

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.23.011

高糖环境下持续性牵张力对子宫平滑肌细胞白介素 -1 和白介素 -6 表达的影响 *

毛 敬 周木兰 马振芳 盛丽丽 柴文星

(同济大学附属第一妇婴保健院产科 上海 200040)

摘要 目的:探讨高糖环境下持续性牵张力对大鼠子宫平滑肌细胞白介素 -1(IL-1)、白介素 -6(IL-6)表达的影响。**方法:**体外培养大鼠子宫平滑肌细胞,高糖作用不同时间后,观察高糖状态下大鼠子宫平滑肌细胞 IL-1、IL-6 表达变化情况。对高糖状态下的肌细胞施加持续性牵张力,明确牵张力对肌细胞 IL-1、IL-6 表达的影响以及高糖和牵张力之间的协同作用,同时采用晚期糖基化终末产物(AGEs)抑制剂拮抗高糖作用作为参照,并对结果进行分析。**结果:**随着高糖作用时间增加,肌细胞 IL-1、IL-6 表达也随之升高。牵张力也可促进肌细胞 IL-1、IL-6 表达增加,并可与高糖状态产生协同作用,这一过程可被高糖抑制剂部分阻断,但不能完全阻断。**结论:**高糖状态及牵张力均可促进肌细胞 IL-1、IL-6 表达增加,并有一定协同作用,AGEs 参与了这一过程,但并不是唯一途径。**关键词:**高糖;持续性牵张力;子宫平滑肌细胞;白介素 -1;白介素 -6

中图分类号:R-33;R714.256 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2019)23-4450-05

Effect of Continuous Stretch on Inflammatory Factor Expression of Uterine Smooth Muscle Under High Glucose Circumstance*

MAO Jing, ZHOU Mu-lan, MA Zhen-fang, SHENG Li-li, CHAI Wen-xing

(Department of Obstetrics, First Maternal and Infant Health Hospital Affiliated to Tongji University, Shanghai, 200040, China)

ABSTRACT Objective: To analyze the effect of continuous stretch on Interleukin -1(IL-1) and Interleukin -6(IL-6) expression of uterine smooth muscle cells under high glucose circumstance. **Methods:** Rat uterine smooth muscle cells were separated and cultured under high glucose circumstance for different durations, then we detected IL-1 and IL-6 expression changes of smooth muscle cells. Continuous stretch was forced on cells under high glucose circumstance to determine synergistic effect of stretch and high glucose. At the same time, the antagonistic effect of advanced glycation end products (AGEs) inhibitors on hyperglycemia was used as a reference, and the results were analyzed. **Results:** With the increase of duration under high glucose circumstance, IL-1, IL-6 expression of muscle cell also increased. Continuous stretch could also promote IL-1, IL-6 expressions and there exist a synergistic effect between stretch and high glucose. This process could partly be blocked by high glucose inhibitor, but not completely. **Conclusions:** Both continuous stretch and high glucose could promote IL-1, IL-6 expressions and there exist a synergistic effect between them. AGEs was involved in this process, but this is not the only signal pathway.

Key words: High glucose; Continuous stretch; Uterine smooth muscle cells; IL-1; IL-6

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R714.256 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)23-4450-05

前言

妊娠期糖尿病临床非常常见,对孕妇和胎儿都会带来不同程度的危害,容易引发流产、早产、胎盘功能不良及胎儿发育异常等并发症^[1-3]。平滑肌作为子宫最主要的组织成分,其活性在整个妊娠过程中起重要作用,也是比较容易受到血糖影响的组织^[45]。研究表明,高糖状态下晚期糖基化终末产物(AGEs)的聚集可影响子宫平滑肌的收缩功能^[6]。妊娠期糖尿病患者在高糖作用下的子宫平滑肌组织同时还要受到子宫增大带来的牵张力的影响^[7]。研究表明,高糖环境和牵张力均可导致多种细胞生物学活性发生异常^[89],但对于高糖和牵张力双重作用下平滑肌

细胞收缩活性的变化情况及其机制未见相关报道。本实验的目的在于阐明在高糖环境下和牵张力双重作用下,子宫平滑肌细胞炎症因子白介素 -1(IL-1)和白介素 -6(IL-6)表达的变化情况,并探究 AGEs 抑制剂对此过程的调控作用。

1 材料与方法

1.1 大鼠成肌细胞培养

取 14 天龄 SD 雌性大鼠,75%酒精中浸泡消毒后断头处死,解剖分离子宫平滑肌组织,在 DMEM 培养液中剪碎, I 型胶原酶 37℃ 水浴振荡消化 1 h,轻轻吹打后离心。弃上清液,平铺接种于 25 mL 培养瓶内,加 4 mL 含血清 DMEM(美国 Gibco)

* 基金项目:上海市卫生和计划生育委员会科研项目(201604121)

作者简介:毛敬(1977-),女,硕士研究生,主治医师,研究方向:产科相关疾病基础研究,E-mail: wjyu38@163.com

(收稿日期:2019-06-06 接受日期:2019-06-30)

培养液,在 3111 型孵箱(美国 ThermoForma)中 37℃、5%CO₂、饱和湿度条件下培养,2 h 翻瓶,72 h 换液,以后每 48 h 换液,在 DMIL 倒置相差显微镜(德国 Leica)下观察,待细胞长至 80%培养瓶底时传代,标为 1 代,噻唑蓝(MTT)法绘制细胞生长曲线。将细胞以 1×10⁴ 个/孔的密度接种于 96 孔培养板,设立空白对照(无细胞培养液)培养 7d,每天每组细胞各取 3 孔,每孔加入 20 μL MTT(5 mg/mL)孵育 4 h 加入二甲基亚砷(DMSO)150 μL,振荡 10 min,选择 490 nm 波长,在 ELx800uv 型酶联免疫检测仪(美国 Bio-Tek)上测各孔的吸光值(OD),以时间为横轴,OD 值为纵轴绘制生长曲线。取 5~8 代细胞用于后续实验^[9]。

1.2 细胞应力加载

取对数生长期细胞以 1×10⁴ 个/孔的密度接种于 6 孔弹性培养板(Flexcell 公司),放置在 CO₂ 恒温孵箱中培养。培养 24h 后换液去除不贴壁细胞,然后采用美国 Flexercell 细胞加力装置对细胞施加持续性牵张力,将弹性培养板固定并密封在底座上,形成一个密闭腔,抽吸空气,形成负压,拉长弹性培养板底膜,增大表面积以拉长细胞。通过调节真空泵的抽吸力,以调整密闭底座内的负压值从而改变弹性培养板底膜形变率达到不同的牵张力强度,根据预实验及参考文献^[10,11],我们采用牵张力强度为 20%细胞表面拉伸率的持续性牵张力作用于细胞,作用时间为 24 h,整个加力过程细胞均在 37℃、5% CO₂、饱和湿度条件下培养。

1.3 Elisa 测定 IL-1、IL-6 含量

将对数生长期细胞,以相同的 1×10⁴ 个/孔密度接种于 6 孔培养板。在生理糖浓度(5.5 mmol/L)、37℃、5% CO₂、饱和湿度条件下培养 24 h,设为对照组(C);在细胞培养基中加入葡萄糖,使培养液中葡萄糖终浓度达到 35 mmol/L,细胞在高糖状态下培养 24 h,设为高糖组(G);在浓度为 35 mmol/L 高糖培养液中加入晚期糖基化终末产物 AGEs 的抑制剂可溶性晚期糖基化终产物受体(sRAGE)(浓度为 1 mg/L)以拮抗高糖作用,培养 24 h,设为高糖+抑制剂组(G+sRAGE);细胞在牵张力强度为 20%细胞表面拉伸率的持续性牵张力作用下,生理糖浓度的培养液中培养 24 h,设为牵张力组(F);在牵张力强度为 20%细胞表面拉伸率的持续性牵张力作用下,细胞在高糖浓度的培养基中培养 24 h,设为高糖+牵张力组(G+F);在高糖培养基中加入晚期糖基化终末产物 AGEs 的抑制剂(sRAGE),同时施加强度为 20%细胞表面拉伸率的持续性牵张力对细胞培养 24 h,设为高糖+抑制剂+牵张力组(G+F+sRAGE)。使用成品大鼠 IL-1、IL-6 的 Elisa 检测试剂盒(上海研域化学试剂有限公司),绘制浓度-吸光度曲线。首先收集各组细胞弃去培养板中孔内液体,PBS 冲洗 3 次,然后每孔加入细胞裂解液 0.5%的 TrtonX-100(美国 Sigma)150 μL 过夜后,使用 TGL-16G 型高速台式离心机(上海安亭)离心取每组细胞上清液,参照 Elisa 检测试剂盒说明书操作,检测吸光度值(OD),根据 OD 值计算 IL-1、IL-6 浓度值。

1.4 统计学处理

对所得数据用 SPSS 17.0 软件进行方差分析,以例数及率的形式表示计数资料,组间比较行卡方检验。以均值±标准差的形式表示计量资料(均为正态资料),组间比较行成组 t 检

验,组内治疗前后比较为配对 t 检验。以 P<0.05 设定为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠子宫平滑肌细胞生长曲线

MTT 实验结果显示,第 1 天、第 2 天,肌细胞增殖处于静止期,无明显增长;第 3 天开始,肌细胞进入快速增值期;第 6 天开始,肌细胞增殖进入平台期。选择第 3 天的细胞进行后续实验。见图 1 表 1。

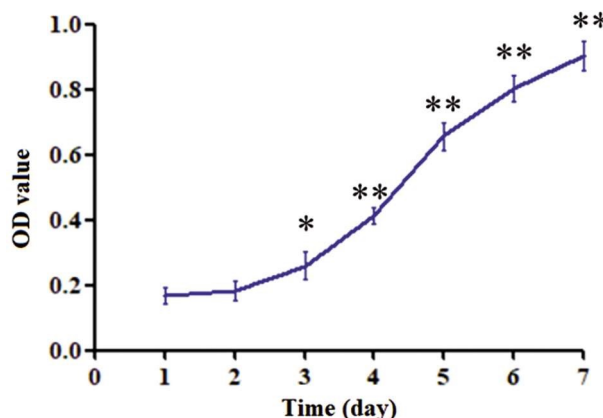


图 1 大鼠子宫平滑肌细胞生长曲线

Fig.1 Growth curve of uterine smooth muscle cells in rats

Note: Compared with 1 day, *P<0.05, **P<0.01.

表 1 大鼠子宫平滑肌细胞的 MTT 结果($\bar{x} \pm s$)

Table 1 MTT results of uterine smooth muscle cells in rats($\bar{x} \pm s$)

Time (day)	OD value
1	0.167± 0.025
2	0.183± 0.031
3	0.260± 0.044*
4	0.413± 0.026**
5	0.657± 0.042**
6	0.803± 0.041**
7	0.903± 0.047**
F value	15.385
P value	0.000

Note: Compared with 1 day, *P<0.05, **P<0.01.

2.2 高糖对肌细胞 IL-1、IL-6 表达的影响

Elisa 结果发现,随着高糖作用时间增加,肌细胞中 IL-1 和 IL-6 表达量增加,差异有统计学意义(P<0.05),见图 2,表 2。

2.3 高糖环境下持续性牵张力对肌细胞 IL-1、IL-6 表达的影响

Elisa 结果发现,与对照相比,高糖、持续性牵张力均可增加肌细胞中 IL-1 和 IL-6 表达量(P<0.05),且高糖、持续性牵张力具有协同作用,进一步增加大鼠子宫平滑肌细胞中 IL-1 和 IL-6 表达量(P<0.05)。AGEs 抑制剂-sRAGE 可一定程度上抑制高糖、持续性牵张力促进肌细胞表达 IL-1 和 IL-6 的作用,见图 3,表 3。

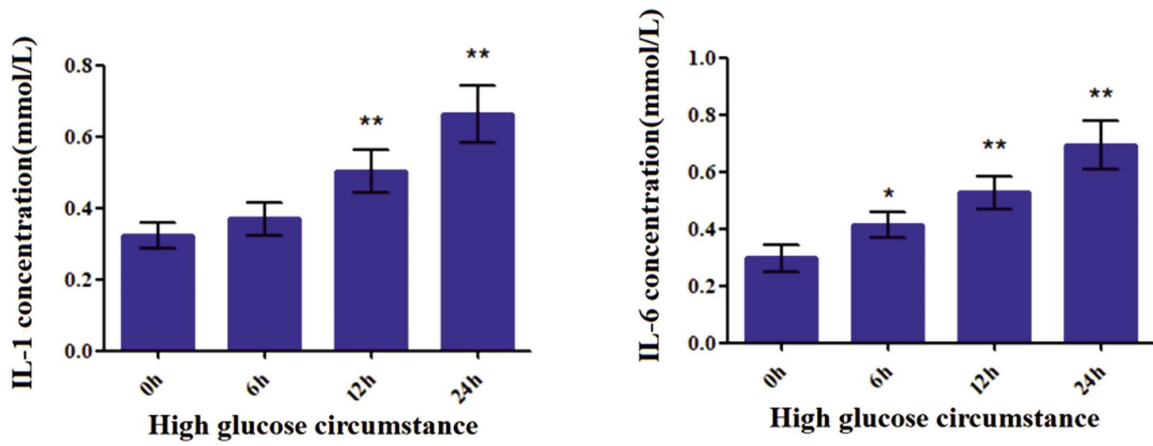


图2 高糖对肌细胞 IL-1、IL-6 表达的影响

Fig.2 Effects of high glucose on the expression of IL-1 and IL-6 in muscle cell

Note: Compared with 0 h, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

表2 高糖对肌细胞 IL-1、IL-6 表达的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effects of high glucose on the expression of IL-1 and IL-6 in muscle cell($\bar{x} \pm s$)

Time	IL-1(mmol/L)	IL-6(mmol/L)
0 h	0.323± 0.035	0.297± 0.047
6 h	0.370± 0.046	0.413± 0.045*
12 h	0.503± 0.062**	0.527± 0.058**
24 h	0.663± 0.081**	0.693± 0.087**
F value	16.694	14.747
P value	0.000	0.000

Note: Compared with 0 h, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

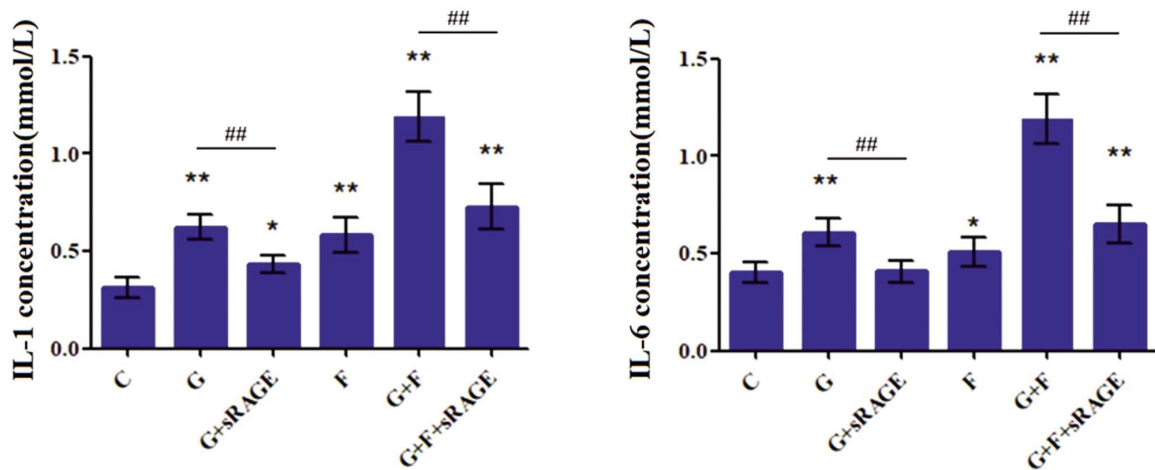


图3 高糖环境下持续性牵张力对肌细胞 IL-1、IL-6 表达的影响

Fig.3 Effects of continuous stretch on the expression of IL-1 and IL-6 in muscle cell under high glucose circumstance

Note: Comparison with control group(C), * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; Comparison between two groups, $^{###}P < 0.01$.

3 讨论

糖尿病是全球患病率最高的疾病之一,在我国糖尿病发病率近年来也呈迅速增长之势。糖尿病对机体的影响是多方面的,其对妊娠的影响也日益受到国内外学者的广泛关注^[12-14]。妊娠期糖尿病对母体,胎儿甚至新生儿均有较大危害,有学者通过大样本的统计分析表明,妊娠期糖尿病单因素自身就可以引起巨大儿的发病率升高,而并不依赖于妇女怀孕前体重和孕期

体重增加量^[15]。国内有学者研究发现妊娠期糖尿病患者血清脂联素水平降低与胰岛素抵抗程度独立相关,提示脂联素分泌紊乱可能参与了妊娠期糖尿病患者胰岛素抵抗的病理生理机制^[16-18]。但总体而言,目前国内外对于妊娠期糖尿病机理及治疗的研究多集中于调节糖代谢,加强监测,降低并发症等方面^[19-21],关于高血糖对子宫自身,特别是对其主要成分-肌肉组织的炎性因子表达有何影响,牵张力在其中又扮演什么样的角色,目前尚无报道。

表 3 高糖环境下持续性牵张力对肌细胞 IL-1、IL-6 表达的影响($\bar{x} \pm s$)Table 3 Effects of continuous stretch on the expression of IL-1 and IL-6 in muscle cell under high glucose circumstance($\bar{x} \pm s$)

Groups	IL-1(mmol/L)	IL-6(mmol/L)
C	0.313± 0.050	0.403± 0.055
G	0.623± 0.065***	0.607± 0.071***
G+sRAGE	0.433± 0.045***	0.407± 0.055**
F	0.583± 0.091**	0.507± 0.075*
G+F	1.190± 0.125***	1.179± 0.127***
G+F+sRAGE	0.727± 0.115***	0.650± 0.099***
F value	69.386	42.494
P value	0.000	0.000

Note: Comparison with control group(C), * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; Comparison between two groups, ** $P < 0.01$.

目前研究已证实子宫激活分娩是一个炎症反应过程,妊娠末期的子宫肌层有大量白细胞浸润,临产子宫肌组织也表现出明显的炎症反应状态,大量的白细胞浸润、组织肿胀以及一些炎性因子和标志物的高表达等^[22,23]。促炎因子可直接参与刺激子宫肌的收缩活性,Chevillard G 等的研究表明白细胞介素 1 β (IL-1 β) 可通过激活核因子 κ B (NF- κ B), 正五聚蛋白 3 (PTX3), 肿瘤坏死因子 α (TNF- α), 趋化因子 (CXCL3), 肌钙蛋白 C (TnC) 等多种途径促进子宫平滑肌的收缩^[24]。Dubicke A 等通过对 59 例早产, 足月分娩, 过期妊娠以及未怀孕妇女进行子宫组织活检, 证实诸多白介素家族成员, 如白细胞介素 -1 α (IL-1 α), IL-1 β , 白细胞介素 -12 (IL-12), 白细胞介素 -18 (IL-18) 等均参与到人类早产的发病机制中^[25]。还有研究表明妊娠期和分娩时分泌的促炎细胞因子如 IL-6、白细胞介素 -8 (IL-8)、Toll 样受体 2 (TLR-2) 等通过自分泌或旁分泌作用于细胞本身或附近细胞, 形成复杂的细胞因子网络系统, 并与机体内分泌形成器官联络系统调节局部子宫活动而参与分娩发动及分娩维持^[26,27]。

我们的研究发现, 随着培养液中高糖浓度作用时间的增加, 肌细胞 IL-1 和 IL-6 的分泌量显著上升, 说明高糖可以呈时间依赖性促进炎症因子的表达。高糖状态下, 炎症因子分泌的增加, 有可能引起子宫平滑肌细胞收缩功能异常, 导致妊娠期糖尿病时各种并发症的产生^[28,29]。进一步研究结果表明, 牵张力可以加剧高糖状态促进肌细胞 IL-1 和 IL-6 表达升高这一过程, 表现为二者具有一定的协同作用, 在高糖和牵张力的共同作用下, IL-1 和 IL-6 的表达会进一步升高, 说明妊娠期子宫更容易受到高糖环境的影响, 导致炎症因子分泌增加。这一过程可被 AGEs 的抑制剂 sRAGE 部分抑制, 但不能完全阻断^[30]。加入 sRAGE 后, IL-1 和 IL-6 的表达虽然有所下降, 但仍然高于对照组, 说明高糖状态下 AGEs 的聚集虽然可以引起肌细胞 IL-1 和 IL-6 的表达升高, 但高糖状态还可能通过其他途径引起相应炎症因子表达升高, 单一抑制剂不能完全阻断这一效果。

参考文献(References)

- [1] Makaruk B, Galczak-Kondraciuk A, Forczek W, et al. The Effectiveness of Regular Exercise Programs in the Prevention of Gestational Diabetes Mellitus-A Systematic Review [J]. *Obstet Gynecol Surv*, 2019, 74(5): 303-312
- [2] Tuesca Molina R, Acosta Vergara T, Domínguez Lozano B, et al. Implementation of a clinical guideline for detection of gestational diabetes in primary care[J]. *Rev Med Chil*, 2019, 147(2): 190-198
- [3] Wagnild JM, Hinshaw K, Pollard TM. Associations of sedentary time and self-reported television time during pregnancy with incident gestational diabetes and plasma glucose levels in women at risk of gestational diabetes in the UK[J]. *BMC Public Health*, 2019, 19(1): 575
- [4] Tang Y, Qiao P, Qu X, et al. Comparison of serum vaspin levels and vaspin expression in adipose tissue and smooth muscle tissue in pregnant women with and without gestational diabetes[J]. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2017, 87(4): 344-349
- [5] Li H, Shin SE, Seo MS, et al. Alterations of ATP-sensitive K⁺ channels in human umbilical arterial smooth muscle during gestational diabetes mellitus[J]. *Pflugers Arch*, 2018, 470(9): 1325-1333
- [6] 毛敬, 韩志敏, 周木兰, 等. 持续性牵张力在高糖状态下对子宫平滑肌细胞收缩蛋白表达的影响 [J]. *国际妇产科学杂志*, 2016, 43(2): 230-233
- [7] Abualhamael S, Mosli H, Baig M, et al. Prevalence and Associated Risk Factors of Gestational Diabetes Mellitus at a University Hospital in Saudi Arabia[J]. *Pak J Med Sci*, 2019, 35(2): 325-329
- [8] Vergara M, Torres M, Müller A, et al. High glucose and low specific cell growth but not mild hypothermia improve specific r-protein productivity in chemostat culture of CHO cells [J]. *PLoS One*, 2018, 13(8): e0202098
- [9] 宋京, 任大鹏, 颜世界, 等. 细胞外信号调节蛋白激酶 1/2 在介导周期性牵张力对牙周膜细胞成骨分化中的作用[J]. *华西口腔医学杂志*, 2017, 35(5): 520-526
- [10] Van Ryswyk E, Middleton P, Hague W, et al. Clinician views and knowledge regarding healthcare provision in the postpartum period for women with recent gestational diabetes: A systematic review of qualitative/survey studies [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2014, 106(3): 401-411
- [11] Alberico S, Montico M, Barresi V, et al. The role of gestational diabetes, pre-pregnancy body mass index and gestational weight gain on the risk of newborn macrosomia: results from a prospective multicentre study[J]. *BMC Pregnancy Childbirth*, 2014, 14(1): 23
- [12] 闫学平, 胡敬, 郝秀丽, 等. 妊娠糖尿病患者血清 HbA1c 与 CRP 水平的相关性分析[J]. *现代生物医学进展*, 2018, 18(9): 1701-1704

- [13] Dickson LM, Buchmann EJ, Janse Van Rensburg C, et al. The impact of differences in plasma glucose between glucose oxidase and hexokinase methods on estimated gestational diabetes mellitus prevalence [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 7238
- [14] Dereke J, Nilsson J, Nilsson C, et al. Soluble CD163 and TWEAK in early pregnancy gestational diabetes?and later glucose intolerance[J]. *PLoS One*, 2019, 14(5): e0216728
- [15] 沙红兰, 薛卫红, 李亚琴, 等. 妊娠期糖尿病妇女膳食状况与巨大儿的相关影响因素研究 [J]. *检验医学与临床*, 2016, 13(15): 2201-2203
- [16] 牟莹莹, 王兰玲, 修霞, 等. 脂联素受体 Adipo-R2 在妊娠期糖尿病胎盘中的表达变化 [J]. *临床和实验医学杂志*, 2018, 17(18): 2001-2003
- [17] 袁小松, 张一鸣, 蒋健, 等. 血清视黄醇结合蛋白联合脂联素对妊娠期糖尿病的早期预测价值 [J]. *重庆医学*, 2016, 45(27): 3788-3789, 3792
- [18] 冯艳, 宋新娜, 徐晓萌, 等. 妊娠期糖尿病患者铁代谢与部分应激激素及胰岛素抵抗的关系 [J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2018, 34(7): 563-566
- [19] Sartorelli DS, Crivellenti LC, Zuccolotto DCC, et al. Relationship between minimally and ultra-processed food intake during pregnancy with obesity and gestational diabetes mellitus [J]. *Cad Saude Publica*, 2019, 35(4): e00049318
- [20] Takata Y, Nomura K, Ishibashi K, et al. Elevated Expression of Vascular Adhesion Molecule-1, Plasminogen Activator Inhibitor-1, Cyclooxygenase-2, and Thrombomodulin in Human Umbilical Vein Endothelial Cells from Hospitalized Gestational Diabetes Mellitus Patients[J]. *Biol Pharm Bull*, 2019, 42(5): 807-813
- [21] 翟悦静, 朱思宇, 左学军, 等. 麦芪降糖丸联合胰岛素对妊娠期糖尿病患者相关指标的影响[J]. *中国药房*, 2016, 27(15): 2035-2036, 2037
- [22] 徐瑾, 杨明华. 二甲双胍联合胰岛素对妊娠期糖尿病患者细胞炎症因子、糖脂代谢、同型半胱氨酸和瘦素水平表达的影响[J]. *中国妇幼保健*, 2019, 34(1): 56-58
- [23] Rajaraman B, Ramadas N, Krishnasamy S, et al. Hyperglycaemia cause vascular inflammation through advanced glycation end products/early growth response-1 axis in gestational diabetes mellitus[J]. *Mol Cell Biochem*, 2019, 456(1-2): 179-190
- [24] Chevillard G, Derjuga A, Devost D, et al. Identification of interleukin-1beta regulated genes in uterine smooth muscle cells [J]. *Reproduction*, 2007, 134(6): 811-822
- [25] Dubicke A, Fransson E, Centini G, et al. Pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in human preterm and term cervical ripening[J]. *J Reprod Immunol*, 2010, 84(2): 176-185
- [26] Tang Y, Ji H, Liu H, et al. Pro-inflammatory cytokine-induced microRNA-212-3p expression promotes myocyte contraction via methyl-CpG-binding protein 2: a novel mechanism for infection-related preterm parturition[J]. *Mol Hum Reprod*, 2019, 25(5): 274-282
- [27] Treviño-Garza C, Villarreal-Martínez L, Estrada-Zúñiga CM, et al. Leptin, IL-6 and TNF- α levels in umbilical cord blood of healthy term newborns in relation to mode of delivery[J]. *J Obstet Gynaecol*, 2016, 36(6): 719-721
- [28] 高秀艳. 门冬胰岛素和生物合成人胰岛素治疗妊娠期糖尿病的疗效观察[J]. *中国妇幼保健*, 2014, 29(19): 3068-3070
- [29] Kansu-Celik H, Ozgu-Erdinc AS, Kisa B, et al. Prediction of gestational diabetes mellitus in the first trimester: comparison of maternal fetuin-A, N-terminal proatrial natriuretic peptide, high-sensitivity C-reactive protein, and fasting glucose levels [J]. *Arch Endocrinol Metab*, 2019, 63(2): 121-127
- [30] 刘诗羽, 付佳鑫, 孟宜波, 等. 晚期糖基化终末产物在妊娠期糖尿病中的研究进展[J]. *中华内分泌外科杂志*, 2018, 12(4): 345-347, 352

(上接第 4439 页)

- [27] Lyu N, Lin Y, Kong Y, et al. FOXA1: a phase II trial evaluating the efficacy and safety of hepatic arterial infusion of oxaliplatin plus fluorouracil/leucovorin for advanced hepatocellular carcinoma [J]. *Gut*, 2018, 67(2): 395.391-396
- [28] Shi M. Transarterial chemoembolization as initial treatment for unresectable hepatocellular carcinoma in southern China[J]. *World J Gastroenterol*, 2010, 16(2): 264-269
- [29] Chen Q-F, Jia Z-Y, Yang Z-Q, et al. Transarterial Chemoembolization Monotherapy Versus Combined Transarterial Chemoembolization-Microwave Ablation Therapy for Hepatocellular Carcinoma Tumors \leq 5 cm: A Propensity Analysis at a Single Center[J]. *Cardiovasc Intervent Radiol*, 2017, 40(11): 1748-1755
- [30] Wu Pei-hong, Li Wang, Chen Qi-feng. Minimally invasive and multi-disciplinary diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma ----2018 Guangzhou Consensus [J]. *J Intervent Radiol*, 2019, 28(7): 610-624
- [31] Chen Qi-feng, Jia Zhen-yu, Yang Zheng-qiang, et al. Transcatheter arterial chemoembolization combined with microwave ablation and hepatic artery meta-analysis of the efficacy of chemoembolization in the treatment of large liver cancer[J]. *J Intervent Radiol*, 2017, 26(3): 225-231
- [32] Huang G, Lau WY, Wang ZG, et al. Antiviral therapy improves postoperative survival in patients with hepatocellular carcinoma: a randomized controlled trial[J]. *Ann Surg*, 2015, 261(1): 56-66
- [33] Yin J, Li N, Han Y, et al. Effect of antiviral treatment with nucleotide/nucleoside analogs on postoperative prognosis of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma: a two-stage longitudinal clinical study[J]. *J Clin Oncol*, 2013, 31(29): 3647-3655
- [34] Benvegna L, Noventa F, Bernardinello E, et al. Evidence for an association between the aetiology of cirrhosis and pattern of hepatocellular carcinoma development[J]. *Gut*, 2001, 48(1): 110-115
- [35] Kneuert PJ, Demirjian A, Firoozmand A, et al. Diffuse infiltrative hepatocellular carcinoma: assessment of presentation, treatment, and outcomes[J]. *Ann Surg Oncol*, 2012, 19(9): 2897-2907