

PDCD5 基因与非小细胞肺癌的研究进展

刘永蕊,刘静蕾,唐国栋,王 艳
(哈尔滨医科大学附属肿瘤医院,黑龙江 哈尔滨 150081)

摘 要:程序性细胞死亡分子 5(programmed cell death 5,PDCD5)作为一种重要的凋亡正调控分子,在许多疾病的发生发展过程中起着重要作用。PDCD5 在肺癌、结直肠癌、卵巢癌、乳腺癌等多种恶性肿瘤细胞株、患者血清及其肿瘤组织中均有表达水平下降,而在骨关节炎、狼疮性肾炎、支气管哮喘等自身免疫性疾病中表达上调。大量的临床实验研究涉及了 PDCD5 与非小细胞肺癌之间的关系,全文就目前 PDCD5 与非小细胞肺癌的研究进展作一综述。

关键词:PDCD5;非小细胞肺癌;文献分析

中图分类号:R734.2 **文献标识码:**B **文章编号:**1004-0242(2015)04-0302-05

doi:10.11735/j.issn.1004-0242.2015.04.A011

Research Progress of PDCD5 in Non-small Cell Lung Cancer

LIU Yong-rui, LIU Jing-lei, TANG Guo-dong, et al.

(Harbin Medical University Cancer Hospital, Harbin 150081, China)

Abstract: Programmed cell death 5(PDCD5) is an important molecule related to apoptosis and plays important roles in the process of many diseases. PDCD5 was under-expression in a variety of lung cancer, colorectal cancer, ovarian cancer, breast cancer and other malignant tumor cells, serum and tumor tissue. However, PDCD5 was overexpressed in autoimmune disease, such as osteoarthritis, lupus nephritis, bronchial asthma. A large quantity of clinical experiments studies concern the relationship between PDCD5 and non-small cell lung cancer. The current research progress of PDCD5 and non-small cell lung cancer were reviewed in this paper.

Key words: PDCD5; non-small cell lung cancer; literature review

原发性支气管肺癌是全球高发且常见的恶性肿瘤,严重威胁着全人类的生命健康,在我国,肺癌的发病率及死亡率逐年上升。非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC) 占有肺癌病例的 80%~85%,是肺癌死亡病例的主要组成部分^[1]。目前,肺癌的治疗采取多学科综合治疗的模式,包括根治性手术治疗、化疗、放疗、分子靶向治疗及生物治疗,但肺癌患者的 5 年总体生存率仍低于 15%。众所周知,肿瘤的发生、发展是一个多基因参与、多阶段、多因素的演变过程,细胞凋亡失衡在此过程中起着非常重要的作用,程序性细胞死亡 5(programmed cell death 5, PDCD5)作为凋亡相关基因中的一员,其在肿瘤中作用的研究已成为目前的一大热点。

1 PDCD5 的定位与结构

PDCD5 原名为 TFAR19,是由北京大学人类疾病基因中心从白血病细胞株 TF-1 细胞中克隆得到的,具有促进多种细胞凋亡和抑制增殖的效应,其异常表达与多种肿瘤及自身免疫性疾病有相关性^[2]。PDCD5 定位于 19q12~q13,由 6 个外显子和 5 个内含子组成,其外显子 6 可能是编码与凋亡活性相关的功能结构域;基因全长约 6Kb, cDNA 全长为 559 个碱基,共含有 125 个氨基酸残基。根据 PDCD5 的三维结构显示,41~101 氨基酸残基形成三个螺旋链和核心蛋白;而 N 端(3~40 氨基酸残基)形成一个独立于核区域的稳定 α 螺旋, C 端 (102~125 氨基酸残基)是一个可以移动的非结构域;但是,目前并没有关于 PDCD5 终端区域的功能相关报道^[3]。PDCD5 的

收稿日期:2014-09-10

通讯作者:王艳, E-mail: wangyan86298263@163.com

mRNA 除了在造血系统外,在成人的心脏、肾脏、肾上腺、睾丸及胎盘中高度表达,其中胚胎组织的表达低于成年组织,肿瘤细胞的表达低于正常细胞。*PDCD5* 在种属进化过程中是高度保守的基因,并且随着种属进化,同源性不断增加,其进化保守性提示它是一种具有重要生物学功能的分子^[4]。

2 *PDCD5* 与细胞凋亡的关系

PDCD5 是一个新的凋亡调节基因,具有凋亡促进功能,主要定位于细胞核内,其高表达在促细胞凋亡过程中有重要作用。研究发现 *PDCD5* 在细胞凋亡的早期表达上调,并且快速发生核转位,而且在 DNA 片段化及磷脂酰丝氨酸外翻之前出现核内聚集^[5]。*PDCD5* 在人类许多肿瘤中显示低表达,例如乳腺癌^[6]、卵巢上皮性癌^[7]、软骨肉瘤^[8]、星形胶质瘤^[9]等,而在骨关节炎^[10]、狼疮性肾炎^[11]、支气管哮喘^[12]等自身免疫性疾病中表达上调。研究发现 *PDCD5* 是凋亡促进剂,而不是凋亡诱导剂^[13]。然而,关于 *PDCD5* 在细胞增殖与凋亡的分子机制仍然不是很清楚,大体归纳以下几点。

第一:在细胞核中,*PDCD5* 可加强组蛋白乙酰转移酶 Tip60 的稳定性,并且增加 Tip 介导的组蛋白的乙酰化(HAT)。在 UV 照射的情况下,*PDCD5* 与 Tip60 的结合量显著增加,增强了 HAT 的活动度和 Tip60 介导的组蛋白乙酰化,进而上调下游凋亡相关分子 Bax 的表达,促进细胞凋亡^[14]。研究证明在细胞周期循环和细胞凋亡中,*PDCD5* 均可以调控 p53 的表达,同时 *PDCD5* 通过抑制 MDM2 介导的 p53 出核和泛素化而维持 p53 的稳定性。在 DNA 损伤的情况下,*PDCD5* 能够影响 p53 的多位点的磷酸化和转录活性,参与到其下游 p21 的转录调控以及细胞周期,导致细胞周期停滞在 G₁ 期,使细胞有足够修复时间。因此 *PDCD5* 与 p53、MDM2 之间形成一个 *PDCD5*-MDM2-p53 复合体,*PDCD5* 通过解离 p53 与 MDM2 竞争性的结合 p53,从而起到稳定 p53 的作用,同时 *PDCD5* 可以促进 MDM2 的泛素化,并抑制其表达,但这一机制需进一步研究^[15,16]。如果细胞修复失败,*PDCD5* 可以协同组蛋白乙酰化转移酶 Tip60,促进 P53K120 的乙酰化,进而激活 Bel 凋亡家族的 Bax 的表达,促进 DNA 损伤引起的细胞凋亡^[14]。

PDCD5、Tip60 和 p53 之间的相互作用表明它们之间存在一个相互调节的网络,在细胞凋亡的调节中起着重要作用。

第二:在线粒体中,*PDCD5* 调节 Bax 蛋白转移到线粒体外膜,在线粒体膜上形成一个通道启动线粒体通透性转化孔(MPT),导致膜电位降低,致使细胞色素 C 释放,进入细胞质中的细胞色素 C 与凋亡蛋白酶活化因子(apoptotic protease-activating factor, Apaf-1) 形成多聚复合体,通过 Apaf-1 氨基端的 caspase 募集结构域募集胞质中的 caspase-9 的前体,激活 caspase-9,进而激活下游的 caspase-3,行使对其相应底物的切割作用,引起细胞凋亡。*PDCD5* 可以与 caspase-3 结合并延长活化的 caspase-3 半衰期,发挥 caspase-3 正调节的效应,*PDCD5* 通过直接或间接途径促进 caspase-3 的凋亡效应^[17,18]。细胞凋亡的核心成分是半胱氨酸蛋白酶家族(cysteine 1 aspartate specific protein-ase, caspase),活化的 caspase 能降解细胞的结构蛋白和功能蛋白,导致细胞凋亡;而 caspase-3 处于凋亡有序级联反应的下游,是细胞凋亡过程的关键酶^[18]。因此,*PDCD5* 可能作为 caspase-3 蛋白的正调控因子促进细胞凋亡。

第三,副凋亡(para-apoptosis)是由 Asher 等^[19]首次提出的,其典型的特征是线粒体和内质网肿胀造成的胞浆空泡化。与坏死相比,副凋亡并不出现细胞膜的破坏。TAJ/TROY 是肿瘤坏死因子家族的一员,可以诱导细胞副凋亡的发生 Wang 等^[20]研究发现,在透射电子显微镜下可见,副凋亡细胞的细胞质中出现广泛的空泡和肿胀的线粒体,但是并未发现细胞核皱缩和碎裂;与细胞凋亡相比,在 TAJ/TROY 引起细胞的副凋亡过程中,也会出现磷脂酰丝氨酸外翻现象和线粒体膜跨膜电位下降,但是空泡的产生独立于 caspase 的活化。此外,在细胞发生副凋亡时,可检测到细胞内程序性细胞死亡因子 5(*PDCD5*)的表达量显著增加,这些结果表明 *PDCD5* 在细胞凋亡和副凋亡过程中都起重要的调节作用,但其具体机制仍不明确。

以上几条凋亡通路表明 *PDCD5* 在细胞凋亡中起重要作用,在人类多种肿瘤细胞中,*PDCD5* 的表达下降,这一结果提示肿瘤细胞可能通过抑制 *PDCD5* 的表达而抵制凋亡^[21]。但 *PDCD5* 在细胞凋亡通路中的定位、作用位点以及与其他凋亡相关因子的相互关系仍需进一步深入研究。

3 PDCD5 与非小细胞肺癌

在我国,肺癌仍是癌症死亡的主要原因,由于局部晚期和远处转移失去手术切除机会,非小细胞肺癌的治疗现状仍不乐观,即使早期患者接受了完整切除术,最终也会因为原发或继发耐药等问题最终导致复发和转移,直到现在,有效的治疗策略仍是有限的。PDCD5 在人类很多肿瘤中是低表达状态,并且与肿瘤的进展和预后密切相关^[22]。然而,国内外关于 PDCD5 在非小细胞肺癌发生、发展中作用机制相关报道甚少。

Spinola 等^[23]在研究 PDCD5 基因上游 35kb 处的 SNPrs1862214 与肺癌关系,发现与 CC 基因型相比,变异 GG 或 GC 的基因型显著增加肺癌的发病风险,且在恶性程度高及生存期短的肺癌患者中,突变率更高;同时 PDCD5 mRNA 在肺癌组织中较正常肺组织下降了 2.4 倍,这表明 PDCD5 可能是一个潜在的分子标记,可以预测肺癌的发生风险和预后,但具体机制不明确。Xu 等^[24]研究发现与肺部正常组织相比,PDCD5 在高分化肺腺癌组织中的表达显著下降,并且通过肺腺癌 A549 细胞研究 PDCD5 对核扩散和集落形成的影响,发现 PDCD5 的表达显著抑制细胞增殖和 A549 细胞集落的形成。这些结果均表明 PDCD5 在非小细胞肺癌的发生、发展中扮演重要角色。张婧雯等^[25]利用免疫组化方法在蛋白水平表明 PDCD5 阳性表达率在癌旁组织显著高于非小细胞肺癌组织,并且 PDCD5 在癌组织中表达与患者的性别、年龄、肿瘤病理类型均无关,而是随肿瘤分化程度的下降、TNM 分期的升高及淋巴结转移,其表达随之下降,染色强度也随之减弱;研究证实 PDCD5 在非小细胞肺癌发生、发展中起抑制作用,在非小细胞肺癌恶性转化中可能起保护作用,但具体机制尚待研究。

尽管肺癌的治疗采取多学科综合治疗模式,但化疗在肺癌的治疗中仍然起着至关重要的作用,由于化疗药物对正常细胞的毒性以及原发或继发耐药等问题经常导致化疗失败,因此,如何在不增加非特异性细胞毒性的前提下有效杀灭肿瘤细胞成为提高化疗药物疗效的一个关键问题。体外实验表明,PDCD5 在多种肿瘤中均可促进肿瘤细胞发生凋亡和抑制肿瘤生长,延长生存期,对放、化疗起协同作

用^[6,26,27]。目前,以铂类药物为主的联合化疗方案已是国际公认的晚期 NSCLC 的标准方案,赵青等^[28]收集Ⅲ、Ⅳ期非小细胞肺癌 30 例,其中鳞癌 11 例,腺癌 16 例,腺鳞癌 3 例,均未接受放、化疗;随机分为 PDCD5 阴性、PDCD5 阳性组,给予顺铂联合多西他赛药物进行化疗,治疗周期 21d,4 个周期后,有效率为 36.67%,其中阳性组有效率为 80%,阴性组有效率为 28%,差异有统计学意义($P<0.05$),该研究发现 PDCD5 在不增加化学药物毒性的情况下,极大的促进肿瘤细胞的凋亡,增加了化疗效果。此前研究表明,PDCD5 能增强化疗药物对线粒体膜的破坏,可以在不增加化疗药物剂量和毒性反应的情况下提高化疗药物疗效,提供了化疗药物与抗癌基因联合治疗肿瘤的模式^[29]。因此,在非小细胞肺癌治疗过程中,通过将 PDCD5 基因与化疗或放疗联合起来,将显著提高化疗药物或射线治疗肿瘤的疗效。同时,随着研究的不断深入,靶向治疗在晚期非小细胞肺癌的治疗中已取得重大成果,因此,PDCD5 作为一种新的治疗靶点,有望为非小细胞肺癌的提供更多的治疗手段。

综上所述,由于肺癌早期缺乏特异性症状,诊断时多数患者已属中晚期,因此对 PDCD5 与非小细胞肺癌关系研究具有重要意义。实验表明,PDCD5 在非小细胞肺癌中的蛋白及 mRNA 水平的表达均下降,推测 PDCD5 在非小细胞肺癌的发生发展、转移以及治疗过程中具有重要作用,但具体机制尚不明确,其作为肺癌诊断和治疗方面的一个新的潜在靶点,需要更多的临床和基础实验来加以验证。

4 PDCD5 与其他肿瘤

目前许多研究证明,PDCD5 在多种癌组织中的表达明显低于癌旁组织及正常组织。Zhang 等^[30]采用 RT-PCR、Western blot 和免疫组化方法检测显示卵巢上皮性癌患者较正常人 PDCD5 表达明显下调,并予相关分析研究显示 PDCD5 下降程度与疾病分期、生存期显著相关。谭万龙等^[31]应用免疫组化的方法显示肾透明细胞癌组织 PDCD5 阳性表达率较癌旁肾组织下降,同时 PDCD5 的阳性表达率随肾透明细胞癌病理分级和临床分期的上升而显著下降,提示 PDCD5 在肾透明细胞癌的浸润和转移中可能有

抑制作用。刘磊玉等^[32]的结果提示,单独的 PDCD5 过表达,并不影响前列腺癌细胞的生长状况,一旦给以顺铂的刺激,就能够显著增加前列腺癌细胞的凋亡,这种凋亡现象的发生可能与过表达的 PDCD5 通过降低 *Bcl-2/Bax* 基因的表达实现的,说明 *PDCD5* 基因能够抑制前列腺癌细胞的增殖,促进其凋亡。Xu 等^[35]通过免疫组化分析发现,PDCD5 蛋白在喉鳞状细胞癌中的表达比喉正常组织减少,进一步评估显示 PDCD5 的表达率与年龄、性别、淋巴结转移情况无关,而与组织学分级和 TNM 分期密切相关,推断 PDCD5 在喉鳞状细胞癌的发展和组织分期中起重要作用。*PDCD5* 是一个重要的凋亡正调控基因,其在多种疾病(肿瘤、白血病等)中表达下调,如果研究出其在疾病中的表达机制,将对肿瘤的早期发现、早期诊断、早期治疗有很大的应用价值。

5 结 语

综上所述,PDCD5 可能参与肺癌早期的发生,可作为非小细胞肺癌的恶性程度、局部浸润、远处转移及危险因素评估的指标;因此,PDCD5 有可能成为一种新的肿瘤分子标志物和临床治疗的新靶点,为非小细胞肺癌的早期诊断和治疗提供新的思路,但还需要更多的临床和基础实验来加以验证。

参考文献:

- [1] Molina JR, Yang P, Cassivi SD, et al. Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship[J]. Mayo Clin Proc, 2008, 83(5): 584-594.
- [2] Liu H, Wang Y, Zhang Y, et al. TFAR19, a novel apoptosis-related gene cloned from human leukemia cell line TF-1, could enhance apoptosis of some tumor cells induced by growth factor withdrawal[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1999, 254(1): 203-210.
- [3] Han XR, Sun Y, Bai XZ. The anti-tumor role and mechanism of integrated and truncated PDCD5 proteins in osteosarcoma cells [J]. Cell Signal, 2012, 24(8): 1713-1721.
- [4] Hong J, Zhang J, Liu Z, et al. Solution structure of *S. Cerevisiae* PDCD5-like protein and its promoting role in H₂O₂-induced apoptosis in yeast [J]. Biochemistry, 2009, 48(29): 6824-6834.
- [5] Chen C, Zhou H, Xu L, et al. Recombinant human PDCD5 sensitizes chondrosarcomas to cisplatin chemotherapy in vitro and in vivo[J]. Apoptosis, 2010, 15(7): 805-813.
- [6] Wang LL, Wang CJ, Su BN. Recombinant human PDCD5 protein enhances chemo-sensitivity of breast cancer in vitro and in vivo[J]. Biochem Cell Biol, 2013, 91(6): 526-531.
- [7] Zhang X, Wang X, Song X, et al. Clinical and prognostic significance of lost or decreased PDCD5 expression in human epithelial ovarian carcinomas[J]. Oncol Rep, 2011, 25(2): 353-358.
- [8] Chen C, Zhou H, Xu L, et al. Prognostic significance of downregulated expression of programmed cell death 5 in chondrosarcoma[J]. Surg Oncol, 2010, 102(7): 838-843.
- [9] Li H, Wang Q, Gao F, et al. Reduced expression of PDCD5 is associated with high-grade astrocytic gliomas [J]. Oncol Rep, 2008, 20(3): 573-579.
- [10] Yi C, Ma C, Xie Z, et al. Down-regulation of programmed cell death 5 by insulin-like growth factor 1 in osteoarthritis chondrocytes[J]. Int Orthop, 2013, 37(5): 937-943.
- [11] Li X, Huang JP, Ding J. Apoptosis and expression of PDCD5 and Caspase-3 in renal tissues of children with lupus nephritis[J]. Zhonghua Er Ke Za Zhi, 2005, 43(7): 517-520.
- [12] Diao XL, Zhu HH, He B, et al. Expression and significance of programmed cell death 5 in patients of bronchial asthma[J]. Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 2012, 93(20): 1392-1395. [刁筱琳, 朱红贺, 蓓潘, 等. 程序化细胞死亡因子 5 在支气管哮喘患者血清中的表达及其意义 [J]. 中华医学杂志, 2012, 93(20): 1392-1395.]
- [13] Zhang X, Wang X, Song X, et al. Clinical and prognostic significance of lost or decreased PDCD5 expression in human epithelial ovarian carcinomas [J]. Oncol Rep, 2011, 25(2): 353-358.
- [14] Zhuge C, Chang Y, Li Y, et al. PDCD5-regulated cell fate decision after ultraviolet-irradiation-induced DNA damage [J]. Biophys J, 2011, 101(11): 2582-2591.
- [15] Xu LJ, Hu J, Zhao YB, et al. PDCD5 interacts with p53 and functions as a positive regulator in the p53 pathway [J]. Apoptosis, 2012, 17(11): 1235-1245.
- [16] Yao H, Feng Y, Zhou T, et al. NMR studies of the interaction between human programmed cell death 5 and human p53[J]. Biochemistry, 2012, 51(13): 2684-2693.
- [17] Essers PB, Klasson TD, Pereboom TC, et al. The von Hippel-Lindau tumor suppressor regulates programmed cell death 5-mediated degradation of Mdm2 [J]. Oncogene, 2014, Jan 27. [Epub ahead of print]
- [18] Li HY, Zhang X, Song XG, et al. PDCD5 promotes cisplatin-induced apoptosis of glioma cells via activating mitochondrial apoptotic pathway[J]. Cancer Biology & Therapy, 2012, 13: 822-830.

- [19] Asher E. Evaluation of cell death in EBV-trans-formed lymphocytes using agarose gel electrophoresis, light microscopy and electron microscopy. II. induction of non-classic apoptosis("para-apoptosis") by tritiated thymidine [J]. Leuk Lymphoma, 1995, 19(1-2): 107-119.
- [20] Wang Y, Li XT, Wang L, et al. An alternative form of paraptosis-like cell death, triggered by TAJ/TROY and enhanced by PDCD5 overexpression [J]. J Cell Sci, 2004, 117(Pt 8): 1525-1532.
- [21] Li YH, Zhou G, La LJ, et al. Transgenic human programmed cell death 5 expression in mice suppresses skin cancer development by enhancing apoptosis [J]. Life Sciences, 2013, 92(24-26): 1208-1214.
- [22] Gao F, Ding LL, Zhao MQ, et al. The clinical significance of reduced programmed cell death 5 expression in human gastrointestinal stromal tumors [J]. Oncol Rep, 2012, 28(6): 2195-2199.
- [23] Spinola M, Meyer P, Kammerer S, et al. Association of the PDCD5 locus with lung cancer risk and prognosis in smokers [J]. Clin Oncol, 2006, 24(11): 1672-1678.
- [24] Xu S, Sui G, Yuan L, et al. Expression of programmed cell death 5 protein inhibits progression of lung carcinoma in vitro and in vivo via the mitochondrial apoptotic pathway [J]. Mol Med Rep, 2014, 10(4): 2059-2064.
- [25] Zhang JW, Jiang JG, Zhai ZY, et al. The expression of PDCD5 in NSCLC and its Significance [J]. Chinese Journal of Gerontology, 2013, 33(9): 2006-2008. [张婧雯, 蒋军广, 翟展艺, 等. 凋亡相关基因 PDCD5 在非小细胞肺癌中的表达及临床意义 [J]. 中国老年学杂志, 2013, 33(9): 2006-2008.]
- [26] Wang SY, Zeng X, Liu YP, et al. Construction and characterization of a PDCD5 recombinant lentivirus vector and its expression in tumor cells [J]. Oncol Rep, 2012, 28(1): 91-98.
- [27] Xu HY, Chen ZW, Pan YM, et al. Transfection of PDCD5 effect on the biological behavior of tumor cells and sensitized gastric cancer cells to Cisplatin-induced apoptosis [J]. Dig Dis Sci, 2012, 57(7): 1847-1856.
- [28] Zhao Q, Zhang MC, Mei TH. Relationship between PDCD5 expression and chemosensitivity of NSCLC [J]. Guangdong Medical Journal, 2013, 34(15): 2331-2333. [赵青, 张明川, 梅同华. 程序化死亡因 5 基因表达与非小细胞肺癌患者对化疗药物敏感性的关系 [J]. 广东医学, 2013, 34(15): 2331-2333.]
- [29] Wu CC, Wang CH, Wang JS. Programmed cell death 5 and its application on anti-tumor research [J]. Journal of International Oncology, 2011, 38(6): 418-420. [武成闯, 王春晖, 王剑松. 程序化细胞死亡分子 5 及其在抗肿瘤研究中的应用 [J]. 国际肿瘤学杂志, 2011, 38(6): 418-420.]
- [30] Zhang X, Wang X, Song X, et al. Clinical and prognostic significance of lost or decreased PDCD5 expression in human epithelial ovarian carcinomas [J]. Oncol Rep, 2011, 25(2): 353-358.
- [31] Tan WL, Xiong L, Zheng SB, et al. Relationship between programmed cell death 5 protein expression and prognosis of renal cancer cell carcinoma [J]. Journal of Southern Medical University, 2006, 26(9): 1316-1318. [谭万龙, 熊林, 郑少斌, 等. 肾透明细胞癌 PDCD5 表达及与预后的关系 [J]. 南方医科大学学报, 2006(9), 26: 1316-1318.]
- [32] Liu LY, Zhao BJH, Qin W, et al. Transfection of PDCD5 promotes effects of cisplatin on apoptosis-inducing of prostate cancer cells [J]. Cancer Research on Prevention and Treatment, 2012, 39(1): 32-35. [刘磊玉, 赵彬佳惠, 秦玮, 等. 转染 PDCD5 基因促进顺铂诱导前列腺癌细胞的凋亡作用 [J]. 肿瘤防治研究, 2012, 39(1): 32-35.]
- [33] Xu FL, Wu K, Zhao MQ, et al. Expression and clinical significance of the programmed cell death 5 gene and protein in laryngeal squamous cell carcinoma [J]. Journal of International Medical Research, 2013, 41(6): 1838-1847.