



doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2017.07.019  
http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1005-6947.2017.07.019  
Chinese Journal of General Surgery, 2017, 26(7):934-938.

· 简要论著 ·

# 肝癌组织中 CUL4A 的表达及其对肝癌细胞生长的影响

郑春雷<sup>1</sup>, 鲍红光<sup>1</sup>, 高红<sup>2</sup>

(1. 齐齐哈尔医学院附属第二医院 肿瘤外科, 黑龙江 齐齐哈尔 16100; 2. 黑龙江省齐齐哈尔市第二医院 外科, 黑龙江 齐齐哈尔 161006)

## 摘要

**目的:** 探讨肝癌组织中泛素连接酶 Cullin 4A (CUL4A) 的表达情况及 CUL4A 对肝癌细胞生长的影响。  
**方法:** 选择 2013 年 1 月—2015 年 12 月 72 例肝癌组织标本及其癌旁组织标本和 72 例正常肝组织标本作为对照, 免疫组化法检测肝癌组织、癌旁组织和正常肝组织中 CUL4A 的表达情况, 用 CUL4A-siRNA、NC-siRNA 转染 Hep-G2、QSG-7701 肝癌细胞, CCK 法检测细胞的增殖情况, PI 染色、流式细胞术检测细胞周期, Transwell 法检测细胞的侵袭迁移能力。  
**结果:** 肝癌组织中 CUL4A 的表达明显高于癌旁组织和正常肝组织 ( $t=48.657$ ,  $P=0.000$ )。肝癌组织中 CUL4A 的表达和肝癌的分化程度、肿瘤直径、淋巴结转移、TNM 分级有关 ( $t=7.254$ 、 $5.254$ 、 $5.835$ 、 $8.212$ ,  $P=0.000$ 、 $0.007$ 、 $0.004$ 、 $0.000$ )。转染 CUL4A-siRNA 的 Hep-G2、QSG-7701 肝癌细胞株在 3 d 和 7 d 时的 OD 值明显低于 NC-siRNA 组 ( $t=3.132$ 、 $5.264$ ;  $3.152$ 、 $5.834$ ,  $P=0.037$ 、 $0.008$ ;  $0.041$ 、 $0.011$ )。转染 CUL4A-siRNA 的 Hep-G2、QSG-7701 肝癌细胞株 S 期细胞比例低于 NC-siRNA 组 ( $F=4.124$ 、 $4.142$ ;  $P=0.014$ 、 $0.009$ )。转染 CUL4A-siRNA 的 Hep-G2、QSG-7701 肝癌细胞株侵袭转移能力低于 NC-siRNA 组 ( $t=3.756$ 、 $4.635$ ;  $4.104$ 、 $4.967$ ,  $P=0.003$ 、 $0.000$ ;  $0.003$ 、 $0.000$ )。  
**结论:** 肝癌组织中 CUL4A 的表达升高, 肝癌组织中 CUL4A 的表达与肝癌的分化程度、肿瘤直径、淋巴结转移、TNM 分级有关, CUL4A 能够促进肝癌细胞的增殖、细胞周期进程和侵袭迁移能力。

## 关键词

肝肿瘤; CUL4A; 细胞增殖; 细胞周期; 侵袭; 迁移  
中图分类号: R735.7

泛素-蛋白酶系统能够降解蛋白质, 具有重要的生物学功能, 泛素-蛋白酶系统参与细胞增殖、分化和细胞凋亡, 参与炎症反应, 具有递呈抗原、转录调控等生命活动, 泛素连接酶 E3 在癌症的发生发展中具有重要作用, Cullin 家族高度保守, 属于 E3 连接酶, CUL4A 是其家族成员之一, CUL4A 的结构和功能与泛素连接酶 Cullin 4B (Ubiquitin ligase Cullin 4B, CUL4B) 比较相似, 通过和 DNA 损伤蛋白、ROC1 环指蛋白结合形成泛素连接酶复合物, 发挥降解底物蛋白的作用<sup>[1-2]</sup>。CUL4A 在乳腺癌、鳞状细胞癌、恶性胸膜间质瘤等多种肿瘤中呈高表达<sup>[3-5]</sup>, 也有研究<sup>[6]</sup>发

现 CUL4A 在肝癌中也呈高表达, 但 CUL4A 在肝癌发生发展中的生物学作用尚不十分明确, 本研究对肝癌组织中 CUL4A 的表达情况进行研究, 并研究 CUL4A 对肝癌细胞生长的影响, 探讨 CUL4A 在肝癌发生发展中的作用。

## 1 资料与方法

### 1.1 研究对象

选择 2013 年 1 月—2015 年 12 月齐齐哈尔医学院病理中心 72 例肝癌术后肝癌组织标本及其癌旁组织 (距离肝癌组织 5 cm 以上) 标本和 72 例肝血管瘤术后正常肝组织标本做为研究对象, 所有肝癌患者术前未进行过放化疗等治疗, 首次进行手术治疗。所有研究对象均签署知情同意书, 均经齐齐哈尔医学院附属第二医院伦理委员会批准。

收稿日期: 2016-10-05; 修订日期: 2017-03-07。

作者简介: 郑春雷, 齐齐哈尔医学院附属第二医院副主任医师, 主要从事肿瘤分子生物学方面的研究。

通信作者: 高红, Email: zcl8315557@163.com

## 1.2 细胞及主要试剂

实验前对正常肝细胞和Hep-G2、QSG-7701肝癌细胞株中CUL4A的表达情况进行检测, CUL4A在正常肝细胞中表达水平低, 在Hep-G2、QSG-7701肝癌细胞株中呈较高表达, 因此选择Hep-G2和QSG-7701肝癌细胞株进行研究, 细胞株均购自上海中科院细胞所。试剂: CUL4A siRNA(美国sigma公司), 胰蛋白酶、胎牛血清(北京索莱宝科技有限公司), 抗CUL4A抗体、抗 $\beta$ -actin抗体(CST公司)等。

## 1.3 方法

**1.3.1 临床资料收集** 收集72例肝癌患者的年龄、性别及临床病理等资料。

**1.3.2 检测CUL4A的表达** 采用免疫组化法检测肝癌组织、癌旁组织和正常肝组织中CUL4A的表达情况。免疫组化结果评分: 根据免疫组化染色范围和强度进行评分: 染色范围: 染色范围为0%为0分, 染色范围为1%~25%为1分, 染色范围为26%~50%为2分, 染色范围为51%~75%为3分, 染色范围为76%~100%为4分; 染色强度: 染色阴性为0分, 染色弱阳性为1分, 染色阳性为2分, 染色强阳性为3~4分。免疫组化评分为染色范围和染色强度相乘。

**1.3.3 细胞增殖实验** 将对数生长的Hep-G2和QSG-7701肝癌细胞接种到96孔板中, 用CUL4A-siRNA转染肝癌细胞, 并以NC-siRNA做为对照, 转染后继续培养, 转染24h后吸出培养基, 加入CCK混合液孵育, 酶标仪测定波长450nm的OD值, 每天同一时间进行检测, 连续监测7d。

**1.3.4 细胞周期监测** 将对数生长的Hep-G2和QSG-7701肝癌细胞接种到12孔板中培养, 待肝癌细胞达85%以上融合时, 用CUL4A-siRNA转染肝癌细胞, 并以NC-siRNA做为对照, 转染48h后胰蛋白酶消化并收集细胞, 进行PI染色, 流式细胞仪检测肝癌细胞周期。

**1.3.5 侵袭实验** 在24孔板中加入RPMI1640培养液, 孔上置入处理过的铺有Matrigel基质胶的小室, 将CUL4A-siRNA和NC-siRNA转染的Hep-G2和QSG-7701肝癌细胞悬液加入小室的上室中培养48h, 取出小室加入甲醇固定, 加入结晶紫染液染色, 高倍显微镜下拍照并观察穿膜细胞数。

**1.3.6 迁移实验** 小室中不铺Matrigel基质胶, 细胞接种培养后12h进行染色, 其余步骤同侵袭实验。

## 1.4 统计学处理

采用SPSS 20.0软件进行分析, 两组均数比较采用t检验, 多组均数比较采用方差分析, 相关性研究采用Spearman相关分析, 取 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 CUL4A在肝癌组织中的表达

肝癌组织中CUL4A的免疫组化评分( $7.64 \pm 2.47$ )明显高于癌旁组织( $1.23 \pm 0.36$ )分和正常肝组织( $0.87 \pm 0.12$ )分( $P = 0.000$ ); 癌旁组织和正常肝组织中CUL4A的表达无统计学差异( $P > 0.05$ ) (图1)。

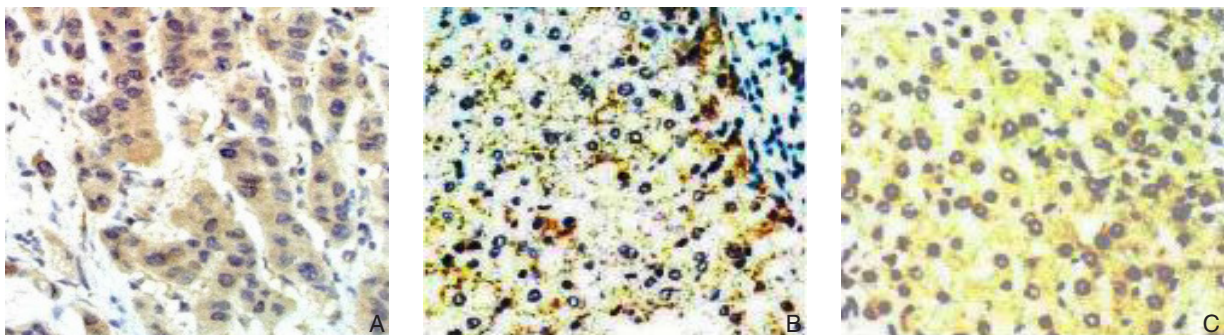


图1 CUL4A的不同肝组织中的表达情况( $\times 200$ ) A: 肝癌组织; B: 癌旁组织; C: 正常肝组织

### 2.2 CUL4A与肝癌临床病理特点的关系

肝癌组织中CUL4A的表达与肝癌的分化程度、肿瘤直径、淋巴结转移、TNM分级

有关( $P < 0.05$ ), 与患者的年龄和性别无关( $P > 0.05$ ); 低分化程度肝癌组织中CUL4A的表达明显高于中/高分化肝癌组织( $P < 0.05$ ),

肝癌直径 $>5$  cm肝癌组织中CUL4A的表达高于直径 $\leq 5$  cm肝癌组织 ( $P<0.05$ ), 有淋巴结转移肝癌组织中CUL4A的表达高于无淋巴结转移者 ( $P<0.05$ ), TNM分级III级肝癌组织中CUL4A的表达高于I~II级 ( $P<0.05$ ) (表1)。

表1 CUL4A的表达与肝癌临床病理特点的关系

项目	n	CUL4A 免疫组化评分 ( $\bar{x} \pm s$ )	t/F	P
年龄(岁)				
> 50	53	7.89 ± 2.54	2.143	0.125
≤ 50	19	7.64 ± 2.31		
性别				
男	61	7.91 ± 2.15	1.564	0.326
女	11	7.67 ± 2.63		
分化程度				
低	14	11.91 ± 2.14	7.254	0.000
中	48	7.98 ± 3.02		
高	10	5.12 ± 2.03		
肿瘤直径(cm)				
> 5	40	9.01 ± 2.75	5.254	0.007
≤ 5	38	7.78 ± 3.26		
淋巴结转移				
有	12	8.53 ± 2.75	5.835	0.004
无	60	7.74 ± 2.57		
TNM 分级				
I~II 级	59	7.69 ± 3.02	8.212	0.000
III 级	13	8.61 ± 2.73		

### 2.3 CUL4A 对肝癌细胞生长能力的影响

转染CUL4A-siRNA的Hep-G2肝癌细胞株在3 d和7 d时的OD值明显低于NC-siRNA组 ( $P<0.05$ ) (表2); 转染CUL4A-siRNA的QSG-7701肝癌细胞株在3 d和7 d时的OD值明显低于NC-siRNA组 ( $P<0.05$ ) (表3)。

### 2.4 CUL4A 对肝癌细胞生长周期的影响

转染CUL4A-siRNA的Hep-G2肝癌细胞株S期细胞比例低于NC-siRNA组 ( $P<0.05$ ) (表4); 转染CUL4A-siRNA的QSG-7701肝癌细胞株S期细

胞比例低于NC-siRNA组 ( $P<0.05$ ) (表5)。

表2 CUL4A对Hep-G2肝癌细胞株增殖的影响

组别	OD 值		
	1 d	3 d	7 d
CUL4A-siRNA 组	0.51 ± 0.12	0.65 ± 0.21	1.93 ± 0.43
NC-siRNA 组	0.54 ± 0.13	0.82 ± 0.25	2.52 ± 0.51
t	0.082	3.132	5.264
P	0.913	0.037	0.008

表3 CUL4A对QSG-7701肝癌细胞株增殖的影响

组别	OD 值		
	1 d	3 d	7 d
CUL4A-siRNA 组	0.26 ± 0.07	1.09 ± 0.27	1.72 ± 0.34
NC-siRNA 组	0.28 ± 0.06	1.28 ± 0.31	2.37 ± 0.39
t	0.143	3.152	5.834
P	0.916	0.041	0.011

表4 CUL4A对Hep-G2肝癌细胞株生长周期的影响

组别	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> 期 (%)	S 期 (%)	G <sub>2</sub> /M 期 (%)
CUL4A-siRNA 组	49.53 ± 1.32	43.78 ± 1.32	6.69 ± 0.32
NC-siRNA 组	47.82 ± 1.26	49.01 ± 1.53	3.17 ± 0.28
F		4.124	
P		0.014	

表5 CUL4A对QSG-7701肝癌细胞株生长周期的影响

组别	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> 期 (%)	S 期 (%)	G <sub>2</sub> /M 期 (%)
CUL4A-siRNA 组	52.18 ± 2.14	42.87 ± 2.17	4.95 ± 0.11
NC-siRNA 组	46.52 ± 2.24	48.54 ± 2.31	4.94 ± 0.14
F		4.142	
P		0.009	

### 2.5 CUL4A 对肝癌细胞侵袭转移的影响

转染CUL4A-siRNA的Hep-G2肝癌细胞株侵袭转移能力低于NC-siRNA组 ( $P<0.05$ ) (图2); 转染CUL4A-siRNA的QSG-7701肝癌细胞株侵袭转移能力低于NC-siRNA组 ( $P<0.05$ ) (图3)。

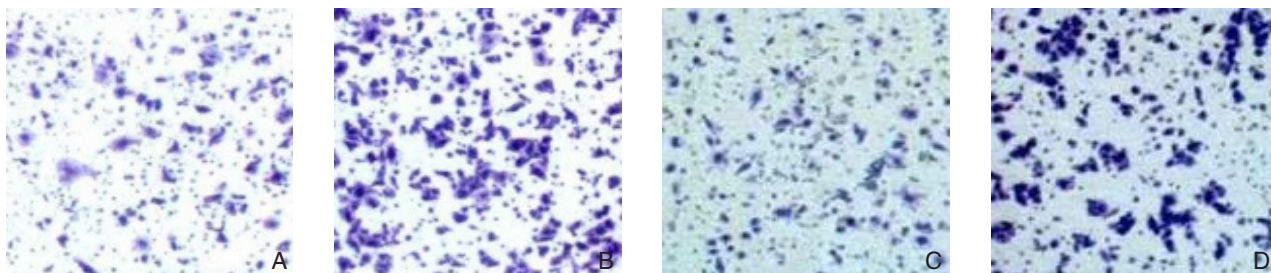


图2 CUL4A对Hep-G2肝癌细胞株侵袭转移的影响 A: CUL4A-siRNA 侵袭; B: NC-siRNA 侵袭; C: CUL4A-siRNA 迁移; D: NC-siRNA 迁移

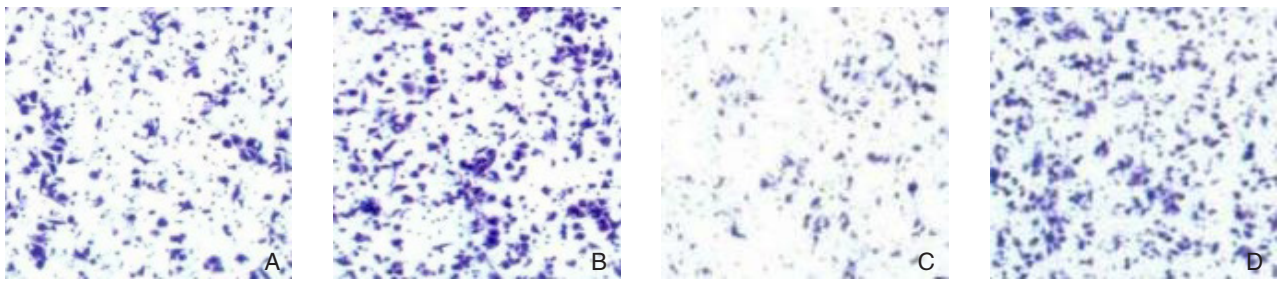


图3 CUL4A对QSG-7701肝癌细胞株侵袭迁移的影响 A: CUL4A-siRNA侵袭; B: NC-siRNA侵袭; C: CUL4A-siRNA迁移; D: NC-siRNA迁移

### 3 讨论

CUL4A属于通过泛素化调节蛋白质的降解, Cullin家族成员<sup>[7]</sup>, 是最大类的E3泛素连接酶, CUL4A能够调节粒细胞的分化, 能够调节造血干细胞的分化和增殖, 与肿瘤的发生发展关系密切<sup>[8-9]</sup>。在乳腺癌、前列腺癌、肾细胞癌、鳞状细胞癌等多种肿瘤中呈高表达<sup>[10-12]</sup>, 被推断为是癌基因, CUL4A可以激活E2F1的活性, 对损伤的DNA进行修复; CUL4A还可以修饰p27、p21、p53等蛋白使细胞周期停滞, 抑制细胞增殖, CUL4A能够通过MDM2对P53进行调节, CUL4A表达的升高能够降解P53, 从而促进恶性肿瘤的发生<sup>[13-20]</sup>。

王允山等<sup>[5]</sup>发现CUL4A在乳腺癌的侵袭转移中发挥重要作用; 李振宇<sup>[10]</sup>发现CUL4A在结肠癌中异常表达, 并和结肠癌的转移和进展关系密切; 韩小妮等<sup>[13]</sup>发现CUL4A在卵巢癌中异常表达, 促进卵巢癌的侵袭和转移。有研究<sup>[6]</sup>发现CUL4A在正常肝组织中低表达, 在肝癌组织中为高表达, 但CUL4A在肝癌发生发展中的具体机制尚不清楚, CUL4A是否也影响肝癌细胞的生长? 是否影响肝癌细胞的侵袭和转移? 本研究对肝癌组织中CUL4A的表达情况进行研究, 并探讨CUL4A对肝癌细胞生长的影响, 结果发现: 肝癌组织中CUL4A的表达明显高于癌旁组织和正常肝组织。肝癌组织中CUL4A的表达和肝癌的分化程度、肿瘤直径、淋巴结转移、TNM分级有关。转染CUL4A-siRNA的Hep-G2、QSG-7701肝癌细胞株在3 d和7 d时的OD值明显高于NC-siRNA组。转染CUL4A-siRNA的Hep-G2、QSG-7701肝癌细胞株S期细胞比例低于NC-siRNA组。转染CUL4A-siRNA的Hep-G2、QSG-7701肝癌细胞株侵袭转移能力低于NC-siRNA组。本研究结果证实了CUL4A在肝癌组织中呈高表达, CUL4A的高表达和肝癌

的临床病理特点关系密切, Hep-G2和QSG-7701肝癌细胞株中CUL4A下调后细胞的增殖受到抑制、S期细胞比例降低、侵袭转移能力下降, 表明CUL4A可以促进肝癌细胞的生长、影响肝癌细胞周期, 促进肝癌细胞的侵袭转移能力。CUL4A在肝癌中发挥促癌基因的作用, CUL4A促进肝癌细胞增殖, 影响肝癌细胞周期以及促进侵袭转移能力的机制有待进一步研究, 可能与CUL4A修复损伤的DNA, 修饰p27、p21、p53等蛋白阻止细胞周期从而抑制细胞增殖, CUL4A和P53关系密切, CUL4A高表达可以降解P53, 从而影响肝癌细胞的生物学特性<sup>[21-25]</sup>。

### 参考文献

- [1] Hannah J, Zhou P. Distinct and overlapping functions of the cullin E3 ligase scaffolding proteins CUL4A and CUL4B[J]. *Gene*, 2015, 573(1):33-45. doi: 10.1016/j.gene.2015.08.064.
- [2] Yang YL, Ni J, Hsu PC, et al. Cul4A overexpression associated with Gli1 expression in malignant pleural mesothelioma[J]. *J Cell Mol Med*, 2015, 19(10):2385-2396. doi: 10.1111/jcmm.12620.
- [3] Ren W, Shen S, Sun Z, et al. Jak-STAT3 pathway triggers DICER1 for proteasomal degradation by ubiquitin ligase complex of CUL4A(DCAF1) to promote colon cancer development[J]. *Cancer Lett*, 2016, 375(2):209-220. doi: 10.1016/j.canlet.2016.02.055.
- [4] Deng J, Lei W, Xiang X, et al. Cullin 4A (CUL4A), a direct target of miR-9 and miR-137, promotes gastric cancer proliferation and invasion by regulating the Hippo signaling pathway[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(9):10037-10050. doi: 10.18632/oncotarget.7048.
- [5] 王允山. CUL4A促进乳腺癌细胞上皮间质转化及侵袭转移的作用机制研究[D]. 济南: 山东大学, 2014.  
Wang YS. The mechanism of CUL4A promoting breast cancer cell epithelial-mesenchymal transition and metastasis[D]. Jinan: Shandong University, 2014.
- [6] 李玉琼. CUL4A在肝细胞癌发生和转移中的作用及机制[D]. 上

- 海: 第二军医大学, 2012.
- Li YQ. The mechanism of CUL4A in hepatocellular carcinoma and metastasis[D]. Shanghai: Second Military Medical University, 2012.
- [7] Kim K, Lee B, Kim J, et al. Linker Histone H1.2 cooperates with Cul4A and PAF1 to drive H4K31 ubiquitylation-mediated transactivation[J]. *Cell Rep*, 2013, 5(6):1690–1703. doi: 10.1016/j.celrep.2013.11.038.
- [8] Wang Y, Wen M, Kwon Y, et al. CUL4A induces epithelial-mesenchymal transition and promotes cancer metastasis by regulating ZEB1 expression[J]. *Cancer Res*, 2014, 74(2):520–531. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-2182.
- [9] Hannah J, Zhou PB. The CUL4A ubiquitin ligase is a potential therapeutic target in skin cancer and other malignancies[J]. *Chin J Cancer*, 2013, 32(9):478–482. doi: 10.5732/cjc.012.10279.
- [10] 李振宇. 结肠癌组织中CUL4A的表达及临床病理学意义[J]. *中外医疗*, 2013, 32(34):194–195.
- Li ZY. Expression of CUL4A in colon cancer tissue and the clinicopathologic significance[J]. *China Foreign Medical Treatment*, 2013, 32(34):194–195.
- [11] Hung MS, Chen IC, You L, et al. Knockdown of Cul4A increases chemosensitivity to gemcitabine through upregulation of TGFBI in lung cancer cells[J]. *Oncol Rep*, 2015, 34(6):3187–3195.
- [12] Song J, Zhang J, Shao J. Knockdown of CUL4A inhibits invasion and induces apoptosis in osteosarcoma cells[J]. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 2015, 28(2):263–269. doi: 10.1177/0394632015586656.
- [13] 韩小妮, 方念, 孙玉芳, 等. CUL4 A促进人卵巢癌细胞侵袭转移及其机制探讨[J]. *现代妇产科进展*, 2015, 24(12):889–892. doi:10.13283/j.cnki.xdfekjz.2015.12.003.
- Han XN, Fang N, Sun YF, et al. Effect and mechanism of CUL4A on migration and invasion in ovarian cancer cells[J]. *Progress in Obstetrics and Gynecology*, 2015, 24(12):889–892. doi:10.13283/j.cnki.xdfekjz.2015.12.003.
- [14] Liu G, Zhu Z, Lang F, et al. Clinical significance of CUL4A in human prostate cancer[J]. *Tumour Biol*, 2015, 36(11):8553–8558. doi: 10.1007/s13277-015-3580-2.
- [15] Yang YL, Hung MS, Wang Y, et al. Lung tumorigenesis in a conditional Cul4A transgenic mouse model[J]. *J Pathol*, 2014, 233(2):113–123. doi: 10.1002/path.4352.
- [16] Han X, Fang Z, Wang H, et al. CUL4A functions as an oncogene in ovarian cancer and is directly regulated by miR-494[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 480(4):675–681. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.10.114.
- [17] Jia L, Yan F, Cao W, et al. Dysregulation of CUL4A and CUL4B Ubiquitin Ligases in Lung Cancer[J]. *J Biol Chem*, 2017, 292(7):2966–2978. doi: 10.1074/jbc.M116.765230.
- [18] Ren W, Sun Z, Zeng Q, et al. Aberrant Expression of CUL4A Is Associated with IL-6/ STAT3 Activation in Colorectal Cancer Progression[J]. *Arch Med Res*, 2016, 47(3):214–222. doi: 10.1016/j.arcmed.2016.07.001.
- [19] Hung MS, Chen IC, You L, et al. Knockdown of cullin 4A inhibits growth and increases chemosensitivity in lung cancer cells[J]. *J Cell Mol Med*, 2016, 20(7):1295–1306. doi: 10.1111/jcmm.12811.
- [20] Li X, Xu R, Liu H, et al. CUL4A expression in pediatric osteosarcoma tissues and its effect on cell growth in osteosarcoma cells[J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(6):8139–8144. doi: 10.1007/s13277-015-4715-1.
- [21] Xu Y, Wang Y, Ma G, et al. CUL4A is overexpressed in human pituitary adenomas and regulates pituitary tumor cell proliferation[J]. *J Neurooncol*, 2014, 116(3):625–632. doi: 10.1007/s11060-013-1349-2.
- [22] Wang Y, Ma G, Wang Q, et al. Involvement of CUL4A in regulation of multidrug resistance to P-gp substrate drugs in breast cancer cells[J]. *Molecules*, 2013, 19(1):159–176. doi: 10.3390/molecules19010159.
- [23] Thirunavukarasou A, Govindarajalu G, Singh P, et al. Cullin 4A and 4B ubiquitin ligases interact with  $\gamma$ -tubulin and induce its polyubiquitination[J]. *Mol Cell Biochem*, 2015, 401(1/2):219–228. doi: 10.1007/s11010-014-2309-7.
- [24] Thirunavukarasou A, Singh P, Govindarajalu G, et al. E3 ubiquitin ligase Cullin4B mediated polyubiquitination of p53 for its degradation[J]. *Mol Cell Biochem*, 2014, 390(1/2):93–100. doi: 10.1007/s11010-014-1960-3.
- [25] Lau AW, Inuzuka H, Fukushima H, et al. Regulation of APC(Cdh1) E3 ligase activity by the Fbw7/cyclin E signaling axis contributes to the tumor suppressor function of Fbw7[J]. *Cell Res*, 2013, 23(7):947–961. doi: 10.1038/cr.2013.67.

( 本文编辑 姜晖 )

本文引用格式: 郑春雷, 鲍红光, 高红, 等. 肝癌组织中CUL4A的表达及其对肝癌细胞生长的影响[J]. 中国普通外科杂志, 2017, 26(7):934–938. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2017.07.019

Cite this article as: Zheng CL, Bao HG, Gao H, et al. Expression of CUL4A in hepatic cancer tissue and the influence on proliferation of hepatic cancer cells[J]. *Chin J Gen Surg*, 2017, 26(7):934–938. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2017.07.019