

肝 癌

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.001631

HBV-X 突变与 TGF- β 1 致肝细胞肝癌相关性分析

王玉凤, 何 松

(重庆医科大学附属第二医院消化内科, 重庆 400010)

【摘要】目的:探讨乙肝病毒 X 区基因(hepatitis B virus X gene, HBV-X)变异情况与慢性乙肝病毒(hepatitis B virus, HBV)感染患者血清中转化生长因子- β 1(transforming growth factor beta 1, TGF- β 1)表达致肝细胞肝癌间的相关性。**方法:**收集 2015 年 1 月至 2016 年 10 月期间重庆医科大学附属第二医院的慢性乙型肝炎患者血清 35 例, 肝硬化 35 例, 肝癌 35 例。采用聚合酶链反应方法(polymerase chain reaction, PCR)扩增 HBV-X 基因序列, 并对其产物行 DNA 测序, 将测序结果与已知 HBV-X 基因序列对比分析变异位点。酶联免疫吸附测定法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测患者血清中 TGF- β 1 浓度。将结果进行卡方检验、单因素方差分析等方法处理数据。**结果:**TGF- β 1 浓度在肝癌组表达明显高于非肝癌组, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。肝病患者血清中常见的突变位点依次为: A1762T/G1764A、T1719C、G1635A、A1605G、C1653T、T1753G, 其中 A1605G、A1762T/G1764A、T1753G 突变率在肝癌组明显高于非肝癌组, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。采用 t 检验对两者进行分析发现, 3 个位点突变与不突变组的 TGF- β 1 浓度存在统计学差异。**结论:**HBV-X 基因中的 T1753G、A1605G、A1762T/G1764A 位点突变可能与 TGF- β 1 表达及肝癌的发生相关, 这可能参与了肝癌疾病发展进程。

【关键词】乙肝病毒 X 基因; 点突变; 肝细胞肝癌; 转化生长因子- β 1

【中图分类号】R735.7

【文献标志码】A

【收稿日期】2018-01-01

Correlation between HBV-X gene mutation and TGF- β 1
in hepatocellular carcinoma

Wang Yufeng, He Song

(Department of Gastroenterology, The Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To study the correlation between hepatitis B virus X gene (HBV-X gene) mutation and transforming growth factor beta 1 (TGF- β 1) in hepatocarcinogenesis among the patients with chronic hepatitis B virus (HBV) infection. **Methods:** The serum samples of 105 patients with HBV infected were collected in The Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University from 2015 to 2016. They were divided into chronic hepatitis B group (35 cases), liver cirrhosis groups (35 cases), primary liver cancer group (35 cases). The HBV-X gene sequences were amplified from the serum samples by polymerase chain reaction (PCR), then the amplified products were sequenced, finally compared with those reported in GenBank to find the variable sites. The levels of TGF- β 1 from serum samples were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. **Results:** The level of TGF- β 1 was significantly higher in primary liver cancer group than in other groups. The common HBV-X gene mutation sites including: A1762T/G1764A, T1719C, G1635A, A1605G, C1653T, T1753G. The HBV-X gene mutation including A1605G, A1762T/G1764A, T1753G was significantly higher in primary liver cancer group than in other groups. T test was used to compare HBV-X gene mutation sites and the level of TGF- β 1 in all patients; there were statistical differences in TGF- β 1 levels of three mutation sites between mutation group and non-mutation group. **Conclusion:** The HBV-X gene mutation sites including A1605G, A1762T/G1764A, T1753G may have correlation with the level of TGF- β 1 and HCC, which may participate in the occurrence of hepatocellular carcinoma.

【Key words】 hepatitis B virus X gene; point mutation; hepatocellular carcinoma; transforming growth factor β 1

作者介绍: 王玉凤, Email: 935232457@qq.com,

研究方向: 原发性肝癌发病机理的研究。

通信作者: 何 松, Email: hedoctor65@sina.com。

基金项目: 重庆市卫生局医学科研计划重点资助项目 (编号: 2013-1-019)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20180409.1312.006.html>
(2018-04-09)

肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是世界上常见的发病范围广、死亡率高的恶性肿瘤,目前对于肝细胞肝癌的发生发展过程仍不清楚。慢性乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染被认为是引起 HBV 相关性肝癌的主要原因^[1]。HBV 的生物学行为改变是引起肝细胞肝癌的主要发病因素,乙肝病毒 X 基因是 HBV DNA 中最小的一个开放读码框,编码乙肝病毒 X 蛋白(hepatitis B virus X protein, HBx),参与 HCC 发生发展的众多生物学过程。大量资料显示 HBV-X 基因变异可改变 HBV 的生物学行为,有利于 HBV 持续性复制,促进 HCC 进程^[2]。转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)是一种细胞生长调节因子,与肝脏疾病最相关的是 TGF- β 1。近年来研究发现 TGF- β 可抑制 HBV 复制,参与影响 HBV 的生物学进程^[3]。而 HBx 可拮抗 TGF- β 的细胞增殖抑制作用,HBx 中的基本核心启动子(basic core promotor, BCP)区自然突变可下调 TGF- β 的表达,有利于肿瘤细胞的恶性增殖^[4]。但目前对于 HBV-X 基因变异与 TGF- β 表达在致 HBV 相关性 HCC 中的关系还不清楚。因此,本实验通过收集 105 例 HBV 相关性肝病患者的血清,检测其 HBV-X 基因变异情况及 TGF- β 1 浓度,探讨 HCC 患者血清中 HBV-X 区常见变异位点与 TGF- β 1 表达的相关性,从而探讨两者在肝细胞肝癌发病过程中的联系。

1 材料和方法

1.1 材料

收集 2015 年 1 月至 2016 年 10 月期间于重庆医科大学附属第二医院就诊的慢性 HBV 感染患者血清共 105 例,确诊标准参照 2015 版《慢性乙型肝炎防治指南》、2011 版《原发性肝癌诊疗规范》,其中肝炎、肝硬化、肝癌患者各 35 例。所有患者均排除其他嗜肝病毒感染,且无自身免疫性肝病、酒精性肝病、药物性肝损害等肝病病史。所有患者均知情同意,并获得重庆医科大学附属第二医院伦理委员会审查同意(编号:2014-075,2014 年 11 月 28 日)。

1.2 主要仪器

5332 普通 PCR 仪(Eppendorf,德国)、电泳仪(Bio-Rad,美国)、凝胶成像分析系统(Bio-Rad,美国)、超微量微孔板分光光度计(Thermo scientific,美国)等。

1.3 主要试剂

血清 HBV-DNA 提取试剂盒(OMEGA,中国)、高保真

PCR 扩增酶(KOD-201,上海海洋生物科技有限公司)、TGF- β 1 ELISA 试剂盒(武汉博士德生物有限公司)。

1.4 方法

1.4.1 HBV 病毒血清学指标检测 根据门诊及住院资料收集所有肝病患者的性别、年龄、HBV-DNA、病毒抗原抗体定量、是否使用抗病毒治疗等基本资料及实验室检查结果。

1.4.2 HBV-X 基因的扩增、测序 严格按照试剂盒说明书提取肝病患者血清中 HBV-DNA。采用巢式 PCR 方法扩增 HBV-X 基因(GenBank accession numbers:JF911665 to JF911696),其引物序列如下:巢式外引物:上游引物:5'-TGCCAAGT-GTTTGCTGACGC-3',下游引物:5'-ACGGAAGAAATCAG-AAGG-3';巢式内引物:上游引物:5'-GCCGATCCATACT-GCGGAAGT-3',下游引物:5'-GGCACAGCTTGAGGCTTG-AA-3',目的扩增片段大小为 624 bp(引物由上海生工合成)。第一轮 PCR 反应配置:Taq 酶 13 mL、10 mmol/L 引物各取 1.5 mL、模板 HBV-DNA 4 mL,加灭菌双蒸水至 25 mL,反应条件为:94℃,15 s;50℃,30 s;68℃,1 min,共 30 个循环。取第一轮反应产物的 2 mL 用巢式内引物按照前述配置反应体系,反应条件为:94℃,15 s;55℃,30 s;68℃,1 min;共 30 个循环。PCR 产物于 1.5%琼脂糖凝胶电泳,于凝胶成像仪中紫外灯下观察结果,切下位于目的片段处的亮带,产物送往上海生工纯化后用两侧内引物完成测序,测序结果应用 BioEdit、ClustalW 软件与标准菌株(HBV/ayw,HBV/adr,HBV/adw,HBV/ayr)进行比较,同在 NCBI 上进行比对。

1.4.3 血清 TGF- β 1 的检测 采用酶联免疫吸附测定法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测 TGF- β 1 浓度,严格按照 ELISA 试剂盒说明书操作,于紫外分光光度计下测量吸光度(absorbance, A)值,然后根据 A 值绘制标准曲线后计算浓度。

1.5 统计学分析

使用统计学软件 SPSS 19.0 进行数据统计分析,采用秩和检验、单因素方差分析比较一般资料组间差异,其中正态计量资料采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,非正态计量资料采用中位数和四分位间距表示,卡方检验分析各组间突变位点的情况, t 检验分析 TGF- β 1 与突变位点间的关系。检验水准均采用 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 患者一般资料分析

将纳入的慢性 HBV 感染患者血清进行分组后对比,年龄存在组间差异,肝炎患者人群年龄偏小(65.5% $>$ 21.1%),肝癌组患者年龄偏大(3.4% $<$ 44.7%),差异具有统计学意义。考虑随着年龄增长,乙肝病毒感染病程越长,越易发展为肝细胞肝癌。HBV-DNA 病毒载量在肝炎组(35 例)明显高于肝硬

化组(35 例)和肝癌组(35 例),差异有统计学意义。考虑大多数患者在发现慢性 HBV 感染初期即进行了抗病毒治疗。此外,也可能与 HBV 病毒整合至肝细胞中有关,因此肝癌组 HBV-DNA 病毒载量要明显低于肝炎组。而性别、HBeAg 水平、是否抗病毒治疗在各组间无明显差异,见表 1。

2.2 血清中 TGF- β 1 检测

慢性肝病患者血清中 TGF- β 1 浓度在肝癌组(35 例)中明显高于肝炎组(35 例)和肝硬化组(35 例),分别为:(10.1 ± 12.2)、(11.4 ± 16.8)、(34.4 ± 29.9) ng/mL,差异有统计学意义($P=0.000$,注: P 值为 TGF- β 1 浓度在不同组间的浓度均值有无差异,其中 $P<0.05$ 有统计学意义),考虑 TGF- β 1 高表达可能与肝癌的发生有关。组间多重比较提示:与肝癌组对比,肝炎组及肝硬化组组间差异均具有统计学意义($P=0.000$),肝硬化与肝炎组间比较差异不具有统计学意义,考虑 TGF- β 1 高表达可能与 HCC 的发生有关。根据是否行抗病毒治疗分为抗病毒组(52 例)和非抗病毒组(53 例),发现 TGF- β 1 浓度在抗病毒组中明显低于非抗病毒组,分别为(11.5 ± 20.6)、(25.7 ± 24.4) ng/mL,差异有统计学意义($P=0.002$)。与患者性别、HBeAg 水平等因素亦无关。结合表 1,提示年龄、HBV-DNA 均参与影响肝癌的进程,进一步分析在肝癌组(35 例),TGF- β 1 与年龄($r=0.000$, $P=0.999$)无关,而 TGF- β 1 浓度与

HBV-DNA($r=0.494$, $P=0.003$)具有相关性。

2.3 血清中 HBV-X 基因变异分析

所有患者中 B 型基因型占 56.1%(59/105),C 型基因型占 43.8%(46/105),其中肝癌组中以 B 基因型为主。基因型别与 HBeAg 水平有关,HBeAg 阳性患者中 C 型基因型占 60.3%(35/58),HBeAg 阴性患者 B 型基因型占 76.6%(36/47),而与病毒载量高低无明显关系,这与之前研究一致(表 2)。检测 HBV-X 变异位点结果示:常见的突变位点依次为 A1762T/G1764A、T1719C、G1635A、A1605G、C1653T、T1753G。其中在肝癌组中发生率高的突变位点有:T1753G(57.1%, $P=0.016$)、A1605G(74.3%, $P=0.001$)、A1762T/G1764A(74.3%, $P=0.003$),考虑以上位点变异可能与肝癌的疾病进程有关,与之前研究结果一致(表 2)。此外,未使用抗病毒药物治疗患者血清中常见变异位点为 A1605G、T1719C,而本课题组发现肝癌组中以 A1605G 单点突变的发生率高,但抗病毒治疗是否会影响 HBV-X 基因的突变、参与影响 HCC 进程还需进一步研究证实。

2.4 HBV-X 基因变异与 TGF- β 1 浓度分析

采用 t 检验对两者进行分析,肝病人群(共 105 例)中仅有 A1605G($t=4.778$, $P=0.000$)、T1719C($t=2.555$, $P=0.002$)、A1762T/G1764A($t=3.105$, $P=0.000$)3 个位点突变与不突变组的 TGF- β 1 浓度存在统计学差异。结合表 2 提示 HBV-X 基

表 1 各组患者基线资料

Tab.1 Baseline characteristics of different groups

项目	肝炎组($n=35$)	肝硬化组($n=35$)	肝癌组($n=35$)	$F/\chi^2/Z$ 值	P 值
年龄(岁)	39.83 ± 14.36	46.49 ± 13.05	51.11 ± 9.27	7.308	0.001
<40($n, \%$)	19(54.3)	9(25.7)	1(2.9)	23.249	0.000
≥ 40 ($n, \%$)	16(45.7)	26(74.3)	34(97.1)		
HBV-DNA [$\times 10^6$ 拷贝/mL, $M(P_{25}, P_{75})$]	5.79(1.06, 46.30)	3.62(1.72, 7.42)	0.17(0.02, 2.25)	20.720	0.000
性别(男, $n, \%$)	26(74.3)	27(77.1)	31(88.6)	2.500	0.262
HBeAg(阳, $n, \%$)	23(65.7)	19(54.3)	16(45.7)	1.448	0.240
抗病毒治疗(是, $n, \%$)	20(57.1)	17(48.6)	15(42.9)	1.448	0.485

注: P 值为各影响因素的不同在疾病不同阶段的分布有无区别, $P<0.05$ 有统计学意义

表 2 各组间 HBV-X 位点突变情况($n, \%$)

Tab.2 The HBV-X gene mutations in different groups($n, \%$)

项目	肝炎组($n=35$)	肝硬化组($n=35$)	肝癌组($n=35$)	χ^2 值	P 值
G1635A	18(51.4)	19(54.3)	17(48.6)	0.229	0.892
C1653T	12(34.3)	17(48.6)	21(60.0)	4.658	0.097
T1753G	9(25.7)	11(31.4)	20(57.1)	8.319	0.016
A1605G	10(28.6)	17(48.6)	26(74.3)	14.706	0.001
A1762T/G1764A	12(34.3)	17(48.6)	26(74.3)	11.531	0.003
T1719C	19(54.3)	14(40.0)	22(62.9)	3.742	0.154
基因型别				7.041	0.030
B 型	17(48.6)	16(45.7)	26(74.3)		
C 型	18(51.4)	19(54.3)	9(25.7)		

注: P 值为基因的不同突变位点在疾病不同阶段的突变有无区别, $P<0.05$ 有统计学意义

因中的 T1753G、A1605G、A1762T/G1764A 位点突变率在肝炎组(35 例)、肝硬化组(35 例)、肝癌组(35 例)中逐渐增加,且在肝癌组中突变率最高,差异具有统计学意义,考虑 T1753G、A1605G、A1762T/G1764A 位点突变可能与 TGF- β 1 表达及肝癌的发生相关,这可能参与了肝癌疾病发展进程。

3 讨 论

本研究通过对 105 例 HBV 感染患者血清行 TGF- β 1 浓度与 HBV-X 基因突变检测发现,在肝癌组中 TGF- β 1 浓度明显升高,肝癌组中 A1762T/G1764A、T1753G、A1605G 变异率高于非肝癌组,对 HBV-X 基因变异与 TGF- β 1 浓度分析发现,肝病人群中仅有 A1605G、T1719C、A1762T/G1764A 位点突变与 TGF- β 1 浓度间的比较存在统计学差异。本课题组考虑,HBV-X 基因中的 T1753G、A1605G、A1762T/G1764A 位点突变可能与 TGF- β 1 表达及肝癌的发生相关,这可能参与了肝癌疾病发展进程。

TGF- β 在慢性 HBV 感染导致的肝病进程中起重要作用^[6],可影响细胞周期进程,TGF- β 可通过诱导诱导性脱氨酶脱氨基,诱导 HBV 共价闭合脱氧核糖核酸降解^[3,7],这可能会影响 HBV 的生物学行为。HBV-X 基因变异可引起 HBx 蛋白生物学行为异常,有利于 HBV 持续性复制,促进 HCC 的发生。早期研究显示,肝细胞损伤早期阶段,HBx 可通过与早期生长应答蛋白 1 位点结合反式激活 TGF- β 1 启动子,影响 TGF- β 1 的表达^[8]。进一步研究发现在肝癌细胞中,HBx 可下调 P27 及 TGF- β 的表达,进而拮抗 TGF- β 诱导细胞滞留于 G1 期,促进细胞周期进程^[9]。此外,TGF- β 的低表达和 HBx 的高表达有利于肝细胞复制,两者的不同表达水平可刺激病毒复制中间产物(pgRNA)的合成以及核心和抗原的分泌水平,从而有利于肝细胞的增殖^[10]。HBx 可拮抗 TGF- β 的细胞增殖抑制作用,促进 pSmad3C 向 pSmad3L 转变,有利于癌细胞增殖^[11]。HBx 还可降低肝脏卵圆细胞对 TGF- β 1 增殖抑制效应的敏感度,进而促进肝细胞生长^[13]。可见,TGF- β 与 HBx 在肝细胞肝癌的发病机制中存在一定的相互作用关系。HBV-X 基因突变是导致肝细胞肝癌的原因之一,近年来关于 HBV-X 基因突变成为了研究热点。有研究者发现 HBx 中 BCP 区自然突变较 HBx 野生型更能明显下调 TGF- β 的表达,拮抗细胞凋亡,有利

于肿瘤细胞恶性增殖^[4]。

本研究发现,TGF- β 1 浓度在肝癌组明显高于非肝癌组,而与年龄、性别、HBeAg 水平无明显关系,这与之前的研究结果一致^[6]。在肝癌组中 TGF- β 1 浓度与 HBV-DNA 载量相关,但具体两者间的影响机制还需进一步研究证实。此外,本研究发现 TGF- β 1 浓度在肝癌组中突变率高且有统计学意义的位点有 A1762T/G1764A、T1753G、A1605G,与之前的研究结果一致^[13]。进一步分析,肝病人群中仅有 A1605G ($t=4.778, P=0.000$)、T1719C ($t=2.555, P=0.002$)、A1762T/G1764A ($t=3.105, P=0.000$) 位点突变与 TGF- β 1 浓度间的比较存在显著统计学差异。结合 HBV-X 基因中的 T1753G、A1605G、A1762T/G1764A 位点突变率在肝炎组、肝硬化组、肝癌组中逐渐增加,且在肝癌组中突变率最高,考虑 T1753G、A1605G、A1762T/G1764A 位点突变可能与 TGF- β 1 表达及肝癌的发生相关,这可能参与了肝癌疾病发展进程。

有研究发现,HBx BCP 区自然突变可抑制 TGF- β 表达、有利于肿瘤细胞的增殖,但在肝细胞肝癌发病不同时期 TGF- β 作用机制可能不同。TGF- β 在早期具有抑制肿瘤细胞生长、诱导分化与凋亡的能力,在肿瘤晚期 TGF- β 具有促进癌细胞增殖和转移的能力,HBx 与 TGF- β 可相互影响,促进细胞增殖、迁移^[14-15]。因此,具体 HBV-X 基因突变、TGF- β 1 表达与原发肝癌间是否呈正相关性还需进一步研究证实。

通过本实验得出 HBV-X 基因中的 T1753G、A1605G、A1762T/G1764A 位点突变可能与 TGF- β 1 表达及肝癌的发生相关,这可能参与了肝癌疾病发展进程,但具体相关性还需进一步证实,HBV 相关性肝细胞肝癌的发生机制本就是一个极其复杂的过程,希望本研究为 HCC 的发病机制及治病靶点方面的研究方面提供一个参考。

参 考 文 献

- [1] El-Serag HB. Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma[J]. Gastroenterology, 2012, 142(6): 1264-1273.
- [2] Scaglioni PP, Melegari M, Wands JR. Biologic properties of hepatitis B viral genomes with mutations in the precore promoter and precore open reading frame[J]. Virology, 1977, 233(2): 374-381.

- [3] Qiao Y, Han X, Guan G, et al. TGF- β triggers HBV cccDNA degradation through AID-dependent deamination[J]. FEBS Lett, 2016, 590(3):419-427.
- [4] Yang CH, Song BC, Cho M. A natural mutation of the hepatitis B virus X gene affects cell cycle progression and apoptosis in Huh7 cells[J]. Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry, 2012, 55(2):229-236.
- [5] Barbini L, Tadey L, Fernandez S, et al. Molecular characterization of hepatitis B virus X gene in chronic hepatitis B patients[J]. Virol J, 2012, 9:131-138.
- [6] 彭小华, 堽堂英, 杨求真, 等. 恩替卡韦与拉米夫定对乙型肝炎肝硬化患者血清 TGF- β 1 的影响研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2015, 25(4):830-832.
- [7] Liang G, Liu G, Kitamura K, et al. TGF- β suppression of HBV RNA through AID-dependent recruitment of an RNA exosome complex[J]. PLoS Pathog, 2015, 11(4):e1004780.
- [8] Yoo YD, Ueda H, Park K, et al. Regulation of transforming growth factor- β 1 expression by the hepatitis B virus(HBV) X transactivator. Role in HBV pathogenesis[J]. J Clin Invest, 1996, 97(2):388-395.
- [9] Yang CH, Cho M. Hepatitis B virus X gene differentially modulates cell cycle progression and apoptotic protein expression in hepatocyte versus hepatoma cell lines[J]. J Viral Hepat, 2013, 20(1):50-58.
- [10] Almajhdi FN, Al-Qudari AY, Hussain Z. Differential expression of transforming growth factor- β 1 and HBx enhances hepatitis B virus replication and augments host immune cytokines and chemokines[J]. Ann Hepatol, 2013, 12(3):408-415.
- [11] Wu YH, Ai X, Liu FY, et al. c-Jun N-terminal kinase inhibitor favors transforming growth factor- β to antagonize hepatitis B virus X protein-induced cell growth promotion in hepatocellular carcinoma[J]. Mol Med Rep, 2016, 13(2):1345-1352.
- [12] 王恒毅, 梁慧芳, 陈孝平, 等. 乙型肝炎病毒编码 X 蛋白降低大鼠肝脏卵圆细胞对 β 型转化生长因子 1 增殖抑制效应敏感度的研究[J]. 中华外科杂志, 2011, 49(5):432-435.
- [13] Yan J, Yao Z, Hu K, et al. Hepatitis B virus core promoter A1762T/G1764A (TA)/T1753A/T1768A mutations contribute to hepatocarcinogenesis by deregulating Skp2 and P53[J]. Dig Dis Sci, 2015, 60(5):1315-1324.
- [14] Fabregat I, Moreno-Caceres J, Sanchez A, et al. TGF- β signalling and liver disease[J]. FEBS J, 2016, 283(12):2219-2232.
- [15] Liu Y, Xu Y, Ma H, et al. Hepatitis B virus X protein amplifies TGF- β promotion on HCC motility through down-regulating PPM1a[J]. Oncotarget, 2016, 7(22):33125-33135.

(责任编辑:冉明会)

更正

本刊 2018 年第 4 期第 568-572 页的《输尿管镜直视法建立经皮肾通道的安全性和有效性分析》一文作者由“王云龙, 苏 帅, 张琪琳, 冉瑞图, 刘 航, 翁宏庆”更正为:王云龙, 苏 帅, 张琪琳, 冉瑞图, 刘 航, 翁宏庆, 尹志康。

重庆医科大学学报编辑部