

• 论 著 •

# 不同 TERT 基因状态的肝细胞癌患者的临床特征及外泌体 mRNA 表达谱探索\*

郭 琴<sup>1,2</sup>, 周 娟<sup>1</sup>, 李 晋<sup>1</sup>, 白 玲<sup>1</sup>, 宋佳佳<sup>1</sup>, 陆小军<sup>1</sup>, 应斌武<sup>1△</sup>

(1. 四川大学华西医院实验医学科, 四川成都 610041; 2. 四川省资阳市第一人民医院检验科, 四川资阳 641300)

**摘 要:**目的 分析不同端粒酶逆转录酶(TERT)基因状态的肝细胞癌患者的临床特征及外泌体 mRNA 表达谱,探索不同 TERT 基因状态在原发性肝癌(简称肝癌)发生、发展过程中的潜在作用差异。方法 纳入 36 例行肝切除手术的初治肝癌患者,对患者术前外周血进行外泌体 mRNA 测序分析,检测手术切除的肿瘤组织 TERT 基因突变及其与乙型肝炎病毒(HBV)整合情况,并根据 TERT 基因状态将患者分为 TERT 启动子区(TERTp)突变组、HBV-TERTp 整合组、无 TERT 基因整合及突变组,比较 3 种 TERT 基因状态的临床特征、实验室检查及外泌体 mRNA 表达特征。结果 TERTp 整合与 TERTp 突变互斥,36 例患者中,HBV-TERTp 整合组 9 例(25.00%),TERTp 突变组 13 例(36.11%),无 TERT 基因整合及突变组 14 例(38.89%);HBV-TERTp 整合组与无 TERT 基因整合及突变组的临床特征及实验室结果相似,将这两组合并为非 TERTp 突变组,该组与 TERTp 突变组相比,TERTp 突变组患者年龄更大( $P=0.036$ ),甲胎蛋白(AFP)水平和阳性率更低( $P=0.044, 0.017$ ),中性粒细胞/淋巴细胞比值(NLR)更低( $P=0.025$ ),肿瘤最大径、维生素 K 缺乏或拮抗剂 II 诱导的蛋白(PIVKA-II)、血小板(PLT)、纤维蛋白原(Fib)水平更低。外泌体差异 mRNA 富集分析显示,TERTp 突变组与非 TERTp 突变组间的差异基因在线粒体相关的细胞组分、分子功能及生物过程明显富集。结论 TERTp 突变组与非 TERTp 突变组患者的临床特征存在显著差异,TERTp 突变组患者年龄更大,具有更温和的实验室特征;用 AFP 作为肿瘤筛检指标,可能会造成漏检;TERTp 突变可能通过增强线粒体代谢等方式获能以促进肿瘤增殖,抗氧化治疗可能是 TERTp 突变肝癌患者有效的治疗途径。

**关键词:**肝细胞癌; 端粒酶逆转录酶; 端粒酶逆转录酶启动子区突变; 乙型肝炎病毒

**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2020.23.006

**中图法分类号:**R735.7

**文章编号:**1673-4130(2020)23-2839-06

**文献标识码:**A

## The clinical characteristics and exosomal mRNA expression profile of hepatocellular carcinoma patients with different TERT gene status\*

GUO Qin<sup>1,2</sup>, ZHOU Juan<sup>1</sup>, LI Jin<sup>1</sup>, BAI Ling<sup>1</sup>, SONG Jiajia<sup>1</sup>, LU Xiaojun<sup>1</sup>, YING Binwu<sup>1△</sup>

(1. Department of Laboratory Medicine, West China Hospital of Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610041, China; 2. Department of Clinical Laboratory, the First People's Hospital of Ziyang, Ziyang, Sichuan 641300, China)

**Abstract: Objective** To analyze the clinical characteristics and exosomal mRNA expression profiles of hepatocellular carcinoma patients with different telomerase reverse transcriptase (TERT) gene status, and to explore the potential differences of TERT gene status in the development of primary liver cancer (referred to as liver cancer). **Methods** Thirty-six patients with primary liver cancer who underwent hepatectomy were enrolled. The peripheral blood of the patients was subjected to exosomal mRNA sequencing analysis to detect the mutation of TERT gene in surgically resected tumor tissue and the integration of hepatitis B virus (HBV). According to the TERT gene status, the patients were divided into TERT promoter region (TERTp) mutation group, HBV-TERTp integration group, no TERT gene integration and mutation group, and the clinical characteristics, laboratory examination and exosomal mRNA expression characteristics of the three TERT gene states were compared. **Results** TERTp integration and TERTp mutation were mutually exclusive. Among 36 patients, 9 patients (25.00%) were in the HBV-TERTp integration group, 13 patients (36.11%)

\* 基金项目:四川省成都市科技项目(2017-CY02-00018-GX)。

作者简介:郭琴,女,主管技师,主要从事临床分子诊断研究。△ 通信作者, E-mail:yingbinwu@scu.edu.cn。

本文引用格式:郭琴,周娟,李晋,等.不同 TERT 基因状态的肝细胞癌患者的临床特征及外泌体 mRNA 表达谱探索[J].国际检验医学杂志,2020,41(23):2839-2843.

were in the TERTp mutation group, and 14 patients (38.89%) were in the non-TERT gene integration and mutation group. The clinical characteristics and laboratory results of the HBV-TERTp integration group and the non-TERT gene integration and mutation group were similar. The two groups were combined into the non-TERTp mutation group. Compared with the TERTp mutation group, the patients in the TERTp mutation group were older ( $P=0.036$ ), alpha-fetoprotein (AFP) level and positive rate were lower ( $P=0.044$ ,  $0.017$ ), neutrophil/lymphocyte ratio (NLR) was lower ( $P=0.025$ ), maximum diameter of tumor, vitamin K deficiency or antagonist II-induced protein (PIVKA-II), platelets (PLT), and fibrinogen (Fib) levels were lower. Exosomal differential mRNA enrichment analysis showed that the differential genes between TERTp mutant group and non-TERTp mutant group were significantly enriched in mitochondrial-related cellular components, molecular functions and biological processes. **Conclusion** There are significant differences in clinical characteristics between TERTp mutation group and non-TERTp mutation group, patients in TERTp mutation group are older and have milder laboratory characteristics. Using AFP as a tumor screening index may cause missed detection. TERTp mutation may enhance tumor proliferation by enhancing mitochondrial metabolism, antioxidant therapy may be an effective treatment approach for patients with TERTp mutation liver cancer.

**Key words:** hepatocellular carcinoma; telomerase reverse transcriptase; TERTp mutation; hepatitis B virus

端粒酶逆转录酶(TERT)是端粒酶的催化组分,其经典功能是以端粒酶 RNA 组分(TERC)为模板,合成端粒 DNA,维持端粒稳定性,赋予细胞无限增殖的潜能。正常情况下,TERT 被抑制,伴随着细胞复制周期,端粒逐渐缩短,即发生衰老<sup>[1-3]</sup>;既往研究表明,肿瘤发生时,存在多种 TERT 再激活机制,如启动子突变、启动子甲基化、病毒整合、基因重排等<sup>[2]</sup>。在肝细胞癌(HCC)中,发生于 TERT 启动子区(TERTp)的突变和乙型肝炎病毒(HBV)DNA 整合已经被反复检测到,两者均可诱导 TERT 的再激活,并增加 TERT mRNA 的表达。TERTp 突变和 HBV-TERTp 整合被认为是 HCC 发展的驱动因素。然而两种基因改变方式对 HCC 致癌作用及临床特征的影响是否一致尚不明确。本文通过分析 TERT 基因状态与 HCC 患者临床特征、实验室检查及外泌体 mRNA 表达差异的关系,以期进一步了解不同 TERT 基因改变在 HCC 发生、发展中的作用。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 随机纳入 2019 年 6—12 月于四川大学华西医院肝胆外科初次就诊且进行肝切除术的 HCC 患者 36 例,其中男 31 例,女 5 例,平均年龄( $56.22 \pm 11.59$ )岁。采集患者术前外周血及手术肿瘤组织。纳入标准:初治原发性肝癌(简称肝癌),经病理证实为单纯 HCC,且无其他部位肿瘤者。排除标准:合并自身免疫性疾病、免疫缺陷疾病者;已知异体器官移植史和异体造血干细胞移植史者;1 个月内有输血史者;近期注射肝素等抗凝药物者;不能提供知情同意书或拒绝抽血者。本研究由四川大学华西医院临床试验和生物医学伦理委员会批准,所有研究对象均签署了知情同意书。

**1.2 肿瘤基因突变及 HBV 基因组测序** 采用 QIAamp DNA Mini Kit(德国凯杰)提取肿瘤新鲜组织 DNA,

采用 QIAamp DNA Mini Blood Kit(德国凯杰)提取白细胞 DNA,利用高通量测序技术,在 Gene+2000 平台(中国吉因加)上对肿瘤组织进行杂交捕获建库测序,纳入白细胞测序进行胚系变异过滤,同时对 HBV 基因组测序,分析肿瘤 TERT 基因突变及 HBV 基因整合情况。

**1.3 外泌体 mRNA 测序及差异分析** 采用 exoR-Neasy Maxi Kit(德国凯杰)分离外泌体并提取 RNA,使用 NEB Next Ultra II Directional RNA Library Prep Kit for MGI 建库试剂盒建库,在 Gene+2000 测序仪上测序。采用 edge R 软件进行不同 TERT 状态组间差异分析,以差异的显著性( $P$ -value) $<0.05$ ,差异倍数(Fold Change) $>2$  作为差异显著性标准,使用 DAVID 在线网站对差异基因进行基因本体(GO)及京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析。

**1.4 实验室指标测定** 采用罗氏 Cobas e601 电化学发光免疫分析仪及配套试剂检测甲胎蛋白(AFP)、癌胚抗原(CEA),采用富士 G1200 全自动免疫分析仪及配套试剂检测维生素 K 缺乏或拮抗剂 II 诱导的蛋白(PIVKA-II),采用希森美康 XN1000 全自动血液分析仪及配套试剂计数血小板(PLT)、中性粒细胞、淋巴细胞,并计算中性粒细胞/淋巴细胞比值(NLR),采用希森美康 CS5100 凝血分析仪及配套试剂检测纤维蛋白原(Fib),采用罗氏 Cobas8000 c702 全自动生化分析仪及配套试剂检测乳酸脱氢酶(LDH)水平。

**1.5 统计学处理** 采用 SPSS25.0 对数据进行分析。正态分布的计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,两组间比较用  $t$  检验,3 组间比较用单因素方差分析(one-way ANOVA);非正态分布的计量资料用  $M(P_{25}, P_{75})$  表示,组间比较用 Kruskal-Wallis 秩和检验;计数资料用频数、率表示,比较用 Fisher 确切概率法。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结 果

**2.1 TERT 基因状态与临床特征及实验室指标的相  
关性分析** 对 36 例肿瘤组织标本进行测序分析,根  
据 TERT 基因状态将 36 例患者分为 HBV-TERTp  
整合组(9 例)、TERTp 突变组(13 例)和无 TERT 基  
因整合及突变组(14 例)。各组临床资料及实验室检  
查结果见表 1。结果发现,在肿瘤最大径、有无微血管  
侵犯方面,HBV-TERTp 整合组与另两组比较差异有  
统计学意义( $P<0.05$ );年龄、性别构成、体质量指数、

肝硬化背景,以及 AFP、PIVKA-II、CEA、NLR、PLT、  
Fib、LDH 水平比较,HBV-TERTp 整合组与无 TERT  
基因整合及突变组差异无统计学意义( $P>0.05$ ),因此  
将 HBV-TERTp 整合组与无 TERT 基因整合及突变组  
合并为非 TERTp 突变组。分析发现:与非 TERTp 突  
变组比较,TERTp 突变组平均年龄更大,AFP 水平、  
AFP 阳性率、NLR 更低,差异均有统计学意义( $P<$   
 $0.05$ );而 TERTp 突变组肿瘤最大径更小,PIVKA-II、  
PLT、Fib 水平更低,但差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

表 1 不同 TERT 基因状态 HCC 患者的临床特征及实验室指标的比较

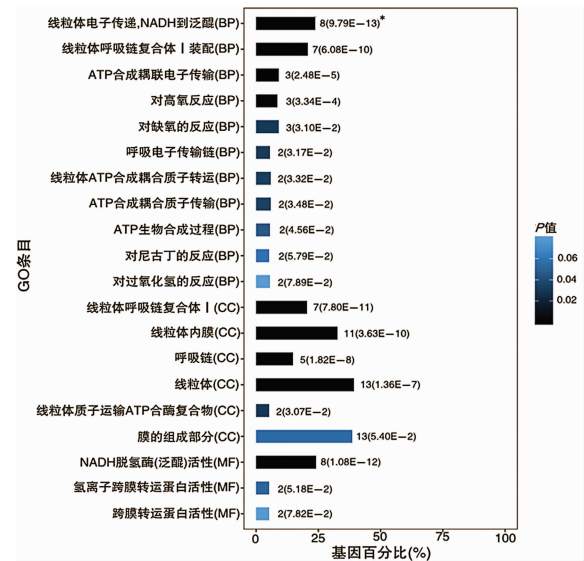
| 项目                                                                           | <i>n</i> | TERTp 突变组<br>( <i>n</i> =13) | HBV-TERTp<br>整合组( <i>n</i> =9) | 无 TERT 基因整合<br>及突变组( <i>n</i> =14) | 非 TERTp<br>突变组( <i>n</i> =23) | <i>P</i> <sub>组间</sub> | <i>P</i> |
|------------------------------------------------------------------------------|----------|------------------------------|--------------------------------|------------------------------------|-------------------------------|------------------------|----------|
| 年龄( $\bar{x}\pm s$ ,岁)                                                       | 36       | 61.54±11.47                  | 55.56±8.00                     | 51.71±12.25                        | 53.22±10.75                   | 0.084                  | 0.036    |
| 性别[ <i>n</i> (%)]                                                            |          |                              |                                |                                    |                               | 0.220                  | 0.089    |
| 女                                                                            | 5        | 0(0.00)                      | 2(22.22)                       | 3(21.43)                           | 5(21.74)                      |                        |          |
| 男                                                                            | 31       | 13(100.00)                   | 7(77.78)                       | 11(78.57)                          | 18(78.26)                     |                        |          |
| 体质量指数( $\bar{x}\pm s$ ,kg/m <sup>2</sup> )                                   | 36       | 25.35±3.90                   | 23.20±2.14                     | 23.82±5.33                         | 23.58±4.30                    | 0.462                  | 0.229    |
| 肿瘤最大径[ <i>M</i> ( <i>P</i> <sub>25</sub> , <i>P</i> <sub>75</sub> ),cm]      | 36       | 4.70(3.50,6.50)              | 5.50(2.65,10.55)               | 4.90(2.58,8.00)                    | 5.50(2.70,8.00)               | 0.915                  | 0.947    |
| 分化程度[ <i>n</i> (%)]                                                          |          |                              |                                |                                    |                               | 0.905                  | 0.448    |
| 低                                                                            | 13       | 4(30.77)                     | 3(33.33)                       | 6(42.86)                           | 9(39.13)                      |                        |          |
| 中                                                                            | 23       | 9(69.23)                     | 6(66.67)                       | 8(57.14)                           | 14(60.87)                     |                        |          |
| 微血管侵犯[ <i>n</i> (%)]                                                         |          |                              |                                |                                    |                               | 0.531                  | 0.633    |
| 是                                                                            | 11       | 4(30.77)                     | 4(44.44)                       | 3(21.43)                           | 7(30.43)                      |                        |          |
| 否                                                                            | 25       | 9(69.23)                     | 5(55.56)                       | 11(78.57)                          | 16(69.57)                     |                        |          |
| 肝硬化背景[ <i>n</i> (%)]                                                         |          |                              |                                |                                    |                               | 0.632                  | 0.319    |
| 是                                                                            | 15       | 9(69.23)                     | 5(55.56)                       | 7(50.00)                           | 12(52.17)                     |                        |          |
| 否                                                                            | 21       | 4(30.77)                     | 4(44.44)                       | 7(50.00)                           | 11(47.83)                     |                        |          |
| HBsAg[ <i>n</i> (%)]                                                         |          |                              |                                |                                    |                               | 0.589                  | 0.422    |
| 阳                                                                            | 28       | 9(69.23)                     | 7(77.78)                       | 12(85.71)                          | 19(82.61)                     |                        |          |
| 阴                                                                            | 8        | 4(30.77)                     | 2(22.22)                       | 2(14.29)                           | 4(17.39)                      |                        |          |
| AFP 阳性[ <i>n</i> (%)]                                                        |          |                              |                                |                                    |                               | 0.014                  | 0.017    |
| 是                                                                            | 21       | 4(30.77)                     | 5(55.56)                       | 12(85.71)                          | 17(73.91)                     |                        |          |
| 否                                                                            | 15       | 9(69.23)                     | 4(44.44)                       | 2(14.29)                           | 6(26.09)                      |                        |          |
| AFP[ <i>M</i> ( <i>P</i> <sub>25</sub> , <i>P</i> <sub>75</sub> ),ng/mL]     | 36       | 15.78(3.95,40.86)            | 127.80(3.54,249.00)            | 108.05(39.23,844.98)               | 121.00(16.46,272.00)          | 0.085                  | 0.044    |
| PIVKA-II[ <i>M</i> ( <i>P</i> <sub>25</sub> , <i>P</i> <sub>75</sub> ),AU/L] | 36       | 159.00(95.00,435.00)         | 2 906.00(100.00,19 868.50)     | 792.00(57.50,4 207.75)             | 1 155.00(59.00,6 361.00)      | 0.145                  | 0.084    |
| CEA[ <i>M</i> ( <i>P</i> <sub>25</sub> , <i>P</i> <sub>75</sub> ),ng/mL]     | 36       | 2.50(1.57,4.48)              | 1.75(1.12,3.17)                | 1.79(1.17,2.15)                    | 1.77(1.17,2.20)               | 0.149                  | 0.052    |
| NLR[ <i>M</i> ( <i>P</i> <sub>25</sub> , <i>P</i> <sub>75</sub> )]           | 36       | 1.67(1.47,2.14)              | 2.48(1.57,4.99)                | 2.39(1.85,2.74)                    | 2.45(1.62,3.97)               | 0.040                  | 0.025    |
| PLT( $\bar{x}\pm s$ ,×10 <sup>9</sup> /L)                                    | 36       | 134.69±58.04                 | 167.11±59.94                   | 157.5±62.75                        | 161.26±60.47                  | 0.427                  | 0.208    |
| Fib[ <i>M</i> ( <i>P</i> <sub>25</sub> , <i>P</i> <sub>75</sub> ),g/L]       | 36       | 2.35(2.26,3.18)              | 2.93(2.30,3.77)                | 2.60(2.30,3.42)                    | 2.62(2.34,3.60)               | 0.568                  | 0.315    |
| LDH[ <i>M</i> ( <i>P</i> <sub>25</sub> , <i>P</i> <sub>75</sub> ),IU/L]      | 36       | 163.00(142.50,204.50)        | 188.00(148.00,336.50)          | 173.00(159.25,196.75)              | 177.00(160.00,211.00)         | 0.610                  | 0.410    |

注:*P*<sub>组间</sub>为 HBV-TERTp 整合组、TERTp 突变组、无 TERT 基因整合及突变组 3 组间比较的 *P* 值;*P* 为 TERTp 突变组与非 TERTp 突变组  
间比较的 *P* 值。

**2.2 外泌体 mRNA 差异分析** 外泌体差异 mRNA  
富集分析显示:HBV-TERTp 整合组与无 TERT 基  
因整合及突变组间差异基因仅富集到核糖核蛋白复

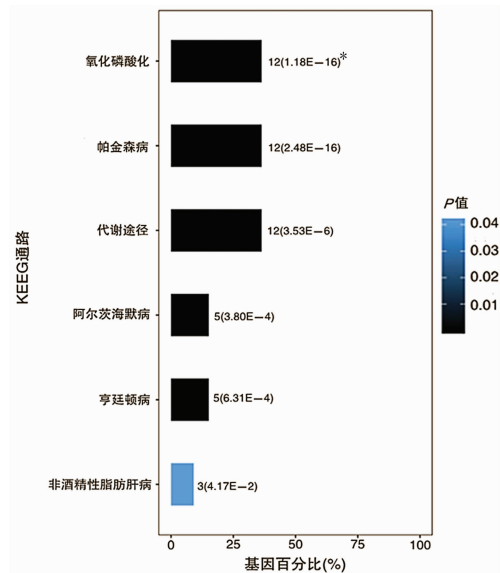
合体;HBV-TERTp 整合组与 TERTp 突变组间差异  
基因仅富集到神经肽信号通路;TERTp 突变组与无  
TERT 基因整合及突变组间、TERTp 突变组与非

TERTp 突变组间差异基因均明显富集到线粒体相关的生物过程(BP)、细胞组分(CC)及分子功能(MF),如氧化磷酸化、呼吸电子传输链、ATP 代谢过程、线粒体 ATP 合成耦合电子转运等,且 TERTp 突变组与非 TERTp 突变组间差异基因富集结果 *P* 值更小;TERTp 突变组与非 TERTp 突变组间差异基因的富集分析结果分别见图 1、图 2。



注: \* 为参与富集的差异基因数(*P* 值)。

图 1 TERTp 突变组与非 TERTp 突变组间外泌体差异基因 GO 富集分析



注: \* 为参与富集的差异基因数(*P* 值)。

图 2 TERTp 突变组与非 TERTp 突变组间外泌体差异基因 KEGG 富集分析

3 讨论

在全球,HCC 是常见恶性肿瘤,占癌症相关死因中的第四位<sup>[4]</sup>。HCC 已知的危险因素包括慢性肝炎病毒感染、酗酒、非酒精性肝病、黄曲霉素等<sup>[1,5]</sup>。多数 HCC 患者确诊时已处于中晚期,治疗选择有限,使得 HCC 的病死率与发病率之比高达 0.95<sup>[6]</sup>。对

HCC 发病机制的分子研究有助于早期诊断或探索更多的治疗方式。

本研究纳入 36 例初治并行肝切除术的 HCC 患者,通过对肿瘤组织进行肿瘤相关基因及 HBV 基因组的测序分析,鉴定出 HBV-TERTp 整合 9 例,TERTp 突变 13 例,无 TERT 基因整合及突变 14 例。TERTp 突变与 HBV-TERTp 整合具有排他性,且发生突变的患者年龄更大,这与其他报道一致<sup>[2,7-9]</sup>。

本研究发现,HBV-TERTp 整合组与无 TERT 基因整合及突变组间的临床特征及实验室结果更为相似,而 TERTp 突变组与前述两组多个指标比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),因此,将 HBV-TERTp 整合组与无 TERT 基因整合及突变组合并为非 TERTp 突变组进行分析,结果发现 TERTp 突变组患者 AFP 水平、AFP 阳性率、NLR 更低( $P < 0.05$ ),肿瘤最大径、PIVKA-II、PLT、Fib 水平也表现出更低的趋势。

以 AFP 大于 20 ng/mL 为阳性判断标准<sup>[10]</sup>,AFP 阳性率在不同 TERT 基因状态 HCC 患者中存在显著差异,TERTp 突变组 AFP 阳性率仅为 30.8%,明显低于非 TERTp 突变组(73.91%),这表明 AFP 作为启动子突变 HCC 患者的肿瘤筛查指标时,更容易漏检。AFP 不仅是肿瘤诊断标志物,亦被认为在肝癌发展过程中对血管生成和细胞侵袭起调节作用,AFP 可以通过 Fas/FasL, Caspase-3 和 PI3K/AKT 信号通路促进肝癌细胞的增殖并调节肝癌细胞的凋亡,沉默 AFP 基因可导致血管内皮生长因子(VEGF)、金属蛋白酶的表达式显著下调<sup>[11-12]</sup>,AFP 水平与不良预后相关<sup>[10]</sup>。PIVKA-II 又叫异常凝血酶原(DCP),其结构中包含两个环形结构域,该结构域与肝细胞生长因子相似,可通过激活 DCP-Met-JAK1-STAT3 信号通路刺激 HCC 生长<sup>[13-14]</sup>,PIVKA-II 还可诱导表皮生长因子受体(EGFR)和 VEGF 在人脐静脉内皮细胞(HUVEC)中的过表达,提高肝癌组织周围的成血管作用<sup>[15-16]</sup>。中性粒细胞能够参与肿瘤微环境的调节,增强肿瘤细胞的侵袭转移、血管生成及细胞外基质重塑;PLT 可以为中性粒细胞的募集提供趋化信号,并为肿瘤的扩散提供黏着位点,保护肿瘤细胞免受免疫攻击<sup>[17]</sup>,术前外周血 PLT 计数与 HCC 患者预后呈负相关<sup>[18]</sup>;Fib 可以转化为纤维蛋白,与 PLT、肿瘤细胞一起形成微血栓,并覆盖在肿瘤细胞外,以对抗宿主免疫监视<sup>[19]</sup>。TERTp 突变组与非 TERTp 突变组间的临床及实验室结果差异,预示 TERTp 突变 HCC 侵袭性更弱,也提示不同 TERT 状态 HCC 的致癌机制可能存在差异。

为进一步探究不同 TERT 基因改变在 HCC 发生、发展过程中的潜在作用差异,本课题组对患者外周血外泌体内的 mRNA 进行了测序分析。外泌体是最大径为 30~100 nm 的由胞吐作用释放到细胞外的

脂质双层囊泡,含有其起源细胞的各种分子,包括蛋白质和核酸等,可反映其来源细胞的分子特征,也可作为细胞间信息交流的载体<sup>[20]</sup>,外泌体已被证实广泛参与免疫抗原呈递、肿瘤的生长与迁移、组织损伤的修复等过程<sup>[21]</sup>。本研究外泌体 mRNA 表达谱发现, TERTp 突变组与非 TERTp 突变组间的差异基因主要富集到线粒体氧化磷酸化等生物过程,参与富集的基因在 TERTp 突变组上调,提示 TERTp 突变组 HCC 患者线粒体相关代谢活动增加。文献报道, TERT 也存在于线粒体内, TERT 能增加肿瘤细胞的适应能力,提高线粒体活性,并抵抗凋亡<sup>[3]</sup>,线粒体 TERT 可以通过结合线粒体 DNA 发挥保护功能,从而增加呼吸链活动并防止氧化应激引起的损害<sup>[22]</sup>。TERT 还可以通过增加还原型谷胱甘肽与氧化型谷胱甘肽的比例,将氧化的过氧化物酶还原成其非氧化形式,增强细胞抗氧化防御系统,减轻细胞水平,并赋予癌细胞逃避死亡刺激的能力<sup>[23]</sup>。因此,推测 TERTp 突变驱动肝癌发生可能是通过增强线粒体代谢等方式获能以促进肿瘤增殖,抗氧化治疗可能是 TERTp 突变肝癌患者有效的治疗途径,但具体机制尚不清楚,还需进一步研究。

#### 4 结 论

TERTp 突变与非 TERTp 突变患者的临床特征存在显著差异, TERTp 突变患者年龄更大,且具有更温和的实验室特征; TERTp 突变患者 AFP 阳性率低,采用 AFP 作为肿瘤筛检指标,可能会造成漏检; TERTp 突变可能通过增强线粒体代谢等方式获能以促进肿瘤增殖,抗氧化治疗可能是 TERTp 突变肝癌患者有效的治疗途径。

#### 参考文献

- [1] LORBEER F K, HOCKEMEYER D. TERT promoter mutations and telomeres during tumorigenesis[J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2020, 60: 56-62.
- [2] YUAN X T, LARSSON C, XU D W. Mechanisms underlying the activation of TERT transcription and telomerase activity in human cancer: old actors and new players[J]. *Oncogene*, 2019, 38(34): 6172-6183.
- [3] CHIOLDI I, MONDELLO C. Telomere-independent functions of telomerase in nuclei, cytoplasm, and mitochondria[J]. *Front Oncol*, 2012, 2: 133.
- [4] Global Burden of Disease Cancer Collaboration, FITZMAURICE C, ALLEN C, et al. Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life-years for 32 cancer groups, 1990 to 2015: a systematic analysis for the global burden of disease study[J]. *JAMA Oncol*, 2017, 3(4): 524-548.
- [5] YANG J D, HAINAUT P, GORES G J, et al. A global view of hepatocellular carcinoma: trends, risk, prevention

- and management[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2019, 16(10): 589-604.
- [6] TAROCCHI M, POLVANI S, MARRONCINI G, et al. Molecular mechanism of hepatitis B virus-induced hepatocarcinogenesis[J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(33): 11630-11640.
- [7] LI C L, LI C Y, LIN Y Y, et al. Androgen receptor enhances hepatic telomerase reverse transcriptase gene transcription after hepatitis B virus integration or point mutation in promoter region[J]. *Hepatology*, 2019, 69(2): 498-512.
- [8] TOTOKI Y, TATSUNO K, COVINGTON K R, et al. Trans-ancestry mutational landscape of hepatocellular carcinoma genomes[J]. *Nat Genet*, 2014, 46(12): 1267-1273.
- [9] CHEN Y L, JENG Y M, CHANG C N, et al. TERT promoter mutation in resectable hepatocellular carcinomas: a strong association with hepatitis C infection and absence of hepatitis B infection[J]. *Int J Surg*, 2014, 12(7): 659-665.
- [10] TREVISANI F, GARUTI F, NERI A. Alpha-fetoprotein for diagnosis, prognosis, and transplant selection[J]. *Semin Liver Dis*, 2019, 39(2): 163-177.
- [11] SAUZAY C, PETIT A, BOURGEOIS A M, et al. Alpha-fetoprotein (AFP): a multi-purpose marker in hepatocellular carcinoma[J]. *Clin Chim Acta*, 2016, 463: 39-44.
- [12] MENG W B, LI X, BAI Z T, et al. Silencing alpha-fetoprotein inhibits VEGF and MMP-2/9 production in human hepatocellular carcinoma cell[J]. *PLoS One*, 2014, 9(2): e90660.
- [13] FAJARDO-PUERTA A B, MATO PRADO M, FRAMP-TON A E, et al. Gene of the month: HGF[J]. *J Clin Pathol*, 2016, 69(7): 575-579.
- [14] ZHANG Y S, CHU J H, CUI S X, et al. Des-γ-carboxy prothrombin (DCP) as a potential autologous growth factor for the development of hepatocellular carcinoma[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2014, 34(3): 903-915.
- [15] WANG S B, CHENG Y N, CUI S X, et al. Des-gamma-carboxy prothrombin stimulates human vascular endothelial cell growth and migration[J]. *Clin Exp Metastasis*, 2009, 26(5): 469-477.
- [16] FUJIKAWA T, SHIRAHARA H, YAMAMOTO K. Significance of des-gamma-carboxy prothrombin production in hepatocellular carcinoma[J]. *Acta Med Okayama*, 2009, 63(6): 299-304.
- [17] KIM J, BAE J S. Tumor-associated macrophages and neutrophils in tumor microenvironment[J]. *Mediators Inflamm*, 2016, 2016: 6058147.
- [18] YAO Z, DONG Y, WU G Q, et al. Preoperative diagnosis and prediction of hepatocellular carcinoma: radiomics analysis based on multi-modal ultrasound images[J]. *BMC Cancer*, 2018, 18(1): 1089.
- [19] SIMANEK R, VORMITTAG R, AY C, et al. High platelet count associated with venous throm-(下转第 2847 页)

并未找到合理且完善的相关指标标准,用以筛查 CEA 数据,仅仅筛除了一年内进行多次检测的数据,后通过 *IQR* 剔除了离群值后,得到的 CEA 参考范围相对直接法的行业标准仍有一定差异。CEA 参考范围表现出了男女之间的差异,这一点与其他报道相同<sup>[15-17]</sup>。

#### 4 结 论

本文证明了间接法建立参考区间具有一定的可行性,可以为那些罕见人群及罕见标本的参考区间研究提供一种可靠的方法,同时也有利于实验室定期评审现有的参考区间,以提高临床工作中检验质量。但间接法仍然存在许多局限性,可能只能对参考区间作出粗略的估计,且过程中如何剔除数据中大量存在的错误值是重点同时也是操作的难点。完善间接法建立参考区间的方法步骤仍需进一步的研究。

#### 参考文献

[1] HORN P S, PESCE A J. Reference intervals: an update [J]. Clin Chim Acta, 2003, 334(1/2): 5-23.

[2] 沈隽霏, 宋斌斌, 潘柏申. 间接法建立生物参考区间[J]. 检验医学, 2015, 30(4): 391-396.

[3] GARY L, HOROWITZ S A, JAMES C, et al. Defining, establishing, and verifying reference intervals in the clinical laboratory; approved guideline-third edition [M]. USA: CLSI and IFCC, 2010: 12-20.

[4] FRASER C G, HYLTOFT PETERSON P, LARSEN M L. Setting analytical goals for random analytical error in specific clinical monitoring situations [J]. Clin Chem, 1990, 36(9): 1625-1628.

[5] FARRELL C L, NGUYEN L. Indirect reference intervals: harnessing the power of stored laboratory data[J]. Clin Biochem Rev, 2019, 40(2): 99-111.

[6] KALLNER A. Bayes' theorem, the ROC diagram and reference values: definition and use in clinical diagnosis[J].

Biochem Med(Zagreb), 2018, 28(1): 010101.

[7] JONES G R D, HAECKEL R, LOH T P, et al. Indirect methods for reference interval determination-review and recommendations[J]. Clin Chem Lab Med, 2018, 57(1): 20-29.

[8] 陈政君, 沈隽霏, 宋斌斌, 等. 评价间接法在癌抗 CA72-4 生物参考区间建立的应用价值[J]. 中华检验医学杂志, 2014, 37(5): 368-370.

[9] 吴文浩, 沈隽霏, 吴炯, 等. 间接法建立上海地区常规肝肾功能生化检验项目参考区间[J]. 中华检验医学杂志, 2016, 39(12): 906-910.

[10] 郭玮, 宋斌斌, 沈隽霏, 等. 基于实验室数据信息库建立丙氨酸转氨酶生物参考区间[J]. 中华医学杂志, 2015, 95(32): 2599-2602.

[11] 赵瀛, 沈隽霏, 吴文浩, 等. LMS 方法评估女性中糖类抗原 125 参考区间的年龄适用性[J]. 中国临床医学, 2017, 24(6): 954-957.

[12] GROSSI E, COLOMBO R, CAVUTO S, et al. The RE-ALAB project: a new method for the formulation of reference intervals based on current data [J]. Clin Chem, 2005, 51(7): 1232-1240.

[13] 国家卫生健康委员会. 常用血清肿瘤标志物检测的临床应用和质量管理: WS/T 459—2018[S]. 北京: 中国标准出版社, 2018: 1-17.

[14] 张婵. 结肠癌患者癌痛与癌胚抗原的相关性研究[J]. 山西医药杂志, 2018, 47(4): 444-445.

[15] 吕园, 俞杨, 瞿卫, 等. 南京及周边地区体检人群 AFP 和 CEA 参考范围的建立[J]. 中国实验诊断学, 2016, 20(11): 1849-1852.

[16] 夏长胜, 樊春红, 杨铁生, 等. 正常人群血清甲胎蛋白和癌胚抗原参考范围的建立[J]. 中国实验诊断学, 2013, 17(8): 1417-1421.

[17] 房格. 应用间接法验证和建立血清肺癌肿瘤标志物的生物参考区间[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2019.

(收稿日期: 2020-04-25 修回日期: 2020-10-10)

(上接第 2843 页)

boembolism in cancer patients: results from the Vienna Cancer and Thrombosis Study (CATS) [J]. J Thromb Haemost, 2010, 8(1): 114-120.

[20] KALLURI R, LEBLEU V S. The biology function and biomedical applications of exosomes [J]. Science, 2020, 367(6478): eaau6977.

[21] LOGOZZI M, MIZZONI D, DI RAIMO R, et al. Exosomes: a source for new and old biomarkers in cancer [J]. Cancers (Basel), 2020, 12(9): 2566.

[22] HAENDELER J, DRÖSE S, BÜCHNER N, et al. Mito-

chondrial telomerase reverse transcriptase binds to and protects mitochondrial DNA and function from damage [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009, 29(6): 929-935.

[23] INDRAN I R, HANDE M P, PERVAIZ S. HTERT over-expression alleviates intracellular ROS production, improves mitochondrial function, and inhibits ROS-mediated apoptosis in cancer cells [J]. Cancer Res, 2011, 71(1): 266-276.

(收稿日期: 2020-04-02 修回日期: 2020-10-13)