

MDM4 和 P53 表达在非小细胞肺癌中的临床意义*

张俊杰¹, 郝李刚², 邸永辉^{2△}, 齐正², 李强¹

(1. 河北省邢台市第一医院 CT&MR 室 054000; 2. 河北省邢台市人民医院胸外科 054000)

[摘要] **目的** 研究 P53 和鼠双微基因 4(MDM4)在非小细胞肺癌中的表达及其对预后的影响。**方法** 应用免疫组织化学的方法检测 MDM4 和 P53 在非小细胞肺癌中的表达情况并做预后分析。**结果** 单因素分析结果显示 P53 表达与 T 分期及肿瘤分化程度存在关联,MDM4 只与肿瘤分化程度存在关联($P < 0.05$)。生存分析显示 P53 和 MDM4 都是预后危险因素($P < 0.05$),P53 和 MDM4 同时阴性组的术后生存明显优于 P53 阳性组、MDM4 阳性组及 P53 和 MDM4 同时阳性组,后三组之间无病生存率(DFS)和总生存率(OS)差异无统计学意义($P > 0.05$)。将后三组合并为 P53 和 MDM4 非同时阴性组是预后独立危险因素,HR 为 2.961(95% CI:1.522~5.067)。进一步基于 TNM 分期的分层分析显示无论早期还是中期患者,P53 联合 MDM4 均具有良好预后预测作用。**结论** P53 和 MDM4 阳性是非小细胞肺癌患者预后不良的危险因素,并且联合 TNM 分期后可能会提高预后评估准确性。

[关键词] 癌,非小细胞肺;鼠双微基因 4;P53;预后**[中图分类号]** R734.2**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2020)08-1259-06

Clinical significance of MDM4 and P53 expression in non-small cell lung cancer*

ZHANG Junjie¹, HAO Ligang², DI Yonghui^{2△}, QI Zheng², LI Qiang¹

(1. CT and MR Room, Xingtai Municipal First Hospital, Xingtai, Hebei 054000, China; 2. Department of Thoracic Surgery, Xingtai Municipal People's Hospital, Xingtai, Hebei 054000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the expressions of P53 and MDM4 in non-small cell lung cancer (NSCLC) and their influence on prognosis. **Methods** The expression levels of P53 and MDM4 in NSCLC were detected by using the immunohistochemical method and the prognosis analysis was performed. **Results** The single factor analysis results showed that the expression of P53 was related to the T stage and tumor differentiation, while MDM4 was only related to the differentiation degree of tumor ($P < 0.05$). The survival analysis revealed that both P53 and MDM4 were the risk factors of prognosis ($P < 0.05$). The postoperative survival in the both P53 and MDM4 negative group was significantly superior to the P53 positive group, MDM4 positive group and both P53 and MDM4 positive group. The disease free survival (DFS) and overall survival (OS) had no statistical difference among the latter three groups ($P > 0.05$). The P53 and MDM4 non-simultaneous negative group merged by the latter three groups was the independent risk factor of prognosis. HR was 2.961(95% CI:1.522—5.067). The further stratification analysis based on the TNM staging showed that no matter in the patients with early stage or middle stage, P53 combined with MDM4 could have better predictive effect. **Conclusion** P53 and MDM4 positive is the risk factor of prognosis in the patients with NSCLC. Their combination with TNM staging may increase the accuracy of prognosis evaluation.

[Key words] non-small cell lung cancer; MDM4; P53; prognosis

P53 作为重要的抑癌基因,在诱导细胞周期捕获、凋亡和 DNA 修复等多种生理功能中发挥作用^[1]。以往研究发现 P53 的突变及杂合性缺失引起的基因组不稳定在多种肿瘤的发生、发展过程中起到了非常重要的作用^[2-4]。野生型的 P53 蛋白稳定性较差,很少检测到。当出现突变时 P53 蛋白的稳定性出现改

变,通过免疫组织化学方法更容易检测到突变 P53 蛋白。因此既往研究发现,P53 阳性是多种肿瘤的预后不良因素。

近些年相关研究发现,P53 的活性及稳定性不仅受突变状态影响,而且受鼠双微基因(MDM)X 家族的影响。MDM2 通过泛素化加快 P53 降解,从而影

响 P53 的作用,促进肿瘤形成。此外近些年的研究发现,MDM4 作为该家族的另外一个蛋白,同 MDM2 对 P53 具有不同的作用机制。MDM4 具有和野生型 P53 蛋白结合从而抑制 P53 蛋白活性的功能,但并不会引起 P53 蛋白的降解。另外,MDM4 也可以通过维持 MDM2 的稳定性从而促进 P53 的降解功能^[5-6]。目前,多项研究已显示 P53 提示肺癌患者预后不良,但 MDM4 在肺癌患者中表达及其对预后的影响尚不清楚。因此本研究应用免疫组织化学的方法探索 P53 与 MDM4 的表达及其相关性在非小细胞肺癌中的临床意义,以及两种蛋白联合是否会提高预后预测能力。

1 资料与方法

1.1 一般资料

回顾性分析 2010 年 1 月至 2014 年 1 月邢台市人民医院及邢台市第一医院 100 例完全手术切除非小细胞肺癌患者的临床资料,其中男 66 例(66.0%),女 34 例(34.0%);年龄 40~77 岁,平均(61.25±8.69)岁;病理类型:腺癌 55 例(55.0%)和鳞癌 45 例(45.0%);吸烟患者 69 例(69.0%);I、II、III 期患者占比分别为 27.0%、39.0%、34.0%。随访结束时肿瘤相关死亡 53 例,53 例患者出现复发和转移,其中局部复发 21 例(21.0%)远处转移 32 例(32.0%)。

入选标准:(1)未行新辅助化疗;(2)接受术式为标准肺叶切除+系统性淋巴结清扫;(3)术后病理类型由两名病理专家确诊为非小细胞肺癌。排除标准:(1)患者术后生存不足 1 个月;(2)TNM 分期不明确;(3)术后未接受规范治疗;(4)存在病历资料缺失情况。所有入选患者根据美国国家综合癌症网络指南接收规范术后治疗,II~III A 期患者接受术后辅助化疗,化疗方案包括紫杉醇、多西他赛、长春瑞滨、培美曲塞等三代化疗药物联合铂类的两药方案。TNM 分期依据第 7 版新分期。术后进行电话或门诊随访:术后前两年每半年复查 1 次胸部 CT,两年之后每年复查 1 次 CT;复发后的治疗:辅助治疗后 6 个月内复发患者更换二线方案,6 个月之后复发患者采用原方案化疗。最后随访截止于 2018 年 7 月,随访终点为死亡,次终点为复查 CT 或活检病理显示出现局部复发和远处转移。局部复发即完全切除后首次出现复发的部位在手术原位、吻合口、支气管断端及区域淋巴结。远处转移即患者在完全切除后,在锁骨上、腹腔等区域淋巴结及骨、脑等其他器官出现原肿瘤类型的转移癌。

1.2 方法

患者肺癌标本在术后快速进行福尔马林固定并行石蜡包埋。将石蜡包埋的组织标本切成 5 mm 厚度的连续组织切片,并固定到多聚赖氨酸处理过的防脱载玻片上。形成的组织切片在 65 °C 条件下恒温烘烤 4 h,放入二甲苯 1 和 2 中各脱蜡 30 min,在无水乙

醇 1(10 min)、无水乙醇 2(10 min)、95%乙醇(5 min)、85%乙醇(5 min)和 75%乙醇(5 min)进行梯度水化。3%过氧化氢封闭 10 min 消除内源性过氧化物酶,柠檬酸盐缓冲液抗原热修复 2 min 30 s,P53 抗体及 MDM4 抗体孵育 4 °C 过夜,磷酸盐缓冲液(PBS)洗片 3 次,每次 5 min。二抗 37 °C 孵育 30 min,PBS 冲洗后,DAB 显色 1 min,苏木素复染 3 min,盐酸酒精分化 5 s,氨水返蓝 15 s,脱水,透明封片。用显微镜进行观察,阳性标准为在 400 倍视野下随机选取的 5 个视野,计算阳性肿瘤细胞数目百分比,应用受试者工作特征(ROC)曲线获取最佳 cut-off 值,P53 和 MDM4 的 cut-off 值为 10%,因此定义数据库中阳性细胞数大于 10%为 MDM4 和 P53 阳性。阳性对照为预试验中阳性表达的标本,阴性对照未加 POMC 抗体。

1.3 统计学处理

采用 SPSS21.0 软件进行统计学分析。分类变量单因素分析采用 χ^2 检验,多因素采用多因素回归分析;单因素生存分析采用 Kaplan-meier 法,Log-rank 检验;多因素生存分析采用 COX 风险模型分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 非小细胞肺癌中 P53 和 MDM4 表达情况

所有患者中共检测到 P53 阳性患者 37 例(33.6%),阴性 63 例(57.3%),见图 1A 和 B。P53 主要为细胞核阳性,胞质染色较浅(图 1E 和 F)。MDM4 阳性 30 例(30.0%),主要为胞质阳性,也可以观察到部分细胞核着色表现为阳性(图 1C 和 D)。P53 和 MDM4 同时阳性表达患者 11 例(11.0%),但两者阳性表达差异无统计学意义($P = 0.958$)。

表 1 MDM4 和 P53 表达与患者临床病理特征之间的关系($n = 100, n$)

变量	P53		P	MDM4		P
	阴性	阳性		阴性	阳性	
性别			0.854			0.927
男性	42	24		46	20	
女性	21	13		24	10	
年龄			0.764			0.159
<60 岁	27	17		34	10	
>60 岁	36	20		36	20	
吸烟史			0.257			0.540
不吸烟	17	14		23	8	
吸烟	46	23		47	22	
T 分期			0.044			0.592
T1	17	9		20	6	
T2	30	10		28	12	
T3	16	18		22	12	
N 分期			0.106			0.621
N0	34	14		35	13	

续表 1 MDM4 和 P53 表达与患者临床病理特征之间的关系 ($n=100, n$)

变量	P53			MDM4		
	阴性	阳性	<i>P</i>	阴性	阳性	<i>P</i>
N1	13	6		14	5	
N2	16	17		21	12	
病理分期			0.044			0.592
I	17	9		10	6	
II	30	10		28	12	
III	16	18		22	12	
分化程度			0.050			0.038
高分化	25	8		25	8	
中分化	23	12		28	7	
低分化	15	17		17	15	
组织类型			0.787			0.826
腺癌	34	21		38	17	
鳞癌	29	16		32	13	
复发模式			0.000			0.081
未复发	38	7		36	9	
局部复发	9	14		16	7	
远处转移	16	16		18	14	

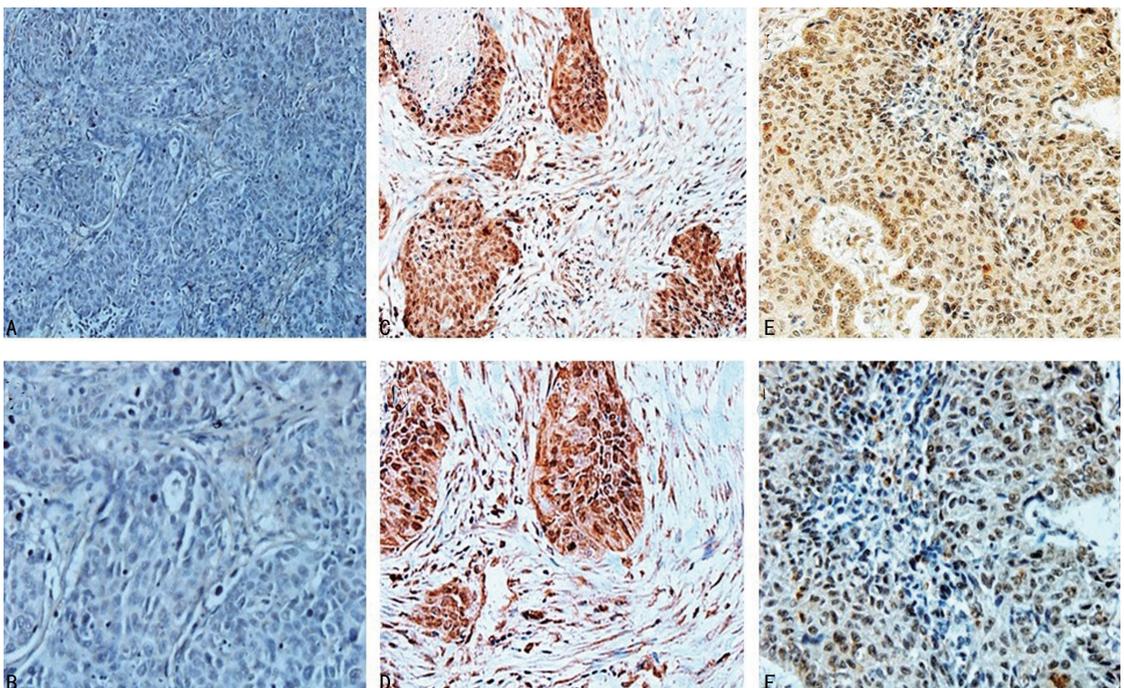
2.2 P53 和 MDM4 表达与临床病理特征的关系

单因素分析结果显示, P53 表达与 T 分期 (T1、T2 和 T3 的 P53 阳性率分别为 34.6%、25.0% 和 52.9%, $P=0.042$) 及肿瘤分化程度存在明显关联 (低分化组、中分化组和高分化组 P53 阳性率分别为 24.2%、34.3%、53.1%), 与 N 分期之间关联尚不明确 ($P=0.106$)。MDM4 只与肿瘤分化程度 (高分化

组、中分化组和低分化组的阳性率分别是 24.2%、20.0% 和 46.9%, $P=0.038$) 存在密切关联。见表 1。

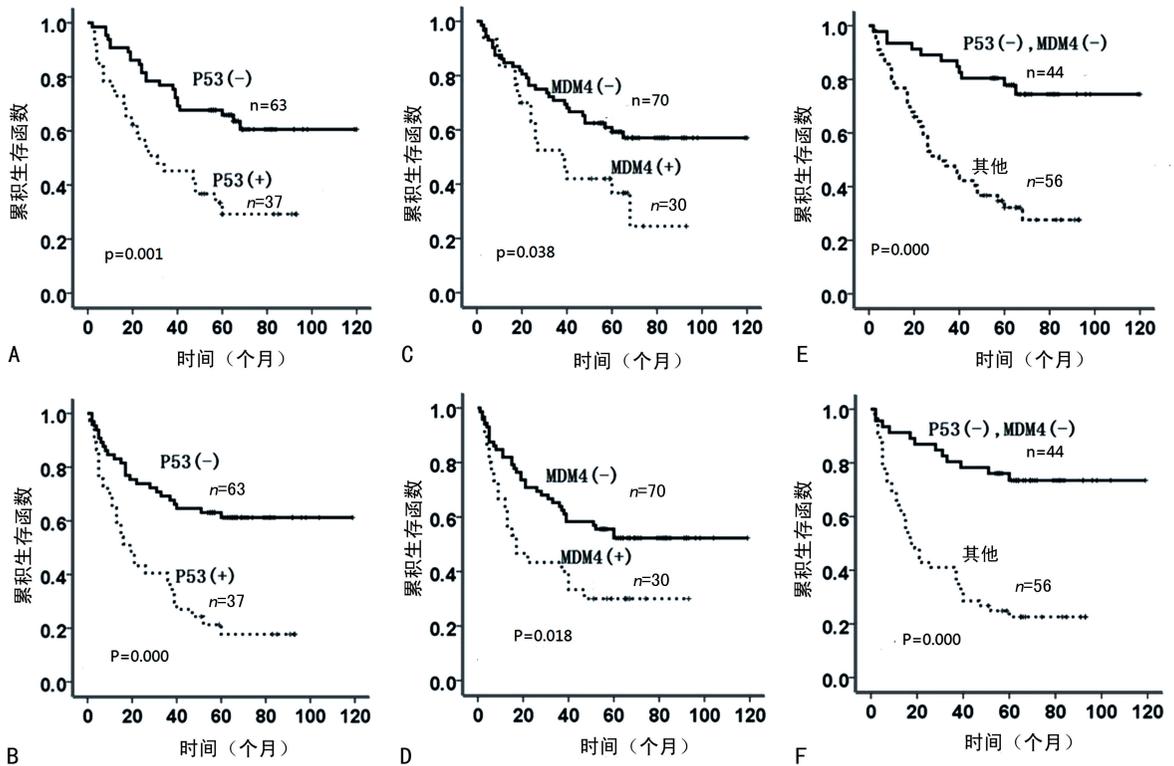
2.3 生存分析

单因素生存分析发现 P53、MDM4 与患者的 5 年无病生存率 (DFS) 和 5 年总生存率 (OS) 存在关联 (图 2A、B、C、D), COX 风险模型分析发现 P53 表达情况 ($HR=2.221, 95\%CI: 1.232\sim 4.006, P=0.008$) 和 MDM4 表达 ($HR=2.155, 95\%CI: 1.148\sim 4.042, P=0.017$) 更是影响术后生存 OS 的独立危险因素 (表 2)。进一步分析发现 P53 和 MDM4 同时阴性组的术后生存明显优于 P53 阳性组、MDM4 阳性组及 P53 和 MDM4 同时阳性组, 然而后三组之间 DFS 和 OS 均差异无统计学意义 ($P>0.05$)。将后三组合并一组后, 分为 P53 和 MDM4 同时阴性组和非同时阴性组作为一个新变量, 可见 P53 和 MDM4 同时阴性组具有更好的 DFS 和 OS (图 2C 和 F)。将新变量再次纳入 COX 风险模型分析发现新变量是预后预测 OS 的独立危险因素 ($HR=3.014, 95\%CI: 1.509\sim 6.021, P=0.002$), 而 P53、MDM4 不再是独立预后危险因素 (表 3)。进一步通过分层分析探索 MDM4 联合 P53 在不同分期中预后预测作用发现, 无论是 DFS 还是 OS, P53 和 MDM4 同时阴性组和非同时阴性组在 I (104.17 个月 vs. 57.55 个月)、II (67.67 个月 vs. 35.75 个月) 期中预后均差异有统计学意义 ($P<0.05$)。III A (41.5 个月 vs. 16.5 个月) 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。ROC 曲线分析显示, P53 联合 MDM4 的曲线下面积达 0.711, 较单独 P53 和 MDM4 更具有生存预测优势 (表 4)。



A、C、E: 200 倍镜下阴性、MDM4 阳性和 P53 阳性结果; B、D、F: 400 倍镜下阴性、MDM4 和 P53 阳性结果。

图 1 免疫组织化学染色



A、C、E: P53、MDM4 和 MDM4 联合 P53 的生存分析 OS 曲线; B、D、F: P53、MDM4 和 MDM4 联合 P53 的生存分析 DFS 曲线。

图 2 生存分析曲线

表 2 多因素生存分析

变量	DFS			OS		
	P	HR	95%CI	P	HR	95%CI
P53	0.004	2.260	1.304~3.918	0.008	2.221	1.232~4.006
MDM4	0.031	1.899	1.061~3.398	0.017	2.155	1.148~4.042
吸烟史	0.002	0.401	0.224~0.717	0.000	0.298	0.160~0.554
病理类型	0.008	0.442	0.241~0.808	0.003	0.363	0.187~0.703
分化程度	0.000	2.998	1.991~4.512	0.000	2.749	1.809~4.179
N 分期	0.000	2.233	1.580~3.156	0.000	2.320	1.589~3.387

表 3 P53 和 MDM4 合并后多因素生存分析

变量	DFS			OS		
	P	HR	95%CI	P	HR	95%CI
P53+MDM4	0.001	3.303	1.538~5.973	0.002	3.014	1.509~6.021
吸烟史	0.011	0.472	0.264~0.843	0.001	0.346	0.189~0.634
病理类型	0.007	0.434	0.235~0.799	0.004	0.381	0.198~0.732
分化程度	0.000	2.986	1.984~4.492	0.000	2.758	1.813~4.197
N 分期	0.000	2.097	1.483~2.964	0.000	2.153	1.484~3.122

表 4 受试者工作特征(ROC)曲线分析预后预测能力

变量	P	ROC 曲线下面积	95%CI
P53	0.018	0.698	0.596~0.801
MDM4	0.138	0.586	0.474~0.698
P53+MDM4	0.000	0.711	0.608~0.814
T 分期	0.809	0.514	0.400~0.628

续表 4 受试者工作特征(ROC)曲线分析预后预测能力

变量	P	ROC 曲线下面积	95%CI
N 分期	0.010	0.650	0.542~0.759
TNM 分期	0.001	0.687	0.581~0.793
P53+MDM4+TNM 分期	0.000	0.801	0.714~0.888

3 讨 论

野生型 P53 是一种经典的抑癌基因,对维持基因组的稳定性,保持细胞的正常凋亡、基因修复及诱导难以修复突变细胞的死亡具有非常重要的作用。然而,突变型的 P53 基因具有促进肿瘤发生、发展的作用。研究发现,在非小细胞肺癌中 P53 基因的突变率约为 32.5%,并且突变组生存较野生型组差^[7-8]。突变型的 P53 蛋白的稳定性明显增加,同时还可以与野生型 P53 蛋白形成聚合物积聚于细胞核内,使野生型 P53 失去抑癌功能及半衰期增长,从而免疫组织化学可以检测,因此通过检测 P53 蛋白表达水平来预测患者预后^[9]。

肿瘤中 MDM4 的表达可通过影响野生型 P53 蛋白的稳定性和功能促进肿瘤的发生、发展。MDM4 可以直接通过与 P53 蛋白转录活性区的结合抑制其活性的同时亦可以稳定 P53 蛋白,因此在 MDM4 阳性表达患者中免疫组织化学也可能检测出一部分无活性的野生型 P53 蛋白^[10]。也有相关研究显示 MDM4 可以和 MDM2 结合促进 MDM2 的稳定性,从而促进 P53 的降解,促进肿瘤的发生、发展^[11]。以往的研究表明 MDM4 除了通过对 P53 的调节实现促肿瘤生长作用,它还可通过不依赖 P53 的途径使损伤的 DNA 修复延迟,从而影响基因组的稳定性促进肿瘤的发生、发展^[12]。

虽然,以往很多研究通过免疫组织化学的方法检测 P53 在非小细胞肺癌患者中的表达情况及其对预后的影响。但 MDM4 在非小细胞肺癌中的表达情况及其对患者预后的影响尚不清楚。因此本文通过免疫组织化学的方法检测 MDM4 和 P53 在非小细胞肺癌中的表达情况及两者之间的关系,并探索联合 P53 与 MDM4 在非小细胞肺癌患者预后的预测作用。

以往的研究发现在非小细胞肺癌中 P53 免疫组织化学阳性比例为 30%~65%,主要为细胞核阳性,在具有病理核分裂相的肿瘤细胞中散在分布于细胞质,而且 P53 阳性非小细胞肺癌患者的预后较阴性组差,笔者最近的研究得到相似的结果^[10]。MDM4 在非小细胞肺癌中研究较少,本研究发现 MDM4 阳性率为 30.0%,主要显示为细胞质阳性,与肿瘤分化程度相关。MDM4 与 P53 表达无关联可能是因为 MDM4 既可以联合 MDM2 促进 P53 降解,又可以稳定 P53 的双重功能有关,但是在何种非小细胞肺癌亚型中通过何种机制作用于 P53 尚不清楚,尚需进一步探讨。

本研究将 MDM4 和 P53 联合起来做预后分析显示 MDM4 和 P53 共阴性组的生存明显优于 MDM4 阳性组、P53 阳性组和两者同时阳性组,并且后三组之间生存差异无统计学意义($P>0.05$)。因此可以发现,单纯 P53 阳性使患者预后不良很可能是由于 P53 突变失去抑癌基因功能引起的^[13]。而单纯 MDM4 阳

性、单纯 P53 阳性和两者同时阳性预后无差异揭示 MDM4 和 P53 阳性表达对非小细胞肺癌患者预后的影响不存在协同效应。这可能是由于在非小细胞肺癌当中 MDM4 对患者预后的影响主要是通过多种机制影响 P53 的活性实现的,并且该功能足以达到和 P53 突变相同的作用影响患者的预后,而 MDM4 独立于 P53 影响基因组稳定性促进肿瘤发生、发展的机制可能在非小细胞肺癌中并不起明显的效应^[14-15]。MDM4 和 P53 同时阴性组预后最好,可能由于该部分患者存在野生型 P53,且有活性的野生型 P53 蛋白功能又没有 MDM4 的影响,具有较高的基因修复功能,具有较好的预后。并且本研究中发现,无论早期还是中期患者,P53 联合 MDM4 均具有良好预后预测作用。因此联合 P53 和 MDM4 可能更能够揭示 P53 的功能状态对非小细胞肺癌患者预后的影响,能够更好地预测患者的预后。

综上所述,本研究结果显示 P53 和 MDM4 阳性是非小细胞肺癌患者预后不良的危险因素,而两者对非小细胞肺癌患者预后的影响并不存在协同效应,两者联合能更好地预测非小细胞肺癌患者的预后。笔者推测在非小细胞肺癌中 MDM4 可能主要通过影响 P53 的活性来影响患者的预后,而并非是独立于 P53 影响基因组稳定性的机制实现。限于回顾性研究和病例数量,本研究可能存在一定的偏倚,因此 P53 和 MDM4 在非小细胞肺癌中的临床应用价值尚需大样本前瞻性随机对照研究来证实。

参考文献

- [1] LEVINE A J. The evolution of tumor formation in humans and mice with inherited mutations in the p53 gene[J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2017, 407(2): 205-221.
- [2] BALIOU E, NONNI A, KERAMOPOULOS D, et al. Deregulation of p53-MDM2 auto-regulatory pathway in breast carcinoma[J]. *J Buon*, 2016, 21(5): 1099-1103.
- [3] GRONROOS E, LOPEZ-GARCIA C. Tolerance of chromosomal instability in cancer: mechanisms and therapeutic opportunities[J]. 2018, 78(23): 6529-6535.
- [4] BELLUTTI F, TIGAN A S, NEBENFUEHR S, et al. CDK6 antagonizes p53-Induced responses during tumorigenesis[J]. *Cancer Discov*, 2018, 8(7): 884-897.
- [5] CARVAJAL L A, NERIAH D B, SENEAL A. Dual inhibition of MDMX and MDM2 as a therapeutic strategy in leukemia[J]. *Sci Transl Med*, 2018, 10(436): e3003.

- [6] LIU T, ZHANG H, YI S, et al. Mutual regulation of MDM4 and TOP2A in cancer cell proliferation[J]. *Mol Oncol*, 2019, 13(5):1047-1058.
- [7] LABBE C, CABANERO M, KORPANTY G J, et al. Prognostic and predictive effects of TP53 co-mutation in patients with EGFR-mutated non-small cell lung cancer (NSCLC)[J]. *Lung Cancer* 2017, 111(1):23-29.
- [8] MOLINA-VILA M A, BERTRAN-ALAMILLO J, GASCO A, et al. Nondisruptive p53 mutations are associated with shorter survival in patients with advanced non-small cell lung cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2014, 20(17):4647-4659.
- [9] ERIKSSON S E, CEDER S, BYKOV V J N, et al. p53 as a hub in cellular redox regulation and therapeutic target in cancer[J]. *J Mol Cell Biol*, 2019, 11(4):330-341.
- [10] LI M, CONG Y, LI Y, et al. Insight into the binding mechanism of p53/pDIQ-MDMX/MDM2 with the interaction entropy method [J]. *Front Chem*, 2019, 7(1):33.
- [11] BIDERMAN L, POYUROVSKY M V, ASSIA Y, et al. MdmX is required for p53 interaction with and full induction of the Mdm2 promoter after cellular stress[J]. *Mol Cell Biol*, 2012, 32(7):1214-1225.
- [12] CARRILLO A M, BOUSKA A, ARRATE M P, et al. Mdmx promotes genomic instability independent of p53 and Mdm2[J]. *Oncogene*, 2015, 34(7):846-856.
- [13] TEN K F, SUZUKI L, DORSSERS L C J, et al. Pattern of p53 protein expression is predictive for survival in chemoradiotherapy-naive esophageal adenocarcinoma [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(61):104123-104135.
- [14] FARLIK M, VILLUNGER A, KOLLMANN K, et al. Dual inhibition of MDM2 and MDM4 in virus-positive Merkel cell carcinoma enhances the p53 response[J]. *Cancer Discov*, 2019, 11(6):1027-1032.
- [15] GAO C, XIAO G, PIERSIGILLI A, et al. Context-dependent roles of MDMX (MDM4) and MDM2 in breast cancer proliferation and circulating tumor cells[J]. *Breast Cancer Res*, 2019, 21(1):5.

(收稿日期:2019-06-15 修回日期:2019-12-25)

(上接第 1258 页)

- [15] VASSALLO M, DURANT J, BISCAY V, et al. Can high central nervous system penetrating antiretroviral regimens protect against the onset of HIV-associated neurocognitive disorders? [J]. *AIDS*, 2014, 28(4):493-501.
- [16] CROSS H M, COMBRINCK M I, JOSKA J A. HIV-associated neurocognitive disorders: antiretroviral regimen, central nervous system penetration effectiveness, and cognitive outcomes[J]. *S Afr Med J*, 2013, 103(10):758-762.
- [17] HAMMOND E R, CRUM R M, TREISMAN G J, et al. The cerebrospinal fluid HIV risk score for assessing central nervous system activity in persons with HIV[J]. *Am J Epidemiol*, 2014, 180(3):297-307.
- [18] ANTINORI A, PERNO C F, GIANCOLA M L, et al. Efficacy of cerebrospinal fluid (CSF)-penetrating antiretroviral drugs against HIV in the neurological compartment: different patterns of phenotypic resistance in CSF and plasma[J]. *Clin Infect Dis*, 2005, 41(12):1787-1793.
- [19] CALCAGNO A, DI PERRI G, BONORA S. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of antiretrovirals in the central nervous system [J]. *Clin Pharmacokinet*, 2014, 53(10):891-906.
- [20] ANTINORI A, MARCOTULLIO S, ANDREONI M, et al. Italian guidelines for the use of antiretroviral agents and the diagnostic-clinical management of HIV-1 infected persons update 2015[J]. *New Microbiol*, 2016, 39(2):93-109.

(收稿日期:2019-04-08 修回日期:2019-10-20)