

## 胃癌组织中 SnoN、Egr3 和 SFRP1 的表达情况及临床意义

442049 湖北十堰 东风公司花果医院内科 谭华斌, 卢光新<sup>1,2</sup>

**【摘要】目的** 探讨核转录共抑制因子 SnoN、早期生长反应基因 3(Egr3)和分泌型卷曲相关蛋白 1(SFRP1)在胃癌组织中的表达水平,分析三者与胃癌临床病理特征的关系。**方法** 收集 75 例胃癌组织及 62 例癌旁组织标本,采用免疫组化 Elivision 法检测以上组织石蜡切片中 SnoN、Egr3 及 SFRP1 的表达情况,分析 3 种蛋白表达与胃癌临床病理特征的关系。**结果** 胃癌组织中 SnoN、SFRP1 的高表达率为 45.3%(34/75)和 38.7%(29/75),均低于癌旁组织的 62.9%(39/62)和 58.1%(36/62);而 Egr3 的高表达率为 69.3%(52/75),高于癌旁组织的 38.7%(24/62)。以上差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。SnoN、Egr3 和 SFRP1 的表达均与临床分期、分化程度有关,SnoN 表达还与年龄、浸润深度及淋巴结转移有关,SFRP1 表达与年龄、肿瘤大小及浸润深度有关。SnoN、SFRP1 与 Egr3 的表达均呈负相关,相关系数依次为  $r = -0.324$ 、 $-0.244$  ( $P$  均  $< 0.05$ );SnoN 与 SFRP1 的表达呈正相关( $r = 0.487$ ,  $P < 0.001$ )。**结论** 胃癌组织中 SnoN、SFRP1 呈低表达,而 Egr3 呈高表达,三者表达均与临床分期、分化程度有关,提示三者在胃癌发生、发展中有重要意义,可用于辅助胃癌的诊断和病情评估。

**【关键词】** 胃癌; 核转录共抑制因子; 早期生长反应基因 3; 分泌型卷曲相关蛋白 1

中图分类号:R735.2 文献标识码:A 文章编号:1009-0460(2014)10-0901-05

### Expressions and clinical significance of SnoN, Egr3 and SFRP1 in gastric cancer

TAN Huabin, LU Guangxin. Department of Internal Medicine, Huaguo Hospital of Dongfeng Coporation, Shiyan 442049, China

Corresponding author: LU Guangxin, E-mail: sylgx1325@sina.com

**【Abstract】 Objective** To explore the expressions of Ski-novel protein (SnoN), early growth response protein 3 (Egr3) and secreted frizzled related protein 1(SFRP1) in gastric cancer tissue, and further analyze their clinicopathological characteristics in gastric cancer. **Methods** Seventy-five cases of gastric cancer tissues and 62 cases of para-cancer tissues were collected. The immunohistochemical Elivision method was used to analyze the expressions of SnoN, Egr3 and SFRP1 from the above tissues. The clinicopathological characteristics of gastric cancer patients were collected and subsequently analyzed for their correlation with expressions of SnoN, Egr3 and SFRP1. **Results** The high-level expression rates of SnoN and SFRP1 were 45.3% (34/75) and 38.7% (29/75), both lower than 62.9% (39/62) and 58.1% (36/62) in para-cancer tissues ( $P < 0.05$ ). While the high-level expression rate of Egr3 was 69.3% (52/75) in cancer tissues, higher than 38.7% (24/62) in para-cancer tissues ( $P < 0.05$ ). The expression of SnoN, Egr3 and SFRP1 were related with clinical stage and degree of differentiation. In addition, the SnoN expression was related with age, depth of invasion and lymph node metastasis, and SFRP1 expression was related with age, tumor size and depth of invasion. The expressions of both SnoN and SFRP1 were all negatively correlated with Egr3 in cancer tissues ( $r = -0.324$ ,  $-0.244$ ) with significant difference ( $P < 0.05$ ). The SnoN expression was positively correlated with SFRP1 ( $r = 0.487$ ,  $P < 0.001$ ). **Conclusion** There are high expression of Egr3 but low expression of SnoN and SFRP1 in gastric cancer. All tested proteins are related with clinical stage and degree of differentiation, indicating an important role in the occurrence and development of gastric cancer.

**【Key Words】** Gastric cancer; Ski-novel protein(SnoN); Early growth response protein 3(Egr3); Secreted frizzled related protein 1(SFRP1)

胃癌是人类最常见的消化系统恶性肿瘤,尽管目前胃癌相关死亡率已降低,但仍居恶性肿瘤死亡

的第 2 位<sup>[1]</sup>。大多数胃癌患者确诊时已为晚期,根治性切除后的复发率高且治疗效果不理想。为提

1 442000 湖北医药学院附属人民医院消化科

2 通讯作者,E-mail:sylgx1325@sina.com

胃癌患者生存率,导致预后不良的分子机制研究是当前的热点。肿瘤的发生、发展涉及了多个基因异常,故研究胃癌中异常表达基因有重要价值,可为胃癌诊断、治疗方案制定及预后评估提供指导<sup>[2]</sup>。

核转录共抑制因子(Ski-novel protein, SnoN)为 TGF $\beta$ /Smad 的负调节因子,可调节 p53 的稳定性,近年来发现 SnoN 具有抑癌基因的作用<sup>[3]</sup>,如 Shingawa 等<sup>[4]</sup>发现缺失 SnoN 基因小鼠暴露于致癌剂后发生癌病变的风险升高。早期生长反应蛋白 3 (early growth response protein 3, Egr3)为转录因子家族成员之一,可调节血管新生,敲除 Egr3 后可导致血管表皮生长因子诱导的人脐静脉血管内皮细胞增殖减慢、迁移及小管形成抑制<sup>[5]</sup>,近年发现其在乳腺癌、前列腺癌中高表达<sup>[6-7]</sup>,且与乳腺癌的淋巴结转移及远处转移有关<sup>[6]</sup>,提示 Egr3 具有癌基因的作用。分泌型卷曲相关蛋白 1 (secreted frizzled related protein 1, SFRP1)可抑制 Wnt 信号通路的功能,具有抑癌基因的作用<sup>[8]</sup>,在乳腺癌、结直肠癌中低表达甚至不表达<sup>[9-10]</sup>。

TGF $\beta$  信号通路和 Wnt 信号通路在肿瘤发生、发展中均起到了重要作用,研究指出两条通路的相互作用可介导多种生理功能,如调节造血干细胞和祖细胞的动态平衡<sup>[11]</sup>、细胞增殖<sup>[12]</sup>及上皮-间充质相互作用<sup>[13]</sup>等。此外,TGF $\beta$  通路可诱导 Egr3 表达<sup>[14]</sup>,鉴于 SnoN、Egr3 及 SFRP1 蛋白在 TGF $\beta$  信号通路和 Wnt 信号通路中的重要作用,且在胃癌组织中的表达情况及 3 个指标之间的相关性尚无报道,故本研究检测胃癌组织及癌旁组织中三者的表达情况,并初步探讨其临床意义。

## 1 资料与方法

1.1 一般资料 组织标本来源于本院病理科 2008 年 12 月至 2013 年 12 月经病理确诊的 75 例胃癌患者,取经手术切除的 75 例癌组织及 62 例对应癌旁组织石蜡标本。男性 44 例,女性 31 例;年龄范围 30~78 岁,中位年龄 58.0 岁, $\leq 60$  岁 39 例, $> 60$  岁 36 例;临床分期:Ⅰ期 12 例,Ⅱ期 21 例,Ⅲ期 42 例;肿瘤部位:近端 1/3 26 例,远端 2/3 49 例;肿瘤大小: $\leq 5$ cm 41 例, $> 5$ cm 34 例;分化程度:低未分化 46 例,中分化 16 例,高分化 13 例;浸润深度:T<sub>1</sub> 期 19 例,T<sub>2</sub> 期 23 例,T<sub>3</sub> 期 17 例,T<sub>4</sub> 期 16 例;48 例有淋巴结转移。

1.2 主要试剂与仪器 兔抗 SnoN 多克隆抗体购自英国 Abcam 公司,羊抗 Egr3、SFRP1 多克隆抗体购自美国 Santa cruz 公司,即用型免疫组化 Elivision plus 试剂盒购自福州迈新生物技术开发有限公司,DAB 显色液购自北京博润莱特科技有限公司。仪器:5417R 小型台式冷冻离心机购自德国 Eppendorf 公司;BOND MAX TM 全自动免疫组织化学染色仪和 RM2235 石蜡切片机均购自德国 Leica 公司。

1.3 免疫组化 Elivision 法 手术切除后立即将病理组织用石蜡包埋,置于低温冰箱内复温,切成厚度为 5  $\mu$ m 的切片,依次经脱蜡、酒精水化、高压修复、内源性过氧化物酶灭活后,分别加入 SnoN、Egr3 及 SFRP1 一抗(稀释比例依次为 1:200、1:100 和 1:200),37 $^{\circ}$ C 孵育,经 DAB 显色、苏木素复染、脱水及透明后,采用中性树胶封片。以已知阳性组织切片作阳性对照,以 PBS 代替一抗作阴性对照。

1.4 结果判定 光镜下观察整个切片,均由 2 名病理医师采用双盲法阅片,每例随机选取 5 个高倍镜视野。SnoN、Egr3 的阳性表达颗粒位于细胞浆和胞核,SFRP1 的阳性表达颗粒位于胞浆,均呈棕黄色或棕褐色。评分以染色强度与阳性细胞计数结合起来计算:(1)按阳性细胞数计数:阳性细胞数 $\leq 5\%$ 计为 0 分,6%~25%计 1 分,26%~50%计 2 分,51%~75%计 3 分, $> 75\%$ 计 4 分;(2)按染色深浅:无阳性细胞计为阴性(0 分),黄色计弱阳性(1 分),棕黄色计阳性(2 分),棕褐色计强阳性(3 分)。将两者得分相乘,以 5 分为界值分为低表达( $< 5$  分)和高表达( $\geq 5$  分)。分析 SnoN、Egr3 及 SFRP1 蛋白表达水平与胃癌临床病理特征(性别、年龄、临床分期、肿瘤部位、肿瘤大小、分化程度、浸润深度及淋巴结转移)的关系。

1.5 统计学分析 采用 SPSS 16.0 版软件处理数据。数据均以“率”表示并行 $\chi^2$  检验,相关性分析用 Spearman 检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

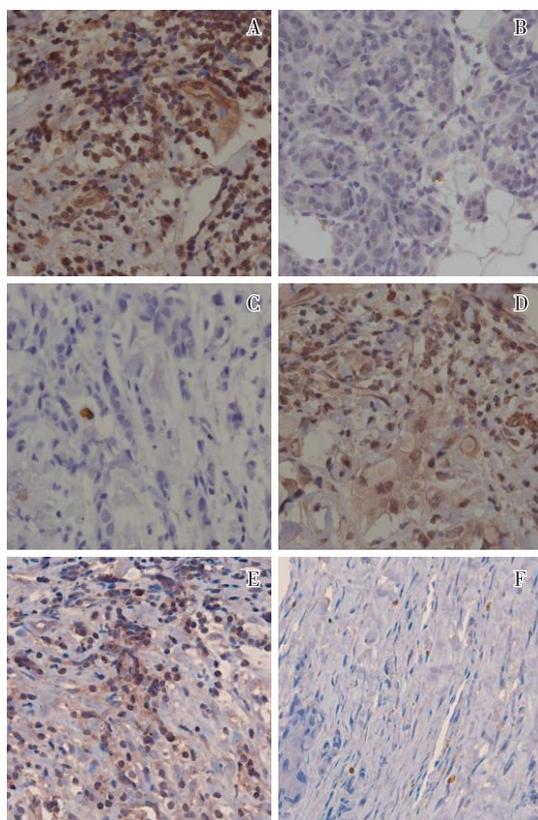
## 2 结果

2.1 胃癌和癌旁组织中 SnoN、Egr3 和 SFRP1 的表达情况 胃癌组织中 SnoN、SFRP1 呈低表达,而 Egr3 呈高表达。SnoN、SFRP1 的高表达率为 45.3% 和 38.7%,均低于癌旁组织的 62.9% 和 58.1%;而 Egr3 的高表达率为 69.3%,高于癌旁组织的 38.7%。以上差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表 1、图 1。

表 1 SnoN、Egr3 和 SFRP1 在胃癌和癌旁组织中的表达[例(%)]

组别	n	SnoN		Egr3		SFRP1	
		高表达	低表达	高表达	低表达	高表达	低表达
癌组织	75	34(45.3)*	41(54.7)	52(69.3)#	23(30.7)	29(38.7) <sup>△</sup>	46(61.3)
癌旁组织	62	39(62.9)	23(37.1)	24(38.7)	38(61.3)	36(58.1)	26(41.9)

注:  $\chi^2=4.209$ , \* $P=0.04$ ;  $\chi^2=12.887$ , # $P<0.001$ ;  $\chi^2=5.122$ , <sup>△</sup> $P=0.024$



A: SnoN 在癌旁组织中高表达; B: SnoN 在癌组织中低表达; C: Egr3 在癌旁组织中低表达; D: Egr3 在癌组织中高表达; E: SFRP1 在癌旁组织中高表达; F: SFRP1 在癌组织中低表达

图 1 SnoN、Egr3 和 SFRP1 在胃癌及癌旁组织中的表达 (Elivision ×400)

2.2 胃癌组织中 SnoN、Egr3 和 SFRP1 表达与临床病理特征的关系 SnoN 表达与年龄、临床分期、分化程度、浸润深度及淋巴结转移有关, Egr3 表达仅与临床分期、分化程度有关, SFRP1 表达与年龄、临床分期、肿瘤大小、分化程度及浸润深度有关, 以上差异均有统计学意义 ( $P<0.05$ )。见表 2。

2.3 胃癌组织中 SnoN、Egr3 和 SFRP1 表达的相关性分析 SnoN、SFRP1 表达与 Egr3 表达均呈负相关 ( $r = -0.324$ ,  $r = -0.244$ ;  $P$  均  $< 0.05$ ); SnoN 与 SFRP1 表达呈正相关 ( $r = 0.487$ ,  $P < 0.001$ )。见表 3 ~ 表 5。

### 3 讨论

SnoN 可通过负性调节 TGF $\beta$  信号通路来发挥其功能, 近年来发现其具有较广的抑癌基因作用<sup>[3-4]</sup>。高水平 SnoN 可抑制体外癌基因诱导的鼠初级胚胎成纤维细胞转化, 同时可抑制皮肤癌小鼠模型的肿瘤生长<sup>[15]</sup>。Zhu 等<sup>[16]</sup>发现当 SnoN 表达降低时, 肺癌及乳腺癌细胞的上皮间质转化和迁移均增强。SnoN 在癌组织中的表达异常, 如 Jahchan 等<sup>[17]</sup>在食管癌组织中发现 SnoN 为低表达。本研究通过免疫组化检测发现胃癌组织中 SnoN 为低表达, 其高表达率均低于癌旁组织, 与其他肿瘤中报道的结论一致<sup>[18]</sup>, 提示 SnoN 表达在胃癌发生、发展中有重要意义。研究指出, SnoN 可能通过影响 p53 基因稳定情况来发挥其抗癌作用<sup>[11]</sup>。当细胞处于应激反应, 高水平 SnoN 蛋白被招募至细胞核内的 PML 核小体来诱导 p53 稳定, 进而导致细胞衰老和细胞凋亡<sup>[19]</sup>。因此推测高水平 SnoN 可能通过在细胞内激活 PML-p53 肿瘤抑制物来发挥抑癌作用。

早期生长反应蛋白转录因子参与细胞癌变的多个环节, 如增殖、分化、凋亡及生长抑制等<sup>[14]</sup>。早期生长反应家族包括 Egr1、Egr2、Egr3 和 Egr4, 其中 Egr3 被证实在神经发育及调节环境应激反应中起重要作用, 如 Egr3 缺陷小鼠会发生交感神经异常和严重感觉性共济失调<sup>[19]</sup>。近期研究发现 Egr3 在肿瘤发生中可能起到促进作用, 如调节血管新生等<sup>[5]</sup>。近年来发现 Egr-3 在乳腺癌、前列腺癌中高表达<sup>[6-7]</sup>, 且与乳腺癌的雌激素受体、淋巴结转移及远处转有关, 提示其具有癌基因的作用<sup>[6]</sup>。与既往报道结果相似<sup>[6-7]</sup>, 本研究亦发现胃癌组织中 Egr3 高表达, 其高表达率高于癌旁组织。

Wnt 信号通路调节众多细胞的基本功能, 如胚胎发育、细胞分化及细胞增殖, 而在多种肿瘤中亦发现其异常激活。SFRP 家族为 Wnt 信号通路的主要拮抗剂, 通过与 Wnt 分子 CBD 区域的直接结合, 可引起 Wnt 信号通路下游分子异常, 故 SFRP 有抑

表 2 SnoN、Egr3 和 SFRP1 的表达与胃癌临床病理特征的关系 [n(%)]

临床病理参数	n	SnoN	$\chi^2$	P	Egr3	$\chi^2$	P	SFRP1	$\chi^2$	P
性别			0.199	0.656		0.577	0.448		0.226	0.635
男	44	19(43.2)			32(72.7)			18(40.9)		
女	31	15(48.4)			20(64.5)			11(35.5)		
年龄(岁)			4.023	0.045		1.046	0.307		10.786	0.001
≤60	39	22(56.4)			25(64.1)			22(56.4)		
>60	36	12(33.3)			27(75.0)			7(19.4)		
临床分期			10.822	0.001		6.061	0.014		8.885	0.003
I+II	33	22(66.7)			18(54.5)			19(57.6)		
III	42	12(28.6)			34(81.0)			10(23.8)		
肿瘤部位			0.147	0.701		1.078	0.299		2.155	0.142
近端 1/3	26	11(42.3)			20(76.9)			13(50.0)		
远端 2/3	49	23(46.9)			32(65.3)			16(32.7)		
肿瘤大小(cm)			1.264	0.261		2.971	0.085		6.009	0.014
≤5	41	21(51.2)			25(61.0)			21(51.2)		
>5	34	13(38.2)			27(79.4)			8(23.5)		
分化程度			3.901	0.048		9.861	0.002		5.432	0.020
低+未	46	25(54.3)			38(82.6)			13(28.3)		
高+中	29	9(31.0)			14(48.3)			16(55.2)		
浸润深度			22.010	0.000		0.319	0.572		5.170	0.023
T <sub>1</sub> +T <sub>2</sub>	42	9(21.4)			28(66.7)			21(52.0)		
T <sub>3</sub> +T <sub>4</sub>	33	25(75.8)			24(72.7)			8(24.2)		
淋巴结转移			4.198	0.040		3.766	0.052		2.888	0.089
无	27	8(29.6)			15(55.6)			7(25.9)		
有	48	26(54.2)			37(77.1)			22(45.8)		

表 3 胃癌组织中 SnoN 和 Egr3 蛋白表达的相关性

SnoN	Egr3		r	P
	低表达	高表达		
低表达	7	34	-0.324	0.005
高表达	16	18		

表 4 胃癌组织中 SnoN 和 SFRP1 蛋白表达的相关性

SnoN	SFRP1		r	P
	低表达	高表达		
低表达	34	7	0.487	0.000
高表达	12	22		

癌基因的作用<sup>[8]</sup>。本研究发现,胃癌组织中 SFRP1 低表达,其高表达率低于癌旁组织,与之前报道的 SFRP1 在乳腺癌、结直肠癌中低表达甚至不表达的

表 5 胃癌组织中 Egr3 和 SFRP1 蛋白表达的相关性

SFRP1	Egr3		r	P
	低表达	高表达		
低表达	10	36	-0.244	0.035
高表达	13	16		

结论一致<sup>[9-10]</sup>。Huth 等<sup>[20]</sup>发现 BDNF 为 SFRP1 的靶基因,在乳腺癌中,SFRP1 可能通过 BDNF 来发挥抑癌作用。本研究推测 SFRP1 在胃癌中可能也存在类似的作用,将作为今后研究的重点。

为验证 SnoN、Egr3 和 SFRP1 3 种蛋白异常表达与胃癌发生、发展的关系,本研究初步探讨了三者表达与临床病理特征的关系。结果显示,SnoN、Egr3 和 SFRP1 表达均与临床分期、分化程度有关,同时 SnoN 表达还与年龄、浸润深度及淋巴结转移有关,

SFRP1 表达与年龄、肿瘤大小及浸润深度与有关。提示三者可能与胃癌的发生、发展有关,但确切结论还需要大样本的研究证实。此外,本研究发现 SnoN、SFRP1 与 Egr3 的表达均呈负相关,提示 SnoN、SFRP1 与 Egr3 在肿瘤发生、发展中的作用模式不同;而 SnoN 与 SFRP1 的表达呈正相关,提示 SnoN 调节 TGF $\beta$  信号通路和 SFRP1 调节的 Wnt 信号通路在胃癌发生、发展中存在相互作用。

综上所述,胃癌组织中 SnoN、SFRP1 呈低表达,而 Egr3 呈高表达,三者表达均与临床分期、分化程度有关,提示三者胃癌发生发展中均有重要意义,可用于辅助胃癌的诊断和病情评估。

### 参考文献

- [ 1 ] 邱 萍. microRNAs 与胃癌治疗[J]. 临床肿瘤学杂志, 2014, 19(1): 90-94.
- [ 2 ] Tian R, Basu MK, Capriotti E. Contrast Rank: a new method for ranking putative cancer driver genes and classification of tumor samples[J]. *Bioinformatics*, 2014, 30(17): 572-578.
- [ 3 ] Deheuninck J, Luo K. Ski and SnoN, potent negative regulators of TGF-beta signaling[J]. *Cell Res*, 2009, 19(1): 47-57.
- [ 4 ] Shinagawa T, Nomura T, Colmenares C, et al. Increased susceptibility to tumorigenesis of ski-deficient heterozygous mice[J]. *Oncogene*, 2001, 20(56): 8100-8108.
- [ 5 ] Liu D, Evans I, Britton G, et al. The zinc-finger transcription factor, early growth response 3, mediates VEGF-induced angiogenesis[J]. *Oncogene*, 2008, 27(21): 2989-2998.
- [ 6 ] Kumbrink J, Kirsch KH, Johnson JP. EGR1, EGR2, and EGR3 activate the expression of their coregulator NAB2 establishing a negative feedback loop in cells of neuroectodermal and epithelial origin[J]. *J Cell Biochem*, 2010, 111(1): 207-217.
- [ 7 ] Pio R, Jia Z, Baron VT, et al. Early growth response 3 (Egr3) is highly over-expressed in non-relapsing prostate cancer but not in relapsing prostate cancer[J/OL]. *PLoS One*, 2013[2014-07-20]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3544741>.
- [ 8 ] Kang P, Wan M, Huang P, et al. The Wnt antagonist sFRP1 as a favorable prognosticator in human biliary tract carcinoma[J/OL]. *PLoS One*, 2014[2014-07-20]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmid/24594839>.
- [ 9 ] Bernemann CH, Isewig C, Ruckert C, et al. Influence of secreted frizzled receptor protein 1 (SFRP1) on neoadjuvant chemotherapy in triple negative breast cancer does not rely on WNT signaling[J]. *Mol Cancer*, 2014, 13:174.
- [ 10 ] Neve RM, Chin K, Fridlyand J, et al. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes[J]. *Cancer Cell*, 2006, 10(6): 515-527.
- [ 11 ] Emmrich S, Rasche M, Schöning J, et al. miR-99a/100~125b tricistrons regulate hematopoietic stem and progenitor cell homeostasis by shifting the balance between TGF $\beta$  and Wnt signaling[J]. *Genes Dev*, 2014, 28(8):858-874.
- [ 12 ] Rognoni E, Widmaier M, Jakobson M, et al. Kindlin-1 controls Wnt and TGF- $\beta$  availability to regulate cutaneous stem cell proliferation[J]. *Nat Med*, 2014, 20(4): 350-359.
- [ 13 ] Iwata J, Suzuki A, Yokota T, et al. TGF- $\beta$  regulates epithelial-mesenchymal interactions through WNT signaling activity to control muscle development in the soft palate[J]. *Development*, 2014, 141(4): 909-917.
- [ 14 ] Fang F, Shangguan AJ, Kelly K, et al. Early growth response 3 (Egr-3) is induced by transforming growth factor- $\beta$  and regulates fibrogenic responses[J]. *Am J Pathol*, 2013, 183(4): 1197-1208.
- [ 15 ] Pan D, Zhu Q, Luo K. SnoN functions as a tumour suppressor by inducing premature senescence[J]. *EMBO J*, 2009, 28(22): 3500-3513.
- [ 16 ] Zhu Q, Kim YH, Wang D, et al. SnoN facilitates ALK1-Smad1/5 signaling during embryonic angiogenesis[J]. *J Cell Biol*, 2013, 202(6):937-950.
- [ 17 ] Jahchan NS, Ouyang G, Luo K. Expression profiles of SnoN in normal and cancerous human tissues support its tumor suppressor role in human cancer[J/OL]. *PLoS One*, 2013[2014-07-22]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3572181>.
- [ 18 ] Sumitomo S, Fujio K, Okamura T, et al. Egr2 and Egr3 are the unique regulators for systemic autoimmunity[J/OL]. *JAKSTAT*, 2013 [2014-07-22]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24058814>.
- [ 19 ] Quach DH, Oliveira-Fernandes M, Gruner KA, et al. A sympathetic neuron autonomous role for Egr3-mediated gene regulation in dendrite morphogenesis and target tissue innervation[J]. *J Neurosci*, 2013, 33(10):4570-4583.
- [ 20 ] Huth L, Rose M, Kloubert V, et al. BDNF is associated with SFRP1 expression in luminal and basal-like breast cancer cell lines and primary breast cancer tissues: A novel role in tumor suppression? [J/OL]. *PLoS One*, 2014[2014-07-22]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3572181>.

收稿日期:2014-08-01; 修回日期:2014-09-07