

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.01.009

kisspeptin/kiss1r 系统在复发性流产患者中的表达及意义*

张冬梅¹, 孙凤英², 蔺香云^{3△}

(滨州医学院附属医院:1. 生殖医学科;2. 麻醉科;3. 妇产科, 山东滨州 256603)

[摘要] **目的** 探究 kisspeptin/kiss1r 系统在复发性流产患者中的表达及作用机制。**方法** 选取复发性流产绒毛组织(病例组)、正常绒毛组织(对照组)进行研究,实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)、Western blot、免疫组织化学法检测 kisspeptin、kiss1r 表达。体外培养 JAR、JEG-3 细胞株并转染 kiss1r,分空白对照组、阴性转染组和 kiss1r 转染组,CCK8 法检测细胞增殖情况,平板细胞克隆实验检测菌落形成,Transwell 系统检测细胞迁移、侵袭能力,Western blot 检测基质金属蛋白酶(MMP)-2、MMP-9 表达。**结果** 与对照组比较,病例组中 kisspeptin、kiss1r 表达降低($P<0.05$)。与 kisspeptin、kiss1r 阳性表达者相比,kisspeptin、kiss1r 阴性表达者促黄体生成素(LH)升高,催乳激素(PRL)、雌二醇(E2)、孕酮(P)降低($P<0.05$)。与空白对照组、阴性转染组比较,kiss1r 转染组细胞中 kisspeptin、kiss1r 蛋白表达升高、增殖率升高,细胞菌落数量、迁移、侵袭数量及 MMP-2、MMP-9 蛋白表达均升高($P<0.05$)。**结论** kisspeptin、kiss1r 在复发性流产患者绒毛组织中呈低表达,与复发性流产有关。

[关键词] kisspeptin;kiss1r;流产,习惯性;作用机制
[中图分类号] R711.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2019)01-0035-05

Expression and significance of kisspeptin/kiss1r system in patients with recurrent abortion*

ZHANG Dongmei¹, SUN Fengying², LIN Xiangyun^{3△}

(1. Department of Reproductive Medicine; 2. Department of Anesthesiology; 3. Department of Gynaecology and Obstetrics, the Affiliated Hospital of Binzhou Medical College, Binzhou, Shandong 256603, China)

[Abstract] **Objective** To explore the expression and mechanism of kisspeptin/kiss1r system in patients with recurrent spontaneous abortion. **Methods** Villus tissues from patients with recurrent abortion (the case group) and normal people (the control group) were studied. Real time quantitative PCR (RT-qPCR), Western blot and immunohistochemistry were used to detect the expression of kisspeptin and kiss1r. JAR, JEG-3 cell lines were cultured in vitro and kiss1r was transfected. They were divided into the control group and the negative transfection group and the kiss1r transfected group CCK8 assay was used to detect cell proliferation. Plate cell clone test was used to detect colony formation. Transwell was used to detect cell migration and invasion. Western blot was used to detect matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 expression. **Results** Compared with the control group, the expression of kisspeptin and kiss1r decreased in the case group ($P<0.05$). Compared with the positive expression of kisspeptin and kiss1r, luteinizing hormone (LH), prolactin (PRL), estradiol (E2) and progesterone (P) decreased in kisspeptin and kiss1r negative expressions ($P<0.05$). Compared with the control group and the negative transfection group, the expression of kisspeptin and kiss1r protein, proliferation rate, cell colonies, numbers of migration and invasion, expression of MMP-2 and MMP-9 all increased in the kiss1r transfected group ($P<0.05$). **Conclusion** The low expression of kisspeptin and kiss1r in villus tissues of patients with recurrent abortion is related to recurrent abortion.

[Key words] kisspeptin;kiss1r;abortion,habitual;pharmacological action

复发性流产发病率占妊娠总数的 1%~3%,研究显示遗传、内分泌异常、感染、自身抗体、凝血机制等均与其发生有关,但仍有 50% 患者病因不明确^[1]。kisspeptin 受体 kiss1r 属于肿瘤转移、侵袭因子,在乳腺癌、黑色素瘤中研究显示其表达与肿瘤细胞的转移能力呈负相关^[2-3]。近期研究显示 kiss1r 与胎盘滋养

* 基金项目:山东省医药卫生科技发展计划重点项目(2015WS0481)。 作者简介:张冬梅(1968—),主任医师,硕士,主要从事生殖医学研究。 △ 通信作者,E-mail:linxiangyun68@sina.com。

细胞浸润异常及胎盘功能不良有关,在不良妊娠者血清中呈低表达^[4]。基于以上研究推测其还可能与复发性流产的发生有关。本研究通过检测复发性流产病例绒毛组织中 kisspeptin、kiss1r 的表达,并在体外进行验证,探究复发性流产可能的病理机制,为临床治疗提供一定的参考,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2015 年 4 月至 2017 年 5 月在本院进行治疗的复发性流产患者 46 例进行研究(病例组),年龄 20~35 岁,平均(27.54±4.18)岁,另选取 20 例人工流产患者作为对照组,年龄 22~36 岁,平均(28.13±3.66)岁,所纳入对象均月经规律、知情同意,无慢性病史、生殖道畸形、染色体异常、感染、妊娠内分泌相关疾病,未近期服用激素药物等。

1.2 方法

1.2.1 标本来源 患者入院时采集静脉血 3 mL,保存于-20℃以备后续使用。患者经刮宫术取出的妊娠组织在生理盐水中漂洗后,分离新鲜绒毛组织,一部分置于-80℃中保存,一部分置于 4%多聚甲醛溶液中。JAR、JEG-3 绒癌细胞购自中国科学院上海细胞生物研究所,置于含 10%胎牛血清的 RPMI-1640 培养基,放置在 37℃、5% CO₂ 培养箱中进行培养。

1.2.2 实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)法 采用 RNA 试剂盒提取绒毛组织 RNA,并反转录为 cDNA。RT-qPCR 反应体系为 20.0 μL:SYBR Premix 10.0 μL,cDNA 1.0 μL,H₂O 8.0 μL,上下游引物各 0.5 μL。反应程序:95℃ 30 s,95℃ 15 s,72℃ 15 s,共循环 40 次。以 GADPH 作为内参计算 kisspeptin、kiss1r mRNA 相对表达水平。

1.2.3 Western blot 法 收集细胞培养液,离心后添加裂解液反应 30 min,提取细胞总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,参考文献^[5]进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳、转膜反应,结束后置于凝胶成像仪中观察蛋白表达情况。

1.2.4 免疫组织化学法 常规制备绒毛组织切片(4 μm),用二甲苯脱蜡,参考文献^[6]进行免疫组织化学染色,置于显微镜下进行观察。每张切片挑选 10 个视野,计算阳性染色细胞数比例。

1.2.5 血清中性激素相关指标检测 采用酶联免疫法检测血清中促卵泡生成激素(follicle-stimulating hormone,FSH)、促黄体生成激素(leuteinizing hormone,LH)、雌二醇(estriol,E2)、催乳素(prolactin,PRL)及孕酮(progesterone,P)水平。

1.2.6 细胞转染 构建重组质粒 pcDNA3.1-kiss1r,取对数期细胞,细胞饥饿培养 1 h,参照试剂盒分别转染 JAR、JEG-3 细胞,分为空白对照组、阴性转染组、kiss1r 转染组,转染后培养 48 h,随后收集细胞上清

液,进行后续测定。

1.2.7 细胞增殖测定 收集转染后细胞,添加至 96 孔培养板,调整细胞密度为 5×10⁴/孔,分别继续培养 12、24、48、72 h,弃上清液,向孔内加入 20 μL CCK-8 溶液,继续培养 4 h 后,在酶标仪中检测 460 nm 处吸光度值。

1.2.8 平板细胞克隆形成实验检测克隆形成 将转染后培养 48 h 的细胞接种在 96 孔板中孵育 24 h 后,磷酸缓冲盐溶液(PBS)清洗细胞 3 次,加入 4%甲醛溶液(甲硫醇:冰乙酸=7:1)固定 15 min,于 37℃、5% CO₂ 细胞培养箱内培养 14 d。用固定剂固定 15 min 后,用含 0.1% Gimsa 溶液染色 30 min 后,干燥后拍照计数克隆形成个数。

1.2.9 Transwell 实验检测细胞迁移能力 转染后细胞饥饿培养 24 h 后,在 Transwell 上室加入 300 μL 细胞悬液,下室加入 500 μL 含胎牛血清培养液,培养 24 h 后,保留室内下层细胞,清理未迁移细胞,加入结晶紫染液染色 15 min,在显微镜下进行计数。

1.2.10 Transwell 实验检测细胞侵袭能力 用 50 mg/L Matrigel 1:8 稀释液 60~80 μL 包被 Transwell 小室聚碳酸酯膜的上室面,置于 37℃使其风干呈凝胶状态。细胞转染正常培养后,后续操作同迁移实验。

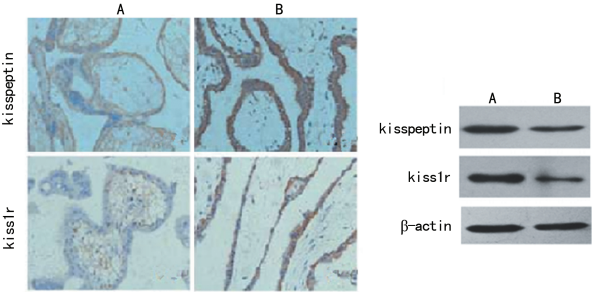
1.2.11 转染后细胞中基质金属蛋白酶(MMP)-2、MMP-9 蛋白表达 细胞转染后继续培养 48 h,收集转染后细胞,参照方法 1.2.3 进行蛋白检测。

1.3 统计学处理 采用 SPSS21.0 软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,比较采用 *t* 检验或方差分析,以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 所有对象组织中 kisspeptin、kiss1r 表达 与对照组比较,病例组中 kisspeptin、kiss1r 表达均降低,差异有统计学意义(*P*<0.05),见图 1、表 1。

2.2 kisspeptin、kiss1r 表达与患者性激素水平关系 与 kisspeptin、kiss1r 阳性表达者比较,kisspeptin、kiss1r 阴性表达者 LH 水平升高,PRL、E2、P 水平降低,差异有统计学意义(*P*<0.05),见表 2。



A:对照组;B:病例组

图 1 kisspeptin、kiss1r 表达表达情况(×200)

表 1 绒毛组织中 kisspeptin、kiss1r 表达比较

组别	mRNA($\bar{x}\pm s$)		蛋白($\bar{x}\pm s$)		阳性率[n(%)]	
	kisspeptin	kiss1r	kisspeptin	kiss1r	kisspeptin	kiss1r
对照组	0.72±0.04	0.84±0.06	0.93±0.08	1.12±0.03	19(95.00)	15(75.00)
病例组	0.33±0.05 ^a	0.37±0.03 ^a	0.45±0.09 ^a	0.41±0.04 ^a	16(34.78) ^a	14(30.43) ^a

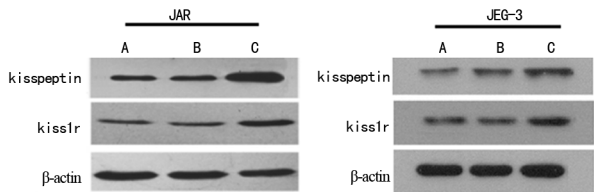
^a: $P<0.05$,与对照组比较

表 2 kisspeptin、kiss1r 表达与患者性激素水平关系($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	FSH(U/L)	LH(U/L)	PRL(ng/mL)	E2(pg/mL)	P(ng/mL)
kisspeptin 阳性表达	16	6.55±1.16	4.25±1.16	16.79±3.44	62.48±12.44	13.65±3.78
kisspeptin 阴性表达	30	6.73±1.09	5.57±1.32 ^a	13.28±3.51 ^a	43.15±7.69 ^a	8.96±2.63 ^a
kiss1r 阳性表达	14	6.44±1.68	4.35±1.08	16.88±3.43	63.75±11.74	12.83±3.62
kiss1r 阴性表达	32	6.69±1.37	5.62±1.09 ^b	13.36±3.78 ^b	44.76±8.13 ^b	8.28±2.54 ^b

^a: $P<0.05$,与 kisspeptin 阳性表达比较;^b: $P<0.05$,与 kiss1r 阳性表达比较

2.3 细胞中 kisspeptin/kiss1r 表达 与空白对照组、阴性转染组比较,kiss1r 转染组细胞中 kisspeptin、kiss1r 蛋白表达水平均升高($P<0.05$),见图 2、表 3。



A:空白对照组;B:阴性转染组;C:kiss1r 转染组

图 2 细胞 kisspeptin、kiss1r 蛋白表达

2.4 细胞增殖情况 随着细胞培养时间延长,kiss1r 转染组细胞增殖率逐渐升高,在同一时间点,与空白对照组、阴性转染组比较,kiss1r 转染组增殖率均升高,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 4。

表 3 转染后 kisspeptin、kiss1r 表达情况

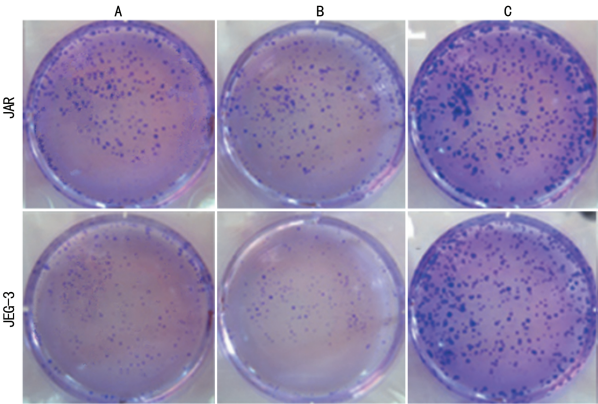
组别	JAR		JEG	
	kisspeptin	kiss1r	kisspeptin	kiss1r
空白对照组	0.33±0.04	0.13±0.02	0.23±0.03	0.25±0.04
阴性转染组	0.36±0.05	0.15±0.04	0.26±0.04	0.27±0.03
kiss1r 转染组	1.08±0.26 ^{ab}	0.66±0.12 ^{ab}	0.88±0.13 ^{ab}	0.74±0.09 ^{ab}

^a: $P<0.05$,与空白对照组比较;^b: $P<0.05$,与阴性转染组比较

表 4 转染后 JAR、JEG-3 细胞增殖率比较($\bar{x}\pm s$,%)

组别	JAR				JEG-3			
	12 h	24 h	48 h	72 h	12 h	24 h	48 h	72 h
空白对照组	16.56±0.87	23.19±0.79	33.23±0.88	40.31±0.71	15.18±0.64	26.42±0.34	33.67±0.51	42.78±0.46
阴性转染组	16.57±0.92	23.26±0.89	33.25±1.02	40.29±0.84	15.17±0.56	26.58±0.77	33.63±0.68	42.01±0.49
kiss1r 转染组	28.74±2.37 ^{ab}	40.54±3.85 ^{ab}	52.57±5.86 ^{ab}	68.18±7.15 ^{ab}	27.23±2.36 ^{ab}	38.96±4.49 ^{ab}	49.86±5.06 ^{ab}	63.29±5.28 ^{ab}

^a: $P<0.05$,与空白对照组比较;^b: $P<0.05$,与阴性转染组比较



A:空白对照组;B:阴性转染组;C:kiss1r 转染组

图 3 细胞菌落形成情况

2.5 细胞克隆形成情况 与空白对照组、阴性转染

组比较,kiss1r 转染组细胞菌落数量均升高,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 3、表 5。

表 5 细胞菌落数量比较($\bar{x}\pm s$,个)

组别	JAR	JEG-3
空白对照组	32.44±3.58	25.53±4.79
阴性转染组	36.53±5.16	23.41±5.67
kiss1r 转染组	94.68±11.78 ^{ab}	95.72±5.44 ^{ab}

^a: $P<0.05$,与空白对照组比较;^b: $P<0.05$,与阴性转染组比较

2.6 细胞迁移、侵袭情况比较 与空白对照组、阴性转染组比较,kiss1r 转染组细胞迁移、侵袭数量均升高,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 4、表 6。

2.7 细胞中 MMP-2、MMP-9 的表达 与空白对照组、阴性转染组相比,kiss1r 转染组细胞中 MMP-2、

MMP-9 蛋白表达均升高,差异有统计学意义 ($P<0.05$),见图 5、表 7。

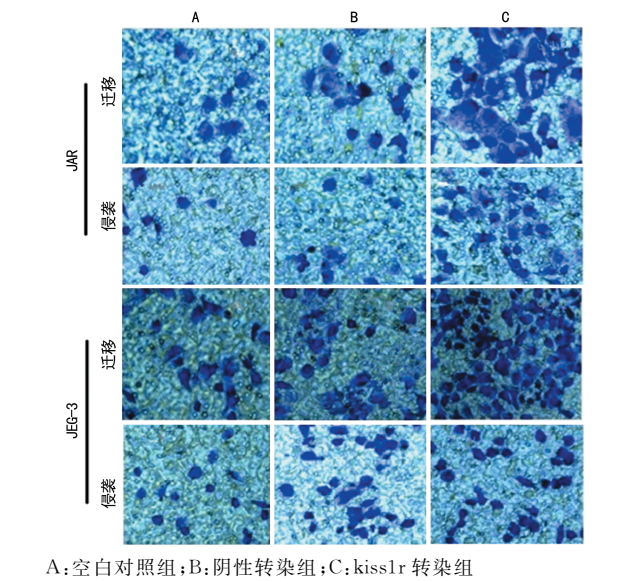


图 4 细胞迁移、侵袭能力比较

组别	JAR		JEG-3	
	迁移	侵袭	迁移	侵袭
	细胞数量	细胞数量	细胞数量	细胞数量
空白对照组	11.39±2.62	12.62±2.79	23.62±2.67	13.52±2.76
阴性转染组	13.78±2.57	11.57±2.28	26.51±2.33	12.76±2.79
kiss1r 转染组	69.63±8.16 ^{ab}	61.65±8.46 ^{ab}	83.58±8.14 ^{ab}	41.32±6.68 ^{ab}

^a: $P<0.05$,与空白对照组比较; ^b: $P<0.05$,与阴性转染组比较

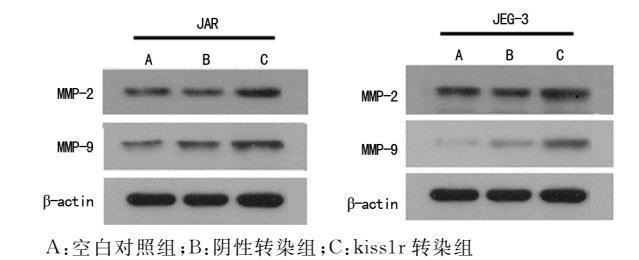


图 5 细胞中 MMP-2、MMP-9 蛋白的表达

组别	JAR		JEG-3	
	MMP-2	MMP-9	MMP-2	MMP-9
	表达情况	表达情况	表达情况	表达情况
空白对照组	0.32±0.04	0.23±0.02	0.33±0.03	0.11±0.02
阴性转染组	0.34±0.05	0.25±0.04	0.30±0.04	0.13±0.03
kiss1r 转染组	0.75±0.03 ^{ab}	0.76±0.12 ^{ab}	0.78±0.13 ^{ab}	0.40±0.04 ^{ab}

^a: $P<0.05$,与空白对照组比较; ^b: $P<0.05$,与阴性转染组比较

3 讨 论

kisspeptin 及其受体 kiss1r 与肿瘤的侵袭、迁移密切相关^[5]。kisspeptin 及其受体 kiss1r 的缺失可导致低促性腺激素功能减退,使生殖功能调控发生紊乱^[7-8]。本研究显示复发性流产患者绒毛组织 kisspeptin、kiss1r 表达均低于对照组,与以往结果相

符^[9],提示 kisspeptin、kiss1r 可能与复发性流产有关。ZABETIAN 等^[10]通过对复发性流产患者滋养层细胞中 kisspeptin 进行检测,结果显示其水平明显低于正常妊娠者。子痫前期、胎儿受限血清 kisspeptin 水平均低于正常妊娠者^[11],推测 kisspeptin 水平异常与胎盘功能不良相关,结合以往研究推测低水平 kisspeptin、kiss1r 与复发性流产有关。

本研究显示,kisspeptin、kiss1r 阴性表达者 LH 水平升高,PRL、E2 及 P 水平降低,表明 kisspeptin、kiss1r 表达与性激素水平有关。PRL 为早期妊娠启动的主要激素,其水平的降低预示着排卵障碍、先兆性流产^[12]。此外 PRL 降低至 5 ng/mL 以下则导致流产、胎儿死亡^[13]。PRL 水平降低影响卵巢功能,因此 E2 水平降低,而血清中 LH 水平升高,其原因可能与 PRL、E2 及 P 对垂体的反馈调控有关。以上结果提示 kisspeptin、kiss1r 表达异常可能会导致患者性激素水平的异常。

滋养细胞成功浸润到子宫组织并顺利着床在妊娠过程中十分重要,这一过程涉及细胞迁移、侵袭,与肿瘤的转移、侵袭相似。有研究显示滋养细胞侵袭能力降低会导致不良妊娠的发生^[14-15]。本研究显示 kiss1r 转染组细胞菌落数量、细胞迁移、侵袭数量均升高,说明 kiss1r 与绒毛细胞的侵袭、迁移密切相关。MMP-2、MMP-9 可完全降解胞外基质,促进滋养细胞的迁移、浸润,是调控滋养细胞侵袭能力的重要因子。吕珊珊等^[16]研究显示 MMP-9 在妊娠 7~11 周达到高峰,说明 MMP-9 水平可能与滋养细胞侵袭能力有关。JIANG 等^[17]建立 MMP-9 缺失型小鼠模型发现小鼠先兆性流产率较高。本研究显示 kiss1r 转染组 MMP-2、MMP-9 表达降低,提示 MMP-2、MMP-9 可影响滋养细胞浸润,进一步提示 kiss1r 基因可能通过影响 MMP-2、MMP-9 促侵袭基因的表达,使滋养细胞侵袭能力出现异常调控,导致复发性流产。

综上所述,kisspeptin、kiss1r 在复发性流产患者绒毛组织中呈低表达,促进绒毛的增殖、侵袭、转移,与复发性流产有关,但其具体作用机制至今尚未阐明,因此 kisspeptin、kiss1r 在复发性流产中的作用机制还有待深入研究。

参考文献

[1] 肖世金,赵爱民.复发性流产病因学研究进展[J].中国实用妇科与产科杂志,2014,30(1):41-45.
[2] 董慧明,黄健康,龚晓萌,等. MACC1、Snail 和 KISS-1 蛋白在浸润性乳腺癌中的表达及其临床病理意义[J].四川大学学报(医学版),2016,47(5):732-737.
[3] 李素娟,龚凤英,朱惠娟. Kisspeptin/Kiss1R 在机体能量代谢调节中的作用及其机制的研究进展[J].医学综述,2015,21(21):3847-3850.

[4] 周庆菊,杨利,赵红燕,等. KISS1R 基因突变所致的一个特发性低促性腺激素性性腺功能减退症家系分析[J]. 重庆医科大学学报,2016,46(11):1113-1116.

[5] 骆倩倩,张冬梅,蔺香云,等. Kisspeptin/kisslr 系统在多囊卵巢综合征大鼠卵巢中的表达及其对卵泡发育障碍的可能作用机制[J]. 解剖学杂志,2016,39(2):156-160.

[6] 寇连翠,骆倩倩,时彦,等. 卵巢黄体表达的 kisspeptin/kisslr 系统在自然流产大鼠发病中的作用[J]. 滨州医学院学报,2016,39(6):401-403.

[7] 臧盛兵,刘景丰,王斌,等. KiSS-1、KiSS-1R 及 MMP-9 表达与肝细胞癌侵袭转移的关系及意义[J]. 中华肝胆外科杂志,2011,17(3):223-227.

[8] 周庆菊. KISS1R 基因突变所致的一个 IHH 家系分析[D]. 重庆:重庆医科大学,2016.

[9] WU S H,ZHANG H,TIAN J W,et al. Expression of kisspeptin/GPR54 and PIBF/PR in the first trimester trophoblast and decidua of women with recurrent spontaneous abortion[J]. Pathol Res Pract,2014,210(1):47-54.

[10] ZABETIAN H,AHMADI-VASMEHJANI A,HAKIM ELAHI H,et al. Serum level of Kisspeptin in pregnant women with preeclampsia[J]. Biosci Biotechnol Res Asia,2016,13(3):1697-1701.

[11] ZIYARAA M A,HAMDAN F B,MOUSA L R. Correlation of kisspeptin-10 level and fetal well-being in pre-eclamptic patients[J]. Taiwan J Obstet Gynecol,2016,55(6):840-846.

[12] 王雅琪,刘蕊洁,刘旭光,等. 益肾安胎汤对早期先兆流产患者血清孕酮、 β -HCG 和 PRL 的影响[J]. 解放军医药杂志,2017,29(9):9-12.

[13] 戴芳芳,张丽晓,郑波,等. 控制性超促排卵中溢乳症的临床处理分析[J]. 中国计划生育和妇产科,2014,6(8):49-51.

[14] 杨微,张丹凤,李梅秀,等. 肿瘤转移抑制基因 KAI1/CD82 及骨桥蛋白 OPN 在妊娠滋养细胞疾病中的表达[J]. 黑龙江医药科学,2015,38(6):63-64.

[15] 辛虹,郑丽丽,王惠兰. Annexin V 在低氧滋养细胞中的表达下调[J]. 基础医学与临床,2011,31(12):1383-1386.

[16] 吕珊珊,候莉莉. 黄芩素对绒毛滋养细胞侵袭的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,40(21):127-131.

[17] JIANG G L,QI Y X. Detection of MMP-9 and TIMP-3 mRNA expression in the villi of patients undergoing early spontaneous abortion;a report of 30 cases[J]. Exp Ther Med,2015,9(5):1939-1943.

(收稿日期:2018-05-30 修回日期:2018-08-29)

(上接第 34 页)

[J]. Pediatr Diabetes,2017,19(3):457-463.

[2] IRANI M,SEIFER D B,GRAZI R V,et al. Vitamin D decreases serum VEGF correlating with clinical improvement in vitamin D-deficient women with PCOS;a randomized placebo-controlled trial[J]. Nutrients,2017,9(4):334.

[3] JY B,KIM J W,KIM I. Low-dose 1,25-dihydroxyvitamin D₃ combined with arsenic trioxide synergistically inhibits proliferation of acute myeloid leukemia cells by promoting apoptosis[J]. Oncol Rep,2013,30(1):485-491.

[4] YOUSEF F M,JACOBS E T,KANG P T,et al. Vitamin D status and breast cancer in Saudi Arabian women;case-control study. [J]. Am J Clin Nutr,2013,98(1):105-110.

[5] LIU H D,LI W,YU X F,et al. EZH2-mediated Puma gene repression regulates non-small cell lung cancer cell proliferation and cisplatin-induced apoptosis[J]. Oncotarget,2016,7(35):56338-56354.

[6] ZHENG X D,LV J Q,SHEN Q,et al. Synergistic effect of pyrrolidine dithiocarbamate and cisplatin in human cervical carcinoma[J]. Reprod Sci,2014,21(10):1319-1325.

[7] 李小峰,张亚华. 顺铂联合吉西他滨与联合紫杉醇治疗晚期非小细胞肺癌疗效分析[J]. 现代肿瘤医学,2014,22(5):1087-1089.

[8] 王宝强,周陈华. 紫杉醇联合顺铂同步放化疗治疗局部晚期非小细胞肺癌的临床疗效及安全性评价[J]. 中国临床药理学杂志,2015,31(8):603-605.

[9] POURGHOLAMI M H,AKHTER J,LU Y,et al. In vitro and in vivo inhibition of liver cancer cells by 1,25-dihydroxyvitamin D₃[J]. Cancer Lett,2000,151(1):97-102.

[10] CAPUTO A,POURGHOLAMI M H,AKHTER J,et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ induced cell cycle arrest in the human primary liver cancer cell line HepG2[J]. Hepatol Res,2003,26(1):34-39.

[11] 余晓燕,陆启光,姚杨伟. 维生素 D 和维生素 D 结合蛋白在非小细胞肺癌患者中的表达及其对预后的影响[J]. 浙江医学,2015,37(8):619-621,643.

[12] SABZICHI M,MOHAMMADIAN J,MOHAMMADI M,et al. Vitamin D-loaded nanostructured lipid carrier (NLC): a new strategy for enhancing efficacy of doxorubicin in breast cancer treatment[J]. Nutr Cancer,2017,69(6):840-848.

(收稿日期:2018-05-28 修回日期:2018-08-21)