

DOI:10.13350/j.cjpb.240603

• 论著 •

病毒宏基因组学在献血人群病毒鉴定的应用研究^{*}

徐爱华^{**}, 崔文艳, 肖玮

(沧州市中心血站, 河北沧州 061001)

【摘要】 目的 探讨宏基因组学技术在献血人群中病毒鉴定的应用潜力,并评估其在提高血液制品安全性方面的效能。**方法** 采用前瞻性队列研究设计,收集了15名献血者的血液样本。通过QIAamp Viral RNA Mini Kit提取核酸,并使用Phusion High-Fidelity PCR Master Mix进行PCR扩增,随后使用NEBNext UltraTM DNA Library Prep Kit构建测序文库。样本通过Illumina HiSeq平台进行双端测序,再进行数据质量控制和宏基因组分析。**结果** 在15名献血者样本中,平均总Reads数量为 $9.86 \times 10^6 \pm 6.11 \times 10^5$,平均总碱基数为 $1.55 \times 10^9 \pm 6.36 \times 10^7$ 。质量分数Q20和Q30的平均碱基数分别为 $1.52 \times 10^9 \pm 7.04 \times 10^7$ 和 $1.47 \times 10^9 \pm 5.95 \times 10^7$,平均占比分别为98.81%±0.02%和95.60%±0.06%,GC含量平均占比为65.99%±0.16%。宏基因组分析鉴定出包括Dinovirus, parvovirus, torque teno virus, papillomavirus, Merkel cell polyomavirus, herpesvirus_6A, herpesvirus_6B, human pegivirus, polyomavirus在内的9类病毒。**结论** 宏基因组学技术能够在献血样本中检测到多种病毒,包括传统筛查可能遗漏的类型。该技术可作为提高献血安全性的有效工具,有助于发现和预防病毒传播,但也需要进一步研究以优化数据处理和解释。

【关键词】 献血者;病毒宏基因组学;高通量测序;病原体检测;血液安全

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2024)06-0631-05

[Journal of Pathogen Biology. 2024 Jun.;19(6):631-635,641.]

Study on the application of metaviral genomics in virus identification among blood donors

XU Aihua, CUI Wenyan, XIAO Wei (Cangzhou Central Blood Station, Cangzhou 061001, Hebei, China)

【Abstract】 Objective To explore the application potential of metagenomic technology in virus identification among blood donors and evaluate its effectiveness in improving the safety of blood products. **Methods** A prospective cohort study design was adopted, and blood samples from 15 blood donors were collected. Nucleic acids were extracted using the QIAamp Viral RNA Mini Kit and PCR amplified using Phusion High-Fidelity PCR Master Mix, followed by constructing a sequencing library using the NEBNext UltraTM DNA Library Prep Kit. The samples were subjected to paired-end sequencing on the Illumina HiSeq platform, followed by data quality control and metagenomic analysis. **Results** Among the 15 blood donor samples, the average number of total reads was $9.86 \times 10^6 \pm 6.11 \times 10^5$, and the average number of total bases was $1.55 \times 10^9 \pm 6.36 \times 10^7$. The average base numbers of quality fractions Q20 and Q30 are $1.52 \times 10^9 \pm 7.04 \times 10^7$ and $1.47 \times 10^9 \pm 5.95 \times 10^7$ respectively, the average proportions are 98.81%±0.02% and 95.60%±0.06% respectively, and the average proportion of GC content is 65.99%±0.16%. Metagenomic analysis identified 9 types of viruses including Dinovirus, parvovirus, torque teno virus, papillomavirus, Merkel cell polyomavirus, herpesvirus_6A, herpesvirus_6B, human pegivirus, and polyomavirus. **Conclusion** Metagenomic techniques are capable of detecting a wide range of viruses in donated blood samples, including types that may be missed by traditional screening. The technology could serve as an effective tool to improve the safety of blood donations and help detect and prevent viral transmission, but further research is needed to optimize data processing and interpretation.

【Keywords】 blood donors; viral metagenomics; high-throughput sequencing; pathogen detection; blood safety

^{**}随着传染病对公共卫生安全构成的潜在影响日益增加,病毒宏基因组学(Viruses metagenomics)作为一项新兴技术,其在病原体检测和鉴定方面的应用受到了广泛关注^[1-2]。病毒宏基因组学基于高通量测序(High throughput sequencing)技术,能够无偏地检测样本中的所有病毒遗传物质,这一特性使其成为监测和预防传染病传播的理想工具,尤其在血液安全领域^[3,4]。

献血者的血液安全至关重要,因为血液及其制品

的任何污染都可能传播病毒给受血者,引发严重的健康问题^[5-6]。尽管现有的病毒检测方法,如聚合酶链式反应(Polymerase chain reaction, PCR)和酶联免疫吸附试验(Enzyme linked immunosorbent assay,

^{*} **【基金项目】** 沧州市科技局重点研发计划项目(No. 204106025)。

^{**} **【通讯作者(简介)】** 徐爱华(1980-),男,河北沧州人,主治医师,本科,输血技术。E-mail: xah_022802@sina.com

ELISA),在献血筛查中发挥了重要作用,但这些方法往往针对特定的已知病毒,对于新出现的或未知的病毒检测则常常无能为力^[7]。此外,这些方法对于低病毒载量的样本也可能缺乏敏感性^[8-9]。

在此背景下,本研究旨在探讨病毒宏基因组学在献血人群中的应用,以提高对已知及新出现病毒的检测能力。通过使用非靶向的高通量测序技术,不仅可以发现那些常规检测可能遗漏的病毒,还能为献血者提供一种更为全面的病毒检测方法。这种方法的广谱性和高灵敏度预计将极大地提高献血安全性,降低因病毒污染导致的输血相关疾病风险。

本研究将通过系统的样本收集、宏基因组学测序、生物信息学分析以及流行病学评估,全面评价病毒宏基因组学在献血人群病毒鉴定中的应用潜力,旨在提高传统病毒检测的覆盖度和准确性,同时拓展对病毒生态和血源性病毒传播机制的理解,进而为预防和控制血源性病毒传播提供重要信息。

对象和方法

1 研究对象

本研究采用前瞻性队列研究设计,在2023年1月1日至2023年7月31日期间,于多个不同指定的中心血站招募的15名献血者作为研究对象。所有受试者在充分了解本研究目的、方法以及潜在的风险和益处后,均自愿参与并签署了书面知情同意书。纳入标准如下:(1)年龄18~60岁健康男性和女性;(2)按照中心血站的标准程序完成献血前的健康筛查;(3)提供知情同意,并同意其匿名化的血液样本用于研究目的。排除标准如下:(1)有严重免疫缺陷疾病史的个体,包括但不限于艾滋病毒感染者;(2)长期使用免疫抑制剂或广谱抗生素的患者;(3)献血前3个月接受过可能影响血液病毒负载检测相关的医疗程序,例如接受过免疫疗法或化疗的患者;(4)献血前12个月内有旅居疟疾流行区的历史;(5)献血当日或前一天有明显呼吸道感染、发烧或其他急性感染症状。

本研究严格遵循《赫尔辛基宣言》的伦理原则,且通过单位伦理委员会的批准(伦理批号:2020118)。为了保障患者隐私,所有收集的数据和样本均进行匿名处理,并且在研究过程中严格保护患者的个人信息。

2 样本收集

在献血过程中,除了常规的献血量外,额外收集约20 mL的全血用于本研究。将收集的全血样本立即置于带有标签的无菌真空采血管中,用于血液常规和生化检测以及病毒宏基因组学分析。所有参与者的样本将在献血当日收集,并遵循严格的操作标准进行处理和保存,以确保样本质量。采集的每份样本将被编

号,并存储在-80℃的条件下以待后续的宏病毒基因组学检测。样本的处理将在收集后的24 h内完成,以最大限度地减少RNA降解的可能。

3 病毒DNA/RNA提取

为了最大限度地回收病毒核酸并保证其纯度和完整性,核酸提取均在无菌条件下进行。将存储在-80℃的血浆样本解冻后室温2 000 g离心15 min去除细胞残留物和大分子杂质。采用QIAamp Viral RNA Mini Kit(Qiagen)试剂盒进行提取核酸,随后进行纯化和浓缩步骤以提高后续测序的灵敏度。核酸的质量和浓度通过纳米滴光谱光度计(NanoDrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific)进行评估,并通过琼脂糖凝胶电泳来检查其完整性。最后,将得到的核酸在储存于-80℃条件下保存以避免降解,同时详细记录每个样本的保存日期、编码和核酸浓度信息。

4 宏基因组测序

提取病毒DNA和RNA后,构建适合高通量测序的宏基因组库。将病毒RNA逆转录生成cDNA,采用Illumina平台进行DNA测序。采用逆转录酶和随机引物生成cDNA,然后,利用特异性引物配对,扩增可能存在的病毒特定标记基因区域。本研究中PCR采用Phusion High-Fidelity PCR Master Mix(New England Biolabs),按说明书操作。采用组合双索引策略构建文库后,使用NEBNext UltraTM DNA Library Prep Kit(New England Biolabs)进一步准备用于测序的样本库,通过Illumina HiSeq测序平台进行双端测序。测序完成后,进行原始数据的质量控制,包括去除低质量的测序读段、修剪接头序列和滤除人类基因组DNA污染。对于滤除的低质量序列,采用Phred质量分数 ≥ 20 ,错误发现率(False discovery rate, FDR) $< 1\%$ 。数据清洗后的高质量读段将用于进一步的宏基因组分析,包括组装、物种鉴定和丰度评估。

5 统计学分析

使用Megahit^[10]工具对质量控制后的序列进行组装,使用BWA^[11]工具把去除污染后的序列与组装结果比对,计算reads利用率。同时使用Blast工具^[12]把组装contigs与宿主序列进行比对,以去除宿主序列,随后使用CD-HIT^[13]工具对所有血液样本的contigs进行去冗余。宿主序列的判定条件为比对长度 ≥ 500 bp、比对相似性 $\geq 90\%$,或者比对长度占contig总长的80%以上、比对相似性 $\geq 90\%$ 。本研究中数据均以均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)的形式表述,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 一般资料

15 名献血者平均年龄 35.23±12.42 岁,其中男性 9 名(60%),女性 6 名(40%)。15 名献血者的血常规和生化检测结果:白细胞计数(WBC)(6.80±1.25)×10⁹/L,红细胞计数(RBC)(4.52±0.48)×10¹²/L,血红蛋白(Hb)(13.70±1.10)g/dL,血小板计数(PLT)(245.00±35.70)×10⁹/L,高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)(1.45±0.25)mmol/L,低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)(2.80±0.75)mmol/L,总胆固醇(TC)(5.10±0.90)mmol/L,甘油三酯(TG)(1.47±0.45)mmol/L,空腹血糖(4.95±0.35)mmol/L,肌酐(88.40±12.65)μmol/L,尿素氮(BUN)(4.35±1.05)mmol/L,谷丙转氨酶(ALT)(22.65±7.80)U/L,谷草转氨酶(AST)(20.55±6.45)U/L,总蛋白(72.50±4.80)g/L,白蛋白(44.60±2.90)g/L。所有受试者的检测结果均在临床参考范围内,因此本研究选取所有受试者的血样样本进行高通量测序。

2 测序数据质量控制

测序完成后采用 Base Calling 将结果转化为原始测序序列(Raw reads),得到每例血样的宏基因组测序数据,使用 Trimmomatic 工具^[14]对原始序列进行质量控制以进行后续数据分析。为了避免宿主序列干扰后续分析,本研究使用 BWA 工具将质控后的序列与人类宿主(Human)进行比对,过滤比对长度低于 Reads 总长 80%的比对结果,然后去除相应序列,去除宿主序列之后的质量信息见表 1。质控完成后,15 例血样样本测序的平均总 Reads 序列数量为 9.86×10⁶±6.11×10⁵,平均总碱基(Bases)数量为 1.55×10⁹±6.36×10⁷。在错误发现率(False discovery rate, FDR)0.01 水平下,质量分高于 20 的碱基(Q20)数量为 1.52×10⁹±7.04×10⁷,平均占比为 98.81%±0.02%;质量分高于 30 的碱基(Q30)数量为 1.47×10⁹±5.95×10⁷,平均占比为 95.60%±0.06%。GC 碱基对含量的平均占比为 65.99%±0.16%。

表 1 去除宿主序列后的测序质量控制信息
Table 1 Sequencing quality control information after removing host sequences

样本名称 Sample ID	总序列数量 Total number of sequences	总碱基数量 Total number of bases	Q20 碱基数量 Number of Q20 bases	Q30 碱基数量 Number of Q30 bases	Q20 碱基占比 Proportion of 20 bases	Q30 碱基占比 Proportion of 30 bases	GC 含量占比 Proportion of GC Content
Bldsplem811	1.01×10 ⁷	1.51G	1.49×10 ⁹	1.45×10 ⁹	0.9878	0.9554	0.6582
Bldsplem812	1.07×10 ⁷	1.60G	1.58×10 ⁹	1.53×10 ⁹	0.9880	0.9562	0.6593
Bldsplem813	1.14×10 ⁷	1.71G	1.69×10 ⁹	1.63×10 ⁹	0.9878	0.9554	0.6587
Bldsplem814	1.02×10 ⁷	1.53G	1.51×10 ⁹	1.46×10 ⁹	0.9880	0.9559	0.6643
Bldsplem815	9.85×10 ⁶	1.47G	1.45×10 ⁹	1.41×10 ⁹	0.9887	0.9580	0.6599
Bldsplem816	9.88×10 ⁶	1.47G	1.46×10 ⁹	1.41×10 ⁹	0.9880	0.9559	0.6591
Bldsplem817	9.89×10 ⁶	1.52G	1.63×10 ⁹	1.53×10 ⁹	0.9879	0.9553	0.6590
Bldsplem818	9.07×10 ⁶	1.65G	1.59×10 ⁹	1.51×10 ⁹	0.9880	0.9554	0.6599
Bldsplef0819	9.58×10 ⁶	1.70G	1.47×10 ⁹	1.44×10 ⁹	0.9884	0.9561	0.6600
Bldsplef0820	9.49×10 ⁶	1.56G	1.46×10 ⁹	1.43×10 ⁹	0.9882	0.9561	0.6594
Bldsplef0821	9.52×10 ⁶	1.71G	1.51×10 ⁹	1.45×10 ⁹	0.9880	0.9560	0.6593
Bldsplef0822	9.01×10 ⁶	1.61G	1.53×10 ⁹	1.48×10 ⁹	0.9854	0.9556	0.6598
Bldsplef0823	9.53×10 ⁶	1.47G	1.49×10 ⁹	1.44×10 ⁹	0.9881	0.9551	0.6632
Bldsplef0824	9.80×10 ⁶	1.57G	1.46×10 ⁹	1.43×10 ⁹	0.9872	0.9562	0.6597
Bldsplef0825	9.73×10 ⁶	1.58G	1.49×10 ⁹	1.44×10 ⁹	0.9891	0.9553	0.6594

3 病毒组成分析

基于 NCBI taxonomy 数据库注释信息和上述数据质控后的序列信息,本研究统计了每例样本的 fragments 数量以分析样本中病毒组的组成成分,测序后各病毒分子类型的 fragments 信息见表 2,各分子类型的 fragments 数量占比见图 1。根据高通量测序结果,出了未注释的 fragments 之外,15 例血液样本中包含的病毒组 fragments 主要为双链 DNA(dsDNA)和单链 DNA(ssDNA),其 fragments 数量分别为 113 211.60±5 304.51(57.64%)和 16 445.93±1 220.48(19.86%);以及占比相对较少的双链 RNA

(dsRNA)和单链 RNA(ssRNA),数量分别为 396.33±36.90(0.48%)和 2.40±0.83(<0.01%)。

4 物种注释及病毒组成分析

使用 Blast 工具,本研究采用 2 种方法对去冗余后的 contig 病毒序列进行组装,并与 NCBI taxonomy 病毒数据库比对后进行物种注释。根据注释结果,本研究基于参考序列的方法得到的病毒 contigs 数量为 31,而基于 Denovo 方法鉴定的 contigs 数量为 97,包含了全部基于参考序列的方法得到的 contigs(图 2),结合上述 2 种方法获得的有分类病毒或未注释病毒 contigs 序列集合的差异,本研究保留全部基于 Deno-

vo 和参考序列鉴定的病毒分类,作为最终的病毒鉴定结果。基于鉴定结果,本研究 15 例血样中在科(Family)、属(Genus)水平下共鉴定出 *Dinovirus*, *parvovirus*, *torque teno virus*, *papillomavirus*, *Merkel cell polyomavirus*, *herpesvirus_6A*, *herpesvirus_6B*, *human pegivirus*, *polyomavirus* 等 9 类病毒(图 3)。每个病毒类别的丰度占比见表 3 和图 4。

表 2 各病毒分子类型的 fragments 数量
Table 2 Number of fragments for each virus molecule type

样本名称 Sample ID	dsDNA	dsRNA	ssDNA (+)	ssRNA (+)	未注释 Un-annotation
Bldsplem811	111677	369	14749	1	64163
Bldsplem812	116118	404	16520	3	66538
Bldsplem813	112180	358	17304	2	64267
Bldsplem814	107224	370	14638	2	61379
Bldsplem815	126396	440	19400	3	71788
Bldsplem816	108803	359	14529	4	62311
Bldsplem817	109689	437	16916	2	68597
Bldsplem818	116658	366	16774	2	66293
Bldsplef0819	111450	440	16914	2	68581
Bldsplef0820	108527	363	16898	2	67492
Bldsplef0821	119615	437	16902	3	67508
Bldsplef0822	110309	364	16899	4	67506
Bldsplef0823	109074	438	16091	2	66048
Bldsplef0824	119031	363	16073	2	66095
Bldsplef0825	111423	437	16082	2	66955

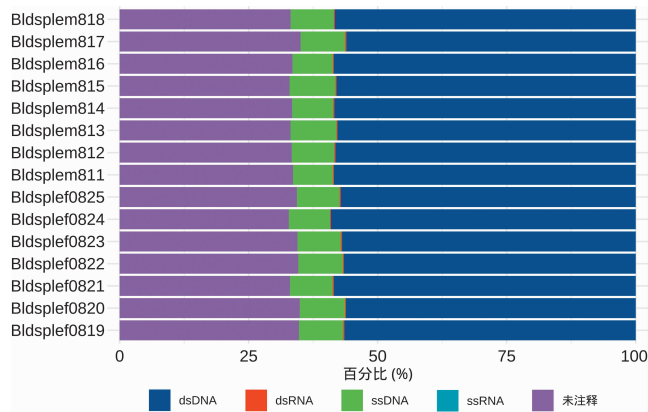


图 1 病毒分子类型 fragments 数量占比
Fig. 1 Percentage of the number of virus molecule type fragments

讨论

本研究利用了宏基因组学技术对献血人群的血液制品进行病原体检测,为血液安全提供了新的监测视角。Lau 等^[15]的研究结果表明,即便是经过白细胞过滤的红细胞制品和血浆制品中,也能检测到多种病毒和细菌病原体,这些病原体可能在传统的病原体筛查中被忽视。在红细胞制品中,尽管含血浆量极少,宏基因组学检测技术仍能检出多种病毒,如小指环病毒属和细小病毒等。这一发现提示,即使是少量的血浆也可能携带病原体,而且部分病原体可以逃避白细胞过

滤的清除。这对于血液制品的安全性提出了新的挑战,尤其是在考虑到病原体可能引起的输血传播性疾病时。

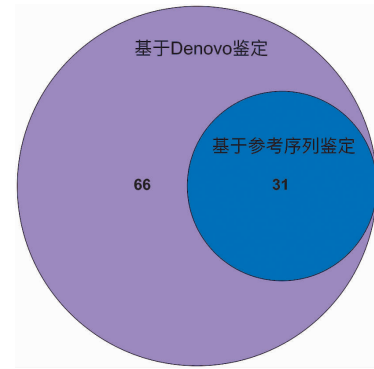


图 2 不同方法获得的病毒 contigs 数量比较
Fig. 2 Comparison of the number of virus contigs obtained by different methods

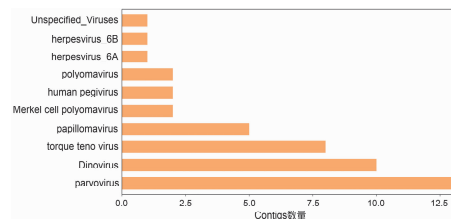


图 3 基于 Denovo 方法和参考序列方法鉴定的科、属水平病毒 contig 数量

Fig. 3 Number of viral contigs identified at the family and genus level based on the Denovo method and the reference sequence method

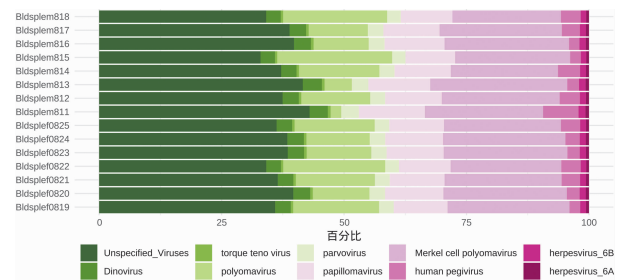


图 4 科(Family)、属(Genus)水平病毒百分比堆积柱形图
Fig. 4 Histogram of virus percentage stacking at Family and Genus level

表 3 15 例血样中各类病毒的平均百分比
Table 3 Mean percentage of each type of virus in blood samples of 15 cases

分类 Classification	占比(%) Proportion
Merkel cell polyomavirus	24.32±1.52
herpesvirus_6A	0.62±0.04
herpesvirus_6B	1.24±0.08
human pegivirus	3.47±1.33
papillomavirus	11.52±0.85
parvovirus	3.09±0.23
polyomavirus	14.32±5.64
torque teno virus	0.50±0.04
Dinovirus	3.31±0.26
Unspecified_Viruses	37.61±2.79

对于血浆制品,宏基因组学技术能够检出与红细胞制品相似的病原体谱,这说明献血者原始血液中的病原体可以在血液制备过程中被保留。徐敏等^[16]的研究进一步强调了血浆中不仅有病毒,也有细菌和寄生虫的遗传物质。这些发现表明,即使在血液制品的生产过程中有多个步骤旨在清除病原体,宏基因组学技术仍然能检测到它们的存在。单采血小板制品的病原体宏基因组学检测,如 Brito 等^[17]的研究所示,揭示了细小病毒和疱疹病毒等病原体的存在,这与全血和血浆制品中的病原体分布相似。这些结果表明,尽管血小板制品中的白细胞和红细胞含量极低,病原体仍然可以在血小板和血浆中生存。

此外, Jacobs 等^[18]的研究表明血液制品中的细菌污染率较低,但依然存在,这可能会引起严重的输血不良反应。Paisse 等^[19]的研究使用 16S rDNA 技术分析不同血液成分中的细菌 DNA,发现其分布存在显著差异。这些研究表明,血液成分中的细菌分布呈现差异性,且红细胞可能是细菌病原体的携带者或储存点。

因此,宏基因组学技术的使用在献血安全管理中显示了其潜在的价值,能够发现传统方法可能忽视的病原体。然而,这项技术也带来了新的挑战,包括如何处理大量的宏基因组数据,以及如何确认检测到的病原体是否具有临床意义。本研究及已发表的文献^[15,19]共同展示了宏基因组学在病原体检测方面的显著效能。红细胞制品中的病原体检测结果表明,尽管血浆含量有限,且有的制品经过白细胞过滤,依然可以检测到多种病毒 DNA 和 RNA。这些发现对于血液制品的安全性提出了新的考虑因素,即传统的病原体筛查可能需要被重新评估,以纳入这些潜在的污染源。

相比于 PCR 和 ELISA 等传统病原体检测方法,宏基因组学技术提供了一个更全面的病原体检测平台。传统技术依赖于特定病原体的先验知识来设计检测引物或抗体,因此它们在检测新型或未分类的病原体方面受到限制。宏基因组学技术,作为一种补充手段,可以帮助弥补这些方法的不足。宏基因组学技术有潜力显著改善献血安全管理。通过提供更详尽的病原体信息,它可以帮助血液中心更精确地评估病原体传播的风险,从而优化献血者的筛选程序和血液制品的处理流程。此外,随着健康人群血液中的发现^[20-22],宏基因组学技术也可能揭示了传统细菌检测方法所忽视的潜在风险。这要求我们重新审视和改进现有的血液安全检测策略,包括考虑这些细菌在血液制品中的生存状态及其可能的影响。

对于未来的研究,需要更深入地探索宏基因组学技术在病原体检测中的应用,特别是开发新的生物信

息学工具来处理 and 解释复杂的宏基因组数据。此外,还需要研究如何将这一技术与现有的病原体检测方法相结合,以实现最佳的检测效果。还需要对宏基因组学技术检测到的病原体进行功能和病理学研究,以确定它们对血液安全的实际意义。

【参考文献】

- [1] Wirth J, Young M. Viruses in subsurface environments[J]. Annu Rev Virol, 2022, 9(1): 99-119.
- [2] Ye SH, Siddle KJ, Park DJ, et al. Benchmarking metagenomics tools for taxonomic classification[J]. Cell, 2019, 178(4): 779-794.
- [3] Slavov SN. Viral Metagenomics for identification of emerging viruses in transfusion medicine[J]. Viruses, 2022, 14(11): 10.3390/v14112448
- [4] 张忠印, 吉飞跃, 周小玉. 异体输血患者术后感染病原菌和大肠埃希菌感染毒力因子的分布及与耐药性的关系[J]. 中国病原生物学杂志, 2022, 17(8): 964-967.
- [5] Sun L, Zhang S, Yang Z, et al. Clinical application and influencing factor analysis of metagenomic next-generation sequencing (mNGS) in ICU patients with sepsis[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2022, 12: 90513210.
- [6] Sauvage V, Gomez J, Boizeau L, et al. The potential of viral metagenomics in blood transfusion safety[J]. Transfus Clin Biol, 2017, 24(3): 218-222.
- [7] Cebria-Mendoza M, Bracho MA, Arbona C, et al. Exploring the diversity of the human blood virome[J]. Viruses, 2021, 13(11): 3390.
- [8] Zhang C, Wang Z, Cai J, et al. Seroreactive profiling of filoviruses in chinese bats reveals extensive infection of diverse viruses[J]. J Virol, 2020, 94(7): 1128.
- [9] Leon KE, Schubert RD, Casas-Alba D, et al. Genomic and serologic characterization of enterovirus A71 brainstem encephalitis[J]. Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm, 2020, 7(3): 10.
- [10] Li D, Luo R, Liu CM, et al. MEGAHIT v1.0: A fast and scalable metagenome assembler driven by advanced methodologies and community practices[J]. Methods, 2016, 102: 3-11.
- [11] Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform[J]. Bioinformatics, 2009, 25(14): 1754-1760.
- [12] Altschul SF, Gish W, Miller W, et al. Basic local alignment search tool[J]. J Mol Biol, 1990, 215(3): 403-410.
- [13] Li W, Godzik A. Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences[J]. Bioinformatics, 2006, 22(13): 1658-1659.
- [14] Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data[J]. Bioinformatics, 2014, 30(15): 2114-2120.
- [15] Lau P, Cordey S, Brito F, et al. Metagenomics analysis of red blood cell and fresh-frozen plasma units[J]. Transfusion, 2017, 57(7): 1787-1800.
- [16] 徐敏, 毛伟, 何涛, 等. 重庆地区健康献血人群血液宏基因组分析与新发病原体鉴定[J]. 中国输血杂志, 2016, 29(9): 895-898.

(下转 641 页)

瘤发展的能力至关重要。本研究中我们构建了 PTEN 过表达的稳转肝癌细胞株,这株细胞的肿瘤生物学行为和蛋白活性相比于对照株 Huh-7/EGFP 明显减弱,细胞内的 ATP-结合盒家族成员 ABCB1 和 ABCG2 表达减少,肿瘤抑制因子 p53 表达上升,与上皮-间质有关的靶分子 E-cadherin 表达升高,Vimentin 表达下降,细胞迁移性能减少。MK2206 的参与表明 Huh-7/hPTEN 能提高细胞对外界药物的利用率,进一步增强对相关蛋白的调控作用。我们的研究结果为 PTEN 作为肝癌治疗的有效分子靶点提供了依据,未来在对肝癌的治疗中,可以针对 PTEN 信号机制研究新的系统性联合治疗,从而降低癌细胞对治疗产生耐药性的可能性。

【参考文献】

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71: 209-249.
- [2] Liu Z, Jiang Y, Yuan H, et al. The trends in incidence of primary liver cancer caused by specific etiologies: results from the Global Burden of Disease study 2016 and implications for liver cancer prevention[J]. J Hepatol, 2019, 70: 674-683.
- [3] European Association for the Study of the Liver. EASL clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma[J]. J Hepatol, 2018, 69: 182-236.
- [4] Li DM, Sun H. TEP1, encoded by a candidate tumor suppressor locus, is a novel protein tyrosine phosphatase regulated by transforming growth factor beta[J]. Cancer Res, 1997, 57: 2124-2129.
- [5] Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, et al. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer[J]. Science, 1997, 275: 1943-1947.
- [6] Liaw D, Marsh DJ, Li J, et al. Germline mutations of the PTEN gene in Cowden disease, an inherited breast and thyroid cancer syndrome[J]. Nat Genet, 1997, 16: 64-67.
- [7] Shi Y, Zhang DD, Liu J B, et al. Comprehensive analysis to identify DLEU2L/TAOK1 axis as a prognostic biomarker in hepatocellular carcinoma[J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2021, 1(23): 702-

718.

- [8] Chow ATS, Salmena L. Recent advances in PTEN signalling axes in cancer[J]. Fac Rev, 2020, 9: 31.
- [9] Wang XJ, Trotman LC, Koppie T, et al. NEDD4-1 is a proto-oncogenic ubiquitin ligase for PTEN[J]. Cell, 2007, 128(1): 129-139.
- [10] Tay Y, Kats L, Salmena L, et al. Coding-independent regulation of the tumor suppressor PTEN by competing endogenous mRNAs[J]. Cell, 2011, 147(2): 344-357.
- [11] Trotman LC, Wang XJ, Alimonti A, et al. Ubiquitination regulates PTEN nuclear import and tumor suppression[J]. Cell, 2007, 128(1): 141-156.
- [12] Uygun B, Abramo K, Leikina E, et al. SLUG is a direct transcriptional repressor of PTEN tumor suppressor[J]. Prostate, 2015, 75: 907-916.
- [13] Freeman DJ, Li AG, Wei G, et al. PTEN tumor suppressor regulates p53 protein levels and activity through phosphatase-dependent and -independent mechanisms[J]. Cancer Cell, 2003, 3: 117-130.
- [14] Tang Y, Eng C. PTEN autoregulates its expression by stabilization of p53 in a phosphatase-independent manner[J]. Cancer Res, 2006, 66: 736-742.
- [15] Liang XX, Li XP, Wang P, et al. Inhibition of lncRNA RET enhances radio-sensitivity of tumor cells via miR-3179/Slug/PTEN axis[J]. Toxicol Res (Camb), 2022, 11(2): 348-360.
- [16] Bruckmueller H, Cascorbi I. ABCB1, ABCG2, ABCC1, ABCC2, and ABCC3 drug transporter polymorphisms and their impact on drug bioavailability: what is our current understanding? [J]. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2021, 17(4): 369-396.
- [17] Weng HJ, Tsai TF. ABCB1 in dermatology: roles in skin diseases and their treatment[J]. J Mol Med, 2021, 99: 1527-1538.
- [18] Stiles B, Gilman V, Khanzenon N, et al. Essential role of AKT-1/protein kinase B alpha in PTEN-controlled tumorigenesis[J]. Mol Cell Biol, 2002, 22: 3842-3851.
- [19] Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream [J]. Cell, 2007, 129: 1261-1274.
- [20] Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2002, 2: 489-501.
- [21] Planchon SM, Waite KA, Eng C. The nuclear affairs of PTEN [J]. J Cell Sci, 2008, 121: 249-253.

【收稿日期】 2023-12-26 【修回日期】 2024-03-17

(上接 635 页)

- [17] Brito F, Cordey S, Delwart E, et al. Metagenomics analysis of the virome of 300 concentrates from a Swiss platelet bank[J]. Vox Sang, 2018: 1111.
- [18] Jacobs MR, Lazarus HM, Maitta RW. The safety of the blood supply-time to raise the bar[J]. N Engl J Med, 2015, 373(9): 882.
- [19] Paise S, Valle C, Servant F, et al. Comprehensive description of blood microbiome from healthy donors assessed by 16S targeted metagenomic sequencing[J]. Transfusion, 2016, 56(5): 1138-1147.

- [20] Goraya MU, Li R, Mannan A, et al. Human circulating bacteria and dysbiosis in non-infectious diseases[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2022, 12: 932702.
- [21] Liu XY, Li J, Zhang Y, et al. Kidney microbiota dysbiosis contributes to the development of hypertension[J]. Gut Microbes, 2022, 14(1): 2143220.
- [22] Borriello L, Coste A, Traub B, et al. Primary tumor associated macrophages activate programs of invasion and dormancy in disseminating tumor cells[J]. Nat Commun, 2022, 13(1): 626.

【收稿日期】 2024-01-27 【修回日期】 2024-04-09