0% (4/20)、30.0% (6/20)、65.0% (26/40); CBX7 的蛋白表达率依次明显降低, 分别为 85.0% (17/20)、75.0% (15/20)、35.0% (14/40), 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。CBX7 与 EZH2 蛋白的阳性表达见图 1。

相关性分析显示, 乳腺癌组织中 EZH2 与 CBX7 mRNA 及蛋白表达水平之间呈负相关 ($r = -0.414$, $P = 0.008$; $r = -1.000$, $P = 0.015$)。

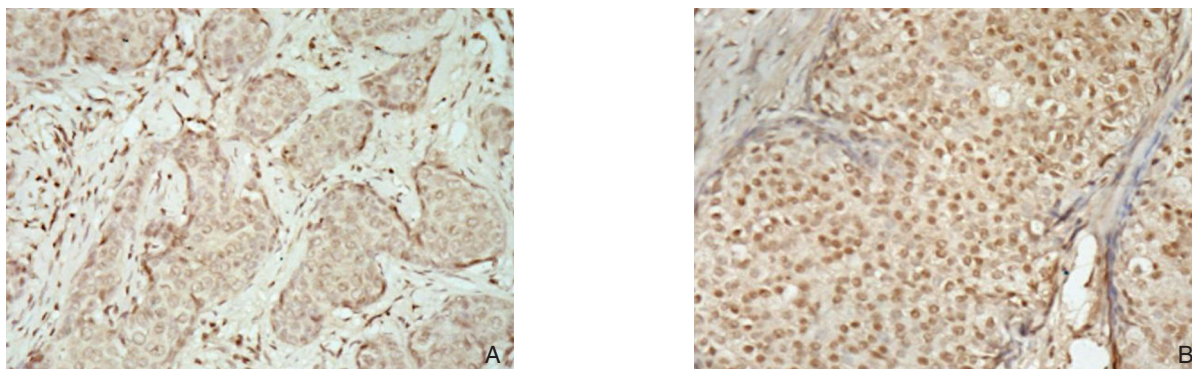


图 1 免疫组化检测乳腺癌组织中 CBX7 与 EZH2 蛋白表达 ($\times 100$) A: CBX7 蛋白表达; B: EZH2 蛋白表达

Figure 1 Immunohistochemical staining for protein expression of CBX7 and EZH2 in breast cancer tissues ($\times 100$) A: CBX7 protein expression; B: EZH2 protein expression

2.2 人乳腺癌组织中 EZH2 和 CBX7 的表达与临床病理特征的关系

EZH2 与 CBX7 mRNA 表达水平和蛋白阳性率与淋巴结转移情况及临床分期有关 (均 $P < 0.05$),

而与患者的年龄、绝经状况、肿瘤大小及组织学分类无关 (均 $P > 0.05$)。其中临床分期高、淋巴结转移数目多的乳腺癌组织中, EZH2 表达增高, CBX7 表达降低 (均 $P < 0.05$) (表 1)。

表 1 EZH2 和 CBX7 的 mRNA 与蛋白表达与乳腺癌临床病理因素的关系

Table 1 Relations mRNA and protein expression of EZH2 and CBX7 with the clinicopathologic factors of breast cancer											
临床病理因素	n	EZH2 mRNA	P	CBX7 mRNA	P	EZH2 蛋白 [n (%)]		P	CBX7 蛋白 [n (%)]		P
						(+)	(-)		(+)	(-)	
年龄 (岁)											
< 40	7	2.520 ± 0.394		0.499 ± 0.017		5 (71.4)	2 (28.6)		3 (42.9)	4 (57.1)	
40~59	23	2.486 ± 0.355	0.287	0.494 ± 0.014	0.603	16 (69.6)	7 (30.4)	0.652	7 (30.4)	16 (69.6)	0.729
≥ 60	10	2.700 ± 0.321		0.493 ± 0.015		5 (50.0)	5 (50.0)		4 (40.0)	6 (60.0)	
绝经状况											
未绝经	14	2.468 ± 0.340	0.343	0.497 ± 0.016	0.487	7 (50.0)	7 (50.0)	0.178	4 (28.6)	10 (71.4)	0.730
已绝经	26	2.583 ± 0.364		0.494 ± 0.014		19 (73.1)	7 (26.9)		10 (38.5)	16 (61.5)	
肿瘤大小											
T ₁	14	2.565 ± 0.331		0.492 ± 0.016		7 (50.0)	7 (50.0)		2 (14.3)	12 (85.7)	
T ₂	20	2.527 ± 0.297	0.950	0.495 ± 0.013	0.332	15 (75.0)	5 (25.0)	0.321	9 (45.0)	11 (55.0)	0.127
T ₃	6	2.562 ± 0.607		0.502 ± 0.017		4 (66.7)	2 (33.3)		3 (50.0)	3 (50.0)	
淋巴结转移											
N ₀	15	2.403 ± 0.311		0.499 ± 0.147		7 (46.7)	8 (53.3)		10 (66.7)	5 (33.4)	
N ₁	18	2.800 ± 0.231	0.000	0.491 ± 0.005	0.007	12 (66.7)	6 (33.3)	0.044	4 (22.2)	14 (77.8)	0.002
N _{>1}	7	2.889 ± 0.286		0.480 ± 0.144		7 (100.0)	0 (0.0)		0 (0.0)	7 (100.0)	
临床分期											
I	8	2.405 ± 0.286		0.507 ± 0.011		3 (37.5)	5 (62.5)		7 (87.5)	1 (12.5)	
II	25	2.468 ± 0.319	0.001	0.493 ± 0.014	0.002	16 (64.0)	9 (36.0)	0.047	7 (28.0)	18 (72.0)	0.001
III	7	2.981 ± 0.228		0.489 ± 0.013		7 (100.0)	0 (0.0)		0 (0.0)	7 (100.0)	
组织学分级											
I	7	2.785 ± 0.385		0.493 ± 0.011		4 (57.1)	3 (42.9)		2 (28.6)	5 (71.4)	
II	27	2.515 ± 0.347	0.115	0.495 ± 0.015	0.885	19 (70.4)	8 (29.6)	0.548	8 (29.6)	19 (70.4)	0.247
III	6	2.405 ± 0.282		0.497 ± 0.019		3 (50.0)	3 (50.0)		4 (66.7)	2 (33.3)	

3 讨 论

传统观点认为肿瘤发生机制是获得性的序列性基因突变导致原癌基因激活和抑癌基因的抑制。如今大量证据表明,其机制还包括表观遗传学的改变,主要有基因组的缺失和基因片段 DNA 的甲基化以及组蛋白转录后的异常修饰,整个过程未改变 DNA 的初始序列^[2]。CBX7 和 EZH2 通过这种修饰发挥靶基因的沉默作用^[7]。

本研究结果表明, EZH2 mRNA 及蛋白在正常乳腺组织、乳腺良性肿瘤组织、乳腺癌组织中的表达依次递增 (均 $P < 0.05$), CBX7 mRNA 及蛋白的表达则依次递减 ($P < 0.05$)。EZH2 与 CBX7 mRNA 和蛋白表达在乳腺癌组织中呈负相关。提示 EZH2 的表达增高和 CBX7 的表达缺失可能与乳腺癌的发生发展相关。CBX7 同 EZH2 均与 DNA 甲基化转移酶相互作用, EZH2 介导无活性染色质,同其他甲基化原子团一起参与 H3K27 的甲基化^[8]。EZH2 蛋白表达上调会引起靶基因的转录抑制,这些基因参与细胞的分化增殖、DNA 的修复,他们的改变将导致肿瘤的发生。乳腺肿瘤起始细胞中 EZH2

表达增加会下调基因损伤修复蛋白,基因突变增多并积累,同时解除对 RAF1-ERK 信号通路的控制,促进了癌症的进展^[9]。EZH2 在肝癌、卵巢癌、前列腺癌等表达升高,与癌症的进展及其较差的预后相关,被列为候选癌基因^[10]。CBX7 缺失后对 HDAC2 (histone deacetylase 2) 的抑制作用减弱, HDAC 下调 E-钙黏蛋白表达的功能增强。CBX7 使 E-钙黏连蛋白启动子上的组蛋白乙酰化致其上调 E-钙黏连蛋白表达的作用减弱^[11],导致肿瘤的浸润转移。Kim 等^[12]发现 CBX7 通过抑制 Wnt/ β -catenin/T 细胞因子途径提高 Dickkopf-1 的表达,从而抑制乳腺肿瘤的发生。CBX7 还可通过控制 microRNA 参与早期乳腺癌的进展^[13]。

本实验结果显示, EZH2 mRNA 及蛋白表达与淋巴结转移情况和临床分期呈正向关系, CBX7 mRNA 及蛋白表达与淋巴结转移情概况和临床分期呈负向关系。提示了 EZH2 与 CBX7 在基因和蛋白的水平均参与了乳腺癌的发生、发展及侵袭转移,且二者存在负相关的关系。推测乳腺癌组织中 CBX7 的低表达、EZH2 的过表达均与乳腺癌的不良预后相关。研究^[14]发现,在患乳腺良性肿瘤

的患者中, 疾病进展为乳腺癌的患者同未发展至癌症的患者相比, EZH2 存在明显上调, 其上调可能预示着无明显组织病理学改变的早期乳腺癌疾病进展的风险性增加。研究^[15]证实, CBX7 表达降低与甲状腺癌的恶性表型及较差的预后相关, 恢复 CBX7 的表达可降低人甲状腺癌细胞的生长速率。该相关性同样表现在结肠癌、卵巢癌、乳腺癌及肺癌中^[16]。在霍奇金淋巴瘤中 EZH2 的 Tyr641 和 Ala677 发生点突变, 促进 H3K27 甲基化, 导致其不良预后^[17]。

通过免疫治疗恢复 CBX7 的表达, 降低 EZH2 的表达, 逆转异常的组蛋白甲基化, 可能为乳腺癌的治疗提供新的思路。EZH2 的强效化学抑制剂 EPZ005687 在多种淋巴瘤细胞中减少 H3K27 的甲基化^[17-18]。Kim 等^[19]研究发现, 伴有稳定的 α 螺旋的 EZH2 多肽可以解离 EZH2-EED 复合体, 抑制 H3K27 的甲基化。三甲基赖氨酸的多肽可分解 CBX7-H3K27me3 复合体, 可用于合成 CBX7 抑制剂^[20]。CBX7 和 EZH2 可作为新的化学性预防和治疗策略的靶标。

参考文献

- [1] 姚响芸, 王萌, 薛丽香. Polycomb 蛋白复合体对细胞衰老的表观遗传学调控 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2012, 28(4):304-309.
- [2] Zhang XW, Zhang L, Qin W, et al. Oncogenic role of the chromobox protein CBX7 in gastric cancer[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2010, 29:114.
- [3] Li H, Cai Q, Godwin AK, et al. Enhancer of zeste homolog 2 promotes the proliferation and invasion of epithelial ovarian cancer cells[J]. Mol Cancer Res, 2010, 8(12):1610-1618.
- [4] Singletary SE, Connolly JL. Breast cancer staging: working with the sixth edition of the AJCC Cancer Staging Manual[J]. CA Cancer J Clin, 2006, 56(1):37-47.
- [5] 杨小玲, 夏和顺, 原俊. 2003WHO 乳腺癌组织学分类及临床意义 [A]//2004 年度国内外重要肿瘤学术会议报告会资料论文集 [C]. 武汉: 湖北省抗癌协会 / 湖北省肿瘤学会, 2005:9.
- [6] 姚凡, 刘崇, 房月, 等. EZH2 在乳腺癌中的表达及其临床意义 [J]. 中国微生态学杂志, 2013, 25(2):143-146.
- [7] SU Shuaikun, ZHANG Min, LI Lianyun, 等. Polycomb Group Genes as the Key Regulators in Gene Silencing[J]. 武汉大学自然科学学报: 英文版, 2014, 19(1):1-7.
- [8] Montgomery ND, Yee D, Chen A, et al. The murine polycomb group protein Eed is required for global histone H3 lysine-27 methylation[J]. Curr Biol, 2005, 15(10):942-947.
- [9] Chang CJ, Yang JY, Xia W, et al. EZH2 promotes expansion of breast tumor initiating cells through activation of RAF1- β -catenin signaling[J]. Cancer Cell, 2011, 19(1):86-100.
- [10] Ding L, Kleer CG. Enhancer of Zeste 2 as a marker of preneoplastic progression in the breast[J]. Cancer Res, 2006, 66(19):9352-9355.
- [11] Federico A, Pallante P, Bianco M, et al. Chromobox protein homologue 7 protein, with decreased expression in human carcinomas, positively regulates E-cadherin expression by interacting with the histone deacetylase 2 protein[J]. Cancer Res, 2009, 69(17):7079-7087.
- [12] Kim HY, Park JH, Won HY, et al. CBX7 inhibits breast tumorigenicity through DKK-1-mediated suppression of the Wnt/b-catenin pathway[J]. FASEB J, 2014. [Epub ahead of print]
- [13] Rong-gang MA, Yang ZHANG, Ting-ting SUN, 等. 多梳抑制复合体 PRC1 的核心组分 CBX 家族蛋白在表观遗传调控中的作用 [J]. 浙江大学学报: 英文版 (B 辑: 生物医学和生物技术), 2014, 15(5):412-428.
- [14] Kleer CG, Cao Q, Varambally S, et al. EZH2 is a marker of aggressive breast cancer and promotes neoplastic transformation of breast epithelial cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(20):11606-11611.
- [15] Pallante P, Federico A, Berlingieri MT, et al. Loss of the CBX7 gene expression correlates with a highly malignant phenotype in thyroid cancer[J]. Cancer Res, 2008, 68(16):6770-6778.
- [16] XIAO LB, TAO YG, LI LL, et al. Polycomb group proteins and their roles in carcinogenesis[J]. Chin Sci Bull, 2012, 57:2259-2264.
- [17] Knutson SK, Wigle TJ, Warholc NM, et al. A selective inhibitor of EZH2 blocks H3K27 methylation and kills mutant lymphoma cells[J]. Nat Chem Biol, 2012, 8(11):890-896.
- [18] 张洁, 丁健, 陈奕. 组蛋白甲基转移酶及其相应抑制剂在抗肿瘤领域的研究进展 [J]. 中国新药杂志, 2014, 23(5):533-540.
- [19] Kim W, Bird GH, Neff T, et al. Targeted disruption of the EZH2-EED complex inhibits EZH2-dependent cancer[J]. Nat Chem Biol, 2013, 9(10):643-650.
- [20] Simhadri C, Daze KD, Douglas SF, et al. Chromodomain antagonists that target the polycomb-group methyllysine reader protein chromobox homolog 7 (CBX7)[J]. J Med Chem, 2014, 57(7):2874-2883.

(本文编辑 姜晖)

本文引用格式: 严文君, 冯爱强, 张彦武, 等. EZH2 和 CBX7 在乳腺癌中的表达及其临床意义 [J]. 中国普通外科杂志, 2014, 23(11):1512-1516. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.11.011
Cite this article as: YAN WJ, FENG AQ, ZHANG YW, et al. Expressions of EZH2 and CBX7 in breast cancer and their clinical significance[J]. Chin J Gen Surg, 2014, 23(11):1512-1516. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.11.011