

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2023.02.003

ABCA2 基因 mRNA 在结核分枝杆菌不同感染阶段的表达 及其作为诊断标志物的研究 *

刘艳华¹ 王 若¹ 苏瑾文² 俞 珊² 孙雯娜¹ 程小星^{1Δ}

(1 解放军总医院第八医学中心结核病医学部 全军结核病防治重点实验室 结核病诊疗新技术北京市重点实验室 北京 100091;

2 解放军总医院第八医学中心结核病医学部结核科 北京 100091)

摘要 目的:比较 ATP 结合转运蛋白 A2(ATP-binding cassette transporterA2,ABCA2)基因 mRNA 在活动性结核病和结核分枝杆菌潜伏感染状态下的表达差异及其作为诊断标志物的能力。**方法:**收集活动性结核病患者、结核分枝杆菌潜伏感染者和健康人外周血,荧光定量 PCR 检测受试者外周血单个核细胞中 ABCA2 的 mRNA 水平,统计学分析各组 ABCA2 基因表达差异,及其鉴别活动性结核和潜伏感染的能力。**结果:**活动性结核病患者外周血单个核细胞中 ABCA2 的 mRNA 表达显著低于潜伏感染者和健康人($H=83.38, P<0.0001$)。ABCA2 鉴别诊断活动性结核和潜伏感染的曲线下面积为 0.9235,灵敏度为 73.53%(95%的置信区间为 63.87%~81.78%),特异性为 93.55%(95%的置信区间为 78.58%~99.21%)。**结论:**外周血单个核细胞中 ABCA2 基因 mRNA 是鉴别活动性结核病和潜伏感染者的潜在标志物,有助于活动性结核病的辅助诊断。

关键词:活动性结核病;潜伏感染;诊断标志物;ATP 结合转运蛋白 A2 基因;mRNA

中图分类号:R52 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2023)02-211-05

The mRNA Expression of ABCA2 Gene from Individuals in Different Infection Stages of Mycobacterium Tuberculosis and its Potential as a Diagnostic Biomarker*

LIU Yan-hua¹, WANG Ruo¹, SU Jin-wen², YU Shan², SUN Wen-na¹, CHENG Xiao-xing^{1Δ}

(1 Tuberculosis Prevention and Control Key Laboratory/ Beijing Key Laboratory of New Techniques of Tuberculosis Diagnosis and Treatment, Senior Department of Tuberculosis, the Eighth Medical Center of PLA General Hospital, Beijing, 100091, China; 2 Tuberculosis Department, Senior Department of Tuberculosis, the Eighth Medical Center of PLA General Hospital, Beijing, 100091, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the mRNA level of ATP-binding cassette transporterA2 (ABCA2) gene from individuals in different infection states of Mycobacterium tuberculosis and its ability as a diagnostic marker. **Methods:** The peripheral blood from patients with active tuberculosis, individuals with latent tuberculosis infection and healthy people was collected. The mRNA level of ABCA2 in peripheral blood mononuclear cells was detected by fluorescence quantitative PCR. The difference of ABCA2 mRNA in groups and its diagnostic ability to distinguish patients with active tuberculosis from individuals with latent tuberculosis infection were analyzed by statistical softwares. **Results:** The mRNA expression of ABCA2 from patients with active tuberculosis was significantly lower than that from individuals with latent infection and healthy people ($H=83.38, P<0.0001$). The area under the curve of ABCA2 mRNA in discriminating patients with active tuberculosis from individuals with latent tuberculosis infection was 0.9235, the sensitivity and specificity were 73.53% (95% confidence interval, 63.87% ~ 81.78%) and 93.55% (95% confidence interval, 78.58% ~ 99.21%) respectively. **Conclusions:** The mRNA of ABCA2 gene in peripheral blood mononuclear cells is a potential marker to distinguish active tuberculosis from latent tuberculosis infection, and is helpful to tuberculosis diagnosis.

Key words: Active tuberculosis; Latent tuberculosis infection; Diagnostic marker; ATP-binding cassette transporterA2; mRNA

Chinese Library Classification(CLC): R52 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2023)02-211-05

前言

结核病 (Tuberculosis, TB) 是由结核分枝杆菌 (Mycobac-

terium tuberculosis, M.tb) 感染引发的慢性传染性疾病, 严重威胁人类健康。人类感染 M.tb 后, 约 5%~10% 的感染者会发展为活动性结核病 (Active tuberculosis, ATB), 绝大多数处于不发病

* 基金项目: 国家重大传染病专项课题 (2017ZX10201301-007); 国家自然科学基金面上项目 (82072233)

作者简介: 刘艳华 (1979-), 女, 研究生, 副研究员, 主要研究方向: 结核病免疫学研究,

电话: 010-66775674, E-mail: liuyanhua79@163.com

Δ 通讯作者: 程小星, 男, 研究生, 研究员, 主要研究方向: 结核病免疫学研究, E-mail: xc36cn@163.com

(收稿日期: 2022-04-28 接受日期: 2022-05-24)

的带菌状态,称为潜伏感染(Latent tuberculosis infection,LTBI)据估计世界有 1/3 的人感染 M.tb,这些无临床症状的潜伏感染者是活动性结核病患者的重要来源。潜伏感染与活动性结核病的鉴别诊断至关重要^[1]。

我们前期的转录组测序结果发现活动性结核病患者和健康人外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)中 ABCA2 基因 mRNA 的表达存在显著差异(结果部分图 1)。ABCA2 基因编码 ABCA2 蛋白,属于 ABC 转运子家族,表达于神经细胞、巨噬细胞、单核细胞和造血干细胞等多种细胞中,主要作用是保持细胞内脂类成分的内平衡和代谢。ABCA2 也可表达于肿瘤细胞中,有助于肿瘤细胞的增殖。ABCA2 与早期动脉粥样硬化、丹吉尔病、小细胞肺癌、急性白血病和阿尔茨海默病的发病相关,还与癌症化疗的耐药相关^[2-6]。据我们所知,ABCA2 与结核病的相关研究较少。

为了进一步研究 ABCA2 在结核病中的表达情况,本研究收集活动性结核病患者、结核潜伏感染者和健康人的外周血,通过荧光定量 PCR(fluorescence quantitative PCR, qPCR)方法检测 ABCA2 基因转录水平,并分析了该基因 mRNA 鉴别活动性结核病和潜伏感染的能力。

1 材料与方法

1.1 研究对象

本研究纳入了 2018 年 2 月到 7 月期间解放军总医院第八医学中心的结核病住院患者,结核病的诊断依据为“肺结核病诊断”^[7],包括临床表现、CT 检查、抗酸染色(acid fast stain, AFB)、细菌培养和核酸检测等。按 AFB 或细菌培养结果分组,结果为阳性者定为菌阳结核组,结果为阴性者定为菌阴结核组。按结核发病部位分组,肺部发病为肺结核组,其他器官发病为肺外结核组。结核潜伏感染者和健康人为 2018 年 3 月到 6 月期间解放军总医院第八医学中心的体检人员,两组受试者均没有结核病史和结核病临床表现,X-ray 检查正常,IGRA 阳性者为结核潜伏感染者^[8],IGRA 阴性者为健康人。纳入的研究对象均没有肝炎、艾滋病和自身免疫相关疾病。本研究通过解放军总医院第八医学中心伦理委员会批准,所有受试者均签署知情同意书。

1.2 样本采集与处理

抽取受试者的外周血并置于肝素抗凝管中,4~6 小时内用 Ficoll 分离液(美国 GE)分离 PBMCs,用 RPMI-1640 培养液(美国 Invitrogen)洗涤细胞 2 遍,沉淀用 1 mL 的 Trizol(美国 Invitrogen)溶解并冻于 -80 °C 备用。

1.3 RNA 提取和 cDNA 合成

Trizol 法提取细胞总 RNA。具体操作如下:1 mL 的 Trizol 细胞裂解液中加入 0.2 mL 氯仿,涡旋后静置 5 min,4 °C 12000 r/min 离心 15 min,取上层无色水相至新离心管中并加入 0.5 mL 异丙醇,混匀后室温放置 10 min,4 °C 12000 r/min 离心 10 min,弃去上清加入 1 mL 的 75%乙醇,4 °C 10000 r/min 离心 10 min,弃上清,RNA 沉淀在室温中干燥 10 min,加入 40 μL 无 RNase 的 ddH₂O 溶解 RNA,冻于 -80 °C 备用。

TaKaRa 反转录试剂盒(大连宝生物)用于 cDNA 的合成,具体操作参照产品说明书。

1.4 引物序列及 qPCR 检测

利用 NCBI 网站 Primerblast 进行引物设计,ABCA2 的参照基因序列为 NM_001606.5,上游引物为 5'-CTCGTGCAC-CTCATGACCAG-3',下游引物为 5'-GAGTCACGTTGCCCA-CAAAA-3'。选 GAPDH 为内参基因,参照的基因序列为 NM_002046,上游引物为 5'-TGTTGCCATCAATGACCCCT-3',下游引物为 5'-TCGCCCCACTTGATTTTGA-3'。SYBR Green I 试剂(美国 KAPA)用于 qPCR 检测,每个反应设 2 个复孔。反应程序如下:95 °C 3 min,1 个循环;95 °C 5 s,60 °C 30 s,共 40 个循环。溶解曲线进行引物特异性检验。反应在 LightCycle® 480 II(瑞士 Roche)上进行。

1.5 研究对象血常规检测

活动性结核病患者血常规由解放军总医院第八医学中心检验科按相关操作流程进行检测,潜伏感染者和健康人的血常规由解放军总医院第八医学中心健康体检科按相关操作流程进行检测。

1.6 数据整理与统计学分析

所有反应的 Ct 值均为 2 个复孔的平均值,ABCA2 基因的表达 = $2^{-\Delta C_t}$ ($\Delta C_t = C_{t(ABCA2)} - C_{t(GAPDH)}$),单核细胞/淋巴细胞的比率 = 单核细胞百分比/淋巴细胞百分比(monocyte/lymphocyte ratio, MLR),数值用“平均值±标准差”表示。采用 Graphpad 5.0 软件进行统计学分析。Mann-Whitney 或 Kruskal-Wallis 用于 2 组或 3 组数据的统计学分析,Spearman 用于相关性分析,受试者工作特征曲线(receiver operator characteristic curve, ROC)用于曲线下面积(area under curve, AUC)、诊断灵敏度和特异性分析。诊断的灵敏度和特异性取尤登指数最大时所对应的数值。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义, $P < 0.01$ 为差异有显著统计学意义。

2 结果

2.1 研究对象的临床和人口特征

活动性结核病患者共计 102 例,男女比例为 61:41,平均年龄为 48 岁(21~67)。102 例结核病患者菌阳组有 43 例,菌阴组有 59 例。102 例结核病患者肺结核有 84 例,肺外结核有 18 例。潜伏感染者共计 31 例,男女比例为 19:12,平均年龄为 46 岁(28~59)。健康人共计 31 例,男女比例为 18:13,平均年龄为 43 岁(23~56)。三组受试者的年龄和性别组成没有统计学差异。

2.2 ABCA2 基因 mRNA 在结核分枝杆菌不同感染状态下的表达

我们前期转录组测序结果显示活动性结核病患者 ABCA2 基因 mRNA 的表达显著低于健康人($t=5.503, P=0.0006$),结果见图 1。本研究通过 qPCR 技术证实了活动性结核病患者 PBMCs 中 ABCA2 基因 mRNA 表达显著低于潜伏感染者和健康人($H=83.38, P<0.0001$)。我们比较了菌阳组和菌阴组结核病患者 ABCA2 基因 mRNA 的表达,结果显示菌阳组和菌阴组中 ABCA2 基因 mRNA 的表达没有显著差异($U=1518, P=0.2397$),我们又比较了肺结核和肺外结核病患者 ABCA2 基因 mRNA 的表达,结果显示肺结核和肺外结核中 ABCA2 基因 mRNA 的表达也没有显著差异($U=1095, P=0.7423$),结果见图 2。

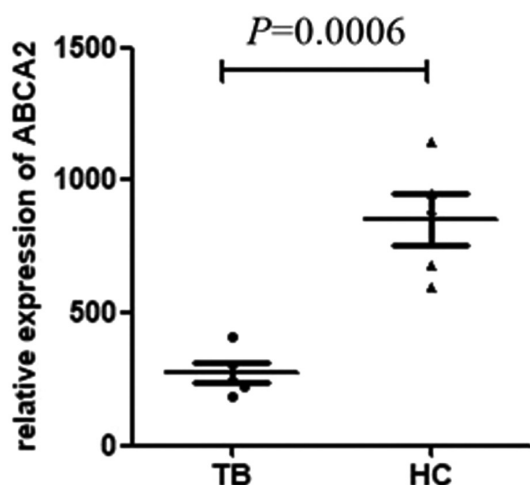


图1 转录组检测 ABCA2 基因 mRNA 的表达

Fig.1 The mRNA expression of ABCA2 gene detected by transcriptome sequencing

注:TB 为活动性结核病患者,HC 为健康对照

Notes: TB: tuberculosis, HC: healthy controls

2.3 活动性结核病患者 ABCA2 基因 mRNA 表达与单核细胞百分比、MLR 的相关性分析

活动性结核病患者外周血中单核细胞百分比高于 LTBI 和健康人,MLR 显著高于 LTBI 和健康人(图 3)。为了研究活动性结核病患者 ABCA2 基因 mRNA 的表达异常是否与单核细胞百分比和 MLR 的异常相关,我们分析了活动性结核病患者 ABCA2 基因 mRNA 的表达与单核细胞百分比和 MLR 的相关性。结果显示,活动性结核病患者外周血 ABCA2 基因 mRNA 表达与单核细胞的百分比成负相关($r=-0.2071, P=0.0464$),与 MLR 成显著负相关($r=-0.4062, P<0.0001$),结果见图 4。

2.4 ABCA2 基因 mRNA 对活动性结核病和潜伏感染的诊断分析

以潜伏感染为对照,我们用 ROC 分析了 ABCA2 基因 mRNA 诊断活动性结核的性能。ROC 分析显示,AUC 为 0.9235(95%CI 为 0.717~0.896),诊断灵敏度为 73.53%,95%置信区间(Confidence Interval, CI)为 73.55%~89.19%,特异性为 93.55%,95%CI 为 78.58%~99.21%。结果见图 5。

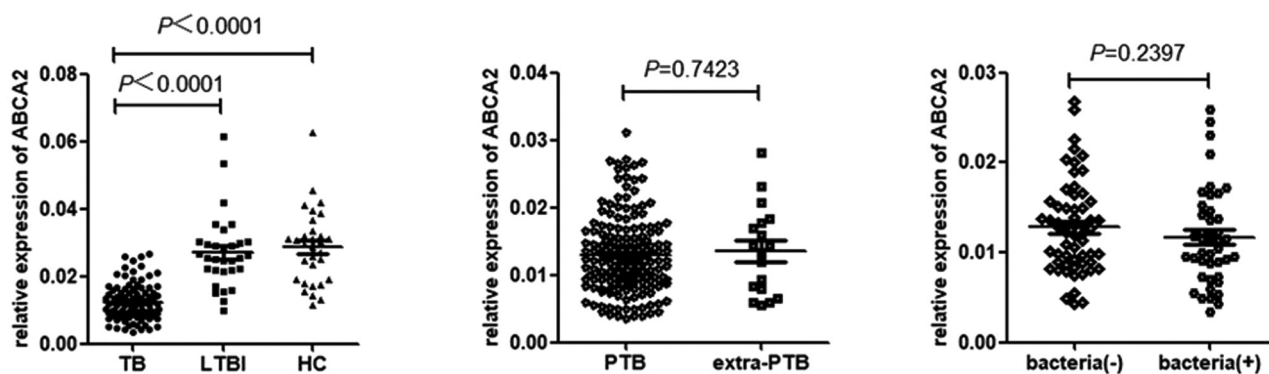


图2 qPCR 检测 ABCA2 基因 mRNA 的表达

Fig.2 The mRNA expression of ABCA2 gene detected by qPCR

注:TB 为活动性结核病患者,LTBI 为结核潜伏感染者,HC 为健康对照,PTB 为肺结核,extra-PTB 为肺外结核,bacteria(-)为菌阴结核,bacteria(+)为菌阳结核。

Notes: TB: tuberculosis, LTBI: latent TB infection, HC: healthy controls, PTB: pulmonary tuberculosis, extra-PTB: extra-pulmonary tuberculosis, bacteria(-): tuberculosis with M.tb negative in sputum sample, bacteria(+): tuberculosis with M.tb positive in sputum sample.

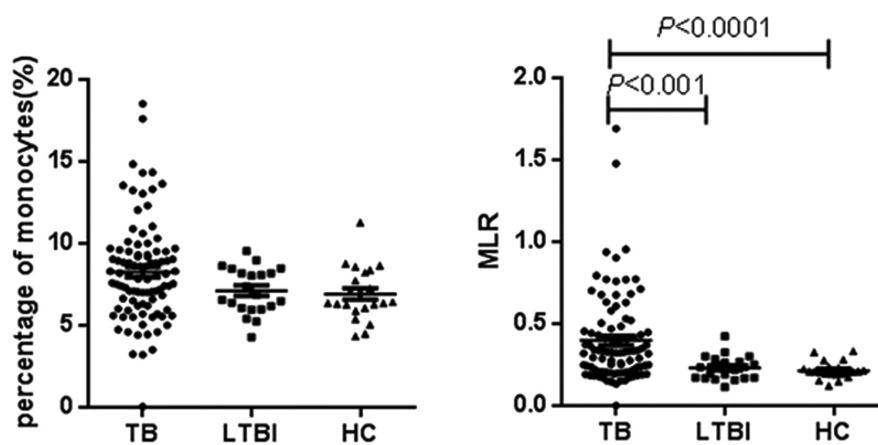


图3 活动性结核病患者、潜伏感染者和健康人的单核细胞比例和 MLR

注:TB 为活动性结核病患者,LTBI 为结核潜伏感染者,HC 为健康对照。

Fig. 3 Percentage of monocytes and MLR in peripheral blood from patients with active tuberculosis, individuals with latent tuberculosis infection and healthy controls

Notes: TB: tuberculosis, LTBI: latent TB infection, HC: healthy controls.

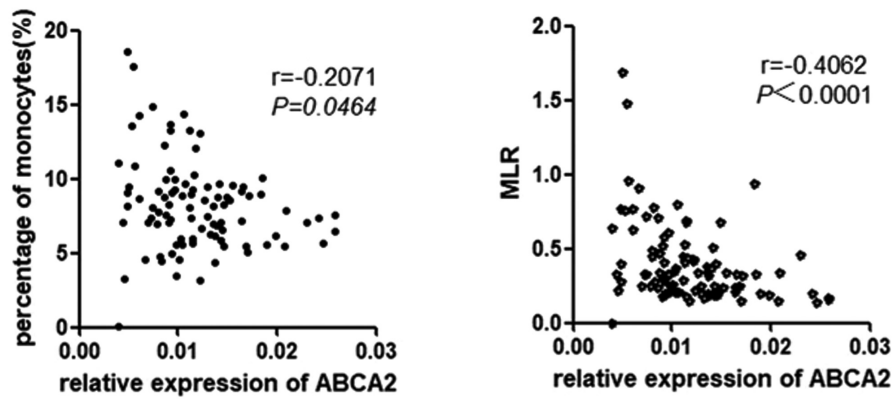


图4 活动性结核病患者 ABCA2 基因 mRNA 与单核细胞比例、MLR 的相关性

Fig. 4 The correlation of mRNA of ABCA2 with percentage of monocytes and MLR in patients with tuberculosis

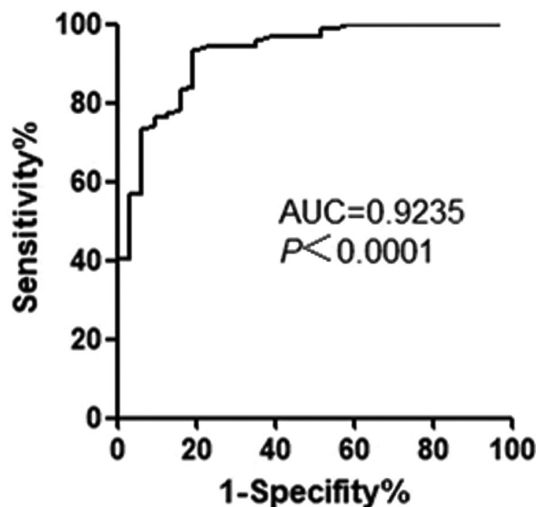


图5 ABCA2 基因 mRNA 鉴别活动性结核病和潜伏感染的 ROC

Fig. 5 The ROC of ABCA2 mRNA in differentiation ATB from LTBI

3 讨论

本研究通过 qPCR 方法对活动性结核病患者、结核潜伏感染者和健康人外周血中 ABCA2 转录水平进行检测,相比于转录组测序,qPCR 更加简便和经济,是目前基因检测的重要手段。本研究结果证实活动性结核病患者 ABCA2 的表达显著低于潜伏感染者和健康人,潜伏感染者和健康人 ABCA2 的表达没有显著差异,提示活动性结核病患者 ABCA2 的表达异常与 *M.tb* 感染后发病相关。外周血细胞亚群中 ABCA2 的相关研究较少,本研究分析了活动性结核病患者 ABCA2 表达水平与单核细胞百分比的相关性,令人意想不到的是,两者呈负相关,不仅如此,活动性结核患者 ABCA2 的表达水平与 MLR 呈显著负相关性,提示活动性结核患者 ABCA2 的表达降低不仅与单核细胞百分比上升相关,还与淋巴细胞百分比降低相关。

本研究 ROC 分析显示 ABCA2 基因 mRNA 能较好的区分活动性结核病和潜伏感染,灵敏度和特异性分别达到了 73.53% 和 93.55%。研究者通过转录组测序发现活动性结核病和潜伏感染中存在多个差异基因,并将其作为潜在的诊断标志物^[9-14]。近年来研究人员不断的寻找诊断效果更好的差异基因及其组合,比如 GBP1、GBP5、GZMA、CD64、FCGR1B 和 C1QB 等多个差异表达基因是鉴别活动性结核和潜伏感染较好的标

志物^[15-30]。

结核病的确证依据是 AFB 和细菌培养,但是由于两者灵敏度较低,一半以上的结核病患者检测结果为阴性,称为菌阴结核病。2018 年新修订的结核病诊断标准将核酸检测纳入确诊方法,极大提高了结核病的诊断水平,但是由于核酸检测自身假阳性率较高的特点,菌阴结核病的诊断仍然是结核病诊断的难点。本研究比较了纳入的活动性结核中菌阳结核患者和菌阴结核患者 ABCA2 基因 mRNA 的表达,结果显示两组 ABCA2 基因 mRNA 的表达相似,提示 ABCA2 基因 mRNA 也可以用于菌阴结核病的诊断。此外,结核病为全身性疾病,相比于肺结核,肺外结核的诊断更困难,本研究的活动性结核病患者中有 18 例肺外结核(约占纳入结核病例的 1/5),统计学分析发现肺结核和肺外结核中 ABCA2 基因 mRNA 的平均表达水平相似,提示该基因也可以用于肺外结核的诊断。

总之,本研究发现 ABCA2 基因的 mRNA 可以用于活动性结核病和结核潜伏感染的鉴别诊断。但是本研究纳入的样本数较少,ABCA2 作为结核病诊断标志物的价值还需要在更大的样本中进行验证。此外 ABCA2 诊断的灵敏度还有待提高,是否需要和其他差异基因联合诊断还需要进一步的研究。

参考文献(References)

- [1] WHO. Global tuberculosis report 2020 [EB/OL]. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240013131>
- [2] Davis W Jr, Tew KD. ATP-binding cassette transporter-2 (ABCA2) as a therapeutic target[J]. *Biochem Pharmacol*, 2018, 151: 188-200
- [3] Zhu X, Zhuo Y, Wu S, et al. TFEB promotes prostate cancer progression via regulating abca2-dependent lysosomal biogenesis[J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 632524
- [4] Hu W, Lin X, Zhang H, et al. ATP binding cassette subfamily a member 2 (abca2) expression and methylation are associated with alzheimer's disease[J]. *Med Sci Monit*, 2017, 23: 5851-5861
- [5] Aberuyi N, Rahgozar S, Khosravi Dehaghi Z, et al. The translational expression of ABCA2 and ABCA3 is a strong prognostic biomarker for multidrug resistance in pediatric acute lymphoblastic leukemia[J]. *Onco Targets Ther*, 2017, 10: 3373-3380
- [6] Behl T, Kaur I, Sehgal A, et al. The interplay of ABC transporters in aβ translocation and cholesterol metabolism: implicating their roles in alzheimer's disease[J]. *Mol Neurobiol*, 2021, 58(4): 1564-1582

- [7] WS 288-2017, 肺结核病诊断[S]. 北京; 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 2017
- [8] 中华医学会结核病学分会. 结核分枝杆菌 γ -干扰素释放试验及临床应用专家意见 (2021 年版)[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2022, 45 (2): 143-150
- [9] Sinigaglia A, Peta E, Riccetti S, et al. Tuberculosis-associated micrnas: from pathogenesis to disease biomarkers[J]. Cells, 2020, 9 (10): 2160
- [10] Mamishi S, Pourakbari B, Sadeghi RH, et al. Differential gene expression of asun, nemf, ptpcr and dhx29: candidate biomarkers for the diagnosis of active and latent tuberculosis [J]. Infect Disord Drug Targets, 2021, 21(2): 268-273
- [11] Darboe F, Mbandi SK, Naidoo K, et al. Detection of tuberculosis recurrence, diagnosis and treatment response by a blood transcriptomic risk signature in hiv-infected persons on antiretroviral therapy[J]. Front Microbiol, 2019, 10: 1441
- [12] AZak DE, Penn-Nicholson A, Scriba TJ, et al. Blood RNA signature for tuberculosis disease risk: a prospective cohort study.ACS and GC6-74 cohort study groups [J]. Lancet, 2016, 387 (10035): 2312-2322
- [13] Goletti D, Lee MR, Wang JY, et al. Update on tuberculosis biomarkers: From correlates of risk, to correlates of active disease and of cure from disease[J]. Respirology, 2018, 23(5): 455-466
- [14] Sampath P, Periyasamy KM, Ranganathan UD, et al. Monocyte and macrophage miRNA: potent biomarker and target for host-directed therapy for tuberculosis[J]. Front Immunol, 2021, 12: 667206
- [15] Long NP, Phat NK, Yen NTH, et al. A 10-gene biosignature of tuberculosis treatment monitoring and treatment outcome prediction [J]. Tuberculosis (Edinb), 2021, 131: 102138
- [16] Perumal P, Abdullatif MB, Garlant HN, et al. Validation of differentially expressed immune biomarkers in latent and active tuberculosis by real-time PCR[J]. Front Immunol, 2021, 11: 612564
- [17] Chen J, Liu C, Liang T, et al. Comprehensive analyses of potential key genes in active tuberculosis: A systematic review [J]. Medicine (Baltimore), 2021, 100(30): e26582
- [18] Kaul S, Nair V, Birla S, Dhawan S, et al. Latent tuberculosis infection diagnosis among household contacts in a high tuberculosis-burden area: a comparison between transcript signature and interferon gamma release assay[J]. Microbiol Spectr, 2022, 10(2): e0244521
- [19] Gliddon HD, Kaforou M, Alikian M, et al. Identification of reduced host transcriptomic signatures for tuberculosis disease and digital pcr-based validation and quantification [J]. Front Immunol, 2021, 12: 637164
- [20] Chen H, Cheng S, Liu C, et al. Bioinformatics analysis of differentially expressed genes, methylated genes, and miRNAs in unexplained recurrent spontaneous abortion [J]. J Comput Biol, 2019, 26 (12): 1418-1426
- [21] Wu K, Li M, Chen ZY, et al. Probe signal values in mrna arrays imply an excessive involvement of neutrophil FCGR1 in tuberculosis [J]. Front Med (Lausanne), 2020, 7: 19
- [22] Laux da Costa L, Delcroix M, Dalla Costa ER, et al. A real-time PCR signature to discriminate between tuberculosis and other pulmonary diseases[J]. Tuberculosis (Edinb), 2015, 95(4): 421-425
- [23] Sweeney TE, Braviak L, Tato CM, et al. Genome-wide expression for diagnosis of pulmonary tuberculosis: a multicohort analysis[J]. Lancet Respir Med, 2016, 4(3): 213-224
- [24] Francisco NM, Fang YM, Ding L, et al. Diagnostic accuracy of a selected signature gene set that discriminates active pulmonary tuberculosis and other pulmonary diseases [J]. J Infect, 2017, 75(6): 499-510
- [25] Liu YH, Wang R, An HJ, et al. Diagnostic value of FCGR1B gene transcription level in active tuberculosis [J]. Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi, 2022, 45(4): 373-378
- [26] Natarajan S, Ranganathan M, Hanna LE, et al. Transcriptional profiling and deriving a seven-gene signature that discriminates active and latent tuberculosis: an integrative bioinformatics approach [J]. Genes (Basel), 2022, 13(4): 616
- [27] Li Y, Deng Y, He J. Monocyte-related gene biomarkers for latent and active tuberculosis[J]. Bioengineered, 2021, 12(2): 10799-10811
- [28] Yi XH, Zhang B, Fu YR, et al. STAT1 and its related molecules as potential biomarkers in Mycobacterium tuberculosis infection [J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(5): 2866-2878
- [29] Zhang Y, Zhang X, Zhao Z, et al. Integrated bioinformatics analysis and validation revealed potential immune-regulatory miR-892b, miR-199b-5p and miR-582-5p as diagnostic biomarkers in active tuberculosis[J]. Microb Pathog, 2019, 134: 103563
- [30] de Araujo LS, Ribeiro-Alves M, Wipperman MF, et al. Transcriptomic biomarkers for tuberculosis: validation of npc2 as a single mrna biomarker to diagnose TB, predict disease progression, and monitor treatment response[J]. Cells, 2021, 10(10): 2704