

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.07.017

网络首发 http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.r.20190327.1054.041.html(2019-03-28)

## 原发性胆汁性肝硬化患者外周血长链非编码 RNA 差异表达分析\*

向国艳<sup>1</sup>, 樊佳<sup>2</sup>, 叶震璇<sup>3</sup>, 付雪<sup>3</sup>, 李红梅<sup>3</sup>, 张华<sup>3,4,△</sup>

(1. 贵州医科大学临检教研室, 贵阳 550004; 2. 西南医科大学附属医院中医医院检验科, 四川泸州 646000; 3. 贵州医科大学医学检验学院, 贵阳 550004; 4. 贵州省人民医院检验科, 贵阳 550002)

**[摘要]** **目的** 探讨原发性胆汁性肝硬化(PBC)患者外周血单个核细胞(PBMC)中差异表达的长链非编码 RNA(lncRNA)在 PBC 发病中的作用。**方法** 利用 Illumina 高通量测序技术检测 5 例健康人和 5 例 PBC 患者外周血 PBMC 中 lncRNA 与 mRNA 的表达水平, 筛选差异表达的 lncRNA 与 mRNA。对差异表达的 mRNA 进行基因本体(GO)功能分析、信号转导通路富集分析(KEGG 分析)及蛋白互作网络分析, 寻找与 PBC 相关的 mRNA。靶基因 Cis-和 Trans-分析预测 lncRNA 和 mRNA 的关系, 寻找与 PBC 相关的 lncRNA, 并通过实时荧光定量 PCR 进行验证(采用 25 例健康人和 25 例 PBC 患者)。**结果** 共检测到差异表达的 mRNA 5 143 个(2 318 个上调和 2 825 个下调), 差异表达的 lncRNA 716 个(367 个上调和 349 个下调)。GO 与 KEGG 分析发现, 差异表达的 mRNA 与炎症、免疫活性、代谢及 TCR 信号通路、核因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)信号通路、趋化因子信号通路等相关。其中早期生长反应因子 1(EGR1)参与了炎症、免疫细胞活化、TCR 信号通路等, 可能与 PBC 的发生相关。Cis-分析发现 lncRNA NONHSAT250451.1 对 EGR1 具有靶向调控作用, 其可能参与 PBC 的发生。实时荧光定量 PCR 结果显示 lncRNA NONHSAT250451.1 与 EGR1 在 PBC 患者 PBMC 中的表达水平较对照组分别高出 7.26、3.91 倍( $P < 0.05$ ), 与测序结果一致。**结论** lncRNA NONHSAT250451.1 可能参与 PBC 的发生。

**[关键词]** 肝硬化, 胆汁性; 长链非编码 RNA; 微 RNAs**[中图分类号]** R446.6**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2019)07-1149-06

## Differential expression analysis of long non-coding RNA in peripheral blood of patients with primary biliary cirrhosis\*

XIANG Guoyan<sup>1</sup>, FAN Jia<sup>2</sup>, YE Zhenxua<sup>3</sup>, FU Xue<sup>3</sup>, LI Hongmei<sup>3</sup>, ZHANG Hua<sup>3,4,△</sup>

(1. Teaching and Researching Section of Clinical Laboratory, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550004, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Chinese Medicine Hospital, the Affiliated Hospital of Southwestern Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China; 3. School of Clinical Laboratory Science, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550004, China; 4. Department of Clinical Laboratory, Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang, Guizhou 550002, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the role of long non-coding RNA (lncRNA) differentially expressed in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in the pathogenesis of primary biliary cirrhosis (PBC). **Methods** Illumina high-throughput sequencing technology was adopted to detect the relative expression levels of lncRNA and mRNA in peripheral PBMC of 5 cases of PBC patients and 5 healthy subjects, then dysregulated lncRNA and mRNA were screened. Gene ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway and protein interaction network analysis were performed to searching for the dysregulated mRNAs which related to the pathogenesis of PBC. The relationship between lncRNA and mRNA was predicted through the Cis-analysis and Trans-analysis, and searching for lncRNAs related to the pathogenesis of PBC. Finally, certain dysregulated lncRNAs and mRNAs were verified by quantitative real-time PCR (25 healthy subjects and 25 PBC patients were enrolled). **Results** A total of 5 143 dysregulated mRNAs (2 318 up-regulated and 2 825 down-regulated) and 716 dysregulated lncRNAs (367 up-regulated and 349 down-regulated) were found in PBC compared to healthy controls. GO and KEGG pathway analysis indicated that dysregulated mRNA was associated with inflammation, immune activity, metabolism and T cell receptor (TCR)

signaling pathway, nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) signaling pathway and chemokine signaling pathway, et al. The early growth response factor 1 (EGR1) was involved in inflammation, immune cell activation, TCR signaling pathway, et al, which may be involved in the pathogenesis of PBC. Cis-analysis found that lncRNA NONHSAT250451.1 had a targeted regulation of EGR1, which may be involved in the pathogenesis of PBC. The results of real-time PCR showed that the expression levels of lncRNA NONHSAT250451.1 and EGT1 in PBMC of PBC patients were 7.26 and 3.91 times higher than those of the control group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The lncRNA NONHSAT250451.1 may be involved in the pathogenesis of PBC.

**[Key words]** liver cirrhosis, biliary; long non-coding RNA; microRNAs

原发性胆汁性肝硬化(primary biliary cirrhosis, PBC)是一种渐进性发展的慢性自身免疫性肝脏疾病,以肝脏汇管区淋巴细胞浸润、胆管上皮细胞特异性损伤及血清中出现高滴度抗线粒体抗体为特征<sup>[1]</sup>。好发于中年女性,起病隐匿且病程长。其病因尚不完全清楚,可能与遗传易感性及环境等因素有关。熊去氧胆酸(ursodeoxy-cholic acid, UDCA)是目前唯一被美国肝病学会(AASLD)、食品药品监督管理局(FDA)批准的用于治疗PBC的有效药物<sup>[2]</sup>,但仍有患者治疗效果欠佳,最终需要肝脏移植。

长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)是指一类核苷酸超过200个碱基、不编码蛋白质的功能性非编码RNA分子<sup>[3]</sup>。研究表明,lncRNA可通过表观遗传修饰与转录调控、转录后加工、翻译调控等多种机制,在细胞生命活动中发挥重要作用。其功能失调时与肿瘤、系统性红斑狼疮(SLE)和类风湿等<sup>[4-6]</sup>疾病的发生、发展都有着密切的关系。近年来关于lncRNA的研究发展迅猛,但也只是冰山一角,绝大部分lncRNA的功能仍然未知。lncRNA关于PBC的研究则更是鲜有报道,现有的研究也是采用基因芯片的方法<sup>[7]</sup>。而基因芯片的假阳性率很高,也不能发现新的转录本。因此,本研究采用Illumina高通量测序技术,检测并分析PBC患者和健康对照外周血单个核细胞中lncRNA的表达差异,为PBC的研究提供新的方向。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 收集2017年8—12月就诊于贵州省人民医院的PBC患者30例(PBC组),男2例、女28例,平均年龄(50.20±10.94)岁。另选取同期于贵州省人民医院健康体检中心受检的30例健康者(对照组),男2例、女28例,平均年龄(54.00±11.64)岁。两组间年龄与性别分布比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。本研究经医院伦理委员会审查通过(2017109),且所有患者均知情同意。纳入标准:参照2009年AASLD推荐的诊断标准<sup>[2]</sup>。排除标准:系统性疾病引起的肝脏病变、自身免疫性疾病、药物和胆道梗阻等引起的肝脏病变等。

**1.2 材料与试剂** 反转录试剂盒及SYBR Green II试剂盒购自大连TaKaRa公司;PCR引物由上海生工生物工程有限公司合成;QUBIT RNA ASSAY KIT

购自美国Invitrogen公司;Ribo-Zero<sup>TM</sup> Magnetic Kit(Epicentre)购自美国NEB公司;RNA 6000 Pico chip购自美国Agilent公司;lncRNA测序、图像采集、数据分析等由北京博奥晶典生物技术有限公司完成。

## 1.3 方法

**1.3.1 PBMC的收集** 采集PBC患者与对照组外周静脉血3~5 mL,3 500 r/min离心10 min,收集血浆于-80℃冻存备用。通过Ficoll分离法分离PBMC,并加1 mL Trizol冻存在-80℃备用。

**1.3.2 总RNA的提取、RNA文库建立及测序** Trizol法提取总RNA,QUBIT RNA ASSAY KIT对起始的总RNA进行准确定量,Ribo-Zero<sup>TM</sup> Magnetic Kit(Epicentre)对总RNA中rRNA进行分离去除, RNA 6000 Pico chip对去除rRNA的总RNA进行质控,构建好去除rRNA的质控转录组测序文库后上机进行RNA-seq。

**1.3.3 测序结果的处理和分析** 采用NGSQC软件对原始数据进行过滤和统计。Cuffquan和Cuffnorm软件进行表达水平分析,geometric方法对基因的表达进行标准化。差异RNA的筛选标准: $|\log_2^{FC}| \geq 1$ 且 $P < 0.05$ ,即PBC组比对照组表达变化在2倍以上且 $P < 0.05$ 。对筛选出的差异RNA做层次聚类分析。基因本体(GO)功能分析与信号转导通路富集分析(KEGG分析)对差异表达mRNA的功能属性及生物学途径进行富集分析,显著富集是指 $P < 0.05$ 。根据差异表达基因、GO分析及KEGG分析的结果进行蛋白互作分析。经靶基因Cis-分析和Trans-分析预测可能与PBC相关的lncRNA。

**1.3.4 实时荧光定量PCR验证差异RNA的表达水平** 选取PBC患者与健康对照各30例,经RNA/DNA/蛋白共提取试剂盒严格按照试剂说明书提取PBMC中的RNA,并用nondrop检测RNA的浓度和纯度。根据GeneBank设计引物,序列见表1。采用SYBR Green染料,通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析目的基因的表达水平。每个样品做3个复孔,扩增条件:95℃ 30 s, 95℃ 5 s, 60℃ 34 s, 40个循环。

**1.4 统计学处理** 采用SPSS20.0统计软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,方差齐采用两独立样本 $t$ 检验,若方差不齐采用 $t'$ 检验;计数资料采用百分率表示。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表 1 lncRNA NONHSAT250451.1、EGR1 和 GAPDH 引物

目的基因	引物	产物长度(bp)
lncRNA NONHSAT250451.1	正向:5'-CACTGAGCCAAGGTATCGG-3'	132
	反向:5'-CGTTAGGTGAGCTGCACAGG-3'	
EGR1	正向:5'-ACAGTGGCAACACCTTGTGG-3'	172
	反向:5'-GGACTGCTGTCGTTGGATGG-3'	
GAPDH	正向:5'-CAGGAGGCATTGCTGATGAT-3'	138
	反向:5'-GAAGGCTGGGGCTCATT-3'	

EGR1:早期生长反应因子 1;GAPDH:3-磷酸甘油醛脱氢酶

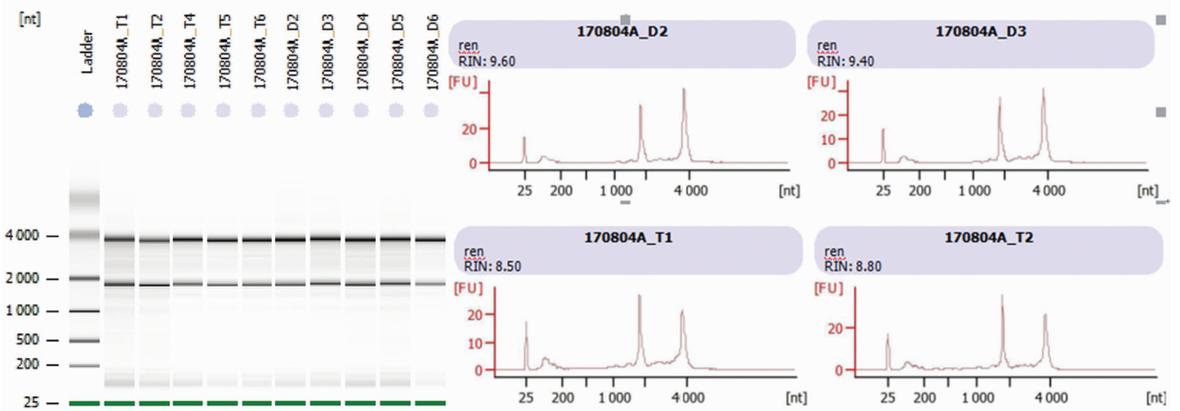
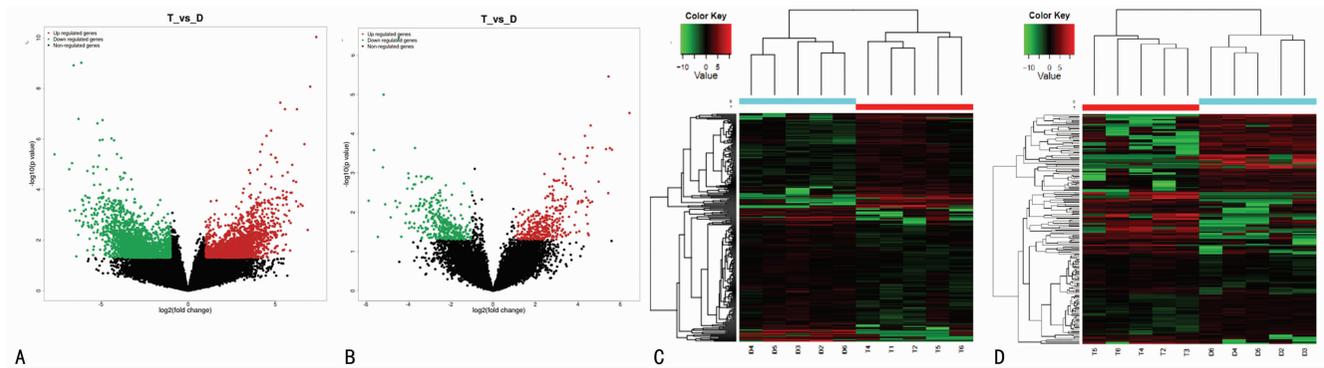


图 1 总 RNA 质检结果图



A、B:分别为差异表达 mRNA 与 lncRNA 的火山图;C、D:分别为差异表达 mRNA 与 lncRNA 的聚类分析图;红色:上调;绿色:下调;黑色:无差异

图 2 差异表达 RNA 的火山图与聚类分析图

## 2 结果

**2.1 总 RNA 质检结果** 用于转录组测序的 10 个 RNA 样品, RNA 总量大于或等于 5  $\mu$ g, 260 nm 与 280 nm 处吸光度比值( $A_{260/280}$ ) 在 1.8~2.1 范围内。甲醛变性胶和 Agilent 2100 电泳检测结果显示, 电泳条带清晰, rRNA 比值(28 s/18 s)  $\geq 1.5 : 1.0$ ; RIN  $\geq 7$ 。受检的所有 RNA 样品基本符合 Illumina RNA-Seq 样品建库的实验要求, 对照组以 D2 和 D3 为例, 实验组以 T1 和 T2 为例, 见图 1。

**2.2 差异表达 RNA 聚类分析** 根据筛选标准 ( $|\log_2 FC| \geq 1$  且  $P < 0.05$ ), 差异的 mRNA 共 5 143 个(2 318 个上调和 2 825 个下调), 差异的 lncRNA 共 716 个(367 个上调和 349 个下调)。差异表达 RNA 的火山图与聚类分析图, 见图 2。

**2.3 GO 功能分析** 差异基因在 GO 功能分析: 其中 Biological Process 富集到 3 213 个 term、Cell Component 富集到 230 个 term, 以及 Molecular Function 富集到 354 个 term。共富集到的 3 797 个 term 中多数与炎症、免疫活性及代谢等功能有关。差异基因和背景基因在 GO 功能分析的每个二级条目上的分布情况, 见图 3。

**2.4 KEGG 分析** 共显著富集到 33 个 term, 在 organismal system 中富集到与免疫系统相关信号通路有 TCR 信号通路、趋化因子信号通路等。在 Environmental Information Processing 中富集到了与免疫相关的信号通路有核因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 信号通路、丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 信号通路、Jak-STAT 信号通路、肿瘤坏死因子 (TNF) 信号通路等, 见图 4。

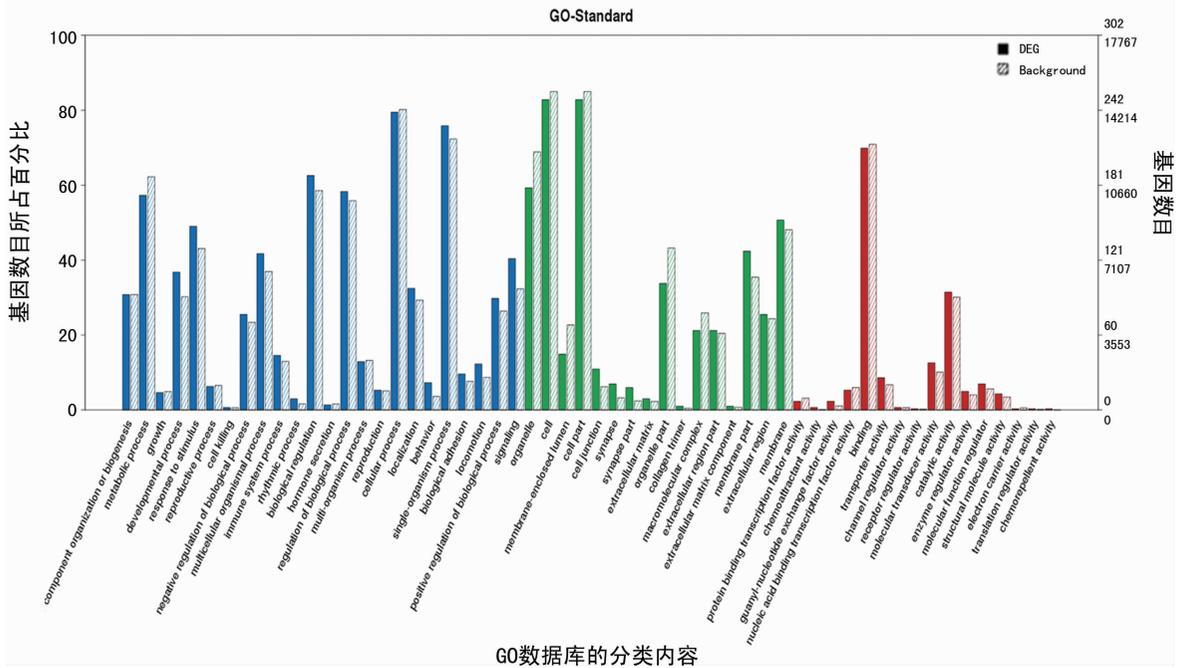


图 3 GO 二级频率图

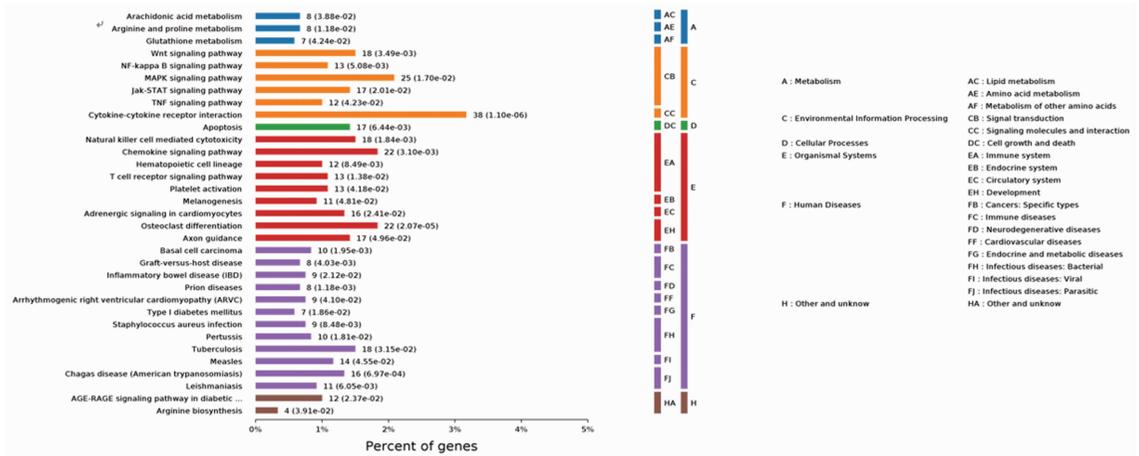
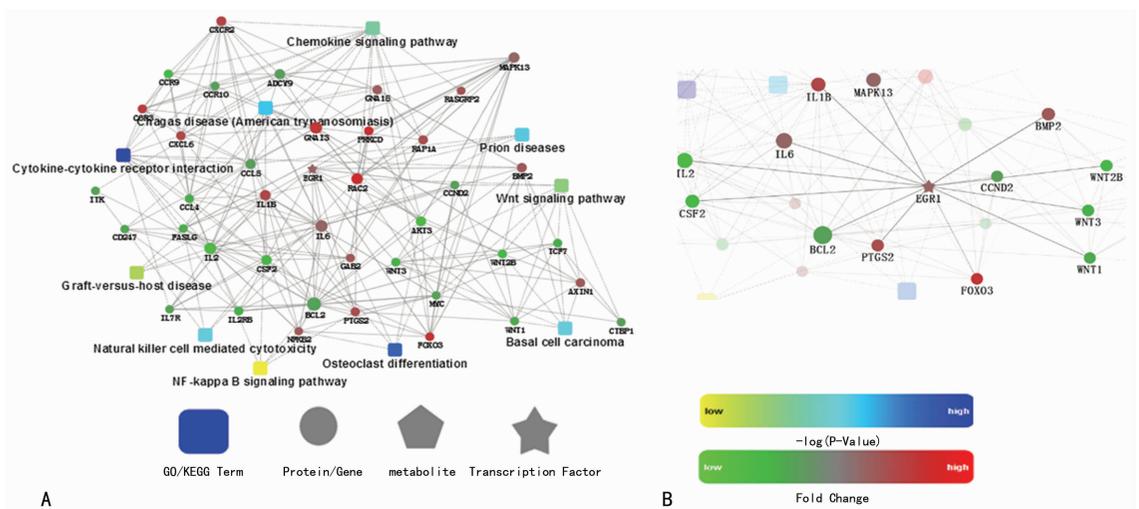


图 4 差异基因 KEGG 通路分类示意图



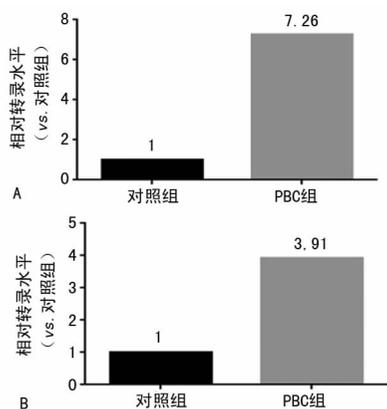
A: 差异表达的蛋白互作网络总图; B: EGR1 及其相关调控基因互作网络图

图 5 蛋白互作网络图

2.5 蛋白互作分析与靶基因预测 蛋白互作分析发现早期生长反应因子 1(EGR1)是差异 mRNA 中唯一

的转录因子,且与白细胞介素(IL)-1 $\beta$ 、IL-6、IL-2 等炎症因子及 MAPK13、叉头蛋白 3(FOXO3)等相互作用,见图 5。另外,靶基因 Cis-分析预测到 lncRNA NONHSAT250451.1 对 EGR1 具有靶向调控作用。

**2.6 lncRNA NONHSAT250451.1 与 EGR1 表达情况** PBC 组患者 PBMC 中 lncRNA NONHSAT250451.1 与 EGR1 表达分别为对照组的 7.26、3.91 倍,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),见图 6。



A:lncRNA NONHSAT250451.1; B:EGR1

图 6 lncRNA 和 EGR1 的相对表达情况

### 3 讨论

PBC 是一种以免疫介导的肝内小胆管渐进性破坏、慢性胆汁淤积为特征的肝脏疾病<sup>[1]</sup>。2015 年被更名为原发性胆汁性胆管炎,这更准确地反映了绝大多数患者的疾病自然史<sup>[8]</sup>。目前 PBC 的发病机制尚不完全清楚,较为公认的假说是在遗传及环境等因素相互作用下,机体免疫耐受屏障破坏而引发 PBC。可见 PBC 具体发病机制有待于继续探索。

lncRNA 是指一类核苷酸超过 200 个碱基、不编码蛋白质的功能性非编码 RNA 分子。研究发现异常表达的 lncRNA 参与了多种疾病的发生,如 PCA3 是一个前列腺癌特异表达的 lncRNA,在前列腺癌患者尿液中异常升高,已经用于临床前列腺癌诊断<sup>[4]</sup>。lncRNA GAS5、linc0597 和 lnc-DC 等在 SLE 患者血浆中高表达,有望成为 SLE 新的诊断标志物<sup>[5]</sup>。可见,疾病中差异表达的 lncRNA 有可能成为疾病的诊断标志物和潜在的药物治疗靶点。本研究通过高通量测序技术,筛选 PBC 患者外周血 PBMC 中差异表达的 lncRNA,寻找可能与 PBC 发病相关且特异的 lncRNA。

研究显示,共富集到差异表达的 lncRNA 716 个,差异表达的 mRNA 5 143 个。GO 功能分析与 KEGG 分析发现,显著差异表达的 mRNA 与炎症、免疫活性、代谢等功能及多种免疫信号通路相关(如 TCR、NF- $\kappa$ B 和 Jak-STAT 等信号通路)。免疫细胞及免疫相关信号通路(如 TCR 信号通路)的异常激活都可能是参与 PBC 发病的原因之一<sup>[9]</sup>。其中,差异表

达基因 EGR1 与免疫细胞增殖、分化有关,其激活与否受 TCR 信号通路的影响<sup>[10]</sup>。因此笔者猜想 EGR1 可能与 PBC 发病相关。而且蛋白互作分析发现,EGR1 与 IL-1 $\beta$ 、IL-2、IL-6 和 FOXO3 等相互作用。FOXO3 可以与 FOXP3 结合导致机体调节性 T 淋巴细胞(Treg)数量异常<sup>[11]</sup>,进而打破体内免疫平衡促进自身免疫性疾病的发生。IL-1 $\beta$ 、IL-2、IL-6 等炎症因子也都与 PBC 的发病相关<sup>[12-13]</sup>。另外,有研究发现 EGR1 可以直接与辅助性 T 淋巴细胞 1(Th1)细胞特异性的转录因子 T-bet 的启动子区结合,促进 T-bet 转录,进而促进 Th1 细胞增殖及干扰素- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )的大量释放<sup>[10]</sup>。而 KAWATA 等<sup>[14]</sup>发现 IFN- $\gamma$  的缺失极大地抑制了胆管炎的发展,说明 Th1 介导的免疫炎症反应在致 PBC 肝脏病变过程中具有重要作用。Th1/Th2 比例失衡是 PBC 主要发病机制之一<sup>[15]</sup>。可见,EGR1 可能是通过影响 Th1/Th2 比例,以及与多种炎症因子的相互作用来参与 PBC 的发生。

靶基因预测结果发现,lncRNA NONHSAT250451.1 在 EGR1 基因上游 4 297 bp 左右的位置处以 Cis 调控(Antisense)的方式对 EGR1 进行调控。而且,通过 NONCODE 数据库确定 NONHSAT250451.1 确实为 lncRNA。因此笔者推测,lncRNA NONHSAT250451.1 可能是通过调控 EGR1 的表达来参与 PBC 的发生,其在 PBC 中发挥的作用有待于进一步的探讨。实时荧光定量 PCR 发现,lncRNA NONHSAT250451.1 与 EGR1 在 PBC 患者 PBMC 中的表达水平较对照组分别高出 7.26、3.91 倍,与测序结果一致。该结果进一步证实 lncRNA NONHSAT250451.1 与 EGR1 在 PBC 患者中存在明显的差异,有望成为 PBC 的诊断标志物和药物治疗靶点候选者之一。另外,本研究还发现了许多显著差异表达的 lncRNA,如 XLOC\_000016 上调了 21.27 倍,XLOC\_117137 上调了 19.22 倍,XLOC\_072647 下调了 22.23 倍,XLOC\_039465 下调了 14.32 倍。这些 lncRNA 在 PBC 中均未见报道,但是它们在 PBC 组中的表达差异非常显著,可能对 PBC 的发生、发展有着重要的调控作用,在后续的研究中值得进一步的挖掘。

综上所述,本研究发现了很多差异表达的 lncRNA,并经文献找到可能与 PBC 发病相关的 mRNA,猜想与之相关的 lncRNA 可能也与 PBC 的发生相关。本实验发现了 EGR1 及对其有靶向调控作用的 lncRNA NONHSAT250451.1。在后续的实验中将进一步探讨 lncRNA NONHSAT250451.1 在 PBC 发病机制中的作用,期望为以后 PBC 的诊断和治疗提供新思路。

### 参考文献

[1] 中华医学会肝病学会,中华医学会消化病学分会,中华

- 医学会感染病学分会. 原发性胆汁性肝硬化(又名原发性胆汁性胆管炎)诊断和治疗共识(2015)[J]. 肝脏, 2015, 20(12):960-968.
- [2] CAREY E J, ALI A H, LINDOR K D. Primary biliary cirrhosis[J]. *Hepatology*, 2015, 50(1):291-308.
- [3] CALLE A S, KAWAMURA Y, YAMAMOTO Y A, et al. Emerging roles of long non-coding RNA in cancer[J]. *Cancer Sci*, 2018, 109(7):2093-2100.
- [4] VAN POPPEL H, HAESE A, GRAEFEN M, et al. The relationship between Prostate CAncer gene 3 (PCA3) and prostate cancer significance[J]. *BJU Int*, 2012, 109(3):360-366.
- [5] WU G C, LI J, LENG R X, et al. Identification of long non-coding RNAs GAS5, linc0597 and linc-DC in plasma as novel biomarkers for systemic lupus erythematosus [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(14):23650-23663.
- [6] Luo Q, XU C, LI X, et al. Comprehensive analysis of long non-coding RNA and mRNA expression profiles in rheumatoid arthritis[J]. *Exp Ther Med*, 2017, 14(6):5965-5973.
- [7] 杨敏. 原发性胆汁性肝硬化患者 lncRNA 表达谱芯片分析及功能研究[M]. 第二军医大学, 2015:1-59.
- [8] TANAKA A, TAKIKAWA H, MIWA H, et al. Changing nomenclature for PBC from "primary biliary cirrhosis" to "primary biliary cholangitis" [J]. *Hepatol Res*, 2016, 46(8):725-726.
- [9] LIASKOU E, KLEMSDAL HENRIKSEN E K, HOLM K, et al. High-throughput T-cell receptor sequencing across chronic liver diseases reveals distinct disease-associated repertoires [J]. *Hepatology*, 2016, 63(5):1608-1619.
- [10] SHIN H J, LEE J B, PARK S H, et al. T-bet expression is regulated by EGR1-mediated signaling in activated T cells[J]. *Clin Immunol*, 2009, 131(3):385-394.
- [11] OUYANG W, BECKETT O, MA Q, et al. Foxo proteins cooperatively control the differentiation of Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells[J]. *Nat Immunol*, 2010, 11(7):618-627.
- [12] GOLOVANOVA E V, II'CHENKO LIU, TSAREGOR-ODTSEVA T M, et al. Cytokines in primary biliary cirrhosis (diagnostic and prognostic value) [J]. *Ter Arkh*, 2004, 76(2):8-11.
- [13] WEBB G J, SIMINOVITCH K A, HIRSCHFIELD G M. The immunogenetics of primary biliary cirrhosis: a comprehensive review[J]. *J Autoimmun*, 2015, 64:42-52.
- [14] KAWATA K, TSUDA M, YANG G X, et al. Identification of potential cytokine pathways for therapeutic intervention in murine primary biliary cirrhosis [J]. *PLoS One*, 2013, 8(9):e74225.
- [15] 陈辰, 刘一博, 张玮. Th1/Th2 与原发性胆汁性胆管炎相关性的研究进展[J]. 肝脏, 2016, 21(12):1077-1080.
- (收稿日期:2018-09-24 修回日期:2018-11-09)
- 
- (上接第 1148 页)
- Oncol*, 2014, 4:131.
- [8] BURKHOLDER B, HUANG R Y, BURGESS R, et al. Tumor-induced perturbations of cytokines and immune cell networks[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1845(2):182-201.
- [9] KENNEDY R, CELIS E. Multiple roles for CD4<sup>+</sup> T cells in anti-tumor immune responses[J]. *Immunol Rev*, 2008, 222:129-144.
- [10] 中华医学会血液学分会. 中国慢性髓性白血病诊断与治疗指南(2016 年版)[J]. *中华血液学杂志*, 2016, 37(8):633-639.
- [11] SEYMOUR L, BOGAERTS J, PERRONE A, et al. iRECIST: guidelines for response criteria for use in trials testing immunotherapeutics[J]. *Lancet Oncol*, 2017, 18(3):e143-152.
- [12] INNO A, LO RUSSO G, SALGARELLO M, et al. The evolving landscape of criteria for evaluating tumor response in the era of cancer immunotherapy: from Karnofsky to iRECIST[J]. *Tumori*, 2018, 104(2):88-95.
- [13] LI Z, SONG W, RUBINSTEIN M, et al. Recent updates in cancer immunotherapy: a comprehensive review and perspective of the, 2018 China Cancer Immunotherapy Workshop in Beijing[J]. *J Hematol Oncol*, 2018, 11(1):142.
- [14] KANESVARAN R, CORDOBA R, MAGGIORE R. Immunotherapy in older adults with advanced cancers: implications for clinical decision-making and future research [J]. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*, 2018(38):400-414.
- [15] NIXON N A, BLAIS N, ERNST S, et al. Current landscape of immunotherapy in the treatment of solid tumours, with future opportunities and challenges [J]. *Curr Oncol*, 2018, 25(5):e373-384.
- [16] DAI J, YANG X, HUANG X B, et al. Dasatinib significantly enhances the level of Th1 cells while decreases the level of Treg cells in chronic myeloid leukemia patients, and Th1 can be a potential marker for evaluating the therapeutic efficacy and prognosis [J]. *Blood*, 2018, 132(Suppl 1):S4272.
- (收稿日期:2018-09-18 修回日期:2018-12-23)