

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.11.009

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2017.11.009>

神经母细胞源性肿瘤患儿 *N-MYC* 基因拷贝数的变化及其临床意义

王沛¹, 关丹丹¹, 岳婷¹, 许素素¹, 宫丽平^{1,2}, 袁远^{1,2}

(1. 首都医科大学基础医学院病理系, 北京 100069; 2. 肿瘤侵袭和转移机制研究北京市重点实验室, 北京 100069)

[摘要] 目的: 研究*N-MYC*基因拷贝数在神经母细胞源性肿瘤(neuroblastic tumors, NTs)患者中的异常改变及其临床病理学意义。方法: 收集483例NTs患儿肿瘤组织标本, 其中包括神经母细胞瘤(neuroblastoma, NB) 388例、节细胞神经母细胞瘤(ganglioneuroblastoma, GNB) 89例、节细胞神经瘤(ganglioneuroma, GN) 6例。运用荧光原位杂交技术(fluorescence in situ hybridization, FISH)检测*N-MYC*基因拷贝数改变。考察*N-MYC*基因拷贝数改变与临床病理学特征的关系并进行生存分析。结果: 483例NTs患儿*N-MYC*基因扩增率为12.4%。*N-MYC*基因扩增均发生在NB中, 而在GNB及GN中未见其扩增($P<0.05$)。*N-MYC*基因拷贝数改变更易发生在低分化程度的NB中($P=0.01$), 且随着分化程度降低, *N-MYC*基因扩增率增加。男性患儿*N-MYC*基因拷贝数改变的发生率多于女性患儿($P=0.05$)。患儿年龄 ≤ 18 个月者*N-MYC*基因扩增率有低于 >18 个月者的趋势($P=0.092$)。生存分析显示: *N-MYC*基因扩增组患儿生存率明显低于获得组及正常组。结论: NTs患儿*N-MYC*基因扩增与NTs的类型、分化程度、性别、年龄及生存密切相关。本研究为NTs患者的诊断、治疗及预后提供可靠的参考和帮助。

[关键词] 神经母细胞源性肿瘤; *N-MYC*; 荧光原位杂交技术; 临床病理分析

Copy number variations and its clinical significance of *N-MYC* gene in children with neuroblastic tumors

WANG Pei¹, GUAN Dandan¹, YUE Ping¹, XU Susu¹, GONG Liping^{1,2}, YUAN Yuan^{1,2}

(1. Department of Pathology, School of Basic Medical Science, Capital Medical University, Beijing 100069;

2. Beijing Key Laboratory for Cancer Invasion and Metastasis Research, Beijing 100069, China)

Abstract **Objective:** To detect *N-MYC* gene copy number alterations, and to analyze their related clinicopathological implications in pediatric neuroblastic tumors (NTs). **Methods:** A total of 483 NT samples were obtained, including 388 neuroblastomas (NBs), 89 ganglioneuroblastomas (GNBs) and 6 ganglioneuromas (GNs). Fluorescence in situ hybridization (FISH) was used to detect numerical aberrations of *N-MYC*. Statistical analysis was used to study its association with clinicopathological features, as well as with the survival rate of patients. **Results:** Of 483 NT cases, *N-MYC* amplification rate was 12.4%. Gene amplification of *N-MYC* were found only in NB, but not in any GNB or GN case ($P<0.05$). *N-MYC* gene amplification was more likely to occur in poorly differentiated neuroblastoma

收稿日期 (Date of reception): 2017-07-18

通信作者 (Corresponding author): 袁远, Email: farfargirl@126.com

($P=0.01$), the rate of which was inversely related to tumor differentiation. The *N-MYC* amplification rate in male patients was higher than that in female patients ($P=0.05$). There was a trend that the amplification rate of *N-MYC* gene was lower in patients ≤ 18 months as compared to patients > 18 months, but difference was not significantly ($P=0.092$). The univariate survival analysis showed that the survival rate of patients with *N-MYC* gene amplification was significantly lower than those with *N-MYC* gain or normal gene status. **Conclusion:** *N-MYC* gene amplification is tightly correlated with tumor type, differentiation, gender, age and survival. Detection of abnormal *N-MYC* copy number would be helpful for the diagnosis and prognosis of neuroblastic tumors.

Keywords neuroblastic tumors; *N-MYC* gene; fluorescence in situ hybridization; clinicopathological analysis

神经母细胞源性肿瘤(neuroblastic tumors, NTs)是儿童最常见的颅外实体肿瘤,起源于原始神经嵴的神经母细胞。根据细胞分化程度,可分为神经母细胞瘤(neuroblastoma, NB)、节细胞神经母细胞瘤(ganglioneuroblastoma, GNB)和节细胞神经瘤(ganglioneuroma, GN)。其中NB是婴儿期发病率和致死性最高的肿瘤,占儿童肿瘤的8%~10%^[1],部分高危和侵袭性NB疗效差^[2-3];GN则较为罕见,为周围神经良性肿瘤,由完全成熟的节细胞构成;而GNB是介于在NB与GN之间的中间类型。NB的临床表现与生物学行为具有明显异质性,部分病例有较好预后,不经治疗即可自行消退或转化为良性的GN;但多数病例恶性度较高,早期可发生转移,且耐药严重,使肿瘤治疗十分困难^[4]。

*N-MYC*基因在1983年首次被报道^[5],是位于人类染色体2p23~24区上具有转录因子活性的原癌基因,为*MYC*基因家族重要成员,在细胞周期调控、细胞增殖分化及肿瘤形成过程中处于重要地位。至今多项研究^[6-7]发现*N-MYC*基因在NB,小细胞肺癌,前列腺癌等多种肿瘤内存在拷贝数改变及高表达。*N-MYC*基因高拷贝数水平可调控下游基因及相关蛋白,如*p53*基因和*N-MYC*下游调节基因1/2,胰岛素瘤相关基因1、谷氨酰胺酶2,核激素受体^[8-12],以此影响NTs细胞的增殖及侵袭力等,并导致患者预后不良^[13]。

本研究应用荧光原位杂交技术(fluorescence in situ hybridization, FISH)对483例NT患儿肿瘤样本进行分析,以探讨*N-MYC*基因拷贝数异常及其临床病理学意义。

1 材料与方法

1.1 病例资料

收集2008年7月至2016年3月在北京儿童医院、301医院、304医院、复旦大学附属儿科医院、湖南省儿童医院及武警总医院送交首都

医科大学临床病理中心进行*N-MYC*基因检测的483例NT组织及相关临床信息。其中男291例,女192例;年龄1~156(中位30)个月;化疗后患儿99例,未化疗384例;病例按照WHO神经系统肿瘤分类标准进行分类,NB 388例、GNB 89例及GN 6例。本研究获得首都医科大学伦理委员会批准,注册号为2015sy71。

1.2 *N-MYC* 基因 FISH 检测

利用位点特异性*N-MYC*/CEP2 (*N-myc*SG/CEP2 SOpabe)双色探针在4 μm 的NT石蜡组织切片上进行FISH检测。具体方法如下:首先用钻石笔标记间质少或缺乏、无出血坏死的肿瘤细胞丰富区域作为杂交区域,切片常规脱蜡、水化后,置入高压锅内沸水煮3 min,之后在37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中用0.1%的胃蛋白酶消化20 min。梯度乙醇脱水、空气干燥后,在杂交区域内加2.0 μL 探针,盖上盖玻片,用橡胶水泥封片。将切片放入原位杂交仪(Abbott ThermoBrite公司)中,启动设定好的程序(75 $^{\circ}\text{C}$ 20 min, 37 $^{\circ}\text{C}$ 24 h),完成变性、杂交过程。杂交结束后,以梯度SSC液洗去切片的背景,最后用含有DAPI的抗荧光衰退封片剂(美国Vector Labs公司)封片。利用荧光显微镜(日本Olympus公司, BX63)观察结果,以Olympus cellSens Standard 1.14软件采集图像。

*N-MYC*拷贝数目增加时,与2号染色体数目相比,每单倍体基因组中*N-MYC*拷贝数目为4~100,定义为扩增;*N-MYC*拷贝数为1~4为,定义为获得^[14]。483例NT患儿中,*N-MYC*基因扩增者60例(12.4%),获得者300例(62.1%),正常者123例(25.5%),总扩增率为12.4%,非扩增率87.6%。

1.3 统计学处理

运用SPSS 17.0统计学软件进行分析。两变量差异分析采用卡方检验分析,检验水准 $\alpha=0.05$;单因素生存分析应用Kaplan-Meier法, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般临床资料

483例NT患儿中,男291例,女192例,男性患儿数量明显多于女性。发病年龄最小者仅1个月,最大者13岁,中位年龄2.5岁。患儿年龄 ≤ 18 个月者165例(34.2%), >18 个月者318例(65.8%)。NB 388例(80.3%),GNB 89例(18.4%),GN 6例(1.2%)。

NT各分类临床特征见表1。184例具有组织学分类信息的NB中(其余204例未提及或无法确定分化类型),分化型91例(49.5%),分化差型90例(49.0%),未分化型3例(2%)。99例患儿为化疗后改变,384例为未化疗患儿。483例患儿送检肿瘤组织多位于腹膜后,占59.6%(288/483),腹膜后肿瘤中43.1%位于肾上腺(124/288);肿瘤位于纵膈者占24.4%(118/483);位于骨髓者占5.0%(24/483);其他及未提及具体部位者53例,共占11.0%(53/483)。对128例患儿进行回访,截至2015年10月30日,死亡患儿29例(22.7%),复发患儿14例(10.9%),85例患儿生存且未复发(66.4%)。

2.2 N-MYC 基因 FISH 检测结果

N-MYC基因FISH检测结果显示在图1。位点特异性双色探针制剂含有以橙色(Spectrum Orange)和绿色(Spectrum Green)荧光素标记的两个探针,橙色荧光标记2号染色体,计数2号染色体的数目;绿色荧光标记N-MYC基因。探针与靶基因杂交后在橙绿滤光片下观察,正常间期细胞核中显示两个橙色和两个绿色荧光信号,为2号染色体及N-MYC基因的数目。当细胞核中橙色或绿色信号

增多或减少时,说明存在2号染色体或N-MYC基因数目异常。

2.3 N-MYC 基因拷贝数异常与临床病理学特征的关系

N-MYC基因拷贝数与NB类型、年龄、性别、化疗与否、NB分化程度的关系见表2。NB患儿N-MYC基因扩增者60例,获得者236例,正常者92例,扩增率15.5%(60/388);GNB患儿N-MYC基因扩增者0例,获得者63例,正常者26例;GN患儿N-MYC基因扩增者0例,获得者1例,正常者5例,N-MYC基因扩增仅发生于NB中。患儿年龄 ≤ 18 个月者N-MYC扩增率为9.1%(15/165), >18 个月者N-MYC基因扩增率为14.5%(46/318),N-MYC基因扩增在年龄较大患儿(>18 个月)中的发病率有增多的趋势($P=0.092$)。男性患儿扩增者42例,获得者185例,正常者63例,N-MYC基因扩增率为14.5%(42/291);女性患儿扩增者19例,获得者114例,正常者59例,N-MYC基因扩增率为9.9%(19/192),N-MYC基因扩增在男性患儿中较女性患儿常见($P=0.05$)。化疗后改变的99例肿瘤中,扩增者14例,获得者69例,正常者16例,N-MYC扩增率为14.1%(14/99);未化疗患儿扩增者47例,获得者231例,正常者106例,N-MYC扩增率为12.2%(47/384)。N-MYC基因扩增与化疗与否无相关性($P=0.4$)。NB分化型中,N-MYC基因扩增者6例,获得者63例,正常者22例,N-MYC扩增率为6.6%;NB分化差型病例中,N-MYC扩增者16例,获得者58例,正常者16例,扩增率17.6%;未分化型中,该基因扩增者2例,获得者1例,扩增率为66.7%。N-MYC基因拷贝数改变更易发生在低分化程度NB中($P=0.01$),且随着分化程度降低,N-MYC扩增率增加。

表1 神经母细胞源性肿瘤的分类及临床特征

Table 1 Classification and clinical features of neuroblastic tumors

项目	NB	GNB	GN
病例数/[例(%)]	388 (80.3)	89 (18.4)	6 (1.2)
男/女	244/144	42/47	5/1
中位年龄/月	24	42	34
年龄/月			
≤ 18	160	5	0
>18	225	84	6
N-MYC基因			
扩增	60	0	0
获得	236	63	1
正常	92	26	5

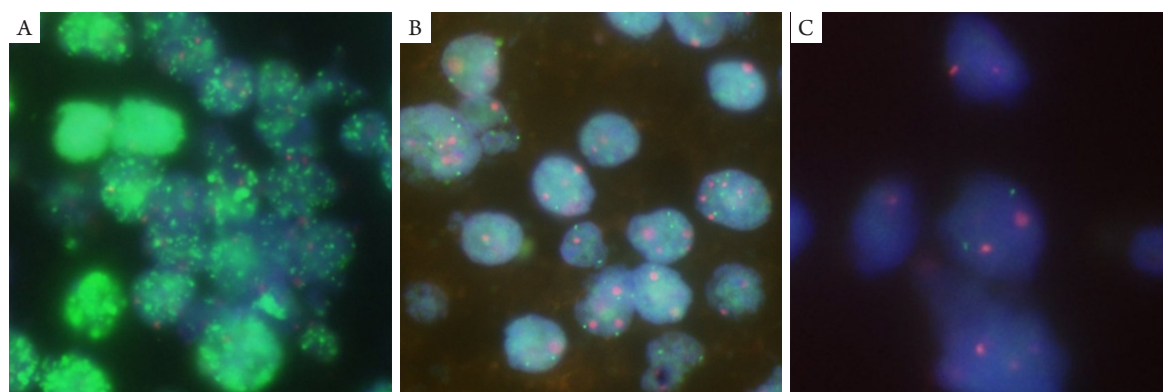


图1 *N-MYC*基因FISH检测结果

Figure 1 *N-MYC* gene FISH detection result

(A) *N-MYC*扩增, 可见2个橙色信号及大于50个拷贝的*N-MYC*的绿色信号; (B) *N-MYC*获得, 可见多个橙色信号(可能与多倍体有关)及4~10个*N-MYC*的绿色信号; (C) *N-MYC*正常, 可见两个橙色信号及两个*N-MYC*的绿色信号。

(A) Amplification: 2 CEP2 signals (orange) and more than 50 *N-MYC* signals (green). (B) Gain: Some CEP2 signals (orange) (may be related to the polyploid) and 4~10 *N-MYC* signals (green); (C) Normal: Cells with 2 *N-MYC* signals (green) and 2 CEP2 signals (orange).

表2 *N-MYC*基因拷贝数与NB类型、年龄、性别、化疗及NB分化程度的关系

Table 2 Relationship between *N-MYC* gene status and the type, age, gender, chemotherapy or the degree of NB differentiation

项目	<i>n</i>	<i>N-MYC</i> 基因				<i>P</i>
		扩增	获得	正常	扩增率/%	
类型						<0.01
NB	388	60	236	92	15.5	
GNB	89	0	63	26	0	
GN	6	0	1	5	0	
年龄/月						0.092
≤18	165	15	110	40	9.1	
>18	318	46	190	82	14.5	
性别						0.05
男	291	42	186	63	14.5	
女	192	19	114	59	9.9	
化疗与否						0.4
化疗	99	14	69	16	14.1	
未化疗	384	47	231	106	12.2	
NB分化程度						0.01
分化型	91	6	63	22	6.6	
分化差型	90	16	58	16	17.8	
未分化型	3	2	1	0	66.7	

2.4 生存分析

本研究中获得随访资料者共128例, 其中 *N-MYC* 基因扩增者15例, 获得者76例, 正常者37例; 截至2015年10月, 29例死亡, 99例生存, 生存期2~54个月。其中 *N-MYC* 基因扩增患儿7例死亡, 8例生存, 生存期4~39(中位18)个月; *N-MYC* 基因获得患儿12例死亡, 64例生存, 生存期3~54(中位22)个月; *N-MYC* 基因正常患儿死亡10例, 生存27例, 生存期2~53(中位22)个月。经生存分析(Kaplan-Meier法)显示: *N-MYC* 基因扩增患儿生存期明显低于 *N-MYC* 基因获得和正常患儿 ($P=0.005$, 图2), 表明 *N-MYC* 基因拷贝数改变与 NT 患儿预后有关。

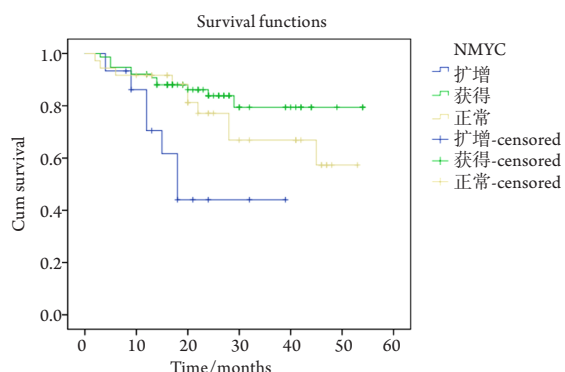


图2 *N-MYC* 基因拷贝数不同改变的 NT 患儿生存曲线

Figure 2 Survival curves for NT patients with different *N-MYC* gene copy numbers

根据 *N-MYC* 基因拷贝数的改变分为扩增组、获得组和正常组, 三组间差异有统计学意义 ($P=0.005$)。

Based on the *N-MYC* copy number variations, the cohort of patients were divided into three groups: a *N-MYC* amplification group, a *N-MYC* gain group and normal status group. The difference between these three groups was statistically significant ($P=0.005$).

3 讨论

神经母细胞源性肿瘤是儿童常见的颅外实体肿瘤, 多发生于5岁以前, 中位年龄22个月^[4,15]。多项研究^[2,5,12]发现: 2号染色体上的 *N-MYC* 基因在 NT 组织中存在扩增或获得, 而在正常组织中 *N-MYC* 基因拷贝数正常。 *N-MYC* 的拷贝数改变与 NT 的进展、分期或肿瘤细胞分化程度有关, 并可为治疗方案的选择提供帮助。

本研究结果显示: 483例 NT 患者中, 发病年龄1个月~13岁, 中位年龄2.5岁, 较其他研究^[16]

报道中位年龄(22个月)略长, 可能由于本组病例包括一些 GN, GNB 病例, 二者年龄多较 NB 患儿大。483例 NT 患儿中 NB 患儿占 80.3%, GNB 患儿占 18.4%, GN 患儿占 1.2%。男性患儿发病率高于女性患儿(男女之比为 1.51:1), 与其他研究^[16]数据基本一致。本研究结果显示: 男性患儿 *N-MYC* 扩增率高于女性, 表明 *N-MYC* 扩增更常见于男性患儿, 关于男女性患儿 *N-MYC* 扩增率差异尚未见文献报道, 该结果有待于进一步证实。

NT 最常发生在腹膜后及纵隔, 其中腹膜后以肾上腺为主, 本研究患儿肿瘤送检部位多数位于腹膜后(59.6%), 其中肾上腺发病患者占腹膜后发病的 43.1%, 占总发病人数的 25.7%, 与其他研究^[17]数据基本一致。

483例 NT 患者病例中, *N-MYC* 扩增率为 12.4%(60/483), 与国外多机构联合研究的结果(10%)基本一致^[5]。本研究结果还显示: *N-MYC* 扩增仅发生于 NB 患者中, GN 及 GNB 中未发现 *N-MYC* 扩增, 与文献^[16]报道一致。已有研究^[8-12]表明在 NT 中, *N-MYC* 基因的高拷贝数水平可通过调控 *N-MYC* 下游相关基因及蛋白, 促进 NT 的增殖, 影响肿瘤的侵袭与转移, 促进肿瘤发展并引起不良预后。

本研究结果显示在确定分化类型的部分 NB 病例中 *N-MYC* 扩增率随着分化程度的降低而升高 ($P=0.01$), 推测 *N-MYC* 拷贝数异常与 NT 分化及恶性程度有关。另外, 本研究中化疗后病例 *N-MYC* 扩增率较未化疗病例略高, 推测可能与化疗患儿肿瘤恶性程度较高有关, 但两者 *N-MYC* 扩增率无统计学意义 ($P=0.4$), 化疗对 *N-MYC* 拷贝数异常的影响尚未有相关研究, 需进一步加大样本量进行研究。

本研究中, *N-MYC* 基因扩增者及获得者和正常者相比, 生存曲线有明显差异, 说明 *N-MYC* 扩增与不良预后关系密切。近年来有多项研究显示扩增的 *N-MYC* 可通过下游通路及基因, 调控 NT 相关蛋白、离子通道, 以促进肿瘤增殖、转移、抑制肿瘤分化, 提高肿瘤恶性程度, 引起不良预后。而 *N-MYC* 基因获得者生存率低于 *N-MYC* 基因正常者, 与其他相关报道结果一致^[16], 提示 *N-MYC* 获得者有较好预后, 但目前关于 *N-MYC* 获得对预后影响的研究相对较少, 其具体原因及机制有待进一步研究。

综上所述, *N-MYC* 基因与 NTs 的类型、分化程度、性别及发病年龄有关, *N-MYC* 扩增在分化程度低, 男性患儿及 18 个月以上患儿更常见。本研

究在483例大样本NTs中显示*N-MYC*基因扩增及获得与NT的发生发展有关, 可为其临床诊断和预后提供重要参考。而*N-MYC*与NT临床病理学联系的相关机制有待进一步研究。

参考文献

- 李仲荣. 神经母细胞瘤的临床诊断与治疗[J]. 实用儿科临床杂志, 2012, 27(23): 1781-1784.
LI Zhongrong. Clinical diagnosis and treatment of neuroblastoma[J]. Journal of Applied Clinical Pediatrics, 2012, 27(23): 1781-1784.
- 王威亚, 李金男, 吴玮璐, 等. 83例神经母细胞瘤患儿*N-myc*和*ALK*基因检测及临床病理分析[J]. 临床儿科杂志, 2015, 33(8): 720-725.
WANG Weiya, LI Jinnan, WU Weilu, et al. Detection of *N-myc* and *ALK* abnormality in and clinicopathological analyses of 83 cases of neuroblastoma[J]. Journal of Clinical Pediatrics, 2015, 33(8): 720-725.
- 唐锁勤. 高危神经母细胞瘤的治疗[J]. 中国当代儿科杂志, 2014, 16(2): 103-107.
TANG Suoqin. A review on treatment of high-risk neuroblastoma[J]. Chinese Journal of Contemporary Pediatrics, 2014, 16(2): 103-107.
- 陈佳敏, 周春菊, 马晓莉, 等. 儿童神经母细胞源性肿瘤*TOP2A*蛋白表达及其基因拷贝数的变化[J]. 中华病理学杂志, 2016, 45(11): 748-754.
CHEN Jiamin, ZHOU Chunjun, MA Xiaoli, et al. Abnormality of *TOP2A* expression and its gene copy number variations in neuroblastic tumors[J]. Chinese Journal of Pathology, 2016, 45(11): 748-754.
- Bagatell R, Beck-Popovic M, London WB, et al. Significance of *MYCN* amplification in international neuroblastoma staging system stage 1 and 2 neuroblastoma: a report from the International Neuroblastoma Risk Group database[J]. J Clin Oncol, 2009, 27(3): 365-370.
- Lee JK, Phillips JW, Smith BA, et al. *N-Myc* drives neuroendocrine prostate cancer initiated from human prostate epithelial cells[J]. Cancer Cell, 2016, 29(4): 536-547.
- He J, Gu L, Zhang H, et al. Crosstalk between *MYCN* and *MDM2-p53* signal pathways regulates tumor cell growth and apoptosis in neuroblastoma[J]. Cell Cycle, 2011, 10(17): 2994-3002.
- Zhang D, Jia J, Zhao G, et al. *NDRG1* promotes the multidrug resistance of neuroblastoma cells with upregulated expression of drug resistant proteins[J]. Biomed Pharmacother, 2015, 76: 46-51.
- Chen C, Breslin MB, Lan MS. *INSM1* increases *N-myc* stability and oncogenesis via a positive-feedback loop in neuroblastoma[J]. Oncotarget, 2015, 6(34): 36700-36712.
- Xiao D, Ren P, Su H, et al. *Myc* promotes glutaminolysis in human neuroblastoma through direct activation of glutaminase 2[J]. Oncotarget, 2015, 6(38): 40655-40666.
- Ribeiro D, Klarqvist MD, Westermark UK, et al. Regulation of nuclear hormone receptors by *MYCN*-driven miRNAs impacts neural differentiation and survival in neuroblastoma patients[J]. Cell Rep, 2016, 16(4): 979-993.
- 蔡荣芹, 周春菊, 孙勤暖, 等. 儿童神经母细胞源性肿瘤中*N-myc*和*C-myc*基因的分子遗传学异常及其临床病理学意义[J]. 中华病理学杂志, 2013, 42(5): 299-304.
CAI Rongqin, ZHOU Chunju, SUN Qinnuan, et al. Molecular genetic abnormalities of *N-myc* and *C-myc* in pediatric neuroblastic tumors and clinical pathologic significance[J]. Chinese Journal of Pathology, 2013, 42(5): 299-304.
- Park JR, Eggert A, Caron H. Neuroblastoma: biology, prognosis, and treatment[J]. Hematol Oncol Clin North Am, 2010, 24(1): 65-86.
- Lee GY, Chun YS, Shin HW, et al. Potential role of the *N-MYC* downstream-regulated gene family in reprogramming cancer metabolism under hypoxia[J]. Oncotarget, 2016, 7(35): 57442-57451.
- Bowen KA, Chung DH. Recent advances in neuroblastoma[J]. Curr Opin Pediatr, 2009, 21(3): 350-356.
- Lee GY, Chun YS, Shin HW, et al. Potential role of the *N-MYC* downstream-regulated gene family in reprogramming cancer metabolism under hypoxia[J]. Oncotarget, 2016, 7(35): 57442-57451.
- Zhang Z, Faouzi M, Huang J, et al. *N-Myc*-induced up-regulation of *TRPM6/TRPM7* channels promotes neuroblastoma cell proliferation[J]. Oncotarget, 2014, 5(17): 7625-7634.

本文引用: 王沛, 关丹丹, 岳娉, 许素素, 宫丽平, 袁远. 神经母细胞源性肿瘤患儿*N-MYC*基因拷贝数的变化及其临床意义[J]. 临床与病理杂志, 2017, 37(11): 2339-2344. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.11.009

Cite this article as: WANG Pei, GUAN Dandan, YUE Ping, XU Susu, GONG Liping, YUAN Yuan. Copy number variations and its clinical significance of *N-MYC* gene in children with neuroblastic tumors[J]. Journal of Clinical and Pathological Research, 2017, 37(11): 2339-2344. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.11.009