

## $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶和组织因子途径抑制物基因多态性的交互作用及其与大肠癌侵袭和转移的关系

张超贤<sup>a</sup>, 郭李柯<sup>b</sup>, 秦咏梅<sup>a</sup>, 李光艳<sup>a</sup>(新乡医学院第一附属医院 a. 消化内科; b. 口腔科, 河南 卫辉 453100)

**[摘要]** **目的:** 探讨  $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶( $\alpha 1$ -antitrypsin,  $\alpha 1$ -AT)基因第5外显子和组织因子途径抑制物(tissue factor pathway inhibitor, *TFPI*)基因 T287C 多态性的交互作用及其与大肠癌侵袭和转移的关系。**方法:** 选择河南省新乡医学院第一附属医院 2011 年 7 月至 2015 年 7 月期间收治的经病理学确诊的大肠癌 TNM I、II、III 和 IV 期患者各 180 例,以 180 例 TNM 0 期患者作为对照组,用 PCR-RFLP 技术检测各组患者外周血白细胞两基因的多态性,以 Hardy-Weinberg 平衡检验分析样本的群体代表性,以 Khoury 和 Wagener 模型分析两基因多态性的交互作用。ELISA 法检测患者血清  $\alpha 1$ -AT 和 TFPI 蛋白表达,细胞划痕试验和 Transwell 侵袭试验分别检测  $\alpha 1$ -AT 和 TFPI 对人结肠癌 SW480 细胞迁移和侵袭能力的影响,Western blotting 检测 SW480 细胞胰蛋白酶、组织因子(tissue factor, TF)和蛋白酶激活受体-2(protease-activated receptor 2, PAR-2)表达水平。**结果:**  $\alpha 1$ -AT(MZ)、 $\alpha 1$ -AT(ZZ)、TFPI(TC)和 TFPI(CC)基因型者大肠癌侵袭与转移的风险均显著增加,且在  $\alpha 1$ -AT(MZ)和 TFPI(TC)之间、 $\alpha 1$ -AT(MZ)和 TFPI(CC)之间、 $\alpha 1$ -AT(ZZ)和 TFPI(TC)及  $\alpha 1$ -AT(ZZ)和 TFPI(CC)之间均存在正向交互作用(均  $\gamma > 1$ )。I、II、III 和 IV 期患者血清  $\alpha 1$ -AT(或 TFPI)表达明显低于 0 期组,且 I、II、III 和 IV 期患者之间血清  $\alpha 1$ -AT(或 TFPI)表达也有明显差异( $P < 0.01$ )。同一组携带突变基因型个体的血清  $\alpha 1$ -AT(或 TFPI)表达明显低于携带野生型个体( $P < 0.01$ )。体外细胞培养实验显示, $\alpha 1$ -AT 可明显抑制 SW480 细胞胰蛋白酶的表达,而 TFPI 则明显抑制 TF 表达,而两者均可明显降低细胞 PAR-2 的表达及细胞迁移和侵袭能力。**结论:**  $\alpha 1$ -AT(MZ)、 $\alpha 1$ -AT(ZZ)、TFPI(TC)和 TFPI(CC)基因型均是大肠癌侵袭与转移的高危因素,基因多态性的交互作用增加了大肠癌侵袭与转移的风险。

**[关键词]** 大肠癌;  $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶基因; 组织因子途径抑制物基因; 多态性; 侵袭; 转移

**[中图分类号]** R735.3+4; R730.2

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2016)03-0326-09

## Relationship of polymorphism interaction of $\alpha 1$ -antitrypsin and tissue factor pathway inhibitor genes with invasion and metastasis of colorectal carcinoma

ZHANG Chaoxian<sup>a</sup>, GUO Like<sup>b</sup>, QIN Yongmei<sup>a</sup>, LI Guangyan<sup>a</sup>(a. Department of Gastroenterology; b. Department of Stomatology, The First Hospital Affiliated to Xinxiang Medical University, Weihui 453100, Henan, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate polymorphism interaction of  $\alpha 1$ -antitrypsin ( $\alpha 1$ -AT) gene exon 5 and tissue factor pathway inhibitor (*TFPI*) gene T287C and relationship of the gene polymorphism interaction with invasion and metastasis of colon carcinoma. **Methods:** Each of one hundred eighty patients diagnosed as the TNM I, II, III or IV stage colon carcinoma received and treated by the First Hospital affiliated to Xinxiang Medical University Henan Province during July 2011 to July 2015 were selected. One hundred eighty patients with the TNM 0 stage colon carcinoma who without involvement of regional lymph nodes and distant metastasis were selected as control group. Polymorphisms of the both genes in peripheral blood leukocytes of the patients in each group were tested with PCR-RFLP assay. Hardy-Weinberg equilibrium tests were used to analyze the population representativeness of the samples. Polymorphism interaction of the both genes was examined with Khoury and Wagener model. Expressions of the  $\alpha 1$ -AT and TFPI proteins in serum were tested by ELISA assay. Scratch test and Transwell invasion assay were used to detect the effect of the  $\alpha 1$ -AT and TFPI on migration and inva-

**[基金项目]** 河南省教育厅科研基金资助项目(No. 2011A320015)。Project supported by the Science Research Foundation from Bureau of Education of Henan Province (No. 2011A320015)

**[作者简介]** 张超贤(1974-),男,河南柘城人,副主任医师,副教授,硕士,主要从事消化系统肿瘤的分子生物学基础和临床研究

**[通信作者]** 张超贤(ZHANG Chaoxian, corresponding author), E-mail: nn21882001@aliyun.com

**[优先发表]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.r.20160527.1628.006.html>

tion abilities of the human colon carcinoma SW480 line cells respectively. Expression levels of cell trypsin, tissue factor (TF) and protease-activated receptor -2 (PAR-2) were tested with Western blotting assay. **Results:** Risks of invasion and metastasis of the colorectal cancer in the patients with genotypes of  $\alpha 1$ -AT (MZ),  $\alpha 1$ -AT (ZZ), TFPI (TC) and TFPI (CC) significantly increased, furthermore there was a positive interaction between  $\alpha 1$ -AT (MZ) and TFPI (TC),  $\alpha 1$ -AT (MZ) and TFPI (CC),  $\alpha 1$ -AT (ZZ) and TFPI (TC), and  $\alpha 1$ -AT (ZZ) and TFPI (CC) at all (all  $\gamma > 1$ ). Expressions of the  $\alpha 1$ -AT and TFPI proteins in the patients with TNM I, II, III, IV stage were significantly lower than that in the patients with TNM 0 stage, and expressions of serum  $\alpha 1$ -AT and TFPI proteins among the patients with TNM I, II, III and IV stage were also obviously different ( $P < 0.01$ ). In the same group, exoexpressions of serum  $\alpha 1$ -AT and TFPI proteins in the patients with mutant genotype were significantly lower than those in the patients with wild genotype ( $P < 0.01$ ). Cell culture in vitro experiments shown that  $\alpha 1$ -AT obviously inhibited exoexpression of cell trypsin in the SW480 cells, but TFPI inhibited expression of TF evidently. As well as both of them could significantly decrease expression of PAR-2 protein and, migration and invasion abilities of the cells. **Conclusion:** All genotypes of  $\alpha 1$ -AT (MZ),  $\alpha 1$ -AT (ZZ), TFPI (TC) and TFPI (CC) might be risk factors for invasion and metastasis of the colon carcinoma. Polymorphisms and interactions of the genes could increase invasion and metastasis dangers of the colon cancer.

[ **Key words** ] colorectal carcinoma;  $\alpha 1$ -antitrypsin gene ( $\alpha 1$ -AT); tissue factor pathway inhibitor gene (TFPI); polymorphism; invasion; metastasis

[ Chin J Cancer Biother, 2016, 23(3): 326-334. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2016.03.006 ]

蛋白酶激活受体-2 (protease-activated receptor-2, PAR-2) 是一种细胞膜表面胰酶受体, 广泛分布于体内多种器官和组织, 可被体内胰蛋白酶、类胰蛋白酶、膜型丝氨酸蛋白酶-1 和组织因子/活化凝血 VII 因子复合物 (tissue factor/activated coagulation factor VII complex, TF/FVIIa) 等内源性激活剂激活, 激活 PAR-2 可调控多种细胞因子、机体酶生长因子的转录表达, 参与调控机体免疫应答、炎症反应、细胞凋亡及肿瘤形成等多种生理和病理过程, 与肿瘤关系密切<sup>[1-2]</sup>。国内外研究<sup>[3-8]</sup>表明, PAR-2 在恶性肿瘤中呈现过度激活状态, 导致并调控恶性肿瘤患者基质金属蛋白酶-2 (matrix metalloproteinases-2, MMP-2)、MMP-9 和 VEGF 等细胞因子过度 and 持续表达, 参与肿瘤的生长和转移。 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶 ( $\alpha 1$ -antitrypsin,  $\alpha 1$ -AT) 和组织因子途径抑制物 (tissue factor pathway inhibitor, TFPI) 分别是上述蛋白酶和 TF/FVIIa 的重要控制因素<sup>[9-10]</sup>。 $\alpha 1$ -AT、TFPI 基因具有多态性, 有多个等位基因, 不同等位基因编码的  $\alpha 1$ -AT 或 TFPI 活性有差异。 $\alpha 1$ -AT 和 TFPI 基因的多态性可使机体对内外环境反应能力有所不同, 这是决定肿瘤侵袭和转移的一个重要因素。 $\alpha 1$ -AT 与 TFPI 基因多态性与肿瘤侵袭、转移状况的研究日渐增多, 但尚未见上述基因多态性的联合作用对大肠癌侵袭与转移影响的报道。为了调查  $\alpha 1$ -AT 和 TFPI 在河南省新乡地区大肠癌人群中的分布状态, 探索两基因多态性的交互作用及其与大肠癌侵袭、转移的关系, 本课题组开展了  $\alpha 1$ -AT 基因第 5 外显子和 TFPI 基因 T287C 多态性的交互作用及其与大

肠癌侵袭、转移关系的研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 标本的采集

收集 2011 年 7 月至 2015 年 7 月在新乡医学院第一附属医院收治的经病理学确诊、无其他系统恶性肿瘤及癌前病变、无合并免疫系统疾病的大肠癌患者 900 例。参照 2010 年国际抗癌联盟/美国癌症联合委员会 (UICC/AJCC) TNM 分期标准<sup>[11]</sup>, TNM I、II、III、IV 期和无区域淋巴结或远处转移的 0 期患者各 180 例, 其中男性 107 例、女性 71 例。中位数年龄: I 期组 53 岁 (44 ~ 70 岁), II 期组 52 岁 (46 ~ 71 岁), III 期组 53 岁 (45 ~ 70 岁), IV 期组 54 岁 (45 ~ 69 岁), 0 期组 51 岁 (45 ~ 69 岁)。全部患者签署知情同意书, 并经医院医学伦理委员会审核批准 (No. 2011015)。纳入研究时, 均未经任何化学药物和放射治疗。

每人抽取静脉血 12 ml, 分离白细胞, 用 QIAampDNA 提取试剂盒提取白细胞 DNA。另抽取 8 ml 静脉血提取血清。

### 1.2 主要材料与试剂

$\alpha 1$ -AT 基因引物购自上海生工生物工程技术有限公司, TFPI 基因引物购自上海博亚生物技术有限公司, TaKaRa PCR Amplification Kit 购自大连宝生物工程有限公司, 限制性内切酶 Hind III 购自昆明倍捷科技有限公司, ELISA  $\alpha 1$ -AT 试剂盒和 TFPI 测定试剂盒购自上海西唐生物科技有限公司,  $\alpha 1$ -AT (2.5 mg/ml) 购自北京生物制品研究所, TFPI

(1.0 mg/ml)购自南京迪安生物科技有限公司。Western blotting 所用的胰蛋白酶、TF 和 PAR-2 抗体购自武汉博士德生物工程有限公司。人大肠癌 SW480 细胞购自中科院上海生物库。

### 1.3 PCR-RFLP 技术检测 $\alpha 1$ -AT 基因第 5 外显子多态性

引物合成和 PCR 反应体系设计参考文献 [12]。反应条件为: 98 °C 2 min; 94 °C 1 min、56 °C 30 s、72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 8 min。PCR 产物以限制性内切酶 *Taq* I 酶切, 37 °C 孵育 4 h, 4  $\mu$ l 酶切产物经 Bio-Rad 染色琼脂糖凝胶电泳后, 紫外线凝胶成像仪观测。

### 1.4 PCR-RFLP 技术检测 TFPI 基因 T287C 多态性

引物合成和 PCR 反应体系设计参考文献 [13]。反应条件如下: 94 °C 3 min, 94 °C 30 s, 52 °C 45 s、72 °C 45 s, 35 个循环; 70 °C 7 min。12  $\mu$ l PCR 反应产物与限制性内切酶 *Hind* III 于 37 °C 温浴过夜。酶切产物经 3.5% 琼脂糖凝胶电泳(含 0.5  $\mu$ g/ml 溴乙啶)分析。

### 1.5 ELISA 测定血清 $\alpha 1$ -AT 和 TFPI

测定患者血清  $\alpha 1$ -AT 和 TFPI 时, 分别以外购的  $\alpha 1$ -AT 和 TFPI 为标准品, 血清为样品。分别加 100  $\mu$ l 的标准品和样品于空白孔内, 在 450 nm 波长测定 *D* 值, 样品浓度计算公式为: 样品浓度 = 标准品浓度  $\times$  样品 *D* 值 / 标准品 *D* 值。

### 1.6 体外 $\alpha 1$ -AT 和 TFPI 对结肠癌 SW480 细胞干预实验

人结肠癌 SW480 细胞用含 10% FBS 的 DMEM 培养基在 37 °C 含 5% CO<sub>2</sub> 孵箱中培养, 待细胞状态稳定后, 接种于 6 孔培养板(5  $\times$  10<sup>5</sup> 个/孔), 细胞贴壁后加入 丝裂霉素 C(S 期细胞周期阻滞剂)处理 1 h。用 10  $\mu$ l 移液枪头在培养孔内划一直线, 溶剂对照组加 20  $\mu$ l 0.1% 二甲基亚砷,  $\alpha 1$ -AT 组加 20  $\mu$ l  $\alpha 1$ -AT 溶液, TFPI 组加 20  $\mu$ l TFPI 溶液, 联合药物组加 10  $\mu$ l  $\alpha 1$ -AT 溶液和 10  $\mu$ l TFPI 溶液, 继续培养。显微镜下检查 0、24 和 48 h 各组细胞划痕愈合情况, 评估细胞迁移能力。

将 SW480 细胞均匀接种于铺有基质胶的 24 孔 Transwell 小室(上室)中, 分别加入上述二甲基亚砷、 $\alpha 1$ -AT 和 TFPI 溶液, 下室加入含 20% FBS 的完全培养基, 37 °C 培养 24 和 48 h 后, 用棉签拭去小室内底部细胞, 4% 甲醛固定小室外底部细胞, 结晶紫染色, 显微镜下观察各处理组穿过小室的细胞数, 对比不同处理对穿过小室的 SW480 细胞数的影响。

上述不同处理组干预 48 h 后弃去培养液, 用冰

冷 PBS 洗两遍, 加入细胞裂解液 冰上 30 min, 抽提细胞总蛋白, Western blotting 检测细胞胰蛋白酶、TF 和 PAR-2 表达水平。

### 1.7 基因交互作用类型的判定

根据 Khoury 和 Wagener 提出的交互作用模型和交互系数( $\gamma_{甲} = \beta_{甲*乙} / \beta_{甲}, \gamma_{乙} = \beta_{甲*乙} / \beta_{乙}$ )判断基因-基因交互作用类型<sup>[14]</sup>。判定依据:  $\gamma > 1$ , 正向交互作用, 表示一个基因对另一个基因的效应有放大作用,  $\gamma < 1$ , 负向交互作用, 表示一个基因对另一个基因的效应有减弱作用;  $\gamma = 1$ , 表示一个基因和另一个基因没有交互作用。 $\beta$  等于相应患者 OR 值的对数值 (lgOR),  $\gamma$  等于两变量 lgOR 的比值。

### 1.8 统计学处理

Hardy-Weinberg 平衡检验分析样本的群体代表性, 以  $P < 0.05$  为符合 Hardy-Weinberg 规律。用比值比(OR)值和 95% 可信区间(95% CI)评价相对风险, 病例组和对照组之间的基因型频率和等位基因频率采用  $\chi^2$  检验,  $P < 0.05$  和  $P < 0.01$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 $\alpha 1$ -AT 基因第 5 外显子和 TFPI 基因 T287C 的基因多态性

$\alpha 1$ -AT 基因第 5 外显子酶切产物紫外线凝胶成像结果可见 3 种带型: 89 bp 一条区带为 MM 纯合子, 110 bp 一条区带为 ZZ 纯合子, 89 bp 和 110 bp 两条区带为 MZ 杂合子(图 1)。每组随机抽取 20 个初步确定基因型样本, PCR 扩增后, 送上海生工生物工程技术服务公司作 DNA 序列测定获得确认。

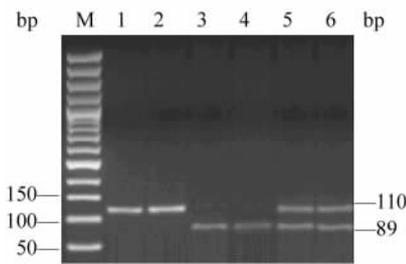


图 1  $\alpha 1$ -AT 基因第 5 外显子 PCR 检测产物

Fig. 1 Electrophoretogram of  $\alpha 1$ -AT exon 5 in PCR products

M: Marker; 1, 2: ZZ; 3, 4: MM; 5, 6: MZ

TFPI 基因 T287C 片段酶切产物紫外线凝胶成像可见 3 种类型: TT 纯合子基因型显示 510 bp 一条区带, TC 杂合子基因型显示 510、307 和 203 bp 三条区带, 而 CC 纯合子基因型则显示 307 bp 和 203

bp 两条区带(图 2)。每组随机抽取 20 个初步确定基因型样本, PCR 扩增后, 送上海生工生物工程技术服务公司进行 DNA 序列测定获得确认。

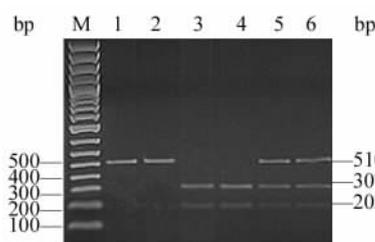


图 2 *TFPI* 基因 T287C PCR 检测产物  
Fig. 2 The electrophoretogram of *TFPI* gene T287C in PCR products

M: Marker; 1,2: TT; 3,4: TC; 5,6: CC

## 2.2 $\alpha 1$ -AT 基因第 5 外显子和 *TFPI* 基因 T287C 多态性及其交互作用和大肠癌侵袭、转移的关系

$\alpha 1$ -AT 基因第 5 外显子 MM、MZ 和 ZZ 基因型频率在 I、II、III、IV 期组与 0 期对照组之间有显著差异 ( $P < 0.01$ ); 等位基因 Z 在大肠癌侵袭、转移各组 (I、II、III 和 IV 期) 和 0 期组之间的分布差异均具有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), 且 OR 值大于 1, 说明含等位基因 Z 的大肠癌个体发生侵袭、转移的风险相对较高, MZ 和 ZZ 基因型大肠癌个体具有发生侵袭、转移的风险较高 (表 1)。

与  $\alpha 1$ -AT 基因相似, 含 *TFPI* 基因 T287C 等位基因 C 的大肠癌个体发生侵袭、转移的风险相对较高, 说明 TC 和 CC 基因型大肠癌个体具有发生侵袭、转移的风险较高 (表 2)。

基因突变的协同分析发现, 在  $\alpha 1$ -AT (MZ) 和 *TFPI* (TC) 之间、 $\alpha 1$ -AT (MZ) 和 *TFPI* (CC) 之间、 $\alpha 1$ -AT (ZZ) 和 *TFPI* (TC) 及  $\alpha 1$ -AT (ZZ) 和 *TFPI* (CC) 之间均存在正向交互作用 (均  $\gamma > 1$ , 表 3)。

表 1  $\alpha 1$ -AT 基因第 5 外显子基因型与等位基因分布 [  $N = 180, n(\%)$  ]

Tab. 1 Distribution of genotypes and alleles in  $\alpha 1$ -AT exon 5 [  $N = 180, n(\%)$  ]

Group	Genotype			Allele	
	MM	MZ	ZZ	M	Z
Stage 0	129 ( 71.67 )	25( 13.89 )	26( 14.44 )	283 ( 78.61 )	77( 21.39 )
Stage I	89 ( 49.44 )	44( 24.44 )	47( 26.11 )	222 ( 61.67 )	138 ( 38.33 )
ORstage I	1.00	2.5510**	2.6201**	1.00	2.2846**
Stage II	51( 28.33 )	62( 34.44 )	67( 37.22 )	164( 45.56 )	196( 54.44 )
ORstage II	1.00	6.2729 $\Delta\Delta$	6.5180 $\Delta\Delta$	1.00	4.3924 $\Delta\Delta$
Stage III	32( 17.78 )	72 ( 40.00 )	76 ( 42.22 )	136( 37.78 )	224( 62.22 )
ORstage III	1.00	11.6100 $\blacktriangle\blacktriangle$	11.7836 $\blacktriangle\blacktriangle$	1.00	6.0534 $\blacktriangle\blacktriangle$
Stage IV	14( 7.78 )	81( 45.00 )	85( 47.22 )	109( 30.28 )	251( 69.72 )
ORstage IV	1.00	29.8542 $\nabla\nabla$	30.1236 $\nabla\nabla$	1.00	8.4633 $\nabla\nabla$

\*\*  $P < 0.01$ ,  $\Delta\Delta P < 0.01$ ,  $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$  and  $\nabla\nabla P < 0.01$  vs stage 0

表 2 *TFPI* 基因 T287C 基因型与等位基因分布 [  $N = 180, n(\%)$  ]

Tab. 2 Distribution of genotypes and alleles in *TFPI* gene T287C [  $N = 180, n(\%)$  ]

Group	Genotype			Allele	
	TT	TC	CC	T	C
Stage 0	132 ( 73.33 )	23( 12.78 )	25( 13.89 )	287 ( 79.72 )	73 ( 20.28 )
Stage I	91 ( 50.56 )	43( 23.89 )	46( 25.56 )	225 ( 62.50 )	135 ( 37.50 )
ORstage I	1.00	2.7118**	2.6690**	1.00	2.3589**
Stage II	52( 28.89 )	63( 35.00 )	65( 36.11 )	167( 46.39 )	193( 53.61 )
ORstage II	1.00	6.9531 $\Delta\Delta$	6.6000 $\Delta\Delta$	1.00	4.5435 $\Delta\Delta$
Stage III	31( 17.22 )	74 ( 40.11 )	75 ( 41.67 )	136( 37.78 )	224( 62.22 )
ORstage III	1.00	13.6998 $\blacktriangle\blacktriangle$	12.7741 $\blacktriangle\blacktriangle$	1.00	6.4754 $\blacktriangle\blacktriangle$
Stage IV	15( 8.33 )	81( 45.00 )	84( 46.67 )	111( 30.83 )	249( 69.17 )
ORstage IV	1.00	30.9913 $\nabla\nabla$	29.5680 $\nabla\nabla$	1.00	8.8193 $\nabla\nabla$

\*\*  $P < 0.01$ ,  $\Delta\Delta P < 0.01$ ,  $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$  and  $\nabla\nabla P < 0.01$  vs stage 0

表3  $\alpha 1$ -AT 基因第5外显子和 *TFPI* 基因 T287C 多态性在大肠癌侵袭和转移中的交互作用[  $N = 180, n( \% )$  ]

Tab.3 Interaction of polymorphisms between  $\alpha 1$ -AT exon 5 and *TFPI* gene T287C in invasion and metastasis of the colorectal cancer[  $N = 180, n( \% )$  ]

Group	Combined genotype of $\alpha 1$ -AT gene exon 5 and <i>TFPI</i> gene T287C [ $n( \% )$ ]								
	MM/TT	MM/TC	MM/CC	MZ/TT	MZ/TC	MZ/CC	ZZ/TT	ZZ/TC	ZZ/CC
Stage 0	95( 52.78 )	16( 8.89 )	18( 10.00 )	18( 10.00 )	3( 1.67 )	4( 2.22 )	19( 10.56 )	4( 2.22 )	3( 1.67 )
Stage I	45( 25.00 )	21( 11.67 )	23( 12.78 )	22( 12.22 )	11( 6.11 )	11( 6.11 )	24( 13.33 )	11( 6.11 )	12( 6.67 )
ORstage I	1.00	2.72 ( OR1 )	2.64 ( OR2 )	2.51 ( OR3 )	7.74 ( OR1 * 3 )	5.84 ( OR2 * 3 )	2.66 ( OR4 )	5.84 ( OR1 * 4 )	8.47 ( OR2 * 4 )
$\gamma$ stage I					2.2241, 2.0451	1.9184, 1.8136		1.8068, 1.7640	2.1810, 2.1949
Stage II	15( 8.33 )	18( 10.00 )	18( 10.00 )	18( 10.00 )	22( 12.22 )	22( 12.22 )	19( 10.56 )	23( 12.78 )	25( 13.87 )
ORstage II	1.00	7.12 $\Delta\Delta$ ( OR1 )	6.33 $\Delta\Delta$ ( OR2 )	6.33 $\Delta\Delta$ ( OR3 )	46.44 $\Delta\Delta$ ( OR1 * 3 )	34.83 $\Delta\Delta$ ( OR2 * 3 )	6.33 $\Delta\Delta$ ( OR4 )	36.41 $\Delta\Delta$ ( OR1 * 4 )	52.78 $\Delta\Delta$ ( OR2 * 4 )
$\gamma$ stage II					2.0795, 1.9548	1.9236, 1.9236		1.9477, 1.8310	2.1487, 2.1487
Stage III	6( 3.33 )	13( 7.22 )	13( 7.22 )	12( 6.67 )	30( 16.67 )	30( 16.67 )	13( 7.22 )	31( 17.22 )	32( 17.78 )
ORstage III	1.00	12.86 $\Delta\Delta$ ( OR1 )	11.44 $\Delta\Delta$ ( OR2 )	10.56 $\Delta\Delta$ ( OR3 )	158.33 $\Delta\Delta$ ( OR1 * 3 )	118.75 $\Delta\Delta$ ( OR2 * 3 )	10.83 $\Delta\Delta$ ( OR4 )	122.71 $\Delta\Delta$ ( OR1 * 4 )	168.89 $\Delta\Delta$ ( OR2 * 4 )
$\gamma$ stage III					2.1491, 1.9827	2.0270, 1.9605		2.0186, 1.8829	2.1527, 2.1051
Stage IV	2( 1.11 )	5( 2.78 )	7( 3.89 )	7( 3.89 )	36( 20.00 )	38( 21.11 )	6( 3.33 )	40( 22.22 )	39( 21.67 )
ORstage IV	1.00	14.84 $\nabla\nabla$ ( OR1 )	18.47 $\nabla\nabla$ ( OR2 )	18.47 $\nabla\nabla$ ( OR3 )	570.01 $\nabla\nabla$ ( OR1 * 3 )	451.25 $\nabla\nabla$ ( OR2 * 3 )	14.90 $\nabla\nabla$ ( OR4 )	475.22 $\nabla\nabla$ ( OR1 * 4 )	617.97 $\nabla\nabla$ ( OR2 * 4 )
$\gamma$ stage IV					2.3745, 2.3522	2.2873, 2.2873		2.2815, 2.2850	2.3788, 2.4050

$\Delta\Delta P < 0.01$  vs ORstage I ;  $\Delta\Delta P < 0.01$  vs OR Stage I or OR stage II ;  $\nabla\nabla P < 0.01$  vs ORstage I or ORstage II or ORstage III

2.3 大肠癌 TNM 各期患者血清  $\alpha 1$ -AT 和 *TFPI* 表达与  $\alpha 1$ -AT 基因第5外显子和 *TFPI* 基因 T287C 基因型的关系

TNM I、II、III 和 IV 期患者血清  $\alpha 1$ -AT 表达水平明显低于 0 期患者,且 I、II、III 和 IV 期患者之间  $\alpha 1$ -AT 表达水平也有明显差异,随期数增加而减少 ( $P < 0.05$ ) (表4)。各期  $\alpha 1$ -AT (MZ)、 $\alpha 1$ -AT (ZZ) 基因型携带者的血清  $\alpha 1$ -AT 表达水平明显低于同一期  $\alpha 1$ -AT (MM) 携带者 ( $P < 0.01$ ),而且不同期相同基因型患者血清  $\alpha 1$ -AT 表达水平也有显著差异 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ) (表5)。TNM 各期患者 *TFPI* T287C 基因型和血清 *TFPI* 表达的关系亦符合上述规律(表6-7)。

表4 大肠癌 TNM 各期血清  $\alpha 1$ -AT 的表达(  $n = 180$  )

Tab.4 Expressions of  $\alpha 1$ -AT in serum of the patients with TNM stages of colorectal cancer(  $n = 180$  )

Group	$\alpha 1$ -AT in serum [ $\rho_B / ( \text{mg} \cdot \text{ml}^{-1} )$ ]
Stage 0	2.39 ± 1.15
Stage I	1.91 ± 0.43*
Stage II	1.54 ± 0.67** $\Delta$
Stage III	1.22 ± 0.58)** $\Delta\Delta$ $\Delta$
Stage IV	0.90 ± 0.42** $\Delta\Delta$ $\Delta\Delta$ $\nabla$

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs stage 0;  $\Delta P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta P < 0.01$  vs stage I ;  $\Delta P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta P < 0.01$  vs stage II ;  $\nabla P < 0.05$  vs stage III

表 5  $\alpha 1$ -AT 基因第 5 外显子多态性对血清  $\alpha 1$ -AT 表达的影响 [ $\rho_B / (\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1})$ ]Tab. 5 Effects of polymorphism of the  $\alpha 1$ -AT exon 5 on expression of  $\alpha 1$ -AT in serum [ $\rho_B / (\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1})$ ]

Group	Expression of $\alpha 1$ -AT in serum for various genotype of $\alpha 1$ -AT exon 5		
	MM	MZ	ZZ
Stage 0	2.71 $\pm$ 0.82	1.56 $\pm$ 0.38 **	1.58 $\pm$ 0.74 **
Stage I	2.44 $\pm$ 0.46 $\Delta$	1.41 $\pm$ 0.79 ** $\Delta$	1.40 $\pm$ 0.51 ** $\Delta$
Stage II	2.23 $\pm$ 0.27 $\Delta\Delta\Delta$	1.25 $\pm$ 0.42 ** $\Delta\Delta\Delta$	1.23 $\pm$ 0.54 ** $\Delta\Delta\Delta$
Stage III	1.89 $\pm$ 0.48 $\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta$	1.08 $\pm$ 0.25 ** $\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta$	1.05 $\pm$ 0.32 ** $\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta$
Stage IV	1.62 $\pm$ 0.37) $\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta$	0.87 $\pm$ 0.36 ** $\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta$	0.83 $\pm$ 0.31 ** $\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta$

\*\*  $P < 0.01$  vs MM in the same stage;  $\Delta P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta P < 0.01$  vs stage 0;  $\Delta P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta P < 0.01$  vs stage I;

$\Delta\Delta\Delta P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta\Delta\Delta P < 0.01$  vs stage II;  $\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta P < 0.05$  vs stage III

#### 2.4 $\alpha 1$ -AT 和 TFPI 体外抑制结肠癌 SW480 细胞迁移及侵袭

细胞划痕试验结果(图 3)显示, $\alpha 1$ -AT 组、TFPI 组和联合药物组 24 和 48 h 细胞划痕愈合率显著低于溶剂对照组( $P < 0.01$ ),联合药物组细胞划痕愈合率显著低于  $\alpha 1$ -AT 组和 TFPI 组( $P < 0.01$ )。Transwell 侵袭试验结果(图 4)显示, $\alpha 1$ -AT 组、TFPI 组和联合药物组 24 h 和 48 h 穿过小室的细胞数比溶剂对照组明显减少( $P < 0.05$ ),联合药物组穿过小室的细胞数显著低于  $\alpha 1$ -AT 组和 TFPI 组( $P < 0.01$ )。Western blotting 结果(图 5~7)显示, $\alpha 1$ -AT 可明显抑制 SW480 细胞胰蛋白酶和 PAR-2 的表达,对 TF 表达无明显影响;TFPI 则明显抑制 TF 和 PAR-2 表达,而对胰蛋白酶表达无明显影响。

表 6 大肠癌各期血清 TFPI 的表达 [ $\rho_B / (\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1})$ ]Tab. 6 Expressions of TFPI in serum of the patients with various stages of colorectal cancer [ $\rho_B / (\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1})$ ]

Group	TFPI in serum
Stage I	144.38 $\pm$ 10.24
Stage I	108.74 $\pm$ 27.57*
Stage II	79.21 $\pm$ 23.73** $\Delta$
Stage III	56.41 $\pm$ 25.53** $\Delta\Delta\Delta$
Stage IV	39.79 $\pm$ 17.42** $\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta$

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs stage 0;  $\Delta P < 0.05$ ,

$\Delta\Delta P < 0.01$  vs stage I;  $\Delta P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta P < 0.01$

vs stage II;  $\Delta\Delta\Delta P < 0.05$  vs stage III

表 7 TFPI 基因 T287C 多态性对血清 TFPI 表达的影响 [ $\rho_B / (\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1})$ ]Tab. 7 Effects of polymorphism of TFPI gene T287C on expression of TFPI in serum [ $\rho_B / (\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1})$ ]

Group	Expression of $\alpha 1$ -AT in serum for various genotype of $\alpha 1$ -AT exon 5		
	TT	TC	CC
Stage 0	165.20 $\pm$ 41.70	89.60 $\pm$ 22.51 **	87.44 $\pm$ 20.16 **
Stage I	142.58 $\pm$ 16.51 $\Delta$	75.38 $\pm$ 12.73 ** $\Delta$	74.65 $\pm$ 29.71 ** $\Delta$
Stage II	129.35 $\pm$ 16.27 $\Delta\Delta\Delta$	59.93 $\pm$ 26.71 ** $\Delta\Delta\Delta$	59.24 $\pm$ 18.43 ** $\Delta\Delta\Delta$
Stage III	107.97 $\pm$ 28.53 $\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta$	47.42 $\pm$ 15.82 ** $\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta$	45.57 $\pm$ 14.78 ** $\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta$
Stage IV	93.65 $\pm$ 15.32 $\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta$	34.79 $\pm$ 10.17 ** $\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta$	35.21 $\pm$ 19.85 ** $\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta$

\*\*  $P < 0.01$  vs TT in the same stage;  $\Delta P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta P < 0.01$  vs stage 0;  $\Delta P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta P < 0.01$  vs stage I;

$\Delta\Delta\Delta P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta\Delta\Delta P < 0.01$  vs stage II;  $\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta P < 0.05$  vs stage III

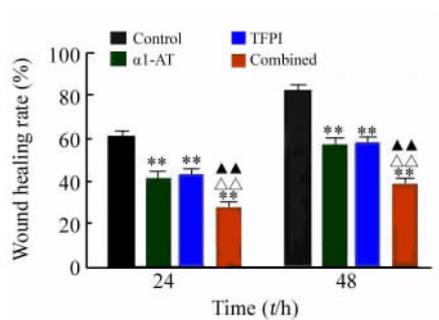


图3 α1-AT 和 TFPI 对 SW480 细胞划痕愈合率的影响

Fig.3 Effects of α1-AT and TFPI on wound healing rate of the SW480 cells

\*\* P < 0.01 vs control group; ΔΔ P < 0.01 vs α1-AT group; ▲▲ P < 0.01 vs TFPI group

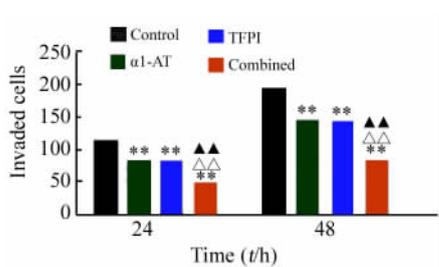


图4 α1-AT 和 TFPI 对 SW480 细胞侵袭的影响

Fig.4 Effects of α1-AT and TFPI on invasion of the SW480 cells

\*\* P < 0.01 vs control group; ΔΔ P < 0.05 vs α1-AT group; ▲▲ P < 0.01 vs TFPI group

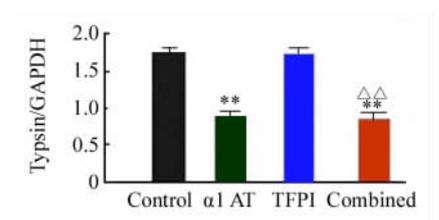


图5 α1-AT 和 TFPI 对 SW480 细胞胰蛋白酶表达水平的影响

Fig.5 Effects of α1-AT and TFPI on expression of trypsin in the SW480 cells

\*\* P < 0.01 vs control group; ΔΔ P > 0.05 vs TFPI group

### 3 讨论

α1-AT 为一种广谱蛋白酶抑制剂的糖蛋白,由肝细胞合成,其生物学作用可抑制胰蛋白酶、类胰蛋白酶、膜型丝氨酸蛋白酶-1 和纤溶酶等蛋白酶<sup>[15-16]</sup>。TFPI 是 TF/FVIIa 复合物的唯一生理抑制

剂。本研究中结肠癌 SW480 细胞体外干预实验结果显示,α1-AT 和 TFPI 分别通过降低结肠癌 SW480 细胞的胰蛋白酶和 TF 表达,抑制 PAR-2 激活,抑制结肠癌细胞的迁移和侵袭。因此,作为调节 PAR-2 激活剂的重要因素,α1-AT 和 TFPI 基因突变或其他因素导致的生物学活性变化可影响大肠癌细胞侵袭、转移的发生和发展。

对 α1-AT 基因第 5 外显子基因型分布研究结果显示,各侵袭、转移组(I~IV 期组)MZ 和 ZZ 基因型频率明显高于无侵袭、转移组(0 期组),携带 MZ 和 ZZ 基因型患者发生癌细胞侵袭、转移的风险高于携带 MM 基因型患者,各期患者的 OR 值均大于 1,与相关研究<sup>[17-19]</sup>结论一致。

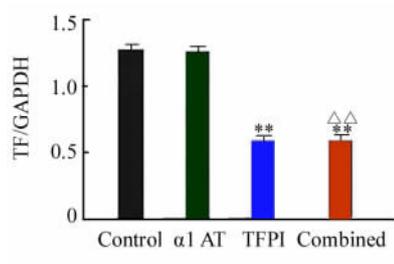


图6 α1-AT 和 TFPI 对 SW480 细胞 TF 表达水平的影响

Fig.6 Effects of α1-AT and TFPI on expression of TF in the SW480 cells

\*\* P < 0.01 vs control group; ΔΔ P < 0.01 vs α1-AT group

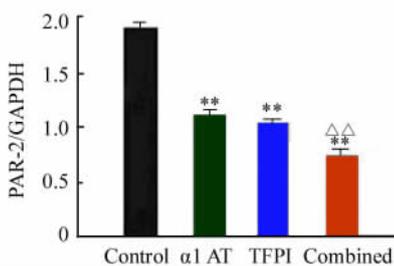


图7 α1-AT 和 TFPI 对 SW480 细胞 PAR-2 表达水平的影响

Fig.7 Effects of α1-AT and TFPI on expression of PAR-2 in the SW480 cells

\*\* P < 0.01 vs control group; ΔΔ P < 0.01 vs TFPI or α1-AT group

TFPI 基因 T287C 的 TC 和 CC 基因型大肠癌患者发生侵袭、转移的风险也显著增加,与 α1-AT 基因第 5 外显子相似。研究<sup>[20-21]</sup>认为,C 等位基因的存在引起 TFPI 活性下降,因此 TC 和 CC 基因型者体内 TFPI 活性降低,抑制 TF/FVIIa 复合物的作用减弱,从而促进恶性肿瘤的发生和侵袭、转移。

本研究对基因突变协同作用的分析发现,  $\alpha 1$ -AT 基因第 5 外显子突变纯合子 ZZ 与 TFPI 基因 T287C 突变纯合子 CC 的交互作用增加了大肠癌发生侵袭、转移的风险。 $\alpha 1$ -AT (ZZ) 和 TFPI (CC) 基因型对大肠癌发生侵袭、转移的风险有显著相互放大效应 ( $\gamma$  均大于 1)。此外, 两基因的杂合子与杂合子之间、杂合子与突变纯合子之间也存在明显的正向交互作用 ( $\gamma$  均大于 1)。I ~ IV 期组分别和 0 期组配对  $\chi^2$  检验所得数据显示,  $\alpha 1$ -AT (MZ)、 $\alpha 1$ -AT (ZZ)、TFPI (TC) 和 TFPI (CC) 基因型均是大肠癌侵袭与转移的易患因素, 基因多态性的交互作用增加了大肠癌侵袭与转移风险。

为进一步了解  $\alpha 1$ -AT 基因第 5 外显子和 TFPI 基因 T287C 多态性及交互作用在大肠癌侵袭与转移中的作用, 本研究又对不同侵袭、转移组 (I ~ IV 期) 之间的基因型频率和等位基因频率进行  $\chi^2$  检验和相对危险度比较。研究显示, 无论是单  $\alpha 1$ -AT 基因第 5 外显子突变基因型、单 TFPI 基因 T287C 突变基因型或联合突变基因型在 I ~ IV 期之间的分布频率及相应 OR 值均具有明显差异 ( $P < 0.01$ ), 进一步揭示  $\alpha 1$ -AT 和 TFPI 不仅增加癌细胞发生侵袭、转移的风险, 而且在大肠癌侵袭、转移进展演变中发挥重要作用。

为进一步研究上述基因突变影响大肠癌侵袭、转移的机制, 本研究又分别分析了血清  $\alpha 1$ -AT、TFPI 表达和大肠癌分期以及和相应基因多态性之间的关系。研究显示,  $\alpha 1$ -AT 表达随 TNM 分期的升高而升高, 各 TNM 分期患者之间  $\alpha 1$ -AT 表达有明显差异, 提示  $\alpha 1$ -AT 表达和大肠癌的侵袭、转移密切相关, 血清  $\alpha 1$ -AT 表达增高可能促进癌细胞的侵袭、转移; 每一 TNM 分期  $\alpha 1$ -AT 基因第 5 外显子突变基因型携带者血清的  $\alpha 1$ -AT 均明显高于同一分期的野生型纯合子基因携带者的血清  $\alpha 1$ -AT 表达 ( $P < 0.01$ ), 提示  $\alpha 1$ -AT 基因第 5 外显子基因突变可以明显提高血清  $\alpha 1$ -AT 表达, 这可能是  $\alpha 1$ -AT 基因第 5 外显子突变促进癌细胞侵袭、转移的重要机制。另外本研究还显示, 相同基因型不同 TNM 分期的血清  $\alpha 1$ -AT 也有显著差异, 说明  $\alpha 1$ -AT 基因第 5 外显子基因型虽是影响血清  $\alpha 1$ -AT 的重要因素, 但不是唯一因素。同样, 血清 TFPI 表达与 TFPI 基因 T287C 基因型和大肠癌 TNM 分期的关系亦符合上述规律。还有哪些因素影响血清  $\alpha 1$ -AT 和 TFPI 表达水平值得进一步研究。

#### [ 参 考 文 献 ]

[ 1 ] XIE L Q, DUAN Z X, LIU C J, et al. Protease-activated receptor

2 agonist increases cell proliferation and invasion of human pancreatic cancer cells [ J ]. *Exp Ther Med*, 2015, 9 ( 1 ): 239-244. DOI: 10.3892/etm.2014.2052.

- [ 2 ] SEDDA S, MARAFINI I, CARUSO R, et al. Proteinase activated-receptors-associated signaling in the control of gastric cancer [ J ]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20 ( 34 ): 11977-11984. DOI: 10.3748/wjg.v20.i34.11977.
- [ 3 ] LIN Z M, ZHAO J X, DUAN X N, et al. Effects of tissue factor, PAR-2 and MMP-9 expression on human breast cancer cell line MCF-7 invasion [ J ]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15 ( 2 ): 643-646. DOI: 10.7314/apjcp.2014.15.2.643.
- [ 4 ] CHANG L H, PAN S L, LAI C Y, et al. Activated PAR-2 regulates pancreatic cancer progression through ILK/HIF- $\alpha$ -induced TGF- $\alpha$  expression and MEK/VEGF-A-mediated angiogenesis [ J ]. *Am J Pathol*, 2013, 183 ( 2 ): 566-575. DOI: 10.1016/j.ajpath.2013.04.022.
- [ 5 ] WIECZOREK E, JABLONSKA E, WASOWICZ W, et al. Matrix metalloproteinases and genetic mouse models in cancer research: a mini-review [ J ]. *Tumour Biol*, 2015, 6 ( 1 ): 163-175. DOI: 10.1007/s13277-014-2747-6.
- [ 6 ] WANG Y, HUANG L, WU S Q, et al. Bioinformatics analyses of the role of vascular endothelial growth factor in patients with non-small cell lung cancer [ J/OL ]. *PLoS ONE*, 2015, 10 ( 9 ): e0139285 [ 2015-12-05 ]. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0139285>. DOI: 10.1371/journal.pone.0139285.
- [ 7 ] WANG G J, WANG Y B, LI D N, et al. Expression of protease-activated receptor-2 in human gastric stromal tumor and its clinicopathological significance [ J ]. *Hepatogastroenterology*, 2013, 60 ( 128 ): 2125-2128.
- [ 8 ] GU Y X, CHENG Y, SONG Y, et al. MicroRNA-493 suppresses tumor growth, invasion and metastasis of lung cancer by regulating E2F1 [ J ]. *PLoS ONE*, 2014, 9 ( 8 ): e102602. DOI: 10.1371/journal.pone.0102602.
- [ 9 ] TORRES-DURAN M, RUANO-RAVINA A, PARENTE-LAMELAS I, et al. Alpha-1 antitrypsin deficiency and Lung cancer Risk: A case-control study in never-smokers [ J ]. *J Thorac Oncol*, 2015, 10 ( 9 ): 1279-1284. DOI: 10.1097/jto.0000000000000609.
- [ 10 ] HE H L, ZHANG J B, LI Q. Clinical significance of expression of tissue factor and tissue factor pathway inhibitor in ulcerative colitis [ J ]. *World J Gastroenterol*. 2014, 20 ( 23 ): 7461-7465. DOI: 10.3748/wjg.v20.i23.7461.
- [ 11 ] KIM S S, CHOI B Y, SEO S I, et al. The comparison between 6th and 7th international union against cancer/American joint committee on cancer classification for survival prognosis of gastric cancer [ J ]. *Korean J Gastroenterol*, 2011, 58 ( 5 ): 258-263. DOI: 10.4166/kjg.2011.58.5.258.
- [ 12 ] ALJARALLAH B, ALI A, DOWAIDAR M, et al. Prevalence of  $\alpha 1$ -antitrypsin gene mutations in Saudi Arabia [ J ]. *Saudi J Gastroenterol*, 2011, 17 ( 4 ): 256-260. DOI: 10.4103/1319-3767.82580.
- [ 13 ] OPSTAD T B, PETERSEN A A, WEISS T, et al. Gender differences of polymorphisms in the TF and TFPI genes, as related to

- phenotypes in patients with coronary heart disease and type-2 diabetes [ J/OL ]. *Thromb J*, 2010, 8:7 [ 2015-12-05 ]. <http://thrombosisjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1477-9560-8-7>. DOI: 10.1186/1477-9560-8-7.
- [ 14 ] WALLACE H M. A model of gene-gene and gene-environment interactions and its implications for targeting environmental interventions by genotype [ J/OL ]. *Theor Biol Med Model*, 2006, 3:35 [ 2015-12-05 ]. <http://tbiomed.biomedcentral.com/articles/10.1186/1742-4682-3-35>. DOI:10.1186/1742-4682-3-35.
- [ 15 ] MOHAMMAD A, SEGELMARK M. Primary systemic vasculitis with severe  $\alpha$ 1-antitrypsin deficiency revisited [ J ]. *J Rheumatol*, 2014, 43 ( 3 ): 242-245. DOI: 10.3109/03009742.2013.846405.
- [ 16 ] BALDUYCK M, ODOU MF, ZERIMECH F, et al. Diagnosis of alpha-1 antitrypsin deficiency: modalities, indications and diagnosis strategy [ J ]. *Rev Mal Respir*, 2014, 31( 8 ): 729-745. DOI: 10.1016/j.rmr.2014.06.001.
- [ 17 ] HUGHES V A, MEKLEMBURG R, BOTTOMLEY S P, et al. The Z mutation alters the global structural dynamics of  $\alpha$ 1-antitrypsin [ J ]. *PLoS ONE*, 2014, 9( 9 ): e102617. DOI: 10.1371/journal.pone.0102617.
- [ 18 ] VAN 'T WOUT E F, DICKENS J A, VAN SCHADEWIJK A, et al. Increased ERK signalling promotes inflammatory signalling in primary airway epithelial cells expressing Z  $\alpha$ 1-antitrypsin [ J ]. *Hum Mol Genet*, 2014, 23( 4 ): 929-941. DOI: 10.1093/hmg/ddt487.
- [ 19 ] ALAM S, LI Z J, ATKINSON C, et al.  $\alpha$ 1-antitrypsin confers a proinflammatory phenotype that contributes to chronic obstructive pulmonary disease [ J ]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2014, 189 ( 8 ): 909-931. DOI: 10.1164/rccm.201308-1458oc.
- [ 20 ] 黄灿, 侯丽虹, 李参, 等. 脑梗死患者组织因子途径抑制物基因-287T/C 多态性 [ J ]. *中国药物与临床*, 2012, 12( 7 ): 854-856. DOI: 10.3969/j.issn.1671-2560.2012.07.005.
- [ 21 ] OPSTAD T B, EILERTSEN A L, HØIBRAATEN E, et al. Tissue factor pathway inhibitor polymorphisms in women with and without a history of venous thrombosis and the effects of postmenopausal hormone therapy [ J ]. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 2010, 21( 6 ): 516-521. DOI: 10.1097/mbc.0b013e32833a06cd.
- [ 收稿日期 ] 2016-02-01 [ 修回日期 ] 2016-04-24  
[ 本文编辑 ] 宋关鸿

· 读者 · 作者 · 编者 ·

## 《中国肿瘤生物治疗杂志》征稿和征订启事

《中国肿瘤生物治疗杂志》是由中国免疫学会和中国抗癌协会联合主办的高级学术刊物,为中国精品科技期刊、RCCSE 中国权威学术期刊、中国中文核心期刊、中国科学引文数据库核心源期刊、中国科技核心期刊、中国人民解放军优秀医学期刊,为同行专家评审期刊;获 2015-2017 年度中国科协精品科技期刊工程项目资助。本刊主要报道肿瘤生物治疗领域基础研究和临床应用的新成果、新理论、新技术和新经验,常设有述评、院士论坛、专家论坛、研究快报、青年学者论坛、基础研究、临床研究、转化医学、技术方法、短篇论著、学术争鸣、文献综述、个案报告等栏目,以从事肿瘤防治的中高级临床和科研工作者、医药院校师生及相关学科科技人员为读者对象。双月刊(2017 年始改为月刊),每双月底 20 日出版,国内外公开发行。

本刊主编为中国医学科学院院长、中国免疫学会理事长曹雪涛院士,编委会由包括 15 名院士和 9 名外籍专家的众多名家大师组成。本刊已被美国《化学文摘》(CA)、俄罗斯《文摘杂志》(AJ)、荷兰《医学文摘》(EMbase)等 10 个国际著名检索系统收录。本刊在国内肿瘤学领域的学术地位和影响力名列前茅,在国际学术界的显示度日益广泛和增强。

本刊使用网络远程投稿、审稿系统和编校管理系统进行编辑出版工作,工作效率高,编校质量好,论文发表周期短。另设“快速发表通道”,将有较高创新性的论文以 2~3 个月的速度快速发表。

热忱欢迎广大肿瘤防治工作者通过本刊网站投稿系统、电子信箱踊跃投稿。

《中国肿瘤生物治疗杂志》每册定价 15.00 元,全年定价 90.00 元。邮发代号: 4-576,请通过当地邮局订阅。若错过,可从本刊编辑部补订,请将 90.00 元(优惠免邮资)寄编辑部,并注明详细通讯地址及邮政编码,编辑部负责将每期杂志准时寄给您。

联系地址:上海市翔殷路 800 号;第二军医大学免疫楼《中国肿瘤生物治疗杂志》编辑部(邮编 200433)

联系人:韩丹 黄静怡

联系电话: 021-55620605 × 22, 021-81871002 × 22

传 真: 021-81871007; 网 址: [www.biother.org](http://www.biother.org); 电子邮箱: [cjcb@biother.org](mailto:cjcb@biother.org)