

· 论 著 ·

ANKRD22 检测抗体制备及其在结直肠癌中的表达

林云华¹, 柳景文², 杨赛赛², 刘希永³, 王宏平²

1.平湖市第一人民医院, 浙江 平湖 314200; 2.浙江大学医学院附属第二医院; 3.杭州贺普生物有限公司

摘要: **目的** 制备特异性锚蛋白重复结构域蛋白 22 (ANKRD22) 抗体, 了解 ANKRD22 在结直肠癌中的表达。 **方法** 用 pET-42a 表达系统从大肠杆菌中表达重组人 ANKRD22 蛋白, 纯化后免疫 Balb/c 小鼠, 以高表达 ANKRD22 的 293T 细胞裂解液为抗原, 采用免疫印迹法筛选抗人 ANKRD22 特异性单克隆抗体; 采用免疫组织化学染色法检测 112 例结直肠癌患者组织芯片中 ANKRD22 的表达。 **结果** 本研究获得了 93 个杂交瘤细胞, 筛选出 4 株抗人 ANKRD22 特异性单克隆抗体, 均与天然的人 ANKRD22 呈良好反应。 ANKRD22 主要分布于结直肠癌细胞的细胞质。在 112 例患者结直肠癌组织中, ANKRD22 表达阳性 94 例, 阳性率为 83.93%。 ANKRD22 表达阳性与 p53 表达和 β -catenin 表达存在统计学关联 ($P < 0.05$), 而与年龄、性别、结直肠肿瘤位置、临床 AJCC 分期、Dukes 分期、肿瘤分化程度、有无淋巴结转移和错配修复基因表达均无统计学关联 ($P > 0.05$)。 **结论** ANKRD22 在结直肠癌组织中表达水平较高, 可能参与了结直肠上皮的癌变过程, 是一个潜在的辅助诊断标志。

关键词: 结直肠癌; ANKRD22; 表达; 单克隆抗体; 免疫组织化学染色法

中图分类号: R735.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 2096-5087 (2019) 03-0231-05

Preparation of antibody against ANKRD22 and its expression in colorectal cancer

LIN Yun-hua*, LIU Jing-wen, YANG Sai-sai, LIU Xi-yong, WANG Hong-ping

*First People's Hospital of Pinghu, Pinghu, Zhejiang 314200, China

Abstract: **Objective** To prepare the monoclonal antibody against ankyrin repeat domain 22 (ANKRD22) and to investigate its expression in colorectal cancer tissues. **Methods** The recombinant human ANKRD22 was expressed through E. coli and pET-42a and then used to immunize Balb/c mice after purification. Anti-human ANKRD22 specific monoclonal antibodies were selected by Western blotting with 293T cell lysate highly expressing ANKRD22 as antigen. The expression of ANKRD22 in the tissue microarrays of 112 patients with colorectal cancer was detected by immunohistochemical staining. **Results** Four specific monoclonal antibodies against human ANKRD22 were screened out of 93 hybridoma cells, which reacted well with natural human ANKRD22. ANKRD22 was mainly distributed in the cytoplasm of colorectal cancer cells. In 112 cases of colorectal cancer, 94 cases were detected positive for ANKRD22 expression, with the positive rate of 83.93%. The expression of ANKRD22 was statistically correlated with the expression of p53 and β -catenin ($P < 0.05$), but not with age, sex, location of tumors, AJCC stage, Dukes stage, degree of differentiation, lymph node metastasis and mismatch repair gene expression ($P > 0.05$). **Conclusion** The expression level of ANKRD22 was high in colorectal cancer. ANKRD22 might be involved in the carcinogenesis of colorectal epithelium and be a potential diagnostic marker.

Key words: Colorectal cancer; ANKRD22; Expression; Monoclonal antibody; Immunohistochemical staining

结直肠癌是我国常见的恶性肿瘤之一, 近年来结直肠癌发病率和死亡率均呈上升趋势^[1]。锚蛋白重复结构域蛋白 22 (ankyrin repeat domain 22, ANKRD 22)

是从结直肠癌干细胞内发现的新蛋白, 通过分析肿瘤 TCGA 数据库资料发现 ANKRD22 在正常人食管、胃和结直肠上皮细胞中均有表达, 在结直肠癌细胞中表达明显增加, 但 ANKRD22 与结直肠癌细胞恶性生物学行为的相关性尚不明确^[1]。由于目前用于检测的 ANKRD22 抗体有较强的非特异性, 本研究通过实验

DOI: 10.19485/j.cnki.issn2096-5087.2019.03.004

作者简介: 林云华, 本科, 副主任技师, 主要从事医学检验工作

通信作者: 王宏平, E-mail: wanghp02@163.com

制备特异性 ANKRD22 抗体, 并对 112 例结直肠癌患者 ANKRD22 进行检测, 研究 ANKRD22 在结直肠癌中的表达, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验材料与仪器 人 293 T 细胞 (中国科学院上海细胞库), 用含 10% 胎牛血清 (美国 Invitrogen 公司) 和 100 IU/mL 庆大霉素的 DMEM 培养液 (美国 Hyclone 公司), 置于 5% CO₂ 37 °C 培养箱培养; ANKRD22 DNA (北京傲锐东源生物科技有限公司); 原核细胞重组蛋白 pET-42a 表达载体 (美国 Millipore 公司); 镍柱 (美国 Bio-Rad 公司); 重组 ANKRD22 表达慢病毒 (广州赛业生物公司); HRP 标记的羊抗鼠二抗 (美国 Jackson Immunology 公司); ECL 液 (美国 Millipore 公司); 5~6 周龄 SPF 级裸 Balb/c 雌鼠 (中国科学院上海动物实验中心); 鼠抗人 p53 抗体 (杭州华安生物科技有限公司); 鼠抗人 β -catenin 抗体 (杭州华安生物科技有限公司); 免疫组化 SP 法试剂盒 (福州迈新生物公司); TRIZOL (德国 Macherey-Nagel 公司); PrimeScript™ 反转录试剂盒 (大连宝生物工程有限公司); Premix E_xTaq™ 试剂盒 (大连宝生物工程有限公司)。主要仪器: C-DiGit 化学发光检测仪 xy 型 (美国 LI-COR 公司); SCIENTZ-950E 超声波细胞粉碎机 (宁波新芝生物科技股份有限公司); Life Express TC-96/G/H (b) 基因扩增仪 (杭州博日科技有限公司)。

1.2 制备特异性 ANKRD22 抗体

1.2.1 重组人 ANKRD22 表达与纯化 ANKRD22 DNA 片段经 PCR 扩增后和 pET-42a 分别用 Nco I 和 BamH I 内切酶酶切, 以 9 : 1 (ANKRD22 : pET-42a) 混合后用 T4 连接酶连接过夜; 连接产物转化新鲜制备的大肠杆菌工程菌 DH5 α 感受态细胞, 筛选转化克隆; 经 DNA 测序鉴定后的 ANKRD22/pET-42a 质粒转化大肠杆菌 Rosetta DE3 细胞, 用异丙基- β -D-硫代半乳糖苷诱导表达重组蛋白, 收集包涵体, 进行复性处理。首先在冰上用含 0.5% 曲拉通 X-100 的磷酸盐缓冲液 (pH=8.0, 100 mM) 重悬菌体, 加入溶菌酶使其浓度为 100 μ g/mL, 30 °C 孵育 15 min, 超声粉碎 15 s/次, 连续 20 次后, 10 000 \times g 离心 10 min, 弃上清; 再用含 0.5% 曲拉通 X-100 的磷酸盐缓冲液 (pH=8.0, 100 mM) 重悬, 10 000 \times g 离心 10 min, 弃上清; 沉淀物称重, 加入包涵体溶解液 (每 50 mL 包涵体溶解液含 10 \times 溶解缓冲液 5 mL、30% N-月桂酰肌氨酸 0.5 mL、1M 二硫苏糖醇 50 μ L

和去离子水 44.45 mL), 使包涵体沉淀浓度为 10~20 mg/mL, 吹打混匀, 室温孵育 15 min, 10 000 \times g 离心 10 min, 收集上清, 用含 0.01% 二硫苏糖醇的 Tris-盐酸缓冲液 (pH=8.0, 50 mM) 4 °C 透析 2 次, 每次 3 h; 再用含 1 mM 还原型谷胱甘肽和 0.2 mM 氧化型谷胱甘肽的 Tris-盐酸缓冲液 (pH=8.0, 50 mM) 4 °C 透析过夜, 过镍柱纯化, 咪唑 (pH=8.0, 300 mM) 洗脱, 收集含 ANKRD22 重组蛋白的洗脱液, 加 30% 的甘油透析后冻存。

1.2.2 高表达 ANKRD22 的 293T 细胞建立 在细胞密度达 50%~70% 贴壁培养的 293T 细胞中加入 5 μ g/mL 溴化己二甲铵, 再感染重组 ANKRD22 表达慢病毒颗粒 (100 μ L/mL, 病毒感染复数为 100 : 1) 48 h, 以 1 : 10 传代, 5 μ g/mL 嘌呤霉素压力筛选 7~10 d, 扩大培养, 鉴定。

1.2.3 鼠源性抗人 ANKRD22 单克隆抗体制备 委托杭州华安生物科技公司制备鼠源性抗人 ANKRD22 单克隆抗体。用制备的重组人 ANKRD22 免疫 Balb/c 小鼠, ANKRD22 单克隆抗体筛选以高表达 ANKRD22 的 293T 细胞裂解液为抗原, 行免疫印迹法确认。

1.2.4 免疫印迹法筛选抗 ANKRD22 特异性单克隆抗体 消化收集上述高表达 ANKRD22 的 293T 细胞, 用 PBS 清洗 2 次, 加入 500 μ L 预冷的 RIPA 裂解液 [Tris-盐酸缓冲液 (pH=7.5, 50 mM, 含 150 mM NaCl), 1 mM EDTA, 0.25% 脱氧胆酸, 1% NP-40] 和 5 μ L 混合蛋白酶抑制剂 (100 \times) 吹打混匀, 冰上裂解 15 min, 13 000 \times g 离心 10 min, 留取上清。加入 3 \times 上样缓冲液煮沸 3 min, 室温下冷却备用。取蛋白裂解液 20 μ L 上样, 经变性的聚丙烯酰胺电泳并转至硝酸纤维素膜, 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 含 0.05% 吐温 -20 的磷酸盐缓冲液 (pH=7.4, 100 mM) 洗膜 5 次, 每次 3 min。分别加入 1.2.3 中的细胞培养上清液 4 °C 孵育过夜。辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗 (1 : 2 000) 室温孵育 1 h。ECL 曝光检测与真核细胞表达的 ANKRD22 抗原有较强反应的抗 ANKRD22 单克隆抗体。

1.3 结直肠癌患者 ANKRD22 表达检测 收集 2014—2016 年浙江大学医学院附属第二医院手术切除的结直肠癌组织芯片 5 张, 来自 228 例患者, 均由病理科医生确诊, 且在手术治疗之前未经化疗或放疗, 其中 112 例具有完整临床资料。收集结直肠癌组织芯片的制作及临床资料 (年龄、性别、结直肠肿瘤位置、AJCC 分期、Dukes 分期、肿瘤分化程度、淋巴结转移、错配修复基因、p53 表达、 β -catenin 表达和结局

等)。采用免疫组化染色法检测患者组织芯片中 ANKRD 22 表达。常规石蜡组织切片经二甲苯脱蜡,水化,用枸橼酸缓冲液微沸状态修复 10 min,自然冷却后,用 3%过氧化氢室温下 10 min 灭活内源性过氧化物酶活性。用 0.1 mol/L PBS 洗涤 3 次,加入正常山羊血清室温放置 30 min 以封闭非特异性吸附,然后加入 1:200 稀释的 ANKRD22 抗体、p53 或 β -catenin 在湿盒中孵育 1 h,用 0.1 mol/L PBS 洗涤 3 次,加入生物素化二抗室温反应 30 min,用 0.1 mol/L PBS 洗涤 3 次,加入辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素溶液室温反应 30 min,用 0.1 mol/L PBS 洗涤 3 次,二甲苯联苯胺显色,经苏木素复染后封片,镜检。判断标准:凡结直肠癌细胞呈黄棕色染色即判为 ANKRD22 阳性。

1.4 统计分析 采用 SPSS 22.0 软件统计分析。结直肠癌患者 ANKRD22 蛋白表达阳性率比较采用 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 鼠源性抗人 ANKRD22 特异性抗体筛选 采用 pET-42a 表达系统从大肠杆菌中表达了重组人

ANKRD22,经纯化后免疫 Balb/c 小鼠,获得 93 个杂交瘤细胞,筛选出 4 株特异性单克隆抗体,均与人 ANKRD22 呈良好反应。见图 1。

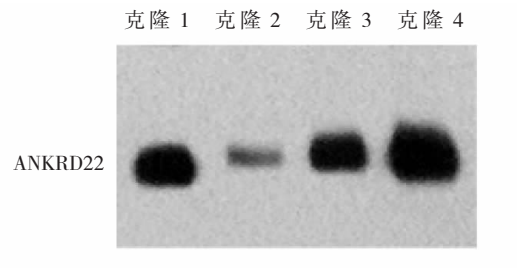


图 1 免疫印迹法检测 4 株单克隆抗体与 293T 细胞表达的 ANKRD22 的反应性

2.2 结直肠癌患者 ANKRD22 表达 ANKRD22 主要分布于结直肠癌细胞的细胞质,见图 2。112 例结直肠癌患者组织中,ANKRD22 表达阳性 94 例,阳性率为 83.93%。ANKRD22 表达阳性与 p53 表达和 β -catenin 表达存在统计学关联 ($P < 0.05$),而与患者年龄、性别、结直肠肿瘤位置、临床 AJCC 分期、Dukes 分期、肿瘤分化程度、有无淋巴结转移和错配修复基因表达均无统计学关联 ($P > 0.05$),见表 1。

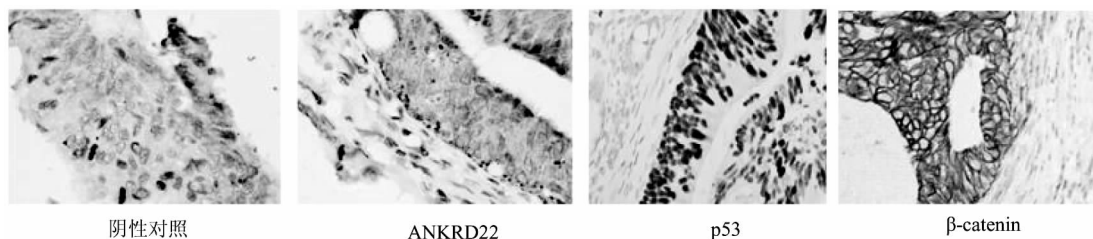


图 2 免疫组化染色法检测结直肠癌组织 ANKRD22、p53 和 β -catenin 表达 ($\times 400$)

3 讨论

本研究结果提示,ANKRD22 可能是一个诊断结直肠癌预后的潜在肿瘤标志物。

ANKRD22 属于锚蛋白重复序列 (ANK) 家族。ANK 是普遍存在于生物体中的一种蛋白质序列模体,已确定有 400 多种含有该模体的蛋白质^[2-4]。ANK 是最常见的蛋白-蛋白相互作用结构模体之一,每一个重复子包含 2 个反向 β 螺旋和 1 个 α 发卡样的 L 形结构,约有 33 个氨基酸残基,形成高亲和的分子连接脚手架结构。与其他蛋白-蛋白相互作用模体不同,这类蛋白没有统一的功能特征,作用主要表现为与其相互结合的靶蛋白的作用^[5]。包含 ANK 结构

的蛋白在进化上十分保守,但与其相互结合的靶蛋白却非常广泛,使这种蛋白-蛋白的相互作用参与了多种细胞生理功能的调节,包括转录调节、细胞骨架、离子转运、信号转导、炎症和免疫及肿瘤发生等^[6-8]。如 Notch 通路受体蛋白 (Notch1-4) 是含有 6 个锚蛋白重复序列的 ANK 家族成员,Notch 通路的激活可抑制 MUC2 和 ATOH1 表达而抑制分化,通过促进 HES1 表达扩大干细胞数量^[9]。ASPP2 蛋白包含 4 个锚蛋白重复序列,在肝癌组织中表达下调,引起 FAK/Src/ ERK 信号活化,使肝癌细胞重新获得干细胞特性,抗药性增强^[10]; ANKRD6 蛋白可招募 CKI-epsilon 到 β -catenin 降解复合体中,抑制 β -catenin/TCF 信号^[11]; ANKRD28 蛋白在急性髓性白

表2 不同结直肠癌患者 ANKRD22 表达阳性率比较

项目	例数	ANKRD22 阳性数	阳性率 (%)	χ^2 值	P 值
年龄 (岁)				8.541	0.129
20~	10	3	5.77		
40~	16	9	17.31		
50~	28	17	32.69		
60~	26	8	15.38		
70~	23	9	17.31		
80~	9	6	11.54		
性别				1.036	0.309
男	66	28	53.85		
女	46	24	46.15		
部位				1.080	0.299
结肠	64	27	51.92		
直肠	48	25	48.08		
肿瘤直径 (cm)				0.010	0.919
0~2	22	10	19.23		
3~4	90	42	80.77		
淋巴结转移				0.738	0.390
无	49	25	48.08		
有	63	27	51.92		
远处转移				0.813	0.367
无	102	46	88.46		
有	10	6	11.54		
AJCC 分期				0.431	0.512
0~II	48	24	46.15		
III~IV	64	28	53.85		
Dukes 分期				1.549	0.671
A	17	9	17.31		
B	32	15	28.85		
C	53	22	42.31		
D	10	6	11.54		
错配修复基因				0.326	0.568
正常	48	21	40.38		
突变	63	31	59.62		
p53 表达				9.354	0.002
高	38	10	19.23		
低	74	42	80.77		
β -catenin 表达				10.097	0.006
低	26	8	15.38		
中	35	12	23.08		
高	51	32	61.54		

血病干细胞中表达较非干细胞增加^[12]；ANKRD1 蛋白可通过抑制 NF- κ B 的转录活性抑制炎症反应，而 I κ B、NF- κ B 也是 ANK 重复蛋白家族成员，含有 5~7 个锚蛋白重复序列，通过 NF- κ B 通路影响结直肠癌细胞的干性和自我更新^[13]。ANKRD22 的分子功能有待进一步明确。CABA 等^[14]发现 ANKRD22 在胰腺癌外周血单个核细胞中表达增加；YIN 等^[15]发现

非小细胞肺癌细胞通过上调转录因子 E2F1 促进 ANKRD22 的表达；VENNER 等^[16]发现在肾移植发生排斥反应的巨噬细胞中表达增加；提示 ANKRD22 可能与 AIM2 相似，是一个 IFNG 通路的负性调控分子。本研究发现 ANKRD22 表达与结直肠癌患者的预后有关，但与其他临床参数均无统计学关联，提示 ANKRD22 在结直肠癌细胞中的功能可能不同于巨噬细胞。

p53 基因和 Wnt 通路相关基因是结直肠癌组织中最常发生突变的肿瘤抑制基因，p53 基因突变可影响结直肠肿瘤的生物学行为和肿瘤预后^[17]。本研究发现 ANKRD22 表达水平与 p53 表达有统计学关联，提示 ANKRD22 可能具有稳定 p53 蛋白的作用，但具体分子机制还有待进一步研究。Wnt 通路对结直肠细胞癌变和结直肠癌进展具有促进作用， β -catenin 异常表达是结直肠肿瘤发展进程的关键早期事件， β -catenin 的表达随着结直肠肿瘤分化程度的降低而增加^[18]。本研究发现 ANKRD22 表达水平与 β -catenin 的表达有统计学关联，然而体外实验提示 ANKRD22 并非 Wnt 通路中的分子，因此推测 ANKRD22 可能是 Wnt 通路作用的一个协同分子，连接了 p53 和 Wnt 通路间的分子交互作用，然其作用靶分子有待于进一步研究。

参考文献

- [1] ZHANG Y, CHEN Z, LI J. The current status of treatment for colorectal cancer in China: a systematic review [J]. *Medicine*, 2017, 96 (40): e8242.
- [2] YANG C S, CHANG K Y, RANA T M. Genome-wide functional analysis reveals factors needed at the transition steps of induced reprogramming [J]. *Cell Rep*, 2014, 8 (2): 327-337.
- [3] WISSING M L, KRISTENSEN S G, ANDERSEN C Y, et al. Identification of new ovulation-related genes in humans by comparing the transcriptome of granulosa cells before and after ovulation triggering in the same controlled ovarian stimulation cycle [J]. *Hum Reprod*, 2014, 29 (5): 997-1010.
- [4] LIU H, PECKA J L, ZHANG Q, et al. Characterization of transcriptomes of cochlear inner and outer hair cells [J]. *J Neurosci*, 2014, 34 (33): 11085-11095.
- [5] LI J, MAHAJAN A, TSAI M D. Ankyrin repeat: a unique motif mediating protein-protein interactions [J]. *Biochemistry*, 2006, 45 (51): 15168-15178.
- [6] PASQUALI C C, ISLAM Z, ADAMOSKI D, et al. The origin and evolution of human glutaminases and their atypical C-terminal ankyrin repeats [J]. *J Biol Chem*, 2017, 292 (27): 11572-11585.
- [7] CUNHA E S, HATEM C L, BARRICK D. Enhancement of cellu-

- lase pairs linked by consensus ankyrin repeats: determination of the roles of spacing, orientation, and enzyme identity [J]. *Proteins*, 2016, 84 (8): 1043–1054.
- [8] MUNIZ J R, GUO K, KERSHAW N J, et al. Molecular architecture of the ankyrin SOCS box family of Cul5-dependent E3 ubiquitin ligases [J]. *J Mol Biol*, 2013, 425 (17): 3166–3177.
- [9] ABDOLAZIMI Y, STOJANOVA Z, SEGIL N. Selection of cell fate in the organ of Corti involves the integration of Hes/Hey signaling at the Atoh1 promoter [J]. *Development*, 2016, 143 (5): 841–850.
- [10] XU L, TONG X, ZHANG S, et al. ASPP2 suppresses stem cell-like characteristics and chemoresistance by inhibiting the Src/FAK/Snail axis in hepatocellular carcinoma [J]. *Tumour Biol*, 2016, 37 (10): 13669–13677.
- [11] MUHAMMAD B A, ALMOZYAN S, BABAEI-JADIDI R, et al. FLYWCH1, a novel suppressor of nuclear β -catenin, regulates migration and morphology in colorectal cancer [J]. *Mol Cancer Res*, 2018, 16 (12): 1977–1990.
- [12] DE JONGE H J M, WOOLTHUIS C M, VOS A Z, et al. Gene expression profiling in the leukemic stem cell-enriched CD34+ fraction identifies target genes that predict prognosis in normal karyotype AML [J]. *Leukemia*, 2011, 25 (12): 1825–1833.
- [13] LIU X H, BAUMAN W A, CARDOZO C. ANKRD1 modulates inflammatory responses in C2C12 myoblasts through feedback inhibition of NF- κ B signaling activity [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 464 (1): 208–213.
- [14] CABA O, PRADOS J, ORTIZ R, et al. Transcriptional profiling of peripheral blood in pancreatic adenocarcinoma patients identifies diagnostic biomarkers [J]. *Dig Dis Sci*, 2014, 59 (11): 2714–2720.
- [15] YIN J, FU W, DAI L, et al. ANKRD22 promotes progression of non-small cell lung cancer through transcriptional up-regulation of E2F1 [J]. *Sci Rep*, 2017, 7 (1): 4430.
- [16] VENNER J M, FAMULSKI K S, BADR D, et al. Molecular landscape of T cell-mediated rejection in human kidney transplants: prominence of CTLA4 and PD ligands [J]. *Am J Transplant*, 2014, 14 (11): 2565–2576.
- [17] LI X L, ZHOU J, CHEN Z R, et al. P53 mutations in colorectal cancer—molecular pathogenesis and pharmacological reactivation [J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21 (1): 84–93.
- [18] BAHRAMI A, AMERIZADEH F, SHAHIDSALES S, et al. Therapeutic potential of targeting wnt/ β -catenin pathway in treatment of colorectal cancer: rational and progress [J]. *J Cell Biochem*, 2017, 118 (8): 1979–1983.

收稿日期: 2018-11-14 修回日期: 2018-12-30 本文编辑: 徐文璐

(上接第 230 页)

- [11] 陈静, 万宇辉, 孙莹, 等. 中学生睡眠问题与自杀行为的相关性研究 [J]. *中华流行病学杂志*, 2014, 35 (2): 129–133.
- [12] LAW B M, SHEK D T. Self-harm and suicide attempts among young Chinese adolescents in Hong Kong: prevalence, correlates, and changes [J]. *Pediatr Adolesc Gynecol*, 2013, 26 (3): 26–32.
- [13] HU J, DONG Y, CHEN X, et al. Prevalence of suicide attempts among Chinese adolescents: a meta-analysis of cross-sectional studies [J]. *Comprehensive Psychiatry*, 2015, 61: 78–89.
- [14] PHILLIPS M R, YANG G, ZHANG Y, et al. Risk factors for suicide in China: a national case-control psychological autopsy study [J]. *Lancet*, 2002, 360 (9347): 1728–1736.
- [15] XING X Y, TAO F B, WAN Y H, et al. Family factors associated with suicide attempts among Chinese adolescent students: a national cross-sectional survey [J]. *J Adol Health*, 2010, 46 (6): 592–599.
- [16] 闫敬, 梁素改, 黄颀, 等. 都姜堰市中学生自杀未遂的危险因素研究 [J]. *中国卫生统计*, 2014, 31 (3): 498–500.
- [17] 夏莹, 杨子云, 戢汉斌. 影响中国中学生自杀意念危险因素 Meta 分析 [J]. *中国健康心理学杂志*, 2017, 25 (2): 178–181.
- [18] WANG H, HU R Y, ZHONG J M, et al. Binge drinking and associated factors among school students: a cross-sectional study in Zhejiang Province, China [J]. *BMJ Open*, 2018, 8 (4): e021077.
- [19] HONG L Y, GUO L, WU H, et al. Bullying, depression, and suicidal ideation among adolescents in the Fujian Province of China: a cross-sectional study [J]. *Medicine*, 2016, 95 (5): e2530.
- [20] 陶芳标. 投资青少年健康刻不容缓 [J]. *中华预防医学杂志*, 2012, 46 (3): 195–197.
- [21] CARIS T F, ERICK M, DANIEL J B. Teen sleep and suicidality: results from the Youth Risk Behavior Surveys of 2007 and 2009 [J]. *Clin Sleep Med*, 2011, 7 (5): 351–356.

收稿日期: 2018-09-03 修回日期: 2018-12-27 本文编辑: 徐文璐