

文章编号:1000-5404(2012)07-0639-04

论著

三氧化二砷对前列腺癌 DU-145 细胞 RASSF1A 基因的去甲基化作用

倪渐凤¹, 孙晓娟¹, 张伟杰¹, 赵培荣², 王留兴¹ (450052 郑州, 郑州大学第一附属医院: 肿瘤科¹, 肿瘤中心²)

[摘要] 目的 研究三氧化二砷(arsenic trioxide, As₂O₃)对激素非依赖性前列腺癌 DU145 细胞的生长抑制作用及对 RASSF1A 基因去甲基化和蛋白表达的影响。方法 应用 MTT 法检测不同浓度(0.5、1.0、2.0、4.0、6.0、12.0、20.0 μmol/L)的 As₂O₃ 不同作用时间(24、48、72 h)对 DU145 细胞的生长抑制作用;应用甲基化特异性 PCR(MSP)和 Western blot 检测 As₂O₃ 对 DU145 细胞 RASSF1A 基因甲基化状态及蛋白表达的影响。结果 As₂O₃ 可抑制 DU145 细胞的增殖,在一定范围内随着药物浓度的增高,抑制作用逐渐增强($F = 838.089, P < 0.05$);同一浓度作用时间越长,抑制率越高($F = 8.849, P < 0.05$);且 As₂O₃ 可使 RASSF1A 基因甲基化逆转,蛋白重新表达。结论 As₂O₃ 可以逆转前列腺癌 DU145 细胞 RASSF1A 基因启动子 CpG 岛的异常甲基化,诱导该抑癌基因的重新表达,抑制前列腺癌 DU145 细胞的增殖。

[关键词] 三氧化二砷;前列腺癌;甲基化;RASSF1A 基因

[中图分类号] R737.25; R966; R979.19

[文献标志码] A

As₂O₃ demethylates RASSF1A gene in DU145 prostate cancer cells

Ni Jianfeng¹, Sun Xiaojuan¹, Zhang Weijie¹, Zhao Peirong², Wang Liuxing¹ (¹Department of Oncology, ²Tumor Center, First Affiliated Hospital, Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan Province, 450052, China)

[Abstract] **Objective** To determine the inhibitory effects of arsenic trioxide (As₂O₃) on the proliferation in hormonal independent prostate cancer DU145 cells, and on demethylation and expression of Ras-association domain family 1A (RASSF1A). **Methods** MTT assay was used to test the growth of DU145 cells after the treatment of As₂O₃ at 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 12.0 or 20.0 μmol/L for 24, 48 or 72 h. Methylation-specific PCR (MSP) and Western blot analysis were used to detect the methylation status and protein expression of RASSF1A gene in Du145 cells after treatment. **Results** As₂O₃ significantly inhibited the proliferation of DU145 cells in a dose- and time-dependent manner ($F = 838.089, P < 0.05, F = 8.849, P < 0.05$). As₂O₃ treatment reversed the methylation status of RASSF1A gene and made the protein re-expression. **Conclusion** As₂O₃ reverses abnormal methylation status of promoter CpG island of RASSF1A gene in DU145 prostate cancer cells, induces protein re-expression and inhibits the cells proliferation.

[Key words] arsenic trioxide; prostate cancer; methylation; Ras-association domain family 1A gene

Corresponding author: Wang Liuxing, E-mail: wlx2246@yahoo.com.cn

前列腺癌(prostate cancer, PCa)是男性泌尿生殖系统最常见的恶性肿瘤之一。我国前列腺癌发病率近年来迅速增长,且发现时大多已处于中晚期,因此对于晚期前列腺癌的治疗是临床医师面临的巨大挑战。RASSF1A(Ras-association domain family 1A)属于 Ras 相关结构域家族,是新近发现的一个位于人染色体 3p21.3 上的抑癌基因^[1],编码一组 RAS 效应蛋白。RASSF1A 的功能分析显示该蛋白在凋亡的信号传导、微管稳定性和细胞周期循环方面有潜在的作用^[2],在多种恶性肿瘤的发生和诱导细胞凋亡的过程中发挥作用。大量研究表明其在正常组织中可以表达,而在多

种实体肿瘤中却出现较高频率的表达缺失,其表达缺失的机制有:RASSF1A 启动子甲基化、纯合子缺失和杂合子缺失,以启动子甲基化为主^[1]。故对其去甲基化可以使该基因重新表达。目前较常用的甲基化抑制剂为 5-氮杂脱氧胞苷(5-Aza-CdR)等胞苷类似物,但因其细胞毒性强和致突变效应限制了临床使用^[3]。近几年的大量研究表明三氧化二砷(As₂O₃)用于治疗复发和难治性的急性粒细胞白血病,缓解率高达 72% 以上,As₂O₃ 治疗实体瘤的疗效也处于临床研究中^[4]。这些主要是研究关于 As₂O₃ 的诱导细胞凋亡和细胞分化的作用,而对于其去甲基化的作用研究却相对较少。本研究探讨 As₂O₃ 对前列腺癌 DU145 细胞的 RASSF1A 基因是否有去甲基化作用,是否能诱导其重新表达。

[通信作者] 王留兴, E-mail: wlx2246@yahoo.com.cn

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 细胞系及药物 非雄激素依赖性前列腺癌 DU145; 三氧化二砷购与北京双鹭药业股份有限公司(规格为 10 mg)。

1.1.2 主要仪器及试剂 动物组织基因组提取和 PCR 试剂盒购于北京康为世纪生物科技有限公司,甲基化 DNA 修饰试剂盒购于艾美捷科有限公司,兔抗人 RASSF1A 单抗购自北京博奥森生物技术有限公司,山羊抗兔二抗购自北京鼎国昌盛生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 MTT 测定及细胞增殖抑制率计算 取处于对数生长期的前列腺癌 DU145 细胞,用 0.25% 的胰蛋白酶消化后,制成浓度为 4×10^4 /ml 单细胞悬液,接种到 96 孔板中(100 μ l/孔),培养 24 h 后,加入已配制的不同浓度的 As₂O₃ 溶液(0.5、1.0、2.0、4.0、6.0、12.0、20.0 μ mol/L)100 μ l/孔,对照组只加 10% 胎牛血清 RPMI1640 培养基。每组设 6 个平行孔,分别用药物处理 24、48、72 h 后,每孔加入 MTT 液(5 mg/ml)10 μ l,培养箱中继续培养 4 h,终止培养,小心移去孔内培养液,每孔加入 150 μ l DMSO 溶液后,震荡 10 min,充分溶解结晶物。在酶标仪上选择 570 nm 波长,测定各孔的光密度值 [D(570)],并记录结果。实验重复 3 次,取其平均值,计算其抑制率。

$$\text{抑制率} = [1 - \text{实验组 } D(570) \text{ 值} / \text{对照组 } D(570) \text{ 值}] \times 100\%$$

1.2.2 DNA 提取及甲基化 PCR 检测 用不同浓度的 As₂O₃ 溶液(0.5、1.0、2.0、4.0 μ mol/L)处理前列腺癌 DU145 细胞株 72 h 后,离心收集悬浮细胞,按动物组织基因组提取试剂盒提取 DNA,取 24 μ l DNA 样品,按甲基化 DNA 修饰试剂盒进行甲基化修饰。取修饰后 DNA 1 μ g 按 2 \times Es Taq Master Mix (含染料)试剂盒合成 DNA, RASSF1A 基因非甲基化引物上游:5'-GAGAGTGTGTTTGTGTTTGTGTTTTC-3', 下游:5'-CCCATACTTCACTAACTTTAAACAC-3', 扩增产物为 183 bp, 甲基化引物上游:5'-GAGAGCGCGTTTGTGTTTGTGTTTTC-3', 下游:5'-ACCCG-TACTTCGCTAACTTTAAACG-3', 扩增产物为 184 bp, PCR 反应条件如下:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,58 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,共 35 个循环,反应产物经过 2% 琼脂糖凝胶电泳后,观察其凝胶成像情况。

1.2.3 蛋白质提取及 Western blot 检测 用不同浓度的 As₂O₃ (0.5、1.0、2.0、4.0 μ mol/L)处理前列腺癌 DU145 细胞株 72 h 后,离心收集悬浮细胞,提取蛋白质。配胶、加样,以 100 V 恒压进行 SDS-PAGE 电泳 100 min 后,在 100 V 恒压进行转膜(湿转)1.5 h。转膜结束后封闭 1 h。加一抗或内参(TBST 1:200 稀释)于 4 $^{\circ}$ C 过夜。TBST 震荡洗涤 3 次后加二抗(TBST 1:1 000 稀释)震荡 1 h。TBST 洗涤 3 次。ECL 发光 2 min,放入 X 线片夹中曝光、显影、定影及拍照。用 Visionworks 软件分析目标条带的光密度值作为条带的强度指标,比较 As₂O₃ 处理组的蛋白条带强度与相应的 β -actin(48×10^3)条带强度的比值,实验重复 3 次,取平均值进行统计分析。

1.3 统计学分析

计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 17.0 统计学处理软件进行统计学分析,统计学差异的比较采用非参数检验及方差分

析,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 As₂O₃ 对 DU145 细胞的增殖抑制作用

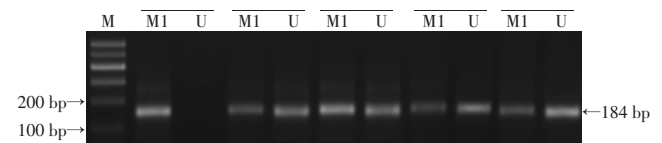
不同浓度的 As₂O₃ 对前列腺癌 DU145 细胞增殖抑制的影响结果见表 1。同一药物浓度组作用 24、48、72 h 3 个时间点,随着时间的延长抑制率越高 ($F = 8.849, P < 0.05$),不同浓度组作用 DU145 细胞随浓度的增高,抑制率越高 ($F = 838.089, P < 0.05$)。

表 1 不同浓度 As₂O₃ 不同作用时间对 DU145 细胞的增殖抑制率 [n = 6, ($\bar{x} \pm s$) %]

As ₂ O ₃ 浓度(μ mol/L)	24 h	48 h	72 h
0.5	4.834 \pm 2.047	11.275 \pm 1.254	19.531 \pm 4.819
1.0	12.058 \pm 3.556	17.992 \pm 3.399	26.453 \pm 4.884
2.0	17.998 \pm 4.354	23.809 \pm 4.240	37.329 \pm 3.021
4.0	22.894 \pm 3.910	30.933 \pm 5.086	44.285 \pm 10.654
6.0	27.150 \pm 4.337	43.348 \pm 10.909	57.692 \pm 10.064
12.0	48.273 \pm 4.521	60.204 \pm 9.235	74.400 \pm 7.894
20.0	77.228 \pm 6.094	81.418 \pm 2.359	94.245 \pm 2.927

2.2 As₂O₃ 作用 DU145 细胞后 RASSF1A 基因甲基化变化

不同浓度的 As₂O₃ 作用前列腺癌 DU145 细胞 72 h 后,提取 DNA 并甲基化修饰后扩增,反应产物经过 2% 琼脂糖凝胶电泳后,成像结果见图 1,对照组 DU145 细胞 RASSF1A 基因呈高甲基化状态,0.5 μ mol/L 的 As₂O₃ 就可以使高甲基化的 RASSF1A 基因去甲基化。

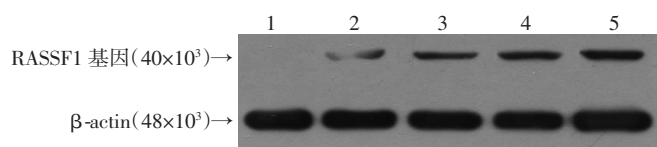


M:DNA 标准;M1:甲基化特异性扩增产物;U:非甲基化特异性扩增产物;1:对照组,未经 As₂O₃ 处理组;2:0.5 μ mol/L As₂O₃ 处理组;3:1.0 μ mol/L As₂O₃ 处理组;4:2.0 μ mol/L As₂O₃ 处理组;5:4.0 μ mol/L As₂O₃ 处理组

图 1 不同浓度的 As₂O₃ 作用 DU145 细胞后 RASSF1A 基因甲基化结果

2.3 As₂O₃ 作用 DU145 细胞后 RASSF1A 基因表达的变化

不同浓度的 As₂O₃ 作用 DU145 细胞 72 h 后,Western blot 检测 RASSF1A 基因蛋白表达结果见图 2。未经 As₂O₃ 处理组无 RASSF1A 基因蛋白的表达,浓度分别为 0.5、1.0、2.0 及 4.0 μ mol/L As₂O₃ 处理后,各组细胞在相对分子质量 40×10^3 处均可见一条带,各条带的灰度不一。经计算机软件分析各组面积积分光密度值,随 As₂O₃ 浓度升高,RASSF1A 基因蛋白表达增加。经 0.5、1.0、2.0、4.0 μ mol/L As₂O₃ 处理后 RASSF1A 蛋白条带强度与相应的 β -actin 条带强度的比值分别为:0.414、0.480、0.560、0.595,随 As₂O₃ 浓度升高,灰度比值升高 ($Z = 10.385, P < 0.05$)。



1: 对照组, 未经 As_2O_3 处理组; 2: $0.5 \mu mol/L$ As_2O_3 处理组; 3: $1.0 \mu mol/L$ As_2O_3 处理组; 4: $2.0 \mu mol/L$ As_2O_3 处理组; 5: $4.0 \mu mol/L$ As_2O_3 处理组

图2 不同浓度的 As_2O_3 作用 DU145 细胞后 RASSF1A 蛋白的表达

3 讨论

肿瘤发生是一个多因素、多阶段、多步骤的遗传学和表观遗传学异常共同参与的复杂过程^[5]。遗传学是研究基因序列改变所致基因表达水平变化,如基因突变、杂合缺失和微卫星不稳定等;而表观遗传学则研究非基因序列改变所致基因表达水平变化^[6]。表观遗传学的分子机制包括 DNA 甲基化、基因印记、组蛋白修饰、染色质重塑和 RNA 干扰等,其中 DNA 甲基化是研究得最清楚的表观遗传学修饰形式^[7]。肿瘤 DNA 甲基化模式的改变主要表现为基因组整体低甲基化和启动子区 CpG 岛的甲基化水平升高^[5]。因此肿瘤抑制基因失活与其启动子区域 CpG 岛高甲基化状态直接关联。由于 DNA 甲基化等表观遗传学事件的发生是可以逆转的,因而在恶性肿瘤中通过去甲基化处理可以恢复某些关键性抑癌基因的功能而起到预防及治疗肿瘤的作用,为肿瘤治疗开辟一条新途径。

RASSF1A 基因是 2000 年由 Dammann 等^[8] 确认的一种新型抑癌基因,RASSF1A 基因失活存在于多种肿瘤发生、发展中,该基因表达失活主要机制是启动子区的 CpG 高甲基化^[9]。有研究显示 RASSF1A 启动子 CpG 岛甲基化在前列腺癌中发生率约为 53%,表明 RASSF1A 基因过甲基化是该基因发生转录沉默的根本原因^[10]。Kuzmin 等^[11] 将缺失 RASSF1A 基因表达的前列腺癌细胞用人类乳头状病毒转染使其表达 RASSF1A,在体外可抑制肿瘤细胞的生长。故 RASSF1A 基因的重新表达,可以起到抗肿瘤的作用。

目前较常用的甲基化抑制剂为 5-氮杂脱氧胞苷(5-Aza-dC)等胞苷类似物,但是由于 5-Aza-dC 有较强的细胞毒性和致突变效应,使其临床使用受到限制。 As_2O_3 作为我国传统中药,在肿瘤的治疗中发挥一定的作用,早在急性早幼粒细胞白血病、原发性肝癌等实体肿瘤的治疗取得了显著的疗效,大多数研究显示 As_2O_3 抗肿瘤作用主要为诱导细胞凋亡和细胞分化,但是关于 As_2O_3 去甲基化作用报道很少^[12]。 As_2O_3 诱导 RASSF1A 基因重新表达的作用机制可能为: As_2O_3 进

入人体后,竞争性利用 DNA 甲基化过程中甲基供体 S-腺苷蛋氨酸,被还原发生甲基化,形成一甲肿酸或二甲肿酸而导致细胞内缺甲基状态^[13],而起到去甲基化作用。

本实验通过选用激素非依赖性前列腺癌 DU145 细胞为研究对象,观察经过不同浓度 As_2O_3 处理后的细胞增殖抑制作用和对 RASSF1A 基因去甲基化及蛋白表达的影响,以未经过 As_2O_3 处理的细胞为对照,本研究发现:适当浓度的 As_2O_3 可以使前列腺癌 DU145 细胞增殖抑制,同时可以逆转该细胞 RASSF1A 基因启动子 CpG 岛的 DNA 的异常甲基化现象,诱导该抑癌基因的重新表达。在研究中我们发现, As_2O_3 在体外浓度为 $0.5 \mu mol/L$ 时就对前列腺癌 DU145 细胞有生长抑制作用,并且随着浓度的增高,以及作用时间的延长,其生长抑制作用也随之增强。为了进一步验证该实验中 As_2O_3 对前列腺癌 DU145 细胞的抑制作用是否与 RASSF1A 抑癌基因的蛋白重新表达有关,我们进一步应用 MSP 及 Western blot 等方法检测 As_2O_3 处理前列腺癌 DU145 细胞,发现 As_2O_3 能成功逆转 RASSF1A 基因启动子的甲基化状态,使蛋白恢复表达。由此可证明, As_2O_3 可以使前列腺癌 DU145 细胞因甲基化而转录失活的 RASSF1A 基因恢复其转录活性,得到重新表达,从而能够发挥抑癌基因的肿瘤抑制作用,为晚期内分泌治疗失败后激素非依赖性前列腺癌的治疗提供新的治疗可能。刘志宇等^[14] 研究发现 $2.0 \mu mol/L$ 的 As_2O_3 作用 DU145 细胞 24 h 后就具有增殖抑制作用,而 $8.0 \mu mol/L$ 作用 24 h 后即出现细胞凋亡的形态学改变。因而, As_2O_3 对前列腺癌细胞具有增殖抑制作用的同时对机体也有毒性作用,应采用合适的浓度及作用时间。有关 As_2O_3 治疗前列腺癌特别是激素非依赖性前列腺癌的价值有待进一步的实验研究。

参考文献:

- [1] 胡佳乐, 陈云. RASSF1A 基因甲基化作为肿瘤生物学标志的临床应用[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2008, 15(3): 296-300.
- [2] Pfeifer G P, Dammann R. Methylation of the tumor suppressor gene RASSF1A in human tumors [J]. Biochemistry (Mosc), 2005, 70(5): 576-583.
- [3] 王冰, 王锦绣, 樊青霞, 等. 三氧化二砷体外诱导雌激素受体 α 表达的初步研究[J]. 肿瘤基础与临床, 2006, 19(3): 183-184.
- [4] Losler S, Schlieff S, Kneifel C, et al. Antimony-trioxide- and arsenic-trioxide-induced apoptosis in myelogenic and lymphatic cell lines, recruitment of caspases, and loss of mitochondrial membrane potential are enhanced by modulators of the cellular glutathione redox system [J]. Ann Hematol, 2009, 88(11): 1047-1058.
- [5] Esteller M. Epigenetics in cancer [J]. N Engl J Med, 2008, 358(11): 1148-1159.

- [6] 倪培民, 孙然, 王雷, 等. 恶性肿瘤患者循环 DNA 的研究进展[J]. 中国实验诊断学, 2011, 15(1): 172-174.
- [7] Bird A P. The relationship of DNA methylation to cancer[J]. *Cancer Surv*, 1996, 28: 87-101.
- [8] Dammann R, Li C, Yoon J H, et al. Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumour suppressor locus 3p21. 3[J]. *Nat Genet*, 2000, 25(3): 315-319.
- [9] 崔军, 孙志熙, 武云飞, 等. 5Aza-dc 对 Du145 前列腺癌细胞株 RASSF1A 基因去甲基化的转录调节作用[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2007, 14(11): 834-837.
- [10] Maruyama R, Toyooka S, Toyooka K O, et al. Aberrant promoter methylation profile of prostate cancers and its relationship to clinicopathological features[J]. *Clin Cancer Res*, 2002, 8(2): 514-519.
- [11] Kuzmin I, Gillespie J W, Protopopov A, et al. The RASSF1A tumor suppressor gene is inactivated in prostate tumors and suppresses growth of prostate carcinoma cells[J]. *Cancer Res*, 2002, 62(12): 3498-3502.
- [12] 杨建华, 饶石磊, 王冰, 等. 三氧化二砷对人乳腺癌雌激素受体蛋白表达的影响[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(4): 428-430.
- [13] 傅海英, 沈建箴, 沈松非, 等. 巢式 MSP 检测抑制剂诱导人多发性骨髓瘤 U266 细胞系 p16 基因去甲基化及转录[J]. 中国实验血液学杂志, 2007, 15(1): 79-85.
- [14] 刘志宇, 刘用楫, 曲红, 等. 三氧化二砷对前列腺癌 DU-145 细胞周期阻滞及凋亡的影响[J]. 中国中西医结合外科杂志, 2008, 14(3): 243-247.
- (收稿:2011-10-21;修回:2011-12-20)
(编辑 汪勤俭)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2012)07-0642-01

罕见颈胸腹连体分离术后患儿营养治疗体会

朱文艺, 李明秀, 樊荣, 黄陈, 刘俊, 王建 (400037 重庆, 第三军医大学新桥医院营养科)

[关键词] 连体儿; 营养治疗

[中图分类号] R459.3 [文献标志码] B

我院心外科自 1996 年 10 月至 2011 年 5 月, 共收治了 5 例连体儿(1 例腹部连体, 2 例胸腹连体, 1 例颈胸腹连体, 1 例头部连体)。5 例连体儿出生时体质量在 4.8~5.7 kg 范围内, 体质量偏低, 存在轻度营养不良, 现将第 4 例连体儿(颈胸腹连体儿)的营养治疗经验总结如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料

患儿双胎连体, 体质量 4.8 kg, 以“双胎连体 21 d, 间断发热 17 d, 呼吸困难 2 d”为主诉入住我院儿科治疗, 积极给予抗感染、化痰、吸氧、配方奶喂养等处理, 期间行超声检查示姐妹共用心脏及肝脏, 存在循环相通。后患儿呼吸困难加重, 呈点头样呼吸及吸气性三凹征, 血氧饱和度持续下降, 并出现紫绀。经全院大会诊后急转心外科行颈胸腹连体分离术。手术非常成功, 病情相对较轻的姐姐被保留而存活, 而病情较重的妹妹因心脏分离不得不舍弃而死亡。术后患儿持续呼吸机辅助呼吸, 生命体征相对平稳, 对外刺激可, 有明显吮吸动作; 全身轻度水肿, 腹胀较明显; 白色黏痰较多, 呼吸音较粗; 血常规白细胞明显升高、血小板明显降低; 肝功能转氨酶明显升高, 存在胆汁淤积(巩膜黄染); 肾功能急剧下降, 无尿, 考虑急性肾功能衰竭而行血液透析; 解少量墨绿色大便。

1.2 营养治疗

1.2.1 肠内营养 患儿术后采取常规禁食, 主要以输液补液为主, 儿科组为患儿制定了精确的补液方案(根据透析量调

整入量, 主要是抗感染、化痰、保肝、补蛋白、补糖水及输成分血等), 患儿病情较重, 腹胀一直较严重, 尽管禁食期过后, 肠道喂养仍十分有限, 开始以糖水为主, 之后用配方奶加益生元喂养, 后借用产科母乳奶水喂养, 但摄入量都较少, 统计术后 28 d (7.31~8.27) 的摄入量, 最多的 1 d 只有 71 ml, 能量也只有 57 kcal, 远远不能满足新生儿能量需求, 因而需要肠外营养额外补充。

1.2.2 肠外营养 患儿术后生命体征相对平稳后, 即开始静脉营养支持(8月4日), 我科有新生儿及婴幼儿静脉营养治疗经验, 但对于此种疾病患儿经验不多, 可供参考的国内外文献也很少, 故结合平时经验, 同时也参照中华医学会肠内肠外营养分会儿科组及在儿科领域闻名的上海新华医院儿科治疗经验来进行, 我们借鉴其新生儿营养素推荐标准^[1-3], 同时结合患儿相关检验指标如血糖、电解质、肝肾功、血常规等不断调整静脉营养处方。

2 结果

经过 28 d 的营养治疗, 患儿营养状况得到明显改善, 硬肿、水肿明显减轻, 蛋白水平上升也较明显。

患儿由于术后 1 周内生命体征相对不平稳, 且腹胀严重, 主要以对症治疗静脉补液为主, 未采用肠内营养及肠外营养, 故患儿血清蛋白水平有明显下降趋势; 采取营养治疗后, 虽然这期间蛋白水平时有反复, 但总体有明显上升趋势; 随着透析的进行, 患儿肾功能也逐渐恢复接近正常。

3 讨论

本例营养治疗参考文献资料极少, 我们接受患儿营养方面

(下转 650 页)