

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2016.08.009

• 临床研究 •

肝细胞癌中ChREBP基因CpG岛甲基化与mRNA表达的相关性

冉凤鸣¹, 罗成刚^{2*}, 邱雪平³, 黄一芳³, 郑芳³, 魏少忠⁴

Correlation of ChREBP mRNA Expression and Its CpG Island Methylation in Human Hepatocellular Carcinoma

RAN Fengming¹, LUO Chenggang^{2*}, QIU Xueping³, HUANG Yifang³, ZHENG Fang³, WEI Shaozhong⁴ (*: Contributed Equally as the First Author)

1. Department of Internal Oncology, Hubei Cancer Hospital, Wuhan 430079, China; 2. Department of Radiology, Hubei Cancer Hospital, Wuhan 430079, China; 3. Center for Gene Diagnosis, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, China; 4. Department of Gastrointestinal Surgery, Hubei Cancer Hospital, Wuhan 430079, China

Corresponding Author: WEI Shaozhong, E-mail: weishaozhong@126.com



Abstract: Objective To detect the expression of *ChREBP* mRNA and its CpG island methylation in human hepatocellular carcinoma tissues and investigate their correlation. **Methods** Bisulfite Genomic sequencing was used to analyze the methylation level of 29 CpG sites in CpG island of *ChREBP* in 45 paired hepatocellular carcinoma and adjacent non-tumor tissues. The expression of *ChREBP* mRNA was detected in 31 paired hepatocellular carcinoma and adjacent non-tumor tissues using quantitative real-time PCR, meanwhile, the relationship between the level of methylation status and mRNA expression was analyzed. **Results** The methylation level of some CpG sites (5, 6, 7, 14) were significantly lower in hepatocellular carcinoma tissues than those in the adjacent non-tumor tissues ($P < 0.05$). There was no statistical significant difference in the methylation level of other CpG sites between hepatocellular carcinoma tissues and adjacent non-tumor tissues (all $P > 0.05$). The methylation level of *ChREBP* at CpG 15, 18, 20, 23, 26 and 29 tended to be higher in patients with older age (≥ 50 years) than those in younger age (< 50 years) (all $P < 0.05$). The mRNA expression of *ChREBP* in hepatocellular carcinoma tissues was lower than that in adjacent non-tumor tissues ($P = 0.003$), however, no significant relationship was observed between DNA methylation and the mRNA expression of *ChREBP* in hepatocellular carcinoma tissues ($P > 0.05$). **Conclusion** There was a down-regulated expression of *ChREBP* in hepatocellular carcinoma tissues, which could not be mediated by DNA methylation.

Key words: Hepatocellular carcinoma; DNA methylation; *ChREBP*; mRNA expression

摘要: **目的** 检测肝细胞癌中*ChREBP*基因CpG岛甲基化水平及mRNA表达水平,并探讨两者的相关性。**方法** 收集肝细胞癌及癌旁冰冻组织90例,采用亚硫酸氢钠处理结合克隆测序检测*ChREBP*基因CpG岛内29个CpG位点的甲基化水平;采用荧光定量PCR检测其中31对新鲜冰冻组织中*ChREBP*基因mRNA表达水平,分析甲基化水平与mRNA表达之间的关系。**结果** *ChREBP*基因的5、6、7、14号CpG位点甲基化水平在肝细胞癌中显著低于其配对的癌旁组织($P < 0.05$)。其余CpG位点及整体甲基化在肝细胞癌与癌旁组织中差异无统计学意义(均 $P > 0.05$)。15、18、20、23、26、29号CpG位点在 ≥ 50 岁年龄组的甲基化水平均高于 < 50 岁年龄组(均 $P < 0.05$)。肝细胞癌中*ChREBP*基因mRNA表达水平

低于癌旁组织($P = 0.003$),但与甲基化无显著相关性($P > 0.05$)。**结论** 肝细胞癌中*ChREBP*基因mRNA表达水平低于癌旁组织,但这一改变可能不是通过影响DNA的甲基化水平实现的。

关键词: 肝细胞癌; DNA甲基化; *ChREBP*; mRNA表达

中图分类号: R735.7

文献标识码: A

收稿日期: 2016-02-16; 修回日期: 2016-05-05

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973计划)(2012CB720605)

作者单位: 1. 430079 武汉,湖北省肿瘤医院肿瘤内科; 2. 430079 武汉,湖北省肿瘤医院放射科; 3. 430071 武汉,武汉大学中南医院基因诊断中心; 4. 430079 武汉,湖北省肿瘤医院胃肠外科

通信作者: 魏少忠, E-mail: weishaozhong@126.com

作者简介: 冉凤鸣(1972-),女,硕士,副主任医师,主要从事肿瘤内科治疗及基础研究;罗成刚(1972-),男,硕士,副主任医师,主要从事肿瘤的辅助治疗研究(*: 并列第一作者)

0 引言

碳水化合物反应元件结合蛋白 (carbohydrate response element binding protein, ChREBP) 在葡萄糖介导的基因转录调控机制中发挥重要作用, 并参与调节哺乳动物体内糖脂代谢以及组织脂肪沉积等。最近研究表明, *ChREBP* 可能在肿瘤发生相关的病理机制中起到了一定的作用。Tong等^[1]发现抑制结直肠癌和肝癌细胞系中*ChREBP*的表达, 细胞增殖受到了严重影响, 有氧糖酵解减少, 而且会诱导p53活化和细胞周期停滞。另外在研究肝癌细胞系HepG2中*ChREBP*靶基因表达时发现这些靶基因与肿瘤代谢及恶性进展相关的通路密切相关^[2]。而且肿瘤细胞都摄入大量葡萄糖, 并进行有氧糖酵解为细胞供能^[3]。

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是发病率、死亡率最高的恶性肿瘤之一^[4]。越来越多的研究表明DNA甲基化在肝细胞癌的发生发展中起到了至关重要的作用^[5]。本研究拟采用重亚硫酸盐克隆测序和荧光定量PCR检测原发性肝细胞癌及癌旁组织中*ChREBP* CpG岛甲基化状态及mRNA表达水平, 分析两者的关系, 以期揭示原发性肝细胞癌中*ChREBP* mRNA的表达水平与CpG岛甲基化的关系。

1 资料与方法

1.1 资料

1.1.1 临床资料 收集武汉大学中南医院肝细胞癌患者手术切除的肝癌及配对癌旁组织90例 (45对)。所有癌组织均经病理证实为原发性肝细胞癌, 癌旁组织距肿瘤边缘≥2 cm并确保肉眼及镜下均无瘤。组织样本于取材后立即置于-80℃冰箱冻存。所有标本取材均通过中南医院伦理委员会审核, 并经家属知情同意, 术前均未行放疗。所有患者的临床病理资料见表1。

1.1.2 主要试剂 Trizol试剂盒 (美国Invitrogen公司)、第一链cDNA合成试剂盒 (美国Fermentas公司)、ABI SYBR Green PCR Master Mix (美国ABI公司)、NaHCO₃ (美国Sigma公司)、Wizard™ DNA clean-up system (美国Promega公司)、糖原 (上海碧云天科技有限公司)、Tris饱和酚 (上海普博欣公司)、蛋白酶K (美国Sigma公司)、RNaseA (美国Fermentas公司)、胶回收试剂盒 (杭州爱思进公司)、pMD18-T vector (大连TaKaRa公司)、Taq酶 (美国Fermentas公司)。本实验所用引物全部由武汉擎科生物公司合成。

表1 肝细胞癌患者临床病理资料 (n=45)

Table1 Clinicopathological characteristics of patients with HCC (n=45)

Characteristics	n(%)
Age(years)	
<50	20(44.44%)
≥50	25(55.56%)
$\bar{x} \pm s$	51.84±9.45
Gender	
Male	42(93.33%)
Female	3(6.67%)
HBsAg	
HBsAg(+)	38(84.44%)
HBsAg(-)	7(15.56%)
Serum AFP (ng/ml)	
Negative(<200)	23(51.11%)
Positive(≥200)	22(48.89%)
Size of tumor(cm)	
<5.0	13(28.89%)
≥5.0	32(71.11%)
Number of tumor(n)	
Single	35(77.78%)
Multiple	10(22.22%)
TNM stage	
I	30(66.67%)
II	4(8.89%)
III	11(24.44%)
IV	0(0.00%)
Differentiation(Edmondson)	
I	3(6.67%)
II	41(91.11%)
III	1(2.22%)
IV	0(0.00%)

Notes: HCC: hepatocellular carcinoma; HBsAg: hepatitis B surface antigen; AFP: alpha-fetoprotein; TNM: tumor-node-metastasis

1.2 方法

1.2.1 BSP克隆测序检测*ChREBP*基因CpG岛甲基化状态 采用经典的蛋白酶K-酚/氯仿法抽提基因组DNA。所有DNA样本置于-20℃保存。采用中南医院基因诊断中心实验室前期已经建立的方法学^[6]对基因组DNA进行亚硫酸氢钠处理及巢氏PCR扩增。PCR产物经切胶纯化后与pMD18-T连接、克隆。每个样本随机挑取10个阳性克隆, 提取质粒测序。甲基化水平采用如下公式计算: 甲基化水平 (%) = 甲基化CG数目 / (甲基化CG数目 + 未甲基化CG数目) × 100%。

1.2.2 荧光定量PCR检测*ChREBP*基因mRNA表达水平 Trizol法提取31对癌与癌旁组织的总RNA。取1 μg RNA, 采用Fermentas公司第一链cDNA合成试剂盒进行反转录, 所有cDNA置于-20℃冰箱保存。取2 μl cDNA样本作为模板, 按照ABI SYBR Green PCR Master Mix使用说明进行荧光定量PCR, 目的基因及内参基因mRNA引物见表2。PCR扩增条件为: 95℃ 5 min预变性; 95℃ 15 s, 60℃

30 s, 72°C 45 s, 共45个循环。为保证PCR产物的特异性,于扩增结束后进行熔解曲线分析。每个样本设3个复孔,并以β-actin为内参基因;采用 $2^{-\Delta Cq}$ 方法计算ChREBP mRNA的相对表达量。

表2 荧光定量PCR引物列表

Table2 Primers used for quantitative real-time PCR

Primer	Sequences (5'-3')	Product (bp)	Tm (°C)
ChREBP- mRNA	F: CGCCTGAACAACGCCATCT	183	60
ChREBP- mRNA	R: GTATTCCCGCATCACCACCTC		
β-actin- mRNA	F: CGAAACTACCTTCAACTCCATCA	272	60
β-actin- mRNA	R: CGGACTCGTCATACTCCTGCT		

Notes: F: Forward; R: Reverse

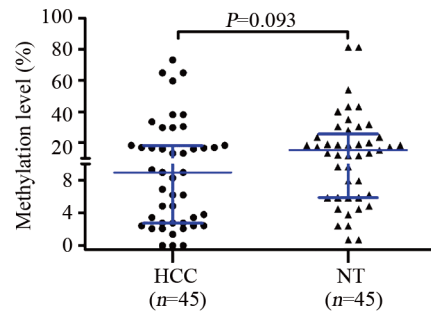
1.3 统计学方法

所有数据采用SPSS16.0软件进行分析。两组之间采用Mann-Whitney U检验或者配对样本Wilcoxon检验,不同变量之间的相关分析采用Spearman秩相关检验进行。所有统计均采用双侧检验, $P < 0.05$ 作为假设检验具有统计学差异的标准。

2 结果

2.1 肝细胞癌及癌旁组织中ChREBP基因CpG岛甲基化分析

BSP克隆测序分析发现ChREBP基因CpG岛的整体甲基化水平在肝细胞癌组织[8.96% (2.76%~18.28%)]中低于其配对的癌旁组织[15.17% (5.86%~25.69%)],但两者差异无统计学意义($Z = -1.682, P = 0.093$),见图1。对所分析片段内的29个CpG位点一一进行甲基化分析,发现肝细胞癌组织中5、6、7、14号CpG位点的甲基化水平显著低于其配对的癌旁组织(均 $P < 0.05$),其余CpG位点的甲基化在两组中差异均



HCC: hepatocellular carcinoma; NT: adjacent non-tumor tissues

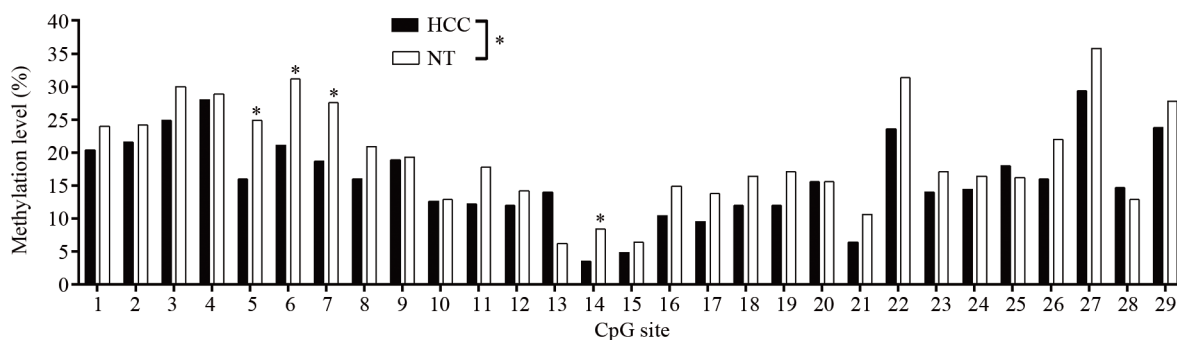
图1 重亚硫酸盐处理结合克隆测序法检测45对肝细胞癌及癌旁组织ChREBP甲基化水平

Figure1 Bisulfite Genomic sequencing analysis of ChREBP methylation levels in 45 paired HCC and adjacent non-tumor tissues

无统计学意义(均 $P > 0.05$),见图2。

2.2 ChREBP基因CpG岛甲基化水平与临床病理因素的关系

<50岁患者ChREBP基因CpG岛发生甲基化的有20例(占44.44%),≥50岁的有25例(占55.56%);单发肿瘤患者发生甲基化的有35例(占77.78%),多发患者有10例(占22.22%);I+II期患者有34例(占75.56%)发生甲基化,III+IV期有11例(占24.44%)发生甲基化。对HCC甲基化水平与临床病理资料之间的关系进行分析,发现整体甲基化水平在不同年龄组(<50岁vs.≥50岁)、血清AFP水平(<200 ng/ml vs. ≥200 ng/ml)、肿瘤大小(<5 cm vs. ≥5 cm)、肿瘤数目(单个vs.多个)、TNM分期(I+II vs. III+IV)中均无差异($P > 0.05$, Mann-Whitney U检验)。但是,单独分析每一个CpG位点的甲基化水平与临床病理资料之间的关系发现:15、18、20、23、26、29号CpG位点在≥50岁年龄组的甲基化水平均高于<50岁年龄组(均 $P < 0.05$, Mann-Whitney U检验),见表3;6、21、24号CpG位点和2号CpG



*: $P < 0.05$

图2 45对肝细胞癌及癌旁组织中ChREBP各CpG位点甲基化水平

Figure2 Methylation level of each CpG site of ChREBP in 45 paired HCC and adjacent non-tumor tissues

位点的甲基化水平分别在单个肿瘤以及较低级别TNM分期中更高（均 $P < 0.05$ ，Mann-Whitney U检验），见表3。

2.3 肝细胞癌及癌旁组织中ChREBP基因mRNA表达水平分析

荧光定量PCR检测了31对癌及配对癌旁组织中ChREBP基因mRNA表达水平，结果发现癌旁组织中ChREBP基因mRNA表达水平高于癌组织，且差异具有统计学意义[0.119 (0.033~0.746) vs. 0.011 (0.005~0.034)； $Z = -3.019$, $P = 0.003$ ，Wilcoxon配对检验]，见图3。

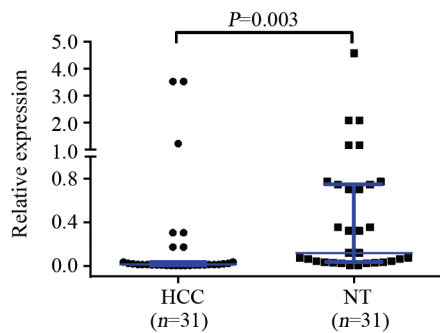


图3 31对肝细胞癌及癌旁组织中ChREBP基因mRNA相对表达水平

Figure3 Relative expression of ChREBP mRNA in 31 paired HCC and adjacent non-tumor tissues

2.4 对HCC中ChREBP mRNA表达水平与临床病理资料之间的关系

结果发现ChREBP mRNA表达水平在血

清AFP < 200 ng/ml的HCC患者高于AFP ≥ 200 ng/ml的患者[0.022 (0.009~0.304) vs. 0.009 (0.002~0.017)，差异有统计学意义； $Z = -2.534$, $P = 0.011$ ，Mann-Whitney U检验]，而在不同年龄组（ < 50 岁 vs. ≥ 50 岁）、肿瘤大小（ < 5 cm vs. ≥ 5 cm）、肿瘤数目（单个 vs. 多个）、TNM分期（I + II vs. III + IV）中差异均无统计学意义（ $P > 0.05$ ，Mann-Whitney U检验）。

2.5 肝细胞癌及癌旁组织ChREBP基因CpG岛甲基化与mRNA表达关联分析

对62例组织样本（31对）中ChREBP基因CpG岛甲基化与mRNA表达进行关联分析，发现两者之间有正相关趋势，但差异无统计学意义（ $r = 0.035$, $P = 0.790$ ，Spearman秩相关检验）。

3 讨论

ChREBP基因位于人类染色体7q11.23，包括17个外显子，基因组DNA长度约为33 kb^[7]。其蛋白包含864个氨基酸，相对分子质量为94 600。它属于Mondo家族，是碱性螺旋-环-螺旋/亮氨酸拉链（basic helix-loop-helix/leucine zipper, bHLH/ZIP）转录因子，在葡萄糖介导的基因转录调控机制中发挥重要作用，参与调节哺乳动物体内糖脂代谢以及组织脂肪沉积等^[8]。最近研究发现ChREBP基因通过不同的方式参与了乳腺癌、前列腺癌的发生发展^[9-10]。本研究发现肝细胞癌中ChREBP基因

表3 45例肝细胞癌患者ChREBP甲基化水平与临床病理特征的关系

Table3 Association between ChREBP methylation level and clinicopathologic parameters in 45 HCC patients

CpG site	Age		P	Number of tumor(s)			TNM stage		
	< 50 years	≥ 50 years		Single	Multiple	P	I + II	III + IV	P
2	15.00 (10.00-30.00)	10.00 (0.00-50.00)	0.475	10.00 (0.00-30.00)	5.00 (0.00-30.00)	0.366	20.00 (0.00-42.50)	0.00 (0.00-10.00)	0.018
6	10.00 (0.00-30.00)	20.00 (0.00-35.00)	0.285	20.00 (0.00-40.00)	5.00 (0.00-10.00)	0.019	10.00 (0.00-40.00)	10.00 (0.00-20.00)	0.099
15	0.00(0.00-0.00)	0.00(0.00-10.00)	0.023	0.00(0.00-0.00)	0.00(0.00-10.00)	0.737	0.00(0.00-0.00)	0.00(0.00-10.00)	0.845
18	0.00 (0.00-7.50)	10.00 (0.00-30.00)	0.006	0.00 (0.00-20.00)	10.00 (0.00-10.00)	0.946	0.00 (0.00-20.00)	10.00 (0.00-10.00)	0.845
20	0.00 (0.00-10.00)	10.00 (0.00-30.00)	0.027	0.00 (0.00-20.00)	10.00 (0.00-20.00)	0.459	0.00 (0.00-20.00)	0.00 (0.00-10.00)	0.490
21	0.00 (0.00-10.00)	0.00 (0.00-5.00)	0.398	10.00 (0.00-10.00)	0.00 (0.00-0.00)	0.028	0.00 (0.00-2.50)	0.00 (0.00-10.00)	0.382
23	0.00 (0.00-10.00)	10.00 (0.00-40.00)	0.016	10.00 (0.00-20.00)	0.00 (0.00-25.00)	0.657	10.00 (0.00-20.00)	10.00 (0.00-20.00)	0.630
24	10.00 (0.00-10.00)	0.00 (0.00-25.00)	0.884	10.00 (0.00-20.00)	0.00 (0.00-10.00)	0.044	0.00 (0.00-22.50)	0.00 (0.00-10.00)	0.066
26	5.00 (0.00-10.00)	10.00 (5.00-30.00)	0.010	10.00 (0.00-30.00)	10.00 (0.00-20.00)	0.619	10.00 (0.00-30.00)	10.00 (0.00-20.00)	0.630
29	10.00 (0.00-30.00)	30.00 (10.00-45.00)	0.036	10.00 (0.00-40.00)	30.00 (0.00-32.50)	0.778	15.00 (0.00-40.00)	30.00 (0.00-30.00)	0.825

Notes: This table just listed the data with statistical significant difference, excluding the CpG sites which had no significant correlation with clinicopathological information including AFP and tumor size

mRNA表达水平低于癌旁组织，但这一改变可能不是通过影响DNA的甲基化水平实现的。

Tong等^[1]认为增殖的细胞需要通过ChREBP的诱导来保持其增殖能力。在结直肠癌和肝癌细胞系中利用RNA干扰技术抑制ChREBP的表达，细胞增殖严重受到影响。而且抑制ChREBP表达会导致有氧糖酵解减少，脂肪合成及核苷酸生物合成减少。从这个层面上来讲，ChREBP mRNA的表达水平在肝细胞癌组织中应该会升高，但是本研究发现其在癌组织的表达水平低于其配对癌旁组织。这可能是由于Tong等的研究仅仅说明ChREBP表达缺失不利于癌细胞增殖。但是该研究并没有明确ChREBP处于多高的表达水平有利于癌细胞生长。也许在肿瘤细胞中ChREBP的表达水平不高只要没有缺失也是有利于肿瘤细胞生长的。不过这仅仅是体外细胞水平的结果，不能完全适用于人体复杂的环境；而且癌和癌旁组织还含有部分的间质细胞，也会成为基因表达水平检测的混淆因素；也有可能像Airley等在乳腺癌中报道的那样ChREBP存在复杂的负反馈机制^[9]。肿瘤细胞葡萄糖摄取和代谢的增加激活ChREBP，高表达的ChREBP诱导脂肪酸合成最终又会抑制ChREBP基因mRNA的合成。

DNA甲基化是表观遗传学研究的主要内容之一，DNA特定的甲基化模式对于维持基因组稳定性及基因正确的时空表达具有重要意义，DNA甲基化异常参与很多肿瘤的发生、发展^[11]。研究发现肿瘤细胞中的DNA异常甲基化状态主要表现为基因组整体的低甲基化状态和特定基因CpG岛的高甲基化状态^[12]。本实验采用亚硫酸氢钠处理结合克隆测序的方法检测了ChREBP基因CpG岛一个片段中29个CpG位点的甲基化情况。结果发现肝细胞癌组织中该片段内的整体甲基化水平有低于癌旁组织的趋势；并且5、6、7、14号CpG位点的甲基化水平在肝细胞癌组织中显著低于其配对的癌旁组织。同时我们也发现在肝细胞癌组织中有部分CpG位点的甲基化水平在高年龄组（≥50岁）HCC患者中更高，这进一步证实了在肝细胞中DNA甲基化会随年龄的增加而发生改变，与前期报道一致^[13]。

但我们并没有发现ChREBP基因CpG岛甲基化水平与mRNA表达水平有相关性。很重要的一个原因是标本量的限制；另外患者个体之间的差异、肝细胞癌的组织类型、分化程度也是重要的影响因素；再者，除甲基化外，还有其他遗传学

的改变也可能介导该基因的mRNA表达调控，如突变、杂合性缺失等；最后也有可能是除本实验中检测到的区域外，其他CpG岛也存在甲基化现象，且对转录调控机制起着更重要的作用，从而掩盖了该段区域DNA甲基化对mRNA表达的影响。为了进一步明确肝细胞癌中ChREBP基因CpG岛甲基化情况及其对mRNA表达的影响，尚需要大量的标本、完善的对照体系、组织类型及分化程度的筛选标准，这都有待进一步研究。

参考文献：

- [1] Tong X, Zhao F, Mancuso A, *et al.* The glucose-responsive transcription factor ChREBP contributes to glucose-dependent anabolic synthesis and cell proliferation[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106(51): 21660-5.
- [2] Jeong YS, Kim D, Lee YS, *et al.* Integrated expression profiling and genome-wide analysis of ChREBP targets reveals the dual role for ChREBP in glucose-regulated gene expression[J]. PLoS One, 2011, 6(7): e22544.
- [3] Hsu PP, Sabatini DM. Cancer cell metabolism: Warburg and beyond[J]. Cell, 2008, 134(5): 703-7.
- [4] Jemal A, Bray F, Center MM, *et al.* Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69-90.
- [5] Mann DA. Epigenetics in liver disease[J]. Hepatology, 2014, 60(4): 1418-25.
- [6] 钱冉, 郑芳, 郭书忍, 等. MLXIPL, PMVK, TRIB3基因启动子区甲基化检测方法的建立[J]. 中国实验诊断学, 2010, 14(8): 1166-9. [Qian R, Zheng F, Guo SR, *et al.* Detection method for methylation in promoters of MLXIPL, PMVK, TRIB3 Genes[J]. Chin J Lab Diagn, 2010, 14(8): 1166-9.]
- [7] de Luis O, Valero MC, Jurado LA. WBSR14, a putative transcription factor gene deleted in Williams-Beuren syndrome: complete characterisation of the human gene and the mouse ortholog[J]. Eur J Hum Genet, 2000, 8(3): 215-22.
- [8] Iizuka K. Recent progress on the role of ChREBP in glucose and lipid metabolism[J]. Endocr J, 2013, 60(5): 543-55.
- [9] Airley RE, McHugh P, Evans AR, *et al.* Role of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) in generating an aerobic metabolic phenotype and in breast cancer progression[J]. Br J Cancer, 2014, 110(3): 715-23.
- [10] Wang XL, Wen XF, Li RB, *et al.* ChREBP regulates the transcriptional activity of androgen receptor in prostate cancer[J]. Tumour Biol, 2014, 35(8): 8143-8.
- [11] Strathdee G, Brown R. Aberrant DNA methylation in cancer: potential clinical interventions[J]. Expert Rev Mol Med, 2002, 4(4): 1-17.
- [12] Feinberg AP, Tycko B. The history of cancer epigenetics[J]. Nat Rev Cancer, 2004, 4(2): 143-53.
- [13] Nishida N, Nagasaka T, Nishimura T, *et al.* Aberrant methylation of multiple tumor suppressor genes in aging liver, chronic hepatitis, and hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology, 2008, 47(3): 908-18.

[编辑校对：安凤]