

• 论 著 •

胆石病患者胆汁酸代谢轮廓分析*

段银环¹, 毕小云^{1△}, 邵 勇², 李 欢²

(重庆医科大学附属第一医院: 1. 检验科; 2. 产科, 重庆 400046)

摘要:目的 探讨胆石病患者与健康人群血清胆汁酸谱差异, 分析其对胆石病的辅助诊断价值及可能的成石机制。方法 选取 2018 年 1 月至 2019 年 1 月到重庆医科大学附属第一医院就诊的胆石病患者($n=33$)及健康志愿者(对照组, $n=51$)共 84 例为研究对象。采用超高效液相色谱-串联质谱分析法同时检测胆石病患者和健康志愿者血清中 15 种胆汁酸的水平, 并对检测所得到的数据进行多个变量的分析, 从而建立胆石病的临床诊断模型, 筛选出合适的胆汁酸生物标志物, 并对血清中的生物标志物的统计学意义及诊断价值进行分析。结果 成功构建出胆石病的正交偏最小二乘法判别分析(OPLS-DA)模型。2 组甘氨酸鹅脱氧胆酸、鹅脱氧胆酸、牛磺熊脱氧胆酸、甘氨酸胆酸、牛磺脱氧胆酸、牛磺石胆酸、牛磺鹅脱氧胆酸、牛磺胆酸水平比较, 差异均有统计学意义($P<0.05$)。结论 胆汁酸代谢轮廓对临床诊断胆石病有较大的应用价值, 有望用于胆石病的早期诊断及鉴别诊断。

关键词:胆汁酸代谢轮廓; 超高效液相色谱-串联质谱分析法; 胆石病

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2020.02.002 中图法分类号:R575

文章编号:1673-4130(2020)02-0133-05 文献标识码:A

Analysis of the metabolic profile of bile acid in patients with cholelithiasis*

DUAN Yinhan¹, BI Xiaoyun^{1△}, SHAO Yong², LI Huan²

(1. Department of Clinical Laboratory; 2. Department of Obstetrical, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400046, China)

Abstract: Objective To investigate the difference of serum bile acid composition between patients with cholelithiasis and healthy people and to analyze its diagnostic value and possible stone-forming mechanism for cholelithiasis. **Methods** A total of 84 patients with cholelithiasis ($n=33$) and healthy volunteers (control, $n=51$) who visited the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University from January 2018 to January 2019 were recruited. Fifteen bile acids were quantified using high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). On the basis of analysis of multi-variables, the clinical diagnostic model for cholelithiasis had established, appropriate biomarkers of bile acids were screened out, the statistical significance and diagnostic value of biomarkers in serum were analyzed. **Results** The orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) models of cholelithiasis were successfully constructed. The difference of glycine chenodeoxycholic acid, chenodeoxycholic acid, taurochordoxycholic acid, glycine, taurocholate, taurocholate, taurocholate, taurocholate between the two groups was statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** The metabolic profile of bile acid has great value in clinical diagnosis of cholelithiasis, which is expected to be used in the early diagnosis and differential diagnosis of cholelithiasis.

Key words: metabolic profile of bile acid; high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; holecithiasis

胆石病是临床最常见的消化系统疾病之一, 其成石机制目前仍不十分清楚。研究表明, 胆石病发病的根源是胆汁酸代谢紊乱及胆固醇稳态的破坏^[1]。胆汁酸代谢轮廓是反映生物体内胆汁酸种类、水平、变化的指标。当肝脏发生病变或患胆管疾病时会引起胆汁酸代谢障碍, 总胆汁酸早期不会发生明显改变, 而血清中各种亚型胆汁酸水平将产生相应的变化, 使血清中胆汁酸成分与水平显著改变^[2]。监测人体内

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(81471473)。

作者简介: 段银环, 女, 在读研究生, 主要从事临床生化检验研究。△ 通信作者, E-mail: Bxy20061963@163.com。

本文引用格式: 段银环, 毕小云, 邵勇, 等. 胆石病患者胆汁酸代谢轮廓分析[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(2): 133-137.

胆汁酸代谢轮廓的特征有望用于肝胆疾病的早期诊断及鉴别诊断。因此,需要对胆石病患者血清中胆汁酸进行全面分析,以充分掌握与成石有关的胆汁酸的毒性作用及发现具有早期诊断作用的标志胆汁酸。本研究采用超高效液相色谱-串联质谱分析法同时检测胆石病患者和健康志愿者(对照)血清中 15 种胆汁酸的水平,结合主成分分析(PCA)和正交偏最小二乘法判别分析(OPLS-DA)建立诊断区分模型,并初步探讨血清胆汁酸代谢轮廓分析对胆石病的初步诊断价值及可能的成石机制。

1 资料与方法

1.1 一般资料 共收集 2018 年 1 月至 2019 年 1 月到重庆医科大学附属第一医院就诊的胆石病患者及健康志愿者共 84 例为研究对象,其中对照组 51 例,胆石病组 33 例。清晨采集研究对象的空腹静脉血 3 mL,待标本凝固后离心,提取上层血清保存于-80℃冰箱直至上机分析。对照组纳入标准:赴重庆医科大学附属第一医院体检健康者;平均每天摄入乙醇量<20 g;在同期的医学检查中,肝肾功及血脂处于正常参考区间内;无人患有糖尿病和血脂异常等内分泌系统疾病;无被诊断为胆结石或有任何肝肾功能障碍疾病或其他血液系统及呼吸系统疾病。胆石病组纳入标准:经影像学 B 超和(或)CT、MRI 及逆行胰胆管造影(ERCP)检查确诊的胆石病患者,除外各种类型肝炎及其他原因引起的肝脏损伤,不合并糖尿病、代谢综合征及其他慢性疾病。

1.2 仪器与试剂 Waters Xevo TQD IVD 串联质谱;Acquity UPLC I-Class 超高效液相色谱仪;Masslynx 4.1 工作站(美国 Waters 公司);色谱柱:Waters ACQUITY UPLC BEH C18(50.0 mm×2.1 mm, 1.7 μm);Cobas c701 全自动生化分析仪;甘氨石胆酸(GLCA)标准品购自 Toronto Research Chemicals 公司;胆酸(CA)、石胆酸(LCA)、脱氧胆酸(DCA)、熊脱氧胆酸(UDCA)、鹅脱氧胆酸(CDCA)、牛磺胆酸(TCA)、甘氨胆酸(GCA)、牛磺石胆酸(TLCA)、牛磺脱氧胆酸(TDCA)、牛磺熊脱氧胆酸(TUDCA)、牛磺鹅脱氧胆酸(TCDCA)、甘氨脱氧胆酸(GDCA)、甘氨鹅脱氧胆酸(GCDCA)、甘氨熊脱氧胆酸(GUDCA)标准品及同位素标记的内标氘代胆酸(d4-CA)、氘代脱氧胆酸(d4-DCA)、氘代熊甘氨胆酸(d5-GCA)、氘代熊脱氧胆酸(d4-UDCA)、氘代石胆酸(d4-LCA)均购自 Sigma Aldrich 公司。

1.3 方法

1.3.1 血清标本前处理 在 0.25 mL 血清标本中,加入 1 mg/mL 内标(3,12-二醇-7-醇-5β-胆酸)甲醇液 10 μL,加入甲醇 4 mL,超声震动 20 min,4 000 g 离心 20 min,上清液在 60℃用氮气吹干。先依次各

用 2 mL 的氯仿-甲醇(2:1 V/V)、甲醇和水活化 C18 小柱。吹干的血清溶于 1 mL 水中,上样。依次用 2 mL 水、2 mL 正己烷冲洗,最后用 5 mL 甲醇洗脱。在 60℃用氮气吹干,残余物溶于 1 mL 乙腈-水(1:1)中。

1.3.2 色谱和质谱条件 色谱柱:Waters ACQUITY UPLC BEH C18(50.0 mm×2.1 mm,1.7 μm);流动相:A 相为 0.1%甲酸水溶液(体积比),B 相为 0.1%甲酸-乙腈:甲醇(3:1, v:v)溶液;流速:0.4 mL/min;柱温:45℃;梯度洗脱程序:0~2.0 min,>35%~43%,B;>2.0~3.5 min,>43%~46%,B;>3.5~5.0 min,>46%~<59%,B;>5.0~7.0 min,59%,B;>7.0~8.7 min,>59%~66%,B;>8.7~10.7 min,>66%~98%,B;>10.7~11.3 min,35%,B。离子源:电喷雾离子源(ESI);扫描方式:负离子扫描;检测方式:多反应监测(MRM)模式;毛细管电压:3.0 kV;离子源温度:150℃;脱溶剂气温度:400℃;脱溶剂气流速:800 L/h;锥孔气流速:50 L/h。用时间分段来提高待测物响应值,15 种胆汁酸质谱参数见表 1。

1.3.3 方法学评价及质控 15 种胆汁酸在 1.0~6 000.0 nmol/L 线性范围内线性关系良好,线性决定系数(R²)均>0.993;目标物的定量限为 1.0~10.0 nmol/L;低、中、高水平的萃取回收率在 95.5%~114.1%,日内、日间精密度(RSD)均<11.4%,15 种胆汁酸的高低质控变异系数<15%。

表 1 15 种胆汁酸质谱参数

化合物名称	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	驻留时间 (s)	锥孔电压 (V)	碰撞能量 (ev)
CA	407.3	407.3	0.18	-80	10
d4-CA	411.3	411.3	0.18	-80	10
LCA	375.3	375.3	0.18	-95	10
d4-LCA	379.3	379.3	0.18	-95	10
DCA	391.3	391.3	0.18	-84	10
d4-DCA	395.3	395.3	0.18	-84	10
UDCA	391.3	391.3	0.20	-84	10
d4-UDCA	395.3	395.3	0.20	-84	10
CDCA	391.3	391.3	0.25	-84	10
d4-CDCA	395.3	395.3	0.25	-84	10
TCA	514.3	80.0	0.16	-90	67
GCA	464.3	74.0	0.17	-76	42
TLCA	482.3	80.0	0.20	-88	60
GLCA	432.3	74.0	0.16	-64	36
TDCA	498.3	80.0	0.23	-92	62
TUDCA	498.3	80.0	0.17	-92	62
TCDCA	498.3	80.0	0.23	-92	62
GDCA	448.3	74.0	0.18	-74	40
GCDCA	448.3	74.0	0.18	-74	40
GUDCA	448.3	74.0	0.16	-74	40

1.3.4 特征标志胆汁酸的筛选 将数据导入 SIM-CA 13.0 (Umetrics 瑞典) 软件, 结合 PCA 和 OPLS-DA 对血清胆汁酸谱进行分析, 建立模式识别模型。再根据所得的投影重要性值 (VIP) 及其置信区间对标志物进行初步筛选, 获得对分组有贡献的胆汁酸变量。筛选标准为: $VIP>1$ 且置信区间不包括 0 的胆汁酸。对初筛的标志物进行不同组间的非参数检验以寻找有差异的特征标志胆汁酸。

1.4 统计学处理 采用 SPSS21.0 统计软件进行统计分析, 对于符合正态分布连续性变量以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用 t 检验比较, 对于不符合正态分布的连续性资料, 以中位数 (四分位数) [$M(P_{25}, P_{75})$], 表示采用 Mann-Whitney U 检验进行比较, 计数资料比较采用 χ^2 检验, 绘制受试者工作特征曲线 (ROC 曲线) 并计算各曲线下面积 (AUC), 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。采用 SIMCAP13.0 软件对血清胆汁酸定量结果进行 PCA 和 OPLS-DA 分析。

2 结 果

2.1 一般临床资料 对照组与胆石病组相比, 性别构成 ($\chi^2=1.706, P=0.191$)、直接胆红素 (DBil) ($t=-2.020, P=0.052$) 差异无统计学意义, 可排除性别对胆汁酸谱的影响。2 组年龄、丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶 (AST)、总碱性磷酸酶 (ALP)、总胆汁酸 (TBA)、总胆红素 (TBil) 比较, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。见表 2。

表 2 对照组与胆石病组一般资料比较 ($\bar{x}\pm s$)				
项目	对照组 ($n=51$)	胆石病组 ($n=33$)	χ^2/t	P
性别			1.706	0.191
男	16	15		
女	35	18		
年龄(岁)	40.6 $\pm$ 13.3	52.5 $\pm$ 18.1 ^a	-3.452	0.001
ALT(U/L)	10.6 $\pm$ 5.6	90.6 $\pm$ 30.9 ^a	-3.509	0.001
AST(U/L)	14.2 $\pm$ 4.8	72.7 $\pm$ 66.1 ^a	-3.493	0.001
ALP(U/L)	65.9 $\pm$ 21.6	142.0 $\pm$ 90.8 ^a	-2.687	0.011
TBA(μ mol/L)	3.8 $\pm$ 2.5	14.9 $\pm$ 17.9 ^a	-2.532	0.016
TBil(μ mol/L)	7.9 $\pm$ 3.1	41.8 $\pm$ 34.6 ^a	-2.129	0.041
DBil(μ mol/L)	3.0 $\pm$ 1.0	34.5 $\pm$ 18.5	-2.020	0.052

注: 与对照组比较, ^a $P<0.05$ 。

2.2 构建区分模型 将得到的胆汁酸数据导入 SIMCA13.0 软件先进行无监督的 PCA 分析, 根据 DModX 及 Loading plot 对异常离群点 (outlier) 反复剔除后建立 PCA 模型, 模型解释力 ($R^2X=83.9\%$), 预测力 ($Q^2=43.9\%$), 见图 1。依据筛选后的数据构建有监督的 OPLS-DA 模型, 见图 2。交叉验证显示预测能力 $Q^2=20.8\%, 50.9\%$ 的变量 [$R^2(X)$] 可用

于解释 26.3% 的组间差异 [$R^2(X)$]。从 3D 得分图中可以看出对照组分布在右侧, 胆石病患者分布在左侧, 该模型筛选到的标志胆汁酸有 GCDCA、CDCA、GUDCA、TUDCA、GCA、TDCA、TLCA、TCDCA、TCA。

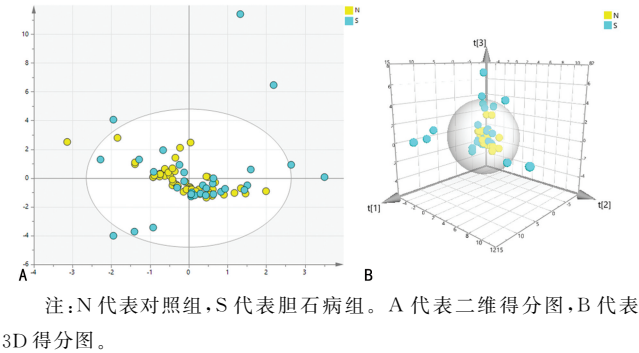


图 1 基于对照与胆石病组的 PCA 模型

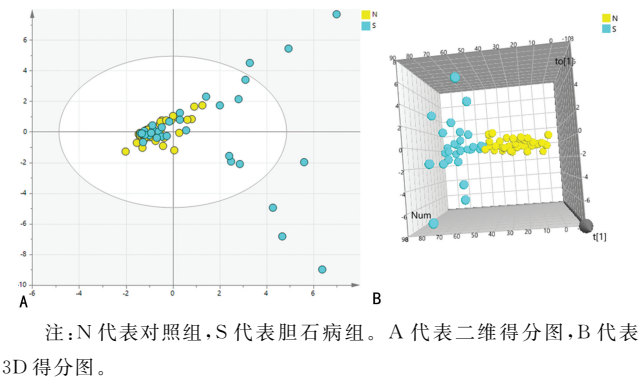


图 2 基于对照与胆石病组的 OPLS-DA 模型

表 3 健康对照与胆石病胆汁酸代谢轮廓 [nmol/L, $M(P_{25}, P_{75})$]			
项目	对照组($n=51$)	胆石病组($n=33$)	P
LCA	11.2(3.4, 19.2)	6.4(4.6, 17.3)	
UDCA	61.7(40.6, 96.4)	64.3(9.6, 198.4)	
CDCA	92.9(63.4, 167.2)	202.3(69.8, 803.8) ^a	0.013
DCA	258.4(123.1, 504.6)	23.9(4.6, 493.8)	
CA	64.7(34.5, 137.2)	93.4(37.6, 344.5)	
GLCA	5.7(3.1, 11.7)	5.1(3.4, 14.9)	
GUDCA	65.0(46.9, 113.9)	98.3(46.5, 281.5)	0.118
GCDCA	719.2(387.5, 1319.0)	1788.1(955.5, 4377.9) ^{ab}	0.000
GDCA	142.9(80.7, 250.2)	92.3(37.1, 282.8)	
GCA	120.0(85.8, 193.5)	215.6(106.2, 1251.8) ^{ab}	0.002
TLCA	1.8(1.6, 2.6)	3.0(2.7, 7.5) ^a	0.000
TUDCA	2.0(1.1, 3.9)	5.5(2.3, 11.7) ^{ab}	0.000
TDCA	11.4(5.0, 23.0)	15.6(4.4, 62.7)	0.407
TCDCA	42.4(27.3, 95.5)	152(41.0, 788.2) ^{ab}	0.000
TCA	10.5(7.3, 23.4)	34.7(11.4, 289.1) ^{ab}	0.001

注: 与对照组相比, ^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ 。

2.3 特征胆汁酸临床价值评估 为探索这些标志胆

汁酸对胆石病的诊断效能,将胆石病与对照组进行非参数检验,寻找有差异的标志胆汁酸。见表 3。与对照组相比,胆石病组的 GCDCA、CDCA、TUDCA、GCA、TDCA、TLCA、TCDCA、TCA 差异均有统计学意义($P<0.05$),其中 GCDCA、CDCA、TUDCA、GCA、TDCA、TCDCA、TCA 差异有显著统计学意义($P<0.01$)。对差异胆汁酸进行 ROC 曲线分析并计算他们的 AUC,胆石病组 TLCA 的 AUC 为 0.615 ($P<0.05$),认为有较好的区分效能,表 4、见图 3。

表 4 胆石病差异胆汁酸的 AUC 及 P 值

差异胆汁酸	AUC	P	95%CI
GCDCA	0.355	0.007	0.270~0.439
CDCA	0.602	0.059	0.489~0.716
TUDCA	0.308	0.000	0.228~0.387
GCA	0.298	0.000	0.216~0.381
TDCA	0.383	0.032	0.283~0.484
TLCA	0.615	0.035	0.519~0.710
TCDCA	0.341	0.004	0.247~0.436
TCA	0.320	0.001	0.223~0.418

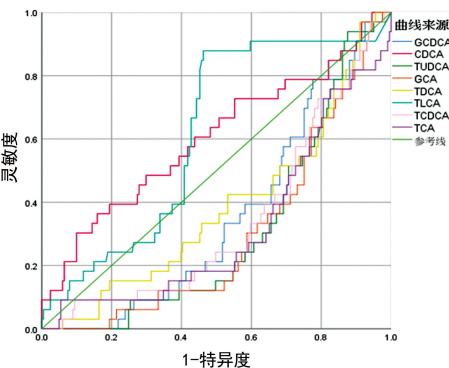


图 3 胆石病差异胆汁酸的 ROC 曲线及 AUC

3 讨 论

PCA 是将多个指标的数据进行降维化为少数几个指标的一种方法,它在尽可能保留原有信息的基础上将样本指标数压缩,使数据矩阵简化,降低维数,PCA 是通过分析可观测的指标,提取几个较少的综合指标以揭示原来变量绝大多数信息的一种多元统计方法^[3-5]。OPLS-DA 是将正交信号校正方法(OSC)与偏最小二乘法(PLS)相互结合同时对偏最小二乘法进行改进。OPLS-DA 可以更好地区分组间差异,提高模型的有效性和解析能力。目前,OPLS-DA 在代谢组学研究中已经被广泛应用,其应用价值也不断被认可^[6-7]。

胆石病是多因素作用的结果,研究表明胆石病发病的根源是胆汁酸代谢紊乱及胆固醇稳态的破坏。本研究采用超高效液相色谱-串联质谱分析方法同时检测胆石病患者和健康志愿者血清中 15 种胆汁酸的

水平并分析胆汁酸亚组份的差异,建立区分模型,探讨可能的成石机制。本研究结果显示,与对照组相比,胆石病组的 GCDCA、CDCA、TUDCA、GCA、TDCA、TLCA、TCDCA、TCA 水平差异均有统计学意义($P<0.05$),可以作为胆石病的标志胆汁酸,其中 TLCA 有一定的区分效能。

既往有研究表明,游离型胆汁酸的差异主要影响胆石病的形成^[8],这与本研究结果不符,本研究中,有差异的除 CDCA 是游离型胆汁酸外,GCDCA、TUDCA、GCA、TDCA、TLCA、TCDCA、TCA 均为结合型胆汁酸,胆汁酸的毒性通常与其两亲性有关,大量毒性胆汁酸的堆积可诱导肝细胞的氧化应激及凋亡,最终导致肝脏实质损伤。有研究表明,DCA、LCA 是毒性最大的疏水胆汁酸^[9-11],在本研究中未见明显升高。事实上,牛磺结合胆汁酸和甘氨酸结合型胆汁酸都是疏水性胆汁酸,具有相似的细胞毒性作用^[10,12-14]。本研究中胆石病组 GCDCA、TUDCA、GCA、TDCA、TLCA、TCDCA、TCA,与对照相比,差异均有统计学意义,可能是成石的主要因素,同时也可以解释胆石病患者的肝功能损害。

LCA 是 CDCA 在肠道细菌的作用下脱羟基形成的一种次级胆汁酸,既往有研究表明,LCA 在无症状的胆石病患者血清中可测出,而在健康人血清中检测不出,认为 LCA 可以用来鉴别胆石病的有无^[15],但也有学者在健康人血清标本中检测出 LCA^[16]。在本研究中,LCA 与对照比较,差异无统计学意义,而 CDCA 及 TLCA 水平差异有统计学意义,结合本研究结果,认为可以将血清 TLCA 作为区分胆石病与非胆石病的指标。

既往研究表明,血清 DCA 水平增多是结石形成的诱发因素之一^[17],本实验中胆石病组血清样本中 DCA 水平与对照组差异无统计学意义。综上所述,DCA 在胆固醇结石形成中的作用存在争议,仍需进一步研究。

4 结 论

本研究中结合胆汁酸 GCDCA、TUDCA、GCA、TDCA、TLCA、TCDCA、TCA 的差异主要影响胆石的形成;TLCA 可能是鉴别胆石病与非胆石病的指标,胆汁酸代谢轮廓对临床诊断胆石病有较大的应用价值,有望用于胆石病的早期诊断及鉴别诊断。

参考文献

[1] WANG H H,PORTINCASA P,WANG D Q. Molecular pathophysiology and physical chemistry of cholesterol gallstones[J]. Front Biosci,2008,13:401-423.

[2] ARAB J P,KARPEN S J,DAWSON P A, et al. Bile acids and nonalcoholic fatty liver disease: molecular insights and therapeutic perspectives [J]. Hepatology,

- 2017, 65(1):350-362.
 - [3] FANG M, PAN E P. Clustering analysis[M]. Beijing: Geological publishing house, 1982.
 - [4] SAMBASIVAM S, THEODOSOPOULOS N. Advanced data clustering methods of mining web documents[J]. Inform Sci Inform Technol, 2006, (3):563-579.
 - [5] MARQUES J P, 著. 吴逸飞, 译. 模式识别——原理、方法及应用[M]. 北京: 清华大学出版社, 2002.
 - [6] MUN J H, LEE H, YOON D, et al. Discrimination of basal cell carcinoma from normal skin tissue using high-resolution magic angle spinning 1H NMR spectroscopy [J]. PLoS One, 2016, 11(3):e0150328.
 - [7] LIU T, LI J, XU F, et al. Comprehensive analysis of serum metabolites in gestational diabetes mellitus by UPLC/Q-TOF-MS[J]. Anal Bioanal Chem, 2016, 408(4):1125-1135.
 - [8] HOFMANN A F. Bile acids: the good, the bad, and the ugly[J]. News Physiol Sci, 1999, 14(1):24-29.
 - [9] NATALINI B, SARDELLA R, GIOIELLO A, et al. Determination of bile salt critical micellization concentration on the road to drug discovery[J]. J Pharm Biomed Anal, 2014, 87(1):62-81.
 - [10] SHARMA R, MAJER F, PETA V K, et al. Bile acid toxicity structure-activity relationships: correlations between cell viability and lipophilicity in a panel of new and known bile acids using an oesophageal cell line (HET-1A) [J]. Bioorg Med Chem, 2010, 18(18):6886-6895.
 - [11] HOFMANN A F. Detoxification of lithocholic acid, a toxic bile acid: relevance to drug hepatotoxicity[J]. Drug Metab Rev, 2004, 36(3/4):703-722.
 - [12] KOMICHI D, TAZUMA S, NISHIOKA T, et al. Glycochenodeoxycholate plays a carcinogenic role in immortalized mouse cholangiocytes via oxidative DNA damage [J]. Free Radic Biol Med, 2005, 39(11):1418-1427.
 - [13] JAESCHKE H, GORES G J, CEDERBAUM A I, et al. Mechanisms of hepatotoxicity[J]. Toxicol Sci, 2002, 65(2):166-176.
 - [14] BENZ C, ANGERMULLER S, OTTO G, et al. Effect of tauroursodeoxycholic acid on bile acid-induced apoptosis in primary human hepatocytes [J]. Eur J Clin Invest, 2000, 30(3):203-209.
 - [15] 叶庆林. 血清胆汁酸测定在肝病诊断上的价值: 各种胆汁酸分析对肝胆疾病的诊断意义[J]. 国际检验医学杂志, 1983, 5(1):41-42.
 - [16] 罗澜, 印其友, 李水军, 等. 血清胆汁酸 LC-MS/MS 测定及在老年人血清检测中的应用[J]. 中国临床医学, 2006, 13(5):873-876.
 - [17] MARCUS S, HEATON K. Deoxycholic acid and the pathogenesis of gall stones [J]. Gut, 1988, 29(4):522-533.
-
- (收稿日期: 2019-05-29 修回日期: 2019-10-23)
-
- (上接第 132 页)
- [6] FARRIS A B, ADAMS C D, BROUSAIDES N, et al. Morphometric and visual evaluation of fibrosis in renal biopsies[J]. J Am Soc Nephrol, 2011, 22(1):176-186.
 - [7] JIANG S, XIA R, JIANG Y, et al. Vascular endothelial growth factors enhance the permeability of the mouse blood-brain barrier[J]. PLoS One, 2014, 9(2):86407.
 - [8] 陈金颖, 杨成, 刘华锋. 肾小管上皮细胞损伤在急性肾损伤相慢性肾脏病转化中的作用[J]. 中华肾脏病杂志, 2017, 33(2):155-160.
 - [9] 蒋慧, 丁国华. VEGF 对肾脏调节作用的研究进展[J]. 综述与进展, 2017, 46(11):182-185.
 - [10] ROSENZWEIG B, PINTHUS J H, KLEINMANN N, et al. The relative contribution of urine extravasation to elevate plasma creatinine levels in acute unilateral ureteral obstruction[J]. Can Urol Assoc J, 2015, 9(7/8):E428-E433.
 - [11] YUAN X, WANG X, CHEN C, et al. Bone mesenchymal stem cells ameliorate ischemia/reperfusion-induced damage in renal epithelial cells via microRNA-223 [J]. Stem Cell Res Ther, 2017, 8(1):146.
 - [12] 张婷婷, 杨晶, 张颖, 等. SIRT1 在大鼠肾小管上皮细胞细胞缺氧复氧所致凋亡中的保护作用及其机制[J]. 中华肾脏病杂志, 2016, 32(5):378-379.
 - [13] 李卫卫, 王晓红, 马宏. UUO 幼年大鼠肾间质微血管损伤趋势及其相关分子特征[J]. 中国中西医结合肾脏病杂志, 2018, 19(2):150-152.
 - [14] ELENA M K, OMAR E A, EDILIA T, et al. Unilateral ureteral obstruction as a model to investigate fibrosis-attenuating treatments[J]. Biomolecules, 2019, 9(4):141.
 - [15] SAHUTOGLU T, SAKACI T, HASBAL N B, et al. Serum VEGF-C levels as a candidate biomarker of hypervolemia in chronic kidney disease[J]. Medicine (Baltimore), 2017, 96(18):e6543.
 - [16] 薛建新, 秦志强, 李潇等. VEGF165 转染内皮细胞祖细胞移植对大鼠肾脏缺血再灌注的保护作用[J]. 南京医科大学学报(自然科学版) 2018, 38(1):34-39.
- (收稿日期: 2019-05-11 修回日期: 2019-09-25)