

# 医学参考报

## 检验医学专刊

Laboratory Medicine

第八期 NO.08

### 高通量测序推动临床微生物组研究

【据《The Journal of Clinical Investigation》2022年4月报道】  
题：高通量测序推动临床微生物组研究（约翰·霍普金斯大学医学院 作者Wensel CR等）

自从科赫法则的提出及结核分枝杆菌的发现，人类开始认识到体内微生物“定居”影响身体健康状况。许多疾病与微生物失调高度相关，例如结核、梅毒等传染病，以及炎症肠病、糖尿病、肥胖、癌症等非传染性疾病。科赫法则提出通过培养的方法发现导致疾病的微生物，但是对不可培养微生物难以进行分析和检测。而高通量测序（next-generation sequencing, NGS）方法不依赖于传统培养技术，具有检测不可培养微生物、识别独特物种、多个样本并行测序的能力，目前在微生物组研究及临床诊疗中应用越来越广泛。

#### 一、NGS方法基本原理

NGS方法通过直接对粪便、血液或组织样本中的微生物DNA/RNA进行测序，获得样本中存在微生物丰度信息及功能概况。目前使用的两种NGS方法是扩增子测序和鸟枪法宏基因组测序；除此之外，RNA测序可以直接检测转录组，进一步明确了微生物种群功能信息。细菌16S核糖体RNA（rRNA）基因高度保守且普遍存在，同时包含9个高可变区，可以用于区分细菌不同种属。因此扩增子测序首先通过PCR扩增细菌16S核糖体RNA（rRNA）基因的高可变区，然后对产物进行测序。测序原始数据需要通过“清洗”步骤去除接头盒引物序列、去除低质量碱基和reads，以及去除人源序列匹配

的测序reads。随后将测序reads根据相似性进行聚类分析，基于每个聚类（OTU）对微生物进行物种注释。除此之外，基于“去噪分析”获取ASV特征进而进行物种注释也是应用广泛的数据分析方法。

鸟枪法宏基因组测序主要流程包括DNA提取、DNA随机打断、接头和index连接、上机测序。将测序reads“清洗”后与数据库参考序列比对，例如RefSeq、GenBank、真核病原体数据库EuPathDB等，进而实现不同微生物分类。RNA测序流程类似于鸟枪法宏基因组测序，不同的是片段化的RNA需要通过反转录成DNA（cDNA）进而进行DNA测序。

#### 二、NGS方法的比较

开展微生物组研究及临床诊疗选择哪种NGS方法，需要根据不同方法的特点及临床研究需要解决的问题来决定。三种NGS方法的不同之处主要可以分为四个方面：①检测内容：16S rRNA测序仅能检测到细菌，而鸟枪法宏基因组测序及RNA测序可以检测到真菌、寄生虫、病毒。②物种分类分辨率：16S rRNA测序物种分类能力较低，仅能有效将测序数据解析到门、属水平；鸟枪法测序及RNA测序可以实现属、种水平微生物分类。③微生物功能预测：无法从16S rRNA测序中直接获得功能图谱，而鸟枪法测序及RNA测序可以全面地预测微生物功能信息。④宿主污染：16S rRNA测序宿主污染风险较小。尽管鸟枪法宏基因组

和RNA测序提供了更多分类、功能信息，但是如果只需要识别样本中的优势细菌等，16S rRNA测序因为其更低的成本及生信分析难度可能是更合适的方法。

#### 三、影响NGS检测结果的因素

NGS检测流程复杂，各个阶段都存在影响最终检测结果的因素。首先，临床研究中需要选择用于NGS检测分析的样本类型，尽管粪便和体液样本容易收集且可以连续取样，然而管腔内粪便样本或组织样本可以提供特定部位的微生物组特征。样本储存条件会进一步影响NGS结果，需要及时冷冻样本并-80℃保存。既往研究表明DNA提取或RNA提取会导致大部分NGS检测结果的变异，目前有许多用于核酸提取的试剂盒可供选择，例如Covaris、Qiagen、Zymo Research等。使用阴性对照以评估试剂盒特异性污染物是开展临床研究前必要的步骤。

在测序文库构建阶段，由于16S rRNA基因扩增区域、引物数量、引物质量的不同，因此PCR扩增偏向成为16S rRNA测序结果变异的来源。另外，测序阶段的仪器设备也会导致检测结果的变异，例如不同测序平台（Illumina、MGI），

不同测序仪器型号（Illumina MiSeq、NovaSeq等）。对于庞大的测序数据，可以选择各种生物信息分析流程进行数据处理，而不同软件计算和统计方法会对检测结果产生影响。

总之，NGS测序任何步骤[例如，样本类型、样本存储、DNA提取、PCR扩增、测序技术、reads长度和（或）生物信息学分析流程]都会导致数据的变异，以及影响检测结果的准确性。而目前仍然没有微生物组NGS检测的最佳方法、流程或指南，因此在开展临床研究过程中，对所有样本需要使用相同的方法和流程以进行有意义的比较，而不同研究之间的比较通常需要关注检测流程中各种变量的不同。

#### 四、微生物组NGS检测在临床及转化研究与临床诊疗中的应用

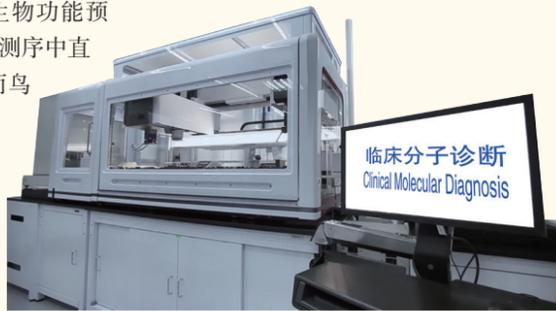
微生物组NGS检测在发现疾病机制方面已经展现出巨大潜力，同时促进对人类疾病病理生理学的探索。以往多项研究已经利用NGS方法探索了肠道微生物组与饮食及新陈代谢、皮肤微生物组与特定疾病、出生和生命早期的微生物暴露与生长发育之前的相关性。同时，微生物组NGS检测能够实现详细的流行病学分析，有助于追踪和识别多重耐药病原体的来源，有助于实施干预措施以消除感染源。另外，目前临床微生物学实验室已经开始使用微生物组NGS方法进行疾病诊断，特别是识别慢性疾病的潜在传染性病因。仍然需要相关临床及转化研

究以确定微生物组NGS方法在促进患者护理、解决暴发源、识别和定义新出现的病原体，而这也对临床医生和转化医学科学家提出新的挑战，也就是进一步解读NGS数据以满足临床需求。

迄今为止，还未有基于人类微生物群落的治疗方法得到批准，然而，以往研究已经证明了微生物群落相关的治疗手段是极具潜力的研究领域，例如粪便微生物群移植、益生元或益生菌、靶向调节微生物组等。而微生物组NGS方法成了评估各种治疗效果的重要途径。

综上所述，微生物组学研究正在朝着微生物组精准医学方向发展，但研究者仍然缺乏足够的临床数据，无论是横向还是纵向，都无法提供足够的证据将基于NGS的检测手段或者基于微生物群落的治疗方式应用于人类疾病诊疗中。NGS数据和微生物组研究在临床医学中的应用尚处于起步阶段，因此既有希望也存在不确定性。目前缺乏大规模的前瞻性和纵向人体研究，这也为临床转化医学科学家提供了机会及挑战。通过利用微生物组科学的跨学科性质和复杂性，有助于加深对疾病发展、进展、诊断和治疗的理

解。  
(国家卫生健康委临床检验中心  
王锋 李金明 编译)  
(DOI: 10.1172/JCI154944  
IF: 19.456)



### 下呼吸道感染危重症患者抗生素耐药性的宏基因组学预测

【据《Genome Medicine》2022年7月报道】  
题：下呼吸道感染危重症患者抗生素耐药性的宏基因组学预测（美国加州大学作者Serpa PH等）

抗生素耐药性（anti-microbial resistance, AMR）是指病原体不能被抗生素及其他抗感染药物有效杀死的抵御能力，会增加下呼吸道感染（lower respiratory tract infections, LRTI）患者治疗失败率。对LRTI患者进行有效和靶向治疗不仅需要准确检

测病原体，还需要评估抗生素耐药性。宏基因组下一代测序技术（metagenomic next-generation sequencing, mNGS）除了明确感染病原体之外，也可以通过检测细菌耐药性基因来预测病原体AMR，虽然已经有很多研究评估了mNGS检测细菌培养物耐药性的性能，但评估mNGS直接预测呼吸道标本AMR性能的研究很少。因此，本研究旨在评估mNGS在细菌性LRTI中预测AMR的性能，并利用CRISPR/Cas9富集和纳米孔测序

来进行AMR基因快速检测。

本研究纳入了从2013年7月至2018年9月期间的88例急性呼吸衰竭患者，包括70例LRTI机械通气患者、18例非传染性呼吸道疾病患者，采集下呼吸道标本进行mNGS检测。首先对临床微生物培养阳性并明确病原体感染种类的27例患者进行分析，其次对所有受试者进行二次分析。分析的工作流程如下：首先从临床样本中提取DNA

下转第2版

#### 导读

- 宏基因组测序在重症监护病房脓毒症患者病因诊断中的应用 **2**版
- 全身炎症和胰岛素抵抗替代标志物有助预示癌症结局 **4**版
- 人类猴痘的临床特征和疾病管理：英国的一项回顾性观察研究 **6**版
- 内皮激活和应激指数（EASIX）评分是弥漫性大B细胞淋巴瘤患者的独立预后因素 **8**版

## 宏基因组测序在重症监护病房脓毒症患者病因诊断中的应用

【据《Microbiology Spectrum》2022年7月报道】题：宏基因组测序在重症监护病房中脓毒症患者病因诊断中的应用（中国台湾大学医学院 作者Chien JY等）

脓症患者由于癌症、遗传综合征或移植而导致免疫功能低下，因此容易感染多种常见和不常见的病原体，包括病毒、细菌、真菌和寄生虫，而有效抗菌药物治疗的延迟应用会导致患者生存率降低。然而，目前以培养为基础的诊断程序往往产生假阴性结果，这可能是由于同时进行了抗生素治疗，应用了预防性抗菌药物，以及某些生长缓慢的病原

微生物的感染等。而某些不依赖培养的检测方法，如PCR，由于引物特异性，只能实现有限微生物的检出，遗漏了罕见病原体，降低了诊断敏感度。宏基因组下一代测序技术（metagenomic next-generation sequencing, mNGS），即对样本中的随机DNA或RNA进行鸟枪测序，主要优点是能够无偏倚检测已知和未知的病原体，并提供样本中病原体浓度的定量或半定量数据。因此，本研究对脓症患者进行了前瞻性研究，以评价mNGS与标准培养方法相比的诊断价值和临床意义。

本研究纳入了50例重症脓症患者，并采集了血液

（50份）和支气管肺泡灌洗液（BALF）样本（50份），使用mNGS和传统培养方法对共100份样本进行检测。研究发现，mNGS的总体检出率高于血液培养样本（88.0%和26.0%）和BALF样本（92.0%和76.0%）。在100份样本中，mNGS和传统培养方法在49份样本中均检出阳性，8份样本未检出阳性，41份样本只有mNGS方法检出阳性，2份样本只有传统培养方法检出阳性。在49份由两种方法均检出阳性的样本中，只有1份样本的mNGS和传统培养方法检测结果完全匹配，12份样本的mNGS检测结果与传统培养方法结果完全不匹配，剩余36份样本的两种

检测结果部分匹配。应用mNGS技术，共检测到158种病原体，其中肺炎克雷伯菌最为常见。而额外的RNA测序增加了对几种细菌、真菌和病毒的mNGS检出率，但对分枝杆菌和弓形虫的检出率没有提高。在血液样本中，mNGS检测到的细菌、真菌和病毒明显高于血培养，而在BALF中，mNGS对细菌和病毒的检出率明显高于常规培养物。此外，mNGS对几种革兰阴性菌、部分革兰阳性菌和病毒的检出率较高，但对真菌和分枝杆菌的检出率不高。

在本研究中，作者发现使用mNGS的总体病原体检出率明显高于常规培养，特别是在血

液样本中。高通量mNGS方法可以有效地检测非典型病原体，如病毒、真菌、分枝杆菌和支原体，并对含有低水平微生物核酸的样本也更为敏感，因此，受抗菌治疗的影响较小。虽然基于DNA的mNGS在同时检测细菌、真菌和病毒方面具有优势，但若不同时进行RNA测序，可能会导致某些病毒的假阴性结果。另外，考虑到临床上缺乏统一的诊断标准，对mNGS数据的解释应与临床数据和常规诊断方法相结合。

（国家卫生健康委临床检验中心 冯蕾 李金明 编译）

（DOI：10.1128/spectrum.00746-22 IF：7.171）

## 上接第1版

和RNA，之后进行illumina DNA和RNA测序，并通过FLASH CRISPR/Cas9技术富集病原体AMR基因序列并建库，再进行纳米孔测序，将输出结果与SRST2和ARG-ANNOT数据库比对、使用CARD耐药基因识别工具、SURPIrt生物信息学管道来分析AMR基因。结果显示，illumina测序平均产生 $4.3 \times 10^7$ 和 $6.9 \times 10^7$ 个DNA和RNA读长，使用之前建立的宏基因组规则模型来识别呼吸道感染微生物，从27例明确诊断的患者样本中鉴定出32种细菌性病原体中的26种（81%），4种（67%）缺失的病原体存在于多微生物培养中，1种（17%）被鉴定为不同的链球菌属。通过RNA测序和DNA测序分别鉴定了138个和234个AMR基因，其中 $\beta$ 内酰胺抗性基因最为常见。与临床抗菌药物药敏试验相比，呼吸系统mNGS预测AMR的性能因病原体、抗菌药物和核酸类型不同。对于革兰阳性细菌，RNA和DNA组合mNGS的敏感性为70%，特异性为95%。对于革兰阴性菌，敏感性为100%，特异性为64%。独立进行RNA测序时，对革兰阳性病原体的灵敏度为52%，特异性为100%，准确性为86%；对革

兰阴性病原体敏感性为100%，特异性为64%，准确性为79%。独立进行DNA测序时，对革兰阳性病原体的敏感性为39%，特异性为95%，准确性为78%；对革兰阴性病原体的敏感性为58%，特异性为67%，准确性为63%。另外，该研究发现与社区获得性LRTI相比，医院获得性LRTI患者呼吸道微生物组中的AMR基因负担更大。利用Cas9和纳米孔测序对AMR基因进行靶向富集和快速检测，验证了FLASH Cas9技术富集低丰度AMR基因的实用性，与单独的DNA测序相比，可以增加 $>2500$ 倍的低丰度AMR基因。AMR基因靶标可以在实时纳米孔测序的10min内被识别出来，这表明单个样本的潜在周转时间小于6小时。

该研究结果表明，mNGS能够不依赖培养地预测LRTI中的AMR，证明了mNGS对AMR耐药性流行病学监测的可行性，并强调了入院后感染与下呼吸道微生物AMR耐药基因负担之间的关联。并且Cas9靶向富集结合纳米孔测序与illumina测序结果具有很高的 consistency。

（国家卫生健康委临床检验中心 冯蕾 李金明 编译）

（DOI：10.1186/s13073-022-01072-4 IF：11.117）

## 利用二代测序进行探索性宏基因组分析胸膜感染的细菌学模式

【据《Lancet Microbe》2022年4月报道】题：利胸膜感染的细菌学（TORPIDS）：一项通过下一代测序实施的探索性宏基因组分析（英国牛津呼吸医学中心 作者Nikolaos I Kanellakis等）

胸膜感染是一种临床上常见且严重的疾病，在全世界范围内都有较高的发病率和死亡率。然而目前临床对胸膜感染的细菌学模式知之甚少，这很大程度上是因为传统的基于细菌培养的病原体鉴定方法敏感性不足、培养过程难免微生物偏倚以及运转周期问题。基于二代测序的16s rRNA测序可以快速、高敏感地测定胸腔积液样本中的微生物构成，因此有助于我们探索胸膜感染灶中的细菌构成。

来自英国牛津呼吸医学中心的研究团队，采集POILT研究中的243例感染性胸膜炎和20例非感染性胸腔积液样本，使用Illumina MiSeq平台进行16s rRNA测序，以探索胸膜感染灶中的细菌模式以及其与临床预后的关联。243例感染性胸腔积液样本中共检出9类致病菌，按丰度排名分别为厌氧菌、其他革兰阴性菌、咽峡链球菌组、肺炎链球菌、肠杆菌科、其他革兰阳性菌、金黄色葡萄球菌、结核分枝杆菌和一种鉴定失败的菌。在33.5%（165例）样本中发现了厌氧菌感染，在27.5%（143

例）样本中发现了其他革兰阴性菌感染。另外还发现大多数（79%）的胸膜感染病例都是多重感染。使用无监督层次聚类和相关性分析发现以肺炎链球菌为主的样本之间呈现出较紧密的模式联系，厌氧菌也是如此。社区获得性感染样本中肺炎链球菌的丰度更高，而医院获得性感染样本中肠杆菌科和金葡菌的丰度更高。此外社区获得性胸膜感染（233种）比医院获得性感染样本（55种）有更大的物种丰富度。研究团队对RAPID评分因素进行多变量Cox回归分析，发现细菌种类是死亡率的独立预测因素。厌氧菌和咽峡链球菌组感染者的1年生存率比未感染它们的胸腔积液病例更高，而以金葡菌或肠杆菌科为主要病原体的样本生存率较差。另外还发现医院获得性胸膜感染的死亡率明显高于社区获得性胸膜感染。

总之，本次研究初步探索了胸膜感染灶中的细菌模式，为临床感染性胸腔积液的诊治决策提供了新方向。进一步的研究应该扩大观察范围，收集更详细的背景资料，以阐明这些微生物种类和丰度对临床结局的影响。

（国家卫生健康委临床检验中心 张远峰 李金明 编译）

（DOI：10.1016/S2666-5247（21）00327-X IF：86.208）

## 医学参考报

理事长兼总编辑：巴德年 社长：魏海明  
副理事长兼副总编辑：曹雪涛等 副社长：吕春雷  
理事会秘书长：周赞 副社长：周赞  
社址：北京市西城区红莲南路30号红莲大厦B0403  
邮编：100055 总机：010-63265066  
网址：www.yxckb.com

## 检验医学专刊

名誉主编：尚红 申子瑜	张峰 张曼 张军力 张传宝 张志英
顾问：侯生才 沈雁英 杨振华 陈民钧 丛玉隆	张炳昌 张莉萍 陈瑜 陈燕 陈文明
刘人伟 马斌荣 吕元 郭健 潘柏申	范红 郑卫东 府伟灵 赵敏 赵建宏
邹伟民 张正 胡丽华 康熙雄 田亚平	郝晓柯 胡娟 胡成进 胡志东 胡晓波
张捷 张会英 张伟民 于维麟 任健康	胡朝晖 秦雪 秦东春 袁宏 夏薇
居军 黄文方 王兰兰 徐维家	徐克前 高红 高春芳 崔巍 彭林
主编：王清涛	彭明婷 谢风 韩晓芳 潘卫 魏殿军
副主编：李金明 徐国宾 徐英春 姜晓峰 王传新	魏殿军 陈春志 段少雷 顾小丰 姚国樑 林日升
执行主编：李金明	李川 秦颖 沈广仟 万志静 吴乐斌
编委：（按姓氏笔画排序）	杨军 杨军艳 姚勇 俞捷 朱耀毅
王治国 王建中 王培昌 王露楠 卢志明	张晨
许斌 刘勇 刘敏 刘文恩 刘彦虹	编辑部主任：陈文明 编辑部副主任：岳育红
仲人前 孙自镛 孙桂荣 李艳 李连青	编辑：孙影 张括 周倩倩 赵建玉 郭毅
李俊明 李晓军 李彬先 何成彦 沈佑君	周慧星 郑晔 左畅 梁玉芳

## cfDNA 中 LINC00473 启动子高甲基化用于结直肠癌的早期无创检测

【据《Clinical Epigenetics》2022年7月报道】题：cfDNA中LINC00473启动子高甲基化用于结直肠癌的早期无创检测（圣地亚哥大学临床医院 作者Juan Ruiz-Bañobre等）

结直肠癌（CRC）是全球第三大癌症，预计到2030年将增加60%，超过220万新增病例。CRC通常晚期被诊断，这是癌症死亡的主要原因。CRC患者的5年生存率为14%~90%，主要取决于在疾病的早期或晚期被诊断。结直肠癌的早期筛查方法包括粪便免疫化学试验（FIT），这是一种广泛用于检测粪便血红蛋白的无创方法。但是这种基于粪便的检测方法存在局限性，无法可靠地检测结肠直肠癌前病

变。结肠镜检查被认为是CRC诊断的金标准，但它是一种侵入性手术，可能导致严重的并发症，患者依从性较低。因此，迫切需要新型的无创检测方法来早期发现CRC。

来自圣地亚哥大学临床医院的研究团队，通过检测药物处理和未处理人结直肠癌细胞系HCT-116；纳入4个结直肠组织样本队列和4个血浆样本队列，评估了长链非编码RNA LINC00473启动子甲基化作为检测结直肠癌和相关癌前病变的非侵入性生物标志物的临床应用潜力。首先，通过亚硫酸盐基因组测序和表达分析，评估了启动子高甲基化对LINC00473的表观遗传调控，结果显示，结直肠癌HCT-116细胞的CpGI

发生高甲基化，而正常结肠黏膜细胞是未甲基化的，并且LINC00473相对于未甲基化的正常细胞表达下调。此外，还纳入450K甲基化芯片和来自癌症基因组图谱（TCGA）的RNA-seq数据，进一步分析了结直肠肿瘤中LINC00473的甲基化水平，结果表明结直肠肿瘤中LINC00473的甲基化水平明显高于对照组，这在所有TNM肿瘤分期中都是一致的。LINC00473的启动子甲基化与其表达水平呈显著负相关。然后，通过焦磷酸测序，在几个独立的结直肠癌和晚期结直肠息肉患者队列中基于组织进行了研究，显示LINC00473的甲基化程度在结直肠息肉、结直肠癌明显高于健康对照组，而在息肉和结直肠癌之间没有发

现差异，其中，LINC00473的甲基化状态能够准确检测晚期结直肠息肉，AUC为0.992，敏感性可达100%，特异性为94%。最后，基于定量甲基化特异性PCR和数字PCR检测了LINC00473甲基化在cfDNA结直肠癌早期检测中的临床应用，结果表明对CRC患者具有非常高的诊断准确性，AUC为0.881，敏感性为81%，特异性可达100%。

因此，LINC00473启动子的高甲基化作为CRC及相关癌前病变的无创早期检测的生物标志物具有巨大的潜力。

（国家卫生健康委临床检验中心  
常璐 李金明 编译）

（DOI：10.1186/s13148-022-01302-x  
IF：7.259）

## SLC5A7 启动子的靶向去甲基化抑制结直肠癌进展

【据《Clin Epigenetics》2022年7月报道】题：SLC5A7启动子的靶向去甲基化抑制结直肠癌进展（华西医院 作者Yang Li等）

DNA甲基化在转录水平的基因调控中起关键作用，甲基化的改变调节多种病理过程，包括癌症的发生和进展。SLC5A7是一种Na<sup>+</sup>依赖性胆碱转运蛋白，具有13个跨膜结构域，主要在脊髓和髓质中表达，属于Na<sup>+</sup>/葡萄糖协同转运蛋白家族（SLC5）。SLC5A7在认知功能和神经肌肉接头信号传导的调节中起关键作用。在结直肠癌（CRC）中下调，并作为肿瘤抑制因子发挥作用。然而，在CRC中，SLC5超家族（包括SLC5A7）在肿瘤发生和进展中的作用和分子机制几乎完全未知。在本研究中，旨在阐明SLC5A7在CRC中失活的机制及SLC5A7启动子甲基化与CRC个体预后之间的潜在相关性。

该研究基于dCas9系统，针对人CRC细胞（HCT116和RKO）特定位点的DNA去甲基化，来探索SLC5A7在CRC中失活的机制，以及SLC5A7启动子甲基化与CRC个体预后之间的潜在相关性。

在之前的研究表明，SLC5A7在大多数CRC组织和细胞中被下调。为了进一步揭示SLC5A7在CRC中失活的潜在机制，使用两种广谱去甲基化化学物质DAC和AZA来治疗HCT116和RKO细胞。在HCT116和RKO细

胞中，与未处理的对照组相比，在DAC和AZA干预后观察到更高的SLC5A7 mRNA和蛋白质表达水平。并且DNMT3b参与了SLC5A7的特异性甲基化，因为SLC5A7 mRNA和蛋白质表达上调，随后DNMT3b沉默。总的来说，这些结果表明SLC5A7的表达受到DNMT3b介导的CRC细胞DNA甲基化的抑制。

为了进一步研究DNA甲基化在CRC细胞中SLC5A7失活中的作用，进行了SLC5A7的DNA序列分析。飞行时间质谱法用于确定来自HXCRC队列的69个CRC组织中SLC5A7序列（1 800~2 500 bp）的甲基化状态，结果表明，恶性样本中SLC5A7 DNA启动子的甲基化百分比高于HXCRC队列中的正常组织此外，与正常相邻组织相比，qPCR结果表明SLC5A7在大多数CRC组织中下调，SLC5A7的DNA甲基化与其表达和CRC患者预后呈负相关。

该研究设计了6个sgRNA来构建dCas9-multiGCN4/scFv-TET1CD-sgRNA，它们可以特异性地使SLC5A7基因去甲基化以逆转其表达。在转染dCas9-multiGCN4/scFv-TET1CD-sgSLC5A7后，在转染sgSLC5A7-2和-3的HCT116和RKO细胞中观察到SLC5A7转录显著增加。进一步分析，Western印迹结果证实了HCT116和RKO细胞中SLC5A7的有效上调。飞行时间质谱法显示转染sgSLC5A7-2和sgSLC5A7-3的CRC细胞中CpG甲基化减少。这些数据证实了基于dCas9的sgSLC5A7-2和sgSLC5A7-3在SLC5A7去甲基化中是有效且特异性的。

接下来，为了检查SLC5A7选择性去甲基化在CRC中可能的抗肿瘤作用，使用基于dCas9的sgSLC5A7-2和sgSLC5A7-3转染的CRC细胞进行了进一步的体外和体内实验。这些结果表明，将sgSLC5A7-2和sgSLC5A7-3转染到HCT116和RKO癌细胞中导致了较低的肿瘤细胞活力和集落形成。此外，在雌性BALB/c裸鼠右侧注射HCT116细胞的皮下肿瘤模型显示，稳定转染sgSLC5A7-2和sgSLC5A7-3的HCT116细胞具有更小的肿瘤体积和重量与未转染sgRNA细胞相比。这些结果证实了靶向去甲基化系统与sgSLC5A7-2和sgSLC5A7-3在CRC细胞中的抗肿瘤作用。

总之，该研究结果表明DNA甲基化水平介导SLC5A7表达，可用作CRC患者的预后指标。靶向SLC5A7 DNA去甲基化试剂的实施在体外和体内均产生了显著的抗肿瘤作用。此外，dCas9-multiGCN4/scFv-TET1CD-sgSLC5A7可能在结肠癌和其他癌症中具有治疗价值。

（国家卫生健康委临床检验中心 张丽静 李金明 编译）

（DOI：10.1186/s13148-022-01308-5 IF：7.259）

血浆 cfDNA 甲基化组  
可用于检测卵巢癌

【据《Clin Epigenetics》2022年6月报道】题：利用血浆细胞游离DNA甲基化组检测卵巢癌（中国中山大学孙逸仙纪念医院 作者Huaiwu Lu等）

卵巢癌（OC）是一种高致死率的妇科肿瘤，早期诊断困难导致其五年生存率仅为46%，是最致命的妇科癌症之一。由于卵巢癌没有明显的早期症状，且在临床上没有特异性标志物用于早期检测，大约3/4的患者都在晚期（III-IV期）才诊断出来，而早期卵巢癌的五年生存率可以达到92%。借助早期标志物早发现卵巢癌很可能是一种有效的改善策略。近年来，cfDNA甲基化在癌症的早期检测中发挥着重要的作用。DNA甲基化改变是癌变过程中最早发生的事件之一，它抑制肿瘤抑制基因，激活肿瘤基因，促进肿瘤转化，因此有望成为卵巢癌的早期标志物。目前已经在卵巢癌中发现了一些cfDNA甲基化位点，但由于缺乏cfDNA全基因组甲基化信息，其早期检测能力有限。

中国中山大学孙逸仙纪念医院的Huaiwu Lu等人通过cfMeDIP-seq获得卵巢癌的cfDNA甲基化组，评估cfDNA甲基化组是否可用于检测卵巢癌，尤其是早期卵巢癌。该研究收集了74例卵巢癌患者、20名良性盆腔肿块患者和86名健康志愿者的血浆样本，通过cfMeDIP-seq生成cfDNA甲基化组，识别出差异甲基化区域（DMRs），然后再使用机器学习迭代训练评估DMRs对卵巢癌的鉴别能力。通过两两分组，该研究发现DMRs能够准确区分晚期卵巢癌与非肿瘤样本（健康、良性），累计受试者工作特征曲线下面积（AUROC）分别达到0.97、0.98。DMRs对早期卵巢癌与非肿瘤样本（健康、良性）同样具有良好的分类表现，累计AUROC达到0.86、0.96。然而，广泛使用的卵巢癌蛋白标志物CA125对早期卵巢癌与良性样本中的鉴别能力较差。此外，早期甲基化标志物对晚期样本和健康样本具有较好的区分能力（AUC=0.88）；对晚期肿瘤样本和良性对照的鉴别能力相对较弱（AUC=0.71）。然而，晚期卵巢癌样本的甲基化组具有晚期特异性模式，不适合用于早期卵巢癌的检测。

血浆cfDNA甲基化组可以有效检测卵巢癌患者，尤其是早期卵巢癌。此外，该研究还验证了卵巢癌cfDNA甲基化位点具有阶段特异性模式。

（国家卫生健康委临床检验中心 谭评 李金明 编译）

（DOI：10.1186/s13148-022-01285-9

IF：7.259）

## 公益广告



接种新冠疫苗  
利己利家利国



## 全身炎症和胰岛素抵抗替代标志物有助预示癌症结局

【据《BMC Cancer》2022年6月报道】题：癌症患者全身胰岛素抵抗和胰岛素抵抗的预后重要性：一项前瞻性多中心研究（中国北京世纪坛医院 作者Guo-Tian Ruan等）

全身性炎症和胰岛素抵抗（insulin resistance, IR）广泛存在于诸如代谢综合征、2型糖尿病和癌症等的各类慢性疾病中。学界普遍认为中晚期癌症通常伴随着能量代谢异常和炎症紊乱，其严重程度往往与肿瘤疾病的分期和严重程度相关。由于IR检测的金标准葡萄糖钳夹技术难以在临床实践中开展，许多替代性标志物被用来间接评估IR程度，如低密度脂蛋白胆固醇/高密度脂蛋白胆固醇（LDL-c/HDL-c, LHR）、总胆固醇/高密度脂蛋白胆固醇（TC/HDL-c）、三酰甘油/高密度脂蛋白胆固醇（TG/HDL-c）和空腹三酰甘油葡萄糖指数（TyG）等。但

这些IR替代指标和全身炎症反应与各类癌症预后的相关性仍不清楚，哪些指标能作为预后预测指标仍待研究。

为此，来自北京世纪坛医院胃肠中心的研究人员联合国内多家癌症中心进行了一项前瞻性横断面研究，收集2013—2021年就诊的5 221例癌症患者的临床病理数据及疾病各阶段的血清生化结果，分析CRP和上述IR替代指标与肿瘤疾病进展和预后的关系。结果显示，患者的中位生存时间为44.5个月，ROC预后曲线和C指数表明，LHR指数在指导肿瘤预后方面优于其他IR指数。高CRP和LHR的患者普遍BMI较高、肿瘤分期较晚、自理能力较差、平均住院日和治疗费用较高，死亡率比低CRP和LHR患者的死亡率高1.75倍。除此之外，CRP在不同癌种间的差异较大，如乳腺癌的CRP水平较其他癌症低，而LHR在各种癌种间分布均

匀。相比而言，CRP更能指示肿瘤疾病的不良预后，其每增加1SD死亡风险比将增加13%（95%CI 1.09~1.19），而LHR较高时与癌症的死亡率增加更相关，且女性的不良预后与LHR更相关。

综上，此研究强调了全身炎症和IR在进展期癌症患者预后中的重要性。LHR作为一种IR替代性指标在指示癌症预后方面优于其他指标，揭示了肿瘤后期微环境紊乱导致细胞因子分泌和能量代谢障碍对于癌症分化转移的影响，提示此阶段临床医生应该给予患者更多抗炎和营养代谢支持。此项研究的缺陷主要在于方法学上的回顾性及CRP易受其他因素干扰，因此在临床应用上应综合考虑更多方面因素带来的影响。

（北京大学肿瘤医院 陈坤 徐国兵 编译）  
（DOI：10.1186/s12885-022-09752-5  
IF：4.638）

## 多变量生物标志物方法可识别慢性肾脏疾病患者突发心力衰竭事件

【据《European Journal of Heart Failure》2022年6月报道】题：多变量生物标志物方法可识别慢性肾脏疾病患者突发心力衰竭事件：来自慢性肾功能不全队列的研究结果（美国克利夫兰大学医院和医疗中心哈林顿心脏和血管研究所 作者Scott E. Janus等）

慢性肾脏病（CKD）是心力衰竭（HF）的已知危险因素，亟待新诊断工具对具有高心力衰竭风险的CKD患者进行可靠识别并辅助指导治疗。有研究表明高敏肌钙蛋白T（hsTnT）、B型钠尿肽（BNP）水平与HF发生风险增加有关，另外众多生物标志物可能有助于识别其病理途径的改变，如高敏C反应蛋白（hsCRP）、髓过氧化物酶（MPO）、纤维蛋白原、成纤维细胞生长因子23（FGF23）等可在预测HF风险中发挥作用。该研究旨在探索一种简单、综合的生物标志物评分方法帮助对CKD患者HF事件发生进行风险分层。

该研究是基于多中心队列的一项前瞻性研究，其中纳入3 182例轻中度CKD患者，随机分为建模队列与验证队列，研究结局为患者发生心力衰竭事件，中位随访数为7年。研究通过建模队列数据构建COX回归模型，存在4个标志物与HF事件发生呈独立相关，分别为BNP、FGF23、纤维蛋白原和hsTnT。每个标志物的HR较为接近，则赋予相同的权重，设定任一标志物高于约登指数最佳阈值点记1分，同一患者最后可能得分为0~4分。

结果显示两队列HF发生率随生物标志物评分的增加而升高。在调整多变量因素后，与评分为0分的患者相比，评分为4的患者其HF风险增加近10倍（ $P<0.001$ ）。该评分方法对HF事件具有良好的鉴别性，其性能优于任何单一的标志物（AUC=0.76，95%CI 0.74~0.79），且基础临床模型联合生物标志物评分可以提升模型的预测性能（ $P<0.001$ ）。

综上所述，生物标志物评分不但作为一种独立的工具对CKD患者HF事件有较好区分能力，将生物标志物评分添加到临床风险模型可适度重新分类HF风险并略微改善预测，这些发现对于早期识别高危患者具有重要意义。

（北京大学第三医院 刘琪 崔丽艳 编译）  
（DOI:10.1002/ejhf.2543  
IF：17.349）

## 一项回顾性研究：建立有效鉴别肝内胆管癌和肝细胞癌的列线图

【据《Frontiers in Oncology》2022年4月报道】题：一项回顾性研究：建立有效区分肝内胆管癌和肝细胞癌的列线图模型（中国山东第一医科大学附属山东省医院 作者Yuan-Quan Si等）

原发性肝癌（PLC）是2020年全球第六大最常见癌症和第三大癌症相关死亡原因，包括肝细胞癌（HCC）和肝内胆管癌（ICC），以及不同细胞来源的混合性肝细胞癌-胆管癌。其中ICC起源于肝内胆管上皮细胞，是第二常见的肝脏恶性肿瘤。近年来ICC发病率急剧上升却没有明确病因，其预后和生存均比HCC差。据报道ICC五年生存率仅为30%。作为一种恶性肿瘤，ICC与HCC具有共同的危险因素和临床特征，因此，迫切需要找到一种有效、特异的方法来鉴别ICC和HCC。目前鉴别HCC与ICC的金标准仍为病理检查，临床上常使用AFP和CA199鉴别HCC和ICC，但其诊断特异性和灵敏度并不能满足临床需求。列线图是一种简

单有效的图形，在各种恶性肿瘤的术前诊断和预后评估中，可能比传统方法更准确。本研究纳入了来自山东第一医科大学附属山东省医院1 591例经病理证实为HCC或ICC的患者，符合纳入标准和排除标准的患者按3:1的比例随机分为开发组和验证组，以期建立和验证有效的ICC和HCC鉴别模型。

研究者首先分析了训练队列中HCC和ICC患者临床病例资料的基线水平，除ALT、AST、TP、ALB外，其余指标（CEA、CA199、CA125、AFP、HBV、PIVKA-II等）在HCC和ICC患者中存在差异。将上述差异元素纳入多元逻辑回归，只有logAFP、logCA125、logCA199、logPIVKA-II、HBV是ICC和HCC存在的独立差异因素。研究者用上述差异因素建立了列线图模型。在列线图模型中，每一个变量对应的线段都标注了刻度，代表该变量的取值范围，线段长度代表了该因素对结局事件的贡献度，在诊断

时，根据患者的每一项指标的取值获得分数，最后得出总得分，也就是最后一行，研究者就可以得出患者患ICC的概率。

作者随后建立AFP和CA199组成的传统诊断模型，与列线图进行比较。结果显示，在ROC分析和DCA分析中，列线图都显示出更大的优势。

在本研究中，通过单变量和多变量logistic回归发现，HBV、Log-AFP、Log-CA199、Log-CA125和Log-PIVKA-II是区分它们的独立因素。基于这些独立差异因素，建立了一个列线图，在训练组和验证组的AUC分别为0.951和0.958，显示出较高的准确性，为疾病的诊断和预后评估提供了一种更简单高效的方法。下一步希望能在多中心、大样本调查中进一步验证其临床价值。

（北京大学肿瘤医院 王雅婷 徐国兵 编译）  
（DOI：10.3389/fonc.2022.833999  
IF：5.738）

## 基于肌酐与胱抑素C估算CKD患者GFR的个体差异与心力衰竭的相关性

【据《American Journal of Kidney Diseases》2022年7月报道】题：由肌酐、胱抑素C分别估算的肾小球滤过率的个体差异与心力衰竭事件的相关性（美国旧金山加州大学旧金山分校医学系肾内科 作者Debbie C. Chen等）

据统计慢性肾脏病（CKD）患者发生心力衰竭（HF）的风险较高，较低的估算肾小球滤过率（eGFR）与HF事件发生的风险密切相关。目前基于肌酐估算的肾小球滤过率（eGFR<sub>cr</sub>）在临床实践中广泛应用，但易受到多种因素影响，而基于胱抑素C估算的肾小球滤过率（eGFR<sub>cys</sub>）则更加稳定。研究表明，基于胱抑素C估算的肾小球滤过率（eGFR<sub>cys</sub>）与HF事件具有更强的线性关系，由基于肌酐及胱抑素C估算的肾

小球滤过率衍生的指标eGFR<sub>diff cys-cr</sub>（eGFR<sub>cys</sub>、eGFR<sub>cr</sub>差值），与全因死亡率、CVD事件、终末期肾病等相关，但尚未在已确诊CKD队列中评估该指标与HF的相关性。该研究旨在探究CKD患者中，eGFR<sub>cys</sub>和eGFR<sub>cr</sub>估算的肾小球滤过率个体间差异及纵向变化与心力衰竭风险的关系。

该研究是一项基于人群的前瞻性队列研究，纳入4 512例有CKD且未有HF的患者，随访3.5年，其中532例（12%）发生了急性心力衰竭住院事件。对eGFR<sub>diff cys-cr</sub>按照<-15、-15~15、>15进行分层，使用Fine-Gray比例风险模型比较eGFR<sub>diff cys-cr</sub>的基线、纵向变化、斜率与HF事件发生风险的相关性。

研究结果显示，在4 512名参与者

中，2/3患者的eGFR<sub>diff cys-cr</sub>介于-15~15之间。在调整多变量因素后，较低的基线eGFR<sub>diff cys-cr</sub>（<-15）与较高的HF事件风险相关（HR=1.20，95%CI 1.07~1.34）。纵向随访观察，较低eGFR<sub>diff cys-cr</sub><-15仍与较高的HF住院风险相关（HR=1.99，95%CI 1.39~2.86）。除此之外，与eGFR<sub>cys</sub>和eGFR<sub>cr</sub>同时下降的患者相比，eGFR<sub>cys</sub>下降速度快于eGFR<sub>cr</sub>的CKD患者发生HF的风险更高（HR=1.49，95%CI 1.19~1.85）。

综上所述，eGFR<sub>cys</sub>和eGFR<sub>cr</sub>的个体差异及纵向时间变化对于评估CKD患者发生HF的风险具有一定价值。

（北京大学第三医院 张茜 崔丽艳 编译）  
（DOI：10.1053/j.ajkd.2022.05.011  
IF：6.653）

## 基于多信号放大的微流控化学发光生物传感器快速灵敏检测大肠杆菌 O157:H7

【据《Biosensors & Bioelectronics》2022年5月报道】题：基于多信号放大的微流控化学发光生物传感器快速灵敏检测大肠杆菌O157:H7（清华大学化学学生物学重点实验室 作者Dongli Sun等）

据世界卫生组织报道，产志贺毒素样的大肠杆菌O157:H7作为一种重要的食源性病原体，已经在全世界造成了280万例出血性结肠炎。预防控制O157:H7感染的关键策略便是快速有效地检测，因为其感染剂量低至10~100个细胞。迄今为止，该细菌检测的金标准仍是平板培养，但是该方法费时费力；在快速检测方面，目前主要有酶联免疫吸附试验（ELISA）和聚合酶链反应（PCR）。但是，ELISA反应灵敏度较低且容易产生假阳性，PCR反应需要复杂的样本处理过程，导致检测时间较长。因此，迫切需要开发简单、快速、灵敏的检测大肠杆菌O157:H7的新方法。而本研究则基于多重信号放大策略，开发了一种微流控化学发光生物传感器

用于大肠杆菌O157:H7的快速超灵敏检测。

为提高检测的灵敏度，本研究设计了基于催化夹组装反应（CHA）的多重信号放大策略。当检测样本中存在大肠杆菌O157:H7时，会将启动序列S从大肠杆菌适配体（Apt-E）上释放出来，从而启动后续由生物素化的H1和辣根过氧化物酶（HRP）标记的H2介导的CHA反应。当加入化学发光剂时，通过固定在微柱上的H1留在反应体系中的H2-HRP则会被催化发光。在研究该传感器的可行性时，只有当大肠杆菌O157:H7和所有CHA试剂同时存在时才会显示较高的化学发光信号强度，该信号强度几乎是只含CHA试剂的溶液的23倍，可见该微流控化学发光传感器的反应信号强，信噪比高。在研究该传感器的检测灵敏度时，根据空白值的3倍标准差计算出检测限为130 CFU/ml，低于大多数报道的检测方法。在研究该传感器的特异性时，使用了浓度为 $1 \times 10^8$  CFU/ml的五种不同病原体：大肠杆菌O157:H7，大

肠杆菌K12，鼠伤寒杆菌，金黄色葡萄球菌和英诺克李斯特菌。结果显示，只有大肠杆菌O157:H7的反应信号强，其他病原体的反应信号可忽略不计。可见，基于CHA的微流控化学发光传感器的特异性较好。此外，基于CHA的微流控化学发光传感器检测大肠杆菌O157:H7只需要10  $\mu$ l样本便可进行检测，且检测时间只需1.5小时。

总之，本研究设计的基于CHA的微流控化学发光传感器反应信号强，信噪比高，检测限低至130 CFU/ml，灵敏度高且特异性高。可以说本研究基于CHA多重信号放大策略，开发了一种快速灵敏的微流控化学发光传感器用于大肠杆菌O157:H7的检测。但是，本研究也存在一定的不足之处，首先是微流控装置的成本较高，其次是通过金纳米作为交联剂的H2——HRP虽然信号强，但是价格较贵。

（国家卫生健康委临床检验中心 马驭 张瑞 编译）  
（DOI：10.1016/j.bios.2022.114390 IF：12.545）

## 基于LAMP-CRISPR的单管等温检测肺炎克雷伯菌的新方法

【据《Microbiology Spectrum》2022年7月报道】题：基于LAMP-CRISPR的单管等温检测肺炎克雷伯菌的新方法（中国疾病预防控制中心国家重点实验室 作者Qiu X等）

肺炎克雷伯菌（*K. pneumoniae*）是一种革兰阴性芽孢杆菌，是引起急性呼吸道感染甚至肺炎，特别是院内获得性感染的最常见的细菌病原体之一。近年来，随着耐多药分离株和高毒性变异的出现，肺炎克雷伯菌已成为全球公共卫生的重大威胁。因此，肺炎克雷伯菌感染的早期诊断和指导治疗需要一种快速、准确、便捷的检测方法。传统的基于表型的鉴定方法所需诊断时间长，基于核酸检测的聚合酶链式反应（PCR）技术虽取得令人满意的效果，但受限于昂贵精密的仪器及较长的反应时间（2~4 h）。近年来，基于CRISPR/Cas的核酸检测平台由于其高特异性及高灵敏性广泛应用于各病原体的检测中，该平台通常由扩增步骤和CRISPR/Cas反应步骤两部分组成，需要多次手工操作，交叉污染的风险较高。本研究将环介导等温扩增（LAMP）技术和CRISPR/Cas反应相结合，建立了一个单管等温的核酸检测平台，可实现肺炎克雷伯菌的快速、灵敏、特异检测。

本研究首先使用试剂盒法对样本进行DNA提取，而后对核酸样本进行LAMP扩增以产生大量的靶dsDNA，靶dsDNA被CRISPR/Cas12特异性识别后，可非特异地切割体系中的ssDNA报告基因，导致荧光基团和淬灭基团分离而产生荧光信号。荚膜多糖合成调控基因*rcsA*由于其保守性和特异性被选为检测的靶序列。在方法学的建立与优化过程中，本研究首先通过浊度法检测扩增后的产物，在相同条件下使用三组引物进行LAMP反应并筛选出扩增最快的引物组。随后，研究者对方法学中各反应条件进行优化，结果显示

LAMP反应中所使用的引物混合液体积为0.4  $\mu$ l时表现出最佳的检测结果；ssDNA探针的体积为0.5  $\mu$ l（原浓度100  $\mu$ M，工作浓度2  $\mu$ M）最快达到饱和荧光。使用优化条件后的本方法测定105株菌株，包括64株肺炎克雷伯菌临床分离株和41种非肺炎克雷伯菌菌株，结果显示所有测试的肺炎克雷伯菌分离株均为阳性，非肺炎克雷伯菌菌株均为阴性。为了确定本研究中新建方法的LOD值，研究者们从肺炎克雷伯菌中提取基因组DNA，并以10倍的间隔稀释范围从1 ng/ $\mu$ l到1 fg/ $\mu$ l，结果显示本方法的LOD值为1 pg，而单独的LAMP反应的LOD值为10 pg，是本方法的10倍。最后，研究者在临床样本中验证了本方法的临床诊断性能。在58份临床痰标本中，有25份痰液样本成功分离出肺炎克雷伯菌菌株，且未发现其他病原体。以培养结果为金标准，本方法和LAMP检测的灵敏度分别为96%（24/25）和95.8%（23/24）；特异性分别为100%（33/33）和79.4%（27/34）。此外，本方法和LAMP的阳性预测值分别为100%（24/24）和76.7%（23/30）；阴性预测值分别为97.1%（33/34）和96.4%（27/28），即本方法的临床诊断性能优于独立的LAMP反应。

总之，本研究建立了一种基于CRISPR/Cas和LAMP反应的肺炎克雷伯菌检测新方法，具有灵敏、特异、等温（56  $^{\circ}$ C）、快速（60 min）、低成本（3.5美元/反应）等优势。但该方法仍存在一定的局限性，首先该方法的LOD相对较高（1 pg基因组DNA，相当于160个肺炎克雷伯菌细胞和1.6个 $\times 10^5$  CFU/ml对于样本），可能导致假阴性，导致低剂量感染；其次，该方法未测试使用细菌悬浮液或未提取核酸的样品进行该测试的可行性，仍需要核酸提取步骤，不够简便快捷。

（国家卫生健康委临床检验中心 黄滔 李金明 编译）  
（DOI：10.1128/spectrum.01545-22, IF：9.043）

## 等温扩增技术

### 与横向流动试纸条法快速简单特异检测牙龈卟啉单胞菌

【据《Frontiers in Cellular and Infection Microbiology》2022年5月报道】题：等温扩增技术与横向流动试纸条法快速简单特异检测牙龈卟啉单胞菌（连云港市第二人民医院 作者Zhenxing Chen等）

牙周病是发生在牙周支持组织的一种慢性传染病，由于患病率高，目前被认为是人类第六大流行疾病。牙龈卟啉单胞菌是目前公认的与牙周病发展相关的主要优势菌，是牙周微生物学领域研究的关键致病菌之一。牙龈卟啉单胞菌数量可预测相关疾病的进展，其数量与疾病程度呈显著正相关。因此，探索牙龈卟啉单胞菌的快速检测方法对口腔疾病及相关全身疾病的诊断和早期干预具有重要的指导意义。传统的培养方法需要对微生物进行分离、培养，具有耗时、不敏感、烦琐等缺点。随着分子生物学技术的发展，核糖体RNA（16S rRNA）PCR检测、荧光定量PCR、免疫层析、电离飞行时间质谱、DNA探针杂交等快速诊断研究进展迅速。然而，这些方法依赖于训练有素的技术人员和精

密的机器，限制了它们在偏远地区和资源有限的实验室的应用。

本研究采用重组酶多聚酶扩增技术（RPA）结合横向流动试纸条法（LFS），建立了一种快速、灵敏、不依赖于仪器的方法用于牙龈卟啉单胞菌的检测。使用Primer Premier 5软件针对16S rRNA基因序列设计特异性RPA引物和探针组，并检测ATCC 33277标准菌株筛选出最佳的引物探针组合。其他23种常见病原菌临床分离株作为特异性分析样本，梯度稀释的 $6 \times 10^4 \sim 6 \times 10^{-1}$  CFU/ $\mu$ l牙龈卟啉单胞菌作为敏感性分析样本，probit回归分析计算出LOD。

以16S rRNA基因为靶序列设计了5对引物，目的条带大小为353 bp、254 bp、223 bp、183 bp和213 bp。琼脂糖凝胶电泳显示引物对3、4和5出现引物二聚体 $< 100$  bp，因此，选择引物对1和2为后续探针设计。两种引物-探针组合RPA-LFS结果都产生了正确的阳性信号，但都出现了假阳性信号。引入碱基替换来消除探针和反向引物之间的连续碱基配对，引物-探针组1仍显示弱假

阳性信号，引物-探针组2无假阳性信号。特异性分析结果显示20个牙龈卟啉单胞菌的临床分离株阳性，23个其他病原菌的分离株阴性。敏感性分析结果显示在 $10^4$  CFU/ $\mu$ l时，测试线上有一条清晰的红色带，随着模板浓度的降低，信号逐渐减弱。在 $6 \times 10^{-1}$  CFU/ $\mu$ l，信号消失。检测灵敏度不受人类DNA的影响。Probit回归分析得到LOD为9.27 CFU/ $\mu$ l。用RPA-LFS方法检测了118个牙龈卟啉单胞菌阳性样品和12个阴性样品，所得结果与PCR方法完全一致。

这项研究建立了一个快速、特异、敏感检测牙龈卟啉单胞菌的RPA-LFS方法。在无需设备的条件下，用简单的方法可在1小时内获得可读的结果。这可能为未来快速检测牙龈卟啉单胞菌等病原微生物提供参考，也将有助于相关疾病的早期诊断，对口腔疾病及全身性疾病的早期干预和临床治疗具有重要的指导意义。

（国家卫生健康委临床检验中心 陈玉清 李金明 编译）  
（DOI：10.3389/fcimb.2022.895261 IF：6.073）



## 人类猴痘的临床特征和疾病管理： 英国的一项回顾性观察研究

【据《Lancet Infectious Diseases》2022年5月报道】题：人类猴痘的临床特征和疾病管理：英国的一项回顾性观察研究（英国国家医疗服务体系严重后果传染病网络中心 作者Hugh Adler等）

猴痘是天花病毒的近亲，是一种罕见的疾病，被英国卫生安全局列为严重后果感染性疾病（high consequence infectious disease, HCID）。在本轮猴痘疫情暴发前，猴痘病例主要在非洲中部和西部地区散发。5月以来，罕见而不寻常的猴痘疫情在全球多个国家暴发，目前87个国家和地区报告超过31 800例猴痘病例。被美国批准用于治疗天花预防生物恐怖袭击的两种口服药物布林昔多福韦和特考韦瑞，已证明对动物猴痘有效。本文的研究目的为阐述高收入水平环境下猴痘病例的临床进程、病毒传播动力学，以及与布林昔多福韦和特考韦瑞治疗相关的不良事件。

本研究回顾分析了2018年8月15日至2021年9月10日期间在HCID中心住院的确诊猴痘的所有7例患者的临床数据。7例患者中4例男性，3例女性，4例患者在英国以外感染猴痘，3例在英国境内感染。所有患者都表现出了多形性皮肤病变（丘疹、小疱、脓疱、脐脓液、溃疡性病变和痂）和上呼吸道拭子检测到病毒DNA。

最初3例患者在出现皮疹7天后使用布林昔多福韦。但服药后均出现谷丙转氨酶升高，均未完成全程治疗。因此未观察到布林昔多福韦的临床益处。而且前4名患者均在45~48天后都完全康复。出院后出现了复发情况，其复发时间与其性生活时间重叠，后康复出院。2021年的家庭聚集性病例为父亲传染女儿，随后女儿传染其母亲，母亲接受了特考韦瑞的治疗，且在服药后48小时，来自血液和上呼吸道的样本猴痘病毒PCR阴

性，72小时时阴性，在特考韦瑞治疗24小时后未出现新的病变。

综上所述，虽然本研究的病例数较少，但提示在猴痘大规模暴发流行前，已有潜在的散发流行。布林昔多福韦治疗猴痘对临床的获益可能不大，特考韦瑞（tecovirimat）对临床治疗和病毒学反应更快，迫切需要对这种疾病的抗病毒药物进行前瞻性研究。上呼吸道拭子中病毒DNA脱落至少需要3周时间，上呼吸道拭子阳性和皮肤结痂病变时的传染性仍未确定，急需进一步深入研究。皮肤病变消退后上呼吸道病毒DNA长时间脱落，对当前的感染防控指导提出了挑战。生殖器或许为猴痘病毒的储存池造成猴痘的复发。

（首都医科大学附属北京同仁医院  
代芳芳 鲁辛辛 编译）

[DOI : 10.1016/S1473-3099 (22) 00228-6. IF : 71.421]

## 铜绿假单胞菌在慢性阻塞性肺疾病患者体内的持续感染和遗传适应性

【据《Clinical Microbiology and Infection》2022年2月报道】题：铜绿假单胞菌在慢性阻塞性肺疾病患者体内的持续感染和遗传适应性（丹麦哥本哈根大学医院 作者Josefin Eklöf等）

COPD患者痰标本中铜绿假单胞菌培养阳性占导致COPD因细菌性感染急性加重病例的20%，且其与COPD的发病和致死有明显相关性。本研究对入选丹麦随机对照试验的COPD急性加重患者在固定时间点培养的铜绿假单胞菌进行了全基因组测序研究，探究痰样本铜绿假单胞菌阳性后1年内COPD患者痰标本中复发铜绿假单胞菌的患病率及复发是否是由同一克隆菌株引起。

本研究纳入2018年1月至2020年1月间连续纳入丹麦四个大区医院的COPD患者，其下呼吸道标本铜绿假单胞菌培养阳性，且在过去12个月内，至少有2次既往病情加重，或1次需要住院或急诊入院，并接受全身泼尼松龙和（或）抗生素治疗。然后将患者按1:1随机分组，接受靶向抗铜绿假单胞菌抗生素治疗14天（访视第1天至第14天）或不接受抗生素治疗（对照组）。在基线（来访第1天）和预定来访第14、30、60、90、365天采集痰标本进行菌株培养，对培养出的菌株用质谱仪进行鉴定和全基因组测序分析。

结果对153株菌株（每个患者2~12株）进行了测序，19例患者（83%）反复出现铜绿假单胞菌，除1例患者外，所有患者均为同一克隆系。突变富集分析显示在抗生素耐药性和慢性感染中重要的基因突变更为频繁，提示适应性突变是正向选择的结果。

综上所述，本研究发现在COPD患者首次发现铜绿假单胞菌感染后，该菌株可携带较长时间并造成复发性感染。复发是由同一克隆系的持续存在引起的，并与遗传适应有关。因此本文的研究为临床应用抗生素根除COPD中铜绿假单胞菌的临床获益提供了依据。

（首都医科大学附属北京同仁医院  
代芳芳 鲁辛辛 编译）  
[DOI : 10.1016/j.cmi.2022.01.017. IF : 13.31]

## 多菌落抗真菌药敏试验检测临床念珠菌培养的多耐药性： 一项来自欧洲医学联合会真菌学中心的研究



【据《Clinical Microbiology and Infection》2022年4月报道】题：多菌落抗真菌药敏试验检测临床念珠菌培养的多耐药性：一项来自欧洲医学联合会真菌学中心的研究（奥地利因斯布鲁克医科大学卫生和医学微生物学研究所 作者Miriam A.Knoll等）

侵袭性念珠菌感染尤其对于免疫缺陷患者来说具有高死亡率和高发病率。随着耐药物种的增加，监测和检测抗真菌药物耐药性十分重要。多菌落试验（MCT）通常建议用于测定曲霉的抗真菌药敏试验（AFST）也可应用于念珠菌标本，研究其在宿主体内的基因多态性。本研究是将MCT应用于欧洲的一项前瞻性多中心研究中来评估常规无菌标本和念珠菌属中AFST的样本内方差，调查PR（polyresistance）的普遍性。本研究将PR定义为在不同的潜在耐药机制下同一种念珠菌培养的不同MIC。PR分为3个等级：strong PR（敏感度分类有差异且MIC相差3

个log<sub>2</sub>稀释度以上）；moderate PR（敏感度分类有差异且MIC相差将近3个log<sub>2</sub>稀释度）；weak PR（MIC相差3个log<sub>2</sub>稀释度以上但敏感度分类无差异）。

通过分别测试每个临床培养标本的5个不同菌落，研究其在分类相同的菌株中PR的频率（药敏结果分类具有差异或者相差3个log<sub>2</sub>稀释度以上时认为是PR）；对PR样本的AFST用EUCAST微量稀释法和Etest法进行重复；对强PR样本的5个菌落进行MLST基因分型分析。同一标本不同方法间检出率的差异用秩和检验McNemar test进行统计学分析；不同种类样本间检出率的差异用Pearson chi-square test进行统计学分析。

结果显示，经过MCT检测PR出现在8.1%（33/405）的样本中；PR在非白色念珠菌中的出现率高于白色念珠菌；强PR检测率为2%（8/405）而且在非白色念珠

菌中检出率高；基因分型结果显示PR是多方面导致的结果。

综上所述，MCT方法检测AFST时更容易发现低水平耐药；对PR的检测说明临床实践中常规药敏AFST结果是一个完全随机性的事件，PR才是真实药敏情况的展现；标准AFST可能无法检测到耐药性，可用MCT或改良接种等方法来代替。

（北京协和医学院中日友好临床医学院  
杨欣蕊 鲁炳怀 编译）

[DOI : 10.1016/j.cmi.2022.04.014. IF : 13.310]



## 定义 COVID-19 相关肺曲霉病的综述和荟萃分析

【据《Clinical Microbiology and Infection》2022年2月报道】题：定义COVID-19相关肺曲霉病的综述和荟萃分析（加拿大艾伯塔大学医学与病理学系诊断与应用微生物学部 作者Ruwandi M.Kariyawasam等）

肺曲霉病可能导致COVID-19复杂化，并导致重症监护病房（ICU）患者的死亡率过高。本文的目的是通过回顾COVID-19相关肺曲霉病（CAPA）的患病率、诊断、治疗和结果来比较研究其定义[疾病定义：通过提取患者级别的数据并根据四个研究定义（在本文以第一作者的名字命名：Koehler、Verweij、Bassetti和

White）重新分类患者来分析这些数据]。

该文纳入了1 52例入住ICU的COVID-19患者来进行队列研究。计算每项研究的CAPA流行率，并使用Freeman-Tukey随机效应方法汇总；使用DerSimonian-Laird随机效应荟萃分析测试作者报告并根据四个研究定义证明可能的CAPA患者的抗真菌治疗与死亡率之间的关联；此外，纳入生存荟萃分析，该研究需要接受治疗及未接受治疗的患者，并记录至少1例死亡和1例存活的患者；使用 $I^2$ 统计量测量所有荟萃分析中的异质性；使用Spearman等级相关性（r）评估诊断定义之间的一致性。

结果显示抗真菌治疗与生存之间关联的荟萃分析在不同研究中有所不同，但该关联没有达到统计学意义；没有足够的研究包括符合该荟萃分析的Bassetti定义的患者；在任何分析中都没有异质性（ $I^2=0%$ ）的迹象。综上所述，通过回顾性分析和荟萃分析总结出虽然各研究中的CAPA患病率很明显，但是在将4个定义统一标准后发生了很大变化，CAPA患病率可能被非标准定义夸大。

（北京协和医学院中日友好临床医学院  
杨欣蕊 鲁炳怀 编译）

[DOI : 10.1016/j.cmi.2022.01.027. IF : 13.310]

## 脑胶质瘤患者血清乳酸升高的相关因素

【据《Frontiers in Oncology》2022年5月报道】  
题：脑胶质瘤患者血清乳酸水平与血糖和肿瘤体积等多种因素有关（挪威科技大学 作者Beathe Sitter等）

神经胶质瘤（Glioma）是最常见的原发性脑瘤，世界卫生组织将神经胶质瘤根据其组织病理学和分子特征被分为四级。这种分级可以预测临床行为，是治疗决定的关键，其中最恶性的是多形性胶质母细胞瘤。血清乳酸被认为是脑肿瘤的恶性程度和临床预后的生物标志物。为了研究神经胶质瘤患者影响肿瘤治疗的相关因素与血清乳酸升高的关系，本研究共纳入261例经组织病理学证实的弥漫性胶质瘤患者。

研究人员收集患者的性别、年龄、健康状况、药

物治疗和术前肿瘤体积、根据Mr图像计算的最大直径肿瘤水肿、WHO分级、查尔森合并症指数（CCI），测定血清中的乳酸、葡萄糖、pH、血红蛋白量和碱剩余值。最后通过统计分析找寻上述因素与血清乳酸水平的相关性。研究者比较了血清乳酸水平升高和正常的患者，血清乳酸升高的患者血糖水平高于血清乳酸水平正常的患者，且肿瘤体积和肿瘤水肿存在差异，血清乳酸升高的患者肿瘤体积和肿瘤水肿均高于血清乳酸水平正常的患者。

研究者将所有变量之间的相关系数列出。结果表明血清乳酸、年龄、血糖、碱剩余值、肿瘤体积、肿瘤水肿、胶质瘤分级、卡诺夫斯基表现量表和使用

皮质类固醇治疗等变量与大部分变量均有相关性。血清乳酸水平与是否接受过皮质类固醇治疗呈中度相关性。性别和CCI与其他变量没有相关性，而是接受过皮质类固醇治疗与肿瘤体积和高血糖有相关性。

综上，血清乳酸升高的神经胶质瘤患者平均血糖更高，肿瘤平均体积和肿瘤水肿平均面积更大，接受过皮质类固醇治疗比例更大。多变量线性回归表明，性别、肿瘤体积、CCI、高血糖和皮质类固醇治疗与血清乳酸水平有关。

（中国医学科学院肿瘤医院 吴宇欣 崔巍 编译）

（DOI：10.3389/fonc.2022.831079.

IF：5.738）

## 血小板减少症患者血小板去唾液酸化与循环滤泡辅助性T细胞的关系研究

【据《Frontiers in Immunology》2022年4月报道】  
题：血小板减少症患者血小板去唾液酸化与循环滤泡辅助性T细胞的关系研究（福建医科大学附属协和医院 Yuwen Chen等）

血小板减少症是一种以血小板水平异常低为特征的疾病，包括免疫性血小板减少症（immunologic thrombocytopenic purpura, ITP）、再生障碍性贫血（aplastic anemia, AA）、白血病和骨髓增生异常综合征（myelodysplastic syndromes, MDS）等，严重的血小板减少症患者易发生自发性出血。ITP与抗血小板自身抗体的产生有关，可能增加血小板的破坏，损害血小板的产生。血小板表面覆盖着丰富的唾液酸，随着血小板在外周血中循环，唾液酸逐渐被唾液酸酶去除，这一过程被称为血小板去唾液酸化。T卵泡辅助细胞（T follicular helper, TFH）是CD4<sup>+</sup>T细胞的一个特殊子集，它提供相关的B-T细胞相互作用和细胞因子，TFH细胞的主要功能协助激活B细胞。TFH细胞对免疫系统的建立以及功能的完善非常重要，特别是针对感染疾病的体液免疫起决定性调节作用，同时在自身免

疫和肿瘤发生等相关疾病中也扮演重要角色。目前关于CXCL13和循环CXCR5<sup>+</sup>TFHs在血小板减少症患者中的作用的数据有限。

研究者主要采用流式细胞术，ELISA，WB等实验方法。通过ECL和RCA-I结合的测定表明，ITP患者的平均去唾液酸化血小板水平分别比健康志愿者高2.2倍和4.2倍；ROC分析表明ECL和RCA-I在ITP中较好的预后价值；Spearman相关分析表明，血小板去唾液酸化与血小板计数呈负相关，较高水平去唾液酸化血小板的ITP患者表现出显著较低的血小板计数；提示血小板去唾液酸化的存在可用作血小板减少症的潜在诊断和预后生物标志物。

通过流式细胞术测定结果表明，与健康对照（healthy control, HC）组相比，ITP患者的CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>TFHs和CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>PD1<sup>+</sup>TFHs均增加；携带抗血小板自身抗体的患者的TFH平均水平比没有自身抗体的患者高5.9倍；与正常对照组相比，MDS和AA患者的CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>TFHs和CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>PD1<sup>+</sup>TFHs显著升高；并且ITP、AA和MDS组之间的TFH水平

没有显著差异；提示TFHs的增多可能参与了ITP或非ITP血小板减少症的免疫发病机制。较高水平的去唾液酸化血小板与ITP患者外周血中更多的TFH频率相关；与HC组相比，ITP队列中的CXCL13水平显著增加了2.3倍，提示趋化因子CXCL13与ITP的发生密切相关；与HC组相比，ITP组的凋亡血小板水平显著增加了1.8倍；ITP患者的凋亡血小板水平与血小板计数显著相关。凋亡血小板水平越高，ITP队列中的血小板计数越低；细胞凋亡和去唾液酸化可能是血小板减少症患者血小板数量减少的原因。

综上所述，血小板减少症患者的血小板去唾液酸化和循环TFH异常增加；去唾液酸化血小板水平与TFH的增多呈正相关，与血小板计数呈负相关；血小板去唾液酸化的存在可作为血小板减少症的潜在诊断和预后生物标志物，并为血小板减少症患者提供了新的治疗靶点。

（中国医学科学院肿瘤医院 吴宇欣 崔巍 编译）

（DOI：10.3389/fimmu.2022.810620.

IF：8.786）

## 循环血小板结合中性粒细胞的基因特征与癌症患者的不良预后相关

【据《International Journal of Cancer》2022年2月报道】  
题：循环血小板结合中性粒细胞的基因特征与癌症患者的不良预后相关（法国里昂大学癌症研究中心 作者Pacôme Lecol等）

肿瘤相关中性粒细胞可能通过减弱抗肿瘤T细胞的反应，并刺激转移性肿瘤细胞的增殖和侵袭来协助肿瘤的转移。有研究表明循环中性粒细胞也可能导致癌症进展。循环中性粒细胞的一个亚群，称为低密度中性粒细胞（low density neutrophils, LDN），在癌症患者的血液中增多，并与较差的预后相关。此外，与正常密度中性粒细胞（normal density neutrophils, NDN）相比，LDN显示出促肿瘤中性粒细胞的特征，例如抑制T细胞的功能。血小板可以与循环白细胞结合，形成白细胞-血小板聚集体，增强其效应功能。在脓毒症中，与游离中性粒细胞相比，中性粒细胞-血小板聚集体（neutrophil-platelet aggregate, NPA）产生更多的中性粒细胞胞外陷阱（neutrophil extracellular traps, NETs），并显示出更强的吞噬功能和跨内皮迁移能力，因此促进中性粒细胞浸润到损伤部位并加剧各种疾病的病理性炎症。但迄今为止NPAs在癌症中的表征患者尚未被探索。

研究者收集了6例转移性非小细胞肺癌（non-small cell lung cancer, NSCLC）患者，以及与之年龄和性别匹配的健康献血者（healthy donor, HD）的全血于EDTA-抗凝管中；多光谱成像流式细胞术

（ImageStreamX, ISX）分析受试者的全血、正常密度中性粒细胞和低密度中性粒细胞；应用迈格吉（May-Grunwald Giemsa, MGG）染色法对全血的血涂片进行染色；研究者基于NSCLC患者和HD全白血细胞的单细胞转录组测序（Single-cell RNA sequencing, scRNA-seq）数据和TCGA转录组测序数据进行生信分析；使用了Wilcoxon秩和检验，多因素COX分析等统计方法。

研究者使用ISX成像，将来自NSCLC患者和HD的全血的CD15<sup>+</sup>CD14<sup>low</sup>中性粒细胞鉴定为NPA，NPA的CD36和ITGA2B染色呈双阳性；MGG染色可识别NSCLC患者全血涂片中的NPA；与HDs相比，NSCLC患者中每毫升血液中LDNs的绝对数量显著增加；从全血中分离LDN和NDN，使用ISX成像，可以从LDN样本，而非NDN样本中，可视化CD15<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>CD36<sup>+</sup>ITGA2B<sup>+</sup>CD62P<sup>+</sup>NPA。因此，血小板优先结合LDN，而不是癌症患者血液中的NDN。对scRNA数据集的所有白细胞进行重新聚类，并区分出六组中性粒细胞，中性粒细胞特征性标志物（包括CSF3R、CXCR2、FCGR3B）作证的聚类的准确性；Neu5簇似乎是与其他中性粒细胞簇不同，与血小板簇非常接近；Neu5高表达PLT相关特征性基因（包括PPBP、PF4、NRGN），Neu5中性粒细胞簇显示出血小板基因的高表达，很可能含有NPA。

对NPA相关的中性粒细胞特异性高表达的120个基因进行基因富集分析表明，中性粒细胞脱粒/趋化

相关生物过程、分泌颗粒相关细胞成分和跨内皮迁移相关的基因集显著富集。总的来说，NPA表现出增强的脱粒、趋化性和跨内皮迁移功能。对NPA和其他免疫细胞进行差异基因表达分析，找到16个非血小板NPA相关的中性粒细胞特异性基因，消除了由多种其他肿瘤相关细胞类型高度表达基因，最终产生由12个基因构成的NPA相关的中性粒细胞特征。没有发现NPA相关的中性粒细胞特征与肺鳞状细胞癌或肺腺癌的预后之间存在任何关联；然而，在胰腺癌患者以及肝细胞癌患者中，该特征与更差的无进展间期PFI和总生存期OS相关。传统的中性粒细胞特征并无法概括胰腺癌和肝细胞癌中如此重要的预后价值。

综上所述，研究人员通过结合ISX成像流式细胞术和对人类循环中性粒细胞公共单细胞转录组数据的分析，表明来自NPA的中性粒细胞代表了癌症患者中活化的中性粒细胞的一个独特亚群。与NDN相比，LDN优先参与NPA的形成。与NPA相关的中性粒细胞表现出增强的脱粒、趋化性和跨内皮迁移特征。特定的NPA相关中性粒细胞特征基因集与PAAD和LIHC癌症患者的预后较差有关。因此NPA可能具有临床实用性，可作为实体瘤癌症患者的新型非侵入性血液预后生物标志物。

（中国医学科学院肿瘤医院 吴宇欣 崔巍 编译）

（DOI：10.1002/ijc.33991.

IF：7.316）

## 内皮激活和应激指数（EASIX）评分 是弥漫性大B细胞淋巴瘤患者的独立预后因素

【据《BMC Cancer》2022年7月报道】题：内皮激活和应激指数（EASIX）评分是弥漫性大B细胞淋巴瘤患者的独立预后因素（韩国金州庆尚国立大学医学院庆尚国立本科医院内科血液学肿瘤科&昌原庆生国立大学医学院昌原医院健康科学研究所内科血液学和肿瘤学作者Sungwoo Park等）

弥漫性大B细胞淋巴瘤（DLBCL）是最常见的非霍奇金淋巴瘤（NHL），国际预后指数（IPI）仍然是目前DLBCL最可靠的预后工具，但它预测将经历特别严重疾病过程的能力有限。构成

EASIX的血小板计数、血清肌酐和乳酸脱氢酶（LDH）是为人所熟知的淋巴瘤预后因素。因此，本文作者进行了这项研究，以确定EASIX是否也可用于预测DLBCL患者的生存结果。

本研究回顾性分析了2004年1月7日至2020年3月5日期间265例DLBCL患者的医疗记录。EASIX使用以下公式计算： $LDH(U/L) \times 肌酐(mg/dl) / 血小板计数(10^9/L)$ 。使用ECOG量表，Lugano分类标准，PET-CT检查，CTCAE v5.0毒性量表等来进行研究。卡方检验，Kaplan-Meier，ROC工作特

性曲线，单变量分析和logrank检验，Cox比例风险回归模型多变量分析等方法进行数据处理。计算Harrell的c指数来评估和比较模型的预测性能。

结果显示，患者年龄中位数为64岁（范围为21~88岁），148例患者（55.8%）为男性，124例患者（46.7%）表现为中高或高危IPI。低EASIX组的完全缓解率（CR）高于高EASIX组。在对除淋巴瘤进展外未提前停止治疗的患者进行的亚组分析中也是如此。在57个月的中位随访期中，低和高EASIX组之间的五年无进展生存率（PFS）（67.9% vs 31.6%）

和五年总生存率（OS）（70.6% vs 34.3%）发生率存在显著差异（ $P < 0.001$ ）。

在单变量分析中，有无慢性肾脏疾病及指数评分的高低与OS和PFS显著相关。在多变量分析中，国际预后指数和本文的指数评分是重要的预后因素。在包括IPI、修订IPI或NCCN IPI的Cox回归模型中，Harrell的c指数分别为0.73、0.74和0.73。根据基线疾病特征，在大多数亚组中，OS结果偏向于低EASIX组。基于基线时的疾病特征，OS结果有利于大多数亚组中的低EASIX组。高和低EASIX组在血液学毒性

等级的发生率方面显示出显著差异，两组治疗相关死亡率无显著差异。

本研究评估了EASIX对新诊断DLBCL患者的预后价值。诊断时具有高EASIX值的患者的生存结果明显较差，并且显示出比那些具有低EASIX价值的患者更严重的毒性。因此，EASIX可能是新诊断DLBCL患者生存结果的潜在预测因子，其有效性应通过外部验证队列进行确认。

（哈尔滨医科大学第四附属医院  
刘旭 姜晓峰 编译）

（DOI：10.1186/s12885-022-09915-4 IF：4.6382）

## 超级增强子超突变有望成为B细胞淋巴瘤基因治疗新靶点

【据《Nature》2022年7月报道】题：超级增强子超突变改变B细胞淋巴瘤中的癌基因表达（美国哥伦比亚大学作者Elodie Bal等）

弥漫性大B细胞淋巴瘤（DLBCL）是最常见的B细胞非霍奇金淋巴瘤，因为大约40%的患者无法通过现有的免疫化疗方案治愈。基因表达谱已经确定了DLBCL的2个主要亚组——生发中心B细胞样DLBCL（GCB-DLBCL）和预后较差的活化B细胞样DLBCL（ABC-DLBCL）。尽管单个DLBCL亚型与临床结果的关联表明该分类具有临床相关性，但并非所有患者都可以分类，并且该分类是基于对仅占基因组2%~3%的编码区的分析。因此，致病相关性的进一步遗传复杂性可能存在于基因组的非编码调控部分。新出现的证据表明，非编码区域，特别是那些参与转录调控的区域，可能会反复发生突变，从而导致肿瘤发生的功能后果。最近的证据表明，包括超级增强子（SE）在内的非编码区可能会在DLBCL中发生突变活动。

为了探究全基因组层面上活性增强子/超级增强子（E/SE）是否受DLBCL中功能相关的复发突变的影响。作者团队应用了染色质免疫沉淀和H3K27Ac ChIP-seq分析在代

表主要的29个DLBCL细胞源亚型（20 GCB-DLBCL和9 ABC-DLBCL）和两个独立的正常生发中心（GC）B细胞池，使用ROSE算法进行了活性E/SEs的全基因组鉴定，使用FishHook在93例DLBCL病例的WGS数据中对复发性突变热点进行了无偏搜索。具有匹配的正常DNA的denovo DLBCL用于识别反复突变的E/SE。然后使用包含WGS数据的150例原发病例和具有靶向Sanger测序数据的169例原发病例的独立扩展小组来确认BCL6-iSE、BCL2-SE和CXCR4-SE。

结果显示，共发现35 697个经典增强子和3 775个SE，约97%在原发性DLBCL中。以这3 775个活性SE为基础进行无监督层次聚类，通过将GCB-DLBCL从ABC-DLBCL中分离出来，部分再现了原始细胞来源分类。这表明E/SEs的活性可反映肿瘤的表型异质性。经典胞苷脱氨酶（AID）特征在SE区域显著且优先富集（ $q < 0.0001$ ，BH校正的Wilcoxon秩和检验），证实AID介导的体细胞超突变（SHM）是潜在机制。在每个细胞系中，大约2%的活性SE SHM的影响，与基因组其余部分的背景突变率相比，突变频率显著更高（ $q < 0.05$ ，BH校正的 $\chi^2$ 检验）。相比之下，仅有一小部分经典增强子在少数细胞系中发生了超突变（平均

0.15%；范围，0.01%~1.5%； $q < 0.001$ ，BH校正的Wilcoxon秩和检验），表明SE是引起这些区域超突变的关键因素。

进一步分析发现，与经典增强子或同一样本中的突变背景相比，SE区域呈现出显著更高的突变负荷。值得注意的是，排除与IG基因座相关性，仍有92%的原发性DLBCL病例包含至少2个超突变的SE。SE是SHM的优先发生区，几乎在所有DLBCL中都代表主要的突变靶点，而这种SE的超突变主要是AID活性引起的。SHM涉及的SE与GCB-DLBCL和ABC-DLBCL亚型发病机制有潜在联系的基因和相关通路存在关联。

为了确定SE SHM是否具有功能性后果，作者重点选取了部分反复发生超突变的SE，这些SE与对DLBCL发病机制明确相关的基因有关。BCL6基因编码GC发育所需的转录抑制因

子，并参与DLBCL相关的致癌染色体易位，是SE SHM最常见的靶点，在超过5个病例中有4个不同的SEs发生超突变。在对BCL6基因内的SE（iSE）进行扫描以精确定位潜在功能变异的反复突变热点时，在所有分析的病例中，第776、779和780位核苷酸的突变率分别为4.9%、3.4%和10.2%，而这三个位置在正常记忆B细胞中以极低的频率发生突变，表明这些事件的肿瘤特异性选择。

对于BCL6-iSE热点突变导致BCL6表达失控的机制，作者发现，BCL6-iSE是BLIMP1在体内结合的生理位点，该结合被DLBCL相关的BCL6-iSE SHM破坏后导致BCL6表达失调。此外，SE的突变可能使NR3C1无法结合而导致BCL2转录失调。BCL2基因内SE被确定为超突变的第二个靶点，突变阻止了糖皮质激素受体NR3C1对BCL2的

转录抑制，同时NR3C1失活的主要功能之一实际上可能是释放BCL2转录。在BCL2易位的病例中，NR3C1结合位点突变的频繁发生也支持了这样的猜想。

还有一种复发性超突变与CXCR4基因有关，NR3C1是CXCR4的负调控因子，在GCB-DLBCL亚型中，SE热点突变可能阻止与GCB-DLBCL亚型相关的亮区突变，这与其在GC暗区的特异表达一致下调。CXCR4-SE突变通过降低其与NR3C1的结合亲和力解除对基因转录的调控。

本研究在全基因组范围内研究活性增强子和超级增强子是否受到弥漫性大B细胞淋巴瘤中功能相关复发突变的影响。在大多数这些肿瘤中，超级增强子大多是AID介导的超突变的主要靶点。与原癌基因相关的特异复发性超级增强子突变导致了原癌基因逃避转录调控，并且为维持转化表型所必需，同时超级增强子突变具有致癌依赖性。本研究揭示了一个新的基因改变，这一改变将可以用于识别已知和新癌基因的失调机制，确定了新的基因治疗靶点，对DLBCL的精确分类和靶向治疗具有重要意义。

（哈尔滨医科大学第四附属医院  
张心宇 姜晓峰 编译）

（DOI：10.1038/s41586-022-04906-8 IF：69.5026）



医学参考报检验医学专刊长期合作伙伴

