

论著 · 基础研究

长远航海员皮肤共生微生物宏基因组分析*

郑巍巍¹, 代淑阳¹, 乔媛媛¹, 张 泽¹, 赵晓航^{1,2,△}

(1. 海军总医院基础医学研究中心, 北京 100048; 2. 中国医学科学院肿瘤医院分子
肿瘤学国家重点实验室, 北京 100021)

摘要:目的 探讨海上长远航作业环境对作业人员皮肤共生微生物的影响, 以及皮肤共生微生物与宿主之间的相互关系。方法 采集长远航作业人员作业前后脐周微生物样本, 经 16S rRNA V4 区段扩增并测序和全宏基因组鸟枪法高通量测序; 分析菌群结构、种类和微生物代谢功能改变; 采集长远航作业与岸基作业人员外周血, 进行血常规分析。结果 海上航行 105 d 后, 长远航作业者脐周微生物群落多样性减小; 硬壁菌门相对丰度升高, 变形菌门相对丰度降低; 葡萄球菌属相对丰度升高, 而棒状杆菌属相对丰度降低, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。特别是表皮葡萄球菌、金黄色葡萄球菌等致病菌或条件致病菌相对丰度显著增高。功能基因分析提示, 长远航作业后期脐周微生物感染相关基因表达升高。与岸基作业人员相比, 长远航作业组外周血淋巴细胞异常升高人员的比例显著增高, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 脐周皮肤共生微生物可能反映海上长远航作业者的健康状况。

关键词: 长远航; 宏基因组; 二代测序; 皮肤微生物

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2018.01.002 **中图法分类号:** Q93.331

文章编号: 1673-4130(2018)01-0005-05 **文献标识码:** A

Metagenomic analysis of symbiotic microorganism in sailors with long sea voyage*

ZHENG Weiwei¹, DAI Shuyang¹, QIAO Yuanyuan¹, ZHANG Ze¹, ZHAO Xiaohang^{1,2,△}

(1. Research Center of Basic Medical Sciences, Navy General Hospital, Beijing 100048, China;

2. State Key Laboratory of Molecular Oncology, Cancer Hospital, Chinese
Academy of Medical Sciences, Beijing 100021, China)

Abstract: Objective To investigate the influence of long sea voyage working environment on the symbiotic microorganisms and their relationship with their hosts. **Methods** The periumbilical microbial samples from the operating workers of long sea voyage before and after operation were collected. Then 16S rRNA V4 section amplification, sequencing and whole metagenome shotgun high-throughput sequencing were performed. Moreover the bacterial community structure, kinds and microorganism metabolic function change were analyzed. The peripheral blood was collected from the workers of long sea voyage operation and shore-based operation for conducting the blood routine analysis. **Results** After 105 d ocean sailing, the diversity of periumbilical microbial community in the workers with long sea voyage operation decreased and the relative abundance of Firmicutes increased, while which of Proteobacteria decreased; which of Staphylococcus increased, while which of Corynebacteria decreased, the differences were statistically significant ($P < 0.05$), the relative abundance of pathogenic bacteria or conditional pathogenic bacteria, especially Staphylococcus epidermidis and Staphylococcus aureus, increased significantly. The functional gene analysis indicated that the expression of periumbilical microbial infection related genes increased after the long sea voyage operation. Compared with shore-based operation workers, the proportion of workers with peripheral blood lymphocytes abnormal elevation in the long sea voyage group increased significantly, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** The periumbilical skin symbiotic microorganisms may reflect the health conditions in the workers with long sea voyage operation.

Key words: long sea voyage; metagenomics; next generation sequencing; skin microbias

* 基金项目: 国家高技术发展“863”计划资助项目(2012AA020206); 国家自然科学基金资助项目(81372591, 91629105)。

作者简介: 郑巍巍, 女, 副主任医师, 主要从事疾病相关微生物研究。 △ 通信作者, E-mail: zhaoxh@cicams.ac.cn。

本文引用格式: 郑巍巍, 代淑阳, 乔媛媛, 等. 长远航海员皮肤共生微生物宏基因组分析[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(1): 5-9.

海上高温、高湿、船体颠簸,且淡水和蔬果摄入减少及特殊环境影响长远航海员的生理和心理健康^[1-2]。皮肤是人体抵御外界感染的重要屏障,皮肤表面存在大量的共生微生物群落,对维护皮肤健康和调节免疫功能具有重要作用^[3-4]。体表共生微生物与宿主间的平衡一旦被破坏,可能引发皮肤疾病,甚至全身性感染。基于分离培养和代谢产物特征的传统微生物鉴定方法通量有限,大部分微生物处于分析鉴定的检测盲区^[5]。基于二代高通量测序和生物信息学分析的宏基因组学技术可同时获得样本中包括不易培养、低丰度和无法分类的所有微生物的种类、群落结构和代谢潜能等信息^[6]。本研究对长远航海员脐周皮肤微生物样本进行共生微生物的宏基因组学分析,探讨海上作业对人体皮肤共生微生物的影响,以及微生物与宿主健康的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 在知情同意前提下,选取海上连续航行 105 d 的长远航作业人员 170 例作为研究对象,分别在起航前 1 d 与任务结束船舶靠岸当日采集外周静脉血 3 mL,用于血常规分析。从该人群中选取男性 14 例,年龄 21~41 岁,平均 27 岁,采集脐周微生物样本用于宏基因组测序分析。同时,选取性别、年龄匹配的岸基作业人员 200 例作为对照,采集外周血 3 mL,用于血常规分析。

1.2 仪器与试剂 高通量宏基因组测序平台采用 Illumina 公司提供的 HiSeq 测序仪和 Life Technology 公司提供的 Ion Torrent 测序仪;Thermo Fisher Scientifics 公司提供 Nanodrop 8000 微量紫外分光光度计和小型低温台式离心机;TECHNE 公司提供 TC-5000 聚合酶链反应(PCR)扩增仪;QIAGEN 公司提供基因组提取试剂盒和 PCR 产物纯化试剂盒。

1.3 方法

1.3.1 微生物样本采集 在洗澡前采集脐周皮肤微生物样本,即将拭子伸入脐内旋转 10 次左右,然后将拭子浸入采样液中,于-80℃保存用于宏基因组分析

1.3.2 微生物基因组提取 样本于冰上解冻后混匀,12 000 g 离心 5 min 后弃上清。用基因组提取试剂盒,按说明书提取微生物基因组 DNA,经紫外分光光度计定量后于-20℃保存备用。

1.3.3 微生物 16S rRNA V4 区段测序和数据分析 通过 Illumina HiSeq 高通量测序仪分析细菌 16S rRNA 序列。微生物基因组 DNA 经 515F/806R 引物扩增 16S rRNA V4 区段,每份样本的反向引物包含 6 bp 标签序列,以便区分不同样本。经混样、建库后用双末端测序法测序。用 FLASH 软件拼接原始测序结果,拼接后的序列用 QIIME 软件包和 UPARSE 软件进行数据分析。相似性大于 97% 的序列为同一操作分类单元。

1.3.4 细菌全宏基因组鸟枪法测序和数据分析 细

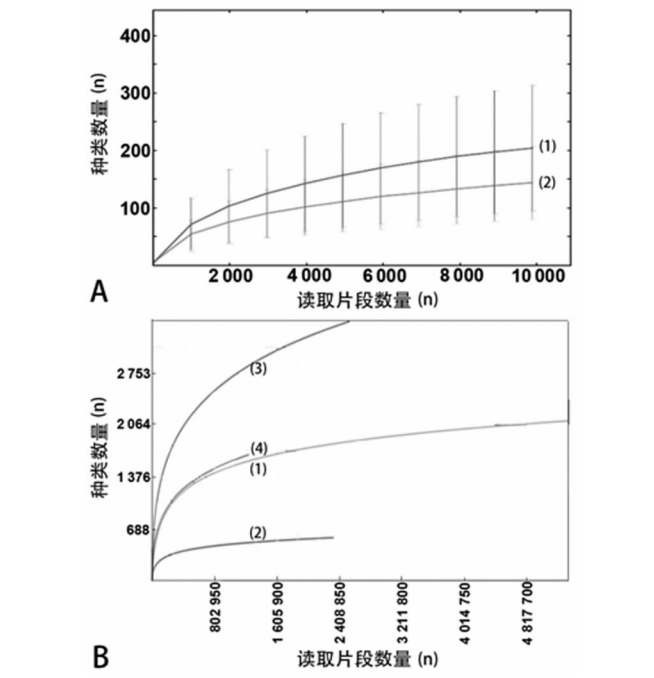
菌 DNA 构建文库,每个样本中插入序列长度约为 300 bp,分别于 Ion Torrent 和 Illumina Miseq 高通量测序平台上进行全基因组测序,测序结果用宏基因组亚系统技术快速注释软件(MG-RAST,版本 3.3)分析。初始数据经质控分析,去除宿主 DNA。采用最低相似度分析方法(LCA)进行物种分析并与美国国立生物技术信息中心(NCBI)数据库比对。分析阈值:e 值最大为 10^{-5} ,相似度最低为 80%,最短比对长度为 15 bp。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计学软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用秩和检验,定性资料组间率的比较采用 χ^2 检验; $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

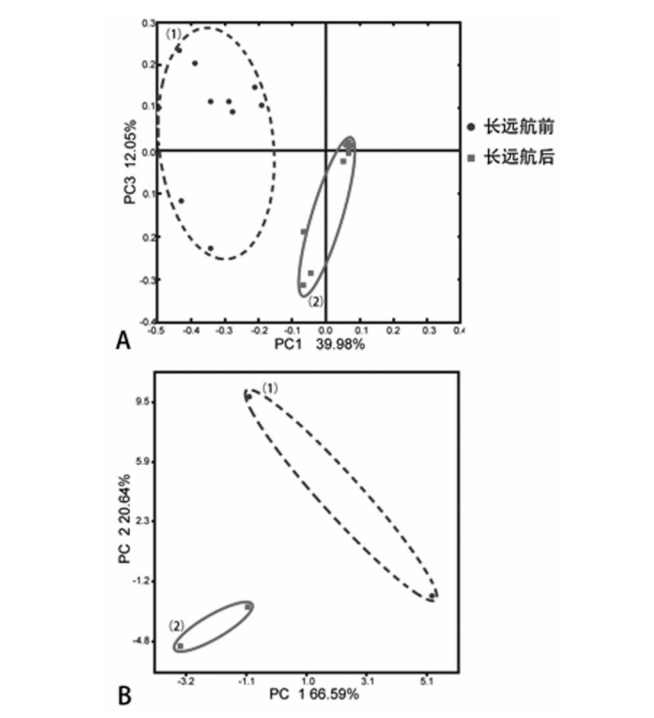
2.1 16S rRNA 和全宏基因组测序数据概述 应用 Illumina Hiseq 测序平台对 12 名长远航海员,长远航前后共 24 份脐周微生物样本进行 16S rRNA 测序分析,了解微生物样本中细菌群落的改变,获得脐周微生物群落结构组成。平均每个样本产生 53 617 个测序读段,其中 48 047 个测序读段通过质控,平均长度为 253 nt。用检测到的微生物种类数量绘制稀释曲线并评价测序样本内所有覆盖的微生物种类。结果显示脐周微生物样本测序均达到或接近平台期,测序深度基本覆盖了样品中所有的物种,见图 1A。其次,进一步对 2 名海员的长远航前后共 4 份脐周微生物样本进行全宏基因组测序,平均每个样本得到 3 840 082 个序列,其中 2 151 679 个序列通过了质控,平均长度为 134 bp。稀释曲线显示靠近横坐标右侧,曲线趋于平缓提示测序覆盖全部微生物种类,见图 1B。

2.2 长远航后个体间脐周微生物群落多样性减少 质控分析结果显示,16S rRNA 和全基因组测序数据质量高,在此基础上分析长远航前后脐周共生微生物群落的改变。使用称为“UniFrac 距离”的度量方法分析样品间序列的进化信息,比较样品在特定进化谱系中的微生物群落差异。其中,基于非加权 UniFrac 距离的主坐标分析(PCoA),即对多维数据降维后提取数据中最主要元素和结构,选取贡献率最大的主坐标组合作图,横、纵坐标分别为贡献最大的两个主成分,每个主成分对总体差异的贡献值以其后的百分比表示,分析长远航后不同个体脐周微生物的变化趋势。不同个体间脐周微生物群落结构构成越相似,它们在 PCoA 图中的距离就越近。长远航前样本中,不同个体的点散在分布于 PCoA 图中,提示不同个体脐周微生物菌群结构差异较大,而长航后样本分布范围缩小,见图 2A。全宏基因组测序结果也提示长远航后个体间的距离减小,见图 2B。值得注意的是,长远航前后的样本分部于坐标的不同区域,提示长远航后不仅个体间差异减小,脐周微生物群落整体结构也发生了改变。



注:图 1A 为长远航前后 24 个样本 16S rRNA 测序样本稀释曲线;图 1A 中(1)为长远航前样本;(2)为长远航后样本;图 1B 为长远航前后两个个体全宏基因组测序样本稀释曲线;图 1B 中(1)为一号志愿者在长远航前样本;(2)为一号志愿者在长远航后样本;(3)为二号志愿者在长远航前样本;(4)为二号志愿者在长远航后样本

图 1 长远航前后脐周微生物测序样本稀释曲线



注:A 为 16S rRNA 测序结果;B 为全基因组测序结果。(1)为长远航前样本集中区域,以虚线圆圈表示,其中的圆点代表长远航前样本;(2)为长远航后样本集中区域,以实线圆圈表示,其中的方块代表长远航后样本

图 2 长远航前后脐周微生物 PCoA 分析

2.3 长远航后脐周微生物种类变化 分析长远航前后脐周微生物 16S rRNA 测序结果,长远航前以变形菌门为主,占有所有细菌的 40.29%,平均为(40.29±

22.87)%;其次为硬壁菌门,占 32.47%,平均为(32.47±12.92)%;以及放线菌门,其比例为 23.19%,平均(23.19±19.41)%。长航后硬壁菌门比例升高,为所有细菌的 74.51%,平均为(74.51±25.11)%;而变形菌门比例降低,为所有细菌的 8.10%,平均为(8.10±15.86)%,差异具有统计学意义($P<0.05$)。进一步从菌属水平分析高丰度细菌在长远航前后比例变化,结果显示长远航前以葡萄球菌属和棒状杆菌属为主,其比例分别为 27.88%、平均为(27.88±7.48)%和 18.42%、平均为(18.42±5.56)%;长远航后葡萄球菌属比例升高至 65.82%,平均为(65.82±7.23)%,而棒状杆菌属比例下降到 0.71%,平均为(0.71±0.39)%,差异均有统计学意义($P<0.05$)。

全基因组测序可得到样本中更为准确的微生物种类信息,鉴定水平可精确到物种水平。全基因组测序结果显示长远航前后细菌均占脐周微生物总数的 99% 以上。以细菌为例,长远航后硬壁菌门占优势,由长远航前的 54.99% 升至 94.16%。在菌属水平与 16S rRNA 结果一致,长远航后比例上升最为显著的是葡萄球菌属,由 2.31% 升至 87.11%。在葡萄球菌属中比例最高的为表皮葡萄球菌,由 0.15% 升至 21.77%。值得注意的是致病菌金黄色葡萄球菌比例升高,由 0.04% 升至 0.68%。

2.4 长远航后与人类疾病相关的微生物基因比例升高 全基因组测序不仅能了解详细的微生物种类信息,还可提供样本中的微生物功能基因信息。进一步对脐周微生物组的基因进行功能注释和分类,计算不同类型的功能基因在所有功能基因中所占的比例。长远航前后约一半以上基因与代谢相关,长远航前比例为 55.12%,长远航后为 56.84%;其次是与环境相关基因,长远航前比例为 18.47%,长远航后为 17.02%;以及与遗传相关的基因,其长远航前比例为 20.62%,长远航后为 20.00%;与细胞活动相关的基因在长远航后比例下降,由 3.99% 下降至 1.49%;值得注意的是,与人类疾病相关的基因,在长远航后期比例显著增加,由 1.25% 增至 2.65%。其中,感染性疾病相关基因增加尤为明显,由 0.94% 增至 2.33%。提示随着海上航行时间延长,个体患传染性疾病的风险可能增加。

2.5 长远航作业人员外周血淋巴细胞比例检测 脐周皮肤微生物组的功能分类分析提示,长远航后与感染性疾病相关的基因比例增加。为了解共生微生物中疾病相关基因增加与宿主健康的关系,进一步检测了长航作业人员($n=170$)与岸基作业人员($n=200$)血常规。结果表明在淋巴细胞百分比这一检测项目,长远航海员中维持在正常区间(临床检验取 20%~40% 区间为正常范围)的船员所占的比例低于岸基作业人员,异常增高的船员比例则高于岸基作业人员,

差异具有统计学意义($P=0.002$),见表 1。提示长期海上作业者可能伴随一定的免疫功能失调。

表 1 长远航作业人员淋巴细胞比例比较[n(%)]				
工作人员	<i>n</i>	偏低	正常	偏高
岸基作业人员	200	5 (2.50)	155 (77.50)	40 (20.00)
长远航作业人员	170	2 (1.18)	107 (62.94)	61 (35.88)

3 讨 论

海上长期航行中,由于环境高温、高湿且作业工作强度大,以及海员缺乏身体锻炼、生物节律变化等原因,可能导致微生物多样性减少,致病菌或条件致病菌比例增加,微生物代谢活性降低,为人类提供营养物质减少。皮肤表面共生着包括细菌、真菌和病毒等大量微生物,它们参与宿主免疫调节、病原菌防御等生理功能。肚脐位置特殊,脐周皮肤不易被日常擦拭清洗,可最大程度反映皮肤微生物群落的天然状况。为了解海上长远航作业者皮肤共生微生物改变对皮肤生态,以及宿主免疫系统的影响,本研究结合 16S rRNA 和全基因组测序分析长远航海员脐周微生物群落结构与功能基因的改变,结果提示长远航前后脐周微生物的变化可能与人体免疫系统的调节相关。人体共生微生物群体很大程度上受周围环境的影响,海上作业环境与陆地存在显著差异。作业人员在海上航行过程中,接触的外界因素有限,不同个体仅受有限的外界环境因素影响,个体之间共生微生物多样性降低。研究者曾比较分析了长远航前后作业者口腔颊黏膜微生物宏基因组改变^[7]。发现长远航后作业者口腔颊黏膜微生物多样性显著降低,不同个体之间的差异减小。以硬壁菌门和链球菌属为主,长远航后二者的比例均进一步上升。在菌属比例,葡萄球菌属在长远航后比例显著增高,棒状杆菌属比例则显著下降。长远航后部分条件致病菌比例上升。微生物全基因组测序结果提示长远航后口腔颊黏膜样本中存在大量未分类细菌(69.46%)。测序结果经京都基因组百科全书通路和微生物功能基因注释分析提示,长远航后期微生物参与三大物质代谢和叶酸合成代谢的功能基因数量下降。进一步分析作业者血清叶酸水平,发现长远航后期血清叶酸水平下降,与微生物参与叶酸合成酶类数量下降趋势呈正相关。微生物种类分析发现长远航后期致病和条件致病微生物比例增高,而长远航后作业人员外周血粒细胞与淋巴细胞比值下降,平均血红蛋白浓度降低。长远航后期共生微生物叶酸合成活性和作业者血清叶酸水平降低,对作业者健康具有一定影响。采用作业者口服补充多种维生素和微量元素,以及增加靠港次数及时补充蔬果等措施后,可以有效恢复血清叶酸水平。本研究则探讨了人体体表共生微生物在长远航前后的变化。在长远航后期个体间皮肤微生物构成差异降低,

微生物构成改变,趋势与口腔颊黏膜微生物组在长远航后出现的趋势一致^[8-9]。此外,长远航期间人员也只在一个小群体中互相接触,起居饮食单一,因此个体间皮肤微生物可能也存在彼此趋同的趋势。进一步探讨微生物属水平的变化,发现在长远航前脐周微生物中葡萄球菌属和棒状杆菌属比例较高,这与相关文献报道一致^[10]。脐周部位相对较潮湿,适合葡萄球菌属和棒状杆菌属生长。长远航后葡萄球菌比例显著上升,而棒状杆菌比例下降。海上环境潮湿,但空气中含盐量较高,可能抑制棒状杆菌增殖。而葡萄球菌则对高盐环境有较高的耐受度,甚至可利用汗液中的尿素作为营养成分^[11],因此更能适应海上高湿高盐的环境而大量增殖。对全基因组测序样本的深入分析发现,在葡萄球菌属中表皮葡萄球菌的增长尤为明显。表皮葡萄球菌是重要的皮肤共生微生物,一方面它可通过大量定植于皮肤表面,抵御外来病原菌侵袭,另一方面它可通过激活 TLR2 通路诱导角质细胞分泌产生抗菌肽,其自身也可分泌酚溶解调控蛋白作为抗菌肽抵御其他病原菌的侵入^[12-13]。此外,表皮葡萄球菌可分泌丝蛋白酶 Esp,能抑制金黄色葡萄球菌生物膜生长,同时刺激人 β -防御素的抗菌效应^[14]。金黄色葡萄球菌是人类重要的病原菌,可引起皮肤感染、呼吸系统疾病和食物中毒^[15]。研究发现在过敏性皮炎患者未治疗部位,表皮葡萄球菌和金黄色葡萄球菌比例增高,提示葡萄球菌属的不同菌种间存在复杂的相互调控机制^[3]。长远航后期皮肤中葡萄球菌属比例显著增高,包括致病性金黄色葡萄球菌,提示脐周微生物组成改变,致病菌增加可引起作业人员易患皮肤疾病,这也与长远航海员通常皮肤疾病高发的观察一致。全宏基因组测序分析长远航前后脐周微生物功能基因比例改变,发现长远航后期与人类疾病相关的基因,尤其是感染性疾病相关的基因比例增高,这可能与病原菌如金黄色葡萄球菌比例增高有关或病原菌致病机能代谢活跃,提示长远航后期海员患感染性疾病的风险增加。

与岸基作业人员相比,长远航作业人员淋巴细胞百分比异常增高的人员比例显著高于岸基作业人员,提示长远航作业人员免疫系统平衡改变。共生微生物可参与调节免疫系统功能,表皮葡萄球菌可通过与 Toll 样受体结合而缓和炎症反应、促进伤口愈合^[16]。通过小鼠模型研究发现,皮肤共生菌能够与皮肤内的免疫系统相互作用,进而引起相应的免疫应答。表皮葡萄球菌移植于小鼠皮肤后,CD8⁺ T 细胞的数量增加,而 CD8⁺ T 细胞能生产化学信使白细胞介素 17A (IL-17A)^[17]。本研究发现表皮葡萄球菌与宿主淋巴细胞比例同时增高,推测在长远航状态下表皮葡萄球菌比例增高,可能刺激免疫系统产生并活化 CD8⁺ T 细胞,导致淋巴细胞总量增高。

皮肤共生微生物帮助人体抵御外来病原菌并参

与人体免疫系统调节,对人体健康发挥重要作用。本研究发现远航后脐周微生物中病原菌比例升高,微生物感染性基因比例升高;与岸基作业人员相比,远航作业人员的免疫系统平衡发生改变。提示远航离港前应针对由于某些致病菌或条件致病菌大量增殖,可能导致皮肤感染比例增加,需采取一定的预防措施;在作业期间,作业人员应调整膳食结构,合理安排作息时时间,适当参加体育锻炼,及时调整心理状态,提高机体免疫力。远海作业,机体共生微生物种类与比例信息或许可以作为反映作业者健康状况的窗口。

参考文献

- [1] OLDENBURG M, HARTH V, JENSEN HJ. Overview and prospect; food and nutrition of seafarers on merchant ships[J]. *Int Marit Health*, 2013, 64(4):191-194.
- [2] RYDSTEDT L W, LUNDH M. The relationship between psychosocial workload and mental strain among engine officers in the Swedish merchant fleet[J]. *Int Marit Health*, 2010, 62(3):168-175.
- [3] SANFORD J A, GALLO R L. Functions of the skin microbiota in health and disease[J]. *Semin Immunol*, 2013, 25(5):370-377.
- [4] NAIK S, BOULADOUX N, WILHELM C, et al. Compartmentalized control of skin immunity by resident commensals[J]. *Science*, 2012, 337(698):1115-1119.
- [5] GUINANE C M, COTTER PD. Role of the gut microbiota in health and chronic gastrointestinal disease: understanding a hidden metabolic organ[J]. *Therap Adv Gastroenterol*, 2013, 6(4):295-308.
- [6] 叶丹丹, 樊萌萌, 关琼, 等. 宏基因组研究的生物信息学平台现状[J]. *动物学研究*, 2012, 33(6):574-585.
- [7] ZHENG W, ZHANG Z, LIU C, et al. Metagenomic sequencing reveals altered metabolic pathways in the oral microbiota of sailors during a long sea voyage[J]. *Sci Rep*, 2015, 25(1):9131.
- [8] 张泽, 郑巍巍, 赵晓航. 远航作业人员口腔细菌 16S rRNA 测序[J]. *中国卫生检验杂志*, 2015, 6(11):1681-

- 1684.
- [9] 周典蓉, 张泽, 赵晓航. 应用二代测序方法研究远航作业人员口腔细菌变化[J]. *中国卫生检验杂志*, 2016, 22(10):1369-1372.
- [10] FINDLEY K, OH J, YANG J, et al. Topographic diversity of fungal and bacterial communities in human skin[J]. *Nature*, 2013, 498(7454):367-370.
- [11] GALLO R L, HOOPER L V. Epithelial antimicrobial defence of the skin and intestine[J]. *Nat Rev Immunol*, 2012, 12(7):503-516.
- [12] WANG Z, MACLEOD D T, DI NARDO A. Commensal bacteria lipoteichoic acid increases skin mast cell antimicrobial activity against vaccinia viruses[J]. *J Immunol*, 2012, 189(4):1551-1558.
- [13] COGEN A L, YAMASAKI K, SANCHEZ K M, et al. Selective antimicrobial action is provided by Phenol-Soluble modulins derived from staphylococcus epidermidis, a normal resident of the skin[J]. *J Invest Derm*, 2010, 130(1):192-200.
- [14] IWASE T, UEHARA Y, SHINJI H, et al. Staphylococcus epidermidis Esp inhibits Staphylococcus aureus biofilm formation and nasal colonization[J]. *Nature*, 2010, 465(7296):346-349.
- [15] LARSEN AR, STEGGER M, BOCHER S, et al. Emergence and characterization of community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections in Denmark, 1999 to 2006[J]. *J Clin Microbiol*, 2009, 47(1):73-78.
- [16] LAI Y, DI NARDO A, NAKATSUJI T, et al. Commensal bacteria regulate Toll-like receptor 3-dependent inflammation after skin injury[J]. *Nat Med*, 2009, 15(12):1377-1382.
- [17] NAIK S, BOULADOUX N, LINEHAN J L, et al. Commensal-dendritic-cell interaction specifies a unique protective skin immune signature[J]. *Nature*, 2015, 520(7545):104-108.

(收稿日期:2017-06-16 修回日期:2017-09-11)

(上接第 4 页)

- [8] HUANG Q, WANG G Y, FU W L, et al. High sensitive mutation analysis on KRAS gene using LNA/DNA chimeras as PCR amplification blockers of wild-type alleles[J]. *Mole Cellular Probes*, 2010, 24(6):376-380.
- [9] ZIEMKE E K, DOSCH J S, MAUST J D, et al. Sensitivity of KRAS-mutant colorectal cancers to combination therapy that cotargets MEK and CDK4/6[J]. *Clin Cancer Res*, 2016, 22(2):405-414.
- [10] OSTREM J M, PETERS U, SOS M L, et al. K-Ras (G12C) inhibitors allosterically control GTP affinity and effector interactions[J]. *Nature*, 2013, 503(7477):548-

- 551.
- [11] MAO M, TIAN F, MARIADASON J M, et al. Resistance to BRAF inhibition in BRAF-mutant colon cancer can be overcome with PI3K inhibition or demethylating agents[J]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19(3):657-667.
- [12] DIAZ L J, WILLIAMS R T, WU J, et al. The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers[J]. *Nature*, 2012, 486(7404):537-540.

(收稿日期:2017-06-24 修回日期:2017-09-26)