

· 基础研究 ·

# 基于液相色谱-质谱技术的高尿酸血症血浆代谢组学研究

马文峰<sup>1</sup>, 马志刚<sup>2</sup>, 王万山<sup>3</sup>, 周 娅<sup>4△</sup>, 俞守义<sup>3</sup>

(1. 广东省卫生厅干部保健局, 广东广州 510000; 2. 甘肃省人民医院肾内科, 甘肃兰州 730000; 3. 南方医科大学比较医学研究所, 广东广州 510515; 4. 广州军区联勤部卫生部, 广东广州 510063)

**摘要:**目的 利用代谢组学技术研究高尿酸血症患者与健康人血浆的代谢差异情况, 寻找差异代谢标志物, 为探讨高尿酸血症病因及与其他代谢性疾病的关系提供参考。方法 通过超高效液相色谱-四级杆-飞行时间质谱(UPLC-Q-TOF-MS)技术分析高尿酸血症患者(高尿酸血症组)和健康者(对照组)血浆代谢物图谱, 采用 MarkerLynx XS 软件对原始数据进行校正和归一化处理, 应用 SIMCA-P+12.0.1 软件对样品进行分组并采用正交信号校正和偏最小二乘法判别分析(OSC-PLS-DA)分析。分析结果以二维、三维得分图和载荷图的形式表示, 根据 OSC-PLS-DA 模型的 VIP 值及显著性差异检验结果等筛选出差异性代谢物。结果 高尿酸血症组与对照组分别呈现聚类分布, 两组之间未见交叉与重叠, 得到了明显区分。初步确认 6 种化合物(质荷比分别为 282.279 2、496.340 0、280.263 2、79.020 3、256.263 2 及 284.294 5)为区分高尿酸血症与健康人的潜在的血浆差异性代谢标志物。结论 建立了利用液相色谱-质谱技术进行高尿酸血症血浆代谢组学研究的方法, 为高尿酸血症的发病机制、预测和防治研究奠定了基础。

**关键词:**高尿酸血症; 色谱法, 液相; 质谱法; 代谢组学

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.02.018

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)02-0176-04

## Liquid chromatography-mass spectrometry-based research on plasma metabolomics of patients with hyperuricemia

Ma Wenfeng<sup>1</sup>, Ma Zhigang<sup>2</sup>, Wang Wanshan<sup>3</sup>, Zhou Ya<sup>4△</sup>, Yu Shouyi<sup>3</sup>

(1. Cadres Health Care Bureau, Department of Health of Guangdong Province, Guangzhou, Guangdong 510000, China; 2. Department of Nephrology, People's Hospital of Gansu Province, Lanzhou, Gansu 730000, China; 3. Institute of Comparative Medicine, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510515, China; 4. Health Division, Joint Logistics Department of Guangzhou Military Command, Guangzhou, Guangdong 510063, China)

**Abstract: Objective** To explore the differences in plasma metabolism between patients with hyperuricemia and healthy people using the technology of metabolomics, searching the metabolic markers, which will provide a reference for exploring the etiology of hyperuricemia and its relationship with other metabolic diseases. **Methods** The plasma metabolites patterns of patients with hyperuricemia (hyperuricemia group) and healthy people (control group) were analyzed by ultra-performance liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS). MarkerLynx XS software was used to regulate and normalize the original data. Statistical software SIMCA-P+12.0.1 was applied to group the sample and analyze the data using orthogonal signal correction-partial least square discriminate analysis (OSC-PLS-DA). Results of the analysis were expressed by the form of two-dimensional and three-dimensional scores plot and loading plot, respectively. The different metabolites were screened according to the VIP value of OSC-PLS-DA model and the results of significant differences test. **Results** The cluster distribution was displayed in both hyperuricemia group and control group, no cross and overlap was observed between the two groups, which means that these two groups were distinguished from each other clearly. Six compounds (mass to charge ratios were 282.279 2, 496.340 0, 280.263 2, 79.020 3, 256.263 2 and 284.294 5, respectively) were initially identified as potential plasma metabolic markers to distinguish hyperuricemia from healthy people. **Conclusion** The method of hyperuricemia plasma metabolomics study has been constructed using the technology of liquid chromatography-mass spectrometry which lay the foundation for the research of hyperuricemia pathogenesis, prediction and prevention.

**Key words:** hyperuricemia; chromatography, liquid; mass spectrometry; metabolomics

代谢组学是继基因组学和蛋白质组学后出现的以定性和定量描述生物体内多种代谢物动态变化为目的的新兴组学, 是系统生物学的重要组成部分。质谱分析和核磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR)是该领域内 2 种关键的实验技术, 其中液相色谱-质谱(liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS)联用技术集高效液相色谱高分离性能与质谱的高灵敏度、高特异性的优点于一体, 逐渐成为代谢组学研究的主流技术。当前临床和流行病学领域已有大量代谢组学的实际应用, 用于探索各种疾病的复杂的分子机制。评价各种代谢途径的大量代谢物(如底物、中间产物以及终端产物)的技术更是

广泛用于糖尿病、心血管疾病代谢状态的危险评估中<sup>[1-3]</sup>。高尿酸血症作为世界范围内一般人群中患病率较高的代谢性疾病在当前并未引起足够重视, 其与糖尿病、肾病及代谢综合征等代谢性疾病之间具有错综复杂的相互作用<sup>[4]</sup>, 代谢组学研究将为揭示高尿酸血症的发病机制、危险因素及其与相关代谢性疾病的发生、发展提供了一个独特视角。

### 1 材料与方法

**1.1 病例来源** 收集单纯高尿酸血症男性患者 14 例, 将其作为高尿酸血症组, 年龄 20~40 岁; 无背景疾病, 如感染, 高血脂, 高血压, 高血糖及肝、肾疾病等; 诊断参照中华医学会风湿病学分会定义标准<sup>[5]</sup>。收集健康成年男性 10 例作为对照组。

作者简介: 马文峰(1972~), 博士, 高级经济师, 主要从事保健医学研究和管理工。 △ 通讯作者, Tel: (020)61648336; E-mail: sunnymawf@126.com。

**1.2 主要仪器和试剂** 主要仪器包括: ACQUITY UPLC 超高效液相色谱系统(美国)、Xevo G2 QToF 四极杆飞行时间串联质谱仪(美国); Aquity UPLCTM C18 柱(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm)、低温高速离心机(德国 Beckman 公司)、超声清洗仪(昆山禾创超声仪器有限公司); GR-202 AND 电子分析天平(日本)、热电超低温冰箱(美国 Thermo Scientific Forma ULT)、华凌 BD-42 冰箱。主要试剂: 大黄素(批号: 30269), 购自美国 Sigma 公司; 乙腈、甲醇为色谱纯, 购自美国 Merck 公司; 纯水由反渗透超纯水仪(GT-30L, 上海飞域实验室设备有限公司)制备。

**1.3 采样和血浆分离** 受检者早餐前空腹于上肢静脉处采血 5 mL, 血样收集于真空肝素抗凝的采血管内, 静置 10 min 后 4 °C 1 000 × g 冷冻离心 10 min, 取离心后的上清液, 于 -80 °C 冷冻储存。

**1.4 样品处理** 取 200 μL 血浆样品至 1.5 mL 的 Eppendorf 管中, 加 20 μL 内标溶液(含 10 μg/mL 大黄素), 再加 800 μL 甲醇-乙腈(1 : 1, V/V), 涡流混合 1 min, 震荡均匀, 然后 14 000 × g 离心 30 min 后, 取 10 μL 上清液进样。

**1.5 分析条件** 采用超高效液相色谱-四级杆-飞行时间质谱(ultra-performance liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry, UPLC-Q-TOF-MS) 技术分析高尿酸血症患者和健康者血浆代谢物图谱。

**1.5.1 色谱条件** Aquity UPLCTM C18 柱(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm), 流速 0.6 mL/min, 柱温 35 °C, 流动相 A 为 0.1% FA-H<sub>2</sub>O, 流动相 B 为 0.1% FA-CAN, 进样体积 0.2 L。梯度洗脱程序见表 1。

表 1 色谱梯度洗脱程序

时间(s)	流动相 A(%)	流动相 B(%)	Curve
0.00	99.0	1.0	Initial
0.50	99.0	1.0	6
2.00	50.0	50.0	6
7.00	2.0	98.0	6
9.00	2.0	98.0	6

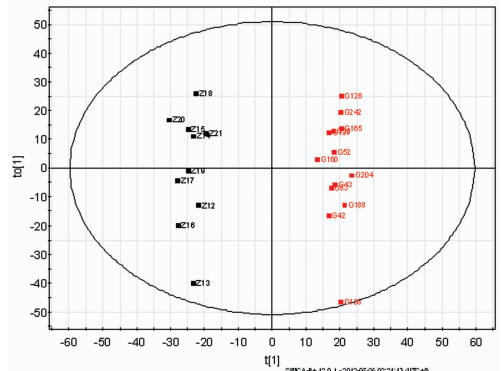
**1.5.2 质谱条件** 采用 Xevo G2 QToF 四极杆飞行时间串联质谱仪, 离子化模式: 电喷雾电离(electrospray ionization, ESI)(+), 毛细管电压 3 kV, Sampling Cone 30 V, Extraction Cone 4.0 V, 源温度 120 °C, 雾化气温度 550 °C, 雾化气流速 800 L/h, 锥孔气流速 50 L/h。

**1.6 统计学处理** 采用 MarkerLynx XS 软件对原始数据进行校正和归一化处理, 对处理后的数据应用 SIMCA-P+12.0.1(瑞典 Umctries 公司)统计学软件对样品进行分组并采用正交信号校正和偏最小二乘法判别分析(orthogonal signal correction-partial least square discriminate analysis, OSC-PLS-DA)分析。分析结果以二维和三维得分图(scores plot)和载荷图(loadings plot)的形式表示, 考察健康志愿者组和高尿酸血症患者组的样品差异性及其获取差异信息。组间比较采用 *t* 检验, 以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

**2 结果**

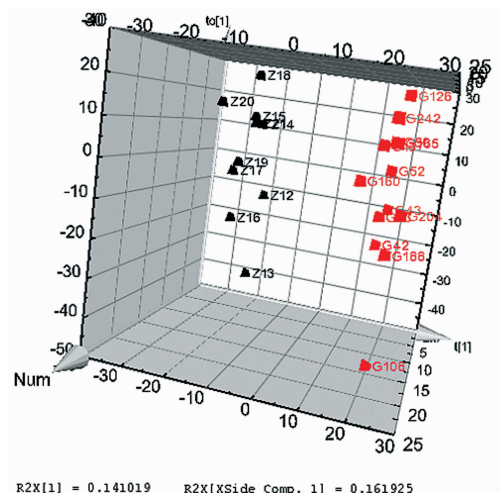
**2.1 血浆代谢物图谱 OSC-PLS-DA 结果** 应用 SIMCA-P+12.0.1 软件对 MarkerLynx XS 导出数据进行 OSC-PLS-DA 分析, 绘制出得分图(图 1、2)、载荷图(图 3)和 S-plot 图(图 4)。由图 1、2 可知, 高尿酸血症组与对照组分别具有一定的聚类作用, 在二维空间得分图中高尿酸血症组和对照组受检者的血浆代谢谱中各自成长条状集中分布, 且两组无交叉重叠, 明显分开, 提示两组之间血浆中小分子代谢物的组成具有差异, OSC-

PLS-DA 方法可以将两组样本较好地分开。并且二维得分图和三维得分图具有很好的 consistency。从图 3 可知, 绝大多数点集中在原点附近, 只有少数点远离原点。这些远离原点的点实际上就是将高尿酸血症组与对照组患者的血浆样品完全区分开的关键代谢物, 也就是说这些代谢物是在高尿酸血症患病血浆内发生显著变化的关键化合物。红框为高尿酸血症组与对照组之间潜在的差异代谢标志物。由图 4 可看出 S-plot 的两端是潜在的差异代谢标志物。



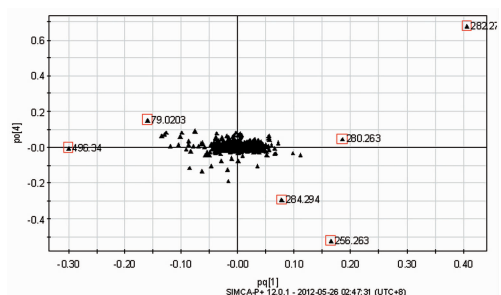
黑色: 正常组; 红色: 高尿酸血症组。

图 1 OSC-PLS-DA 分析的二维得分图



黑色: 正常组; 红色: 高尿酸血症组。

图 2 OSC-PLS-DA 分析的三维得分图



红框: 潜在的差异代谢标志物。

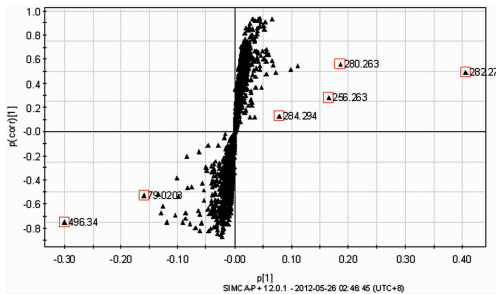
图 3 OSC-PLS-DA 分析的载荷图

**2.2 潜在标记物的发现** 在 OSC 滤噪的 PLS-DA 模型中 VIP(very important in projection)值大于 1 的变量被看作可能的潜在标记物, 通过 S-plot 图对它们的可靠性进行验证, 将和分类相关性低的变量剔除, 剩余的变量再进行 *t* 检验, *P* < 0.05 的变量视为高尿酸血症患者与健康人区分的潜在标记物。经过多种多变量分析手段的结合, 最终共有 6 种质荷比大小的代

表 2 两组间的差异代谢标记物

编号	Var ID (Primary)	Var ID (Ret. Time)	Var ID (m/z)	VIP <sup>[1]</sup>	可能的分子式	变化趋势
1	215 1	6.538 3	282.279 2	23.595 0	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> NO	增高
2	154 8	4.517 1	496.340 0	17.083 1	C <sub>30</sub> H <sub>44</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	降低
3	193 0	5.903 2	280.263 2	10.201 2	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> NO	增高
4	22	0.602 6	79.020 3	8.892 0	C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> ONa	降低
5	205 6	6.328 6	256.263 2	8.666 4	C <sub>16</sub> H <sub>34</sub> NO	增高
6	257 4	7.231 0	284.294 5	4.402 9	C <sub>18</sub> H <sub>38</sub> NO	增高

代谢物被认为是区分高尿酸血症患者与健康人的潜在标记物,见表 2。经过搜索 HMDB (<http://www.Hmdb.ca/>) 数据库及 KEGG (<http://www.genome.jp/>) 数据库,同时参照有关文献,结果发现油酸、亚油酸、棕榈酸、硬脂酸、反油酸、异油酸、Pristanal、三甲基十三烷酸、癸烯酸、8-异构前列腺素、Postin、3-葡萄糖苷酸孕二醇、肠抑素、吡啶等近 20 种物质是高尿酸血症潜在的生物标志物,主要包括脂肪酸和短肽等,准确的结构确认和含量测定有待于二级质谱扫描和利用标准物质进行进一步的对照和计算。



红框:潜在的差异代谢标志物。

图 4 OSC-PLS-DA 分析的 S-plot 图

### 3 讨论

与传统组学相比,代谢组学有自身的优点<sup>[6]</sup>。首先是最接近表型,基因和蛋白表达的变化最终以落脚于代谢过程产生终端效应。因此,代谢组学研究是反映生物体系型和遗传型之间联系的纽带,对了解生物体病理生理和新陈代谢的本质具有重要的作用。其次,基因和蛋白表达的有效的微小变化会在代谢物上得到放大,从而使检测更容易。另外,因为代谢产物在各个生物体系中都是类似的,可以寻找到针对某种代谢物或者一类代谢物的分析方法,而不用考虑物种的区别<sup>[7]</sup>,因此,代谢组学研究中采用的技术更为通用;而且代谢物的种类要远小于基因和蛋白的数目,便于分析。

目前国内关于利用代谢组学进行高尿酸血症研究的仅有 1 篇报道,钟麟等<sup>[8]</sup>利用氢 NMR 代谢组学方法分析高尿酸血症患者和健康对照组血浆中饱和脂肪酸、N-乙酰糖蛋白、极低密度脂蛋白等代谢物的变化,结合主成分分析(principal component analysis, PCA)和 PLS,分析这些目标代谢物的表达差异。结果发现与健康对照组比较,高尿酸血症组患者的饱和脂肪酸、N-乙酰糖蛋白、极低密度脂蛋白、乳酸、乙醇的水平上升,卵磷脂、谷氨酰胺、葡萄糖的水平下降。从而认为高尿酸血症患者相较于健康对照组受检者存在更多脂类代谢异常、糖酵解加剧、谷氨酰胺水平下降等问题,并指出该类物质可能与高尿酸血症的发病、转归和预后有关。由此也提示高尿酸血症患者血脂、血糖代谢亦出现异常,从分子机制上证明尿酸水平与血脂、血糖等质谱分析组分是有关联的。该研究中同时也发现高尿酸血症患者发生了类似心血管疾病进程中的脂类代谢改变,提示高尿酸血症与心血管疾病的关联。

本研究结果提示脂肪酸代谢异常可能是高尿酸血症发病

牵涉的代谢途径之一:棕榈酸、亚油酸、油酸、硬脂酸等脂肪酸主要参与脂肪酸的合成、脂肪酸在线粒体的伸长、脂肪酸代谢以及不饱和脂肪酸的合成等生化反应过程,这些物质在高尿酸血症患者血浆中的升高提示高尿酸血症患者脂肪酸代谢可能发生紊乱。有研究表明硬脂酸、亚油酸、油酸等可作为冠状动脉粥样硬化性心脏病(冠心病)的代谢产物谱。饱和脂肪酸摄入过多是导致高胰岛素血症的危险因素,尤其是棕榈酸(C16:0),可促使 2 型糖尿病的发生。脂肪酸引起血压升高和促进高血压血管病变与血浆游离脂肪酸的组成有关,血浆游离脂肪酸对血管内皮细胞有直接作用,在脂肪酸中,损害血管内皮的脂肪酸有硬脂酸(C18:0)、油酸(C18:1)、软脂酸(C16:0)等。最新研究表明,高尿酸血症与冠心病、糖尿病、高血压等有密切的相互作用,这在脂质代谢紊乱中得到集中体现。

本研究还发现高尿酸血症患者 Pristanal 水平可能升高,Pristanal 是植烷酸和降植烷酸之间的中间代谢产物,植烷酸和降植烷酸水平升高与过氧化物酶体失调有关,此时,由于缺乏功能性过氧化物酶体而导致植烷酸降解障碍。植烷酸水平升高常与多种代谢紊乱的发生相关,在多种代谢性疾病发生中发挥重要作用。此外,研究结果提示高尿酸血症患者 Postin 和肠抑素水平可能下降,Postin 是胰蛋白酶抑制剂 C 的 N 末端四肽,是促吞噬肽激活剂,而促吞噬肽与免疫系统功能相关。肠抑素是脂肪消化时释放自胰辅酯酶的五肽,主要存在于近端小肠,是选择性食欲抑制剂,尤其是针对脂肪摄入。女性肥胖者血浆肠抑素水平常常升高,饱食之后其分泌减少。

Liu 等<sup>[9]</sup>采用高效液相色谱-二极管阵列检测器技术检测和鉴定了痛风患者血清和尿液中的新生物标志物,即血清中的尿酸、肌酐、色氨酸和尿液中的尿酸、肌酐、鸟嘌呤核苷及马尿酸。通过对标志物在痛风不同时期的对比发现,与间歇期痛风比较,急性痛风期患者嘌呤、蛋白质以及葡萄糖代谢异常更为显著,急性期由于鸟苷代谢的原因促使血清尿酸水平升高。研究结果对痛风代谢机制的阐明很有帮助,这对本研究的进一步开展以及确定高尿酸血症患者血浆潜在的生物标志物具有借鉴意义。

总之,本研究应用超高效液相色谱技术,结合高分辨率质谱,达到了区分高尿酸血症患者与健康人血浆小分子代谢物的目的,并发现了部分差异代谢标志物。由于时间的原因,本研究没有进行差异代谢标志物的鉴定。在下一步工作中将对这些目标化合物进行跟踪并获得其二级质谱结构信息,必要时结合标准品对照,对其结构进行鉴定和确认,这将有助于揭示高尿酸血症的发病机制及其代谢特征,为其预测和防治奠定基础。

### 参考文献:

- [1] Wishart DS. Metabolomics: applications to food science and nutrition research [J]. Trends Food Sci Technol, 2008,19(9):482-493.

- [2] Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E. 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data[J]. *Xenobiotica*, 1999, 29(11): 1181-1189.
- [3] Nicholson JK, Connelly J, Lindon JC, et al. Metabonomics: a platform for studying drug toxicity and gene function[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2002, 1(2): 153-161.
- [4] Gonçalves JP, Oliveira A, Severo M, et al. Cross-sectional and longitudinal associations between serum uric acid and metabolic syndrome[J]. *Endocrine*, 2012, 41(3): 450-457.
- [5] Chang HY, Tung CW, Lee PH, et al. Hyperuricemia as an independent risk factor of chronic kidney disease in middle-aged and elderly population[J]. *Am J Med Sci*, 2010, 339(6): 509-515.
- [6] Wang T, Bi Y, Xu M, et al. Serum uric acid associates with the incidence of type 2 diabetes in a prospective cohort of middle-aged and elderly Chinese[J]. *Endocrine*, 2011, 40(1): 109-116.
- [7] 中华医学会风湿病学分会. 原发性痛风诊治指南(草案)[J]. *中华风湿病学杂志*, 2004, 8(3): 178-181.
- [8] Fiehn O. Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks[J]. *Comp Funct Genomics*, 2001, 2(3): 155-168.
- [9] Monton MR, Soga T. Metabolome analysis by capillary electrophoresis-mass spectrometry[J]. *J Chromatogr A*, 2007, 1168(1/2): 237-246.
- [10] 钟麒, 高玉霞, 常红, 等. 男性高尿酸血症患者血浆代谢组学的研究[J]. *天津医药*, 2011, 39(8): 695-697.
- [11] Yang T, Chu CH, Bai CH, et al. Uric acid level as a risk marker for metabolic syndrome: A Chinese cohort study[J]. *Atherosclerosis*, 2012, 220(2): 525-531.
- [12] 简维雄, 袁肇凯, 黄献平, 等. 冠心病心血瘀阻证血浆代谢组学的检测分析[J]. *中国中西医结合杂志*, 2010, 30(6): 579-584.
- [13] See LC, Kuo CF, Chuang FH, et al. Hyperuricemia and metabolic syndrome: associations with chronic kidney disease[J]. *Clin Rheumatol*, 2011, 30(3): 323-330.
- [14] Mankovsky B, Kurashvili R, Sadikot S. Is serum uric acid a risk factor for atherosclerotic cardiovascular disease? A review of the clinical evidence. Part 1, diabetes and metabolic syndrome[J]. *Clin Res Rev*, 2010, 4(3): 176-184.
- [15] van den Brink DM, Wanders RJ. Phytanic acid: production from phytol, its breakdown and role in human disease[J]. *Cell. Mol. Life Sci*, 2006, 63(15): 1752-1765.
- [16] Liu Y, Sun X, Di D, et al. A metabolic profiling analysis of symptomatic gout in human serum and urine using high performance liquid chromatography-diode array detector technique[J]. *Clin Chim Acta*, 2011, 412(23/24): 2132-2140.

(收稿日期: 2012-09-18 修回日期: 2012-12-22)

(上接第 175 页)

- iASPP oncoprotein is a key inhibitor of p53 conserved from wolln to human[J]. *Nat Genet*, 2003, 33(2): 162-167.
- [3] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [4] Levine AJ, Oren M. The first 30 years of p53: growing ever more complex[J]. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9(10): 749-758.
- [5] Lu X. p53: a heavily dictated dictator of life and death[J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2005, 15(1): 27-33.
- [6] Liu ZJ, Xin L, Yun Z, et al. Downregulated mRNA expression of ASPP and the hypermethylation of the 5'-untranslated region in Cancer cell lines retaining wild-type p53[J]. *FEBS Lett*, 2005, 579(7): 1587-1590.
- [7] 方赞熙, 张忠英, 黄如欣, 等. 实时荧光定量 PCR 技术检测 iASPP 基因在肝癌组织中的表达及其临床意义[J]. *第三军医大学学报*, 2011, 33(1): 102-103.
- [8] Zhang XW, Min W, Zhou CL, et al. The expression of iASPP in acute leukemias[J]. *Leuk Res*, 2005, 29(2): 179-183.
- [9] Jiang L, Siu MK, Wong OG, et al. iASPP and chemoresistance in ovarian cancers: effects on paclitaxel-mediated mitotic catastrophe[J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(21): 6924-6933.
- [10] Liu ZJ, Cai Y, Hou L, et al. Effect of RNA interference of iASPP on the apoptosis in MCF-7 breast cancer cells[J]. *Cancer Invest*, 2008, 26(9): 878-882.
- [11] Chen J, Xie F, Zhang L, et al. iASPP is over-expressed in human non-small cell lung cancer and regulates the proliferation of lung cancer cells through a p53 associated pathway[J]. *BMC Cancer*, 2010, 10: 694.
- [12] 李强, 程湘, 孙守勋, 等. 乳腺癌细胞过表达 iASPP 对顺铂作用的影响[J]. *第三军医大学学报*, 2008, 30(15): 1438-1440.
- [13] Hang L, Min W, Diao SY, et al. siRNA-mediated down-regulation of iASPP promotes apoptosis induced by etoposide and daunorubicin in leukemia cells expressing wild-type p53[J]. *Leuk Res*, 2009, 33(9): 1243-1248.
- [14] 全国肿瘤防治研究办公室, 卫生部统计信息中心. 2008 年中国卫生统计提要[J]. 2004~2005 年前十位恶性肿瘤死亡率, 52-53.
- [15] Jung I, Messing E. Molecular mechanisms and pathways in bladder cancer development and progression[J]. *Cancer Control*, 2000, 7(4): 325-334.

(收稿日期: 2012-09-09 修回日期: 2012-12-01)