海外学人

2015 年特刊 ISSN: 1556-861X

生物医药专刊

中國旅美科技協會
Chinese Association for Science and Technology, USA (CAST-USA)
www.cast-usa.net

中国旅美科技协会名誉顾问

杨振宁　清华大学教授、诺贝尔奖获得者
周光召　中国科协名誉主席、中国科学院前院长
朱丽兰　中国科学技术部前部长
邓文中　美国工程院院士、美国林同琰国际公司董事长
路甬祥　中国科学院前院长、全国人大常委会副委员长
宋　健　中国工程院前院长、全国政协前副主席
陈香梅　美国国际合作委员会主席

中国旅美科技协会机构与主要负责人

执行委员会主席	董事会主席	理事会主席	候任会长
宋云明	于　浩	蔡逸强	陈志雄

总会负责人

杨晓梅　行政事务
王行宇　行政事务
万　乐　组织发展
焦德泉　组织建设和发展
谢长春　组织建设和发展
贾鹏程　组织建设和发展
徐惠平　组织建设和发展
尧圆明　组织建设和发展
郭旭光　对外交流和发展
蒋为民　对外交流和发展
郭　梁　对外交流和发展
程晓红　对外交流和发展
黄　雷　对外交流和发展
张　宣　法律顾问
陆　强　《海外学人》主编
潘星华　学术交流、发展和刊物出版
肖继忠　学术交流、发展和刊物出版
郭　光　新闻通讯，刊物出版
颜为民　学术交流、发展和刊物出版
于　娜　学术交流、发展和刊物出版
陈鸿云　学术交流、发展和刊物出版
蔡路凯　科技创新和学术成果转化
彭　伟　科技创新和学术成果转化
汤　斌　科技创新和学术成果转化
郭　勇　科技创新和学术成果转化
向　凌　科技创新和学术成果转化
易　飞　科技创新和学术成果转化
张晓宇　科技创新和学术成果转化
曾大军　技术顾问

海外学人
Overseas Scholars

OVERSEAS SCHOLARS

2015 年生物医药专刊

ISSN: 1556-861X

本期责任编辑：潘星华 蔡逸强 彭 伟
马 超

发 行 人：曾大军

《海外学人》编辑部

名 誉 主 编：王飞跃
主 编：陆 强
执 行 主 编：郭 光
顾 问：胡 晖
编 辑：盛晓明 蔡逸强 陈志雄
王志梁
美 术/摄 影：徐 珺
公 共 关 系：蒋为民
专刊审稿人：吴湘玥 胡志伟 庄守纲
陈 新 李爱荣
排版图文设计：王卫红 刘语焉

杂志主办

中国旅美科技协会
Chinese Association for Science and Technology, USA (CAST-USA)
www.cast-usa.net

U.S.A.

中国旅美科技协会简介

中国旅美科技协会（旅美科协）是 1992 年夏在纽约成立的非政治性，非盈利性的民间团体。旅美科协的宗旨是促进中美之间文化、科技、教育、经贸等领域的合作与发展；弘扬中国传统文化，促进中美两国人民的相互了解；促进旅美学人、华人专业人士之间的团结、合作与交流。

旅美科协是一个跨地区（美国）、跨行业的综合性科技团体，会员主要由来自科技、文教、工程、法律、金融、人文等各个领域的中国旅美专业人士组成，现有会员八千人。许多会员是在世界 500 强跨国企业或美国知名大公司、高等院校或研究机构从事科技开发、研究工作，部分会员已经成为了中、高层管理人员。目前在全美有十余个分会及学会，会员分布在几十个州，并在中国国内几个大城市设立了联络处。总会设执行委员会负责日常工作，还设有董事会、理事会、专业学术协调委员会和顾问委员会。旅美科协成立以来的知名名誉顾问包括陈省身教授，宋健教授，杨振宁教授，朱光亚教授，陈香梅女士，田长霖教授，周光召教授，朱丽兰教授等学术及社会知名人士。

旅美科协总会及各分会举行定期学术研讨活动，为会员提供学术交流的平台。旅美科协总会定期出版《海外学人》杂志及实时通讯，杂志及实时通讯内容包括介绍协会的学术活动与中美科技界、工商界的最新动态及各种工作与投资机会等许多会员们切身关心的内容。

每年总会及各分会举办包括全国年会及分会年会、学术讲座等在内的几十次大中型学术研讨活动，活动中旅美科协邀请中美各界知名人士对会员所关心的学术及社会问题进行了探讨。旅美科协注重与其他专业协会的交流与合作，加强不同学科华人的交流，同时促进中美之间科技人才的沟通和科技的发展。旅美科协各分会也注重参加当地的华人社区活动，与所在地的其它侨团建立了良好的关系。

旅美科协总会现任会长宋云明，董事会主席于浩，理事会主席蔡逸强，候任会长陈志雄。旅美科协历任会长为周华康、章球、徐震春、陆重庆、马启元、周孟初、谢家叶、肖水根、石宏、邹有所、林民跃、王飞跃、李百炼、左力、沈陆、陆强、曾大军、方彤、盛晓明、蔡逸强、于浩。

Table of Content

1 生命科学世纪的曙光

—《海外学人—生物医学专刊》第四期出版前言…潘星华 马超 彭伟 蔡逸强

3 医学遗传专科的发展及其对医疗保健的影响……李培宁

11 基因组学对肺癌诊断及治疗的影响……姜结根 高基民

17 荧光原位杂交(FISH)技术在早期肺癌检测中的应用……代建丽 吴萍

23 Epsins：肿瘤相关的重要内吞接头蛋白调节子……紀卫东 王敏

29 ADAMTS 在关节炎中的作用 ……蔚建鲁 刘传聚

36 盐传感激酶——血清和糖皮质激素诱导的蛋白激酶 1 及其介导的致病性 Th17 细胞发育……吴船 王超 张雪莉

44 神经炎症与阿尔茨海默病……汪怀山 张建民

50 IgA 肾病遗传学研究进展……余学清 李明

57 人脑组织库建设与神经科学研究……仇文颖 黄越 盖卫平 严小新 马超

62 QOE：新型生物信息数据挖掘工具……冀开元 马文丽 郑文岭

70 软组织肿瘤的分类……刘婷

73 杜氏进行性肌营养不良的基因治疗前景……王冰

生命科学世纪的曙光

——《海外学人—生物医药专刊》 第四期　出版前言

潘星华　马超　彭伟　蔡逸强

二十世纪后期人们热烈期望的生命科学世纪已经开始了 14 年。今天，生命科学确实深刻地改变了人类生活的各个方面，从生命的诞生、出生、疾病、食品、药品到死亡的每一个领域的研究成果都直接使人们受益，大大促进了健康和长寿。生命科学还是现代科学的生长点和龙头。生命科学近年广泛发展和应用的芯片和深度测序以及相关的大数据分析促进了数学的发展，例如单细胞测序技术促进了数据噪音处理和客观敏感的分层分析；先进仪器的使用，如微流控技术，芯片和测序都离不开先进物理材料和精准的自动控制；化学更是生命科学的基础；胚胎植入前和产前基因筛查/诊断对健康的预测为社会伦理学和保险业带来新的规范；生物制药、生物治疗、基因诊断和基于疾病遗传基础的个体化治疗也成为医学发展和经济增长的热点。

生命科学专刊第四期继承之前一、二、三期的传统，将着重讨论生命科学最新进展， 及其在临床医学中的应用。

基因组学的突破性成就对临床医学产生了不可估量的影响， 产生了基因组医学、 P4 医学(预测性 Predictive 、预防性 Preventive 、个体化 Personalized 、参与性 Participatory)等新学科和新概念。这里收录了 3 篇综述。在基因组学成果的应用方面，耶鲁大学医学院分子细胞遗传学和基因组学实验室主任李培宁副教授从专业发展的角度概括了新形势下美国医学遗传专科人员的发展培训途径、基地的设置、技能要求、相关的政策规范和科技服务范围等的最新情况，特别介绍了在遗传病诊断预防和治疗、和基因组医学和个性化医学研究和应用中所发挥的作用，对拟从事本专业的人员具有重要指导意义，对其他读者也提供了有益的借鉴。 加州 Genoptix 医学实验室资深血液病理医师姜结根博士和现任职于温州大学的海归教授高基明博士以其自身的商业实验室和其学术研究经验，以肺癌为例分享了基因组学研究成果在病人的早期诊断、预后分析和指导个性化治疗中的应用经验和见解，读者可以看到美国基因诊断的应用情况。从犹他大学医学院海归的华中科技大学同济医学院病理生理系吴萍教授等介绍了荧光原位杂交(FISH)技术 检测肺癌 DNA 微小突变在肺癌早期筛查的应用。这些检测通过疾病早期发现和诊断都能有效提高患者的生存率和生存质量。

生命科学基础理论研究是临床应用的前提，许多领域近年获得了巨大的发展。我们生物医学专刊将陆续介绍部分研究成果，本期包括 5 篇论文。耶鲁大学教授-中山大学海归王敏教授等是 Epsins 研究专家。他的综述专门介绍 Epsins 作为癌症形成和发展中的重要内吞接头蛋白调节子的作用-促进瘤细胞增殖、迁移和侵袭， 并提出特异性抑制 Epsins 表达可作为肿瘤治疗的靶向干预的一种新的策略。纽约大学医学院刘传聚教授在含 I 型血小板蛋白结合基序的解聚蛋白样金属蛋白酶 (ADAMTS)家族研究方面有独特原创发现。ADAMTS 的异常调节和突变可导致多种疾病的发生发展，如炎症、肿瘤、关节炎和动脉粥样硬化等；刘教授重点综述了 ADAMTS 的结构及其在关节炎中的作用。哈佛大学研究员吴船博士等介绍了他本人的最新发现：盐传感激酶-血清和糖皮质激素诱导的蛋白激酶 1(SGK1)是诱导 IL-23R 信号通路下游的主要激酶，能够介导的致病性辅助型 T 细胞 17(Th17)细胞发育。Th17 是一种新近发现的 T 细胞亚型，在机体防御真菌感染和细胞外病原体的过程中都发挥着广泛作用，在多种自身免疫性疾病的诱发过程中也充当着重要的角色， 近年来风靡一时。作者提出 SGK1 可作为诱导病原性 Th17 细胞的分化从而促进自身免疫发展的一个重要靶点，从而在自身免疫病的治疗中将有应用前景。从霍普金斯大学助理教授海归协和医科大学的张建民教授等结合自己的研究，介绍了 阿尔茨海默病（AD）的最新研究进展。AD 是

一种最常见的神经退行性疾病，主要表现为进行性记忆减退和认知功能障碍， 海外学人生物医学专刊第一期曾介绍其诊断和治疗，本文则重点综述了 AD 的分子机制。中山大学附属第一医院副院长余学清长江学者教授在 IgA 肾病全基因组关联分析(GWAS)研究方面取得了重要成果，在综述中介绍了 IgA 肾病遗传学研究最新进展，并指出了新的具有重要的科学指导意义和临床实用价值发展方向。GWAS 是一种广泛应用的遗传学分析技术，硕果累累，可参看海外学人生物医学专刊第三期的报告，所以，本文也有比较普遍性的指导意义。

本期还特别奉献有关专家关于大型组织库、新型生物信息学工具、软组织肿瘤的最新分类和杜氏进行性肌营养不良的基因治疗的进展和展望的 4 篇综述。从耶鲁大学海归北京协和医学院的马超教授及其合作伙伴介绍了其参与组织筹备成立“中国人脑组织库协作联盟”，并拟订《中国人脑组织库标准化操作方案》的情况，这一努力将为中国神经科学基础与临床研究提供新的资源和动力。美国海归广州南方医科大学的马文丽、郑文岭教授等介绍了一种新型生物信息数据挖掘工具 Qlucore Omics Explorer(QOE)。 QQE 是一款新的生物信息分析软件，可用于快速分析基因表达、基因芯片、实时 PCR 以及 DNA 甲基化等多种生物学数据。本文对 QOE 的功能和特点做了介绍，并分析了 QOE 的应用前景。犹他大学医学院临床病理医生刘婷副教授专攻各器官肿瘤诊断。软组织肿瘤为一组非常见疾病，对疾病的认识无论对于病人或者医生都是一种挑战。刘教授介绍了软组织肿瘤的最新分类进展，将对于病人或医生有所帮助。现任职于美国匹兹堡大学医学院、担任分子治疗生物学实验室主任的王冰副教授介绍了杜氏进行性肌营养不良疾病的分子基础和目前在基因治疗方面的进展和将来的前景。基因治疗是基因组学研究成果基础上的一个应用。DMD 的基因治疗也为基因组学促进人类健康的承诺提供了一个缩影。

中国留美学者中，生命科学和医学领域占有很大的比例，他们中的许多人获得了公认的科学成就和崇高的学术荣誉，在北美甚至全球生物医学界也有重要影响， 对其所在的专业有独到的见解。这些科学家要申请基金等繁忙研究工作之中积极供稿，但是由于时间和本期篇幅有限，还有一批非常优秀的成就未来得完稿及收入，将会在以后陆续发表。各位作者介绍的各个不同领域的前沿图景确使我们见一叶而知秋，也从一个侧面展示了中国海外学人的风采，体会生命科学的激情脉动。

最后， 借此机会感谢所有的应邀作者、《海外学人》杂志编委会，及应邀审稿专家共同的努力和辛勤的工作。正是所有美中两地的朋友们的同心协力、无私奉献、才使得本刊能够顺利出版。同时也希望有更多的朋友继续对生物医学专刊的出版给予大力的支持！

医学遗传专科的发展及其对医疗保健的影响

The Development of Medical Genetics Specialty and its Impacts on Health Care

李培宁

（分子细胞遗传学和基因组学实验室, 耶鲁大学医学院遗传学系, 纽黑文, 康涅狄格州 06520）
Peining Li, PhD, FACMG
Molecular Cytogenetics and Genomics Laboratory,
Department of Genetics, Yale School of Medicine New Haven, CT 06520

Abstract

The accumulated knowledge of human medical genetics and the increased demands for the diagnosis, prevention and treatment of genetic diseases led to the birth of a new medical specialty—medical genetics. Since 1980s, the American Board of Medical Genetics has developed the training programs and the American College of Medical Genetics has established many policies, guidelines and standards. In this report, firstly, the organization of medical genetics training programs, the educational credentials and the core competencies for trainees and the status quo of certified specialists in medical genetics are outlined. Then, the process of making medical genetics policies, guidelines and standards and the current administrative management of diagnostic genetics laboratories are briefly introduced. Furthermore, the impacts of medical genetics specialty on the diagnosis, prevention and treatment of genetic diseases, the translational research for genetic and genomic medicine and personalized medicine, and promoting genetics education for other non-genetics medical professionals and improving genetics literacy for general public are summarized. The development of medical genetics specialty in the United States has been a successful model for building a strategic and perspective new medical field on the basis of research and educational progresses. It severs as a value reference not only for the further direction of medical genetics in China but also for the development of knowledge-based economy in the information era.

摘要

人类医学遗传知识的积累以及对遗传性疾病的诊断预防和治疗的需求催生了医学遗传这一全新的医学专科。从 1980 年代起，美国医学遗传资质委员会启动了医学遗传专科，同时美国医学遗传学会制定了遗传医学相关政策规范和标准。本文将首先概述美国医学遗传专科的专业和培训基地的设置、对受训人员教育资格和专业核心技能的要求以及现有专业人才的组成和数量，然后简要地介绍遗传医学专业服务政策规范标准的制定过程和遗传诊断实验室的行政监管，以及医学遗传专业人员在遗传病诊断预防和治疗、转化遗传和基因组医学和个性化医学研究、对其他非遗传医学从业人员和社会公众进行遗传病知识教育和普及中发挥的作用。美国医学遗传专科的发展已经成为在教育科研基础之上建立战略性前瞻型的新型医学领域的成功范例，它不仅对中国医学遗传面临的问题和发展方向具有重要的借鉴价值，同时也对信息化时代知识经济的发展提供一个参考模式。

前言

医学遗传学和基因组学是研究人类遗传性疾病的发病机理及其预防治疗手段的专业学科。 自从 1953 年 James Watson 和 Francis Crick 发现 DNA 双螺旋结构后， 分子生物学和分子遗传学知识的积累和技术的进步加速了对遗传性疾病的染色体变异、基因突变、和代谢异常的研究。 从 1966 年至今由 Victor MuKusick 及其在约翰霍普金斯大学医学院

的团队系统性地汇总编制各种类型遗传性疾病目录，到 2014 年 4 月在线版人类孟德尔遗传（Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM, www.omim.org）已经收录 4092 种已知分子机理和相关表型的遗传性疾病和 1707 种具有表型描述但分子机理未知的遗传性疾病。 从事遗传学研究的医学工作者充分认识到遗传缺陷是造成人类器官系统发育障碍的重要病因和各种肿瘤的驱动和诱发因素，从而开始建立以人类基因及其载体染色体作为诊断、预防、及治疗对象的医学遗传专科[1]。 1980 年，由医学遗传专家组成的美国医学遗传资质委员会（ABMG, American Board of Medical Genetics, www.abmg.org）启动了医学遗传专业的设置和培训计划，由资质委员会认可的培训基地逐渐在美国主要医学院校中组建并实施。医学遗传专科包括面向病患的临床遗传专业和从事实验诊断的细胞遗传、分子遗传、和生化遗传专业，临床遗传是为具有从医资质的医生设置的专科住院医（residence)训练，考虑到遗传诊断技术的复杂性，细胞遗传、分子遗传、和生化遗传专业除了吸收具有从医资格的医生之外也招收具有人类遗传和分子生物学博士学位的学员（fellow)。1991 年， 美国医学专科委员会 (ABMS, American Board of Medical Specialties, www.abms.org) 认可临床遗传作为新的医学专科， 同年成立的美国医学遗传学会（ACMG, American College of Medical Genetics, www.acmg.net) 成为制定临床遗传政策标准和相关实践规范的主导机构。 经过 20 多年的努力，美国医学遗传资质委员会和医学遗传学会共同建立起了严格的医学遗传专业培训和资质认证体系，培养了一批高质量的医学遗传专业人才， 并且提供了完善及时的诊断治疗规范[2,3]。本文将提供美国医学遗传专业训练原则和专业人才组成的概述，并进一步分析医学遗传专科对现行医疗保健服务以及未来个性化医学的作用和影响。美国医学遗传专科是以教育科研为基础发展新型专业化医学领域的一个成功范例，对于推动中国医学遗传事业的发展具有重要的示范参考效应。

医学遗传专科培训和资质认证体系

一、 医学遗传专科的专业设置和培训基地

为了满足临床服务对遗传病诊断、预防和治疗的需求以及在转化遗传和基因组医学研究中对专业人才的要求，美国医学遗传资质委员会在医学遗传专科中设立了临床遗传、细胞遗传、分子遗传和生化遗传专业，同时也与美国病理资质委员会 (American Board of Pathology) 联合设立了临床生化遗传专业和分子遗传病理专业。临床遗传专业面向具有儿科、妇产科、内科、肿瘤科等行医资格的医生，临床生化遗传和分子遗传病理专业面向具有病理专科资格的的医生。主要从事实验室诊断的细胞遗传、分子遗传和生化遗传专业既面向医生，也吸收具有人类遗传学和分子生物学博士学位的学员。截至 2012 年 6 月，获得美国医学遗传学资质委员会认可的培训基地包括 49 个临床遗传专业培训单位、29 个生化遗传专业培训单位、44 个细胞遗传专业培训单位和 39 个分子遗传专业培训单位， 所有经认证的培训基地均是设在医学院的遗传系、病理系或其他临床科系中， 每一个专业都需两年全日制的住院医师训练或专业博士后训练，选择第二专业的需要额外增加一年的全职训练。每个培训单位都必备培训手册以概括相关专业技能要求和考核流程，受训医师和学员通过对大量具体临床案例的学习来了解各种遗传性疾病的表型、诊断方法和预防治疗手段，且需将其中的 150 例具有专业代表性的遗传异常案例呈送资质委员会的专家用于评估专业训练的深度和广度，评估合格者方能获得参加资质考试的资格，资质考试每两年举行一次，通过考试的医师和学员即成为具有专业证书的医学遗传专家。值得一提的是，作为临床遗传医师助理的遗传咨询师需要具有硕士学历并且经过专业资质训练，美国遗传咨询资质委员会（ABGC, American Board of Genetic Counseling, www.abgc.net) 有 31 个认可的遗传咨询师培训单位。在加拿大也建有类似医学遗传专科和遗传咨询师的专业设置和培训体系（www.ccmg-ccmg.org) 。

二、 医学遗传专业培训原则和核心技能

和其它医学专科一样，医学遗传专科培训的原则着重于对六项核心能力的培养： 1） 专业性 -- 具备专业责任感、坚守职业道德、保持对各类患者的敏感、真诚和同情心；2)护理治疗技能 -- 能够提供适当和有效的治疗以促进健康；3） 医学知识 - 充分了解现有的以及不断更新的临床生物医学等相关科学知识并应用在病人治疗中；4） 基于实践的学习与改进能力 -- 能够评估病人的诊疗措施是否得当并依据科学证据来提高诊疗水平；5） 人际关系与沟通技巧 -- 具备良好的沟通交流能力来达成与病人、家属和其它专业人员的有效医疗合作；6） 基于系统的实践能力 -- 了解医疗卫生保健系统的构成并通过对系统资源的应用提供最佳的诊断和治疗服务。

美国医学遗传学会的专家组和欧洲人类遗传学协会教育委员会总结报告了对医学遗传医师总体能力和专业核心技能的训练要求[4,5]。临床遗传医师的总体能力包括：1） 通过对病人体征病史和家族史的了解来评估诊断遗传性疾病；2）确定需要进行的具体遗传检测项目、解释检测结果、并制定相应的治疗和咨询方案； 3） 整合各项遗传诊断结果、家族史和其它相关信息为家族成员提供遗传风险的量化分析；4）为遗传病患者或可能患病的亲属提供正确的相关遗传病知识；5）运用遗传学知识制定和实施治疗和预防方案； 6） 参与和评判遗传和基因组相关的转化医学研究和临床试验； 7） 将公共卫生核心知识应用于遗传病人治疗和护理；8）对病人护理治疗中的伦理问题保持敏感和谨慎；9）对基因组测序和外显子组测序的临床应用及诊断结果提供正确的解释和咨询。具有特定专科背景的临床遗传医师应该充分了解与自己专科相关的生化/代谢、癌症、心血管肝肺肾脏疾病、耳聋、先天性畸形和缺陷以及结缔组织、皮肤、内分泌、胃肠道、血液、免疫、神经、眼科、产前/生殖、骨骼和精神各器官系统等的遗传传疾病。

临床分子遗传、细胞遗传、和生化遗传诊断实验室专家的专业核心技能力包括： 1） 充分掌握和了解本专业相关遗传诊断实验的原理、方法和质量监控程序； 2） 监督诊断实验流程、指导技术员实验技能、不断改进诊断质量和效率； 3）全面深入掌握相应专业领域涉及的遗传多态性、家族遗传规律、病因病理临床表现和预防治疗手段；4） 提供正确的结果分析和诊断报告，并为临床遗传医师或其它医护保健人员提供后续诊断和治疗建议；5)参加遗传病的临床研究并追踪引进新的遗传诊断方法。

三、 医学遗传专业人才的组成和数量

从 1991 年医学专科的正式确认到 2011 年这二十多年间， 美国医学遗传资质委员会总计认证了 1,419 名临床遗传医师、295 名临床生化遗传专家、687 名临床细胞遗传专家和 536 名临床分子遗传专家，此外，还有 3,026 名由遗传咨询资质委员会认证的遗传咨询师。临床遗传医师、遗传实验室诊断专家、和遗传咨询师的比例大致为 1：1：2。以 3.12 亿美国总人口规模估算，在平均 22.3 万人中有一个临床遗传医师、一个遗传实验室诊断专家、和二个遗传咨询师。经过二十多年的努力建立起来的这支资质完备专业明确的医学遗传队伍承担了美国对遗传性疾病的临床诊断预防和治疗服务、对专业培训基地的教学任务及遗传病知识的咨询普及、和对遗传和基因组转化医学研究的参与和评估。在美国 49 个资质认可的医学遗传培训基地中，根据训练专业和规模每个基地大概有 6 至 12 名具备资质的临床遗传医师和遗传诊断专家，据此估计大约 10%-20%具有资质认证的医学遗传专家工作在医学院校中成为医学遗传服务、教学和科研的主要驱动力量。据北美华人遗传学会统计，2%的临床遗传医师、5%的生化遗传专家、7%的细胞遗传专家和 10%的分子遗传专家为华裔和留美中国学者[3]。

遗传和基因组医学的作用和影响

一、医学遗传和基因组服务的专业规范和行政监管

美国医学遗传服务的规范和监管体系由双轨纵向交互的医学遗传学会和资质委员会管理机制和三层横向平行的联邦法规、公共卫生部门和病理学会的监管机制构成(图 1)。美国医学遗传学会是遗传和基因组医学服务政策(Policies)和公告(Statements)的起草者也是专业规范(Guidelines)和标准(Standards)的制定者。通常由学会组织专家委员会负责拟定初稿，然后交由同行复议修改，定稿的政策、公告、规范和标准将发表在学会专业期刊 (Genetics in Medicine) 或在线存档在学会网站上。从 1995 年到 2013 年，美国

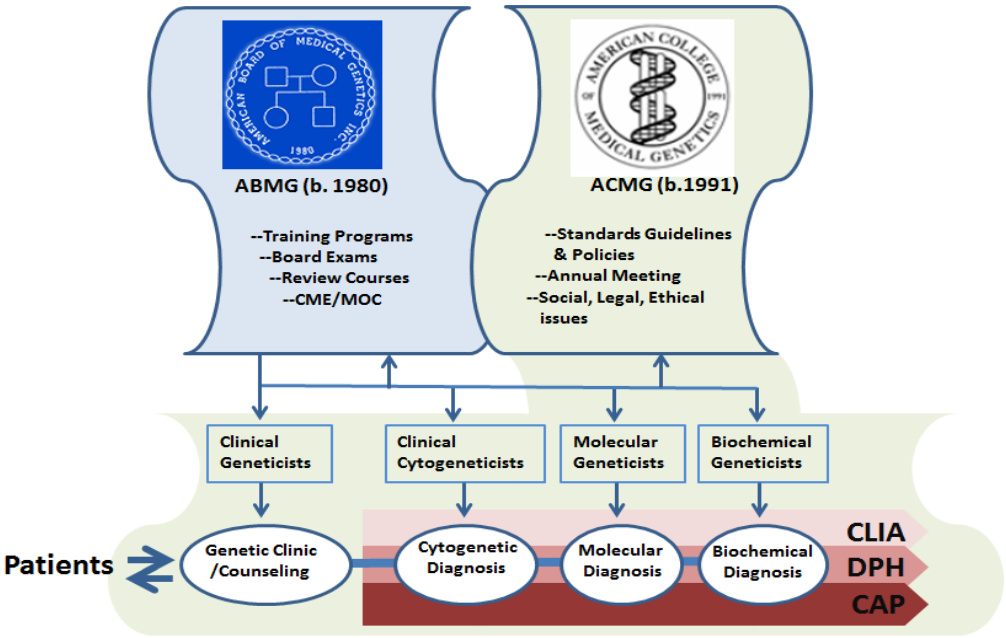


图 1. 医学遗传服务的规范和监管体系由纵向双轨交互的医学遗传学会（ACMG）和资质委员会（ABMG）管理机制和横向三层平行的联邦法规 （CLIA），公共卫生部门 （DPH, Department of Public Health）和病理学会 （CAP）的监管机制构成。 (CME, Continuing Medical Education, MOC, Maintenance of Certificate)

医学医学遗传学会已经发表了 23 项政策和公告、27 项行业规范和 15 项诊疗标准[2]。近年来学会的一个专家组正在规划标准化的新生儿筛查流程以规范选列病种、后续诊疗手段及追踪方法[6]。同时学会也发表了对全基因组覆盖的微阵列比较基因组分析和全外显子二代测序的临床应用和检测报告的规范[7, 8]。学会还常设经济委员会参与专科相关的医疗保险和政策的制定，常设的社会、伦理和法律委员会则专责解决相应问题。美国医学遗传资质委员会负责管理培训基地，继续医学教育项目和对资格维持的监管。获得资质认可的临床医师和遗传诊断专家一般具有十年的资质有效期，在这十年中必须保持良好执业记录，完成继续教育学分和专业文献考核来保持认证资格，十年期限前需重新参加资质考试来更新专业证书。美国医学遗传学会致力于提供标准化高效益和安全的医学遗传服务，其主要目的是：1）通过医学遗传和基因组转化研究和临床实践的整合形成优质服务，2 ）促进并完善医学遗传学和基因组学的教育体系，3 ）提高遗传和基因组医学在医疗系统中的介入和融合程度以促进健康。

对临床遗传诊断实验室的监管主要由联邦行政法规、州属公共卫生部门审核和同行专业检查三部分组成。美国卫生和公众服务部 (United States Department of Health and Human Services)在 1988 年制定了临床实验室改进修正案（CLIA, Clinical Laboratory Improvement Amendments），该法案适用于除临床试验和基础研究之外的所有临床实验室检测。遗传诊断实验室必须具有 CLIA 执照才能合法提供临床服务并合理收费，具有 CLIA 执照的实验室可以自主开发新技术进入临床。美国卫生和公众服务部下属的医疗保险和医疗补助服务中心(The Centers for Medicare & Medicaid Services) 通过医疗补助间接管理近二十五万个临床实验室检测项目。美国食品和药

物管理局 (FDA, The Food and Drug Administration)主要负责管理公司生产出来的产品包括用于遗传诊断的仪器设备和试剂。各州公共卫生部门负责监督实验室的工作环境、实验规范和安全标准并发放各州许可执照，CLIA 和州执照一般两年有效并要求按时复查更新。专业检查由美国病理学会（CAP, College of American Pathologists, www.cap.org)负责组织有资质的专业同行来实施，检查中发现实验室的缺陷会汇总在年检报告中并存档在病理协会和州公共卫生部门，实验室必须就存在的缺陷及时改进并将结果报告病理学会。此外病理学会对主要的遗传诊断项目有专项质量普查要求，每个实验室必须参加每年两到三次对学会送检样品的检测以评估不同实验室诊断的准确度，并促进各实验室自行检讨和修正误差，列入美国病理学学会普查的诊断项目可以作为检测‘金标准’的重要指标，例如，美国病理学会报告的微阵列比较基组分析质量普查结果证明了该方法对基因组拷贝数检测的普适性、特异性、灵敏度和可重复性[9]。

二、 医学遗传和基因组专科的作用

医学遗传专科的临床特色是通过对遗传信息的分析来诊断特定遗传性疾病或评估常见多发疾病的遗传易感性、并据此制定相应的咨询预防和治疗方案。致病性的遗传变异和易感风险存在于我们每一个人中，遗传变异包括染色体结构和数量异常、拷贝数变异、碱基突变和表观遗传变化，组成性遗传变异是数以千计的孟德尔遗传疾病和数百种染色体和基因组综合征的致病原因，而体细胞的遗传变异的检测广泛应用于许多类型肿瘤的诊断、分类、治疗方案的优化和预后评估中，全基因组关联分析也对很多常见疾病如高血压、冠状动脉疾病、中风、糖尿病和风湿病的遗传危险因素进行了研究并将转化到临床。遗传专科已经成为妇产科产前诊断，儿科发育和智力障碍诊断、血液系统癌症诊断治疗的重要组成部分。

遗传和基因组医学仍处于早期发展阶段，许多遗传变异的致病机理仍需要进一步的基础研究来阐明，很多遗传病的治疗和预防方法也有待临床试验来验证。在所有医学专科中，临床遗传研究论文显示最高单篇平均引用率和领先的专科 H 指数（图 2），这不仅证明遗传和基因组医学是前沿学科，而且也印证了它与其它领先学科如肿瘤、心脏、血液病、内分泌、

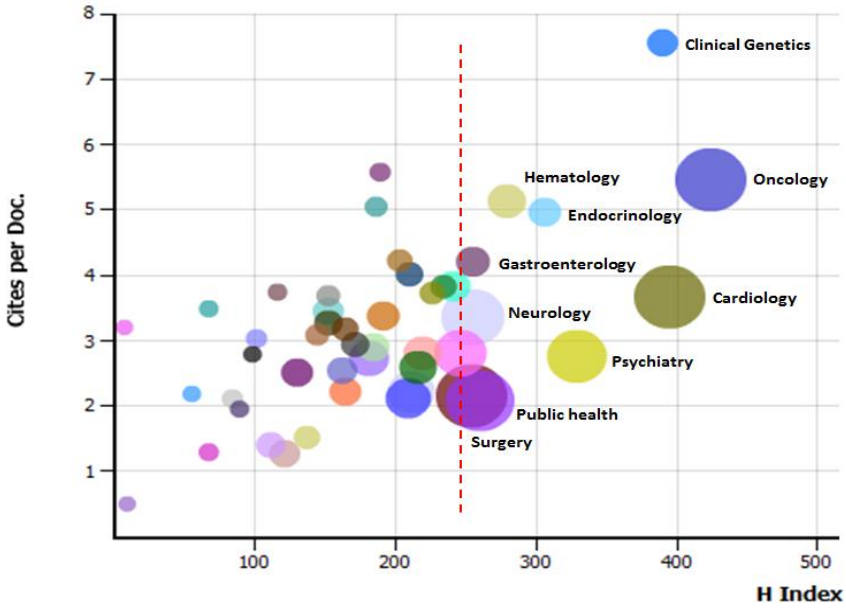


图 2. 在所有医学专科于 2011-2012 年发表的论文中，临床遗传研究论文显示最高单篇平均引用率和领先的专科 H 指数。红色虚线右侧标示前十位前沿医学专科（Adapted from The SCImago Journal & Country Rank, http://www.scimagojr.com/ ）。

神经等的相关性。高通量基因组学技术和二代测序技术在遗传诊断中的应用强化了检测的深度也扩大了研究范围，使得诊断实验室可以承担更多的转化医学研究[10-12]。在技术方面，遗传诊断实验室需要不断的通过评估验证新技术来提高诊断质量和效率。在临床方面，凭借对特殊病例的个案或系列分析以及大规模病例对照研究可以提供‘基因型和表型’的准确关联以预测病症轻重和病变发展[13]。同时遗传医师和诊断专家的研究成果也为行业政策、规范和标准的制定提供坚实的基础。例如，参与细胞基因组国际标准协作(The International Standards for Cytogenomic Arrays Consortium, https://www.iscaconsortium.org/)和癌症基因组协作 (Cancer Genomic Consortium, http://www.cancergenomics.org/) 的专家们也参与了美国医学遗传学会微阵列技术临床规范和标准的的制定[7，14]。遗传和基因组医学体现了以技术驱动和以循证医学为基础的新型医学专科的发展模式。随着对遗传病机理研究的不断深入，诊断技术和质量的不断提高，以及预防预测治疗手段的不断完善，现行以防病治病为主导的医疗保健系统将逐步演进到以预测预防主导的个性化医疗系统，遗传和基因组医学的进展将会为实现这一重大医学进步提供坚实的基础。

三、提高卫生专业人员和公众遗传与基因组医学知识

随着遗传和基因组医学的应用从遗传疾病的诊治扩张到对个人遗传易感风险的保健预防，提高非遗传专业医药卫生人员和公众的遗传学知识也变得日益重要。世界卫生组织（WHO）专设的网上人类遗传项目（http://www.who.int/genomics/en/ ）提供了遗传疾病的分类和国际编码系统等信息，并帮助遗传专业协会，社会团体，公共卫生专业人员和患者了解与遗传病相关的政策制定情况，以及涉及到的伦理，法律和社会等问题。联邦政府也制定了许多计划和方案来以推动遗传医学的发展。例如，美国卫生与公众服务部的新生儿和儿童遗传病咨询委员会建议对妇产科和儿科医生推广遗传和基因组医学教育[15] 。各州公共卫生部门也制定了与遗传和基因组医学有关的行动计划。例如，针对直接面向消费者的个人基因组测试的公众知情普查结果显示卫生行政部门应当在监管、教育和政策各方面发挥更多的作用[16]。美国医学遗传学会和人类遗传学会(ASHG, American Society of Human Genetics, www.ashg.org) 也启动从小学到大学的遗传学知识扫盲，让社会大众对遗传有正确的认知，同时面向执业的家庭医生，牙医、护士和其它相关医药卫生从业人员也推出更多的教育活动。

美中医学遗传面临的问题和展望

美国遗传和基因组医学所面临的巨大挑战在于必须加强专科各类专业人员的培养，以满足临床服务和转化科研的需要。根据 2012 年的医师专科数据，其它专科如心脏科、妇产科、儿科和内科的单一医生对应人口数分别为 14,164 、7,654 、5,568 和 2,834,而临床遗传医师则为 223,000。鉴于人类群体中的智力和发育障碍和先天性异常的患病率约为 3%-5%，现有的临床遗传医师不可能满足这些病人及其家属的诊疗需要，此外，不断增长的遗传病产前诊断和癌症患者遗传分析的需求，也加重了遗传医学各专业人员的负担，尤其是高通量基因组技术和二代测序的临床应用更要求掌握生物医学信息学工具，美国医学遗传学会和资质委员会正致力于吸引和培养更多的专业人才。

中国拥有全球最多的人口，因而也承担全球最多遗传病患者的负荷[17]。中国在医学遗传学的教学和研究方面已经取得很大的进步，作为中华医学会分支机构的中华医学遗传学会成立于 1986 年；国家医学遗传学重点实验室和区域性医学遗传学中心已经颇具规模。医院提供及商业途径的遗传诊断服务也在快速增加[17-19]， 然而医学遗传在中国仍不能作为独立的医学专科，因而缺乏具有专业资质的人才队伍，由此导致行业政策规范制定的滞后、质量监控系统的缺位、遗传检测的过度商业化以及不成熟技术的临床应用，所有这些状况都有可能对医疗系统造成严重问题[17,19]。例如，最近国家食品药品监督总局和计划生育委员会行政叫停应用二代测序进行无创产前诊断就是专业体系缺乏和规范监控缺失所造成的失控状态。同时以行政审核主导的医学教育管理体系也限制了对新型医学专业的探索和发展，以短期培训培养医学遗传咨询师的项目虽然已经建立[20]，但此类缺乏专科

设置和专业资质认可的培训方式不可能培养高素质的人才队伍。美国以医学专科学会主导战略性、前沿性和创新型学科发展的方式值得中国医学同行及相关部门参考借鉴。

【参考文献】

1. McKusick, V.A. Medical Genetics: a 40-year perspective on the evolution of a medical specialty from a basic science. JAMA 270, 2351-56 (1993)

2. Rimoin, D.L. The American College of Medical Genetics, the first 20 years. Genet Med 13, 179-187 (2011).

3. Li, P. et al. Progress and perspective for professional training in medical genetics and genomics: A report of the Association of Chinese Geneticists in America. N A J Med Sci 6, 173-180 (2013).

4. Competencies for the physician medical geneticist in the 21st century: Report of a working group of the American College of Medical Genetics http://www.acmg.net/StaticContent/Misc/ACMG_Competencies.pdf

5. Skirton, H. et al. Genetic education and the challenge of genomic medicine: development of core competences to support preparation of health professionals in Europe. Eur J Hum Genet 18, 972-977 (2010).

6. American College of Medical Genetics Newborn Screening Expert Group. Newborn screening: toward a uniform screening panel and system--executive summary. Pediatrics 117, S296-307 (2006).

7.Kearney, H.M. et al. American College of Medical Genetics recommendations for the design and performance expectations for clinical genomic copy number microarrays intended for use in the postnatal setting for detection of constitutional abnormalities. Genet Med 13, 676-679 (2011).

8. Rehm, H.L. et al. ACMG clinical laboratory standards for next-generation sequencing. Genet Med 15, 733-747 (2013).

9. Brothman, A.R. et al. College of American Pathologists/American College of Medical Genetics proficiency testing for constitutional cytogenomic microarray analysis. Genet Med. 13, 765-769 (2011).

10. Li, M.M., Andersson, H.C. Clinical application of microarray-based molecular cytogenetics: an emerging new era of genomic medicine. J Pediatr 155, 311-317 (2009).

11. Yu, Y. et al. Exome and whole-genome sequencing as clinical tests: a transformative practice in molecular diagnostics. Clin Chem 58, 1507-1509 (2012).

12. Grommisch, B. et al. Biobanking of residual specimens from diagnostic genetics laboratories: Standard operating procedures, ethical and legal considerations, and research applications. N A J Med Sci 6, 200-207 (2013).

13. Wei, Y., Xu, F., Li, P. Technology-driven and evidence-based genomic analysis for integrated pediatric and prenatal genetic evaluation. J Genet Genomics 40, 1-14 (2013).

14. Cooley, L.D. et al. American College of Medical Genetics and Genomics technical standards and guidelines: microarray analysis for chromosome abnormalities in neoplastic disorders. Genet Med 15, 484-494 (2013).

15. Kemper, A.R. et al. A blueprint for maternal and child health primary care physician education in medical genetics and genomic medicine: recommendations of the United States secretary for health and human services advisory committee on heritable disorders in newborns and children. Genet Med 12, 77-80 (2010).

16. Kolor, K. et al. Public awareness and use of direct-to-consumer personal genomic tests from four state population-based surveys, and implications for

clinical and public health practice. Genet Med 14, 860-867 (2012).
17. Zhao, X., et al. Genetic services and testing in China. J Community Genet 4, 379-390 (2013).

18. Yin, A., et al. Building reproductive genetic services from bottom up: over 30-year experience of a major prenatal diagnostic center in Guangdong province. N A J Med Sci 6, 216-218 (2013).

19. Zou, L., et al. Opportunities and challenges in molecular genetic testing in China: the experience of an academic center for clinical molecular medicine. N A J Med Sci 6, 213-215 (2013).

20. An, Y., et al. Genetic counseling training in China: a pilot program at Fudan University. N A J Med Sci 6, 221-222 (2013).

作者简介：

李培宁博士为美国医学遗传资质委员会认证的临床分子遗传和细胞遗传专家，美国医学遗传学会会员。早年毕业于南开大学生物系遗传专业，曾经在天津儿童医院儿科研究所遗传室工作。其后留学美国就读于伯明翰阿拉巴马大学医学遗传专业获博士学位，并在耶鲁医学院遗传系，完成博士后训练。曾就职于圣路易华盛顿大学医学院儿科系任临床助理教授和细胞遗传实验室主任。现为耶鲁医学院遗传系副教授，分子细胞遗传和基因组遗传实验室主任，主要从事染色体异常和基因组拷贝数异常的临床检测并承担相应的教学和科研任务。

李培宁　博士　副教授

分子细胞遗传学和基因组学实验室主任
耶鲁大学医学院遗传学系,
纽黑文, 康涅狄格州 06520
联系电话：　203-785-6317
传　　真：　203-785-7342
电子邮件：　peining.li @ yale.edu

基因组学对肺癌诊断及治疗的影响

姜结根 [1,2] **高基民** [2]

1. Genoptix 医学实验室，诺华公司，卡尔斯巴，加州 92008
2. 温州医科大学，检验及生命科学学院，温州

摘要

肺癌是目前人类的主要恶性肿瘤，由于缺乏可靠的早期诊断手段及有效的治疗，其发病率和死亡率都居前列。近几年来，随着高通量基因组分析和测序技术的发展，对肺癌的发生及发展机理有了更进一步的认识，进而在肺癌的诊断及治疗上有了长足的进步。最近发现和比较主要的相关基因是 EGFR, ALK, MET, KRAS, ROS1, RET, FGFR1, 针对这些靶点的酪氨酸激酶抑制剂目前正用于相关病人的治疗，更多的酪氨酸激酶抑制剂正在实验治疗阶段。本文简单介绍这些基因变异在肺癌病人中的分布、临床相关特征、目前的主要检测手段、及相关的用于肺癌治疗的酪氨酸激酶抑制剂。这是一个全新的领域，对从事医学研究的科研人员、制药公司的研发人员、临床病理诊断的病理医生、及临床治疗的肿瘤科医生都是一个机遇和挑战。

Impact of genomics and next-generation equencing at molecular diagnosis and treatments of lung cancer.

Abstract

Lung cancer is one of the most common cancers in the world and the leading cause of cancer-related death due to lack of diagnostic methods for early-stage disease and efficient treatments for advanced-stage disease. In recent years, scientific and technologic progress in genomics and next-generation sequencing has accelerated the pace of discoveries in molecular pathogenesis of lung cancer that drive significant improvement in diagnoses and treatments in patients with lung cancer. Several genes such as EGFR, ALK, MET, KRAS, ROS1, RET, and FGFR1 are identified to have close relationship with lung cancer. Some tyrosine kinase inhibitors (TKIs) targeting these gene alterations have been approved by FDA for patients with lung cancer and more TKIs are in clinical trials. This review briefly summarizes the distribution of these gene alterations in patients with lung cancer, patients' clinical characteristics, their detecting methods, and related TKIs. As expected, more gene alterations associated with lung cancer will be discovered and more TKIs will be available clinically, which will lead to more options for personalized treatment paradigms and improve patients' outcome. This new era of personalized medicine not only provides opportunities but also create a challenge to scientists in biomedical sciences, researchers in Pharmaceutics, pathologists, and oncologists.

Key words

lung cancer, gene alterations, molecular diagnosis, tyrosine kinase inhibitors, target therapy.

正文

肺癌是目前人类的主要癌症。2006 至 2010 年的统计数据表明，在美国，尽管肺癌的发病率在男性中低于前列腺癌，在女性中低于乳腺癌，但肺癌的死亡率在两性中都明列首位（1）。2008 年中华人民共和国卫生部公布的数据显示，肺癌

开始取代肝癌成为中国首位恶性肿瘤死亡原因；2012 年中国肿瘤登记年报分析认为，随着国家的进一步工业化及环境污染加重，肺癌发病率及死亡率大大高于肝癌，且有年轻化趋势（2）。

病理学上把肺癌主要分为小细胞肺癌和非小细胞肺癌，非小细胞肺癌大约占所有肺癌的百分之八十到八十五，肺腺癌是非小细胞癌中的最常见的组织类型。肺癌病人的死亡率高，其主要原因是肺癌缺少有效的早期诊断方法，致使大部分肺癌病人在比较晚期才发现而错过了有效的外科手术切除时机。另外，传统的化疗或放疗效果不理想。

近年来，随着高通量基因组分析和测序技术迅速发展，人类对肺癌的分子致病机制的认识有了长足的进步，从而对其早期检测、诊断、分期、及治疗产生了积极的影响（3）。通过对肺癌基因组的研究，查明了一些与肺癌发生及发展相关的癌基因，这些基因的突变(mutation)、融合(fusion)、或重排(rearrangement)导致癌细胞中下游信号通路的持续激活，特别是酪氨酸激酶的活化，致使癌细胞生长失控。这些基因的变异为肺癌的诊断及治疗提供了有效的靶点，产生了对肺癌病人的有效个体化治疗及靶疗。目前认识比较深入的基因有 EGFR(表皮细胞生长因子受体)、ALK(间变性淋巴瘤激酶)、KRAS、MET、RET、FGFR 及 ROS1。本文简单介绍一些有关这些基因在肺癌诊断及治疗方面的进展。

1. EGFR 和 ALK 及其激酶抑制剂

EGFR 是与上皮细胞生长密切相关的受体基因，在癌症的发生和发展中起重要作用。ALK 基因重排主要存在于间变性大细胞淋巴癌(Anaplastic large cell lymphoma, ALCL)和炎性假瘤(inflammatory pseudotumor) 中。近期研究发现这两者的变异都存在于肺癌病人当中。研究表明，女性肺癌病人中的 EGFR 基因突变多于男性，分别是 37．5%和 13．0%；非吸烟者多于吸烟者，分别是 50．8%和 9．0%；东亚病人多于美国病人，分别是 29．1%和 9．5%(4)。最常见的突变是第 19 个外显子中的缺失突变和第 21 个外显子的点突变 L858R(5)。大约 2%到 7%的非小细胞肺癌病人有 ALK 基因重排，不吸烟或少吸烟者有 ALK 基因重排的机率更高，另外晚期肺癌病人有 ALK 基因重排的可能性也较高(6)。2013 年，the College of American Pathologists, International Association for the Study of Lung Cancer, Association for Molecular Pathology 联合发表了 EGFR 和 ALK 分子检测指南，指南指出，适合 EGFR 或 ALK 酪氨酸激酶抑制剂(tyrosine kinase inhibitor,TKI)靶疗(target therapy)的肺癌病人及肺腺癌病人都应该做 EGFR 或 ALK 分子检测；对于外科切除的肺癌标本，无论组织分化程度，所有的肺腺癌或含有腺癌成份的任何组织类型，都适合做两者的分子检测；两者的分子检测不适用于无腺癌成份的肿瘤，比如纯鳞状上皮癌、纯小细胞癌、或不含腺癌成份的大细胞癌。对于小的活检标本，由于很难确定是否含有腺癌成份，只要临床指标适合，都应该做两者的分子检测。检测原发癌和转移癌具有同样的指导作用，对于有多个原发病变的肿瘤，每个病灶需分别检测。两者的检测适用于晚期(四期)病人，对于早期(一，二，三期)病人，可根据具体情况和实验室条件而定(7)。所以，在病理诊断中，外科病理学家要尽最大努力确定是否是腺癌或含腺癌成份，并排除鳞状上皮癌(8)。EGFR 突变主要用 PCR 的方法来检测，而 ALK 基因重排主要用 FISH 的方法。

美国病人研究表明，EGFR 基因突变和 ALK 基因重排存在着功能互斥(mutually exclusive)现象，两个基因只要有其中一个阳性，另一个就不用检测。但在东亚病人当中，情况或许不同，互斥现象有待证实。这种互斥现象的机理不清(9)。

目前 FDA 批准用于肺癌治疗的 EGFR —TKI 有 Erlotinib 和 afatinib ，两者是用于治疗转移性非小细胞肺癌的第一线药，afatinib 是第二代 TKI，与 EGFR 不可逆性结合。两者主要是针对 EGFR 第 19 外显子的缺失突变和第 21 外显子的点突变(L858R)。正在临床试用的 TKI 包括 Pelitininb, Canertininb, AZD8931, PF299, 和

Neratinib 等(10)。

Crizotinib 是在美国第一个用于 ALK 基因重排阳性肺癌病人的 ALK－TKI，在欧洲只作为二级治疗药。目前正在临床试用的 ALK-TKI 包括 LDK378 、 Alectinib 及 AP26113(11)。

2. KRAS 和 MET 与 EGFR-TKI 的抗性

KRAS 是 EGFR 信号传导通路中的一个重要成员，它在很多癌症的发生发展中都起重要作用。大约有 30％肺腺癌和 5％鳞状上皮癌有 KRAS 突变，KRAS 的突变导致独立于 EGFR 激活的 RAS-MAPK 信号通道的持续性活化，从而对 EGFR-TKI 产生抗性。最常见的点突变是密码子 12 和 13 的突变，这些突变常见于吸烟肺癌患者(12)。临床实验室主要用 PCR 技术来检测这些突变。虽然许多美国临床实验室常规检测这些突变，但是临床上一直不确定在带野生型(wild type)EGFR 的肺腺癌病人中，有 KRAS 突变与没有 KRAS 突变是否会导致 EGFR-TKI 有不同的治疗效果。因此，在没有 EGFR 突变的病人中，检测 KRAS 突变对于选择 TKI 治疗是否有参考价值没有定论。虽然同时有 EGFR 和 KRAS 突变的可能性很低，但是临床治疗观察表明，这种病人对 TKI 治疗并没有明显的抗性(13)。

MET 基因编码肝细胞生长因子的受体（HGF 受体），MET 基因扩增在肺癌的致癌过程中也起重要作用。MET 基因扩增是造成 EGFR-TKI 抗性的另一种原因，大约有 1%至 7％的非小细胞肺癌有 MET 基因扩增。由于 EGFR 突变和 MET 基因扩增不是互斥事件，MET 基因扩增是 EGFR-TkI 的获得性抗性还是 de novo 抗性有待进一步研究(14)。目前大多数临床实验室用 FlSH 来检测 MET 的基因扩增。另外，初步研究表明，直接作用于 MET 激酶受体或配体的靶疗药效果不错，因此，EGFR 和 MET 两者的 TKI 联合应用可能更有效(13)。

产生 EGFR－TKI 抗性的另外一种机制是 T790M EGFR 突变，这个突变可以与 L858R 突变共存，所以这个突变可能是原始突变而不一定是获得性突变。由于在起始癌瘤中带这种突变的癌细胞数量很少，所有对于 TKI 的起始疗效并没有太多的影响。但对后期癌症的复发及抗性起着重要作用(15)。

EGFR 信号传导通路中还有其它基因的参与，比如 HER2、BRAF、PI3K、LKB1、SHP2 等。除了 PI3K 之外，其它基因的突变互斥，所以继续研究其它基因的突变既有助于了解 EGFR－TKI 的抗性，也有助于寻找新的药物靶点。

3. ROS1

ROS1 是一个受体型酪氨酸激酶，是胰岛素受体家族中的一员(16)。在美国， 大约有 2％的非小细胞肺癌有 ROS1 基因重排，临床上，携带有 ROS1 基因重排的非小细胞癌的病人与携带有 ALK 基因重排的非小细胞癌病人具有相同的临床特征，通常为年轻女性并无吸烟史。因此，两者可能有相同或类似的致癌机理。同 ALK 基因重排一样，对于携带有 ROS1 基因重排的肺癌病人，Crizotinib 有同样显著的抗癌作用和疗效。临床实验室目前主要用 FlSH 方法检测 ROS1 基因重排，这种检测方法也是目前最有效最可靠的方法(17)。关于 ROS1 信号传导通路，目前知道的不多，特别是对其下游的信号传导知道的更少。这个酶本身的结构和激活机制及抑制剂的筛选， 有待于进一步研究。这些方面的深入研究将有助于发现新的 ROS1 激酶抑制剂(TKIs)。

4. FGFR1

FGFR1 基因是癌症患者中最常见的扩增基因之一，此基因的酪氨酸激酶在癌的发生及发展中起着关键作用，FGFR1 的基因变异包括基因扩增、点突变、转位(translocation)。临床资料表明， 在与吸烟相关的鳞状上皮癌病人中，FGFR1 基因扩增是主要的癌基因变异。吸烟越多，此基因扩增的可能性越高。FISH 分析表明，在西方国家的白种人群中， 大约 22％的肺鳞状

上皮癌携带有 FGFR1 基因的扩增。亚洲肺鳞状上皮癌病人中，大约有 13%的病人有这个基因的扩增(18)。最近德国学者发表的研究报告称，肺小细胞癌也存在 FGFR1 基因扩增，所占的比例大约是 5%(19)。因此，肺鳞状上皮癌和肺小细胞癌都应该做 FGFR1 基因扩增的 FISH 检测。目前正在临床进行实验治疗的 FGFR1 酪氨酸激酶抑制剂有 Brivanib, Dovitinib, AZD4547, TSU-68(20)。

5. RET

RET 也是一个受体型酪氨酸激酶，参与细胞的增生、分化、及运动等(21)。最近研究表明，RET 能够与其它基因发生融合（gene fusion），产生融合基因，比如 KlF5B－RET、CCDC6－RET、NCOA4－RET，这些融合基因在部分肺腺癌的发生发展过程中起重要作用。正常肺组织中，RET 的表达水平较低，但这些融合基因在肺癌组织中表达增高，最常见的融合基因是 KlF5B－RET，其次是 CCDC6－RET，NCOA4－RET 比较少见。在中国人群中，大约在 1．4%的非小细胞肺癌病人中能检测到 RET 基因融合，1•7%的肺腺癌病人携带 RET 融合基因。这些病人一般比较年青，没有吸烟史，有早期淋巴结转移，癌组织增长呈片块状而无明显的腺体分化。比较好的检测 RET 基因融合的方法有 FISH 和 RT－PCR，前者是最有效的检测方法，但由于成本及技术要求高，后者也不失为一种有效的选择(22)。目前用于临床实验治疗的 RET－TKI 有 sunitinib, sorafenib, 和 vandetanib(20)。

结语

以上仅简要介绍了几个目前研究比较多的相关基因，随着研究的深入，高通量基因组分析和测序技术的进一步完善和改正， 更多与肺癌有关的基因将被发现，针对这些变异靶点的抑制剂也会越来越多，越来越多的靶点的抑制剂将应用于肺癌病人的治疗，肺癌病人可供选择的治疗手段会更多，从而病人的个性化治疗将更普遍，肺癌病人的预后将会进一步改善。然后，由于癌症病人机体内外环境的多元性，相关癌基因的多样性，目前对致癌机制了解的有限性，癌细胞群体本身的异质性，靶疗药物的局限性，及治疗过程中产生的耐药性，在保证病人生活质量的前提下，给予癌症病人适当和有效的治疗， 是目前临床医学面临的另一个挑战。

【参考文献】

1 Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer statistics, 2014. CA CANCER J CLIN 2014;64:9–29

2 The Ministry of Health of the People's Republic of China. Third national retrospect pot-check of death-causation. 1st ed. Beijing: Peking Union Medical College Press, 2008; page: 22

3 Winer E, Gralow J, Diller L, et al. Clinical cancer advances 2008: major research advances in cancer treatment, prevention, and screening—a report from the American Society of Clinical Oncology. J Clinical Oncol. 2009; 27(5):812-826

4 Pao W, Miller VA. Epidermal growth factor receptor mutations, small molecule kinase inhibitors, and non-small-cell lung cancer: current knowledge and future directions. J Clin Oncol. 2005;23(11):2556-2568.

5 Rosell R, Moran T, Queralt C, et al; Spanish Lung Cancer Group. Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. N Engl J Med. 2009;361(10):958-967.

6 Shaw AT, Engeloman JA. ALK in Lung Cancer: Past, Present, and Future. J Clin Oncol. 2013; 31(8):1105-1111

7 Lindeman NI, Cagle PT, Beasley MB, Chitale DA, Dacic S, Giaccone G, Jenkins RB, Kwiatkowski DJ, Saldivar JS, Squire J, Thunnissen E, Ladanyi M. Molecular testing guideline for selection of lung cancer patients for EGFR and ALK tyrosine kinase inhibitors: guideline from the College of American Pathologists, International Association for the

Study of Lung Cancer, and Association for Molecular Pathology. Arch Pathol Lab Med. 2013;137(6):828-860.

8 NCCN guidelines: non-small cell lung cancer, 2014(www.nccn.com).

9 Gainor JF, Varghese AM, Ou SH, Kabraji S, Awad MM, Katayama R, Pawlak A, Mino-Kenudson M, Yeap BY, Riely GJ, Iafrate AJ, Arcila ME, Ladanyi M, Engelman JA, Dias-Santagata D, Shaw AT. ALK rearrangements are mutually exclusive with mutations in EGFR or KRAS: an analysis of 1,683 patients with non-small cell lung cancer. Clin Cancer Res. 2013; 19(15):4273-4281

10 Heigener DF, Reck M. Mutations in the epidermal growth factor receptor gene in non-small cell lung cancer: Impact on treatment beyond gefitinib and erlotinib. Adv Ther. 2011; 28(2):126-133

11 Shaw AT, Kim DW, Nakagawa K, Seto T, Crinó L, Ahn MJ, De Pas T, Besse B, Solomon BJ, Blackhall F, Wu YL, Thomas M, O'Byrne KJ, Moro-Sibilot D, Camidge DR, Mok T, Hirsh V, Riely GJ, Iyer S, Tassell V, Polli A, Wilner KD, Jänne PA. Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer. N Engl J Med. 2013; 368(25):2385-2394

12 Herbst RS, Heymach JV, Lippman SM. Lung cancer. N Engl J Med. 2008; 359(13):136713-80.

13 Dacic S. Molecular diagnostics of lung carcinomas. Arch Pathol Lab Med. 2011; 135(5):622-629

14 Bean J, Brennan C, Shih JY, Riely G, Viale A, Wang L, Chitale D, Motoi N, Szoke J, Broderick S, Balak M, Chang WC, Yu CJ, Gazdar A, Pass H, Rusch V, Gerald W, Huang SF, Yang PC, Miller V, Ladanyi M, Yang CH, Pao W. MET amplification occurs with or without T790M mutations in EGFR mutant lung tumors with acquired resistance to gefitinib or erlotinib. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007; 104(52):20932-20937.

15 Pao W, Miller VA, Politi KA, Riely GJ, Somwar R, Zakowski MF, Kris MG, Varmus H. Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. PLoS Med. 2005; 2(3):e73

16 Birchmeier C, O'Neill K, Riggs M, Wigler M. Characterization of ROS1 cDNA from a human glioblastoma cell line. Proc Natl Acad Sci U S A. 1990; 87(12):4799-4803.

17 Bergethon K, Shaw AT, Ou SH, Katayama R, Lovly CM, McDonald NT, Massion PP, Siwak-Tapp C, Gonzalez A, Fang R, Mark EJ, Batten JM, Chen H, Wilner KD, Kwak EL, Clark JW, Carbone DP, Ji H, Engelman JA, Mino-Kenudson M, Pao W, Iafrate AJ. ROS1 rearrangements define a unique molecular class of lung cancers. J Clin Oncol. 2012; 30(8):863-870.

18 Kim HR, Kim DJ, Kang DR, Lee JG, Lim SM, Lee CY, Rha SY, Bae MK, Lee YJ, Kim SH, Ha SJ, Soo RA, Chung KY, Kim JH, Lee JH, Shim HS, Cho BC. Fibroblast growth factor receptor 1 gene amplification is associated with poor survival and cigarette smoking dosage in patients with resected squamous cell lung cancer. J Clin Oncol. 2013; 31(6):731-737.

19 Schultheis AM, Bos M, Schmitz K, Wilsberg L, Binot E, Wolf J, Büttner R, Schildhaus HU. Fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1) amplification is a potential therapeutic target in small-cell lung cancer. Mod Pathol. 2014; 27(2):214-421.

20 Villaflor VM, Salgia R. Targeted agents in non-small cell lung cancer therapy: What is there on the horizon? J Carcinog. 2013; 18:12-17.

21 Eng C. RET proto-oncogene in the development of human cancer. J Clin Oncol. 1999;17(1):380-393.

22 Wang R, Hu H, Pan Y, Li Y, Ye T, Li C, Luo X, Wang L, Li H, Zhang Y, Li F, Lu Y, Lu Q, Xu J, Garfield D, Shen L, Ji H, Pao W, Sun Y, Chen H. RET fusions define a unique molecular and clinicopathologic subtype of non-small-cell lung cancer. J Clin Oncol. 2012; 30(35):4352-4359.

作者简介:

姜结根，医学及哲学博士，资深临床血液病理医生.1980－1985,南方医科大学,本科;1985－1988,军事医学科学院,硕士;1993－1997,匹兹堡大学医学院,分子病理博士;1999－2000，病理系，研究助理教授;2000－2003，凯西西部保留地大学医学院病理系,住院医生;2003－2005,哥伦比亚大学医学院病理系,血液专科.现任诺华公司Genoptix医学实验室资深血液病理医生.
Genoptix 医学实验室，卡尔斯巴，加州 92008
联系电话:760－516－5173 传真:760-516-6201

电子邮件：jjiang@genoptix.com

荧光原位杂交（FISH）技术在早期肺癌检测中的应用

代建丽[1]　　吴　萍[2]

1.武昌理工学院生命科学学院生物工程系，430223，武汉
2.通讯作者，华中科技大学同济医学院基础医学院病理生理系，430030，武汉
Tel. 18971666873, E-mail: wpingwp@mails.tjmu.edu.cn

摘要

荧光原位杂交(Fluorescence in situ hybridization, FISH)是一种高特异性、安全快速的核酸原位显示技术，能检测出 DNA 的单碱基突变。鉴于基因变异在肿瘤发生发展中的作用，FISH 在肿瘤的早期筛查中具有重要意义。肺癌是当前世界各地最常见的恶性肿瘤之一，其早期诊断将有助于提高患者的生存率和生存质量。本文介绍了肺癌早期诊断中 FISH 技术的应用情况和一些学者的研究结果，主要包括所应用的 FISH 探针、样本情况及 FISH 技术面临的问题。

Abstract

Fluorescence in situ hybridization (FISH) is a technique used to identify and localize specific DNA sequences in cells or tissues. It can detect extremely small genetic alterations with very high specificity. Since genetic mutation plays an important role in tumorigenesis, FISH has become a useful tool for the early detection of cancer. Lung cancer is the leading cause of cancer deaths worldwide. The prognosis for these patients is strongly correlated to the stage of the disease at the time of diagnosis. In this paper, we introduced some early detection methods for lung cancer, especially the usage of FISH.

前言

肺癌是当前世界各地最常见的恶性肿瘤之一，位居恶性肿瘤患者死亡原因之首，全球范围内每年约有 140 万人死于肺癌，且其发病率和死亡率呈逐年上升趋势[1]。仅在中国，过去 30 年间死于肺癌的患者人数就增加了 4.65 倍[2]。

造成肺癌患者高死亡率的主要原因是早期诊断技术的缺乏，大多数患者出现持续咳嗽、咳血和胸痛等临床症状就诊时已处于中晚期，确诊后的患者 5 年生存率只有 15%(非小细胞肺癌)[3]和 5%(小细胞肺癌)[4]。 有研究显示 I 期肺癌术后的 10 年生存率甚至可以达到 92%[5]，因此，早期诊断和治疗是降低肺癌死亡率的关键。本文就肺癌的早期诊断方法尤其是荧光原位杂交(Fluorescence in situ hybridization, FISH)技术的应用作一简单综述。

一、肺癌早期筛查方法

肺癌常规筛查手段包括影像学检查、病理学检查以及血清肿瘤标记物检测等。

影像学方法中胸部 X 光片检查只能显示病变在解剖和形态上的特征性变化，分辨率较低，在肺癌的早期诊断方面不具优势。常规 CT 扫描技术提高了对早期肺癌的检出率，但筛选人群接受辐射剂量较大，不符合放射学检查最优化原则。低剂量 CT 克服了辐射剂量大的问题，如低剂量螺旋 CT 可以检测到 2mm-3mm 的小结节[6]，但是难以区分密度相近的中央型肺癌与肺不张。近

年，FDG-PET/CT[7]和微波断层扫描[8]因其大大提高检测的灵敏度而作为肺癌检测的新技术开始得以推广。

支气管内镜检查是临床上确诊肺癌的重要检查手段，在早期肺癌检测中具有重要地位。如自体荧光支气管镜检查和窄带成像技术联用可以用于筛查包括鳞状上皮非典型增生、原位癌、早期肺癌等几个阶段的早期癌变，其敏感性和特异性分别达到 93.7%和 86.9%[9]。但是作为一种侵入性检查，在临床应用中可能引起出血、气胸等并发症。

肿瘤标志物检测是筛查早期癌症较为有效的方法，其中常用的指标有癌胚抗原(CEA) 、细胞角蛋白(CYFRA21-1)、神经元特异性烯醇化酶(NSE)、糖抗原 125(CA125)、鳞状细胞癌抗原(SCC)等[10]。但是肿瘤标志物检测存在灵敏度和特异性较低的问题。

生化检测作为无创检测成为目前肺癌检测的研究热点之一，但普遍存在检测指标过多且灵敏度不高的问题。 Mohammad 等应用体液的自发荧光，通过检测血浆、痰样本中的色氨酸和弹性蛋白以及尿样本中的核黄素、NADH、卟啉筛查早期肺癌，准确率高达 90%[11]。Chao 等利用尿中氯、铁、镁、铝、锌等 9 种元素的浓度筛查肺癌，在实验条件下特异性为 92.9%[12]。Amel 等通过检测呼出的 15 种气体成分筛查肺癌，但是灵敏度仅为 80%[13]。

二、FISH 在肺癌早期检测中的应用

1、FISH 方法简介

FISH 是 20 世纪 80 年代末在原有的放射性原位杂交技术基础上发展起来的非放射性原位杂交技术，通过直接或间接将荧光基团标记的 DNA 探针与样品中同源序列的核酸杂交，实现对目的 DNA 片段或基因的定量或者定位分析。因其可以检测出微小的染色体畸变和单基因突变，具有操作简便、可与多种技术结合、快速、高灵敏度、高特异性的特征，已成为国际上较常用的检测染色体及某些单基因异常的方法。众所周知，基因变异是导致肿瘤发生的主要原因，且早于细胞形态学的改变，对染色体异常的检测是癌症早期诊断的有效措施，因此，FISH 在癌症早期检测中的应用潜力引起了科学界广泛的重视。

目前已有大量 FISH 检测方法的研究，由于其适用的标本来源较为丰富，既可以在玻片上显示中期染色体数量或结构的变化，也可以在悬液中显示间期染色体 DNA 的结构，分化或者未分化的细胞、甚至是死亡的细胞都可被检测，这一特性使其在肿瘤诊断中具有广阔的应用前景，用此方法检测的癌症类型主要有膀胱癌[14]、脑膜瘤[15]、淋巴瘤[16]、胃癌[17]、乳腺癌[18]、肺癌[19-31]等。而目前用于肿瘤诊断的商用试剂盒也已经面世，如雅培公司的膀胱癌和乳腺癌检测试剂盒以及 LAVysion 公司的肺癌检测试剂盒等。

2、FISH 检测技术在肺癌中的应用

目前已有100篇左右的文献报道了FISH技术在肺癌检测中的应用。如Eunhee等详细比较了发表于2010年至2012年之间的5篇文章，这些文章同时利用FISH和常规免疫组织化学检测，对非小细胞肺癌患者的间变性淋巴瘤激酶 (anaplastic lymphoma kinase, ALK) 基因重排进行了临床实验，分析结果显示FISH与免疫组化的结果有很高的一致性[19]；Liu的研究表明FISH对经支气管刷取样的鳞状细胞癌样本具有诊断意义，其检测灵敏度和特异性分别为98.2%和94.6%[20]。Ruth等对35例肺癌患者、26例吸烟者以及6名健康人群的痰液进行了检测，结果显示与单用常规细胞学检测相比，同时结合针对染色体3p22.1和10q22.3异常的FISH，将肺癌检测的灵敏度从37%提高到74%，但是特异性从87%下降到82%[21]。Sai等在一项针对122名患者的临床使用中， 同时应用FISH技术检测了肺部肿瘤组织、肺部癌旁组织、患侧支气管刷样本和健侧支气管刷样本，结果表明应用FISH检测3p22.1和10q22.3的缺失可以作为病人罹患非小细胞肺癌高风险的指标[22]。

3、用于肺癌FISH检测的探针

FISH技术种类甚多，发展迅速，其实现需要能与靶序列互补结合的探针。目前对于FISH探针的名称和分类并没有统一的标准，用于肺癌FISH检测的探针分为三大类型：染色体计数探针(Chromosome enumeration probe, CEP)，它能够与通常位于着丝粒区域高度重复的α卫星序列杂交，用以检测染色体的数目异常；端粒探针和位点特异性探针。目前较常用的部分肺癌检测探针见表1。由于不同针对靶点的探针在不同组织样本中的检测灵敏度和特异性有所不同，为了提高诊断的正确率，目前越来越多的使用双色探针。LAVysion甚至开发出的四色探针，能同时检测染色体5p15，6，7p12和8q24的变化[23]。

虽然已有众多的探针应用于肺癌的FISH检测，但适用于不同组织类型的具有高灵敏度和特异性的探针仍然非常缺乏。随着更多来源的样本如痰细胞用于肺癌早期检测，特异性更高、适应样品更广泛的探针设计已成为FISH领域的热点。随着基因组和蛋白质组学的研究，在肺癌发生和发展中的一系列基因和功能蛋白被发现，如RBM5[32]、鳞状细胞癌相关抗原(SCC-Ag)、可溶性白细胞介素2受体(sIL-2R)、血清淀粉样蛋白A(SAA)等[10]。这些分子极有可能成为肺癌早期FISH诊断的新靶点。

表1　肺癌FISH检测中应用的探针比较

探针检测对象	样品来源	灵敏度	特异性
染色体3p22.1和10q22.3 [21]	痰	74%	82%(结合细胞学)
染色体3p22.1和10q22-23 [22]	痰	91.6%	80%
染色体3p22.1和10q22[23]	支气管刷	100%和79%	100%
TERC和3号染色体 [24]	支气管刷	87.3%（鳞癌99%）	-
染色体5p15, 6，7p12和8q24 [25]	支气管刷	71%	83%
ALK [26]	石蜡切片	75%	100%
ALK [27]	腺癌石蜡切片	90.9%	94.4%
c-met和染色体7q [28]	腺癌组织 肺癌细胞系	灵敏度高于病理检测	-
EGFR和7号染色体 [29]	石蜡切片	75.9%，97.4%	-
p16和p53 [30]	外周血	-	-
ROS1 [31]	肺腺癌石蜡切片	-	-

注：-原文没有统计对应项

三、肺癌FISH检测的标本类型

FISH技术适用于广泛的标本类型， 包括新鲜、冷冻或石蜡包埋标本以及穿刺物、脱落细胞和体外培养的细胞等。目前用于肺癌检测的标本主要有四类：肿瘤组织石蜡切片、肿瘤细胞滴片或涂片、支气管刷标本、痰样本。近来年，外周

血细胞成为新的研究样本[30]。其中，石蜡切片和细胞标本的检测灵敏度和特异性相对较高，痰样本的检出率处于较低水平。作为无创样本，提高痰样本检测的灵敏度和特异性具有重要意义，很多研究采用了FISH和细胞学相结合的检测方法[21,22]，并辅助特殊的细胞成像系统，但特异性仍有待提高。血液样本作为新的无创样本，具有极大的应用前景，但目前研究较少，尚缺乏具有高灵敏度和特异性的探针。

四、肺癌FISH检测展望

FISH检测技术具有高特异性及稳定性的特征，当前已经成为癌症检测的有力辅助手段，较多的应用于肺癌、乳腺癌、膀胱癌等的诊断中，未来FISH技术也将成为肿瘤检测的新方向。尽管目前适用于肺癌FISH检测的标本类型比较多样（表1），石蜡切片、支气管刷和穿刺样本在取材时会对患者造成伤害，而外周血和痰样本等对患者伤害较小的样本其检测灵敏度较低，痰样本中自肺部的细胞较少也降低了FISH检测的准确率。如何提高肺癌FISH检测的灵敏度特别是无创样本检测的灵敏度成为亟待解决的问题。由于FISH检测的灵敏度和特异性主要依赖于探针和检测仪器，具有高特异性和灵敏度的探针开发成为较为关键的问题。病理学、基因组学、蛋白质组学的研究为新探针的制备提供了途径；传统的影像学、细胞学、病理学检测以及临床试验、患者回访跟踪调查为探针的有效性提供了依据。多探针联合使用以提高检测的特异性和灵敏度将是很好的方向。样本的预处理技术例如痰样本中来自肺部细胞的富集也是可行的途径。

【参考文献】

1. Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics. CA Cancer J Clin, 2011, 62(2): 69-90.
2. Wen C, Dehnel T. China wrestles with lung cancer. Lancet Oncol. 2011,12(1):15.
3. Alam N, Darling G, Evans WK, et al. Adjuvant chemotherapy for completely resected non-small cell lung cancer:A systematic review. Crit Rev Oncol Hematol. 2006, 58(2):146–155.
4. Booth CM, Shepherd F. Adjuvant chemo-therapy for resected non-small cell lung cancer. J Thorac Oncol. 2006, 1(2): 180-187.
5. International Early Lung Cancer Action Program Investigators, Henschke CI, Yankelevitz DF, et al. Survival of patients with stage I lung cancer detected on CT screening. N Engl J Med. 2006, 355(17):1763-1771.
6. Becker N, Motsch E, Gross ML, et al. Randomized study on early detection of lung cancer with MSCT in Germany: study design and results of the first screening round. J Cancer Res Clin Oncol. 2012,138(9):1475–1486.
7. Sato M, Okumura T, Kaito K, et al. Usefulness of FDG-PET/CT in the detection of pancreatic metastases from lung cancer. Ann Nucl Med. 2009, 23(1):49–57.
8. Semenov S, Pham N, Egot-Lemaire S. Ferroelectric Nanoparticles for Contrast Enhancement Microwave Tomography: Feasibility Assessment for Detection of Lung Cancer. IFMBE Proceedings. 2009, 25/VIII: 311–313.
9. Kazuhiro Yasufuku. Early Lung Cancer: Methods for Detection. Interventions in Pulmonary Medicine. 2013, 211-219.
10. Shilpa B, Deepshikha PK, Swatantra KJ. Serum-based protein biomarkers for detection of lung cancer. Cent. Eur. J. Biol. 2014, 9(4): 341-358.
11. Al-Salhi M, Masilamani V, Vijmasi T, et al. Lung Cancer Detection by Native Fluorescence Spectra of Body Fluids-A Preliminary Study. J Fluoresc. 2011, 21(2):637–645.

12. Tan C, Chen H, Wu T. Classification Models for Detection of Lung Cancer Based on Nine Element Distribution of Urine Samples. Biol Trace Elem Res. 2011, 142(1):18–28.

13. Bajtarevic A, Ager C, Pienz M, et al. Noninvasive detection of lung cancer by analysis of exhaled breath. BMC Cancer. 2009, 9:348-353.

14. Banek S, Schwentner C, Tager D, et al. Prospective evaluation 0f fluorescence-in situ-hybridization to detect bladder cancer:Results from the uroscreen-study. Urol Oncol. 2013, 31(8):1656-1662.

15. Yilmaz Z, Sahin F, Atalay B, et al. Chromosome 1p36 and 22qter Deletions in Paraffin Block Sections of Intracranial Meningiomas. Pathol Oncol Res. 2005, 11(4): 224-228.

16. Hirose Y, Masaki Y, Ozaki M. Fluorescence In Situ Hybridization Detection of Chromosome IGH/BCL2 Translocations from Paraffin-Embedded Tissue: Evaluation in Follicular Lymphoma. Int J Hematol. 2003,78(2): 154-159.

17. Fang Z, Xiong Y, Li J, et al. APC gene deletions in gastric adenocarcinomas in a Chinese population:a correlation with tumour progression. Clin Transl Oncol. 2012, 14(1): 60-65.

18. Torres L, Ribeiro FR, Pandis N, et al. Intratumor genomic heterogeneity in breast cancer with clonal divergence between primary carcinomas and lymph node metastases. Breast Cancer Res Treat. 2007, 102(2):143–155.

19. Yi ES, Chung JH, Kulig K, et al. Detection of Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK) Gene Rearrangement in Non-Small Cell Lung Cancer and Related Issues in ALK Inhibitor Therapy. Mol Diagn Ther. 2012,16(3): 143-150.

20. Liu YZ, Wang Z, Fang LL, et al. A potential probe set of fluorescence in situ hybridization for detection of lung cancer in bronchial brushing specimens. J Cancer Res Clin Oncol. 2012, 138(9):1541–1549.

21. Katz RL, Zaidi TM, Fernandez RL, et al. Automated detection of genetic abnormalities combined with cytology in sputum is a sensitive predictor of lung cancer. Mod Pathol. 2008, 21(8): 950–960.

22. Yendamuri S, Vaporciyan AA, Zaidi T, et al. 3p22.1 and 10q22.3 Deletions Detected by Fluorescence In Situ Hybridization (FISH): A Potential New Tool for Early Detection of Non-small Cell Lung Cancer (NSCLC). J Thorac Oncol. 2008,3(9):979-984.

23. Barkan GA, Caraway NP, Jiang F, et al. Comparison of molecular abnormalities in bronchial brushings and tumor touch preparations. Cancer. 2005, 105(1):35–43.

24. Fan YB, Ye L, Wang TY, et al. Correlation between morphology and human telomerase gene amplification in bronchial brushing cells for the diagnosis of lung cancer. Diagn Cytopathol. 2010, 38(6):402–406.

25. Halling KC, Rickman OB, Kipp BR, et al. A comparison of cytology and fluorescence in situ hybridization for the detection of lung cancer in bronchoscopic specimens. Chest. 2006, 130(3):694–701.

26. Zhang YG, Jin ML, Li L, et al. Evaluation of ALK Rearrangement in Chinese Non-Small Cell Lung Cancer Using FISH, Immunohistochemistry, and Real-Time Quantitative RT- PCR on Paraffin-Embedded Tissues. PLoS One. 2013,8(5): e64821.

27. Yang P, Kulig K, Boland JM, et al. Worse disease-free survival in neversmokers with ALK+ lung adenocarcinoma. J Thorac Oncol. 2012, 7 (1):90-97.

28. Tanaka A, Sueoka-Aragane N, Nakamura T, et al. Co-existence of positive MET FISH status with EGFR mutations signifies poor

prognosis in lung adenocarcinoma patients. Lung Cancer. 2012, 75:89-94.

29. Zlobec I, Raineri I, Schneider S, et al. Assessment of mean EGFR gene copy number is a highly reproducible method for evaluating FISH in histological and cytological cancer specimens. Lung Cancer. 2010,68(2): 192–197.

30. Demirhan O, Tastemir D, Hasturk S, et al. Alterations in p16 and p53 genes and chromosomal findings in patients with lung cancer: Fluorescence in situ hybridization and cytogenetic studies. Cancer Epidemiol. 2010,34(4): 472–477.

31. Mescam-Mancini L, Lantuejoul S, Moro-Sibilot D, et al. On the relevance of a testing algorithm for the detection of ROS1-rearranged lung adenocarcinomas. Lung Cancer. 2014,83(2):168–173.

32. Oh JJ, Taschereau EO, Koegel AK, et al. RBM5/H37 tumor suppressor, located at the lung cancer hot spot 3p21.3,alters expression of genes involved in metastasis. Lung Cancer. 2010,70(3): 253–262.

作者简介:

代建丽，生物学硕士，讲师。2004年毕业于华南师范大学，武昌理工学院生物工程系教师。

吴萍，博士，副教授，博士生导师。1991-1996 同济医学大学本科，获学士学位；1999-2002 华中科技大学同济医学院病理生理学系，获硕士学位；2005-2008 华中科技大学同济医学院病理生理学系，获博士学位。1996-今，华中科技大学同济医学院病理生理学系。2007-2010，美国犹他大学医学院呼吸内科联合培养博士、博士后。先后获得两项国家自然科学基金项目，多项湖北省卫生厅、科技厅项目。

Epsins：肿瘤相关的重要内吞接头蛋白调节子

紀卫东(Weidong Ji)[1]　王敏(Wang Min)[1,2]

[1]中山大学附属第一医院(No.1 Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou, China).
[2]Department of Pathology, Yale University School of Medicine.

摘要

Epsins 是一类具有内吞作用的接头蛋白家族，其在人类多种肿瘤中表达上调，研究证实 Epsins 在肿瘤细胞增殖、肿瘤细胞侵袭和肿瘤血管生成中起着重要作用。Epsins 通过对表皮生长因子受体（EGFR）的调节和小 GTP 酶（Rho GTPase）信号的激活促进肿瘤细胞增殖、迁移和侵袭；Epsins 通过调节 VEGF 和 Notch 信号通路影响肿瘤血管生成。特异性抑制 Epsins 表达将为肿瘤治疗的靶向干预提供一种新的策略。

关键词

Epsins; 肿瘤；内吞接头蛋白；信号通路

前言

肿瘤细胞增殖、迁移和肿瘤血管生成是涉及肿瘤相关蛋白的表达改变和各种信号通路失控所致的累积效应。其中，细胞内吞作用异常是导致细胞恶性转化的重要机制之一。一方面，一些细胞内吞蛋白如 Dab2、Nunb 等功能失活导致细胞内吞缺陷及相关受体信号的持续激活促进肿瘤的发生发展；另一方面，一些内吞蛋白形成融合蛋白如 CALM、AF10，或者内吞接头蛋白表达异常升高如 Epsins 亦导致肿瘤的进展 [1,2] 。Epsins 是一类由 clathrin 介导细胞内吞的接头蛋白小家族，其在皮肤癌、乳腺癌和肺癌等肿瘤中表达升高，并介导 EGFR 、小 GTP 酶、VEGF 和 Notch 信号通路参与肿瘤的发生发展 [3,4]。本文将讨论内吞接头蛋白 Epsins 在肿瘤进展中的作用及分子机制，为其作为肿瘤治疗潜在靶点提供新的见解。

Epsins 蛋白家族概述

Epsins 是含酵母 epsins（ENT1 和 ENT2），黑腹果蝇 epsins（称为液体胭脂）和哺乳动物 epsins（EPN1，EPN2 和 Epn3）的一个进化上保守的蛋白家庭。哺乳动物 Epsin1 和 Epsin2 广泛表达在各种组织中，其中大脑组织中表达最高 [5,6]。与此相反，而 Epsin 3 只限于表达特定的组织细胞中如迁移的角质细胞、胃壁细胞等 [7,8]。Epsin 包含三个结构域和一个基序，分别为 ENTH 结构域、DPW 结构域、NPF 结构域及泛素相互作用基序（UIM）。在氨基末端，epsins 包含一个高度保守的，约 150 个氨基酸长的 epsin N 端同源性区域（ENTH），X 晶体衍射及 NMR 光谱分析发现哺乳动物 ENTH 结构域为一超螺旋折叠，有七个 α 螺旋，第八个螺旋线与超螺旋轴错位。ENTH 结构域结合于细胞膜上 4,5-二磷酸磷脂酰肌醇（PI(4,5)P2），研究表明这种相互作用诱导一个显著的构象变化，导致形成一个额外 N-末端 α-螺旋，helix0（α0）[9-11]。由于它的亲水亲脂性质，α0 插入到质膜的胞质内和促进膜弯曲，这一过程被认为是膜朝向的网格蛋白小窝（CCPs）内陷和囊泡包裹网格蛋白形成的最初步骤之一 [12-15]。在 Epsin 羧基端的 NPF 结构域结合于 EH 结构域蛋白如 Eps15、Intersectin、POB1 等 [15,16]；而其 DPW 结构域包含 clathrin/Ap-2 结合位点，并可募集相关蛋白参与 clathrin 介导的细胞内吞作用 [5,17,18]。由于 Epsin 具有泛素相互作用基序

（UIM），主要与泛素化的膜蛋白相互作用，识别泛素化膜蛋白，并募集至与其相互作用的clathrin 的凹面，通过内吞作用，使得膜蛋白发生内在化（Internalization），因此，Epsin 又被称为特异的货物接头蛋白（Cargo-specific adaptor protein)（图 1），在特异的货物信号通路中发挥重要作用 [19-21]。Epsins 通过其特定结构域和基序参与细胞增殖、分化、迁移和血管生成等事件的信号调控。

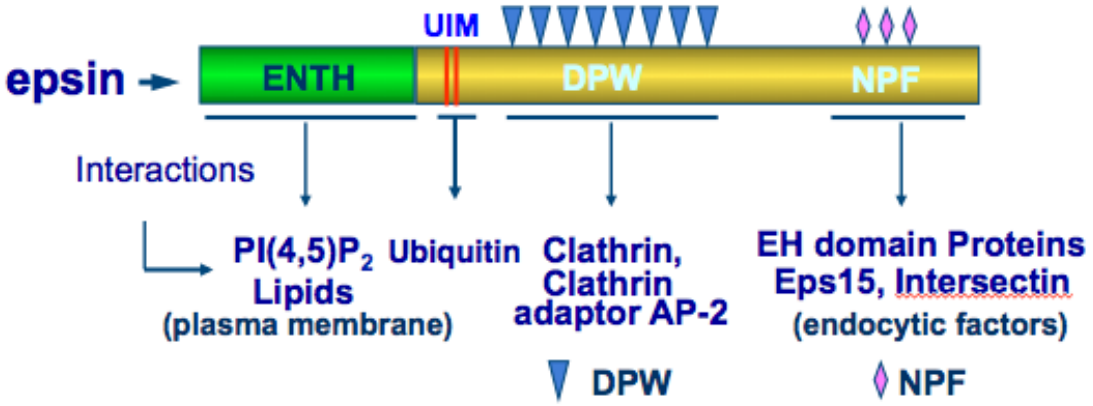


图 1　Epsins 蛋白结构域及其相互作用蛋白

Epsins 通过 EGFR 促进肿瘤细胞增殖

表皮生长因子受体 (EGFR，ErbB) 酪氨酸激酶家族在多种肿瘤中有表达或高表达，在特异性配体的诱导下能够发生家族成员的二聚化，从而激活细胞内下游信号转导途径，调控细胞的增殖、分化、迁移等生物效应。异常的 EGFR 信号与肿瘤的发生、发展有着密切的关系。研究揭示 EGFR 结合配体使其细胞外结构域不仅诱导下游信号传导，同时也促进了受体的内吞作用。表皮生长因子受体激酶活性是通过早期核内体在网格蛋白 Clathrin 介导的内吞作用得以维持，而泛素化的表皮生长因子受体的内化又依赖于 Epsin，并要求与其基序 UIMS 的结合 [22,23]。EGF 刺激诱导 EGFR 的泛素化并随后与 Epsins 相互作用，Epsins 有利于募集 EGFR 到网格蛋白 Clathrin 覆盖小窝进行内化 [24]。Epsins 与表皮生长因子受体相互作用的会显著改变 EGF 信号，从而影响肿瘤细胞增殖。

Epsins 通过激活小 GTP 酶促进肿瘤细胞迁移和侵袭

肿瘤细胞浸润在很大程度上依赖于肿瘤细胞是否得到传播和侵入周围组织的能力。在侵袭阶段，迁移的肿瘤细胞进入血液循环并最终传播到其他远处器官。细胞迁移在很大程度上取决于一个有效的肌动蛋白网络以促进细胞的极性并调控伪足的形成和回缩。对这一过程精确调节的分子机制非常复杂，涉及胞内多条信号转导通路。在多条信号级连反应通路中，小 GTP 酶尤其是 RhoA、Rac1 和 Cdc42 是关键的调控因子，主要参与对细胞形态改变，细胞形态改变和伪足形成是侵袭转移的起始步骤。Rac 可诱导质膜突起形成片状样的层状伪足，而 Cdc42 诱导指头样突起的丝状伪足形成。小 GTP 酶参与细胞与基质粘附及细胞骨架重组的调控，调节肿瘤细胞的侵袭转移过程 [25]。研究发现 Epsins 的 ENTH 结构域与 Cdc42 / Rac1 活化蛋白 GAP 和 Ral 结合蛋白 1（RalBP1）相互作用，而 GAP 可加速小 GTP 酶的水解，使小 GTP 酶由活性状态变为无活性

状态，Epsins 与 GAP 和 RalBP1 的相互作用可解除 GAP 诱导的 Cdc42 / Rac1 的失活，从而促进 Cdc42 / Rac1 的信号激活 [26-29]。定点突变 Epsins 的 ENTH 结构域位点（ENTHY100R 和 ENTHT104D）导致 Cdc42 活性降低、细胞活力减少和肌动蛋白细胞骨架的去极化 [28]；RNA 干扰介导 Epsins 基因敲低导致 Rac1 的激活缺陷。同时研究揭示 Epsins 富集于迁移细胞的前缘，且 Epsin-3 在迁移角质形成细胞中选择性地表达，过表达 epsins 增强细胞迁移和侵袭 [30-32]。可见，Epsins 通过激活小 GTP 酶在肿瘤细胞迁移和侵袭过程中起重要作用。

Epsins 通过调节 VEGF 和 Notch 促进肿瘤血管生成

肿瘤血管生成是肿瘤发生的一个重要驱动力，增强的肿瘤脉管系统网络可确保足够的氧和营养物质输送到大部分缺氧和需要能量的肿瘤细胞，从而促进肿瘤持续的生长。在肿瘤微环境中，肿瘤血管新生和淋巴管新生的过程受多个信号系统和基因的调控，包括 VEGF/VEGFRs、bFGF/FGFRs、PDGF/PDGFRs、Delta（Dll4）/Notch、eph/ephrins、血管生成素等。其中 VEGF 和 Dll4/Notch 信号通路在血管发育、肿瘤血管、淋巴管新生方面发挥着重要作用 [33]。VEGF 信号通路促进血管、淋巴管内皮出芽，而 Dll4/Notch 信号通路可抑制过强的 VEGF 信号引起的内皮过度生长。因此，VEGF 和 Notch 两条信号通路的交互作用形成的负反馈环对于肿瘤生长和转移过程中所必需的功能性血管和淋巴管新生具有重要作用 [34]。

研究表明 Epsin1，Epsin2 （DKO）双敲除，而不是单一的 Epsins1 或 Epsins2 （SKO）的敲除会导致胚胎第 10 天（E10）发生死亡，通过对胚体、胎盘和卵黄囊的检查发现由于 Notch 基因缺失导致的严重的血管缺陷，进一步的研究证实了在 E9 胚胎中 Epsins 的缺失会损伤 Notch 信号通路 [35]。机制研究揭示 Epsins 促进 Notch 信号活化所需的内化和蛋白水解，Notch 信号的活化依赖于溶蛋白性裂解和 Notch 受体胞内结构域（NICD）的释放。裂解依赖于由 Notch 配体-Dll4 作用的 Notch 受体胞外结构域（NECD）的胞吞作用。而胞吞作用是依赖于 Dll4 的泛素化，Dll4 的配体依赖性泛素化为 Epsins UIM 结合结构域提供了一个对接部位，从而为 Notch NECD 域的胞吞作用和 Notch 激活提供了一个配体依赖性机制 [36]。

新近，我们首次证实了血管内皮细胞 Epsin 缺失可通过增强 VEGF 信号而抑制肿瘤生长。研究表明，尽管生殖系 Epsin1，Epsin2 敲除可致胚胎致死，而用 Cre 小鼠产生的内皮细胞特异性 Epsin1，Epsin2 敲除小鼠在正常条件下无异常表型。表明血管成熟后，内皮 Epsin 缺失不影响静息期血管，但皮下及原位前脑注射肿瘤细胞至这些小鼠，发现异常血管结构，伴有通透性增加，显著抑制肿瘤生长，提示 Epsin 通过在肿瘤微环境中调控肿瘤生长 [37]。机制研究进一步揭示，Epsin 可通过 UIM 与泛素化的 VEGFR2 结合介导其内吞。Epsin 缺失干扰了 VEGF 诱导的 VEGFR2 的内吞从而在肿瘤血管中失去了对增强的 VEGF 信号的抑制，导致血管渗漏，肿瘤血管新生障碍，抑制肿瘤的生长。由于 Epsin 是 Notch 信号通路的关键调节子，我们又进一步证实 Notch 不能回复因内皮细胞 Epsin1 和 2 的缺失而引起的增强了的 VEGFR2 信号的和功能异常的肿瘤血管新生，提示 Epsin 介导的 Notch 信号和 VEGFR2 信号可能是平行或上位模式，即 Epsins 调节 VEGFR2 是 Epsins 调节 Notch 信号的上游分子事件 [38,39]。上述结果表明 Epsins 在通过配体介导的泛素化和 VEGFR2 的内化和 Notch NECD 的胞吞作用在调节肿瘤血管生成中发挥着重要作用。

结论与展望

总之，Epsins 不仅通过介导 EGFR 、小 GTP 酶信号通路促进肿瘤细胞增殖、迁移/侵袭，而且可通过肿瘤微环境介导内皮细胞 VEGF 和 Notch 信号通路促进肿瘤血管发生。鉴于 Epsins 涉及数个重叠的信号级联反应，而这些反应涉及信号受体与肿瘤的发生发展密切相关，因此，基于拮抗 Epsins 特定结构域或基序的干预措施将为肿瘤的靶向治疗提供新的策略。

【参考文献】

1 Mellman, I. & Yarden, Y. Endocytosis and cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**, a016949, oi:10.1101/cshperspect.a016949 a016949 [pii]5/12/a016949 [pii] (2013).
2 Kahlert, C. & Kalluri, R. Exosomes in tumor microenvironment influence cancer progression and metastasis. *J Mol Med (Berl)* **91**, 431-437, doi:10.1007/s00109-013-1020-6 (2013).
3 Tessneer, K. L. *et al.* Epsin Family of Endocytic Adaptor Proteins as Oncogenic Regulators of Cancer Progression. *J Can Res Updates* **2**, 144-150, doi:10.6000/1929-2279.2013.02.03.2 (2013).
4 Sen, A., Madhivanan, K., Mukherjee, D. & Aguilar, R. C. The epsin protein family: coordinators of endocytosis and signaling. *Biomol Concepts* **3**, 117-126, doi:10.1515/bmc-2011-0060 (2012).
5 Chen, H. *et al.* Epsin is an EH-domain-binding protein implicated in clathrin-mediated endocytosis. *Nature* **394**, 793-797, doi:10.1038/29555 (1998).
6 Rosenthal, J. A. *et al.* The epsins define a family of proteins that interact with components of the clathrin coat and contain a new protein module. *J Biol Chem* **274**, 33959-33965 (1999).
7 Ko, G. *et al.* Selective high-level expression of epsin 3 in gastric parietal cells, where it is localized at endocytic sites of apical canaliculi. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 21511-21516, doi:10.1073/pnas.1016390107 1016390107 [pii] (2010).
8 Spradling, K. D., McDaniel, A. E., Lohi, J. & Pilcher, B. K. Epsin 3 is a novel extracellular matrix-induced transcript specific to wounded epithelia. *J Biol Chem* **276**,29257-29267, doi:10.1074/jbc.M101663200 M101663200 [pii] (2001).
9 Hyman, J., Chen, H., Di Fiore, P. P., De Camilli, P. & Brunger, A. T. Epsin 1 undergoes nucleocytosolic shuttling and its eps15 interactor NH(2)-terminal homology (ENTH) domain, structurally similar to Armadillo and HEAT repeats, interacts with the transcription factor promyelocytic leukemia Zn(2)+ finger protein (PLZF). *J Cell Biol* **149**, 537-546 (2000).
10 Itoh, T. *et al.* Role of the ENTH domain in phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate binding and endocytosis. *Science* **291**, 1047-1051, doi:10.1126/science.291.5506.1047 291/5506/1047 [pii] (2001).
11 Ford, M. G. *et al.* Curvature of clathrin-coated pits driven by epsin. *Nature* **419**, 361-366, doi:10.1038/nature01020 nature01020 [pii] (2002).
12 Kweon, D. H. *et al.* Membrane topology of helix 0 of the Epsin N-terminal homology domain. *Mol Cells* **21**, 428-435, doi:990 [pii] (2006).
13 Horvath, C. A., Vanden Broeck, D., Boulet, G. A., Bogers, J. & De Wolf, M. J. Epsin: inducing membrane curvature. Int J Biochem Cell Biol 39, 1765-1770, doi:S1357-2725(06)00352-9 [pii] 10.1016/j.biocel.2006.12.004 (2007).
14 Hurley, J. H. & Wendland, B. Endocytosis: driving membranes around the bend. *Cell* **111**, 143-146, doi:S0092867402010449 [pii] (2002).
15 Yamabhai, M. *et al.* Intersectin, a novel adaptor protein with two Eps15 homology and five Src homology 3 domains. *J Biol Chem* **273**, 31401-31407 (1998).
16 Morinaka, K. *et al.* Epsin binds to the EH domain of POB1 and regulates receptor-mediated endocytosis. *Oncogene* **18**, 5915-5922, doi:10.1038/sj.onc.1202974 (1999).
17 Wendland, B. Epsins: adaptors in endocytosis? *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 971-977, doi:10.1038/nrm970nrm970 [pii] (2002).
18 Traub, L. M., Downs, M. A., Westrich, J. L. & Fremont, D. H. Crystal structure of the alpha appendage of AP-2 reveals a recruitment platform for clathrin-coat assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 8907-8912 (1999).
19 Huang, F., Kirkpatrick, D., Jiang, X., Gygi, S. & Sorkin, A. Differential regulation of EGF receptor internalization and degradation by multiubiquitination within the kinase domain. *Mol Cell* **21**, 737-748, doi:S1097-2765(06)00120-1 [pii] 10.1016/j.molcel.2006.02.018 (2006).
20 Sugiyama, S., Kishida, S., Chayama, K., Koyama, S. & Kikuchi, A. Ubiquitin-

interacting motifs of Epsin are involved in the regulation of insulin-dependent endocytosis. *J Biochem* **137**, 355-364, doi:137/3/355 [pii] 10.1093/jb/mvi044 (2005).

21 Hawryluk, M. J. *et al.* Epsin 1 is a polyubiquitin-selective clathrin-associated sorting protein. *Traffic* **7**, 262-281, doi:TRA383 [pii] 10.1111/j. 1600-0854.2006.00383.x (2006).

22 Sigismund, S. *et al.* Clathrin-independent endocytosis of ubiquitinated cargos. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 2760-2765, doi:0409817102 [pii] 10.1073/pnas.0409817102 (2005).

23 Kazazic, M. *et al.* Epsin 1 is involved in recruitment of ubiquitinated EGF receptors into clathrin-coated pits. *Traffic* **10**, 235-245,doi:10.1111/j.1600-854.2008.00858.x TRA858 [pii] (2009).

24 Bertelsen, V. *et al.* A chimeric pre-ubiquitinated EGF receptor is constitutively endocytosed in a clathrin-dependent, but kinase-independent manner. *Traffic* **12**, 507-520, doi:10.1111/j.1600-0854.2011.01162.x (2011).

25 Ridley, A. J. Rho proteins: linking signaling with membrane trafficking. Traffic 2, 303-310, doi:tra020502 [pii] (2001).

26 Rosse, C., L'Hoste, S., Offner, N., Picard, A. & Camonis, J. RLIP, an effector of the Ral GTPases, is a platform for Cdk1 to phosphorylate epsin during the switch off of endocytosis in mitosis. J Biol Chem 278, 30597-30604, doi:10.1074/jbc.M302191200 M302191200 [pii] (2003).

27 Mukherjee, D. et al. The yeast endocytic protein Epsin 2 functions in a cell-division signaling pathway. J Cell Sci 122, 2453-2463, doi:10.1242/jcs.041137 jcs.041137 [pii] (2009).

28 Aguilar, R. C. et al. Epsin N-terminal homology domains perform an essential function regulating Cdc42 through binding Cdc42 GTPase-activating proteins. Proc Natl Acad Sci U S A 103, 4116-4121, doi:0510513103 [pii] 10.1073/pnas.0510513103 (2006).

29 Jenna, S. et al. The activity of the GTPase-activating protein CdGAP is regulated by the endocytic protein intersectin. *J Biol Chem***277**,6366-6373, doi:10.1074/jbc.M105516200 M105516200 [pii] (2002).

30 Coon, B. G., Burgner, J., Camonis, J. H. & Aguilar, R. C. The epsin family of endocytic adaptors promotes fibrosarcoma migration and invasion. J Biol Chem 285, 33073-33081, doi:10.1074/jbc.M110.124123 M110.124123 [pii] (2010).

31 Wang, Y. et al. Profiling signaling polarity in chemotactic cells. Proc Natl Acad Sci U S A 104, 8328-8333, doi:0701103104 [pii] 10.1073/pnas.0701103104 (2007).

32 Coon, B. G., Direnzo, D. M., Konieczny, S. F. & Aguilar, R. C. Epsins' novel role in cancer cell invasion. Commun Integr Biol 4, 95-97, doi:10.4161/cib.4.1.14129 (2011).

33 Kerbel, R. S. Tumor angiogenesis. N Engl JMed358,2039-2049, doi:10.1056/NEJMra0706596 358/19/2039 [pii] (2008).

34 Lobov, I. B. et al. Delta-like ligand 4 (Dll4) is induced by VEGF as a negative regulator of angiogenic sprouting. Proc Natl Acad Sci U S A 104, 3219-3224, doi:0611206104 [pii] 10.1073/pnas.0611206104 (2007).

35 Chen, H. et al. Embryonic arrest at midgestation and disruption of Notch signaling produced by the absence of both epsin 1 and epsin 2 in mice. Proc Natl Acad Sci U S A 106, 13838-13843, doi:10.1073/pnas.0907008106 0907008106 [pii] (2009).

36 Tian, X., Hansen, D., Schedl, T. & Skeath, J. B. Epsin potentiates Notch pathway activity in Drosophila and C. elegans. Development 131, 5807-5815, doi:131/23/5807 [pii] 10.1242/dev.01459 (2004).

37 Tessneer, K. L. et al. Endocytic adaptor protein epsin is elevated in prostate cancer and required for cancer progression. ISRN oncology 2013, 420597, doi:10.1155/2013/420597 (2013).

38 Pasula, S. et al. Endothelial epsin deficiency decreases tumor growth by enhancing VEGF signaling. J Clin Invest 122, 4424-4438, doi:10.1172/JCI64537
64537 [pii] (2012).

39 Klauber-Demore, N. Are epsins a therapeutic target for tumor angiogenesis? J Clin Invest 122, 4341-4343, doi:10.1172/JCI6617166171 [pii] (2012).

作者简介：

王 敏 博士，美国耶鲁大学医学院病理系终身教授。博士毕业于英国University of Wales。现任中山大学附属第一医院转化医学中心主任，教授，博士生导师；耶鲁大学医学院病理系研究生招生委员会主任，耶鲁大学病理学研讨会主任，美国国立卫生研究院（NIH）研究部（AICS）常务委员，美国国立卫生研究院（NIH）基金评审专家，美国国立卫生研究院“肿瘤微环境”特别成员，美国心脏协会（AHA）国家基金评审专家，中国“973”项目评审专家。*Science*，*Nature Medicine*, *J. Clin. Invest.*等十多个著名杂志特聘审稿专家；*Arterioscler Thromb Vasc Biol* 杂志编委。*Arterioscler Thromb Vasc Biol* 杂志编委。长期从事炎症及血管生物的信号传导通路的基础研究，在炎症、新生血管的信号传导途径及抗炎、抗新生血管的研究中取得许多重要的发现。在 *Nature Biotechnology*，*JCI*，*JEM*, *Science Signaling*, *Cell*, *PNAS* 等国际顶级期刊发表论文 90 余篇。获得美国专利一项，三项在申请中。总科研经费达 1800 余万美元。

ADAMTS 在关节炎中的作用

Role of ADAMTS in Arthritis

蔚建鲁 [1]　刘传聚 [1,2]

（纽约大学医学院）

1.Department of Orthopaedic Surgery, New York University Medical Center, New York, NY 10003, USA

2.Department of Cell Biology, New York University Medical Center, New York, NY 10003, USA

摘要

含 I 型血小板蛋白结合基序的解聚蛋白样金属蛋白酶 (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs，ADAMTS)家族是一类新的 Zn^{2+}依赖的金属蛋白酶家族，它们广泛存在于哺乳动物和无脊椎动物体内。自从 1997 年发现第一个 ADAMTSs 家族成员以来，迄今为止共有 19 个 ADAMTS 成员被发现。这些蛋白酶在个体发育、血管生成和凝血等生理过程中发挥着重要的作用，这些酶的异常调节和突变可导致多种疾病的发生发展，如炎症、肿瘤、关节炎和动脉粥样硬化等。本文综述了 ADAMTSs 的结构及其在关节炎中的作用。

Abstract

The a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs (ADAMTS) family is a new Zn^{2+} dependent metalloproteinase family, which widely exists in mammal and invertebrate animals. ADAMTS family was first identified in 1997, since that time the ADAMTS family has grown to include 19 members. These enzymes are known to play an important role in development, angiogenesis and coagulation. Dysregulation and mutation of these enzymes have been implicated in many disease processes, such as inflammation, tumor, arthritis and atherosclerosis. This review summarizes the structure of ADAMTS and the role of ADAMTS in arthritis.

关键词

ADAMTS， 金属蛋白酶， 关节炎

前言：

关节炎泛指发生在人体关节及其周围组织的炎性疾病，此疾病以关节损坏为特点，从而导致慢性疼痛和关节僵硬 [1]。关节炎可分为数十种，其中骨关节炎（osteoarthritis，OA）和类风湿性关节炎（rheumatoid arthritis, RA）是两种主要的类型。骨关节炎是关节炎中最主要的类型，主要发生在大关节，以关节软骨逐渐丢失，同时软骨下骨重构，骨赘形成为主要特点。类风湿性关节炎是一种以慢性滑膜炎症为主要特点的多关节自身免疫性疾病，主要影响小关节，可导致关节及关节周围组织的损害。关节软骨损害是 OA 和 RA 的共同特点，而这一过程与蛋白酶降解细胞外基质（extracelluar matrix, ECM）成分有关。ADAMTS 中有可以降解细胞外基质的家族成员，并且，ADAMTSs 在 OA 和 RA 中的作用已被广泛认可。虽然现在对于 ADAMTS 家族中某些成员的结构和功能的认识有了很大的进展，但是这些分子在关节炎中的具体机制还没有完全了解。

本综述总结了已知的在关节炎中发挥作用的ADAMTS家族成员：ADAMTS-4，-5，-7及-12的结构和功能。

ADAMTS的结构

ADAMTS的家族成员大多以无活性的酶原形式存在，而且由于不同的剪接方式可产生多种异构体。一般来说，ADAMTS的结构包括信号肽，前结构域，金属蛋白酶催化结构域，解聚样结构域，中央TSP重复序列，半胱氨酸富集结构域，间隔接结构域和C端的具有可变数目的TSP重复序列[2]（图1）。尽管ADAMTS的催化结构域与基质金属蛋白酶（matrix metalloproteinases, MMPs）的催化区有相似的结构，但是MMPs并不具备ADAMTS家族其他的结构特点，并且，与MMPs相比，ADAMTS的底物谱相对狭窄。ADAMTS家族成员C端的TSP序列对于结合细胞外基质成分有十分重要的作用，其重复数目可由0（ADAMTS-4）到14（ADAMTS-20）。ADAMTS-4没有C端的TSP重复序列，它通过C端的间隔结构域同细胞外基质成分结合。大多数ADAMTS家族成员经过N端加工，即移除信号肽和前结构域后激活，而ADAMTS-13则可以在前结构域依然存在的条件下被激活。ADAMTS也可以对C端加工，即切割间隔结构域，这种加工对于ADAMTS的底物特异性和定位具有十分重要的作用。

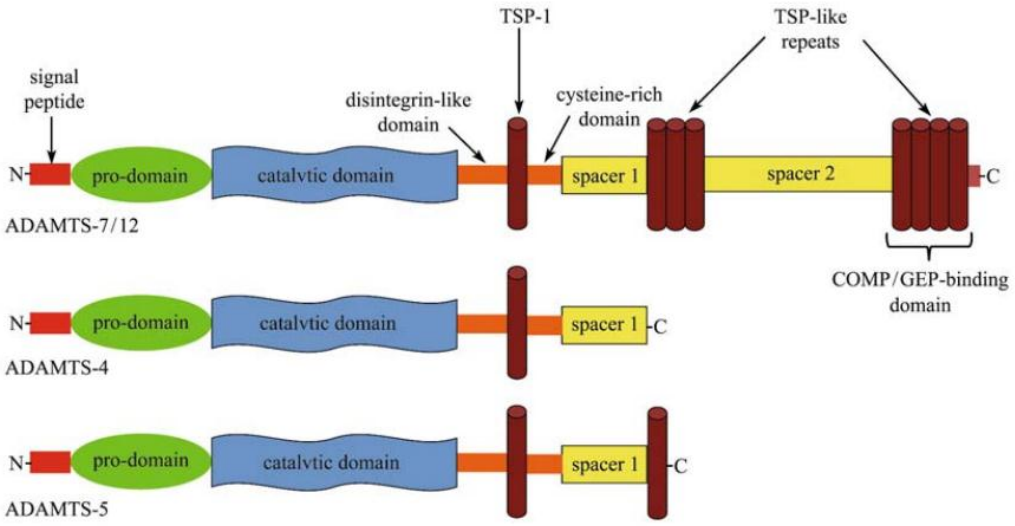


图1：ADAMTS-4，-5，-7和-12的结构示意图

ADAMTS家族成员基于他们结构和功能的相似性被分为四个亚型[3]，I型包括ADAMTS-1，-4，-5，-8，-15，-9和-20，II型包括ADAMTS-2，-3,-14，III型包括ADAMTS-13，IV型由四小组结构相似的ADAMTS构成，包括ADAMTS-17和-19，ADAMTS-16和-18，ADAMTS-7和-12，以及ADAMTS-6和-10。

ADAMTS−4和−5

蛋白多糖（aggrecan）是关节软骨的主要成分，并在保护胶原不受降解的过程中发挥了关键性的作用。蛋白多糖通过和透明质酸及连接蛋白相互作用，形成了一个聚集的复合物，填充与细胞外基质胶原中。蛋白多糖含有多个粘多糖（glycosaminoglycan， GAG）侧链，而GAG能够保护II型胶原在水存在的情况下免受膨胀损害[4]。

蛋白多糖的降解在关节炎疾病发生和进展过程中发挥着关键的作用。ADAMTS-1，-4，-5，-8，-9，-15，-16，-18 可以切割蛋白多糖。然而 ADAMTS-1，-8，-9，-15，-16 和-18 的蛋白多糖酶的活性非常低，因此，ADAMTS-4 和-5 成为了主要的蛋白多糖酶。ADAMTS-4 能够通过其 C 端的间隔结构域与细胞外基质的纤连蛋白相结合。而 ADAMTS-4 经过 C 端的蛋白水解加工作用，由 74KDa 大小的全长蛋白加工成为 60KDa 和 50KDa 大小的异构体，同时打破了 ADAMTS-4 和纤连蛋白的结合。而且，全长的 ADAMTS-4 在 Glu^{1480}-Gly^{1481} 位点切割蛋白多糖，而加工后的异构体在 Glu^{373}-Ala^{374} 位点切割蛋白多糖。ADAMTS-4 的蛋白多糖酶的活性依赖于特异性结合于蛋白多糖的 GAG 侧链，有证据表明，ADAMTS-4 的半胱氨酸富集结构域和/或间隔结构域能够同 GAG 相互结合。ADAMTS-4 与纤连蛋白的相互作用能够抑制 ADAMTS-4 的蛋白多糖酶的活性，而且纤连蛋白同蛋白多糖均可与 ADAMTS-4C 端的间隔结构域相互作用，这提示纤连蛋白能够与蛋白多糖竞争性的与 ADAMTS-4 结合。同时，ADAMTS-4 同时能够通过其 TSP 重复序列与蛋白多糖的 GAG 侧链结合，而且这种结合对于 ADAMTS-4 的蛋白多糖酶的活性是必须的[5]。

ADAMTS-4 和 ADAMTS-5 可在 Glu^{373}-Ala^{374} 以及其他四个位点切割蛋白多糖，而且体外实验表明在其他四个位点的切割效率要高于 Glu^{373}-Ala^{374} 位点的切割效率，然而，在 Glu^{373}-Ala^{374} 位点的切割对于关节炎的病理发生发展更为重要。因为此位点完整性的丧失可以导致整个蛋白多糖的丧失，进而损伤关节的完整性和功能。而且，在此位点的蛋白多糖的切割被认为是关节炎活动性的一个可靠指标，同时，在骨关节炎病人的滑膜液中已经鉴定出由此位点切割而产生的蛋白多糖片段。在 Glu^{373}-Ala^{374} 位点具有切割抗性的基因修饰小鼠的骨关节炎和炎症性关节炎模型中发现，蛋白多糖的损失和关节腐蚀的程度同野生型小鼠相比大大减轻。

将牛关节软骨用 IL-1 和 TNF-α 处理，产生的蛋白多糖片段同 ADAMTS-4 和-5 介导切割所产生的片段相同。这些片段在正常的关节软骨中也存在，而且随年龄的增长而增加。在损伤的关节软骨及暴露于 ADAMTS-4 和-5 的软骨中均发现这些片段表达水平升高。

尽管体外实验表明 ADAMTS-4 能有效切割蛋白多糖，ADAMTS-4 敲基因小鼠并不能使蛋白多糖免受损失。然而，ADAMTS-5 敲基因小鼠能够保护免受滑膜炎，减轻关节损伤。因此，ADAMTS-5 被认为是小鼠关节炎中主要的关节损害调节介质。而且，在小鼠中，IL-1α 能够显著提高 ADAMTS-5 的表达，而不能显著提高 ADAMTS-4 的表达。

尽管 ADAMTS-5 在小鼠关节炎模型的发生发展中发挥着主要作用，然而研究表明 ADAMTS-4 在人关节炎中发挥着主要作用。例如，ADAMTS-5 的基因突变并不能影响骨关节炎的易感性；将人的软骨细胞或软骨经过 IL-1β 或 TNF-α 处理，能够大量诱导 ADAMTS-4 的表达，同时仅能轻度提高 ADAMTS-5 的表达。同时，一些研究表明只有 ADAMTS-4 在骨关节炎的软骨中表达升高。也有一些研究发现，ADAMTS-4 和-5 在人骨关节炎软骨中均大量表达，而且 ADAMTS-4 和-5 在正常和骨关节炎的软骨中均能导致蛋白多糖的降解。因此，ADAMTS-5 在小鼠关节炎中发挥重要作用，而 ADAMTS-4 或者 ADAMTS-4 和-5 在人关节炎中发挥着关键性作用[6]。

ADAMTS-4 能够被一些内源性分子所诱导，如 IL-1，TNF-α，OSM，TGF-β 等，这些细胞因子均能提高软骨移植物中 ADAMTS-4 的表达。有意思的是，这些细胞因子并不能诱导 ADAMTS-5 的表达。在人软骨细胞系中，IL-1α 和 OSM 共同作用可以提高 ADAMTS-4 的表达，而在 IL-1α 单独作用下就可以提高 ADAMTS-5 的表达。这表明 ADAMTS-4 和 ADAMTS-5 可被不同的信号通路所调节。与上述猜想相一致的是，在人滑膜细胞中，ADAMTS-4 的表达可被 TNF-α 阻断剂或 IL-1β 抗体所抑制，而这些抑制剂对 ADAMTS-5 的表达没有影响[7]。

ADAMTS-4 和-5 的活性也被其他内源性因子所调节，如 PACE-4 是由人骨关节炎中的软骨细胞分泌的一种前蛋白转化酶，能够激活 ADAMTS-4 和-5。而 PACE-4 不在健康关节软骨中表达[8]。

Syndecan-4 属于粘附分子整合素跨膜粘结蛋白（heparan sulfate proteoglycan，HSPG）家族，能够调节 ADAMTS-5 的活性。Syndecan-4 可以直接通过蛋白质-蛋白质相互作用，或者通过修饰 MAPK 信号通路调节 MMP-3 的合成来激活 ADAMTS-5。在 Syndecan-4 敲基因小鼠中发现，MMP-3 表达下降，并且阻断 MMP-3 的活性能够降低 ADAMTS-4 和-5 的活性，但是其中的分子机制尚不明确。值得注意的是，Syndecan-4 敲基因小鼠能够保护避免关节损伤，提示临床上 Syndecan-4 和 ADAMTS-5 对骨关节炎的病理过程具有潜在的相关性[9]。

ADAMTS-4 和-5 也具有其他的功能，他们可以切割人的双糖链蛋白多糖（biglcan）。双糖链蛋白多糖可以与 VI 型胶原相互作用，并在建立 VI 型胶原网络中发挥作用。双糖链蛋白多糖降解产物出现在骨关节炎和类风湿性关节炎病人的关节软骨中，然而，这个发现是否具有功能重要性仍然不是很清楚[10]。

ADAMTS-7 和-12

ADAMTS-7 和-12 是最近发现的结构相似的 ADAMTS 家族成员。有证据表明 ADAMTS-7 和-12 在关节炎病理过程中发挥着重要的作用。研究发现，ADAMTS-7 和-12 在类风湿性关节炎病人的关节软骨中表达显著升高，而在骨关节炎病人的关节软骨中，仅有 ADAMTS-12 的表达显著升高。在人关节软骨移植物培养中，TNF-α 和 IL-1β 均能显著诱导 ADAMTS-7 和-12 的表达，有趣的是，这些细胞因子在人胎儿纤维母细胞中不能诱导 ADAMTS-12 的表达，表明细胞因子诱导的 ADAMTS 的表达具有组织细胞特异性。

ADAMTS-7 和-12 在软骨发育过程中发挥着作用，ADAMTS-7 和-12 异常调节或基因改变可导致软骨发育异常，从而导致关节疾病的发生。有报道称 ADAMTS-7 和-12 可以作为甲状旁腺激素相关多肽（parathyroid hormone related peptide，PTHrP）信号通路的下游分子，负向调控软骨细胞生成。ADAMTS-7 和-12 主要在胚胎生长板的增生性软骨细胞和前肥大性软骨细胞中表达，而在 PTHrP 敲基因小鼠的胚胎中几乎检测不到 ADAMTS-7 和-12 的表达。而且，在软骨细胞中过表达 ADAMTS-7 和-12，软骨化过程中的早期标志物（Col II 和 Sox9）和晚期标志物（Col X）的表达均被抑制，相反的是，PTHrP 的表达显著提高。与此相一致的是，抑制 ADAMTS-7 和-12 的表达时，PTHrP 表达下降，而恢复 ADAMTS-7 和-12 的表达后可以恢复 PTHrP 的作用。值得注意的是，ADAMTS-7 和-12 负向调控软骨细胞分化的作用依赖于它们的酶活性[11]。

E 型指过短（brachydactyly type E，BDE）是一种常染色体显性遗传病，以双侧掌骨，指骨和跖骨短小为主要临床表现。在 BDE 病人中研究发现，其软骨分化过程异常，且 PTHrP 以及其下游分子 ADAMTS-7 和-12 的表达显著下降。进一步研究发现，在 BDE 病人分化的软骨细胞中，软骨化标志物的表达均发生了显著的改变。这些证据表明，ADAMTS-7 和-12 对于肢体正常发育具有重要意义[12]。

关节炎的病理过程以蛋白酶降解细胞外基质蛋白为特点，而 ADAMTS-7 和-12 能够降解关节寡聚基质蛋白（cartilage oligomeric matrix protein ，COMP）。COMP 是一个 524KDa 大小的由二硫键连接的多结构域的糖蛋白，是软骨细胞外基质的一种成份。人类 COMP 基因突变与常染色体显性遗传肢体短小型疾病有关，如多发性骨骺发育不良，假性软骨发育不全等。现在的研究表明，COMP 可以通过整联蛋白受体（integrin receptor）来调节软骨细胞的粘附，同时可以通过与细胞外基质成份如 II 型胶原，IX 型胶原，蛋白多糖，纤连蛋白的特异性相互作用，来稳定细胞外基质[13]。

ADAMTS-7 和-12 与关节炎有相关性是因为他们可以降解 COMP。在损伤关节的软骨，滑

膜液以及病人血清中可检测到 COMP 片断，而且在骨关节炎和类风湿性关节炎病人的关节软骨和滑膜中发现，ADAMTS-7 和-12 的水平显著升高。体外 GST pull-down 和免疫共沉淀实验表明，ADAMTS-7 和-12 可以直接结合 COMP。而且，由 ADAMTS-7 和-12 介导所产生的 COMP 片断与在关节炎病人中检测到的 COMP 片断相同。将关节软骨移植物进行体外培养，加入 ADAMTS-7 和-12 的特异性抗体后，可以显著抑制 IL-1 和 TNF-α 所诱导的 COMP 的降解。与此相一致的是，将人软骨细胞进行体外培养时，加入特异性抑制 ADAMTS-7 和-12 的 SiRNA，可以显著降低 COMP 的降解。同时，研究表明，ADAMTS-7 和-12 与 COMP 共同位于人类软骨细胞细胞表面及其细胞质中。值得注意的是，虽然 ADAMTS-7 和-12 具有相似的结构，ADAMTS-7 不能降解蛋白多糖，而 ADAMTS-12 可以降解蛋白多糖[14-16]。

研究表明，α_2 巨球蛋白（alpha-2-macroglobulin，α_2M）可以作为 ADAMTS-7 和-12 的底物，竞争性保护 COMP 的降解。同时，颗粒蛋白前体（Progranulin，PGRN）能够通过两种不同的机制来抑制 ADAMTS-7 和-12，从而保护 COMP 免受降解。具体的说，一方面，PGRN 能够抑制炎症性细胞因子如 TNF-α 诱导的 ADAMTS-7 和-12 的产生，另一方面，PGRN 能够通过蛋白质-蛋白质之间相互作用打破 ADAMTS-7 和-12 同 COMP 之间的相互联系。ADAMTS-7 和-12，蛋白多糖，COMP，PGRN，α_2M 和 TNF-α 之间形成了一个相互作用的工作网络，并在关节炎病理过程中发挥作用（图 2）[17, 18]。

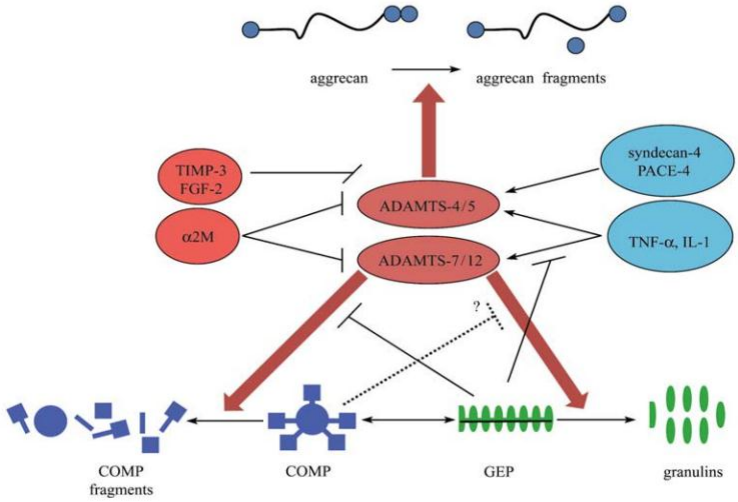


图 2：在关节炎病理过程中，ADAMTS-7 和-12，蛋白多糖，COMP，PGRN，α_2M 和 TNF-α 之间相互作用示意图

最近研究表明，在骨关节炎病理过程中，ADAMTS-7 同 TNF-α 形成了一个正反馈调节通路，促进骨关节炎的发生发展。在手术诱导的鼠骨关节炎模型中，ADAMTS-7 的表达水平随疾病的进展而升高。在软骨细胞中组织特异性过表达 ADAMTS-7，发现在幼年小鼠中，膜内成骨延迟，并在老年小发现自发的骨关节炎样的表现。在手术诱导的骨关节炎小鼠模型中发现，过表达 ADAMTS-7 的小鼠表现出关节破坏增多，骨关节炎症状加重，而 knockdown ADAMTS-7 后能够减轻关节基质的降解，并且减低了骨关节炎的发展。ADAMTS-7 能够上调 TNF-α 以及其他与骨关节炎相关的金属蛋白酶的表达，同时，TNF-α 可以通过 NF-κB 信号通路诱导 ADAMTS-7 的表达（图 3）[19, 20]。

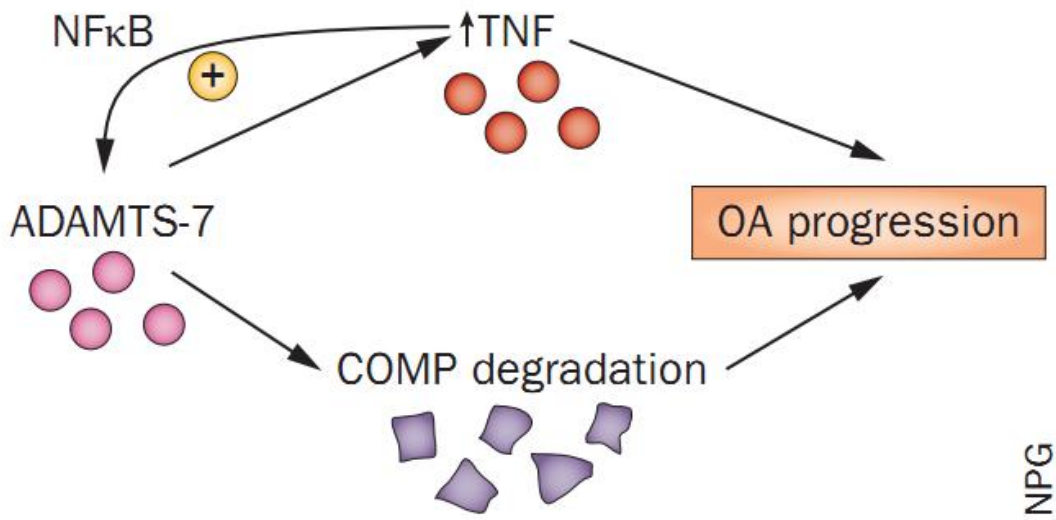


图 3：ADAMTS-7 同 TNF-α 在骨关节炎中形成正反馈调节通路示意图

展望

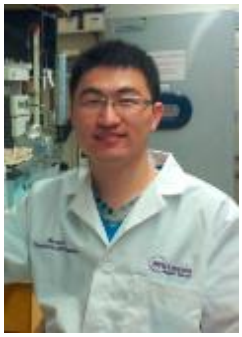
ADAMTS-4,-5,-7,-12 能够与软骨细胞外基质成分相互作用，可以导致软骨细胞外基质成分的降解，从而导致软骨的完整性及生物功能的丧失。而减缓甚至逆转软骨基质的破坏可能成为缓解关节炎的关键。因此，寻找内源性和外源性 ADAMTS 的抑制剂可能成为临床治疗关节炎的一个潜在治疗策略。

【主要参考文献】

1. Gray, L. The American Heritage Dictionary of the English Language, 5th edition. *Journal of English Linguistics* **42**, 176-180 (2014).
2. Tang, B.L. ADAMTS: a novel family of extracellular matrix proteases. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **33**, 33-44 (2001).
3. Wei, J., Liu, C. & Li, Z. ADAMTS-18: A metalloproteinase with multiple functions. Front Biosci (Landmark Ed) 19, 1456-67 (2014).
4. Roughley, P.J. Articular cartilage and changes in arthritis - Noncollagenous proteins and proteoglycans in the extracellular matrix of cartilage. Arthritis Research 3, 342-347 (2001).
5. Little, C.B. et al. Blocking aggrecanase cleavage in the aggrecan interglobular domain abrogates cartilage erosion and promotes cartilage repair. J Clin Invest 117, 1627-36 (2007).
6. Stanton, H. et al. ADAMTS5 is the major aggrecanase in mouse cartilage in vivo and in vitro. Nature 434, 648-652 (2005).
7. Glasson, S.S. et al. Deletion of active ADAMTS5 prevents cartilage degradation in a murine model of osteoarthritis. Nature 434, 644-8 (2005).
8. Malfait, A.M. et al. Proprotein convertase activation of aggrecanases in cartilage in situ. Archives of Biochemistry and Biophysics 478, 43-51 (2008).

9. Echtermeyer, F. et al. Syndecan-4 regulates ADAMTS-5 activation and cartilage breakdown in osteoarthritis. Nature Medicine 15, 1072-U127 (2009).
10. Melching, L.I., Fisher, W.D., Lee, E.R., Mort, J.S. & Roughley, P.J. The cleavage of biglycan by aggrecanases. Osteoarthritis and Cartilage 14, 1147-1154 (2006).
11. Bai, X.H. et al. ADAMTS-7, a Direct Target of PTHrP, Adversely Regulates Endochondral Bone Growth by Associating with and Inactivating GEP Growth Factor. Molecular and Cellular Biology 29, 4201-4219 (2009).
12. Maass, P.G. et al. A cis-regulatory site downregulates PTHLH in translocation t(8;12)(q13;p11.2) and leads to Brachydactyly Type E. Hum Mol Genet 19, 848-60 (2010).
13. Wei, J., Richbourgh, B., Jia, T. & Liu, C. ADAMTS-12: A Multifaced Metalloproteinase in Arthritis and Inflammation. Mediators Inflamm 2014, 649718 (2014).
14. Lin, E.A. & Liu, C.J. The role of ADAMTSs in arthritis. Protein Cell 1, 33-47 (2010).
15. Liu, C.J. The role of ADAMTS-7 and ADAMTS-12 in the pathogenesis of arthritis. Nat Clin Pract Rheumatol 5, 38-45 (2009).
16. Liu, C.J. et al. ADAMTS-7: a metalloproteinase that directly binds to and degrades cartilage oligomeric matrix protein. Faseb Journal 20, 988-+ (2006).
17. Luan, Y. et al. Inhibition of ADAMTS-7 and ADAMTS-12 degradation of cartilage oligomeric matrix protein by alpha-2-macroglobulin. Osteoarthritis Cartilage 16, 1413-20 (2008).
18. Guo, F. et al. Granulin-epithelin precursor binds directly to ADAMTS-7 and ADAMTS-12 and inhibits their degradation of cartilage oligomeric matrix protein. Arthritis Rheum 62, 2023-36 (2010).
19. Lai, Y. et al. ADAMTS-7 forms a positive feedback loop with TNF-alpha in the pathogenesis of osteoarthritis. Ann Rheum Dis (2013).
20. Buckland, J. Osteoarthritis: positive feedback between ADAMTS-7 and TNF in OA. Nat Rev Rheumatol 9, 566 (2013).

作者简介：



蔚建鲁，2011 年毕业于山东大学临床医学院，现为山东大学医学院骨外科在读硕博连读研究生。主要从事关节炎分子机制的研究。

Email: jianlu.wei@nyumc.org

刘传聚，博士（PhD），毕业于山东大学，于美国耶鲁大学受博士后训练。于 2002 年任纽约大学医学院骨外系和细胞生物系双聘助理教授，于 2007 年任纽约大学终身副教授，于 2013 年任纽约大学终身教授。迄今在《science》等国际知名杂志共发表学术论文百余篇。

Email: chuanju.liu@nyumc.org

盐传感激酶--血清和糖皮质激素诱导的蛋白激酶1及其介导的致病性Th17细胞发育

吴船[1] 王超[1] 张雪莉[2]

[1] Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, USA, [2] Institute for Physiological Chemistry and Pathobiochemistry, University of Muenster, Germany

摘要

辅助型T细胞17（T helper type 17，Th17）是一种新近发现的T细胞亚型，以分泌白细胞介素17（IL-17）为特征，在机体防御真菌感染和细胞外病原体的过程中都发挥着广泛作用。此外，在多种自身免疫性疾病的诱发过程中，Th17细胞也充当着重要的角色。但是，并不是所有的Th17细胞都是致病性的，致病性Th17细胞的的分化往往需要IL-23的介导。通过研究IL-23受体（IL-23R）转录的下游因子，我们发现血清和糖皮质激素诱导的蛋白激酶1 （Serum Glucocorticoid Kinase 1，SGK1）是诱导IL-23R信号通路下游的主要激酶。而高浓度的氯化钠（NaCl）也可以诱导SGK1的产生，因此大大地提高了通过高盐饮食（high salt diet，HSD）来诱导SGK1使T 细胞分化为致病性Th17细胞进而促进自身免疫发展的可能性。 研究显示，HSD确实可诱发肠道中的致病性Th17细胞的分化，促进自身免疫的发展。这表明， HSD可能是自身免疫性疾病流行的环境诱因之一。在这篇综述中，我们提出SGK1 ，一种盐感应激酶，可作为诱导病原性Th17细胞的分化从而促进自身免疫发展的一个重要靶点。

关键词

Th细胞，血清和糖皮质激素诱导的蛋白激酶1（SGK1），自身免疫，实验性自身免疫性脑脊髓炎（EAE）

在过去的五十年里，尽管工业化国家的医疗保健和人类卫生有了显著的改善，但是自身免疫性疾病的发病率仍然持续上升。自身免疫性疾病的发生和发展主要是由遗传和环境因素引起的。迄今为止，几个环境诱因已经确定，包括吸烟，维生素D的水平，感染和肠道菌群[1]。尽管如此，这些已知的因素，无论是单独还是组合，都不足以解释西方国家自身免疫性疾病发病率前所未有的增长。现在，高盐摄入由于能够诱导致病性T细胞的分化及扩增从而导致自身免疫的发展，被确定为自身免疫性疾病的另一个可能的环境触发因素[2, 3]。值得注意的是，与第三世界国家相比，典型西化饮食中食用大量的加工后食品和所谓的快餐，导致钠的摄入量较高，这与其自身免疫性疾病的发生和流行密切相关[4, 5]。

在细胞水平上，致病性自身反应性T细胞可产生促炎性细胞因子并诱导自身免疫，而Foxp3阳性调节性T细胞（Tregs）则可防止自身免疫性组织炎症的发生[6, 7]。TGF-β是Tregs产生的一个关键分化因子，而IL-6作为一个在感染，炎症和损伤过程中被诱导产生的急性期蛋白，可抑制TGF-β诱导的$Foxp3^{+}$Tregs的产生，反过来诱导促炎性Th17细胞的产生[8]。因此，以前的数据表明诱导自身免疫的病原性Th17细胞和抑制自身免疫性组织损伤的Foxp3+调节性T 细胞的产生之间存在着相互关系[6, 9]。后续的研究显示Th17细胞的致病性依赖于它们的扩张性和稳定性[10-

12]。因此，细胞因子和环境因素共同决定着效应性Th17细胞在免疫反应过程中的命运。最近发现钠可促进病原性Th17细胞的诱导分化，这为探究自身免疫性疾病的诱发提供了另一种潜在的环境因素[2, 3]。

1. Th17细胞的诱导

多种动物模型和人类疾病的研究已表明，Th17细胞，作为最有潜力的促炎性T细胞亚群之一，与多种自身免疫紊乱和炎症相关[2, 12-15]。体外Th17细胞的初始分化是通过TGF-β1和IL-6的刺激来诱导转录因子RORγt的表达来实现的[9, 16-18]。Th17细胞不仅可分泌IL-17A，同时也可以分泌一些其他细胞因子，包括IL-17F，IL-21和IL-22，而这些都是Th17细胞所特有的细胞因子[12, 19-21]。

$CD4^+$T细胞的可塑性强，在不同细胞因子影响下可进行可逆分化[22]。奇怪的是，Th17细胞和Treg细胞在体外分化过程中有一个共同期。TGF-β1单独可以诱导Foxp3和RORγt的表达，然而当与IL-6同时存在的情况下则可促进RORγt的表达，同时拮抗Foxp3的诱导表达[6]。因此，炎症过程中如果有大量的IL-6产生，Th17细胞和Treg细胞之间的平衡就会向Th17细胞的方向移动。Th17细胞和Treg细胞之间的平衡与肠道中的T 细胞尤其相关，而这种相关性被认为是对由$CD103^+$树突状细胞分泌的TGF-β1和由肠道微生物诱导的IL-1/IL-6的补充。 但是，肠道内的Th17细胞与组织炎症部位例如皮肤牛皮癣损伤部位的Th17细胞可能是不同的，即Th17细胞可能具有不同的类型，而这些不同类型的Th17细胞是否是由不同组织或者细胞因子环境诱导分化而成的还需要进一步的研究证实。

多项研究阐明TGF-β1在Th17细胞起始发育过程中发挥着重要的作用[7, 9, 16]。体内TGF-β1信号的缺失可导致Th17细胞数量的减少[16]，而过量表达TGF-β1则可促进Th17细胞的分化[7, 9]。然而，最近的研究显示Th17细胞分化还有另外一种不依赖于TGF-β1的途径。初始型$CD4^+$ T细胞可在IL-1β，IL-6和IL-23共同存在的情况下分化为另一种Th17细胞。与由TGF-β1和IL-6诱导的经典Th17细胞相比，这种Th17细胞对诱导小鼠自身免疫疾病模型具有更强的致病性[26]。在此基础上，我们进一步分析了Th17细胞分化所需的的条件。我们发现，病原性Th17细胞的产生需要TGF-β3而不是TGF-β1，TGF-β3可促进Th17细胞致病特征的发育[27]。 事实上，IL-1β 和IL-6对初始型T细胞的激活可导致其分泌内源性TGF-β3，TGF-β3作为一种自分泌因子，可促进病原性Th17细胞的产生。与缺失一些其它Th17细胞分化相关的细胞因子相类似，TGF-β3的缺失或阻断都可抑制Th17细胞分化进而影响EAE的发展[27]。因此，以上研究标明不同的细胞因子环境会产生不同功能的Th17细胞。确实，在小鼠和人身体中已经确定存在两种不同类型的Th17细胞。一种可产生IL-17与IL-10，对自身免疫是非致病性的，而另一种可产生IL-17和IFN-γ，是自身免疫和组织炎中的强效诱导剂[28]。使用分化测绘系统， Hirota 等人证明，Th17细胞在慢性炎症例如EAE过程中可同时分泌IFN-γ和IL-17，或者转换为仅产生IFN-γ的Th1细胞[29]。致病性Th17细胞的重要特征之一是促进T-bet的表达，即使在它们转换为Th1细胞后，仍可上调T-bet的表达。但是，白色念珠菌的急性感染中并不能观察到这样的转换，表明Th17细胞分化的可塑性取决于多种因素，如病原体类型，组织炎症类型，细胞因子环境和Th17细胞诱导的炎症组织类型。

2. Th17细胞扩增和稳定

尽管Th17细胞的分化有不同的通路，研究已经发现IL-23对Th17细胞的扩增和维持以及通过上调IL-23R的表达来诱导Th17细胞的致病性中起着关键的作用[3, 11]。IL-23是由p19和p40两个亚单位组成的异源二聚体。p19基因缺失小鼠对EAE的发展显示出完全的保护作用，Th17细胞在p19基因缺失小鼠中枢神经系统（CNS）中的数目显著减少[10, 30, 31]。遗传连锁研究显示， IL-23R的多个单核苷酸多态性（SNPs）与溃疡性结肠炎（UC），克罗恩病（CD），多发性硬化症（MS），强直性脊柱炎和牛皮癣的发病相关[32-36]。从细胞水平上来说， IL-23信号通过IL-23R可形成一个正反馈环路，上调反应性T细胞表面

IL-23R的水平。初始型T细胞不表达IL-23R，而在Th17的分化过程中RORγt的诱导可促进IL-23R的表达。在自身免疫性疾病，如EAE，结肠炎和胶原诱导的关节炎（CIA）中，IL-23R的诱导与Th17细胞的稳定性和致病性密切相关[11, 37, 38]。IL-23R缺陷小鼠奴性中EAE的病是受到抑制的，这与Th17细胞在CNS中的减少相关[11]。到目前为止，IL-23R的调节作用得到了广泛的研究。虽然有研究表明IL-6和IL-21能够以STAT3依赖性的方式来诱导IL-23R的表达 [21, 39], 但是另一项研究也显示，一个新发现的Th17细胞的转录因子c-Maf 对记忆性T细胞上IL-23R的表达起着重要作用[40, 41]。此外，最新RORγt芯片测序的数据指出，RORγt可结合IL-23R启动子，直接激活*IL23r*基因的表达[3, 42, 43]。因此，在Th17细胞发育的不同阶段，多种转录因子参与了IL-23R的表达，并赋予IL-23回应。目前，对于IL-23依赖的Th17致病性的信号通路的研究正在逐渐的开展。我们实验室采用高分辨率的转录和生物信息学方法，确定了SGK1是IL-23R信号传导通路下游的一个主要激酶。 一般而言，SGK1是一个调控上皮钠通道（Epithelial Sodium Channel，ENaC）的盐传感激酶。本综述的下一部分将集中探讨氯化钠和SGK1与Th17细胞分化和功能的相关性。

3. T细胞发育过程中Na^+ 的作用

电压-控钠离子通道（voltage-gated sodium channel，VGSC）由两个亚基组成，一个成孔的CN5A亚基和一个调节的SCN4B亚基[44, 45]。据报道VGSC主要表达于可兴奋细胞，但是在某些免疫细胞上也有VGSC的表达[46]。例如，在胸腺发育过程中，胸腺T 细胞就可表达VGSC。最近的研究表明，在TCR激活的情况下，T细胞表面的VGSC能够维持胞内外Ca^{2+}的交换，进而促进$CD4^+$ T细胞的发育[47, 48]。研究发现，VGSC的表达对于设定$CD4^+$ T细胞阳性选择信号的阈值是至关重要的。而VGSC的抑制，无论是河豚毒素对其的化学抑制，还是SCN5A基因敲除导致其表达量的下降，都能够抑制$CD4^+$ T细胞的选择信号[44]。在电兴奋细胞，包括神经元和肌肉细胞，VGSC的活化可诱导Na^+流，通过膜的去极化和随之引起的电压-控钙离子通道的激活而导致细胞溶质Ca^{2+}的增多。但是，VGSC和TCR之间具体是如何相互作用的，以及它们维持Ca^{2+}信号进而活化T细胞的机制，还需要进一步的研究阐明。因此，通过对VGSC调控Ca^{2+}信号的分子机制的研究，将会帮助我们更好的理解T细胞发育初期的特异性。

4. Na^+诱导的Th17细胞的分化

胞外Na^+浓度可调节渗透压，进而在很大程度上影响集体的张力和水代谢。ENaC可控制Na^+的转运，从而调节钠的排泄和水平衡。因此，ENaC已被描述成机体内环境体积和血压的调节器。它的这一功能也已在水肿和胃肠以及呼吸系统疾病中得到了验证，如囊性纤维化，新生儿呼吸窘迫综合征和高海拔肺水肿[49]。

然而，最近的研究揭示了惊人的发现，即胞外Na^+也能够影响Th17细胞的分化和增加患自身免疫性疾病的风险[2, 3]。在小鼠和人的T细胞中，Na^+在胞浆中的浓度约为140mM，与标准的细胞培养液中Na^+的浓度相似。在体外实验中，Na^+浓度适度增加40mM，就能促进Th17细胞的分化[50, 51]。更有趣的是，对于小鼠的T细胞，甚至在不加入任何外源性细胞因子的情况下，钠就可以诱导Th17相关基因，如*Rorc, Il17a, Il17f, Il23r* 的表达。此观察表明钠本身即可使T细胞分化为Th17细胞[2, 3]。更重要的是，体内观察显示，HSD能够增加肠道和中枢神经系统（CNS）中的Th17细胞，并使由Th17细胞介导的自身免疫性疾病多发性硬化（MS）小鼠模型EAE的发病加重。

HSD对EAE发病的严重性有显著影响，这可能来自于肠道中盐对Th17细胞的直接影响，也可能是由于盐对肠道菌群的间接影响[52].。目前普遍认为肠道菌群对免疫应答有着很大的影响[52-55]。例如，有研究表明分段的丝状菌（segmented filamentous bacteria，SFB）在体内可诱导Th17细胞[52]，而梭菌属则可诱导Treg细胞[56]。肠道菌群如何与自身免疫相关联是一个正在不断深入研究的课题。研究发现，无菌（germ free，GF）小鼠对EAE具有更强的抵抗性，对B和T细胞两

者的增殖都有影响。另一方面，SFB的加入，可使GF小鼠的EAE恶化，Th17细胞数目增加[53]。通过日常饮食来调节肠道菌群进而影响自身免疫性疾病的发展是完全可能的。例如，日常蔬菜中的一种成分色氨酸光氧化产物6-甲酰吲哚并[3，2-b]咔唑（6-formyl-indolo [3，2-b] carbazole，FICZ），也被称为芳香烃受体（aryl hydrocarbon receptor，AHR）的环境配体，已被证明能够显著影响上皮内淋巴细胞（intraepithelial lymphocytes，IEL）进而调节肠道菌群。还有研究表明，在饮食中添加FICZ对小鼠结肠炎的发展具有保护效应[57]。对于高盐饮食如何影响肠道菌群以及随后如何活化Th17细胞的研究，将在分子水平上大大提高我们对环境因素与自身免疫性疾病相关性的理解。

5. Th17细胞分化的Na^+信号

以前的研究表明Na^+介导的Th17细胞活化的信号转导通路与转录因子NFAT5和蛋白激酶p38以及SGK1相关，其中SGK1对ENaC的活性是很关键的[51, 58]。据报道，p38/MAPK能够感应到由细胞外Na^+浓度改变引起的张力变化[51, 59]。随后，渗透敏感转录因子NFAT5可以通过反式激活SGK1来确定这种转化过程[58]。以前的文献指出NFAT5和SGK1都是P38的下游底物。Kleinewietfeld等人通过使用化学抑制剂和RNA干扰技术发现，p38，NFAT5和SGK1三者在Na^+诱导的Th17细胞分化过程中起都着重要作用。

另一方面，SGK1在转导钠信号中的作用在我们的研究中得到了更突出的体现[3]。通道的磷酸化对ENaC的活性是至关重要[49]。SGK1是调节ENaC的活性的最显著元素之一。它是一个信号传导分子，可通过防止胞内滞留和提高质膜上ENaC的表达和活性来加强Na^+的运输。令人吃惊的是，对Th17细胞的稳定起关键作用的IL-23信号同时也可诱导SGK1的表达[3]。SGK1缺陷的T细胞在Th17分化的初期没有任何表型，但是在IL-23的影响下，Th17细胞的稳定性有明显的变化。生物信息学分析显示IL-23受体缺陷的T细胞和SGK1缺陷的T细胞在IL-23的刺激下，它们的基因表达有一个显著重叠，表明SGK1和IL-23R信号通路具有某种功能相关性。然而IL-23信号调节Th17细胞分化的机制，除了抑制的IL-23R可诱导STAT3的表达之外，都尚未阐明[11]。我们的研究证明，SGK1是IL-23信号转导通路中的另外一个关键要素，它可以特异性地转导IL-23信号和维持Th17细胞的表型。

此外，SGK1在与细胞代谢和分化相关的信号级联反应中也起着重要的作用。它属于AGC激酶家族，与Akt同源[49, 60]。通过PI3K或PDK磷酸化的SGK1能够激活多个下游调节信号因子，包括mTOR和Foxo1。不同研究已经显示了这些因素在T细胞发育和分化中的相关性。为此，我们进行了一个密集的基因芯片分析，结果显示$CD4^+$T细胞上，除了IL-17外，*Ifng*, *Tbx21*, *Il2* 和 *Il9*基因也都可以通过SGK1和Na^+来调节[3]。

与SGK1调节Th17细胞分化需要IL-23的介导相一致，SGK1缺陷的T细胞分泌IL-17呈现了一种依赖IL-23的减少 [3]。SGK1缺陷小鼠对EAE的发病具有抵抗性，HSD是不能提高SGK1缺陷小鼠自身免疫性疾病发病率的[3]。综上所述，SGK1可作为Na^+信号通路途径中的一个主要信号结点。

6. 结语与展望

Th17细胞的起始和稳定已经得到了很多的研究和报道。细胞因子和环境因素对于Th17细胞的极化，可塑性和稳定性是至关重要的，这一观点已经被广泛接受。我们的研究发现，HSD可以作为诱导Th17细胞分化和促进自身免疫性疾病发生发展的一个环境触发因素。

已知，多余的钠能改变胞外渗透压，随后通过NFAT5/TonEBP 信号促进 SGK1 的表达[51]。高渗透压可诱导参与 SGK1 的渗透激活的 p38 MAPK 信号，$CD4^+$T 细胞中这一信号通路的激活可能直接控制 Th17 细胞的表型，因此，提高了高钠治疗后 SGK1 可直接调节 Th17 细胞分化的可能性。

Th17细胞对IL-23的暴露很大程度上决定了Th17细胞的致病性。Th17细胞信号转导中IL-23，Na^+ 和SGK1之间的相关性已经建立[11, 30]。然而，Th17细

胞驱动信号级联反应过程中，这两种刺激物（IL-23和Na^+）之间的重叠程度仍不清楚，识别这些信号元素可能会为抑制Th17细胞和自身免疫性疾病提供潜在的药物靶点。

鉴于许多因素可以影响Th17细胞的发育，包括细胞因子，代谢，饮食和微生物，HSD 饮食可通过SGK1增加Th17细胞分化和自身免疫，这一作用的发现为自身免疫性疾病的治疗提供了一个意想不到的靶点。在选定的遗传背景下，识别和控制这些环境触发因素会为我们抵制自身免疫性疾病的上升流行提供一些方法。

【参考文献】

1 de Carvalho JF, Pereira RM, Shoenfeld Y. The mosaic of autoimmunity: the role of environmental factors. Frontiers in bioscience 2009;1:501-9.

2 Kleinewietfeld M, Manzel A, Titze J, et al. Sodium chloride drives autoimmune disease by the induction of pathogenic TH17 cells. Nature 2013;496(7446):518-22.

3 Wu C, Yosef N, Thalhamer T, et al. Induction of pathogenic TH17 cells by inducible salt-sensing kinase SGK1. Nature 2013;496(7446):513-7.

4 Adrogue HJ, Madias NE. Sodium and potassium in the pathogenesis of hypertension. The New England journal of medicine 2007;356(19):1966-78.

5 Elliott P, Stamler J, Nichols R, et al. Intersalt revisited: further analyses of 24 hour sodium excretion and blood pressure within and across populations. Intersalt Cooperative Research Group. Bmj 1996;312(7041):1249-53.

6 Zhou L, Lopes JE, Chong MM, et al. TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgammat function. Nature 2008;453(7192):236-40.

7 Bettelli E, Korn T, Oukka M, Kuchroo VK. Induction and effector functions of T(H)17 cells. Nature 2008;453(7198):1051-7.

8 Korn T, Mitsdoerffer M, Croxford AL, et al. IL-6 controls Th17 immunity in vivo by inhibiting the conversion of conventional T cells into Foxp3+ regulatory T cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2008;105(47):18460-5.

9 Bettelli E, Carrier Y, Gao W, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. Nature 2006;441(7090):235-8.

10 El-Behi M, Ciric B, Dai H, et al. The encephalitogenicity of T(H)17 cells is dependent on IL-1- and IL-23-induced production of the cytokine GM-CSF. Nature immunology 2011;12(6):568-75.

11 McGeachy MJ, Chen Y, Tato CM, et al. The interleukin 23 receptor is essential for the terminal differentiation of interleukin 17-producing effector T helper cells in vivo. Nature immunology 2009;10(3):314-24.

12 Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. Annu Rev Immunol 2009;27:485-517.

13 Zielinski CE, Mele F, Aschenbrenner D, et al. Pathogen-induced human TH17 cells produce IFN-gamma or IL-10 and are regulated by IL-1beta. Nature 2012;484(7395):514-8.

14 Tesmer LA, Lundy SK, Sarkar S, Fox DA. Th17 cells in human disease. Immunological reviews 2008;223:87-113.

15 Miossec P, Korn T, Kuchroo VK. Interleukin-17 and type 17 helper T cells. The New England journal of medicine 2009;361(9):888-98.

16 Veldhoen M, Hocking RJ, Flavell RA, Stockinger B. Signals mediated by transforming growth factor-beta initiate autoimmune encephalomyelitis, but chronic inflammation is needed to sustain disease. Nature immunology 2006;7(11):1151-6.

17 Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGFbeta in the context of an

inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. Immunity 2006;24(2):179-89.

18 Ivanov, II, McKenzie BS, Zhou L, et al. The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. Cell 2006;126(6):1121-33.

19 Huber S, Gagliani N, Zenewicz LA, et al. IL-22BP is regulated by the inflammasome and modulates tumorigenesis in the intestine. Nature 2012;491(7423):259-63.

20 Rutz S, Noubade R, Eidenschenk C, et al. Transcription factor c-Maf mediates the TGF-beta-dependent suppression of IL-22 production in T(H)17 cells. Nature immunology 2011;12(12):1238-45.

21 Korn T, Bettelli E, Gao W, et al. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. Nature 2007;448(7152):484-7.

22 Murphy KM, Stockinger B. Effector T cell plasticity: flexibility in the face of changing circumstances. Nature immunology 2010;11(8):674-80.

23 Benson MJ, Pino-Lagos K, Rosemblatt M, Noelle RJ. All-trans retinoic acid mediates enhanced T reg cell growth, differentiation, and gut homing in the face of high levels of co-stimulation. The Journal of experimental medicine 2007;204(8):1765-74.

24 Coombes JL, Siddiqui KR, Arancibia-Carcamo CV, et al. A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. The Journal of experimental medicine 2007;204(8):1757-64.

25 Sun CM, Hall JA, Blank RB, et al. Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. The Journal of experimental medicine 2007;204(8):1775-85.

26 Ghoreschi K, Laurence A, Yang XP, et al. Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TGF-beta signalling. Nature 2010;467(7318):967-71.

27 Lee Y, Awasthi A, Yosef N, et al. Induction and molecular signature of pathogenic TH17 cells. Nature immunology 2012;13(10):991-9.

28 McGeachy MJ, Bak-Jensen KS, Chen Y, et al. TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology. Nature immunology 2007;8(12):1390-7.

29 Hirota K, Duarte JH, Veldhoen M, et al. Fate mapping of IL-17-producing T cells in inflammatory responses. Nature immunology 2011;12(3):255-63.

30 Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, et al. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. Nature 2003;421(6924):744-8.

31 Codarri L, Gyulveszi G, Tosevski V, et al. RORgammat drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflammation. Nature immunology 2011;12(6):560-7.

32 Begovich AB, Chang M, Caillier SJ, et al. The autoimmune disease-associated IL12B and IL23R polymorphisms in multiple sclerosis. Human immunology 2007;68(11):934-7.

33 Lee YH, Choi SJ, Ji JD, Song GG. Associations between interleukin-23R polymorphisms and ankylosing spondylitis susceptibility: a meta-analysis. Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.] 2012;61(2):143-9.

34 Chua KH, Hilmi I, Lian LH, et al. Association between inflammatory bowel disease gene 5 (IBD5) and interleukin-23 receptor (IL23R) genetic polymorphisms in Malaysian patients with Crohn's disease. Journal of digestive diseases 2012;13(9):459-65.

35 Duerr RH, Taylor KD, Brant SR, et al. A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. Science 2006;314(5804):1461-3.

36 Kim SW, Kim ES, Moon CM, et al. Genetic polymorphisms of IL-23R and IL-17A and novel insights into their associations with inflammatory bowel disease. Gut 2011;60(11):1527-36.

37 Yoshiga Y, Goto D, Segawa S, et al. Invariant NKT cells produce IL-17 through IL-23-dependent and -independent pathways with potential modulation of Th17 response in collagen-induced arthritis. International journal of molecular medicine 2008;22(3):369-74.

38 Ahern PP, Schiering C, Buonocore S, et al. Interleukin-23 drives intestinal inflammation through direct activity on T cells. Immunity 2010;33(2):279-88.

39 Zhou L, Ivanov, II, Spolski R, et al. IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. Nature immunology 2007;8(9):967-74.

40 Bauquet AT, Jin H, Paterson AM, et al. The costimulatory molecule ICOS regulates the expression of c-Maf and IL-21 in the development of follicular T helper cells and TH-17 cells. Nature immunology 2009;10(2):167-75.

41 Sato K, Miyoshi F, Yokota K, et al. Marked induction of c-Maf protein during Th17 cell differentiation and its implication in memory Th cell development. The Journal of biological chemistry 2011;286(17):14963-71.

42 Ciofani M, Madar A, Galan C, et al. A validated regulatory network for th17 cell specification. Cell 2012;151(2):289-303.

43 Yosef N, Shalek AK, Gaublomme JT, et al. Dynamic regulatory network controlling TH17 cell differentiation. Nature 2013;496(7446):461-8.

44 Lo WL, Donermeyer DL, Allen PM. A voltage-gated sodium channel is essential for the positive selection of CD4(+) T cells. Nature immunology 2012;13(9):880-7.

45 Lo WL, Allen PM. Self-awareness: how self-peptide/MHC complexes are essential in the development of T cells. Molecular immunology 2013;55(2):186-9.

46 Painter MW, Davis S, Hardy RR, Mathis D, Benoist C, Immunological Genome Project C. Transcriptomes of the B and T lineages compared by multiplatform microarray profiling. J Immunol 2011;186(5):3047-57.

47 Moran AE, Hogquist KA. T-cell receptor affinity in thymic development. Immunology 2012;135(4):261-7.

48 Morris GP, Allen PM. How the TCR balances sensitivity and specificity for the recognition of self and pathogens. Nature immunology 2012;13(2):121-8.

49 Lang F, Bohmer C, Palmada M, Seebohm G, Strutz-Seebohm N, Vallon V. (Patho)physiological significance of the serum- and glucocorticoid-inducible kinase isoforms. Physiological reviews 2006;86(4):1151-78.

50 Machnik A, Neuhofer W, Jantsch J, et al. Macrophages regulate salt-dependent volume and blood pressure by a vascular endothelial growth factor-C-dependent buffering mechanism. Nature medicine 2009;15(5):545-52.

51 Go WY, Liu X, Roti MA, Liu F, Ho SN. NFAT5/TonEBP mutant mice define osmotic stress as a critical feature of the lymphoid microenvironment. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2004;101(29):10673-8.

52 Ivanov, II, Atarashi K, Manel N, et al. Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. Cell 2009;139(3):485-98.

53 Berer K, Mues M, Koutrolos M, et al. Commensal microbiota and myelin autoantigen cooperate to trigger autoimmune demyelination. Nature 2011;479(7374):538-41.

54 Lathrop SK, Bloom SM, Rao SM, et al. Peripheral education of the immune system by colonic commensal microbiota. Nature 2011;478(7368):250-4.

55 Markle JG, Frank DN, Mortin-Toth S, et al. Sex differences in the gut microbiome drive hormone-dependent regulation of autoimmunity. Science 2013;339(6123):1084-8.

56 Atarashi K, Tanoue T, Shima T, et al. Induction of colonic regulatory T cells by indigenous Clostridium species. Science 2011;331(6015):337-41.

57 Li Y, Innocentin S, Withers DR, et al. Exogenous stimuli maintain intraepithelial lymphocytes via aryl hydrocarbon receptor activation. Cell 2011;147(3):629-40.

58 Pearce D, Kleyman TR. Salt, sodium channels, and SGK1. The Journal of clinical investigation 2007;117(3):592-5.

59 Kino T, Takatori H, Manoli I, et al. Brx mediates the response of lymphocytes to osmotic stress through the activation of NFAT5. Science signaling 2009;2(57):ra5.

60 Bruhn MA, Pearson RB, Hannan RD, Sheppard KE. Second AKT: the rise of SGK in cancer signalling. Growth factors 2010;28(6):394-408.

作者简介：

吴船，博士 现任哈佛大学附属 Brigham and Women's 医院神经病病学讲师（Instructor）. 先后就读于瑞典 Lund University，和德国 Münster University (博士学位)。从事白细胞介素分泌细胞 TH17 等方面的研究多年，在国际著名杂志如 <Nature>，〈PNAS〉等发表论文多篇，并多次获奖。

神经炎症与阿尔茨海默病

汪怀山　张建民

中国医学科学院基础医学研究所&北京协和医学院基础学院免疫学系

摘要

阿尔茨海默病（AD）是一种最常见的神经退行性疾病，主要表现为进行性记忆减退和认知功能障碍。随着多个基于 Aβ 淀粉样蛋白为靶点的药物临床实验的失败，人们对阿尔茨海默病的发病机理开始重新思考。近几年，小神经胶质细胞（Miroglia） 介导的神经炎症在 AD 发生发展中的作用引起广大科研工作者的关注，并取得了一定的研究进展。小神经胶质细胞活化造成的中枢神经系统炎症微环境能够诱发 Aβ 淀粉样蛋白的沉积以及 tau 蛋白的过度磷酸化，最终导致神经元退化、死亡，形成认知障碍和痴呆，表明神经炎症在 AD 的发生发展中发挥重要原因。此外，APOE4 基因和线粒体相关的炎症小体活化也起了重要作用。

关键词

阿尔茨海默病、神经炎症、小神经胶质细胞、炎症小体

Abstract

Alzheimer's Disease (AD) is the most common neurodegenerative disease characterized by a progressive loss of cognitive ability and memory. With the failure of clinical trials of Aβ amyloid-based drugs, the Aβ hypothesis of AD pathogenesis has been challenged. In recent years, microglia-mediated neuroinflammation in the pathogenesis of AD has attracted extensive attentions in the field of neuroscience. The inflammatory microenvironment caused by microglia activation in the central nervous system can induce the deposition of Aβ amyloid and the hyperphosphorylation of tau protein, eventually leading to neuronal degeneration and death, cognitive impairment and dementia. These findings indicate that neuroinflammation may play an important role in the pathogenesis of AD. In addition, APOE4 and mitochondria-associated activation of NLRP3 inflammasome also play important roles in the development of this disorder.

Keywords

Alzheimer's Disease,Neuroinflammation, Microglia, Inflammasome

前言

阿尔茨海默病（Alzheimer's Disease，AD）是一种最常见的神经退行性疾病（neurodegenerative disease），主要表现为进行性记忆减退和认知功能障碍。大约 70%的老年性痴呆患者是由 AD 引起，主要发生于 65 岁以上的老年人，85 岁以上的老年人有 1/3 罹患 AD。随着全球老龄化人口比例的增加，痴呆症患者的发病率逐年上升，全球患者已达 3560 万人。如果仍然没有有效的治疗或预防手段，估计到 2030 年将达到 6570 万人，而到 2050 年每 85 个人中就有一位 AD 患者，全球将达到 1.1 亿患者。因此，AD 已经严重威胁人类生命健康，并造成沉重的社会负担 [1,2]。

AD 患者脑组织内最明显的病理学改变是大量淀粉样蛋白 Aβ 的沉积和神经纤维结节的形

成。Aβ 沉积早期对神经元造成毒性刺激，促进神经元胞体内微管相关蛋白 tau（Microtubule-Associated Protein Tau，MAPT）的过度磷酸化，进而形成纤维缠结，造成神经元失能、退化并死亡，脑皮质部明显萎缩 [2]。伴随所有以 Aβ 为靶向的药物临床实验的宣告失败，AD 的致病机理依然笼罩着一层迷雾，严重限制了 AD 药物开发、临床预防、诊断和治疗。

近年来， 在神经科学及神经退行性疾病研究中，小神经胶质细胞（Microglia）在 AD 发生发展中的作用逐渐引起学界的关注，小神经胶质细胞活化造成的中枢神经系统炎症微环境与神经退行性疾病之间的关系也日益受到重视 [3]。本文重点综述了近几年在神经炎症与 AD 领域的最新研究进展。

小神经胶质细胞与神经炎症

小神经胶质细胞是驻留在中枢神经系统内的巨噬细胞样免疫细胞，正常健康状态下，小神经胶质细胞具有未成熟髓样细胞的特征，细胞形态能够连续地伸张、回缩和重塑。同时，小神经胶质细胞被认为是中枢神经系统，特别是脑组织内的第一道防线 [4,5]。在脑损伤或炎性刺激的情况下，小神经胶质细胞进行快速形态变化成为类似阿米巴样（Amoeboid），数量增殖，并迅速迁移到病理损伤部位，功能活化，获得成熟髓样细胞的特性，如抗原递呈、活性物质的产生、基质金属蛋白酶（Matrix Metalloproteinase, MMP）表达、吞噬作用以及细胞因子和生长因子分泌 [6,7]。

小神经胶质细胞的吞噬功能在防止脑组织内有害的外源性物质、死亡细胞碎片、Aβ 淀粉样蛋白的沉积和老年斑的形成等方面发挥重要作用，对神经网络和神经元起保护作用 [5,8]。然而，小神经胶质细胞被活化后产生多种活性物质、基质金属蛋白酶和炎性细胞因子，如 IL-1β，TNF-α、IL-6 等，诱发强烈的炎症反应，对神经元产生毒性作用，进一步诱发神经元变性与死亡 [5]。此外，在其他中枢神经系统疾病和脑损伤中，如帕金森氏病（PD），肌萎缩侧索硬化症（ALS）和多发性硬化（MS），脑中风（Stroke）等病人脑组织病变和损伤部位有大量活化的小神经胶质细胞聚集 [9-11]。

研究表明，在神经退行性疾病（如 AD 和 PD 等）患者中枢神经系统中，一种线粒体定位的转运蛋白 TSPO（18kDa Translocator Protein）的表达水平明显升高，同时伴随小神经胶质细胞明显增多 [12]。同样在 AD 病人尸检脑组织中发现，海马区小神经胶质细胞 TSPO 的表达与 NMDA 受体的变化具有一致性 [13]。TSPO 在线粒体外膜上与电压依赖性阴离子通道（Voltage-Dependent Anion Channel，VDAC）和腺嘌呤核苷转运酶（ANT）共同组成蛋白复合物，参与多种细胞生物学过程，例如，TSPO 可能介导胆固醇由胞浆向线粒体基质内的转运，参与类固醇激素及神经类固醇的生物合成 [14]。在中枢神经系统，TSPO 主要在小神经胶质细胞表达，小神经胶质细胞受到刺激信号活化后，TSPO 的表达水平迅速升高 [15]。目前国际上有多个研究机构在进行 TSPO 作为脑组织内炎症反应的特异性生物标志物的研究，利用放射性同位素标记 TSPO 的配体如[11C](R)-PK11195 作为正电子断层扫描（PET）显影剂，检测脑组织内 TSPO 的表达水平，用于临床评价脑组织内的神经炎症反应 [16]。这些研究及临床应用均提示 AD 的发生发展与小神经胶质细胞活化诱导的炎症反应密切相关。

小神经胶质细胞功能紊乱可诱发 AD 样病变

虽然神经炎症与 AD 的伴发性已经被广泛认同，但其相互关系一直是 AD 发病机制研究的争论热点之一。一些临床研究显示，AD 患者在出现轻度认知障碍（Mild Cognitive Impairment，MCI）及痴呆症状之前的 10~20 年，就出现 Aβ 淀粉样蛋白沉积而成的老年斑，并可通过功能性磁共振检查（functional MRI，fMRI）进行检查诊断 [17]，这些研究表明神经元内 tau 的过度磷酸化聚集可能是由 Aβ 淀粉样蛋白的沉积介导的。然而，该理论目前受到广泛的质疑。

正常情况下，中枢神经系统内的 Aβ 代谢与载脂蛋白 E（Apolipoprotein E，APOE）密切相关。APOE 主要由小神经胶质细胞产生，能够与

可溶的 Aβ 结合，以低密度脂蛋白（LDL）的形式通过循环系统转运至神经系统外 [18]。Laura Spinney 在 2014 年 6 月 5 日发表在《Nature》杂志上的一篇评论中指出，无论是遗传学研究还是药物的临床研究都表明，APOE4 是一个 AD 高风险的基因，相比 Aβ 而言，更可能作为一个 AD 的药物靶点。而 Aβ 也许只是 AD 的一个障眼法 [19]。

针对两种 Aβ 淀粉样蛋白的单抗 Solanezumab（Lilly 公司）和 Bapineuzumab（Pfizer & Janssen AI 公司）的 III 期临床研究表明，通过主动免疫或被动免疫的手段，虽然能够明显清除轻度和中度 AD 患者（包括 APOE4 基因携带者与非携带者）脑组织内 Aβ 淀粉样蛋白沉积，但是并不能阻止患者认知和记忆能力退化，也无法预防 tau 蛋白的过度磷酸化、神经纤维结节的形成和神经元退行性变性、死亡 [20]。这些临床研究结果对 AD 的 Aβ 淀粉样蛋白诱导学说形成了巨大的挑战，这也促使人们的研究重点转移到 tau 病理学说上来，而且 tau 的病理学变化可能更早于 Aβ 淀粉样蛋白的沉积。

最近研究发现，小神经胶质细胞在神经元 tau 蛋白磷酸化方面发挥重要调节作用，并参与 AD 的发生发展。最直接的证据则是来源于对一种小神经胶质细胞特异性 Fractalkine 趋化因子受体（Microglial-Specific Fractalkine Receptor，CX3CR1）的研究。Kiran Bhaskar 及其同事研究发现，CX3CR1 敲除小鼠（$CX3CR1^{-/-}$）的小神经胶质细胞在 LPS 活化后，能够通过 TLR4 和 IL-1 信号激活 p38 MAPK 通路，诱发严重的 tau 磷酸化聚集和小鼠行为学损伤，这表明在正常生理情况下 CX3CR1 对神经元起保护作用 [21]。

Fractalkine（CX3CL1）是一种由神经元产生的趋化因子，其唯一的受体是小神经胶质细胞表面的 CX3CR1，CX3CL1-CX3CR1 信号是神经元与小神经胶质细胞和平共处的特异性信号 [22]。研究表明，CX3CL1 是一种具有神经元保护作用的信号因子，其受体 CX3CR1 与神经退行性疾病密切相关，在 AD 等神经退行性疾病患者的脑中表达量呈进程性降低 [23]。随后的研究也进一步证实 CX3CR1 与小神经胶质细胞的活化密切相关，在多种神经退行性疾病和脑损伤中起到保护作用 [24-27]。因此，人们认为，小神经胶质细胞对神经元可能兼有神经保护和神经毒性作用，而其介导的炎症则是 AD 等疾病发生的重要原因。最近几年，对小神经胶质细胞在脑组织内功能的研究已成为神经科学研究领域的研究热点之一。

炎症小体活化与 AD

炎症小体是存在于炎症细胞中的模式识别受体复合物，能识别包括胞内核酸、活性氧簇（ROS）及胞外晶体和蛋白聚合体（包括 Aβ 老年斑和路易氏体）在内的多种危险信号因子，活化产生 IL-1β 和 IL-18 等炎症因子 [28]。在中枢神经系统中，小神经胶质细胞内炎症小体的活化是引发神经炎症和 AD 的重要因素。AD 患者脑组织内 Aβ 淀粉样蛋白能够激活老年斑周围小神经胶质细胞中的 NLRP3 型炎症小体，释放神经毒性细胞因子 IL-1β，进而对神经元造成强烈的神经毒性作用 [29]。研究表明，IL-1β 与 tau 的磷酸化有直接的关系 [30,31]。在 IL-1β 转基因小鼠模型中，IL-1β 的持续性过表达虽然能够降低 3 月龄 AD 模型小鼠老年斑的生成，但是显著的刺激了老年斑周围小神经胶质细胞的数量和活化程度，并且增加了 tau 蛋白的磷酸化水平，进而促进了小鼠 AD 的病程 [32]。同时，在 NLRP3 敲除的 AD 模型（$NLRP3^{-/-}$，APP^{+}, $PSEN1^{+}$）小鼠中发现，NLRP3 缺失可以明显降低 IL-1β 的产生，减少老龄 AD 小鼠 Aβ 淀粉样蛋白在脑组织内的沉积，改善 AD 模型小鼠的认知和记忆能力 [33]。这表明 NLRP3 炎症小体的活化直接参与了 AD 的病理发生发展过程。

线粒体与神经炎症

虽然在 AD 的进程中，Aβ 是否能够直接影响线粒体形态和功能还存在争议 [34]， 但是，最近研究发现，炎性小体的活化与线粒体功能和线粒体自噬（Mitophagy）密切相关 [35,36]。在静息状态下，NLRP3 定位于胞浆，而炎性小体在激活后，NLRP3 会被募集到核周空间，与线粒体共定位。而且，如果通过抑制 VDAC 使线粒体活性失调，NLRP3 炎性小体的活化将会受到抑制，

ROS 的产生也会减少 [36]，这表明线粒体参与了 NLRP3 炎性小体的活化。

我们前期研究发现，NLRP3 炎症小体的活化可能与 TSPO 有关；此外，我们新发现的一种 AAA^+ ATP 水解酶索瑞酶（Thorase）[37] 也被证明与线粒体的形态功能、神经元保护和神经退行性疾病相关(结果尚未发表)。期望通过这些研究，能够进一步探索神经炎症与神经退行性疾病之间的联系。

小结与展望

神经炎症与 AD 之间的面纱将逐渐被揭开，但是，如同“炎症与肿瘤微环境”的复杂程度一样（黄波，本刊 13 年特刊，13-18），在“AD 相关的神经炎症微环境”中，小神经胶质细胞的作用依然有待深入研究。

NIH 脑研究计划（BRAIN 2025）以及中国脑科学研究计划项目的启动为我们参与相关领域的研究提供了一个前所未有契机。更加有效的动物模型、基因操作手段以及神经科学研究新方法的不断涌现，为 AD 发病机制的探明提供了技术保障，而基于炎症的 AD 药物靶点开发则是该领域未来研究的重点。

【参考文献】

1 World Health Organization and Alzheimer’s Disease International. Dementia: a public health priority.

2 Querfurth, H. W. & LaFerla, F. M. Alzheimer's disease. The New England journal of medicine 362, 329-344 (2010).

3 Perry, V. H., Nicoll, J. A. & Holmes, C. Microglia in neurodegenerative disease. Nature reviews. Neurology 6, 193-201 (2010).

4 Ransohoff, R. M. & Cardona, A. E. The myeloid cells of the central nervous system parenchyma. Nature 468, 253-262 (2010).

5 Gandy, S. & Heppner, F. L. Microglia as dynamic and essential components of the amyloid hypothesis. Neuron 78, 575-577 (2013).

6 Aguzzi, A., Barres, B. A. & Bennett, M. L. Microglia: scapegoat, saboteur, or something else? Science 339, 156-161 (2013).

7 Graeber, M. B. Changing face of microglia. Science 330, 783-788 (2010).

8 Yong, V. W. & Rivest, S. Taking advantage of the systemic immune system to cure brain diseases. Neuron 64, 55-60 (2009).

9 Cardona, A. E. et al. Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor. Nature neuroscience 9, 917-924 (2006).

10 Lucin, K. M. et al. Microglial beclin 1 regulates retromer trafficking and phagocytosis and is impaired in Alzheimer's disease. Neuron 79, 873-886 (2013).

11 Sun, H. et al. Therapeutic potential of mesenchymal stromal cells and MSC conditioned medium in Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS)--in vitro evidence from primary motor neuron cultures, NSC-34 cells, astrocytes and microglia. PloS one 8, e72926 (2013).

12 Rupprecht, R. et al. Translocator protein (18 kDa)(TSPO) as a therapeutic target for neurological and psychiatric disorders. Nature Reviews Drug Discovery 9, 971-988 (2010).

13 Kravitz, E., Gaisler-Salomon, I. & Biegon, A. Hippocampal Glutamate NMDA Receptor Loss Tracks Progression in Alzheimer’s Disease: Quantitative Autoradiography in Postmortem Human Brain. PloS one 8, e81244 (2013).

14 Stocco, D. M. The Role of PBR/TSPO in Steroid Biosynthesis Challenged. Endocrinology 155, 6-9 (2014).

15 Choi, J., Ifuku, M., Noda, M. & Guilarte, T. R. Translocator protein (18 kDa)/peripheral benzodiazepine receptor specific ligands induce microglia functions consistent with an activated state. Glia 59, 219-230 (2011).

16 Dickens, A. M. et al. Detection of Microglial Activation in an Acute Model of Neuroinflammation Using PET and Radiotracers 11C-(R)-PK11195 and 18F-GE-180. Journal of Nuclear Medicine 55, 466-472 (2014).

17 Yoshiyama, Y., Lee, V. M. & Trojanowski, J. Q. Therapeutic strategies for tau mediated neurodegeneration. Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry 84, 784-795 (2013).

18 Kim, J., Basak, J. M. & Holtzman, D. M. The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease. Neuron 63, 287-303 (2009).

19 Spinney, L. Alzheimer's disease: The forgetting gene. Nature 510, 26-28 (2014).

20 Doody, R. S., Farlow, M., Aisen, P. S., Alzheimer's Disease Cooperative Study Data, A. & Publication, C. Phase 3 trials of solanezumab and bapineuzumab for Alzheimer's disease. The New England journal of medicine 370, 1460 (2014).

21 Bhaskar, K. et al. Regulation of tau pathology by the microglial fractalkine receptor. Neuron 68, 19-31 (2010).

22 Mizuno, T., Kawanokuchi, J., Numata, K. & Suzumura, A. Production and neuroprotective functions of fractalkine in the central nervous system. Brain research 979, 65-70 (2003).

23 Combadiere, C. et al. CX3CR1-dependent subretinal microglia cell accumulation is associated with cardinal features of age-related macular degeneration. The Journal of clinical investigation 117, 2920-2928 (2007).

24 Morganti, J. M. et al. The soluble isoform of CX3CL1 is necessary for neuroprotection in a mouse model of Parkinson's disease. The Journal of Neuroscience 32, 14592-14601 (2012).

25 Cho, S. H. et al. CX3CR1 protein signaling modulates microglial activation and protects against plaque-independent cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer disease. The Journal of biological chemistry 286, 32713-32722 (2011).

26 Nash, K. R. et al. Fractalkine overexpression suppresses tau pathology in a mouse model of tauopathy. Neurobiology of aging 34, 1540-1548 (2013).

27 Cipriani, R. et al. CX3CL1 is neuroprotective in permanent focal cerebral ischemia in rodents. The Journal of Neuroscience 31, 16327-16335 (2011).

28 Schroder, K. & Tschopp, J. The inflammasomes. Cell 140, 821-832 (2010).

29 Tan, M. S., Yu, J. T., Jiang, T., Zhu, X. C. & Tan, L. The NLRP3 inflammasome in Alzheimer's disease. Molecular neurobiology 48, 875-882 (2013).

30 Kitazawa, M. et al. Blocking IL-1 signaling rescues cognition, attenuates tau pathology, and restores neuronal beta-catenin pathway function in an Alzheimer's disease model. Journal of immunology 187, 6539-6549 (2011).

31 Li, Y., Liu, L., Barger, S. W. & Griffin, W. S. Interleukin-1 mediates pathological effects of microglia on tau phosphorylation and on synaptophysin synthesis in cortical neurons through a p38-MAPK pathway. The Journal of Neuroscience 23, 1605-1611 (2003).

32 Ghosh, S. et al. Sustained interleukin-1beta overexpression exacerbates tau pathology despite reduced amyloid burden in an Alzheimer's mouse model. The Journal of Neuroscience 33, 5053-5064 (2013).

33 Heneka, M. T. et al. NLRP3 is activated in Alzheimer's disease and contributes to pathology in APP/PS1 mice. Nature 493, 674-678 (2013).

34 Archer, S. L. Mitochondrial dynamics--mitochondrial fission and fusion in human diseases. The New England journal of medicine 369, 2236-2251 (2013).

35 Subramanian, N., Natarajan, K., Clatworthy, M. R., Wang, Z. & Germain, R. N. The adaptor MAVS promotes NLRP3 mitochondrial localization and inflammasome activation. Cell 153, 348-361 (2013).

36 Zhou, R., Yazdi, A. S., Menu, P. & Tschopp, J. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. Nature 469, 221-225 (2011).

37 Zhang, J. et al. The AAA+ ATPase Thorase Regulates AMPA Receptor-Dependent Synaptic Plasticity and Behavior. Cell 145, 284-299 (2011).

作者简介：

张建民教授，2003 年毕业于中国协和医科大学基础医学院免疫学系，获免疫学博士学位。2004 年 2 月到耶鲁大学生物免疫生物学系做博士后，2005 年 8 月转到约翰霍普金斯大学医学院神经病学系做博士后，2009 – 2013 年约翰霍普金斯大学医学院神经病学系任讲师、助理教授。现任中国医学科学院基础医学研究所/北京协和医学院基础学院免疫学系教授、“协和学者”特聘教授、博士生导师。研究方向：1.神经系统与免疫系统的对话机制研究；2.神经免疫性疾病的发病机理、早期诊断生物标志及治疗性靶点的研究。研究论文发表在 Cell，PNAS 等国际杂志上 30 余篇。

通讯地址：北京市东单三条五号新科研楼 704
Email：jzhang42@gmail.com

IgA 肾病遗传学研究进展

Advance in the genetics study of IgA nephropathy

余学清　李明

中山大学附属第一医院肾内科，广州，广东，510080

Yu Xueqing　Li Ming

Department of Nephrology, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University; Key Laboratory of Nephrology, Ministry of Health, Guangzhou,Guangdong,510080，China.

摘要

IgA 肾病（IgAN）是全世界最常见的原发性肾小球疾病，尤其在中国，IgAN 占了所有肾活检的40%以上。已有研究表明，遗传因素在 IgAN 发病机制中起重要作用。近 30 余年来，IgAN 遗传学研究取得了很大的进展，包括连锁分析，候选基因的关联分析以及近年来兴起的全基因组关联分析研究（GWAS）。尤其是 GWAS 在全基因组范围内发现 IgAN 的易感基因，避免了之前关联分析中需预先构建假设而产生的偏倚，为揭示 IgAN 的发病机制提供了重要的依据，是遗传学领域研究中的一个质的飞跃。同时，针对 GWAS 很难发现罕见变异及可能遗漏相关遗传信息的不足，目前又提出了后 GWAS 研究，包括对 GWAS 数据的深度挖掘，GWAS 数据的 Meta 分析，采用外显子芯片进行罕见变异的检测，以及易感位点的精细定位以发现 IgAN 的致病基因等。IgAN 遗传学研究的深入开展，对揭示 IgAN 的遗传发病机制，并进一步探索 IgAN 特异性治疗方法及干预新靶点，寻找预测病人预后和治疗反应的生物标记，具有重要的科学指导意义和临床实用价值。

关键词

IgA 肾病，全基因组关联分析研究，易感基因，单核苷酸多态性，精细定位，基因填补，外显子芯片，后 GWAS 研究

Abstract

IgA nephropathy (IgAN) is the most common primary glomerulonephritis among patients undergoing renal biopsy, and accounts for more than 40% of total renal biopsy; several lines of evidence support the importance of genetic risk factors on the pathogenesis of IgAN. In the past three decades, the genetic studies of IgAN have been in great progress, including linkage study and candidate gene association study. Recent years, the rise of genome wide association study (GWAS) provides the new tactics of genetics study, which avoids the bias of constructing hypothesis in previous association studies, and provided an important theoretical basis for revealing the pathogenesis of IgAN. With regard to the limitation of GWAS in the difficulty in discovering the rare variants and possible omissions related genetic information, post-GWAS study was put forward, including data mining of GWAS data, Meta analysis of GWAS data, Exome array in discovering the rare variants and fine mapping of the susceptibility loci to discover the possible causal genes. The in-depth development of IgAN genetics study has important scientific significance and practical value for revealing the genetic pathogenesis of IgAN and further exploring new targets of IgAN intervention.

Key word

IgA nephropathy, Genome wide association study (GWAS), susceptibility gene, singlenucleotidepolymorphism (SNP), fine mapping, imputation, exome array, post-GWAS study

一．研究背景

1.IgA 肾病（IgAN）概述

IgA 肾病（IgA nephropathy，IgAN）由法国 Jean Berger 医生于 1968 年首次提出并详细描述[1],是至今临床最常见的原发性肾小球疾病,占原发性肾小球疾病的 25-50%[2]。在中国，IgAN 占了所有肾活检的 40%以上[3]。IgAN 的病理特征是以 IgA 单独沉积或 IgA 沉积为主的免疫球蛋白及补体在肾小球系膜区和（或）肾小球毛细血管袢沉积，肾小球系膜细胞增生和系膜基质积聚为主要特征[4,5]。其临床表现主要为反复发作的肉眼血尿或持续镜下血尿，可伴有不同程度的蛋白尿、高血压及肾功能损害，常由上呼吸道感染诱发[6,7]。IgAN 临床及病理表现多样，症状轻重不一，治疗反应差异较大，临床结局不一，有的病人可表现为良性血尿，肾功能终生稳定，而约有 15%～40%的患者最终进展至终末期肾脏病（end stage kidney diseases, ESKD，尿毒症）[5]。

2. IgAN 流行病学研究

IgAN 的发病高峰年龄为中青年，在不同地域其发病率有显著差异，在亚洲人群中发病率明显高于欧洲和美国，而在非洲人群中最低；不同地域的发病率也存在性别差异，在欧洲，男性 IgAN 发病率高于女性，而在亚洲人群中没有差别;轻微尿检异常是否需要肾穿尚存在争议，这可能是导致发病率有地域差异的一个原因，但尚不足以解释全部差异[1,5,8]。此外，在 IgAN 中存在明显的家族聚集性，在意大利北部、法国以及美国东部等地区进行的相关调查研究发现，家族性 IgAN（familial IgA nephropathy, FIgAN）占所有 IgAN 的 10％～15％[9]。

3.遗传因素在 IgAN 发病机制中的作用

IgAN 发病率的地域差别、临床表现和预后的不同以及家族聚集性等特点共同提示遗传因素在 IgAN 发病机制的重要作用。大多数学者认为，IgAN 属于多基因复杂性疾病，其发病是由多个基因及环境因素相互作用的结果；已有的研究倾向认为其是不完全外显的常染色体显性遗传[6,10]。在一个意大利南部的 FIgAN 的研究中发现：IgAN 患者一级亲属 IgAN 的发病率为普通人群的 16.4 倍，二级亲属的发病率为普通人群的 2.4 倍[6]。近 20 年来 IgA1 糖基化异常一直被认为是 IgAN 发病机制中的一个核心环节[10,11]，而有研究表明糖基化异常的 IgA1 的产生也是源于遗传因素的作用，且是由常染色体显性遗传导致；糖基化异常可能是疾病发展过程中的始动因素，其他遗传背景和环境因素的共同作用共同促使了疾病的发生发展[10]。

基于遗传因素在 IgAN 中所起的作用，一系列探讨其遗传背景的研究方法也在不断发展、改进和完善。

二．IgAN 遗传学研究现状

目前对于 IgAN 的遗传学研究，主要有以 IgAN 家系为研究对象的连锁分析和以散发性 IgAN 为研究对象的关联性研究，其中关联性研究主要包括候选基因关联研究及全基因组关联研究。

1. 连锁分析

连锁分析的原理是通过估计某种表型与遗传标志物在子代中的重组率，计算两者之间的连锁程度和遗传距离，从而确定该表型致病基因在染色体上的位置。对IgAN家系进行连锁分析是定位致病基因的主要方法之一。目前已有3个对FIgAN进行全基因组连锁分析的研究结果报道，发现了多个可能与IgAN相关的致病区间(包括6q22-23，4q26-21，17q12-22和2q36等)[12-14]。但截至目前，在这些连锁区间里，还没有发现与IgAN相关的致病基因及易感基因。分析其原因，可能是由于IgAN为多基因复杂性疾病，导致其表现型的识别相对困难，同时，IgAN遗传的异质性也限制了致病基因的精确定位。另外，在不同家系中进行的连锁分析研究得到的结果各不相同，提

示FIgAN可能存在多个易感基因，这些基因和环境因素共同决定患者的表型。

2. 候选基因的关联分析

候选基因的关联分析是一种以散发人群为研究对象的相关性研究，其主要是通过以对疾病发病机制的深入研究或者之前连锁分析确定的疾病相关区间为基础来选取相关的候选基因进行病例-对照研究。相对于连锁分析，候选基因关联研究的病例收集相对容易，是目前较常用的关联研究方法，而且结论可给出明确的 OR 值，得到阳性结果的概率较高。目前的研究对于 IgAN 候选基因的选择主要集中在肾素-血管紧张素系统相关基因（血管紧张素转化酶等）[15]、免疫识别相关基因（人类白细胞抗原等）[16]、细胞因子相关基因（如肿瘤坏死因子、白细胞介素 10、转化生长因子β1 等）[17-19] 以及近年来研究比较多的 IgA1 分子糖基化异常相关基因 [20] 等。但这些候选基因的关联分析研究很多都存在着患者样本数较少，统计分析方法相对滞后及未在另一患者群中进行验证等缺陷 [9]。

3. 全基因组关联分析研究

全基因组关联分析(Genome-wide association study，GWAS)是应用基因组中数以百万计的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)为分子遗传标记，进行全基因组水平上的对照分析或相关性分析，通过比较发现影响复杂性状的基因变异的一种新策略，其对于定位微效及中效易感基因效能要强于连锁分析，与传统的候选基因关联分析策略不同的是，GWAS研究不再需要预先依据尚未充分阐明的生物学基础来假设某些特定的基因或位点与疾病相关联[21]。

自2005年GWAS研究兴起以来，已有多个人类的复杂疾病找到了相关的易感基因。IgAN的GWAS研究起步相对较晚，自2010年，相继有3个不同种族背景人群的IgAN的GWAS研究。其中，IgAN的首个GWAS研究由Feehally等[22]同时对2组欧洲人的318127个SNP进行扫描，发现6号染色体短臂人类白细胞抗原(HLA)区域与IgAN强关联；对该区域的HLA相关基因进一步分析显示，HLA-DQ基因所在区段与疾病相关性最强；但此项研究样本量较少，且未经大规模人群验证。另一项由美国和中国学者合作进行的大规模的GWAS研究，发现在中国和欧美高加索人群中共有5个易感位点与IgAN相关联(包括22q12，HLA区域的3个独立信号和lq32上)[23]。

中山一院肾科新近完成的基于中国人群IgAN的GWAS研究，选取1434例散发性的IgAN患者和4270例健康对照者进行全基因组关联分析，随后将筛选出的差异显著的61个SNP在2703例患者和3464例对照中进行验证，发现了中国人群中IgA肾病独有的两个新的易感基因位点（17p13和8p23），验证了美国研究中发现的易感位点22q12，并采用多重关联分析发现HLA区域多个SNPs位点与IgAN强关联；同时还进行了差异表达SNPs与临床表型的相关研究，发现多个SNP与IgAN的临床和病理表型相关联[24]。

这 3 项 IgAN-GWAS 研究结果均发现 HLA 区域与 IgAN 的发病相关，提示机体免疫应答在 IgAN 的发病中起着重要的作用。同时，除外 HLA 区域，我们的研究结果验证了之前研究发现的 22q12，该区域内的相关基因与粘膜免疫和炎症相关；同时首次发现了中国人群 IgA 肾病特有的两个易感位点，这两个位点内的基因 TNFSF13 和 DEFA 分别与自身免疫及肾小球巨噬细胞浸润相关，提示 IgAN 可能与自身免疫和炎症等相关联。GWAS 研究结果提示多个易感基因位点参与 IgAN 的发生和发展，为 IgA 肾病发病机制研究提供了新的理论基础和客观证据。

虽然GWAS极大提高了对复杂性状分子遗传机制的认识，但随着GWAS研究的深入开展，其自身的局限性也逐渐显现。据此，科学家们提出了后GWAS研究的概念。

三. IgAN的后GWAS 研究：

GWAS发现了多个复杂疾病的易感基因/位点，推动了复杂疾病的分子遗传学的发展。然而，其自身也存在着一些缺陷。首先，GWAS中单个SNP的分析往往挑选最具有统计学差异的SNPs，而忽略了其他统计学意义相对较弱的SNP，这样

导致遗漏了可能与疾病存在较弱关联效应的基因；其次，GWAS对常见变异(common variants)的检测率较高，而难以检测低频变异（low-frequency variants）和罕见变异（rare variants）[25]。因此，采取有效措施充分分析现有的GWAS数据，提高发现易感基因/位点的效能，同时进一步发现罕见和低频变异，以发现致病基因，是后GWAS研究的重点。据此，后GWAS研究主要包括：

1.进一步发现IgAN相关的遗传易感位点

采用多种遗传学方法，发现与IgAN相关的常见变异、罕见及低频变异等。

1）使用统计方法发现GWAS中未检测到的常见变异，方法有：

GWAS数据的深度挖掘：采用基因填补（imputation）的方法发现GWAS中遗漏的遗传信息。Imputation是根据GWAS 已经检测到的位点基因型信息，结合已有的数据库提供的单体型结构，来推断未检测位点的基因型，进而对该位点与疾病的关联性进行分析[26]。Imputation还可以对一些分型失败位点的基因型进行推测和校正。目前Imputation主要以HapMap的数据作为参考对照，但由于HapMap计划中的分型样本数量相对较少，因此作为参考对照的基因分型数据并不能完全准确代表各人群的真实情况，所获得的数据资料相对有限[27]。随着“千人基因组计划（1000 genome project）”的完成，我们可以发现最小等位基因频率（MAF）在1-5%的SNP信息[28]，将能够提供更加全面和准确的DNA序列变异数据，提高Imputation的准确性。目前已有多项研究采用imputation的方法对GWAS的数据进行分析，从而发现之前研究未寻找到的相关SNP位点，提示采用imputation可以更准确地了解相关的疾病遗传信息。我们选取了529万SNPs，在4,000病人和4,000正常对照进行了分析，发现了7个新的变异位点，论文已投送Nature Genetics评阅。

多个GWAS数据的meta 分析。鉴于GWAS研究的工作量巨大、实验费用昂贵等特点，增加GWAS一阶段的研究样本量相对来说比较困难，但是单个GWAS研究的样本量又可能难以达到研究需要，因此目前也有多个研究采用meta分析的方法通过合并多个研究数据的方式增加样本含量，提高统计把握度，从而发现新的易感位点。目前已经广泛应用在多种复杂疾病的GWAS研究中，如糖尿病、哮喘及过敏性皮炎等[29,30]。因此，加强国际间的合作，将不同单个GWAS研究进行联合荟萃分析，将有助更全面地发现IgAN相关易感基因。

2）发现罕见和低频变异：采用外显子测序（或外显子芯片）检测IgAN的罕见变异和低频变异。

目前多基因复杂疾病的发病模式有“常见疾病-常见变异（common disease, common variants, CD/CV）”和“常见疾病-罕见变异（common disease, rare variants, CD/RV）”两种模式，后者是指一些多基因复杂疾病的单个易感基因的变异十分罕见，但每一个变异的效应却十分强大 [31]。越来越多的证据表明，罕见变异对疾病的发病影响可能较大 [32]。据此，科学家提出了外显子组测序（exome sequencing）和/或外显子芯片（exome array）技术以检测罕见及低频变异。外显子组是指占人类基因组约 1%的全部外显子区域的集合，该区域包含着合成蛋白质所需要的信息。外显子组测序是将基因组中的所有外显子进行测序，了解相关的遗传信息。其优势在于能够更全面地寻找目标 SNP 位点（包括常见变异和罕见变异），从而能够更准确地发现与疾病相关的致病基因。自 2009 年以来，已有多个研究采用高通量外显子测序方法和/或外显子芯片的方法发现疾病的罕见变异 [33,34]，科学界对这一研究方法给予了充分肯定，并提示采用该方法可以在复杂多基因遗传病中更准确地寻找到相关致病基因 [35]。而目前尚无采用该方法对 IgAN 进行研究的报道。我们选取了 2,000 病人和 15,000 正常对照进行了第一期挖掘，然后我们选取了 4,000 病人和 4,000 正常对照进行了研究，初步发现了 11 个非常有显著性的易感位点，后续研究正在进行之中。

2.易感基因的精细定位以明确可能的IgAN致病基因

在 GWAS 研究中发现与疾病相关的易感位点，只是提示在该位点内可能有致病基因的存在。还需要对这一相对局限的区域内进行全面分析，系统了解该区域的遗传变异图谱，以发现真正的致病基因。目前认为，采用精细定位（fine mapping）策略，对 GWAS 研究发现的易感染色体区段进行深入研究，是在后 GWAS 时代遗传学研究发现复杂疾病致病基因的一个有效方法[36]。精细定位是通过增加易感染色体区域内遗传标记的检测密度，找到与疾病关联程度最强的一组变异，进而确定易感基因或者缩小易感区域[37]。随着新一代高通量测序技术的开展，通过对目标区域进行深入测序，可以全面寻找候选区域或候选基因内的易感位点，从而发现该区段与疾病相关的易感基因。目前已经广泛应用于复杂疾病、癌症和单基因病等遗传性疾病研究中。因此在后 GWAS 时代，采用新一代高通量测序对 GWAS 研究中发现的易感染色体位点进行深入研究，精细定位，从而发现 IgAN 致病基因，将对揭示 IgAN 发病机制起着重要的影响。我们和英国诺丁汉大学遗传研究所合作，开展了 Defensins 基因拷贝数变异与 IgAN 相关关系的研究，目前进展良好。下一步将重点探讨易感位点拷贝数变异与 IgAN 临床表型及长期预后的关系。

四．结论

综上所述，IgAN 的遗传学研究在开展了多项 GWAS 研究后，目前已进入后 GWAS 时代，即采用多种研究方法全面寻找易感基因。而采用精细定位发现 IgAN 可能的致病基因后，还需采用功能学方法加以证实，以期发现真正的致病基因（causal genes）。另外，由于 IgAN 是由基因和环境因素共同起作用的复杂性多基因疾病，因此了解基因-基因的相互作用及基因-环境的相互关系，将更进一步增加对疾病的认识。同时，已有的研究显示，即使在 GWAS 研究发现了多个遗传易感位点后，这些易感位点也仅能解释约 5% 左右的 IgAN 遗传度，那么这些丢失的遗传度需要如何解释呢？目前还需要从表观遗传学等角度以进一步研究。相信随着 IgAN 遗传学研究的深入开展，在揭示 IgAN 发病机制上一定会有新的突破。

【参考文献】

1 Feehally, J. and Cameron, J. S., IgA nephropathy: progress before and since Berger. Am J Kidney Dis58 (2), 310 (2011).

2 Suzuki, Y. et al., Pathological role of tonsillar B cells in IgA nephropathy. Clin Dev Immunol2011, 639074 (2011).

3 Cai GY,Chen XM. Immunoglobulin A nephropathy in China: progress and challenges. Am J Nephrol30(3):268 (2009).

4 Mestecky, J. et al., IgA nephropathy: molecular mechanisms of the disease. Annu Rev Pathol8, 217 (2013).

5 Barratt, J. and Feehally, J., IgA nephropathy. J Am Soc Nephrol16 (7), 2088 (2005).

6 Schena, F. P. et al., Increased risk of end-stage renal disease in familial IgA nephropathy. J Am Soc Nephrol13 (2), 453 (2002).

7 Kiryluk, K., Novak, J. and Gharavi, A. G., Pathogenesis of immunoglobulin A nephropathy: recent insight from genetic studies. Annu Rev Med64, 339 (2013).

8 Kiryluk, K. et al., Geographic differences in genetic susceptibility to IgA nephropathy: GWAS replication study and geospatial risk analysis. PLoS Genet8 (6), e1002765 (2012).

9 Kiryluk, K. et al., Genetic studies of IgA nephropathy: past, present, and future. Pediatr Nephrol25 (11), 2257 (2010).

10 Gharavi, A. G. et al., Aberrant IgA1 glycosylation is inherited in familial and sporadic IgA nephropathy. J Am Soc Nephrol19 (5), 1008 (2008).

11 Moldoveanu, Z. et al., Patients with IgA nephropathy have increased serum galactose-deficient IgA1 levels. Kidney Int71 (11), 1148 (2007).

12 Gharavi, A. G. et al., IgA nephropathy, the most common cause of glomerulonephritis, is linked to 6q22-23. Nat Genet26 (3), 354 (2000).

13 Bisceglia, L. et al., Genetic heterogeneity in Italian families with IgA nephropathy: suggestive linkage for two novel IgA nephropathy loci. Am J Hum Genet79 (6), 1130 (2006).

14 Paterson, A. D. et al., Genome-wide linkage scan of a large family with IgA nephropathy localizes a novel susceptibility locus to chromosome 2q36. J Am Soc Nephrol18 (8), 2408 (2007).

15 Zhou, T. B., Yin, S. S. and Liang, R., A meta-analysis of the association between angiotensin-converting enzyme insertion/deletion gene polymorphism and end-stage renal disease risk in IgA nephropathy patients. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst14 (3), 235 (2013).

16 Vuong, M. T. et al., Genetic evidence for involvement of adaptive immunity in the development of IgA nephropathy: MHC class II alleles are protective in a Caucasian population. Hum Immunol74 (8), 957 (2013).

17 Tuglular, S., Berthoux, P. and Berthoux, F., Polymorphisms of the tumour necrosis factor alpha gene at position -308 and TNFd microsatellite in primary IgA nephropathy. Nephrol Dial Transplant18 (4), 724 (2003).

18 Bantis, C. et al., Influence of interleukin-10 gene G-1082A polymorphism on recurrent IgA nephropathy. J Nephrol21 (6), 941 (2008).

19 Vuong, M. T. et al., Genetic variation in the transforming growth factor-beta1 gene is associated with susceptibility to IgA nephropathy. Nephrol Dial Transplant24 (10), 3061 (2009).

20 Li, G. S. et al., Variants of C1GALT1 gene are associated with the genetic susceptibility to IgA nephropathy. Kidney Int71 (5), 448 (2007).

21 Hardy, J. and Singleton, A., Genomewide association studies and human disease. N Engl J Med360 (17), 1759 (2009).

22 Feehally, J. et al., HLA has strongest association with IgA nephropathy in genome-wide analysis. J Am Soc Nephrol21 (10), 1791 (2010).

23 Gharavi, A. G. et al., Genome-wide association study identifies susceptibility loci for IgA nephropathy. Nat Genet43 (4), 321 (2011).

24 Yu, X. Q. et al., A genome-wide association study in Han Chinese identifies multiple susceptibility loci for IgA nephropathy. Nat Genet44 (2), 178 (2012).

25 Manolio, T. A., Genomewide association studies and assessment of the risk of disease. N Engl J Med363 (2), 166 (2010).

26 Marchini, J. and Howie, B., Genotype imputation for genome-wide association studies. Nat Rev Genet11 (7), 499 (2010).

27 Browning, S. R., Missing data imputation and haplotype phase inference for genome-wide association studies. Hum Genet124 (5), 439 (2008).

28 Abecasis, G. R. et al., A map of human genome variation from population-scale sequencing. Nature467 (7319), 1061 (2010).

29 Zeggini, E. et al., Meta-analysis of genome-wide association data and large-scale replication identifies additional susceptibility loci for type 2 diabetes. Nat Genet40 (5), 638 (2008).

30 Torgerson, D. G. et al., Meta-analysis of genome-wide association studies of asthma in ethnically diverse North American populations. Nat Genet43 (9), 887 (2011).

31 Bodmer, W. and Bonilla, C., Common and rare variants in multifactorial susceptibility to common diseases. Nat Genet40 (6), 695 (2008).

32 Walsh, T. et al., Rare structural variants disrupt multiple genes in neurodevelopmental pathways in schizophrenia. Science320 (5875), 539 (2008).

33 Ng, S. B. et al., Targeted capture and massively parallel sequencing of 12 human exomes. Nature461 (7261), 272 (2009).

34 Ng, S. B. et al., Exome sequencing identifies the cause of a mendelian disorder. Nat Genet42 (1), 30 (2010).

35 Biesecker, L. G., Exome sequencing makes medical genomics a reality. Nat Genet42 (1), 13 (2010).

36 Shea, J. et al., Comparing strategies to fine-map the association of common SNPs at chromosome 9p21 with type 2 diabetes and myocardial infarction. Nat Genet43 (8), 801 (2011).

37 McCarthy, M. I. et al., Genome-wide association studies for complex traits: consensus, uncertainty and challenges. Nat Rev Genet9 (5), 356 (2008).

作者简介:

余学清，男，教育部长江学者特聘教授。现任中山大学附属第一医院副院长，卫生部和广东省肾脏病重点实验室主任。主要学术兼职：国务院学位委员会学科评议组成员，中华肾脏病学会候任主任委员，中国医师协会肾内科医师分会前任会长，中国肾脏病防治联盟主席，Associate Editor of 〈American Journal of kidney Diseases〉, Subject Editor of Nephrology。毕业后长期从事内科肾脏疾病临床和基础研究工作，至今共承担各级科研基金 39 项，包括国家自然科学杰出青年基金，国家自然科学基金重点项目、“973”重点基础研究计划和“十二五”国家科技计划课题组长；发表科研论文 391 篇，其中 SCI 收录 141 篇，包括 Nature Genetic, Lancet, JASN, Kidney Int, JBC 等。主要研究方向 1. IgA 和狼疮性肾炎遗传易感基因、免疫发病机制及干预研究； 2. 腹膜透析的临床和相关基础研究；3. 基于慢性肾脏病危险因素的社区干预研究。

人脑组织库建设与神经科学研究

Human Brain Banking and Neuroscience Research

仇文颖[1]　黄越[2]　盖卫平[3]　严小新[4]　马超*[1]

1. 中国医学科学院基础医学研究所，北京协和医学院基础学院，人体解剖与组胚学系
2. 澳大利亚神经科学院，新南威尔士大学，悉尼人脑组织库
3. 澳大利亚阿德莱德市弗林德大学神经科学中心和生理学系，南澳洲人脑组织库
4. 中南大学湘雅医学院人体解剖与神经生物学系

* 通讯作者：马超

Wenying Qiu[1]，Yue Huang[2]，Wei-Ping Gai[3]，Xiao-Xin Yan[4]，Chao Ma*[1]

1. Department of Human Anatomy, Histology & Embryology, Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing, China
2. Neuroscience Research Australia, Randwick, Sydney; School of Medical Sciences, University of New South Wales, Sydney, Australia
3. South Australian Brain Bank, Centre for Neuroscience and Department of Human Physiology, Flinders University, GPO Box 2100, Adelaide, SA, Australia
4. Department of Anatomy and Neurobiology, Central South University School of Basic Medical Science, Changsha, Hunan, China

* Corresponding: Chao Ma

摘要

人脑组织库是收集、贮存、评估和提供人脑组织用于科学研究的专业机构，在发达国家已经形成了完善的运行体系，极大的推动了脑科学和脑疾病的研究。中国医学科学院北京协和医学院与中南大学湘雅医学院于 2014 年 4 月 18-26 日在长沙和北京联合召开了首届“中国人脑组织库建设国际研讨会”。会上达成共识，筹备成立“中国人脑组织库协作联盟”，并拟订《中国人脑组织库标准化操作方案》。这将为我国神经科学基础与临床研究提供新的资源和动力。

Abstract

Human brain banking is a systematic scientific endeavor specialized in the collection, storage, assessment and dissemination of human brain tissues for scientific research of human brain functions and diseases. Human brain banking has been well established in western countries and has made critical contributions to the understanding of brain functions and disorders. The first International Workshop on Human Brain Banking in China was held in Changsha and Beijing on April 19-26, 2014, jointly organized by the Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College and Central South University XiangYa School of Medicine. During the workshop, domestic participants reached consent to startup a ‘Chinese Consortium of human brain banking’, and planned to co-draft a Chinese version of ‘Standard Operation Protocol in Human Brain Banking’. The establishment of a nationwide network of standardized human brain banks will provide much needed resources for the improvement of basic and clinical neuroscience research of human brains in China.

正文

人脑是亿万年生物进化的巅峰，是自然界已知最复杂和最特殊的器官。了解人脑的功能是人类认识自身和自然最具挑战性的科学使命。针对人脑和脑相关疾病的研究在很大程度上难以用动物模型替代。正常以及罹患疾病的人脑组织是我们认识脑的基础。人脑组织库是收集、贮存以及提供人脑组织用于教学与研究的专门机构，可以帮助我们了解脑的结构，认识脑的功能，整合神经病学、心理学、以及发育异常的基础以及临床的实验研究，并指导动物或体外模型创建及疾病分子机制与转化医学研究[1]。人脑组织库的建设和研究在世界范围内已有 50 多年的历史，在很多国家都受到高度重视。已形成比较完善的操作标准、研究平台和成熟的协作体系，其相关学术成果推动了神经疾病病因学和病理学机制认识，为建立和完善对这些疾病的预防和治疗提供了新的理论基础和探索方向。

近一百多年来，针对人脑组织的研究有了很大的进展。最初，由于技术手段的限制，脑组织多以石蜡包埋形式保存[2]，用于脑疾病的神经病理检查。从 1892 年的‘皮克病’，到 Alzheimer’s 病、路易体痴呆，神经病理在确定疾病的类型方面起到了决定性的作用。即使是在医学影像和其他诊断技术高度发达的今天，罕见的神经性疾病仍需神经病理做出最后的确定诊断。随着现代医学和分子生物学技术的发展，人们对神经疾病的认识已不再满足于定性的需要。科学家们开始用人脑材料探讨神经疾病的发生、发展机制，进而，找到相应的治疗方案来治疗这类疾病。组织冷冻技术可保存脑组织内的蛋白、脂类以及核酸等分子，扩展了人脑组织的研究水平。现代的脑组织库，不仅可以提供组织切片用于染色观察，还能够提供保存完好的组织用以提取生物大分子等成分[3]。

目前世界上医学比较发达的国家几乎都有人脑组织库[4]。在欧洲，19 个人脑组织库组成一网络系统（BrainNet Europe），共同签署有脑库相关的基本法律准则以及伦理学原则。荷兰脑库成立于 1985 年，通过前瞻性的供者计划收集脑及脊髓，所有组织均有全面的神经病理诊断。平均 6.5 小时的取材延迟时间使得神经组织能用于基因组学、表观遗传学、蛋白质组学等方面的研究。截至目前，已经为世界范围内的 700 余个项目提供组织样本，发表论文 1700 余篇。英国 Queen Square Brain Bank (QSBB) 同样成立于 1985 年，主要收集包括帕金森病在内的多种运动系统疾病和痴呆病历以供研究。在美国， 人脑组织库中心有 10 个下属的人脑组织分库。以 Lieber 脑研究所为例，主要致力于精神疾病研究，在过去的 18 年中收集了近 2000 例脑组织，利用对照的脑组织进行了从 4 个月的胎儿到 90 余岁老年的不同生命阶段的正常基因表达的 cDNA 研究，并建立了 BrainCloud™网络系统全球共享。在澳大利亚，每个州都有 1-2 个人脑组织库，并在此基础上，形成人脑组织库联盟（ABBN）。8 个不同脑库各具特点，有针对性地收集特异疾病的人脑、脊髓组织，包括神经退行性变，运动神经元病，酒精性脑病，精神疾病等。由各个脑库主管组成 ABBN 执行委员会， 统一脑组织处理、诊断的标准以及组织提供程序。

二十年来，脑库的组织框架、脑组织的获取以及神经病理学技术都取得了长足的进步。正是在这样的组织基础上，一些神经病学的重要成果才得以出现，如额颞叶痴呆患者细胞包涵体中 TDP-43 蛋白的分离[5]，以及对脑内转录本的深入理解[6] 。这些成果突显了脑库的应用潜力。随着新技术的开发与完善，如单细胞 RNA 测序，死后脑组织成像等，脑库组织的应用还会继续增加。

既便如此发展，研究者还是感到优质脑组织资源的短缺。脑组织供者的临床、组织病理信息越完善，脑组织的利用价值也越高。这一方面需要脑库与医院的密切协作，建立及维持恒定的供者库。另一方面需要应用最新的神经病理学技术及标准，对脑库组织进行准确的诊断。对于一些罕见病，更需要多脑库的共同合作，脑库的全球化将是未来的发展方向。因此，在脑库的建设及发展中，标准化的操作以及诊断是必不可少的。

[1] 一个运行良好的人脑组织库，往往是由神经病理学家、神经科学家及神经科医生共同努力的结果。

中国的神经病理奠基人有协和医院的黄克维教授、华山医院的张沅昌教授和北大医院的许英魁教授等。他们都曾在国外进行过神经病理的学习，并于上世纪 40 年代回国，开始创办神经病理学。在 1980 年代,中国的各个地区都有神经病理学家和神经科医生，如郭玉璞、王德生、刘多三、林世和和许庆中教授等。然而，随着时代的变迁，神经科医生从事全脑神经病理的越来越少，脑组织的病理尸检率和遗体捐献率也逐年下降，以至于许多医院取消了全脑神经病理这一科室和相关项目。

目前在中国，人脑组织的来源除了手术取得的部分病理组织（绝大多数是肿瘤组织）外，主要依赖于遗体志愿捐献。国内有不少单位也曾试图创建人脑组织库，但由于人脑组织的来源困难，以及管理和使用方面也缺乏规范的标准和各单位之间的协作网络，国内人脑组织库的规模与意义并没有充分的发挥出来。因此，建立规范标准的中国人脑组织库并且形成国内的协作网，既是世界范围内神经科学研究的大势所趋，也是目前国内医学研究的迫切需求。

为了借鉴国外先进经验，加强国内高校及科研团体间的合作，在建设和完善中国的人脑组织库操作规范和研究平台，中国医学科学院北京协和医学院与中南大学湘雅医学院联合筹备并主办了首届“中国人脑组织库建设国际研讨会”(http://anatomy.sbm.pumc.edu.cn/brainbankworkshop2014/)。会议于 2014 年 4 月 18 日至 26 日先后在湖南长沙和北京召开，邀请了数十位来自美国、澳大利亚、荷兰、英国、丹麦、斯里兰卡等国的人脑组织库负责人和相关专家参会，并得到了国内各大医学院校和相关科研机构的积极响应。4 月 19 日在湖南长沙召开了大会开幕式和专题报告会，中南大学湘雅医学院人体解剖与神经生物学系的严小新教授主持了会议。国内知名的神经科学专家，浙江大学医学部主任段树民院士做大会开幕发言，展望了中国脑科学计划的前景，随后，各国人脑组织库的负责人和神经科学专家就人脑组织库的建设和管理的经验以及相关研究成果进行了专题会议报告，与会的国内专家也介绍了各自的资源以及研究成果。4 月 25 日，北京卫星会场的学术讲座在首都医科大学北京天坛医院神经外科研究所举行。多位国际知名专家就人脑组织库的运行细节以及对中国的指导意义进行了专题演讲并与国内专家进行了深入探讨；参会的中国医学科学院基础医学研究所、北京协和医院、浙江大学医学院、首都医科大学、北京大学医学院、中南大学医学院、河北医科大学等单位的相关国内专家还就国内脑库联盟建设、组织收集步骤、资源共享方式等进行了热烈讨论，经北京协和医学院与湘雅医学院的代表提议，全体参会人员一致同意筹备成立“中国人脑组织库协作联盟”，并着手分工拟订《中国人脑组织库标准化操作方案》。4 月 26 日，在北京协和医学院基础学院举行了中国人脑组织库标准化操作培训。培训班的开幕式在具有近百年历史的东单三条九号院解剖楼举行，首先参会全体人员进行了向遗体和脑志愿捐献者致敬、默哀和献花的仪式。澳洲神经科学院首席专家 Glenda Halliday 教授向北京协和医学院人体解剖与组胚学系马超教授赠送了一件特殊的礼物：来自澳大利亚悉尼人脑组织库的正常老年人、帕金森病和阿尔兹海默症患者的成套脑组织病理切片。利用这套切片，Halliday 教授和她的同事黄越博士在医大新教学科研楼的组织学实验室结合临床病理讲授了相关人脑退行性疾病的诊断标准；随后在澳大利亚 Flinders 大学医学院生理学系研究员、人脑组织库专家盖卫平博士和 Robyn Flook 女士的指导下，实时演示了固定脑组织的切片、取材及采样过程。参会的美国和荷兰专家还结合标本现场讲解了人脑组织的大体检查。来自国内多所高校、医院和研究所院的参会人员都获益匪浅。

此次会议的成功召开标志着我国人脑组织库的建设和研究进入了广泛合作和快速发展阶段。包括“中国科技网”在内的国内多家媒体都对此次会议做了报道（ http://www.wokeji.com/shouye/guonei/201405/t20140504_706629.shtml ）。人脑组织库标准化操作规范的制订及其

在全国范围内的推广，将为中国人脑组织库的建设和合作共享奠定基础，从而为我国神经科学基础与临床研究的快速发展提供宝贵的资源平台。

【参考文献】

1 Samarasekera, N., et al., Brain banking for neurological disorders. Lancet Neurol, 2013. 12(11): p. 1096-105.

2 Gere, C., A brief history of brain archiving. J Hist Neurosci, 2003. 12(4): p. 396-410.

3 Graeber, M.B., Twenty-first century brain banking: at the crossroads. Acta Neuropathol, 2008. 115(5): p. 493-6.

4 Kretzschmar, H., Brain banking: opportunities, challenges and meaning for the future. Nat Rev Neurosci, 2009. 10(1): p. 70-8.

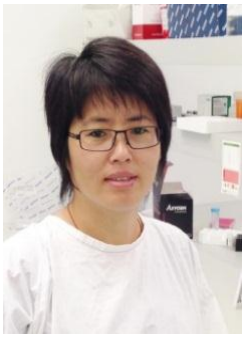
5 Neumann, M., et al., Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. Science, 2006. 314(5796): p. 130-3.

6 Colantuoni, C., et al., Temporal dynamics and genetic control of transcription in the human prefrontal cortex. Nature, 2011. 478(7370): p. 519-23.

作者简介：

仇文颖博士

2000 年毕业于首都医科大学组胚系，获硕士学位。2003 年毕业于北京协和医学院，获博士学位。在北京协和医学院人体解剖与组织胚胎学系任教至今，从事医大本科、护理及研究生《组织胚胎学》《组织化学》教学工作。科研工作集中在皮肤毛囊发育及干细胞研究。2014 年赴悉尼参加脑库培训课程。参与了中国医学科学院北京协和医学院人脑组织库的建设并负责开展神经病理学检测工作。



Yue Huang, MD, PhD

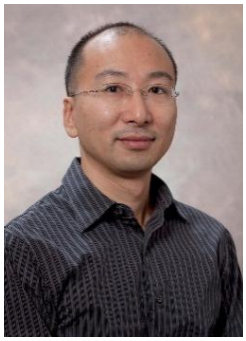
黄越博士于 1991 年毕业于哈尔滨医科大学，从事神经内科临床工作 9 年。于 2003 年获得神经病学博士。在读博期间，通过首都医科大学和澳洲 Flinders 大学联合培养，学习神经科疾病的基因和蛋白质组学检测。自 2003 年始，黄越博士即在澳大利亚神经科学院从事神经变性性疾病的病理、基因和临床方面的研究。黄越博士目前是澳大利亚神经科学院的研究员，兼新南威尔士大学高级讲师，指导博士、硕士及本科生的学习。她曾应邀为多个国际杂志审稿、客座编辑，并参与国家基金的评审。

Weiping Gai, MD, PhD

盖卫平博士 1982 年获衡阳医学院临床医学学士学位，1985 年获湖南医学院神经解剖学硕士学位。毕业后赴澳大利亚从事博士后研究，并于 1996 年在费林德大学获神经病理学博士学位。盖卫平博士为人脑组织库主要创建者，人体生理学系高级讲师。自 1990 年以来，主要从事巴金森病和其它神经退行性疾病的人脑解剖学与病理学研究，特别关注这些疾病中神经细胞内涵体的发生、形成机制及其神经生物学与病理学意义。

严小新博士

1984 年获湖南医学院临床医学系学士学位，1990 年获湖南医科大学神经解剖学硕士学位， 2013 年获中南大学神经生物学博士学位。1991 年-1993 年任英国查林十字和西敏寺医学院解剖学系访问学者。1995 年-2000 年在美国犹他大学莫兰眼科中心和加州大学尔湾分校任博士后研究助理。2001 年-2004 年任美国杜邦制药公司及施贵宝制药公司研究员。2005 年-2011 年任南伊利洛伊大学医学院解剖系助理教授。2010 年起任中南大学湘雅医学院人体解剖学与神经生物学系教授。现兼任人体解剖学与神经生物系常务副主任。



马超博士

1999 年毕业于中国协和医科大学，获医学博士学位。毕业后在北京协和医院外科任住院医师 1 年。2000 年起赴美国耶鲁大学医学院麻醉学系从事慢性痛发生机制的研究，任博士后访问学者（2000-2003），Associate Research Scientist（2003-2008）和助理教授（2008-2011），作为课题独立负责人获得了美国国立卫生研究院基金等支持，并主编学术专著《Animal Models of Pain》。2011 年底回到母校，任北京协和医学院、中国医学科学院基础医学研究所解剖与组胚学系主任，“协和学者”特聘教授，博士生导师。2012 年底开始作为负责人建立了中国医学科学院北京协和医学院人脑组织库。

Email: mcpumc@163.com

QOE：新型生物信息数据挖掘工具

QOE, a new bioinformatics data mining software

冀开元　马文丽　郑文岭

（广东省广州市南方医科大学基因工程研究所 510515）

Kaiyuan Ji, Wenli Ma, Wenling Zheng

（Institute of Genetic Engineering, South Medical University, Guangzhou, 510515, china）

摘要

随着生物芯片技术的发展，生物信息数据呈指数增长。如何有效地分析挖掘数据成为生物医药目前急需解决的问题。Qlucore Omics Explorer(QOE)是一款新的生物信息分析软件，可用于快速分析基因表达、基因芯片、实时 PCR 以及 DNA 甲基化等多种生物学数据。本文对 Qlucore Omics Explorer (QOE)的基本功能和特点做了介绍，包括软件背景，数据输入输出类型，软件界面，软件应用等，最后分析了 QOE 的应用前景。

关键字

QOE，生物信息，基因表达

Abstract

With the advancement of gene microarray, there is an exponential increase in bioinformatics data. To explore the bioinformatics data and get meaningful analysis become urgent in biomedical studies now. Qlucore Omics Explorer is a new software for analyzing gene expression, microarray, real-time PCR, and DNA methylation as well as other kinds of bioinformatics data. We review the basic function and characteristics of Qlucore Omics Explorer, including the background, the import and export of data, the window of software, application of software, as well as the future perspectives of the applications of the Qlucore Omics Explorer.

Keywords

Qlucore Omics Explorer, bioinformatics, gene expression

1. QOE 背景

基因芯片自问世以来，其强大的力量迅速席卷生物和医学领域[1]。基因芯片使得研究者可以从全基因组水平对基因表达谱、药物代谢、疾病发生发展过程进行快速的定量分析[2]。随着现代分子生物学的发展，以及人类基因组计划的完成，生命科学的研究已经进入后基因组时代。近年来芯片技术的革新和优化，使现在芯片数据急剧增长，芯片质量大幅度提高。生物学家面对的不再是零散的、少量的、简单的数据，而是公共数据库中数以万兆计的、各种各样的复杂生物数据，GEO(Gene Expression Omnibus)公共数据库中数据集的数据也在逐年增长[3]（图 1）。各个研究所和实验室产生出了大量的实验数据，但是这些数据的信息往往没有被完全挖掘出来。因此，如何有效分析这些生物数据成为当前的生物学瓶颈，这就迫使人们寻求一种有效的方法和工具

去管理筛选这些数据，并且对它们进行统计、聚类和进一步利用。海量的生物学数据中必然蕴含着重要的生物学规律，这些规律将是解释生命之谜的关键。

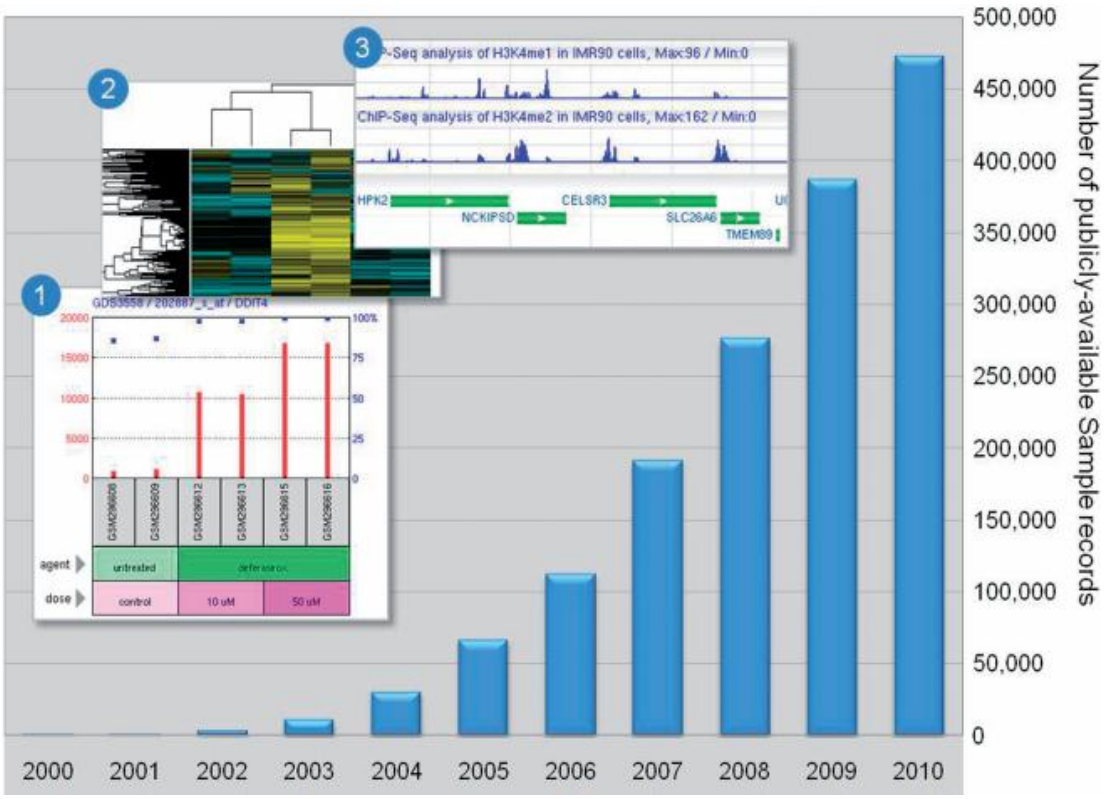


图 1．GEO 数据库中样本数量的增长情况

Figure1．The growth of sample records in GEO

由于生物信息数据庞大复杂，数据成千上万，变量也不仅仅是几百个几千个，而是上万个，并且涉及多个学科的交叉[4]。通常需要研究者精通生物学、计算机软件学和统计学相关专业，实际上生物学家往往不懂计算机专业知识，而且计算机专业的学者又没有生物学的思维，即使两者合作，也会有技术上的代沟。因此，最佳的解决方法是给生物学家一些方便快捷的生物信息学分析工具，通过简化的统计学方法来挖掘生物信息数据集。

传统的生物信息学分析软件不容易学习和掌握，多数生物信息分析软件也仅能提供简单的数据统计信息，并且操作麻烦、分析速度慢，在面对大规模数据集时有心无力。Qlucore Omics Explorer 是瑞典隆德大学的合作研究项目，由数学和医学遗传学系的研究人员研究。为处理表达谱芯片产生的大量的高维数据，此软件把数据经统计计算转换为 3D 可视化图，再经过主成分分析和聚类降维[5, 6]，从多个角度识别出数据中隐藏的结构和模式。QOE 软件巧妙的编程和设计，使得用户在普通电脑上交互实时地探索和分析高维数据集。QOE 把大量数据统计和分析功能进行了系统融合，形成了类似视窗浏览器的简单界面，使生物信息数据分析过程更为简便、直观和形象，从而满足了生物学工作者的生物信息学分析需求。

2. QOE 功能

QOE 作为一款生物信息学数据分析软件，可以快速、直观地显示分析后的数据图示，同时应用各种生物统计学原理，对数据进行深入和有效地分析。QOE 只需要一个普通的电脑就可以实时处理庞大的数据集（超过 100 万个条目）。操作 QOE 不需要对数学或统计有深入的了解，也不需要具备一台强大的超级电脑，只需要一台普通电脑，就能够轻松探索高维数据并迅速得到相关结果。QOE 具有很强的易用性和快速性，可以直接在电脑屏幕上实时进行对数据的可视化处理。

QOE 能直接引用标准化的 Agilent 公司和 Affymetrix 公司的芯片数据。也可以直接从公共数据库 GEO 中下载所需数据并导入到软件中。使用者可以直接导入自己的数据集也可以导入网上下载的其它数据集，其中 GEO 数据库的数据集可以直接在 QOE 中输入相应 GSE 或 GDS 编号来导入，并且选择性自动加载相应注释文件。该软件能打开同时打开多个数据集，共同来比较分析。QOE 能将数据进行实时的 2D 和 3D 的可视化演示，所有的图都可以完全互动，将软件自带示例数据，急性白血病亚型的数据集[7]导入后分析界面（图 2）。导入的数据集可在工作窗口即时生成可视化的图，包括主成分分析（principal component analysis）图，散点（scatter）图，线（line）图，热（heat）图，箱（box）图等，这个分析过程极大地方便了研究者进一步寻找数据间的规律和关系，并且所有的图都会随着操作即时更新。

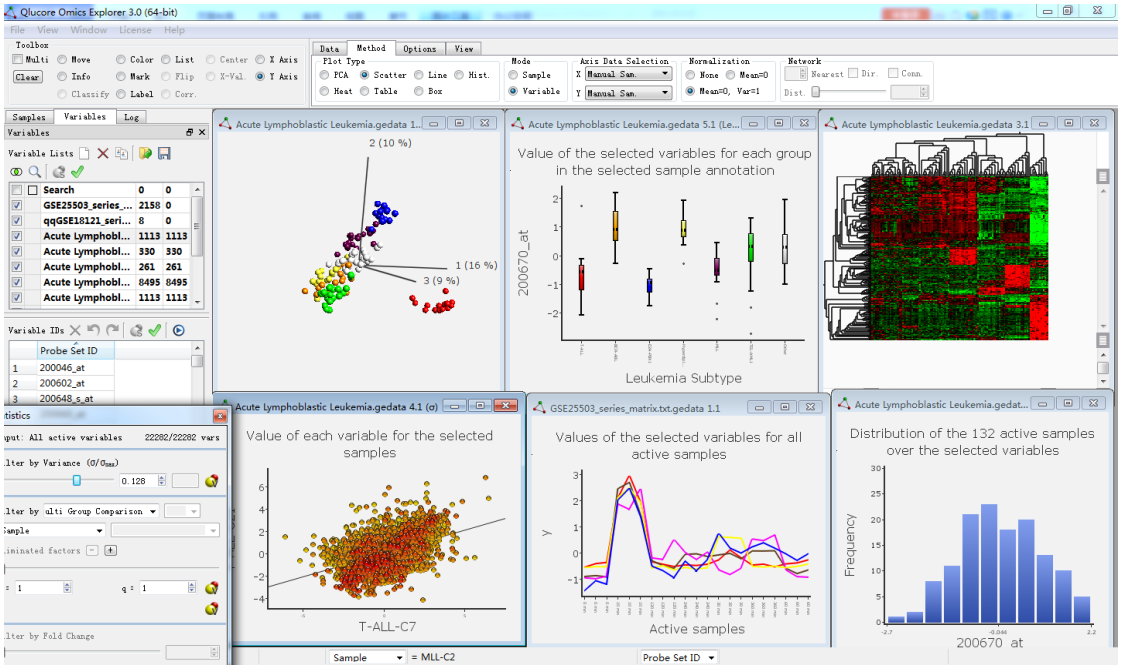


图 2：Acute Lymphoblastic Leukemia data set 的 QOE 分析结果.

Figure2：Analysis results of Acute Lymphoblastic Leukemia data set on QOE

数据导入后，QOE 会把数据集的原始值进行 mean=0 以及 var=1 的标准化处理，并且进一步把每个变量计算出相应的标准误 σ，使用者可以通过统计窗口中的 σ / σ_{max} 来筛选掉样本之间差异小的变量，PCA 图和热图会随着操作实时变化，使用者可以通过图的变化选择其它统计学方法进行下一步的分析。

而在整个分析过程中，QOE 根据不同目的进行不同的统计方法和措施，及时计算出相应的 p 值和 q 值，通过点击鼠标来改变过滤器的参数（见图 3）从而探索数据筛选出所需目的基因或者发现新的结构和关系。主要的统计方法有：两组比较(two group comparison)，多组比较(multi group comparion)，线性回归(linear regression)，二次回归（quadratic regression），秩回归（rank regression）。而且还有 fold change 功能去进一步供我们选择应用。改变过滤变量参数的设置，有助于研究人员找到不同生物学统计意义条件下的生物学方面数据的改变，从而有利于展开进一步的实验研究。

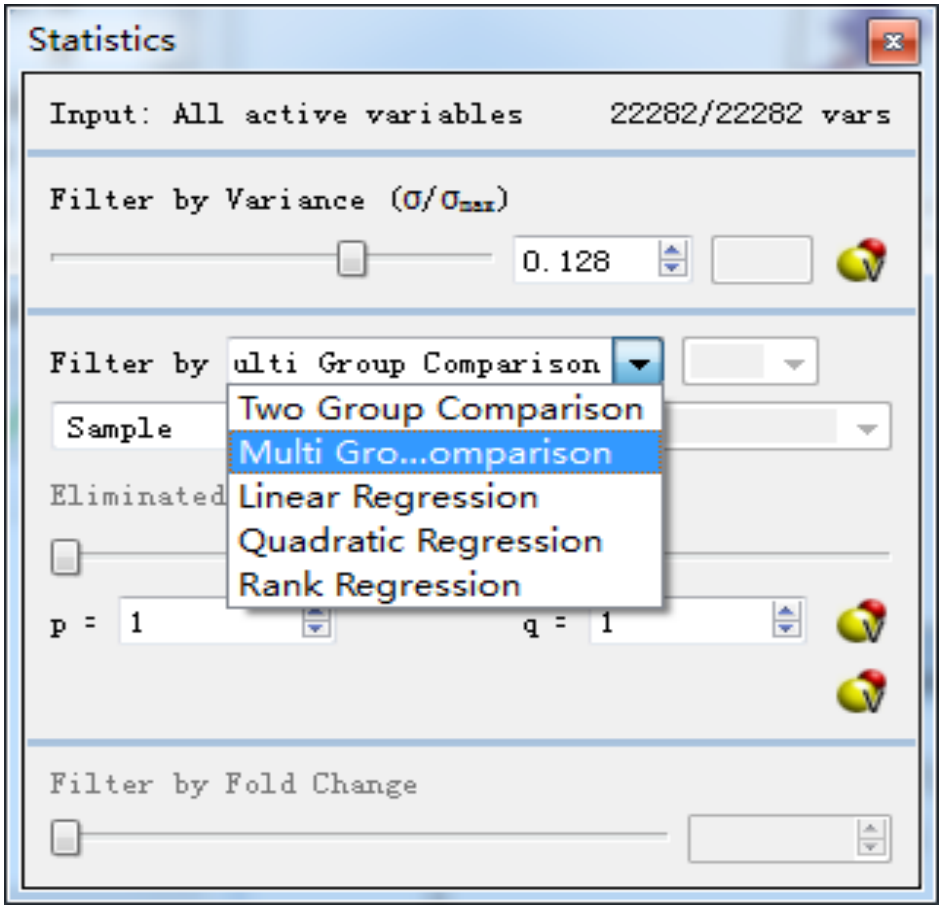


图 3：QOE 的统计窗口　　Figure3：Statistics window of GOE

在分析的过程中，内置的 GSEA（Gene Set Enrichment Analysis）和 GO（Gene Ontology）插件（见图 4 和图 5），可帮助使用者分析基因功能和通路信息。可以对重要的变量或样本进行着色和标记，而且可以根据自我需求导入或导出不同的注释信息列表，如 GI、gene symbol、gene ID、gene title 等。产生的图也可以随时的导出，也可以导出 PCA 的视频。操作的进度可以随时保存，保证了分析的连贯性。QOE 的官方网站为 http://www.qlucore.com/，在此网站可以观看操作视频以及相关文件，并且提供针对微软 window 操作系统 32 位和 64 位的两种版本的 QOE，目前的版本名称为 Qlucore Omics Explorer 3.0。

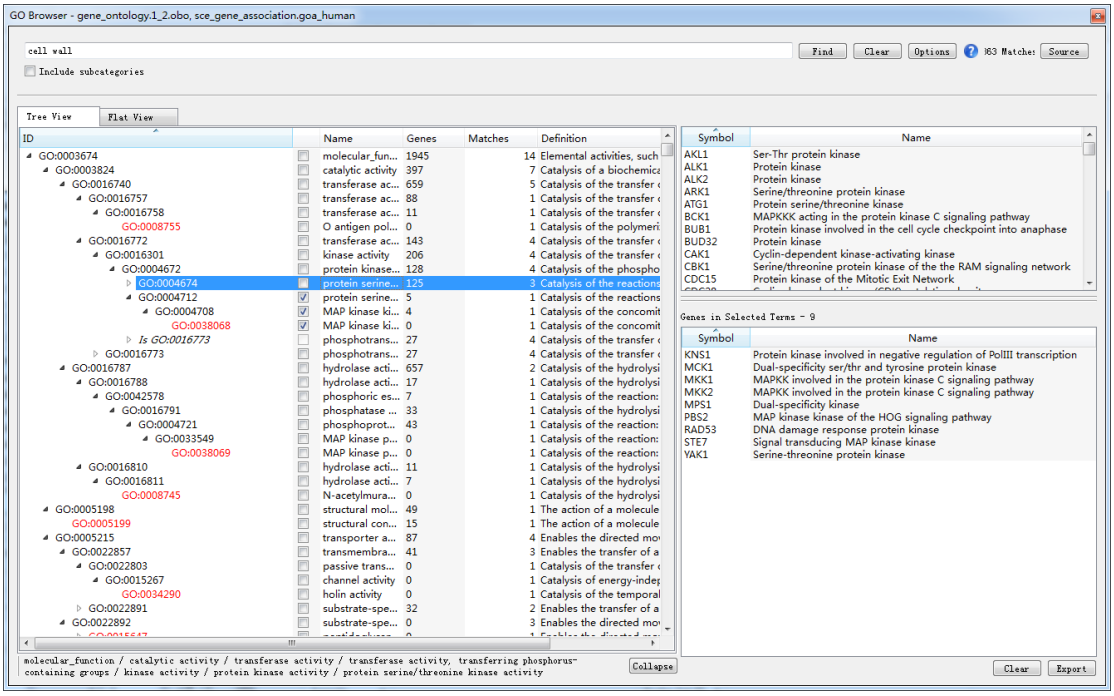


图 4：QOE 的 GO 插件栏　　Figure4:The GO toolbar of QOE

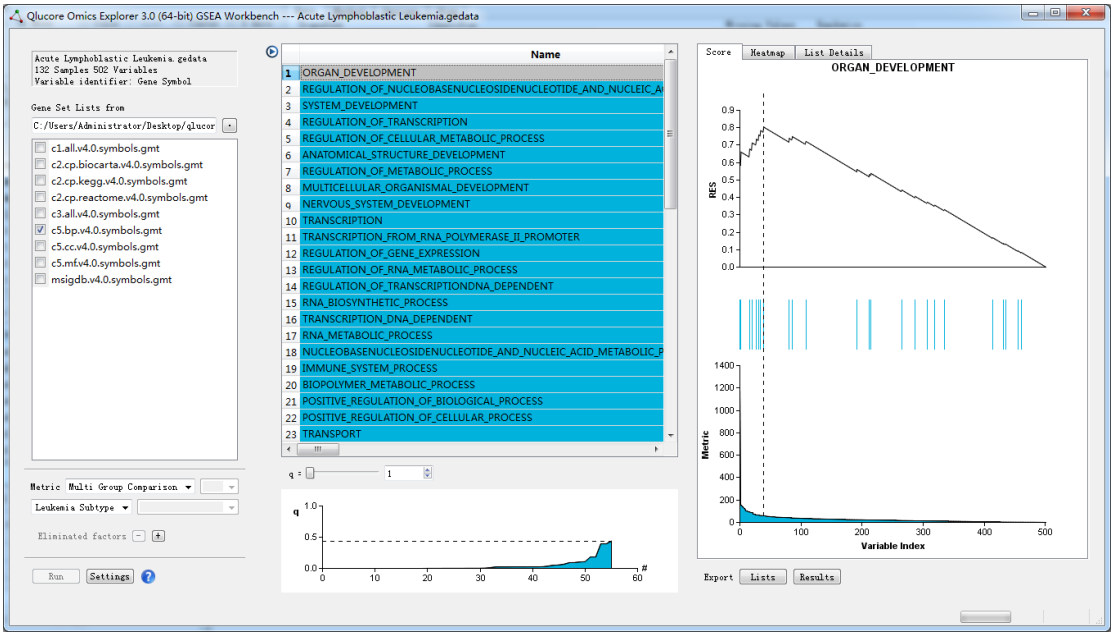


图 5：QOE 的 GSEA 插件栏　　Figure5:The GSEA toolbar of QOE

3. QOE 支持的文件

QOE 支持直接导入的标准化的文件包括：Affymetrix 公司和 WT 的阵列、安捷伦基因阵列、安捷伦 microRNA 阵列。

对于 Illumina 的数据，建议是通过 GenomeStudio 或 BeadStudio 软件将数据标准化，然后使用向导将数据导入到 QOE。其它的芯片仪器产生的数据或来自其它类型的数据，大部分都可以导入到 QOE 中。支持的全部格式如下：

文件类型	文件后缀
Affymetrix 公司的的 CEL 文件	.cel
Affymetrix 的探针组文件	.chp
安捷伦文本文件	.txt
安捷伦基因查看文件	.txt
简单的数据文件	.txt
Qlucore 数据文件	.gedata
GEO 数据集	.soft 和.soft.gz
GEO 系列矩阵	.txt 和.txt.gz
小型文本文件	.txt;.csv
生物芯片软件文件	.base

4. QOE 的界面

打开 QOE，双击电脑桌面上的 QOE 图标（快捷方式）或者从电脑的 Start Menu（开始菜单）中的 Program Menu（程序菜单）打开 QOE。QOE 的 Main Window（主窗口）将出现，如图 6。

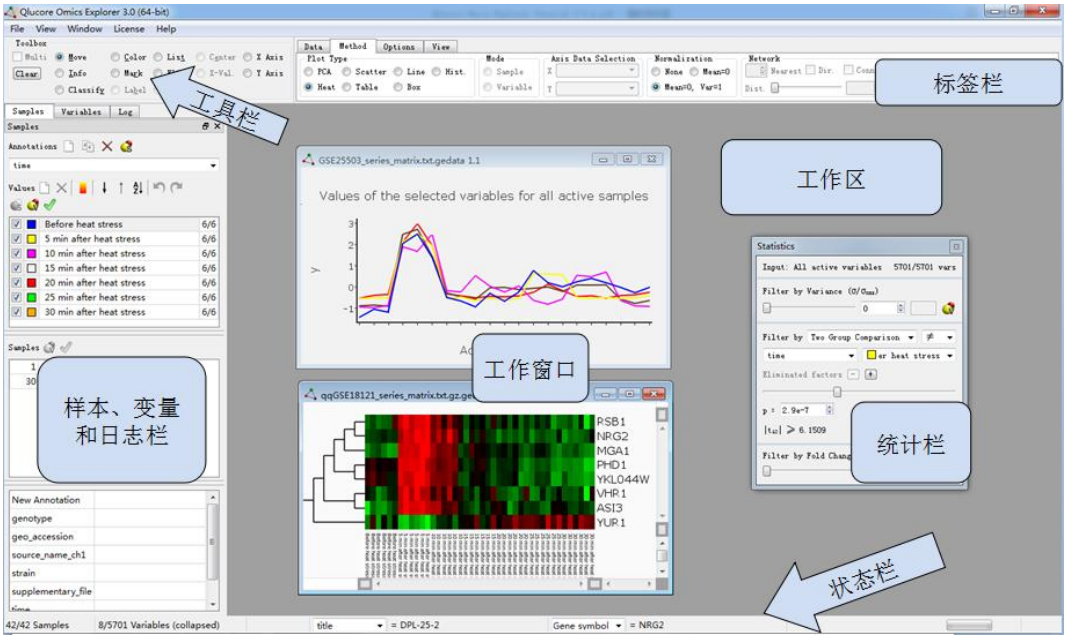


图 6：QOE 软件的操作界面　　Figure6: The window of QOE.

在屏幕中间，会显示在 Plot Windows（图形窗口）的 Work Space（工作空间）。此外，会发现几个 dock windows（停靠窗口）。在默认状态下，Samples（样本）、Variables（变量）和 Log（日志）等三个停靠窗口停靠在主窗口的左侧，而 Statistics（统计）和 Getting Started（入门）等两个窗口则是浮动状态。可以在 Menu Bar（菜单栏）中通过点击 view（视图）> Dock Windows（停靠窗口），选择显示的停靠窗口。菜单栏下可以找到管理，以及在数据集上执行各种操作功能的

不同控件。还可以找到能帮助您在 QOE 中选择和管理工作流程的四个不同选项卡（Tabs）：Data（数据），Method（方法），Options（选项）和 View（视图）。在 Statistics dock window（统计停靠窗口）中，可以根据研究数据集的需要选择合适的统计方法。最后，在底部有 Status Bar（状态栏）。在状态栏里会显示例如数据集里样本的总数和各种变量，以及此刻能参与分析的有用信息。

5. QOE 的应用

QOE 既可以用来做实验前的预测和筛选，以确定实验方案。也可以做实验结果的证明，发现未知功能和关系，更适合利用庞大的数据库做生物信息“干实验”。可应用于基因表达芯片数据、临床数据、蛋白芯片数据、抗体数据、microRNA 芯片数据、蛋白质芯片数据、实时定量 PCR 数据、DNA 甲基化数据,转录组测序数据等。只要符合软件要求，任何数据都可以导入到 QOE 中进行分析。

6. 总结和展望

目前由于生物芯片的研究和发展，大量的生物信息比如基因芯片的数据产生出来，而且大量的基因数据也带来了大量的生物信息，这些信息都是些高维数据，基因数据的维数差异给后续分析带来的困难[8]。而 QOE 能通过方差过滤和 PCA 技术相结合的方式解决数据的降维问题。把结果通过 PCA 图的方式呈现出来，经人脑的高效率的分辨挖掘，从而快速有效的分析出有用的信息，避免有用信息被筛选掉，克服了机械处理数据的弊端。

综上所述，QOE 是一个强大的交互式分析和可视化的分析软件。它可用于许多不同类型的数据集进行分析。QOE 支持用户快速、动态地分析和验证各种不同的假说，结合统计检验提供即时的可视化结果。QOE 还可以发现数据中隐藏的结构和大型数据集的隐藏的模型，以充分利用各种注释以及各个环节与数据的连接，以快速轻松地导出许多不同类型的报告和演示文稿中使用的数据、图像和动画，并进行进一步研究。QOE 可以使生物学家不依赖于计算机和统计专业的支持，研究自己的数据集。用户界面的设计是直观和易于使用的，可以对数据集结构进行随心所欲的研究，同时提供了内置了功能互动和简单的假设检验。在使用的 QOE 中，主成分分析图，散点图，热图和数据表也是一个重要的基本操作，使得能够高维数据低维可视化。让研究者克服计算机方面的瓶颈，充分利用自己的专业知识完成对数据的挖掘和探索。而且 QOE 还能用于其它高维复杂数据的分析，有着广阔的应用范围。相信在不久的将来，QOE 在生物学、医学、农学等领域的应用会取得很大进展。

【参考文献】

1 Bellazzi, R., et al., Data analysis and data mining: current issues in biomedical informatics. Methods Inf Med, 2011. 50(6): p. 536-44.

2 Schulze, A. and J. Downward, Navigating gene expression using microarrays--a technology review. Nat Cell Biol, 2001. 3(8): p. E190-5.

3 Barrett, T., et al., NCBI GEO: archive for functional genomics data sets--10 years on. Nucleic Acids Res, 2011. 39(Database issue): p. D1005-10.

4 Hasman, A., et al., Biomedical informatics--a confluence of disciplines? Methods Inf Med, 2011. 50(6): p. 508-24.

5 Ji, H., et al., Differential principal component analysis of ChIP-seq. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. 110(17): p. 6789-94.

6 Yeung, K.Y. and W.L. Ruzzo, Principal component analysis for clustering gene expression data. Bioinformatics, 2001. 17(9): p. 763-74.

7 Ross, M.E., et al., Classification of pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. Blood, 2003. 102(8): p. 2951-9.

8 Alter, O., P.O. Brown and D. Botstein, Singular value decomposition for genome-wide expression data processing and modeling. Proc Natl Acad Sci USA, 2000. 97(18): p. 10101-6.

作者简介：

马文丽 博士 南方医科大学基因工程研究所所长，教授， 博士生导师。

郑文岭 博士 南方医科大学基因工程研究所教授。

软组织肿瘤的分类

刘　婷　　副教授

外科病理室主任，外科病理培训部主任
犹他大学医学院/ARUP 国家临床检实验室

摘要

软组织肿瘤为一组非常见疾病，对疾病的认识无论对于病人或者医生都是极大的考验。由于肿瘤的病理机制、肿瘤分类，诊断以及治疗均较为复杂和特殊，普通临床医生均缺乏这方面的常识，以致错误临床处理较为常见，而病人则更缺乏这方面的常识所导致的忽视及对病情的延误也常常发生。因此，本文侧重介绍一些常见软组织肿瘤疾病，希望籍此对病人或医生有所帮助。

Abstract

Soft tissue tumors are a group of heterogeneity neoplastic tumors. Among them, the majority of tumor is benign. The incidence of the malignant soft tissue tumors or sarcomas is approximately 1% of malignancies of human being. Due to the rarity of the tumor, complicity of tumor classification system, difficulty of diagnostics, unique treatment options with different modality in comparison with other malignant tumors, there is a great potential of mismanagement for the patients. The general surgeons and primary care physicians usually lack specialty training and knowledge of soft tissue tumors. The article is focused on the most common soft tissue tumors and a common approach of diagnosis and clinical management for sarcoma patients.

软组织肿瘤是一组较为罕见的肿瘤，有良性与恶性之分，两者的准确发病率不清。与恶性肿瘤相比，良性瘤占绝大多数，由于多数良性瘤无需治疗以及病人的忽视，具体良性肿瘤发病率仍不清楚。然而，恶性软组织肿瘤又称肉瘤是绝对不可忽视，如不积极治疗，病人预后非常差。 由于恶性软组织肉瘤为罕见病，大部分医生及患者对疾病的认识不够，本文重点讨论一些常见肿瘤的临床诊断和治疗。

软组织肿瘤的诊断及分类，不同于其它部位尤其是内脏器官肿瘤。肿瘤分类繁多， 目前广为接受的为世界卫生组织（WHO）的肿瘤分类法。多科室（学科）综合诊断是很有必要的， 包括外科、放射影像，尤其是核磁共振、病理学显微镜形态学检查以及尤为重要的分子生物学检查，已成为软组织肿瘤的常规诊断方式。

有些软组肿瘤表现出明显体位特异性，根据肿瘤的组织的分化和来源，肿瘤可分为脂肪肿瘤、纤维肿瘤、平滑肌肿瘤、骨骼肌肿瘤、血管肿瘤以及组织分化不明确肿瘤等等。 软组织肿瘤的分化程度是根据 FNCLCC 标准而定：1）细胞分化相似度：1-3；2）细胞分裂数：1-3； 3） 肿瘤坏死度：1-3。总分越高， 肿瘤恶性度越高，分化度越高。恶性肿瘤最终分为分化度 1 至 3 级。

脂肪肿瘤是成年人群中最为常见的肿瘤。良性脂肪瘤，通常位于身体浅表部位，皮下脂肪，尤其上半身（腰以上）及四肢，但手足部位很少见。脂肪肉瘤也是成年人中最为常见的恶性软组织肿瘤，多为分化程度低（一度）， 通常位于组织深处或腹膜后腔，多发于老年人。 如肿瘤位于四肢，肿瘤命名为非典型脂肪瘤性肿瘤，手术全切较易，通常病人预后较好。 但若同样肿瘤位于腹膜后腔，由于所处部位隐蔽，不宜早期发现，此种肿瘤则命名为脂肪肉瘤， 多数肿瘤分化为一度。若肿瘤存在时间过长，肿瘤多已发展成去分化脂肪肉瘤， 其分化度或恶性程度为二

度至三度。对于这种部位的脂肪肉瘤，手术治疗为首选，但由于解剖部位复杂，往往无法手术全部切除，肿瘤复发非常普遍，而高分化肿瘤则需放射甚至化疗，病人预后不好。分子生物学分析，如荧光原位杂交（FISH） 检查证实 MDM-2 基因增殖为脂肪肉瘤特异性诊断，现已应用于日常临床诊断。

纤维肉瘤是常见恶性肿瘤之一，多见于软组织深处，如四肢、躯干及头颈部，80%的纤维肉瘤分化为二度以上，主要治疗为外科手术切除。局部肿瘤复发、远端、肺及骨转移很常见。五年生存率大约 55%。纤维肉瘤可见于表浅，皮下脂肪，这种情况多分化于隆突性皮肤纤维肉瘤（DFSP）。小儿纤维肉瘤为儿童年龄中最常见软组织恶性肿瘤，与成年纤维肉瘤不同，多呈现染色体异位为其特异性诊断指标。

平滑肌肉瘤也是常见恶性软组织肿瘤之一，可位于表浅即皮下 肢体，驱干及腹腔深层。一般来讲，皮下表浅部位肿瘤预后非常好，如手术未切尽，病人多表现局部复发，无远端转移可能性，所以，近年此病已改名为非典型平滑肌瘤，而非恶性。然而，位于组织深层的肿瘤多为恶性，绝大多数肿瘤启源于血管壁平滑肌层。病人预后不良。远端多处转移较为常见。现无有效治疗方法。

骨骼肌肉瘤是一种在儿童及成人中相当常见的恶性肿瘤， 然而，成人及儿童所发肿瘤类型却非常不同，其分类较细，。如胚胎性横纹肌肉瘤仅见于儿童人群，其它类型如腺泡状横纹肌肉瘤，多形性横纹肌肉瘤及梭型细胞性横纹肌肉瘤则多见于成年人群。临床 治疗及预后也相差甚远。

还有一组恶性软组织肉瘤的组织来源不清，其中以小圆细胞肿瘤为一组最为常见恶性瘤，这组肿瘤可见于所有人群， 其中包括如尤文肉瘤、促结缔组织增生型小圆细胞癌、滑膜肉瘤。由于这组肿瘤拥有特异性染色体异位，如 t（11，22） 见于尤文肉瘤，促结缔组织增生型小圆细胞癌；而 t（x，18） 则仅见于滑膜肉瘤，另外如滤泡性软组织瘤，骨骼肌外粘液性软骨肉瘤，软组织透明细胞肉瘤等等肿瘤属于此组肿瘤，各有其特异性的染色体变异，临床治疗及预后根据各案情形，各不相同。

总之，软组织肿瘤分类较为复杂，除了病理学常规显微镜组织学检查外，影像学（断层 CT 和核磁共振 MRI）特点，肿瘤在身体内的部位、局部的侵润性以及分子生物学分析结果在诊断和临床治疗中均起到非常重要的作用。 因而，多科室共同合作是至关重要的。 在治疗中，外科手术完全切除往往为治疗首选，放射治疗及化疗，以至靶向治疗已成为治疗的选择。在美国肿瘤专科医院或大型医学院的附属医院，一般都有每周多科室肿瘤讨论会，其中包括外科医生、放射科医生、肿瘤放疗科、化疗科医生、病理科医生，以及社会工作者，他们共同讨论各种病人的具体治疗方案。由于基础医学研究的日新月异，对肿瘤的认识也有着不同的新的观点，新的分子生物学的发现，使得对肿瘤的诊断及治疗不断有着新的认识和可能性，新知识的不断涌现，使得多科室合作及共同病例探讨成为必不可缺且更有临床价值。由于软组织肿瘤较为少见，对于一般非专科训练的医生来说，对疾病的认识、诊断、治疗以及放化疗会有相当大的难度。病人需要咨询有专门接受过软组织肿瘤训练的专科医生，通过多学科合作以确保正确的诊断及治疗。

【参考文献】

1. Pathology & Genetics Tumours of Soft Tissue and Bone, World Health Organization Classification of Tumours, IARC Press, 2013

2. Enzinger & Weiss’s Soft Tissue Tumors, Sharon W. Weiss, John R. Goldbum. Mosby Elsevier 2008

作者简介：

刘婷医学博士现为美国犹他大学医学院临床病理医生，目前就职于犹他大学医学院， 为病理系副教授、外科病理系主任、外科病理临床研究员培训部主任。专攻各器官肿瘤诊断，尤其秘尿系统肿瘤及骨和软组织肿瘤的诊断。除日常临床工作外，重点在医学生、住院医及外科病理临床研究员的培训以及临床疾病的科研工作。

Email address： ting.liu@path.utah.edu
Working address:
Ting Liu, M.D.
Division of Anatomic Pathology
Dept. of Pathology/ARUP Laboratories
University of Utah
1950 Circle of Hope, RM N3105
Salt Lake City, UT 84112 U.S.A.

杜氏进行性肌营养不良的基因治疗前景

Gene Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy (DMD)

王冰（Bing Wang）, MD, PhD.
Associate Professor, University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh, PA, USA

Abstract

Muscle-directed gene therapy for genetic muscle diseases such as Duchenne muscular dystrophy (DMD) can be performed by the recombinant adeno-associated viral (rAAV) vector delivery system to achieve long-term therapeutic gene replacement and function amelioration in all affected muscles.

Key words

gene therapy, AAV vector, dystrophin gene, and Duchenne muscular dystrophy

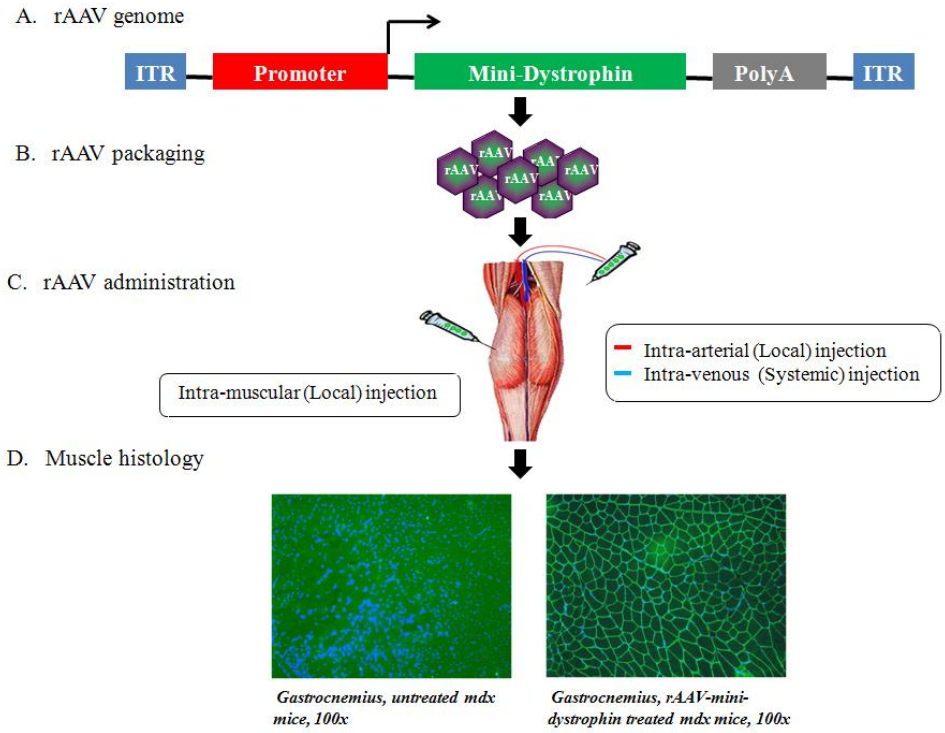
杜氏进行性肌肉营养不良综合症（Duchenne Muscular Dystrophy, DMD）是全世界最常见、致死性的遗传性肌肉萎缩病，每 3500 名男童中就有 1 人患病。由于该病缺陷基因（Dystrophin Gene）存在于 X 性染色体中（Xp21），因此它是透过性连锁式隐性遗传型态传播的。[1] 基因突变缺陷导致肌肉细胞不能正常产生一种称为 Dystrophin 的肌肉细胞膜机构蛋白质，[2] 因而使钙离子渗入细胞，引发瀑布反应，导致患者全身肌肉无力；另一方面，因为肌肉细胞内缺少 Dystrophin，又导致细胞组织肌肉纤维变得无力且脆弱，经长期的伸展后该缺失肌肉细胞组织将产生机械性伤害等等因素而破坏，引起肌肉激酶（Muscle Creatine Kinase, MCK）外溢，并吸引机体 T 细胞、巨噬细胞及肥大细胞聚集到肌肉损伤的部位，进一步导致慢性炎症，坏疽，最终导致肌肉细胞死亡。DMD 患者一般会在 5 岁左右出现症状，并逐渐加重。由于进行性肌肉无力及退化，杜氏肌肉营养不良症最终会影响到所有平滑肌，以及心脏和呼吸肌肉，DMD 患者一般由于呼吸衰竭或心功能紊乱而死亡，病人很少能活过 35 岁。[3] 临床上主要采取的是支持疗法 （包括提升自体体力和免疫力 ）以及物理疗法（包括呼吸机辅助呼吸）。然而，目前还没有行之有效的治疗方案。常规的 DMD 的的治疗方法（包括中医和西医）效果都非常有限。现在对 DMD 肌营养不良症的致病基因以及病理已经研究得比较清楚。目前的临床试验研究进展也在不断向我们预示，通过基因治疗治愈肌营养不良症这样的基因疾病是有可能的。或许在若干年之后，在基因治疗科学家的努力下，这些疾病的治疗会和今天的药物治疗一样普遍。

在当前的信息时代，随着现代分子和细胞生物学技术的高速更新和人类基因组的完全阐明，针对单基因缺陷、最常见的遗传性疾病，肿瘤，病毒传染性疾病的基因治疗的研究和发展在西方发达国家正进入一个前所未有的高投资，高发展期。生物医药，包括基因产品作为一种特别的生物活性药物，也被产业进行投资和发展。针对基因治疗药物本身的特点以及它与经典的化学合成药物或基因工程药物的差别，中国卫生部已经有了相应的管理方案，并于 1993 年颁布的《人的体细胞治疗及基因治疗临床研究质控要点》；2003 年中国国家药监局进一步完善了《人基因治疗研究和制剂质量控制技术指导原则》。

目前，基因治疗最常用、最有效、副作用最小的的基因载体 – 重组腺相关病毒载体（Recombinant Adeno-associated Viral Vector,

AAV）能承载 4900 个外援性的脱氧核苷酸 （目的基因表达框架）。当前，基因诊断及治疗药物的研发已广泛涉足单基因缺乏遗传性疾病、疫苗、抗肿瘤药物、抗心脑血管疾病、抗病毒感染。 根据基因医学库(http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical/)，美国政府临床试验数据库(http://www.clinicaltrials.gov)，以及美国肌肉营养不良综合征研究协会(htt://www.mda.org/research/view_ctrial.aspx?id=212) 最新的统计，目前世界上以 AAV 载体系统为基础的基因治疗临床试验针对 67 种不同的疾病，包括在美国 FDA 批准进行的。

DMD 的基因治疗是目前学术界研究的重点，也是前沿课题。以 AAV 基因表达系统为基础的基因药物治疗 DMD 具有很多优点，譬如：具有人体肌肉组织特异性基因表达，表达时间长且稳定，免疫排斥小，副作用小等等优点。但是，抗肌萎缩蛋白太大了，完整的基因有一万多个脱氧核苷酸（即 DNA 序列）不可能完整地包装到一个 AAV 载体中。在匹兹堡大学医学院从事博士后研究工作期间，本文作者于 2000 年首先建立了一系列缩短版本的功能性 Dystrophin (Mini-dystrophin) 基因及基因携带载体。[4] 动物试验结果证明，AAV 载体在肌肉细胞膜上高效率、长时间表达外援性 Mini-dystrophin，并恢复肌肉功能、延长 DMD 疾病老鼠动物的寿命。[4–9] **图 1**，显示了缩短版本的功能性 Dystrophin 基因及载体治疗 DMD 的策略，包括基因载体的构建、AAV 载体的包装、基因载体的注射途径、基因表达以及功能检测。[10]



在相关的前期基础试验中，本人作为核心科研人员建立了一系列人，狗和老鼠的缩短版本的功能性 Dystrophin 基因以及相应的基因携带载体，并在老鼠以及狗的 DMD 疾病模型上，检测了基因的功能以及潜在的副作用。另外，我们在载体的制备、注入模式和剂量、以及功能恢复检测方面积累了丰富经验。其中一个截短的抗肌萎缩蛋白基因以及相应的 AAV 载体，2006 年被美

国食品药品监督管理局（FDA）批准，在俄亥俄州哥伦比亚市用于第一例基因治疗 DMD 肌营养不良临床试验。

俄亥俄州哥伦比亚儿童医院协同肌肉营养失调协会（MDA）以及 Asklepios 生物医药公司一起，开始了第一例针对 DMD 进行性肌营养不良基因治疗的方案。著名的神经学家 Jerry Mendell 将 AskBio 公司生产的 Biostrophin（包括抗肌肉畏缩蛋白的功能基因）注射入病人体内。在美国 FDA 批准的这次实验中，每个接受临床试验的杜氏进行性肌营养不良患者一条手臂的肱二头肌将被注射入外源的截短的抗肌萎缩蛋白基因，而另一条手臂的肱二头肌将被注射入用于进行对照的安慰剂，无论是研究者还是受试者都不知道患者的哪条手臂被注射了外源的抗肌萎缩蛋白基因。注射后的几个星期，在显微镜下对被注射外源的抗肌萎缩蛋白的肌肉组织进行分析，同时还进行一系列的身体和患者肌肉力量的测试，以便观察这一基因疗法对杜氏进行性肌营养不良患者是否是安全的，以及外源的微型抗肌萎缩蛋白是否能在杜氏进行性肌营养不良患者的肌肉细胞中持续地表达抗肌萎缩蛋白。I 期临床观察表明被注射入外源的截短的抗肌萎缩蛋白基因能够在肌肉细胞中持续的表达，并且没有出现排斥反应。目前该项实验已经进入临床 IIb 期试验，相信不久的将来，治愈杜氏进行性肌营养不良这种不治之症不再是梦。

另外，临床试验中的肌肉组织特异性基因表达也是非常关键的，可以减少机体的免疫排斥以及其它的副作用。因此，病毒载体介导的替代性外援基因在肌肉组织中的特应性表达对于在临床预试验中的病人安全性非常重要。作为通信作者，本人于 2008 年发表的肌肉特异性 tMCK 基因表达启动子也被美国 FDA 批准的应用于一种进行性肢带型肌肉营养不良症（LGMD-2D）基因治疗临床试验中。[8]

除了缩短版本的功能性 Dystrophin 基因替代疗法，2007 年 10 月英国开展了“外显子跳越的基因治疗”，这是世界上第一次用反义的寡聚核苷酸的分子补丁，掩盖住杜氏进行性肌营养不良患者有缺陷的部分后面的 51 号外显子，恢复了内源性基因阅读框，使其能够合成有一定功能的抗肌萎缩蛋白。[11] 由于每一个病人的 Dystrophin 基因突变部位差异很大，所以“外显子跳越的基因治疗”要针对每个病人的基因突变位点设计不同的个体方案，这样导致基因载体设计复杂化以及应用成本大大提高。

另外，辅助性治疗在基因治疗中也越来越广泛地运用。例如：病毒载体表达的胰岛素生长因子 1（IGF-1），[12] 血管内皮生长因子（VEGF）[12, 13]，以及肌肉生长限制因子的抑制剂（Myostatin Propeptide），[14] 可以维持肌细胞的更新，增强肌肉力量，改善病人的肌无力与肌萎缩症状。理论上这些辅助性治疗方案可以优化基因治疗，但是在 DMD 动物模型中不能改变疾病的整体预后。

在基因替代治疗的基础上，最近我们实验室有设计了一系列新的 AAV 表达载体来表达显性抑制 [15] 以及沉默 RNA （shRNA）[16] 用来降低核转录因子 NF-κB 的活性，从而达到减低肌

肉慢性炎症的作用。比如：通过 shRNA 技术阻断 NF-κB 介导的炎症信号通道，含有绿色荧光蛋白标记的基因载体能够减低肌肉中的慢性炎症，优化基因治疗的环境和效率，减少机体对基因表达产物及载体的排斥的风险。**图 2** 显示基因载体注射到老鼠疾病模型（*mdx*）的下肢后， 慢性炎症得到缓解，肌肉再生得以增强。

从策略上，DMD 的“外源基因替代疗法”不同于“外显子跳越的基因治疗”策略，AAV 载体介导的基因表达系统可以适用于各种 Dystrophin 基因突变的病人。大约 5%的病例是经由性染色体隐性遗传而来；35%的病例则由于基因突变而来。根据病情，越早治疗越好。然而，将实验台上的理论转化为病床上可以实用的治疗方案（From Bench to Bedside），却有着较长的距离。目前基因治疗的临床实验数据反映治疗效果良好，给 DMD 患者带来新的希望。以基因治疗为基础的新兴转化研究（Translational Research）还面临一些挑战。

基因治疗临床试验主要集中在西方发达国家，中国只有少数几例。目前中国还没有基因治疗方案针对杜氏肌营养不良综合征。全球基因治疗正在快速发展，其中治疗肿瘤和单基因缺乏的眼病，以及人类免疫缺陷病毒(HIV)的基因疫苗的研制等方面取得很大的进展。然而，基因治疗的特殊性及复杂性导致目前基因治疗没有想象的发展迅速。在中国生物医药“十二五”规划中，核酸药物及基因治疗药物成为生物医药“十二五”期间重点突破领域之一。因此，新一代特效基因药物的研制和开发，对广大肌营养好不良综合征患者，特别是不治之症的 DMD 患者，都是极大的福音。目前，DMD 的 AAV 介导基因治疗在大型动物临床预试验以及人临床试验最大的挑战主要有以下几个方面，[17-19] 例如：1）Dystrophin 基因表达的效率离临床要求有一段距离；2) DMD 病人机体内预先存在的高水平的免疫预警状态导致机体容易产生对基因表达产物以及病毒载体的排斥。然而，这些都可以通过以下措施来克服。比如：1） 通过优化病毒载体；2）选择合适的血清型病毒载体；3）选择肌肉特异性启动子；4)改进载体的注入方式。

作者简介：

王冰（Bing Wang)，MD， PhD。现任职于美国匹兹堡大学医学院干细胞研究中心，担任分子治疗研究实验室主任、骨科系以及神经学系副教授。同时，兼任 McGowan 再生医学研究所副教授以及华中科技大学同济医院客座教授。主要从事基因、干细胞以及组织工程技术在再生医学方面应用的研究。1986 年毕业于华中科技大学同济医学院医学系；1991 年任职于同济医学院第三附属医院（梨园医院）主治医师；1994 年从师于中国科学院微生物研究所田波院士，并获得分子病毒学博士学位；1998 年任职于中国科学院病毒所副研究员，之后于香港科技大学生物化学系从事博士后研究工作。1999 年开始在美国匹兹堡大学医学院从事 DMD 基因治疗研究。在 Duchenne 型肌营养不良遗传疾病基因治疗等方面取得了一系列突出研究成果，提出了 Dystrophin 基因治疗结合抑制核因子 NF-κB 信号通路设想。现担任美国干细胞及基因治疗协会（ASGCT）-骨骼疾病干细胞及基因治疗委员会成员，以及美国骨外科研究协会 (ORS) -提名委员会成员。此外，参与多个专业杂志的编委以及多个基金评审。

【参考文献】

1. Hoffman EP, Monaco AP, Feener CC, Kunkel LM. Conservation of the Duchenne muscular dystrophy gene in mice and humans. Science. 1987;238:347-50.

2. Koenig M, Monaco AP, Kunkel LM. The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. Cell. 1988;53:219-28.

3. Lapidos KA, Kakkar R, McNally EM. The dystrophin glycoprotein complex: signaling strength and integrity for the sarcolemma. Circulation research. 2004;94:1023-31.

4. Wang B, Li J, Xiao X. Adeno-associated virus vector carrying human minidystrophin genes effectively ameliorates muscular dystrophy in mdx mouse model. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2000;97:13714-9.

5. Watchko J, O'Day T, Wang B, Zhou L, Tang Y, Li J, et al. Adeno-associated virus vector-mediated minidystrophin gene therapy improves dystrophic muscle contractile function in mdx mice. Hum Gene Ther. 2002;13:1451-60.

6. Wang BL, J; Chen, C; Jiang, X; O'Day, T; Watch, K; Xiao, X. Long-term expression of mini-human dystrophin in transgenic mdx mice improves dystrophic muscle functions. Oral presentation. . Molecular Therapy. 2006;13:16.

7. Wang B, Li J, Qiao C, Chen C, Hu P, Zhu X, et al. A canine minidystrophin is functional and therapeutic in mdx mice. Gene therapy. 2008;15:1099-106.

8. Wang B, Li J, Fu FH, Chen C, Zhu X, Zhou L, et al. Construction and analysis of compact muscle-specific promoters for AAV vectors. Gene therapy. 2008;15:1489-99.

9. Wang B, Li J, Fu FH, Xiao X. Systemic human minidystrophin gene transfer improves functions and life span of dystrophin and dystrophin/utrophin-deficient mice. Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society. 2009;27:421-6.

10. Wang B. Gene Therapy and Muscles: The Use of Adeno-associated Virus-Where are We Today? Operative Techniques in Orthopaedics. 2010;20:136-43.

11. Trollet C, Athanasopoulos T, Popplewell L, Malerba A, Dickson G. Gene therapy for muscular dystrophy: current progress and future prospects. Expert opinion on biological therapy. 2009;9:849-66.

12. Foster K, Foster H, Dickson JG. Gene therapy progress and prospects: Duchenne muscular dystrophy. Gene therapy. 2006;13:1677-85.

13. Thirion C, Lochmuller H. Current status of gene therapy for muscle diseases. Drug news & perspectives. 2007;20:357-63.

14. Qiao C, Li J, Jiang J, Zhu X, Wang B, Li J, et al. Myostatin propeptide gene delivery by adeno-associated virus serotype 8 vectors enhances muscle growth and ameliorates dystrophic phenotypes in mdx mice. Hum Gene Ther. 2008;19:241-54.

15. Tang Y, Reay DP, Salay MN, Mi MY, Clemens PR, Guttridge DC, et al. Inhibition of the IKK/NF-kappaB pathway by AAV gene transfer improves muscle regeneration in older mdx mice. Gene therapy. 2010.

16. Yang Q, Tang Y, Imbrogno K, Lu A, Proto JD, Chen A, et al. AAV-based shRNA silencing of NF-kappaB ameliorates muscle pathologies in mdx mice. Gene therapy. 2012;19:1196-204.

17. Tang Y, Cummins J, Huard J, Wang B. AAV-directed muscular dystrophy gene therapy. Expert opinion on biological therapy. 2010;10:395-408.

18. Mendell JR, Campbell K, Rodino-Klapac L, Sahenk Z, Shilling C, Lewis S, et al. Dystrophin immunity in Duchenne's muscular dystrophy. The New England journal of medicine. 2010;363:1429-37.

19. Wang Z, Kuhr CS, Allen JM, Blankinship M, Gregorevic P, Chamberlain JS, et al. Sustained AAV-mediated dystrophin expression in a canine model of Duchenne muscular dystrophy with a brief course of immunosuppression. Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy. 2007;15:1160-6.

MEDICAL
SCIENCE
BIOLOGY