

高脂血症大鼠肝脏中牛磺胆酸钠转运蛋白的表达状况

张孟瑜, 王洁萍, 夏先明

张孟瑜, 夏先明, 泸州医学院附属医院肝胆外科 四川省泸州市 646000

王洁萍, 泸州医学院附属医院康复科 四川省泸州市 646000

张孟瑜, 主治医师, 主要从事肝胆胰疾病的基础和临床研究。

作者贡献分布: 课题设计由夏先明完成; 研究过程及论文写作由张孟瑜与王洁萍完成; 数据分析由王洁萍完成; 试剂由夏先明提供。

通讯作者: 夏先明, 教授, 646000, 四川省泸州市江阳区太平街25号, 泸州医学院附属医院肝胆外科. xxm6206@126.com
电话: 0830-3165903

收稿日期: 2015-05-05 修回日期: 2015-05-23

接受日期: 2015-05-28 在线出版日期: 2015-07-08

Na⁺/taurocholate cotransporting polypeptide expression in liver tissue of hyperlipidemia rats

Meng-Yu Zhang, Jie-Ping Wang, Xian-Ming Xia

Meng-Yu Zhang, Xian-Ming Xia, Department of Hepatobiliary Surgery, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, Sichuan Province, China

Jie-Ping Wang, Department of Rehabilitation, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, Sichuan Province, China

Correspondence to: Xian-Ming Xia, Professor, Department of Hepatobiliary Surgery, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, 25 Taiping Street, Jiangyang District, Luzhou 646000, Sichuan Province, China. xxm6206@126.com

Received: 2015-05-05 Revised: 2015-05-23

Accepted: 2015-05-28 Published online: 2015-07-08

Abstract

AIM: To establish a rat model of hyperlipidemia, detect the expression of Na⁺/taurocholate cotransporting polypeptide (Ntcp) in this model, and explore the role of Ntcp in bile acid and cholesterol metabolism in hyperlipidemia rats.

METHODS: Sixty Wistar rats were randomly divided into two groups, a control group (control group) that was fed an ordinary diet, and a high fat diet group (experimental group) that was fed a high fat diet. Regular detection of cholesterol and bile acid content was conducted to assess whether the hyperlipidemia model was successfully established. After successful induction of hyperlipidemia, liver tissues were taken to detect the mRNA expression of Ntcp by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and protein expression by immunohistochemistry (streptavidin-peroxidase).

RESULTS: In the experiment group the contents of cholesterol and bile acid were significantly higher than those in the control group. RT-PCR analysis showed that the mRNA expression of Ntcp in the liver tissue was significantly lower in the experimental group than in the control group. Immunohistochemistry showed that in the experimental group, the positive expression rate of Ntcp was 23.6%, significantly lower than 75.2% in the control group ($\chi^2 = 9.858, P < 0.05$).

CONCLUSION: Ntcp expression decreases significantly in rats with hyperlipidemia, suggesting that Ntcp may be used as a target for treatment of hyperlipidemia and related diseases.

© 2015 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: Na⁺/taurocholate cotransporting polypeptide; Hyperlipidemia; Wistar rats

Zhang MY, Wang JP, Xia XM. Na⁺/taurocholate

背景资料

目前我国患高脂血症的病员数量在逐年增多, 降脂治疗的运用越来越广泛, 而现有降脂治疗的方法有限, 且效果并非十分理想。

同行评议者

高泽立, 副教授, 周浦医院消化科, 上海交通大学医学院九院周浦分院

■ 研发前沿

目前研究的热点和重点为新型的降脂方法和降脂药物, 而基因治疗是一个非常具有前途但又尚未在临床广泛应用的领域。

cotransporting polypeptide expression in liver tissue of hyperlipidemia rats. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2015; 23(19): 3123-3128 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/23/3123.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v23.i19.3123>

摘要

目的: 本研究以牛磺胆酸钠转运蛋白(Na^+ /taurocholate cotransporting polypeptide, Ntcp)为研究对象, 通过分析Ntcp在高脂血症大鼠模型肝脏中的表达状况, 寻求新的高脂血症治疗措施。

方法: 取♂ Wistar大鼠(体质量 $150 \pm 5 \text{ g}$)60只, 随机均分为实验组及对照组。喂食90 d, 建立高脂血症模型, 喂食期间定期取血检测胆固醇及胆汁酸含量, 建模成功后, 分别取两组大鼠肝脏组织。应用逆转录-聚合酶链反应(RT-polymerase chain reaction, RT-PCR)技术检测肝脏组织的Ntcp基因表达的状况。应用免疫组织化学SP(streptavidin-peroxidase)法检测肝脏组织的Ntcp蛋白表达的状况。

结果: 实验组胆固醇及胆汁酸含量提高明显。电泳结果显示: 两组肝脏组织都出现了位于425 bp的内参 β -actin基因的扩增带和位于325 bp的Ntcp基因扩增带, 实验组Ntcp基因扩增带亮度减弱; 免疫组织化学结果显示: 实验组Ntcp表达阳性率为23.6%, 对照组Ntcp表达阳性率为75.2%, 差异有统计学意义($\chi^2 = 9.858, P < 0.05$)。

结论: 实验组大鼠的Ntcp基因的表达明显减弱, 提示我们Ntcp基因可能会成为高脂血症及其相关疾病新的药物治疗靶点。

© 2015年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: 牛磺胆酸钠转运蛋白; 高脂血症; Wistar大鼠

核心提示: 建立高脂血症大鼠模型, 以牛磺胆酸钠转运蛋白(Na^+ /taurocholate cotransporting polypeptide, Ntcp)为研究对象, 初步探讨Ntcp在高脂血症大鼠肝脏中的表达状况, 为治疗高脂血症找到新的思路。

张孟瑜, 王洁萍, 夏先明. 高脂血症大鼠肝脏中牛磺胆酸钠转运蛋白的表达状况. 世界华人消化杂志 2015; 23(19): 3123-3128 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/23/3123.asp> DOI:

<http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v23.i19.3123>

0 引言

随着目前生活水平的提高, 饮食结构的改善, 高脂血症已成为越来越常见的疾病, 一般在成年人高脂血症主要包括胆固醇升高或甘油三酯(triglyceride, TG)升高。大量流行病学证据表明, 随着脂类物质的升高, 血管内膜脂质沉积, 以其为基础病因的各种心脑血管疾病会逐步出现, 而除了引发心脑血管疾病外, 高脂血症还可诱发胆结石、胰腺炎等。高脂血症的危害性已越来越被广大普通群众所认识并积极予以治疗, 但目前降脂治疗的方法和手段有限, 效果欠佳, 那么是否存在更好而有效的方法呢? 基因治疗是目前尚未在临床广泛应用而又极具前景的治疗方法, 牛磺胆酸钠转运蛋白(Na^+ /taurocholate cotransporting polypeptide, Ntcp)基因位于肝细胞血窦面基底膜上, 在胆汁酸的肠肝循环中, 胆汁酸需通过其重吸收进入肝脏, 所以其与胆汁酸存在密切关系^[1-3], 因此本项目拟以Ntcp为研究对象, 对高脂血症大鼠肝细胞中Ntcp基因表达状况进行分析, 尝试找到新的高脂血症治疗方法。

1 材料和方法

1.1 材料 ♂ Wistar大鼠(体质量 $150 \pm 5 \text{ g}$)60只, 随机均分为2组: 普通饮食组(简称对照组)、高脂饮食组(简称实验组)。大鼠入选前无与高脂血症相关疾病存在。高脂饮食的原料: (1)猪油; (2)基础饲料; (3)丙硫氧嘧啶片; (4)胆固醇; (5)去氧胆酸钠。在60℃热水中融化猪油, 研细丙硫氧嘧啶片, 在基础饲料中加入质量分数为10.0%猪油、5.0%蔗糖、4.0%胆固醇、0.5%胆酸钠、0.2%丙基硫氧嘧啶, 加水混合充分搅拌, 制备等体积大小饲料烘干备用。主要仪器有PCR扩增仪, 低温离心机, 显微摄像系统(PM-10A)等; 主要试剂有RT-PCR试剂盒, Ntcp单克隆抗体等。

1.2 方法

1.2.1 建立高脂血症大鼠模型: 实验首先配制高脂饮食建立高脂血症大鼠模型, 喂食过程中定期取血使用自动生化检测仪检测胆固醇及胆汁酸含量, 90 d后, 待到实验组血脂相关各项指标与对照组产生统计学差异^[4,5], 确定建立高脂血症模型成功。

1.2.2 逆转录-聚合酶链反应(RT-polymerase

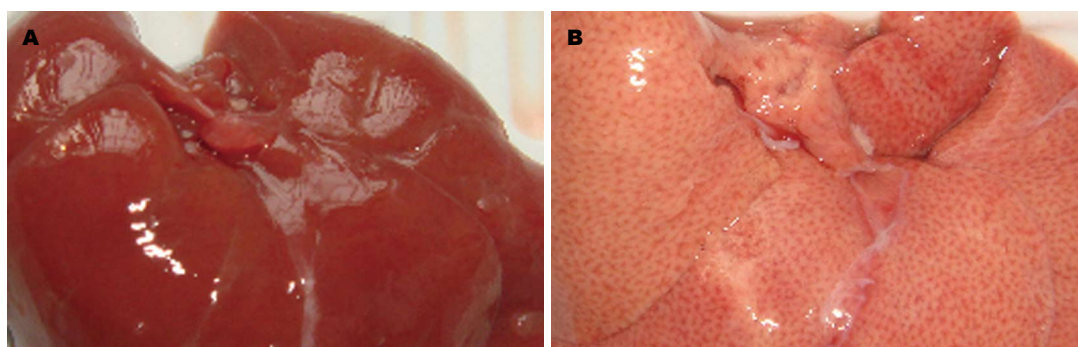


图1 不同饮食饲养后肝脏变化情况. A: 普通饮食饲养后肝脏变化; B: 高脂饮食饲养后肝脏变化.

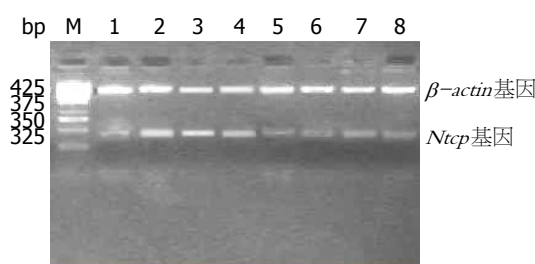


图2 PCR电泳结果. 1, 5-8: 实验组; 2-4: 对照组. 325 bp处: *Ntcp*基因; 425 bp处: β -actin基因. *Ntcp*: 牛磺胆酸钠转运蛋白.

chain reaction, RT-PCR)技术检测肝脏组织的*Ntcp*基因表达: 分别取对照组和实验组肝脏组织, 设定引物及内参照序列, *Ntcp*的上游引物为: 5'-GATGGAGGTGCACAACGTAT-3', 下游引物为: 5'-CTGTCTCAGTTCATGGCTCC-3'; β -actin作为内参照, 上游引物为: 5'-GATGGTGGGTATGGGTCAGAA-3', 下游引物为: 5'-CTAGGAGCCAGGGCAGTAATC-3'. 提取RNA, 进行逆转录反应, 制备PCR产物, 取产物10 μ L进行1%琼脂糖凝胶电泳, 确认PCR反应产物. Quantity One软件计算*Ntcp*基因与 β -actin条带的光密度的相对比值, 通过半定量分析得出其在肝脏组织中RNA表达相对含量.

1.2.3 免疫组织化学SP(streptavidin-peroxidase)法检测两组模型肝脏组织的*Ntcp*蛋白表达的强度: 取材, 烤片, 二甲苯脱蜡、梯度乙醇脱水, 阻断灭活内源性过氧化物酶, 抗原修复, 正常羊血清工作液封闭, 滴加一抗4 $^{\circ}$ C冰箱孵育过夜, 滴加生物素标记二抗, 滴加辣根过氧化物酶标记的链霉素卵白素工作液, DAB/ H_2O_2 反应染色, 自来水充分冲洗后, 苏木素复染, 常规脱水, 透明, 干燥, 封片, 高倍显微镜下观察. 从每张切片随机选取5个视野, 每个视野内观察100个细胞, 阳性细胞 $\geq 10\%$ 为阳

性, 否则为阴性.

统计学处理 用mean \pm SD表示测得数据, 采用SPSS19.0统计软件进行分析, 判断组间差异采用*t*检验, 免疫组织化学SP法染色结果采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为存在统计学意义.

2 结果

2.1 血脂相关指标检测结果 经过90 d喂食后两组大鼠均存活, 未出现死亡, 肝脏变化情况如图1, 其血清指标如表1. 从图中我们可以看到, 实验组大鼠肝脏出现了明显的脂质沉积. 从表1可见, 实验组大鼠血液中总胆固醇(total cholesterol, TC)、TG和低密度脂蛋白(low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)升高, 而高密度脂蛋白(high density lipoprotein cholesterol, HDL-C)出现了相反的变化, 其值降低; 与对照组比较差异具有统计学意义($P < 0.05$).

2.2 PCR结果

2.2.1 电泳结果显示: 实验中两组扩增产物均显现了*Ntcp*基因的325 bp扩增带和 β -actin基因的425 bp扩增带, 实验组*Ntcp*基因扩增带亮度均明显弱于对照组(图2).

2.2.2 半定量分析显示: 实验组*Ntcp*基因mRNA表达较低(0.371 ± 0.026), 对照组*Ntcp*基因mRNA表达较高(0.852 ± 0.031); *Ntcp*基因在对照组和实验组中表达差异具有统计学意义($P < 0.05$).

2.3 免疫组织化学结果 肝脏组织中*Ntcp*蛋白出现黄色染色颗粒为阳性细胞(图3)(蓝色箭头所提示). 免疫组织化学结果显示: 实验组*Ntcp*表达阳性率为23.6%, 对照组*Ntcp*表达阳性率为75.2%, 他们之间的差异具有统计学意义($\chi^2 = 9.858, P < 0.05$).

■ 相关报道

有研究介绍了胆汁酸转运体牛磺胆酸钠转运蛋白(Na^+ /taurocholate cotransporting polypeptide, *Ntcp*)与胆囊结石形成的相关性和联系.

创新点

本文通过建立高脂血症大鼠模型, 使用PCR及免疫组织化学法初步发现了Ntcp在高脂血症大鼠肝组织中的表达状况.

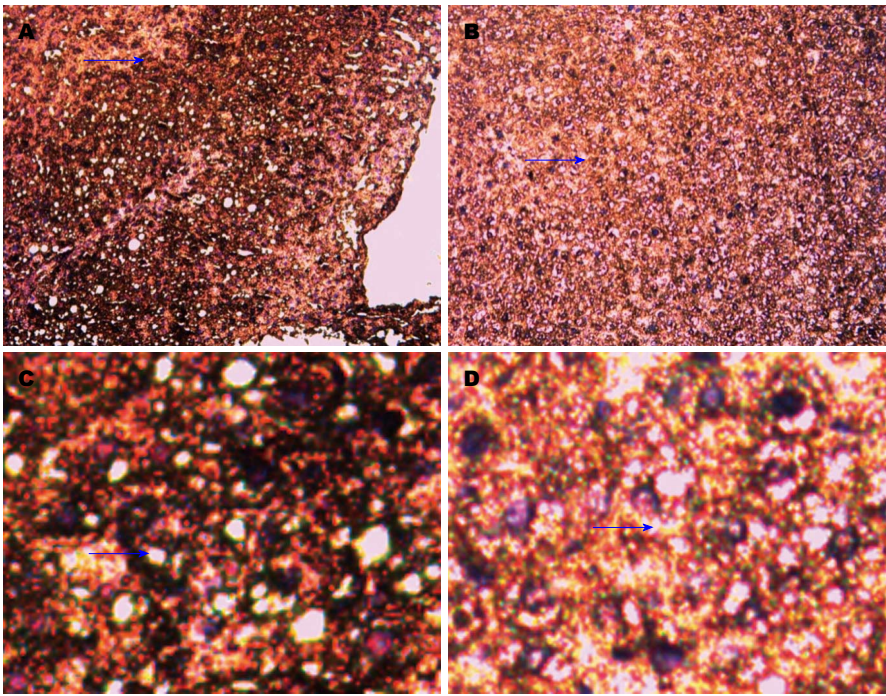


图 3 免疫组织化学结果. A、C: 实验组Ntcp基因表达; B、D: 对照组Ntcp基因表达. A、B为100倍镜下观察; C、D为200倍镜下观察. 箭头所指即为Ntcp蛋白. Ntcp: 牛磺胆酸钠转运蛋白.

表 1 各组大鼠血清指标的变化 ($n = 30$, mean \pm SD, mmol/L)

血清指标	对照组	实验组
Glu	5.23 \pm 0.36	5.19 \pm 0.38
TC	1.62 \pm 0.17	3.51 \pm 0.20 ^a
TG	0.53 \pm 0.11	2.97 \pm 0.12 ^a
HDL-C	0.93 \pm 0.08	0.46 \pm 0.09 ^a
LDL-C	0.21 \pm 0.03	0.75 \pm 0.02 ^a

^a $P < 0.05$ vs 对照组. Glu: 葡萄糖; TC: 胆固醇; TG: 甘油三酯; HDL-C: 高密度脂蛋白; LDL-C: 低密度脂蛋白.

3 讨论

血脂包括人体血液中所含各类脂质, 主要的脂质有胆固醇、TG、LDL-C和HDL-C等. 高脂血症(hyperlipidemia)是血浆中脂质高于正常水平, 其原因可能为脂肪代谢出现异常, 脂质运转体出现异常, 胆汁酸的肠肝循环出现异常等等. 可表现为各类脂质含量呈现不同程度的升高, 其中又以一种升高为主. 对于胆固醇、TG、LDL-C而言, 这三项指标呈现升高状态时, 大量脂质可在血管壁沉积, 从而引起粥样斑块的形成; 而粥样斑块的形成, 则可能引起血管管腔狭窄, 血管壁弹性降低, 从而出现重要组织如心脑血管供血不足, 导致中风、猝死等情况出现, 是形成冠心病的主要因素之一, 故其越升高则危害越大. 而HDL-C则有减少粥

样斑块形成, 抑制动脉硬化的作用, 故其升高则对人体有益. 由于目前降脂方法有限, 效果欠佳, 所以我们力求寻找新的治疗方法, 因此与胆汁酸重吸收关系密切的Ntcp基因进入了思考范围^[6-8].

Ntcp基因为法尼基衍生物X受体(farnesyl derivatives X receptor, FXR)的靶基因, 我们已进行实验发现在高脂血症大鼠中存在FXR基因, 并且其在肝脏中的表达增强, 那么Ntcp在高脂血症大鼠肝组织中是否出现了相似的变化, 其作用是增强还是减弱, 继续引导我们深入研究和思考^[9-11]. Ntcp通常表达在人肝细胞表面, 是一种多肽类物质, 主要在胆汁酸转运过程中起作用, 对胆汁酸的分泌、胆汁酸浓度的稳定、胆汁酸的肠肝循环中胆汁酸的重吸收过程, 具有重要的作用^[12-14]. 胆汁酸的肝肠循环在各种介质的配合和相互调节下完成, 肝细胞合成胆汁酸后, 接下来胆汁酸在胆盐输出泵(bile salt export pump, Bsep)作用下主动分泌转运至肠道, 当被排入小肠后结合胆汁酸超过90%依次通过顶端钠依赖胆汁酸转运蛋白(apical sodium-dependent bile acid transport, ASBT)、细胞内胆汁酸结合蛋白和基侧膜的终末腔面钠盐依赖的胆汁酸转运体(terminal apical sodium-dependent bile acid transporter, tASBT)被重吸收, 其中约85%的胆汁酸在Ntcp协助下被摄入肝细胞内, 与上述分泌过程一

样其再次被分泌到胆汁中形成胆汁酸的肠肝循环^[15-17]。而如果Ntcp功能紊乱导致胆汁酸重吸收出现紊乱, 则可能出现胆汁酸无法正常重吸收进入肝脏, 从而进一步血脂则会相应升高, 出现脂质代谢紊乱。所以, Ntcp基因是否表达, 以及表达的情况是我们所关注的和了解的重点^[18-20]。

本实验在经过90 d高脂饮食的喂养成功建立高脂血症大鼠模型, 试验过程中使用PCR, 免疫组织化学等方法进行检测, 从而发现了一个现象, 在高脂血症时大鼠的肝脏组织中Ntcp基因出现了明显降低, 较对照组大为减少, 而高脂血症时TC、TG、LDL-C显著升高, HDL-C逐步下降, 由此我们初步考虑胆固醇、胆汁酸的增加会伴随Ntcp基因表达降低, 减少了重吸收的过程, 增加胆固醇及胆汁酸的排泄几率。上述也就提示我们, Ntcp的发现可能会成为高脂血症治疗新的靶点^[21,22], 但Ntcp在肝脏组织中还有相关基因Bsep, 此基因在高脂血症时是否与Ntcp发生了类似的变化, 是否增强或抑制了Ntcp的作用, 需更深入的研究。在目前所用降脂药物存在各种不足和缺陷, 比如服用量大但不能完全起到治疗效果、出现较强的胃肠道反应、患者耐受性差等缺点, 上述原因阻碍了其在临床治疗高脂血症和相关疾病的广泛应用, Ntcp基因表达状况及代谢调节作用的研究将可能有助于人们更好地认识胆汁酸代谢紊乱机制, 并在基础研究和临床治疗高脂血症的方法上起到明显的改变, 找到一种新的治疗措施。

4 参考文献

- Romero MR, Monte MJ, Marin JJ. Pathophysiological and pharmacological implications of elucidating the molecular bases of the interaction between HBV and the bile acid transporter NTCP. *Ann Hepatol* 2015; 14: 143-144 [PMID: 25536655]
- Marada VV, Flörl S, Kühne A, Müller J, Burckhardt G, Hagos Y. Interaction of human organic anion transporter 2 (OAT2) and sodium taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) with antineoplastic drugs. *Pharmacol Res* 2015; 91: 78-87 [PMID: 25481222 DOI: 10.1016/j.phrs.2014.11.002]
- Song P, Rockwell CE, Cui JY, Klaassen CD. Individual bile acids have differential effects on bile acid signaling in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 2015; 283: 57-64 [PMID: 25582706 DOI: 10.1016/j.taap.2014.12.005]
- 孙赫, 梁桂洪, 林勇凯, 黄宇新. 高脂血症大鼠模型几种造模方法的筛选及优化. *动物医学进展* 2014; 35: 89-93
- 张雯娟, 邢喜平, 王虎平. 大黄对高脂血症模型大鼠血清总胆固醇、甘油三酯及高密度脂蛋白胆固醇含量的影响. *甘肃中医学院学报* 2014; 31: 8-11
- Erlinger S. NTCP deficiency: a new inherited disease of bile acid transport. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2015; 39: 7-8 [PMID: 25193235 DOI: 10.1016/j.clinre.2014.07.011]
- Fattah S, Augustijns P, Annaert P. Age-dependent activity of the uptake transporters Ntcp and Oatp1b2 in male rat hepatocytes: from birth till adulthood. *Drug Metab Dispos* 2015; 43: 1-8 [PMID: 25305012 DOI: 10.1124/dmd.114.059212]
- Veloso Alves Pereira I, Buchmann B, Sandmann L, Sprinzl K, Schlaphoff V, Döhner K, Vondran F, Sarrazin C, Manns MP, Pinto Marques Souza de Oliveira C, Sodeik B, Ciesek S, von Hahn T. Primary biliary acids inhibit hepatitis D virus (HDV) entry into human hepatoma cells expressing the sodium-taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP). *PLoS One* 2015; 10: e0117152 [PMID: 25646622 DOI: 10.1371/journal.pone.0117152]
- Benadjaoud MA, Blanchard P, Schwartz B, Champoudry J, Bouaita R, Lefkopoulos D, Deutsch E, Diallo I, Cardot H, de Vathaire F. Functional data analysis in NTCP modeling: a new method to explore the radiation dose-volume effects. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2014; 90: 654-663 [PMID: 25304951 DOI: 10.1016/j.ijrobp.2014.07.008]
- Zhang G, Zhou Y, Rao Z, Qin H, Wei Y, Ren J, Zhou L, Wu X. Effect of Yin-Zhi-Huang on up-regulation of Oatp2, Ntcp, and Mrp2 proteins in estrogen-induced rat cholestasis. *Pharm Biol* 2015; 53: 319-325 [PMID: 25420584 DOI: 10.3109/13880209.2014.918156]
- Iwamoto M, Watashi K, Tsukuda S, Aly HH, Fukasawa M, Fujimoto A, Suzuki R, Aizaki H, Ito T, Koiwai O, Kusuhara H, Wakita T. Evaluation and identification of hepatitis B virus entry inhibitors using HepG2 cells overexpressing a membrane transporter NTCP. *Biochem Biophys Res Commun* 2014; 443: 808-813 [PMID: 24342612 DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.12.052]
- Erlinger S. HBV: Stowaway of NTCP. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2014; 38: 661-663 [PMID: 25178832 DOI: 10.1016/j.clinre.2014.07.009]
- Gozalpour E, Greupink R, Wortelboer HM, Bilos A, Schreurs M, Russel FG, Koenderink JB. Interaction of digitalis-like compounds with liver uptake transporters NTCP, OATP1B1, and OATP1B3. *Mol Pharm* 2014; 11: 1844-1855 [PMID: 24754247 DOI: 10.1021/mp400699p]
- Dong Z, Ekins S, Polli JE. Quantitative NTCP pharmacophore and lack of association between DILI and NTCP Inhibition. *Eur J Pharm Sci* 2014; 66C: 1-9 [PMID: 25220493 DOI: 10.1016/j.ejps.2014.09.005]
- Fu LL, Liu J, Chen Y, Wang FT, Wen X, Liu HQ, Wang MY, Ouyang L, Huang J, Bao JK, Wei YQ. In silico analysis and experimental validation of azelastine hydrochloride (N4) targeting sodium taurocholate co-transporting polypeptide (NTCP)

应用要点

通过初步发现Ntcp在高脂血症大鼠肝组织中的表达状况, 为进一步寻找作用于Ntcp基因的药物治疗打下基础, 从而改善高脂血症治疗的现状。

■ 同行评价

本研究经建立高脂血症大鼠模型, 以Ntcp为研究对象, 分析Ntcp在高脂血症大鼠模型肝脏中的表达, 实验紧扣当前脂肪肝、高脂血症研究热点, 设计合理, 数据可信, 统计方法得当, 有很好的研究价值。

- in HBV therapy. *Cell Prolif* 2014; 47: 326-335 [PMID: 24965018 DOI: 10.1111/cpr.12117]
- 16 Vojtíšek R, Mužík J, Slampa P, Budíková M, Hejsek J, Smolák P, Ferda J, Finek J. The impact of PET/CT scanning on the size of target volumes, radiation exposure of organs at risk, TCP and NTCP, in the radiotherapy planning of non-small cell lung cancer. *Rep Pract Oncol Radiother* 2014; 19: 182-190 [PMID: 24944819 DOI: 10.1016/j.rpor.2013.09.006]
- 17 Troeller A, Yan D, Marina O, Schulze D, Alber M, Parodi K, Belka C, Söhn M. Comparison and limitations of DVH-based NTCP models derived from 3D-CRT and IMRT data for prediction of gastrointestinal toxicities in prostate cancer patients by using propensity score matched pair analysis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2015; 91: 435-443 [PMID: 25636766 DOI: 10.1016/j.ijrobp.2014.09.046]
- 18 Wopken K, Bijl HP, van der Schaaf A, van der Laan HP, Chouvalova O, Steenbakkers RJ, Doornaert P, Slotman BJ, Oosting SF, Christianen ME, van der Laan BF, Roodenburg JL, Leemans CR, Verdonck-de Leeuw IM, Langendijk JA. Development of a multivariable normal tissue complication probability (NTCP) model for tube feeding dependence after curative radiotherapy/chemo-radiotherapy in head and neck cancer. *Radiother Oncol* 2014; 113: 95-101 [PMID: 25443500 DOI: 10.1016/j.radonc.2014.09.013]
- 19 Tong S, Li J. Identification of NTCP as an HBV receptor: the beginning of the end or the end of the beginning? *Gastroenterology* 2014; 146: 902-905 [PMID: 24576732 DOI: 10.1053/j.gastro.2014.02.024]
- 20 Brouwer CL, Steenbakkers RJ, Gort E, Kamphuis ME, van der Laan HP, Van't Veld AA, Sijtsma NM, Langendijk JA. Differences in delineation guidelines for head and neck cancer result in inconsistent reported dose and corresponding NTCP. *Radiother Oncol* 2014; 111: 148-152 [PMID: 24560759 DOI: 10.1016/j.radonc.2014.01.019]
- 21 Li H, Zhuang Q, Wang Y, Zhang T, Zhao J, Zhang Y, Zhang J, Lin Y, Yuan Q, Xia N, Han J. HBV life cycle is restricted in mouse hepatocytes expressing human NTCP. *Cell Mol Immunol* 2014; 11: 175-183 [PMID: 24509445 DOI: 10.1038/cmi.2013.66]
- 22 König A, Döring B, Mohr C, Geipel A, Geyer J, Glebe D. Kinetics of the bile acid transporter and hepatitis B virus receptor Na⁺/taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) in hepatocytes. *J Hepatol* 2014; 61: 867-875 [PMID: 24845614 DOI: 10.1016/j.jhep.2014.05.018]

编辑: 郭鹏 电编: 都珍珍

