

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.33.012

GRHPR 在肝细胞癌组织和细胞中的表达及意义*

潘英连¹, 邓青春^{2#}, 许丹妮¹, 孙华茂¹, 曾江正¹, 陈不尤³, 卢彦达^{1△}

(1. 海南医学院第一附属医院肿瘤内科, 海口 570102; 2. 海南医学院第二附属医院妇产科, 海口 570102;
3. 南通大学医学院附属医院放疗科, 江苏南通 226001)

[摘要] **目的** 研究乙醛酸还原酶/羟基丙酮酸还原酶 (GRHPR) 在肝细胞癌 (HCC) 中的表达, 与肝癌细胞增殖相关性, 及其对 HCC 患者预后分析。**方法** 采用 Western blot 检测 GRHPR 在 8 例肝癌及癌旁组织标本和肝癌细胞株的表达情况; 采用免疫组织化学方法检测 120 例 HCC 及相应癌旁组织微阵列中 GRHPR 和增殖指标 Ki-67 的表达情况, 并结合肝癌临床病理资料分析 GRHPR 与 HCC 患者的年龄、性别、肿瘤分级、大小和转移及血清甲胎蛋白 (AFP) 等因素之间的关系, 并对上述病例进行随访, 应用 Kaplan-Meier 法分析 HCC 患者生存率。**结果** 采用 Western blot 检测发现 GRHPR 在新鲜活体肿瘤组织中表达比在癌旁组织中表达减少, 在肿瘤细胞株中表达也减少; 免疫组织化学检测结果显示 GRHPR 表达与 Ki-67 呈负相关性 ($r = -0.870$, $P < 0.05$); 在癌和相应癌旁组织中 GRHPR 阴性表达的患者生存率低于 GRHPR 阳性患者 ($P < 0.05$)。Kaplan-Meier 分析结果显示 GRHPR 在 HCC 中的阳性表达与患者总生存率的增加显著相关 ($P < 0.01$)。**结论** GRHPR 在癌和癌旁组织缺失提示 GRHPR 可能是肝癌发生、发展过程中的保护因素。

[关键词] 癌, 肝细胞; 乙醛酸还原酶/羟基丙酮酸还原酶; 诊断; 预后
[中图分类号] R735.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2018)33-4246-06

Expression and significance of GRHPR in hepatocellular carcinoma tissue and cells*

PAN Yinglian¹, DENG Qingchun^{2#}, XU Danni¹, SUN Huamao¹,
ZENG Jiangzheng¹, CHEN Buyou³, LU Yanda^{1△}

(1. Department of Medical Oncology, Affiliated Hospital of Hainan Medical University, Haikou, Hainan 570102, China; 2. Department of Obstetrics and Gynecology, Second Affiliated Hospital of Hainan Medical University, Haikou, Hainan 570102, China; 3. Department of Medical Oncology, Affiliated Hospital of Medical College, Nantong University, Nantong, Jiangsu 226001, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the expression of glyoxylate reductase/hydroxypyruvate reductase (GRHPR) in hepatocellular carcinoma (HCC) and its correlation with HCC proliferation and its prognosis analysis in HCC patients. **Methods** The expression level of GRHPR in 8 cases of tissue sample and HCC cell line was detected by adopting the Western blot; the immunohistochemistry was utilized to examine the expression levels of GRHPR and Ki-67 in 120 cases of HCC and corresponding paracancerous tissue microarray. The correlation between GRHPR with the factors of age, sex, tumor grade, size, metastasis and serum AFP was analyzed by combining with the HCC clinicopathological data. The above cases were followed up. The survival rate of HCC patients was analyzed by using the Kaplan Meier method. **Results** The Western blot detection found that the GRHPR expression in fresh in vivo tumor tissue was decreased compared with the non-cancerous tissue; the immunohistochemical detection results showed that the GRHPR expression was negatively correlated with Ki-67 ($r = -0.870$, $P < 0.05$); the survival rate in the patients with GRHPR expression negative in cancer and corresponding paracancerous tissue was lower than that in the patients with GRHPR positive ($P < 0.05$). The Kaplan-Meier analysis results showed that the GRHPR positive expression in HCC was significantly correlated with the total survival rate of the patients ($P < 0.01$). **Conclusion** The deficiency of GRHPR in cancer and paracancerous tissue prompts that GRHPR may be a protective factor of the occurrence and development process of HCC.

[Key words] carcinoma, hepatocyte; glyoxylate reductase/hydroxypyruvate reductase; diagnostis; prognostic

* 基金项目: 海南医学院第一附属医院青年培育基金 (AYFYYPY201601)。 作者简介: 潘英连 (1986—), 主治医师, 硕士, 主要从事肝癌发生发展机制研究; # 共同第一作者: 邓青春 (1987—), 副主任医师, 博士, 主要从事肿瘤基础的研究。 △ 通信作者, E-mail: luyandajx@sina.com。

肝细胞癌(HCC)的发病因素很多,除了乙型肝炎病毒(HBV)感染,丙型肝炎病毒(HCV)感染外,还有很多慢性肝脏疾病,如慢性酒精性肝病,非酒精性脂肪肝病,以及代谢紊乱疾病也是 HCC 发生与流行的主要因素。其中,代谢综合征和非酒精性脂肪肝病在癌症发生过程中没有肝硬化的表现,引起了人们相当程度的关注^[1-3]。目前已经有大量关于代谢产物和代谢途径异常与 HCC 发生、发展关系的研究。有研究发现,尿中糖代谢物质可以作为 HCC 的诊断标志物^[4-6]。

乙醛酸还原酶/羟基丙酮酸还原酶(GRHPR)的基因位于人类 9 号染色体着丝点,人和鼠 GRHPR 基因结构一致,但是剪切位点存在差异性,并且内含子的区域差异性也较大,在肝脏中表达最高^[7-8]。在基因调节和蛋白质相互作用的研究中,与 GRHPR 相关的主要有过氧化物酶体活化受体 α (PPAR α)。PPAR α 参与多种代谢途径基因转录调控,调节过氧化物酶体和线粒体脂肪氧化分解,胆汁酸和氨基酸代谢、葡萄糖稳态、生物转化、炎症,龋齿类动物肝癌形成^[9]。GENOLET 等^[10]发现 PPAR α 配体调节龋齿类动物中 GRHPR 基因表达、肝癌形成,不能调控人类 GRHPR 的表达。GRHPR 具有两种酶活性:羟基丙酮酸还原酶(HPR)和 D-甘油酸脱氢酶(DGDH)活性,两种活性维持平衡状态。NADH/NAD⁺ 比例异常是人体代谢异常产生的原因之一^[11]。然而生化证据表明 GRHPR 利用 NADPH 作为辅酶生成 NADP⁺,为磷酸戊糖途径提供 NADP,为人体提供必需的核糖和多个代谢反应所需的供氢体 NADPH^[12]。由此可见,GRHPR 在细胞糖代谢,能量稳态中发挥着重要作用。

GRHPR 既然是存在于肝脏的一种酶,并且参与多个代谢途径,因此推测它的异常也可能与肝脏疾病具有相关性。在本研究中发现 GRHPR 在 HCC 中严重减少,在某些病例中甚至缺失。这个发现引起了作者极大的兴趣。

1 资料与方法

1.1 一般资料

1.1.1 细胞株和主要试剂 人类组织来源肝癌细胞 SMMC-7721、Huh7、HepG2、Hep3B 细胞及人肝细胞系 Lo2 均购自中国科学院细胞库上海保藏中心。DMEM 培养基、胎牛血清购自美国 Gibco 公司。细胞总蛋白抽提试剂盒、 β -actin 抗体、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 抗体、BCA 蛋白测定试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司,兔抗人 GRHPR 购自 SANTA CRUZ 公司。

1.1.2 组织来源及患者资料 原发性肝癌石蜡标本 120 份,选自南通市肿瘤医院,标本均为 2003—2006 年手术切除标本,病理诊断明确,切缘均大于 1 cm,并且有完整的临床病理资料。标本来源患者中,男 96 例,女 24 例,中位年龄 49.2 岁;肝癌直径 < 5 cm 60

例,肝癌直径 > 5 cm 60 例;组织学分化分级:高分化 12 例,中分化 64 例,低分化 44 例;转移病例(包括淋巴结转移、门静脉癌栓和远处转移)19 例,无转移病例 101 例;合并肝硬化 98 例;HBsAg 阳性 87 例;患者随访 1~91 个月,中位数 41.5 个月。肝癌及配对的癌旁组织新鲜标本 8 份,取自南通市肿瘤医院,用作冰冻切片和蛋白提取,新鲜组织离体后 30 min 内置于 -80 °C 冰箱内保存。所有患者的最终诊断均经两位病理医师复诊确认。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养条件 Lo2、SMMC-7721、Huh7、HepG2 和 Hep3B 细胞分别用 DMDM、RPMI 1640 完全培养基(含 10% 胎牛血清、2 mmol/L L-谷氨酰胺、100 U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素),5% CO₂、饱和湿度、37 °C 培养箱内常规培养传代。收集处于对数生长期的细胞进行实验。各项实验至少重复 3 次。

1.2.2 Western blot 法检测正常肝细胞和 HCC 细胞中 GRHPR 蛋白的表达 收集足量的 SMMC-7721、Huh7、HepG2、Hep3B 和 Lo2 细胞,以细胞裂解液提取总蛋白,应用 BCA 蛋白定量法进行蛋白定量,10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜,封闭。以免抗人 GRHPR(1 : 500) 或 β -actin 抗体(1 : 500)、辣根过氧化物酶标记的鼠抗兔 IgG 二抗(1 : 1 000)室温孵育 1 h,电化学发光法显影并拍照。

1.2.3 组织微阵列 将数十个、数百个乃至数千个小的组织片整齐地排列在某一载体上(通常是载玻片)而成的微缩组织切片。

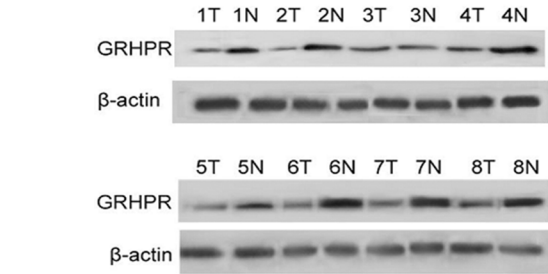
1.2.4 免疫组织化学结果判定标准 GRHPR、Ki-67 的统计学分析是根据国际半定量 Remmele Score 方法来进行统计的。统计方法:每个标本组织根据染色强度分为 4 等(I0 为无着色,I1 为弱着色,I2 为中等着色,I3 为强着色),根据阳性细胞百分比分为 5 等(P0 为无着色,P1 为 $\leq 10\%$ 的阳性细胞,P2 为 $> 10\% \sim 50\%$ 的阳性细胞,P3 为 $> 50\% \sim 80\%$ 的阳性细胞,P4 为 $> 80\%$ 的阳性细胞)。染色结果 = 染色强度 $\times$ 阳性细胞百分比。每个结果由 2 位经验丰富的病理学者,在电子显微镜下计数,若 2 位病理学者之间存在误差($P > 0.5$)时,则要对标本重新计数。

1.3 统计学处理 运用 SPSS11.0 统计软件(Chicago, III, USA),受试者工作特征(ROC)曲线分析找到 GRHPR 阳性的切点。对 GRHPR 和 Ki-67 在 HCC 中的表达与相应的临床病理学特征之间的关系采用 χ^2 检验或 Fisher 精确概率法分析。HCC 中 GRHPR 和 Ki-67 表达间的相互关系采用 Pearson 相关分析。Log-rank 检验生存曲线统计学差异,Kaplan-Meier 分析患者的总体生存率曲线和 5 年生存率曲线。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GRHPR 在 HCC 中表达 Western blot 检测 8

例人肝癌及癌旁新鲜组织中 GRHPR 表达,在相对分子质量 $>35\times 10^3$ 可以得到 GRHPR 的清晰条带,结果显示:GRHPR 在 HCC 中的表达明显低于对应癌旁组织,癌旁组织中均可检测到 GRHPR 的表达,而对应的癌组织中低表达或缺失表达(图 1)。



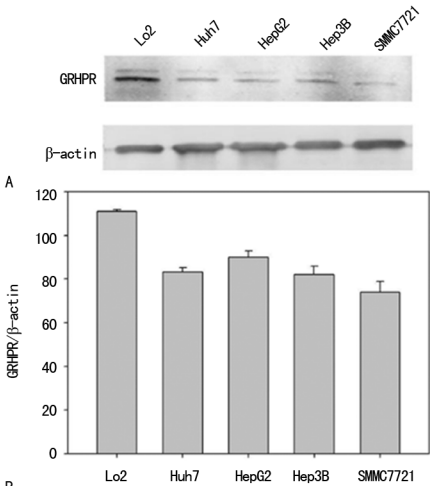
T:来自于 HCC 组织;N:来自于对应的癌旁组织;β-actin:内参对照

图 1 GRHPR 在肝癌及癌旁新鲜组织中的表达

2.2 GRHPR 在 HCC 细胞株和正常肝细胞株中的表达 检测正常肝细胞株 Lo2 和肝癌细胞株 Huh7、HepG2、Hep3B、SMMC-7721 中 GRHPR 蛋白质表达,Western blot 结果显示,GRHPR 在肝癌细胞株中有所表达,并且明显低于正常的肝细胞系($P<0.05$,图 2)。

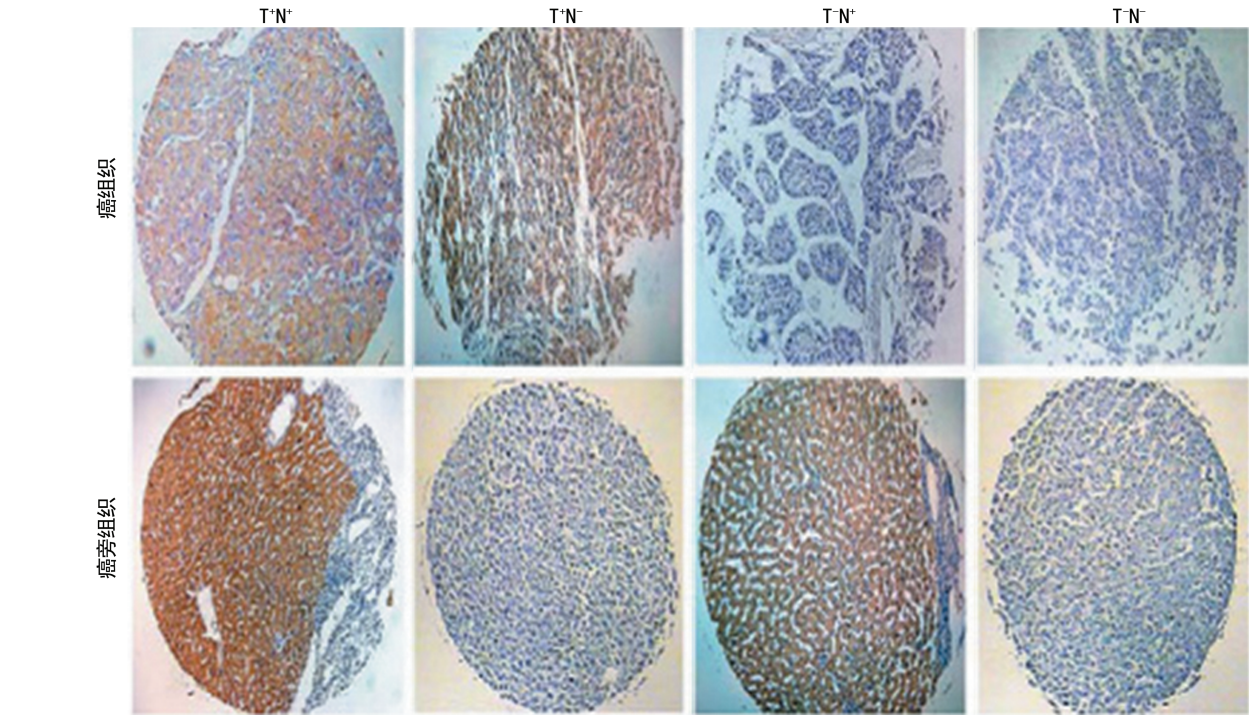
2.3 GRHPR 在人肝癌及癌旁组织微阵列中的表达 免疫组织化学检测 120 例 HCC 及癌旁组织石蜡切片,结果 GRHPR 在 HCC 和癌旁组织中的表达形式,见图 3。表达定位于细胞质,细胞核无定位,染色呈棕黄或棕褐色,细胞核蓝色, T^+N^+ :癌和癌旁组织

GRHPR 均高表达的; T^+N^- :癌组织高表达而癌旁组织低表达; T^-N^+ :癌组织表达阴性而癌旁组织高表达; T^-N^- :癌组织和癌旁组织中均呈现低表达。直方图显示在癌组织中 GRHPR 定量计数偏低的病例较多,而在癌旁组织中结果相反(图 4)。箱式图统计结果显示在癌组织及癌旁组织中 GRHPR 表达平均值分别为 1.12 ± 0.19 和 2.04 ± 0.27 ($P<0.05$,图 5)。ROC 曲线确定 GRHPR 表达阳性和阴性切点值为 1.53, $AUC=0.74$ ($AUC>0.50$),诊断试验具有准确性(图 6)。



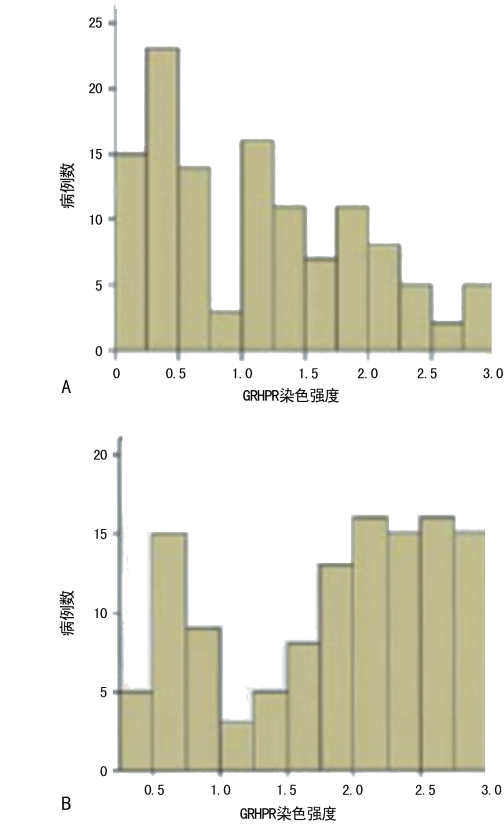
A:GRHPR 在不同细胞中的表达;B:灰度值检测

图 2 GRHPR 在肝癌细胞中表达



T^+N^+ :在 HCC 和癌旁组织中均阳性; T^+N^- :GRHPR 在癌中阳性表达而在癌旁中阴性表达; T^-N^+ :GRHPR 在癌中阴性而在癌旁阳性表达; T^-N^- :GRHPR 在癌及癌旁中均阴性

图 3 免疫组织化学检测 120 例 HCC 及相应癌旁组织中 GRHPR 的表达



A: HCC 组织; B: 癌旁组织
图 4 GRHPR 在 HCC 和癌旁组织表达直方图

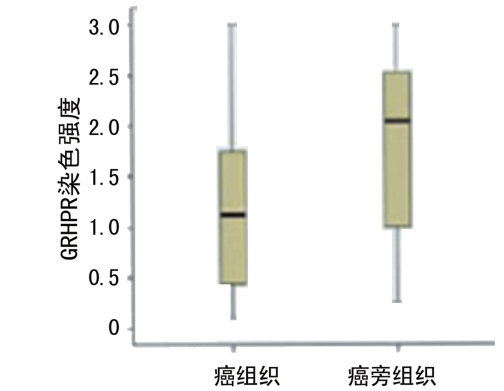


图 5 GRHPR 在 HCC 和癌旁组织表达箱式图

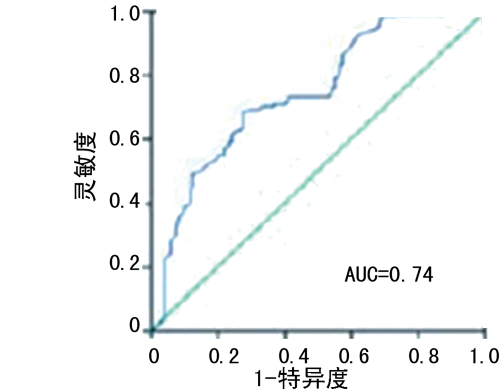


图 6 ROC 曲线图

2.4 GRHPR 与 HCC 临床病理因素的相关性 对进行了免疫组织化学实验的 120 例 HCC 患者的石蜡

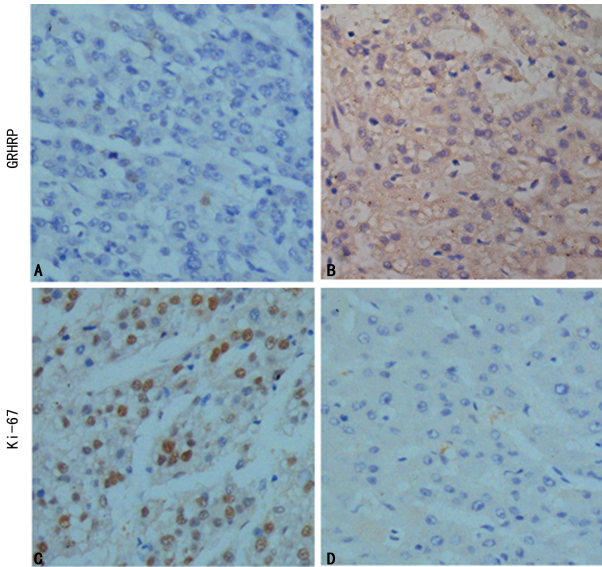
切片标本进行统计,GRHPR 根据 ROC 曲线最左上角切点值 1.53,将其分为高表达组和低表达组,分析 GRHPR 的表达与肝癌患者临床病理特征之间的关系。分析显示 HCC 组织中 GRHPR 的表达强度与肝癌患者肿瘤病理分化程度 ($P=0.003$)、肿瘤大小 ($P=0.015$)、甲胎蛋白 ($P=0.003$)、乙型肝炎病毒表面抗原 ($P=0.010$) 相关,差异有统计学意义,与患者的性别、年龄、肿瘤结节多少及是否伴有肝硬化状态无关 ($P>0.05$);在癌旁组织中,GRHPR 与肿瘤大小相关 ($P=0.01$),与患者的性别、肿瘤结节多少及是否伴有肝硬化状态等无关 ($P>0.05$),见表 1。

表 1 GRHPR 蛋白表达与 HCC 患者临床病理特征的关系 (n)

临床病理特征	n	HCC 组织			癌旁组织		
		GRHPR 蛋白表达			GRHPR 蛋白表达		
		阴性	阳性	P	阴性	阳性	P
性别							
男	96	66	30	0.512	23	73	0.074
女	24	16	8		2	22	
年龄							
<49.2 岁	59	45	14	0.050	10	49	0.211
≥49.2 岁	61	37	24		15	46	
分化程度							
高分化	12	3	9	0.003	3	9	0.596
中分化	64	46	18		15	49	
低分化	44	33	11		7	37	
淋巴结转移							
有	19	17	2	0.024	5	14	0.170
无	101	65	36		17	84	
脉管侵袭							
无	35	27	8	0.132	11	24	0.059
有	85	55	30		14	71	
包膜							
有	42	31	11	0.217	12	30	0.105
无	77	50	27		13	64	
肿瘤大小							
<5 cm	60	35	25	0.015	4	56	0.010
≥5 cm	60	47	13		21	39	
甲胎蛋白							
<50 ng/mL	52	28	24	0.003	8	44	0.145
≥50 ng/mL	68	54	14		17	51	
肿瘤结节数							
单个	77	51	26	0.326	16	61	0.580
多个	43	31	12		9	34	
乙型肝炎病毒表面抗原							
阳性	87	68	19	0.010	18	69	0.566
阴性	33	14	19		7	26	
肝硬化							
阳性	98	67	31	0.586	12	76	0.273
阴性	22	15	7		3	19	

2.5 免疫组织化学检测 HCC 中 GRHPR、Ki-67 表达 Ki-67 与 GRHPR 表达结果呈反向趋势的, GRHPR 阴性表达(表达强度评分=0.66)的病例中, Ki-67 呈强阳性表达(阳性百分比=0.63),而在 GRHPR 强阳性表达(表达强度评分=3.00)的病例中, Ki-67 呈弱阴性表达(阳性百分比=0.06),见图 7。

2.6 GRHPR、Ki-67 二者相关性分析 根据免疫组织化学的染色结果, Pearson 相关系数法分析显示 120 例肝癌组织中, GRHPR 和 Ki67 的表达呈负相关($r=-0.870, P<0.05$, 图 8)。



A、B: GRHPR 和 Ki67 在同一例 HCC 组织中 GRHPR 阴性表达, 而对应 Ki67 阳性表达; C、D: 同一例 HCC 组织中 GRHPR 阳性性表达, 而对应 Ki67 阴性表达

图 7 免疫组织化学检测 HCC 中 GRHPR、Ki-67 表达

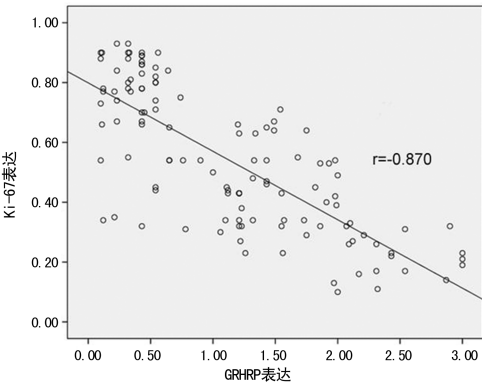
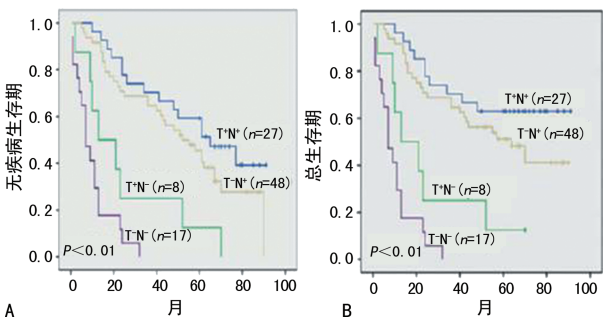


图 8 Pearson 相关系数法分析 GRHPR 和 Ki-67 表达在 HCC 中的相关性

2.7 GRHPR 在 HCC 患者中生存率的评价 将 GRHPR 按 T^+N^+ , T^+N^- , T^-N^+ , T^-N^- 分组, 经 Kaplan-Meier 法分析得到 HCC 患者 5 年无病生存率: T^+N^+ 组生存期为 59.8 个月 (SE 5.7; 95%CI: 48.6~70.9), T^-N^+ 组 49.4 个月 (SE 4.0; 95%CI: 41.4~57.4), T^+N^- 组 27.3 个月 (SE 9.0; 95%CI: 9.6~44.0), T^-N^- 组 10.1 个月 (SE 3.2; 95%CI: 5.9~14.3; $P<0.01$)。总体生存率 T^+N^+ 组生存期

中位数 66.8 个月 (SE 6.2; 95%CI: 54.6~79.0), T^-N^+ 组 56.4 个月 (SE 4.9; 95%CI: 47.0~66.0), T^+N^- 组 25.0 (SE 7.8; 95%CI: 9.6~40.3), T^-N^- 组 10.0 个月 (SE 2.1; 95%CI: 5.9~14.3), T^-N^- 患者 5 年无病生存率及总体生存率的显著降低 ($P<0.01$), 见图 9。



HCC 和癌旁组织中 GRHPR 均阳性表达的 T^+N^+ 组获得较高的生存率; GRHPR 均阴性表达 T^-N^- 组的患者生存率低

图 9 不同 GRHPR 分组中 HCC 患者 3 年无病生存率 (A) 和总体 (B) 生存曲线

3 讨 论

最初的研究发现, GRHPR 在 HCC 中和肝癌细胞株中表达较少或缺失。这个发现提示, GRHPR 在 HCC 中表达下降可能不仅仅是一种独立的表面现象, 于是引起了作者进一步关注。进一步发现 GRHPR 在增殖的细胞中表达下降, 并且发现 GRHPR 与 HCC 预后有关。

为了探讨 GRHPR 与 HCC 之间的联系, 首先, 通过 Western blot 检测 8 例 HCC 及相应癌旁组织中 GRHPR 表达, 发现癌组织中 GRHPR 表达低于癌旁组织, 在肝癌细胞株中也获得一致结论, HCC 细胞株 GRHPR 表达相对于正常细胞株表达少, 说明 GRHPR 在 HCC 与相邻的“正常”组织表达存在差异, 在肿瘤发生、发展中逐渐表达下降或者缺失。然后采用免疫组织化学方法检测了 120 例 HCC 患者癌及癌旁组织中 GRHPR 的表达, 同样也得到 GRHPR 在 HCC 组织中表达低于相邻癌旁组织的结论, 根据 GRHPR 在 HCC 和癌旁表达情况, 将患者主要分 4 个亚类, 分别为 T^+N^+ 、 T^+N^- 、 T^-N^+ 、 T^-N^- , 总体频数分布结果显示, 在 HCC 中, GRHPR 表达强度评分总体偏低, 然而在癌旁组织中, GRHPR 表达强度评分总体偏高。临床病理相关分析显示, 在 HCC 中, GRHPR 阳性表达与癌的分化级别, 转移与否, 癌灶大小, 乙型肝炎病毒表面抗原具有相关性, 差异有统计学意义。Ki-67 是判断肿瘤侵袭力和肿瘤预后的有效指标。进一步分析 GRHPR 表达强度评分与 Ki-67 表达强度评分呈负相关性, 说明 GRHPR 在 HCC 中与 Ki-67 不同, 而是肿瘤发展中的一个保护性因素。根据随访结果, 100 例患者中 (失访 20 例) 分 4 个亚类, 即 T^+N^+ 、 T^+N^- 、 T^-N^+ 、 T^-N^- 。从生存时间分析结果显

示: T^+N^+ 亚类获得较好的预后, 生存期中位数 59.8 个月, $SE\ 5.7$, $95\%CI: 46.6 \sim 70.9$; T^-N^+ 亚类生存期中位数 49.4 个月 ($SE\ 4.0$, $95\%CI: 41.4 \sim 57.4$); T^+N^- 亚类生存期中位数 27.3 个月 ($SE\ 9.0$, $95\%CI: 9.6 \sim 44.0$); T^-N^- 亚类生存期中位数 10.1 个月 ($SE\ 3.2$, $95\%CI: 5.9 \sim 14.3$)。总之, GRHPR 在 HCC 中缺失, 并与 HCC 致癌过程相关, 可能影响肝癌细胞生长和迁移等生物学行为。

近年研究已经证实代谢性疾病与恶性肿瘤存在共性的机制。在近几年, 随着人们生活结构改变, 代谢性疾病随之增加, 例如非酒精性肝炎、2 型糖尿病已经被证实与 HCC 致病有关^[13-15]。本结果显示, 无论 GRHPR 在癌组织中是否阳性表达, GRHPR 在癌旁组织中阳性表达都能获得较高的生存期。这就表明 GRHPR 在相对“正常”肝脏组织是十分重要的代谢酶, 并且在异常癌组织是患者预后因子之一。这些发现得到了进一步的关注, GRHPR 是一种具有两种活性的酶, 即使 HPR 活性和 DGDH 活性。并且, 两种活性维持平衡状态。因为 GRHPR 将乙醛酸还原为羟乙酸盐酶活性异常是导致 2 型高尿酸血症的原因。那么, HCC 发生、发展可能与 2 型原发性高尿酸血症一样是因为 GRHPR 的 HPR 活性异常, 也可能 GRHPR 的 D-甘油酸脱氢酶活性发生改变参与肝癌进展中。由于目前本研究是回溯性的研究, 有关肝癌发生与代谢性疾病相关的机制有待将来进一步探讨。

综上所述, 本文是初步研究 GRHPR 在 HCC 中的作用, GRHPR 在癌组织中的表达减少, 在 HCC 细胞株中表达量相对正常细胞株表达减少, 提示 GRHPR 在 HCC 中的表达与“正常”组织具有差异性, 提示 GRHPR 对 HCC 可能具有诊断价值。分析 GRHPR 与核增殖指标相关性发现 GRHPR 与肿瘤的恶性程度和增殖活性呈负相关, 提示 GRHPR 是肝癌的发生、发展的保护性因素。

参考文献

- [1] GHOURI Y A, MIAN I, ROWE J H. Review of hepatocellular carcinoma: epidemiology, etiology, and carcinogenesis[J]. *J Carcinog*, 2017, 16(1): 1.
- [2] OLIVEIRA C P, STEFANO J T, CARRILHO F J. Clinical patterns of hepatocellular carcinoma (HCC) in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): a multicenter prospective study[J]. *Hepatobiliary Surg Nutr*, 2017, 6(5): 350-352.
- [3] MA C, ZHANG Q, GRETEN T F. Non-alcoholic fatty liver disease promotes hepatocellular carcinoma through direct and indirect effects on hepatocytes[J]. *FEBS J*, 2017, 8(12): 14209-14232.
- [4] TANG A N, HALLOUCH O, CHERNYAK V, et al. Epidemiology of hepatocellular carcinoma: target population

- for surveillance and diagnosis[J]. *Abdominal Radiology (New York)*, 2017, 13(4): 1-13.
- [5] OZAKYOL A. Global epidemiology of hepatocellular carcinoma (HCC epidemiology)[J]. *J Gastrointest Cancer*, 2017, 48(3): 238-240.
- [6] LABENZ C, PRENOSIL V, KOCH S, et al. Impact of individual components of the metabolic syndrome on the outcome of patients with advanced hepatocellular carcinoma treated with sorafenib[J]. *Dig Dis*, 2018, 36(1): 78-88.
- [7] LASSALLE L, ENGILBERGE S, MADERN D, et al. New insights into the mechanism of substrates trafficking in glyoxylate/hydroxypyruvate reductases[J]. *Sci Rep*, 2016, 6(51): 20629.
- [8] SUBRAMANIAN V S, NABOKINA S M, PATTON J R, et al. Glyoxalate reductase/hydroxypyruvate reductase interacts with the sodium-dependent vitamin C transporter-1 to regulate cellular vitamin C homeostasis[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2013, 304(12): G1079-G1086.
- [9] ZONG C Y, NIE X K, ZHANG D M, et al. Up regulation of glyoxylate reductase/hydroxypyruvate reductase (GRHPR) is associated with intestinal epithelial cells apoptosis in TNBS-induced experimental colitis[J]. *Pathol Res Pract*, 2016, 212(5): 365-371.
- [10] GENOLET R, KERSTEN S, BRAISSANT O, et al. Promoter rearrangements cause species-specific hepatic regulation of the glyoxylate reductase/hydroxypyruvate reductase gene by the peroxisome proliferator-activated receptor alpha[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(25): 24143-24152.
- [11] FAUVART M, BRAEKEN K, DANIELS R, et al. Identification of a novel glyoxylate reductase supports phylogeny-based enzymatic substrate specificity prediction[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1774(9): 1092-1098.
- [12] BOOTH M P, CONNERS R, RUMSBY G, et al. Structural basis of substrate specificity in human glyoxylate reductase/hydroxypyruvate reductase[J]. *J Mol Biol*, 2006, 360(1): 178-189.
- [13] GUTHLE M, DOLLINGER M M. Epidemiology and risk factors of hepatocellular carcinoma[J]. *Der Radiologe*, 2014, 54(7): 654-659.
- [14] MANTOVANI A, TARGHER G. Type 2 diabetes mellitus and risk of hepatocellular carcinoma: spotlight on non-alcoholic fatty liver disease[J]. *Annals of translational medicine*, 2017, 5(13): 270.
- [15] BABA H, KURANO M, NISHIDA TAKESHI, et al. Facilitatory effect of insulin treatment on hepatocellular carcinoma development in diabetes[J]. *BMC Res Notes*, 2017, 10(1): 478.