

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.33.021

# GP73 在肝癌患者外周血 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞中的异常表达及其相关机制研究

李淑群, 翁俊, 莫庆荣, 喻亚群<sup>△</sup>

(桂林医学院附属医院肝胆胰外科, 广西桂林 541000)

**[摘要]** **目的** 探讨肝癌患者外周血 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞中高尔基体蛋白 73(GP73)的异常表达及其对 Th1/Th2/Th17 亚型分化的影响。**方法** 选择该院 2015 年 5 月至 2016 年 2 月住院的肝癌患者 50 例为研究对象,50 例健康志愿者作为对照。采集外周血并分离 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞,采用实时荧光定量 PCR 检测 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞中 GP73 表达水平;另将分选的 20 例健康者 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞分别转染 GP73 小干扰 RNA 或过表达载体,实时荧光定量 PCR 及蛋白质印迹法(Western blot)检测 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞中 GP73 及核因子  $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)表达水平,ELISA 检测上清液中白细胞介素 4(IL-4)、 $\gamma$  干扰素(IFN- $\gamma$ )、白细胞介素 17(IL-17)的分泌水平。**结果** 肝癌患者外周血 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞中 GP73 mRNA 的表达与健康者相比明显上调,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。GP73 过表达组 NF- $\kappa$ B 表达水平明显升高( $P < 0.05$ ),GP73 干扰组 NF- $\kappa$ B 表达水平明显降低( $P < 0.05$ )。过表达 GP73 导致 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞中 IL-4、IL-17 水平明显升高,IFN- $\gamma$  水平明显降低( $P < 0.05$ );沉默 GP73 导致 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞 IL-4、IL-17 水平明显降低,IFN- $\gamma$  水平明显升高( $P < 0.05$ )。**结论** GP73 在肝癌患者的外周血 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞中过表达,而 GP73 很有可能通过激活 NF- $\kappa$ B 参与炎症反应,导致患者体内 Th1/Th2/T17 失衡,促进肝癌的发生与发展。

**[关键词]** 肝肿瘤;GP73;肿瘤免疫;CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞**[中图分类号]** R735.7**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2017)33-4667-03

## Abnormal expression of GP73 in peripheral blood CD4<sup>+</sup>T lymphocytes of patients with hepatocellular carcinoma and its related mechanism

Li Shuqun, Weng Jun, Mo Qingrong, Yu Yaqun<sup>△</sup>

(Department of Hepatobiliary and Pancreatic Surgery, Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guilin, Guangxi 541000, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the abnormal expression of Golgi protein 73(GP73) in CD4<sup>+</sup>T lymphocytes of the patients with hepatocellular carcinoma(HCC) and its influence of Th1/Th2/Th17 subtype differentiation. **Methods** Fifty cases of HCC hospitalized in this hospital from May 2015 to February 2016 and 50 healthy volunteers as controls were selected. Peripheral blood was collected and CD4<sup>+</sup>T lymphocytes were isolated; then the expression levels of GP73 and nuclear factor kappa-light-chain-enhancer (NF- $\kappa$ B) in CD4<sup>+</sup>T lymphocytes were determined by using RT-qPCR and Western blotting methods; furthermore, the secretion levels of IL-4, IL-17 and IFN- $\gamma$  in the supernatants were examined by using ELISA method. **Results** GP73 mRNA expression in peripheral blood CD4<sup>+</sup>T lymphocytes in the HCC patients were significantly up-regulated compared with the healthy volunteers, the difference was statistical difference( $P < 0.05$ ). The expression level of in GP73 overexpression group was significantly increased( $P < 0.05$ ), while which in the GP73 interference group was significantly decreased( $P < 0.05$ ). Over-expression of GP73 induced significant increase of IL-4 and IL-17 levels and significant decrease of IFN- $\gamma$  ( $P < 0.05$ ); silencing GP73 induced marked decrease in the expression of IL-4 and IL-17 in CD4<sup>+</sup> cells and obvious increase of IFN- $\gamma$ ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** GP73 is over-expressed in peripheral blood CD4<sup>+</sup>T cells of HCC patients, moreover GP73 is very likely to participate in the inflammatory reaction by activating NF- $\kappa$ B to cause the unbalance of Th1/Th2/T17 and promote the occurrence and development of HCC.

**[Key words]** liver neoplasms; GP73; tumor immunology; CD4<sup>+</sup>T lymphocytes

在我国,肝癌是一种高发恶性恶性肿瘤,近年来其发生率和病死率呈现不断上升的趋势,严重威胁了人们的生命健康<sup>[1]</sup>。目前,对于肝癌的诊断和治疗效果不令人满意,因此,筛选新型肿瘤特异性标志物作为检验及治疗的靶点成为了该肿瘤研究领域的难点。高尔基体蛋白 73(GP73)是近年来新发现的一种肝癌诊断指标,大量研究表明,GP73 在肝癌患者血清中异常表达,证实其可能在肝癌的发生、发展中起到重要作用<sup>[2-3]</sup>。另一方面,肿瘤免疫也是癌症研究方面的一个热点,研究证实肿瘤患者辅助性 T 淋巴细胞(Th)的功能异常是导致肿瘤发生的重要原因<sup>[4]</sup>。截至目前,国内外尚无 GP73 在肝癌患者 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞中的表达及其机制研究的相关报道。本研究通过

验证 GP73 在肝癌患者外周血 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞中的表达及其对 Th 亚型分化的影响,从肿瘤免疫角度来探讨 GP73 在肝癌中的相关作用。

### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选取 2015 年 5 月至 2016 年 2 月在本院住院的肝癌患者 50 例为研究对象。所有患者均经病理确诊为肝癌,TNM 临床分期均为 I ~ II 期,无淋巴结转移。所有患者未进行任何抗肿瘤治疗,排除肝炎病毒重叠感染、自身免疫病,以及其他重大器官(如心、肺等)功能异常。其中男 27 例,女 23 例,年龄 47 ~ 75 岁,中位年龄 59 岁;TNM 临床分期 I 期 31 例,II 期 19 例;乙型肝炎病毒(HBV)感染 36 例,丙型肝炎病

毒(HCV)感染 14 例;Child-Pugh 肝功能分级 A 级 47 例,B 级 3 例;甲胎蛋白(AFP) $<400 \mu\text{g/L}$  35 例, $\geq 400 \mu\text{g/L}$  15 例;肿瘤直径小于或等于 5 cm 32 例, $>5 \text{ cm}$  18 例;肿瘤数目 1 个 45 例,2 个及以上 5 例;低分化或未分化 11 例,中分化 30 例,高分化 9 例;有血管浸润 24 例,无血管浸润 26 例。另选取体检中心年龄及性别匹配的健康志愿者 50 例为对照,男 26 例,女 24 例,年龄 46~76 岁,中位年龄 59 岁。两组一般资料比较差异无统计学意义( $P>0.05$ ),具有可比性。

**1.2 主要材料** GP73 小干扰 RNA(GP73 siRNA)及过表达(GP73 Overexpression)载体(上海吉玛制药技术有限公司);感受态大肠杆菌 DH5 $\alpha$  和人肝癌细胞 HepG2 由本实验室保存;限制性内切酶 Bgl II、EcoR I、Hind III、T4 DNA 连接酶(TaKaRa 公司);胶回收试剂盒(Promega 公司);质粒提取试剂盒(Tiangen 公司);引物及测序由奥科公司完成。人淋巴细胞分离液(美国 GE 公司);磁力架、CD4<sup>+</sup> 磁珠及试剂盒、MS 分离柱(德国 Miltenyi Biotec 公司);RPMI 1640 培养基、TRIzol 试剂、胎牛血清及 Lipofectamine 3000 脂质体转染试剂(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);实时荧光定量 PCR 试剂盒[宝生物工程(大连)有限公司];GP73、核因子  $\kappa\text{B}$ (NF- $\kappa\text{B}$ )、GAPDH 引物[生工生物工程(上海)股份有限公司];人白细胞介素 4(IL-4)、 $\gamma$  干扰素(IFN- $\gamma$ )、IL-17(南京奥青生物技术有限公司);NF- $\kappa\text{B}$  及 GAPDH 抗体(美国 Abcam 公司)。

### 1.3 方法

**1.3.1 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞的分选、鉴定、培养和转染** 清晨空腹采集患者和健康者外周血各 10 mL,加入淋巴细胞分离液,采用密度梯度离心法分离参与外周血单一核细胞(PBMC)。CD4<sup>+</sup> 磁珠分选试剂盒按照说明书分选 PBMC 中的 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞。每管细胞分选后采用流式细胞仪进行鉴定,其分选纯度均大于 95%。根据后续实验的不同需求,所得 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞或保存于  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ ,或进行后续培养。

根据文献提供的针对 GP73 siRNA 序列 5'-GCC AGT GCA TCA ATC AGA T-3',并经 BLAST 分析确定与其他已知基因没有同源性后,按照 pSUPER. retro. neo+gfp 载体的说明和要求设计合成了两条相应的 DNA 序列。将酶切鉴定正确的克隆测序,测序正确的相应质粒命名为 psiGP73。

Flag-GP73 载体的构建 human gp73-BamHI-forward: 5'-CGG GAT CCA TGA TGG GCT TGG GAA ACG GGC GTC-3', human gp73-EcoRI-reverse: 5'-CGG AAT TCT CAG AGT GTA TGA TTC CGC TTT CAC-3'。

将分选的部分健康人 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞加入含有 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液,分别加入 GP73 siRNA (psiGP73) 或过表达(Flag-GP73)载体,使用 Lipofectamine 3000 按说明书流程进行转染。转染后细胞分为未转染组,GP73 干扰组及 GP73 过表达组,在 anti-CD28(1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 和 anti-CD3 (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 的刺激条件下,37  $^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  条件培养 72 h,收集细胞及上清液进行后续实验。

**1.3.2 实时荧光定量 PCR 检测 GP73、NF- $\kappa\text{B}$  mRNA 表达水平**  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  保存的 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞加入 1 mL TRIzol,按照说明书指示提取总 RNA,使用一步法实时荧光定量 PCR 试剂盒,逆转录合成 cDNA 后对目的基因进行扩增。GP73:上游引物 5'-CAG CGC TGA TTT TGA GAT G-3',下游引物 5'-ATG ATC CGT GTC TGG AG-3';NF- $\kappa\text{B}$ :上游引物 5'-ATG TGC ATC GGC AAG TGG-3',下游引物 5'-CAG AAG TTG AGT TTC GGG TAG-3';GAPDH:上游引物 5'-AAG TAT

GAC AAC AGC CTC AAG A-3',下游引物 5'-CAC CAC CTT CTT GAT GTC ATC A-3'。PCR 反应条件:95  $^\circ\text{C}$  30 s;95  $^\circ\text{C}$  5 s,60  $^\circ\text{C}$  30 s,40 个循环。PCR 产物的相对表达采用  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  法计算,以 GAPDH 的表达量作为内参。

**1.3.3 蛋白质印迹法(Western blot)检测 NF- $\kappa\text{B}$  蛋白表达水平** 用 RIPA 裂解液裂解细胞后,进行 SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白,将蛋白转至 PVDF 膜,加入 5% 的脱脂牛奶封闭 1 h 后,加入 NF- $\kappa\text{B}$  抗体 4  $^\circ\text{C}$  孵育过夜,洗涤,加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗孵育 1 h 后加入化学发光物质进行显影。

**1.3.4 ELISA 检测 IL-4、IFN- $\gamma$  及 IL-17 水平** 转染及未转染的 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞培养 72 h 后,根据 ELISA 试剂盒说明书步骤,测定上清液中 IL-4、IFN- $\gamma$ 、IL-17 的分泌水平。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS17.0 统计软件进行分析。计量资料以  $\bar{x}\pm s$  表示,采用  $t$  检验。以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 GP73 mRNA 的表达水平** 肝癌患者外周血 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞中 GP73 mRNA 的表达较对照组升高,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。见图 1。

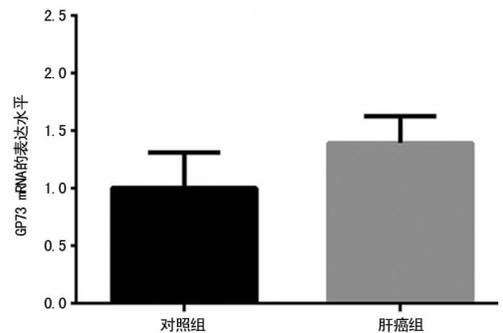


图 1 GP73 mRNA 的表达水平

**2.2 GP73 mRNA 水平与肝癌患者的临床病理特征关系** 将肝癌患者 GP73 mRNA 水平分为低表达组(低于对照组 1.1 倍)和高表达组(不低于对照组 1.1 倍)。与 GP73 mRNA 低表达相比,高表达患者表现较恶化的临床病理,包括 TNM 临床分期、Child-Pugh 肝功能分级、肿瘤直径和肿瘤分化程度( $P<0.05$ );而和 HBV/HCV 感染、AFP、肿瘤数目及血管浸润等无明显关系( $P>0.05$ )。

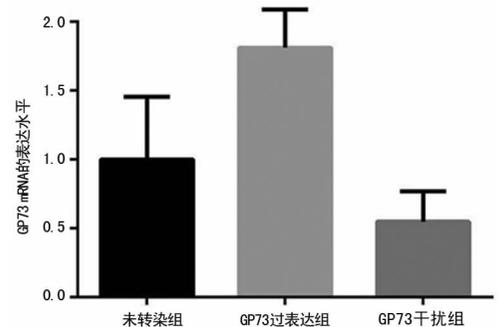


图 2 各组 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞中 GP73 mRNA 的表达水平

**2.3 过表达与沉默 GP73 对 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞 NF- $\kappa\text{B}$  表达水平的影响** GP73 过表达组 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞中 GP73 mRNA 水平较未转染组明显上升( $P<0.05$ ),而 GP73 干扰组较未转染组明显降低( $P<0.05$ ),证明转染成功,见图 2。GP73 过表

达组 NF- $\kappa$ B mRNA 及蛋白表达水平均明显升高 ( $P < 0.05$ ), GP73 干扰组明显降低 ( $P < 0.05$ ), 见图 3。

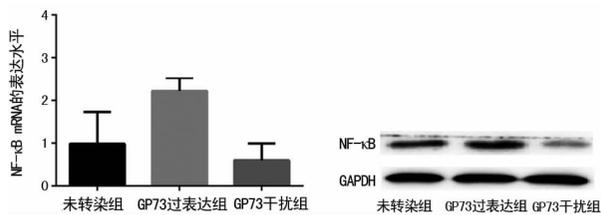


图 3 各组 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞 NF- $\kappa$ B mRNA 及蛋白的表达水平

**2.4 患者与健康人群外周血中的 IL-4、IFN- $\gamma$  和 IL-17 的水平比较** 与健康人群相比, 肝癌患者外周血 IL-4 和 IL-17 的水平明显升高, IFN- $\gamma$  水平明显降低 ( $P < 0.05$ ). 见表 3。

表 3 患者与健康人群外周血中的 IL-4、IFN- $\gamma$  和 IL-17 的水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ , pg/mL)

组别	n	IL-4	IL-17	IFN- $\gamma$
对照组	50	30.80 $\pm$ 32.79	72.65 $\pm$ 12.33	49.69 $\pm$ 16.38
肝癌组	50	62.19 $\pm$ 52.93	142.56 $\pm$ 22.36	23.45 $\pm$ 7.21

**2.5 过表达与沉默 GP73 对 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞 IL-4、IL-17 和 IFN- $\gamma$  分泌的影响** 与未转染组相比, GP73 过表达组中 IL-4 和 IL-17 水平明显升高, IFN- $\gamma$  水平明显降低 ( $P < 0.05$ ); 而 GP73 干扰组有效沉默 GP73 后, 其显示 IL-4 和 IL-17 水平较未转染组明显降低, IFN- $\gamma$  水平明显上升 ( $P < 0.05$ ). 见表 4。

表 4 过表达与沉默 GP73 对 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞 IL-4、IL-17 和 IFN- $\gamma$  分泌的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	IL-4 (ng/mL)	IL-17 (pg/mL)	IFN- $\gamma$ (ng/mL)
未转染组	233.41 $\pm$ 15.31	8.13 $\pm$ 2.89	65.13 $\pm$ 7.56
GP73 过表达组	270.25 $\pm$ 17.81*	14.84 $\pm$ 3.90*	43.78 $\pm$ 3.87*
GP73 干扰组	198.91 $\pm$ 10.94*	4.19 $\pm$ 1.13*	85.31 $\pm$ 9.15*

\*  $P < 0.05$ , 与未转染组比较

### 3 讨 论

近年来, GP73 作为肝癌特异性标记物的研究成为了癌症领域的一个热点。GP73 是由 Kladney 等<sup>[5]</sup> 在 2000 年发现并首次报道的, GP73 是一个位于细胞内高尔基体上的 II 型跨膜蛋白, 研究显示在肝癌患者中 GP73 水平与肝脏纤维化程度呈正相关, 并在患者发展成为原发性肝癌时达到高峰, 证实其参与肝癌的发生和发展。此后, 大量研究证实, 肝癌患者血清中 GP73 水平明显升高并与肿瘤的发展密切相关<sup>[6-7]</sup>。本研究验证了 GP73 在肝癌患者外周血 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞中的表达, 与健康人相比, GP73 在肝癌患者外周血 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞中过表达 ( $P < 0.05$ ), 揭示其可能通过影响免疫系统的功能参与肝癌的发生与进展。

本研究结果表明, 和 GP73 mRNA 低表达组相比, 高表达患者表现较恶化的临床病理, 包括 TNM 临床分期、Child-Pugh 肝功能分级、肿瘤直径和肿瘤分化程度 ( $P < 0.05$ ) 等, 从而为临床医生在患者的诊断方面提供重要的参考, 具有重要的临床意义。

肿瘤免疫是肿瘤机制研究领域的重要组成部分。大量的研究证实, 免疫系统与肿瘤之间存在着错综复杂的关系。一方面, 目前的许多抗肿瘤疗法通过激活各种免疫细胞及其分泌的

相关因子对癌细胞进行杀伤; 而另一方面, 也有大量研究证实, 某些免疫细胞通过各种炎症通路参与癌症的发展与发生<sup>[8-9]</sup>。研究表明, 某些慢性炎症可能导致体内大量活性氧的产生与累积, 从而导致致内 DNA 的损伤及基因的突变, 最终促进肿瘤的发生。因此, 如何有效地控制炎症可能会对肿瘤的发生及治疗产生极为重要的作用。NF- $\kappa$ B 是炎症反应中最为重要的一个转录因子, NF- $\kappa$ B 的启动可以激活其下游信号通路, 分泌各种炎性因子促进炎症的发生。在本研究中, 在 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞中过表达 GP73 后, NF- $\kappa$ B 的表达也随之上调, 而在沉默 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞中的 GP73 可导致 NF- $\kappa$ B 表达的下调, 提示 GP73 可能通过激活 NF- $\kappa$ B 信号通路激活炎症反应, 从而促进癌症的发生和发展。

CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞是一类 Th, 与其他类型淋巴细胞不同, CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞通过分泌各种细胞因子对机体的免疫功能进行调节。CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞根据其功能及分泌细胞因子的种类主要分为两个亚群, Th1 及 Th2。Th1 主要调节机体细胞免疫, 其代表性分泌细胞因子包括 IFN- $\gamma$ 、IL-2 等; 而 Th2 主要调节机体体液免疫, 以 IL-4、IL-6 等作为其标志性分泌因子<sup>[10]</sup>。而 Th1 通过分泌的 IFN- $\gamma$  抑制 Th2 的分化, Th2 则可通过分泌 IL-4 抑制 Th1 的分化。大量研究证实, 许多疾病的发生、发展与 Th1/Th2 的比例失调密切相关<sup>[11-12]</sup>。细胞免疫是机体免疫系统参与肿瘤发生、进展及肿瘤免疫中最主要的部分, 当 Th1 的数量及其分泌的相关因子在患者体内占有主导地位的时候, 患者的免疫系统处于抵抗状态, 较为活跃, 具有较强的抗肿瘤能力, 而一旦 Th1/Th2 比例失调, Th2 数量占优时, 患者免疫系统处于易感状态, 抗肿瘤能力较差<sup>[13]</sup>。除以上两种主要的 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞亚群外, 近年来新发现的 Th17 在肿瘤的发生与发展中也扮演着及其重要的角色。Th17 主要分泌 IL-17, 在肿瘤微环境中, IL-17 可能通过促进肿瘤组织新生血管的形成促进肿瘤的生长、迁移、侵袭与转移<sup>[14]</sup>, 同时, IL-17 促进 Th17 生成, 抑制 Th1 的分化及 IFN- $\gamma$  的分泌<sup>[15]</sup>。在本研究中, 与健康人群相比, 肝癌患者外周血 IL-4 和 IL-17 的水平明显升高, 而 IFN- $\gamma$  水平明显降低 ( $P < 0.05$ ); 过表达 GP73 组中 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞 IL-4 和 IL-17 水平明显上升, IFN- $\gamma$  水平明显降低 ( $P < 0.05$ ); 而沉默 GP73 后, IL-4 和 IL-17 水平较未转染组明显降低, 而 IFN- $\gamma$  水平明显上升 ( $P < 0.05$ ), 说明 GP73 异常表达可能导致患者体内 Th1/Th2/T17 失衡, 从而抑制机体抗肿瘤的相关免疫反应, 促进肿瘤的发生及进展。

综上所述, GP73 在肝癌患者外周血 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞中过表达, 而 GP73 很有可能通过激活 NF- $\kappa$ B 参与炎症反应, 导致患者体内 Th1/Th2/T17 失衡, 促进肝癌的发生与生长。然而, GP73 与 Th1/Th2/T17 细胞失衡作用的机制并不清楚, 将在未来工作中做进一步研究。

### 参考文献

[1] 周亮, 王世明. GP73、AFP 异质体联合检测在原发性肝癌早期诊断中的应用进展[J]. 中国当代医药, 2015, 22(4): 15-17.

[2] Block TM, Comunale MA, Lowman M, et al. Use of targeted glycoproteomics to identify serum glycoproteins that correlate with liver cancer in woodchucks and humans[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(3): 779-784.

[3] Liang R, Chen XY, Ge LY, et al. Meta-(下转第 4672 页)

- 247-249.
- [6] Lilic N, Addison B, Hammodat H. Gallbladder carcinoma: a New Zealand centre's 10-year experience with presentation, ethnic diversity and survival rate[J]. ANZ J Surg, 2015, 85(4):260-263.
- [7] Tayeb M, Rauf F, Ahmad K, et al. Is it necessary to submit grossly normal looking gall bladder specimens for histopathological examination? [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2015, 16(4):1535-1538.
- [8] Emmett C, Barrett P, Gilliam A, et al. Routine versus selective histological examination after cholecystectomy to exclude incidental gallbladder carcinoma[J]. Ann R Coll Surg Engl, 2015, 97(7):526-529.
- [9] Argon A, Yagci A, Tasli F, et al. A different perspective on macroscopic sampling of cholecystectomy specimens [J]. Korean J Pathol, 2013, 47(6):519-525.
- [10] Raznatovic Z, Zaric N, Galun D, et al. Multiple port-site metastasis of incidental gallbladder carcinoma after laparoscopic cholecystectomy[J]. Acta Chir Iugosl, 2012, 59(1):105-109.
- [11] Tian Y, Ji X, Liu B, et al. Surgical treatment of incidental gallbladder cancer discovered during or following laparoscopic cholecystectomy[J]. World J Surg, 2015, 39(3):746-752.
- [12] Garcia F, Diaz T, Lapena V, et al. Port site metastases after laparoscopic cholecystectomy for an unexpected gallbladder carcinoma[J]. Abdom Imaging, 1999, 24(4):404-406.
- [13] Ahmad J, Mayne A, Zen Y, et al. Spilled gallstones during laparoscopic cholecystectomy[J]. Ann R Coll Surg Engl, 2014, 96(5):e18-20.
- [14] Tsirlis T, Ausania F, White S, et al. Implications of the index cholecystectomy and timing of referral for radical resection of advanced incidental gallbladder cancer [J]. Ann R Coll Surg Engl, 2015, 97(2):131-136.
- [15] Goetze T, Paolucci V. Immediate radical re-resection of incidental T1b gallbladder cancer and the problem of an adequate extent of resection (results of the German Registry "Incidental Gallbladder Cancer") [J]. Zentralbl Chir, 2014, 139(Suppl 2):e43-48.
- [16] 董家鸿, 王剑明, 曾建平. 胆囊癌诊断和治疗指南(2015版) [J]. 临床肝胆病杂志, 2016, 32(3):411-419.
- [17] Shirobe T, Maruyama S. Laparoscopic radical cholecystectomy with lymph node dissection for gallbladder carcinoma [J]. Surg Endosc, 2015, 29(8):2244-2250.
- [18] Agarwal A, Javed A, Kalayarasan R, et al. Minimally invasive versus the conventional open surgical approach of a radical cholecystectomy for gallbladder cancer: a retrospective comparative study [J]. HPB (Oxford), 2015, 17(6):536-541.
- [19] Machado M, Makdissi F, Surjan R. Totally laparoscopic hepatic bisegmentectomy (s4b+s5) and hilar lymphadenectomy for incidental gallbladder cancer [J]. Ann Surg Oncol, 2015, 22(Suppl 3):336-339.
- [20] Aloia T, Jarufe N, Javle M, et al. Gallbladder cancer: expert consensus statement [J]. HPB (Oxford), 2015, 17(8):681-690.
- [21] 丁国乾, 秦鸣放, 邹富胜, 等. 腹腔镜胆囊切除术意外胆囊癌 35 例临床分析 [J]. 重庆医学, 2012, 41(5):484-485.

(收稿日期:2017-05-09 修回日期:2017-07-10)

(上接第 4669 页)

- analysis supports the diagnostic value of GP73 in primary liver cancer [J]. Clin Res Hepatol Gastroenterol, 2015, 39(5):71-72.
- [4] 刘真, 肖斌, 毛旭虎. 炎症与肿瘤的关系研究进展 [J]. 现代生物医学进展, 2009, 9(3):591-593.
- [5] Kladney RD, Bulla GA, Guo L, et al. GP73, a novel Golgi-localized protein up-regulated by viral infection [J]. Gene, 2000, 249(1/2):53-65.
- [6] 朱源荣, 陆建华. GP73 及其与肝癌诊断的研究进展 [J]. 医学诊断, 2011, 1(2):13-17.
- [7] Xu WJ, Guo BL, Han YG, et al. Diagnostic value of alpha-fetoprotein-L3 and Golgi protein 73 in hepatocellular carcinomas with low AFP levels [J]. Tumour Biol, 2014, 35(12):12069-12074.
- [8] Wu D, Wu P, Zhao L, et al. NF- $\kappa$ B expression and outcomes in solid tumors: a systematic review [J]. Medicine (Baltimore), 2015, 94(40):e1687.
- [9] 焦国慧, 杨荣存. 肿瘤相关免疫抑制细胞与免疫逃逸机制研究进展 [J]. 癌症进展, 2008, 6(2):147-151.
- [10] Ma J, Liu H, Wang X. Effect of ginseng polysaccharides and dendritic cells on the balance of Th1/Th2 T helper cells in patients with non-small cell lung cancer [J]. J Tradit Chin Med, 2014, 34(6):641-645.
- [11] 姚金晶, 陈宜涛. Th1/Th2 平衡调节与疾病发生的研究进展 [J]. 现代生物医学进展, 2009, 9(13):2597-2600.
- [12] Shurin MR, Lu L, Kalinski P, et al. Th1/Th2 balance in cancer, transplantation and pregnancy [J]. Springer Semin Immunopathol, 1999, 21(3):339-359.
- [13] Lauerova L, Dusek L, Simickova M, et al. Malignant melanoma associates with Th1/Th2 imbalance that coincides with disease progression and immunotherapy response [J]. Neoplasma, 2002, 49(3):159-166.
- [14] 刘登尧. IL-17 的促肿瘤与抗肿瘤功能研究进展 [J]. 新疆医学, 2013, 43(7):1-4.
- [15] Wu X, Yang T, Liu X, et al. IL-17 promotes tumor angiogenesis through Stat3 pathway mediated upregulation of VEGF in gastric cancer [J]. Tumor Biology, 2016, 37(4):1-9.

(收稿日期:2017-05-13 修回日期:2017-08-02)