

Expression of Glucose-Regulated Protein 78 in Cervical Tissue and the Relationship with Clinical Significance

Juan Qin, Hong Lin, Qing Liu, Anwei Lu*

Guizhou Provincial Maternal and Child Health Hospital, Guiyang Guizhou
Email: ant000999@163.com

Received: Oct. 14th, 2018; accepted: Oct. 29th, 2018; published: Nov. 5th, 2018

Abstract

Objective: To investigate the effects of glucose-regulated protein 78 (GRP78) on the occurrence and development of cervical cancer by detecting the expressions of GRP78 in cervical cancer tissues. **Methods:** The specimens involving 89 cases of cervical cancer tissues, 45 cases of CIN and 41 cases of chronic cervical tissues were collected from Department of Obstetrics and Gynecology, Guiyang Maternal and Child Health-Care Hospital during January, 2010 to December, 2013. By using immunohistochemistry and RT-PCR techniques, the expressions of GRP78 protein in the cervical cancer tissues, chronic cervical tissues and CIN were detected respectively. **Results:** 1) GRP78 can be detected in chronic cervical tissues and CIN tissues, and the expression of GRP78 in cervical cancer tissues was obviously higher than that of chronic cervical tissues and CIN tissues ($P < 0.01$); 2) The expressions of GRP78 in cervical cancer tissues were higher in poorly differentiated squamous cell carcinoma than those in high differentiated squamous cell carcinoma ($P < 0.05$); The expression of GRP78 in stage II cervical cancer tissues was higher than that in stage I cervical cancer tissues ($P < 0.05$). The expressions of GRP78 in cervical cancer tissues with lymph node metastasis were higher than those without lymph node metastasis in cervical cancer specimens ($P < 0.05$). **Conclusion:** GRP78 protein has higher expression in cervical cancer tissues, and GRP78 might have certain relevance with the occurrence and development of cervical cancer.

Keywords

Cervical Tissue, Glucose-Regulated Protein, HPV Subtype

GRP78蛋白在宫颈组织中表达及与宫颈癌临床特征的关系

秦娟, 林虹, 刘卿, 陆安伟*

*通讯作者。

贵州省贵阳市妇幼保健院妇科, 贵州 贵阳
Email: ant000999@163.com

收稿日期: 2018年10月14日; 录用日期: 2018年10月29日; 发布日期: 2018年11月5日

摘要

目的: 通过检测葡萄糖调节蛋白78在宫颈癌组织中的表达与临床病理特征的相关性及其与宫颈癌发生、发展的关系。**方法:** 收集贵阳市妇幼保健院妇科宫颈组织标本175例, 其中宫颈癌组织89例、宫颈上皮内瘤变组织45例、慢性宫颈炎组织41例。采用免疫组织化学及RT-PCR方法检测GRP78在慢性宫颈炎组织、宫颈上皮内瘤变组织和宫颈癌组织中表达情况。**结果:** 1)慢性宫颈炎组织、宫颈上皮内瘤变及宫颈癌组织中均有GRP78蛋白的表达, GRP78蛋白在宫颈癌组织中阳性表达率显著高于慢性宫颈炎组织及宫颈上皮内瘤变($P < 0.01$); 2)宫颈癌患者组织中GRP78的表达与临床病理资料的关系: GRP78在宫颈低分化鳞癌中的表达高于高分化鳞癌($P < 0.05$); GRP78的表达水平随着宫颈癌临床分期较晚而升高; GRP78在宫颈癌有淋巴结转移的患者中表达水平高于无淋巴结转移的患者($P < 0.05$)。GRP78蛋白在高危型HPV的宫颈鳞癌组织中的阳性表达率高于低危型HPV的宫颈鳞癌组织($P < 0.05$)、HPV阴性宫颈鳞癌组织($P < 0.05$)。**结论:** GRP78在宫颈癌中呈高表达并可能与宫颈癌发生、发展有一定的关系。

关键词

宫颈, 葡萄糖调节蛋白, HPV分型

Copyright © 2018 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

宫颈癌是我国女性常见的生殖道恶性肿瘤, 发病率呈上升趋势。在肿瘤细胞中, 一些 HSP 家族成员表达增强并参与肿瘤细胞的某些生物活动。因此, GRP78 在宫颈癌的发生、发展中所起的作用日益受到学者的关注。本研究分析了 GRP78 在慢性宫颈炎、CIN 组织、宫颈癌组织中的表达差异, 并对 GRP78 在宫颈癌组织中是否存在表达及与宫颈癌患者的病理分型、临床分期和淋巴结转移等临床病理参数之间的关系进行分析。

2. 材料与方法

2.1. 临床资料

收集贵阳市妇幼保健院妇产科 2010 年 1 月至 2013 年 12 月期间宫颈组织标本共计 175 例, 分别为: 术中取出组织标本: 宫颈癌组织标本 89 例, 所有标本均经病理组织学证实为宫颈癌, 患者在手术前均未接受放化疗, 并同时采集宫颈癌相关的临床病理资料: 患者年龄、临床分期、淋巴转移、宫颈癌(病理)分化程度及 HPV 亚型情况。行宫颈锥形切除术取出组织标本: 1) 慢性宫颈炎组织标本 45 例, 所有病例均诊断为宫颈炎, 病理证实无瘤变的宫颈组织。2) 宫颈上皮内瘤变 41 例, 所有病例均为病理证实宫颈上皮内瘤变 1~2 级。取出组织, 每一标本分成两部分, 一部分立即置于液氮中保存, 用于 RT-PCR 检测; 另一部分固定, 用于石蜡切片包埋。本研究已经获得贵阳市妇幼保健院伦理委员会批准。

2.2. 方法

2.2.1. 免疫组化检测宫颈组织 GRP78 蛋白表达检测

采用免疫组化 Envision 二步法染色切片经脱蜡、水化后, 3%过氧化氢溶液阻断 15 min。GRP78 用鼠抗人 GRP78 单抗、阴性对照用 1% PBS 缓冲液作为一抗, 一抗稀释倍数为 1:100, 4℃孵育过夜。苏木精复染后, DAB 显色, 梯度酒精脱水, 中性树脂封片, 显微镜下观察并拍照。

2.2.2. 实验结果判断

以福州迈新公司提供的阳性片为阳性对照, 以 PBS (0.01 mol/l, PH6.0)代替一抗作为阴性对照。免疫组化染色阳性表现为: 细胞浆或细胞膜上出现黄色颗粒。参考 Schindl 等[1]报道的方法略作修改, 阳性标记强度判定标准: 随机取 5 个高倍镜($\times 200$)视野下观察, 每个视野观察 200 个细胞, 进行评分: 1 分: 阳性染色细胞数 $\leq 25\%$; 2 分: 阳性染色细胞数占 25%~49%; 3 分: 阳性细胞数 $\geq 50\%$ 。根据染色强度评分: 0 分——无染色, 1 分——淡黄色, 2 分——黄色, 3 分——棕黄色。在正常宫颈、慢性宫颈炎及癌组织中阳性细胞数及染色强度得分相乘, 根据所占百分比分为 4 个等级: 0~1 分为阴性(-), 2~3 分为弱阳性(+), 4~6 分及为阳性(++), 7~9 分为强阳性(+++)。

2.2.3. RT-PCR 分析 GRP78 的表达

按 TRIzol 试剂说明书常规提取总 RNA, 经紫外分光光度计定量, RNA 浓度和纯度, 逆转录合成 cDNA。根据 NCBI 数据库 Gene ID: 3309 发现 GRP78 的 CDS 区域, 并结合 NCBI 中 Primer-BLAST 设计引物序列: F1:GTCCTATGTCGCCTTCACTCC; R1:AAATGTCTTTGTTTGCCACC; β -actin: F1:GGCGACGAGGCCAGA; R1:CGATTTCCTCGGC。将反应体系置于 PCR 扩增仪上 94℃预变性 3 min, 然后开始 PCR 循环: 94℃ 30 s, 62℃ 30 s, 72℃ 45 min, 共 30 个循环, 最后 1 个循环 72℃延长 10 min。

2.2.4. 统计学方法

应用 SPSS20.0 软件包进行统计学分析, 计数资料采用 χ^2 检验、Fisher 确切概率法计算。计量资料采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 采用 t 检验、ANOVA 或 SNK-q 检验, 以 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

3. 结果

3.1. 宫颈组织中 GRP78 蛋白表达

用高倍镜观察全片, 光镜下 GRP78 在细胞浆和细胞膜中表达, 染色后出现黄色颗粒为阳性表达, 其中分为淡黄色、黄色、棕黄色, 细胞核中未着色。本实验中 GRP78 在慢性宫颈炎组织、CIN 组织及研究组宫颈癌组织和均有不同程度的阳性表达。见图 1 及图 2。GRP78 在宫颈癌中阳性表达率(94.4%)高于慢性宫颈炎和 CIN 组织。GRP78 在宫颈癌组与 CIN 组间的表达差异有统计学意义($\chi^2 = 31.76, P < 0.01$), 宫颈癌组与慢性宫颈炎组间 GRP78 的表达差异有统计学意义($\chi^2 = 48.40, P < 0.01$), 慢性宫颈炎组与 CIN 组间 GRP78 的表达差异无统计学意义(确切概率 $P = 0.206$)。见表 1。

Table 1. The comparison of the expression of GRP78 in chronic cervicitis, CIN and cervical cancer tissue
表 1. GRP78 在慢性宫颈炎组织、CIN 组织和宫颈癌组织中的表达比较例(%)

分组	例数 (N)	GRP78表达				阳性率(%)
		(-)	(+)	(++)	(+++)	
慢性宫颈炎组织	41	19	14	4	4	53.7
CIN组织	45	18	10	12	5	60.0**
宫颈癌组织	89	5	12	37	35	94.4*#

*: 宫颈癌与正常宫颈组织比较, $P < 0.01$; #: 宫颈癌与慢性宫颈炎组比较, $P < 0.01$; **慢性宫颈炎组与正常宫颈组织比较, $P > 0.05$ 。

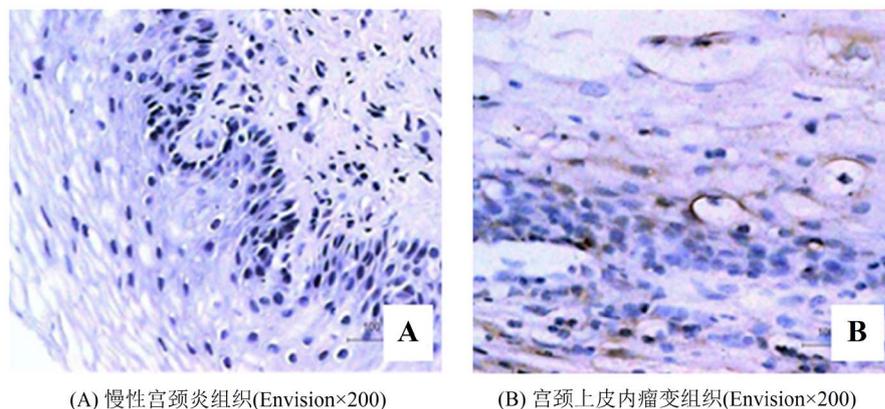


Figure 1. Positive expression of GRP78 in control group

图 1. GRP78 在对照组中的阳性表达

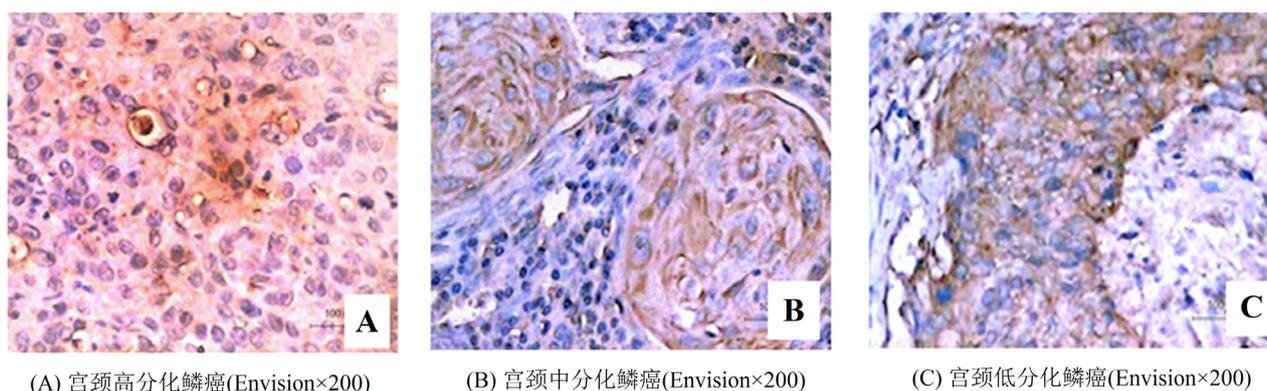


Figure 2. Positive expression of GRP78 in cervical cancer tissue

图 2. GRP78 在宫颈癌组织中的表达

3.2. 宫颈癌组织中 GRP78 的阳性表达与患者临床病理特征的关系

GRP78 在 19 例高分化鳞癌中阳性表达率为 89.5%，25 例中分化鳞癌中阳性表达率为 96%，45 例低分化鳞癌中阳性表达率为 95.55%，高分化鳞癌与中分化鳞癌间比较无明显差异($P > 0.05$)。高分化鳞癌与低分化鳞癌间比较具有明显差异($P < 0.05$)。中分化鳞癌与低分化鳞癌间比较无明显差异($P > 0.05$)。GRP78 在宫颈癌 I 期标本中阳性表达率为 90%，宫颈癌 II 期标本中阳性表达率为 96.6%，两者间比较具有明显差异($P < 0.05$)。GRP78 在无淋巴结转移标本中阳性表达率为 91.89%，有淋巴结转移标本中阳性表达率为 96.15%，两者间比较具有明显差异($P < 0.05$)。见表 2。

3.3. GRP78mRNA 的表达水平与患者临床病理特征的关系

GRP78mRNA 在高分化和中分化中表达无明显差异($P > 0.05$)，在中分化与低分化中的表达无明显差异性($P > 0.05$)，在宫颈癌低分化中相对表达明显高于高分化，具有明显差异性($P < 0.05$)。GRP78mRNA 在宫颈癌中表达水平与宫颈癌临床分期的关系：GRP78mRNA 在宫颈癌 II 期标本中相对表达(85.86 ± 8.21)明显高于宫颈癌 I 期相对表达(81.47 ± 5.53)，具有显著差异($P < 0.01$)。GRP78mRNA 在宫颈癌中表达水平与宫颈癌淋巴转移的关系：GRP78mRNA 在有淋巴结转移中的相对表达(85.92 ± 8.41)明显高于无淋巴结转移者(82.21 ± 5.95)，具有明显差异性($P < 0.05$)。见图 3。

Table 2. The relationship between the expression of GRP78 and the clinical features of cervical cancer
表 2. GRP78 蛋白在宫颈癌中的表达与宫颈癌临床病理特征的关系例(%)

分组	例数	GRP78表达				阳性率 (%)	P
		(-)	(+)	(++)	(+++)		
病理分化							
高分化	19	2	7	5	5	89.5 [#]	0.048
中分化	25	1	2	10	12	96 ^{**}	
低分化	45	2	3	22	18	95.6	
临床分期							
I期	30	3	8	10	9	90	0.029
II期	59	2	4	27	26	96.6	
淋巴结转移							
有	52	2	3	22	25	96.2	0.029
无	37	3	9	15	10	91.9	

*高分化与中分化比较 P = 0.062; #高分化与低分化比较 P = 0.012; **中分化与低分化比较 P = 0.907。

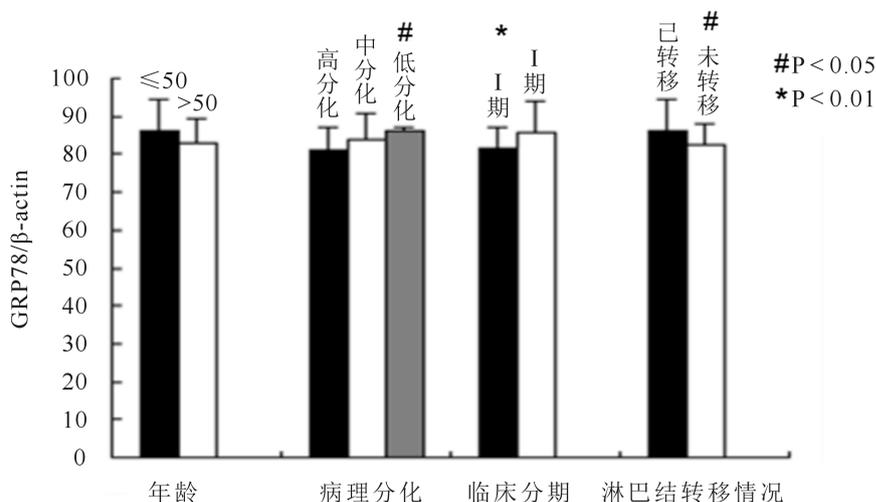


Figure 3. The relationship of the level of GRP78 mRNA in cervical cancer tissue and the clinical features of cervical cancer
图 3. GRP78mRNA 在宫颈癌中的表达与宫颈癌临床病理特征的关系

3.4. GRP78 蛋白的表达水平与 HPV 亚型的关系

GRP78 蛋白在高危型 HPV 的宫颈鳞癌组织中的阳性表达率为 73.08% (HPV16(+): 72.41%; HPV18(+): 62.5%; HPV16(+)、HPV18(+): 85.71%)。与高危型 HPV 的宫颈鳞癌组织中的阳性表达率相比较, 低危型 HPV 宫颈鳞癌组织(阳性表达率为 47.37%)及 HPV(-)宫颈鳞癌组织(阳性表达率为 38.89%)明显降低, 具有明显差异性(P < 0.05)。见表 3。

4. 讨论

肿瘤的发生、发展是多因素参与, 多途径作用的过程, 其发生机制尚不完全清楚。近期研究发现, GRP78 与肿瘤的发生发展密切相关, 在肝癌等多种恶性肿瘤中都显现高表达[2]。在对乳腺癌、胃癌和前列腺癌[3]等病例研究中发现: GRP78 高表达常与较晚的临床分期、较低病理分级和不良的预后相伴随。由此可推论 GRP78 具有对抗肿瘤细胞凋亡、促进肿瘤的增殖、复发、转移及耐药的作用[4]。

Table 3. The expression of GRP78 in the cervical cancer with different HPV subtype
表 3. GRP78 蛋白在不同 HPV 亚型宫颈癌组织中的表达例(%)

分组	例数	GRP78表达				阳性率 (%)	P
		(-)	(+)	(++)	(+++)		
HPV分型							
高危	52	14	8	12	18	73.08	
HPV16(+)	29	8	2	9	10	72.41	
HPV18(+)	16	5	4	2	5	62.5	
HPV16(+)/HPV18(+)	7	1	2	1	3	85.71	
低危	19	10	5	2	2	47.37	0.007*
阴性	18	11	3	3	1	38.89	0.002**

*高危与低危组比较 P=0.007; **高危与阴性组比较 P=0.002。

本实验免疫组化结果显示: GRP78 在宫颈癌中的阳性表达率显著高于在慢性宫颈炎和 CIN 组, 差异具有统计学意义, 而其在慢性宫颈炎组及 CIN 组间的表达比较, 差异无统计学意义。RT-PCR 结果显示: GRP78mRNA 在宫颈癌中相对表达水平显著高于慢性宫颈炎和 CIN 组织, 差异具有统计学意义。实验结果说明 GRP78 高表达于宫颈癌组织。此外, 近年来研究发现, GRP78 还高表达于其他肿瘤中: 在泌尿系, Pootrakul 等发现 GRP78 在前列腺癌标本中的表达明显高于癌旁组织[5]。在消化系统中, 张新晨等报道 GRP78 在胃癌病人的表达水平高于正常胃组织[6]。刘芳等报道在结肠癌组织中 GRP78 的表达高于结肠腺瘤, 并且 GRP78 在结肠腺瘤中的表达水平高于正常结肠组织[7]。在乳腺肿瘤中, Fernandez 等报道 GRP78 在恶性乳腺肿瘤中的表达明显升高, 但在良性乳腺病变中表达则不明显[8]。在对宫颈癌的研究中, 荣小灵采用免疫组化及 PCR 方法检测报道: GRP78 在宫颈癌中的阳性表达显著高于在宫颈炎中的表达[9]。张晶采用免疫组化检测发现: 宫颈鳞癌组 GRP78 阳性表达率高于其在宫颈上皮内瘤变和正常宫颈组织中的表达[10]。由此说明 GRP78 具有辨别肿瘤组织与非肿瘤组织的特性[11]。GRP78 高表达于恶性肿瘤中, 并且关于宫颈癌的两组报道与本研究结果有相同结论, 均表明 GRP78 在宫颈癌中呈高表达趋势, 而在宫颈非瘤变组织中呈低表达。提示 GRP78 有可能成为宫颈癌生物学行为的一项标记物。

本研究收集宫颈癌患者临床资料, 并结合其免疫组化及 RT-PCR 实验结果分析 GRP78 表达水平与患者临床病理特征的关系, 结果显示: GRP78 在宫颈癌 II 期标本中阳性表达率及 GRP78mRNA 的相对表达水平明显高于 I 期宫颈癌标本。说明 GRP78 在宫颈癌中表达水平随宫颈癌的临床分期较晚而上升。宫颈癌的临床分期是根据肿瘤浸润周围组织的范围而定义的[12]。在宫颈癌向邻近组织及器官局部浸润、扩散、侵蚀这个逐渐蔓延的过程中, 癌细胞不断地处于缺血、缺氧等微环境应激状态, 触发 UPR, 在 UPR 中 GRP78 不断被诱导、合成、增加, 以保护癌细胞继续生长、增殖[13]。这与肿瘤形成后 GRP78 对肿瘤细胞进一步保护、促生长、促侵蚀机制是一致的。

其次, 本研究中 GRP78 蛋白在低分化鳞癌中的阳性表达率明显高于高分化鳞癌。GRP78mRNA 在低分化鳞癌中的相对表达水平明显高于高分化鳞癌。说明宫颈癌病理分化越低, GRP78 表达水平越高。宫颈癌细胞病理分化越低, 癌细胞侵袭力越强, 预后越差, 宫颈癌细胞分化和预后密切相关, 而 GRP78 表达水平与细胞分化有关。由此可见 GRP78 的表达水平能反映宫颈癌的预后情况。

此外, 本实验显示宫颈癌中 GRP78 蛋白在有淋巴结转移标本中阳性表达率高于无淋巴结转移标本。GRP78mRNA 在有淋巴结转移中的相对表达明显高于无淋巴结转移者。实验结果说明 GRP78 蛋白和核酸在有淋巴结转移标本中明显高于无淋巴结转移者。提示 GRP78 在宫颈癌中表达水平随宫颈癌淋巴转移而增加。淋巴结转移是宫颈癌转移的主要途径, 也是影响宫颈癌预后的最重要、独立因素[14], 早期宫颈癌

5年生存率达80%~90%，但当有淋巴结转移时，宫颈癌5年生存率则明显下降至40%~50% [15]。因此，进一步说明GRP78表达水平可能作为宫颈癌预后评估的一项参考指标。

本研究进一步在此基础上进一步探讨，GRP78表达水平与患者HPV亚型的关系。GRP78蛋白在高危型HPV16(+)、HPV18(+)的宫颈鳞癌组织中的蛋白含量明显高于HPV(-)及低危HPV感染的宫颈癌组织。进一步证实了GRP78与HPV感染有相关性，提示内质网应激蛋白参与了宫颈癌的发生与发展。

5. 结论

综上所述：通过本研究发现与慢性宫颈炎、CIN相比，GRP78在宫颈癌呈高表达。提示GRP78有可能成为宫颈癌辅助诊断的一项标记物。GRP78的表达水平与宫颈癌临床分期、细胞分化、淋巴转移有关，与宫颈癌患者年龄无关。而宫颈癌临床分期、细胞分化、淋巴转移正是临床上评估宫颈癌预后的主要指标，患者年龄与宫颈癌预后无相关性。因此，GRP78可能成为宫颈癌病情发展、预后评估的一项参考指标。然而，本研究的样本规模有限，需要扩大样本量或多中心合作并长期研究，可以发现是否在临床工作中以GRP78作为宫颈癌辅助诊断及病情评估的标记物，可进一步提高宫颈癌体检普查及辅助诊断的准确性，为宫颈癌及时诊断、预后评估提供一项新标准及依据。

基金项目

贵阳市卫生局科学技术基金（筑卫科技第21号）；贵州省科技基金（黔科合J[2013]2020号）项目资助；贵州省科技基金（黔科合LH[2014]7297）项目资助。国家自然科学基金（81560287）。

参考文献

- [1] Schindl, M., Bachtiry, B., Dreier, B., *et al.* (2001) Impact of Human Papilloma Virus Infection on the Expression of the KAI1 Metastasis Suppressor Protein in Invasive Cervical Cancer. *Cancer Letters*, **162**, 261-266. [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(00\)00672-8](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(00)00672-8)
- [2] Su, R., Li, Z., Li, H., *et al.* (2010) Grp78 Promotes the Invasion of Hepatocellular Carcinoma. *BMC Cancer*, **10**, 20. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-20>
- [3] Daneshmand, S., Quek, M.L., Lin, E., *et al.* (2007) Glucose-Regulated Protein GRP78 Is Up-Regulated in Prostate Cancer and Correlates with Recurrence and Survival. *Human Pathology*, **38**, 1547-1552. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2007.03.014>
- [4] Fu, Y., Li, J. and Lee, A.S. (2007) GRP78/BiP Inhibits Endoplasmic Reticulum BIK and Protects Human Breast Cancer Cells against Estrogen Starvation-Induced Apoptosis. *Cancer Research*, **67**, 3734-3740. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-4594>
- [5] Pootrakul, L., Datar, R.H., Shi, S.R., *et al.* (2006) Expression of Stress Response Protein Grp78 Is Associated with the Development of Castration-Resistant Prostate Cancer. *Clinical Cancer Research*, **12**, 5987-5993. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-0133>
- [6] 张新晨, 杨维良, 徐华锋, 等. 葡萄糖调节蛋白 78 在胃癌组织中的表达及意义[J]. 中华实验外科杂志, 2005, 22(12): 1483-1485.
- [7] 刘芳, 邢晓明, 李玉军, 等. 结直肠癌组织 Grp78 表达及意义[J]. 青岛大学医学院学报, 2009, 45(3): 252-254.
- [8] Fernandez, P.M., Tabbara, S.O., Jacobs, L.K., *et al.* (2000) Overexpression of the Glucose-Regulated Stress Gene GRP78 in Malignant But Not Benign Human Breast Lesions. *Breast Cancer Research and Treatment*, **59**, 15-26. <https://doi.org/10.1023/A:1006332011207>
- [9] 荣小灵, 郭琼, 海米提. 子宫颈癌中 MHC-I 类分子抗原呈递相关蛋白 GRP78, CRT, ERP57 表达及意义[J]. 临床与实验病理学杂志, 2011, 27(5): 463-467.
- [10] 张晶. 葡萄糖调节蛋白 78 在宫颈鳞癌中的表达及其临床意义[D]: [硕士学位论文]. 太原: 山西医科大学, 2014.
- [11] 周玮. GRP78 的表达与肿瘤发生发展的关系—Meta 分析[D]: [博士学位论文]. 武汉: 华中科技大学, 2011.
- [12] 林仲秋, 谢幸, 苟文丽, 等. 妇产科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2014: 301-305.
- [13] Vilatoba, M., Eckstein, C., Bilbao, G., *et al.* (2005) Sodium 4-Phenylbutyrate Protects against Liver Ischemia Reperfu-

sion Injury by Inhibition of Endoplasmic Reticulum-Stress Mediated Apoptosis. *Surgery*, **138**, 342-351.
<https://doi.org/10.1016/j.surg.2005.04.019>

[14] 连利娟. 林巧稚妇科肿瘤学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 273.

[15] Gorski, S.M., Chittaranjan, S., Pleasance, E.D., *et al.* (2003) A SAGE Approach to Discovery of Genes Involved in Autophagic Cell Death. *Current Biology*, **13**, 358-363. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(03\)00082-4](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(03)00082-4)

知网检索的两种方式:

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2161-8712, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: acm@hanspub.org