

肿瘤坏死因子 α -863C/A 基因多态性与慢性阻塞性肺疾病的相关性研究

毕书婷¹ 陈 石² 葛海波² 李 田² 姚 欣¹ 黄 茂^{1△}

(1 南京医科大学第一附属医院呼吸科; 2 南京市胸科医院呼吸二科 江苏 南京 210029)

摘要 目的:探讨肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) -863C/A 基因多态性与慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 间的关系。**方法:**采用多重聚合酶链 - 高温连接酶检测反应 (PCR-LDR) 方法研究 56 例吸烟 COPD 患者、64 例吸烟正常对照组的 TNF- α -863 位点基因型及 A 等位基因的分布情况。**结果:**(1) 吸烟 COPD 组在 -863 位点上的 CA 基因型及 A 等位基因频率均低于吸烟非 COPD 组 ($P < 0.05$)。 (2) 重度、极重度 COPD 组在该位点的 CA 基因型频率和 A 等位基因频率均低于轻中度 COPD 组 ($P < 0.05$)。在 COPD 组中携带 A 等位基因的患者有着更高的第 1 秒呼气量 / 用力肺活量 (FEV1/FVC) 和体重指数 (BMI) ($P < 0.05$)。 (3) 吸烟 COPD 组携带 CA 基因型的患者肺源性心脏病的发病率高于携带 CC 基因型的患者 ($P < 0.05$)。 (4) 吸烟 COPD 组的 BMI [$(22.0 \pm 3.1) \text{ kg/m}^2$] 较吸烟非 COPD 组 [$(24.5 \pm 3.7) \text{ kg/m}^2$] 低, 重度、极重度 COPD 组 BMI [$(21.2 \pm 3.0) \text{ kg/m}^2$] 较轻中度 COPD 组 [$(23.3 \pm 3.3) \text{ kg/m}^2$] 低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论:** TNF- α -863 位点 A 等位基因的发生对 COPD 患者是一个保护性因素。低 BMI 与 COPD 关系密切, BMI 可能成为预测 COPD 患者病情严重程度的一个重要指标。

关键词: 肿瘤坏死因子 α 基因; 基因多态性; 慢性阻塞性肺疾病

中图分类号: R563, R734.2 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273 (2011) 21-4098-05

Relationship between Gene Polymorphisms of Tumour Necrosis Factor- α -863C/A and Chronic Obstructive Pulmonary Disease

BI Shu-ting¹, CHEN Shi², GE Hai-bo², LI Tian², YAO Xin¹, HUANG Mao^{1△}

(1 Department of Respiratory Medicine, the First Affiliated Hospital, Nanjing Medical University, 210029, Nanjing, China;

2 Nanjing Chest Hospital, 210029, Nanjing, China)

ABSTRACT Objective: To study the relationship between tumor necrosis factor- α -863C/A gene polymorphisms and chronic obstructive pulmonary disease (COPD). **Methods:** Polymerase chain reaction-ligase detection reaction-based sequence analysis was applied to determine the frequencies of genotypes and allele of TNF- α -863 in 56 cases of patients with smoking-related COPD and a control group of 64 smokers. **Results:** The frequencies of TNF- α -863 CA and A allele in COPD patients were lower than the control group ($P < 0.05$), and the severe subgroups were lower than non-severe subgroups ($P < 0.05$). The CA genotype was associated with a better FEV1/FVC ratio, and higher BMI ($P < 0.05$). The prevalence of chronic pulmonary heart disease in the CA genotypes was higher than the CC genotypes in COPD group ($P < 0.05$). Compared with non-COPD subjects, BMI was lower in COPD patients [(22.0 ± 3.1) vs $(24.5 \pm 3.7) \text{ kg/m}^2$, $P < 0.05$]; BMI was also lower in the severe subgroups [(21.2 ± 3.0) vs $(23.3 \pm 3.3) \text{ kg/m}^2$, $P < 0.05$]. **Conclusions:** The TNF- α -863 A allele may be a protective factor for COPD. Lower BMI was strongly associated with COPD, possibly as a potential predictor for COPD severity.

Key words: Tumor necrosis factor- α ; Gene polymorphisms; Chronic obstructive pulmonary disease

Chinese Library Classification (CLC): R563, R734.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273 (2011) 21-4098-05

前言

慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 是一种具有气流受限特征的疾病^[1], 气流受限不完全可逆、呈进行性发展, 与肺部对香烟烟雾等有害气体或有害颗粒的异常炎症反应有关。COPD 的发病机制尚未完全明了。许多研究提示 COPD 是一种复杂的遗传性疾病, 其危险因素包括个体易感性和环境因素^[2]。吸烟是 COPD 的主要危险因素。但

吸烟人群中仅有 15%-20% 发展成有症状的 COPD 患者, 而 10%-20% 的 COPD 患者为不吸烟者^[3]。另有研究报道 COPD 的发生有家族聚集现象, 提示 COPD 存在遗传易感性^[4]。

TNF- α 是一种多效性细胞因子, 有大量研究报道 TNF- α 基因多态性与 COPD 的相关性, 结果不一。本例就 TNF- α 基因 -863 位点 (rs1800630) 的基因多态性与 COPD 的相关性进行研究。

1 对象与方法

1.1 对象

1.1.1 COPD 组 57 例 选取 2008 年 5 月至 2009 年 6 月在我院呼吸科住院治疗患者, 其中男性 44 例, 女性 13 例, 平均年龄 65.98 ± 11.47 岁。吸烟指数 ≥ 200 , 且符合 2007 年中华医学会

作者简介: 毕书婷 (1982-), 女, 本科, 主治医师, 现在南京市胸科医院呼吸科工作, 主要研究方向: COPD 的基因多态性研究,

电话 025-58619726, E-mail: ting2170@163.com

△通讯作者: 黄茂, E-mail: hm6114@126.com

(收稿日期: 2011-05-23 接受日期: 2011-06-18)

呼吸病分会制订的 COPD 诊断标准^[9],并排除既往史或影像学检查发现患有支气管扩张、肺结核、支气管哮喘、肺间质纤维化、肺癌及其他部位恶性肿瘤的患者。无高血压、糖尿病史。依据 2007 年 COPD 分级标准^[9],将该组患者分为两组:第 1 秒呼气量/用力肺活量(FEV1/FVC) <70%,第 1 秒呼气量(FEV1) ≥ 预计值的 50%为轻中度(Ⅰ、Ⅱ级)COPD 组;FEV1/FVC < 70%, FEV1 < 预计值的 50%或伴有呼吸衰竭为重度及极重度(Ⅲ、Ⅳ级)COPD 组。

1.1.2 吸烟非 COPD 组 64 例 选自同期我院门诊就诊患者,其中男性 50 例,女性 14 例,平均年龄 63.33± 10.45 岁。吸烟指数 ≥ 200,肺功能正常(FEV1/FVC ≥ 70%, FEV1 ≥ 预计值的 80%),无肺部疾病及恶性肿瘤史,无高血压、糖尿病史。

1.2 实验方法

1.2.1 基因组 DNA 抽提 用抗凝管抽取以上对象外周血 5ml。总 DNA 抽提试剂盒为 AXYGEN 公司的 AxyPrep-96 全血基因组 DNA 试剂盒,严格按试剂盒说明书抽提基因组 DNA。

1.2.2 引物和探针 rs1800630 位点引物序列:上游引物为:5'-TGTCCAGGGCTATGGAAGTC-3',下游引物为:5'-TTTCATTCTGACCCGGAGAC-3',PCR 扩增片段长度为 247bp。rs1800630 位点探针序列:rs1800630_modify(标记探针):P-GGGGGTCCCCATACTCGACTTCCATTTTTTTTTTTT-TTTTT-FAM。rs1800630_A(非标记探针):TTTTTTTTTTTTT-TTCTACATGGCCCTGTCTTCGTTAAGT,LDR 扩增片段长度为 82bp。rs1800630_C(非标记探针):TTTTTTTTTTTTTTT-

TTCTACATGGCCCTGTCTTCGTTAAGG,LDR 扩增片段长度为 84bp。引物及探针序列均由上海翼和应用生物技术有限公司合成。

1.2.3 多重 PCR-LDR 反应体系

1.2.3.1 PCR 反应体系 20μL 在 1.5mleppendorf 离心管中分别加入 200μl PCR-buffer (10×),60μl Mg²⁺ (100mM),200μl dNTP (20mM/each),20μl Taq 酶 (5U/μl),400ul Q-solution (4×),40μl primer(5pM),最后加入 980ul 去离子水。充分混匀后离心,再取 19μl 分装在 200μl 的 PCR 反应管中,最后再加入 1ul 基因组 DNA。反应条件为:95℃变性 15m,35 个循环,每个循环有 3 个温度,94℃30s,59℃1m,72℃1m,最后在 72℃延伸 7m。将 PCR 反应管放入 PCR 仪进行反应。反应结束后,取 2μl 反应产物在 3.0%琼脂糖胶,0.5× TBE 中电泳,检测反应是否成功,确定其作为模板在 LDR 反应中加入的量。(图 1)。

1.2.3.2 LDR 反应体系 10μL 在 PCR 扩增产物中加入等体积 ddH₂O 稀释,作为连接反应的模板。在 1.5mleppendorf 离心管中分别加入 100μl buffer (10×),100ul Probe Mix,5μl 连接酶,695μl 去离子水。充分混匀后离心,再取 9μl 分装在 200μl 的 PCR 反应管中,最后再加入 1μlPCR 反应产物。反应条件为:95℃变性 2m,35 个循环,每个循环有 2 个温度,94℃30s,50℃2m。

1.2.4 测序 对 LDR 产物进行 377 测序,应用 Genemapper 软件对 377 数据进行数据分析和基因分型。各位点的分型截图见图 2。

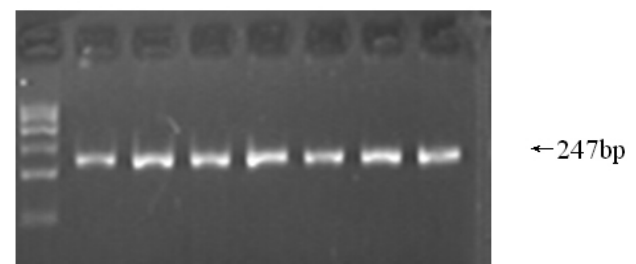


图 1 TNF-α -863C/A 基因 PCR 扩增结果
Fig.1 Electrophoresis imaging of TNF-α -863C/A PCR products

1.3 统计学方法

所有数据应用 SPSS19.0 统计软件处理,计量资料用平均值± 标准差表示,采用 t 检验。TNF-α 基因型用直接计数法;等位基因频率 = (该基因纯合子个体数× 2+ 该基因杂合子数)/总个体数× 2,等位基因确认符合 Hardy-Weiburgh 平衡。计数资料采用卡方检验。COPD 组内基因型、等位基因频率的比较,及不同基因型 COPD 肺源性心脏病发病率的比较采用 Fisherman 精确概率法。P<0.05 为有显著差异。

2 结果

2.1 两组一般资料、肺功能及体重指数(BMD)情况

吸烟 COPD 组与吸烟非 COPD 组在年龄、吸烟指数上无显著的差异(P>0.05),而两组肺功能、BMI 有显著差异(P<0.05)(表 1)。

重度、极重度 COPD 组与轻中度 COPD 组在年龄及吸烟

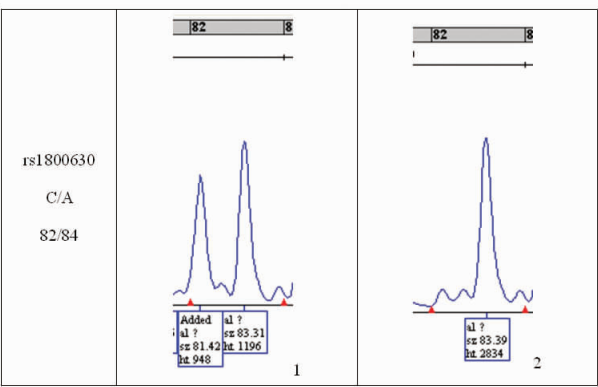


图 2 TNF-α -863C/A 基因分型截图
1 为 rs1800630CA 型,2 为 rs1800630CC 型
Fig.2 Genotyping imaging of TNF-α -863C/A
1: rs1800630CA,2: rs1800630CC

指数上无明显差异(P>0.05),而肺功能指标及 BMI 前者低于后者(P<0.05)(表 2)。

2.2 TNF-α 基因-863 位点基因多态性

(1) 吸烟 COPD 组与吸烟非 COPD 组的检测结果(表 3)提示两组间的基因型分布和等位基因的频率均有显著差异(P<0.05)。(2) 重度、极重度 COPD 组与轻中度 COPD 组在该位点的基因型及等位基因的频率存在显著差异(P<0.05)(表 4)。(3) 吸烟 COPD 组不同基因型间肺功能及 BMI 比较(表 5)-863CA 基因型 COPD 患者的 FEV1/FVC 及 BMI 要高于-863CC 基因型 COPD 患者(P<0.05)。(4) 吸烟 COPD 组不同基

因型合并肺源性心脏病发病率的比较（表 6）携带 -863CA 基 基因型的 COPD 患者。
因型的 COPD 患者肺源性心脏病的发病率要低于携带 -863CC

表 1 吸烟 COPD 组与吸烟非 COPD 组年龄、吸烟指数、肺功能、体重指数比较
Table 1 Comparison of age, smoking index, pulmonary function and BMI between COPD group and control group

Group	COPD group	Control group
Cases	57	64
Sex (male/female)	44/13	50/14
Age(years)	65.98± 11.47	
Smoking Index (cigarettes-years)	592.24± 312.85	528.83± 63.33± 10.45343.20
FEV1 (% predicted)	45.89± 14.26*	88.74± 6.93
FEV1/FVC (%)	54.50± 11.01*	78.78± 7.49
BMI (kg/m ²)	22.0± 3.1*	24.5± 3.7

Note: *P<0.05

表 2 重度、极重度 COPD 组与轻中度 COPD 组年龄、吸烟指数、肺功能、体重指数比较
Table 2 Comparison of age, smoking index, pulmonary function and BMI between the severe subgroups and non-severe subgroups in COPD patients

COPD group	Group of III and IV degree	Group of I and II degree
Cases	25	32
Sex (male/female)	19/6	25/7
Age(years)	63.56± 10.07	66.44± 9.24
Smoking Index (cigarettes-years)	608.00± 222.99	585.93± 288.54
FEV1 (% predicted)	37.89± 8.72*	55.93± 6.15
FEV1/FVC (%)	48.40± 10.20*	63.02± 7.80
BMI (kg/m ²)	21.2± 3.0*	23.3± 3.3

Note: *P<0.05

表 3 吸烟 COPD 组与吸烟非 COPD 组在 -863 位点基因型频率、等位基因的频率比较
Table 3 Comparison of the frequencies of genotypes and allele of TNF-α -863 between COPD group and control group

Group	Genotype (n, %)		Allele (n, %)	
	CC	CA/AA	C	A
COPD group	45	12/0	102	12
(n=57)	(78.9)	(21.1)	(89.5)	(10.5)
Control group	39	25/0	103	25
(n=64)	(60.9)	(39.1)	(80.5)	(19.5)

Note: P<0.05

表 4 重度、极重度 COPD 组与轻中度 COPD 组在 -863 位点基因型频率、等位基因的频率比较
Table 4 Comparison of the frequencies of genotypes and allele of TNF-α -863 between the severe subgroups and non-severe subgroups in COPD patients

COPD group	Genotype (n, %)		Allele (n, %)	
	CC	CA/AA	C	A
Group of III and IV degree	23(92.0)	2/0	48	2
(n=25)		(8.0)	(96.0)	(4.0)
Group of I and II degree	22	10/0	54	10
(n=32)	(68.8)	(31.2)	(84.4)	(15.6)

Note: P<0.05

表 5 COPD 患者中 -863 位点不同基因型肺功能及 BMI 比较

Table 5 Comparison of pulmonary function and BMI between TNF-α -863CC subgroup and TNF-α -863CA subgroup in COPD patients

Genotype	-863CC	-863CA
Cases	45	12
FEV1 (% predicted)	43.98± 12.99	51.04± 13.03
FEV1/FVC (%)	49.54± 8.87*	62.30± 5.02
BMI (kg/m ²)	22.1± 3.5*	23.9± 3.0

Note:*P<0.05

表 6 COPD 组患者 -863 位点不同基因型与肺源性心脏病的发生率的比较

Table 6 Comparison of the prevalence of chronic pulmonary heart disease between TNF-α -863CC subgroup and TNF-α -863CA/AA subgroup in COPD patients

	CC	CA/AA
Group of chronic pulmonary heart disease	22	1/0
Control group	26	8/0

Note: P<0.05

3 讨论

近年国内外多项研究发现 COPD 的发生、发展与多种细胞因子和炎症细胞有关,如白介素(IL)、TNF、干扰素(IFN)、白三烯(LT)等。TNF-α 是免疫和炎症反应的重要的调节剂,参与包括 COPD 在内的多种疾病。除了发现 COPD 患者血清中 TNF-α 增高,国内外有很多研究发现 COPD 患者诱导痰^[6]、支气管肺泡灌洗液(BALF)^[7]及支气管活检物^[8]、呼出气冷凝液(EBC)^[9]中 TNF-α 明显升高,提示 TNF-α 可能通过促进气道重构和改变平滑肌细胞的功能在 COPD 的发生中发挥重要作用。另有研究显示 TNF-α 作为一种重要的炎症因子,可通过参与炎症反应从而导致患者的体质质量下降^[10]。

研究发现,TNF 基因多态性现象的标志是基因内的碱基变化。Endo 等^[11]应用聚合酶链反应-序列特异性寡核苷酸探针(PCR-SSOP)技术,共检测到 5 种单核苷酸多态性:除 -308(G/A)外,还包括 -1031(T/C)、-863(C/A)、-857(C/T)、-238(G/A),除上述位点外,TNF-α 基因单核苷酸多态性尚包括 +498(G/A)、-1196(C/T)、-1125(G/C)、-572(A/C)、-316(G/A)、-163(G/A)、+70(G/A)等。目前国内外研究较多的以 -308 位点为主。最近的荟萃分析显示,在亚洲人群中,TNF-α -308 基因与 COPD 易感性相关,但在白种人群 COPD 组和非 COPD 组,两者之间无明显相关性^[12,13]。

TNF-α -863(C→A)为在启动子区域转录起始位点上游第 863 位点的碱基 C 被碱基 A 代替,从而造成了限制性内切酶 Bpil 识别位点的增加,使核苷酸序列能被 Bpil 识别并切断,即出现限制性片段长度多态性,称为 TNF-α -863 的基因多态性。TNF-α -863 的基因多态性与 COPD 的相关性的研究目前不多。

本研究分析了 TNF-α 基因 -863 位点 C 和 A 等位基因频率、基因型频率在吸烟有关的 COPD 患者和吸烟有关的非 COPD 人群的分布差异。结果显示在 COPD 组 TNF-α -863A

等位基因以杂合子形式存在,在该位点 COPD 组 CA/AA 基因型及 A 等位基因频率均低于非 COPD 组;重度、极重度 COPD 组 CA 基因型及 A 等位基因频率低于轻中度 COPD 组。在 COPD 组,TNF-α 基因 -863 位点含 A 等位基因的患者拥有更高的 FEV1/FVC 和 BMI,且该组患者发生肺源性心脏病的概率明显减低。因此我们认为 TNF-α -863 位点 A 等位基因的发生对 COPD 患者是一个保护性因素。之前也有文献报道,TNF-α -863A 等位基因对 COPD 易感性有更低的优势比,但对 COPD 患者的保护作用还没有确定^[14,15]。我们分析这可能与种族差异及样本大小、不同的对照组及肺功能检测的方法不同有一定的关系。

在我们的研究中也发现 COPD 组的 BMI 显著低于对照组,与 Harik-Khan 等^[16]报道一致。动物实验也证实,胚胎发育营养不良可导致肺结构和功能改变,肺发育迟缓,弹性减低,肺泡腔扩大,与肺气肿的病理改变相似^[17]。而且在 COPD 组中,重度、极重度 COPD 患者的 BMI 要明显低于轻中度 COPD 患者,意味着 BMI 越低的 COPD 患者病情越重,预后越差。而含有 TNF-α -863A 等位基因的 COPD 患者有着更高的 BMI,我们判断 BMI 可以成为预测 COPD 患者病情严重程度的独立因子。有研究表明,与正常 BMI 的 COPD 患者比较,BMI 低的 COPD 患者病死率增加,尤其是重度 COPD^[18],改善 BMI 可以降低其病死率^[19]。

综上,我们发现 TNF-α -863 位点携带 A 等位基因的 COPD 患者有着更轻的症状。A 等位基因可以降低吸烟者发生 COPD 的危险性,也可以降低 COPD 患者发生肺源性心脏病、病情恶化的危险性,与吸烟的 COPD 患者的预后呈正相关。通过检测 TNF-α -863 位点 A 等位基因对判断 COPD 的预后有一定的借鉴意义,也对进一步了解 TNF-α 在 COPD 中的作用及 COPD 的防治有一定意义,但由于本研究样本量较小,尚有待多中心大样本的临床研究进一步证实。

参考文献(References)

- [1] Pauwels RA,Buist PM,Calverley CR,et al.Global strategy for the diagnosis,management,and prevention of chronic obstructive pulmonary disease NHLBI/WHO Global Initiative for Chronic Obstructive Lung disease (GOLD) Workshop summary[J].Am J Respir Crit Care Med, 2001,163(5):1256-1276
- [2] Seiichiro Sakao,Koichiro Tatsumi,Hidetoshi Igari,et al.Association of tumor necrosis factor α gene promoter polymorphism with low attenuation areas on high - resolution CT in patients with COPD[J].Chest Chicago,2002,122,2:416-421
- [3] Stephen I.Rennard,MD.Overview of causes of COPD;New understanding of pathogenesis and mechanisms can guide future therapy [J].Postgraduate Medicine Minneapolis,2002,111,6:28
- [4] Yanbaeva DG,Dentener MA,Creutzberg EC,et al.Systemic inflammation in COPD: is genetic susceptibility a key factor?[J]. COPD,2006,3 (1):1-2
- [5] 中华医学会呼吸病学分会.慢性阻塞性肺疾病诊治指南(2007 年修订版)[J].中华结核和呼吸杂志, 2007, 30 (1): 8-17
The department of respiratory disease of Chinese Medical Association.Standard for the diagnosis and treatment of chronic obstructive pulmonary disease [J]. Chin J Tuberc Respir Dis, 2007, 30 (1): 8-17 (In Chinese)
- [6] Dima E,Rovina N,Gerassimou C,et al.Pulmonary function tests,sputum induction,and bronchial provocation tests:diagnostic tools in the challenge of distinguishing asthma and COPD phenotypes in clinical practice[J].Int J Chron Obstruct Pulmon Dis,2010,5:287-296
- [7] Cheng SL,Wang HC,Yu CJ.Increased expression of placenta growth factor in COPD[J].Thorax,2008,63:500-506
- [8] Lé tuvé S,Kozhich A,Humbles A,et al.Lung chitinolytic activity and chitotriosidase are elevated in chronic obstructive pulmonary disease and contribute to lung inflammation [J].Am J Pathol,2010,176(2): 638-649
- [9] 陈金亮,陈建荣,陶一江,等.慢性阻塞性肺疾病患者呼出气冷凝液中白细胞三烯 B₄ 和肿瘤坏死因子 α 的检测及其临床意义[J].中国危重病急救医学,2008,20(6):357-360
Chen jin-liang,Chen jian-rong,Tao yi-jiang,et al.Determination and clinical implication of leukotriene B₄ and tumor necrosis factor- α in condensate of exhaled breathe of chronic obstructive pulmonary disease patients[J].Chin Crit Care Med,2008,20(6):357-360 (In Chinese)
- [10] Deveci Y,Deveci F,Ihan N,et al.Serum ghrelin,IL-6 and TNF- α levels in patients with chronic obstructive pulmonary disease[J].Tuberk Toraks,2010,58(2):162-172
- [12] Endo M,Tai H,Tabeta K,et al.Analysis of single nucleotide polymorphisms in the 5-flanking region of tumor necrosis factor- α gene in Japanese patients with earlyonset periodontitis [J].J Periodontol, 2001,72(11):1554-1559
- [13] Zhang S,Wang C,Xi B,Li X.Association between the tumour necrosis factor- α -308G/A polymorphism and chronic obstructive pulmonary disease:An update[J].Respirology,2010,doi:10.1111/j.1440-1840
- [14] Zhan P,Wang J,Wei SZ.TNF-308 gene polymorphism is associated with COPD risk among Asians:meta-analysis of data for 6,118 subjects[J].Mol Biol Rep,2011,38(1):219-227
- [15] Gingo MR, Silveira LJ, Miller YE, Friedlander AL, Cosgrove GP, Chan ED, Maier LA, Bowler RP (2008). Tumour necrosis factor gene polymorphisms are associated with COPD [J].Eur Respir J 31: 1005-1012
- [16] Papatheodorou A, Latsi P, Vrettou C, Dimakou A, Chroneou A, Makrythanasis P, Kaliakatsos M, Orfanidou D, Roussos C, Kanavakis E, Tzetzis M (2007). Development of a novel microarray methodology for the study of SNPs in the promoter region of the TNF- α gene: their association with obstructive pulmonary disease in Greek patients [J]. Clin Biochem 40:843-850
- [16] Harik-Khan RI, Fleg JL, Wise RA. Body mass index and the risk of COPD[J].Chest,2002,121:370-376
- [17] Matsui R, Thurlbeck WM, Fujita Y, et al. Connective tissue, mechanical, and morphometric changes in the lungs of weanling rats fed a low protein diet[J]. Pediatr Pulmonol,1989,7:159-166
- [18] Gray-Donald K, Gibbons L, Shapiro SH, et al. Nutritional status and mortality in chronic obstructive pulmonary disease [J]. Am J Respir Crit Care Med,1996,153:961-966
- [19] Schols AM, Slangen J, Volovics L, et al. Weight loss is a reversible factor in the prognosis of chronic obstructive pulmonary disease[J]. Am J Respir Crit Care Med,1998,157(6 Pt 1):1791-1797