

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.16.043

microRNA 在口腔鳞癌中的研究进展*

白黎露 姚 宏 张海军 李建学 马东洋[△]

(兰州军区总医院口腔科 甘肃 兰州 730050)

摘要: 口腔鳞状细胞癌(OSCC)是口腔颌面部恶性肿瘤中最主要的一类,约占 80%以上,好发于男性,但近年来女性的发病率也呈现逐年增加的趋势;microRNA,是一类稳定的短序列非编码 RNA,其主要功能是在转录后水平参与靶基因的调控,近来研究已发现在 OSCC 患者中存在许多异常表达的 microRNAs,而这些分子在 OSAS 的发生发展中扮演着重要的角色,异常的 microRNA 同样对 OSCC 的临床诊断、治疗以及判断预后都有着重要的作用;本文对当前 microRNA 在 OSCC 中的异常表达、作用机制以及作为诊断标记物、治疗靶点的潜能进行了综述。

关键词: 口腔鳞状细胞癌;微小 RNA

中图分类号: R781 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2014)16-3163-04

Review on the role of microRNA in Oral squamous cell carcinoma (OSCC)*

BAI Li-lu, YAO Hong, ZHANG Hai-jun, LI Jian-xue, MA Dong-yang

(Department of Stomatology, General Hospital of Lanzhou Area Command of Chinese PLA, Lanzhou, Gansu, 730050, China)

ABSTRACT: Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is one of the most common cancers worldwide about 80%, and it primarily affected male population, but the incidence of OSCC in women was increased recently. MicroRNAs (miRNAs) are small noncoding RNAs that post-transcriptionally modulate gene expression by degrading or repressing the translation of target messenger RNAs (mRNA). Aberrant miRNA expression has been reported in OSCC, and this altered expression may be useful for the early detection of oral cancer. In this review we highlight the miRNAs profile of OSCC, mechanisms, and the potential of being diagnostic markers or therapeutic targets in OSAS.

Key words: Oral squamous cell carcinoma; MicroRNA

Chinese Library Classification(CLC): R781 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)16-3163-04

前言

口腔鳞状细胞癌(OSCC)是口腔颌面部最常见的恶性肿瘤,约占 80%以上,据统计在世界范围内,OSCC 发病率在男性中排在第 8 位,在女性中排在第 14 位^[1];虽然在过去几十年里肿瘤基础研究及临床治疗得到了迅速发展,但 OSCC 的 5 年生存率并没有得到显著改善仍约为 50%左右,给患者的生活质量与社会医疗造成了极大的负担^[2];microRNA,作为一类重要的转录后调控因子,几乎参与了生物体所有的生物学活动,近来研究发现在 OSCC 患者中存在异常表达的 microRNA,这些 microRNA 与 OSCC 的发生、发展都有着重要的作用;对于二者关系的研究将有助于提高 OSCC 早期诊断效能、改善 OSCC 的临床治疗状况以及判断 OSCC 患者的预后生存等,故本文对当前 microRNA 在 OSCC 中的研究进行综述如下:

1 OSCC 中异常的 microRNA 表达谱

研究已证实在 OSCC 中存在多种异常表达的 microRNA,如上调的 miR-21、miR-24、miR-31、miR-155、miR-184、miR-211

等,下调的 miR-100、miR-125、miR-133、miR-137、miR-138、miR-145、miR-222、miR-375 等,这些 microRNAs 在 OSCC 患者的肿瘤组织中处于异常表达水平,通过对多种不同的肿瘤相关蛋白的异常调节参与肿瘤的发生、发展;近来,Daisuke 通过对 29 例 OSCC 与 7 例健康对照组分析发现在 OSCC 肿瘤组织中存在有 12 个 microRNAs 上调及 11 microRNA 下调^[3];而在 Siow 的研究中只发现有 19 个 microRNA 在 OSCC 中异常表达^[4];这种差异也显示出在不同类型的 OSCC 中可能存在有不同的 microRNA 表达;而随着新一代全基因组深度测序技术的发展,OSCC 患者中全面的异常 microRNA 表达谱也将逐渐清晰,新的、更多的异常表达 microRNA 也将被发现。

2 microRNA 在 OSCC 中的生物学功能

肿瘤的形成的是由一系列基因或表观遗传修饰改变导致正常细胞恶变成肿瘤细胞的过程,在此过程中包括许多信号通路如细胞增殖分化、能量代谢、肿瘤免疫等均可能发生异常,研究已证实在 OSCC 中,异常表达的 microRNA 可影响包括细胞增殖分化、凋亡、血管形成、肿瘤浸润及转移等多种功能。

* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(81170938);甘肃省自然科学基金项目(1208RJZA263);

全军医学科研"十二五"计划项目(CWS12J066)

作者简介:白黎露(1982-02-23),女,主治医师,主要研究方向:口腔肿瘤发病机制与治疗,电话:18919170577, E-mail:bailloral@126.com

[△]通讯作者:马东洋, E-mail:doctormdy@hotmail.com

(收稿日期:2014-01-26 接受日期:2014-02-25)

miR-21 是当前在 OSCC 中研究较为彻底的一类 microRNA, 在肿瘤形成的过程中, miR-21 可通过异常调控 Bcl-2、PTEN、TPM1 等分子参与肿瘤形成、浸润与转移^[9]; 还发现 miR-21 是一类潜在的致癌基因与抗凋亡因子, 其不仅可以促进 OSCC 细胞的生长还能抑制癌细胞凋亡, 临床研究证实 miR-21 的表达水平与 OSCC 的组织破坏程度呈正相关^[9]。miR-24 在 OSCC 中同样高表达, 在高表达 miR-24 的 OSCC 细胞中 p57 的水平会显著降低; 此外, 在舌鳞状癌细胞中 miR-24 可以下调 RNA 结合蛋白 DND1 的表达, 抑制细胞周期依赖性蛋白激酶抑制体 1B(CDKN1B, p27) 的活性促进癌细胞生长、抑制凋亡^[7]。miR-211 在 OSCC 形成过程的被认为可以靶向作用于多个参与肿瘤血管形成、癌细胞凋亡的基因, 上高 miR-211 的表达后可通过调控细胞周期蛋白 D1 的活性增加癌细胞增殖、转移及肿瘤集落的形成^[8]。高表达的 miR-31 在 OSCC 细胞中可促进缺氧诱导因子 HIF 的表达, 激活 HIF 信号通路, 促进与肿瘤血管生成、转移有关的多种基因翻译参与 OSCC 形成与发展^[9]。miR-155 同样可以靶向作用于 CDC73, 下调其表达, 在鳞癌细胞株中上高 miR-155 的活性可以降低 CDC73 表达, 增强肿瘤细胞增殖与活力、抑制肿瘤细胞凋亡^[10]。除此之外, 研究还发现在舌鳞癌细胞中高表达的 miR-184 可通过调控 c-Myc 的表达参与肿瘤细胞凋亡的异常调控。

除上述上调的 microRNA 外, 在 OSCC 中同样存在许多表达下调的 microRNAs, 这些 microRNA 可通过诱导细胞周期异常、凋亡障碍等参与肿瘤的发生、发展, 在 OSCC 中 miR-137、miR-193a 可以分别靶向作用于细胞周期依赖性激酶 6(CDK6) 及 E2F 转录因子 6(E2F6), 在转染 miR-133 前体后可使肿瘤细胞增殖减弱、凋亡增强^[11]; 此外, miR-133 还可以靶向作用于致癌因子 M2 型丙酮酸激酶(PKM2)^[12]。miR-138 是一类可以影响 OSCC 转移的 microRNA, 在舌鳞癌细胞中上调 miR-138 的表达可以抑制肿瘤细胞浸润、引起细胞周期阻滞及细胞凋亡, 而敲除 miR-138 基因后癌细胞浸润能力加强而凋亡能力减弱; 进一步的研究显示 miR-138 在 OSCC 中主要通过 Rho GTPase 信号级联信号通路参与调节细胞形态、极化、运动, 实现癌细胞的远处转移^[13]。此外, 最近研究还发现 miR-145 在 OSCC 患者中表达显著下调, 上调 miR-145 的水平可以降低 c-Mys、CDK6 的表达进而抑制癌细胞增殖、集落形成以及诱导 G1 周期阻滞、癌细胞凋亡^[14]。

基质金属蛋白酶(MMPs)在 OSCC 中的表达存在显著异常^[15,16], miR-100 被报道可以靶向作用于 MMP13 下调其表达并激活 MMP 家族其它成员^[17]; 而 miR-204 同样可以通过与 MMPs 相互作用调控细胞-基质相互作用及蛋白水解作用, 在鳞癌细胞株中发现, 增加 miR-204 活性可以抑制细胞-基质相互作用、降低癌细胞体外运动及侵袭的能力^[18]; miR-222 作为 OSCC 中下调的一类 microRNA, 已经证实其实也可以调控 MMP1 的表达参与癌细胞侵袭与转移, 而在机制研究中发现 miR-222 被认为可通过两种机制调节 MMP1 的表达: 一是直接靶向调控 MMP1 mRNA, 二是通过作用 SOD2 间接抑制 MMP1 的表达^[19]。

3 microRNA 与 OSCC 的临床诊断

不同类型的 OSCC 中特异性 microRNA 表达谱的存在提示一些特定的 microRNA 可以用于鉴别诊断肿瘤组织的分化程度、类型、临床分期等; 当前关于 microRNA 在 OSCC 中潜在诊断作用得到了广泛的研究。如人们发现 miR-205 在伴淋巴结转移的 OSCC 患者中表达显著高于非转移者, 提示 miR-205 有助于诊断转移性 OSCC^[20]; miR-375 被发现在局部晚期的头颈部鳞状细胞癌中显著下调, 而且发现与口腔内鳞状细胞癌相比, miR-375 在咽、喉部鳞癌中的表达更高, 这一发现认为 miR-375 可以用于鉴别肿瘤的类型、区分肿瘤的部位等^[21]; 此外, 还发现 miR-31 在 OSCC 的早期阶段、淋巴结未转移或口腔粘膜鳞癌中特异性升高, 而 miR-375 在晚期、直径较大及非粘膜型的侵袭性鳞状细胞癌中表达特异性下调, 证实这两类 microRNA 与肿瘤的分期、部位都有着显著的相关性^[22]; 最近的研究还发现下调的 miR-145 对于 OSCC 的早期诊断有着重要的价值^[23]; 除此之外, Gombos 等人还发现肿瘤组织中异常表达 miR-21 与 miR-155 联合诊断 OSCC 的特异度与敏感度均可超过 90%, 显示 microRNA 良好的诊断效能^[23]。

由于血清与唾液的易得性及相对非侵入性, 当前是许多研究者开始寻找血清或唾液中用于诊断 OSCC 的特异性 microRNA; 如发现在晚期 OSCC 患者外周血清中游离 miR-24、miR-184 的浓度显著升高, 且在原发肿瘤切除后 miR-184 水平会显著下降^[7,24]; 类似的还有 miR-31 在手术切除前血清与唾液中的浓度升高, 而在手术后两种体液中的 miR-31 均会显著下降, 从而提示该 microRNA 可能会作为一类区分 OSCC 非癌条件的全身标记物^[9]。在唾液中游离 microRNA 的检测方面, 研究发现在 OSCC 患者的唾液中 miR-200a、miR-125a 显著低于健康组, 而在 OSCC 的口腔漱液中同样发现 miR-375 及 miR-200a 的浓度显著降低^[25,26]; 因此, 认为 microRNA 在口腔体液中是存在的且可检测, 提示其可在将来可作为一种非侵入性的 OSCC 临床检测方法。

4 microRNA 与 OSCC 的治疗

特定 microRNA 靶基因的鉴定对于评估 microRNA 的功能以及基于 microRNA 的肿瘤治疗都是至关重要的步骤, 上调低表达的肿瘤抑制性 microRNA 以及下调高表达的致癌性 microRNA 是两个潜在有效的治疗肿瘤的方法。

肿瘤抑制性 microRNA 的重组与致癌性 microRNA 的特异性敲除已经在动物模型中达到了很好的效果, 且在不同的肿瘤中得到了验证; 致癌性 microRNA 的下调可以通过反义寡核苷酸或抑制成熟 microRNA 的合成等方法来完成; 如在 OSCC 癌细胞中转染 miR-21 抑制体可以降低肿瘤的增殖, 而转染 miR-137、miR-193a 类似物可以显著降低癌细胞数量。

除了 microRNA 抑制体与类似物以外, 最近的一篇研究还发现 miR-200 与 miR-205 在浸润性、转移性肿瘤中显著下调表达, 而该种下降主要与 CpG 的甲基化有关, 所以在这类患者中针对 DNA 甲基化的策略对于鉴别此类肿瘤以及靶向治疗都有着重要的作用^[27]; 而随着新的研究不断的开展, 这些方法都可能会成为 OSCC 治疗中新分子治疗途径。

此外, 研究还发现一些 microRNA 可能与 OSCC 的药物治疗效果有着重要的关系, 如 miR-125b 被发现与 OSCC 患者的

放疗耐受有关,高表达 miR-125b 的细胞有显著低的增殖率,并呈现出对放射治疗的敏感性,且这种异表达水平与 OSCC 肿瘤分期及生存率有着重要相关性^[28];而 miR-21 被认为与肿瘤对顺铂的敏感性有关,而 miR-214 及 miR-23 与肿瘤对顺铂的耐受有关,这提示 microRNA 也可能成为将来 OSCC 患者个性化治疗的重要标记物^[29]。

5 microRNA 与 OSCC 的预后

最近研究 microRNA 异常表达与病人的生存率的关系时发现在舌鳞状细胞癌中高度表达于肿瘤组织中的 miR-21 是显示预后较差的标记分子,高水平的 miR-21 会显著降低患者的 5 年生存率^[30];而 miR-17-92 家族的过表达可以下降 OSCC 癌细胞的侵袭力,与淋巴结转移及 TNM 分期均呈负相关性,可以显著改善 OSCC 的预后状况^[31];此外,Let-7、miR-205 也被动发现与 OSCC 患者差的预后有着重要的关系^[32]。

此外,据报道 16-62% 的口腔鳞状细胞癌都是从口腔粘膜白斑发展而来,它是最常见的口腔粘膜的癌前病变,但是至今没有有效的临床或组织学方法来预测其发展方向,microRNA 生物合成、microRNA 基因、以及潜在恶性病变相关的重要基因异常都可能与口腔粘膜白斑癌变有关,这些异常 microRNA 同样可能会成为癌症预防和早期诊断的可靠标记物;如 miR-181b、miR-345、miR-21, 由于其表达水平已被证明可随病变的严重程度增加而升高,故认为其可用于评估口腔粘膜白斑有无恶变的风险^[6]。

6 小结与展望

综上所述,当前的研究已明确证实在 OSCC 中存在异常表达的 microRNAs,这些 microRNA 分子参与调控了肿瘤细胞增殖、分化、凋亡、浸润及转移等;特异性 microRNA 的检测可以提高肿瘤早期诊断的效能,及用于判断肿瘤的分期、分化、类型等,具有巨大的肿瘤靶向治疗的潜能;此外,对于肿瘤患者的预后判断同样有着重要的指示作用。但是,尽管在 microRNA 与 OSCC 关系的研究中取得了如此多的成绩,但对于 microRNA 在 OSCC 中的具体作用机制我们并未十分清楚,从而要求在将来的研究中继续在不同类型、不同分期、不同分化程度的 OSCC 肿瘤中分析 microRNA 表达及其作用机制,为将来 microRNA 用于 OSCC 的鉴别诊断、靶向治疗、预后判断等提供理论支持。

参考文献(References)

- [1] De Camargo Cancela M, Voti L, Guerra-Yi M, et al. Oral cavity cancer in developed and in developing countries: population-based incidence [J]. *Head Neck*, 2010, 32(3): 357-367
- [2] Funk GF, Karnell LH, Robinson RA, et al. Presentation, treatment, and outcome of oral cavity cancer: a National Cancer Data Base report[J]. *Head Neck*, 2002, 24(2): 165-180
- [3] Soga D, Yoshida S, Shioyama S, et al. microRNA expression profiles in oral squamous cell carcinoma[J]. *Oncol Rep*, 2013, 30(2): 579-583
- [4] Siow M, Karen Ng L, Vincent Chong V, et al. Dysregulation of miR-31 and miR-375 expression is associated with clinical outcomes in oral carcinoma[J]. *Oral Dis*, 2013
- [5] Wang W, Songlin P, Sun Y, et al. miR-21 inhibitor sensitizes human OSCC cells to cisplatin[J]. *Mol Biol Rep*, 2012, 39(5): 5481-5485
- [6] Cervigne NK, Reis PP, Machado J, et al. Identification of a microRNA signature associated with progression of leukoplakia to oral carcinoma[J]. *Hum Mol Genet*, 2009, 18(24): 4818-4829
- [7] Lin SC, Liu CJ, Lin JA, et al. miR-24 up-regulation in oral carcinoma: positive association from clinical and in vitro analysis[J]. *Oral Oncol*, 2010, 46(3): 204-208
- [8] Chang KW, Liu CJ, Chu TH, et al. Association between high miR-211 microRNA expression and the poor prognosis of oral carcinoma [J]. *J Dent Res*, 2008, 87(11): 1063-1068
- [9] Liu CJ, Kao SY, Tu HF, et al. Increase of microRNA miR-31 level in plasma could be a potential marker of oral cancer [J]. *Oral Dis*, 2010, 16(4): 360-364
- [10] Rather MI, Nagashri MN, Swamy SS, et al. Oncogenic microRNA-155 down-regulates tumor suppressor CDC73 and promotes oral squamous cell carcinoma cell proliferation: implications for cancer therapeutics[J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(1): 608-618
- [11] Kozaki K, Imoto I, Mogi S, et al. Exploration of tumor-suppressive microRNAs silenced by DNA hypermethylation in oral cancer [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(7): 2094-2105
- [12] Wong TS, Liu XB, Chung-Wai Ho A, et al. Identification of pyruvate kinase type M2 as potential oncoprotein in squamous cell carcinoma of tongue through microRNA profiling[J]. *Int J Cancer*, 2008, 123(2): 251-257
- [13] Jiang L, Liu X, Kolokythas A, et al. Downregulation of the Rho GTPase signaling pathway is involved in the microRNA-138-mediated inhibition of cell migration and invasion in tongue squamous cell carcinoma[J]. *Int J Cancer*, 2010, 127(3): 505-512
- [14] Shao Y, Qu Y, Dang S, et al. MiR-145 inhibits oral squamous cell carcinoma (OSCC) cell growth by targeting c-Myc and Cdk6[J]. *Cancer Cell Int*, 2013, 13(1): 51
- [15] Mashhadiabbas F, Mahjour F, Mahjour SB, et al. The immunohistochemical characterization of MMP-2, MMP-10, TIMP-1, TIMP-2, and podoplanin in oral squamous cell carcinoma [J]. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*, 2012, 114(2): 240-250
- [16] 刘友良,唐贻贵,方晓明等. 基质金属蛋白酶-9 及基质金属蛋白酶抑制剂-1 在口腔鳞状细胞癌中的表达研究[J]. *口腔医学*, 2010, 30(2): 80-82
- [16] Liu You-liang, Tang Zhan-gui, Fang Xiao-min g, et al. Expression of MMP-9 and TIMP-1 in oral squamous cell carcinoma[J]. *Stomatology*, 2010, 30(2): 80-82
- [17] Henson BJ, Bhattacharjee S, O'Dee DM, et al. Decreased expression of miR-125b and miR-100 in oral cancer cells contributes to malignancy[J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 2009, 48(7): 569-582
- [18] Lee Y, Yang X, Huang Y, et al. Network modeling identifies molecular functions targeted by miR-204 to suppress head and neck tumor metastasis[J]. *PLoS Comput Biol*, 2010, 6(4): e1000730
- [19] Liu X, Yu J, Jiang L, et al. MicroRNA-222 regulates cell invasion by targeting matrix metalloproteinase 1 (MMP1) and manganese superoxide dismutase 2 (SOD2) in tongue squamous cell carcinoma cell lines[J]. *Cancer Genomics Proteomics*, 2009, 6(3): 131-139
- [20] Kimura S, Naganuma S, Susuki D, et al. Expression of microRNAs in

- squamous cell carcinoma of human head and neck and the esophagus: miR-205 and miR-21 are specific markers for HNSCC and ESCC[J]. *Oncol Rep*, 2010, 23(6): 1625-1633
- [21] Hui AB, Lenarduzzi M, Krushel T, et al. Comprehensive MicroRNA profiling for head and neck squamous cell carcinomas[J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(4): 1129-1139
- [22] Gao L, Ren W, Chang S, et al. Downregulation of miR-145 expression in oral squamous cell carcinomas and its clinical significance[J]. *Onkologie*, 2013, 36(4): 194-199
- [23] Gombos K, Horvath R, Szele E, et al. miRNA expression profiles of oral squamous cell carcinomas [J]. *Anticancer Res*, 2013, 33 (4): 1511-1517
- [24] Wong TS, Liu XB, Wong BY, et al. Mature miR-184 as Potential Oncogenic microRNA of Squamous Cell Carcinoma of Tongue[J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(9): 2588-2592
- [25] Wiklund ED, Gao S, Hulf T, et al. MicroRNA alterations and associated aberrant DNA methylation patterns across multiple sample types in oral squamous cell carcinoma[J]. *PLoS One*, 2011, 6(11): e27840
- [26] Park NJ, Zhou H, Elashoff D, et al. Salivary microRNA: discovery, characterization, and clinical utility for oral cancer detection [J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(17): 5473-5477
- [27] Minor J, Wang X, Zhang F, et al. Methylation of microRNA-9 is a specific and sensitive biomarker for oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas[J]. *Oral Oncol*, 2012, 48(1): 73-78
- [28] Shiiba M, Shinozuka K, Saito K, et al. MicroRNA-125b regulates proliferation and radioresistance of oral squamous cell carcinoma[J]. *Br J Cancer*, 2013, 108(9): 1817-1821
- [29] Yu ZW, Zhong LP, Ji T, et al. MicroRNAs contribute to the chemoresistance of cisplatin in tongue squamous cell carcinoma lines[J]. *Oral Oncol*, 2010, 46(4): 317-322
- [30] Li J, Huang H, Sun L, et al. MiR-21 indicates poor prognosis in tongue squamous cell carcinomas as an apoptosis inhibitor [J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(12): 3998-4008
- [31] Chang CC, Yang YJ, Li YJ, et al. MicroRNA-17/20a functions to inhibit cell migration and can be used a prognostic marker in oral squamous cell carcinoma[J]. *Oral Oncol*, 2013
- [32] Childs G, Fazzari M, Kung G, et al. Low-level expression of microRNAs let-7d and miR-205 are prognostic markers of head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Am J Pathol*, 2009, 174(3): 736-745

(上接第 3144 页)

- [13] Nancy A, Andrew A, Mark T, et al. Safety and Efficacy of the Cyclooxygenase-2 Inhibitors Parecoxib and Valdecoxib after Noncardiac Surgery[J]. *Anesthesiology*, 2006,104(3):518-526
- [14] Brucek PJ, Straka Z, Vanek T, et al. Less invasive cardiac anesthesia: an ultra- fast-track Procedure avoiding thoracic epidural analgesia[J]. *Heart Surg Forum*, 2003,6(6): 107-110
- [15] Reuben SS, Ekman EF, Raghunathan K, et al. The effect of cyclooxygenase-2 inhibition on acute and chronic donor-site pain after spinal-fusion surgery [J]. *Reg Anesth pain Med*, 2006, 31 (1) :6-13
- [16] 杜权,葛衡江,朱佩芳.围术期镇痛对术后炎症反应的影响[J]. *国际麻醉学与复苏杂志*,2007,28(1):48-50
- Du Quan, Ge Heng-jiang, Zhu Pei-fang. Effects of perioperative analgesia on postoperative inflammatory response[J]. *International Journal of Anesthesiology and Resuscitation*, 2007,28(1):48-50
- [17] Fornai M, Colucci R, Graziani F, et al. Cyclooxygenase-2 induction after oral surgery does not entirely account for analgesia after selective blockade of cyclooxygenase 2 in the preoperative period[J]. *Anesthesiology*, 2006,104(1):152-157
- [18] Wills VL, Hunt DR. Pain after laparoscopic cholecystectomy[J]. *Br J Surg*,2000,87(3):273-284
- [19] Wu CL, Berenholtz SM, Pronovost PJ, et al. Systematic review and analysis of post discharge symptoms after out-patient surgery [J]. *Anesthesiology*,2002,96:994-1003
- [20] Bisgaard T, Klarskov B, Rosenberg J, et al. Characteristics and prediction of early pain after laparoscopic cholecystectomy [J]. *Pain*, 2001,90(3):261-269