

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.19.004

DHA 通过抑制氧化应激反应减轻七氟烷所致神经元损伤 *

赵 敏¹ 赵 品¹ 葛 娜¹ 李 潇¹ 张尚民² 蒯建科^{1Δ}

(1 西安市第三医院麻醉科 陕西 西安 710000; 2 西安安琪儿妇产医院麻醉科 陕西 西安 710000)

摘要 目的:观察二十二碳六烯酸(DHA)是否通过抑制氧化应激反应减轻七氟烷所致神经元损伤。**方法:**HT22 小鼠海马神经元分为 Con 组、DHA 组和 Sevo 组和 DHA+Sevo 组,药物处理各组细胞 24 h 后,在倒置相差显微镜下拍照记录各组细胞形态改变,采用 MTT 法检测神经元存活情况,检测各组培养基中 LDH、NO、SOD 及 MDA 的含量。**结果:**CON 组和 DHA 组细胞形态正常,Sevo 组细胞皱缩,胞体破裂,正常形态消失,而 DHA+Sevo 组细胞形态基本正常,皱缩破裂的细胞较少;与 CON 组和 DHA 组相比,Sevo 组 HT22 细胞存活率下降至 CON 组的 25.79%,培养液中 LDH 的漏出量显著增加至 CON 组的 400.15%,SOD 活力下降至 CON 组的 30.96%,培养液中 NO 及 MDA 的含量分别增加至 CON 组的 507.62%和 342.15%($P<0.05$);而与 Sevo 组相比,DHA+Sevo 组 HT22 细胞存活率增加至 CON 组的 75.68%,培养液中 LDH 的漏出量下降至 CON 组的 175.68%,SOD 活力增加至 CON 组的 70.48%,培养液中 NO 及 MDA 的含量分别下降至 CON 组的 355.80%和 192.27%($P<0.05$)。**结论:**DHA 通过抗氧化应激反应减轻七氟烷对 HT22 细胞的损伤。

关键词:DHA;神经元;七氟烷;氧化应激

中图分类号:R-33;R338;R614 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2018)19-3618-05

DHA Attenuates Sevoflurane-induced Neuronal Damage through an Anti-oxidative Stress Response*

ZHAO Min¹, ZHAO Pin¹, GE Na¹, LI Xiao¹, ZHANG Shang-min², KUAI Jian-ke^{1Δ}

(1 Department of Anesthesiology, Xi'an No.3 hospital, Xi'an, Shaanxi, 710000, China;

2 Department of Anesthesiology, Xi'an angel women's hospital, Xi'an, Shaanxi, 710000, China)

ABSTRACT Objective: To observe whether DHA ameliorate sevoflurane-induced neuronal damage and explore the possible mechanism. **Methods:** Cells were assigned to Con group, DHA group, Sevo group and DHA+Sevo group. After treated, the cell morphology changes were photographed under inverted phase contrast microscope, and cell survival was assessed by MTT assay; then the medium was used to assess the concentration of LDH, SOD, NO and MDA. **Results:** In CON and DHA groups, the cell morphology was normal, the cells in Sevo group were collapsed, the cell body ruptured and the normal morphology disappeared. However, the cell morphology in DHA+Sevo group was normal and there were fewer rupture cells. Compared with CON group and DHA group, the survival rate of HT22 cells in Sevo group decreased, the amount of LDH leakage and the activity of SOD decreased, the content of NO and MDA in the culture fluid increased significantly ($P<0.05$); Compared with the Sevo group, the viability of HT22 cells in DHA + Sevo group was significantly increased, the leakage of LDH in the culture fluid decreased, and the activity of SOD increased. The content of NO and MDA in the culture fluid decreased($P<0.05$). **Conclusion:** DHA attenuates sevoflurane-induced damage to HT22 cells through an anti-oxidative stress response.

Key words: DHA; Neuron; Sevoflurane; Oxidative stress

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R338; R614 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)19-3618-05

前言

七氟烷因其具有气味芳香,刺激性小,诱导苏醒均较快等优点,是一种在临床麻醉工作中被广泛使用的挥发性麻醉药。但七氟烷具有潜在神经损害作用,据报道可能与老年患者术后认知功能障碍的发生有关^[1,2]。在一项以幼年动物为实验对象的研究中发现七氟烷通过氧化应激反应,介导幼年动物神经损害

及脑发育障碍^[3]。DHA 是一种不饱和脂肪酸,是神经元胞膜的重要组成部分,DHA 在脑内的功能与神经细胞之间信号传递,防止细胞骨架蛋白降解以及抑制氧化应激和脂质过氧化反应有关。一项随机对照的研究表明在膳食中添加 DHA 的人群,阿尔兹海默症的发病率下降^[4]。但 DHA 是否能减轻七氟烷所致的神经损害尚缺乏文献报道,我们设计如下实验观察 DHA 是否通过抗氧化应激的作用减轻七氟烷对 HT22 小鼠海马神经

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81470414)

作者简介:赵敏(1979-),主治医师,研究方向:吸入麻醉药的神经毒性,电话:15398023886, E-mail: 3431793243@qq.com

Δ 通讯作者:蒯建科,副主任医师,研究方向:吸入麻醉药与神经保护,电话:13572289310, E-mail: kjk20060317@126.com

(收稿日期:2018-03-21 接受日期:2018-04-17)

元的损伤。

1 材料与方法

1.1 材料

HT-22 小鼠海马神经元细胞系由空军军医大学西京医院神经内科惠赠,七氟烷(上海恒瑞医药有限公司); β - 巯基乙醇和四甲基偶氮唑盐 (MTT)(科昊试剂公司);DMEM 细胞培养基(美国 Hyclone);0.25%胰蛋白酶和青链霉素混合溶液(美国 Hyclone);DHA(绿叶生物试剂公司);LDH、NO、SOD、MDA 检测试剂盒(南京建成试剂公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与分组 使用含 10%胎牛血清、50 $\mu\text{mol/L}$ 的 β - 巯基乙醇,100 单位/mL 的青霉素、100 单位/mL 的链霉素的 DMEM 培养基培养 HT-22 小鼠海马神经细胞系,培养箱环境控制为 37 $^{\circ}\text{C}$,气体环境维持为 95%空气和 5%二氧化碳的混合气体。参考以往文件及预实验结果,采用 DHA25 μM 作为干预药物^[9]。细胞分 4 组,Con 组正常培养 24 h;DHA 组用含 DHA25 μM 的培养基培养 24 h;Sevo 组将加入正常培养基中的细胞放置于 2%七氟烷的处理装置中处理 24 h (细胞培养板底部有持续流动的热水浴保证细胞处于 37 $^{\circ}\text{C}$);DHA+Sevo 组,加入含 DHA25 μM 的培养基后,将细胞培养板至于 2%七氟烷的处理装置中处理 24 h。药物处理结束后在倒置相差显微镜下拍照记录各组细胞的生长状态及形态改变。

1.2.2 MTT 法检测细胞活力 将细胞接种于 96 孔细胞培养板中,待细胞生长至覆盖 60%培养孔后按试验计划进行处理,检测时每孔加入 MTT 溶液 (5 mg/mL)20 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 继续孵育 24 h,用二甲亚砜溶解紫色结晶物,采用 490 nm 波长,在酶联免疫检测仪上测定各孔吸光度值进行统计学分析。

1.2.3 LDH,SOD, NO 及 MDA 检测 将细胞接种于 24 孔细胞培养板中,待细胞生长至覆盖 60%培养孔后按试验计划进行处理,取培养基上清离心后,分别根据试剂盒说明书检测培养基中 LDH,SOD,NO 及 MDA 的浓度。

1.3 统计学分析

采用 SPSS15.0 软件进行统计分析。细胞存活率和 LDH 漏出量均以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各组间采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)进行比较, $P < 0.05$ 则组间差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DHA 对七氟烷所致神经元形态变化的影响

CON 组为倒置相差显微镜下正常培养的 HT22 海马神经元的形态照片,细胞呈长索性,胞膜完整,折光性好;DHA 组细胞形态与 CON 组相比无明显差异;Sevo 组可见细胞皱缩,胞体破裂,正常形态消失,漂浮的死亡细胞较多;而 DHA+Sevo 组细胞形态基本正常,皱缩破裂的细胞较少,漂浮死亡的细胞较少(见图 1)。

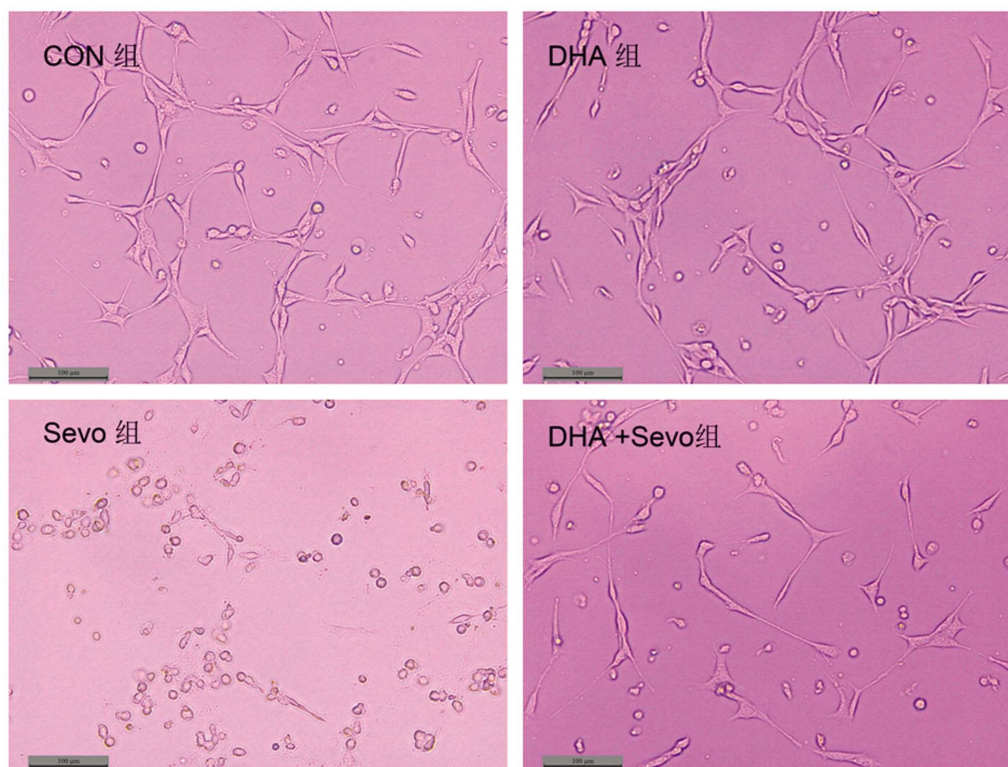


图 1 DHA 对七氟烷所致 HT22 细胞形态改变的影响(bar=100 μm)

Fig.1 Effect of DHA and sevoflurane on morphological changes of HT22 cells
(bar=100 μm)

2.2 DHA 减轻七氟烷所致 HT22 细胞存活率下降及 LDH 的漏出

与 CON 组和 DHA 组相比,与 CON 组和 DHA 组相比,Sevo 组 HT22 细胞存活率下降至 CON 组的 25.79%($P < 0.05$),DHA+Sevo 组 HT22 细胞存活率增加至 CON 组的 75.68%

($P < 0.05$);与 CON 组和 DHA 组相比,培养液中 LDH 的漏出量显著增加至 CON 组的 400.15%($P < 0.05$),而与 Sevo 组相比,DHA+Sevo 组培养液中 LDH 的漏出量下降至 CON 组的 175.68%($P < 0.05$)(见图 2)。

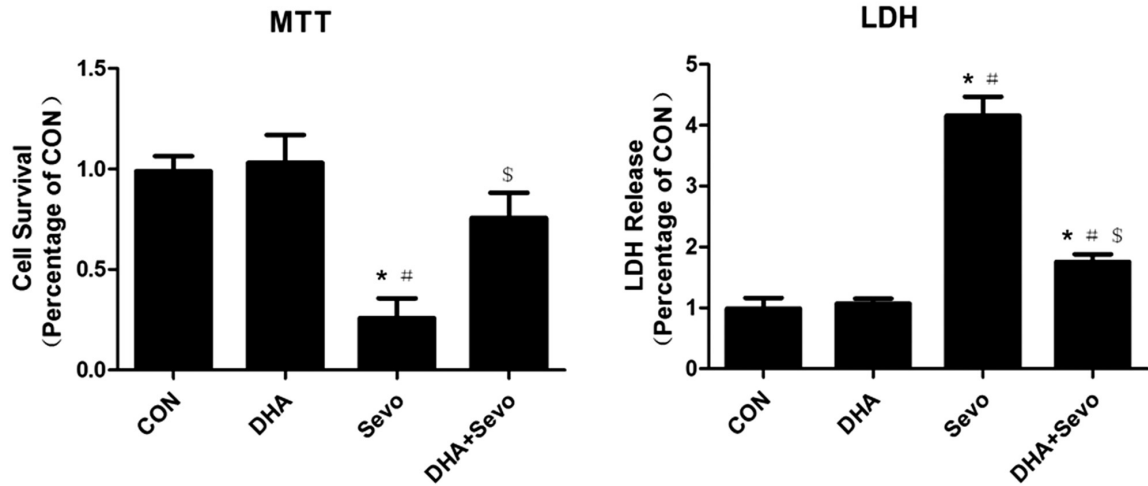


图2 DHA 及七氟烷对 HT22 细胞存活率及 LDH 的漏出量的影响

Fig.2 Effect of DHA and Sevoflurane on Survival Rate of HT22 Cells and LDH Leakage

*P<0.05 vs CON 组, #P<0.05 vs DHA 组, \$P<0.05 vs Sevo 组

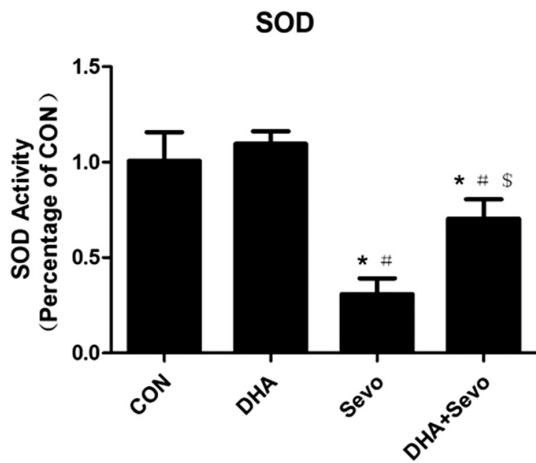


图3 DHA 及七氟烷对 HT22 细胞 SOD 活性的影响

Fig.3 Effect of DHA and Sevoflurane on SOD Content in HT22 Cell Culture Medium

Culture Medium

*P<0.05 vs CON 组, #P<0.05 vs DHA 组, \$P<0.05 vs Sevo 组

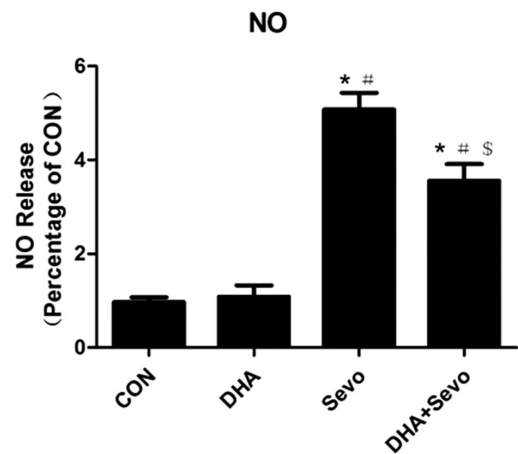


图4 DHA 及七氟烷对 HT22 细胞 NO 释放量的影响

Fig.4 Effect of DHA and Sevoflurane on NO Content in HT22 Cell Culture Medium

Culture Medium

*P<0.05 vs CON 组, #P<0.05 vs DHA 组, \$P<0.05 vs Sevo 组

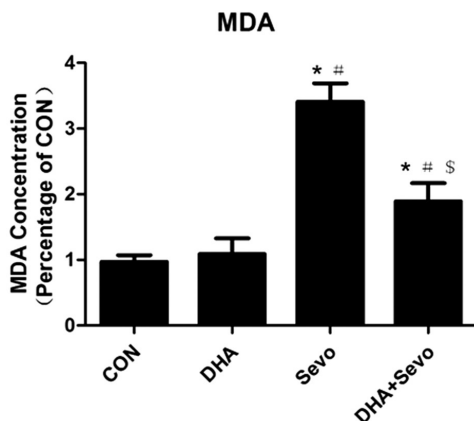


图5 DHA 及七氟烷对 HT22 细胞培养基中 MDA 含量的影响

Fig.5 Effect of DHA and Sevoflurane on MDA Content in HT22 Cell Culture Medium

Culture Medium

*P<0.05 vs CON 组, #P<0.05 vs DHA 组, \$P<0.05 vs Sevo 组

与 CON 组和 DHA 组相比, SOD 活力下降至 CON 组的 30.96%(P<0.05), 而与 Sevo 组相比, DHA+Sevo 组 SOD 活力增加至 CON 组的 70.48%(P<0.05)(见图 3); 与 CON 组和 DHA 组相比, 培养液中 NO 及 MDA 的含量分别增加至 CON 组的 507.62% 和 342.15%(P<0.05), 而与 Sevo 组相比, DHA+Sevo 组培养液中 NO 及 MDA 的含量分别下降至 CON 组的 355.80% 和 192.27%(P<0.05)(见图 4, 5)。

3 讨论

本实验结果提示, 七氟烷可以使离体培养的 HT22 小鼠海马神经元形态发生改变, 胞膜破裂, 细胞皱缩或者死亡漂浮, 细胞代谢率下降, 同时培养基中 LDH 的漏出量增加, 这与既往文献的报道相一致, 七氟烷可诱导神经元坏死和凋亡, 其机制可能与氧化应激和神经炎症反应相关^[6]。在本实验中 DHA 可改善七氟烷造成的形态改变, 细胞代谢率升高, LDH 漏出减少, 氧化应激指标 NO 和 MDA 含量下降, 而抗氧化酶 SOD 的活力增高, 可见 DHA 可减轻七氟烷所致的神经损伤, 且与其抗氧

2.3 DHA 增强 SOD 的活力, 减轻七氟烷所致 HT22 细胞 NO 及 MDA 的释放

化应激的作用有关。

七氟烷是目前最常用的挥发性全身麻醉药物之一,在临床麻醉中被广泛的应用,但有研究证实,长时间多次暴露于七氟烷可导致幼年动物的神经发育障碍,学习记忆能力受损^[7],另外对于老年患者的临床研究也表明,暴露于七氟烷与老年患者的术后认知功能的发生有关^[8]。七氟烷的神经毒性具有暴露时间和剂量的依赖性^[9],Wang 等研究者的实验表明^[10],怀孕的大鼠接触七氟烷可导致新生鼠生后 2 w 内发生脑损伤,饲养到成年后进行的行为学实验中也发现七氟烷暴露组学习记忆能力低于对照组。在神经发育的高峰期暴露于七氟烷的实验动物,会影响突触可塑性和长时程增强,进而出现学习记忆能力下降^[11,12]。七氟烷对小鼠海马 CA1 区突触可塑性的损害具有剂量依赖性,吸入浓度越高,损伤越重^[13]。细胞内钙离子浓度升高常被认为是细胞凋亡发生的重要因素之一,吸入七氟烷可激活肌质网的 IP3 受体,促进肌质网内钙离子的释放,使细胞内钙离子浓度升高,细胞凋亡增多^[14,15]。寻找一种行之有效的措施减轻七氟烷潜在的神经毒性具有比较重要的意义。

DHA 是构成脑的正常结构的物质之一,又容易从深海鱼油等物质中获得,常被加工成保健品或者营养补充剂加入食品中。有调查显示在以地中海饮食为主的人群中,神经退行性疾病的发生率较低,可能与其长期摄入的食物中 DHA 等物质的含量较高有关^[16]。DHA 的潜在神经保护作用已引起人们的关注,研究它是否可能对认知下降及其神经病理学产生积极的影响。在雌性幼龄(3 个月)和老龄(24 个月)小鼠的研究中,老年小鼠中的总 DHA 水平显著低于年轻小鼠,老年组中的 DHA 降低可以通过给予鱼油(550 mg DHA / kg 体重 / 天,经口灌胃 21 天)来部分补偿^[17,18]。在一些老年啮齿动物的研究中,DHA 和 / 或二十碳五烯酸(EPA)补充剂被证明可以提高认知测试的表现,并引起对神经炎症和氧化应激的保护^[19,20]。但关于 DHA 具有促进神经发育,减轻神经损伤的研究较多都是将 DHA 混入食物或灌胃所得到的结论^[21],在本实验中,我们采用离体培养的细胞,较直观地观察 DHA 对七氟烷造成神经损伤的影响,及其可能机制,减少了其他成分的干扰。

七氟烷的神经毒性作用,可能与氧化应激损害,活化胶质细胞造成中枢炎症反应,诱导神经凋亡等多种机制有关^[22]。本实验的结果提示,DHA 对七氟烷神经毒性的保护作用可能与抗氧化机制有关,以往文献也有类似报道,DHA 可以通过抗氧化机制减轻脑缺血再灌注后梗死面积,改善神经功能^[23]。在 CCI 脑外伤小鼠的研究中也发现,DHA 可以减轻海马区的神经元数目减少和脑白质损伤,以及促炎性介质的生和内质网应激^[24]。在一项关于创伤性脑损伤(TBI)研究中,模型动物以氧化应激和学习障碍以及 BDNF 减少为主要特征,补充 DHA 后 TBI 所致氧化应激指标下降,学习障碍改善和 BDNF 表达上调^[25,26]。除了抗氧化作用外 DHA 还通过抑制炎症反应发挥神经保护作用,DHA 可以形成具有亲电子特性的含氧代谢物,并且这些代谢物可以通过激活 Nrf2 / ARE 途径来转导抗炎活性^[27]。有证据表明补充 DHA 和 EPA 可以通过抑制 NF- κ B 和诱导 Nrf2 途径来防止脑缺血再灌注损伤^[28,29]。在阿尔兹海默症的模型中,给予 DHA 有助于减轻中枢炎症反应和学习记忆功能减退,其机制可能与 DHA 的抗炎作用有关^[30]。这提示我们在以后的研

究中可以进一步研究抗炎作用是否为 DHA 减轻七氟烷神经损伤的可能机制之一。

本研究通过观察在 HT22 小鼠海马神经元的培养基中加入 DHA,观察 DHA 对七氟烷神经毒性的保护作用及可能机制,为寻找七氟烷的神经毒性的治疗药物提供了一定的证据和支持。

参考文献(References)

- [1] Gross A F, Stern T A. Neuropsychiatric conditions associated with anesthesia exposure[J]. Psychosomatics, 2014, 55(1): 21-28
- [2] 吴丹,黄俊梅,刘君,等.不同麻醉维持方法对老年患者早期术后认知功能障碍的影响[J].现代生物医学进展,2017, 17(11): 2093-2098
Wu Dan, Huang Jun-mei, Liu Jun, et al. Effect of Different Anesthesia Maintenance Methods on Cognitive Dysfunction in Elderly Patients after Early Operation [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2017, 17 (11): 2093-2098
- [3] Shinya Y, Yasushi S, Ryosuke A, et al. Suppression of ERK phosphorylation through oxidative stress is involved in the mechanism underlying sevoflurane-induced toxicity in the developing brain [J]. Sci Rep, 2016, 6: 21859
- [4] Hartmann T, van Wijk N, Wurtman R J, et al. A nutritional approach to ameliorate altered phospholipid metabolism in Alzheimer's disease [J]. J Alzheimers Dis, 2014, 41(3): 715-717
- [5] Philip K C, Armen K, Rebecca A M, et al. Docosahexaenoic acid (DHA): a modulator of microglia activity and dendritic spine morphology[J]. J Neuroinflammation, 2015, 12: 34
- [6] 张康泰,梁斌,赵蕊,等.不同浓度七氟烷对小儿麻醉后 cTn I,CRP 及补体影响研究[J].现代生物医学进展,2016, 16(21): 4134-4137
Zhang Kang-qin, Liang Bin, Zhao Rui, et al. Effects of different concentrations of sevoflurane on cTn I, CRP and complement after pediatric anesthesia [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2016, 16(21): 4134-4137
- [7] 孙敏,张磊,宋淑玲,等.七氟烷对培养的小鼠小胶质细胞炎症因子表达的影响[J].现代生物医学进展,2015, 15(15): 2840-2844
Sun Min, Zhang Lei, Song Shu-ling, et al. Effect of sevoflurane on the expression of microglia inflammatory cytokines in cultured mice [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2015, 15(15): 2840-2844
- [8] Qiu L, Zhu C, Bodogan T, et al. Acute and Long-Term Effects of Brief Sevoflurane Anesthesia During the Early Postnatal Period in Rats[J]. Toxicol Sci, 2016, 149(1): 121-133
- [9] Fan D, Li J, Zheng B, et al. Enriched Environment Attenuates Surgery-Induced Impairment of Learning, Memory, and Neurogenesis Possibly by Preserving BDNF Expression [J]. Mol Neurobiol, 2016, 53(1): 344-354
- [10] Van de Rest O, Wang Y, Barnes L L, et al. APOE epsilon4 and the associations of seafood and long-chain omega-3 fatty acids with cognitive decline[J]. Neurology, 2016, 86(22): 2063-2070
- [11] Drobish J K, Gan Z S, Cornfeld A D, et al. From the Cover: Volatile Anesthetics Transiently Disrupt Neuronal Development in Neonatal Rats[J]. Toxicol Sci, 2016, 154(2): 309-319
- [12] Zhao Y, Chen K, Shen X. Environmental Enrichment Attenuated Sevoflurane-Induced Neurotoxicity through the PPAR-gamma Signaling Pathway[J]. Biomed Res Int, 2015, 2015: 107149

- [13] Gui L, Lei X, Zuo Z. Decrease of glial cell-derived neurotrophic factor contributes to anesthesia- and surgery-induced learning and memory dysfunction in neonatal rats [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2017, 95 (4): 369-379
- [14] Tao G, Luo Y, Xue Q, et al. Docosahexaenoic Acid Rescues Synaptogenesis Impairment and Long-Term Memory Deficits Caused by Postnatal Multiple Sevoflurane Exposures [J]. *Biomed Res Int*, 2016, 2016: 4062579
- [15] Moon S Y, de Souto B P, Chupin M, et al. Association between Red Blood Cells Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and White Matter Hyperintensities: The MAPT Study[J]. *J Nutr Health Aging*, 2018, 22 (1): 174-179
- [16] Ho C F, Bon C P, Ng Y K, et al. Expression of DHA-Metabolizing Enzyme Alox15 is Regulated by Selective Histone Acetylation in Neuroblastoma Cells[J]. *Neurochem Res*, 2017
- [17] Hopperton K E, Trepanier M O, James N, et al. Fish oil feeding attenuates neuroinflammatory gene expression without concomitant changes in brain eicosanoids and docosanoids in a mouse model of Alzheimer's disease [J]. *Brain Behav Immun*, 2017 [Epub ahead of print]
- [18] Mazereeuw G, Herrmann N, Andreazza A C, et al. Baseline Oxidative Stress Is Associated with Memory Changes in Omega-3 Fatty Acid Treated Coronary Artery Disease Patients [J]. *Cardiovasc Psychiatry Neurol*, 2017, 2017: 3674371
- [19] Valentini K J, Pickens C A, Wiesinger J A, et al. The effect of fish oil supplementation on brain DHA and EPA content and fatty acid profile in mice[J]. *Int J Food Sci Nutr*, 2017: 1-13
- [20] Chuang D Y, Simonyi A, Kotzbauer P T, et al. Cytosolic phospholipase A2 plays a crucial role in ROS/NO signaling during microglial activation through the lipoxygenase pathway [J]. *J Neuroinflammation*, 2015, 12: 199
- [21] Francos-Quijorna I, Santos-Nogueira E, Gronert K, et al. Maresin 1 Promotes Inflammatory Resolution, Neuroprotection, and Functional Neurological Recovery After Spinal Cord Injury[J]. *J Neurosci*, 2017, 37(48): 11731-11743
- [22] Bu J, Dou Y, Tian X, et al. The Role of Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids in Stroke [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 2016: 6906712
- [23] Pu H, Guo Y, Zhang W, et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation improves neurologic recovery and attenuates white matter injury after experimental traumatic brain injury [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2013, 33(9): 1474-1484
- [24] Begum G, Harvey L, Dixon C E, et al. ER stress and effects of DHA as an ER stress inhibitor[J]. *Transl Stroke Res*, 2013, 4(6): 635-642
- [25] Arunagiri P, Balamurugan E, Saravanakumar M, et al. Omega-3 fatty acids supplementation with lithium and aripiprazole for improving the balance of circulating hormones and brain neurotransmitters in manic mice model[J]. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol*, 2017
- [26] Avci B, Bilge S S, Arslan G, et al. Protective effects of dietary omega-3 fatty acid supplementation on organophosphate poisoning [J]. *Toxicol Ind Health*, 2017: 1124833106
- [27] Balanza M V. Nutritional supplements in psychotic disorders [J]. *Actas Esp Psiquiatr*, 2017, 45(Supplement): 16-25
- [28] McDougale D R, Watson J E, Abdeen A A, et al. Anti-inflammatory omega-3 endocannabinoid epoxides [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017, 114(30): E6034-E6043
- [29] Trojjan T H, Wang D H, Leddy J J. Nutritional Supplements for the Treatment and Prevention of Sports-Related Concussion-Evidence Still Lacking[J]. *Curr Sports Med Rep*, 2017, 16(4): 247-255
- [30] Bernier P J, Gourdeau C, Carmichael P H, et al. Validation and diagnostic accuracy of predictive curves for age-associated longitudinal cognitive decline in older adults [J]. *CMAJ*, 2017, 189 (48): E1472-E1480

(上接第 3647 页)

- [24] Chu-Yuan H, Jing P, Yi-Sheng W, et al. The impact of chemotherapy-associated neutrophil/ lymphocyte counts on prognosis of adjuvant chemotherapy in colorectal cancer[J]. *BMC Cancer*, 2013, 13: 177
- [25] Campian JL, Sarai G, Ye X, et al. Association between severe treatment-related lymphopenia and progression-free survival in patients with newly diagnosed squamous cell head and neck cancer [J]. *Head Neck*, 2014, 36(12): 1747-1753
- [26] De Giorgi U, Rihawi K, Aieta M, et al. Lymphopenia and clinical outcome of elderly patients treated with sunitinib for metastatic renal cell cancer[J]. *J Geriatr Oncol*, 2014, 5(2): 156-163
- [27] Wu ES, Oduyebo T, Cobb LP, et al. Lymphopenia and its association with survival in patients with locally advanced cervical cancer[J]. *Gynecol Oncol*, 2016, 140(1): 76-82
- [28] Ohrmalm L, Smedman C, Wong M, et al. Decreased functional T lymphocyte-mediated cytokine responses in patients with chemotherapy-induced neutropenia[J]. *J Intern Med*, 2013, 274(4): 363-370
- [29] Guthrie GJ, Charles KA, Roxburgh CS, et al. The systemic inflammation-based neutrophil-lymphocyte ratio: experience in patients with cancer[J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2013, 88(1): 218-230
- [30] Templeton AJ, Mcnamara MG, Seruga B, et al. Prognostic role of neutrophil-to-lymphocyte ratio in solid tumors: a systematic review and meta-analysis[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2014, 106(6): dju124
- [31] Kim IY, You SH, Kim YW. Neutrophil-lymphocyte ratio predicts pathologic tumor response and survival after preoperative chemoradiation for rectal cancer[J]. *BMC Surg*, 2014, 14: 94