

PNET 生存率较高^[18]；而胸腔、脊柱旁等部位的肿瘤由于易转移、肿瘤残留等因素导致疗效不佳^[17]。本研究统计 3 例胸腔 PNET,均经手术 + 化疗综合治疗,1 例失随访,1 例仅存活 6 个月,1 例到目前随访 13 个月健康生存。其他胸腔巨大恶性肿瘤由于样本量较少,需进一步增加样本量、随访明确肿瘤预后情况。

本研究发现手术切除是胸腔巨大良性肿瘤预后相关因素。胸腔巨大恶性肿瘤复发率、转移率高,预后差,术后结合化疗/放疗可延长患者生存时间;儿童胸腔巨大肿瘤以神经源性肿瘤多见,患者性别、肿瘤胸腔内原发部位等与神经源性肿瘤预后无相关性,而患者年龄、肿瘤临床分期、肿瘤病理类型、是否辅助化疗是神经源性肿瘤预后相关因素。由于本研究样本量小,病种较多,胸腔巨大肿瘤组织学复杂,难于做到理想的前瞻性统计学分析,需继续扩大样本量或多中心合作进一步加强研究。分别统计分析不同胸腔巨大肿瘤的相关预后因素,在临床疾病的诊断和治疗中给予指导。

参考文献

- 1 Furukawa N, Hansky B, Niedermeyer J, *et al.* A silent gigantic solitary fibrous tumor of the pleura; case report[J]. J Cardiothorac Surg, 2011,29,6:122
- 2 李国庆,王磊,钟斌,等. 儿童原发性胸部巨大肿瘤的外科处理[J]. 临床小儿外科杂志, 2010,9(2):101-103
- 3 许绍发,刘志东,秦明,等. 胸腔巨大肿瘤的外科治疗[J]. 肺外科学, 2010;99-100
- 4 Hayat J, Ahmed R, Alizai S, *et al.* Giant ganglioneuroma of the posterior mediastinum[J]. Interact Cardiovasc Thorac Surg, 2011,13(3):344-345
- 5 付浩,陈克能,梁震,等. 单一医生组原发性纵隔肿瘤外科治疗的长期随访[J]. 中国肿瘤临床, 2014,41(7):456-460
- 6 孙楠. 手术治疗纵隔肿瘤的临床分析[J]. 中国现代药物应用, 2011,5(13):47-48

- 7 Liu FY, Wang MQ, Duan F, *et al.* Combined embolization and surgical resection of a giant mediastinal tumor[J]. Thorac Cardiovasc Surg, 2014,62(3):265-269
- 8 Louis CU, Shohet JM. Neuroblastoma: molecular pathogenesis and therapy[J]. Annu Rev Med, 2015,66:49-63
- 9 杨合英,王艳娜,高建,等. 小儿神经母细胞瘤的临床分析[J]. 中华小儿外科杂志, 2014,35(2):100-103
- 10 张晓红,石军. 小儿神经母细胞瘤相关预后因素研究进展[J]. 中国小儿血液与肿瘤杂志, 2015,20(2):107-109
- 11 Peuchmaur M, d'Amore ES, Joshi VV, *et al.* Revision of the international neuroblastoma pathology classification: confirmation of favorable and unfavorable prognostic subsets in ganglioneuroblastoma, nodular[J]. Cancer, 2003,98(10):2274-2281
- 12 高建. 80 例神经母细胞瘤的临床诊疗疗效及预后影响因素分析[D]. 郑州:郑州大学, 2013
- 13 张国锋,侯广军,耿宪杰,等. 45 例儿童神经母细胞瘤预后因素分析[J]. 中国实用医药, 2014,9(21):8-9
- 14 Canete A, Gerrard M, Rubie H, *et al.* Poor survival for infants with MYCN - amplified metastatic neuroblastoma despite intensified treatment; the International Society of Paediatric Oncology European Neuroblastoma Experience[J]. J Clin Oncol, 2009,27(7):1014-1019
- 15 杨异,陈吉. 原发于纵隔的淋巴瘤外科治疗分析[J]. 中华胸心血管外科杂志, 2002,18(5):315
- 16 Sarkaria IS, Bains MS, Sood S, *et al.* Resection of primary mediastinal non - seminomatous germ cell tumors: a 28 - year experience at memorial sloan - kettering cancer center[J]. J Thorac Oncol, 2011,6(7):1236-1241
- 17 林如峰,方拥军,陆勤,等. 儿童原始神经外胚叶瘤的临床分析[J]. 医学研究生学报, 2015,12(28):1280-1282
- 18 Orr WS, Denbo JW, Billups CA, *et al.* Analysis of prognostic factors in extraosseous Ewing sarcoma family of tumors: review of St. Jude Children's Research Hospital experience[J]. Ann Surg Oncol, 2012,19(12):3816-3822

(收稿日期:2017-04-09)

(修回日期:2017-04-15)

乳腺癌差异表达 miRNA 在预后中的意义

马 跃 高英静 何 浪

摘 要 **目的** 运用生物信息学方法研究复发转移乳腺癌组织中的差异表达 MicroRNAs,预测其在乳腺癌预后中的分子调控网络。**方法** 从 GEO 数据库中获取乳腺癌组织 MiRNA 表达谱,包括 131 例 10 年内无远处转移复发者,79 例 10 年内有复发者。GEO2R 在线分析工具筛选差异表达 MiRNA,靶基因预测验证数据库预测 miRNA 靶基因,使用 DAVID 工具的基因功能注释

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81201702);国家级创新性实验项目(201313705009)

作者单位:610500 成都医学院基础医学院(马跃、高英静);成都医学院生物医学系(何浪)

通讯作者:何浪,副教授,电子信箱:helang79@sohu.com

和通路富集方法对靶基因进行分析。TF - miRNA 调控数据库寻找其上游转录因子, Cytoscape 软件构建互作网络。结果 复发转移组乳腺癌组织共筛选到差异表达的 miRNA 5 个, 其中表达上调 3 个, 表达下调 2 个。得到 4 个相关上游转录因子 HIF1A、EGRI、FOXMI、ESR2, 与差异 miRNA 共调控 154 个的靶基因。靶基因功能集中在 BMP 信号通路, TGF - β 信号通路, 细胞骨架组装功能和 Rho GTPases 信号通路。结论 差异性表达的 miRNA 包括 hsa - miR - 210、hsa - miR - 33a、hsa - miR - 32、hsa - miR - 135a、hsa - miR - 30a - 3p, 利用生物信息学方法, 能够有效获取信息, 为乳腺癌的治疗及预后监测的新策略研究开辟新思路。

关键词 乳腺癌 预后 microRNAs 调控网络 生物信息学

中图分类号 R730.3

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.01.011

Differential Expression of miRNA in Breast Cancer and the Significance in Prognosis. Ma Yue, Gao Yingjing, He Lang. Department of Biomedicine, Chengdu Medical College, Sichuan 610500, China

Abstract Objective To explore changes in the expression of MicroRNAs related to prognosis in breast cancer tissue. **Methods** Microarray data of breast cancer tissue were downloaded from the GEO database, including MicroRNAs profilings of 10 year distant - relapse free survival and the controls. The differentially - expressed MicroRNAs were identified use GEO2R tool. The upstream transcription factor (TF) and downstream target genes of differentially - expressed MicroRNAs were investigated with prediction websites. Function and pathway of target genes were annotated by DAVID. Regulating network of TF - miRNA - target gene were constructed by cytoscape. **Results** A total of 5 miRNAs were differentially expressed (3 up - and 2 down - regulated). 5 upstream TFs and 154 downstream target genes were found respectively. Functional enrichment analysis indicated that negative regulation of BMP signaling pathway, cytoskeleton organization, signaling by TGF beta, signaling by Rho GTPases were involved. **Conclusion** hsa - miR - 210, hsa - miR - 33a, hsa - miR - 32, hsa - miR - 135a, hsa - miR - 30a - 3p were the differentially - expressed miRNAs relevant to prognosis of breast cancer. Our study systemically characterize miRNAs expression changes using bioinformatics methods to the benefit of the diagnosis and treatment for breast cancer prognosis.

Key words Breast cancer; Prognosis; MicroRNAs; Regulating network; Bioinformatics

乳腺癌是常见的女性恶性肿瘤之一, 具有异质性高的特点, 即使细胞形态学和雌激素受体等细胞分子表型很相似的乳腺癌患者, 也可能具有不同的预后表现, 或对相同的治疗方案存在不同的反应^[1-3]。因此, 除目前临床常用的指标外, 需要更准确、更具临床实用性的预测因子, 为乳腺癌个体化治疗提供依据。miRNAs (miRNAs) 为 18 ~ 25 个核苷酸的低分子非编码 RNA, 可结合 3' 端非翻译区, 在转录后水平抑制 mRNA 的翻译或导致其降解。有赖于靶基因的差异, miRNAs 既可促癌也可抑癌。乳腺癌组织中 miRNAs 表达失调, 可能导致细胞分化、增殖和凋亡的改变。近年来的研究表明, 乳腺癌发生、发展的各阶段均有不同程度的 miRNAs 相对表达失调^[4]。较之 mRNA 作为分子标记, miRNAs 相对分子质量小, 结构稳定不易降解, 从冷冻组织、甲醛溶液固定组织以及血液中均能提取, 故 miRNAs 在预后中的意义逐渐受到重视^[5, 6]。

肿瘤生物信息学将生物信息学的方法学、工具软件及数据库等应用于肿瘤的分子机制、新的肿瘤生物标志物和个体化治疗措施的研究中^[7]。本研究以 miRNA 表达谱数据为基础, 联合生物信息学工具及文献挖掘手段, 比较分析了 10 年无远处转移复发和有复发的乳腺癌组织 miRNA 表达谱变化, 评价 miR-

NA 与乳腺癌患者预后的关联性, 探讨乳腺癌组织 miRNA 差异在乳腺癌预后判断中的意义。

材料与方法

1. 数据收集: 数据来源于基因表达综合数据库 (GEO, Gene Expression Omnibus, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>), 材料为乳腺癌组织, 登录号 GSE22216, 由 Buffa 等^[8]提交。包括 210 例原发性乳腺癌, 所有患者均有完整的 10 随访资料, 其中 131 例 10 年内无远处转移复发, 79 例 10 年有复发 (其中 50 例为 5 年内出现远处复发, 复发转移发生的平均时间为 4.26 ± 2.49 年, 复发中位时间 4.15 年)。Trizol 法提取组织总 RNA, 生物素标记, 采用 Illumina 公司 Human v1 MicroRNA expression beadchip 芯片杂交。本数据集实验过程通过牛津大学地方伦理委员会批准, 所有组织标本的收集均征得患者本人的知情同意^[8]。患者乳腺癌组织分子表型及肿瘤分级见表 1^[8]。

2. 差异表达 miRNA 筛选: 本研究中将样本分为 10 年内无复发组和有复发组。采用 GEO 数据库的 GEO2R 在线分析工具进行差异表达 miRNA 筛选。该工具基于 R 程序语言, 应用 *t* 检验筛选两组样本之间的差异表达 miRNA, 多重假设检验控制采用 Benjamini & Hochberg (BH) 法^[9]。BH 法对 *P* 值进行校

表 1 乳腺癌组织分子表型及肿瘤分级

项目	有复发组(<i>n</i>)	无复发组(<i>n</i>)
雌激素受体表型		
阳性	46	81
阴性	33	50
累及淋巴结		
0	32	88
1~3	19	38
>3	28	5
肿瘤分级(Bloom-Richardson 氏分级法)		
1	9	33
2	33	48
3	28	35
未知	9	15

正,以校正假阳性率。符合下述标准的即判定为差异表达 miRNA: $P<0.05$,校正 P (adjusted P) <0.05 ,表达值倍数变化(fold change,FC) ≥ 1.5 。

3. 差异表达 miRNA 的靶基因预测:使用靶基因预测数据库 PicTar (<http://pictar.bio.nyu.edu>), MiRanda (<http://www.microrna.org/microrna/home.do>) 和 TargetScan(<http://www.targetscan.org/>) 在线预测差异表达 miRNAs 的潜在靶基因,取其预测结果交集作为下一步分析的靶基因集合。

4. 靶基因功能注释和通路分析:采用 DAVID (the database for annotation, visualization and integrat-

ed discovery) 平台,分别对差异表达上调和下调的 miRNA 所对应的靶基因进行生物学功能和信号通路分析^[10]。富集分析的结果以 P 值由小到大排列。该富集评分采用改良 Fisher 精确检验,分析提交的靶基因是否在某个功能节点上出现过,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义的功能类及通路。生物学功能选择在基因本体(gene ontology,GO)中注释其参与的生物学过程,信号通路选择人类生物学反应及信号通路数据库 Reactome 反应组学数据库(Reactome, <http://www.reactome.org>)^[11,12]。

5. 以差异 miRNA 为基础的调控网络构建:TransmiR(<http://www.cuilab.cn/transmir>)^[13] 是转录因子(transcription factor,TF)对应 microRNA 的调节关系数据库,利用 TransmiR 检索差异表达 miRNA 的上游转录因子。结合靶基因预测结果,使用 Cytoscape 软件绘制上游转录因子(TF)-microRNA-下游靶基因(target gene)的调节网络^[14]。

结 果

1. 差异表达的 miRNA:依据两样本 t 检验 $P<0.05$,多重假设检验校正 P (adjusted P) <0.05 ,FC ≥ 1.5 的阈值条件,10 年内有复发和无复发的乳腺癌组织差异表达的 miRNA 见表 2,其中表达上调 3 个,表达下调 2 个。

表 2 有复发 Vs 无复发乳腺癌组织差异表达 miRNA

miRNA 名称	校正 P	P	序更(5'→3')
正调节			
hsa-miR-210	0.000	0.000	CTGTGCGTGTGACAGCGG
hsa-miR-33a	0.019	0.000	GTGCATTGTAGTTGCATTG
hsa-miR-32	0.021	0.000	TATTGCACATTACTAAGTTGC
负调节			
hsa-miR-135a	0.000	0.000	TATGGCTTTTATTTCCTATG
hsa-miR-30a-3p	0.000	0.000	CTTTCAGTCGGATGTTTG

2. 差异表达 miRNA 的靶基因预测:采用三大 miRNA 靶基因预测数据库,对差异性表达 miRNA 的潜在靶基因进行预测,上调的 miRNA(hsa-miR-210、hsa-miR-33a、hsa-miR-32)预测的靶基因数分别为 5、20、76,下调的 miRNA(hsa-miR-135a、hsa-miR-30a-3p)预测的靶基因数分别为 50 和 3。所有靶基因名称见图 1。

3. 靶基因的生物学功能及通路富集分析:采用 DAVID 在线平台的 Functional annotation chart 工具对上调和下调的差异表达 miRNA 对应的靶基因,分别

进行富集分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义的阈值条件,详见表 3。

4. 绘制以差异表达 miRNA 为基础的乳腺癌预后相关的分子调控网络:运用 TransmiR 软件预测的 hsa-miR-210 的转录因子为缺氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor 1 alpha subunit,HIF1A,定位于 14 号染色体),hsa-miR-32 的转录因子为 EGR1(early growth response 1,EGR1,定位于 5 号染色体),hsa-miR-135a 的转录因子为 FOXM1(forkhead box M1,叉头框蛋白 M1,定位于 12 号染色体),hsa-miR-

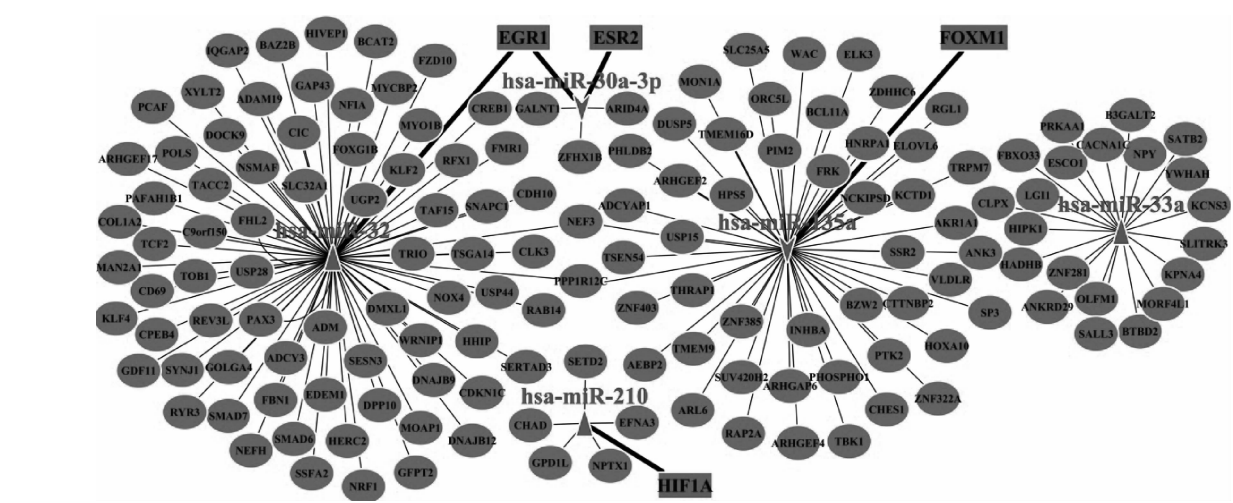


图 1 乳腺癌预后相关 miRNA 分子调控网络

红色三角形节点为乳腺癌差异表达 miRNA,正三角为表达上调,倒三角为表达下调;绿色长方形节点为 miRNA 上游的转录因子,蓝色圆形节点为 miRNA 下游靶基因;黑色实线代表转录因子对 miRNA 的调控作用,灰色实线代表 miRNA 对靶基因的调控作用

表 3 差异表达 miRNA 对应的靶基因功能及信号通路列表

功能及信号通路条目	P	基因名
差异表达上调 miRNA 对应的靶基因功能		
GO:0007178 ~ transmembrane receptor protein serine/threonine kinase signaling pathway	0.004	SMAD7、CREB1、SMAD6、COL1A2、TOB1
GO:0048666 ~ neuron development	0.004	CDKN1C、SALL3、SLITRK3、ADM、CREB1、PAFAH1B1、GAP43、MYCBP2
GO:0030182 ~ neuron differentiation	0.005	CDKN1C、SALL3、SLITRK3、ADM、CREB1、PAFAH1B1、PAX3、GAP43、MYCBP2
GO:0030514 ~ negative regulation of BMP signaling pathway	0.007	SMAD7、SMAD6
GO:0048812 ~ neuron projection morphogenesis	0.009	SLITRK3、ADM、CREB1、PAFAH1B1、GAP43、MYCBP2
REACTOME 信号通路		
REACT_6844:Signaling by TGF-β	0.089	SMAD7、SMAD6
差异表达下调 miRNA 对应的靶基因功能		
GO:0007010 ~ cytoskeleton organization	0.001	CTTNBP2、ARHGEF2、ARHGAP6、PTK2、TRPM7、ANK3、NCKIPSD
GO:0046777 ~ protein amino acid autophosphorylation	0.023	CTTNBP2、PTK2、TRPM7
GO:0006468 ~ protein amino acid phosphorylation	0.034	FRK、CTTNBP2、PTK2、TRPM7、TBK1、PIM2
GO:0006793 ~ phosphorus metabolic process	0.047	DUSP5、FRK、CTTNBP2、PTK2、TRPM7、TBK1、PIM2
GO:0006796 ~ phosphate metabolic process	0.047	DUSP5、FRK、CTTNBP2、PTK2、TRPM7、TBK1、PIM2
REACTOME 信号通路		
REACT_11044:Signaling by Rho GTPases	0.032	ARHGEF4、ARHGEF2、ARHGAP6

GO 功能类条目按 P 值排序,篇幅所限,仅列出前 5 条

30a-3p 的转录因子为 EGR1 和 ESR2 (estrogen receptor 2,雌激素受体 2,定位于 14 号染色体)。hsa-miR-32 未检索到相应转录因子。Cytoscape 软件整合转录因子、差异表达 miRNA 和靶基因,构建预后相关的分子调控网络见图 1。

讨 论

目前,经手术完全切除的乳腺癌逐渐成为乳腺癌患者的主体。患者通过及时的预后监测,达到生存最

大化,同时也要避免不必要的治疗。乳腺癌的分子分型是临床上判断乳腺癌生物学行为,指导针对性治疗方案制定及预后估计的重要依据,仍有约 10% 的肿瘤尚不能分型^[15]。因此,乳腺癌患者的个体化医疗,要求用于预测的分子标记兼顾特异性和实用性以及潜在治疗靶点的特性。本研究利用乳腺癌组织 microRNA 表达谱,应用生物信息学的方法,比较了 10 年内有复发转移与无复发乳腺癌的差异表达 miR-

NA。得到 5 个乳腺癌复发相关 miRNA, 其中 3 个表达上调, 2 个表达下调。

miRNA 通过特异性调控其靶基因来行使其功能, 利用生物信息学手段预测 miRNA 的靶基因, 分析靶基因的生物学功能, 以寻找 miRNA 与疾病的关联。本研究采用权威在线数据库预测差异表达 miRNA 的靶基因, 上调的 miRNA 共预测到靶基因 101 个, 下调的 miRNA 共预测到靶基因 53 个。进一步对靶基因生物学功能注释发现, 差异表达的 miRNA 调控的靶基因, 包含有 SMAD7、SMAD6、TOB1 等分子的跨膜受体蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶途径 (GO: 0007178 ~ transmembrane receptor protein serine/threonine kinase signaling pathway) 和 BMP 信号通路 (GO: 0030514 ~ negative regulation of BMP signaling pathway), 以及包含有 TRPM7 等基因的细胞骨架组装功能 (GO: 0007010 ~ cytoskeleton organization)。

BMP 为骨形态发生蛋白 (bone morphogenetic protein), 是转化生长因子 - β (transforming growth factor - β , TGF - β) 超家族的重要组成。近年来, BMP 信号通路在癌症发生、发展和转移中的功能逐渐成为新热点。差异表达下调 miRNA 对应的下游靶基因 SMAD7, SMAD6 分子均为 TGF - β 或 BMP 信号通路的抑制剂。最近的研究表明, SMAD7 可抑制乳腺癌细胞的上皮间质转化和侵袭^[16]; 而 SMAD6 可通过抑制 BMP 信号通路, 阻碍血管增生^[17]。

细胞骨架 (cytoskeleton) 是细胞内不同蛋白纤维聚合物以及多种调控蛋白交错连接的网络, 可维持细胞的形态, 参与胞内运输、细胞运动、信号转导等生理活动, 参与肿瘤细胞迁移扩散^[18]。差异表达下调 miRNA 对应的下游靶基因功能涉及细胞骨架组装功能, 其中 TRPM7 属于瞬时受体电位 (transient receptor potential, TRP) 通道 M 型亚类, 同时具有激酶活性和离子通道的功能, 在多种肿瘤的迁移中起作用^[19]。有研究报道, TRPM7 在乳腺癌患者中异常高表达, 并且与肿瘤的转移、临床分期等相关, 是预后的独立预测因子^[20]。

miRNA 的转录被转其上游的转录因子所调控, 二者同属于基因表达调控的重要组成, 共同完成对下游靶基因的表达调节。本研究进一步运用 TransmiR 软件查找差异表达 miRNA 的上游转录因子, 共得到 4 个相关转录因子 HIF - 1α 、EGR1、FOXO1、ESR2, 均有文献报道, 在乳腺癌转移及预后中发挥重要作用。利用 Cytoscape 软件将上述转录因子、差异表达 miR-

NA 和靶基因整合, 绘制了以 miRNA 为核心的乳腺癌预后相关的分子调控网络^[21~24]。网络分析提示本研究中差异表达 miRNA 可能通过多基因, 多途径在乳腺癌的演进和转移中发挥作用, TGF - β 信号通路 (REACT_6844: Signaling by TGF beta), Ras 相似物 GTP 酶信号通路 (REACT_11044: Signaling by Rho GTPases) 可能是其主要信号通路。深入研究, 有望为乳腺癌的个体化治疗及预后监测提供新的分子靶点和新的靶向治疗思路。

综上所述, 高通量技术所产生的结果较多, 以及统计方法的局限性, 不可避免地出现一些假阳性结果, 因此需要进一步开展生物学实验和功能研究加以验证。同时表达谱检测的 miRNA 数量有限, 需采用更高的检测通量以及更广泛的检测范围对该调控网络予以补充和完善。

参考文献

- Palma G, Frasci G, Chirico A, *et al.* Triple negative breast cancer: looking for the missing link between biology and treatments [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(29): 26560 - 26574
- Bertos NR, Park M. Breast cancer - one term, many entities? [J]. *J Clin Invest*, 2011, 121(10): 3789 - 3796
- Prat A, Adamo B, Cheang MC, *et al.* Molecular characterization of basal - like and non - basal - like triple - negative breast cancer [J]. *Oncologist*, 2013, 18(2): 123 - 133
- Nassar FJ, Nasr R, Talhouk R. MicroRNAs as biomarkers for early breast cancer diagnosis, prognosis and therapy prediction [J]. *Pharmacol Ther*, 2017, 172: 34
- Mathe A, Scott RJ, Avery - Kiejda KA. MiRNAs and other epigenetic changes as biomarkers in triple negative breast cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(12): 28347 - 28376
- Perez - Rivas LG, Jerez JM, Carmona R, *et al.* A microRNA signature associated with early recurrence in breast cancer [J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): e91884
- 周洁白, 王向东. 肿瘤生物信息学: 系统临床医学的新手段 [J]. *转化医学杂志*, 2012, 1(1): 41 - 43
- Buffa FM, Camps C, Winchester L, *et al.* microRNA - associated progression pathways and potential therapeutic targets identified by integrated mRNA and microRNA expression profiling in breast cancer [J]. *Cancer Res*, 2011, 71(17): 5635 - 5645
- Huber W, Carey VJ, Gentleman R, *et al.* Orchestrating high - throughput genomic analysis with bioconductor [J]. *Nat Methods*, 2015, 12(2): 115 - 121
- Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources [J]. *Nat Protoc*, 2009, 4(1): 44 - 57
- Gene Ontology Consortium. Gene Ontology Consortium: going forward [J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43 (Database issue): D1049 - D1056

- 12 Fabregat A, Sidiropoulos K, Garapati P, *et al.* The Reactome pathway Knowledgebase [J]. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44 (D1): D481 – D487
- 13 Wang J, Lu M, Qiu C, *et al.* TransmiR: a transcription factor – microRNA regulation database[J]. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38 (Database issue): D119 – D122
- 14 Smoot ME, Ono K, Ruscheinski J, *et al.* Cytoscape 2.8: new features for data integration and network visualization[J]. *Bioinformatics*, 2011, 27(3): 431 – 432
- 15 Toss A, Cristofanilli M. Molecular characterization and targeted therapeutic approaches in breast cancer[J]. *Breast Cancer Res*, 2015, 17: 60
- 16 Stolfi C, Marafini I, De Simone V, *et al.* The dual role of Smad7 in the control of cancer growth and metastasis[J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(12): 23774 – 23790
- 17 Mouillesseaux KP, Wiley DS, Saunders LM, *et al.* Notch regulates BMP responsiveness and lateral branching in vessel networks via SMAD6[J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 13247
- 18 谢朝晖,陈兰英. 细胞骨架研究进展[J]. *癌变·畸变·突变*, 2011, 23(4): 315 – 318
- 19 赵敏,罗晨辉,王瑛,等. TRPM7 与肿瘤[J]. *中南大学学报:医学版*, 2016, 3: 333 – 337
- 20 Yee NS, Kazi AA, Yee RK. Cellular and Developmental Biology of TRPM7 Channel – Kinase: Implicated Roles in Cancer[J]. *Cells*, 2014, 3(3): 751 – 777
- 21 Yang J, Altahan A, Jones DT, *et al.* Estrogen receptor – alpha directly regulates the hypoxia – inducible factor 1 pathway associated with antiestrogen response in breast cancer[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(49): 15172 – 15177
- 22 Sun L, Liu Y, Lin S, *et al.* Early growth response gene – 1 and hypoxia – inducible factor – 1alpha affect tumor metastasis via regulation of tissue factor[J]. *Acta Oncol*, 2013, 52(4): 842 – 851
- 23 Hamurcu Z, Ashour A, Kahraman N, *et al.* FOXM1 regulates expression of eukaryotic elongation factor 2 kinase and promotes proliferation, invasion and tumorigenesis of human triple negative breast cancer cells[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(13): 16619 – 16635
- 24 Elebro K, Borgquist S, Rosendahl A H, *et al.* High estrogen receptor beta expression is prognostic among adjuvant chemotherapy – treated patients – results from a population – based breast cancer cohort[J]. *Clin Cancer Res*, 2016, 76(4): P5 – 08 – 27 – P5 – 08 – 27

(收稿日期:2017 – 02 – 10)

(修回日期:2017 – 04 – 03)

艰难梭菌感染 C57BL/6 小鼠模型的建立方法研究

吕 治 彭国丽 王保亚 苏建荣

摘 要 **目的** 建立 C57BL/6 小鼠抗菌药物诱导艰难梭菌感染模型,为更有效地认识人类艰难梭菌感染性疾病的发病机制及治疗措施提供依据。**方法** C57BL/6 小鼠经抗菌药物混合液预处理 3 天后,进行克林霉素腹腔注射。之后给予高、中、低浓度艰难梭菌 ATCC43255 悬液灌胃,建立艰难梭菌感染诱导肠损伤和结肠炎的 CDI 模型。观察小鼠的病死亡率,平均相对体重、结肠组织病理学评分和粪便艰难梭菌 A&B 毒素变化。**结果** 小鼠经抗菌药物处理和艰难梭菌灌胃后,出现腹泻,体重下降,粪便艰难 AB 毒素检测阳性。结肠病理切片可见炎性细胞浸润和组织坏死等结肠炎表现。随着灌胃菌液浓度的增加,小鼠症状越重,粪便毒素值越高。造模后存活下来的小鼠即使再次给予艰难梭菌灌胃也不再出现症状。**结论** C57BL/6 小鼠艰难梭菌感染模型与人类 CDI 病程变化相似,可进一步用于 CDI 防治措施的研究。

关键词 C57BL/6 小鼠 艰难梭菌 动物模型

中图分类号 R1 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.01.012

Established *Clostridium Difficile* Infected C57BL/6 Mouse Model. Lv Zhi, Peng Guoli, Wang Baoya, *et al.* Clinical Laboratory Center, Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China

Abstract Objective To established a CDI C57BL/6 mouse model for realize the mechanisms and treatments of CDI. **Methods** C57BL/6 mice were challenged with *C. difficile* strain VPI 10463 after treatment with an antibiotic cocktail. Disease activity index, mean relative weight, pathological scores and toxins A&B in stool samples were measured. **Results** After Intra gastric administration with antibiotics and *C. difficile*, mice had signs of CDI, such as diarrhea, weight loss, positive test for feces AB toxins. Colon pathological visible inflammatory cells infiltration and tissue necrosis colitis. Disease severity varied from fulminant to minimal in accordance with the challenge

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30972819)

作者单位:100050 首都医科大学附属北京友谊医院检验科

通讯作者:100050 苏建荣,教授,博士生导师,电子邮箱:friendshiplab@sina.com