



ISSN 1674-6929

CN 44-1656/R

邮发代号: 46-283

分子诊断与治疗杂志

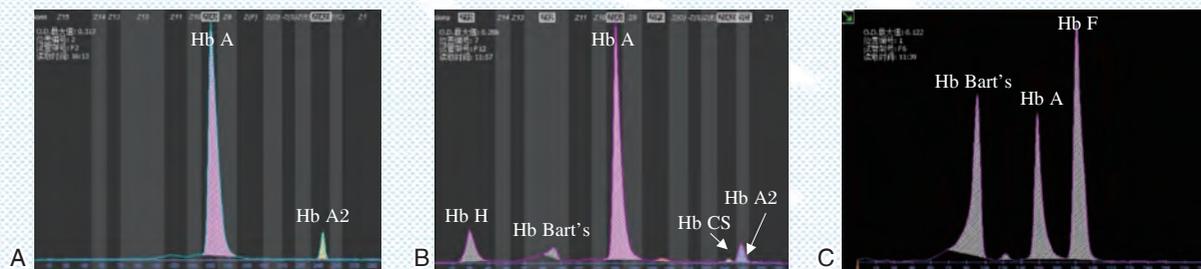
FENZI ZHENDUAN YU ZHILIAO ZAZHI

2020年6月 第12卷 第6期 总第70期

JOURNAL OF

MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Volume 12 Number 6 June 2020



图(P723) 三种 $\alpha\text{-SE}^A/\alpha\alpha^T$ 血红蛋白电泳图

Figure(P723) Hemoglobin electrophoresis of 3 kinds of $\alpha\text{-SE}^A/\alpha\alpha^T$

中山大学 主管

中国科技核心期刊(中国科技论文统计源期刊)
 中国核心期刊(遴选)数据库收录期刊
 中国期刊全文数据库全文必录期刊
 中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊
 中文生物医学期刊文献数据库 CMCC 收录期刊
 中国生物医学期刊引文数据库 CMCI 收录期刊
 中国学术期刊影响因子年报统计源期刊

ISSN 1674-6929



06>

9 771674 692204



戴二黑



戴二黑,《分子诊断与治疗杂志》第三、四、五届编辑委员会常务编委。

1963年4月出生。2020年毕业于军事医学科学院军事预防医学专业,医学博士学位。美国哈佛大学和纽约大学访问学者。

主任医师,教授,博士生导师。现任河北医科大学附属石家庄市第五医院副院长。荣获河北省省管优秀专家、省优秀科技工作者、石家庄市高层次人才、市管拔尖人才、市有突出贡献中青年专家等荣誉称号。担任中华医学会检验医学分会委员、中国医师协会检验医师分会委员、中国老年保健医学研究会检验医学分会常委、河北省医学会检验医学分会主任委员等职务。担任《世界华人消化杂志》常务副主编,《分子诊断与治疗杂志》常务编委,《临床检验杂志》、《河北医药》等杂志编委。

戴二黑教授长期从事病原微生物学研究,在乙肝母婴传播发生机制与阻断策略、细菌与病毒耐药分子机制及分子检测技术、结核分枝杆菌复合群群特异性新基因鉴定、乙肝血清学标志物定量检测临床意义、新冠病毒核酸与抗体检测临床意义等领域做出了重要贡献。承担及完成国家、省部级研究课题40余项,其中国家艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治科技重大专项子课题、国家自然科学基金课题、国际合作课题共15项。获得省部级科技进步奖五项,其中一、二和三等奖分别为1、3和1项。获得国家发明专利4项发表学术论文近200篇,其中SCI收录30余篇,特别是2016年6月论文“Tenofovir to Prevent Hepatitis B Transmission in Mothers with High Viral load”在世界顶尖生物医学期刊《新英格兰医学杂志》发表,在业内引起轰动,研究成果已经成为世界卫生组织(WHO)、中华医学会肝病学会、美国肝病研究学会(AASLD)、欧洲肝脏研究学会(EASL)等世界各大肝病学会更新《乙肝防治指南》时必不可少的重要循证医学证据。主编、副主编及参编专著15部。培养和招收博士及硕士研究生22名。

分子诊断与治疗杂志

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

月刊 2020年6月 第12卷 第6期 总第70期 Bimonthly Volume 12 Number 6 June 2020

| | |
|--------------------------------|---|
| 主管 | 中山大学 |
| 主办 | 《中国家庭医生》杂志社有限公司 |
| 承办 | 中山大学达安基因股份有限公司 |
| 顾问 | 申子瑜 |
| 主编 | 李明 |
| 编辑部主任 | 蒋析文 |
| 编辑部副主任 | 刘悦 |
| 编辑部 | 《分子诊断与治疗杂志》编辑部 |
| 编辑 | 李晓兰 李彩珍 莫源浩 |
| 出版 | 《中国家庭医生》杂志社有限公司 |
| 地址 | 广州市天河区天河北路179号祥龙大厦11楼(510620) |
| 电话 | (020) 32290789-206, 32290789-201 |
| 电子邮箱 | jmdt@vip.163.com |
| 刊号 | ISSN 1674-6929 CN 44-1656/R |
| 邮发代号 | 46-283 |
| 发行单位 | 广东省报刊发行局 |
| 发行范围 | 国内外公开发售 |
| 广告发布登记通知书 | 440100190057 |
| 印刷 | 天意有福科技股份有限公司 |
| 出版日期 | 2020年6月18日 |
| 定价 | RMB 15.00元 |
| Responsible Institution | <i>Sun Yat-sen University</i> |
| Sponsor | <i>China Family Doctors Magazine Publisher Co., Ltd.</i> |
| Organizer | <i>Da An Gene Co., Ltd. of SunYat-sen University</i> |
| Consultant | <i>SHEN Ziyu</i> |
| Editor in Chief | <i>LI Ming</i> |
| Managing Director | <i>JIANG Xiwen</i> |
| Associate Editor | <i>LIU Yue</i> |
| Editorial Office | <i><JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY> Editorial Office</i> |
| Editors | <i>LI Xiaolan LI Caizhen MO Yuanhao</i> |
| Editing | <i>China Family Doctors Magazine Publisher Co., Ltd.</i> |
| Add | <i>11 Fl., Xianglong Building, 179# Tian he bei Lu, Guangzhou, China 510620</i> |
| Tel | <i>(020) 32290789-206, 32290789-201</i> |
| E-mail | <i>jmdt@vip.163.com</i> |
| CSSN | <i>ISSN 1674-6929 CN 44-1656/R</i> |
| Printing | <i>TianYi Yofus Technology Co., Ltd.</i> |
| Publish Date | <i>2020.6.18</i> |
| Price | <i>RMB 15.00</i> |



扫码订购《分子诊断与治疗杂志》

版权归《分子诊断与治疗杂志》所有,本刊刊出的所有文章不代表本刊编委会的观点,除非特别声明。



中国科技核心期刊

(中国科技论文统计源期刊)

收录证书

CERTIFICATE OF SOURCE JOURNAL
FOR CHINESE SCIENTIFIC AND TECHNICAL PAPERS AND CITATIONS

分子诊断与治疗杂志

经过多项学术指标综合评定及同行专家
评议推荐，贵刊被收录为“中国科技核心期
刊”（中国科技论文统计源期刊）。

特颁发此证书。

中国科学院信息研究所

Institute of Scientific and Technical Information of China

北京复兴路 15 号 100038 www.istic.ac.cn

2019年11月

证书编号：2018-G556-0387
有效期至：2020年12月



分子诊断与治疗杂志

月刊 2020年6月 第12卷 第6期

目次

述评

乙型肝炎病毒血清学标志物检测技术的发展历程 张学东 卢建华 王梦寒 等(693)

COVID-19 专栏

新型冠状病毒肺炎患者实验室检测指标与免疫学特征分析
..... 董艳迎 李妙美 朱建宏 等(697)

论著

非小细胞肺癌患者 *ALK*、*ROS1* 及 *BRAF-V600E* 基因突变与临床特征的相关性 李华芳(701)

液相芯片技术检测地中海贫血国家参考品 张文新 林卫萍 孙楠 等(705)

中重度开放性颅脑损伤患者 CRP、D-D 与压力相关参数关系及预测预后价值
..... 孔羽 罗永刚 常天颖 等(710)

血清 Tenascin C 及 CADILLAC 危险评分与急诊急性心肌梗死相关性研究
..... 涂胜 王莹 刘飞 等(715)

307 例非缺失型 α -地贫的基因型及血液学特征分析 冼嘉嘉 何健淳 王燕超 等(720)

DNA 结合抑制因子 2、Rab5 基因在子宫内膜异位症患者中的表达及其意义
..... 陈豫中 赖威 张国安 等(724)

miR-499、miR-16、肌红蛋白与常规心肌损伤标志物的关系及在急性心肌梗死早期诊断中的价值
..... 李刚 朱春凯 郑培明(728)

HBV 相关 ACLF 患者免疫功能及 IL-10 和 IL-32 与预后的相关性
..... 王少渊 任旭 李世红 等(733)

胞二磷胆碱联合血塞通注射液治疗 ACI 患者疗效及其对血清 TLR4/NF- κ B 信号通路水平的作用
..... 肖淑红 刘建浩 王波海(737)

HBP、ADA、CHE 鉴别急性细菌性脑膜炎病原菌的价值及其与病情的关联性
..... 徐雪勤 马永磊 杨喜勇(741)

sTRAIL、PCT、ALB 在重症肝病合并感染患者外周血中的表达及临床意义
..... 徐萍 伍廷平 夏红 等(746)

AAG、CD64 指数和 IL-10 对肺癌术后并发感染的预测价值及与转归情况关联性
..... 姜淮 刘金 张道忠 等(751)

血清 MMP-9 和 LCN-2 水平在乳腺癌患者中表达意义及相关性分析 赵凌云(756)

circNT5E 通过调控 miR-506-3p 表达对结肠癌细胞迁移、侵袭和凋亡的影响
..... 孟凡迪 徐勤鸿 杨刚华 等(760)

| | |
|--|--------------------|
| EOS-CRSwNP 与 Neu-CRSwNP 鼻粘膜组织 IL-13、血清 tIgE、外周血 EO% 和临床评分的比较及 相关性研究 | 马艳丽 陈付华 麻宁 等(765) |
| 自发性早产的高危因素及血清 TLR2、MCP-1、TNF- α 水平的预测价值 | 于哲 张洛英 潘大欢 等(769) |
| 急性冠脉综合征患者 UA、NLRP3 水平与冠脉 SYNTAX 评分、斑块稳定性的相关性研究 | 郑耐心 唐国栋 田正凤(773) |
| IFN- γ 、IL-6、sIL-2R 在初治型肺结核患者血清中的变化意义研究 | 张信鸽 刘新 赵丹晖(777) |
| Fibroscan 弹性值与肝纤维化标志物在肝硬化患者中的关系及预后预测价值分析 | 张文利 董家琪 周柱玉 等(781) |
| MRI 在肝癌合并肝硬化经皮穿刺射频消融效果及术后复发中的预测价值 | 孟兆伟 王洪涛 管唯唯(786) |
| IMT 联合血清 Lp-PLA2 在诊断动脉粥样硬化脑梗死与预测斑块稳定性的价值 | 何丹青 邱文倩 牛居辉(790) |
| 中枢神经系统感染患儿血清 MMP-9、AQP4、PC 水平变化及其对 ICNS 的诊断价值 | 赵芳丽 杨媛洁 陈相宏 等(794) |
| 复发性流产孕妇血清 25(OH)D 水平与炎症因子、自身免疫抗体及 T 淋巴细胞亚群分布的 相关性分析 | 郝月兰 刘辉 吕明云 等(799) |
| 宫颈癌患者组织 β -catenin、Wnt1 表达及与新辅助化疗疗效的关系 | 谭建媛 阳莉 罗安莉(803) |
| miR-26a 靶向 ADAM10 对类风湿关节炎滑膜成纤维细胞增殖及迁移的影响 | 于守杰 张振春 厉彦山 等(808) |
| miRNA-193b、Lp-PLA2、miR-146a 与阿尔茨海默病严重程度的关系及预测疗效的价值 | 尚晓峰 冉秀荣 李虹(813) |
| β 2-MG、Hcy、Cys-C 检测在 2 型糖尿病视网膜病变诊断中的价值 | 陈斌 齐晓玲 徐礼五 等(818) |
| 下调 miR-9 对 LPS 诱导的大鼠心肌细胞炎症因子分泌的影响和机制 | 李媛莉 赵继波 张三明(822) |
| SLE 及 LN 患者血清 C1q 的表达水平及意义 | 张明娇 吴勇(827) |
| 恩必普治疗对 ICVD 患者血液流变学、血清 chemerin 和 Hcy 水平的影响 | 王丽轩 洪震 张乐国 等(831) |

综 述

| | |
|-------------------------------|-------------------|
| 单细胞转录组测序技术在类风湿性关节炎的研究进展 | 李琼 陈宇婷 接力刚 等(835) |
|-------------------------------|-------------------|

专家风采

| | |
|-----------|------|
| 戴二黑 | (封二) |
|-----------|------|

实验室巡礼

| | |
|-------------------|------|
| 石家庄市第五医院检验科 | (封三) |
|-------------------|------|

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Monthly Volume 12 Number 6 June 2020

CONTENTS

COMMENTS

The development course of hepatitis B virus serological marker detection technology

ZHANG Xuedong, LU Jianhua, WANG Menghan, DAI Erhei (693)

COVID-19 Column

Analysis of laboratory detection markers and immunological characteristics of patients with Coronavirus disease 2019

DONG Yanying, LI Miaoxian, ZHU Jianhong, MENG Hao, LIU Hailong, ZHANG Hua, GAO Ning,

ZHANG Lei, DANG Shuangshuo, GENG Yan (697)

ORIGINAL ARTICLES

Correlation between *ALK*, *ROS1* and *BRAF-V600E* gene mutations and clinical features in patients with non-small cell lung carcinoma

LI Huafang (701)

Detecting national reference material for thalassemia by liquichip technology

ZHANG Wenxin, LIN Weiping, SUN Nan, GAO Fei, SUN Jing, HUANG Jie, QU Shoufang (705)

Relationship between CRP, D-D and pressure-related parameters and prognostic value in patients with moderate to severe open head injury

KONG Yu, LUO Yonggang, CHANG Tianying, LIU Wenhui (710)

Serum Tenascin C and CADILLAC Risk Score and Emergency Acute Myocardial Infarction Correlation Study

TU Sheng, WANG Ying, LIU Fei, ZHANG Hui, LIU Juan, HAN Yanru, BU Lingtong (715)

Genotype and hematological characteristics of 307 cases of non-deletion α -thalassaemia

XIAN Jiajia, HE Jianchun, WANG Yanchao, LI Shaoying, HE Wenzhi, MA Xiaoyan, YE Guoxin, LI Qing, ZENG Jun (720)

Expression and Significance of DNA Binding Inhibitory Factor 2 and Rab5 Genes in Patients with Endometriosis

CHEN Yuzhong, LAI Wei, ZHANG Guoan, LI Zhengying (724)

Application of miR-499, miR-16, myoglobin and conventional markers of myocardial injury in the early diagnosis of acute myocardial infarction

LI Gang, ZHU Chunkai, ZHENG Peiming (728)

The immune function of HBV-related ACLF patients and the correlation between IL-10, IL-32 and prognosis

WANG Shaoyuan, REN Xu, LI Shihong, WEI Jiangxia (733)

Efficacy of Citicoline Combined with Xuesaitong Injection in Patients with Acute Cerebral Infarction and Effect on the level of Serum TLR4/NF- κ B Signaling Pathway

XIAO Shuhong, LIU Jianhao, WANG Bohai (737)

The value of HBP, ADA, CHE to identify the pathogenic bacteria of acute bacterial meningitis and its correlation with the disease

XU Xueqin, MA Yonglei, YANG Xiyong (741)

Expression and clinical significance of serum sTRAIL, PCT, ALB in patients with severe liver disease and infection

XU Ping, WU Tingping, XIA Hong, SHI Zhipeng, YANG Qiang, LIU Helei (746)

The predictive value of AAG, CD64 index, and IL-10 in the postoperative infection of lung cancer and its correlation with outcome

JIANG Huai, LIU Jin, ZHANG Daozhong, LI Yangliang (751)

| | |
|---|-------|
| Significance and correlation analysis of serum MMP-9 and LCN-2 levels in breast cancer patients <i>ZHAO Lingyun</i> | (756) |
| Effect of circNT5E on the migration, invasion and apoptosis of colon cancer cells by regulating the expression of miR-506-3p <i>MENG Fandi, XU Qinrong, YANG Ganghua, WAN Yong, ZHANG Lei</i> | (760) |
| Comparison and correlation between EOS-CRSwNP and Neu-CRSwNP nasal mucosa tissue IL-13, serum IgE, peripheral blood EO% and clinical score <i>MA Yanli, CHEN Fuhua, MA Ning, XIONG Xiaoxing, BIAN Jin, LIU Yafeng</i> | (765) |
| High-risk factors of spontaneous preterm delivery and the predictive value of levels of serum inflammatory factors TLR2, MCP-1 and TNF- α <i>YU Zhe, ZHANG Luoying, PAN Dahuan, WANG Jing</i> | (769) |
| Correlation between serum uric acid and NLRP3 level and coronary SYNTAX score, plaque stability in patients with acute coronary syndrome <i>ZHENG Naixin, TANG Guodong, TIAN Zhengfeng</i> | (773) |
| Study on the significance of serum levels of IFN- γ , IL-6 and sIL-2R in patients with primary pulmonary tuberculosis <i>ZHANG Xinge, LIU Xin, ZHAO Danhui</i> | (777) |
| Relationship between Fibroscan elasticity value and liver fibrosis markers in patients with liver cirrhosis and prognostic value <i>ZHANG Wenli, DONG Jiaqi, ZHOU Zhuyu, JIANG Xiangmei</i> | (781) |
| Predictive value of MRI in percutaneous puncture radiofrequency ablation of liver cancer with liver cirrhosis and its recurrence <i>MENG Zhaowei, WANG Hongtao, GUAN Weiwei</i> | (786) |
| Value of IMF combined with serum Lp-PLA2 in diagnosis of atherosclerotic cerebral infarction and prediction of plaque stability <i>HE Danqing, QIU Wenqian, NIU Juhui</i> | (790) |
| Changes of serum MMP-9, AQP4 and PC levels in children with central nervous system infection and their diagnostic value for ICNS <i>ZHAO Fangli, YANG Yuanjie, CHEN Xianghong, GUO Ying, QIAO Lina</i> | (794) |
| Correlation analysis of serum 25-hydroxyvitamin D level and distribution of inflammatory factors, autoimmune antibodies and T lymphocyte subsets in pregnant women with recurrent miscarriage <i>HAO Yuelan, LIU Hui, LV Mingyun, TENG Huaixiang</i> | (799) |
| Expressions of β -catenin and Wnt1 in cervical cancer patients and their relationship with the efficacy of neoadjuvant chemotherapy <i>TAN Jianyuan, YANG Li, LUO Anli</i> | (803) |
| Effects of miR-26a targeting ADAM10 on the proliferation and migration of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts <i>YU Shoujie, ZHANG Zhenchun, LI Yanshan, ZHANG Lili</i> | (808) |
| The relationship between miRNA-193b, Lp-PLA2, miR-146a and the severity of Alzheimer's disease and the value of predicting efficacy <i>SHANG Xiaofeng, RAN Xiurong, LI Hong</i> | (813) |
| β 2-MG, Hcy, Cys-C detection in the diagnosis of type 2 diabetic retinopathy <i>CHEN Bin, QI Xiaoling, XU Liwu, HU Wenwen, HUANG Peipei</i> | (818) |
| The effect and mechanism of down-regulation of miR-9 on LPS-induced inflammatory factor secretion in rat cardiomyocytes <i>LI Yuanli, ZHAO Jibo, ZHANG Sanming</i> | (822) |
| Changes of serum complement C1q level in patients with systemic lupus erythematosus and lupus nephritis and its significance <i>ZHANG Mingjiao, WU Yong</i> | (827) |
| Effects of Butylphthalide on hemorheology, levels of serum chemerin and Hcy in ICVD patients <i>WANG Lixuan, HONG Zhen, ZHANG Leguo, JIA Jianpu, ZHANG Junling</i> | (831) |

REVIEWS

| | |
|---|-------|
| Research progress of single cell RNA sequencing technology in rheumatoid arthritis <i>LI Qiong, CHEN Yuting, JIE Ligang, WU Jing, DU Hongyan</i> | (835) |
|---|-------|

· 述 评 ·

乙型肝炎病毒血清学标志物检测技术的发展历程

张学东¹ 卢建华² 王梦寒¹ 戴二黑^{2*}

[摘要] 乙型肝炎病毒血清学标志物检测在乙肝流行病学调查、疾病诊断与预后判断、抗病毒疗效监测与预测、乙肝疫苗效果评价等方面发挥着重要的作用,而检测技术的不断进步是保证检测结果准确性的重要保障。本文系统回顾性的总结了对流免疫电泳、红细胞凝集试验、放射免疫分析试验、酶联免疫吸附试验、固相膜免疫分析技术、化学发光免疫分析技术的原理、特点及其在乙肝血清学标志物检测中的应用现状,重点对化学发光免疫检测系统在乙肝血清标志物定量检测的应用前景进行了分析与展望。

[关键词] HBV; 血清学; 标志物; 检测技术

The development course of hepatitis B virus serological marker detection technology

ZHANG Xuedong¹, LU Jianhua², WANG Menghan¹, DAI Erhei^{2*}

(1. Autobio Diagnostics Co., Ltd, Zhengzhou, Henan, China, 450016; 2. The Fifth Hospital of Shijiazhuang, Shijiazhuang, Hebei, China, 050000)

[ABSTRACT] The detection of hepatitis B virus serological markers plays an important role in the investigation of hepatitis B epidemiology, disease diagnosis and prognosis, antiviral efficacy monitoring and prediction, and the evaluation of the effect of hepatitis B vaccination. The continuous improvement of detection technology is necessary to guarantee the accuracy of results. This article systematically summarizes the principles and characteristics of counter immunoelectrophoresis, erythrocyte agglutination test, radioimmunoassay test, enzyme-linked immunosorbent assay, solid-phase membrane immunoassay technology, chemiluminescence immunoassay technology and their serologic al markers in hepatitis B and the current status of the application. The focus is on the analysis and prospect of the application of chemiluminescent immunoassay system in the quantitative detection of hepatitis B serum markers.

[KEY WORDS] Hepatitis B virus; Serum; Markers; Detecting technique

自从1965年美国巴鲁克·布伦博格博士(Barruch Blumberg)发现澳大利亚抗原即乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)以来,至今已有50多年的历史^[1],乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染的实验室检测方法不断涌现和更新换代,HBV DNA、HBV RNA、HBV cccDNA定量检测、HBV基因型与基因突变位点检测、HBV核心相关抗原

(HBcrAg)检测等新技术、新方法相继问世并在临床逐渐推广应用^[2-6]。与此同时,传统的HBV血清学标志物如常用的HBsAg、抗-HBs、HBeAg、抗-HBe、抗-HBc乙肝“两对半”等检测技术也不断创新发展^[7],从最初的免疫扩散技术相继建立了对流免疫电泳技术(CIEP)、红细胞凝集试验、放射免疫分析试验(Radio Immunoassay, RIA)、酶联免疫吸

基金项目:石家庄市科学技术研究与发展指导计划(151460653)

作者单位:1. 郑州安图生物工程股份有限公司,河南,郑州450016

2. 石家庄第五医院,河北,石家庄050000

*通信作者:戴二黑, E-mail: daieh2008@126.com

附试验 (enzyme-linked immuno sorbent assay, ELISA)、固相膜免疫分析技术、化学发光免疫分析技术 (chemiluminescent immunoassay, CLIA) 等。

本文重点对以上 HBV 血清学标志物检测技术的原理及其特点进行简要介绍,旨在帮助大家正确地理解 HBV 血清学标志物检测方法的基础上,根据各单位的实际情况科学合理的选用这些技术。

1 HBV 血清学标志物检测技术

1.1 对流免疫电泳技术

对流免疫电泳是将双向免疫扩散与电泳相结合,在直流电场中定向加速的免疫扩散技术。1970年, Gocke、prinee 等用对流免疫电泳技术检测乙型肝炎表面抗原 (HBsAg) 和表面抗体 (HBsAb), 取得了较好的效果而被推广应用^[8]; 中国学者余乾炎和张志荣也在 HBsAg 上做了相应研究^[9]。该试验相对简单、快速,灵敏度相比双向免疫扩散试验提高 8~16 倍,可测定的蛋白质浓度最低限度达 $\mu\text{g/mL}$ 水平。该方法常用于抗原或抗体的性质、效价和纯度的测定,但不适用于抗原为免疫球蛋白或抗原抗体迁移率接近的情况,否则会导致抗原抗体朝同一个方向泳动^[9]。目前随着新的检测技术的发展,乙肝血清学标志物检测目前很少应用此技术。

1.2 红细胞凝集试验

红细胞凝集试验利用抗人 O 型红细胞的单克隆抗体,该抗体能与任何血型的红细胞结合而不出现凝集现象,将此抗体与特异性抗体或抗原连接,运用特异性凝集反应可检测标本中的抗原或抗体^[10]。该试验中受检标本为新鲜全血,取手指血或耳垂血即可进行实验,受检者即刻可知检测结果。此试验以前曾经用于检测乙肝表面抗原,灵敏度为 2~5 IU/mL,根据最新国家行业标准要求^[11], HBsAg 要求检测限 $\text{adr} \leq 0.1 \text{ IU/mL}$, $\text{adw} \leq 0.1 \text{ IU/mL}$, $\text{ay} \leq 0.2 \text{ IU/mL}$,因此此技术灵敏度不能满足国家标准要求,乙肝血清学标志物检测一般不再使用此技术。

1.3 放射免疫分析试验

放射性免疫试验以放射性核素为基本特征,用放射性核素标记抗原或抗体分子,通过测定放射性强度评估抗原-抗体反应的情况,从而实现对待测物质的定量或定性分析^[12]。放射免疫试验将放射性核素的高灵敏性与抗原-抗体间的高特异性结合于一体,检测 HBsAg 灵敏度可以达到

0.5 IU/mL。放射性免疫试验开创了体液微量物质定量分析的新纪元^[13],并为建立酶免疫试验、化学发光免疫试验等方法奠定了理论和实践基础。目前,由于放射性核素的放射性污染问题,放射免疫试验已经逐渐被酶免疫试验、化学发光免疫试验等方法所替代。

1.4 酶联免疫吸附试验

酶联免疫吸附试验是以酶作为标记指示物,以抗原抗体免疫反应为基础的固相吸附测定方法。结合在固相载体表面的抗原或抗体仍保持其活性,酶标记的抗原或抗体既保留其免疫学活性,又保留酶的活性^[14]。ELISA 技术因具有方法简单、易于操作、试剂开放、成本较低等优点,从上世纪 80 年代开始一直占据临床免疫学检测领域的主导地位,采用此技术检测乙肝血清学标志物乙肝“两对半”,如 HBsAg 灵敏度可以达到 0.1 IU/mL^[15]。但是,因为存在手工操作误差大、耗费人力,结果报告时间久,灰区结果较多,难以准确定量,需要批量操作,以及灵敏度和特异性较低等劣势,人们一直在探寻新的方法克服 ELISA 技术的不足。

1.5 固相膜免疫分析技术

固相膜免疫分析技术属于快速免疫检验技术,一般包括免疫层析试验、免疫渗滤试验、斑点酶联免疫吸附试验和免疫印迹试验。用于乙肝血清学标志物检测的技术主要是免疫层析试验,以硝酸纤维素膜等为固相载体,样品溶液借助毛细作用在层析条上泳动,同时样品中的待测物与层析材料上待测物的受体发生高特异性、高亲和性的免疫反应,层析过程中免疫复合物被富集或截留在层析材料的一定区域,通过目测或仪器检测标记物聚集而得到直观的实验结果。这项技术多用于急诊检测及床旁检测,但由于其检测 HBsAg 的灵敏度只有 5 IU/mL^[16],人眼判断结果主观性较强,批量化操作相对较难等问题,在应用范围方面受到一定的限制。

1.6 化学发光免疫分析技术

化学发光免疫分析技术是指伴随化学反应过程所产生的光的发射现象,由于化学反应产生电子能级处于激发态的物质,被激发的物质通过跃迁释放能量产生光子,从而导致发光现象。按发光持续时间分为辉光型 (glow) 和闪光型 (flash),辉光型发光时间在数分钟至数十分钟以上;闪光型发光时间在数秒内^[17]。

1.6.1 化学发光技术分类及代表性厂家

化学发光检测技术大体上可分为两大类,即酶促与非酶促化学发光免疫检测系统。酶促化学发光免疫检测系统中作为标记物的酶基本不被消耗,而反应体系中发光剂的量充分过量,发光强度稳定,发光时间长,常采用速率法检测^[18]。其中辣根过氧化物酶系统的标记物为辣根过氧化物酶(Horseradish Peroxidase, HRP),以鲁米诺(Luminol)及其衍生物作为发光底物^[19],安图、强生等厂家的化学发光检测系统属于此类;碱性磷酸酶系统的标记物为碱性磷酸酶(AP),以螺旋金刚烷环氧化物苯磷酸酯(3-[2-spiroadamantane]-4-methoxy-4-[3-phosphoryloxy]-phenyl-1,2-dioxetane) Dioxetane, AMPPD)作为发光底物^[20],迈瑞、西门子(德普)、希斯美康、贝克曼等厂家的化学发光检测系统属于此类。非酶促化学发光检测系统目前有三种方法,一是直接化学发光,作为标记物的化学物质如吖啶酯在碱性环境下,直接被过氧化物氧化产生发光信号,发光过程中标记物被消耗,发光信号持续时间短,检测模块需加装进样器^[21],雅培、西门子等厂家的化学发光检测系统属于此类。二是通过电极上的电化学反应产生而不是由氧化剂或者发光剂产生,标记物为三联吡啶衍生物即[R₆(bpy)₃]²⁺,并以三丙胺为还原剂^[22],该技术是罗氏公司的专利。三是光激化学发光(LiCA):如目标抗原可使两个抗体上标记的感光珠和发光珠紧密的连接在一起,在680 nm激发光下,可完成鲁米诺氧化途径化学发光过程^[23],国内科美公司的化学发光检测系统属于此类。

1.6.2 磁微粒化学发光检测系统特点及乙肝标志物应用

由于磁微粒本身具有大比表面和高分散稳定性、超顺磁性生物相容性、功能基特性、生物活性物质化学连接、类均相反应等特性^[24],赋予磁微粒化学发光检测系统以下几方面的特点:①灵敏度高,如采用鲁米诺系统的化学发光法,检测发光值的信号范围0~10¹⁰^[25]。②反应迅速:属于类均相反应,底物不需要终止直接发光,整体反应时间在17~56 min。③随机单孔管理:具有样本随到随测或急诊功能,不存在加样时间差。④自动化程度高:磁微粒化学发光分析仪集自动进样、加样、反应、检测、打印报告等步骤于一体。⑤全封闭系统:磁微粒化学发光分析仪整个系统封闭,避免了人为因素带来

的检测误差,同时也提高了生物安全性。

化学发光免疫检测技术由于上述各方面性能的优势,促进了乙肝血清学标志物由定性检测向定量检测转变^[26]。目前国内外主流产品可进行表面抗原和表面抗体的定量检测,单位分别为IU/mL和mIU/mL。而安图生物率先在国际上研发和生产了基于磁微粒化学发光检测技术的乙肝五项全定量全自动检测系统,表面抗原和表面抗体均可以溯源至WHO和国家标准物质;e抗原、e抗体、核心抗体也可以溯源至WHO标准物质。乙肝五项全定量检测赋予了乙肝血清学标志物新的内涵和临床意义^[27],为深入研究乙肝自然史、抗病毒治疗疗效预测与监测、乙肝疫苗免疫效果评价、推动精准医疗等提供了坚实可靠的平台。

2 小结与展望

近年来,化学发光免疫分析方法及应用研究发展异常迅速,并以其独特的优势在乙肝检测领域得到了广泛应用,特别是磁性微粒子的免疫分离技术、金纳米粒子的催化功能以及化学发光共振能量转移在化学发光免疫分析方法中的应用^[28]。但是,化学发光免疫分析技术在实际应用中仍然存在不足,如核心技术智能化控制技术欠缺等^[29]。为了使化学发光免疫分析技术得到更加广泛的应用,未来研究的主要方向应集中在以下几个方面:①分析仪器的大通量化与流水线化;②降低仪器成本,使仪器微型化、便携化;③强化对检测样本基质的处理,减少非特异性吸附,提高检测的稳定性;④在高通量研究方面,完善多通道、多组分化学发光免疫分析检测技术,提高检测效率;⑤发展化学发光免疫分析联用技术,扩大应用范围。

化学发光经过近30年发展已成为临床主要检测技术之一。随着检验分析技术的不断进步,实验室和临床检验仪器从过去半自动化逐步向全自动化普及^[30],工作模式也从过去单台仪器的自动工作发展到目前流水线作业的全实验室自动化(Total laboratory automation, TLA)或称为全程自动化,流水线和生化免疫联机是大势所趋。国产化学发光乙肝产品在新形势下有着巨大的市场潜力,同时也将面临着更加激烈、残酷的竞争。如何提高检测精准度、检测稳定性等方面或许是化学发光乙肝产品保持竞争力的核心问题。这也需要行业内所有的企业的共同努力,在竞争中成长、在成长中优化,促

进化学发光技术的长远发展。

乙肝检测技术从定性到定量的发展,需要解决溯源准确性的问题。化学发光技术面临当前及未来医学发展的需求,在辅助临床诊断之外,承担起更多疾病的早期筛查、治疗效果监测及预后评估等任务时,就不得不要更准确更科学的检测结果。乙肝化学发光产品由定性向定量的功能升级转换也对企业提出的更高要求。检验结果的溯源性将成为检验仪器、试剂生产以及临床实验室检验的重要质量指标,也必然受到IVD厂商和医学实验室越来越多的重视。

参考文献

- [1] Blumberg BS. Primary and secondary prevention of liver cancer caused by HBV[J]. *Front Biosci (Schol Ed)*, 2010, 2: 756-763.
- [2] Peeling RW, Boeral DL, Marinucci F, et al. The future of viral hepatitis testing: innovations in testing technologies and approaches[J]. *BMC Infect Dis*, 2017, 17(Suppl 1):699.
- [3] Gerlich WH. Medical virology of hepatitis B: how it began and where we are now[J]. *Virology*, 2013, 10:239.
- [4] Yildiz UH, Inci F, Wang SQ, et al. Recent advances in micro/nanotechnologies for global control of hepatitis B infection[J]. *Biotechnol Adv*, 2015, 33(1):178-190.
- [5] Yao CY, Fu WL. Biosensors for hepatitis B virus detection[J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(35): 12485-12492.
- [6] 林健聪,王红翠,吴英松,等.乙肝标志物定量测定试剂盒的性能验证及临床应用评价[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2018, 10(1):47-55.
- [7] 黄洁,吴建华.乙型肝炎病毒血清标志物与HBV-DNA关系探讨[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2014, 6(2):113-116.
- [8] Stoltz DR, Poirier LA, Lrving CC, et al. Evaluation of short-term Tests for Carcinogenicity Toxic Appl Pharmacol [J], 1974, 29:157.
- [9] 余乾炎,张志荣.乙型肝炎表面抗原(HBsAg)检测技术[J]. *浙江医科大学学报*, 1979, 8(4):184-185.
- [10] Samuelson L, Ohman R, Ridell M, et al. A simple technique for increased sensitivity in immunoelectrophoresis by the use of antiserum against IgG[J]. *Journal of Immunological Methods*, 1987, 97(2):281.
- [11] 肖健,李克坚,喻剑虹,等. HBsAg 检测试剂的定量性能分析[J]. *中国生物制品学杂志*, 2015, 28(12):1285-1288.
- [12] Cohen BJ, Hewish RA, Mortimer PP, et al. Comparison of radioimmunoassay and counter-immunoelectrophoresis for the detection of antibody to hepatitis B core antigen[J]. *J Virol Methods*, 1981, 2(3):181-192.
- [13] 霍来文,李藏珍.放射免疫分析法[J]. *河北医药*, 1984, 6(6):371-374.
- [14] Warren RC, Richardson MD, White LO, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay of antigens from *Candida albicans* circulating in infected mice and rabbits: The role of mannan[J]. *Mycopathologia*, 1979, 66(3):179-182.
- [15] 李克坚,周诚,蓝海云,等. 2013年我国乙型肝炎病毒表面抗原诊断试剂盒专项抽验调查[J]. *中国生物制品学杂志*, 2013, 29(1):45-50.
- [16] 姚景娟.乙型肝炎表面抗原胶体金免疫层析血清快速测定的性能评估[J]. *临床医药文献杂志*, 2018, 5(100):162.
- [17] Mahler M, Bentow C, Serra J, et al. Detection of autoantibodies using chemiluminescence technologies [J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2016, 38(1):14-20.
- [18] Galina FF, Viktoryia AL, Valery AM, et al. Updating the Chemiluminescence Oxygen-Aftereffect Method for Determining the Rate Constant of the Peroxy-Radical Self-Reaction: Oxidation of Cyclohexene [J]. *Photochem Photobiol*, 2019, 95(3):780-786.
- [19] Liu J, Lai JH, Qi LG, et al. Theoretical Study on the Catalytic Oxidation of p-Iodophenol by Horseradish Peroxidase in a Chemiluminescent System [J]. *ChemistrySelect*, 2018, 42(3):11749-11757.
- [20] Yu SC, Yu F, Liu L, et al. Which one of the two common reporter systems is more suitable for chemiluminescent enzyme immunoassay: alkaline phosphatase or horseradish peroxidase[J]. *Luminescence*, 2016, 31(3):888-892.
- [21] 庞彬彬,孙海鹰,徐云根.化学发光试剂的研究新进展[J]. *化学试剂*, 2017, 39(9):942-948.
- [22] Enrico D, Alexander O, Irina S, et al. Theory and Simulation for Optimising Electrogenerated Chemiluminescence from Tris(2,2'-bipyridine) - ruthenium(II) - Doped Silica Nanoparticles and Tripropylamine [J]. *ChemElectroChem*, 2017, 7(4):1719-1730.
- [23] 颜露,赵晓航,许杨.均相光激化学发光免疫分析技术研究进展[J]. *生命科学*, 2016, 28(9):1083-1088.
- [24] 李静雯,刘清璐,杜美红,等.化学发光免疫分析技术在微生物检测中的应用[J]. *分析测试学报*, 2017, 36(11):1409-1416.
- [25] 陈文洋,邹明强,刘峰,等.化学发光检测光子计数的统计特性[J]. *发光学报*, 2015, 36(7):854-859.
- [26] 李宁侠,王海东,李洁,等.慢性乙型肝炎化学发光HBsAg定量与HBV-DNA相关性研究[J]. *中国现代医药杂志*, 2019, 21(8):49-50.
- [27] 中华医学会肝病学会,中华医学会感染病学分会.慢性乙型肝炎防治指南(2015 更新版)[J]. *肝脏*, 2015, 20(12):915-932.
- [28] 肖勤,林金明.化学发光免疫分析新技术研究进展[J]. *分析试验室*, 2017, 36(7):861-868.
- [29] 李耀华.国内外免疫自动化发展趋势现状与分析[J]. *医药论坛杂志*, 2011, 32(14):197-200.
- [30] 马雪峰.自动化在临床免疫检验中的应用进展[J]. *临床医药文献杂志*, 2017, 4(11):2046-2048.

新型冠状病毒肺炎患者实验室检测指标与免疫学特征分析

董艳迎 李妙美 朱建宏 孟昊 刘海龙 张华 高宁 张磊 党双锁 耿燕*

【摘要】 目的 分析新型冠状病毒肺炎,即2019冠状病毒病(COVID-19)患者实验室检测指标与免疫学功能指标的变化水平,并探讨其临床应用价值。方法 回顾性研究2020年1月至2020年3月在我院住院的6例新型冠状病毒肺炎确诊患者的实验室检测结果,探索患者常规实验室检查与免疫学功能指标包括T淋巴细胞亚群及细胞因子的变化规律。结果 ①血常规结果显示 COVID-19 患者的淋巴细胞计数较正常对照组明显降低($P<0.05$)。红细胞沉降率、纤维蛋白原、D-二聚体、谷丙转氨酶、谷草转氨酶、胱抑素 C、乳酸脱氢酶、羟丁酸脱氢酶、C-反应蛋白水平较正常对照组显著上升($P<0.05$)。②COVID-19 患者免疫功能指标分析结果显示外周血 CD3⁺T、CD4⁺T 及 CD8⁺T 淋巴细胞计数较正常对照组明显降低($P<0.05$)。炎症因子 IL-2R、IL-6、IL-8、IL-10 和 TNF- α 较正常对照组显著增高($P<0.05$)。结论 T 淋巴细胞下降和细胞因子风暴的出现是 COVID-19 患者重要的免疫学特征,动态观察 COVID-19 患者各项实验室及免疫功能指标对评估机体免疫状态、早期识别新冠病毒感染诱发的细胞因子风暴及监测疗效均具有重要意义。

【关键词】 新型冠状病毒肺炎;新型冠状病毒;免疫功能紊乱;临床预警指标

Analysis of laboratory detection markers and immunological characteristics of patients with Coronavirus disease 2019

DONG Yanying, LI Miaoxian, ZHU Jianhong, MENG Hao, LIU Hailong, ZHANG Hua, GAO Ning, ZHANG Lei, DANG Shuangso, GENG Yan*

(Clinical Laboratory, The Second Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shanxi, China, 710004)

【ABSTRACT】 Objective To analyze the changes of laboratory detection markers and immunological function markers for patients with Coronavirus disease 2019 (COVID-19), and to explore its clinical application value. Methods Routine and immune laboratorial data in six confirmed cases from in-patients with COVID-19 between January, 2020 and March, 2020 in our hospital were retrospective studied. The changes of common and immune function indexes including T lymphocyte subsets and various cytokines were detected and analyzed. Results ① Blood routine examination showed that the lymphocyte counts of the COVID-19 patients were significantly lower than those of the normal control ($P<0.05$). ② ESR, FIB, D-D, ALT, AST, CysC, LDH, HBDH and CRP increased significantly than those of the normal control ($P<0.05$). COVID-19 patients exhibited a remarkable decline of lymphocytes counts including CD3⁺, CD4⁺ and CD8⁺ T cells, and significant up-regulation of cytokines including IL-2R, IL-6, IL-8, IL-10 and TNF- α ($P<0.05$). Conclusion The decrease of T lymphocytes and the appearance of cytokine storm are important immunological characteristics of COVID-19 patients. Dynamic observation of various laboratory and immune function indicators of COVID-19 patients

基金项目:国家自然科学基金青年项目(81801581)、陕西省重点研发计划(2019SF-159和S2020-YF-YBSF-1279)

作者单位:西安交通大学第二附属医院检验科,陕西,西安710004

*通信作者:耿燕, E-mail: wsw87679358@163.com

can be used to evaluate the immune status. Early identification of cytokine storm induced by COVID-19 and monitoring the efficacy is of great significance.

[KEY WORDS] Coronavirus disease 2019; Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2; Immune dysfunction; Clinical warning indexes

新型冠状病毒肺炎,正式名称为2019冠状病毒病(coronavirus disease 2019, COVID-19)是由新型冠状病毒,即严重急性呼吸综合征冠状病毒2(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)感染引起的急性感染性肺炎,主要表现为发热、乏力、干咳,部分患者可发展为严重的急性呼吸窘迫综合症、脓毒症休克及多器官功能衰竭等^[1-2]。截止到2020年4月12日,全球范围内共有1 696 588例确诊感染SARS-CoV-2,死亡人数105 952例,其中中国感染人数83 482例,死亡人数3 349例,其中危重型病例病死率极高^[3]。目前对于SARS-CoV-2导致的新型冠状病毒肺炎致病机制尚未完全阐明。但越来越多的证据支持SARS-CoV-2致病是免疫介导的病理反应。免疫细胞功能紊乱和过度激活的炎症反应引起的细胞因子风暴可能是造成多器官损伤的主要原因^[4-6]。本研究对6例新型冠状病毒肺炎患者的实验室检测数据进行回顾性研究,分析其免疫功能指标T淋巴细胞亚群及多种细胞因子的变化规律,将有助于进一步探索COVID-19致病机制,为临床开展COVID-19早期预警和病情判断提供潜在的分子标志物。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取2020年1月至2020年3月在本院住院的6例新型冠状病毒肺炎患者。选取本院健康体检者10例为正常对照。6例COVID-19患者男性3例,女性3例,年龄为(51.17±13.78)岁;10例健康对照患者男性、女性各5例,年龄为(49.7±11.61)岁,COVID-19病例组与正常对照组间年龄、性别比例均无统计学差异($P>0.05$)。所有新型冠状病毒肺炎确诊病例诊断标准均依据国家卫生健康委员会办公厅同期发布的“新型冠状病毒肺炎诊疗方案”^[7]。本研究所涉及研究对象均已出院,主要利用患者的病例资料进行回顾性分析,未对研究对象进行干预行为,未涉及和侵犯患者的个人隐私和权益。

1.2 方法

通过本院电子病例系统提取患者性别、年龄、流行病学史及诊断等资料。通过实验室信息系统提取患者实验室检查结果的原始资料,主要观察指标包括:血常规、凝血、心脏肝肾功能、血细胞沉降率、C反应蛋白和降钙素原等检查指标。COVID-19患者免疫功能的评估包括利用Beckman coulter流式细胞仪检测患者T淋巴细胞亚群及利用西门子Immulate 1000化学发光仪检测患者多种炎症因子的变化。所有实验室数据采集当日项目室内质控均在控。

1.3 统计学处理

采用Graphpad Prism 7软件进行统计分析。对符合正态分布的计量资料以($\bar{x}\pm s$)表示,两组间差异分析采用两组独立样本资料 t 检验;对不符合正态分布的计量资料以四分位间距表示,两组间差异分析采用两独立样本资料秩和检验;计数资料用 $n(\%)$ 表示,用 χ^2 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 新型冠状病毒肺炎患者实验室检测结果分析

新型冠状病毒肺炎患者淋巴细胞计数较正常对照组显著下降($P<0.05$)。COVID-19患者ESR、FIB、D-D、肝功能检验指标ALT和AST、肾功能检测指标CysC和急性心肌损伤标志物LDH、HBDH均较正常对照组显著增高($P<0.05$)。COVID-19患者PCT正常,CRP较正常对照组显著增高($P<0.05$) (表1)。

2.2 新型冠状病毒肺炎患者免疫功能指标检测结果分析

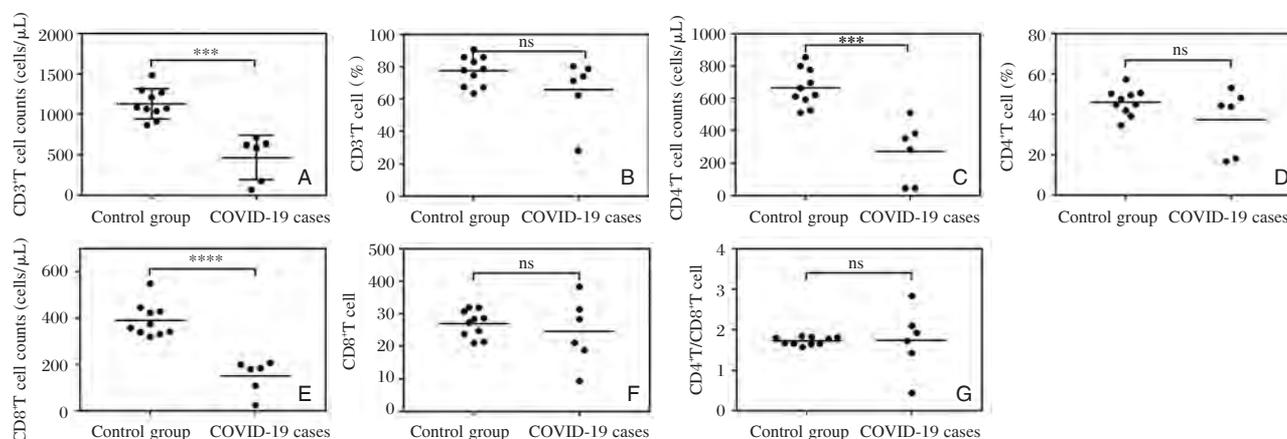
T淋巴细胞亚群计数检测结果显示CD3⁺T、CD4⁺T及CD8⁺T淋巴细胞计数较正常对照组明显降低($P<0.05$)。COVID-19患者CD4⁺/CD8⁺T淋巴细胞比值与正常对照组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。细胞因子检测结果显示COVID-19患者炎症因子IL-2R、IL-6、IL-8、IL-10和TNF- α 均较正常对照组显著增高($P<0.05$) (图1和图2)。

表1 新型冠状病毒肺炎患者实验室检测结果 $[(\bar{x} \pm s), \text{四分位间距}]$

Table 1 Laboratory data of COVID-19 patients $[(\bar{x} \pm s), \text{四分位间距}]$

| 项目 | 正常对照 (n=10) | COVID-19 患者 (n=6) | t/Mann-Whitney U | P 值 |
|----------------------------------|--------------------|--------------------------------|------------------|--------|
| 白细胞计数(WBC, $\times 10^9/L$) | 5.72 \pm 0.93 | 7.45 \pm 4.79 | 1.14 | 0.28 |
| 中性粒细胞计数(NEUT#, $\times 10^9/L$) | 3.35 \pm 0.78 | 4.97 \pm 3.23 | 1.55 | 0.14 |
| 淋巴细胞计数(LYMP#, $\times 10^9/L$) | 1.81 \pm 0.42 | 0.84 \pm 0.46 ^d | 4.29 | 0.0008 |
| 红细胞沉降率(ESR, mm/h) | 5.70 \pm 3.20 | 46.5 \pm 12.34 ^d | 10.12 | 0.0008 |
| 纤维蛋白原(FIB, mg/dL) | 247.44 \pm 49.33 | 441.2 \pm 104.9 ^c | 4.86 | 0.0003 |
| D-二聚体(D-D, $\mu\text{g/L}$) | 100~150 | 412.5~5970 ^c | 0 ^l | 0.0004 |
| 谷丙转氨酶(ALT, IU/L) | 10~23.25 | 56.67 \pm 51.88 ^a | 2.31 | 0.037 |
| 谷草转氨酶(AST, IU/L) | 21.1 \pm 4.41 | 51.33 \pm 32.71 ^a | 2.95 | 0.011 |
| 尿素(UREA, mmol/L) | 5.04 \pm 1.41 | 4.85 \pm 2.62 | 0.15 | 0.88 |
| 血肌酐(CREA, $\mu\text{mol/L}$) | 56.24 \pm 11.44 | 46.53 \pm 18.18 | 1.32 | 0.21 |
| 胱抑素C(CysC, mg/L) | 0.804 \pm 0.11 | 1.09 \pm 0.37 ^a | 2.30 | 0.038 |
| 乳酸脱氢酶(LDH, IU/L) | 175.3 \pm 31.23 | 310 \pm 190.8 ^a | 2.23 | 0.04 |
| 羟丁酸脱氢酶(HBDH, IU/mL) | 117.1 \pm 26.74 | 200.2 \pm 117.8 ^a | 2.19 | 0.046 |
| 降钙素原(PCT, ng/mL) | 0.05~0.07 | 0.08~0.24 | 4.5 ^l | 0.003 |
| C-反应蛋白(CRP, mg/L) | 3.14~3.57 | 47.84 \pm 38.72 ^b | 7.5 ^l | 0.0096 |

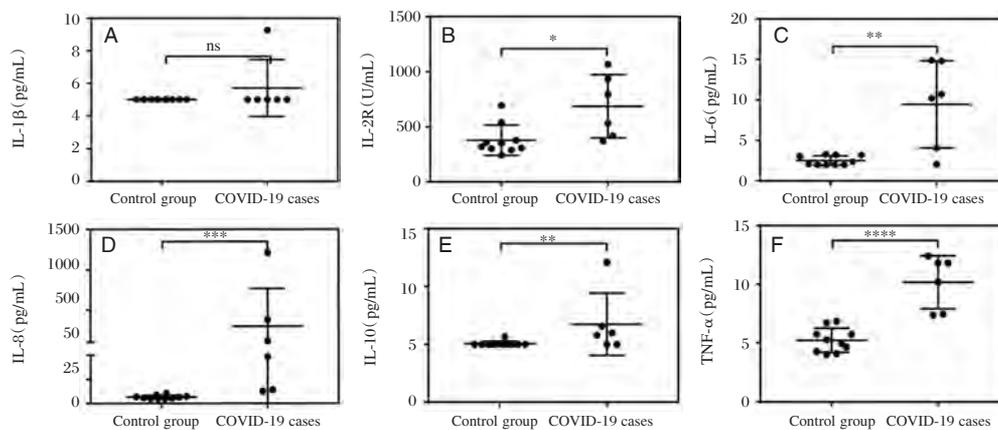
注: 正常对照&COVID-19患者间比较:^a $P < 0.05$; ^b $P < 0.01$; ^c $P < 0.001$; ^d $P < 0.0001$; ^l统计值为Mann-Whitney U值。



注: ^{*} $P < 0.05$; ^{**} $P < 0.01$; ^{***} $P < 0.001$; ^{****} $P < 0.0001$ 。

图1 新型冠状病毒肺炎患者T淋巴细胞亚群的变化

Figure 1 The change of T lymphocyte subtypes in COVID-19 patients



注: ^{*} $P < 0.05$; ^{**} $P < 0.01$; ^{***} $P < 0.001$; ^{****} $P < 0.0001$ 。

图2 新型冠状病毒肺炎患者多种细胞因子的变化

Figure 2 The change of various cytokines in COVID-19 patients

3 讨论

COVID-19 患者发病早期外周血白细胞总数正常,淋巴细胞计数减少,其降低程度提示 COVID-19 患者免疫功能低下。凝血功能指标 FIB 和 D-二聚体增高,有研究表明危重型 COVID-19 患者体内存在高凝状态,抗磷脂抗体可加重患者的凝血异常,增高患者血栓发生风险^[8-9],白细胞及凝血系统的改变对新型冠状病毒肺炎的诊断及病情判断具有一定的参考价值^[10]。根据目前的尸检和穿刺组织病理检查结果显示 COVID-19 患者存在广泛的多器官损伤,包括肺脏、脾脏、心脏、血管、肝脏、胆囊、肾脏表现出不同程度的实变^[11]。本研究中 COVID-19 患者与对照组相比,心、肝及肾功能损伤指标均有不同程度的增高。患者 CRP 和 ESR 升高,PCT 正常提示新冠病毒感染后 COVID-19 患者体内存在急性炎症反应,这些常规炎症指标的升高程度反映炎症组织的大小及疾病的活动性,持续的升高提示病情加重、治疗失败和预后差。

机体感染新冠病毒后,固有免疫在早期抗感染免疫中发挥着重要作用,这也是轻症患者能够痊愈的主要原因。T 淋巴细胞是参与机体细胞免疫应答的主要细胞,细胞毒性 T 细胞(CD8⁺T 细胞)在抗病毒感染免疫及免疫病理损伤中起重要作用,辅助型 T 细胞(CD4⁺T 细胞)在免疫调节功能中起重要作用,当不同 T 淋巴细胞亚群的数量和功能发生异常时,机体可发生免疫功能紊乱而导致一系列病理变化^[4, 12, 13]。在我们的分析中发现 COVID-19 患者 CD4⁺T 和 CD8⁺T 淋巴细胞均显著降低,提示机体感染新冠病毒后,免疫功能处于低下及抑制状态。COVID-19 患者体内 IL-2R、IL-6、IL-8、IL-10 和 TNF- α 水平较对照组显著增高,是新冠肺炎患者病情加重及预后不良的重要指标。新冠病毒感染后,引起机体免疫应答的同时,也活化了各种细胞信号,导致炎症因子大量释放,引起细胞因子风暴。炎症因子的释放是一种应激反应,一方面有利于病毒清除,然而失控的炎症反应和免疫紊乱会引起多器官免疫病理损伤^[14]。IL-6 受体抑制剂托珠单抗抑制 COVID-19 患者炎症因子风暴已在新冠肺炎的临床治疗中得到大力推广,进一步证实细胞因子风暴是重症新冠肺炎一个重要的致病因素^[15]。由于本研究为单中心研究,样本数量的限制可能会导致结果的偏倚,后续需进行更大规模的多中心研究

佐证我们的结果是非常必要的。

新型冠状病毒感染的发病机制是一个多因素的复杂过程。T 淋巴细胞的进行性下降和细胞因子风暴的出现是 COVID-19 患者重要的免疫学特征,动态观察 COVID-19 患者各项实验室及免疫功能指标对评估机体免疫状态、早期识别机体炎症状态及监测疗效均具有重要意义。

参考文献

- [1] Huang C. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China [J]. *Lancet*, 2020, 395: -. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30183-5.
- [2] Xu X, Yu C, Qu J, et al. Imaging and clinical features of patients with 2019 novel coronavirus SARS-CoV-2 [J]. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2020, 47 (5): 1275-1280. DOI: 10.1007/s00259-020-04735-9.
- [3] Coronavirus disease 2019 (COVID-19) Situation Report-83, World Health Organization.
- [4] Cao X. COVID-19: immunopathology and its implications for therapy [J]. *Nat Rev Immunol*, 2020, DOI: 10.1038/s41577-020-0308-3.
- [5] Zheng M. Functional exhaustion of antiviral lymphocytes in COVID-19 patients [J]. *Cell Mol Immunol*, 2020: -. DOI: 10.1038/s41423-020-0402-2.
- [6] Runfeng L. Lianhuaqingwen exerts anti-viral and anti-inflammatory activity against novel coronavirus (SARS-CoV-2) [J]. *Pharmacol Res*, 2020: -. DOI: 10.1016/j.phrs.2020.104761.
- [7] 国家卫生健康委员会办公厅,国家中医药管理局办公室. 新型冠状病毒感染的肺炎诊疗方案(试行第七版) [J]. *全科医学临床与教育*, 2020, 18(2): 100-105. DOI: 10.13558/j.cnki.issn1672-3686.2020.002.002
- [8] Zhang Y, Xiao M, Zhang S, et al. Coagulopathy and Antiphospholipid Antibodies in Patients with Covid-19 [J]. *N Engl J Med*, 2020, DOI: 10.1056/NEJMc2007575.
- [9] Han H, Yang L, Liu R, et al. Prominent changes in blood coagulation of patients with SARS-CoV-2 infection [J]. *Clin Chem Lab Med*, 2020, DOI: 10.1515/cclm-2020-0188.
- [10] Chen X, et al. Restoration of leukomonocyte counts is associated with viral clearance in COVID-19 hospitalized patients. Preprint at medRxiv <https://doi.org/10.1101/2020.03.03.20030437> (2020).
- [11] Xu Z. Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome [J]. *Lancet Respir. Med.*, 2020, 8: -. DOI: 10.1016/S2213-2600(20)30076-X.
- [12] Prompetchara E, Ketloy C, Palaga T. Immune responses in COVID-19 and potential vaccines: Lessons learned from SARS and MERS epidemic [J]. *Asian Pac J Allergy Immunol*, 2020, 38(1): 1-9. DOI: 10.12932/AP-200220-0772.

(下转第 714 页)

· 论 著 ·

非小细胞肺癌患者 *ALK*、*ROS1* 及 *BRAF-V600E* 基因突变与临床特征的相关性

李华芳*

[摘要] 目的 研究分析非小细胞肺癌(NSCLC)患者中 *ALK*、*ROS1* 及 *BRAF-V600E* 基因的突变状态,分析其突变率与患者的年龄、性别、吸烟史、组织学分型等临床病理特征的关系,为精准治疗提供依据。方法 采用PCR方法检测1042例NSCLC患者 *ALK*、*ROS1* 及114例NSCLC患者 *BRAF-V600E* 基因突变情况,并分析基因突变与患者临床病理特征的关系。结果 在1042例NSCLC患者中,*ALK* 和 *ROS1* 基因融合突变阳性率分别为3.84%和1.54%,其中女性患者阳性率分别为3.86%和0.61%,男性为3.82%和2.36%;年龄 ≥ 60 岁的患者为3.04%和0.71%, < 60 岁的患者为4.77%和2.49%;吸烟者阳性率分别为4.10%和1.28%,不吸烟患者为3.68%和1.69%。114例肺腺癌患者中 *BRAF-V600E* 基因突变率为5.26%,男性5.97%,女性4.26%;年龄 ≥ 60 岁4.44%,年龄 < 60 岁5.80%;吸烟与无吸烟史的阳性率分别为3.92%和6.35%。结论 年龄是 *ALK*、*ROS1* 基因融合突变的显著相关因素,而 *ROS1* 基因突变更常见于男性患者。推荐在NSCLC患者中进行多基因联合检测,为指导临床靶向治疗提供依据。

[关键词] 非小细胞肺癌; *EML4-ALK*; *ROS1*; *BRAF-V600E*; 突变

Correlation between *ALK*, *ROS1* and *BRAF-V600E* gene mutations and clinical features in patients with non-small cell lung carcinoma

LI Huafang*

(Department of Pathology, The second people hospital of Dezhou, Dezhou, Shandong, China, 253000)

[ABSTRACT] Objective To investigate the mutation status of *ALK*, *ROS1* and *BRAF-V600E* genes in NSCLC patients, and to analyze the relationship between the mutation status and the clinicopathological characteristics of NSCLC patients. Methods PCR was used to detect *ALK*, *ROS1* in 1042 NSCLC patients and *BRAF-V600E* gene mutation in 114 NSCLC patients, and to analyze the relationship between the gene mutation and the clinicopathological characteristics of the patients. Results Among 1,042 NSCLC patients, the *ALK* and *ROS1* gene fusion mutation positive rates were 3.84% and 1.54%, of which female patients were 3.86% and 0.61%, and males were 3.82% and 2.36%. 3.04% and 0.71% of patients were ≥ 60 years old, and 4.77% and 2.49% of patients < 60 years old. The positive rates of smokers were 4.10% and 1.28%, respectively, and non-smokers were 3.68% and 1.69%. In 114 lung adenocarcinoma patients, the mutation rate of *BRAF-V600E* gene was 5.26%, male 5.97%, female 4.26%. Age ≥ 60 years old 4.44%, age < 60 years old 5.80%. The positive rates of smoking and no smoking history were 3.92% and 6.35% respectively. There was significant difference in *ALK* and *ROS1* gene mutation rates among NSCLC patients of different age. Conclusion Age is a significant related factor for *ALK* and *ROS1* gene fusion mutations, and *ROS1* gene mutations are more common in male patients. It is recommended to carry out multi-gene joint detection in NSCLC patients to provide a basis for guiding clinical targeted therapy.

[KEY WORDS] Non-small cell lung carcinoma; *ALK*; *ROS1*; *BRAF-V600E*; Mutation

作者单位:德州市第二人民医院病理科,山东,德州 253000

*通信作者:李华芳, E-mail: dzlihf@163.com

肺癌是世界范围内发病率和病死率最高的恶性肿瘤之一,同时还是男性癌症死因中的首位^[1]。非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)约占所有肺癌的85%,大约有三分之二的NSCLC患者在确诊时已无根治性手术的机会^[2]。由于他们的治疗方案有限,预后差,生存率低^[3]。近年来,以分子靶向治疗为核心的个体化治疗逐渐成为NSCLC治疗的研究热点。以EGFR-TKI为代表的小分子酪氨酸蛋白激酶(PTK)抑制剂的应用,极大程度改善了NSCLC患者的预后。在美国国家综合癌症网络(NCCN)“非小细胞肺癌精准治疗(2019V1)”中,非小细胞肺癌指南专家组强烈建议进行广泛的分子检测,其目的在于识别罕见的驱动突变;因此,本文探讨NSCLC中间变性淋巴瘤激酶(Anaplastic lymphomakinase, ALK)和原癌基因蛋白酪氨酸激酶(ROS proto-oncogene 1 receptor tyrosine kinase, ROS1)基因融合及鼠类肉瘤滤过性病毒致癌基因同源体B1(V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B, BRAF)V600E基因突变情况,分析其与临床病理特征(性别、年龄、吸烟史、组织学分型)的相关性,为促进NSCLC靶向治疗的进展,改善患者的预后提供一定的数据支持。

1 材料与方法

1.1 一般资料

收集本院2015年9月1日至2019年9月1日期间NSCLC的病例。排除经免疫组化标记仍未能明确组织学类型的或活检标本中肿瘤细胞数量较少、难以保证结果准确性的病例后,最终有1 042例患者的石蜡包埋组织纳入研究。其中男性550例,女性492例;年龄 ≥ 60 岁560例,年龄 < 60 岁482例;其中贴壁为主型腺癌492例,实性腺癌为主型252例,腺泡型腺癌为主型200例,粘液性腺癌47例,腺泡型伴微乳头型腺癌51例。所有病理组织标本均应用10%中性缓冲福尔马林固定,石蜡包埋,蜡块资料保存完整。所有病例均进行了ALK及ROS1融合基因的检测,其中选取2018年以后的114例进行了BRAF-V600E的检测。

1.2 方法

采用人类ALK基因融合(生产批号11219041601X 11219032101X 11220010201X)和人类ROS1基因融合联合检测试剂盒(生产批号11219073102X 11219061202X),人类BRAF基因

V600E突变检测试剂盒(生产批号11219090401Z 11219090201Z),均购自厦门艾德生物医药科技技术有限公司。取10片5 μm 厚度的蜡卷脱蜡后加入蛋白酶K液及Buffer RTL进行组织裂解,按核酸提取试剂说明书操作方法及步骤进行RNA及DNA的提取。并通过ARMS-PCR方法进行ALK、ROS1和BRAF-V600E基因的检测,每一批次实验均设阴、阳性对照,所用仪器为美国IBM7500实时荧光定量PCR,具体操作程序参考说明书,数据使用其配套版软件进行分析。

1.3 统计学分析

运用计算机软件SPSS 22.0进行统计分析,计数资料用 $n(\%)$ 表示,采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ALK基因检测结果及其与临床病理特征的关系

ALK基因融合检测结果显示年龄 ≥ 60 岁的患者ALK基因融合阳性率低于年龄 < 60 岁患者,差异有统计学意义($P < 0.05$);而年龄 < 51 岁NSCLC患者的ALK重排的概率低于年龄 < 41 岁患者中ALK重排概率;男女性在性别及是否吸烟及组织学亚型之间比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表1。

2.2 ROS1基因检测结果及其与临床病理特征的关系

ROS1基因融合突变在性别及年龄上的比较,差异均具有统计学意义($P < 0.05$);而与是否吸烟无相关性,差异无统计学意义($P > 0.05$)。在组织学分型中更常见于腺泡型腺癌和微乳头状腺癌。见表2。

2.3 BRAF-V600E基因检测结果及其与临床病理特征的关系

BRAF-V600E检测结果显示年龄 ≥ 60 岁患者的BRAF-V600E突变阳性率低于年龄 < 60 岁阳性率,BRAF-V600E基因突变与性别、年龄及有无吸烟史无相关性,差异无统计学意义($P > 0.05$),见表3。

3 讨论

据国家癌症中心2019年公布的全国癌症统计数据显示,肺癌的发病率和死亡率仍然居所有恶性肿瘤之首^[4]。近年来,随着分子医学的进展和靶向

表1 ALK 基因突变与临床特征的相关性 [n(%)]

Table 1 Correlation between mutations of ALK gene and clinical features [n(%)]

| 特征 | n | ALK 突变型 | ALK 野生型 | χ ² 值 | P 值 |
|-------------|-------|----------|---------------|------------------|------|
| 总病例数 | 1 042 | 40(3.84) | 1 002(96.16%) | | |
| 性别 | | | | 2.02 | 0.16 |
| 男 | 550 | 21(3.82) | 529(96.18) | | |
| 女 | 492 | 19(3.86) | 473(96.14) | | |
| 年龄 | | | | 6.25 | 0.01 |
| ≥60 | 560 | 17(3.04) | 543(96.96) | | |
| <60 | 482 | 23(4.77) | 459(95.23) | | |
| 吸烟与否 | | | | 0.031 | 0.86 |
| 吸烟 | 390 | 16(4.10) | 374(95.90) | | |
| 不吸烟 | 652 | 24(3.68) | 628(96.32) | | |
| 组织学类型 | | | | 2.35 | 0.72 |
| 贴壁为主型 | 492 | 18(3.66) | 474(96.34) | | |
| 实性腺癌为主 | 252 | 11(4.37) | 241(95.63) | | |
| 腺泡型腺癌 | 200 | 9(4.50) | 191(95.50) | | |
| 粘液型腺癌 | 47 | 0(0.00) | 47(100.00) | | |
| 腺泡型腺癌伴微乳头腺癌 | 51 | 2(3.92) | 49(96.08) | | |

表2 ROS1 基因突变与临床特征的相关性 [n(%)]

Table 2 Correlation between mutations of ROS1 gene and clinical features [n(%)]

| 特征 | n | ROS1 突变型 | ROS1 野生型 | χ ² 值 | P 值 |
|-------------|-------|----------|--------------|------------------|------|
| 总病例数 | 1 042 | 16(1.54) | 1 026(98.46) | | |
| 性别 | | | | 4.19 | 0.04 |
| 男 | 550 | 13(2.36) | 537(97.64) | | |
| 女 | 492 | 3(0.61) | 489(99.39) | | |
| 年龄 | | | | 4.29 | 0.04 |
| ≥60 | 560 | 4(0.71) | 556(99.29) | | |
| <60 | 482 | 12(2.49) | 470(97.51) | | |
| 吸烟与否 | | | | 0.06 | 0.80 |
| 吸烟 | 390 | 5(1.28) | 385(98.70) | | |
| 不吸烟 | 652 | 11(1.69) | 641(98.31) | | |
| 组织学类型 | | | | 33.85 | 0.00 |
| 贴壁为主型 | 492 | 3(0.61) | 489(99.39) | | |
| 实性腺癌为主 | 252 | 1(0.40) | 251(99.60) | | |
| 腺泡型腺癌 | 200 | 7(3.50) | 193(96.50) | | |
| 粘液型腺癌 | 47 | 0(0.00) | 47(100.00) | | |
| 腺泡型腺癌伴微乳头腺癌 | 51 | 5(9.80) | 46(91.20) | | |

药物的不断研发,肿瘤的治疗已进入到“个体化”医疗时代。NSCLC 研究热点更偏向对肿瘤携带的复杂基因突变进行系统的分子分型。准确检测 EGFR、ALK、ROS1、BRAF 等肺癌驱动基因的存在状态,可为 NSCLC 患者的靶向用药治疗提供必要依据。

表3 BRAF-V600E 基因突变与临床特征的相关性

Table 3 Correlation between mutations of BRAF-V600E and clinical features

| 特征 | n | BRAF-V600E 突变型(%) | BRAF-V600E 野生型(%) | χ ² 值 | P 值 |
|-------|-----|-------------------|-------------------|------------------|------|
| 总病例数 | 114 | 6(5.26) | 108(94.74) | | |
| 性别 | | | | 0.00 | 1.00 |
| 男 | 67 | 4(5.97) | 63(94.03) | | |
| 女 | 47 | 2(4.26) | 45(95.74) | | |
| 年龄 | | | | 0.01 | 0.69 |
| ≥60 | 45 | 2(4.44) | 43(95.56) | | |
| <60 | 69 | 4(5.80) | 65(94.20) | | |
| 有无吸烟史 | | | | 0.02 | 0.69 |
| 有 | 51 | 2(3.92) | 49(96.08) | | |
| 无 | 63 | 4(6.35) | 59(93.65) | | |

ALK 基因定位于染色体 2p23 带,其编码的 ALK 是胰岛素受体家族中成员,正常表达于神经系统。在 NSCLC 患者中 ALK 基因断裂后主要和活化的 EML4 gene 融合,通过 PIK3/AKT、MAPK/JAK/STAT3 等多条信号传导通路参与抑制细胞凋亡,促进细胞增殖。

国内杨衿记^[5]等综合了全球 17 个实验结果得出,在未经选择的 NSCLC 患者中,EML4-ALK 基因融合的发生率为 0.4%~11.7%。东方人的阳性率为 4.1%。在年轻 NSCLC 患者中,发生 ALK 基因融合的概率高,在年龄<51 岁的患者中,发生 ALK 融合的概率高达 18.5%^[6]。研究结果与上述报道一致^[7]。有文献报道 ALK 基因融合情况多见于男性肺腺癌患者。在不吸烟或少吸烟的相对年轻的患者中阳性检出率较高^[8]。而也有报道吸烟不是 ALK 融合基因的显著影响因素^[7]。据文献报道 ALK 基因融合患者病理组织学类型常见于腺泡型腺癌、实性腺癌、粘液癌及印戒细胞癌,常见于年轻的肺腺癌患者,发现时常为晚期^[9]。

有研究表明 ALK 可能是 NSCLC 患者的独立预后因素^[10]。临床试验显示克唑替尼对于 ALK 阳性的晚期 NSCLC 患者,疗效优于传统化疗,二线单药治疗患者有效率达到 65.3%,中位无进展生存期(PFS)为 7.7 个月^[9]。回顾性研究显示,克唑替尼后续治疗患者中位 PFS 达 17.4 个月,中位总生存期达 49.4 个月^[9]。本组有随访资料的 ALK 患阳性患者 15 人接受克唑替尼治疗后,13 人相关症状明显得到改善,如咳嗽、呼吸困难减轻,胸水逐渐减少,转移灶消失,原发肿瘤病灶明显缩小;整体生

活质量得到改善。但由于随访病例少且随访时间短,尚需继续跟踪随访以获取更多的数据。

ROS1 基因重排代表一类新的独特的 NSCLC 分子亚型^[11],有文献报道 *ROS1* 融合基因在 NSCLC 中的阳性率为 1.0%~3.4%^[12],*ROS1* 基因重排与 *ALK* 基因融合的 NSCLC 患者在临床特征上有明显吻合,而且亚洲患者占多数。CAI W 等^[13]等发现在中国人群中 *ROS1* 重排阴性的患者相比阳性患者有一个相对好的预后。但是属于小样本范围内的比较,且未能在两组患者间发现吸烟史、性别及年龄上的差异。有研究认为,阳性多见于年轻、不吸烟、组织学低分化的肺腺癌患者^[14],组织成分中腺泡状和/或乳头状成分显著。

BRAF 是一种编码丝氨酸/苏氨酸特异性激酶,属于 *RAF* 家族。*RAF* 是 RAS-RAF-MEK-ERK 信号转导通路中的重要成员,它与 *ERFR*、*ALK* 等均属于 *PTK* 家族,在肿瘤细胞增殖、分化和凋亡等方面发挥重要作用^[15]。*BRAF* 最常见的突变位点为 *BRAF-V600E*,其突变将导致转导通路改变和激酶活性增加,进而导致肿瘤的产生及转移^[16]。Karbel HAE^[17]在 9.3% 的 NSCLC 患者中发现了 *BRAF-V600E* 突变,Willenbacher E^[18]等的研究显示,*BRAF-V600E* 突变更常见于吸烟者。既往研究表明 *BRAF-V600E* 突变预后差^[19]。有研究显示 *BRAF-V600E* 突变的高度特异性与 EGFR 酪氨酸激酶抑制剂的反应呈负相关,在组织学上往往伴有更具有侵袭性的组织学类型出现,如微乳头状癌成分^[17]。研究结果显示,有 3 例伴有不同数量的微乳头状癌成分,其中两例以微乳头状癌成分为主,由于缺乏相关的随访资料,无法证实其预后与野生型的差异。*BRAF-V600E* 突变一般预示着肿瘤更具有侵袭性,与不良预后相关^[20]。因此,*BRAF-V600E* 可能成为 NSCLC 新的治疗靶点。但对于肺腺癌 *BRAF* 基因突变的研究仅限于 *V600E*,其他 *BRAF* 基因突变位点目前尚未能知,并且 *BRAF* 基因突变对 NSCLC 治疗预测和预后的机制与作用,都值得进一步探讨。

综上所述,在靶向治疗前,多基因联合检测具有重要意义,一方面与以往的单独检测比较节约了组织并且提高了检测效率,另一面可以为 NSCLC 的个体化靶向治疗提供更多的临床依据。

参考文献

- [1] Lei L, Wang WX, Yu ZY, et al. A Real-World Study in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer with KRAS Mutations [J]. *Transl oncol*, 2020, 13(2): 329-335.
- [2] 佳浓,于冠宇,韩一平.非小细胞肺癌驱动基因与临床病理及预后的关系[J].*热带医学杂志*,2018,18(1):28-31+35.
- [3] Miller KD, Nogueira L, Mariotto AB, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2019[J]. *CA Cancer J Clin*, 2019, 69(5): 363-385.
- [4] 郑荣寿,孙可欣,张思维,等.2015年中国恶性肿瘤流行情况分析[J].*中华肿瘤杂志*,2019,41(1):19-28.
- [5] 杨衿记,张绪超,江本元,等.EML4-ALK融合基因为靶点的晚期NSCLC个体化治疗研究进展[J].*癌症进展*,2010,8(6):538-545.
- [6] Hong S, Fang W, Hu Z, et al. A large-scale cross-sectional study of ALK rearrangements and EGFR mutations in non-small-cell lung cancer in Chinese Han population [J]. *Sci rep*, 2014, 4(1): 7268.
- [7] Rodig SJ, Mino-Kenudson M, Dacic S, et al. Unique clinicopathologic features characterize ALK-rearranged lung adenocarcinoma in the western population [J]. *Clin cancer res*, 2009, 15(16): 5216-5223.
- [8] Barlesi F, Mazieres J, Merlio JP, et al. Routine molecular profiling of patients with advanced non-small-cell lung cancer: results of a 1-year nationwide programme of the French Cooperative Thoracic Intergroup (IFCT) [J]. *Lancet*, 2016, 387(10026): 1415-1426.
- [9] Gainor JF, Tan DS, De Pas T, et al. Progression-Free and Overall Survival in ALK-Positive NSCLC Patients Treated with Sequential Crizotinib and Ceritinib [J]. *Clin cancer res*, 2015, 21(12): 2745-2752.
- [10] Blakely CM. Interpretation of ceritinib clinical trial results and future combination therapy strategies for ALK-rearranged NSCLC [J]. *Expert rev anticancer ther*, 2019, 19(12): 1061-1075.
- [11] Digumarthy SR, Mendoza DP, Lin JJ, et al. Computed Tomography Imaging Features and Distribution of Metastases in ROS1-rearranged Non-Small-cell Lung Cancer [J]. *Clin lung cancer*, 2020, 21(2): 153-159.
- [12] Landi L, Chiari R, Tiseo M, et al. Crizotinib in Deregulated or Rearranged Pretreated Non-Small Cell Lung Cancer (METROS): A Phase II, Prospective, Multicenter, Two-Arms Trial [J]. *Clin cancer res*, 2019, 25(24): 7312-7319.
- [13] CAI W, LI X, SU C, et al. ROS1 fusions in Chinese patients with non-small-cell lung cancer [J]. *Ann oncol*, 2013, 24(7): 1822-1827.
- [14] Rimkunas VM, Crosby KE, Li D, et al. Analysis of receptor tyrosine kinase ROS1-positive tumors in non-small cell lung cancer: identification of a FIG-ROS1 fusion [J]. *Clin cancer res*, 2012, 18(16): 4449-4457.

(下转第719页)

· 论 著 ·

液相芯片技术检测地中海贫血国家参考品

张文新¹ 林卫萍² 孙楠¹ 高飞¹ 孙晶¹ 黄杰^{1*} 曲守方^{1*}

[摘要] **目的** 采用基于液相芯片技术的地中海贫血(α/β 型)基因检测试剂盒,对地中海贫血核酸检测国家参考品进行检测,评价该技术方法试剂盒的质量。**方法** 对32例地中海贫血核酸国家参考品进行PCR扩增,将PCR产物杂交后,使用Luminex Magpix平台进行地中海贫血基因突变的检测,通过判断其检测结果与国家参考品是否一致来评估该方法检测国家参考品的准确性。**结果** 32例国家参考品检测结果准确,试剂盒检测范围内的国家阳性参考品均为相应基因型别,范围外的国家阳性参考品和国家阴性参考品均为野生型,检测限不高于25ng。**结论** 基于液相芯片技术的地中海贫血(α/β 型)基因检测试剂盒(PCR-流式荧光杂交法),完善了地中海贫血基因突变的检测方法,能够符合地中海贫血核酸检测国家参考品的要求。

[关键词] 液相芯片技术;地中海贫血;国家参考品;突变

Detecting national reference material for thalassemia by liquichip technology

ZHANG Wenxin¹, LIN Weiping², SUN Nan¹, GAO Fei¹, SUN Jing¹, HUANG Jie^{1*}, QU Shoufang^{1*}

(1. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing, China, 100050; 2. Daan Gene Co., Ltd. Of Sun Yat-Sen University, Guangzhou, Guangdong, China, 510665)

[ABSTRACT] **Objective** To evaluate the quality of the kit, the national reference material for thalassemia detected by the thalassemia (α/β type) gene detecting kit based on liquichip technology. **Methods** PCR amplification was performed on 32 cases of thalassemia national nucleic acid reference materials, after hybridization of PCR products, the mutation of thalassemia genes was detected using the Luminex Magpix platform. The accuracy of this method was evaluated by whether the test results were consistent with the national reference materials. **Results** The results of 32 samples were all consistent with the original types. The results of the national positive reference within the detection range of the kit were the corresponding genotype. The results of the national negative reference and the national positive reference beyond the detection range of the kit were wild-type. The limit of detection was not higher than 25ng. **Conclusion** The liquichip technology could further improve the gene detection method of thalassemia disease and meet the requirements of national reference material for thalassemia.

[KEY WORDS] Liquichip Technology; Thalassemia; National Reference Material; Mutation

遗传性血红蛋白疾患,包括地中海贫血和镰状细胞疾病,是全球最常见的单基因病之一。地中海贫血是一种人类单基因疾病,根据致病机制的不同,分为 α -地中海贫血以及 β -地中海贫

血^[1-2]。 α -地中海贫血由位于16号染色体上的 α 珠蛋白基因发生缺失、插入、突变、重排等因素导致, β -地中海贫血由位于11号染色体上的 β 珠蛋白基因缺失、插入、突变、重排等因素导致,基因变

基金项目:国家重点研发专项(2016YFC1000300)

作者单位:1. 中国食品药品检定研究院,北京 100050

2. 中山大学达安基因股份有限公司,广东,广州 510665

*通信作者:黄杰, E-mail: jhuang5522@126.com; 曲守方, E-mail: qushoufang@126.com

注:张文新和林卫萍共为第一作者

异导致 α 与 β 珠蛋白基因的不平衡表达,是形成地中海贫血的主要病因^[3-6]。

产前基因筛查是目前预防地中海贫血的主要手段。地中海贫血(α/β 型)基因检测试剂盒的原理是基于液相悬浮阵列技术(suspension array),即国内常称的液相芯片。它的核心技术就是采用被编码的微球取代了常规基因芯片的固相载体,每个检测用的具有生物识别功能的分子对应一种编码的微球,可以在一个体系实现多种基因突变位点检测。它具有生物芯片的高通量、高集成、微型化、连续化和自动化等优点,还具有液相反应的高敏感性、高重复性、检测线性范围宽、反应快速等优点,并且该方法操作简便、快捷、样品用量少。其检测原理示意图。见图1、图2。

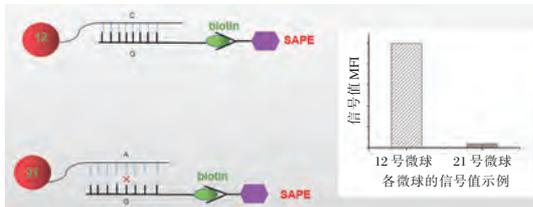


图1 α/β 型点突变位点微球检测原理示意图
Figure 1 The microsphere detection principle of α/β mutations

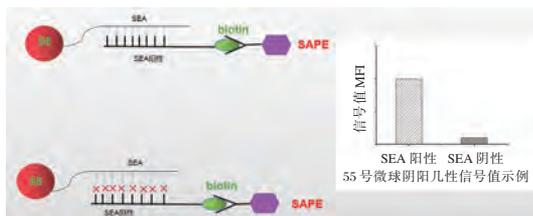


图2 α 型缺失位点微球检测原理示意图
Figure 2 The microsphere detection principle of α -deletions

本研究使用液相芯片技术对来自中国食品药品检定研究院提供的地中海贫血核酸检测国家参考品进行检测,用于评价该技术方法试剂盒的质量。

1 材料与方法

1.1 研究对象

中国食品药品检定研究院提供的32例地中海贫血核酸检测国家参考品的DNA。

1.2 仪器与试剂

Applied Biosystems Veriti Dx 热循环仪购自美国赛默飞世尔科技公司;Luminex Magpix 仪器

购自美国Luminex公司;地中海贫血(α/β 型)基因检测试剂盒(PCR-流式荧光杂交法)由中山大学达安基因股份有限公司提供;地中海贫血核酸检测国家参考品由中国食品药品检定研究院提供。

1.3 方法

1.3.1

将样本稀释至 $12.5 \text{ ng}/\mu\text{L}$,严格按地中海贫血(α/β 型)基因检测试剂盒(PCR-流式荧光杂交法)说明书进行PCR扩增、杂交、显色等步骤。

1.3.2 检测

具体操作为:①运行xponet4.2软件,打开Plate Heater,使之加热到 55°C 。②打开Samples选项,点击Create New Samples输入样品信息。③将孵育后的反应物转移到Magpix设备上,并点击“run”读取Net MFI。

1.3.3 结果判读

根据试剂盒说明书对检测结果进行判读。

2 结果

2.1 野生型位点信号值以及N/M值分布情况(非缺失型)

野生型位点信号值以及N/M值分布情况(非缺失型)。见表1。所有野生型位点检测结果均与国家参考品结果一致。

2.2 阳性位点信号值以及N/M值分布情况(非缺失型)

阳性位点信号值以及N/M值分布情况(非缺失型)结果见表2。各位点杂合位点比值在 $0.76\sim 1.77$ 之间,纯合型位点比值在 $0.06\sim 0.07$ 之间;各位点N/M比值均落在相应的杂合或纯合区间。经统计,所有阳性位点检测结果均与国家参考品结果一致。

2.3 缺失型信号值分布情况

缺失型样本信号值分布情况见表3。所有缺失样本检测结果均与国家参考品型别一致。

2.4 不同型别样本与微球信号值关系(非缺失型)

以IVS-II-654位点为代表,不同型别检测结果见图3。

编码为52号的微球偶联了IVS-II-654位点野生型探针(N探针),编码为62号的微球偶联了IVS-II-654位点突变型探针(M探针)。对于IVS-II

表1 样本野生型位点检测结果(非缺失型)

Table 1 Results of wild type loci in samples (non-deletion genotype)

| 位点缩写 | N 阈值 | M 阈值 | N/M 比值 | | | n | 检测结果 | |
|------------|---------|---------|--------|-----------|-------|----|-------|-------|
| | | | 野生型 | 杂合型 | 纯合型 | | N 信号 | N/M 值 |
| CD26 | ≥905 | ≥886 | ≥2.01 | 0.6~2.01 | ≤0.6 | 31 | ≥2420 | ≥3.58 |
| -28 | ≥1003.5 | ≥959 | ≥2.91 | 0.62~2.91 | ≤0.62 | 31 | ≥4712 | ≥3.1 |
| IVS-II-654 | ≥334.5 | ≥722 | ≥1.97 | 0.46~1.97 | ≤0.46 | 29 | ≥2823 | ≥3.58 |
| IVS-I-1 | ≥1599 | ≥1528.7 | ≥2.03 | 0.72~2.03 | ≤0.72 | 31 | ≥4086 | ≥4.92 |
| CD71/72 | ≥1094 | ≥886 | ≥1.94 | 0.53~1.94 | ≤0.53 | 31 | ≥3649 | ≥3.78 |
| IVS-I-5 | ≥1783 | ≥2322 | ≥2.10 | 0.69~2.10 | ≤0.69 | 31 | ≥3614 | ≥3.05 |
| CD17 | ≥812 | ≥1806 | ≥1.94 | 0.53~1.94 | ≤0.53 | 31 | ≥4516 | ≥5.84 |
| QS | ≥417 | ≥605 | ≥1.96 | 0.65~1.96 | ≤0.65 | 29 | ≥3472 | ≥3.62 |
| CAP | ≥1391 | ≥2218 | ≥1.91 | 0.54~1.91 | ≤0.54 | 31 | ≥3712 | ≥9.55 |
| CD43 | ≥712 | ≥793 | ≥2.01 | 0.64~2.01 | ≤0.64 | 30 | ≥1986 | ≥8.01 |
| Int | ≥1589 | ≥1428 | ≥2.07 | 0.75~2.07 | ≤0.75 | 31 | ≥2205 | ≥5.41 |
| CD41-42 | ≥491.5 | ≥721 | ≥1.92 | 0.59~1.92 | ≤0.59 | 30 | ≥4406 | ≥7.8 |
| CD27-28 | ≥1000 | ≥1824 | ≥1.91 | 0.45~1.91 | ≤0.45 | 31 | ≥2675 | ≥4.72 |
| CS | ≥797 | ≥1082 | ≥1.93 | 0.61~1.93 | ≤0.61 | 29 | ≥3712 | ≥5.23 |
| WS | ≥622.5 | ≥651.25 | ≥2.07 | 0.59~2.07 | ≤0.59 | 29 | ≥1369 | ≥3.15 |
| -29 | ≥1397 | ≥1707 | ≥2.1 | 0.68~2.10 | ≤0.68 | 31 | ≥1358 | ≥2.61 |
| CD14-15 | ≥403 | ≥428 | ≥1.52 | 0.52~1.52 | ≤0.52 | 30 | ≥4406 | ≥2.3 |
| -32 | ≥818.5 | ≥1248 | ≥1.98 | 0.51~1.98 | ≤0.51 | 32 | ≥2212 | ≥3.46 |
| -30 | ≥1853 | ≥1537.5 | ≥2.05 | 0.64~2.05 | ≤0.64 | 32 | ≥1843 | ≥3.93 |
| CD31 | ≥380.5 | ≥829.5 | ≥1.98 | 0.49~1.98 | ≤0.49 | 32 | ≥2977 | ≥2.25 |

表2 样本阳性位点检测结果(非缺失型)

Table 2 Results of mutant type loci in samples (non-deletion genotype)

| 样本编号 | 型别 | 位点缩写 | N 阈值 | M 阈值 | N/M 值 | | 检测结果 | | |
|------|------------------------------|------------|---------|---------|-----------|-------|------|------|-------|
| | | | | | 杂合型 | 纯合型 | N 信号 | M 信号 | N/M 值 |
| 3 | Codons26(G>A)杂合 | CD26 | ≥905 | ≥886 | 0.6~2.01 | ≤0.6 | 2745 | 2805 | 0.98 |
| 4 | -28(A>G)杂合 | -28 | ≥1003.5 | ≥959 | 0.62~2.91 | ≤0.62 | 3877 | 3022 | 1.28 |
| 5 | IVS-II-654(C>T)杂合 | IVS-II-654 | ≥334.5 | ≥722 | 0.46~1.97 | ≤0.46 | 2153 | 2066 | 1.04 |
| 9 | IVS-I-1(G>T)杂合 | IVS-I-1 | ≥1599 | ≥1528.7 | 0.72~2.03 | ≤0.72 | 4095 | 3939 | 1.04 |
| 11 | Codons 71/72(+A)杂合 | CD71/72 | ≥1094 | ≥886 | 0.53~1.94 | ≤0.53 | 3211 | 1816 | 1.77 |
| 12 | Codon 17(A>T)杂合 | CD17 | ≥812 | ≥1806 | 0.53~1.94 | ≤0.53 | 4167 | 2356 | 1.77 |
| 13 | QS125(T>C)杂合 | QS | ≥417 | ≥605 | 0.65~1.96 | ≤0.65 | 3515 | 3407 | 1.03 |
| 14 | 5'UTR +43 to +40(-AAAC)杂合 | CAP | ≥1391 | ≥2218 | 0.54~1.91 | ≤0.54 | 3735 | 2647 | 1.41 |
| 15 | Codon 43(G>T)杂合 | CD43 | ≥712 | ≥793 | 0.64~2.01 | ≤0.64 | 2340 | 3060 | 0.76 |
| 16 | Initiation codon (ATG>AGG)杂合 | Int | ≥1589 | ≥1428 | 0.75~2.07 | ≤0.75 | 2206 | 2288 | 0.96 |
| 18 | Codons 41/42(-TTCT)杂合 | CD41-42 | ≥491.5 | ≥721 | 0.59~1.92 | ≤0.59 | 3811 | 2890 | 1.32 |
| 20 | Codons 27/28(+C)杂合 | CD27-28 | ≥1000 | ≥1824 | 0.45~1.91 | ≤0.45 | 3230 | 2203 | 1.47 |
| 21 | CS142(T>C)杂合 | CS | ≥797 | ≥1082 | 0.61~1.93 | ≤0.61 | 3078 | 2475 | 1.24 |
| 22 | WS122(C>G)杂合 | WS | ≥622.5 | ≥651.25 | 0.59~2.07 | ≤0.59 | 1550 | 1736 | 0.89 |
| 24 | -29(A>G)杂合 | -29 | ≥1397 | ≥1707 | 0.68~2.10 | ≤0.68 | 2091 | 2030 | 1.03 |
| 26 | Codons 41/42(-TTCT)纯合 | CD41-42 | ≥491.5 | ≥721 | 0.59~1.92 | ≤0.59 | 190 | 2941 | 0.06 |
| 27 | Codons 14/15(+G)杂合 | CD14-15 | ≥403 | ≥428 | 0.52~1.52 | ≤0.52 | 3620 | 4574 | 0.79 |
| 29 | IVS-II-654(C>T)杂合 | IVS-II-654 | ≥334.5 | ≥722 | 0.46~1.97 | ≤0.46 | 2301 | 2717 | 0.85 |
| 30 | IVS-II-654(C>T)纯合 | IVS-II-654 | ≥334.5 | ≥722 | 0.46~1.97 | ≤0.46 | 215 | 2941 | 0.07 |

表3 样本检测结果(缺失型)

Table 3 Results of samples(deletion genotype)

| 样本编号 | 型别 | 位点缩写 | 野生型阈值 | | 杂合型阈值 | | 纯合型阈值 | | 检测结果 | |
|------|-------------------------------|------|--------------|---------------|--------------|---------------|--------------|---------------|------|---------------|
| | | | 缺失探针 | $\alpha 2$ 探针 | 缺失探针 | $\alpha 2$ 探针 | 缺失探针 | $\alpha 2$ 探针 | 缺失探针 | $\alpha 2$ 探针 |
| 5 | $\alpha\alpha/--^{SEA}$ | SEA | ≤ 852.7 | ≥ 1293 | ≥ 852.7 | ≥ 1293 | ≥ 852.7 | ≤ 1293 | 2731 | 4883 |
| 6 | $\alpha\alpha/--^{SEA}$ | SEA | ≤ 852.7 | ≥ 1293 | ≥ 852.7 | ≥ 1293 | ≥ 852.7 | ≤ 1293 | 1738 | 2714 |
| 8 | $\alpha\alpha/-\alpha^{3.7}$ | 3.7 | ≤ 612.5 | ≥ 1293 | ≥ 612.5 | ≥ 1293 | ≥ 612.5 | ≤ 1293 | 1743 | 2057 |
| 19 | $\alpha\alpha/-\alpha^{4.2}$ | 4.2 | ≤ 834.5 | ≥ 1293 | ≥ 834.5 | ≥ 1293 | ≥ 834.5 | ≤ 1293 | 940 | 1363 |
| 29 | $-\alpha^{4.2}/-\alpha^{4.2}$ | 4.2 | ≤ 852.7 | ≥ 1293 | ≥ 852.7 | ≥ 1293 | ≥ 852.7 | ≤ 1293 | 1862 | 325 |
| 30 | $\alpha\alpha/--^{SEA}$ | SEA | ≤ 852.7 | ≥ 1293 | ≥ 852.7 | ≥ 1293 | ≥ 852.7 | ≤ 1293 | 4369 | 6105 |
| 7 | $-\alpha^{3.7}/--^{SEA}$ | 3.7 | ≤ 612.5 | ≥ 1293 | ≥ 612.5 | ≥ 1293 | ≥ 612.5 | ≤ 1293 | 1133 | 395 |
| | | SEA | ≤ 852.7 | ≥ 1293 | ≥ 852.7 | ≥ 1293 | ≥ 852.7 | ≤ 1293 | 1524 | 395 |

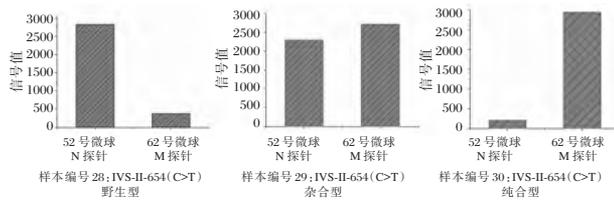


图3 IVS-II-654 位点的检测结果(非缺失型)

Figure 3 The results of IVS-II-654(non-deletion genotype)

-654 位点野生型样本,52 号微球产生信号值远大于 62 号微球;对于 IVS-II-654 位点杂合型样本,52 号微球产生信号值与 62 号微球信号值差异不大;对于 IVS-II-654 位点纯合型样本,52 号微球产生信号值远远小于 62 号微球。

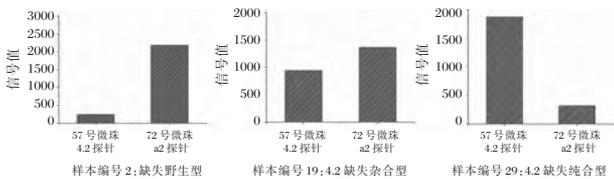


图4 4.2 缺失的检测结果(缺失型)

Figure 4 The results of 4.2 deletion (deletion genotype)

2.5 不同型别样本与微球信号值关系(缺失型)

以 4.2 缺失位点为代表,不同型别检测结果见图 4。

编码为 57 号的微球偶联了 4.2 缺失型探针(4.2 探针),编码为 72 号的微球偶联了缺失野生型探针($\alpha 2$ 探针)。对于缺失野生型样本,72 号微球产生信号值远大于 57 号微球;对于 4.2 缺失杂合型样本,57 号微球产生信号值与 72 号微球信号值差异不大;对于 4.2 缺失纯合型样本,57 号微球产生信号值远远大于 72 号微球。

3 讨论

地中海贫血主要是由珠蛋白基因异常引起的。世界上约有 4.83% 的人口携带珠蛋白变异基因,我国发病率较高的广西、广东人群中地中海贫血基因携带率为 12.22%~23.02%。目前该病尚无有效的治疗方法,因此遗传咨询、产前诊断以及在我国南方开展大人群的分子筛查作为防治该疾病的首要途径,对控制重型地贫患儿的出生,提高出生人口素质具有重要意义^[7-10]。

基因检测在地中海贫血的预防中发挥了极其重要的作用。目前临床基因检测手段主要有反向点杂交法、跨越断裂点 PCR 法(Gap-PCR)等。反向点杂交法可用时对未知样本中多个突变进行筛查大大提高了诊断效率。但缺点是操作繁琐。跨越断裂点 PCR 法,主要用于 α 地贫的基因诊断,其缺陷就是只能诊断缺失大片段缺失型样品而不能诊断点突变,且容易产生假阳性结果。

本研究基于液相芯片的技术特点,将 20 个点突变位点的野生型探针以及突变型探针分别偶联到 40 个具有特殊编码的微球中;将 4 种缺失探针(3.7, 4.2, SEA, $\alpha 2$)偶联到 4 种具有特殊编码的微球中,同时设置一个微球用于质控。在含 45 种微球的杂交体系中,利用液相芯片技术,设备将每种微球的信号一一计算,并转化为数字信号,经过运算快速实现了分型目的。

根据对地中海贫血核酸检测国家参考品中 32 例样本进行检测,结果表明:对于非缺失型,不同型别位点的 N/M 值有显著差异。以 CD41-42 位点为例,共计检测到 30 例该位点野生型的样本、1 例该位点杂合型样本、1 例该位点纯合型样本。其中

30例野生型标本的N/M值均大于或等于7.8,1例杂合型标本的N/M值为1.32,1例纯合型样本比值为0.06。结果表明,利用液相芯片平台,可以显著区分三种型别的样本,并且利用N/M值这种判读方式,可以显著修正因样本加样量增加、样本浓度波动等导致的背景信号、非特异信号升高等对结果的干扰,使检测结果准确率大大提高。对于缺失型,使用 $\alpha 2$ 探针作为内控, $\alpha 2$ 与其余三种探针相互校验,可区分杂合缺失、纯合缺失、双重缺失以及缺失野生型。

本研究对地中海贫血核酸检测国家参考品中32例样本进行检测,国家参考品的型别包括7种 α -地中海贫血基因突变类型以及18种 β -地中海贫血基因突变类型。在这32例国家参考品中,3例样本已知为野生型,6例样本已知为试剂盒检测范围外位点阳性,23例为试剂盒检测范围内位点阳性。经检测,试剂盒的结果符合国家参考品的预期结果,试剂盒检测范围内的国家阳性参考品均为相应基因型别,试剂盒检测范围内的国家阴性参考品均为野生型,准确性达100%。针对6例试剂盒检测范围外位点阳性的国家参考品,因本试剂盒并未设计这些位点的相应探针,故无检测数据输出,对这些位点是否突变阳性并不进行判读;但对于试剂盒检测范围内的位点,其检测结果均为野生型,符合国家参考品的预期结果。

本研究局限性在于无法检测一些罕见地贫大片段缺失,如泰国型(--THAI),中国型($G\gamma+(A\gamma\delta\beta)0$),东南亚型(SEA-HPFH),以及一些罕见碱基转换,如Codon37(TGG>TAG),-90(C>T)。针对目前罕见的大片段缺失,采用的方法通常为Gap-PCR法,操作繁琐,且较容易污染^[11-13]。进一步开发基于液相芯片法的试剂覆盖上述检测位点有利于推动地中海贫血产前筛查的普及率。

基于液相芯片技术的的地中海贫血(α/β 型)基因检测试剂盒,能够满足我国地中海贫血核酸检测国家参考品的要求,具有很好的质量,为地中海贫血基因检测提供了一种可靠的检测方法。

参考文献

- [1] Higgs DR, Vickers MA, Wilkie AO, et al. A review of the molecular genetics of the human α -Globin gene cluster[J]. Blood, 1989, 73(5):1081-1104.
- [2] Viprakasit V, Ekwattanakit S. Clinical Classification, Screening and Diagnosis for Thalassemia[J]. Hematol Oncol Clin North Am, 2018, 32(2):193-211.
- [3] Mettananda S, Higgs DR. Molecular Basis and Genetic Modifiers of Thalassemia[J]. Hematol Oncol Clin North Am, 2018, 32(2):177-191.
- [4] Farashi S, Hartevelde CL. Molecular basis of α -thalassemia[J]. Blood Cells Mol Dis, 2018, 70:43-53.
- [5] Zhuang J, Tian J, Wei J, et al. Molecular analysis of a large novel deletion causing α -thalassemia[J]. BMC Med Genet, 2019, 20(1):74-79.
- [6] Hassan S, Ahmad R, Zakaria Z, et al. Compound Heterozygous -30(T>C) and Cd 41/42(-TTCT) Leading to β -thalassemia Major in a Malay Autistic Patient[J]. Blood Disorders Transf, 2015, 6(1):246-248.
- [7] 李华,何旭霞.广州市黄埔区5306对夫妇孕期地中海贫血的筛查与诊断分析[J].中国妇产科临床杂志,17(1):37-39.
- [8] 周冰焱,赵文忠,李铭臻,等.广东地区16336例地中海贫血初筛阳性样本基因型分析[J].中国医药导报,2016,13(32):73-77.
- [9] Yin A, Li B, Luo M, et al. The prevalence and molecular spectrum of α - and β -globin gene mutations in 14,332 families of Guangdong Province, China[J]. PLOS ONE, 2014, 9(2):e89855.
- [10] 黎永鉴,闫丽琼,陈唯.梧州市1365对地中海贫血筛查双阳夫妇泰国缺失型 α 地中海贫血基因诊断及产前诊断结果分析[J].吉林医学,2017,38(2):317-319.
- [11] 赵文忠,罗招凡,朱志勇.1例泰国型 α -地中海贫血的实验室诊断[J].热带医学杂志,2018,18(10):1287-1288,1303.
- [12] Pongjantharasatien K, Banyatsupasin W, Pounsawat S, et al. Occurrence of the --(SEA), --(THAI) and --(FIL) α -Thalassemia-1 Carriers from a 7-Year Study at Ramathibodi Hospital, Bangkok, Thailand[J]. Hemoglobin, 2016, 40(4):283-284.
- [13] Ha Ly Thi Thanh, Huong Le Thi Thanh, Long Hoang Luong, et al. Prenatal diagnosis of a case with SEA-HPFH deletion thalassemia with whole HBB gene deletion[J]. Taiwan J Obstet Gynecol, 2018, 57(3):435-441.

中重度开放性颅脑损伤患者CRP、D-D与压力相关参数关系及预测预后价值

孔羽* 罗永刚 常天颖 刘文慧

【摘要】 目的 探讨中重度开放性颅脑损伤患者脑脊液C-反应蛋白(CRP)、D-二聚体(D-D)与压力相关参数及预测预后价值。方法 选取本院中重度开放性颅脑损伤患者122例作为研究对象,均行脑积水分流术治疗,随访28 d,根据预后情况分为预后良好组(77例)、预后不良组(45例)。对比两组手术前后脑脊液CRP、D-D、压力相关参数[脑脊液压力(CSFP)、颅内压(ICP)], Pearson相关性系数分析脑脊液CRP、D-D与CSFP、ICP关联性,受试者工作特征(ROC)曲线分析脑脊液因子预测预后的价值。结果 预后良好组术后1、3 d脑脊液CRP、D-D水平、CSFP、ICP低于预后不良组,差异有统计学意义($P<0.05$);术后1、3 d脑脊液CRP、D-D与CSFP、ICP呈正相关,差异有统计学意义($P<0.05$);术后3 d脑脊液CRP、D-D水平联合预测预后的AUC值为0.864(95%CI为0.790~0.919),敏感度为80.00%,特异度为81.82%;术后3 d脑脊液CRP、D-D高表达者生存率低于低表达者,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 中重度开放性颅脑损伤患者脑脊液CRP、D-D水平与CSFP、ICP关系密切,联合检测可为评估预后生存情况提供客观依据。

【关键词】 颅脑损伤; 脑脊液; C-反应蛋白; D-二聚体; 颅内压; 脑脊液压力

Relationship between CRP, D - D and pressure - related parameters and prognostic value in patients with moderate to severe open head injury

KONG Yu, LUO Yonggang, CHANG Tianying, LIU Wenhui

(Comprehensive ICU, The first affiliated hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan, China, 450052)

【ABSTRACT】 Objective To explore the parameters of cerebrospinal fluid C - reactive protein (CRP), D-dimer (D-D) and pressure in patients with moderate to severe open head injury and their value in predicting prognosis. Methods A total of 122 patients with moderate to severe open head injury in our hospital were selected as research subjects, and all patients were treated with shunt hydrocephalus, followed up for 28 days. According to the prognosis, they were divided into good prognosis group (77 cases) and poor prognosis group (45 cases). Cerebrospinal fluid, CRP, D-D, and pressure-related parameters [cerebrospinal fluid pressure (CSFP), intracranial pressure (ICP)] were measured and compared between the two groups before and after surgery. The Pearson correlation coefficient was used to analyze the correlation between CRP and D-D with CSFP and ICP, and the receiver operating characteristic (ROC) curve was used to analyze the value of cerebrospinal fluid factors in predicting prognosis. Results The levels of CRP, D-D and CSFP or ICP in cerebrospinal fluid at 1 and 3 days after surgery were lower in the group with good prognosis than those in the group with poor prognosis, The difference is statistically significant ($P<0.05$). CRP and D-D were positively correlated with CSFP and ICP at 1 and 3 days after surgery, The difference is statistically significant

基金项目:国家青年自然科学基金(81802781)

作者单位:郑州大学第一附属医院综合ICU,河南,郑州450052

*通信作者:孔羽, E-mail: rulin6566@163.com

($P < 0.05$). The combined CRP and D-D levels of cerebrospinal fluid at 3 days postoperatively predicted the prognosis AUC value of 0.864 (95% CI 0.790~0.919), with a sensitivity of 80.00% and a specificity of 81.82%. The survival rate of those with high expression of CRP and D-D in cerebrospinal fluid was lower than that of those with low expression at 3 days after operation ($P < 0.05$). **Conclusion** CRP and D-D levels of cerebrospinal fluid in patients with moderate to severe open head injury are closely related to CSFP and ICP, combined detection can provide an objective basis for evaluating prognosis and survival.

[KEY WORDS] Craniocerebral injury; Cerebrospinal fluid; C-reactive protein; D-dimer; Intracranial pressure; Cerebrospinal fluid pressure

颅脑损伤是神经外科多发创伤性疾病,且近年受交通事故、建筑事故频发等影响,其发生率有显著升高趋势^[1]。颅脑损伤致残率、病死率均较高,其主要原因是脑脊液循环受阻、吸收障碍等诱发脑积水,并积聚于脑室系统、蛛网膜下腔致颅内压(Intracranial pressure, ICP)异常升高,继发脑组织病理性改变^[2]。脑积水分流术是临床治疗颅脑损伤常用手术,虽能迅速恢复脑室形态,但患者预后影响因素众多。明确高危预后患者病理特征,以加强干预措施是促进病情转归的关键环节^[3]。脑脊液压力(Cerebrospinal fluid pressure, CSFP)、ICP监测可为临床评价颅脑损伤病情变化提供连续性、实时性参考依据,但其属持续性有创监测,易给患者带来不适感,且增加并发症发生风险^[4]。已有研究显示,颅脑损伤后外周血及脑脊液C-反应蛋白(C-reactive protein, CRP)、D-二聚体(D-dimer, D-D)水平平均显著升高,且升高程度与颅脑损伤严重程度关系密切^[5-6]。但当前关于脑脊液CRP、D-D与CSFP、ICP关系研究报道较少。本研究对此探讨,旨在为临床病情及预后评价提供参考。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取本院2016年6月至2019年10月颅脑损伤患者122例作为研究对象,脑积水分流术治疗,随访28d,根据预后情况分为预后良好组(77例)、预后不良组(45例)。纳入标准:①明确颅脑损伤史;②头颅CT诊断确诊;③均行脑积水分流术;④伤前两周内未应用影响凝血功能药物。排除标准:①伴严重感染性疾病者;②合并心肝肾肺等脏器功能障碍者;③伴严重多发伤、复合伤者。两组年龄、性别、体质量指数、受伤原因、受伤至手术时间一般资料均衡可比($P > 0.05$),见表1。

表1 两组一般资料比较 [$n(\%)$, ($\bar{x} \pm s$)]

Table 1 Comparison of general information between the 2 groups [$n(\%)$, ($\bar{x} \pm s$)]

| 项目 | 预后良好组 ($n=77$) | 预后不良组 ($n=45$) | t/χ^2 值 | P 值 |
|---------------------------|---------------------|---------------------|--------------|-------|
| 年龄(岁) | 47.01±6.45 | 46.83±6.29 | 0.150 | 0.881 |
| 性别 | | | 0.013 | 0.910 |
| 男 | 47(61.39) | 27(60.00) | | |
| 女 | 30(38.96) | 18(40.00) | | |
| 体质量指数(kg/m ²) | 20.89±1.01 | 21.03±0.98 | 0.747 | 0.457 |
| 受伤原因 | | | 0.251 | 0.882 |
| 交通伤 | 43(55.94) | 27(60.00) | | |
| 击打伤 | 20(25.97) | 10(22.22) | | |
| 其他 | 14(18.18) | 8(17.78) | | |
| 受伤至手术时间(h) | 6.45±1.75 | 6.80±1.38 | 1.149 | 0.253 |

1.2 方法

①入院先行腰大池引流术+CSFP、ICP监测,再行脑室-腹腔脑积水分流术,腰大池引流术选取脑科引流管(山东百多安,型号:FR4),侧卧位, L₃₋₄椎间隙实施腰椎穿刺,引流管末端三通管分别与引流袋连接引流,一次性压力感受器测CSFP;采取ICP监护仪(上海涵飞医疗器械有限公司, NIP-310型)监测CSFP、ICP,监护仪探头置硬膜外,非开颅术将探头置大脑右侧,开颅术将探头置非术侧,发际线后2.5 cm,旁开矢状线纵行2.5 cm切口,常规备皮消毒,切开头皮,钻孔,止血,探头调零设置警报值,置硬膜外固定,缝合,包扎,连接监护仪,测ICP。②脑脊液CRP、D-D检测:取脑脊液5 mL采用免疫比浊法测CRP、D-D水平。试剂盒由上海西塘生物科技有限公司提供。

1.3 观察指标

①对比预后良好组、预后不良组术前、术后1 d、3 d脑脊液CRP、D-D水平、CSFP、ICP。②分析脑脊液CRP、D-D水平与CSFP、ICP关系。③分析脑脊液CRP、D-D单独及联合预测预后的价值。④分析

不同脑脊液 CRP、D-D 水平患者生存状况。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 21.0 统计分析软件,符合正态分布的计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用 t 检验;计数资料以(%)表示,两组间比较采用 χ^2 检验。Pearson 相关性系数分析相关性;受试者工作特征(ROC)曲线分析预测价值。 $P < 0.05$ 为差异有统计

学意义。

2 结果

2.1 两组脑脊液 CRP、D-D、CSFP、ICP 水平比较

预后良好组术后 1 d、3 d 脑脊液 CRP、D-D 水平、CSFP、ICP 低于预后不良组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 手术前后脑脊液 CRP、D-D、CSFP、ICP 水平比较 [$n, (\bar{x} \pm s)$]

Table 2 Comparison of CRP, D-D, CSFP and ICP levels in cerebrospinal fluid before and after operation [$n, (\bar{x} \pm s)$]

| 时间 | 组别 | n | CRP(mg/L) | D-D($\mu\text{g/L}$) | CSFP(mmHg) | ICP(mmHg) |
|--------|-------|-----|-----------------|------------------------|------------------|------------------|
| 术前 | 预后良好组 | 77 | 0.74 \pm 0.20 | 422.71 \pm 80.31 | 12.31 \pm 2.10 | 14.17 \pm 3.28 |
| | 预后不良组 | 45 | 0.76 \pm 0.22 | 420.29 \pm 76.24 | 12.27 \pm 2.02 | 14.23 \pm 3.19 |
| | t 值 | | 0.514 | 0.164 | 0.103 | 0.099 |
| | P 值 | | 0.609 | 0.870 | 0.918 | 0.922 |
| 术后 1 d | 预后良好组 | 77 | 2.69 \pm 0.61 | 725.10 \pm 122.10 | 15.17 \pm 2.38 | 17.06 \pm 3.72 |
| | 预后不良者 | 45 | 3.17 \pm 0.72 | 863.47 \pm 139.28 | 17.21 \pm 2.57 | 21.18 \pm 4.05 |
| | t 值 | | 3.921 | 5.731 | 4.435 | 5.712 |
| | P 值 | | <0.001 | <0.001 | <0.001 | <0.001 |
| 术后 3 d | 预后良好组 | 77 | 1.72 \pm 0.43 | 610.15 \pm 108.54 | 14.29 \pm 2.11 | 15.74 \pm 3.22 |
| | 预后不良者 | 45 | 3.08 \pm 0.68 | 907.44 \pm 187.76 | 16.45 \pm 2.30 | 21.55 \pm 4.39 |
| | t 值 | | 13.537 | 11.096 | 5.277 | 8.386 |
| | P 值 | | <0.001 | <0.001 | <0.001 | <0.001 |

2.2 脑脊液 CRP、D-D 与 CSFP、ICP 关系

Pearson 相关性分析,术后 1、3 d 脑脊液 CRP、D-D 与 CSFP、ICP 呈正相关($P < 0.05$),差异有统计学意义。见表 3。

表 3 脑脊液 CRP、D-D 与 CSFP、ICP 关系

Table 3 Correlation between CRP and D-D of cerebrospinal fluid and CSFP and ICP

| 时间 | 项目 | CSFP | | ICP | |
|--------|-----|-------|-------|-------|-------|
| | | r 值 | P 值 | r 值 | P 值 |
| 术后 1 d | CRP | 0.517 | 0.003 | 0.635 | 0.009 |
| | D-D | 0.469 | 0.005 | 0.598 | 0.011 |
| 术后 3 d | CRP | 0.705 | 0.002 | 0.804 | 0.002 |
| | D-D | 0.567 | 0.014 | 0.659 | 0.018 |

2.3 脑脊液 CRP、D-D 单独及联合预测预后价值

分别绘制术后 1、3 d 脑脊液 CRP、D-D 单独及联合的 ROC 曲线,得到 AUC 值分别为术后 3 d 脑脊液 CRP、D-D 水平联合 > 术后 3 d 脑脊液 D-D > 术后 1 d 脑脊液 D-D > 术后 3 d 脑脊液 CRP > 术后 1 d 脑脊液 CRP。见表 4、图 1。

2.4 生存分析

45 例预后不良患者中,死亡 13 例,根据术后 3 d 脑脊液 CRP、D-D 均数分为高表达、低表达者。KM 曲线显示,术后 3 d 脑脊液 CRP、D-D 高表达者生存率低于低表达者($\chi^2=6.473, 5.314, P=0.011, 0.021$)。见图 2。

表 4 ROC 分析结果

Table 4 Results of ROC analysis

| 指标 | AUC | 95%CI | 截断值 | 敏感度(%) | 特异度(%) | P 值 |
|-----------------------|-------|-------------|-------------------------|--------|--------|--------|
| 术后 1 d 脑脊液 CRP | 0.696 | 0.607-0.776 | >3.31 mg/L | 42.22 | 89.61 | <0.001 |
| 术后 1 d 脑脊液 D-D | 0.797 | 0.714-0.864 | >862.16 $\mu\text{g/L}$ | 53.33 | 89.61 | <0.001 |
| 术后 3 d 脑脊液 CRP | 0.764 | 0.678-0.836 | >2.20 mg/L | 80.00 | 63.64 | <0.001 |
| 术后 3 d 脑脊液 D-D | 0.812 | 0.731-0.877 | >798.09 $\mu\text{g/L}$ | 68.89 | 79.22 | <0.001 |
| 术后 3 d 脑脊液 D-D、CRP 联合 | 0.864 | 0.790-0.919 | / | 80.00% | 81.82% | <0.001 |

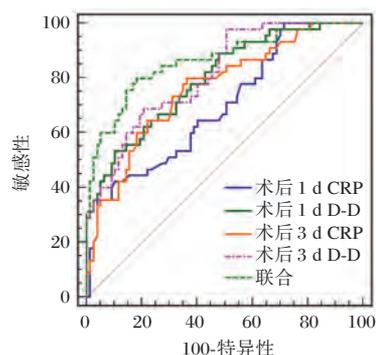


图1 脑脊液CRP、D-D单独及联合预测预后ROC曲线
Figure 1 ROC curve of CRP and D-D of cerebrospinal fluid alone and jointly predict the prognosis

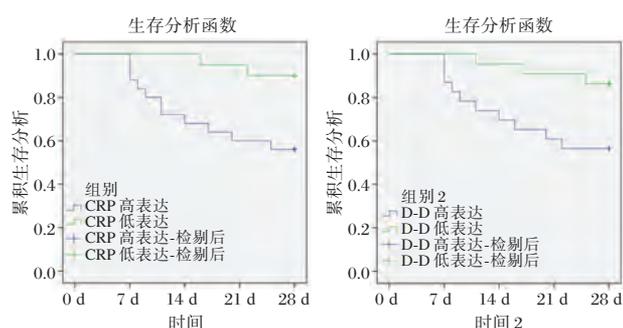


图2 生存曲线
Figure 2 Survival curve

3 讨论

颅脑损伤是外界暴力所致创伤性疾病,发病后脑积水所诱发急性ICP升高是造成患者病情恶性、预后不良,甚至死亡的主要原因之一^[7]。因此,颅脑损伤早期准确判定ICP升高并采取针对性措施对缓解病情具有重要意义。

目前临床主要采取头颅CT扫描评价颅内损伤,虽能发现各种继发脑损害,但无法实现床旁检查及连续性监测,临床应用受限^[8]。临床监测患者ICP手段主要有两种,一是手术置ICP传感器,获取ICP信息;二是腰椎穿刺术测CSFP,获得ICP。腰椎穿刺术虽简便易行,但仅可反映当时颅内压,同样难以持续性监测,且易受患者体位、配合度等影响,可能无法准确反映ICP水平^[9]。D-D是反映机体激发纤溶亢进、高凝状态的敏感指标;CRP是临床常用炎性细胞因子,可反映创伤、感染严重程度^[10-11]。本研究显示,预后良好组除CSFP、ICP低于预后不良组外,术后1、3d脑脊液CRP、D-D水平同样低于预后不良组,与学者王宝等^[12]研究结果一致,提示颅脑损伤患者存在脑脊液CRP、D-D

异常表达情况,其水平检测可为临床评价颅脑损伤程度、ICP提供新方向,且操作简便,可间断持续性监测其水平变化。CRP是一种重要的急性期反应蛋白,其在健康群体脑脊液中基本不表达,但发生颅脑损伤后脑脊液CRP水平会异常升高^[13]。有研究显示,中度、重度颅脑损伤患者伤后1d脑脊液CRP即显著升高,伤后3d可达峰值,随后降低,而重型颅脑损伤患者伤后6~8h,脑脊液CRP即显著升高,3d内可达峰值,其特异性表达可作为评价颅脑损伤严重程度的指标^[14]。D-D是一种特异性纤溶过程标记物,正常情况下机体凝血-纤溶系统维持动态平衡,但颅脑损伤会打破这种动态平衡,造成血栓形成、纤溶亢进致出血倾向;颅脑损伤后颅中血管内皮组织细胞损害,凝血活酶活性增强激活外源性凝血系统,介导血栓形成,继而引起纤溶亢进产生D-D,同时局部脑损害引起外周血D-D大量释放入脑脊液。因此,脑脊液D-D水平对ICP变化敏感性较高^[15]。结果提示脑脊液CRP、D-D水平变化与CSFP、ICP关系密切,可间接反映ICP变化,为临床评价颅脑损伤进展提供参考依据。

此外,本研究结果还显示,术后3d脑脊液CRP、D-D联合检测预测预后的AUC值最大。术后3d脑脊液CRP、D-D高表达可能与颅脑损伤患者预后不良有关,具体机制包含:①脑组织损伤后释放大量细胞因子入外周血系统,激活凝血系统^[16];②脑组织损伤继发性炎症反应,引起脑血管内皮损害,激活内源性凝血过程;③脑组织损伤常合并低体温、低血氧症及酸中毒等均会加重凝血系统紊乱;④重型颅脑损伤后炎症反应本质上是机体抗损害保护性效应,但CRP过度表达又会进一步加重脑组织细胞损害,甚至诱发全身炎症瀑布效应,形成恶性循环;⑤机体高凝状态会加重脑组织循环障碍、脑组织缺氧缺血及脑水肿,而纤溶亢进引起颅内继发性出血、脑水肿等均会造成ICP升高^[17]。颅脑损伤病情相对较轻患者,度过术后3d危险期,机体内环境趋向稳定,表现脑脊液CRP、D-D逐渐降低。因此,推测脑脊液CRP、D-D水平越高机体内环境紊乱程度越严重,预示预后不良。根据单独预测价值,选择术后3d脑脊液CRP、D-D水平进行KM曲线分析,结果显示,术后3d脑脊液CRP、D-D高表达者生存率低于低表达者符合上述推测,证实术后3d脑脊液CRP、D-D水平可应用于预后评估,为临床制定治疗方案提供参

考。因此,针对尚不具备有创监测 CSFP、ICP 医疗单位,有必要在颅脑损伤患者行脑积水分流术后持续监测脑脊液 CRP、D-D 水平,频率可结合其变化特征设定间隔 12 h 监测一次,若表达异常升高,需积极做好降 ICP 准备。

综上可知,中重度开放性颅脑损伤患者脑脊液 CRP、D-D 水平与 CSFP、ICP 呈正相关,联合检测可能对预后评价具有一定指导意义。但是由于本文涉及病例数量较少,还需要长期观察、继续研究,以完善其预测价值的研究。

参考文献

- [1] Edlow BL, Chatelle C, Spencer CA, et al. Early detection of consciousness in patients with acute severe traumatic brain injury[J]. *Brain*, 2017, 140(9):2399-2414.
- [2] Mangussi-Gomes J, Balsalobre LL, Gomes MQT, et al. In reference to intervention for elevated intracranial pressure improves success rate after repair of spontaneous cerebrospinal fluid leaks[J]. *Laryngoscope*, 2018, 128(8):E271.
- [3] Chang SI, Tsai MD, Yen DH, et al. The Clinical Predictors of Shunt-Dependent Hydrocephalus Following Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage[J]. *Turk Neurosurg*, 2018, 28(1):36-42.
- [4] Hu R, Holbrook J, Newman NJ, et al. Cerebrospinal Fluid Pressure Reduction Results in dynamic Changes in Optic Nerve Angle on Magnetic Resonance Imaging [J]. *J Neuroophthalmol*, 2019, 39(1):35-40.
- [5] Borges ÁH, O'Connor JL, Phillips AN, et al. Interleukin 6 Is a Stronger Predictor of Clinical Events Than High-Sensitivity C-Reactive Protein or D-Dimer during HIV Infection [J]. *J Infect Dis*, 2016, 214(3):408-416.
- [6] Acosta SA, Tajiri N, Sanberg PR, et al. Increased Amyloid Precursor Protein and Tau Expression Manifests as Key Secondary Cell Death in Chronic Traumatic Brain Injury: APP and secondary cell death in late TBI [J]. *J Cell Physiol*, 2017, 232(3):665-677.
- [7] Han J, Yang S, Zhang C, et al. Impact of Intracranial Pressure Monitoring on Prognosis of Patients With Severe Traumatic Brain Injury: A PRISMA Systematic Review and Meta-Analysis [J]. *Med (Baltimore)*, 2016, 95(7):e2827.
- [8] Mata-Mbamba D, Mugikura S, Nakagawa A, et al. Canadian CT head rule and New Orleans Criteria in mild traumatic brain injury: comparison at a tertiary referral hospital in Japan [J]. *Springerplus*, 2016, 5(1):176.
- [9] 张超,高国一,冯军峰,等.脑脊液压力相关参数预判颅脑损伤后脑积水分流术疗效的研究[J]. *中华神经外科杂志*, 2019, 35(2):115-119.
- [10] Sugimoto K, Suehiro E, Shinoyama M, et al. D-Dimer Elevation as a Blood Biomarker for detection of Structural Disorder in Mild Traumatic Brain Injury [J]. *J Neurotrauma*, 2017, 34(23):3245-3248.
- [11] Pfortmueller CA, Lindner G, Funk GC, et al. Role of D-Dimer testing in venous thromboembolism with concomitant renal insufficiency in critical care [J]. *Int Care Med*, 2017, 43(3):470-471.
- [12] 王宝,孙媛,宋康,等.应激性高血糖对颅脑损伤患者炎症状态和外周血乳酸、MMP-9 水平以及 28 天死亡率的影响 [J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2019, 11(1):39-43.
- [13] Dawood FZ, Judd S, Howard VJ, et al. High Sensitivity C-Reactive Protein and Risk of Stroke in Atrial Fibrillation (From the Reasons for Geographic and Racial Differences in Stroke Study [REGARDS]) [J]. *Am J Cardiol*, 2016, 118(12):1826-1830.
- [14] Li J, Wang A, Zhao X, et al. High-sensitive C-reactive protein and dual antiplatelet in intracranial arterial stenosis [J]. *Neurology*, 2018, 90(6):e447-e454.
- [15] 孙健平,王鹏飞,薛汉中,等.多发伤患者围手术期深静脉血栓形成的发生及危险因素 [J]. *中华创伤骨科杂志*, 2019, 21(1):39-43.
- [16] Maegele M, Schöchl H, Menovsky T, et al. Coagulopathy and haemorrhagic progression in traumatic brain injury: advances in mechanisms, diagnosis, and management [J]. *Lancet Neurol*, 2017, 16(8):630-647.
- [17] Ding H, Wang X, Wang H, et al. Nrf2-ARE signaling provides neuroprotection in traumatic brain injury via modulation of the ubiquitin proteasome system [J]. *Neurochem Int*, 2017, 111(1):32-44.

(上接第 700 页)

- [13] Qin C. Dysregulation of immune response in patients with COVID-19 in Wuhan, China [J]. *Clin Infect Dis*, 2020: -. DOI: 10.1093/cid/ciaa248.
- [14] Li X, Geng M, Peng Y, et al. Molecular immune pathogenesis and diagnosis of COVID-19 [J]. *J Pharm Anal*, 2020, DOI: 10.1016/j.jpha.2020.03.001.
- [15] Zhang C, Wu Z, Li JW, et al. The cytokine release syndrome (CRS) of severe COVID-19 and Interleukin-6 receptor (IL-6R) antagonist Tocilizumab may be the key to reduce the mortality [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2020: 105954. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2020.105954.

· 论 著 ·

血清 Tenascin C 及 CADILLAC 危险评分与急诊急性心肌梗死相关性研究

涂胜 王莹* 刘飞 张辉 刘娟 韩燕如 卜令同

[摘要] 目的 探讨血清腱糖蛋白 C (Tenascin C) 表达水平及 CADILLAC 危险评分与急诊急性心肌梗死相关性研究。方法 选择 2018 年 1 月至 2019 年 3 月本院心内科收治的成功行急诊经皮冠状动脉介入治疗的急性心肌梗死患者 151 例作为研究对象。并选择同期住院经冠状动脉造影排除冠心病诊断的患者 31 例作为对照组。患者在入院即刻抽取静脉血,测定血清 Tenascin C 及 NT-proBNP,且均于本院接受冠状动脉造影及支架术治疗。根据 CADILLAC 危险评分预测值将 ePCI-AMI 患者分成三组即高危组 (CADILLAC ≥ 6)、中危组 ($3 \leq \text{CADILLAC} \leq 5$) 及低危组 (CADILLAC ≤ 2),随访 1 年主要不良心血管事件的发生率,包括心源性死亡、心肌梗死和靶病变血运重建等。结果 ePCI-AMI 患者血清 Tenascin C 水平明显高于对照组 ($P=0.035$)。高危组血清 Tenascin C 水平及 CADILLAC 危险评分显著高于中、低危组,差异均有统计学意义 ($P<0.05$),中危组血清 Tenascin C 水平及 CADILLAC 危险评分显著高于低危组,差异有统计学意义 ($P<0.05$)。Tenascin C 水平及 CADILLAC 危险评分呈显著正相关 ($r=0.679, P<0.05$),尤其是在高危组具有更高的正相关 ($R=0.793, P<0.05$),1 年的临床随访显示:高危组累计 MACE 较之中、低危组更高,差异具有统计学意义 ($P<0.05$);新发心衰的发生率在数值上更高, MACE 主要来源于新发心衰及心源性死亡。结论 Tenascin C 水平及 CADILLAC 危险评分在 ePCI-AMI 患者的早期诊断中具有重要的临床意义,能够提示 ePCI-AMI 的危险程度,为不同危险程度的 ePCI-AMI 患者临床预后提供评估依据。

[关键词] 急性心肌梗死; 腱糖蛋白 C; CADILLAC 危险评分; 早期诊断; 预后评估

Serum Tenascin C and CADILLAC Risk Score and Emergency Acute Myocardial Infarction Correlation Study

TU Sheng, WANG Ying*, LIU Fei, ZHANG Hui, LIU Juan, HAN Yanru, BU Lingtong

(Department of Cardiology, Bozhou People's Hospital, Anhui Province, Bozhou, Anhui, China, 236800)

[ABSTRACT] Objective To investigate the serum level of Tenascin-C (TN-C) and CADILLAC risk score in patients with emergency acute myocardial infarction for early diagnosis and late prognostic. Methods 151 patients with acute myocardial infarction who underwent emergency percutaneous coronary intervention in the Department of Cardiology, Bozhou People's Hospital of Anhui Province were selected as the research subjects from January 2018 to March 2019. 31 patients who were excluded coronary heart disease by coronary angiography were selected as the control group during the same time. Serum tenascin C and BNP were measured from venous blood after admission. Enrolled patients were followed up during 1-year. EPCI-AMI patients were divided into three groups according to CADILLAC risk score, and the incidence of major adverse cardiovascular events, including cardiac death, myocardial infarction and target lesions revascularization were followed up for 1 year. Results The serum TN-C level of ePCI-AMI patients was significantly higher than that of the control group ($P=0.035$). The serum TN-C level and CADILLAC risk score in the high-risk group were significantly higher than those of the low/middle risk groups ($P<0.05$), TN-C level and CADILLAC risk

基金项目:国家自然科学基金(81670332);安徽省亳州市重点研发项目(bzzc2019018)

作者单位:安徽省亳州市人民医院心内科,安徽,亳州 236800

*通信作者:王莹, E-mail:tusheng77@163.com

score showed a significant positive correlation ($r=0.679$), especially in the high-risk group with a higher positive correlation ($R=0.793$). Compared with the middle/low-risk groups, 1-year clinical follow-up showed that the cumulative MACE in the high-risk group ($P<0.05$), the difference was statistically significant. The incidence of new-onset heart failure is numerically higher, and MACE mainly comes from new-onset heart failure and cardiogenic death. **Conclusion** The TN-C level and CADILLAC risk score have important clinical significance in the early diagnosis of ePCI-AMI patients, which can indicate the risk degree of ePCI-AMI and provide an evaluation basis for the clinical prognosis of ePCI-AMI patients with different risk levels.

[KEY WORDS] Acute myocardial infarction; Tenascin C; CADILLAC risk score; Early diagnosis; Prognostic assessment

急性心肌梗塞 (acute myocardial infarction, AMI) 是世界范围内死亡和残疾的主要原因之一。患者的预后由于冠脉介入技术普及及提高, 可获得高效治疗。及早和准确地检测急性心肌梗死至关重要^[1]。十八导联心电图 (18 lead ECG) 和心肌肌钙蛋白水平的测量构成了急诊科急性心肌梗死早期诊断的临床评估基础。在急性心肌梗死诊断的最初几个小时内进行常规的肌钙蛋白测定这些研究一致表明, 将心脏肌钙蛋白作为二分变量 (肌钙蛋白阴性和肌钙蛋白阳性) 的经典诊断解释似乎不再合适, 因为对肌钙蛋白阳性的急性心肌梗死的阳性预测价值仅为 50% 左右, 对 AMI 的预后评估价值不确切^[2-3]。所以亟需探讨在 AMI 的早期诊断中特异性更强, 对预后评估更好预测的生物标记物。最近, 通过开发更灵敏的心肌损伤方法, 取得了重大进展。腱糖蛋白 C (Tenascin-C, TN-C) 可以低浓度地测量高精度, 已被证明可以极大地克服心脏肌钙蛋白的敏感性不足^[4]。新近的 CADILLAC 危险评分是针对接受 PCI 治疗的 AMI 患者制定的, 而且是基于大规模试验建立的预测模型, 其能对发病后 1 年的预后风险进行评估^[5]。本研究就 TN-C 联合 CADILLAC 危险评分在 ST 段抬高心肌梗死 (STEMI) 早期诊断和预后评估方面的作用进行探讨。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选择 2018 年 1 月至 2019 年 3 月本院心内科收治的成功行急诊经皮冠状动脉介入治疗的急性心肌梗死 (Emergency Percutaneous Coronary Intervention with Acute myocardial infarction, ePCI-AMI) 患者 151 例作为研究对象。并选择同期住院经冠状动脉造影排除冠心病诊断的患者 31 例作为对照组。纳入标准: 诊断标准符合中华医学会心血管病学分会 2015 年“急性 ST 段抬高型心肌梗死诊断和治疗

指南”; 排除标准: ①妊娠女性; ②年龄 >90 岁 ③陈旧性心肌梗死、慢性心衰、严重肝肾功疾病、心肌炎、心肌病、甲亢以及其它不符合本实验研究者。本研究获得医院医学伦理委员会同意, 所有受试者 (或法定监护人) 理解试验要求和治疗程序, 在执行任何方案规定的检查或操作前签署了书面知情同意书。

1.2 方法

患者在入院即刻抽取静脉血, 测定血清 TN-C 浓度, 且均于本院接受冠状动脉造影及支架术治疗。根据 CADILLAC 危险评分预测值将 ePCI-AMI 患者分成 3 组: 高危组 ($CADILLAC \geq 6, n=60$)、中危组 ($3 \leq CADILLAC \leq 5, n=56$) 及低危组 ($CADILLAC \leq 2, n=35$), 随访 1 年主要不良心血管事件 (major adverse cardiovascular events, MACE) 的发生率, 包括心源性死亡、心肌梗死和靶病变血运重建 (target lesion revascularization, TLR) 等。

1.3 检测方法

TN-C 试剂 (批号: 1033519C4MS, 规格: 96T) 由日本 IBL 株式会社免疫生物研究所提供, 检测采用全自动生化分析仪检测 (日立 7600-020-ISE)。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析。计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用方差分析, 两组间比较采用 t 检验; 计数资料以 $n(\%)$ 表示, 采用 χ^2 或 Fisher 精确概率检验。采用 Kaplan-Meier 方法绘制各手术组的生存曲线, 各组间比较使用 Log-rank 检验。所有检验均为双尾检验, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组基线资料特征比较

两组一般特征包括糖尿病、吸烟、年龄、性别、高血压比例、外周动脉病等比较, 差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。ePCI-AMI 患者组血清 TN-C 水平

明显高于对照组,差异有统计学意义($P=0.035$)。见表1。

表1 两组基线水平特征 [$n(\%)$, ($\bar{x} \pm s$)]

Table 1 Baseline characteristics of Control of 2 groups [$n(\%)$, ($\bar{x} \pm s$)]

| 资料 | 对照组 ($n=31$) | 实验组 ($n=151$) | P 值 |
|-----------------------------|-------------------|--------------------|-------|
| 年龄(岁) | 63.35±10.54 | 62.51±11.32 | 0.583 |
| 性别(男/女) | 16/15 | 98/53 | 0.091 |
| 高血压 | 3(9.7) | 82(54.6) | 0.019 |
| 糖尿病 | 3(9.7) | 33(21.9) | 0.088 |
| 吸烟 | 8(25.8) | 51(33.8) | 0.110 |
| 外周动脉病 | 1(3.0) | 5(3.3) | 0.765 |
| HbA1c | 4.7±1.69 | 6.7±2.21 | 0.042 |
| 血肌酐($\mu\text{mol/L}$) | 70.81±24.26 | 86.62±22.91 | 0.059 |
| Killip 分级(≥ 2) | 21(100.0) | 33(21.9) | 0.000 |
| LVEF(%) | 60.36±5.32 | 49.63±8.97 | 0.029 |
| NT-proBNP(pg/mL) | 356.6±116.8 | 3939.8±2461.6 | 0.002 |
| TN-C(ng/mL) | 25.22±5.78 | 56.41±19.75 | 0.035 |

注: HbA1c=糖化血红蛋白; eGFR=肾小球滤过率; LVEF=左室射血分数; NT-proBNP=氨基末端B型利钠肽前体。

2.2 ePCI-AMI亚组基线资料特征比较

各亚组一般特征包括年龄、性别、高血压比例、糖尿病、吸烟、外周动脉病等, ePCI-AMI亚组差异均无统计学意义($P>0.05$), 实验组中三个亚组男性多见($>64\%$)。见表2。

2.3 各组病变特征和手术风险评分比较

AMI三亚组病变分布、右冠状动脉病变、支架用量、支架直径、支架长度、手术时间、造影剂用量等比较, 差异无统计学意义($P>0.05$), 三亚组在造影剂用量、术前TIMI分级比较, 差异有统计学意义($P<0.05$)。AMI亚组病变特征及手术风险评分比较。见表3。

2.4 随访结果

对151例患者完成临床随访, 其中高危组60例(100.0%)、中危组56例(100.0%), 低危组35例(100.0%)。随访1年时, 共发生MACE 40例(26.5%), 中、高危组均有心源性死亡及高危组有TLR 1例。随访1年时, AMI亚组低、中、高危组MACE的发生率分别为14.3%、26.8%、41.7%, 比较

表2 ePCI-AMI亚组病例基线水平特征 [$n(\%)$, ($\bar{x} \pm s$)]

Table 2 Baseline characteristics of subgroups in ePCI-AMI [$n(\%)$, ($\bar{x} \pm s$)]

| 变量 | 低危组($n=35$) | 中危组($n=56$) | 高危组($n=60$) | P 值 |
|-----------------------------|---------------|---------------------------|-----------------------------|-------|
| 年龄(岁) | 63.31±8.89 | 61.34±11.66 | 63.13±12.29 | 0.103 |
| <65 | 14(40.0) | 26(46.4) | 26(43.3) | 0.178 |
| ≥ 65 | 21(60.0) | 30(53.6) | 34(56.7) | 0.178 |
| 性别# | | | | |
| 男性 | 27(77.1) | 35(62.5) | 36(60.0) | 0.430 |
| 女性 | 8(22.9) | 21(37.5) | 24(40.0) | 0.430 |
| 高血压 | 19(54.3) | 30(54.6) | 33(55.0) | 0.515 |
| 收缩压(mmHg) | 132.1±15.9 | 135.6±19.5 | 139.6±19.5 | 0.748 |
| 舒张压(mmHg) | 73.2±13.3 | 75.6±11.4 | 76.2±11.4 | 0.459 |
| 糖尿病# | 8(22.9) | 11(19.6) | 14(23.3) | 0.202 |
| TC(mmol/L) | 3.92±1.19 | 4.06±1.26 | 4.34±1.31 | 0.100 |
| LDL-C(mmol/L) | 2.42±1.28 | 2.66±1.63 | 2.56±1.46 | 0.075 |
| 吸烟 | 13(37.1) | 15(26.8) | 23(38.3) | 0.468 |
| 饮酒 | 16(45.6) | 28(50.0) | 34(56.7) | 0.746 |
| 外周动脉病 | 1(2.9) | 2(3.6) | 2(3.3) | 0.691 |
| HbA1c | 6.42±2.15 | 6.61±2.03 | 6.92±1.96 | 0.219 |
| 血肌酐($\mu\text{mol/L}$) | 84.81±24.26 | 86.62±22.91 | 88.15±26.93 | 0.470 |
| eGFR(mL/min) | 89.63±12.21 | 86.84±14.29 | 83.89±12.28 | 0.143 |
| Killip 分级(≥ 2) | 4(11.4) | 12(21.4) ^a | 17(28.3) ^b | 0.041 |
| LVEF(%) | 60.4±9.89 | 53.69±10.16 | 50.62±7.89 | 0.231 |
| <40% | 3(8.6) | 10(17.9) ^a | 17(28.3) ^{ab} | 0.039 |
| NT-proBNP(pg/mL) | 656.6±116.8 | 2056.6±616.5 ^a | 5616.5±1269.8 ^{ab} | 0.019 |
| TN-C(ng/mL) | 40.27±8.59 | 56.21±16.10 ^a | 65.99±21.44 ^{ab} | 0.041 |
| CADILLAC 评分 | 1.60±0.60 | 4.16±0.78 ^a | 11.87±3.64 ^{ab} | 0.038 |

注: 低危组与中危组或高危组比较^a $P<0.05$, 中危组与高危组比较^b $P<0.05$, TC=总胆固醇; LDL-C=低密度脂蛋白胆固醇; HbA1c=糖化血红蛋白; eGFR=肾小球滤过率; LVEF=左室射血分数; NT-proBNP=氨基末端B型利钠肽前体。

表3 ePCI-AMI亚组病变特点和介入特征 [n(%), ($\bar{x}\pm s$)]

| 变量 | 低危组 (n=35) | 中危组 (n=56) | 高危组 (n=60) | P值 |
|-------------------|---------------|-------------------------|-------------------------|--------|
| 病变分布 | | | | |
| LM/LAD/D1 | 14(40.0) | 24(42.9) | 26(43.3) | 0.613 |
| LCX/OM | 10(28.6) | 20(35.7) | 19(31.7) | 0.398 |
| RCA | 11(31.4) | 12(21.4) | 9(15.0) | 0.460 |
| 三支病变 | 0(0.0) | 2(3.6) | 6(10.0) ^a | <0.001 |
| 血管支架数量 | 1.07±0.32 | 1.18±0.28 | 1.46±0.21 | 0.548 |
| 最大支架直径 (mm) | 3.59±0.33 | 3.71±0.30 | 3.65±0.38 | 0.856 |
| 支架总长度(mm) | 15.2±10.3 | 19.5±9.9 | 17.9±9.4 | 0.630 |
| 手术时间(min) | 41.5±13.3 | 48.1±21.2 | 46.61±18.6 | 0.363 |
| 造影剂总量(mL) | 88.2±10.2 | 111.5±16.6 ^a | 127.5±16.1 ^b | 0.036 |
| 术前TIMI分级 (≤2级) | 21(60.0) | 40(71.4) ^a | 46(76.7) ^a | 0.044 |
| 再灌注时间(h) | 2.1±0.6 | 2.4±0.9 | 2.2±0.4 | 0.209 |

注:低危组与中危组或高危组比较^a $P<0.05$,中危组与高危组比较^b $P<0.05$ 。

差异有统计学意义(均 $P<0.05$),见表4。TN-C水平与CADILLAC危险评分呈显著正相关($r=0.679$, $P=0.042$),尤其是在高危组具有更高的正相关性($R=0.793$, $P=0.031$),见图1。

表4 ePCI-AMI亚组随访1年临床终点事件比较 [n(%)]

| 终点事件 | 低危组 (n=35) | 中危组 (n=56) | 高危组 (n=60) | P值 |
|--------|---------------|----------------------|-----------------------|-------|
| 总MACE | 5(14.3) | 15(26.8) | 25(41.7) | 0.045 |
| 恶性心律失常 | 1(2.9) | 2(3.6) | 3(5.0) | 0.302 |
| 再发心绞痛 | 2(5.7) | 3(5.4) | 2(3.4) | 0.433 |
| 新发心衰 | 2(5.7) | 9(16.1) ^a | 10(16.7) ^a | 0.031 |
| 心源性死亡 | 0(0.0) | 1(1.8) | 2(3.3) | 0.061 |
| 心肌梗死 | 0(0.0) | 0(0.0) | 1(1.7) ^a | 0.048 |
| TLR | 0(0.0) | 0(0.0) | 1(1.7) ^a | 0.048 |

注:低危组与中危组或高危组比较^a $P<0.05$,中危组与高危组比较^b $P<0.05$,MACE=主要不良心血管事件(包括恶性心律失常、再发心绞痛、新发心衰、心源性死亡、心肌梗死和TVR);TVR=靶血管血运重建。

3 讨论

冠状动脉粥样硬化斑块的形成可以导致AMI。AMI的危险因素包括吸烟、饮酒、高血压、高脂血症、糖尿病、年龄、冠状动脉家族史等^[6]。近

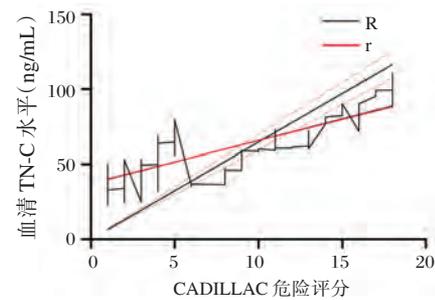


图1 ePCI-AMI患者血清TN-C水平与CADILLAC危险评分比较

Figure 1 Comparison of Serum TN-C Level and CADILLAC Risk Score in ePCI-AMI Patients

年流行病学研究表明AMI的死亡率逐年增加。因此,早期准确、快速地诊断AMI和尽早制定治疗计划可以增加AMI患者康复几率,改善预后。

传统的检测项目cTnI已被证明是AMI早期诊断的常规指标。cTnI更加敏感,比其他生物标志物更具特异性,被认为是心肌损伤的金标准^[7]。cTnI的缺陷是cTnI会在冠脉阻塞心肌坏死3~6小时后升高,并且血清浓度持续较高水平约半个月。因此,当患者胸部疼痛,很难区分是否由近期急性冠脉事件引起^[8]。

TN-C是细胞外基质成员之一,在脊椎动物中高度保守,主要在胚胎发育过程中表达,特别是在神经、骨骼和血管形成中高表达。在成年人中,TN-C在肌腱及其相关组织中的表达大大减少且仅检测到低表达。在重塑和新血管形成的过程表达增加^[9-11]。TN-C可以促进AS进展,而AMI作为AS进展、斑块由稳定变为不稳定的极端状态,TN-C在心脏组织的瞬时高水平表达与疾病的活动是密切相关的,而在正常的心肌不再表达,提示TN-C可能在AMI、炎症反应、心肌修复过程中发挥作用。在本研究,结果表明AMI中TN-C的水平组比对照组要高,与相关研究相吻合^[12]。在AMI后更早期抽血测定TN-C浓度,检测患者血清TN-C水平有助于早期识别和评估AMI。既往研究结果发现,TN-C水平较高的患者,其左室重构更加明显。血清TN-C水平成为致残率和致死率的主要预测因子,对将来发生不良心血管事件具有很好的预测价值。本研究也发现,TN-C水平与预后相关,随着TN-C水平的升高,MACE的发生率逐渐升高,提示TN-C预测MACE的价值较高。

CADILLAC 危险评分的测评最初源自 CADILLAC 队列数据库,该数据库包含大量全面的针对 PCI 数据,故目前主要用于进行 PCI 的 AMI 患者预后评估^[13]。该研究结果可以得出 TN-C 的血清浓度与 CADILLAC 危险评分呈高度相关,这对急性心肌梗死早期的诊断和预后评估方面有重要意义。但是本研究的病例数较少,可能会存在一定偏差,而且本研究只检测了患者入院即时 TN-C 水平,未能监测 TN-C 水平的动态变化。因此仍需进行多中心、大样本、更深入的研究,以进一步明确 TN-C 在 ePCI-AMI 患者近期及远期预后中的作用。

参考文献

- [1] Lim W Y, Thevarajah TM, Goh BT et al. Paper microfluidic device for early diagnosis and prognosis of acute myocardial infarction via quantitative multiplex cardiac biomarker detection[J]. Biosens Bioelectron, 2019;176-185.
 - [2] Alpert J S, Jaffe, A S. 1-h High-Sensitivity Troponin Rule-Out and Rule-In Approach: Strengths and Potential Weaknesses?[J]. J Am Coll Cardiol, 2018,72(6):633-635.
 - [3] Shanmugam N R, Muthukumar S, Tanak A S, et al. Multiplexed electrochemical detection of three cardiac biomarkers cTnI, cTnT and BNP using nanostructured ZnO-sensing platform[J]. Future Cardiol, 2018,14(2):131-141.
 - [4] Jeanne A P. Weighting the potential of using tenascin C in diagnosis and therapy of atherosclerosis[J]. Acta med Indones, 2010,42(2):104-107.
 - [5] Eugenia N, Roxana M H, Mehrdad S, et al. Prognostic impact of blood transfusion after primary angioplasty for acute myocardial infarction: analysis from the CADILLAC (Controlled Abciximab and Device Investigation to Lower Late Angioplasty Complications) Trial[J]. J Am Coll Cardiol, 2009;624-632.
 - [6] 张朝义,刘泽森,张婷玉,等. 光学相干断层扫描技术对冠心病合并糖尿病患者斑块特点的应用分析[J]. 中国循证心血管医学杂志, 2020,(1):91-94.
 - [7] Thomas F L. Chronic coronary syndromes: expanding the spectrum and natural history of ischaemic heart disease [J]. Eur Heart J, 2020,41(3):333-336.
 - [8] Veerle R, Angela M, Paul L, et al. Sex and gender-stratified risks of psychological factors for adverse clinical outcomes in patients with ischemic heart disease: A systematic review and meta-analysis[J]. Int J Cardiol, 2020;21-29.
 - [9] Paul K. Revascularization therapy in stable ischaemic heart disease: Perfusion restores, why does outcome not? [J]. Eur Heart J Cardiovasc Imaging, 2020,21(1):47-48.
 - [10] Alexander W, Milan M, Christa B, et al. EACTS/EACTA/EBCP Committee Reviewers, 2019 EACTS/EACTA/EBCP guidelines on cardiopulmonary bypass in adult cardiac surgery [J]. Eur J Cardiothorac Surg, 2020,57(2):210-251.
 - [11] 常亚伟,李赛,琚绍坦. 血管内皮生长因子基因 936C/T 位点多态性与急性心肌梗死的关系[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020,2:151-155.
 - [12] Naohide A, Hiroyuki K, Ousuke F, et al. Successful Inflammation Imaging of Non-Human Primate Hearts Using an Antibody Specific for Tenascin-C [J]. Int Heart J, 2019,60(1):151-158.
 - [13] Antoniucci D. Block the Ischemia and Reperfusion Damage [J]. J Am Coll Cardiol, 2014,63(22):2363-2364.
-
- (上接第 704 页)
- [15] 李晓锋,张冠军,汪园园,等. 非小细胞肺癌 EGFR、ALK 和 ROS1 基因联合检测及突变共存分析[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2018, 10(6): 378-384.
 - [16] Tan I, Stinchcombe TE, Ready NE, et al. Therapeutic outcomes in non-small cell lung cancer with mutations: a single institution, retrospective cohort study [J]. Transl lung cancer res, 2019, 8(3): 258-267.
 - [17] Karbel HAE, Ejam SS. Immunohistochemical Study Using Monoclonal VE1 Antibody Can Substitute the Molecular Tests for Apprehension of BRAF V600E Mutation in Patients with Non-small-Cell Lung Carcinoma [J]. Anal cell pathol (Amst), 2019;1-6.
 - [18] Willenbacher E, Willenbacher W. Clinical challenges in a patient with two BRAF V600E-mutated diseases [J]. Thorax, 2019, 74(6): 620-622.
 - [19] Lin Q, Zhang H, Ding H, et al. The association between BRAF mutation class and clinical features in BRAF-mutant Chinese non-small cell lung cancer patients [J]. J transl med, 2019, 17(1): 298.
 - [20] Li J, Sasane M, Zhang J, et al. Is time to progression associated with post-progression survival in previously treated metastatic non-small cell lung cancer with BRAF V600E mutation? A secondary analysis of phase II clinical trial data [J]. BMJ open, 2018, 8(8): e021642.

307例非缺失型 α -地贫的基因型及血液学特征分析

冼嘉嘉^{1,2} 何健淳² 王燕超² 李少英² 何文智² 马晓燕² 叶国新² 黎青² 曾军^{1*}

[摘要] **目的** 分析广州地区地中海贫血筛查人群非缺失型 α -地贫的发生率、基因突变型、构成比和临床特征。**方法** 分析本院近5年诊断为非缺失型 α -地贫的患者307例。对所有患者均行地贫基因、血常规和血红蛋白电泳检测。**结果** 307例非缺失型 α -地贫以 $\alpha\alpha^{ws}/\alpha\alpha$ 最为常见,非缺失型 α -地贫患者的MCV值与MCH值整体比正常个体低,携带 $\alpha\alpha^{qs}$ 等位基因的患者血液学临床表现最重, $\alpha\alpha^{cs}$ 较 $\alpha\alpha^{qs}$ 轻, $\alpha\alpha^{ws}$ 的表现最轻。非缺失型HbH病患者中, $--^{SEA}/\alpha\alpha^{cs}$ 与 $--^{SEA}/\alpha\alpha^{qs}$ 均出现血红蛋白H及血红蛋白Bart's条带,而 $--^{SEA}/\alpha\alpha^{ws}$ 未发现。**结论** 在非缺失型 α -地贫筛查中,实验员留意受检者的MCV值和MCH值及血红蛋白电泳结果,疑似携带者须做进一步基因检测。

[关键词] 非缺失型 α 地贫; 基因; 筛查; 血常规; 血红蛋白电泳

Genotype and hematological characteristics of 307 cases of non-deletion α -thalassaemia

XIAN Jiajia^{1,2}, HE Jianchun², WANG Yanchao², LI Shaoying², HE Wenzhi², MA Xiaoyan², YE Guoxin², LI Qing², ZENG Jun^{1*}

(1. Department of biochemistry and molecular biology, Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong, China, 511436; 2. Key Laboratory for Major Obstetric Diseases of Guangdong Province, Experimental Department of Institute of Obstetrics and Gynecology, The Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong, China, 510150)

[ABSTRACT] **Objective** To analyze the incidence, mutation type, composition ratio and clinical characteristics of non-deletion alpha-thalassaemia in thalassaemia screening population in Guangzhou. **Methods** A retrospective analysis of 307 patients diagnosed with non-deletion α -thalassaemia in our hospital from July 2014 to June 2019 were performed. The thalassaemia gene, blood routine and hemoglobin electrophoresis detected in all patients. **Results** Among the 307 non-deletion alpha-thalassaemias, the genotype of $\alpha\alpha^{ws}/\alpha\alpha$ is the most common. The MCV and MCH values of non-deletion alpha-thalassaemia patients were lower than those of normal individuals. Patients carrying the $\alpha\alpha^{qs}$ allele presented the heaviest clinical manifestations in hematology. $\alpha\alpha^{cs}$ is lighter than $\alpha\alpha^{qs}$ and $\alpha\alpha^{ws}$ performs the lightest. In patients with non-deletive HbH disease, both $--^{SEA}/\alpha\alpha^{cs}$ and $--^{SEA}/\alpha\alpha^{qs}$ showed hemoglobin H and Bart's bands, but $--^{SEA}/\alpha\alpha^{ws}$ was not found. **Conclusion** In non-deletion alpha-thalassaemia screening, laboratory technician should pay attention to the MCV and MCH values of the subjects and the results of hemoglobin electrophoresis. Once a suspected carrier is found, further genetic testing is required.

[KEY WORDS] α -Thalassaemia; Non-deletion; Genotype; Screening; Hematological values; Hemoglobin electrophoresis testing

基金项目:广州市科技计划项目(201902010005)

作者单位:1. 广州医科大学基础学院生物化学与分子生物学教研室, 广东, 广州 511436

2. 广州医科大学附属第三医院广东省产科重大疾病研究重点实验室, 妇产科研究所实验部, 广东, 广州 510150

*通信作者:曾军, E-mail: zjcycx@163.com

地中海贫血(地贫, thalassemia)是一种由于珠蛋白基因突变或者缺失导致的珠蛋白链合成减少或完全缺失所引起的遗传性慢性溶血性疾病^[1]。其中, α -地贫由 α -珠蛋白基因缺陷所致,根据基因改变类型的不同, α -地贫可分为缺失型和非缺失型,前者是由于珠蛋白基因大片段缺失所致,是主要的突变类型,后者是由于仅珠蛋白基因或其调节序列发生点突变造成的^[1-2]。广东作为地贫高发地区之一,地贫发病率达9.46%^[3],目前对于广州地区非缺失型 α -地贫基因检测的报道仍然较少。本研究旨在了解该地区的非缺失型 α -地贫的基因突变类型和构成比,以及相对应的临床和血液学特征,为明确非缺失型 α -地贫的诊断指标,完善本地区的非缺失型 α -地贫筛查提供科学的参考依据。

1 对象与方法

1.1 研究对象

2014年7月至2019年6月在本院进行地贫基因检测的患者共27 502例,其中男性12 485例,年龄0~83岁;女性15 017例,年龄0~79岁,均为广州地区患者。本研究选取其中明确诊断为非缺失型 α -地贫的307例患者作为研究对象,所有病例均排除缺铁, α 复合 β -地贫和异常血红蛋白病。所有患者及家属均已签署知情同意书。本研究经过医院伦理委员会批准。

1.2 仪器与试剂

1.2.1 仪器

血细胞分析仪(NX-9000, Sysmex, 日本),全自动毛细管电泳仪(Capillars 2 Flex Piercing, Sebia, 法国),离心机(Eppendorf 5240, 德国), PCR扩增仪(ABI9700, 美国),凝胶成像分析系统(Bio-rad, 美国),水平电泳槽及电泳仪(Bio-rad, 美国),恒温水浴箱。

1.2.2 试剂

全血基因组DNA提取试剂盒(QIAGEN, 德国),地贫基因检测试剂盒购于亚能生物技术(深圳)有限公司,试剂均为厂家原装配套试剂。

1.3 方法

1.3.1 血细胞分析

采用血细胞分析仪进行血细胞分析,送检样本在4 h内完成检测。主要观察指标为HGB、红细胞平均体积(MCV)、红细胞平均血红蛋白含量(MCH)。

1.3.2 血清铁和血清铁蛋白分析

采用化学比色法和化学发光免疫分析法分别用于血清铁(serum iron, SI)和血清铁蛋白(serum ferritin, SF)的测定。

1.3.3 血红蛋白电泳

严格按照Capillars 2 Flex Piercing全自动毛细管电泳仪的说明书进行操作,分析样本各血红蛋白组分的含量。

1.3.4 基因型分析

以DNA提取试剂盒(QIAamp DNA Blood Mini Kit)提取基因组DNA。采用跨越断裂点PCR(gap polymerase chain reaction, Gap-PCR)技术检测3种缺失型 α -地贫基因突变类型(--^{SEA}、 $\alpha^{3.7}$ 和 $\alpha^{4.2}$),采用PCR结合反向杂交(PCR-reverse dot blot, PCR-RDB)技术检测非缺失型 α -地贫基因3种常见突变类型($\alpha\alpha^{WS}$, $\alpha\alpha^{CS}$ 和 $\alpha\alpha^{QS}$),所有地贫基因诊断试剂盒均购于亚能生物技术(深圳)有限公司,具体操作按试剂盒说明进行。

1.3.5 统计学分析

使用SPSS 22.0软件对数据进行统计分析。计量资料用($\bar{x} \pm s$)表示,比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)及 t 检验。计数资料采用 n (%)表示。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 非缺失 α -地贫基因型检测结果

在27 502受检者中,检出307例非缺失型 α -地贫,非缺失型 α -地贫的发生率为1.12%。307例非缺失型 α -地贫中以 $\alpha\alpha^{WS}/\alpha\alpha$ 最为常见,占44.63%,此外,在--^{SEA}/ $\alpha\alpha^T$ 患者中,也以复合Hb WS最为常见,占6.51%,见表1。

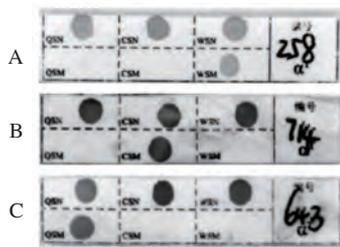
表1 307例非缺失型 α -地贫基因型分布情况 [n (%)]

Table 1 Distribution of non-deletion α -Thalassemia genotype in 307 cases [n (%)]

| 基因型 | n | 比例 |
|---|-----|------------|
| $\alpha\alpha/\alpha\alpha^{WS}$ | 307 | 137(44.63) |
| $\alpha\alpha/\alpha\alpha^{CS}$ | 307 | 79(25.73) |
| $\alpha\alpha/\alpha\alpha^{QS}$ | 307 | 43(14.00) |
| -- ^{SEA} / $\alpha\alpha^{WS}$ | 307 | 20(6.51) |
| -- ^{SEA} / $\alpha\alpha^{CS}$ | 307 | 7(2.28) |
| -- ^{SEA} / $\alpha\alpha^{QS}$ | 307 | 2(0.65) |
| $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha^{WS}$ | 307 | 8(2.61) |
| $-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha^{WS}$ | 307 | 3(0.98) |
| $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha^{CS}$ | 307 | 5(1.63) |
| $-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha^{CS}$ | 307 | 2(0.65) |
| $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha^{QS}$ | 307 | 1(0.33) |

2.2 常见非缺失型α-地贫血液学特征分析

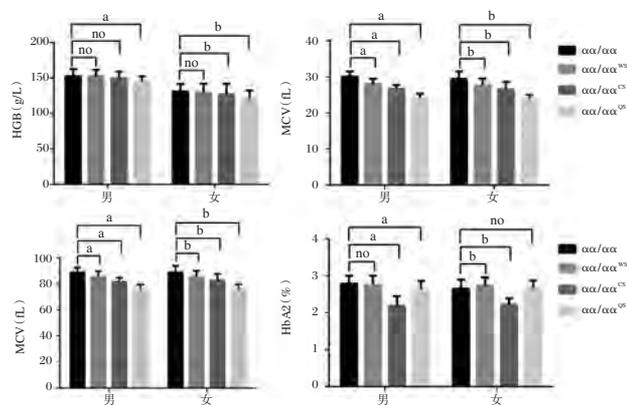
3种常见非缺失型α-地贫的杂交膜条结果(图1),血常规及血红蛋白电泳结果(图2)。男性αα^{WS}/αα组、αα^{CS}/αα组和αα^{QS}/αα组与男性对照组相比较,MCV、MCH水平均有下降,差异有统计学意义(MCV: $F=83.95, P<0.05$; MCH: $F=153.54, P<0.05$)。女性αα^{WS}/αα组、αα^{CS}/αα组和αα^{QS}/αα组与女性对照组相比较,MCV、MCH水平均有下降,差异有统计学意义(MCV: $F=64.69, P<0.05$; MCH: $F=80.05, P<0.05$)。男性αα/αα^{QS}组与男性正常组比较HGB显著性降低($t=3.272, P<0.05$),男性αα/αα^{CS}组与男性正常组比较HbA2显著性降低($t=2.565, P<0.05$),女性αα^{CS}/αα组(HbA2: $t=17.279, P<0.05$)和αα^{QS}/αα(HbA2: $t=6.295, P<0.05$)组具有同样的趋势。



注:A. αα/αα^{WS}; B. αα/αα^{CS}; C. αα/αα^{QS}。

图1 3种非缺失型α-地贫反向斑点杂交结果

Figure 1 Results of 3 non - deletion α-Thalassemia detected by reverse dot blot



注:与男性αα/αα组比较,^a $P<0.05$;与女性αα/αα组比较,^b $P<0.05$ 。

图2 3种常见αα/αα^T血液学指标分析结果

Figure 2 Results of hematological analysis of 3 kinds of common αα/αα^T

2.3 --SEA/αα^T及-α/αα^T的血液学特征分析

--SEA/αα^T及-α/αα^T的血常规及血红蛋白电泳结

果见图3。各组的HGB、MCV、MCH均有下降,--SEA/αα^{CS}的HbA2有显著的下降,而MCV出现增高的现象。--SEA/αα^{CS}与--SEA/αα^{QS}均出现血红蛋白H及血红蛋白Bart's,而--SEA/αα^{WS}未发现,见图4。在--SEA/αα^{QS}的两例患者中,有一例为新生儿。

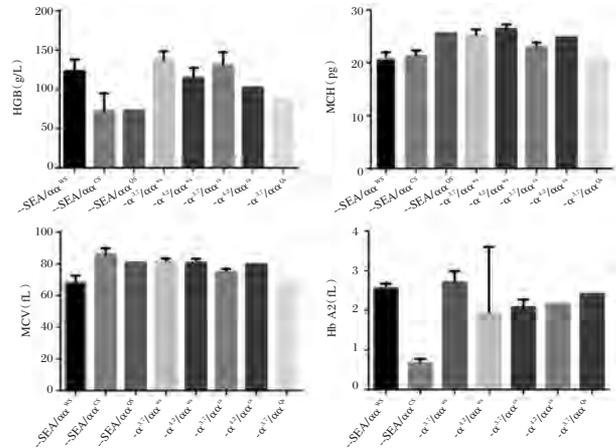


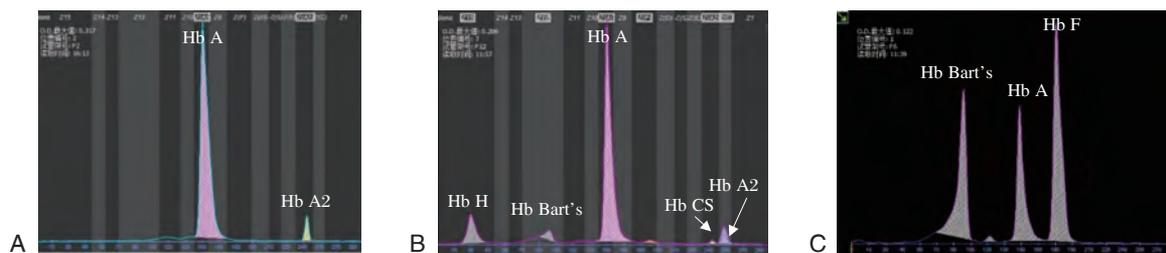
图3 --SEA/αα^T及-α/αα^T的血液学指标分析结果

Figure 3 Results of hematological analysis of --SEA/αα^T and -α/αα^T

3 讨论

非缺失型α-地贫的分子致病基础是α珠蛋白基因或其调节序列发生单碱基置换或者存在核苷酸的缺失或插入所致,通常以α^T表示累及的基因。非缺失型α-地贫的基因型,目前已报道80余种,常发生于α2基因^[4],约占α-地贫的5%,αα/αα^{CS}、αα/αα^{QS}和αα/αα^{WS}是我国目前发现较为常见的突变类型^[5]。

本文从27502受检者中,检出307例非缺失型α地贫患者,非缺失型α-地贫的发生率为1.12%。目前的文献报道有广西南宁地区^[6]、清远^[7]及中山^[8]、厦门^[9]等地方的非缺失α地贫流行病学统计数据,清远地区报道的以αα^{WS}/αα检出率最高,中山地区以αα^{QS}/αα常见,而广西南宁及厦门则以αα^{CS}/αα最为常见。本研究数据显示最常见的非缺失型α-地贫基因突变类型是αα/αα^{WS}(44.63%),其次是αα/αα^{CS}(25.73%)和αα/αα^{QS}(14.00%),与清远地区一致,但与广西南宁、中山及厦门结果存在差异,经过分析认为主要由以下几点原因导致:研究筛查的样本量存在差异,样本量少容易产生较大误差;挑选的筛查对象差异会影响阳性率,基因型频率存在明显地域差异,人群挑选的不同也导致结果不能直接进行比较。



注: A. $--^{SEA}/\alpha\alpha^{WS}$; B. $--^{SEA}/\alpha\alpha^{CS}$; C. $--^{SEA}/\alpha\alpha^{OS}$ (新生儿) A. $--^{SEA}/\alpha\alpha^{WS}$; B. $--^{SEA}/\alpha\alpha^{CS}$; C. $--^{SEA}/\alpha\alpha^{OS}$ (The newborn)。

图4 3种 $--^{SEA}/\alpha\alpha^T$ 血红蛋白电泳图

Figure 4 Hemoglobin electrophoresis of 3 kinds of $--^{SEA}/\alpha\alpha^T$

本研究针对的是在本院进行地贫筛查的所有人群,因此可补充本地区的非缺失 α 地贫流行病学数据。

从血液学指标来看, $\alpha\alpha/\alpha\alpha^{OS}$ 携带者的血液学表型相对较重些,该结果与以往报道的结果基本一致^[10]。 $\alpha\alpha/\alpha\alpha^{CS}$ 是 $\alpha 2$ 基因终止密码子的突变使mRNA转录延长至3'非翻译区,进而影响mRNA的稳定性,使其极容易被破坏; $\alpha\alpha/\alpha\alpha^{OS}$ 是 $\alpha 2$ 基因密码子125CTG变为CCG,导致翻译后产生高度不稳定的肽链,易被蛋白酶水解,以上突变均会让 α -珠蛋白链合成量减少^[2]。 $\alpha\alpha/\alpha\alpha^{WS}$ 突变也发生在 $\alpha 2$ 基因上,但其所导致的 α -珠蛋白链合成减少的影响程度较低。以上分组的HGB、MCV、MCH的结果差异说明基因突变类型对 α -珠蛋白链合成减少的程度有重要影响,影响程度低则指标趋向正常的可能性大,提示我们今后要进行地贫的全面基因筛查,血液学指标的截值也需要针对各基因型进行细化以提高初筛检出率。

HbH病分为缺失型HbH病和非缺失型HbH病,非缺失型HbH病比缺失型导致更严重的 α 珠蛋白链合成的减少,因此临床表现更为严重。Chanchai Traivaree等^[11]报道过,在泰国人群中,非缺失型HbH病患者的血液学表现比缺失型HbH病患者的血液学表现严重。本文统计了3种非缺失型HbH病的类型, $--^{SEA}/\alpha\alpha^{OS}$ 的临床表现相对较重。三种非缺失型HbH病的临床特征与《地贫预防控制操作指南》^[10]一致。但目前本研究未发现 $\alpha\alpha^{CS}/\alpha\alpha^{CS}$ 、 $\alpha\alpha^{CS}/\alpha\alpha^{OS}$ 及 $\alpha\alpha^{OS}/\alpha\alpha^{OS}$ 的纯合子患者,部分特殊基因类型样本量较少,未能全面涉及,不足以反应该类人群血液学情况,有待扩大样本量进行验证分析,以丰富数据多态性。

总的来说,在非缺失型 α -地贫筛查中,我们应密切留意受检者的MCV值和MCH值及血红蛋白电泳结果,以提示疑似携带者做进一步基因检测。

参考文献

- [1] Piel FB, Weatherall DJ. The α -thalassemias [J]. *New Engl J Med*, 2014, 371(20):1908.
- [2] Farashi S, Harteveld CL. Molecular basis of α -thalassemia [J]. *Blood Cells Mol Dis*, 2018, 70:43-53.
- [3] LAI K, HUANG G, SU L, et al. The prevalence of thalassemia in mainland China: evidence from epidemiological surveys [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):920.
- [4] 唐海深,江陵,陆林苑,等. 罕见 α -地贫的新生儿筛查与诊断 [J]. *中国产前诊断杂志(电子版)*, 2014, 6(1):13-17.
- [5] 许涓涓,丘小霞,杜娟,等. 3种少见 α 地贫点突变杂合子与双重杂合子的临床特征 [J]. *国际生殖健康/计划生育杂志*, 2014, 33(3):172-174.
- [6] 石明芳,杨兰,余夏,等. 6545例 α -地中海贫血基因检测结果分析 [J]. *检验医学*, 2019, 34(1):8-10.
- [7] 黄利华,刘冬霞,李伟明,等. 广东省清远地区人群 α -地中海贫血基因型及临床表型特点 [J]. *第三军医大学学报*, 2017, 39(6):584-588.
- [8] 陈泳珊,周小玲,何洁美. 中山地区非缺失型 α -地中海贫血基因在高危人群中的筛查结果分析 [J]. *中国实用医药*, 2016, 11(27):124-125.
- [9] 孔德佳,黄秋英,王旭东,等. 厦门地区非缺失型 α -地中海贫血流行病学调查 [J]. *中国优生与遗传杂志*, 2014, 22(10):13-15.
- [10] 徐湘民,张新华,陈荔丽. 地贫预防控制操作指南 [M]. 人民军医出版社, 2011.
- [11] Traivaree C, Boonyawat B, Monsreenusorn C, et al. Clinical and molecular genetic features of Hb H and AE Bart's diseases in central Thai children [J]. *Appl Clin Genet*, 2018, 3(11):23-30.

DNA结合抑制因子、*Rab5*基因在子宫内膜异位症患者中的表达及其意义

陈豫中¹ 赖威¹ 张国安¹ 李正英^{2*}

[摘要] 目的 探究DNA结合抑制因子2(ID2)、*Rab5*基因在子宫内膜异位症(EMS)患者中的表达及其意义。方法 以2017年6月至2019年8月本院138例EMS患者为研究组,另120例行输卵管绝育手术患者作为对照组。检测两组子宫内膜组织中*Rab5* mRNA、*ID2* mRNA表达量,采用受试者工作特征(ROC)曲线分析两者单独及联合的诊断价值。研究组按照r-AFS分期划分,比较不同病情分期患者*Rab5* mRNA、*ID2* mRNA、临床指标[血清癌胚抗原125(CA125)、子宫内膜抗体(EmAb)]水平,分析*Rab5* mRNA、*ID2* mRNA与病情分期、血清CA125、EmAb的相关性。结果 研究组子宫内膜组织中*Rab5* mRNA、*ID2* mRNA表达量高于对照组($P<0.05$);*Rab5* mRNA与*ID2* mRNA联合诊断EMS的AUC最大,为0.802,最佳诊断敏感度为78.99%,特异度为69.17%;EMS患者病情分期与*Rab5* mRNA、*ID2* mRNA表达及血清CA125、EmAb水平存在正相关关系($P<0.05$);EMS患者*Rab5* mRNA、*ID2* mRNA表达与血清CA125、EmAb水平存在正相关关系($P<0.05$)。结论 EMS患者*Rab5* mRNA、*ID2* mRNA表达异常增高,与病情分期及血清CA125、EmAb水平关系密切,可辅助临床EMS诊断。

[关键词] 子宫内膜异位症; DNA结合抑制因子2; *Rab5*基因; 癌胚抗原125; 子宫内膜抗体; 诊断

Expression and Significance of DNA Binding Inhibitory Factor 2 and *Rab5* Genes in Patients with Endometriosis

CHEN Yuzhong¹, LAI Wei¹, ZHANG Guoan¹, LI Zhengying^{2*}

(1. Department of Obstetrics and Gynecology, 951 Hospital of the Chinese peopleundefineds Liberation Army, Korla, Xinjiang, China, 841000; 2. The Xinjiang Uygur Autonomous Region people's Hospital, Xinjiang, China, 830001)

[ABSTRACT] Objective To explore the expression and significance of DNA binding inhibitor 2 (ID2) and *Rab5* genes in patients with endometriosis (EMS). Methods 138 patients with EMS in our hospital from June 2017 to August 2019 were selected as the study group, another 120 patients who underwent tubal sterilization were selected as the control group during the same period. The expression levels of *Rab5* mRNA and *ID2* mRNA in the endometrial tissues of the two groups were detected. The receiver operating characteristic (ROC) curve was used to analyze the diagnostic value of the two separately and jointly. The research group was divided according to the r-AFS stage. The levels of *Rab5* mRNA, *ID2* mRNA, and clinical indicators [serum carcinoembryonic antigen 125 (CA125), endometrial antibody (EmAb) in patients with different disease stages were measured and compared. The correlation between *Rab5*, *ID2* mRNA and disease stage, serum CA125, EmAb was analyzed. Results The expression levels of *Rab5* mRNA and *ID2* mRNA in endometrial

基金项目:新疆维吾尔自治区卫生计生适宜技术推广项目(SYTG-201706)

作者单位:1. 中国人民解放军陆军第951医院妇儿科,新疆,库尔勒市841000

2. 新疆维吾尔自治区人民医院消毒供应中心,新疆830001

*通信作者:李正英, E-mail: xjlizhengying@163.com

tissue in the study group were higher than those in the control group ($P<0.05$). Rab5 mRNA and ID2 mRNA combined diagnosis of EMS has the largest AUC of 0.802, the best diagnostic sensitivity is 78.99%, and the specificity is 69.17%. There is a positive correlation between the disease stage of EMS patients and the expression of Rab5 mRNA, ID2 mRNA and serum CA125 and EmAb levels ($P<0.05$). The expression of Rab5 mRNA and ID2 mRNA in EMS patients was positively correlated with serum CA125 and EmAb levels ($P<0.05$). **Conclusion** The increased Rab5 mRNA and ID2 mRNA expressions in EMS patients are closely related to the disease stage and the serum levels of CA125 and EmAb which can assist clinical EMS diagnosis.

[KEY WORDS] Endometriosis; DNA binding inhibitor 2; *Rab5*; Carcinoembryonic antigen 125; Endometrial antibody; Diagnosis

子宫内膜异位症(Endometriosis, EMS)为孕龄期女性常见疾病,由于EMS的临床表现有时与病变程度很不相符,给临床诊断、治疗带来诸多困难^[1-2]。有学者认为细胞生物学相关因子与EMS的发生发展有关,病理过程与肿瘤组织的增殖及迁移等相似,因此,积极探索EMS诊断及治疗的生物学标志物一直是临床研究的重点问题^[3-4]。近年研究提示,DNA结合抑制因子2(Inhibitor of differentiation/DNA binding 2, ID2)与肿瘤细胞的增殖及迁移关系密切^[5-6]。此外,Rab5是三磷酸鸟苷(Guanosine triphosphate, GTP)结合蛋白家族的一员,具有促进细胞迁移、侵袭及血管生成等作用^[7-8]。因EMS具有类似恶性肿瘤的增殖、侵袭及远处转移等生物学行为,推测EMS患者内膜组织中也可能存在Rab5、ID2的变化。基于此,本研究尝试综合分析ID2、Rab5基因在EMS患者中的表达及意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2017年6月至2019年8月本院138例EMS患者作为研究组,年龄29~46岁,体质量48~73 kg,疾病类型:卵巢型35例,腹膜型43例,深部浸润型60例。另选取同期120例行输卵管绝育手术患者作为对照组,年龄30~48岁,体质量47~71 kg。

纳入标准:①EMS的诊断参照世界子宫内膜异位症学会(World Endometriosis Society, WES)制定的相关标准^[9];②对照组均经检查确认无EMS;③入组前6个月无性激素药物使用史;④认知功能、沟通能力正常;⑤患者均知晓本研究,已签署同意书。排除标准:①严重肝肾功能障碍者;②合并卵巢囊肿、先天性子宫发育异常、瘢痕子宫等疾病者;③自身免疫性疾病患者;④内分泌功能紊乱者;⑤合并严重呼吸、消化系统疾病及血液系统疾

病者;⑥恶性肿瘤患者。研究组病变分期:参照美国生育学会修订的内异症分期标准评分:I期(微型)1~5分,II期(轻型)6~15分,III期(中型)16~40分,IV期(重型)大于40分。

1.2 方法

Rab5 mRNA、*ID2* mRNA表达量检测方法:入组当天,由专业检测师取受检者子宫内膜组织,采用磷酸缓冲盐溶液清洗标本组织,并采用实时荧光定量PCR(quantitative real-time PCR, qRT-PCR)法检测*Rab5* mRNA、*ID2* mRNA表达量,应用公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 进行定量分析。

血清癌胚抗原125(Carcinoembryonic antigen 125, CA125)、子宫内膜抗体(Endometrial antibody, EmAb)检测方法:入组当天清晨,取受检者空腹状态下静脉血3 mL,由专业检测师采用上海利鑫坚离心机有限公司生产的L-400离心机,以3 000 r/min转速处理10 min,取血清,采用美国Bio-RAD公司生产的Bio-RAD550型酶标仪与配套试剂盒,以酶联免疫吸附法测定血清CA125、EmAb水平。

1.3 观察指标

①两组子宫内膜组织中*Rab5* mRNA、*ID2* mRNA表达量。②分析*Rab5* mRNA、*ID2* mRNA诊断EMS的价值。③不同病情分期EMS患者*Rab5* mRNA、*ID2* mRNA、血清CA125、EmAb水平。④分析*Rab5* mRNA、*ID2* mRNA、血清CA125、EmAb水平与EMS患者病情分期的相关性。⑤分析EMS患者*Rab5* mRNA、*ID2* mRNA与血清CA125、EmAb水平的相关性。

1.4 统计学方法

采用SPSS 22.0软件进行数据处理,计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,t检验,多组间比较以单因素方差进行分析,采用Spearman和Pearson进行相关性分析,采用受试者工作(Receiver operating characteris-

tic, ROC) 曲线分析预测价值, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组一般资料对比

对比两组分娩情况、年龄、婚姻状况、体质量、子宫内膜情况, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 两组一般资料的比较 [$n(\%)$, ($\bar{x} \pm s$)]

| 项目 | 研究组 ($n=138$) | 对照组 ($n=120$) | t/χ^2 值 | P 值 |
|-----------|--------------------|--------------------|--------------|-------|
| 年龄(岁) | 38.64±3.65 | 39.52±4.21 | 1.798 | 0.073 |
| 体质量(kg) | 56.43±4.21 | 55.57±4.09 | 1.658 | 0.099 |
| 子宫内膜情况(例) | | | | |
| 增殖期 | 72(52.17) | 68(56.67) | 0.522 | 0.470 |
| 分泌期 | 66(47.83) | 52(43.33) | | |
| 婚姻状况(例) | | | | |
| 已婚 | 129(93.48) | 114(95.00) | 0.271 | 0.602 |
| 未婚 | 9(6.52) | 6(5.00) | | |
| 分娩情况(例) | | | | |
| 有 | 117(84.78) | 100(83.33) | 0.101 | 0.751 |
| 无 | 21(15.22) | 20(16.67) | | |

2.2 两组患者子宫内膜组织中 *Rab5* mRNA、*ID2* mRNA 表达量

研究组子宫内膜组织中 *Rab5* mRNA 表达量 (2.75 ± 0.34)、*ID2* mRNA 表达量 (2.32 ± 0.27) 高于对照组 *Rab5* mRNA 表达量 (1.07 ± 0.13)、*ID2* mRNA 表达量 (1.10 ± 0.11) ($t=50.974, 46.263$) 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.3 *Rab5* mRNA、*ID2* mRNA 诊断 EMS 的价值

ROC 曲线分析显示, *Rab5* mRNA 诊断 EMS 的曲线下面积 (Area under the curve, AUC) 为 0.747 (95%CI 为 0.689~0.799), 大于 *ID2* mRNA 的 0.733 (95%CI 为 0.675~0.786), 二者联合诊断 EMS 的 AUC 为 0.802 (95%CI 为 0.748~0.849), 联合诊断的最佳敏感度为 78.99%, 特异度为 69.17%, 见图 1。

2.4 不同病情分期患者 *Rab5* mRNA、*ID2* mRNA、血清 CA125、EmAb

随着 EMS 患者病情分期增高, *Rab5* mRNA、*ID2* mRNA 表达及血清 CA125、EmAb 水平逐渐提高 ($P < 0.05$), 见表 2。

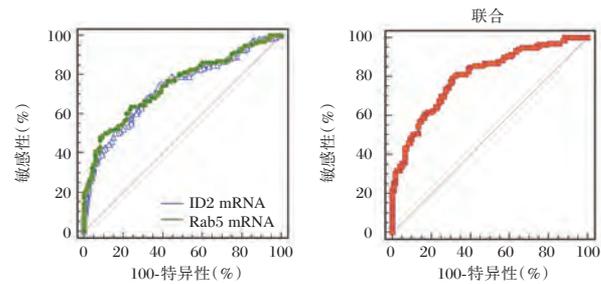


图 1 *Rab5* mRNA、*ID2* mRNA 诊断 EMS 的 ROC 曲线
Figure 1 ROC curves for diagnosis of EMS with *Rab5* mRNA and *ID2* mRNA

表 2 不同病情分期患者 *Rab5* mRNA、*ID2* mRNA、血清 CA125、EmAb 比较 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | n | <i>Rab5</i> mRNA | <i>ID2</i> mRNA | CA125 (kU/L) | EmAb (OD 值) |
|-------|-----|------------------|-----------------|--------------|-------------|
| I 期 | 27 | 2.02±0.30 | 1.81±0.28 | 21.63±3.71 | 0.36±0.04 |
| II 期 | 42 | 2.33±0.35 | 2.14±0.32 | 24.42±4.06 | 0.40±0.05 |
| III 期 | 36 | 2.85±0.41 | 2.36±0.34 | 29.80±4.38 | 0.45±0.07 |
| IV 期 | 33 | 3.77±0.56 | 2.92±0.45 | 35.02±5.03 | 0.52±0.08 |
| F 值 | | 108.381 | 54.148 | 59.891 | 38.597 |
| P 值 | | <0.001 | <0.001 | <0.001 | <0.001 |

2.5 *Rab5* mRNA、*ID2* mRNA 与血清 CA125、EmAb 相关性

Pearson 相关性分析, *Rab5* mRNA ($r_1=0.568$; $r_2=0.468$)、*ID2* mRNA ($r_1=0.522$; $r_2=0.542$) 与血清 CA125、EmAb 呈正相关 ($P < 0.05$), 见图 2。

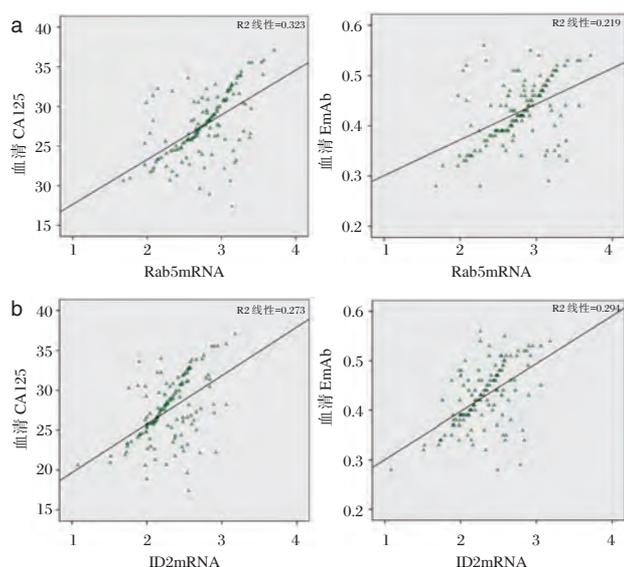
2.6 *Rab5* mRNA、*ID2* mRNA、血清 CA125、EmAb 与病情分期的关系

Spearman 相关性分析, *Rab5* mRNA ($r=0.397$)、*ID2* mRNA ($r=0.511$)、血清 CA125 ($r=0.682$)、EmAb ($r=0.701$) 与 EMS 患者病情分期呈正相关 (P 均 < 0.05)。

3 讨论

EMS 可累及子宫肌层、盆腔、卵巢等部位, 形成痛经、慢性盆腔痛、盆腔黏连及不孕等症状, 危害性较大, 寻求特异性分子标志物对 EMS 的诊断及治疗均具有重要临床意义^[10-11]。

子宫内膜发生异位增殖的关键在于在位内膜基因的表达, 是引发 EMS 的内在因素^[13]。*ID2* 是近年发现的新型转录因子, 其异常表达与肿瘤恶性生物学行为存在密切关系^[14]。国内外大量研究



注: a. *Rab5* mRNA 与血清 CA125、EmAb 相关性; b. *ID2* mRNA 与血清 CA125、EmAb 相关性。

图2 *Rab5* mRNA、*ID2* mRNA 与血清 CA125、EmAb 相关性

Figure 2 Correlation between *Rab5* mRNA、*ID2* mRNA and serum CA125、EmAb

显示,EMS 同样具有类似恶性肿瘤的增殖、侵袭及远处转移等生物学行为^[15]。此次研究发现,EMS 患者子宫内膜组织中 *ID2* 基因表达量显著升高,与 EMS 的发生发展密切相关。*ID2* 可与碱性螺旋-环-螺旋类转录因子结合形成异源二聚体,导致 *ID2* 缺失,影响其与靶基因的结合,进而抑制相关基因表达,而 *ID2* 的异常高表达则能促进肿瘤细胞的增殖及迁移,从而参与 EMS 的发展^[16]。相关研究指出,EMS 患者机体内存在较强的炎症反应,白细胞介素-1 β 、肿瘤坏死因子- α 等炎症因子水平增高^[17]。*Rab5* 作为一种 GTP 酶,是细胞内膜运输的关键调节剂,具有调节炎症因子合成的作用,从而参与细胞炎症反应。本研究发现 *Rab5* 基因异常高表达可促进 EMS 发生和病情进展,与林慧芳等^[18] 研究结果相近,且 *Rab5* mRNA、*ID2* mRNA 联合将有助于改善临床诊断 EMS 敏感性, I 期 EMS 患者子宫内膜组织中 *Rab5* mRNA、*ID2* mRNA 表达水平明显高于子宫内膜正常女性,且随着 EMS 患者病情分期增高,*Rab5* mRNA、*ID2* mRNA 表达水平逐渐提高,检测 *Rab5* mRNA、*ID2* mRNA 表达水平有助于 EMS 的早期发现和治疗。

Jelodar 等^[19] 研究发现,在无 EMS 的机体血清中 CA125 的浓度较低,而在有 EMS 的机体血清中

CA125 的浓度较高。CA125 是一种存在于细胞表面的糖蛋白,在某些特定类型恶性肿瘤或其他良性疾病患者的血液中升高^[20]。EMS 患者血清 CA125 水平与病情分期存在正相关关系,CA125 可通过损伤 EMS 病灶组织中的线粒体而提高腺体细胞的黏附能力,最终严重损伤基底膜层上皮组织,因此 CA125 可在一定程度上反映 EMS 病情严重程度。EmAb 是子宫内膜内的特异性抗体,当女性子宫内膜发生炎症时,可能转化成抗原或半抗原,刺激机体自身产生相应的抗体^[21]。近年来,EmAb 的测定被广泛应用于 EMS 的诊断和辅助治疗,研究发现 EMS 患者细胞和体液免疫均有变化,异位的内膜使机体产生免疫诱导进而产生 EmAb^[22]。国外研究指出,EMS 发生过程中,患者血清和子宫内膜中的 EmAb 对疾病的进展具有重要促进作用,与患者病情关系密切^[23]。本研究发现 EmAb 水平与患者病情分期存在正相关,可指导临床评估 EMS 病情程度。本研究虽然明确了 *Rab5* 和 *ID2* 基因表达在 EMS 诊断及病情程度评估方面具有较高临床价值,但研究是在较理想的实验条件下进行,实际工作中 *Rab5* 和 *ID2* 基因表达能否为 EMS 诊断及病情程度评估的生物学指标,仍需以后开展大量研究及临床试验证实,也是我们后续研究的方向。

参考文献

- [1] Centini G, Afors K, Alves J, et al. Effect of Anterior Compartment Endometriosis Excision on Infertility [J]. JSLs, 2018, 22(4): pii: e2018.00067.
- [2] 张春云,张永鹏. 子宫内膜异位症患者病变部位 ZEB1 和 ZEB2 表达水平[J]. 热带医学杂志, 2019, 19(1): 49-51, 60.
- [3] 张倩,范文生,顾成磊,等. miR-363-3p 表达对人子宫内膜间质细胞生物学表型的影响[J]. 解放军医学院学报, 2019, 40(6): 565-569.
- [4] Yang HL, Mei J, Chang KK, et al. Autophagy in endometriosis[J]. Am J Transl Res, 2017, 9(11): 4707-4725.
- [5] Han J, Seo H, Choi Y, et al. Expression and regulation of inhibitor of DNA binding proteins, ID1, ID2, ID3, and, ID4, at the maternal-conceptus interface in pigs[J]. Theriogenology, 2018, 108(1): 46-55.
- [6] Zhou JD, Ma JC, Zhang TJ, et al. High bone marrow ID2 expression predicts poor chemotherapy response and prognosis in acute myeloid leukemia [J]. Oncotarget, 2017, 8(54): 91979-91989.
- [7] Liu CC, Zhang YN, Li ZY, et al. Rab5 and Rab11 Are Required for Clathrin-Dependent Endocytosis of Japanese Encephalitis Virus in BHK-21 Cells[J]. J Virol, 2017, 91(19): pii: e01113-17. (下转第 732 页)

miR-499、miR-16、肌红蛋白与常规心肌损伤标志物的关系及在急性心肌梗死早期诊断中的价值

李刚* 朱春凯 郑培明

[摘要] 目的 探讨微小RNA-499(miR-499)、微小RNA-16(miR-16)、肌红蛋白(MYO)与常规心肌损伤标志物的关系及在急性心肌梗死(AMI)早期诊断中的价值。方法 选取2017年2月至2019年12月本院收治的134例AMI患者(AMI组)及体检中心134例健康人群(对照组)。比较两组常规心肌损伤标志物[肌钙蛋白I(cTnI)肌酸激酶同工酶(CK-MB)]表达、miR-499 mRNA、miR-169 mRNA、MYO表达,采用Pearson分析miR-499、miR-16、MYO与cTnI、CK-MB相关性,采用接收者操作特征(ROC)曲线及ROC下面积(AUC)分析各指标在AMI早期诊断中的价值。结果 发病2 h时,AMI组CK-MB组高于cTnI组,差异无统计学意义($P>0.05$);发病6、12 h,AMI组cTnI、CK-MB均高于对照组($P<0.05$);发病2、6、12 h时,AMI组miR-499 mRNA、miR-16 mRNA、MYO高于对照组($P<0.05$);miR-499 mRNA与miR-16 mRNA、MYO呈正相关;miR-16 mRNA与MYO呈正相关($P<0.05$);cTnI与miR-499、miR-16、MYO呈正相关($P<0.05$);CK-MB与miR-499、miR-16、MYO呈正相关($P<0.05$);诊断早期AMI的AUC:miR-499为0.751,截断值 >1.37 ,miR-16的AUC为0.800,截断值 >1.87 ,MYO的AUC为0.731,截断值 $>60.14 \mu\text{g/L}$ ($P<0.05$)。结论 miR-499、miR-16、MYO在AMI发病早期即升高,各指标间呈正相关,并与cTnI、CK-MB呈正相关,可作为AMI早期诊断的标志物。

[关键词] miR-499;miR-16;肌红蛋白;心肌损伤标志物;急性心肌梗死;早期

Application of miR - 499, miR - 16, myoglobin and conventional markers of myocardial injury in the early diagnosis of acute myocardial infarction

LI Gang*, ZHU Chunkai, ZHENG Peiming

(Department of clinical laboratory, Henan provincial people's hospital, Zhengzhou, Henan, China, 450003)

[ABSTRACT] Objective To explore the relationship between microRNA-499 (miR-499), microRNA-16 (miR-16), myoglobin (MYO) and conventional myocardial injury markers, and to evaluate the value in the early diagnosis of acute myocardial infarction (AMI). Methods A total of 134 AMI patients (the AMI group) and 134 healthy people (the control group) in the medical examination center from February 2017 to December 2019 were enrolled. The levels of conventional cardiac injury markers [troponin I (cTnI), creatine kinase isoenzyme (CK-MB)], miR-499 mRNA, miR-169 mRNA, and MYO were measured and compared between the two groups. Pearson was used to analyze the correlation between miR-499, miR-16, MYO and cTnI, CK-MB, and the receiver operating characteristic (ROC) curve and area under ROC (AUC) were used to analyze the value of each index in the early diagnosis of AMI. Results At 2 h after the onset, there was no significant difference in cTnI and CK-MB between the AMI group and the control group ($P>0.05$). At 6 and 12 h after onset, cTnI and CK-MB in the AMI group were higher than those in the control group ($P<0.05$). At 2 h, 6 hours, and 12 hs after onset, miR-499 mRNA, miR-16 mRNA, and MYO in the AMI group were

基金项目:河南省科技厅重点项目(281803692)

作者单位:河南省人民医院检验科,河南,郑州 450003

*通信作者:李刚, E-mail: Ligang65587359@163.com

higher than those in the control group ($P<0.05$). miR-499 mRNA was positively correlated with miR-16 mRNA and MYO. miR-16 mRNA was positively correlated with MYO ($P<0.05$). cTnI was positively correlated with miR-499, miR-16, and MYO ($P<0.05$). CK-MB was positively correlated with miR-499, miR-16, and MYO ($P<0.05$). AUC for early diagnosis of AMI: miR-499 was 0.751, cut-off value was >1.37 , miR-16 had AUC of 0.800, cut-off value >1.87 , MYO's AUC was 0.731, cut-off value was $>60.14 \mu\text{g/L}$ ($P<0.05$).

Conclusions miR-499, miR-16, and MYO increased early in the onset of AMI, and were positively correlated with each index and cTnI and CK-MB. Therefore, those indicators could be used as a marker for early diagnosis of AMI.

[KEY WORDS] miR-499; miR-16; Myoglobin; Markers of myocardial injury; Acute myocardial infarction; Early stage

急性心肌梗死 (acute myocardial infarction, AMI) 发病急骤, 是一种严重威胁人类健康的心血管疾病, 随着血运重建技术的发展与进步, 病死率有所降低, 但仍是冠心病死亡的最主要原因之一, 而是否能早期明确诊断, 指导临床及时进行治疗是改善患者预后的关键^[1-2]。肌钙蛋白 I (Cardiac troponin I, cTnI)、肌酸激酶同工酶 (creatinase-MB, CK-MB) 是诊断 AMI 常用的心肌损伤标志物, 特异性较高, 但多在 AMI 发病 3 h 后明显升高, 不利于疾病的早期诊断^[3-4]。微小 RNA 是一类高度保守的非编码小分子 RNA, 由 19~25 个核苷酸组成, 虽然不编码蛋白质, 但能调控靶基因降解、稳定性、蛋白质翻译等, 参与细胞的增殖、分化、凋亡^[5]。有研究显示, 微小 RNA 在血浆中稳定存在, AMI 可引起患者循环中部分微小 RNA 的表达异常, 具有疾病生物学标记的潜在特性^[6-7]。微小 RNA-499 (microRNA-499, miR-499)、微小 RNA-16 (microRNA-16, miR-16) 是两种微小 RNA, 是否与 cTnI、CK-MB 有关及能否用于 AMI 的早期诊断尚不明确。肌红蛋白 (myoglobin, MYO) 在 AMI 患者中呈高表达, 但在发病后表达的时间效应仍不清楚^[8]。鉴于此本研究探讨 miR-499、miR-16、MYO 与常规心肌损伤标志物的关系及在 AMI 早期诊断中的价值, 报告如下。

1 资料和方法

1.1 一般资料

选取 2017 年 2 月至 2019 年 12 月本院收治的 134 例 AMI 患者 (AMI 组) 及体检中心 134 例健康人群 (对照组)。其中 AMI 组女 65 例, 男 69 例, 平均 (63.95 ± 6.94) 岁, 体质指数 $19 \sim 26 \text{ kg/m}^2$, 平均 $(22.29 \pm 1.60) \text{ kg/m}^2$; 对照组女 70 例, 男 64 例, 平均

(64.05 ± 6.89) 岁, 体质指数 $19 \sim 26 \text{ kg/m}^2$, 平均 $(22.33 \pm 1.57) \text{ kg/m}^2$ 。两组性别、年龄、体质指数等资料均衡可比, 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

纳入标准: ① AMI 组均符合 AMI 诊断标准^[9]; ② 发病至入院时间 $<2 \text{ h}$; ③ 无风湿性心脏病; ④ 无病毒性感染等感染类疾病。排除标准: ① 有心脏瓣膜病、心房纤颤者; ② 先天性心脏病者; ③ 合并恶性肿瘤者; ④ 伴有肝肾肺功能严重不全者; ⑤ 急性脑血管疾病者; ⑥ 肺栓塞者; ⑦ 心肌炎者, 主动脉夹层者。

1.3 方法

1.3.1 主要试剂、仪器

cTnI、CK-MB 检测试剂盒 (深圳市科润达生物工程技术有限公司); 总 RNA 提取试剂盒 (上海索宝生物科技有限公司); 逆转录试剂盒 (广州泛思生物科技有限公司); 引物合成 (北京擎科); 赛博绿色荧光染料实时 PCR 反应混合液 (北京智杰方远科技有限公司); 实时定量 PCR 仪 (美国 Biosystems 公司, ABI7300)。

1.3.2 血 cTnI、CK-MB、miR-499 mRNA、miR-16 mRNA 检测

采集 AMI 组发病后 2、6、12 h 及对照组入院后次日清晨空腹肘部静脉血, 采用酶联免疫吸附法检测血清 cTnI、CK-MB 水平, 采用实时荧光定量 PCR 法检测血 miR-499 mRNA、miR-16 mRNA 表达。

1.3 观察指标

① 比较两组常规心肌损伤标志物: cTnI、CK-MB 表达。② 比较两组 miR-499 mRNA、miR-169 mRNA、MYO 的表达。③ 分析 miR-499、miR-16、MYO 之间的相关性。④ 分析 miR-499、miR-16、MYO 与 cTnI、CK-MB 相关性。⑤ 分析 miR-499、miR-16、MYO 在 AMI 早期诊断中的价值。

1.4 统计学方法

采用SPSS 22.0软件进行处理数据,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较以单因素方差分析,两两比较以LSD-*t*检验,计数资料用 $n(\%)$ 表示,采用 χ^2 检验,采用Pearson分析各指标间相关性,采用接收者操作特征(Receiver Operating Characteristic, ROC)曲线及ROC下面积(Area under the curve, AUC)分析各指标在AMI早期诊断中的价值。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组常规心肌损伤标志物的表达

发病2 h时,AMI组cTnI、CK-MB与对照组相比,差异无统计学意义($P > 0.05$);发病6、12 h,AMI组cTnI、CK-MB均高于对照组($P < 0.05$)。见表1。

表1 两组常规心肌损伤标志物的表达比较($\bar{x} \pm s$)
Table 1 Comparison of expression of conventional myocardial injury markers between the 2 groups ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | <i>n</i> | cTnI(μg/L) | CK-MB(U/L) |
|------------|----------|------------|-------------|
| AMI组 | 134 | | |
| 2 h | | 0.25±0.05 | 18.11±4.68 |
| 6 h | | 9.12±2.23 | 24.59±6.13 |
| 12 h | | 20.42±5.65 | 73.58±14.25 |
| 对照组 | 134 | 0.23±0.04 | 17.84±3.79 |
| <i>F</i> 值 | | 1331.381 | 1398.770 |
| <i>P</i> 值 | | <0.001 | <0.001 |

2.2 两组 miR-499 mRNA、miR-16 mRNA、MYO 的表达

发病2、6、12 h时,AMI组miR-499 mRNA、miR-16 mRNA、MYO高于对照组($P < 0.05$)。见表2。

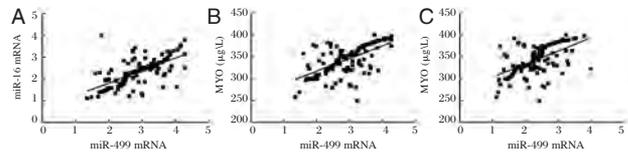
表2 AMI组 miR-499 mRNA、miR-16 mRNA、MYO 的表达比较($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of miR-499 mRNA, miR-16 mRNA, and MYO expression in the AMI group ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | <i>n</i> | miR-499 mRNA | miR-16 mRNA | MYO (μg/L) |
|------------|----------|--------------|-------------|--------------|
| AMI组 | 134 | | | |
| 2 h | | 1.48±0.50 | 2.09±0.77 | 68.98±19.12 |
| 6 h | | 2.69±0.72 | 2.78±0.85 | 132.38±28.44 |
| 12 h | | 2.75±0.68 | 2.25±0.69 | 342.08±33.27 |
| 对照组 | 134 | 1.09±0.39 | 1.18±0.46 | 53.02±12.44 |
| <i>F</i> 值 | | 276.104 | 118.531 | 3899.732 |
| <i>P</i> 值 | | <0.001 | <0.001 | <0.001 |

2.3 分析 miR-499、miR-16、MYO 之间的相关性

miR-499 mRNA 与 miR-16 mRNA($r=0.642$)呈正相关,与MYO($r=0.473$)呈正相关;miR-16 mRNA 与 MYO($r=0.473$)呈正相关,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图1。



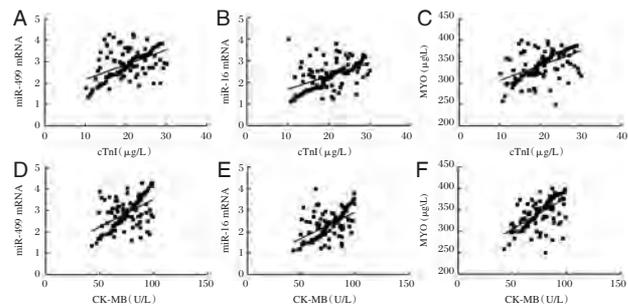
注:A为miR-499 mRNA与miR-16 mRNA相关性;B为miR-499 mRNA与MYO相关性;C为miR-16 mRNA与MYO相关性。

图1 miR-499、miR-16、MYO之间的相关性

Figure 1 Correlation between miR-499, miR-16, and MYO

2.4 分析 miR-499、miR-16、MYO 与 cTnI、CK-MB 相关性

cTnI、CK-MB与miR-499($r_1=0.496, r_2=0.519$)、miR-16($r_1=0.496, r_2=0.557$)、MYO($r_1=0.501, r_2=0.547$)呈正相关,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图2。



注:A为cTnI与miR-499相关性;B为cTnI与miR-16相关性;C为cTnI与MYO相关性;D为CK-MB与miR-499相关性;E为CK-MB与miR-16相关性;F为CK-MB与MYO相关性。

图2 miR-499、miR-16、MYO与cTnI、CK-MB相关性

Figure 2 Correlation between miR-499, miR-16, MYO and cTnI, CK-MB

2.5 分析 miR-499、miR-16、MYO 在AMI早期诊断中的价值

ROC分析显示,miR-16诊断早期AMI的AUC最大,其次是miR-499、MYO,比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表3、图3。

3 讨论

目前AMI的诊断主要依赖临床症状、心电图、心肌损伤标志物的变化,对具有以上病理特征变

表3 ROC分析结果

Table 3 ROC analysis results

| 指标 | AUC | 95%CI | Z统计 | P | 截断值 | 截断值敏感度(%) | 截断值特异度(%) |
|---------|-------|-------------|--------|-------|------------------------|-----------|-----------|
| miR-499 | 0.751 | 0.695~0.802 | 8.500 | <0.01 | >1.37 | 64.18 | 75.37 |
| miR-16 | 0.800 | 0.747~0.846 | 10.920 | <0.01 | >1.87 | 60.45 | 89.55 |
| MYO | 0.731 | 0.674~0.783 | 7.570 | <0.01 | >60.14 $\mu\text{g/L}$ | 70.15 | 66.42 |

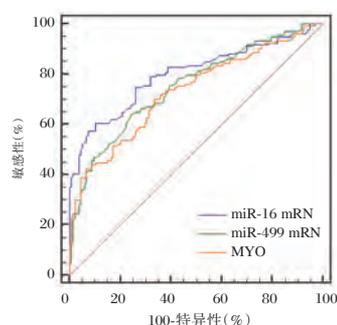


图3 miR-499、miR-16、MYO诊断早期AMI的ROC曲线
Figure 3 ROC curves of miR-499, miR-16, and MYO in the diagnosis of early AMI

化的典型AMI,早期明确诊断较为容易,但长期临床工作发现,早期缺乏AMI典型症状的患者并不少见,且有较大比例患者心电图无典型改变,以致不能获得及时再灌注治疗,严重影响患者的预后,这使得心肌损伤标志物的检测起相当重要的作用^[10]。CK-MB、cTnI是常用的心肌损伤标志物,本研究结果提示AMI发病早期cTnI、CK-MB无显著变化,这一发现与既往的观点^[11]一致。cTnI是心脏的特有分泌物,在AMI后,3~6 h开始释放,10~24 h达到高峰^[12];CK-MB在心肌损伤后,3~8 h后开始升高,可持续3~5 d,提示CK-MB、cTnI在AMI早期诊断中有一定的局限性^[13]。因此有必要研究其他有效的心肌标志物。

miR-499、miR-16均是微小RNA家族成员。终末期肾病合并AMI患者外周血miR-499 mRNA高于未合并AMI患者,提示miR-499 mRNA与AMI发生有关^[14]。miR-16在体外培养新生大鼠心室细胞中的过度表达降低了细胞活力,增加了细胞凋亡,相反miR-16特异性抑制剂能逆转以上变化,用miR-16慢病毒过度表达miR-16,可显著增加AMI大鼠心肌梗死面积,加重心功能不全,而慢病毒介导miR-16基因敲除可减轻急性心肌损伤,可见miR-16参与AMI发病与病情恶化^[15]。但两者是否有助于AMI的早期诊断尚不清楚。结合文献分析,AMI发生后在缺氧/复氧刺激下,心肌细

胞可释放miR-499,导致miR-499表达升高,并介导内皮损伤标志物表达明显增加,引起内皮损伤,从而参与AMI发病及病情进展^[16]。由于研究的前沿性,缺乏相关循证资料,仍不清楚miR-16通过何种途径参与AMI,但本研究采用Pearson分析发现,miR-499 mRNA与miR-16 mRNA呈正相关,表明两者可相互影响发挥作用,且发病12 h miR-499、miR-16均与CK-MB、cTnI呈正相关,有作为心肌损伤标志物的潜质。后续的ROC分析显示,miR-499诊断早期AMI,miR-16均呈现出一定的诊断价值,可为临床诊断早期AMI提供量化数据参考。

MYO是肌细胞等储存和分配氧的蛋白质,心肌中含量特别丰富,在心肌缺血大鼠中表达明显升高^[17]。本研究提示MYO可能有助于AMI的早期诊断。石萍等^[18]指出,MYO在AMI发病早期,0~3 h后血中即可升高,佐证了MYO可作为AMI早期诊断的敏感指标。本研究不足之处在于,未分析各指标联合的诊断价值,有待后续的进一步探讨。

综上所述,miR-499、miR-16、MYO在AMI发病早期即升高,各指标间呈正相关,并与cTnI、CK-MB呈正相关,可作为AMI早期诊断的标志物。

参考文献

- [1] Chen J, Zhang W, Wu YQ, et al. Correlations of acute myocardial infarction complicated by cerebral infarction with insulin resistance, adiponectin and HMGB1 [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(10): 4425-4431.
- [2] 侯经远, 谢运泉, 赵平森, 等. 中国南方客家人群乙醛脱氢酶2基因多态性与急性心肌梗死的相关性研究[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2019, 11(3): 170-175.
- [3] 陈超, 柯剑娟, 丁煌, 等. 糖尿病因素对腺苷后处理减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤的影响[J]. 中华麻醉学杂志, 2018, 38(3): 292-295.
- [4] 刘崇韬, 翁志远, 郑志虹. 急性心肌梗死患者血浆中MEG3和UCA1的表达水平及临床意义[J]. 心血管康复医学杂志, 2019, 28(3): 285-289.

- [5] Su T, Shao X, Zhang X, et al. Value of circulating miRNA-1 detected within 3 h after the onset of acute chest pain in the diagnosis and prognosis of acute myocardial infarction[J]. *Int J Cardiol*, 2019, S0167-5273(19):33471-0.
- [6] Liu G, Niu X, Meng X, et al. Sensitive miRNA markers for the detection and management of NSTEMI acute myocardial infarction patients[J]. *J Thorac Dis*, 2018, 10(6):3206-3215.
- [7] Wang C, Jing Q. Non-coding RNAs as biomarkers for acute myocardial infarction[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2018, 39(7):1110-1119.
- [8] 吕峰峰, 廉铮, 王钢. 急性冠脉综合征患者外周血中趋化因子受体7表达与炎症反应及心肌损伤的关系[J]. *实用预防医学*, 2019, 26(4):487-489.
- [9] 中国医师协会急诊医师分会, 中华医学会心血管病学分会, 中华医学会检验医学分会. 急性冠脉综合征急诊快速诊疗指南[J]. *中华急诊医学杂志*, 2016, 25(4):397-404.
- [10] Cheng Z, Wang R, Xing Y, et al. SERS-based immunoassay using gold-patterned array chips for rapid and sensitive detection of dual cardiac biomarkers[J]. *Analyst*, 2019, 144(22):6533-6540.
- [11] 饶楚炳. 动态监测外周血 CPNE3 对急性心肌梗死的诊断价值[J]. *临床输血与检验*, 2019, 21(3):308-312.
- [12] 徐智虎, 喻佳丽, 雷映霞. 心脏脂肪酸结合蛋白在早期急性心肌梗死诊断中的价值[J]. *心肺血管病杂志*, 2018, 37(6):506-509.
- [13] Xu S, Jiang J, Zhang Y, et al. Discovery of potential plasma protein biomarkers for acute myocardial infarction via proteomics[J]. *J Thorac Dis*, 2019, 11(9):3962-3972.
- [14] Abdelsalam L, Ibrahim AA, Shalaby A, et al. Expression of miRNAs-122, -192 and -499 in end stage renal disease associated with acute myocardial infarction [J]. *Arch Med Sci*, 2019, 15(5):1247-1253.
- [15] Liu J, Sun F, Wang Y, et al. Suppression of microRNA-16 protects against acute myocardial infarction by reversing beta2-adrenergic receptor down-regulation in rats [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(12):20122-20132.
- [16] Zhou R, Huang W, Fan X, et al. miR-499 released during myocardial infarction causes endothelial injury by targeting $\alpha 7$ -nAChR [J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(9):6085-6097.
- [17] 郭志佳, 王成钢, 王瑞. TRPV1/CGRP 信号通路在利多卡因后处理减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤中的作用[J]. *中华麻醉学杂志*, 2018, 38(11):1307-1310.
- [18] 石萍, 贾克刚, 王雄关, 等. 血浆循环 microRNA-30d 在急性冠状动脉综合征中应用的初探[J]. *中华检验医学杂志*, 2018, 41(2):97-102.

(上接第 727 页)

- [8] 朱丽波, 丁少杰, 竺天虹, 等. 子宫内膜异位症患者异位内膜和在位内膜组织中 Rab5 的表达及其意义[J]. *中华妇产科杂志*, 2017, 52(4):264-267.
- [9] Johnson NP, Hummelshoj L, Adamson GD, et al. World Endometriosis Society consensus on the classification of endometriosis[J]. *Hum Reprod*, 2017, 32(2):315-324.
- [10] 刘英杰, 曲银娥, 赵宇, 等. 子宫内膜异位症的病因学研究进展[J]. *河北联合大学学报(医学版)*, 2017, 19(4):333-336.
- [11] Yang JJ, Gao Y, Wang YH, et al. The effect of leflunomide on the transplanted endometriosis lesions in SD rats [J]. *Clin Exp Obstet Gynecol*, 2017, 44(1):129-132.
- [12] 马莉, 刘春喜, 姚丽. 子宫内膜异位症患者子宫内膜组织中 ID2、PRELP、SMOC2 基因表达和临床意义[J]. *成都医学院学报*, 2019, 14(2):193-197.
- [13] 李娟清. Twist 异常甲基化介导的细胞迁移和侵袭在子宫内膜异位症发病机制中的作用[D]. 浙江大学, 2017.
- [14] Araujo FM, Meola J, Rosa-e-Silva JC, et al. Increased expression of ID2, PRELP and SMOC2 genes in patients with endometriosis[J]. *Braz J Med Biol Res*, 2017, 50(7):e5782.
- [15] 托娅, 杨菁, 陈秀娟, 等. CYP19A1、GSTM1、GSTT1 和 GSTP1 基因多态性与子宫内膜异位症患者发病的相关研究[J]. *中华医学杂志*, 2019, 99(7):515-519.
- [16] Liu Y, Puspa R, Pandey, Sambad Sharma, et al. Abstract 5748: Roles of miR29c-ID2 axis in tumor initiating cells of breast ductal carcinoma in situ [J]. *Cancer Res*, 2017, 77(13 Supplement):5748-5748.
- [17] Zhou WJ, Yang HL, Shao J, et al. Anti-inflammatory cytokines in endometriosis [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2019, 76(11):2111-2132.
- [18] 林慧芳, 张晶, 孙东兰, 等. 子宫内膜异位症患者子宫内膜组织中 Rab5、Smad2 基因表达及其临床意义[J]. *河北医科大学学报*, 2019, 40(7):810-814.
- [19] Jelodar G, Azimifar A. Evaluation of serum cancer antigen 125, resistin, leptin, homocysteine, and total antioxidant capacity in rat model of endometriosis treated with Curcumin [J]. *Physiol Rep*, 2019, 7(4):e14016.
- [20] 尤娟. 卵巢癌患者血清 miR-21 及糖类抗原 125 水平变化及意义[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2019, 11(6):513-516, 538.
- [21] 陈诚, 张勇, 黄武. GnRHa 联合戊酸雌二醇反向添加疗法对重度子宫内膜异位症患者 CA125、VEGF、HE4、EMAb 的影响[J]. *中国地方病防治杂志*, 2018, 33(5):590, 593.
- [22] Huo Y, Xu Y, Wang J, et al. Analysis of the serum reproductive system related autoantibodies of infertility patients in Tianjin Region of China [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(8):14048-14053.
- [23] Darville T, Albritton HL, Zhong W, et al. Anti-chlamydia IgG and IgA are insufficient to prevent endometrial chlamydia infection in women, and increased anti-chlamydia IgG is associated with enhanced risk for incident infection [J]. *Am J Reprod Immunol*, 2019, 81(5):e13103.

· 论 著 ·

HBV 相关 ACLF 患者免疫功能及 IL-10 和 IL-32 与预后相关性

王少渊 任旭 李世红 魏江霞*

【摘要】 目的 探讨乙型肝炎病毒(HBV)相关慢加急性肝衰竭(ACLF)患者免疫球蛋白、T淋巴细胞及血清白细胞介素-10(IL-10)和白细胞介素-32(IL-32)水平变化与预后的相关性。方法 选取2017年1月至2019年4月间本院住院治疗的HBV相关ACLF患者60例(HBV-ACLF组)和60例重度慢性乙型肝炎患者(CHB组),检测免疫球蛋白(IgG、IgA、IgM)、T淋巴细胞亚群(CD3+、CD4+、CD8+)、IL-10和IL-32、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)和总胆红素(TBil),观察预后,分析结果。结果 HBV-ACLF组血ALT、AST和TBil水平明显高于CHB组,IgG、IgA水平明显高于CHB组,CD3+、CD4+水平明显低于CHB组,血清IL-10和IL-32水平明显高于CHB组,比较差异有统计学意义($P<0.05$),IgM、CD8+、CD4+/CD8+两组比较差异无统计学意义($P>0.05$);HBV-ACLF组28例患者病情好转,32例恶化,恶化组与好转组患者IgG、IgA、IgM水平、CD8+、CD4+/CD8+两组比较差异无统计学意义($P>0.05$),恶化组CD3+、CD4+水平明显低于好转组,血清IL-10和IL-32的水平恶化组高于好转组,比较差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 HBV相关ACLF患者存在免疫球蛋白及T淋巴细胞免疫紊乱情况,同时血清IL-10和IL-32明显升高,T淋巴细胞紊乱及血清IL-10、IL-32与患者预后关系密切,可用于预后转归的判断。

【关键词】 乙型肝炎病毒;慢加急性肝衰竭;免疫球蛋白;T淋巴细胞;白细胞介素-10;白细胞介素-32

The immune function of HBV - related ACLF patients and the correlation between IL-10, IL-32 and prognosis

WANG Shaoyuan, REN Xu, LI Shihong, WEI Jiangxia*

(General surgery department of Guangyuan first people's Hospital, Guangyuan, Sichuan, China, 628017)

【ABSTRACT】 Objective To explore the relationship between immunoglobulin, T lymphocytes, serum interleukin-10(IL-10), interleukin-32(IL-32) and prognosis of patients with hepatitis b virus(HBV)-related acute-on-chronic liver failure(HBV-ACLF). Methods 60 cases of HBV-ACLF patients (HBV-ACLF group) and 60 cases of severe chronic hepatitis B(CHB group) from January 2017 to April 2019 were recruited for the study. Serum immunoglobulins (IgG, IgA, IgM), T-lymphocyte subgroups (CD3+, CD4+, CD8+), IL-10 and IL-32, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and total bilirubin (TBil) were detected. The results were analyzed and compared. Results Levels of ALT, AST and TBil in the HBV-ACLF group were higher than those in the CHB group ($P<0.05$). Levels of IgG and IgA of the HBV-ACLF group were higher than those of the CHB group ($P<0.05$), while levels of CD3+ and CD4+

基金项目:四川省广元市卫计委资助项目(20180526812S)

作者单位:广元市第一人民医院普外科,四川,广元628017

*通信作者:魏江霞, E-mail:243814487@qq.com

T-lymphocytes in the HBV-ACLF group were lower than those in the CHB group ($P<0.05$). There was no significant difference in IgM and CD8+, and CD4+/CD8+ between the two groups ($P>0.05$). Levels of IL-10 and IL-32 in the HBV-ACLF group were higher than those in the CHB group ($P<0.05$). Twenty eight cases got better and 32 cases got worse in the HBV-ACLF group. There was no significant difference in IgA, IgG, and IgM between the two groups ($P>0.05$). The levels of CD3+ and CD4+ in the deteriorated group were significantly lower than those in the improved group, and the levels of serum IL-10 and IL-32 in the deteriorated group were higher than those in the improved group, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** In patients with HBV-ACLF, immunoglobulin and T lymphocyte immune disorders occur and serum IL-10 and IL-32 were significantly increased. T lymphocyte disorder and serum IL-10 and IL-32 are related to the patient's prognosis and can be used to predict the prognosis.

[KEY WORDS] Hepatitis b virus; acute-on-chronic liver failure; Immunoglobulin; T lymphocytes; IL-10; IL-32

慢加急性肝衰竭(acute-on-chronic liver failure, ACLF)是指在慢性肝病的基础上在短时间内发生急性或亚急性的肝功能失代偿,可出现腹水、黄疸、凝血功能障碍、肝性脑病等表现的临床综合征,该病病情凶险,缺乏特异性的有效治疗手段,患者病死率较高。在我国慢性乙型肝炎病毒(Hepatitis b virus, HBV)感染率较高,HBV感染是引起 ACLF 的主要病因^[1-3]。临床研究显示^[4],在肝衰竭的发生发展中肝组织可经受免疫损伤、缺血缺氧性损伤及内毒素血症的三重打击,其中免疫损伤是中心环节。细胞因子在 ACLF 中也起到重要作用,临床研究显示^[4],细胞因子所引起的炎症反应及对免疫应答的干扰,直接可影响到 ACLF 的预后。本研究对 HBV 相关 ACLF 患者免疫球蛋白、T 淋巴细胞及血清白细胞介素-10(IL-10)和白细胞介素-32(IL-32)水平变化与预后的相关性进行了研究,为 HBV 相关 ACLF 的临床治疗及预后评估等提供理论参考,现将相关研究结果报告如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取 2017 年 1 月至 2019 年 4 月在本院住院治疗的 HBV 相关 ACLF 患者 60 例(HBV-ACLF 组)和 60 例重度慢性乙型肝炎患者(CHB 组)为研究对象,HBV-ACLF 组中男 42 例、女 18 例,年龄(43.28 ± 6.90)岁,CHB 组中男 38 例、女 22 例,年龄(42.95 ± 7.85)岁。

纳入标准:①诊断分别符合《肝衰竭诊疗指南(2012 年版)》中 HBV 相关 ACLF 诊断标准和《慢

性乙型肝炎防治指南(2015 年版)》中 CHB 的诊断标准^[1,5]。②年龄 18~65 岁之间,性别不限。排除标准:①急性或亚急性肝衰竭。②药物性、中毒性、酒精性、自身免疫性、寄生虫性肝病等其他原因导致的慢性肝损伤。③合并恶性肿瘤,包括原发性肝癌或继发性肝癌。④在纳入研究前 3 个月内有免疫治疗史。⑤除 ACLF 和 CHB 之外的其他急慢性感染性疾病。⑥合并其他病毒性感染。⑦妊娠期及哺乳期妇女。两组患者的性别和年龄进行比较差异无统计学意义($P>0.05$),具可比性。

1.2 方法

抽取患者外周静脉血 5 mL,置于有抗凝剂的试管内,以美国贝克曼康尔特公司生产的 AllegraX-22r 低温高速离心机进行离心处理,以美国贝克曼库尔特 IMMAGE800 全自动特定蛋白分析仪测定免疫球蛋白(IgG、IgA、IgM),以美国 BD 公司生产的 Biosciences AccuriC6 流式细胞仪流式细胞仪测定 T 淋巴细胞亚群(CD3+、CD4+、CD8+),以美国 Bil-Red 公司生产的 iMark 全自动定量酶标仪以酶联免疫吸附法测定 IL-10 和 IL-32,以美国贝克曼库尔特 AU680 自动生化分析仪测定丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)和总胆红素(TBil)。

1.3 预后的观察及评定标准^[6]

以患者治疗 12 周为时间节点,评价患者预后。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 19.0 软件进行数据分析,正态计量数据用($\bar{x}\pm s$)表示,采用 t 检验,计数资料采用 n (%)表示,采用卡方检验; $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组 ALT、AST 和 TBil 水平比较

HBV-ACLF 组血 ALT、AST 和 TBil 水平明显高于 CHB 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 1。

表 1 两组 ALT、AST 和 TBil 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 ALT, AST and TBil levels were compared between the 2 groups ($\bar{x} \pm s$)

| 指标 | HBV-ACLF 组 (n=60) | CHB 组 (n=60) | t 值 | P 值 |
|---------------|----------------------|-----------------|-------|-------|
| ALT (U/L) | 978.70±567.35 | 713.65±463.77 | 2.802 | 0.005 |
| AST (U/L) | 942.65±514.79 | 650.09±426.34 | 3.390 | 0.000 |
| TBil (μmol/L) | 345.01±135.77 | 117.89±113.56 | 9.939 | 0.000 |

2.2 两组免疫球蛋白、T 淋巴细胞亚群、血清 IL-10 和 IL-32 水平比较

HBV-ACLF 组 IgG、IgA、CD3+、CD4+ 水平明显高于 CHB 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), IgM、CD8+、CD4+/CD8+ 两组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 血清 IL-10 和 IL-32 水平明显高于 CHB 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 2。

表 2 两组免疫球蛋白、T 淋巴细胞亚群、血清 IL-10 和 IL-32 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Immunoglobulin, t-lymphocyte subsets, and serum IL-10 and IL-32 levels were compared between the 2 groups ($\bar{x} \pm s$)

| 指标 | HBV-ACLF 组 (n=60) | CHB 组 (n=60) | t 值 | P 值 |
|---------------|----------------------|-----------------|-------|-------|
| IgG (g/L) | 19.95±8.46 | 15.73±5.77 | 3.192 | 0.008 |
| IgA (g/L) | 3.20±1.28 | 2.34±1.02 | 4.070 | 0.000 |
| IgM (g/L) | 1.58±0.83 | 1.42±0.65 | 1.176 | 0.371 |
| CD3+ (个/μL) | 823.84±368.99 | 982.10±342.78 | 2.434 | 0.031 |
| CD4+ (个/μL) | 423.70±282.35 | 530.81±211.75 | 2.351 | 0.032 |
| CD8+ (个/μL) | 336.87±212.81 | 390.29±208.67 | 1.388 | 0.395 |
| CD4+/CD8+ | 1.44±0.97 | 1.48±0.93 | 0.231 | 0.112 |
| IL-10 (pg/mL) | 4.52±1.04 | 5.11±1.16 | 2.933 | 0.005 |
| IL-32 (pg/mL) | 422.66±140.34 | 546.32±167.52 | 4.383 | 0.000 |

2.3 HBV-ACLF 组患者预后及不同预后患者免疫球蛋白、T 淋巴细胞亚群、血清 IL-10 和 IL-32 水平比较

恶化组与好转组患者 IgG、IgA、IgM 水平比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 恶化组 CD3+、CD4+

水平明显低于好转组, 比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), CD8+、CD4+/CD8+ 两组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 血清 IL-10 和 IL-32 水平恶化组明显高于好转组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 3。

表 3 HBV-ACLF 组不同预后患者免疫球蛋白、T 淋巴细胞亚群、血清 IL-10 和 IL-32 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Immunoglobulin, t-lymphocyte subsets, and serum IL-10 and IL-32 levels were compared between of the patients with different prognosis in HBV-ACLF group ($\bar{x} \pm s$)

| 指标 | 恶化组 (n=32) | 好转组 (n=28) | t 值 | P 值 |
|---------------|---------------|---------------|-------|-------|
| IgG (g/L) | 20.12±8.20 | 19.46±8.31 | 0.309 | 0.673 |
| IgA (g/L) | 3.34±1.31 | 3.10±1.31 | 0.708 | 0.826 |
| IgM (g/L) | 1.53±0.56 | 1.64±0.85 | 0.599 | 0.775 |
| CD3+ (个/μL) | 678.81±370.45 | 865.35±323.57 | 2.063 | 0.043 |
| CD4+ (个/μL) | 328.56±231.89 | 465.22±230.45 | 2.284 | 0.041 |
| CD8+ (个/μL) | 310.88±200.67 | 375.55±215.54 | 1.203 | 0.368 |
| CD4+/CD8+ | 1.42±0.96 | 1.47±0.68 | 0.230 | 0.112 |
| IL-10 (pg/mL) | 3.16±0.95 | 4.88±1.12 | 6.437 | 0.000 |
| IL-32 (pg/mL) | 284.71±90.65 | 513.92±156.78 | 7.039 | 0.000 |

3 讨论

在我国 HBV 感染是导致肝衰竭的主要病因^[1,5], 而主要引起的肝衰竭类型为 ACLF, 存在病情危重、治疗难度大、病死率高的特点。临床研究显示^[5-8], 在 HBV 相关 ACLF 的发生机制中免疫紊乱及炎症应答均占有重要地位, 在 HBV 感染后机体通过免疫应答过程对 HBV 颗粒进行清除, 抑制病毒复制及对肝细胞的损伤, 但是在免疫应答过程中对肝细胞也可能形成免疫性损伤, 研究显示^[9-11], 在 HBV 相关 ACLF 患者体内可出现免疫紊乱, 分析原因, 可能是在长期的 HBV 感染过程中可出现 T 淋巴细胞的消耗, 提示由于 HBV 病毒无法有效消除的情况下 B 淋巴细胞出现亢进, 因此免疫球蛋白水平会表现为升高, 肝组织反复损伤最终可导致肝衰竭的发生, 本研究结果也进一步证实了 HBV 相关 ACLF 患者存在免疫紊乱。在 HBV 相关 ACLF 发病的机制中, 过度的炎症反应是导致肝细胞损伤的原因之一, IL-10 通过 NF-κB 信号通路对炎症因子进行抑制的效应, IL-10 明显升高, 则可出现抑制炎症反应的效应过度表达, 导致抑制促炎症因子的分泌, 在 ACLF 患者中由于促炎因子的表达上调,

为了维持动态平衡 IL-10 的被动升高,在一定程度上可反应出肝损伤的严重程度。IL-32 作为促炎细胞因子,在 HBV 感染时可促使单核细胞向巨噬细胞分化,以加强对 HBV 的清除作用,在长期慢性的感染过程中,IL-32 的促炎作用会逐渐减弱,免疫麻痹的出现使得感染慢性化。本研究结果与临床研究结果相符^[12],提示 HBV 相关 ACLF 的患者炎症反应过程更为剧烈,炎症应答在肝衰竭发展过程中起到极为重要作用。

肝衰竭患者预后相对较差,病死率较高,早期对患者病情评估后进行积极的保肝等措施治疗,仍然是临床上主要治疗方法^[13]。在以往的相关研究中发现肝衰竭患者的肝功能、肝纤维化程度、甲胎蛋白等指标均可用于患者病情及预后的评估^[14]。本研究结果提示免疫球蛋白水平可能对于预后预测并无价值,而 T 淋巴细胞水平对于患者预后评估具有一定意义,但是也有临床研究显示 T 淋巴细胞水平与预后并无明显相关性^[15],因此本研究结果尚需后期进一步研究,以确定是否存在相关性。本研究结果提示以上指标对于 HBV 相关 ACLF 患者预后也有一定预测价值,以上指标如果患者在入院时水平极高,可能患者预后更差,推测可能以上细胞因子的水平过度表达,可能增强了炎症反应过程,加重了肝细胞的进一步损伤,因此导致预后更差。

综上所述,HBV 相关 ACLF 患者存在免疫球蛋白及 T 淋巴细胞免疫紊乱情况,同时血清 IL-10 和 IL-32 明显升高,T 淋巴细胞紊乱及血清 IL-10、IL-32 与患者预后关系密切,可用于预后转归的判断。

参考文献

- [1] 王贵强,王福生,成军,等.慢性乙型肝炎防治指南(2015年更新版)[J].临床肝胆病杂志,2015,31(12):1941-1960.
- [2] 张吉凯,彭国文,吴承刚,等.2009年广东省部分地区1~14岁儿童乙型肝炎病毒感染状况分析[J].华南预防医学,2011,37(3):11-14.
- [3] 周莹,张军霞,黄舒,等.高灵敏度HBV DNA检测在乙型肝炎相关性肝细胞肝癌中的临床应用价值研究[J].分子诊断与治疗杂志,2019,11(5):365-368.
- [4] 陈佳佳,黄建荣,李兰娟.第八届国际暨全国肝衰竭与人工肝学术会议纪要[J].中华临床感染病杂志,2015,8(3):287-288.
- [5] 中华医学会感染病学分会肝衰竭与人工肝学组,中华医学会肝病学会分会重型肝病与人工肝学组.肝衰竭诊治指南(2012年版)[J].中华临床感染病杂志,2012,5(6):321-322.
- [6] 龚学艳,胡泰洪,关文锋,等.免疫调节治疗在慢加急性肝衰竭早期患者中应用的临床研究[J].中国中西医结合消化杂志,2017,25(5):372-375.
- [7] Lin B, Chen J, Qiu W, et al. Allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stromal cells for hepatitis B virus-related acute-on-chronic liver failure: A randomized controlled trial[J]. Hepatology, 2017, 66(1): 209-219.
- [8] Collins JM, Raphael KL, Terry C, et al. Hepatitis B virus reactivation during successful treatment of hepatitis C virus with sofosbuvir and simeprevir [J]. Clin Inf Dis, 2015, 61(8): 1304-1306.
- [9] 甄沛林,邓洪.血清中IL-6和IL-10变化与慢性乙肝急性发作导致肝衰竭的关系[J].热带医学杂志,2010,10(7):842-844.
- [10] Sihan YIN, Peng LIU, ZHANG T. Analysis of TCM deficiency and excess attributes in patients with HBV-related acute-on-chronic liver failure based on phenotype of dendritic cells and function of T lymphocytes [J]. Linchuang Gandanbing Zazhi, 2016, 32(4): 663-668.
- [11] Jin L, Wang K, Liu H, et al. Genomewide Histone H3 Lysine 9 Acetylation Profiling in CD4+T Cells Revealed Endoplasmic Reticulum Stress Deficiency in Patients with Acute-on-chronic Liver Failure [J]. Scand J Immunol, 2015, 82(5): 452-459.
- [12] 顾静,王艳,陈丽,等.HBV相关慢加急性肝衰竭患者血清IL-32和IL-10水平变化及意义[J].临床肝胆病杂志,2018,34(4):801-805.
- [13] 李晨,游绍莉,辛绍杰.HBV相关慢加急性肝衰竭前期概念及诊疗新进展[J].实用肝脏病杂志,2015,18(1):105-108.
- [14] 李晨.乙型肝炎病毒相关慢加急性肝衰竭患者近期预后危险因素的研究[J].中华肝脏病杂志,2016,24(3):207-213.
- [15] 唐玉珍,陈竹,王丽,等.乙型肝炎相关慢加急性肝衰竭患者的免疫状态及其与预后的相关性[J].中国肝脏病杂志(电子版),2016,8(3):69-73.

· 论 著 ·

胞二磷胆碱联合血塞通注射液治疗 ACI 患者疗效及其对血清 TLR4/NF- κ B 信号通路水平的作用

肖淑红¹ 刘建浩² 王波海^{3*}

【摘要】 目的 探讨胞二磷胆碱联合血塞通注射液治疗急性脑梗塞(ACI)患者疗效及对血清 Toll 样受体 4(TLR4)/核因子- κ B(NF- κ B)信号通路水平的作用。方法 应用前瞻性随机对照研究方法选取 2015 年 6 月至 2019 年 12 月本院 ACI 患者 117 例,以计算机生成的随机数字表将患者分为联合组、对照 A 组、对照 B 组,各 39 例。常规治疗基础上,对照 A 组给予胞二磷胆碱,对照 B 组给予血塞通注射液,联合组给予胞二磷胆碱联合血塞通注射液,均治疗 14 d。比较 3 组疗效与治疗前、治疗 14 d 后血液流变学指标(全血低切黏度、全血高切黏度、血浆黏度、纤维蛋白原)、TLR4/NF- κ B 信号通路水平。结果 联合组治疗 14 d 后总有效率高于对照 A 组、对照 B 组,差异有统计学意义($P<0.05$);3 组治疗 14 d 后全血低切黏度、全血高切黏度、血浆黏度、纤维蛋白原、血清 TLR4、NF- κ B P65 蛋白水平较治疗前下降,且联合组低于对照 A 组、对照 B 组,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 应用胞二磷胆碱联合血塞通注射液治疗 ACI 可改善血液流变学情况,抑制 TLR4/NF- κ B 信号通路,疗效显著。

【关键词】 胞二磷胆碱;血塞通注射液;急性脑梗塞;TLR4/NF- κ B 信号通路;血液流变学

Efficacy of Citicoline Combined with Xuesaitong Injection in Patients with Acute Cerebral Infarction and Effect on the level of Serum TLR4/NF - κ B Signaling Pathway

XIAO Shuhong¹, LIU Jianhao², WANG Bohai^{3*}

(Department of Internal Medicine, Sanya Hospital, Sanya, Hainan, China, 572000; Department of Acupuncture and moxibustion, Sanya, Hainan, China, 572000; Department of Neurology, Second People's Hospital, Shaoyang, Hunan, China, 422001)

【ABSTRACT】 Objective To investigate the efficacy of citicoline and Xuesaitong injection in the treatment of patients with acute cerebral infarction (ACI) and effect on the level of serum Toll-like receptor 4 (TLR4)/nuclear factor - κ B (NF - κ B) signaling pathway. Methods A prospective randomized controlled study was used to select 117 patients with ACI in our hospital from June 2015 to December 2019. The patients were divided into a combined group, a control group A and a control group B by a computer-generated random number table, 39 cases each. On the basis of routine treatment, control group A was given citicoline, control group B was given Xuesaitong injection, and combination group was given citicoline combined with Xuesaitong injection, and all were treated for 14 days. The curative effect, the blood rheology indexes (whole blood low shear viscosity, whole blood high shear viscosity, plasma viscosity, fibrinogen) and TLR4/NF- κ B signaling pathway levels before and after 14 days of treatment of the three groups was compared. Results Af-

基金项目:海南省自然科学基金(817399)

作者单位:1. 海南省三亚市中医院内科,海南,三亚 572000

2. 海南省三亚市中医院针灸科,海南,三亚 572000

3. 湖南省邵阳市第二人民医院神经内科,湖南,邵阳 422001

*通信作者:王波海, E-mail: 58977952@qq.com

ter 14 days of treatment, the total effective rate of the combination group was higher than that of control group A and control group B, the difference was statistically significant ($P<0.05$); after 14 days of treatment, the levels of whole blood low shear viscosity, whole blood high shear viscosity, plasma viscosity, fibrinogen, serum TLR4 and NF- κ B P65 protein in the three groups decreased compared with before treatment, and the combination group was lower than the control group A and control group B, the difference was statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** The application of citicoline combined with Xuesaitong injection in the treatment of ACI can improve the hemorheology and inhibit the TLR4 / NF- κ B signaling pathway, and has a significant effect.

[KEY WORDS] Citicoline; Xuesaitong injection; Acute cerebral infarction; TLR4/NF- κ B signal pathway; Hemorheology

急性脑梗塞(Acute cerebral infarction, ACI)为临床常见脑血管病,占全部脑血管病的75%,具有高发病率、高致残率与高致死率等特点,且发病年龄逐渐年轻化^[1-3]。临床认为,早期改善脑缺血区域血流灌注为治疗ACI的关键所在,应用溶栓治疗疗效显著,但其存在严格时间窗限制,需在发病6 h内实施治疗,多数患者错过溶栓治疗时机^[4]。胞二磷胆碱属脑代谢激活剂,可改善脑能量代谢,提升脑血流量,加速脑功能恢复^[5]。血塞通注射液属中药制剂,可促进脑血管扩张,改善血液流变学,减轻炎症应激,被广泛应用于脑血管病患者^[6]。此外,近期有研究指出,Toll样受体4(TLR4)、核因子- κ B(NF- κ B)参与了机体炎症反应与细胞凋亡过程,于脑梗塞发生、进展

中起着重要作用^[7]。本研究分析胞二磷胆碱联合血塞通注射液治疗对ACI疗效及患者血清TLR4/NF- κ B信号通路水平的影响。报告如下。

1 资料及方法

1.1 一般资料

应用前瞻性随机对照研究方法选取2015年6月至2019年12月本院ACI患者117例,以计算机生成的随机数字表将患者分为联合组、对照A组、对照B组,各39例。3组一般资料(年龄、体质量、性别、发病至入院时间、脑梗塞部位等)均衡可比差异无统计学意义($P>0.05$),且本研究经医院伦理委员会批准。见表1。

表1 3组一般资料比较 [$n(\%)$, ($\bar{x}\pm s$)]
Table 1 Comparison of general data of 3 groups [$n(\%)$, ($\bar{x}\pm s$)]

| 资料 | 联合组($n=39$) | 对照A组($n=39$) | 对照B组($n=39$) | F/χ^2 值 | P 值 |
|------------|------------------|------------------|------------------|--------------|-------|
| 年龄(岁) | 58.72 \pm 7.19 | 58.06 \pm 8.27 | 59.15 \pm 7.63 | 0.198 | 0.821 |
| 体质量(kg) | 61.38 \pm 6.60 | 62.24 \pm 5.75 | 61.83 \pm 6.27 | 0.187 | 0.830 |
| 性别(男/女) | 21/18 | 23/16 | 24/15 | 0.492 | 0.782 |
| 发病至入院时间(h) | 14.27 \pm 2.18 | 14.09 \pm 2.32 | 13.86 \pm 2.48 | 0.303 | 0.739 |
| 脑梗塞部位 | | | | | |
| 基底节 | 26(66.67) | 28(71.79) | 25(64.10) | | |
| 脑叶 | 6(15.38) | 5(12.82) | 7(17.95) | 1.261 | 0.974 |
| 小脑 | 4(10.26) | 3(7.69) | 5(12.82) | | |
| 脑干 | 3(7.69) | 3(7.69) | 2(5.13) | | |

纳入标准:《中国急性缺血性脑卒中诊治指南2014》中ACI相关诊断标准^[8],经头颅MRI、CT检查确诊;单侧脑梗塞;首次发病,发病至入院时间6~47 h;知晓本研究,签订知情同意书,可配合完成治疗。排除标准:蛛网膜下腔出血、脑出血;合并肝、心、肾等脏器器质性病变;合并血液系统、精神系统疾病;合并结缔组织疾病、风湿免疫性疾病、

恶性肿瘤、严重传染病;有消化道溃疡史、出血史;近期应用免疫抑制剂、炎症抑制药物治疗。

1.2 方法

1.2.1 治疗方法

3组均采取脱水、降颅压、控制血糖与血压、调脂、抗血小板聚集、抗感染、吸氧、维持水电解质平衡等常规治疗。在此基础上,对照A组给予胞二

磷胆碱(哈尔滨珍宝制药有限公司, F909004b2, 400 mg/支):750 mg 胞二磷胆碱注射液+100 mL 生理盐水, 静滴, 1次/d; 对照B组给予血塞通注射液(哈尔滨珍宝制药有限公司, F909004b2, 400 mg/支):400 mg 血塞通注射液+250 mL 生理盐水, 静滴, 1次/d; 联合组给予胞二磷胆碱联合血塞通注射液, 胞二磷胆碱治疗方法与应用剂量同对照A组, 血塞通注射液治疗方法与应用剂量同对照B组。3组均治疗14 d。

1.2.2 检测方法

抽取患者清晨空腹静脉血样6 mL, 取3 mL 离心处理(转速3 000 r/min, 离心时间10 min), 取血浆, 应用全自动血流变仪(北京普利生仪器有限公司, 7LBY-N6)检测全血低切黏度、全血高切黏度、血浆黏度、纤维蛋白原水平; 另将3 mL 血样以离心机离心处理(转速3 000 r/min, 离心时间10 min), 提取血清, 酶联免疫吸附法测定血清TLR4、NF- κ B P65蛋白水平。试剂盒均购自上海酶联生物科技有限公司, 严格按试剂盒说明书进行操作。

1.3 疗效评估标准^[9]

治疗14 d后实施疗效评估, 美国国立卫生研

究院卒中量表(NIHSS)分值较治疗前降低<18%或增加为无效; NIHSS分值较治疗前降低18%~45%为有效; NIHSS分值较治疗前降低46%~90%, 病残程度1~3级为显效; NIHSS分值较治疗前降低 \geq 91%, 病残程度0级为基本痊愈, 总有效率=(有效+显效+基本痊愈)/39 \times 100%。

1.4 观察指标

①3组疗效。②3组治疗前、治疗14 d后血液流变学指标(全血低切黏度、全血高切黏度、血浆黏度、纤维蛋白原)水平。③3组治疗前、治疗14 d后血清TLR4/NF- κ B信号通路水平。

1.5 统计学处理

应用SPSS 22.0统计分析, 计量资料用($\bar{x} \pm s$)表示, 组间应用 t 检验; 多组间比较采用 F 检验, 计数资料用 $n(\%)$ 表示, 组间应用 χ^2 检验; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 疗效

联合组治疗14 d后总有效率高于对照A组、对照B组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表2。

表2 3组疗效对比 [$n(\%)$]

Table 2 Comparison of curative effect of 3 groups [$n(\%)$]

| 组别 | 例数 | 无效 | 有效 | 显效 | 基本痊愈 | 总有效率 |
|------------|----|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 联合组 | 39 | 2(5.13) | 11(28.21) | 14(35.90) | 12(30.77) | 37(94.87) |
| 对照A组 | 39 | 11(28.21) | 13(33.33) | 10(25.64) | 5(12.82) | 28(71.79) |
| 对照B组 | 39 | 10(25.64) | 12(30.77) | 11(28.21) | 6(15.38) | 29(74.36) |
| χ^2 值 | | | | | | 7.901 |
| P 值 | | | | | | 0.019 |

2.2 血液流变学指标水平

3组治疗前全血低切黏度、全血高切黏度、血浆黏度、纤维蛋白原间差异无统计学意义($P > 0.05$)。3组治疗14 d后全血低切黏度、全血高切黏度、血浆黏度、纤维蛋白原水平较治疗前下降, 且联合组低于对照A组、对照B组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表3。

2.3 血清TLR4/NF- κ B信号通路水平

3组治疗前血清TLR4、NF- κ B P65蛋白水平间差异无统计学意义($P > 0.05$)。3组治疗14 d后血清TLR4、NF- κ B P65蛋白水平较治疗前降低, 且联合组低于对照A组、对照B组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表4。

3 讨论

ACI属缺血性脑血管病, 有效改善脑缺血区域血液灌注, 促进神经功能恢复为治疗ACI的重点。胞二磷胆碱能提升线粒体三磷酸腺苷酶活性, 阻止脑缺血后过氧化物及氧自由基形成, 减轻炎症反应, 并可下调颅内血管阻力, 促进脑血液循环, 提高脑缺血区域血流灌注量, 抑制梗死病灶继续扩大, 同时能调节脑细胞膜功能, 改善颅内营养物质代谢, 加速神经递质生成, 促进苏醒, 有效保护患者神经功能, 改善预后^[10-11]。但临床实践发现, 单独应用胞二磷胆碱对部分ACI患者治疗效果欠佳。

表3 3组血液流变学指标水平对比($\bar{x} \pm s$)Table 3 Comparison of hemorheology indexes in 3 groups ($\bar{x} \pm s$)

| 时间 | 组别 | n | 全血低切黏度(mPs·s) | 全血高切黏度(mPs·s) | 血浆黏度(mPs·s) | 纤维蛋白原(g/L) |
|---------|------|----|-------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| 治疗前 | 联合组 | 39 | 13.57±2.74 | 6.06±1.19 | 1.74±0.27 | 7.64±1.49 |
| | 对照A组 | 39 | 14.26±2.58 | 6.42±1.50 | 1.83±0.24 | 7.89±1.60 |
| | 对照B组 | 39 | 13.93±2.46 | 6.29±1.37 | 1.79±0.35 | 7.76±1.35 |
| | F值 | | 0.689 | 0.702 | 0.940 | 0.277 |
| | P值 | | 0.504 | 0.498 | 0.394 | 0.759 |
| 治疗14 d后 | 联合组 | 39 | 9.64±1.37 ^a | 4.53±0.68 ^a | 1.26±0.14 ^a | 3.47±0.83 ^a |
| | 对照A组 | 39 | 11.90±1.86 ^a | 5.61±0.94 ^a | 1.64±0.21 ^a | 4.85±1.29 ^a |
| | 对照B组 | 39 | 10.75±1.63 ^a | 5.25±0.82 ^a | 1.52±0.17 ^a | 4.03±1.16 ^a |
| | F值 | | 18.692 | 17.529 | 47.676 | 15.239 |
| | P值 | | <0.001 | <0.001 | <0.001 | <0.001 |

注:与本组治疗前相比,^a $P < 0.05$ 。

表4 3组血清TLR4/NF-κB信号通路水平对比($\bar{x} \pm s$)Table 4 Comparison of TLR4/NF-κB signal pathway levels in 3 groups ($\bar{x} \pm s$)

| 时间 | 组别 | n | TLR4 (ng/mL) | NF-κB P65 (ng/mL) |
|---------|------|----|------------------------|---------------------------|
| 治疗前 | 联合组 | 39 | 4.37±1.25 | 167.97±36.08 |
| | 对照A组 | 39 | 4.58±1.37 | 171.02±41.73 |
| | 对照B组 | 39 | 4.49±1.18 | 169.43±38.92 |
| | F值 | | 0.269 | 0.060 |
| | P值 | | 0.765 | 0.942 |
| 治疗14 d后 | 联合组 | 39 | 2.37±0.46 ^a | 119.42±14.37 ^a |
| | 对照A组 | 39 | 3.12±0.69 ^a | 134.86±20.64 ^a |
| | 对照B组 | 39 | 2.84±0.57 ^a | 127.54±17.85 ^a |
| | F值 | | 16.596 | 7.338 |
| | P值 | | <0.001 | 0.001 |

注:与本组治疗前相比,^a $P < 0.05$ 。

中医理论中,ACI可归于“中风”范畴,主要是由于素体禀赋虚弱,加之劳倦内伤、嗜饮酒浆、过食肥甘厚味、情志不遂等,致脏腑阴阳失调、湿浊内生、血脉淤阻、上犯脑窍,发为本病,核心病机为瘀血阻络,治宜活血化瘀^[12]。本研究依据上述病机应用胞二磷胆碱联合血塞通注射液治疗,发现经治疗患者血液流变学显著改善,疗效显著提升。分析其原因为血塞通注射液为一种活血化瘀类中药制剂,主要成分是中药三七提取物三七总皂苷,可起到活血化瘀与消肿止痛之效,契合ACI病机,症药相符。现代药理学研究显示,血塞通注射液能有效抑制血小板聚集,提升红细胞变形能力与纤维蛋白溶解率,降低血液黏度,改善血液流变学,抗血栓形成,且可促进血管舒张,提升脑血流量,促进脑血液循环,改善缺血病灶附近血供,

加速侧支循环建立,提升脑细胞氧供,改善大脑物质代谢;同时,可阻止脂类生物合成,降低血液内脂蛋白含量,促进血管内皮功能恢复,减轻动脉粥样硬化导致的炎症反应;此外,还能抑制钙离子超载,减轻自由基损伤,发挥脑保护作用,最终改善神经功能缺损与预后情况^[13]。胞二磷胆碱、血塞通注射液联合可由不同途径协同减轻机体炎症反应,改善血液流变学,增加脑血流量,改善脑代谢,促进神经功能恢复,最终增强疗效。

此外,炎症反应在ACI发生、进展中具有重要作用,可加剧脑梗塞病情^[14-15]。TLR4/NF-κB为机体内重要炎症信号通路,被激活后可促进炎症因子、黏附因子生成,加剧机体炎症反应^[16]。本研究显示,联合组治疗14 d后血清TLR4、NF-κB P65蛋白水平低于对照A组、对照B组。表明应用胞二磷胆碱联合血塞通注射液治疗可抑制TLR4/NF-κB信号通路,缓解炎症反应。推究其原因与胞二磷胆碱、血塞通注射液联合可协同缓解机体炎症反应,增强抗炎效果有关。

综上,联合应用胞二磷胆碱与血塞通注射液治疗ACI能改善血液流变学情况,抑制TLR4/NF-κB信号通路,疗效显著。

参考文献

- [1] Wang S, Ma T, Wang L, et al. Effect of acupuncture on cerebrovascular reserve in patients with acute cerebral infarction: protocol for a randomized controlled pilot study [J]. *Trials*, 2017, 18(1): 292.
- [2] 李星,李博,王伊龙. 血清CXCL16、PLGF水平变化与脑梗死患者TOAST分型、预后的相关性[J]. *热带医学杂志*, 2019, 19(9): 1120-1122, 1134. (下转第745页)

· 论 著 ·

HBP、ADA、CHE 鉴别急性细菌性脑膜炎病原菌的价值及其与病情的关联性

徐雪勤* 马永磊 杨喜勇

[摘要] **目的** 探讨脑脊液肝素结合蛋白(HBP)、腺苷脱氨酶(ADA)、胆碱酯酶(CHE)鉴别急性细菌性脑膜炎病原菌的价值及与病情的关联性。**方法** 选取2017年4月至2019年12月本院收治的135例急性细菌性脑膜炎患者,根据病原菌类型分为革兰阳性菌组($n=64$)、革兰阴性菌组($n=71$)。比较两组及不同病情程度患者脑脊液HBP、ADA、CHE表达,采用Spearman分析各指标与病情程度的相关性,采用受试者工作特征(ROC)曲线及ROC下面积(AUC)分析各指标单一及联合鉴别病原菌的价值。**结果** 革兰阴性菌组HBP、ADA高于革兰阳性菌组($P<0.05$);HBP鉴别急性细菌性脑膜炎病原菌的AUC为0.776,ADA鉴别急性细菌性脑膜炎病原菌的AUC为0.709,HBP+ADA鉴别急性细菌性脑膜炎病原菌的AUC为0.883($P<0.05$);HBP、ADA、CHE表达重度>中度>轻度($P<0.05$);HBP、ADA、CHE均与病情程度呈正相关($P<0.05$);HBP与ADA呈正相关,与CHE呈正相关($P<0.05$);ADA与CHE呈正相关($P<0.05$)。**结论** 急性细菌性脑膜炎患者脑脊液HBP、ADA在革兰阴性菌感染患者中表达高于革兰阳性菌,具有较高的病原菌鉴别价值,HBP、ADA、CHE可相互影响,均与病情程度呈正相关。

[关键词] 脑脊液; 肝素结合蛋白; 腺苷脱氨酶; 胆碱酯酶; 急性细菌性脑膜炎; 病原菌

The value of HBP, ADA, CHE to identify the pathogenic bacteria of acute bacterial meningitis and its correlation with the disease

XU Xueqin*, MA Yonglei, YANG Xiyong

(Department of Laboratory Medicine, Zhumadian Central Hospital, Zhumadian, Henan, China, 463000)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the value of cerebrospinal fluid heparin-binding protein (HBP), adenosine deaminase (ADA), and cholinesterase (CHE) to identify the pathogenic bacteria of acute bacterial meningococcal genus and its correlation with the disease. **Methods** A total of 135 patients with acute bacterial meningitis treated in our hospital from April 2017 to December 2019 were selected and divided into Gram-positive bacteria group ($n=64$) and Gram-negative bacteria group ($n=71$) according to the types of pathogens. The expression of HBP, ADA, CHE in the cerebrospinal fluid of the two groups and patients with different levels of disease were compared, and Spearman was used to analyze the correlation between each index and the level of disease, the receiver operating characteristic (ROC) curve and the area under the ROC (AUC) were used to analyze the value of single and joint identification of pathogens. **Results** HBP and ADA were higher in the Gram-negative bacteria group than those in the Gram-positive bacteria group ($P<0.05$). The AUC of HBP to identify the pathogenic bacteria of acute bacterial meningococcus was 0.776, the AUC for ADA to identify the pathogenic bacteria of acute bacterial meningococcus was 0.709, the AUC both HBP and ADA was 0.883 ($P<0.05$). The expression of HBP, ADA, CHE was severe > moderate > mild ($P<0.05$). HBP, ADA, CHE were positively correlated with the disease severity ($P<0.05$); HBP was positively

基金项目:2018年河南省医学科技攻关计划(联合共建项目)(2018020607)

作者单位:河南省驻马店市中心医院检验科,河南,驻马店 463000

*通信作者:徐雪勤, E-mail: xuxueq1971@126.com

correlated with ADA and CHE ($P<0.05$); ADA was positively correlated with CHE ($P<0.05$). **Conclusion** The expression of HBP and ADA in cerebrospinal fluid of patients with acute bacterial meningitis in Gram-negative bacteria is higher than that in Gram-positive bacteria. It has a high value of pathogen identification, HBP, ADA, CHE can affect each other, and are positively correlated with the degree of the disease.

[KEY WORDS] Cerebrospinal fluid; Heparin-binding protein; Adenosine deaminase; Cholinesterase; Acute bacterial meningitis; Pathogenic bacteria

急性细菌性脑膜炎是常见的中枢神经系统感染类疾病,其起病急,病死率高,预后较差。因此,早期明确诊断,并给予针对性治疗是改善患者预后的关键^[1-2]。脑脊液细菌培养是急性细菌性脑膜炎诊断的金标准,但培养时间较长;细菌革兰氏染色能快速鉴别致病菌,但易受脑脊液中细菌浓度的影响,因此研究其他有效指标诊断、鉴别病原菌的种类,评估患者病情意义重大。肝素结合蛋白(Heparin-binding protein, HBP)在脓毒血症早期、矽肺严重感染早期升高明显,有助于感染类疾病的诊断,但在急性细菌性脑膜炎不同病原菌中表达的研究较少^[3-5]。腺苷脱氨酶(adenosine deaminase, ADA)与机体细胞免疫活性密切相关,对结核性脑膜炎具有较高的鉴别价值^[6]。胆碱酯酶(cholinesterase, CHE)是一种生物神经传导中生物酶,可用于脑梗死、痴呆等辅助诊断,故推测与神经系统疾病有关^[7-8]。本研究将探讨HBP、ADA、CHE鉴别不同病原菌的价值及与病情的关联性,为临床决策、治疗等提供参考,报告如下。

1 资料和方法

1.1 一般资料

选取2017年4月至2019年12月本院收治的135例急性细菌性脑膜炎患者,根据病原菌类型分为革兰阳性菌组($n=64$)、革兰阴性菌组($n=71$)。纳入标准:①符合急性细菌性脑膜炎诊断标准^[9];②首次确诊;③入组前无相关治疗史;④无凝血功能障碍。排除标准:①颅脑外科手术史;②肾肝等脏器功能严重异常者;③合并恶性肿瘤者;④存在结核感染类疾病者;⑤合并病毒、真菌等感染类疾病者;⑥伴有免疫系统疾病者。

1.3 方法

1.3.1 主要试剂、仪器

HBP胶乳免疫比浊法试剂盒(杭州中翰盛泰生物技术有限公司,20162400051);ADA过氧化物酶法试剂盒(北京利德曼生化股份有限公司);

CHE丁酰硫代胆碱底物法试剂盒(苏州贝克曼库尔特实验系统有限公司,20162400051);全自动生化分析仪(Backman公司,型号:AU5821)。

1.3.2 标本采集与检测

入院后行腰椎穿刺术,留取脑脊液标本,采用胶乳免疫比浊法检测脑脊液HBP表达,采用过氧化物酶法及全自动生化分析仪测定脑脊液ADA表达,采用丁酰硫代胆碱底物法及全自动生化分析仪测定脑脊液CHE表达。

1.3.3 病情程度评估

采用急性生理和慢性健康状况评分(Acute physiology and chronic health evaluation, APACHE II)^[10]评估,<8分为轻度,8~19分为中度,>19分为重度。

1.4 观察指标

①对比两组临床资料。②比较两组脑脊液HBP、ADA、CHE表达。③分析各指标单一及联合鉴别病原菌的截断值、敏感度、特异度。④比较不同病情程度患者脑脊液HBP、ADA、CHE表达。⑤分析各指标与病情程度的相关性。⑥分析HBP、ADA、CHE之间的相关性。

1.5 统计学方法

采用SPSS 22.0统计学软件处理数据,计量资料经正态性检验,均为正态分布,以($\bar{x}\pm s$)表示;多组间比较采用单因素方差分析;两两比较以LSD-t检验;计数资料用 $n(\%)$ 表示、 χ^2 检验;采用Spearman分析各指标与病情程度的相关性;采用Pearson分析各指标之间的相关性;采用受试者工作特征曲线(Receiver operating characteristic, ROC)曲线及ROC下面积(Area under the curve, AUC)分析各指标单一及联合鉴别病原菌的价值。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组一般资料比较

两组间年龄、性别、年龄、发病至入院时间、体

质量指数、身高、临床症状、病情严重程度、合并疾病等资料比较,差异无统计学意义($P>0.05$),均有可比性。见表1。

表1 两组临床资料比较 [$n(\%)$, ($\bar{x}\pm s$)]

Table 1 Comparison of clinical data between the 2 groups [$n(\%)$, ($\bar{x}\pm s$)]

| 资料 | 革兰阳性菌组 ($n=64$) | 革兰阴性菌组 ($n=71$) | t/χ^2 值 | P 值 |
|---------------------------|----------------------|----------------------|--------------|-------|
| 年龄(岁) | 45.29±19.21 | 46.35±18.87 | 0.323 | 0.747 |
| 发病至入院时间(h) | 6.28±2.05 | 6.34±1.96 | 0.174 | 0.862 |
| 体质量指数(kg/m ²) | 23.08±2.03 | 22.89±1.94 | 0.556 | 0.579 |
| 身高(cm) | 165.49±8.11 | 164.84±7.23 | 0.492 | 0.623 |
| 性别(男/女) | 30/34 | 32/39 | 0.044 | 0.834 |
| 临床症状 | | | | |
| 呕吐 | 32(50.00) | 29(40.85) | 1.139 | 0.286 |
| 意识障碍 | 4(6.25) | 5(7.04) | 0.026 | 0.872 |
| 发热 | 52(81.25) | 56(78.87) | 0.119 | 0.730 |
| 抽搐 | 6(9.38) | 4(5.63) | 0.250 | 0.617 |
| 休克 | 3(4.69) | 5(7.04) | 0.046 | 0.831 |
| 脑膜刺激征阳性 | 10(15.63) | 7(9.86) | 1.017 | 0.313 |
| 脑电图异常 | 8(12.50) | 6(8.45) | 0.594 | 0.441 |
| 病情严重程度 | | | | |
| 轻度 | 16(25.00) | 24(33.80) | | |
| 中度 | 32(50.00) | 29(40.85) | 1.506 | 0.471 |
| 重度 | 16(25.00) | 18(25.35) | | |
| 合并疾病 | | | | |
| 高脂血症 | 7(10.94) | 3(4.23) | 1.341 | 0.247 |
| 糖尿病 | 6(9.38) | 9(12.68) | 0.671 | 0.413 |
| 心脏病 | 2(3.13) | 4(5.63) | 0.083 | 0.773 |
| 高血压 | 3(4.69) | 1(1.41) | 0.377 | 0.539 |

2.2 两组各指标表达比较

革兰阴性菌组 HBP、ADA、CHE 水平高于革兰阳性菌组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表2。

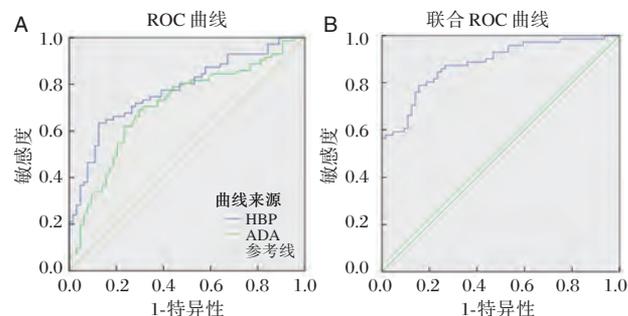
表2 两组各指标表达比较 ($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Comparing the expression of each index in the 2 groups ($\bar{x}\pm s$)

| 组别 | n | HBP(ng/mL) | ADA(U/L) | CHE(U/L) |
|--------|-----|--------------|-----------|--------------|
| 革兰阳性菌组 | 64 | 195.66±60.28 | 1.83±0.64 | 146.98±38.56 |
| 革兰阴性菌组 | 71 | 289.78±91.53 | 2.94±1.22 | 150.15±41.29 |
| t 值 | | 6.974 | 6.514 | 0.460 |
| P 值 | | <0.001 | <0.001 | 0.647 |

2.3 各指标单一及联合鉴别病原菌的价值

HBP 鉴别急性细菌性脑膜炎病原菌的 AUC 为 0.776, ADA 鉴别急性细菌性脑膜炎病原菌的 AUC 为 0.709, HBP+ADA 鉴别急性细菌性脑膜炎病原菌的 AUC 为 0.883($P<0.05$)。见图1、表3。



注:A为HBP、ADA单一鉴别病原菌的ROC曲线,B为HBP+ADA鉴别病原菌的ROC曲线。

图1 HBP、ADA 鉴别病原菌的 ROC 曲线

Figure 1 ROC curve of HBP and ADA identification bacteria

表3 ROC 分析结果

Table 3 Results of ROC analysis

| 指标 | AUC | 95%CI | Z统计 | P 值 | cut-off 值 | 敏感度(%) | 特异度(%) |
|---------|-------|-------------|--------|--------|-----------|--------|--------|
| ADA | 0.709 | 0.624-0.783 | 4.604 | <0.001 | >2.35 U/L | 69.01 | 70.31 |
| HBP | 0.776 | 0.697-0.844 | 6.915 | <0.001 | >249.95 | 63.38 | 87.50 |
| ADA+HBP | 0.883 | 0.816-0.932 | 13.506 | <0.001 | | 78.87 | 84.37 |

2.4 各指标之间的相关性

HBP 与 ADA ($r=0.525, P<0.05$) 呈正相关,与 CHE ($r=0.390, P<0.05$) 呈正相关; ADA 与 CHE ($r=0.349, P<0.05$) 呈正相关。见图2。

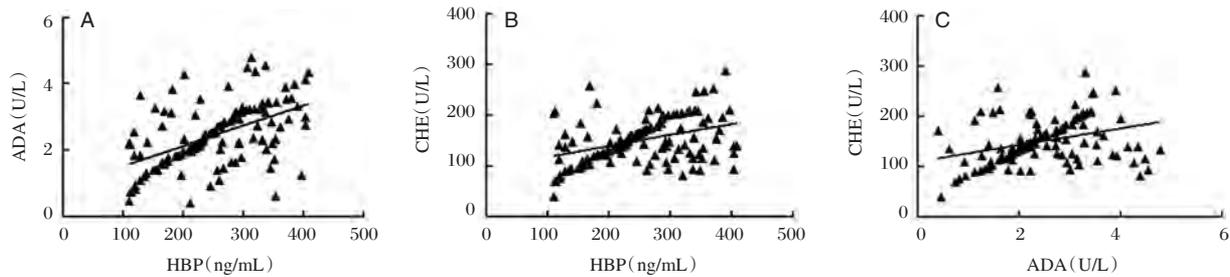
2.5 不同病情程度患者各指标表达比较

采用 Pearson 分析, HBP、ADA、CHE 表达重度>

中度>轻度,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表4。

2.6 各指标与病情程度的相关性

采用 Spearman 分析发现, HBP ($r=0.417, P<0.05$)、ADA ($r=0.529, P<0.05$)、CHE ($r=0.508, P<0.05$) 与病情程度均呈正相关,差异有统计学意义($P<0.05$)。



注:A为HBP与ADA的相关性;B为HBP与CHE的相关性;C为ADA与CHE的相关性。

图2 各指标间的相关性

Figure 2 Correlation among indicators

表4 不同病情程度患者各指标表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Comparison of each index expression in patients with different disease levels ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | n | HBP(ng/mL) | ADA(U/L) | CHE(U/L) |
|----|----|----------------------------|-------------------------|--------------|
| 轻度 | 40 | 205.38±63.92 ^{ab} | 1.15±0.58 ^{ab} | 130.78±36.37 |
| 中度 | 61 | 240.92±75.35 ^a | 2.35±0.72 ^a | 150.33±45.19 |
| 重度 | 34 | 299.57±82.26 | 4.00±1.14 | 166.66±51.25 |
| F值 | | 15.061 | 113.406 | 8.471 |
| P值 | | <0.001 | <0.001 | <0.001 |

注:与重度相比,^a $P < 0.05$;与中度相比,^b $P < 0.05$

3 讨论

HBP具有广泛的杀菌功能,可诱导趋化、调控炎症反应,在急诊恶性肿瘤早期细菌感染及急性细菌性脑膜炎患者中呈高表达^[11]。本研究显示,革兰阴性菌组HBP高于革兰阳性菌组,可能与病原菌的类型有关,且感染越严重,HBP水平越高。正常状态下HBP表达较低,发生细菌性脑膜炎时,菌体本身及细菌释放的毒素等均可刺激中性粒细胞释放HBP,引起HBP水平的升高。革兰阴性菌患者脑脊液HBP较高可能与其导致的感染较严重,释放的毒素对中性粒细胞趋化和刺激作用更大有关。Kahn F等^[12]研究指出,HBP在脓毒症中呈高表达,是患者预后情况的生物标志物,佐证了HBP与患者病情有关。因此临床上应高度重视HBP高表达患者的治疗,以改善患者预后。

CHE由肝脏合成,在中枢神经感染患者脑脊液中表达高于未感染患者,提示CHE与中枢神经感染疾病有关^[13]。本研究发现,革兰阴性菌组CHE表达与革兰阳性菌组比较相似,对病原菌无鉴别价值,但在急性细菌性脑膜炎患者脑脊液中表达,与病情程度呈正相关,可评估患者病情程

度。CHE分子量较大,相对于脑脊液,血浆中CHE活性较高,发生急性细菌性脑膜炎后,血脑屏障被破坏,通透性增加,外周血中CHE进入脑脊液中,造成脑脊液中CHE含量增加^[14]。且脑组织中含有一定量的CHE,急性细菌性脑膜炎发生后,这些组织中CHE可能被释放进入脑脊液,从而使脑脊液中CHE升高。同时感染越严重,血脑屏障破坏越明显,CHE进入脑脊液量越多,因此检测脑脊液中CHE表达能判断病情程度。

ADA广泛分布于白细胞、淋巴细胞、红细胞等,在淋巴细胞中活性较高。Kim CH等^[15]研究发现,血清乳酸脱氢酶与胸液CHE比值对鉴别肺炎支原体肺炎性肺旁积液和结核性胸腔积液具有重要价值。目前关于ADA鉴别不同细菌病原菌的报道鲜见。本研究显示,革兰阴性菌组ADA水平高于革兰阳性菌组,这有助于鉴别病原菌,为评估患者病情,为临床干预提供重要的参考信息。ADA参与机体免疫反应,细菌入侵后,可激活机体的免疫系统,以抵抗病原菌的入侵。由于ADA在淋巴细胞中活性较高,发生急性细菌性脑膜炎后,升高的淋巴细胞是导致脑脊液ADA升高的重要原因,推测可能是革兰阴性菌致病力较强,因此ADA较高,但这一观点仍需后续更多报道的论证。同时HBP、ADA、CHE可能起到了相互协同的作用,但这一结论仍有待更多研究的进一步证实。本研究不足之处在于,革兰阴性菌和革兰阳性菌种类较多,本研究未进行详细的划分,各指标对具体某一菌株的鉴别价值仍有待后续的深入探讨。

综上所述,急性细菌性脑膜炎患者脑脊液HBP、ADA在革兰阴性菌感染患者中表达高于革兰阳性菌,具有较高的病原菌鉴别价值,HBP、ADA、CHE可相互影响,均与病情程度呈正相关。

参考文献

- [1] 范文兵,周银锁. D-乳酸和降钙素原对细菌性脑膜炎的诊断价值[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2019, 11(6):531-534,544.
- [2] Sanjith S, S MK, G TP, et al. Correlation between CSF Glucose Estimation using Glucometers against the Conventional Laboratory Technique in Determining Bacterial Meningitis: An Indian Study[J]. J Assoc Physicians India, 2020, 68(2):43-47.
- [3] Sandoval DR, Gomez Toledo A, Painter CD, et al. Proteomics-based screening of the endothelial heparan sulfate interactome reveals that C-type lectin 14a (CLEC14A) is a heparin-binding protein[J]. J Biol Chem, 2020, 295(9):2804-2821.
- [4] Zhang XT, Han W. Application value of heparin-binding protein in early diagnosis of severe infection in silicosis patients [J]. Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi, 2019, 53(8):835-839.
- [5] Chen S, Zhang C, Hong G, et al. Meta-analysis of the diagnostic efficacy of heparin binding protein in adult sepsis [J]. Chin Crit Care Med, 2019, 31(11):1330-1334.
- [6] Pormohammad A, Nasiri M J. Diagnostic test accuracy of adenosine deaminase for tuberculous meningitis: A systematic review and meta-analysis-An update[J]. J Infect, 2018, 77(4):349-356.
- [7] Ahmadi-Motamayel F, Goodarzi MT, Tarazi S, et al. Evaluation of salivary acetylcholinesterase and pseudocholinesterase in patients with Alzheimer's disease: A case-control study [J]. Spec Care Dentist, 2019, 39(1):39-44.
- [8] Manca C, Hopes L, Kearney-Schwartz A, et al. Assessment of 18F-Florbetaben Amyloid PET Imaging in Patients with Suspected Alzheimer's Disease and Isolated Increase in Cerebrospinal Fluid Tau Proteins [J]. J Alzheimers Dis, 2019, 68(3):1061-1069.
- [9] 胡家胜,邓小龙,孙丹,等. 2016版《欧洲临床微生物和感染病学会急性细菌性脑膜炎诊治指南》解读[J]. 中国实用儿科杂志, 2017, 32(10):726-732.
- [10] Chatterjee R, Parab N, Sajjan B, et al. Comparison of Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II, Modified Computed Tomography Severity Index, and Bedside Index for Severity in Acute Pancreatitis Score in Predicting the Severity of Acute Pancreatitis [J]. Indian J Crit Care Med, 2020, 24(2):99-103.
- [11] 张慧,刘建勇,鲁静,等. 血浆肝素结合蛋白对脓毒症休克的早期预测及预后价值[J]. 热带医学杂志, 2017, 17(10):1322-1327.
- [12] Kahn F, Tverring J, Mellhammar L, et al. Heparin-Binding Protein as a Prognostic Biomarker of Sepsis and Disease Severity at the Emergency Department [J]. Shock, 2019, 52(6):e135-e145.
- [13] Boiarski DR, Toigo CM, Sobjak TM, et al. Assessment of antioxidant system, cholinesterase activity and histopathology in Lithobates catesbeianus tadpoles exposed to water from an urban stream[J]. Ecotoxicology, 2020, 29(3):314-326.
- [14] Di Bari M, Di Pinto G, Reale M, et al. Cholinergic System and Neuroinflammation: Implication in Multiple Sclerosis [J]. Cent Nerv Syst Agents Med Chem, 2017, 17(2):109-115.
- [15] Kim CH, Park JE, Yoo SS, et al. Usefulness of serum lactate dehydrogenase/pleural fluid adenosine deaminase ratio for differentiating Mycoplasma pneumoniae parapneumonic effusion and tuberculous pleural effusion [J]. J Infect, 2017, 75(6):581-583.

(上接第740页)

- [3] Wang T, Gong Y, Shi Y, et al. Feasibility of dual-low scheme combined with iterative reconstruction technique in acute cerebral infarction volume CT whole brain perfusion imaging [J]. Exp Ther Med, 2017, 14(1):163-168.
- [4] 朱新华,刘周婷,肖兴,等. 丁苯酞注射液与依达拉奉联合治疗对急性脑梗死患者血清Hcy、UA及神经功能的影响[J]. 解放军预防医学杂志, 2019, 37(8):140-141,144.
- [5] 侯静,王凌云,张勇. 胞二磷胆碱联合阿替普酶治疗急性脑梗死的疗效观察[J]. 现代药物与临床, 2018, 33(2):256-259.
- [6] 张智勇,王精忠. 中西医结合治疗急性脑梗塞临床疗效观察[J]. 湖北中医药大学学报, 2019, 21(3):61-63.
- [7] 顾红梅,邵阳. 急性脑梗死患者TLR4/NF- κ B信号通路水平与脑血流量的相关性研究[J]. 卒中与神经疾病, 2017, 24(3):197-199,213.
- [8] 中华医学会神经病学分会,中华医学会神经病学分会脑血管病学组. 中国急性缺血性脑卒中诊治指南2014[J]. 中华神经科杂志, 2015, 48(4):246-257.
- [9] 吴芬香,侯倩,吉维忠,等. 依达拉奉联合胞二磷胆碱治疗急性脑梗死对机体氧化应激和炎性反应的影响[J]. 河北医药, 2018, 40(11):1646-1649.
- [10] 陈彬,徐成婷,沈伟. 胞二磷胆碱联合尿激酶治疗急性脑梗死的临床研究[J]. 现代药物与临床, 2018, 33(12):3123-3127.
- [11] 刘阳,潘永贵,刘雅丽,等. 胞二磷胆碱注射液联合替格瑞洛片治疗急性脑梗死昏迷的临床研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2018, 34(11):1285-1287,1305.
- [12] 张东,焦富英,韩冰凌,等. 针刺联合血塞通注射液对脑梗死患者神经功能缺损及细胞因子水平影响[J]. 辽宁中医药大学学报, 2019, 21(1):141-144.
- [13] 肖俊,冯佳梁,戎天艺,等. 血塞通注射液对急性脑梗死患者心电图变化及血液流变学的影响[J]. 现代中西医结合杂志, 2019, 28(2):202-205.
- [14] Teng L, Meng R. Long Non-Coding RNA MALAT1 Promotes Acute Cerebral Infarction Through miRNAs-Mediated hs-CRP Regulation [J]. J Mol Neurosci, 2019, 69(3):494-504.
- [15] 詹麒麟,叶胜业,林森,等. 依达拉奉治疗急性脑梗死的临床疗效及对氧化应激和炎症因子的影响[J]. 贵州医药, 2018, 42(7):816-818.
- [16] 童军卫,刘补兴,胡小铭,等. 灯盏花素对脑外伤大鼠皮质神经元自噬、炎症损伤及TLR4/NF- κ B信号通路的影响[J]. 中国中医急症, 2017, 26(12):2104-2107.

sTRAIL、PCT、ALB 在重症肝病合并感染患者外周血中的表达及临床意义

徐萍¹ 伍廷平^{2*} 夏红¹ 时志鹏¹ 杨强¹ 刘荷蕾¹

[摘要] **目的** 探究可溶性肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(sTRAIL)、降钙素原(PCT)、白蛋白(ALB)在重症肝病合并感染患者外周血中的表达及临床意义。**方法** 选取本院2017年5月至2019年8月收治的重症肝病患者159例,根据是否合并感染分为合并感染患者55例(观察组),未合并感染患者104例(对照组)。检测两组不同治疗结局患者血清sTRAIL、PCT、ALB水平及肝功能指标[总胆红素(TBiL)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)],分析血清sTRAIL、PCT、ALB与肝函数的关系,评价三者对治疗结局的预测价值。**结果** 观察组血清sTRAIL、PCT水平高于对照组,ALB水平低于对照组($P<0.05$);观察组血清TBiL、AST、ALT水平高于对照组($P<0.05$);Pearson相关性分析,血清sTRAIL、PCT与TBiL、AST、ALT呈正相关,ALB与TBiL、AST、ALT呈负相关($P<0.05$);治疗有效者治疗第7、14 d血清sTRAIL、PCT、ALB水平较治疗前显著降低,且均低于同期治疗无效者($P<0.05$);ROC曲线分析,治疗第14 d血清TBiL、AST、ALT联合预测AUC为0.881,大于三者治疗第7、14 d单独预测价值。**结论** sTRAIL、PCT、ALB在重症肝病合并感染患者外周血中异常表达,与肝功能密切相关,且联合检测有助于预测治疗结局。

[关键词] 重症肝病;感染;sTRAIL;PCT;ALB;相关性

Expression and clinical significance of serum sTRAIL, PCT, ALB in patients with severe liver disease and infection

XU Ping¹, WU Tingping^{2*}, XIA Hong¹, SHI Zhipeng¹, YANG Qiang¹, LIU Helei¹

(1. Department of infection, Dazu District People's Hospital, Chongqing, China, 402360; 2. Chongqing Dazu District People's Hospital, Chongqing, China, 402360)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the expression and clinical significance of serum soluble tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (sTRAIL), procalcitonin (PCT), and albumin (ALB) in patients with severe liver disease and infection. **Methods** A total of 159 patients with severe liver disease admitted to our hospital from May 2017 to August 2019 were selected and divided into 55 patients with co-infection (observation group) and 104 patients without co-infection (control group) according to whether they were co-infected. The serum sTRAIL, PCT, ALB levels and liver function indexes [total bilirubin (TBiL), aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT)] were detected in two groups of patients with different treatment outcomes, and the relationship between serum sTRAIL, PCT, ALB and liver function was analyzed, and the predictive value of the three on the treatment outcome was evaluated. **Results** The serum levels of sTRAIL and PCT in the observation group were higher than those in the control group, and the levels of ALB were lower than those in the control group ($P<0.05$); serum TBiL, AST and ALT levels in the

基金项目:重庆市卫生和计划生育委员会科研计划项目(2018ZBXM33781)

作者单位:1. 重庆市大足区人民医院感染科,重庆 402360

2. 重庆市大足区人民医院老院区全科医疗,重庆 402360

*通信作者:伍廷平, E-mail:1265013883@qq.com

observation group were higher than those in the control group ($P<0.05$). Pearson correlation analysis showed that serum sTRAIL and PCT were positively correlated with TBiL, AST and ALT, and ALB was negatively correlated with TBiL, AST and ALT ($P<0.05$); the level of serum sTRAIL, PCT and ALB on the 7th and 14th day of treatment of those who were effective were significantly lower than those before treatment, and were lower than those who were ineffective during the same period ($P<0.05$); ROC curve analysis showed that the combined AUC predicted by serum TBiL, AST, and ALT on the 14th days of treatment was 0.881, which was greater than the individually predicted value on the 7th and 14th days of the three. **Conclusion** The abnormal expression of sTRAIL, PCT, and ALB in patients with severe liver disease and infection is closely related to the liver function, and combined detection can help predict the outcome of treatment.

[KEY WORDS] Severe liver disease; Infection; sTRAIL; PCT; ALB; Correlation

重症肝病是临床常见严重疾病类型,具有较高发病率,且病情严重复杂,若合并感染则会显著提高预后不良及死亡风险^[1-2]。研究表明,肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TNF related apoptosis inducing ligand, TRAIL)是机体内典型的免疫监视分子,在免疫调节及炎症反应中发挥重要作用^[3]。降钙素原(Procalcitonin, PCT)是一种反映炎症与感染的主要指标之一,有助于判断感染发生情况^[4]。白蛋白(Albumin, ALB)在肺部感染、腹腔感染等多种感染中异常表达,且对肝功能有一定影响^[5]。既往虽有研究探讨上述因子在重症肝病合并感染中的变化,但未进行深入分析。基于此,本研究尝试通过探讨sTRAIL、PCT、ALB在重症肝病合并感染患者外周血中的表达,分析其与肝函数的关系及预测治疗结局价值。现报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取本院2017年5月至2019年8月收治的重症肝病重症肝病患者159例,根据是否合并感染分为合并感染患者55例(观察组),年龄在38~72岁,平均年龄(50.23±5.39)岁平均病程(2.17±0.64)年。未合并感染患者104例(对照组)年龄在39~70岁,平均年龄(51.06±4.78)岁,平均病程(2.26±0.70)年。两组年龄、性别、肝病类型、病程、体质量指数等一般资料相比,差异无统计学意义($P>0.05$),有可比性,见表1。且本研究经本院伦理委员会审批通过。

纳入标准:①均经实验室检查、影像学检查、临床诊断证实为重症肝病;②观察组均具备感染临床表现,符合《医院感染诊断标准(试行)》中医

表1 两组一般资料比较 [$n(\%)$, ($\bar{x}\pm s$)]

Table 1 Comparison of general information between 2 groups [$n(\%)$, ($\bar{x}\pm s$)]

| 资料 | 观察组 ($n=55$) | 对照组 ($n=104$) | t/χ^2 值 | P 值 |
|---------------------------|-------------------|--------------------|--------------|-------|
| 年龄(岁) | 50.23±5.39 | 51.06±4.78 | 0.996 | 0.321 |
| 病程(年) | 2.17±0.64 | 2.26±0.70 | 0.794 | 0.429 |
| 性别(例) | | | | |
| 男 | 29(52.73) | 53(50.96) | 0.045 | 0.832 |
| 女 | 26(47.27) | 51(49.04) | | |
| 体质量指数(kg/m ²) | | | | |
| <24 | 34(61.82) | 65(62.50) | 0.007 | 0.933 |
| ≥24 | 21(38.18) | 39(37.50) | | |
| 肝病类型(例) | | | | |
| 肝癌 | 6(10.91) | 12(11.54) | 0.088 | 0.957 |
| 肝硬化 | 16(29.09) | 28(26.92) | | |
| 重型肝炎 | 33(60.00) | 64(61.54) | | |

院感染相关诊断标准^[6];③两组临床资料完整,且均自愿签订知情承诺书。排除标准:①合并严重心血管功能异常者;②伴有肺脏、肾脏等其他重要脏器严重功能障碍者;③近期服用刺激细胞炎性因子释放或免疫抑制剂等相关药物者;④伴有其他恶性肿瘤疾病者;⑤合并自身免疫性肝病、药物性肝病、酒精性肝病等其他类型肝病者;⑥存在血液系统疾病者。

1.2 方法

1.2.1 检测方法

采集所有受试者及观察组治疗前、治疗第7、14天清晨空腹静脉血4 mL,2 500 r/min离心处理,持续15 min,取上清液,保存于-70℃恒温冰箱内,待检。采用电化学发光法检测血清PCT水平,溴甲酚绿法检测血清ALB水平,酶联免疫吸附法检测血清sTRAIL水平,试剂盒购自奥地利维也纳Bender公司。

1.2.2 治疗方法

观察组均于常规保肝、护肝、补液等治疗措施基础上,静脉滴注头孢噻亏钠,1~2 g/次,2~3次/d,每日最高剂量<12 g;静脉滴注人免疫球蛋白,0.4 g/次,1次/d。根据患者恢复情况考虑停药时间,一般治疗2周可停药。

1.3 观察指标

①两组血清sTRAIL、PCT、ALB水平。②两组血清TBiL、AST、ALT水平。③血清sTRAIL、PCT、ALB与肝功能的的关系。④观察组不同治疗结局患者治疗前、治疗第7、14天血清sTRAIL、PCT、ALB水平变化趋势。⑤血清sTRAIL、PCT、ALB对治疗结局的预测价值。

1.4 统计学处理

采用SPSS 22.0软件进行数据处理,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,t检验,计数资料以n(%)表示,采用 χ^2 检验,以Pearson相关性分析相关性,ROC曲线评价预测价值, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组血清sTRAIL、PCT、ALB水平

观察组血清sTRAIL、PCT水平高于对照组,ALB水平低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表2。

表2 两组血清sTRAIL、PCT、ALB水平比较($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of serum levels of sTRAIL, PCT and ALB between the 2 groups ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | n | sTRAIL(pg/mL) | PCT(μ g/L) | ALB(g/L) |
|-----|-----|------------------|-----------------|------------------|
| 观察组 | 55 | 10.25 \pm 2.18 | 9.11 \pm 2.03 | 28.38 \pm 3.26 |
| 对照组 | 104 | 7.53 \pm 1.69 | 0.27 \pm 0.04 | 34.17 \pm 5.29 |
| t值 | | 8.71 | 44.519 | 7.402 |
| P值 | | <0.001 | <0.001 | <0.001 |

2.2 两组肝功能指标

观察组血清TBiL、AST、ALT水平高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表3。

表3 两组肝功能指标比较($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of liver function indexes between the 2 groups ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | n | TBiL(μ mol/L) | AST(U/L) | ALT(U/L) |
|-----|-----|---------------------|--------------------|--------------------|
| 观察组 | 55 | 582.34 \pm 126.29 | 372.19 \pm 63.61 | 481.25 \pm 80.78 |
| 对照组 | 104 | 475.06 \pm 102.47 | 316.14 \pm 50.79 | 405.36 \pm 76.23 |
| t值 | | 5.784 | 6.054 | 5.849 |
| P值 | | <0.001 | <0.001 | <0.001 |

2.3 血清sTRAIL、PCT、ALB水平与肝功能指标相关性

Pearson相关性分析,血清sTRAIL($r=0.530、0.606、0.586$)、PCT($r=0.669、0.715、0.765$)与TBiL、AST、ALT呈正相关,ALB($r=-0.546、-0.505、-0.479$)与TBiL、AST、ALT呈负相关($P < 0.05$),见图1~3。

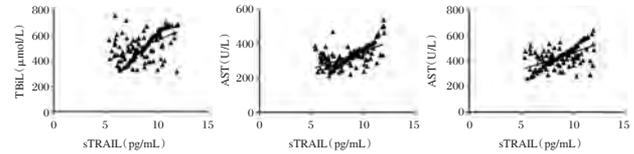


图1 血清sTRAIL与TBiL、AST、ALT的相关性

Figure 1 correlation between serum sTRAIL and TBiL, AST, ALT

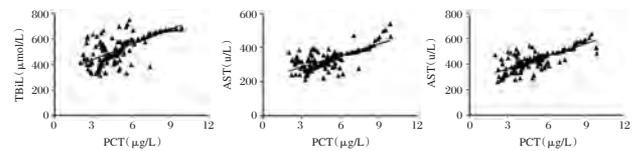


图2 血清PCT与TBiL、AST、ALT的相关性

Figure 2 correlation between serum PCT and TBiL, AST, ALT

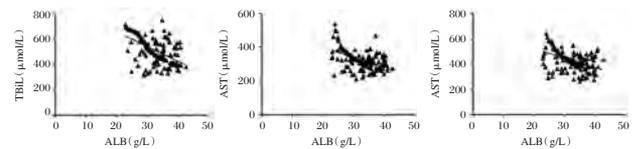


图3 血清ALB与TBiL、AST、ALT的相关性

Figure 3 correlation between serum ALB and TBiL, AST, ALT

2.4 观察组不同治疗结局患者治疗前后血清sTRAIL、PCT、ALB水平变化趋势

治疗有效者治疗第7、14天血清sTRAIL、PCT、ALB水平较治疗前显著降低,且均低于同期治疗无效者,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表4。

2.5 血清sTRAIL、PCT、ALB对治疗结局的预测价值

ROC曲线分析可见,三者联合预测价值大于单一检测。见图4,表5。

3 讨论

感染是重症肝病最严重并发症之一,主要是由于此类患者肝功能严重降低,造成细胞免疫能力下降,导致中性粒细胞及补体成分缺失,从而显

表4 不同治疗结局患者治疗前后血清sTRAIL、PCT、ALB水平变化趋势($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Changes of serum levels of sTRAIL, PCT and ALB in patients with different treatment outcomes before and after treatment ($\bar{x} \pm s$)

| 时间 | 组别 | n | sTRAIL(pg/mL) | PCT(μ g/L) | ALB(g/L) |
|--------|-------|----|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| 治疗前 | 治疗有效者 | 43 | 10.21 \pm 2.07 | 9.02 \pm 1.87 | 28.31 \pm 2.43 |
| | 治疗无效者 | 12 | 10.39 \pm 2.26 | 9.43 \pm 2.08 | 28.63 \pm 2.80 |
| | t值 | | 0.261 | 0.656 | 0.390 |
| | P值 | | 0.795 | 0.515 | 0.698 |
| 治疗第7天 | 治疗有效者 | 43 | 8.16 \pm 1.82 ^a | 5.73 \pm 1.26 ^a | 30.82 \pm 3.10 ^a |
| | 治疗无效者 | 12 | 10.27 \pm 2.33 | 9.04 \pm 2.77 | 28.17 \pm 2.26 |
| | t值 | | 3.337 | 6.005 | 2.756 |
| | P值 | | 0.002 | <0.001 | <0.001 |
| 治疗第14天 | 治疗有效者 | 43 | 6.68 \pm 1.35 ^a | 2.29 \pm 0.41 ^a | 34.70 \pm 4.39 ^a |
| | 治疗无效者 | 12 | 11.09 \pm 2.64 | 9.65 \pm 3.01 | 28.34 \pm 3.03 |
| | t值 | | 7.945 | 15.887 | 4.700 |
| | P值 | | <0.001 | <0.001 | <0.001 |

注:与同组治疗前相比,^aP<0.05。

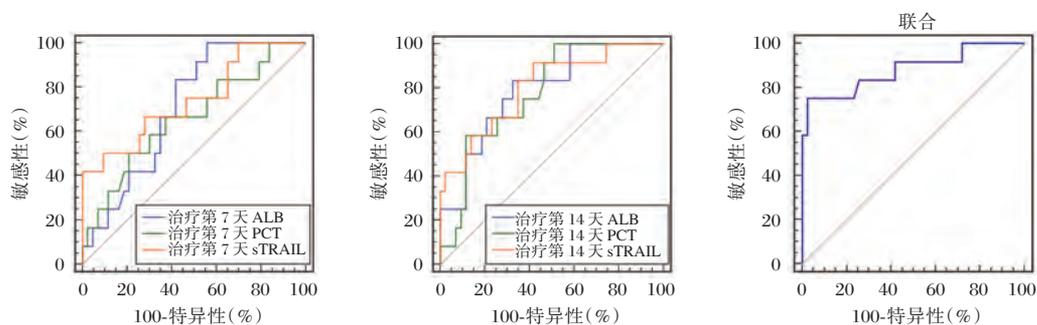


图4 血清sTRAIL、PCT、ALB对治疗结局的预测价值

Figure 4 Predictive value of serum sTRAIL, PCT and ALB for treatment outcome

表5 血清sTRAIL、PCT、ALB对治疗结局的预测价值

Table 5 Predictive value of serum sTRAIL, PCT and ALB to treatment outcome

| 指标 | AUC | 95%CI | P值 | 截断值 | 敏感度(%) | 特异度(%) |
|---------------|-------|-------------|--------|------------------|--------|--------|
| 治疗第7天 sTRAIL | 0.742 | 0.606~0.851 | 0.006 | >11.23 pg/mL | 41.67 | 90.66 |
| PCT | 0.662 | 0.522~0.784 | <0.001 | >7.32 μ g/L | 66.67 | 62.79 |
| ALB | 0.710 | 0.572~0.825 | <0.001 | \leq 30.32 g/L | 97.35 | 44.19 |
| 治疗第14天 sTRAIL | 0.802 | 0.673~0.897 | <0.001 | >9.24 pg/mL | 91.67 | 58.14 |
| PCT | 0.776 | 0.644~0.877 | <0.001 | >6.11 μ g/L | 95.68 | 48. |
| ALB | 0.791 | 0.660~0.889 | <0.001 | \leq 30.62 g/L | 87.33 | 67.44 |
| 治疗第14天三者联合 | 0.881 | 0.765~0.953 | <0.001 | - | 75.00 | 97.67 |

著减弱机体免疫防御功能,最终引发感染^[7]。因此,积极探索相关因子在重症肝病合并感染中的作用成为临床重要研究方向。

TRAIL属于TNF超家族的重要凋亡分子,于多种细胞、组织中广泛表达^[8]。本研究结果证实sTRAIL可能参与感染发生过程,与魏屏等^[9]研究结果一致。sTRAIL作为炎症介质,机体出现炎症

或感染时可过多在细胞、组织表达,加速细胞、组织凋亡或坏死,加重炎症程度,促使病情恶化^[10]。本研究还显示,血清sTRAIL与肝功能密切相关。推测其机制可能为疾病初期机体内众多免疫炎症分子及TRAIL受体/配体系统被激活,参与机体免疫炎症反应,特异性杀伤感染的肝细胞,造成肝脏免疫损伤,肝脏解毒能力下降,从而对肝功能产生

不良影响。说明调控 sTRAIL 血清水平可能是防治重症肝病合并感染的重要途径。

PCT 是一种无激素活性的降钙素前肽, 临床实践证实, 健康者血液中 PCT 含量极低, 若发生感染, 则呈显著升高表达, 能可靠地反映感染情况^[11-12]。徐虹等^[13]报道中显示 PCT 可较为准确地诊断慢性重症肝炎患者早期感染。本研究发现 PCT 不仅在感染中发挥重要作用, 还对肝功能产生明显影响。研究表明, PCT 本身无生理活性, 不会释放进入血液, 而当寄生虫、真菌、细菌或脓毒症等感染发生时, 可由病灶组织细胞合成、分泌入血, 促进炎症反应发生, 加速感染进展, 过多表达能损害病灶组织, 导致相关脏器组织功能降低^[17]。因此, 临床可通过检测血清 PCT 水平了解重症肝病合并感染患者病情改善情况。

吴军等^[14]文献报道称, ALB 血液含量降低与院内感染有关, 且随着感染时间延长、感染程度增加呈现进行性降低。在此基础上, 本研究证实, 血清 ALB 水平在重症肝病合并感染患者中明显降低, 影响肝功能。分析原因, 重症肝病通常伴有胃肠功能减弱现象, 导致 ALB 摄入减少; 炎症反应发生后, 肝脏蛋白质合成丧失优先地位, 加之持续不断的炎症应激状态对肝脏代谢造成干扰, 导致 ALB 合成减少; 炎症反复发作或急性发作能提高代谢率, 加快蛋白质消耗速度; 感染严重时, 机体内产生大量炎性介质, 损伤组织细胞, 增加毛细血管通透性, 促使大量蛋白质被滤出, 进入组织间隙, 从而造成 ALB 血液含量减少^[15-16]。故增加 ALB 摄入可能是重症肝病合并感染患者病情改善的重要环节。

此外, 本研究创新性探讨并发现血清 sTRAIL、PCT、ALB 联合能为预测治疗结局提供可靠证据。但本研究选取样本量较少, 未考虑检测方法对血清水平的影响, 可能造成数据偏移, 需作进一步分析与探究。

综上所述, sTRAIL、PCT、ALB 在重症肝病合并感染患者外周血中异常表达, 与肝功能密切相关, 且联合检测有助于预测治疗结局。

参考文献

- [1] Hagström H, Hemmingsson T, Discacciati A, et al. Alcohol consumption in late adolescence is associated with an in-

creased risk of severe liver disease later in life [J]. *J Hepatol*, 2018, 68(3):505-510.

- [2] 王会哲, 卢双劲, 刘旭. 脂溶性维生素治疗重症肝病效果及对患者肝功能影响 [J]. *临床军医杂志*, 2018, 46(7):808-809.
- [3] 李泮, 袁方, 李二威, 等. 慢病毒介导的肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体过表达对食管癌细胞生长的影响 [J]. *肿瘤基础与临床*, 2019, 32(2):93-96.
- [4] 狄勇, 白建文. PCT、NT-proBNP 及 CRP 水平对危重 HAP 临床诊断价值分析 [J]. *热带医学杂志*, 2017, 17(8):91-94.
- [5] Kaito H, Noritaka S, Tatsuya K, et al. Predictive implications of albumin and C-reactive protein for progression to pneumonia and poor prognosis in *Stenotrophomonas maltophilia* bacteremia following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation [J]. *BMC Infect Dis*, 2017, 17(1):638.
- [6] 中华人民共和国卫生部. 医院感染诊断标准(试行) [J]. *中华医学杂志*, 2001, 81(5):61-67.
- [7] Lubrano T, Dietz AA, Rubinstein HM. Extra Lactate Dehydrogenase Isoenzyme Band in Serum of Patients with Severe Liver Disease [J]. *Clin Chem*, 2020, 17(9):882-885.
- [8] Schneider H, Yanakieva D, Macarrón A, et al. TRAIL-Inspired Multivalent Dextran Conjugates Efficiently Induce Apoptosis upon DR5 Receptor Clustering [J]. *ChemBiochem*, 2019, 20(24):3006-3012.
- [9] 魏屏, 张景辉, 刘薇, 等. 肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体在重症肝炎医院感染患者血清中的表达及意义 [J]. *中华医院感染学杂志*, 2012, 22(24):5466-5468.
- [10] 王艳峰, 解立武, 王红霞, 等. 氯喹上调死亡受体 5 表达增强 Huh7 细胞对肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体的敏感性 [J]. *肿瘤研究与临床*, 2018, 30(7):438-442.
- [11] 杨秉融, 王瑾. 术后早期 PTX-3 及 PCT 检测对全麻妇科腹腔镜术后肺部感染的预测价值 [J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2019, 11(6):491-494.
- [12] Spoto S, Valeriani E, Caputo D, et al. The role of procalcitonin in the diagnosis of bacterial infection after major abdominal surgery: Advantage from daily measurement [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2018, 97(3):e9496.
- [13] 闫丽娜, 原芳. 降钙素原和淀粉样蛋白 A 在重型肝炎自发性细菌性腹膜炎中的诊断价值 [J]. *安徽医药*, 2019, 23(4):771-774.
- [14] 吴军, 刘泽, 张源源, 等. 长期卧床高龄患者医院内感染前后血浆白蛋白水平及细胞免疫功能的变化 [J]. *中华老年多器官疾病杂志*, 2013, 12(9):643-647.
- [15] 常莉, 周平. 慢性乙型肝炎重叠感染戊型肝炎病毒患者临床指标及转归分析 [J]. *临床和实验医学杂志*, 2018, 17(20):2205-2208.
- [16] Siedner MJ, Hunt PW. All About the Albumin Prognostic Capacity of Serum Albumin in Patients With Treated HIV Infection [J]. *J Infect Dis*, 2017, 217(3):347-349.

· 论 著 ·

AAG、CD64 指数和 IL-10 对肺癌术后并发感染的预测价值及与转归情况关联性

姜淮^{1*} 刘金山¹ 张道忠¹ 李杨亮²

[摘要] 目的 探究血清 α 1-酸性糖蛋白(AAG)、CD64指数和白细胞介素-10(IL-10)对肺癌术后并发感染的预测价值及与转归情况关联性。方法 选取2014年10月至2019年12月安徽省淮南市新华医疗集团新华医院肺癌术后并发感染患者120例为感染组,同期术后未发生感染患者120例为未感染组。比较两组间、感染组不同转归情况(生存、死亡)患者术前、术后3、7 d血清AAG、CD64指数、IL-10水平;绘制受试者工作特征(ROC)曲线分析血清各指标单一与联合检测对肺癌术后并发感染的预测价值;并统计感染组不同转归情况患者一般资料。结果 感染组术后3、7 d血清AAG、CD64指数、IL-10水平均高于未感染组,差异有统计学意义($P < 0.05$);感染组患者血清AAG、CD64指数、IL-10水平至术后3 d到达峰值,术后3 d血清AAG、CD64指数、IL-10联合预测肺癌术后并发感染的曲线下面积(AUC)为0.862,大于各指标单一预测的AUC,联合预测的最佳预测敏感度为70.00%、特异度为87.50%;感染组死亡、生存患者术前血清AAG、CD64指数、IL-10水平相比,差异无统计学意义($P > 0.05$);死亡患者术后3、7 d血清AAG、CD64指数、IL-10水平均高于生存患者,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 肺癌术后感染患者血清AAG、CD64指数、IL-10水平呈异常高表达状态,术后第3 d达到峰值,在预测感染发生方面具有较高应用价值,且与患者不良预后关系密切,明确其变化可为临床制定治疗方案提供参考。

[关键词] 肺癌; 术后感染; α 1-酸性糖蛋白; CD64指数; 白细胞介素-10; 疾病转归

The predictive value of AAG, CD64 index, and IL-10 in the postoperative infection of lung cancer and its correlation with outcome

JIANG Huai^{1*}, LIU Jinshan¹, ZHANG Daozhong¹, LI Yangliang²

(1. Department of cardiothoracic surgery, xinhua hospital, xinhua medical group, Anhui, Huainan, China, 232052; 2. Laboratory department of xinhua hospital, Huainan, Anhui, China, 232052)

[ABSTRACT] Objective To explore the predictive value of serum α 1-acid glycoprotein (AAG), CD64 index, and interleukin-10 (IL-10) in the postoperative complications of lung cancer and its correlation with outcome. Methods From October 2014 to December 2019, 120 patients with the postoperative lung cancer infection in our hospital were selected as the infection group, and 120 patients without infection during the same period were selected as the uninfected group. The serum AAG, CD64 index, and IL-10 levels of patients with different outcomes (survival, death) in the two groups and the infection group before, 3 days and 7 days after surgery were measured and compared. The receiver operating characteristic (ROC) curve was drawn to analyze the predictive value of single and combined detection of serum indicators for the postoperative infections of lung cancer, and general statistics of patients with different outcomes in the infection group were collected, Logistic regression analysis was used to explore the influencing factors of death in patients with lung

基金项目:安徽省淮南市科技局项目(2015A2412)

作者单位:1.安徽省淮南市新华医疗集团新华医院心胸外科,安徽,淮南 232052

2.安徽省淮南市新华医疗集团新华医院检验科,安徽,淮南 232052

*通信作者:姜淮, E-mail: hanquan7037@sina.com

cancer complicated by infection. **Results** The levels of serum AAG, CD64 index, and IL-10 were higher in the infected group than in the uninfected group at 3 and 7 days after surgery ($P<0.05$); the levels of serum AAG, CD64 index, and IL-10 in patients in the infection group reached their peaks at 3 days after surgery, the area under the curve (AUC) of serum AAG, CD64 index, and IL-10 combined to predict the postoperative infection of lung cancer at 3 days after surgery was 0.862, which was greater than the AUC predicted by each indicator, the best prediction sensitivity of the combined prediction was 70.00% and the specificity was 87.50%; serum AAG, CD64 index, and IL-10 levels were higher in dead patients in the infection group than in surviving patients at 3 and 7 days after surgery ($P<0.05$); the difference in serum AAG, CD64 index, and IL-10 levels between the death and survival patients in the infection group at 7 days after operation was the greatest, 3 days and 7 days after operation were risk factors for death of patients with lung cancer complicated with infection ($P<0.05$). **Conclusion** The serum AAG, CD64 index and IL-10 levels of patients with lung cancer infection were abnormally high, and reached the peak on the 3rd postoperative day. They have high application value in predicting the occurrence of infection and are closely related to the poor prognosis of patients. Changes can provide a reference for clinical treatment planning.

[KEY WORDS] Lung cancer; Postoperative infection; α 1-acid glycoprotein; CD64 index; Interleukin-10; Disease outcome

肺癌是全球范围内发病率和死亡率增长最快的恶性肿瘤,其发病率高居我国恶性肿瘤之首^[1]。手术为肺癌治疗的最有效方法,但患者术后免疫功能降低,易引发肺部感染、切口感染等并发症,可对患者的手术效果及术后机体恢复产生不良影响,严重者甚至危及其生命^[2-3]。相关研究指出,感染相关血清指标可直观反映患者术后机体感染情况,且对机体的其他不良应激也有积极的监测意义^[4]。 α 1-酸性糖蛋白(α 1-Acidglycoprotein, AAG)、白细胞介素-10(Interleukin-10, IL-10)均为临床常见感染相关指标,与感染的发生发展关系密切^[5-6]。此外,CD64作为近年来感染的新兴标志物,与感染严重程度呈正相关关系^[7]。基于此,本研究尝试探究血清AAG、CD64指数、IL-10对肺癌术后并发感染的预测价值及与转归情况的关联性,旨在为临床治疗本病提供参考。报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2014年10月至2019年12月安徽省淮南市新华医疗集团新华医院肺癌术后并发感染患者120例为感染组,术后均经病原学诊断确诊并发感染。同期术后未发生感染患者120例为未感染组。两组性别、年龄、体重、疾病分期、病例类型一般资料均衡可比,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表1。

表1 两组一般资料对比 [$n(\%)$, ($\bar{x}\pm s$)]

Table 1 Comparison of 2 groups of general data [$n(\%)$, ($\bar{x}\pm s$)]

| 资料 | 感染组 ($n=120$) | 未感染组 ($n=120$) | $t/\chi^2/u$ 值 | P 值 |
|---------|--------------------|---------------------|----------------|-------|
| 性别(女/男) | 45/75 | 40/80 | 0.455 | 0.500 |
| 年龄(岁) | 53.28 \pm 5.12 | 52.45 \pm 5.22 | 1.244 | 0.215 |
| 体重(kg) | 61.19 \pm 6.93 | 62.26 \pm 7.12 | 1.800 | 0.239 |
| 疾病分期(例) | | | 0.312 | 0.378 |
| III期 | 29(24.17) | 26(21.67) | | |
| II期 | 52(43.33) | 54(45.00) | | |
| I期 | 39(32.50) | 40(33.33) | | |
| 病理类型(例) | | | 0.152 | 0.697 |
| 腺癌 | 65(54.17) | 68(56.67) | | |
| 鳞癌 | 55(45.83) | 52(43.33) | | |

1.2 感染组和未感染组选例标准

纳入标准:①均经术后病理诊断确诊为肺癌;②疾病分期I~III期;③择期行手术治疗;④无手术相关禁忌;⑤能耐受手术;⑥无肺部手术史;⑦近1个月内无感染性疾病史;⑧患者知晓本研究,已签署同意书。

排除标准:①合并其他恶性肿瘤者;②肿瘤发生远处转移者;③合并肺结核、哮喘等其他肺部疾病者;④血液系统疾病患者;⑤严重心脑血管肝肾功能不全者。

1.3 方法

采集所有研究对象术前、术后3、7 d空腹静脉血3 mL,采用医用离心机(长沙湘智离心机仪器有限公司生产,型号:TDZ4-WS),以3 000 r/min转

速、8 cm 离心半径离心处理 10 min, 取血清标本, 采用酶联免疫吸附试验测定血清 AAG、IL-10 水平, 严格按照 AAG 检测试剂盒(山东博科生物产业有限公司, 批号: 20151003, 规格 R: 70 mL/42)、绵羊 IL-10 试剂盒(上海博湖生物科技有限公司, 批号: 20141215, 规格: 48T/98T)。采用流式细胞仪[艾森生物(杭州)有限公司生产, 型号: Novo-Cyte D2060R]及 CD64 试剂盒(上海汇中细胞生物科技有限公司, 批号: 20141026, 规格: 20 人份/盒)检测血清指数水平。

1.4 观察指标

①两组术前、术后 3、7 d 血清 AAG、CD64 指数、IL-10 水平。②探究血清 AAG、CD64 指数、IL-10 单一、联合预测肺癌术后并发感染的价值。③感染组术后随访 1 个月, 统计疾病转归情况, 生存患者 97 例, 死亡患者 23 例。④感染组不同转归情况患者术前、术后 3、7 d 血清 AAG、CD64 指数、IL-10 水平。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件进行数据处理, 计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 采用 t 检验, 计数资料以 $n(\%)$ 表示, 采用 χ^2 检验, 等级资料行 Ridit 检验, 采用受试者工作特征 (Receiver operating characteristic, ROC) 曲线分析预测价值, 曲线下面积 (Area under the curve, AUC), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组术前、术后 3、7 d 血清各指标水平比较

两组术后 3、7 d 血清 AAG、CD64 指数、IL-10 水平较术前增高, 尤以术后 3 d 最高, 且感染组各时间点均高于未感染组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。

2.2 血清各指标单一预测肺癌术后并发感染的 ROC 曲线

采用 ROC 曲线分析, 感染组患者血清 AAG、CD64 指数、IL-10 水平至术后 3 d 到达峰值, 以术后 3 d 血清各指标水平预测肺癌术后并发感染, 血清各指标预测曲线下面积 (Area under the curve, AUC) 均较高, 尤以血清 AAG 最高, 为 0.792 (95% CI 为 0.735~0.842), 当血清 AAG > 105.43 mg/dL 时, 其预测敏感度为 63.33%, 特异度为 83.33%。见图 1。

2.3 血清各指标联合预测肺癌术后并发感染的 ROC 曲线

绘制术后 3 d 血清 AAG、CD64 指数、IL-10 联

表 2 两组术前、术后 3、7 d 血清各指标水平比较

$[n=120, (\bar{x} \pm s)]$

Table 2 Comparison of serum indexes between 2 groups before operation, 3 days and 7 days after operation

$[n=120, (\bar{x} \pm s)]$

| 时间 | 组别 | AAG (mg/dL) | CD64 指数 | IL-10 (pg/mL) |
|--------|-------|---------------------------|------------------------|-------------------------|
| 术前 | 感染组 | 84.59±7.36 | 1.57±0.34 | 17.86±2.31 |
| | 未感染组 | 85.37±8.14 | 1.62±0.39 | 18.24±2.15 |
| | t 值 | 0.779 | 1.059 | 1.319 |
| | P 值 | 0.437 | 0.291 | 0.188 |
| 术后 3 d | 感染组 | 121.31±19.68 ^a | 5.49±1.38 ^a | 35.49±7.34 ^a |
| | 未感染组 | 94.25±12.73 ^a | 1.91±0.57 ^a | 26.05±3.29 ^a |
| | t 值 | 12.647 | 26.266 | 12.856 |
| | P 值 | <0.001 | <0.001 | <0.001 |
| 术后 7 d | 感染组 | 106.95±17.46 ^a | 3.02±1.14 ^a | 26.17±3.65 ^a |
| | 未感染组 | 88.07±9.29 ^a | 1.78±0.45 ^a | 19.08±2.92 ^a |
| | t 值 | 10.457 | 11.083 | 16.616 |
| | P 值 | <0.001 | <0.001 | <0.001 |

注: 与本组术前比较, ^a $P < 0.05$ 。

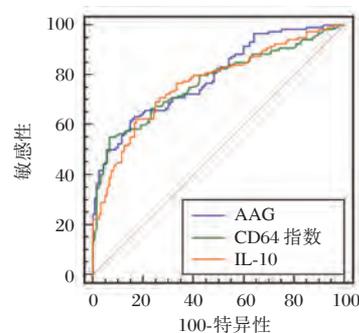


图 1 血清各指标单一预测肺癌术后并发感染 ROC 曲线
Figure 1 ROC curve of postoperative infection of lung cancer predicted by single serum index

合预测肺癌术后并发感染的 ROC 曲线, 发现联合预测的 AUC 为 0.862, 95% CI 为 0.812~0.903, 最佳预测敏感度为 70.00%、特异度为 87.50%。见图 2。

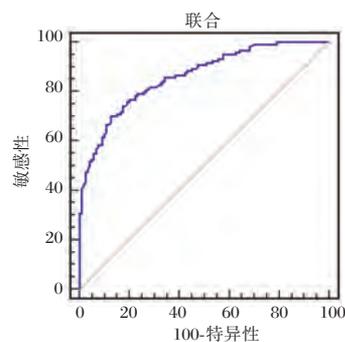


图 2 血清各指标联合预测肺癌术后并发感染 ROC 曲线
Figure 2 Serum indicators combined to predict the ROC curve of lung cancer postoperative infection

2.4 感染组不同转归情况患者一般资料比较

感染组不同转归情况患者年龄、性别、体质量、疾病分期、病理类型、感染部位均衡可比,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表3。

表3 感染组不同转归情况患者一般资料比较
[$n(\%)$, $\bar{x}\pm s$]

Table 3 Comparison of general data of patients with different outcome in the infection group [$n(\%)$, $\bar{x}\pm s$]

| 资料 | 死亡患者 ($n=23$) | 生存患者 ($n=97$) | $t/\chi^2/u$ 值 | P 值 |
|---------|--------------------|--------------------|----------------|-------|
| 年龄(岁) | 53.72±4.94 | 52.96±4.26 | 0.746 | 0.457 |
| 性别(男/女) | 15/8 | 60/37 | 0.090 | 0.764 |
| 体质量(kg) | 60.85±6.62 | 61.34±7.05 | 0.303 | 0.762 |
| 疾病分期 | | | 0.569 | 0.285 |
| Ⅲ期 | 6(26.09) | 23(23.71) | | |
| Ⅱ期 | 11(47.83) | 41(42.27) | | |
| Ⅰ期 | 6(26.09) | 33(34.02) | | |
| 病理类型 | | | 0.064 | 0.801 |
| 腺癌 | 13(56.52) | 52(53.61) | | |
| 鳞癌 | 10(43.48) | 45(46.39) | | |
| 感染部位 | | | 0.208 | 0.901 |
| 创口 | 10(43.48) | 42(43.30) | | |
| 肺部 | 8(34.78) | 30(30.93) | | |
| 其他 | 5(21.74) | 25(25.77) | | |

2.5 感染组不同转归情况患者各时间点血清各指标水平比较

死亡、生存患者术后3、7 d血清AAG、CD64指数、IL-10水平较术前升高,且死亡患者各时间点均高于生存患者,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表4。

表4 感染组不同转归情况患者各时间点血清各指标水平比较($\bar{x}\pm s$)

Table 4 Comparison of serum index levels at different time points in patients with different outcomes in infection group ($\bar{x}\pm s$)

| 时间 | 组别 | n | AAG(mg/dL) | CD64 指数 | IL-10(pg/mL) |
|-------|-------|-----|--------------|-----------|--------------|
| 术前 | 死亡患者 | 23 | 85.47±6.45 | 1.61±0.39 | 18.06±2.57 |
| | 生存患者 | 97 | 84.38±8.19 | 1.56±0.30 | 17.81±2.14 |
| | t 值 | | 0.595 | 0.676 | 0.484 |
| | P 值 | | 0.553 | 0.500 | 0.629 |
| 术后3 d | 死亡患者 | 23 | 142.47±23.14 | 6.64±1.57 | 45.07±10.32 |
| | 生存患者 | 97 | 116.29±18.27 | 5.15±1.26 | 33.22±6.15 |
| | t 值 | | 5.858 | 4.855 | 7.181 |
| | P 值 | | <0.001 | <0.001 | <0.001 |
| 术后7 d | 死亡患者 | 23 | 131.68±19.06 | 3.92±1.30 | 34.68±4.27 |
| | 生存患者 | 97 | 101.09±16.83 | 2.75±1.02 | 24.15±2.39 |
| | t 值 | | 7.639 | 4.681 | 16.006 |
| | P 值 | | <0.001 | <0.001 | <0.001 |

3 讨论

AAG是一种急性时相反应蛋白,主要由肝脏细胞合成,白细胞也能合成,是一种最稳定的早期呈阳性的急性时相反应物^[8]。孙伟等^[9]研究指出,检测血清AAG水平不仅对于感染的发生有一定反映价值,且对于机体的创伤应激反应程度也有积极的检测意义。本研究发现,肺癌患者术后血清AAG水平均呈现出先升高后降低趋势,这与手术操作引起的创伤密切相关,且肺癌术后并发感染患者术后3、7 d血清AAG水平显著高于未感染患者,提示血清AAG的高表达可能促进感染发生。手术操作引起的一系列反应促使机体大量释放IL-1,IL-1能刺激吞噬细胞大量释放脂多糖,促进肝脏细胞、白细胞合成并释放AAG,从而导致术后血清AAG水平快速升高,术后3 d左右机体应激反应等逐渐减轻,对AAG合成的影响逐渐减弱,血液中AAG含量逐渐降低^[10]。但对于并发感染患者,局部炎症反应严重,AAG合成更多,致使感染患者血清AAG水平明显增加。

此外,本研究还发现肺癌术后感染患者血清CD64指数明显高于未感染患者,与张红英等^[11]针对急性心力衰竭合并肺部感染患者的研究结果类似。充分表明CD64参与感染的发生。CD64是免疫球蛋白家族的主要成员,在中性粒细胞、单核细胞、巨噬细胞等抗原呈递细胞表面均有表达,正常机体内其表达水平非常低,但当机体发生创伤、炎症、病原菌侵袭时,上述细胞被激活,致使其表面

CD64 表达明显升高^[12]。肺癌术后并发感染患者存在手术创伤、炎症及病原菌侵袭等,CD64 表达水平更高。此外,CD64 高表达参与感染的发生发展,具有促进感染病情进展的作用,可加重肺部感染病情。

IL-10 是一种多细胞源、多功能的细胞因子,可调节细胞的生长与分化,参与炎症反应和免疫反应,被认为是最主要的炎症与免疫抑制细胞因子之一^[13]。肺癌术后单核巨噬细胞和淋巴细胞被激活,合成、分泌 IL-10 的作用增强,且术后疼痛能刺激机体释放儿茶酚胺,儿茶酚胺可通过激活蛋白激酶 A 和 CREB-1/ATF-1 引起 IL-10 基因转录^[14]。因此肺癌患者术后血清 IL-10 水平逐渐升高,合并感染患者血清 IL-10 水平更高,其原因可能在于感染可进一步刺激单核巨噬细胞和淋巴细胞活性增强。IL-10 表达水平增加提示机体免疫抑制作用增加,机体抵抗致病菌侵袭的功能减弱,从而促进肺部感染的发生发展。

此次研究发现,肺癌术后并发感染患者血清 AAG、CD64 指数、IL-10 水平均在术后 3 d 到达峰值,通过 ROC 曲线分析发现术后 3 d 血清 AAG、CD64 指数、IL-10 在预测肺癌术后并发感染方面均具有较高价值,且各指标联合预测肺癌术后并发感染的 AUC 高达 0.862,大于各指标单一预测的 AUC,有助于临床评估肺癌患者术后感染发生风险,可指导临床开展针对性治疗及干预措施,以降低感染发生率、改善患者预后。

参考文献

- [1] 陈敏琦,吴颖琳,张依,等. 维生素 D 及维生素 D 结合蛋白与肺癌的相关性研究[J]. 热带医学杂志, 2019, 19(5): 633-636.
- [2] Bilgi Z, Batrel HF, Yıldızeli B, et al. No Adverse Outcomes of Video-Assisted Thoracoscopic Surgery Resection of cT2 Non-Small Cell Lung Cancer during the Learning Curve Period[J]. Korean J Thorac Cardiovasc Surg, 2017, 50(4): 275-280.
- [3] Zhang HZ, Guo XY, Li XS, et al. Etiological characteristics of postoperative pulmonary infections in lung cancer patients and influencing factors [J]. Chin J Nosocomiol, 2018, 28(1): 77-80.
- [4] 樊巍,郭凯,吕晶. 血清 CRP、PCT 和 ESR 对骨科患者术后感染的诊断意义的临床研究[J]. 中国实验诊断学, 2019, 23(7): 1186-1189.
- [5] Sierra T, González MC, Moreno B, et al. Total α 1 - acid glycoprotein determination in serum samples using disposable screen-printed electrodes and Osmium (VI) as electrochemical tag[J]. Talanta, 2018, 180(1): 206-210.
- [6] 郭琪,姚昶,郭宇飞. 血清 IL-1 β 、IL-10、IFN- γ 在乳腺肿瘤定性诊断中价值及与预后相关性研究[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(3): 336-339+348.
- [7] 张剑波,曹玫,汪智英,等. 流式细胞术检测中性粒细胞 CD64 指数在鉴别早期感染性疾病中的临床价值分析[J]. 标记免疫分析与临床, 2017, 24(12): 1406-1409+1422.
- [8] Mohammadian M, Zeynali S, Azarbaijani AF, et al. Cytotoxic effects of the newly-developed chemotherapeutic agents 17-AAG in combination with oxaliplatin and capecitabine in colorectal cancer cell lines[J]. Res Pharm Sci, 2017, 12(6): 517-525.
- [9] 孙伟,王猛,李鑫,等. 胸腔镜手术对肺癌患者术后感染及感染相关血清指标的影响研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2017, 27(13): 3010-3013.
- [10] 周幸强. 支撑喉镜下两种手术方案治疗声带息肉的效果对比[J]. 临床医学工程, 2018, 25(6): 703-704.
- [11] 张红英,张宁宁,李新强,等. CD64 指数和降钙素原在诊断急性心力衰竭合并肺部感染中的价值[J]. 广西医学, 2017, 39(10): 1515-1517.
- [12] Qin DJ, Tang ZS, Chen SL, et al. Value of combined determination of neutrophil CD64 and procalcitonin in early diagnosis of neonatal bacterial infection[J]. Chin J Contemp Pediatr, 2017, 19(8): 872-876.
- [13] Chang KK, Liu LB, Jin LP, et al. IL-27 triggers IL-10 production in Th17 cells via a c-Maf/ROR γ t/Blimp-1 signal to promote the progression of endometriosis[J]. Cell Death Dis, 2017, 8(3): e2666.
- [14] 夏奇奕,齐福权. 头孢美唑对老年肺部感染患者 sTREM-1 及 TNF- α 、IL-10 水平的影响[J]. 中国老年学杂志, 2018, 38(2): 391-392.

血清 MMP-9 和 LCN-2 水平在乳腺癌患者中表达意义及相关性分析

赵凌云*

[摘要] 目的 探析血清人基质金属蛋白酶-9(MMP-9)和重组蛋白(LCN-2)水平在乳腺癌患者中表达意义及相关性分析。方法 选取本院2018年3月至2019年12月收治的乳腺癌患者80例(乳腺癌组),收集同期收治的乳腺良性病变患者43例(乳腺良性病变组),统计患者年龄、肿瘤直径、TNM分期、分化程度、组织学类型、淋巴结转移、ER与PR表达特征,另收集医务志愿者40例(对照组),均检测血清MMP-9和LCN-2水平,Spearman相关分析MMP-9和LCN-2与乳腺癌患者临床病理特征的相关性。结果 乳腺癌组血清MMP-9、LCN-2表达水平明显高于乳腺良性病变组、健康对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。乳腺良性病变组血清MMP-9、LCN-2表达水平略高于健康对照组,差异无统计学意义($P > 0.05$)。乳腺癌肿瘤直径 < 2 cm、TNM I~II期、淋巴结转移、ER阳性、PR阳性患者血清MMP-9、LCN-2表达与肿瘤直径 ≥ 2 cm、TNM III~IV期、无淋巴结转移、ER阴性、PR阴性患者比较,差异有统计学意义($P > 0.05$)。经Spearman相关性分析,乳腺癌患者血清MMP-9表达与ER、PR均呈正相关($r = 0.622, r = 0.597, P < 0.05$),乳腺癌患者血清LCN-2表达与ER、PR均呈正相关($r = 0.483, r = 0.491, P < 0.05$)。乳腺癌患者血清MMP-9与LCN-2亦呈正相关($r = 0.508, P < 0.05$)。结论 乳腺癌患者血清MMP-9、LCN-2均呈高表达,增加乳腺癌细胞浸润、转移风险;联检血清MMP-9、LCN-2表达水平,有助于预测评估乳腺癌复发、转移情况。

[关键词] 乳腺癌;基质金属蛋白酶-9;脂质运载蛋白-2;病理特征;相关性

Significance and correlation analysis of serum MMP-9 and LCN-2 levels in breast cancer patients

ZHAO Lingyun*

(Department of Oncology and Geriatrics, Fengshi People's Hospital, Kaifeng, Henan, China, 475000)

[ABSTRACT] Objective To analyze the expression significance and correlation of serum MMP-9 and LCN-2 levels in breast cancer patients. Methods 80 breast cancer patients (breast cancer group) admitted in our hospital from March 2018 to December 2019 were collected, and 43 patients with benign breast lesions (breast benign lesion group) admitted during the same period were collected. The age and tumor diameter of the patients were collected. TNM stage, degree of differentiation, histological type, lymph node metastasis, ER and PR expression characteristics, another 40 medical volunteers (healthy control group) were collected, and serum MMP-9 and LCN-2 levels were detected. Spearman correlation analysis was performed. Correlation between LCN-2 and MMP-9 and clinicopathological characteristics of breast cancer patients. Results The levels of serum LCN-2 and MMP-9 in breast cancer group were significantly higher than those in benign breast lesion group and healthy control group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The serum LCN-2 and MMP-9 expression levels in the benign breast lesion group were slightly higher than those in the healthy control group, but the difference was not statistically significant ($P > 0.05$). Breast cancer tumor diameter < 2 cm, TNM stage I ~ II, lymph node metastasis, ER positive, PR positive patients serum LCN-2, MMP-9 expression and

基金项目:开封市科技局(1903068)

作者单位:封市人民医院肿瘤老年科,河南,开封 475000

*通信作者:赵凌云, E-mail:124213629@qq.com

tumor diameter ≥ 2 cm, TNM stage III ~ IV, no lymph node metastasis, ER negative, Compared with PR negative patients, the difference was statistically significant ($P>0.05$). Spearman correlation analysis showed that serum LCN-2 expression was positively correlated with ER and PR in breast cancer patients ($r=0.483$, $r=0.491$, $P<0.05$), and serum MMP-9 expression was positively correlated with ER and PR in breast cancer patients ($r=0.622$, $r=0.597$, $P<0.05$). There was also a positive correlation between serum MMP-9 and LCN-2 in breast cancer patients ($r=0.508$, $P<0.05$). **Conclusion** The serum levels of LCN-2 and MMP-9 in breast cancer patients are highly expressed, which increases the risk of breast cancer cell infiltration and metastasis. The combined detection of serum LCN-2 and MMP-9 expression levels can help predict and evaluate breast cancer recurrence and metastasis.

[KEY WORDS] Breast cancer; Matrix metalloproteinase - 9; Lipocalin - 2; Pathological features; Correlation

乳腺癌属国内女性常见且高发的恶性肿瘤疾病,因乳腺癌生物学特性影响,其癌细胞可经血液循环途径与淋巴途径呈隐匿性转移,进而诱导癌细胞浸润其他器官组织致功能衰竭,导致患者死亡率较高^[1]。近年临床针对乳腺癌的诊治技术发展,乳腺癌患者5年生存期得以延长,但依旧有25%~37%的患者因乳腺癌复发、转移致死^[2]。故如何有效防控乳腺癌复发、转移成为业界研究热点。张冬冬等^[3]指出,乳腺癌复发及癌细胞转移均与毛细血管再生及细胞外基质损伤有关。研究认为^[4],基质金属蛋白酶9 (Matrix metalloproteinase-9, MMP-9)可降解细胞基底膜,促毛细血管生长效应,亦增强癌细胞侵袭、转移功能。曹亚男等^[5]研究指出,脂质运载蛋白-2(Lipocalin-2, LCN-2)与诸多恶性肿瘤发生、进展有密切关联。对此本研究将,探析血清MMP-9和LCN-2表达水平在乳腺癌患者中的意义及临床病理特征的相关性。

1 对象与方法

1.1 研究对象

收集本院2018年3月至2019年12月收治的乳腺癌患者80例,设为乳腺癌组,年龄36~71岁,平均年龄(53.76 \pm 9.74)岁。29例肿瘤直径 <2 cm, 51例肿瘤直径 ≥ 2 cm, 48例伴有淋巴结转移。病理诊断符合中国临床肿瘤学会(CSCO)《乳腺癌诊疗指南》标准^[6]。基于《乳腺及女性生殖器官肿瘤病理学和遗传学》组织学分类标准^[7],收集同期收治的乳腺良性病变患者43例,设为乳腺良性病变组。另收集医务志愿者40例,对照组。各组年龄比较无统计学意义($P>0.05$)。

纳入标准:①乳腺癌经病理诊断;②临床资料齐全;③检测前未开展放化疗或激素干预;④知

情同意,经医院医学理论委员会讨论批准。排除标准:①合并代谢性疾病者;②肝肾功能不全;③伴严重感染者;④合并心血管疾病。

1.2 方法

取各组外周静脉血(空腹、晨间)3 mL,离心10 min(3 000 r/min),分离血清。采用双抗体夹心酶联免疫吸附法检测血清LCN-2(RD公司生产试剂盒)、MMP-9(晶美生物技术公司生产试剂盒)表达水平,严格遵循试剂盒操作标准执行,根据标准曲线计算LCN-2、MMP-9含量。

1.3 统计学方法

采用SPSS 20.0软件进行分析,计量资料采用($\bar{x} \pm s$)表示组间比较采用 t 检验或方差分析,计数资料用 $n(\%)$ 表示比较采用 χ^2 检验,相关性分析采用Spearman法, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组血清MMP-9、LCN-2的含量比较

血清MMP-9、LCN-2表达水平比较结果为:乳腺癌组>乳腺癌良性病变组>对照组,差异无统计学意义($P>0.05$),表1。

表1 各组血清MMP-9、LCN-2的含量比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of serum MMP-9 and LCN-2 levels in each group ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | <i>n</i> | MMP-9(ng/mL) | LCN-2(ng/mL) |
|------------|----------|---------------------------------|---------------------------------|
| 乳腺癌组 | 80 | 96.02 \pm 23.25 ^{ab} | 95.27 \pm 27.68 ^{ab} |
| 乳腺良性病变组 | 43 | 27.26 \pm 14.47 | 54.39 \pm 21.23 |
| 对照组 | 40 | 23.22 \pm 11.85 | 48.57 \pm 19.09 |
| <i>F</i> 值 | | 286.44 | 66.99 |
| <i>P</i> 值 | | <0.001 | <0.001 |

注:与乳腺良性病变组比较^a $P<0.05$,与健康对照组比较^b $P<0.05$ 。

2.2 血清 MMP-9、LCN-2 表达与乳腺癌临床病理特征的关系

乳腺癌患者血清 MMP-9、LCN-2 表达水平与肿瘤直径、TNM 分期、淋巴结转移、ER、PR 明显

相关,差异有统计学意义($P<0.05$),与年龄、分化程度、组织学类型无相关,差异无统计学意义($P>0.05$),见表2。

表2 血清 MMP-9、LCN-2 表达与乳腺癌临床病理特征的关系 ($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Relationship between serum MMP-9、LCN-2 expression and clinicopathological characteristics of breast cancer ($\bar{x}\pm s$)

| 项目 | <i>n</i> | MMP-9(ng/mL) | <i>t/F</i> 值 | <i>P</i> 值 | LCN-2(ng/mL) | <i>t/F</i> 值 | <i>P</i> 值 |
|----------|----------|--------------|--------------|------------|--------------|--------------|------------|
| 年龄(岁) | | | 0.822 | 0.414 | | 0.833 | 0.408 |
| <50 | 27 | 91.05±28.54 | | | 89.67±31.02 | | |
| ≥50 | 53 | 97.33±34.07 | | | 95.33±27.54 | | |
| 肿瘤直径(cm) | | | 6.631 | <0.001 | | 6.131 | <0.001 |
| <2 | 29 | 80.25±21.04 | | | 67.29±24.36 | | |
| ≥2 | 51 | 127.85±35.19 | | | 113.07±35.72 | | |
| TNM 分期 | | | 6.753 | <0.001 | | 6.352 | <0.001 |
| I~II | 49 | 87.25±20.22 | | | 71.08±19.33 | | |
| III~IV | 31 | 133.76±41.08 | | | 107.36±31.82 | | |
| 淋巴结转移 | | | 7.443 | <0.001 | | 4.871 | <0.001 |
| 有 | 48 | 119.25±30.86 | | | 99.35±30.85 | | |
| 无 | 32 | 73.06±20.41 | | | 68.92±21.03 | | |
| ER | | | 5.391 | <0.001 | | 2.459 | 0.016 |
| + | 58 | 124.73±30.58 | | | 93.17±18.25 | | |
| - | 22 | 85.62±24.07 | | | 79.36±31.05 | | |
| PR | | | 4.565 | <0.001 | | 3.459 | 0.001 |
| + | 50 | 108.69±33.46 | | | 99.28±27.63 | | |
| - | 30 | 76.89±23.58 | | | 76.15±31.07 | | |
| 分化程度 | | | 0.38 | 0.687 | | 0.41 | 0.665 |
| 低分化 | 13 | 92.66±24.29 | | | 101.22±39.56 | | |
| 中分化 | 52 | 86.24±29.33 | | | 91.69±35.52 | | |
| 高分化 | 15 | 83.67±28.26 | | | 96.25±31.13 | | |
| 组织学类型 | | | 1.129 | 0.262 | | 0.418 | 0.677 |
| 特殊型 | 14 | 90.28±31.46 | | | 91.68±30.74 | | |
| 非特殊型 | 66 | 98.77±24.21 | | | 95.14±27.61 | | |

2.4 血清 MMP-9、LCN-2 相关性分析

经 Spearman 相关性分析,乳腺癌患者血清 MMP-9、LCN-2 表达与 ER、PR 均呈正相关($P<0.05$),乳腺癌患者血清 MMP-9 与 LCN-2 亦呈正相关($P<0.05$),见表3。

表3 血清 MMP-9、LCN-2 相关性分析

Table 3 Correlation analysis of serum MMP-9 and LCN-2

| 指标 | ER | | PR | | LCN-2 | |
|-------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| | <i>r</i> 值 | <i>P</i> 值 | <i>r</i> 值 | <i>P</i> 值 | <i>r</i> 值 | <i>P</i> 值 |
| MMP-9 | 0.622 | <0.05 | 0.597 | <0.05 | 0.508 | <0.05 |
| LCN-2 | 0.483 | <0.05 | 0.491 | <0.05 | - | - |

3 讨论

乳腺癌复发及远端转移属预后结局高危独立

影响因素^[8]。因细胞基底膜损伤,导致细胞与细胞连接基质防御结构异常,致使肿瘤原发病灶周围结缔组织浸润,进而引发远端转移。研究发现^[9],MMP-9 则是细胞外基质降解重要参与蛋白水解酶之一,可降解细胞基底膜,破坏基底膜屏障,提高癌细胞组织浸润、转移风险。研究指出^[10],正常人体内 MMP-9 含量较低,但受癌细胞及相关致癌因子刺激,可诱导分泌 MMP-9,造成血清 MMP-9 表达增高。Rašić 等^[11]研究,MMP-9 可对肿瘤基因转录调节,降解纤维粘连蛋白、IV 型胶原,还能增加癌细胞黏附能力,在肿瘤复发、浸润、转移等环节均有促进作用。周宁等^[12]发现,乳腺癌病理特征与 MMP-9 水平有明显关联。故众学者认为,通过测定患者血清 MMP-9 水平表达可评估恶性肿瘤进展程度。

本研究结果发现,乳腺癌患者血清 MMP-9 含量明显高于健康人员及乳腺良性病变患者,且血清 MMP-9 水平与肿瘤直径、淋巴结转移、ER、PR 表达相关;与患者年龄、分化程度、组织学类型并无关联。证实血清 MMP-9 表达水平可评估乳腺癌复发或转移情况。李金涛等^[13]动物研究发现, MMP-9 与肿瘤毛细血管生成因子有明显协同作用,且血清 MMP-9 表达水平越高,其肿瘤血管生成率越大。本研究中,乳腺癌患者 ER、PR 表达与血清 MMP-9 呈正相关,说明在乳腺癌病变进展过程 MMP-9、ER、PR 存在相互协同效应,但受研究样本限制,相关协同机制尚未解析。

早期研究证实,LCN-2 对细胞信号传递、内环境调控及免疫调节均有积极参与。多项研究发现^[14],LCN-2 在肺癌、肝癌、食管癌、乳腺癌等诸多恶性肿瘤中均呈表达上调,推论 LCN-2 在常见恶性肿瘤的发生、进展扮演重要角色。Bauer 等^[15]研究,乳腺癌细胞的凋亡、浸润、转移过程中 LCN-2 均有参与。毕泗成等^[16]研究,血清 LCN-2 水平与恶性肿瘤淋巴结转移、HER2/neu 过表达及 Ki67 均有明显相关性。研究指出^[17],LCN-2 基因抑制可延缓乳腺癌肿瘤生长,抑制癌细胞增殖及转移。反之 LCN-2 高表达可诱导 EMT,增加癌细胞复发、转移风险。本研究结果提示 LCN-2 高表达参与乳腺癌病理进展过程。

研究报道^[18],恶性肿瘤患者血清 LCN-2 过表达可抑制 MMP-9 降解效率,LCN-2 与 MMP-9 可生成复合产物 NGAL/MMP-9,提高癌细胞浸润反应。张萍等^[19]研究亦发现,血清 LCN-2 与 MMP-9 高表达患者 5 年预后生存质量较差,存活率显著低于 LCN-2 与 MMP-9 低表达患者。本研究中乳腺癌患者血清 LCN-2 与 MMP-9 表达呈正相关,经分析可能与 LCN-2 保护调节 MMP-9 活性,促进乳腺癌生长进展相关。提示 LCN-2 与 MMP-9 高表达属乳腺癌复发、转移的主要影响因素,与病情进展相关。

综上所述,乳腺癌患者血清 LCN-2、MMP-9 均呈高表达,增加乳腺癌细胞浸润、转移风险;联检血清 LCN-2、MMP-9 表达水平,有助于预测评估乳腺癌复发、转移情况。

参考文献

[1] 成玉霞,赫淑倩,董贺,等.非特殊型浸润性乳腺癌 HER-2 检测方法的对比研究[J].分子诊断与治疗杂志,2016,8(5):308-315.

- [2] Pavuluri S, Sharp JA, Lefevre C, et al. The Effect of Mammary Extracellular Matrix in Controlling Oral and Mammary Cancer Cells[J]. Asian Pac J Cancer Pre, 2018, 19(1):57.
- [3] 张冬冬,顾生玖,杜云龙,等.乳腺癌组织中肿瘤相关巨噬细胞的浸润与血管内皮生长因子表达的相关性[J].肿瘤研究与临床,2018,30(10):670-673.
- [4] Kim JM, Noh EM, Song HK, et al. Silencing of casein kinase 2 inhibits PKC-induced cell invasion by targeting MMP-9 in MCF-7 cells[J]. Mol Med Rep, 2018, 17(6):8397-8402.
- [5] 曹亚男,李晶晶,张航,等.肺癌骨转移患者血清和转移灶中 LCN2 和 PDGF-BB 的检测及意义[J].临床与实验病理学杂志,2019,35(2):187-191.
- [6] CSCO 乳腺癌诊疗指南(2017.V1)重磅颁布[J].中国全科医学,2017,20(15):1844.
- [7] 程虹,戴林,郭双平,等.乳腺及女性生殖器官肿瘤病理学和遗传学[M].北京:人民卫生出版社,2006:2-13.
- [8] 梁志洪,陈结贞,陈永雪,等.循环肿瘤细胞(CTC)在乳腺癌预后与化疗评估中的应用[J].分子诊断与治疗杂志,2019,11(3):209-213.
- [9] 李燕华,陈志,李燕华,等.基质金属蛋白酶9对星形胶质细胞缺氧缺糖后水通道蛋白4表达的影响及调节机制[J].中华行为医学与脑科学杂志,2019,28(2):110-115.
- [10] Wu GJ, Bao JS, Yue ZJ, et al. Elevated expression of matrix metalloproteinase-9 is associated with bladder cancer pathogenesis[J]. J Cancer Res Ther, 2018, 14(Supplement):S54-S59.
- [11] Rašić I, Rašić A, Akšamija G, et al. The association between the serum levels of matrix metalloproteinase 9 and colorectal cancer[J]. Med Gla, 2017, 14(2):229-235.
- [12] 周宁,谭晓殊,许婷婷,等. RECK、MMP9 蛋白在三阴性乳腺癌中的表达及与患者临床特征及预后的关系[J].癌症进展,2019,17(16):1942-1945.
- [13] 李金涛,李金凤.基质金属蛋白酶-9及金属蛋白酶组织抑制剂-1在肾癌中的表达及临床意义[J].国际肿瘤学杂志,2018,45(2):92-95.
- [14] Mertens C, Mora J, Ören B, et al. Macrophage-derived lipocalin-2 transports iron in the tumor microenvironment[J]. Oncoimmunology, 2018, 7(3):e1408751.
- [15] Bauer M, Eickhoff JC, Gould MN, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) is a predictor of poor prognosis in human primary breast cancer[J]. Breast Cancer Res Treat, 2008, 108(3):389-397.
- [16] 毕泗成,刘浩,张鹏,等.血清 LCN2 与 PSA 联合检测对前列腺癌的诊断价值[J].国际肿瘤学杂志,2018,45(1):27-31.
- [17] Sung H, Choi JY, Lee SA, et al. The association between the preoperative serum levels of lipocalin-2 and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and prognosis of breast cancer[J]. BMC Cancer, 12(1):193.
- [18] 马小刚,杨晓光,赵峥.肺癌患者手术前后血清 Lipocalin-2、MMP-9 表达的临床意义[J].河北医药,2014,36(9):1288-1290.
- [19] 张萍,任世云,张雷.乳腺癌患者血清脂质运载蛋白-2和基质金属蛋白酶-9的表达及临床意义[J].现代检验医学杂志,2015,30(1):72-74.

circNT5E 通过调控 miR-506-3p 表达对结肠癌细胞迁移、侵袭和凋亡的影响

孟凡迪* 徐勤鸿 杨刚华 万永 张雷

[摘要] 目的 探讨 circNT5E 对结肠癌细胞迁移、侵袭和凋亡的影响及分子机制。方法 选取 40 例 2017 年 1 月至 2019 年 5 月本院结肠癌患者癌组织及其相应癌旁组织;将结肠癌细胞 HCT116 分为 si-NC 组、si-circNT5E 组、pcDNA 组、pcDNA-circNT5E 组、miR-NC 组、miR-506-3p 组、si-circNT5E+anti-miR-NC 组、si-circNT5E+anti-miR-506-3p 组。实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 检测 circNT5E 和 miR-506-3p 的表达水平;显色原位杂交 (CISH) 检测癌组织中 circNT5E 表达;Transwell 检测细胞迁移和侵袭;流式细胞术检测细胞凋亡;蛋白质印迹 (Western blot) 法检测基质金属蛋白酶 2 (MMP-2)、基质金属蛋白酶 9 (MMP-9)、B 细胞淋巴瘤/白血病-2 (Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax) 蛋白表达;双荧光素酶报告实验验证 circNT5E 和 miR-506-3p 的靶向关系。结果 与癌旁组织相比,结肠癌组织中 circNT5E 表达水平显著升高,miR-506-3p 表达水平显著降低 ($P < 0.05$)。沉默 circNT5E 或过表达 miR-506-3p,迁移、侵袭细胞数显著降低,细胞凋亡率显著升高,MMP-2、MMP-9、Bcl-2 表达水平显著降低,Bax 表达水平显著升高 ($P < 0.05$)。circNT5E 靶向调控 miR-506-3p,抑制 miR-506-3p 表达逆转了沉默 circNT5E 表达对结肠癌 HCT116 细胞迁移、侵袭和凋亡的作用。结论 沉默 circNT5E 表达可能通过上调 miR-506-3p 的表达抑制结肠癌 HCT116 细胞迁移、侵袭,促进细胞凋亡。

[关键词] circNT5E; miR-506-3p; 结肠癌; 迁移; 侵袭; 凋亡

Effect of circNT5E on the migration, invasion and apoptosis of colon cancer cells by regulating the expression of miR-506-3p

MENG Fandi*, XU Qinrong, YANG Ganghua, WAN Yong, ZHANG Lei

(Department of geriatric surgery, the first affiliated hospital of xi'an jiaotong university, Xi'an, Shanxi, China, 710061)

[ABSTRACT] Objective To investigate the effect and molecular mechanism of circNT5E on colon cancer cell migration, invasion and apoptosis. Methods 40 cases of colon cancer patients tissues and their corresponding adjacent tissues from January 2017 to May 2019 from our hospital were selected. The colon cancer cells (HCT116) were divided into si-NC group, si-circNT5E group, pcDNA group, pcDNA-circNT5E group, miR-NC group, miR-506-3p group, si-circNT5E+anti-miR-NC group, si-circNT5E+anti-miR-506-3p group. Real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) was used to detect the expressions of circNT5E and miR-506-3p. Color in situ hybridization (CISH) was used to detect the expression of circNT5E in cancer tissues. Transwell was used to detect cell migration and invasion Flow cytometry was used to detect apoptosis. Western blot was used to detect matrix metalloproteinase 2 (MMP-2), matrix metalloproteinase 9 (MMP-9), B-cell lymphoma/leukemia-2 (Bcl-2), Bcl-2 related X protein (Bax) expression. Dual luciferase report assay was used to target the relationship between circNT5E and miR-506-

基金项目:陕西省科技攻关项目(2019SF-157、2018SF-055)

作者单位:西安交通大学第一附属医院老年外科,陕西,西安 710061

*通信作者:孟凡迪, E-mail:mdel5658@163.com

3p. Results Compared with adjacent cancer tissues, the expression of circNT5E in colon cancer tissues was significantly increased, and the expression of miR-506-3p was significantly decreased ($P<0.05$). Silence of circNT5E or overexpression of miR-506-3p, the number of migrating and invading cells was significantly reduced, the apoptosis rate was significantly increased, the expressions of MMP-2, MMP-9 and Bcl-2 were significantly reduced, and Bax expression was significantly increased ($P<0.05$). circNT5E targets regulation of miR-506-3p, and inhibits the miR-506-3p expression reversed the effects of silent circNT5E expression on the migration, invasion and apoptosis of HCT116 cells. **Conclusions** Silencing circNT5E expression inhibits the migration and invasion of HCT116 cells and promotes apoptosis by up-regulating the expression of miR-506-3p.

[KEY WORDS] CircNT5E; MiR-506-3p; Colon cancer; Migration; Invasion; Apoptosis

结肠癌是一种临床常见的消化道恶性肿瘤, 在各类恶性肿瘤中发病率较高, 预后差, 新的靶向治疗药物的应用为晚期结肠癌的治疗开辟了新的前景^[1-2]。研究结肠癌转移、凋亡的分子机制有利于寻找新的靶向药物治疗靶点。环状RNA (Circular RNA, circRNA) 是一种新的内源性非编码RNA, 其异常表达与肿瘤的发生、发展相关^[3]。寻找在结直肠癌中存在差异表达并具有重要生物学功能的 circRNA, 将为阐明结肠癌的发病机制奠定基础, 且可为结直肠癌的诊治提供新的靶点及思路^[4]。circNT5E 是来自 NT5E 的 circRNA, 有研究报道 circNT5E 在胶质瘤组织中高表达, 敲低其表达可通过调控 miR-422a 抑制胶质瘤细胞的增殖、迁移和侵袭, 促进细胞凋亡^[5]。circNT5E 在非小细胞肺癌组织和细胞中上调表达, 沉默其表达通过海绵化 miR-134 抑制非小细胞肺癌细胞的增殖和迁移, 并诱导凋亡^[6]。然而 circNT5E 对结肠癌细胞迁移、侵袭和凋亡的影响及其机制还尚未清楚。研究报道 miR-506 可抑制结肠癌增殖^[7]。miR-506-3p 过表达抑制前列腺癌肿瘤的进展, 可作为前列腺癌中的新型肿瘤抑制物^[8]。上调 miR-506-3p 表达可抑制卵巢癌细胞生长和增殖^[9]。因此, 本实验旨在研究 circNT5E 对结肠癌细胞迁移、侵袭和凋亡的影响及其机制是否与 miR-506-3p 表达有关。

1 材料与方法

1.1 临床资料

选取 2017 年 1 月至 2019 年 5 月本院经病理检测为结肠癌且具有完整临床病理资料的患者组织标本 40 例, 其中男 22 例, 女 18 例, 年龄 16~68 岁。以患者癌组织边缘 2~5 cm 处切除的癌旁组

组织作为对照, 所有患者术前均未接受放化疗, 无其他合并肿瘤。所有患者均知情且同意。

1.2 细胞与主要试剂

结肠癌细胞 HCT116 购自上海彩佑实业有限公司; 胎牛血清、RPMI-1640 培养基购自上海研谨生物科技有限公司; 荧光定量 PCR 试剂盒购自北京百奥莱博科技有限公司; Transwell 小室、Matrigel 胶购自美国 Bio-Rad 公司; 膜联蛋白 V-异硫氰酸荧光素/碘化丙锭 (Annexin V-FITC/PI) 凋亡检测试剂盒购自北京凯瑞基生物科技有限公司; RIPA 蛋白裂解液、二辛可宁酸 (bicinchoninic acid, BCA) 试剂盒购自上海圻明生物科技有限公司; MMP-2、MMP-9、Bcl-2、Bax、GAPDH 抗体及 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 购自上海恒斐生物科技有限公司; 双荧光素酶报告基因检测试剂盒购自北京博迈斯科技发展有限公司。

1.3 细胞培养与分组

将结肠癌细胞 HCT116 接种在 RPMI-1640 培养液 (含 10% 胎牛血清) 中, 在 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养, 取对数生长期细胞, 将 si-NC、si-circNT5E、pcDNA、pcDNA-circNT5E、miR-NC、miR-506-3p 分别转染至 HCT116 细胞中, 命名为 si-NC 组、si-circNT5E 组、pcDNA 组、pcDNA-circNT5E 组、miR-NC 组、miR-506-3p 组; 将 si-circNT5E 分别与 anti-miR-NC、anti-miR-506-3p 共转染至 HCT116 细胞中, 命名为 si-circNT5E+anti-miR-NC 组、si-circNT5E+anti-miR-506-3p 组。

1.4 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 检测 circNT5E 和 miR-506-3p 的表达水平

详细步骤参照文献^[7], 其中 PCR 循环条件为 95℃ 预变性 5 min, 95℃ 变性 30 s, 60℃ 退火 30 s; 72℃ 延伸 30 s, 共 40 个循环; 60℃ 延长 5 min。

1.5 显色原位杂交 (CISH) 检测癌组织中 circNT5E 表达

将10%福尔马林固定、石蜡包埋的结肠癌组织和癌旁组织标本切片,厚4 μm,将切片50℃烤片过夜,脱蜡、水化、抗原修复,100℃烤箱孵育15 min,蛋白酶K消化、脱水。杂交过夜,DAB显色,苏木素复染,中性树胶封片、显微镜下观察拍照。

1.6 Transwell 检测细胞迁移和侵袭

将基质胶(Matrigel)与RPMI-1640培养液以1:5比例混匀,然后取100 μL加入Transwell小室的上室,凝固后取100 μL细胞悬液接种于上室,培养24 h。然后分别用4%多聚甲醛固定和0.1%结晶紫染色,显微镜下随机观察5个视野,计算细胞迁移数目和侵袭数目。

1.7 流式细胞仪检测细胞凋亡

取培养24 h后的各组细胞,PBS漂洗胞2次,然后分别加入10 μL的Annexin V-FITC和5 μL的PI,轻摇混匀,常温避光孵育15 min,流式细胞仪检测。每组设3个复孔,实验重复3次。

1.8 蛋白质印迹(Western blot)法检测MMP-2、MMP-9、Bcl-2、Bax蛋白表达

详细步骤参考文献^[7],其中一抗工作液以1:800稀释,二抗工作液以1:1 000稀释。每个蛋白样品设3个重复。

1.9 双荧光素酶报告实验验证 circNT5E 和 miR-506-3p 的靶向关系

构建包含miR-506-3p结合位点的circNT5E野生型和突变型荧光素酶表达载体WT-circNT5E、MUT-circNT5E,将其分别与miR-NC、miR-506-3p共转染至结肠癌细胞中,转染48 h后,根据双荧光素酶报告基因检测试剂盒检测荧光素酶活性。

1.10 统计学分析

采用SPSS 20.0软件进行数据分析,计量资料用($\bar{x} \pm s$)表示,两组比较行t检验,多组间比较采用单因素方差分析。以P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 circNT5E 和 miR-506-3p 在结肠癌组织中的表达

与癌旁组织相比,结肠癌组织中circNT5E呈阳性表达,且表达水平显著升高,miR-506-3p表达水平显著降低(P<0.05)。见图1,表1。

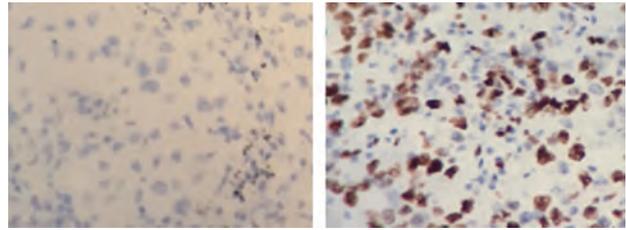


图1 CISH检测circNT5E在结肠癌组织中的表达(HE,×200)
Figure 1 CISH detection of circNT5E expression in colon cancer (HE,×200)

表1 circNT5E和miR-506-3p在结肠癌组织中的表达($\bar{x} \pm s$)
Table 1 Expressions of circNT5E and miR-506-3p in colon cancer tissues ($\bar{x} \pm s$)

| 分组 | n | circNT5E | miR-506-3p |
|-------|----|-----------|------------|
| 癌旁组织 | 40 | 1.00±0.08 | 1.00±0.05 |
| 结肠癌组织 | 40 | 3.37±0.31 | 0.48±0.04 |
| t值 | | 46.818 | 51.362 |
| P值 | | 0.000 | 0.000 |

2.2 沉默 circNT5E 表达对结肠癌 HCT116 细胞迁移、侵袭和凋亡的影响

与si-NC组相比,si-circNT5E组结肠癌HCT116细胞中circNT5E表达水平显著降低,迁移、侵袭细胞数显著降低,细胞凋亡率显著升高,MMP-2、MMP-9、Bcl-2表达水平显著降低,Bax表达水平显著升高(P<0.05)。见表2。

2.3 miR-506-3p 过表达对结肠癌 HCT116 细胞迁移、侵袭和凋亡的影响

与miR-NC组相比,miR-506-3p组miR-506-3p表达水平显著升高,迁移、侵袭细胞数显著降低,细胞凋亡率显著升高,MMP-2、MMP-9、Bcl-2表达水平显著降低,Bax表达水平显著升高(P<0.05)。见表3。

2.4 circNT5E 靶向调控 miR-506-3p 的表达

StarBase在线软件预测显示circNT5E的序列中含有与miR-506-3p互补的核苷酸序列见图2,双荧光素酶报告实验结果显示,与miR-NC组相比,miR-506-3p组转染WT-circNT5E载体的细胞荧光素酶活性显著降低(P<0.05),转染MUT-circNT5E载体的细胞荧光素酶活性无显著变化差异无统计学意义(P>0.05)。见表4。与pcDNA组相比,pcDNA-circNT5E组miR-506-3p表达水平显著降低(P<0.05);与si-NC组相比,si-circNT5E组miR-506-3p表达水平显著升高(P<0.05)。见表5。

表2 沉默 circNT5E 表达对结肠癌 HCT116 细胞迁移、侵袭和凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of silenced circNT5E expression on migration, invasion and apoptosis of colon ca cellsncer HCT116 ($\bar{x} \pm s$)

| 分组 | circNT5E | 迁移细胞数 (个) | 侵袭细胞数 (个) | 凋亡率 (%) | MMP-2 蛋白 | MMP-9 蛋白 | Bcl-2 蛋白 | Bax 蛋白 |
|---------------|-----------|--------------|--------------|------------|-------------|-------------|-------------|-----------|
| si-NC 组 | 1.00±0.06 | 98.32±9.54 | 79.63±7.25 | 6.25±0.52 | 0.71±0.07 | 0.63±0.06 | 0.58±0.05 | 0.33±0.03 |
| si-circNT5E 组 | 0.53±0.05 | 43.25±4.87 | 34.11±3.69 | 23.14±2.33 | 0.31±0.03 | 0.26±0.02 | 0.20±0.02 | 0.78±0.07 |
| <i>t</i> 值 | 18.053 | 15.424 | 16.787 | 21.225 | 15.757 | 17.551 | 21.169 | 17.726 |
| <i>P</i> 值 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |

表3 miR-506-3p 过表达表达对结肠癌 HCT116 细胞迁移、侵袭和凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effects of miR-506-3p overexpression on migration, invasion and apoptosis of colon cancer HCT116 cells ($\bar{x} \pm s$)

| 分组 | miR-506-3p | 迁移细胞数 (个) | 侵袭细胞数 (个) | 凋亡率 (%) | MMP-2 蛋白 | MMP-9 蛋白 | Bcl-2 蛋白 | Bax 蛋白 |
|--------------|------------|--------------|--------------|------------|-------------|-------------|-------------|-----------|
| miR-NC 组 | 1.00±0.08 | 94.36±9.44 | 76.32±7.61 | 7.36±0.78 | 0.70±0.07 | 0.65±0.06 | 0.56±0.05 | 0.32±0.03 |
| miR-506-3p 组 | 2.84±0.27 | 55.21±5.52 | 40.25±4.58 | 18.63±1.25 | 0.36±0.03 | 0.29±0.03 | 0.25±0.02 | 0.74±0.07 |
| <i>t</i> 值 | 19.602 | 10.740 | 12.183 | 22.947 | 13.393 | 16.100 | 17.270 | 16.545 |
| <i>P</i> 值 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |

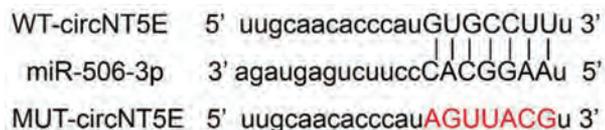


图2 circNT5E 的序列中含有与 miR-506-3p 互补的核苷酸序列

Figure 2 The sequence of circNT5E contains a nucleotide sequence complementary to miR-506-3p

表4 双荧光素酶报告实验 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Double luciferase report experiments ($\bar{x} \pm s$)

| 分组 | WT-circNT5E | MUT-circNT5E |
|--------------|-------------|--------------|
| miR-NC 组 | 1.03±0.06 | 1.05±0.09 |
| miR-506-3p 组 | 0.61±0.06 | 1.01±0.08 |
| <i>t</i> 值 | 14.849 | 0.997 |
| <i>P</i> 值 | 0.000 | 0.334 |

表5 circNT5E 调控 miR-506-3p 的表达 ($\bar{x} \pm s$)

Table 5 circNT5E regulates miR-506-3p expression ($\bar{x} \pm s$)

| 分组 | miR-506-3p |
|------------------|------------------------|
| pcDNA 组 | 1.00±0.08 |
| pcDNA-circNT5E 组 | 0.57±0.05 ^a |
| si-NC 组 | 1.01±0.06 |
| si-circNT5E 组 | 2.63±0.25 ^b |
| <i>F</i> 值 | 396.140 |
| <i>P</i> 值 | 0.000 |

注:与 pcDNA 组比较, ^a*P*<0.05;与 si-NC 组比较, ^b*P*<0.05。

2.5 抑制 miR-506-3p 表达逆转了沉默 circNT5E 表达对结肠癌 HCT116 细胞迁移、侵袭和凋亡的作用

与 si - circNT5E + anti - miR - NC 组相比, si - circNT5E+anti-miR-506-3p 组 miR-506-3p 表达水平显著降低,迁移、侵袭细胞数显著升高,细胞凋亡率显著降低,MMP-2、MMP-9、Bcl-2 表达水平显著升高,Bax 表达水平显著降低(*P*<0.05)。见表6。

3 讨论

circRNA 具有高丰度性、稳定性、保守性的特点,在多种恶性肿瘤的发生发展起重要作用,有望成为新的诊断、预测肿瘤的生物标志物及精准治疗的靶点^[10]。研究报道 circCCDC66 可促进结肠癌的生长和转移^[11]。circPIP5K1A 可抑制结肠癌细胞活力及侵袭、迁移^[12]。说明 circRNA 参与结肠癌的发生发展过程。本实验结果显示,结肠癌患者组织中 circNT5E 表达水平显著升高,说明 circNT5E 与结肠癌有关。且沉默 circNT5E 后,迁移、侵袭细胞数显著降低,细胞凋亡率显著升高,MMP-2、MMP-9、Bcl-2 表达水平显著降低,Bax 表达水平显著升高。说明沉默 circNT5E 可抑制结肠癌细胞迁移、侵袭,促进细胞凋亡。

研究表明异常表达的 miRNA 也参与结肠癌的进展,与其预后相关,可作为预后检测标志物^[13]。miR-506-3p 在骨肉瘤组织和细胞中表达下调,上调其表达抑制骨肉瘤细胞的增殖、迁移和侵袭^[14]。本

表6 抑制 miR-506-3p 表达逆转了沉默 circNT5E 表达对结肠癌 HCT116 细胞迁移、侵袭和凋亡的作用 ($\bar{x} \pm s$)Table 6 Inhibition of miR-506-3p expression reverses the effects of silenced circNT5E expression on colon cancer HCT116 cell migration, invasion and apoptosis ($\bar{x} \pm s$)

| 分组 | miR-506-3p | 迁移细胞数 (个) | 侵袭细胞数 (个) | 凋亡率 (%) | MMP-2 蛋白 | MMP-9 蛋白 | Bcl-2 蛋白 | Bax 蛋白 |
|---------------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| si-NC | 1.00±0.05 | 97.25±9.36 | 77.63±7.58 | 7.03±0.71 | 0.72±0.07 | 0.66±0.06 | 0.57±0.05 | 0.31±0.03 |
| si-circNT5E | 2.69±0.26 ^a | 45.28±4.29 ^a | 38.33±3.68 ^a | 22.36±2.24 ^a | 0.32±0.03 ^a | 0.28±0.03 ^a | 0.23±0.02 ^a | 0.77±0.07 ^a |
| si-circNT5E+ anti-miR-NC | 2.71±0.27 | 44.65±4.33 | 36.94±3.57 | 24.69±2.41 | 0.30±0.03 | 0.26±0.03 | 0.21±0.02 | 0.79±0.08 |
| si-circNT5E+ anti-miR-506-3p | 1.55±0.15 ^b | 81.21±8.36 ^b | 60.36±6.07 ^b | 12.65±1.27 ^b | 0.60±0.06 ^b | 0.57±0.05 ^b | 0.46±0.04 ^b | 0.43±0.04 [#] |
| F 值 | 158.217 | 128.736 | 112.801 | 190.797 | 151.340 | 187.253 | 228.429 | 152.609 |
| P 值 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |

注:与 si-NC 组比较,^a $P < 0.05$;与 si-circNT5E+anti-miR-NC 组比较,^b $P < 0.05$ 。

实验结果显示,结肠癌组织中 miR-506-3p 表达水平显著降低。过表达 miR-506-3p,迁移、侵袭细胞数显著降低,细胞凋亡率显著升高,MMP-2、MMP-9、Bcl-2 表达水平显著降低,Bax 表达水平显著升高。说明过表达 miR-506-3p 可抑制结肠癌细胞迁移、侵袭,促进细胞凋亡。有研究报道,敲除 lncRNA NEAT1 可通过上调 miR-506-3p 诱导胰腺癌细胞的细胞周期停滞和促进细胞凋亡而显著抑制细胞增殖^[15]。lncRNA SNHG17 通过靶向 miR-506-3p/CTNNB1 轴激活 Wnt/ β -catenin 信号通路促进神经胶质瘤的发展^[16]。研究表明 circRNA 可充当 miRNA 的“海绵”,从而参与基因的表达调控。本实验结果显示, circNT5E 靶向调控 miR-506-3p,抑制 miR-506-3p 表达逆转了沉默 circNT5E 表达对结肠癌 HCT116 细胞迁移、侵袭和凋亡的作用。

综上所述,沉默 circNT5E 表达可能通过上调 miR-506-3p 的表达抑制结肠癌 HCT116 细胞迁移、侵袭,促进细胞凋亡。

参考文献

- [1] 孙朝文,周崇民,张皓,等. 晚期结肠癌患者生物治疗临床应用的研究进展[J]. 重庆医学, 2017, 46(8): 121-123.
- [2] 孙清森,孙连生,徐建利,等. 结肠癌患者组织中 AKT2、Annexin A1 表达水平及其临床意义[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2019, 11(3): 194-197.
- [3] 张振,潘晴,刘旭,等. circRNA 与肿瘤发生的研究进展[J]. 现代检验医学杂志, 2018, 33(2): 157-159, 164.
- [4] 游文献. 结直肠癌中差异表达 circRNA 的筛选及其功能研究[D]. 重庆医科大学, 2018.
- [5] Wang R, Zhang S, Chen X, et al. CircNT5E acts as a sponge of microRNA-422a to promote glioblastoma tumorigenesis[J]. Cancer Res, 2018, 78(17): 4812-4825.
- [6] Dong L, Zheng J, Gao Y, et al. The circular RNA NT5E promotes non-small cell lung cancer cell growth via sponging microRNA-134[J]. Aging, 2020, 12(4): 3936-3949.
- [7] 祖彩华,张国梁,刘涛. miR-506 对结肠癌细胞增殖的影响及其作用机制[J]. 山东医药, 2016, 56(40): 5-8.
- [8] Hu CY, You P, Zhang J, et al. MiR-506-3p acts as a novel tumor suppressor in prostate cancer through targeting GALNT4[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(12): 5133-5138.
- [9] Wang Y, Lei X, Gao C, et al. MiR-506-3p suppresses the proliferation of ovarian cancer cells by negatively regulating the expression of MTMR6[J]. J Biosci, 2019, 44(6): 126.
- [10] 刘雨函,何安邦,廖新惠,等. 环状 RNA 在肿瘤中的研究进展[J]. 中国肿瘤, 2017, 26(11): 61-67.
- [11] Hsiao KY, Lin YC, Gupta SK, et al. Noncoding effects of circular RNA CCDC66 promote colon cancer growth and metastasis[J]. Cancer Res, 2017, 77(9): 2339-2350.
- [12] Zhang Q, Zhang C, Ma JX, et al. Circular RNA PIP5K1A promotes colon cancer development through inhibiting miR-1273a[J]. World J Gastroenterol, 2019, 25(35): 5300-5309.
- [13] 刘霞,董丽娟,贺继东,等. miRNA-767-3p 在结肠直肠癌中的表达与患者临床病理特征及预后的关系[J]. 热带医学杂志, 2019, 19(6): 735-738.
- [14] Jiashi W, Chuang Q, Zhenjun Z, et al. MicroRNA-506-3p inhibits osteosarcoma cell proliferation and metastasis by suppressing RAB3D expression[J]. Aging, 2018, 10(6): 1294-1305.
- [15] Huang B, Liu C, Wu Q, et al. Long non-coding RNA NEAT1 facilitates pancreatic cancer progression through negative modulation of miR-506-3p[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 482(4): 828-834.
- [16] Li H, Li T, Huang D, et al. Long noncoding RNA SNHG17 induced by YY1 facilitates the glioma progression through targeting miR-506-3p/CTNNB1 axis to activate Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. Cancer Cell Int, 2020, 20(1): 29.

· 论 著 ·

EOS-CRSwNP 与 Neu-CRSwNP 鼻粘膜组织 IL-13、血清 tIgE、外周血 EO% 和临床评分的比较及相关性研究

马艳丽¹ 陈付华² 麻宁² 熊小星² 边锦² 刘亚峰^{1*}

[摘要] **目的** 比较嗜酸性粒细胞性慢性鼻-鼻窦炎伴鼻息肉(EOS-CRSwNP)与嗜酸性粒细胞性慢性鼻-鼻窦炎 Neu-CRSwNP 患者组织白细胞介素-13(IL-13)血清 tIgE、外周血 EO% 和临床评分的差异,并评估 IL-13 与其他指标的相关性。**方法** 选取2017年1月至2018年10月本院收治的90例 CRSwNP 患者,根据病理学结果将其分为 EOS-CRSwNP 组49例、中性粒细胞性鼻-鼻窦炎伴鼻息肉(Neu-CRSwNP 组)患者41例、无鼻咽部疾病体检健康对象50例作为对照组;检测3组鼻粘膜组织 IL-13、血清总免疫球蛋白 E(tIgE)、外周血嗜酸性粒细胞百分比(EO%)水平,并分析 IL-13 与 tIgE、EO% 及改良 Lund-Mackay 评分、鼻内镜 Lund-Kennedy 评分的关系。**结果** EOS-CRSwNP 组 IL-13 与 tIgE、EO% 检测结果均高于 Neu-CRSwNP 组和对照组,Neu-CRSwNP 组高于对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$);EOS-CRSwNP 组改良 Lund-Mackay 评分、鼻内镜 Lund-Kennedy 评分均高于 Neu-CRSwNP 组和对照组,Neu-CRSwNP 组高于对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$);EOS-CRSwNP 组患者鼻粘膜组织中 IL-13 表达与 tIgE、EO% 检测结果及 Lund-Mackay 评分、鼻内镜 Lund-Kennedy 评分均呈显著的正相关关系($P<0.05$);Neu-CRSwNP 组患者鼻粘膜组织中 IL-13 表达与 tIgE 有正相关关系,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** EOS-CRSwNP 患者鼻粘膜组织中 IL-13 的表达水平高于 Neu-CRSwNP 患者,且与 tIgE、EO% 及患者的症状程度有关。

[关键词] 白细胞介素-13;嗜酸性粒细胞;慢性鼻-鼻窦炎;鼻息肉

Comparison and correlation between EOS-CRSwNP and Neu-CRSwNP nasal mucosa tissue IL-13, serum tIgE, peripheral blood EO% and clinical score

MA Yanli¹, CHEN Fuhua², MA Ning², XIONG Xiaoxing², BIAN Jin², LIU Yafeng^{1*}

(1. Department of Otolaryngology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu, Sichuan, China, 610000; 2. Department of Otolaryngology, Panzhihua Central Hospital, Panzhihua Sichuan, China, 617066)

[ABSTRACT] **Objective** To Compare the differences of tissue IL-13, serum tIgE, peripheral blood EO% and clinical score between patients with EOS-CRSwNP and Neu-CRSwNP, and evaluate the correlation between IL-13 and other indicators. **Methods** 90 patients with CRSwNP admitted to our hospital from January 2017 to October 2018 were selected and divided into 49 patients with EOS-CRSwNP group based on pathological results, neutrophilic rhinosinusitis with nasal polyps (Neu-CRSwNP Group) 41 patients, 50 healthy subjects without nasopharyngeal diseases as a control group. Three groups of nasal mucosa tissue IL-13, serum total immunoglobulin E (tIgE), peripheral blood eosinophils (EO%) Level were measured and compared. The relationship between IL-13 and tIgE, EO%, modified Lund-Mackay score, and endoscopic Lund-Kennedy score was analyzed. **Results** The levels of IL-13 and tIgE and EO% in the EOS-CRSwNP group were higher than those in the Neu-CRSwNP group and the control group, the Neu-CRSwNP group was higher than the con-

基金项目:四川省科技计划项目(2018HH32671)

作者单位:1. 四川大学华西医院耳鼻喉科,四川,成都610000

2. 四川攀枝花市中心医院耳鼻喉科,四川,攀枝花617066

*通信作者:刘亚峰, E-mail:55211676@qq.com

trol group ($P<0.05$). The modified Lund-Mackay score and endoscopic endoscope Lund-Kennedy score of the EOS-CRSwNP group were higher than those of the Neu-CRSwNP group and the control group, and the Neu-CRSwNP group was higher than the control group, the difference was statistically significant ($P<0.05$). There was a significant positive correlation between the expression of IL-13 in the nasal mucosa tissue of the EOS-CRSwNP group and the tIgE, EO% detection results, Lund-Mackay score, and endoscopic Lund-Kennedy score ($P<0.05$). The expression of IL-13 in the nasal mucosa of patients in the Neu-CRSwNP group was positively correlated with serum tIgE ($P<0.05$). **Conclusion** The level of IL-13 in nasal mucosa tissue of patients with EOS-CRSwNP was higher than that of patients with Neu-CRSwNP, and related to tIgE, EO% and the degree of symptoms of patients.

[KEY WORDS] Interleukin-13; Eosinophils; Chronic rhinosinusitis; Nasal polyps

慢性鼻-鼻窦炎伴鼻息肉(Chronic rhinosinusitis with nasal polyps, CRSwNP)是临床常见病,且发病人数逐年增多^[1]。根据免疫病理学特点将CRSwNP分为嗜酸粒细胞性慢性鼻-鼻窦炎(Eosinophilic CRSwNP, EOS-CRSwNP)和中性粒细胞性鼻息肉(Neutrophilic CRSwNP, Neu CRSwNP)2种^[2]。EOS-CRSwNP可以通过手术、药物进行治疗,但患者仍呈现症状重、易复发的特点。EOS-CRSwNP与Neu-CRSwNP是多种因素相互作用的鼻窦黏膜的炎症性疾病^[3-4],其发病机制尚不完全清楚,有研究^[5]认为此病的发展主要与异常的粘蛋白分泌、细菌感染因子、过敏或免疫疾病、解剖异常、炎症反应等有关。白细胞介素13(Interleukin 13, IL-13)是Th2的代表因子,在动物哮喘模型研究显示其能诱导黏液化生,可诱导黏蛋白表达,易导致黏蛋白大量产生^[6]。目前已有研究^[7]显示总免疫球蛋白E(Total immunoglobulin, tIgE)、嗜酸粒细胞(Eosinophilic, EOS)与鼻息肉的发生存在一定关联。本研究旨在比较EOS-CRSwNP与Neu-CRSwNP患者组织IL-13、血清tIgE、外周血EO%和临床评分的差异,并评估IL-13与其他指标的相关性。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取2017年1月至2018年10月本院收治的90例CRSwNP患者,根据病理学结果将其分为EOS-CRSwNP组49例、(Neu-CRSwNP组)41例、无鼻咽部疾病体检健康对象50例作为对照组。EOS-CRSwNP组年龄23~72岁,平均(46.8±13.6)岁;男27例、女22例,其中具有哮喘病史3例、变应性鼻炎病史26例,吸烟27例。Neu-CRSwNP组,年龄25~70岁,平均(45.4±12.4)岁;男25例、女16例,其中具有哮喘病史5例、变应性鼻炎病史23

例,吸烟22例。对照组,年龄22~67岁,平均(43.6±10.0)岁;男29例、女21例。EOS-CRSwNP组与Neu-CRSwNP组上述基线资料比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。

纳入标准:①符合慢性鼻-鼻窦炎的诊断标准^[8];②经鼻内镜、鼻CT检查确诊;③本研究的组织标本来源于鼻甲黏膜;④本研究符合《世界医学协会赫尔辛基宣言》^[3]相关医学伦理规定。⑤所有患者及家属均已签署知情同意书。排除标准:①鼻咽部肿瘤。②真菌性鼻窦炎、鼻窦囊肿、上颌窦后鼻孔息肉等。③放化疗病史;④感染性疾病;⑤原发性鼻纤毛运动功能障碍、囊性纤维化。

1.2 方法

1.2.1 指标检测方法

采集鼻息肉组织,用含青霉素、链霉素和两性霉素B三抗的生理盐水清洗2~3次,每次5~10 min。收集组织置于含有1 mg/mL 胶原蛋白酶的试管中,做好标记,在4℃条件下消化过夜。次日加入10%胎牛血清终止消化,用震荡仪分离上皮细胞,并保存。将细胞种入100 mm培养皿中,加入BEGM培养基,放入37℃ 5%培养箱中培养。培养1周后,当单层细胞融合达70%~80%时,倒掉膜上培养液,在膜下层加入分化培养液(DMEM/F12:BEGM为1:1,100 IU/mL青霉素、100 μg/mL链霉素)。在培养小室基底侧加入IL-13(10 ng/mL),37℃、5% CO₂培养箱中常规培养,每2~3天换液1次,每次换液均重新加入10 ng/mL IL-13,对照组加入0.5 mL培养基。气液界面分别培养至0、7、14 d收获细胞。取组织匀浆上清按照ELISA试剂盒说明书操作进行IL-13的检测。使用SYS-MEX XE-2100D全自动血液分析仪检测血中EOS的百分比,利用Allery Screen过敏原检测系统,体外测定血清中总IgE。

1.2.2 评分标准

根据鼻窦 CT 采用 Lund-Mackay、Lund-Kennedy 评分^[9]对患者病变程度及范围进行评价。

1.3 统计分析

采用 SPSS 21.0 软件进行数据分析,计量数据采用($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用 *t* 检验;计数资料用 *n*(%)表示,行 χ^2 检验;相关性分析采用 Pearson 线性相关分析法;*P*<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3组 IL-13 与 tIgE、EO%检测结果比较

3组中的 IL-13 与 tIgE、EO%检测结果比较:EOS-CRSwNP 组>Neu-CRSwNP 组>对照组,差异具有统计学意义(*P*<0.05)。见表1。

表1 3组 IL-13 与 tIgE、EO%检测结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of IL-13, tIgE, and EO% test results between the 3 groups ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | <i>n</i> | IL-13 (pg/mL) | EO% | tIgE (IU/mL) |
|--------------|----------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|
| EOS-CRSwNP 组 | 49 | 149.5±32.7 ^{ab} | 4.38±0.95 ^{ab} | 233.9±67.4 ^{ab} |
| Neu-CRSwNP 组 | 41 | 73.0±17.5 ^a | 2.41±0.74 ^a | 164.2±44.0 ^a |
| 对照组 | 50 | 40.0±8.9 | 1.64±0.60 | 127.0±22.1 |
| <i>F</i> 值 | | 42.031 | 31.664 | 35.728 |
| <i>P</i> 值 | | 0.000 | 0.000 | 0.000 |

注:与对照组比较^a*P*<0.05,与 Neu-CRSwNP 组比较^b*P*<0.05。

2.2 3组改良 Lund-Mackay 评分、鼻内镜 Lund-Kennedy 评分比较

3组改良 Lund-Mackay 评分、鼻内镜 Lund-Kennedy 评分比较结果为:EOS-CRSwNP 组>Neu-CRSwNP 组>对照组,差异具有统计学意义(*P*<0.05)。见表2。

表2 3组改良 Lund-Mackay 评分、鼻内镜 Lund-Kennedy 评分比较

Table 2 Comparison of modified Lund-Mackay score and nasal endoscopic Lund-Kennedy score between the 3 groups ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | <i>n</i> | 改良 Lund-Mackay 评分(分) | Lund-Kennedy 评分(分) |
|--------------|----------|-------------------------|-----------------------|
| EOS-CRSwNP 组 | 49 | 20.95±5.41 | 15.07±3.02 |
| Neu-CRSwNP 组 | 41 | 17.17±4.40 | 11.66±2.43 |
| 对照组 | 50 | 8.36±2.40 | 5.42±1.98 |
| <i>F</i> 值 | | 3.589 | 5.822 |
| <i>P</i> 值 | | 0.001 | 0.000 |

2.3 鼻粘膜组织中 IL-13 表达与 tIgE、EO%检测结果及 Lund-Mackay 评分、鼻内镜 Lund-Kennedy 评分的相关性

经 Pearson 线性相关法分析,EOS-CRSwNP 组患者鼻粘膜组织中 IL-13 表达与 tIgE、EO%检测结果及 Lund-Mackay 评分、鼻内镜 Lund-Kennedy 评分均呈显著的正相关关系,差异有统计学意义(*P*<0.05)。Neu-CRSwNP 组患者鼻粘膜组织中 IL-13 表达与 tIgE 有正相关关系,差异有统计学意义(*P*<0.05);IL-13 表达与 EO%检测结果及 Lund-Mackay 评分、鼻内镜 Lund-Kennedy 评分比较,差异无统计学意义(*P*>0.05)。见表3。

表3 2组患者鼻粘膜组织中 IL-13 表达与 tIgE、EO%检测结果及 Lund-Mackay 评分、鼻内镜 Lund-Kennedy 评分相关性

Table 3 Correlation analysis results Results of IL-13 expression and tIgE、EO% in nasal mucosa of 2 group and correlation analysis of Lund-Mackay score

| 组别 | IL-13 | <i>r</i> 值 | <i>P</i> 值 |
|--------------|-------------------|------------|------------|
| | | | |
| EOS-CRSwNP 组 | 改良 Lund-Mackay 评分 | 0.664 | 0.000 |
| | Lund-Kennedy 评分 | 0.702 | 0.000 |
| | EO% | 0.586 | 0.000 |
| Neu-CRSwNP 组 | tIgE | 0.552 | 0.000 |
| | 改良 Lund-Mackay 评分 | 0.227 | 0.053 |
| | Lund-Kennedy 评分 | 0.098 | 0.316 |
| | EO% | 0.116 | 0.163 |
| | tIgE | 0.254 | 0.048 |

3 讨论

鼻息肉的病因较多,在临床实践中被认为与嗜酸性粒细胞有关^[10]。随着临床医学技术研究的深入和发展,临床实践进一步证实 CRSwNP 与嗜酸性粒细胞浸润有很强的相关性。因此,临床研究侧重于嗜酸性粒细胞的研究。作为主要的 Th2 细胞因子之一,IL-13 在哮喘、变应性鼻炎等变应性疾病中发挥重要调控作用^[11-12],但在 CRSwNP 中尤其 EOS-CRSwNP 中的表达情况尚不明确。本研究表明 IL-13 可促进嗜酸性粒细胞活化、诱导嗜酸性细胞黏附分子的表达,并抑制其凋亡。IL-13 还可促使 B 细胞产生 IgE,增强过敏反应,促进黏蛋白分泌等等,IL-13 在中性粒细胞与嗜酸性粒细胞中均有分泌,且在嗜酸性粒细胞中分泌的更多。

CRSwNP 主要由 EOS 的浸润、细胞因子引起, 研究表明^[13]随着 EOS 浸润的增加, 患者过敏原阳性和过敏因素增加, 但没有研究表明 EOS 的值是预测鼻息肉发生的良好指标。变应性因素在对 CRSwNP 具有一定的作用。IgE 介导的 I 型过敏反应可释放大量细胞趋化因子如组胺和白三烯, 导致组织炎症细胞浸润, 血管舒张, 炎性渗出和组织水肿, 长期反复水肿和局部炎症, 这些因素将促进息肉的形成。毕梦等^[14]对 CRSwNP 患者进行变应性因素监测, 发现患者血清 tIgE 浓度比健康人高, 且 Lund-MackayCT 评分也高, 这提示了 CRSwNP 患者存在着变态反应性因素。炎症反应因子在 Neu-CRSwNP 可能具有极其重要的作用, Neu-CRSwNP 患者存在显著的 Th1 优势, 表现为更为显著的中性粒细胞浸润, Th1 相关因子通过刺激细胞来发挥促炎作用, Neu-CRSwNP 中嗜酸性粒细胞的变应性因素可能由于组织水肿的等原因, 其与组织重塑无显著关联, tIgE 没有显著增高。

当外部病原体侵入 EOS-CRSwNP 患者时, 中性粒细胞大量聚集, 共同调控细胞免疫功能。IL-13 可加强非特异性免疫功能, 进而改善 EO%、Lund-Mackay 评分、鼻内镜 Lund-Kennedy 评分。炎症反应可使慢性鼻-鼻窦炎患者嗜酸性粒细胞水平增大, 上述检测指标 IL-13 对嗜中性粒细胞具有趋化作用, 中性粒细胞弹性蛋白酶被激活, 增加其他炎症因子的水平, 激发机体变态反应, 影响 tIgE 水平, 损害鼻黏膜, 在患有 EOS-CRSwNP 的患者中, 嗜酸性粒细胞作用显著, 其水平的升高影响鼻息肉的大小和嗅觉功能等。在 Neu-CRSwNP 组中, 不存在相关关系, 分析原因是 IL-13 等通过参与外周血抑制中性粒细胞凋亡的过程, 还与 Th2 反应和中性粒细胞化的减弱有一定联系。

张宇等^[15]的研究表明, IL-13 在 EOS-CRSwNP 中表达升高, 为阐述 EOS-CRSwNP 的机制提供参考。本研究纳入病例数较少, 实验结果可能存在一定程度的偏倚, 在今后的实验研究中需要扩大样本量进一步探究, 得出更具说服力的结论。

综上所述, EOS-CRSwNP 患者鼻粘膜组织中 IL-13 的表达水平高于 Neu-CRSwNP 患者, 并且与 tIgE、EO% 及患者的症状程度有关。

参考文献

- [1] Friend M, Håkansson K, Schwer S, et al. Exhaled and nasal nitric oxide in chronic rhinosinusitis patients with nasal polyps in primary care[J]. *Rhinology*, 2018, 56(1):59-64.
- [2] Liu CC, Zhang HL, Zhi LL, et al. CDK5 Regulates PD-L1 Expression and Cell Maturation in Dendritic Cells of CRSwNP [J]. *Inflammation*, 2018, 42(1): 135-144.
- [3] Deconde AS, Mace JC, Levy JM, et al. Prevalence of polyp recurrence after endoscopic sinus surgery for chronic rhinosinusitis with nasal polyposis[J]. *Laryngoscope*, 2017, 31(4): 278-280.
- [4] Liu J, Li YY, Andiappan A K, et al. Role of IL-13R α 2 in modulating IL-13-induced MUC5AC and ciliary changes in healthy and CRSwNP mucosa[J]. *Allergy*, 2018.
- [5] 魏洪政, 王向东, 朱敏, 等. 不同外周血嗜酸粒细胞表型的慢性鼻-鼻窦炎伴鼻息肉的微生物学研究[J]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2017, 31(5):338-342.
- [6] Parulekar AD, Kao CC, Diamant Z, et al. Targeting the interleukin-4 and interleukin-13 pathways in severe asthma [J]. *Curr Opin Pulm Med*, 2018, 24(1):50-55.
- [7] Baba S, Kondo K, Suzukawa M, et al. Distribution, subtype population, and IgE positivity of mast cells in chronic rhinosinusitis with nasal polyps [J]. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2017, 119(2):120-128.
- [8] 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志编辑委员会. 中国慢性鼻窦炎诊断和治疗指南(2018). *中华耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2019, 54(2):81-100
- [9] 李伟利, 叶成刚, 胡惠玲, 等. 哮喘与阿司匹林哮喘影响慢性鼻窦炎的临床研究[J]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2019, 33(7):635-638.
- [10] Tsetos N, Goudakos JK, Daskalakis D, et al. Monoclonal antibodies for the treatment of chronic rhinosinusitis with nasal polyposis: A systematic review [J]. *Rhinology*, 2018, 56(1):11-21.
- [11] 汤伟. 慢性鼻窦炎手术患者预后的影响因素分析[J]. *江苏医药*, 2019, 45(2):153-155.
- [12] 张大威, 丘小汕, 何健荣, 等. 广州地区 579 例儿童过敏性鼻炎患者吸入过敏原的临床分析[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2015, 7(3):171-175.
- [13] 刘骥, 林云, 邹映东, 等. 慢性鼻-鼻窦炎患者细胞免疫功能与规范化鼻内镜手术疗效分析[J]. *中国眼耳鼻喉科杂志*, 2019, 19(2):92-94.
- [14] Naoko O, Tsuguhisa N, Daiya A, et al. Distinct gene expression profiles and regulation networks of nasal polyps in eosinophilic and non-eosinophilic chronic rhinosinusitis [J]. *Int Forum Allergy Rhinol*, 2018, 8(5):592-604.
- [15] Kim J, Kim D, Yu M S, et al. Role of epigenetics in the pathogenesis of chronic rhinosinusitis with nasal polyps [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(1):1219-1227.

· 论 著 ·

自发性早产的高危因素及血清 TLR2、MCP-1、TNF- α 水平的预测价值

于哲* 张洛英 潘大欢 王静

【摘要】 目的 探讨自发性早产的高危因素,分析血清炎症因子 Toll 样受体 2(TLR2)、单核细胞趋化蛋白 1(MCP-1)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平对早产的预测价值。方法 选择 2017 年 11 月至 2018 年 11 月于本院产检并分娩的妇女 138 例,随访至孕妇分娩孕周,孕 28~36⁺周早产分娩者纳入研究组($n=42$),孕 37 周足月分娩者纳入对照组($n=96$),比较两孕产妇一般临床资料以及血清炎症因子 TLR2、MCP-1、TNF- α 水平,分析影响早产发生的多因素,并绘制受试者工作特征曲线(ROC)分析血清炎症因子 TLR2、MCP-1、TNF- α 水平对早产的预测价值。结果 两组孕产妇早产史、生殖系统感染、妊娠期高血压、TLR2、MCP-1、TNF- α 水平等方面比较,差异有统计学意义($P<0.05$),年龄、体质指数、孕次、产次、妊娠期糖尿病等方面比较,差异无统计学意义($P>0.05$);多因素 logistic 回归分析结果显示,生殖系统感染、妊娠期高血压、TLR2、MCP-1、TNF- α 水平是影响早产发生的独立危险因素($P<0.05$);绘制 ROC 曲线分析结果显示,TLR2+MCP-1+TNF- α 三者联合诊断的预测值优于单测 TLR2、MCP-1、TNF- α 预测自发性早产发生的预测值及 TLR2+MCP-1 诊断、TLR2+TNF- α 诊断、MCP-1+TNF- α 诊断的预测值。结论 自发性早产发生与多种因素有关,血清炎症因子 TLR2、MCP-1、TNF- α 水平可用于预测早产的发生,为及时采取积极预防措施提供指导。

【关键词】 Toll 样受体 2; 单核细胞趋化蛋白 1; 肿瘤坏死因子- α ; 自发性早产; 高危因素; 预测价值

High-risk factors of spontaneous preterm delivery and the predictive value of levels of serum inflammatory factors TLR2, MCP-1 and TNF- α

YU Zhe*, ZHANG Luoying, PAN Dahuan, WANG Jing

(Department of Obstetrics and Gynecology, Zhengzhou Yihe Hospital, Zhengzhou, Henan, China, 450046)

【ABSTRACT】 Objective To explore the high-risk factors of spontaneous preterm delivery, and analyze the predicted value of levels of serum inflammatory factors Toll-like receptor 2 (TLR2), monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) on preterm delivery. Methods A total of 138 women who had prenatal examination and delivered in our hospital from November 2017 to November 2018 were selected. The women were followed up to the gestational week of pregnancy, and those who delivered prematurely at 28-36⁺ weeks were included in the study group ($n=42$), and those who delivered at full-term 37 weeks were included in the control group ($n=96$). The general clinical data and levels of serum inflammatory factors TLR2, MCP-1 and TNF- α were compared between the study group and control group. The multiple factors affecting the occurrence of preterm delivery were analyzed. The receiver operating characteristic curve (ROC) was plotted to analyze the predictive value of serum inflammatory factors TLR2, MCP-1 and TNF- α on preterm delivery. Results There were statistically significant differences in the premature delivery history, reproductive system infection, gestational hypertension, TLR2, MCP-1 and TNF- α between the two

基金项目:河南省医学科技攻关项目(2018020924)

作者单位:郑州颐和医院妇产科,河南,郑州 450046

*通信作者:于哲, E-mail: pesjvuh@163.com

groups ($P<0.05$), and there were no significant differences in the age, body mass index, gravidity, parity and gestational diabetes mellitus ($P>0.05$). Multivariate logistic regression analysis showed that the reproductive system infection, gestational hypertension, TLR2, MCP-1 and TNF- α were independent risk factors affecting the occurrence of preterm delivery ($P<0.05$). ROC curve analysis results show that the best cutoff value, Youden index, sensitivity, specificity and AUC of TLR2 in predicting the occurrence of preterm delivery, and the best cutoff value, Youden index, sensitivity, specificity and AUC of MCP-1 in predicting the occurrence of preterm delivery, and the best cutoff value, Youden index, sensitivity, specificity and AUC of TNF- α in predicting the occurrence of preterm delivery, and the sensitivity, specificity and AUC of TLR2 + MCP-1 diagnosis, and the sensitivity, specificity and AUC of TLR2 + TNF- α diagnosis, and the sensitivity, specificity and AUC of MCP-1 + TNF- α diagnosis were 76.20%, 77.10% and 0.808 (95% CI: 0.733-0.882), and the sensitivity, specificity and AUC of TLR2 + MCP-1 + TNF- α combined diagnosis, and the specificity and AUC of the combined diagnosis were better than those of TLR2, MCP-1 or TNF- α . **Conclusion** The occurrence of spontaneous preterm delivery is related to many factors. The levels of serum inflammatory factors TLR2, MCP-1 and TNF- α can be used to predict the occurrence of preterm delivery and provide guidance for timely proactive prevention measures.

[KEY WORDS] Toll-like receptor 2; Monocyte chemotactic protein 1; Tumor necrosis factor- α ; Spontaneous preterm delivery; High-risk factors; Predictive value

自发性早产属于围生期较为常见的妊娠并发症,新生儿出生死亡率高达15%,是围生儿死亡的首要原因,而存活新生儿也有一部分存在智力发育障碍或者神经系统等严重后遗症^[1,2]。明确早产的高危因素,尽早采取有效措施,对降低早产发生率以及围生儿死亡率至关重要。报道显示,感染所导致的炎症反应是早产发生的病因之一^[3]。Toll样受体2(toll-like receptor 2, TLR2)^[4]、单核细胞趋化蛋白1(monocyte chemotactic protein 1, MCP-1)^[5]、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)^[6]等细胞因子均在炎症反应中发挥作用,从而引起子宫收缩,促进早产发生。本研究旨在探讨自发性早产的高危因素,并分析血清炎症因子TLR2、MCP-1、TNF- α 水平对早产的预测价值,报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选择2017年11月至2018年11月于本院产检并分娩的妇女138例作为研究对象,年龄20~46岁,平均(29.87 \pm 5.68)岁,随访至孕妇分娩孕周,孕28~36⁺周自发性早产分娩者纳入研究组($n=42$),孕37周足月分娩者纳入对照组($n=96$)。全部入组对象知情同意,本研究通过本院医学伦理委员会审批。纳入标准:符合早产诊断标准^[7];孕20~24周;单胎妊娠;年龄18~35岁;超声诊断无胎儿生长受限迹象。排除标准:排除双胞胎妊娠;合并由于早

产前胎膜早破、前置胎盘或宫内窘迫等妊娠合并症治疗性引产者;既往早产史者;有消化系统、呼吸系统以及泌尿生殖系统等感染患者;既往吸烟、酗酒等不良嗜好者;由于胎儿异常或者畸形引产者;治疗性早产、晚期流产或失访者。

1.2 方法

于孕20~24周时分别抽取入组孕妇静脉血,离心并置于4 $^{\circ}$ C条件下保存备用,血清炎症因子TLR2、MCP-1、TNF- α 水平采用酶联免疫吸附法(ELISA)进行检测,严格按照TLR2 ELISA试剂盒(购买自上海恒远生物科技有限公司)和MCP-1、TNF- α ELISA试剂盒(购买自上海泽叶生物科技有限公司)操作说明书进行实验操作。

1.3 观察指标

①比较研究组和对照组孕妇血清炎症因子TLR2、MCP-1、TNF- α 水平。②绘制受试者工作特征曲线(ROC),计算血清炎症因子TLR2、MCP-1、TNF- α 水平预测自发性早产的灵敏度和特异度。

1.4 统计学处理

应用SPSS 19.0软件进行统计学分析,计量资料以($\bar{x}\pm s$)形式描述,数据符合正态分布,两组均值比较采用独立 t 检验;计数资料以 $n(\%)$,采用卡方检验;有显著差异的单因素进行多因素logistic回归分析;制作ROC曲线并计算曲线下面积(AUC)以及最佳截断值, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 研究组和对照组一般情况比较

两组孕产妇早产史、生殖系统感染、妊娠期高血压、TLR2、MCP-1、TNF-α水平等方面比较,差异有统计学意义($P<0.05$),年龄、体质量指数、孕次、产次、妊娠期糖尿病等方面比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表1。

表1 两组一般情况比较 [$n(\%)$, ($\bar{x}\pm s$)]

Table 1 Comparison of general situation between 2 groups [$n(\%)$, ($\bar{x}\pm s$)]

| 因素 | 研究组 ($n=42$) | 对照组 ($n=96$) | t/χ^2 值 | P 值 |
|-------------------------------------|-------------------|-------------------|--------------|--------|
| 年龄(岁) | 30.15±5.82 | 29.44±5.39 | 0.695 | 0.488 |
| 体质量指数 (kg/m^2) | 21.98±2.36 | 21.81±2.32 | 0.394 | 0.694 |
| 孕次(次) | 0.98±0.39 | 0.86±0.34 | 1.823 | 0.071 |
| 产次(次) | 1.46±0.28 | 1.55±0.31 | 1.615 | 0.109 |
| 早产史 | 5(11.90) | 1(1.04) | 5.884 | 0.015 |
| 生殖系统感染 | 12(28.57) | 7(7.29) | 11.144 | 0.001 |
| 妊娠期高血压 | 14(33.33) | 9(9.38) | 12.075 | 0.001 |
| 妊娠期糖尿病 | 2(4.76) | 4(4.17) | 0.025 | 0.875 |
| TLR2(ng/mL) | 3.85±0.66 | 2.41±0.57 | 13.004 | <0.001 |
| MCP-1(pg/mL) | 403.62±79.54 | 281.79±51.68 | 10.721 | <0.001 |
| TNF-α(pg/mL) | 13.27±2.21 | 7.95±1.74 | 15.183 | <0.001 |

2.2 影响早产的多因素 logistic 回归分析

以是否发生自发性早产为因变量,以早产史、生殖系统感染、妊娠期高血压、TLR2、MCP-1、TNF-α为自变量,进行多因素 logistic 回归分析结果显示,生殖系统感染、妊娠期高血压、TLR2、MCP-1、TNF-α水平是影响自发性早产发生的独立危险因素($P<0.05$)。见表2。

表2 影响早产的多因素 logistic 回归分析

Table 2 Multivariate logistic regression analysis of preterm birth

| 因素 | β 值 | SE值 | Wald/ χ^2 值 | P 值 | OR值 | 95%CI |
|--------|-----------|-------|------------------|-------|-------|--------------|
| 生殖系统感染 | 1.323 | 0.582 | 5.167 | 0.024 | 3.755 | 1.200~11.748 |
| 妊娠期高血压 | 1.975 | 0.748 | 6.972 | 0.009 | 7.207 | 1.663~31.221 |
| TLR2 | 1.482 | 0.461 | 10.335 | 0.001 | 4.402 | 1.783~10.865 |
| MCP-1 | 1.906 | 0.718 | 7.047 | 0.008 | 6.726 | 1.647~27.475 |
| TNF-α | 0.761 | 0.335 | 5.160 | 0.024 | 2.140 | 1.110~4.127 |

2.3 血清炎症因子 TLR2、MCP-1、TNF-α 水平对自发性早产的预测价值

绘制 ROC 曲线分析结果显示,TLR2+MCP-1+TNF-α三者联合诊断的预测值优于单测 TLR2、MCP-1、TNF-α预测自发性早产发生的预测值及 TLR2+MCP-1 诊断、TLR2+TNF-α 诊断、MCP-1+TNF-α 诊断的预测值。见图1,表3。

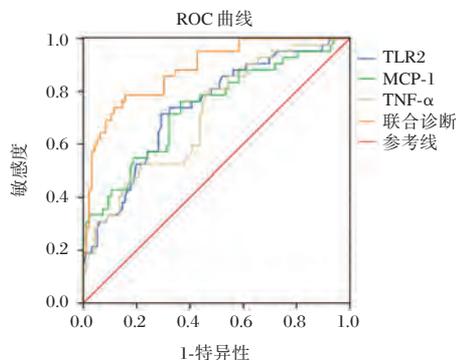


图1 血清炎症因子 TLR2、MCP-1、TNF-α 水平预测自发性早产的 ROC 曲线

Figure 1 ROC curves of spontaneous preterm delivery predicted by serum inflammatory factors TLR2, MCP-1 and TNF-α

表3 血清炎症因子 TLR2、MCP-1、TNF-α 水平对自发性早产的预测价值

Table 3 Predictive value of serum inflammatory factors TLR2, MCP-1 and TNF-α on spontaneous preterm delivery

| 指标 | AUC | 95% CI | 灵敏度 (%) | 特异度 (%) |
|------------|-------|-------------|---------|---------|
| TLR2 | 0.739 | 0.649~0.828 | 71.40 | 70.80 |
| MCP1 | 0.738 | 0.644~0.831 | 76.20 | 63.50 |
| TNFα | 0.708 | 0.616~0.801 | 81.00 | 53.10 |
| TLR2+MCP1 | 0.828 | 0.751~0.905 | 83.30% | 71.90 |
| TLR2 +TNFα | 0.835 | 0.765~0.905 | 78.60% | 78.10 |
| MCP1+TNFα | 0.808 | 0.733~0.882 | 76.20% | 77.10 |
| 三者联合诊断 | 0.883 | 0.824~0.943 | 78.60 | 84.40 |

3 讨论

自发性早产对早产新生儿总体发病率影响较大,并与脑瘫、癫痫、发育迟缓以及早产儿视网膜病变等长期发病率有关,大约有 50%的早产病例与微生物侵入羊膜腔有关,进而出现炎症反应,最终影响早产发病率^[8,9]。尽管围生期医学取得了不错的进展,且对于自发性早产有关的危险因素和潜在机制的了解日益增加,使得早产发病率仍然处于较高水平^[10]。因此,筛选影响自发性早产发

生的高危因素,寻找诊断早产的高效生物标志物,减少炎症相关并发症发生率,以降低围产期发病率具有重要意义。

Toll样受体(toll-like receptor, TLR)作为一类可识别病原菌的蛋白质受体,能够发挥促炎作用以及在绒毛膜羊膜炎、未足月胎盘早破等病理变化中发挥作用^[11]。TLR2属于一种活性很高的Toll样受体因子,主要在革兰氏阳性菌中激活细胞,在巨噬细胞、单核细胞以及中性粒细胞中发挥调节作用,可通过相关信号途径激活炎症反应,诱导环氧合酶-2以及前列腺素E2合成,从而导致子宫收缩,诱发早产^[12]。研究表明,外周血可溶性CD14可促进肽聚糖TLR2结合,从而促进肽聚糖激活核转录因子信号转导途径^[13]。Walsh等^[14]报道显示,TLR2在早产特别是合并妊娠绒毛膜羊膜炎中表达明显上调,其可能通过介导炎症反应或诱导细胞凋亡促进早产。研究表明,白细胞介素、肿瘤坏死因子以及 γ -干扰素等可诱导MCP-1生成,从而增加单核-巨噬细胞活性,继续分泌白细胞介素等细胞因子,最终导致早产、流产发生^[15]。周静等^[16]报道表明,感染性早产生产妇血清MCP-1、sTNFR-I、HMGB1以及TNF- α 表达明显上调,上述指标可以作为预测感染性早产的生物标志物。本研究发现,TLR2+MCP-1+TNF- α 三者联合诊断的优于各指标单独诊断以及不同组间诊断,表明TLR2、MCP-1、TNF- α 对自发性早产发生具有良好的预测价值,各指标联合诊断可降低误诊率。但本研究样本量受限,只能得到初步的结论,今后将需要增加样本例数,增加纳入指标,为自发性早产的预测提供更加全面的证据。

综上所述,自发性早产发生与孕产妇孕次、早产史、生殖系统感染、妊娠期高血压以及血清炎症因子TLR2、MCP-1、TNF- α 水平等多种因素有关,监测血清炎症因子TLR2、MCP-1、TNF- α 水平对预测自发性早产的发生,以及尽早采取积极预防措施具有临床指导意义。

参考文献

- [1] 郝维敏,夏宏林,赵开雷,等.血清Hcy水平最佳切点与早产危险因素关系及其Logistic回归分析[J].实用医学杂志,2017,33(19):99-103.
- [2] Geurtzen R, Draaisma J, Hermens R, et al. Perinatal practice in extreme premature delivery: variation in Dutch physicians' preferences despite guideline [J]. Eur J Pediatr, 2016, 175(8):1039-1046.
- [3] Sussan TE, Sudini K, Talbot CC Jr, et al. Nrf2 regulates gene-environment interactions in an animal model of intrauterine inflammation: Implications for preterm birth and prematurity[J]. Sci Rep, 2017, 7(1):40194-40201.
- [4] Cappelletti M, Lawson MJ, Chan CC, et al. Differential outcomes of TLR2 engagement in inflammation-induced preterm birth[J]. J Leukoc Biol, 2018, 103(3):535-543.
- [5] Angeles-Martínez J, Posadas-Sánchez R, Álvarez-León E, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 gene (MCP-1) polymorphisms are associated with risk of premature coronary artery disease in Mexican patients from the Genetics of Atherosclerotic Disease (GEA) study [J]. Immunol Lett, 2015, 167(2):125-130.
- [6] Melekoglu R, Yilmaz E, Ciftci O, et al. Associations between second-trimester amniotic fluid levels of ADAMTS4, ADAMTS5, IL-6, and TNF- α and spontaneous preterm delivery in singleton pregnancies [J]. J Perinat Med, 2019, 47(3):304-310.
- [7] 胡娅莉. 早产临床诊断与治疗指南(2014)[J]. 中华妇产科杂志, 2014, 49(7):481-485.
- [8] Tambor V, Vajrychova M, Kacerovsky M, et al. Potential Peripartum Markers of Infectious - Inflammatory Complications in Spontaneous Preterm Birth [J]. Biomed Res Int, 2015, 2015(1):343501-343513.
- [9] 马海会,金楚瑶,王海俊,等.北京市通州区单胎孕妇2013-2017年早产发生情况及危险因素研究[J]. 中国儿童保健杂志, 2019, 27(6):592-596.
- [10] Ahumada-Barrios ME, Alvarado GF. Risk Factors for premature birth in a hospital [J]. Rev Lat Am Enfermagem, 2016, 24(8):2750-2757.
- [11] 颜露春,叶蔚,廖少玲,等. Toll样受体4/核因子- κ B信号转导通路介导 β 防御素2在绒毛膜羊膜炎孕妇未足月胎膜早破过程中的作用[J]. 中国综合临床, 2017, 33(3):200-204.
- [12] 叶黎离. 妊娠期宫内感染对胎龄<37周早产儿免疫指标的影响及相关机制研究[J]. 中国妇幼保健, 2018, 33(24):5871-5874.
- [13] Liu G, Zhai X, Zhou H, et al. The combination of maltose-binding protein and BCG-induced Th1 activation is involved in TLR2/9-mediated upregulation of MyD88-TRAF6 and TLR4-mediated downregulation of TRIF-TRAF3 [J]. Cell Immunol, 2018, 325(3):56-63.
- [14] Walsh SW, Chumble AA, Washington SL, et al. Increased expression of toll-like receptors 2 and 9 is associated with reduced DNA methylation in spontaneous preterm labor [J]. J Reprod Immunol, 2017, 121(2):35-41.
- [15] 张彦香,胡海燕,徐风森. 单核细胞趋化蛋白-1与妊娠研究进展[J]. 世界临床医学, 2017, 11(8):121-123.
- [16] 周静,陈萍,郑雅萍,等. 感染性早产生产妇血清MCP-1与sTNFR-I和HMGB1及TNF- α 的表达[J]. 中华医院感染学杂志, 2019, 29(3):125-128.

· 论 著 ·

急性冠脉综合征患者 UA、NLRP3 水平与冠脉 SYNTAX 评分、斑块稳定性的相关性研究

郑耐心^{1*} 唐国栋¹ 田正凤²

[摘要] 目的 分析急性冠脉综合征(ACS)患者尿酸(UA)水平、Nod样受体蛋白-3(NLRP3)与冠脉 SYNTAX 评分、斑块稳定性的相关性。方法 回顾性分析2017年8月至2018年10月在本院接受治疗的ACS患者176例,并选取同期50例正常体检者作为对照组,检测两组患者血清UA、NLRP3水平。ACS患者在入院第2d行冠脉造影检测,评估各患者冠脉 SYNTAX 评分及冠脉病变支数;采用64层螺旋CT判定ACS患者冠状动脉粥样硬化斑块稳定性。分析ACS患者UA、NLRP3水平与冠脉 SYNTAX 评分、斑块稳定性的相关性。结果 ACS患者血清UA、NLRP3水平明显高于对照组($P<0.05$);ACS患者血清UA、NLRP3水平与 SYNTAX 评分正相关($P<0.05$);稳定斑块组患者血清UA、NLRP3水平明显低于不稳定斑块组($P<0.05$);血清UA、NLRP3预测ACS患者斑块稳定性时 ROC 曲线下面积分别为0.803、0.814,均低于联合检测时的0.897($P<0.05$)。结论 ACS患者UA、NLRP3水平较正常人群明显升高,且其水平与 SYNTAX 评分及斑块稳定性密切相关,临床检测UA、NLRP3水平对ACS疾病程度存在预测意义。

[关键词] 急性冠脉综合征;尿酸;Nod样受体蛋白-3;冠脉 SYNTAX 评分;斑块稳定性

Correlation between serum uric acid and NLRP3 level and coronary SYNTAX score, plaque stability in patients with acute coronary syndrome

ZHENG Naixin^{1*}, TANG Guodong¹, TIAN Zhengfeng²

(1. Department of cardiology, Beijing Hospital, National Center of Gerontology; Institute of Geriatric Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences, P. R., Beijing, China, 100073; 2. Donghua community service station, Dongcheng community service center, Beijing, China, 100073)

[ABSTRACT] Objective To analyze the correlation between serum uric acid (UA) level, Nod-like receptor protein-3 (NLRP3), coronary SYNTAX score and plaque stability in patients with acute coronary syndrome (ACS). Methods A retrospective analysis of 176 patients with ACS who were treated in our hospital from August 2017 to October 2018, and 50 normal medical examiners from the same period were selected as the control group to detect the serum UA and NLRP3 levels of the two groups. Coronary angiography was performed on the 2nd day after admission for ACS patients. The coronary SYNTAX scores and number of coronary lesions were evaluated. The correlations between UA and NLRP3 levels in patients with ACS and coronary SYNTAX score and plaque stability were analyzed. Results Serum UA and NLRP3 levels in ACS patients were significantly higher than those in the control group ($P<0.05$). Serum UA and NLRP3 levels in ACS patients were positively correlated with SYNTAX score ($P<0.05$). Serum UA and NLRP3 levels in patients with stable plaque group were significantly lower than those in unstable plaque group ($P<0.05$). The areas under the ROC curve when serum UA and NLRP3 predicted plaque stability in ACS patients were 0.803 and

基金项目:北京市科技计划课题(D161100000816012)

作者单位:1. 北京医院心血管内科国家老年医学中心中国医学科学院老年医学研究院

2. 北京市东城区社区服务中心东花市社区服务站,北京 100073

*通信作者:郑耐心, E-mail: upmryll@163.com

0.814, which were both lower than the combined detection of 0.897 ($P<0.05$). **Conclusion** The levels of UA and NLRP3 in patients with ACS are significantly higher than those in the normal population, and their levels are closely related to the SYNTAX score and plaque stability. Clinical detection of UA and NLRP3 levels has predictive significance for the degree of ACS disease.

[KEY WORDS] Acute coronary syndrome; Serum uric acid; Nod-like receptor protein-3; Coronary SYNTAX score; Plaque stability

急性冠脉综合征(Acute coronary syndrome, ACS)是心血管内科的一类常见疾病,具有起病急、病情发展快且病死率高的特点,以胸闷、胸痛为主要临床病症,严重者可出现心力衰竭、心律失常,甚至直接导致死亡,严重影响患者的生命健康^[1]。近年来,尿酸(Uric acid, UA)在心血管疾病中的作用受到越来越多研究学者的重视,但是其与心血管疾病的发生间存在何种关系,是否与疾病严重程度相关尚存在争议^[2]。Nod样受体蛋白-3(Nod-like receptor protein-3, NLRP3)是一种模式识别受体,可通过活化促炎因子,诱导机体炎症反应,进而降低冠心病患者斑块稳定性,介导冠心病的发展过程^[3-4]。目前,大量学者认为心血管事件的发生主要是由动脉粥样硬化斑块的稳定性决定的,故及时判断动脉粥样硬化斑块的稳定性是目前临床上的研究重点^[5]。SYNTAX评分系统是结合血管有无严重迂曲、钙化、油污分叉病变等血管病变情况对血管进行评分,可全面的对冠脉病变程度进行定量评估^[6]。本研究将探究ACS患者的血清UA、NLRP3水平,并分析其与冠脉SYNTAX评分、斑块稳定性的相关性,旨在探究血清UA水平与冠脉病变程度的关系,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2017年8月至2018年10月在本院接受治疗的176例ACS患者为研究对象,作为观察组,根据患者UA水平分为UA高水平组($\geq 320 \mu\text{mol/L}$)及UA低水平组($< 320 \mu\text{mol/L}$),88例/组。其中,UA高水平组男53例,女35例;平均(59.87 \pm 8.76)岁;疾病类型:不稳定性心绞痛45例、非ST段抬高型心肌梗死26例、ST段抬高型心肌梗死17例;病程2~8年,平均(5.62 \pm 1.20)年。UA低水平组男50例,女38例;平均(60.33 \pm 9.45)岁;疾病类型:不稳定性心绞痛43例、非ST段抬高型心肌梗死28例、ST段抬高型心肌梗死17例;病程3~8年,平

均(5.74 \pm 1.36)年。并选取同期50例体检健康者作为对照组。对照组男31例,女19例;平均(59.65 \pm 9.13)岁。三组患者性别及年龄比较无明显差异($P>0.05$),有可比性。

纳入标准:①符合世界卫生组织制定的关于ACS的诊断标准^[7];②经实验室及影像学等相关检查确诊。排除标准:①合并慢性稳定型冠心病;②合并其他类型心血管疾病,包含心力衰竭、心肌病、先天性心脏病等;③肝、肾等重要器官功能不全者;④合并肿瘤疾病或自身免疫性疾病者;⑤3个月内有外伤或存在手术史者;⑥近期服用影响UA水平药物者。

1.2 检测指标

1.2.1 血清UA水平测定

所有患者在入院后第2d抽取清晨空腹肘静脉血2~3 mL,经离心后分离上清,利用免疫检测试剂盒(上海茁彩生物科技有限公司)检测各患者血清UA、NLRP3水平。检测过程严格按照说明书进行。

1.2.2 冠脉造影检测

所患者在入院后第2d行冠脉造影检查。所有患者均经右手桡动脉途径(血管搏动良好,Allen试验阳性),常规消毒,2%利多卡因局麻,seldinger 7 S法穿刺成功,进入6F鞘管,鞘内注入50 IU/kg肝素,硝酸甘油200 μg ,行冠脉造影检查。由2位经验丰富的心内科医师进行独立阅片并计算相应的SYNTAX评分及冠脉病变支数,当两位医师的意见不一致时引入第3位医师讨论决定。其中,左冠状动脉前降支、回旋支和右冠状动脉病变分别记为单支病变,左主干病变记为两支,属多支病变,左冠状动脉前降支、回旋支和右冠状动脉三支血管中有两支或三支血管病变记为多支病变。根据SYNTAX评分将患者分为低危组(1~22分)、中危组(23~32分)及高危组(> 32 分)。

1.2.3 斑块稳定性检测

所患者在入院后第2d行64层螺旋CT(西门子公司)冠状动脉成像检测。采用西门子64层螺旋CT进行扫描,扫描前于肘静脉处注射浓度为

300 mg/mL的造影剂欧耐派克(通用电气药业有限公司)100 mL,检测时控制患者心率在70下/min以下。由两名经验丰富的医师进行阅片,根据所检测出的冠状动脉粥样硬化斑块的CT值,将其分为软斑块(CT值<60 HU)、混合性斑块(CT值在60~129 HU之间)、硬化斑块(CT值≥130 HU)。其中,硬化斑块为稳定斑块,软斑块及混合性斑块为不稳定斑块。

1.3 统计学方法

采用SPSS 20.0软件分析处理数据,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示首先进行正态性检验,如果各组均满足正态性且两组间方差齐,采用 t 检验进行组间比较;计数资料用 $n(\%)$ 表示,进行 χ^2 检验。采用Pearson法进行相关性分析,Logistic回归分析确定血UA水平的独立危险因素。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者UA、NLRP3水平比较

观察组患者UA、NLRP3水平明显高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表1。

表1 两组患者UA、NLRP3水平比较

Table 1 Comparison of UA and NLRP3 levels between 2 groups of patients

| 组别 | n | UA($\mu\text{mol/L}$) | NLRP3(ng/L) |
|-------|-----|-------------------------|------------------------|
| 对照组 | 50 | 258.54±16.84 | 55.49±6.72 |
| 观察组 | 176 | 290.79±18.36 | 134.88±12.28 |
| t 值 | | 11.156 | 43.84 |
| P 值 | | 0.000 | 0.000 |

2.2 不同SYNTAX评分组患者UA、NLRP3水平比较

三组患者血清UA、NLRP3水平比较结果:低危组<中危组<高危组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表2。

2.3 ACS患者UA、NLRP3水平与SYNTAX评分相关性分析

相关性结果分析显示ACS患者UA、NLRP3水平均与冠脉SYNTAX评分均呈正相关($r=0.526, 0.487, P$ 均<0.05)。

2.4 不同冠脉病变支数患者UA、NLRP3水平及SYNTAX评分比较

多支病变组患者UA、NLRP3水平均明显高于单支病变组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表3。

表2 不同SYNTAX评分组患者UA、NLRP3水平比较

Table 2 Comparison of UA and NLRP3 levels of patients in different SYNTAX score groups

| 组别 | n | UA($\mu\text{mol/L}$) | NLRP3(ng/L) |
|-------|-----|----------------------------|----------------------------|
| 低危组 | 99 | 267.26±12.33 | 93.56±8.56 |
| 中危组 | 45 | 309.36±15.94 ^a | 165.23±12.37 ^a |
| 高危组 | 32 | 337.50±18.69 ^{ab} | 220.03±16.94 ^{ab} |
| F 值 | | 328.468 | 1678.067 |
| P 值 | | 0.000 | 0.000 |

注:与低危组比较,^a $P < 0.05$;与中危组比较,^b $P < 0.05$ 。

表3 不同冠脉病变支数患者UA、NLRP3水平及SYNTAX评分比较

Table 3 Comparison of UA, NLRP3 levels and SYNTAX scores of patients with different coronary artery disease counts

| 组别 | n | UA($\mu\text{mol/L}$) | NLRP3(ng/L) |
|--------|-----|-------------------------|------------------------|
| 稳定斑块组 | 48 | 271.36±21.81 | 112.36±18.32 |
| 不稳定斑块组 | 128 | 298.08±20.23 | 143.32±20.31 |
| t 值 | | 7.638 | 9.242 |
| P 值 | | 0.000 | 0.000 |

2.5 ACS患者UA、NLRP3及两者联合检测对斑块稳定性的预测价值

采用ROC曲线分析结果显示UA的ROC曲线下面积(AUC)为0.803,截断值为289.08 $\mu\text{mol/L}$; NLRP3的AUC为0.814,截断值为125.18 ng/L 。两者联合诊断时AUC为0.897,明显高于两者单独检测时的AUC($P < 0.05$)。见图1、表4。

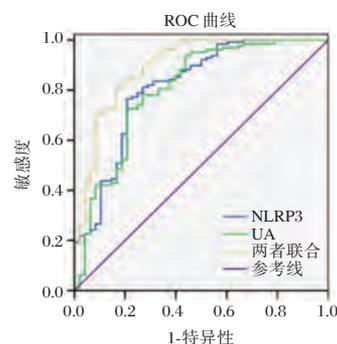


图1 ROC曲线分析UA、NLRP3及两者联合检测对斑块稳定性的预测价值

Figure 1 ROC curve analysis of the predictive value of UA, NLRP3 and their combined detection on plaque stability

3 讨论

UA是人体内嘌呤类化合物代谢的终产物,正常情况下UA的产生及排泄处于动态平衡状态,但是当UA生成增多或UA排泄减少时会导致血液

表4 ACS患者UA、NLRP3及两者联合检测对斑块稳定性的预测价值

Table 4 The predictive value of UA, NLRP3 and the combined detection of ACS patients on plaque stability

| 指标 | AUC | 标准误 | P值 | 95%CI |
|-------|--------------------|-------|-------|-------------|
| UA | 0.803 ^a | 0.041 | <0.05 | 0.723~0.884 |
| NLRP3 | 0.814 ^a | 0.039 | <0.05 | 0.737~0.891 |
| 两者联合 | 0.897 | 0.029 | <0.05 | 0.839~0.954 |

注:与联合诊断比较, ^a*P*<0.05。

中UA浓度明显增加,与冠心病的发生及发展密切相关,但是对于UA水平与冠心病严重程度的关系尚无统一论^[8]。NLRP3炎症小体是一种模式识别受体,被证实可诱导caspase-1前体自剪切成活性形式,而活化的caspase-1可促进炎症因子的释放,引发机体炎症反应,促进血管壁炎症反应进程,进而参与ACS的发生发展过程。Pavillard等^[9]本研究结果显示,相比较于对照组,观察组患者UA、NLRP3表达水平明显升高,提示UA、NLRP3表达水平与ACS的发生发展密切相关。SYNTAX评分是一种基于冠脉造影结果对冠脉病变程度进行定量分析的工具,其数值与冠脉病变程度正相关^[10]。UA主要是由黄嘌呤氧化酶催化产生,同时可生成超氧阴离子自由基,当机体内血UA水平升高时,可刺激血管平滑肌细胞增生、迁移,导致血管内皮功能异常,血管舒张因子减少,加重血管狭窄病变。而作为炎症小体,NLRP3可导致下游炎症因子的释放,发挥促炎作用,进而抑制血管平滑肌细胞的增殖及胶原合成,导致冠脉病变的发生^[11]。

临床研究显示,ACS的发生及发展与冠状动脉的狭窄程度无关,与冠状动脉粥样硬化斑块的稳定性显著相关。既往研究证实,在ACS患者中,75%~85%斑块类型为不稳定性^[12]。在本研究中不稳定斑块占比为72.73%,与上述研究基本一致,说明不稳定性斑块是导致ACS发生及发展的主要原因之一,与ACS的疾病严重程度密切相关。本研究显示,ACS患者UA、NLRP3表达水平与斑块稳定性密切相关。NLRP3诱导炎症的炎症反应主要在斑块低切力的区域,增加炎症的活动,促进动脉粥样斑块的易损,而这也可能是NLRP3高水平患者斑块稳定性差的原因^[13-14]。此外,研究显示UA、NLRP3表达水平对其斑块稳定性均具有较好的预测价值,且联合检测的预测价值更高,进一步证实UA、NLRP3表达水平与斑块稳定密切相关。

综上所述,ACS患者UA、NLRP3水平较正常人群明显升高,且其水平与冠脉SYNTAX评分、斑块稳定性相关。临床可通过检测UA、NLRP3预测ACS患者疾病程度。但由于本研究样本量较少,数据统计可能存在一定的偏差,仍需后续扩大样本量作进一步探讨。

参考文献

- [1] Cuisset T, Deharo P, Quilici J, et al. Benefit of switching dual antiplatelet therapy after acute coronary syndrome: the TOPIC (timing of platelet inhibition after acute coronary syndrome) randomized study [J]. *Eur Heart J*, 2018, 10(1): 3070-3078.
- [2] Din UAASE, Salem MM, Abdulazim D O. Uric acid in the pathogenesis of metabolic, renal, and cardiovascular diseases: A review [J]. *J Adv Res*, 2017, 8(5):537-548.
- [3] 胡龙江,周音频,曹运兰,等. NLRP3炎症小体与冠心病的相关性[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2018, 26(3): 281-286.
- [4] 胡波,张晓刚,李德才. miR-22靶向抑制NLRP3基因对冠心病内皮细胞炎症损伤的保护作用[J]. *安徽医科大学学报*, 2018, 53(5):16-23.
- [5] 皮红泉,李德华,卢盛祥,等. 心脏型脂肪酸结合蛋白和D-二聚体及高敏肌钙蛋白T在急性冠状动脉综合征早期诊断中的应用[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2016, 8(3):182-187.
- [6] 姚艳妮,胡越成,丛洪良. SYNTAX评分及其衍生评分的研究进展[J]. *中华心血管病杂志*, 2017, 45(4):341-344.
- [7] 陆秋雅. 血栓弹力图-MA参数在急性冠脉综合征中的诊断价值[J]. *检验医学*, 2018, 33(2):119-123.
- [8] Cheong E, Ryu S, Lee J Y, et al. Association between serum uric acid and cardiovascular mortality and all-cause mortality: a cohort study [J]. *J Hyper*, 2017, 35(2): S3-S9.
- [9] Pavillard LE, Marín-Aguilar, Fabiola, Bullon P, et al. Cardiovascular diseases, NLRP3 inflammasome, and western dietary patterns [J]. *Pharmacol Res*, 2018, 131(2):44-50.
- [10] 李永斌,加静,王宁,等. 尿酸水平与冠状动脉CTA SYNTAX评分间相关性研究[J]. *实用放射学杂志*, 2017, 3(11):1744-1746.
- [11] Larsen TR, Gerke O, Diederichsen A, et al. The association between uric acid levels and different clinical manifestations of coronary artery disease [J]. *Coronar Artery Dis*, 2017, 29(3):194-203.
- [12] 徐斌,于波. 急性心肌梗死的影像学斑块特征及相关危险因素[J]. *哈尔滨医科大学学报*, 2017, 51(1):53-56.
- [13] 马龙,凡奇,杨森,等. 急性脑梗死患者血清Hcy、UA和CRP水平变化及与颈动脉粥样硬化的关系[J]. *河北医药*, 2018, 40(8):61-64.
- [14] Kok AM, Molony DS, Timmins LH, et al. The Influence of Multidirectional Shear Stress on Plaque Progression and Composition Changes in Human Coronary Arteries [J]. *Eurointervention*, 2019, 15(8):692-699.

IFN- γ 、IL-6、sIL-2R 在初治型肺结核患者血清中的变化意义研究

张信鸽^{1*} 刘新² 赵丹晖³

【摘要】 目的 探讨痰菌阳性的初治型肺结核患者血清干扰素 γ (IFN- γ)、白细胞介素-6(IL-6)、可溶性白介素-2受体(sIL-2R)水平及意义。方法 选取2017年2月至2018年10月在本院治疗的初治型肺结核患者142例(观察组),同时选取健康志愿者120例作为对照组,观察组采用2HREZ/10HR方案治疗,检测治疗前及治疗两个月后血清IFN- γ 、IL-6、sIL-2R水平,观察强化治疗前后血清IFN- γ 、IL-6、sIL-2R水平变化及痰菌转阴情况,并绘制ROC曲线,评估IFN- γ 、IL-6、sIL-2R对痰菌转阴的预测价值。结果 观察组血清sIL-2R、IL-6、IFN- γ 水平明显高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);治疗两个月后观察组患者IFN- γ 、IL-6、sIL-2R水平均较治疗前降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。痰菌转阴患者血清sIL-2R、IL-6、IFN- γ 水平低于痰菌未转阴患者,差异有统计学意义($P<0.05$)。IFN- γ 、IL-6、sIL-2R单独及联合检测预测痰菌转阴的AUC值分别为0.845、0.791、0.745、0.918。结论 初治型肺结核患者血清IFN- γ 、IL-6、sIL-2R水平明显升高,与结核的活动有关,痰菌转阴后IFN- γ 、IL-6、sIL-2R水平明显下降,痰菌阳性肺结核患者联合检测IFN- γ 、IL-6、sIL-2R水平有助于对痰菌转阴情况进行评估。

【关键词】 肺结核;干扰素 γ ;白细胞介素-6;可溶性白介素-2受体

Study on the significance of serum levels of IFN- γ , IL-6 and sIL-2R in patients with primary pulmonary tuberculosis

ZHANG Xinge^{1*}, LIU Xin², ZHAO Danhui³

(1. Nanyang tuberculosis control center, Nanyang, Henan, China, 473000; 2. Department of tuberculosis, Henan Chest Hospital, Zhengzhou, Henan, China, 450000; 3. Department of Pathology, Xi'an Xijing Hospital, Xi'an, Shanxi, China, 710000)

【ABSTRACT】 Objective To investigate the serum levels of interferon- γ (IFN- γ), interleukin-6 (IL-6) and soluble interleukin-2 receptor (sIL-2R) in primary pulmonary tuberculosis patients with positive sputum bacteria. Methods 142 patients (observation group) were selected for the initial treatment of pulmonary tuberculosis in our hospital from February 2017 to October 2018, and 120 healthy volunteers were selected as the control group. The observation group was treated with 2HREZ / 10HR scheme. The levels of serum IFN- γ , IL-6 and sIL-2R in treatment before and 2 months after treatment were measured to observe the changes of serum IFN- γ , IL-6, sIL-2R and the sputum bacteria turning negative before and after intensive treatment. The ROC curve was drawn to evaluate the predictive value of IFN- γ , IL-6 and sIL-2R for the sputum bacteria turning negative. Result The serum levels of sIL-2R, IL-6 and IFN- γ in the observation group were significantly higher than those in the control group, and the differences had statistical significance ($P<0.05$). The levels of IFN- γ , IL-6 and sIL-2R after two months of treatment in the observation group were significantly lower than

作者单位:1. 南阳市结核病防治所结核病区,河南,南阳 473000

2. 河南省胸科医院结核科,河南,郑州 450000

3. 西安西京医院病理科,陕西,西安 710000

*通信作者:张信鸽, E-mail: zhansyuty@163.com

those in treatment before ($P<0.05$). The serum levels of sIL-2R, IL-6 and IFN- γ in patients with the negative turning of sputum bacteria were lower than those in patients with no negative turning of sputum bacteria, and the differences had statistical significance ($P<0.05$). The AUC values of IFN- γ , IL-6 and sIL-2R with alone and combined detection to predictg the negative turning of sputum bacteria were 0.845、0.791、0.745 and 0.918 respectively. **Conclusion** Serum levels of IFN- γ , IL-6 and sIL-2R in the serum of the patients with primary pulmonary tuberculosis were significantly increased, which was related to the activity of tuberculosis. The levels of IFN- γ , IL-6 and sIL-2R were significantly decreased after the sputum bacteria turned negative. The combined detection of IFN- γ , IL-6 and sIL-2R in the patients with sputum bacteria positive pulmonary tuberculosis was helpful to evaluate the sputum bacteria turned negative.

[KEY WORDS] Pulmonary tuberculosis; Interferon- γ ; Interleukin-6; Soluble interleukin-2 receptor

结核病是一种慢性传染性疾病,主要由结核分枝杆菌感染引起,以肺结核最为常见,患者常通过咳嗽、咳痰、打喷嚏等途径感染抵抗力低的人^[1-2]。因此痰菌阳性也是肺结核患者具备传染力的指标之一。据研究^[3],肺结核的发生发展与机体的免疫系统密切相关。干扰素 γ (Interferon- γ , IFN- γ)、白细胞介素-6(Interleukin-6, IL-6)和可溶性白介素-2受体(soluble interleukin-2 receptor, sIL-2R)是3种巨噬细胞相关细胞因子,当体内感染、炎症反应加重时,这三种因子在体内的水平都会显著上升,在抗结核免疫过程中起着十分重要的作用^[4]。本研究将探讨血清IFN- γ 、IL-6、sIL-2R在肺结核患者血清中水平变化及其对痰菌转阴的预测价值,报道如下:

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2017年2月至2018年10月在本院收治的痰菌阳性的初治型肺结核患者142例(观察组),同时选取健康志愿者120例作为对照组纳入标准:①诊断及分型符合中华医学会制定的《肺结核诊断和治疗指南》中的标准^[5]且痰涂片分支杆菌检测阳性;②年龄>18岁;③患者及家属知情同意。排除标准:①合并有恶性肿瘤、结缔组织疾病、甲状腺功能疾病、急慢性感染、肝肾功能不全、糖尿病、高血压等基础性疾病;②合并结缔组织病、免疫系统疾病或近1个月内使用过免疫制剂;③既往曾诊断肺结核或服用抗结核药物。观察组和对照组一般资料比较差异无统计学意义($P>0.05$),见表1。

1.2 治疗方法

观察组患者入组后采用2HREZ/10HR化疗方案,吡嗪酰胺(成都锦华药业有限责任公司,批

表1 两组一般资料比较($\bar{x}\pm s$)

Table 1 comparison of general information between the two groups ($\bar{x}\pm s$)

| 组别 | n | 男/女 | 年龄(岁) |
|---------------|-----|-------|-------------------|
| 观察组 | 142 | 82/60 | 54.46 \pm 9.61 |
| 对照组 | 120 | 70/50 | 55.20 \pm 10.15 |
| t/ χ^2 值 | | 0.009 | 0.605 |
| P值 | | 0.924 | 0.546 |

号:160801,0.5 g/片)1 g,口服,每日1次。异烟胺(沈阳红旗制药有限公司,批号:1602051,0.1 g/片)0.3g,口服,每日1次。利福平(沈阳红旗制药有限公司,批号:1604071,0.15 g/粒)0.45 g,口服,每日1次。乙胺丁醇(杭州民生药业有限公司,批号:160402,0.25 g/片)0.75 g,口服,每日1次。强化治疗2个月,序贯10个月常规治疗,异烟肼0.3 g,口服,每日1次,利福平0.45 g,口服,每日1次。患者治疗期间均监测血常规、肝肾功能等。

1.3 检测方法

患者治疗前及治疗两个月后分别采集空腹静脉血5 mL置于枸橼酸钠促凝管中,离心分离血清。采用双抗体夹心酶联免疫吸附法检测血清中细胞因子IL-6、IFN- γ 、sIL-2R的表达水平,按照试剂盒说明书操作,试剂盒购自上海森雄科技实业有限公司,检测仪器为全波长酶标仪(赛默飞世尔公司,型号:Multiskan GO)。治疗前和治疗两个月后分别检测一次,每个样本分别检测三次取平均值以降低检测误差。

1.4 统计学处理

采用SPSS 19.0软件进行数据分析,计量资料采用($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较使用独立样本t检验,计数资料比较使用 χ^2 检验,绘制ROC曲线,分析IFN- γ 、IL-6、sIL-2R对痰菌转阴的预测价值。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 两组血清 sIL-2R、IL-6、IFN- γ 水平比较

观察组血清 sIL-2R、IL-6、IFN- γ 水平明显高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表2。

表2 两组血清 sIL-2R、IL-6、IFN- γ 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of serum sIL-2R il-6 IFN-level between the two groups ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | n | sIL-2R(pmol/L) | IL-6(ng/L) | IFN- γ (ng/L) |
|-----|-----|--------------------|-------------------|----------------------|
| 观察组 | 142 | 181.12 \pm 42.23 | 55.13 \pm 21.03 | 41.12 \pm 12.11 |
| 对照组 | 120 | 72.26 \pm 20.03 | 26.41 \pm 8.46 | 13.32 \pm 4.03 |
| t 值 | | 25.880 | 14.028 | 24.041 |
| P 值 | | 0.000 | 0.000 | 0.000 |

2.4 观察组治疗前后血清 sIL-2R、IL-6、IFN- γ 水平比较

观察组强化治疗两个月后血清 sIL-2R、IL-6、IFN- γ 较治疗前明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表3。

表3 观察组治疗前后血清 sIL-2R、IL-6、IFN- γ 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of serum sIL-2R il-6 IFN- before and after treatment in the observation group ($\bar{x} \pm s$)

| 时期 | n | sIL-2R(pmol/L) | IL-6(ng/L) | IFN- γ (ng/L) |
|--------|-----|--------------------|-------------------|----------------------|
| 治疗前 | 142 | 181.12 \pm 42.23 | 55.13 \pm 21.03 | 41.12 \pm 12.11 |
| 治疗两个月后 | 142 | 96.08 \pm 29.64 | 24.22 \pm 19.65 | 16.64 \pm 13.03 |
| t 值 | | 14.098 | 15.345 | 19.030 |
| P 值 | | 0.000 | 0.000 | 0.000 |

2.3 强化治疗后痰菌转阴患者和痰菌持续阳性患者血清 sIL-2R、IL-6、IFN- γ 水平比较

强化治疗两个月后 142 例患者中 116 例痰菌转阴,强化治疗后痰菌持续阳性患者血清 sIL-2R、IL-6、IFN- γ 水平明显高于痰菌转阴患者,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表4。

表4 强化治疗后痰菌阳性和痰菌转阴患者血清 sIL-2R、IL-6、IFN- γ 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Comparison of serum sIL-2R il-6 IFN- levels in patients with positive and negative sputum after treatment ($\bar{x} \pm s$)

| 痰菌 | n | sIL-2R(pmol/L) | IL-6(ng/L) | IFN- γ (ng/L) |
|------|-----|--------------------|-------------------|----------------------|
| 痰菌阳性 | 26 | 157.42 \pm 36.10 | 46.87 \pm 16.50 | 27.32 \pm 13.41 |
| 痰菌转阴 | 116 | 82.36 \pm 31.48 | 19.06 \pm 17.80 | 14.20 \pm 10.60 |
| t 值 | | 5.256 | 4.665 | 5.849 |
| P 值 | | 0.000 | 0.000 | 0.000 |

2.5 IFN- γ 、IL-6、sIL-2R 对痰菌转阴的预测价值

ROC 曲线显示,强化治疗两个月后,血清 IL-6 预测痰菌转阴的灵敏度最高,sIL-2R、IL-6、IFN- γ 联合检测预测痰菌转阴的 AUC 值、约登指数、特异度最高。见图1、表5。

3 讨论

结核病是由结核分枝杆菌感染引起特异性感染性疾病^[6]。肺结核是我国位居首位的传染性疾病,临床症状为低热、盗汗、咯血、胸痛、胸闷以及呼吸困难等^[7]。结核杆菌对机体的损害不仅与病原菌致病力

表5 ROC 曲线分析

Table 5 ROC curve analysis

| 指标 | 临界值 | 约登指数 | 敏感度(%) | 特异度(%) | AUC | 95%CI |
|----------------------|--------|-------|--------|--------|-------|-------------|
| IFN- γ (ng/L) | 19.155 | 0.536 | 0.769 | 0.767 | 0.845 | 0.751~0.939 |
| IL-6(ng/L) | 33.425 | 0.463 | 0.885 | 0.578 | 0.791 | 0.707~0.875 |
| sIL-2R(pmol/L) | 95.810 | 0.381 | 0.769 | 0.612 | 0.745 | 0.652~0.838 |
| 联合检测 | - | 0.610 | 0.731 | 0.879 | 0.918 | 0.866~0.970 |

有关,还与患者免疫功能的调节及炎症反应有关^[8]。

有研究^[9]表明,肺结核患者血清中的 IFN- γ 水平显著高于健康人群,而且与病情的变化有密切的联系,所以 IFN- γ 是肺结核患者体内典型的细胞因子。它产生于 Th1 细胞,可以激活、聚集单核细胞,从而有效的抑制病原菌对机体的感染,还可以加强巨噬细胞对病原菌的消灭作用,因此 IFN- γ 在肺结核的发生发展过程中具有免疫调节作用^[10]。

本次研究结果显示肺结核病患者血清中 IFN- γ 水平明显高于健康志愿者,治疗后 IFN- γ 水平下降,这说明 IFN- γ 水平的高低能够体现肺结核的严重程度和治疗效果。当病情严重时,血清中 IFN- γ 水平就会升高^[11-12]。IL-6 是典型的炎性介质,由多种细胞产生^[13]。它可以促进体内的免疫细胞(如 T 细胞、B 细胞)的增殖和分化,在早期炎症反应中发挥着重要的作用^[14]。sIL-2R 是一种多肽物质,构成

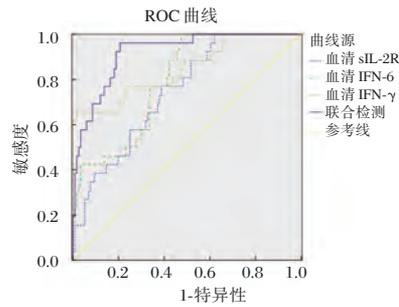


图1 IFN- γ 、IL-6、sIL-2R 单独及联合检测对痰菌转阴预测价值的ROC曲线

Figure 1 ROC curve of IFN- γ , IL-6 and SIL-2R with alone and combined tests in predicting the negative turning of sputum bacteria

活化淋巴细胞膜IL-2R的 α 链成分,活化的T淋巴细胞和单核细胞是其产生的主要场所,主要经细胞膜脱落而进入血液循环^[15]。IL-2是一种重要的细胞因子,参与体内的多种免疫调控,如促进B细胞、NK细胞的分化增殖;而sIL-2R通过与mIL-2R竞争结合IL-2,减弱IL-2依赖的免疫应答反应。所以当机体内sIL-2R水平增高时,说明机体正抑制免疫细胞发挥作用,使得机体易发生炎症反应^[16]。本次研究结果显示肺结核病患者血清中sIL-2R、IL-6水平明显高于健康志愿者,而在治疗后患者血清的sIL-2R、IL-6水平下降,说明sIL-2R和IL-6水平的变化可以反映患者病情的变化^[17]。

肺结核是呼吸道传染性疾病,能够通过飞沫传播,而痰菌阳性是患者排菌及具备传染力的标志之一,因此对于痰菌阳性的患者,痰菌转阴是抗结核治疗的目标之一。在对本组资料的分析,提示痰菌转阴情况与患者体内的炎症活动密切相关。本研究,结果发现,血清IFN- γ 、IL-6、sIL-2R对痰菌转阴均具有一定的预测价值,单独检测IL-6的灵敏度最高,单独检测IFN- γ 的约登指数高于IL-6、sIL-2R,而三者联合检测预测痰菌转阴的AUC值、约登指数、特异度最高,预测效能更佳,提示痰菌阳性的初治型肺结核,在治疗过程中对IFN- γ 、IL-6、sIL-2R水平进行监测,有助于对抗结核治疗的效果及痰菌转阴情况进行评估。

综上所述,肺结核患者血清sIL-2R、IL-6、IFN- γ 水平升高,能够反应结核所致的机体炎症反应状态,对sIL-2R、IL-6、IFN- γ 水平进行检测有助于对痰菌阳性的肺结核病情及治疗效果进行评估,并能够有效预测患者痰菌转阴情况。

参考文献

- [1] 刘佳庆,张丽霞,孙海柏,等. Xpert MTB/RIF 在结核病诊断中的研究进展[J]. 广东医学, 2016, 37(12):234-236.
- [2] 杨艺,黄兴涛,柳彬,等. 肺部误诊为肺结核病例的CT分析[J]. 临床放射学杂志, 2016, 5(12):1822-1826.
- [3] 宋宏颖. 慢性阻塞性肺疾病合并肺结核患者免疫功能及其细胞因子水平变化[J]. 山东医药, 2017, 57(25):578-579.
- [4] 许忠,王艳玲,范海波,等. 肺炎支原体肺炎患儿血清IL-6、IL-2、sIL-2R水平的研究[J]. 临床儿科杂志, 2001, 19(4):1112-1114.
- [5] 中华医学会结核病学分会. 肺结核诊断和治疗指南[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2001, 24(2):70-74.
- [6] 张长桂,周兴军,姚晓燕,等. γ -干扰素释放试验和PPD试验在处置学校结核病暴发疫情中的应用分析[J]. 中国学校卫生, 2016, 37(2):456-458.
- [7] 周颖,李翠萍,何晓,等. 涂阴肺结核病人血清蛋白组学研究及SHBG蛋白验证[J]. 中华疾病控制杂志, 2016, 20(6):559-563.
- [8] 黄丽静,陈焯彬,韦永孜. 肺结核患者病情严重程度与免疫功能受损程度的相关性研究[J]. 海南医学, 2016, 27(9):234-236.
- [9] Martínez-Morales MC, Deswarte C, Castañeda-Casimiro J, et al. Disseminated infection by *M. tuberculosis* complex in patient with IFN- γ receptor 1 complete deficiency [J]. Rev Alerg Mex, 2017, 64(4):499-504.
- [10] Chung YT, Pasquinnelli V, Jurado JO, et al. Elevated cyclic AMP Inhibits Mycobacterium tuberculosis-stimulated T cell IFN- γ Secretion through type I Protein Kinase A [J]. J Infect Dis, 2018, 8(7):234-235.
- [11] 张佳,张峰波,李奇凤,等. 肺结核患者血清中可溶性T细胞免疫球蛋白黏蛋白分子3(sTim-3)和IL-4水平升高但IFN- γ 水平降低[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2016, 32(7):968-971.
- [12] 陈磊,吴剑卿. 慢性阻塞性肺疾病急性加重期合并肺结核患者外周血清中IL-6、TNF- α 和IFN- γ 水平变化及临床意义[J]. 国际呼吸杂志, 2017, 37(16):1211.
- [13] 金武,杜鹃. 不同结核类型患者外周血IL-6与IL-35和IL-37及TNF- α 水平的动态变化研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2017, 7(22):26-29.
- [14] 郝兴亮. 痰菌阴性肺结核患者血清白介素-6、白介素-10、白介素-23、骨桥蛋白水平的动态变化及临床意义[J]. 中国感染与化疗杂志, 2016, 16(3):987-989.
- [15] 谢国强,柳毅,马坚. 乙型病毒性肝炎患者血清IL-2、sIL-2R、IL-13及PDGF测定的意义[J]. 放射免疫学杂志, 2009, 22(5):453-455.
- [16] 蔡后荣,周玉皆. 可溶性IL-2R检测法比较及其在肺结核患者测定中的临床意义[J]. 临床荟萃, 1996, 6(1):185-187.
- [17] Tang SJ, Cui HY, Lan Y, et al. Increased Cytokines Response in Patients with Tuberculosis Complicated with Chronic Obstructive Pulmonary Disease [J]. PLoS One, 2013, 8(4):e62385.

· 论 著 ·

Fibroscan弹性值与肝纤维化标志物在肝硬化患者中的关系及预后预测价值分析

张文利^{1*} 董家琪¹ 周柱玉² 蒋香梅³

[摘要] 目的 探究Fibroscan弹性值(FS)与肝纤维化标志物在肝硬化患者中的关系及预后预测价值。方法 选取本院2016年8月至2019年7月肝硬化患者128例作为研究对象,根据肝功能分级评分分为A级、B级、C级,另选取同期健康体检者120例作为对照组。比较4组FS、肝纤维化标志物[血清透明质酸(HA)、Ⅲ型胶原(PCⅢ)、Ⅳ型胶原(CⅣ)]水平,分析上述指标与肝硬化分期的关系,评价FS与血清HA、PCⅢ、CⅣ相关性。随访3个月,根据生存状况分为生存者、死亡者,比较两者FS、血清HA、PCⅢ、CⅣ,分析上述指标对肝硬化患者死亡的预测价值,并采用Kaplan-Meier曲线进行生存分析。结果 C级FS、血清HA、PCⅢ、CⅣ>B级>A级>健康对照组($P<0.05$);FS、血清HA、PCⅢ、CⅣ与肝硬化分期具有显著相关性($P<0.05$);FS与血清HA、PCⅢ、CⅣ呈正相关($P<0.05$);FS与血清HA、PCⅢ、CⅣ联合预测肝硬化患者死亡的AUC值>HA>FS>CⅣ>PCⅢ,联合检测时AUC值为0.881;Kaplan-Meier曲线分析,FS、血清HA、PCⅢ、CⅣ高危者生存率低于低危者($P<0.05$)。结论 FS、血清肝纤维化标志物(HA、PCⅢ、CⅣ)与肝硬化发生、发展密切相关,联合检测可提高预后预测价值,为病情监测、疗效评估提供依据。

[关键词] Fibroscan弹性值;肝纤维化;肝硬化;透明质酸;Ⅲ型胶原;Ⅳ型胶原

Relationship between Fibroscan elasticity value and liver fibrosis markers in patients with liver cirrhosis and prognostic value

ZHANG Wenli^{1*}, DONG Jiaqi¹, ZHOU Zhuyu², JIANG Xiangmei³

(1. Department of gastroenterology, deyang people's hospital, Deyang, Sichun, China, 618000; 2. Department of ultrasound, deyang people's hospital, Deyang, Sichun China, 618000; 3. Laboratory department, deyang people's hospital, deyang, Sichun China, 618000)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the relationship between Fibroscan elasticity value (FS) and liver fibrosis markers in patients with liver cirrhosis and the prognostic value. **Methods** 128 patients with liver cirrhosis from August 2016 to July 2019 in our hospital were selected as the research objects, according to the liver function reserve (CTP) score, they were divided into grade A, grade B, grade C, and another 120 healthy people were selected as the control group during the same period. Comparing the levels of FS and liver fibrosis markers [serum hyaluronic acid (HA), type III collagen (PC III), type IV collagen (CIV)] in four groups, and analyzing the relationship between the above indicators and the stage of liver cirrhosis, and assessing the correlation between FS and serum HA, PC III, CIV. Followed up for 3 months, and divided them into survivors and deceased according to their survival status, and compared the FS, serum HA, PC III, CIV of the two. The predictive value of the above indicators for death of patients with liver cirrhosis was

基金项目:2019年度德阳市科技计划项目(zukjjsc20-zdyf-2019-01)

作者单位:1. 德阳市人民医院消化内科,四川,德阳 618000

2. 德阳市人民医院超声科,四川,德阳 618000

3. 德阳市人民医院检验科,四川,德阳 618000

*通信作者:张文利, E-mail:zhangwenli7821

analyzed, and Kaplan-Meier curve was used for survival analysis. **Results** FS, serum HA, PC III, CIV of Grade C>Grade B>Grade A>healthy control group ($P<0.05$); FS, serum HA, PC III, CIV had a significant correlation with the stage of liver cirrhosis ($P<0.05$); FS was positively correlated with serum HA, PC III, CIV ($P<0.05$); FS combined with serum HA, PC III, CIV predict the AUC value of death in patients with liver cirrhosis> HA>FS>CIV>PC III. AUC value was 0.881 when combined detection; Kaplan-Meier curve analysis showed that the survival rate of FS, serum HA, PC III, CIV high-risk patients was lower than that of low-risk patients ($P<0.05$). **Conclusion** FS and serum liver fibrosis markers (HA, PC III, CIV) are closely related to the occurrence and development of liver cirrhosis. Joint detection can improve the prognostic value and provide a basis for disease monitoring and efficacy evaluation.

[KEY WORDS] Fibroscan elasticity value; Liver fibrosis; Liver cirrhosis; Hyaluronic acid; Type III collagen; Type IV collagen

肝纤维化为各种慢性肝脏疾病逐渐进展的结果,未得到及时治疗,15%~40%左右患者会进展到肝硬化,甚至发生肝癌^[1-2]。故早期评估肝纤维化及肝硬化程度对慢性肝脏疾病患者尤为重要。目前,肝穿刺活组织检查仍是肝纤维化诊断“金标准”,但存在其自身的局限性与风险性,如有创性、抽样误差等^[3]。Fibroscan利用瞬时弹性成像技术测量肝脏硬度(Liver stiffness Measurement, LSM),进而评估肝纤维化程度,是一种简单、快速、无创、无痛、客观的定量检测方法^[4-5]。透明质酸(Hyalurovnic acid, HA)、Ⅲ型胶原(Procollagen type III, PC III)、Ⅳ型胶原(Collage Type IV, CIV)为临床常用肝纤维化标志物。既往研究证实,Fibroscan弹性值(Fibroscan, FS)联合肝纤维化标志物对肝硬化早期诊断具有较高临床价值^[6-7]。基于此,本研究尝试探讨FS与肝纤维化标志物在肝硬化患者中的关系及预后预测价值,旨在为临床提供数据支持。报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取本院2016年8月至2019年7月肝硬化患者128例作为研究对象,根据肝功能分级评分分为A级,男29例,女15例,年龄18~68岁,平均年龄(40.27±8.25)岁,病因:乙肝31例,酒精性10例,丙肝4例;B级男34例,女18例,年龄18~70岁,平均年龄(41.09±9.30)岁,病因:乙肝36例,酒精性11例,丙肝5例;C级男21例,女11例,年龄18~73岁,平均年龄(41.52±9.04)岁,病因:乙肝23例,酒精性6例,丙肝3例。另选取同期健康体检者120例作为对照组男78例,女42例,年龄18~77岁,平均年龄(41.91±10.24)岁。CTP 5~6分为早期肝硬化,7~9分为中期肝硬化,≥10分为晚期肝硬化。

肝硬化患者均经临床、实验室、B超等相关检查确诊,且符合日本胃肠病协会(JSGE)循证临床实践指南中相关诊断标准^[8]。排除标准:合并其他嗜肝病毒、人类疱疹病毒、巨细胞病毒、HIV感染;合并脂肪肝、自身免疫性肝炎、原发性肝癌。4组性别、年龄比较,差异无统计学意义($P>0.05$),均衡可比。

1.2 方法

①FS值测定:T瞬时弹性扫描(Fibroscan502,法国爱科森公司)检测,选择右侧腋前线至腋中线第7、8、9肋间为检测区域,连续检测,成功检测10次,取中位数为最终结果,以弹性值Kpa表示,要求成功率≥60%,偏差值<中位数1/3。②肝纤维化标志物测定:空腹抽取外周静脉血5 mL,离心(半径8 cm,3 500 r/min,9 min),取血清,HA、PC III、CIV采用固相放射免疫法测定,试剂盒购自山东国康生物科技有限公司。

1.3 观察指标

①4组FS、肝纤维化标志物(HA、PC III、CIV)水平。②FS、肝纤维化标志物(HA、PC III、CIV)与肝硬化分期的关系。③FS与肝纤维化标志物(HA、PC III、CIV)相关性。④肝硬化患者生存者与死亡者FS、肝纤维化标志物(HA、PC III、CIV)水平。⑤FS、血清肝纤维化标志物(HA、PC III、CIV)对肝硬化患者死亡的预测价值。⑥肝硬化患者生存曲线分析。

1.4 统计学处理

采用SPSS 21.0统计分析软件,符合正态分布的计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用 t 检验,多组间比较用单因素方差分析,计数资料以 n (%)表示,两组间比较采用 χ^2 检验。Logistic回归分析FS、血清HA、PC III、CIV与肝硬化分期的相

关性; Pearson 相关性分析 FS 与血清 HA、PC III、CIV 的相关性; ROC 曲线分析死亡预测价值; Kaplan-Meier 生存曲线分析 FS、血清 HA、PC III、CIV 与患者生存率的关系, 采用 Log-Rank 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 四组 FS、肝纤维化标志物水平

四组 FS、血清 HA、PC III、CIV 相比, 差异有统

计学意义(P<0.05); C 级 FS、血清 HA、PC III、CIV>B 级>A 级>健康对照组差异有统计学意义(P<0.05), 见表 1。

2.2 FS、肝纤维化标志物与肝硬化分期的关系

Logistic 回归分析, FS、血清 HA、PC III、CIV 与肝硬化分期具有显著相关性(P<0.05), 见表 2。

2.3 FS 与肝纤维化标志物相关性

Pearson 相关性分析, FS 与血清 HA、PC III、CIV 呈正相关(r=0.402、0.380、0.437, P<0.05), 见图 1。

表 1 四组 FS、肝纤维化标志物水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of four groups of FS and liver fibrosis marker levels ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | n | FS (kPa) | HA (ng/mL) | PC III (μ g/L) | CIV (μ g/L) |
|-------|-----|------------------|--------------------|---------------------|------------------|
| 健康对照组 | 120 | 11.18 \pm 3.06 | 37.01 \pm 10.14 | 72.65 \pm 16.49 | 11.18 \pm 3.17 |
| A 级 | 44 | 20.09 \pm 4.31 | 209.46 \pm 57.02 | 157.61 \pm 37.74 | 17.73 \pm 4.11 |
| B 级 | 52 | 26.37 \pm 6.02 | 350.55 \pm 68.23 | 266.10 \pm 70.05 | 21.22 \pm 7.03 |
| C 级 | 32 | 33.51 \pm 6.84 | 434.67 \pm 81.19 | 344.16 \pm 76.20 | 33.53 \pm 9.25 |
| F 值 | | 264.443 | 834.359 | 401.151 | 157.400 |
| P 值 | | <0.001 | <0.001 | <0.001 | <0.001 |

表 2 FS、肝纤维化标志物与肝硬化分期的关系

Table 2 Relationship between FS, liver fibrosis markers and stage of liver cirrhosis

| 变量 | β 值 | S.E. 值 | Wald/ χ^2 值 | OR 值 | 95%CI | P 值 |
|--------|-----------|--------|------------------|-------|--------------|--------|
| FS | 1.712 | 0.603 | 8.059 | 5.539 | 3.781~8.114 | <0.001 |
| HA | 1.935 | 0.549 | 12.418 | 6.922 | 3.903~12.275 | <0.001 |
| PC III | 1.546 | 0.456 | 11.498 | 4.694 | 2.430~9.067 | <0.001 |
| CIV | 1.244 | 0.417 | 8.897 | 3.469 | 1.926~6.248 | <0.001 |

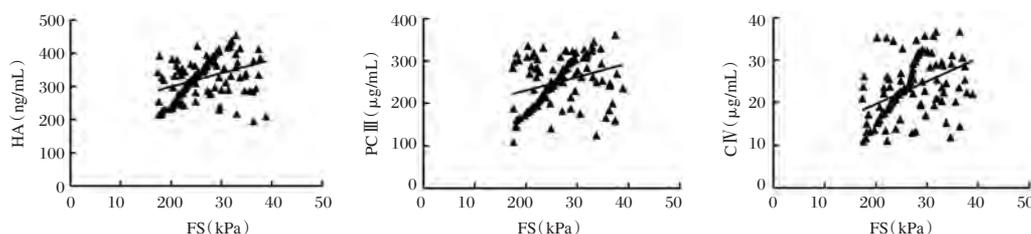


图 1 FS 与肝纤维化标志物相关性

Figure 1 Correlation between FS and liver fibrosis markers

2.4 生存者与死亡者 FS、肝纤维化标志物

随访 3 个月, 根据肝硬化患者生存状况分为生

存者、死亡者。死亡者 FS、血清 HA、PC III、CIV 高于生存者差异有统计学意义(P<0.05), 见表 3。

表 3 生存者与死亡者 FS、肝纤维化标志物比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of FS and liver fibrosis markers between survivors and dead ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | n | FS (kPa) | HA (ng/mL) | PC III (μ g/L) | CIV (μ g/L) |
|-----|-----|------------------|--------------------|---------------------|-------------------|
| 死亡者 | 16 | 34.17 \pm 8.26 | 429.16 \pm 91.17 | 352.08 \pm 80.04 | 35.04 \pm 10.16 |
| 生存者 | 112 | 24.83 \pm 6.52 | 307.93 \pm 75.31 | 233.50 \pm 66.49 | 21.39 \pm 6.23 |
| t 值 | | 5.177 | 5.863 | 6.501 | 7.491 |
| P 值 | | <0.001 | <0.001 | <0.001 | <0.001 |

2.5 FS、血清肝纤维化标志物对肝硬化患者死亡的预测价值

ROC 曲线分析显示,FS、血清HA、PCⅢ、CIV预测肝硬化患者死亡的AUC值均较高,尤以联合预测最高,联合预测时,AUC值为0.881,敏感度为75.00%,特异度96.43%。见图2、表4。

2.6 生存分析

根据FS、血清肝纤维化标志物单一预测最佳截断值分为高危者、低危者。Kaplan-Meier曲线分析,FS、血清HA、PCⅢ、CIV高危者生存率低于低危者($\chi^2=3.876、7.493、4.097、6.383,P=0.042、0.006、0.038、0.012$),见图3。

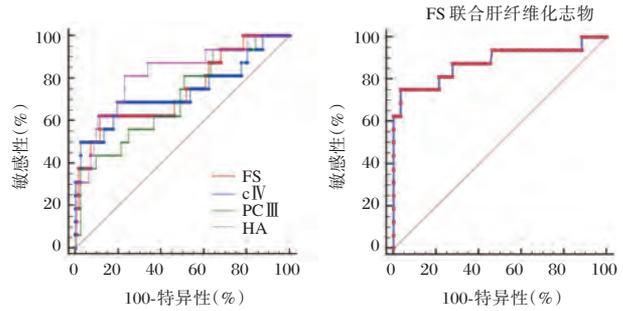


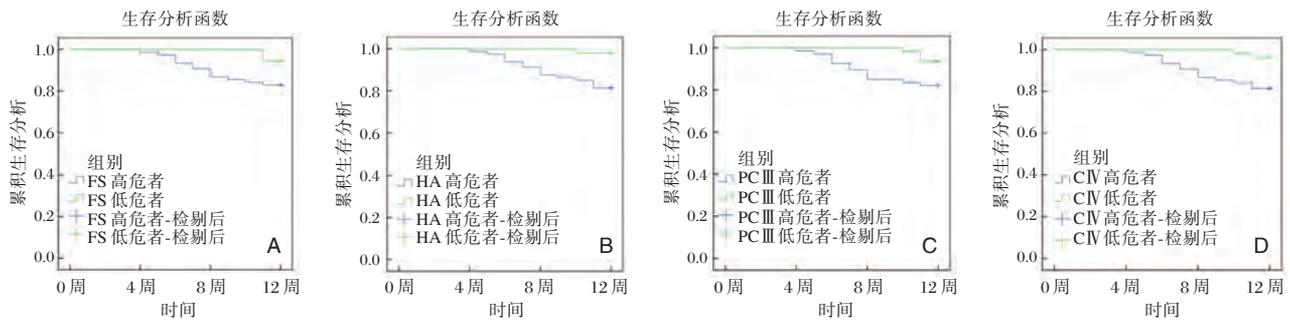
图2 FS、血清肝纤维化标志物对肝硬化患者死亡的预测价值

Figure 2 The predictive value of FS and serum liver fibrosis markers in the death of patients with liver cirrhosis

表4 FS、血清肝纤维化标志物对肝硬化患者死亡的预测价值

Table 4 Predictive value of FS and serum liver fibrosis markers in death of patients with liver cirrhosis

| 指标 | AUC | 95%CI | 截断值 | 敏感度(%) | 特异度(%) | P值 |
|-------------|-------|-------------|---------|--------|--------|--------|
| FS | 0.742 | 0.657~0.815 | >31.32 | 62.50 | 88.39 | <0.001 |
| HA | 0.820 | 0.742~0.882 | >377.16 | 81.25 | 76.79 | <0.001 |
| PCⅢ | 0.708 | 0.621~0.785 | >349.09 | 37.50 | 97.32 | <0.001 |
| CIV | 0.737 | 0.652~0.811 | >30.19 | 68.75 | 80.36 | <0.001 |
| FS联合肝纤维化标志物 | 0.881 | 0.812~0.931 | - | 75.00 | 96.43 | <0.001 |



注:A为FS高危、低危者生存曲线,B为HA高危、低危者生存曲线,C为PCⅢ高危、低危者生存曲线,D为CIV高危、低危者生存曲线。

图3 生存曲线

Figure 3 Survival curve

3 讨论

肝纤维化是各类肝损伤的共同慢性化病理学标志,肝细胞持续损伤与修复,引起肝组织结构反复破坏与重建,最终导致肝内结构改变,肝硬化形成^[9-10]。研究证实,肝脏弹性与肝组织纤维化程度有较好相关性^[11-12]。Fibroscan利用低频超声振动波在不同硬度肝组织内运行速度测定LSM,组织硬度越高,超声振动波传播速度越快,LSM值越大^[13]。研究发现,FS值对诊断非酒精性肝病及病毒性肝病相关肝纤维化与肝硬化的价值较高,可部分替代肝

活检^[14]。学者秦敏^[15]研究发现,肝硬化早期阶段就表现为FS显著升高,对肝硬化早期诊断具有重要意义。同时,多项研究显示,LSM与肝纤维化程度有良好相关性,ROC曲线分析可知,其诊断肝硬化的AUC值达0.87~0.99^[16]。本研究结果表明FS对评价肝硬化发生发展发挥重要作用。

血清直接标志物主要为细胞外基质,目前,HA、PCⅢ、CIV等血清学指标为临床应用较多的肝纤维化血清学标志物。本研究结果表明血清HA、PCⅢ、CIV与肝硬化发生发展有关。HA主要由肝间质成纤维细胞合成,肝受损引起内皮细胞数量

及功能降低,引起血HA摄取及降解障碍,导致血HA水平升高^[17]。PCⅢ是Ⅲ型胶原的前体,可有效反映Ⅲ型胶原合成代谢情况^[18]。CIV是肝损伤时最早增生的纤维,可作为反映胶原合成的指标^[19]。研究指出,肝纤维化标志物(HA、PCⅢ、CIV)虽不是特异性检测项目,但也可综合反映肝硬化在不同时段中功能损伤与纤维化活动,胶原代谢情况,基底膜形成、破坏及转化信号^[20]。且研究显示,LSM不同分期与血清肝纤维化系列指标(PCⅢ、HA、CIV、LN)具有高度一致性,对评估肝纤维化程度准确性较高,且与肝硬化程度密切相关^[21]。本研究表明FS与肝纤维化标志物(HA、PCⅢ、CIV)均可作为肝纤维化及肝硬化诊断及病情评估指标。此外,本研究结果表明FS与血清HA、PCⅢ、CIV联合检测可提高肝硬化患者预后预测价值,为早期干预提供支持。

综上所述,FS、血清肝纤维化标志物(HA、PCⅢ、CIV)与肝硬化发生、发展有关,联合检测可提高预后预测价值,为病情监测、疗效评估提供依据。

参考文献

- [1] Crossan C, Tsochatzis E, Longworth L, et al. Cost-effectiveness of non-invasive methods for assessment and monitoring of liver fibrosis and cirrhosis in patients with chronic liver disease: systematic review and economic evaluation [J]. *Health Technol Assess*, 2015, 19(9): 1-410.
- [2] Beste LA, Leipertz SL, Green PK, et al. Trends in burden of cirrhosis and hepatocellular carcinoma by underlying liver disease in US veterans, 2001-2013 [J]. *Gastroenterology*, 2015, 149(6): 1471-1482.e5.
- [3] 曹欣,关玉娟,余卫华. Fibroscan对慢性乙型肝炎肝脏纤维化的诊断研究[J]. *热带医学杂志*, 2014, 14(6): 779-781.
- [4] 孔梦娟,周贤,罗小庆,等. ARFI与Fibroscan评估HCV肝纤维化诊断效能的Meta分析[J]. *浙江医学*, 2019, 41(8): 795-801.
- [5] 董常峰,冯程,黄婷,等. 弹性成像联合血生化指标评估慢性乙型肝炎肝纤维化程度[J]. *中国超声医学杂志*, 2018, 34(7): 623-626.
- [6] 丁荣蓉,陆伟,王雁冰,等. 采用瞬时弹性成像技术和血清标志物预测丙氨酸转氨酶轻度升高的慢性乙型肝炎患者肝纤维化程度[J]. *中华传染病杂志*, 2019, 37(2): 72-76.
- [7] 周萍,王聪,王晓琴,等. 乙肝患者血清标志物与肝纤维化血清学指标的相关性分析[J]. *现代生物医学进展*, 2017, 17(7): 1350-1352.
- [8] Fukui H, Saito H, Ueno Y, et al. Evidence-based clinical practice guidelines for liver cirrhosis 2015 [J]. *J Gastroenterol*, 2016, 51(7): 629-650.
- [9] Bosch A, Dumortier Maucort-Boulch D, et al. Preventive administration of UDCA after liver transplantation for primary biliary cirrhosis is associated with a lower risk of disease recurrence [J]. *J Hepatol*, 2015, 63(6): 1449-1458.
- [10] An J, Ju HS, Kim SO, et al. Response to Letter Regarding Article, "Prevalence and Prediction of Coronary Artery Disease in Patients With Liver Cirrhosis: A Registry - Based Matched Case - Control Study" [J]. *Circulation*, 2015, 132(2): e19.
- [11] 付懿铭,纪冬,熊艺茹,等. 肝脏弹性检测对非酒精性脂肪性肝炎肝纤维化分期的诊断效能[J]. *解放军医学杂志*, 2019, 44(08): 671-675.
- [12] 刘加群,王守云,曹立华,等. 肝脏瞬时弹性成像对代偿期肝硬化患者恩替卡韦治疗前后肝纤维化程度的评价[J]. *山东医药*, 2017, 57(41): 47-49.
- [13] 沈崔琴,李万斌,雷洁雯,等. γ -谷氨酰转肽酶与血小板比率对慢性乙型肝炎肝纤维化的诊断效能[J]. *第二军医大学学报*, 2019, 40(9): 984-988.
- [14] 张亚飞,叶珺,谢琴秀,等. 不同医院无创性肝纤维化指标预测慢性乙型肝炎患者肝纤维化效能差异分析[J]. *实用肝脏病杂志*, 2019, 22(4): 510-513.
- [15] 秦敏. 慢性乙型肝炎肝硬化FibroScan测量结果与肝穿刺病理的关系[J]. *肝脏*, 2019, 24(6): 674-676.
- [16] 陈勇良,李振燕,董春娇,等. FibroTouch联合血清学指标诊断肝纤维化分期相关性分析[J]. *河北医科大学学报*, 2019, 40(5): 607-610.
- [17] Choudhury, Sharma MK, Sharma BC, et al. Etiology, time frame and spectrum of decompensation in 6236 patients of cirrhosis liver across Asia: a multinational study from APASL ACLF Research Consortium (AARC) [J]. *J Hepatol*, 2017, 66(1): S86-S87.
- [18] 俞晓春,胡旭姣,章家青,等. HA、IV-C、APRI及Fib-4对乙型肝炎后肝纤维化的诊断效果[J]. *检验医学*, 2019, 34(6): 539-542.
- [19] 么丽丽,闫宇,赵东杰,等. 脂肪肝患者肝功能与肝纤维化血清学指标的相关分析[J]. *中国综合临床*, 2018, 34(5): 425-428.
- [20] 姚玉梅,张莉莎,邓开盛,等. 瞬时弹性扫描弹性值和血清学标志物与乙肝患者肝纤维化的相关性[J]. *贵州医科大学学报*, 2018, 43(11): 1315-1317, 1323.

MRI在肝癌合并肝硬化经皮穿刺射频消融效果及术后复发中的预测价值

孟兆伟* 王洪涛 管唯唯

[摘要] **目的** 探讨磁共振技术(MRI)在肝癌合并肝硬化经皮穿刺射频消融效果及术后复发中的预测价值。**方法** 选取2017年9月至2019年10月本院收治的162例行经皮穿刺射频消融肝癌合并肝硬化患者,根据疗效不同分为有效组($n=127$)、无效组($n=35$)。比较两组及复发、未复发患者MRI参数[表观弥散系数(ADC)、真实扩散系数(D)值、灌注分数(f)、峰度、熵值、不均匀度],采用接收者操作特征(ROC)曲线及ROC下面积(AUC)分析MRI各参数预测疗效、复发的价值。**结果** 有效组ADC、D值均高于无效组,熵值低于无效组($P<0.05$);ADC+D值+熵值预测疗效的AUC为0.895高于ADC的0.789,D值的0.816,熵值的0.803($P<0.05$);复发患者ADC、D值低于未复发患者,熵值高于未复发患者($P<0.05$);ADC+D值+熵值预测复发的AUC为0.842,高于ADC的0.765,D值的0.795,熵值的0.705($P<0.05$)。**结论** 肝癌合并肝硬化经皮穿刺射频消融有效患者与术后未复发患者ADC、D值较高,熵值较低,采用MRI检测ADC、D值、熵值,可预测疗效及术后复发情况,为临床提供重要的参考信息。

[关键词] MRI; 肝癌; 肝硬化; 经皮穿刺射频消融; 表观弥散系数; 复发; ROC

Predictive value of MRI in percutaneous puncture radiofrequency ablation of liver cancer with liver cirrhosis and its recurrence

MENG Zhaowei, WANG Hongtao, GUAN Weiwei

(Department of radiology, xin-li cheng'an iron and steel general hospital, Anyang, Henan, China, 455004)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the predictive value of magnetic resonance technique (MRI) in the percutaneous puncture radiofrequency ablation of liver cancer with cirrhosis and its recurrence. **Methods** A total of 162 patients with liver cirrhosis and liver cancer who underwent percutaneous radiofrequency ablation in our hospital from September 2017 to October 2019 were selected and divided into the effective group ($n=127$) and the ineffective group ($n=35$) according to different effects. By comparing the MRI parameters [apparent diffusion coefficient (ADC), true diffusion coefficient (D) value, perfusion fraction (f), kurtosis, entropy value, unevenness] of the two groups and the relapsed and the non-relapsed patients, the receiver operating characteristic (ROC) curve and the area under the ROC (AUC) were used to analyze the MRI parameters to predict the efficacy and recurrence value. **Results** The ADC and D values of the effective group were higher than those of the invalid group, and the entropy value was lower than the invalid group ($P<0.05$); the AUC of ADC+D value+entropy value to predict the therapeutic effect was 0.895 higher than 0.789 of ADC, 0.816 of D value, and 0.803 of entropy value ($P<0.05$); the ADC and D values of relapsed patients were lower than those of non-relapsed patients, and the entropy values were higher than those of non-relapsed patients ($P<0.05$); the predicted AUC of ADC+D value+entropy value was 0.842, which was higher than 0.765 of ADC, 0.795 of D value, and 0.705 of entropy value ($P<0.05$). **Conclusion** The ADC and D values

基金项目:河南省科技厅重点项目(201704025X)

作者单位:新里程安钢总医院放射科,河南,安阳455004

*通信作者:孟兆伟, E-mail: mzw3959@163.com

are higher in patients with hepatocellular carcinoma complicated with liver cirrhosis and percutaneous radiofrequency ablation and those who have not relapsed after surgery are higher, and the entropy values are lower, the use of MRI to detect ADC, D value, and entropy value can predict the curative effect and postoperative recurrence and provide important reference information for the clinic.

[KEY WORDS] MRI; Liver cancer; Liver cirrhosis; Percutaneous radiofrequency ablation; Apparent diffusion coefficient; Recurrence; ROC

肝癌是全球范围内常见的一种消化系统恶性肿瘤,是肝硬化患者的首位死亡原因^[1]。目前手术切除是治疗肝癌的重要手段,但对合并肝硬化患者,受肝脏储备功能、病灶大小等因素影响和制约,存在低切除率、高术后复发率的问题,所以多倾向于非手术疗法^[2-3]。大量研究证实,肝癌经皮穿刺射频消融术与外科手术切除疗效相当,成为合并肝硬化肝癌患者的一种有效策略^[4-5]。但长期临床工作经验发现,不同个体疗效、术后复发情况异质性较大,因此早期评估并预测经皮穿刺射频消融效果及术后复发意义重大。磁共振技术(Magnetic Resonance Imaging, MRI)具有成像参数多、成像序列多、软组织分辨率高等优点,可用于局部疗效的评价,但现阶段关于MRI在肝癌合并肝硬化经皮穿刺射频消融效果及术后复发中预测的报道较少,数据量化情况及价值仍有待探讨^[6]。基于此本研究将分析MRI的应用价值,为临床决策、治疗等提供参考,报告如下。

1 对象和方法

1.1 研究对象

选取2017年9月至2019年10月本院收治的162例行经皮穿刺射频消融肝癌合并肝硬化患者进行回顾性研究。其中男84例,女78例,根据疗效不同分为有效组($n=127$)、无效组($n=35$)。

纳入标准:①符合肝癌诊断标准^[7];合并肝硬化;②行经皮穿刺射频消融术患者;③肝肿瘤数目1~3个且直径 <3 cm或单个直径 ≤ 5 cm;④肝功能Child-pugh分级为A或B级;⑤肿瘤部位离胆囊或门静脉主干 >1 cm;⑥临床资料完整。排除标准:①肺、肾、心功能严重不全者;②合并其他系统原发性恶性肿瘤者;③门静脉癌栓、动静脉瘘者;④认知功能异常;⑤有精神病史者。

1.2 方法

1.2.1 MRI检查

均于经皮穿刺射频消融术前进行检查。检查

前对患者进行呼吸训练,呼气末屏住呼吸,采用Philips Healthcare公司the Netherlands 3.0 T Ingenia MRI成像系统预32通道体部相控阵线圈。采用纽约大学开发的第三方MRI后处理软件FireVoxel进行定量分析,全容积画法手动勾画感兴趣区,在轴位图像病灶连续层面上对病灶边缘进行手动勾画,确保包含整个病灶体积,记录表观弥散系数(apparent diffusion coefficient, ADC)、真实扩散系数(D)值、灌注分数(f)、峰度、熵值、不均匀度。

1.2.2 疗效评估

参照实体瘤疗效评判标准^[8],于经皮穿刺射频消融术后评价。

1.2.3 复发的判断标准

观察时间定为经皮穿刺射频消融术后半年,病灶完全消融之后出现新病灶或病灶消融后又增大为复发组,否则为未复发。

1.3 统计学方法

采用SPSS 22.0软件进行数据处理,计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,用 t 检验,计数资料用 $n(\%)$ 表示,用 χ^2 检验,采用接收者操作特征(Receiver operating characteristic, ROC)曲线及ROC下面积(Area under the curve, AUC)分析MRI参数预测疗效、复发的价值。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组一般资料比较

两组性别、年龄、体质量指数、新辅助治疗、肿瘤数量、肿瘤直径、射频消融治疗周期、肝功能Child-pugh分级、甲胎蛋白(alpha-fetoprotein, AFP)、合并疾病等资料均衡可比($P > 0.05$),见表1。

2.2 两组MRI参数比较

有效组ADC、D值均高于无效组,熵值低于无效组($P < 0.05$)。见表2。

2.3 分析ADC、D值、熵值预测疗效的价值

ADC预测疗效的AUC为0.789(95% CI: 0.718~0.849), cut-off值为 $\leq 1.12 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$,敏感度

表1 两组临床资料对比 [n(%), ($\bar{x} \pm s$)]

Table 1 Comparison of clinical data between the 2 groups [n(%), ($\bar{x} \pm s$)]

| 资料 | 有效组 (n=127) | 无效组 (n=35) | t/ χ^2 值 | P值 |
|---------------------------|----------------|---------------|---------------|-------|
| 年龄 | 62.28±6.82 | 63.14±6.40 | 0.669 | 0.504 |
| 性别(男/女) | 65/62 | 19/16 | 0.106 | 0.745 |
| 体质量指数(kg/m ²) | 22.30±1.96 | 22.26±1.87 | 0.108 | 0.914 |
| 新辅助治疗 | 30(23.62) | 7(20.00) | 0.204 | 0.651 |
| 肿瘤数量 | | | | |
| 1个 | 25(19.69) | 6(17.14) | | |
| 2个 | 60(47.24) | 13(37.14) | 1.939 | 0.379 |
| 3个 | 42(33.07) | 16(45.71) | | |
| 肿瘤直径(cm) | 3.51±0.31 | 3.46±0.33 | 0.833 | 0.406 |
| 射频消融治疗 周期(个) | 3.08±0.84 | 3.11±0.76 | 0.191 | 0.849 |
| Child-pugh分级 | | | | |
| A级 | 78(61.42) | 18(51.43) | | |
| B级 | 49(38.58) | 17(48.57) | 1.134 | 0.287 |
| AFP | | | | |
| ≥200 μg/L | 64(50.39) | 20(57.14) | | |
| <200 μg/L | 63(49.61) | 15(42.86) | 0.501 | 0.479 |
| 合并疾病 | | | | |
| 高脂血症 | 14(11.02) | 4(11.43) | 0.005 | 0.946 |
| 糖尿病 | 8(6.30) | 2(5.71) | 0.073 | 0.788 |
| 心脏病 | 3(2.36) | 0(0) | 0.044 | 0.834 |
| 高血压 | 6(4.72) | 1(2.86) | 0.000 | 0.991 |

为54.29%,特异度为86.61%($P<0.05$);D值预测疗效的AUC为0.816(95%CI:0.743~0.872),cut-off值为 $\leq 1.32 \times 10^{-3}$ mm²/s,敏感度为71.43%,特异度为82.68%($P<0.05$);熵值预测疗效的AUC为0.803(95%CI:0.733~0.861),cut-off值为 >4.39 ,敏感度为77.14%,特异度为71.65%($P<0.05$);ADC+D值+熵值预测疗效的AUC为0.895(95%CI:0.837~0.937),敏感度为74.29%,特异度为90.55%($P<0.05$)。见图1。

2.4 比较复发与未复发患者MRI参数

复发患者ADC、D值低于未复发患者,熵值高于未复发患者($P<0.05$)。见表3。

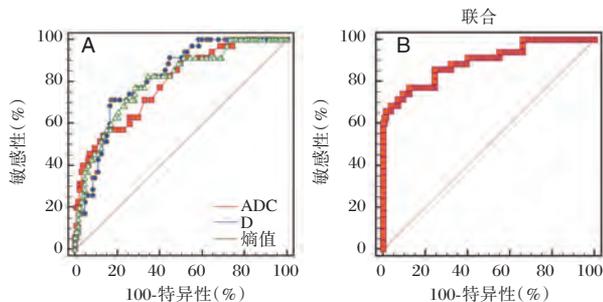
2.5 分析ADC、D值、熵值预测复发的价值

ADC预测复发的AUC为0.765(95%CI:0.692~0.828),cut-off值为 $\leq 1.27 \times 10^{-3}$ mm²/s,敏感度为86.67%,特异度为59.85%($P<0.05$);D值预测复发的AUC为0.795(95%CI:0.725~0.854),cut-off值为 ≤ 1.43 mm²/s,敏感度为93.33%,特异度为56.82%($P<0.05$);熵值预测复发的AUC为0.705(95%CI:0.629~0.774),cut-off值为 >4.45 ,敏感度为56.67%,特异度为78.03%($P<0.05$);ADC+D值+熵值预测复发的AUC为0.842(95%CI:0.776~0.894),敏感度为80.00%,特异度为78.03%($P<0.05$)。见图2。

表2 两组MRI参数比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of 2 sets of MRI parameters ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | n | ADC($\times 10^{-3}$ mm ² /s) | D($\times 10^{-3}$ mm ² /s) | f值(%) | 峰度 | 熵值 | 不均匀度 |
|-----|-----|---|---|-------------|-----------|-----------|-----------|
| 复发 | 30 | 1.02±0.15 | 1.15±0.22 | 49.52±10.78 | 1.96±0.30 | 4.71±0.31 | 0.22±0.05 |
| 未复发 | 132 | 1.30±0.14 | 1.51±0.24 | 50.06±10.05 | 2.00±0.28 | 4.23±0.27 | 0.21±0.04 |
| t值 | | 9.758 | 7.526 | 0.262 | 0.697 | 8.547 | 0.178 |
| P值 | | <0.001 | <0.001 | 0.794 | 0.487 | <0.001 | 0.241 |



注:A为ADC、D值、熵值单一预测疗效的ROC曲线;B为ADC、D值、熵值联合预测疗效的ROC曲线。

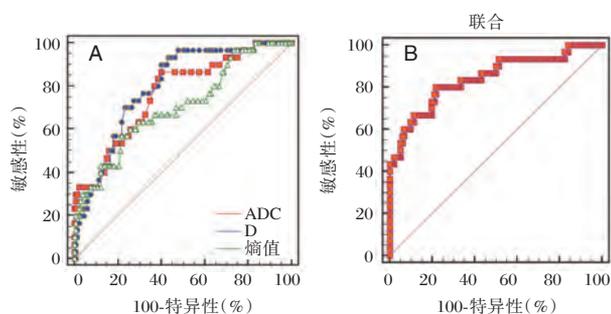
图1 ADC、D值、熵值单一及联合预测疗效的ROC曲线
Figure 1 The ROC curve of ADC, D value, entropy value single and joint predictive effect

3 讨论

DWI序列能从分子水平反映组织内水分子的扩散运动^[9]。本研究显示,有效患者ADC值高于无效患者,可能有助于疗效的预测。林静等^[10]报道显示,肝癌经导管动脉化疗栓塞联合射频消融后,应答者ADC值比未应答者高,且经导管动脉化疗栓塞后,ADC值较术前升高明显者较升高不明显或降低患者无进展生存期更长^[11],均证实ADC在疗效评估中具有应用价值。经皮穿刺射频消融术后,消融区细胞发生不同程度变性坏死,细胞组织间水分子增多,扩散速率增快,对应扩散图

表3 比较复发与未复发患者MRI参数 ($\bar{x} \pm s$)Table 3 Comparison of MRI parameters between relapsed and non-relapsed patients ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | n | ADC($\times 10^{-3}$ mm ² /s) | D($\times 10^{-3}$ mm ² /s) | f值(%) | 峰度 | 熵值 | 不均匀度 |
|-----|-----|---|---|-------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 有效组 | 127 | 1.31 \pm 0.16 | 1.50 \pm 0.21 | 49.86 \pm 10.25 | 1.98 \pm 0.32 | 4.24 \pm 0.30 | 0.21 \pm 0.06 |
| 无效组 | 35 | 1.02 \pm 0.14 | 1.22 \pm 0.23 | 50.34 \pm 11.73 | 2.02 \pm 0.29 | 4.62 \pm 0.35 | 0.22 \pm 0.05 |
| t值 | | 9.740 | 6.841 | 0.238 | 0.668 | 6.394 | 0.903 |
| P值 | | <0.001 | <0.001 | 0.813 | 0.505 | <0.001 | 0.368 |



注:A为ADC、D值、熵值单一预测复发的ROC曲线;B为ADC、D值、熵值联合预测复发的ROC曲线。

图2 ADC、D值、熵值单一及联合预测复发的ROC曲线

Figure 2 ROC curve of ADC, D value, entropy value single and joint prediction of recurrence

像上低信号,ADC值增大,故能通过比较肿瘤内部ADC值变化反应其内部变化。李宏翔等^[12]研究发现,ADC是微血管侵犯的独立影响因素,佐证了ADC可反映肝癌细胞的侵袭情况,与肝癌复发有关。

毛细血管网中的血流灌注能够增加DWI信号衰减,使DWI反映的细胞生物学信息受到限制^[13]。IVIM-DWI应用双指数模型,可同时提供水分子的纯的扩散运动的信息外,还可提供灌注相关信息,反映组织的微观结构及微循环情况,为肿瘤特点、肿瘤后治疗反应提供更多相关信息^[14]。本研究显示,有效患者D值均高于无效患者,复发患者D值低于未复发患者,检测D值可评估疗效、复发情况。Yang SH等^[15]认为,IVIM-DWI可用来评估索拉菲尼治疗肝癌的疗效,治疗有效患者在治疗前D值高于无效患者,本研究观点与之相似。D称真性扩散系数,由组织内水分子的无规则运动产生,和ADC相比,与正常组织或组织病变的特征有更紧密的关系,因此预测价值更高。

纹理分析可评估肿瘤的异质性,具有较高的内部异质性的肿瘤其预后较差,这是内在侵袭性生物学或治疗抗性造成的^[16]。本研究常规T2WI图像的灰度值通过纹理特征技术转化为纹理信息,在不增加MRI增强扫描的情况下,获取肉眼无法识别的纹

理特征信息,其中峰度能反映像素分布是否在均值附近集中,峰度值越小,像素差异度越小。熵值是纹理分析中常用的一个定理参数,反映了感兴趣区图像的复杂程度,具有无创性量化肿瘤异质性的优势,这是通过简单的视觉分析无法获得的^[17]。Zhou W等^[18]报道以MRI检查图像为基础进行纹理特征分析发现,其能反映出肝癌细胞的生物学侵袭性。熵值越高,提示图像内部体素越不均匀,肿瘤异质性越高,复杂度越高,复发的概率越高。本研究不足之处在于,MRI检查时,感兴趣区为手动勾画,可能存在测量误差,有待后续的进一步探讨。

参考文献

- [1] 张帅,朱佳,吴相柏,等. 肝癌组织LncRNA TINCR和ANRIL表达水平及其与患者预后的关系[J]. 热带医学杂志, 2019, 19(1): 55-59.
- [2] 陈明,曹洋. 抗乙型肝炎病毒对肝癌TACE术后复发转移的临床疗效及免疫功能研究[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2019, 11(5): 396-400.
- [3] 陈孝平,项帅,黄志勇. 肝癌合并肝硬化肝切除范围的探讨[J]. 中华消化外科杂志, 2019, 18(4): 303-306.
- [4] 梁勇,廖波,李春林,等. 腹腔镜下肝癌切除术与射频消融术治疗肝细胞癌的疗效观察[J]. 中国肿瘤临床与康复, 2019, 26(06): 671-674.
- [5] 刘文斌,马金良,荚卫东,等. 腹腔镜超声与开腹超声引导肝癌微波消融的对比分析[J]. 肝胆外科杂志, 2019, 27(4): 249-253.
- [6] Nishio N, Kido A, Kurata Y, et al. Investigation of clinical utility of contrast-enhanced MRI in the diagnosis of ectopic pregnancy[J]. Clin Radiol, 2020, 75(7): 543-551.
- [7] 中华人民共和国卫生和计划生育委员会医政医管局. 原发性肝癌诊疗规范(2017年版)[J]. 中华消化外科杂志, 2017, 16(7): 705-720.
- [8] 张百红,岳红云. 实体瘤疗效评价标准简介[J]. 国际肿瘤学杂志, 2016, 43(11): 845-847.
- [9] Gandhi D, Sharma P, Garg G, et al. Intrahepatic splenosis demonstrated by diffusion weighted MRI with histologic confirmation[J]. Radiol Case Rep, 2020, 15(5): 602-606.
- [10] 林静,张贤龙,游建,等. 磁共振成像对肝细胞癌患者经导管动脉化疗栓塞联合射频消融的疗效及预后评估价值[J]. 肝脏, 2018, 23(6): 522-524. (下转第798页)

IMT联合血清Lp-PLA2在诊断动脉粥样硬化脑梗死与预测斑块稳定性的价值

何丹青^{1*} 邱文倩¹ 牛居辉²

[摘要] **目的** 探究颈动脉内中膜厚度(IMT)联合血清脂蛋白相关磷脂酶A2(Lp-PLA2)在诊断动脉粥样硬化脑梗死与预测斑块稳定性的价值。**方法** 选取本院2017年1月至2019年10月动脉粥样硬化脑梗死患者117例作为研究组,另选取同期健康体检者112例作为对照组。均进行颈动脉超声检查、血清Lp-PLA2检测,比较两组颈动脉内中膜厚度(IMT)、血清Lp-PLA2水平,采用受试者工作(ROC)曲线探究IMT、血清Lp-PLA2诊断动脉粥样硬化脑梗死的价值,对比不同稳定性斑块患者IMT、血清Lp-PLA2水平,探究二者之间关系及与斑块稳定性的相关性。**结果** 研究组IMT、血清Lp-PLA2高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);IMT、血清Lp-PLA2联合诊断动脉粥样硬化脑梗死的曲线下面积(AUC)为0.889,大于二者单独诊断,联合诊断的最佳敏感度为76.07%,特异度为90.18%;不稳定斑块患者IMT、血清Lp-PLA2水平>稳定斑块患者>无斑块患者,差异有统计学意义($P<0.05$);动脉粥样硬化脑梗死患者的斑块稳定性与IMT、血清Lp-PLA2水平显著相关,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** IMT及血清Lp-PLA2表达有助于动脉粥样硬化脑梗死的诊断,且是颈动脉不稳定粥样硬化斑块发生的预测因素,可为临床诊断动脉粥样硬化脑梗死患者及制定治疗方案提供重要参考依据。

[关键词] 动脉粥样硬化脑梗死;颈动脉超声;颈动脉内中膜厚度;脂蛋白相关磷脂酶A2;诊断;斑块稳定性

Value of IMF combined with serum Lp-PLA2 in diagnosis of atherosclerotic cerebral infarction and prediction of plaque stability

HE Danqing^{1*}, QIU Wenqian¹, NIU Juhui²

(Department of ultrasound, the first affiliated hospital of anhui medical university, Hefei, Anhui, China, 230000; Department of anesthesiology, the first people's hospital of wuhu city, Wuhu, Anhui, China, 241000)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the value of carotid intima-media thickness (IMT) combined with serum lipoprotein-associated phospholipase A2 (Lp-PLA2) in the diagnosis of atherosclerotic cerebral infarction and the prediction of plaque stability. **Methods** A total of 117 patients with atherosclerotic cerebral infarction from January 2017 to October 2019 in our hospital were selected as the research group, and 112 healthy patients during the same period were selected as the control group. Carotid artery ultrasound examination and serum Lp-PLA2 detection were performed to compare the carotid intima-media thickness (IMT) and serum Lp-PLA2 levels of the two groups. The receiver operating characteristic (ROC) curve was used to explore the value of IMT and serum Lp-PLA2 in the diagnosis of atherosclerotic cerebral infarction, the levels of IMT and serum Lp-PLA2 in patients with different stable plaques were compared, and the relationship between them and

基金项目:芜湖市科技计划项目(2016hm15)

作者单位:1.安徽医科大学第一附属医院超声科,安徽,合肥230000

2.芜湖市第一人民医院麻醉科,安徽,芜湖241000

*通信作者:何丹青, E-mail:hedanqing82@163.com

their correlation with plaque stability were explored. **Results** The IMT and serum Lp-PLA2 in the research group were higher than those in the control group, the difference was statistically significant ($P<0.05$). The area under the curve (AUC) of the combined diagnosis of IMT and serum Lp-PLA2 for the diagnosis of atherosclerotic cerebral infarction was 0.889, which was larger than the two diagnosed alone, the optimal sensitivity of the combined diagnosis was 76.07%, and the specificity was 90.18%; IMT and serum Lp-PLA2 levels in patients with unstable plaque > patients with stable plaque > patients without plaque, the difference was statistically significant ($P<0.05$). The plaque stability of patients with atherosclerotic cerebral infarction was significantly correlated with IMT and serum Lp-PLA2 levels ($P<0.05$). **Conclusion** IMT and serum Lp-PLA2 expression are helpful for the diagnosis of atherosclerotic cerebral infarction, and are predictive factors for the occurrence of unstable carotid atherosclerotic plaques, which can provide an important reference for the clinical diagnosis of patients with atherosclerotic cerebral infarction and the development of treatment plans.

[KEY WORDS] Atherosclerotic cerebral infarction; Carotid ultrasound; Carotid intima - media thickness; Lipoprotein-associated phospholipase A2; Diagnosis; Plaque stability

脑梗死为临床最常见脑血管疾病之一,主要由脑部血液供应不足致使脑组织发生缺血、缺氧性坏死引起,其发生发展与动脉粥样硬化密切相关^[1-2]。近年研究发现,颈动脉不稳定粥样硬化斑块是引起缺血性脑血管事件的潜在危险因素,可增加脑梗死发生风险^[3]。颈动脉超声一直是诊断动脉粥样硬化脑梗死的重要方式,具有简便、经济、无创等优势,但无法呈现动脉粥样硬化的病理改变^[4]。相关研究指出,脂蛋白相关磷脂酶 A2(Lipoprotein-associated phospholipase A2, Lp-PLA2)直接参与动脉粥样硬化早期炎症反应,可能作为临床判断动脉粥样硬化斑块发生和发展的生物标志物^[5]。本研究尝试探究颈动脉超声参数联合血清 Lp-PLA2 在诊断动脉粥样硬化脑梗死与预测斑块稳定性的价值,旨在为临床提供参考依据。报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取本院 2017 年 1 月至 2019 年 10 月动脉粥样硬化脑梗死患者 117 例作为研究组,另选取同期健康体检者 112 例作为对照组。对比两组性别、年龄、体重、合并症、大量吸烟情况,差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。见表 1。

纳入标准:①符合动脉粥样硬化脑梗死相关诊断标准^[6];②首次发病;③发病至入院时间 <3 d;④无颅内感染;⑤发病前 7 d 内未使用抗血小板药物、抗炎药物治疗;⑥患者及家属知晓本研究,已签署同意书;⑦全身体检结果均无明显异常;排除标准:①脑出血患者;②全身感染性疾病患者;③精神疾病患者;④凝血功能障碍、白血病患者;⑤恶性肿

表 1 两组一般资料比较 [$n(\%)$, ($\bar{x}\pm s$)]

Table 1 Comparison of two groups of general data [$n(\%)$, ($\bar{x}\pm s$)]

| 项目 | 研究组 ($n=117$) | 对照组 ($n=112$) | t/χ^2 值 | P 值 |
|---------|--------------------|--------------------|--------------|-------|
| 性别(女/男) | 50/67 | 48/64 | 0.000 | 0.985 |
| 年龄(岁) | 63.18 \pm 5.56 | 61.87 \pm 5.93 | 1.725 | 0.086 |
| 体重(kg) | 65.29 \pm 9.14 | 63.91 \pm 8.95 | 1.154 | 0.250 |
| 合并症(例) | | | | |
| 冠心病 | 35(29.91) | 30(26.79) | 0.276 | 0.600 |
| 糖尿病 | 29(24.79) | 24(21.43) | 0.363 | 0.547 |
| 大量吸烟(例) | | | 0.427 | 0.514 |
| 是 | 52(44.44) | 45(40.18) | | |
| 否 | 65(55.56) | 67(59.82) | | |

瘤患者;⑥严重心肺肝肾功能障碍者;⑦不能配合完成研究者;⑧有心脑血管疾病史者。

1.2 方法

颈动脉超声检查方法:彩色多普勒超声系统(德国西门子公司, ACUSON X150 型),探头频率 8~10 MHz,检查部位为患者双侧颈部血管,具体检查方法:指导患者平躺,充分显露颈部,头部偏向检查对侧,将超声探头置于胸锁乳突肌前缘或后缘,沿颈动脉行纵向、横向扫查,扫查顺序为双侧颈总动脉、颈内动脉颅外段等,检查是否存在斑块、斑块大小、斑块表面与内部回声特征,并测量总动脉分叉处近端内中膜厚度(Intima-media thickness, IMT)。IMT <1.0 mm 为正常,1.0~1.5 mm 为增厚, >1.5 mm 为动脉粥样硬化斑块形成。稳定斑块:斑块内部回声为强回声,伴或不伴有声影。不稳定斑块:内部回声为弱回声,或等回声,或内部回声不均匀。

血清 Lp-PLA2 检测方法:采集受检者入组第 2 d 空腹静脉血 3 mL,置于医用离心机(长沙湘智离心机仪器有限公司,型号:TDZ4-WS)上,以 3 000 r/min 转速离心处理 10 min,取血清,采用酶联免疫吸附试验测定血清 Lp-PLA2 水平,试剂盒购自武汉明德生物科技股份有限公司(规格:20 Test/盒,批号:2017080378)。

1.3 观察指标

①两组 IMT、血清 Lp-PLA2 水平。②探究 IMT、血清 Lp-PLA2 单独及联合诊断动脉粥样硬化脑梗死的价值。③不同稳定性斑块患者 IMT、血清 Lp-PLA2 水平。④探究 IMT 与血清 Lp-PLA2 的关系。

1.4 统计学方法

数据处理采用 SPSS 22.0 软件,计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析,通过 Logistic 分析 IMT、血清 Lp-PLA2 与斑块稳定性的关系,采用受试者工作(Receiver operating characteristic, ROC) 曲线分析诊断价值, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组 IMT、血清 Lp-PLA2 比较

研究组 IMT、血清 Lp-PLA2 水平均较对照组高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见表 2。

表 2 两组 IMT、血清 Lp-PLA2 比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of IMT and serum Lp-PLA2 between the two groups ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | <i>n</i> | IMT(mm) | Lp-PLA2($\mu\text{g/L}$) |
|------------|----------|-----------------|----------------------------|
| 研究组 | 117 | 1.17 \pm 0.24 | 56.71 \pm 6.13 |
| 对照组 | 112 | 0.64 \pm 0.15 | 40.02 \pm 5.28 |
| <i>t</i> 值 | | 19.938 | 22.033 |
| <i>P</i> 值 | | <0.001 | <0.001 |

2.2 IMT、血清 Lp-PLA2 单独诊断价值

绘制 IMT、血清 Lp-PLA2 单独诊断动脉粥样硬化脑梗死的 ROC 曲线,发现血清 Lp-PLA2 诊断的曲线下面积(Area under the curve, AUC)为 0.792 (95% CI 为 0.733~0.842),大于 IMT 的 AUC 0.752 (95% CI 为 0.691~0.806),当血清 Lp-PLA2>49.98 $\mu\text{g/L}$ 时,其诊断敏感度为 56.41%,特异度为 86.61%;IMT、血清 Lp-PLA2 联合诊断的 AUC 为 0.889 (95% CI 为 0.841~0.927),差异有统计学意义 ($P < 0.001$),最佳诊断敏感度为 76.07%,特异度为 90.18%,见图 1。

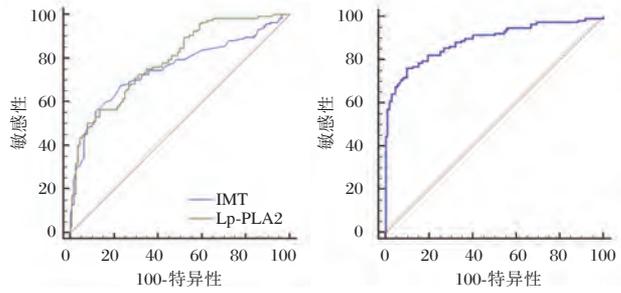


图 1 IMT、血清 Lp-PLA2 单独、联合诊断 ROC 曲线

Figure 1 ROC curve of single and combined diagnosis of IMT and serum Lp-PLA2

2.3 不同稳定性斑块患者 IMT、血清 Lp-PLA2 水平比较

不同稳定性斑块患者 IMT、血清 Lp-PLA2 水平相比,不稳定斑块患者 IMT、血清 Lp-PLA2 水平>稳定斑块患者>无斑块患者,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见表 3。

表 3 不同稳定性斑块患者 IMT、血清 Lp-PLA2 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of IMT and serum Lp-PLA2 levels in patients with different stable plaques ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | <i>n</i> | IMT(mm) | Lp-PLA2($\mu\text{g/L}$) |
|------------|----------|-----------------|----------------------------|
| 无斑块患者 | 15 | 0.83 \pm 0.14 | 44.39 \pm 4.15 |
| 稳定斑块患者 | 40 | 1.02 \pm 0.18 | 51.17 \pm 6.69 |
| 不稳定斑块患者 | 62 | 1.35 \pm 0.34 | 63.26 \pm 8.11 |
| <i>F</i> 值 | | 30.809 | 58.574 |
| <i>P</i> 值 | | <0.001 | <0.001 |

2.4 IMT、血清 Lp-PLA2 与斑块稳定性的关系

经 Logistic 回归分析,IMT、血清 Lp-PLA2 水平与斑块稳定性显著相关,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见表 4。

表 4 IMT、血清 Lp-PLA2 与斑块稳定性的关系

Table 4 Relationship between IMT, serum Lp-PLA2 and plaque stability

| 变量 | β 值 | <i>S.E</i> 值 | Wald/ χ^2 值 | OR 值 | 95%CI | <i>P</i> 值 |
|---------|-----------|--------------|------------------|-------|--------------|------------|
| IMT | 1.714 | 0.412 | 17.305 | 5.550 | 2.786~11.058 | <0.001 |
| Lp-PLA2 | 1.665 | 0.509 | 10.705 | 5.288 | 3.015~9.274 | <0.001 |

3 讨论

国内有研究显示,评估与动脉粥样硬化脑梗死相关因子检测的诊断率,有助于提高临床诊断准确率,

对指导临床治疗、改善患者预后具有积极意义^[7]。颈动脉超声是临床评估动脉粥样硬化脑梗死的首选方法,可清晰显示颈动脉内斑块位置、大小、性质、数目等,且能测定IMT厚度、管径大小、血流量等信息,指导临床对动脉粥样硬化脑梗死进行预测和诊断^[8]。本研究发现,动脉粥样硬化脑梗死患者IMT明显高于健康群体,与谭杰^[9]研究结果一致,且本研究发现在IMT动脉粥样硬化脑梗死诊断方面具有一定价值,但漏诊率较高,需联合应用其他诊断方法。

近年来研究发现,炎症反应参与颈动脉粥样硬化斑块的形成和发展过程^[10]。Lp-PLA2是一种新型炎症性标志物,主要由成熟的巨噬细胞、淋巴细胞产生,并受炎性介质的调节,已有研究证实其表达变化在动脉粥样硬化形成和发展的几个阶段中均起着重要作用^[11]。本研究结果中,动脉粥样硬化脑梗死患者血清Lp-PLA2水平呈异常高表达状态,与顾伟等^[12]文献结果一致,提示Lp-PLA2表达升高参与动脉粥样硬化脑梗死的发生发展。本研究发现,IMT与血清Lp-PLA2间存在正相关关系,提示随着颈动脉斑块的发展,血清Lp-PLA2表达持续升高,且血清Lp-PLA2诊断动脉粥样硬化脑梗死具有较高诊断价值,但也存在诊断敏感度较低的不足。

由于颈动脉超声检测主要提供颈动脉斑块、血流量等表现信息,而分析炎症因子能够从疾病发展角度进行评估疾病内因^[13-14]。因此笔者推测可联合应用IMT、血清Lp-PLA2对动脉粥样硬化脑梗死进行全面分析,从而提高诊断价值。基于此,本研究通过ROC曲线分析发现,IMT、血清Lp-PLA2联合诊断动脉粥样硬化脑梗死的AUC大于二者单独诊断,有助于提高诊断效能,证实了上述推测的正确性,提示联合应用IMT、血清Lp-PLA2有助于动脉粥样硬化脑梗死的早期诊断,指导临床开展早期治疗。本研究结果提示检测IMT、血清Lp-PLA2有助于临床预测颈动脉不稳定粥样硬化斑块发生,指导临床开展针对性治疗、干预措施,以改善患者预后。

综上所述,动脉粥样硬化脑梗死患者IMT及血清Lp-PLA2表达均异常升高,在动脉粥样硬化脑梗死诊断方面具有较高应用价值,且是颈动脉不稳定粥样硬化斑块发生的预测因素,可为临床诊断动脉粥样硬化脑梗死患者及制定治疗方案提供重要参考。但本研究属于横断面研究,未对患者进行后续随访,IMT及血清Lp-PLA2表达与动脉粥样硬化脑

梗死复发的关系尚未明确,有待日后深入探究。

参考文献

- [1] Wang L, Wang J, Shen Y, et al. Relationship between Internal Carotid Artery Angle and Plaque Morphology in Patients with Acute Anterior Circulation Infarction [J]. Chin J Stroke, 2019, 14(7): 671-676.
- [2] 许位,张园园,高敬华,等. 急性脑梗死患者血清sdLDL-C与PTX-3水平与颈动脉粥样硬化斑块性质的关系[J]. 中风与神经疾病杂志, 2019, 36(8): 704-707.
- [3] Fu HJ, Zhao LB, Xue JJ, et al. Elevated serum homocysteine (Hcy) levels may contribute to the pathogenesis of cerebral infarction [J]. J Mol Neurosci, 2015, 56(3): 553-561.
- [4] Guo L, Cheng LG, He W, et al. X-strain Imaging Characteristics of Carotid Atherosclerotic Plaques in Patients with Cerebral Infarction [J]. Chin J Stroke, 2019, 14(1): 38-42.
- [5] Wallentin L, Held C, Armstrong P, et al. Lipoprotein-Associated Phospholipase A2 Activity Is a Marker of Risk But Not a Useful Target for Treatment in Patients With Stable Coronary Heart Disease [J]. J Am Heart Assoc, 2016, 5(6): e003407.
- [6] 国家卫生计生委脑卒中防治工程委员会. 中国脑卒中血管超声检查指导规范 [J]. 中华医学超声杂志(电子版), 2015, 12(8): 599-610.
- [7] 梁蓉. 颈动脉超声联合血清五聚素3、脂蛋白相关磷脂酶A2检测对动脉粥样硬化脑梗死的诊断价值 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2019, 27(9): 791-795.
- [8] Steinbuch J, Hoeks APG, Hermeling E, et al. Standard B-Mode Ultrasound Measures Local Carotid Artery Characteristics as Reliably as Radiofrequency Phase Tracking in Symptomatic Carotid Artery Patients [J]. Ultrasound Med Biol, 2016, 42(2): 586-595.
- [9] 谭杰. 动脉粥样硬化脑梗死患者颈动脉超声造影参数与神经损害、斑块性质变化的相关性 [J]. 海南医学院学报, 2018, 24(19): 1770-1773, 1778.
- [10] Chen J, Cai HW, Miao J, et al. Danlou Tablet Fought against Inflammatory Reaction in Atherosclerosis Rats with Intermingled Phlegm and Blood Stasis Syndrome and Its Mechanism Study [J]. Chin J Integ Tradit West Med, 2016, 36(6): 703-708.
- [11] 刘希奇,李孝庆,姚彦,等. 急性脑梗死患者血清CX-CL16GDF15Lp-PLA2水平变化及临床意义 [J]. 河北医学, 2019, 25(3): 580-584.
- [12] 顾伟,张作念,王志晔,等. 血清脂蛋白相关磷脂酶A2水平对动脉粥样硬化性脑梗死患者预后的预测价值研究 [J]. 实用心脑血管病杂志, 2017, 25(10): 37-41.
- [13] 戴全,邱海英,孙伟薇,等. 实时三维超声血管斑块定量分析技术检测颈动脉斑块特征的临床价值 [J]. 临床超声医学杂志, 2019, 21(8): 589-592.
- [14] 耿彪,宋婷阁,张鹏举,等. 血清炎症因子与老年急性脑梗死颈动脉粥样硬化及预后的关系 [J]. 现代检验医学杂志, 2019, 34(4): 120-123+127.

中枢神经系统感染患儿血清 MMP-9、AQP4、PC 水平变化及其对 ICNS 的诊断价值

赵芳丽 杨媛洁 陈相宏 郭莹 乔莉娜

[摘要] 目的 分析中枢神经系统感染(ICNS)患儿血清基质金属蛋白酶-9(MMP-9)、水通道蛋白4(AQP4)、蛋白C(PC)水平变化及其对ICNS的诊断价值。方法 选取本院2017年9月至2019年9月ICNS患儿114例作为观察组,另选取同期健康体检儿童114例作为对照组。检测对比两组、不同感染类型患儿血清MMP-9、AQP4、PC水平,评价上述指标对疾病发生及感染类型的鉴别诊断价值。根据格拉斯哥预后评分(GOS)分为预后良好与预后不良患儿,对比不同预后患儿血清各指标水平,并分析上述指标与预后的关系。结果 观察组血清MMP-9、AQP4水平高于对照组,PC水平低于对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$);细菌感染患儿血清MMP-9、AQP4水平高于病毒感染患儿,PC水平低于病毒感染患儿,差异有统计学意义($P<0.05$);血清MMP-9、AQP4、PC联合诊断ICNS曲线下面积(AUC) $>$ MMP-9 $>$ AQP4 $>$ PC;血清MMP-9、AQP4、PC联合鉴别诊断细菌感染与病毒感染 AUC $>$ MMP-9 $>$ AQP4 $>$ PC;血清MMP-9、AQP4、PC与预后显著相关,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 血清MMP-9、AQP4、PC异常表达是ICNS患儿预后不良独立危险因素,对ICNS及其感染类型鉴别与诊断具有一定价值。

[关键词] 中枢神经系统感染;基质金属蛋白酶-9;水通道蛋白4;蛋白C

Changes of serum MMP - 9, AQP4 and PC levels in children with central nervous system infection and their diagnostic value for ICNS

ZHAO Fangli, YANG Yuanjie, CHEN Xianghong, GUO Ying, QIAO Lina*

(Key Laboratory of Ministry of Education, Department of Pediatric Intensive Medicine, Birth Defects and Related Maternal and Child Diseases, West China Second Hospital of Sichuan University, Chengdu, Sichuan, China, 610041)

[ABSTRACT] Objective To analyze the serum matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), aquaporin 4 (AQP4), protein C (PC) levels in children with central nervous system infection (ICNS) and their diagnostic value for ICNS. Methods 114 patients with ICNS from September 2017 to September 2019 in our hospital were selected as the observation group, and 114 children with healthy physical examination during the same period were selected as the control group. Serum levels of MMP-9, AQP4, and PC in two groups and children with different infection types were compared, and the differential diagnosis value of the above indicators for disease occurrence and infection type was evaluated. According to the Glasgow prognostic score (GOS), children with good prognosis and poor prognosis were compared, serum levels of children with different prognosis were compared, and the relationship between the above indexes and prognosis was analyzed. Results Serum MMP-9 and AQP4 levels in the observation group were higher than those in the control group, and PC levels were lower than those in the control group, The difference is statistically significant ($P<0.05$). Serum MMP-9 and AQP4 levels in children with bacterial infections were higher than those in viral infections, and PC levels

基金项目:四川省科技厅项目(2019YFS0245)

作者单位:四川大学华西第二医院 儿童重症医学科、出生缺陷与相关妇儿疾病教育部重点实验室, 四川,成都610041

*通信作者:乔莉娜, E-mail:iaqiao@qq.com

were lower than those in viral infections, The difference is statistically significant ($P<0.05$). Serum MMP-9, AQP4, PC combined diagnosis area under the ICNS curve (AUC) is MMP-9>AQP4>PC. Serum MMP-9, AQP4, PC combined differential diagnosis of bacterial infection and viral infection AUC is MMP-9>AQP4>PC. Children with poor prognosis had higher serum MMP-9 and AQP4 levels than those with good prognosis, and PC levels were lower than those with good prognosis. The difference was statistically significant ($P<0.05$). Serum MMP-9, AQP4, PC were significantly correlated with prognosis, the difference was statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** Abnormal expression of serum MMP-9, AQP4, and PC is an independent risk factor for poor prognosis in children with ICNS, and it has certain value for the differentiation and diagnosis of ICNS and its infection type.

[KEY WORDS] Infections of central nervous system; Matrix metalloproteinase-9; Aquaporin 4; Protein C

中枢神经系统感染(Infections of central nervous system, ICNS)是指病原体感染脑与脊髓后所致感染性疾病^[1-2],儿童为高发人群,据统计,我国小儿ICNS发生率>0.05%,且近3年发病率出现缓慢增长趋势^[3]。相关研究发现^[4],患儿无法实施穿刺留取脑脊液标本时,外周静脉血检测可能为ICNS病原学的评估提供初步指向性意见。基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)9可促使血脑屏障外基质蛋白与脑血管基底降解,破坏血脑屏障完整性^[5]。水通道蛋白4(Aquaporin 4, AQP4)参与多种神经系统疾病发生、发展,但其在ICNS的具体机制尚未完全明确。蛋白C(protein C, PC)在抗凝、抑制细胞凋亡、保护神经元等方面起着关键作用^[6]。然而关于三者联合对ICNS感染类型的鉴别诊断价值尚无明确定论。基于此,本研究分析血清MMP-9、AQP4、PC,探讨其对ICNS患儿感染类型的诊断价值及与预后的关联性。报道如下。

1 资料和方法

1.1 一般资料

选取本院2017年9月至2019年9月ICNS患儿114例作为观察组,其中细菌感染42例,病毒感染72例,另选取同期健康体检儿童114例作为对照组。两组基本资料均衡可比,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表1。

纳入标准:①观察组均经脑脊液常规及生化检查,并经涂片革兰染色检菌及脑脊液、血细菌培养等证实为ICNS;②两组监护人均签署知情同意书。排除标准:①既往有癫痫症状史者;②合并肝肾等重要脏器器质性病变者;③监护人精神行为异常。本研究经本院医学伦理委员会审批同意。

表1 两组一般资料比较($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Comparison of general data between two groups ($\bar{x}\pm s$)

| 组别 | <i>n</i> | 性别 (男/女) | 年龄 (岁) | 体质量 (kg) |
|-----------------------|----------|-------------|-----------|-------------|
| 观察组 | 114 | 49/65 | 6.86±2.03 | 28.79±6.33 |
| 对照组 | 114 | 52/62 | 7.02±1.97 | 29.35±6.58 |
| <i>t</i> / χ^2 值 | | 0.160 | 1.062 | 1.081 |
| <i>P</i> 值 | | 0.689 | 0.750 | 0.681 |

1.2 方法

1.2.1 检测方法

空腹取6 mL静脉血,离心12 min, 3 000 r/min,分离取血清,采用酶联免疫吸附试验检测血清MMP-9、AQP4、PC水平,试剂盒(北京荣志海达生物科技有限公司,20153403569,规格:96T/盒),严格按照试剂盒说明书操作。

1.2.2 治疗方法

根据脑脊液常规及生化检查、涂片革兰染色检菌及脑脊液、血细菌培养、药敏试验等予以针对性抗感染治疗。

1.3 观察指标

①比较两组血清MMP-9、AQP4、PC水平。②比较观察组细菌感染与病毒感染患儿血清MMP-9、AQP4、PC水平。③分析血清MMP-9、AQP4、PC单一及联合对ICNS的诊断价值。④分析血清MMP-9、AQP4、PC单一及联合对ICNS感染类型的鉴别诊断价值。⑤采用格拉斯哥预后评分(Glasgow outcome scale, GOS)评估预后,死亡为I级;植物状态为II级;严重后遗症,24 h均需他人照料为III级;中度后遗症为IV级;恢复良好,但可能有轻度后遗症为V级,其中GOS V级为预后良好;GOS I~IV级为预后不良。经有效治疗后,观察组

预后不良患儿 21 例,预后良好患儿 93 例。比较不同预后患儿血清 MMP-9、AQP4、PC 水平。⑥分析血清 MMP-9、AQP4、PC 与预后的关系。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件分析处理数据,计量资料采用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,组间采用 *t* 检验,计数资料用 *n* (%) 表示,组间比较采用 χ^2 检验,采用 Logistic 进行多因素回归分析,采用受试者工作特征曲线(receiver operating characteristic, ROC) 分析诊断价值, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组血清 MMP-9、AQP4、PC 水平比较

观察组血清 MMP-9、AQP4 水平高于对照组,PC 水平低于对照组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见表 2。

表 2 两组血清 MMP-9、AQP4、PC 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of serum MMP-9, AQP4 and PC levels between the two groups ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | <i>n</i> | MMP-9($\mu\text{g/L}$) | AQP4($\mu\text{g/L}$) | PC(mg/L) |
|------------|----------|--------------------------|-------------------------|-----------------|
| 观察组 | 114 | 465.76 \pm 150.29 | 32.64 \pm 7.36 | 3.73 \pm 0.91 |
| 对照组 | 114 | 132.26 \pm 41.98 | 8.01 \pm 2.62 | 4.81 \pm 1.06 |
| <i>t</i> 值 | | 22.819 | 33.661 | 8.254 |
| <i>P</i> 值 | | <0.001 | <0.001 | <0.001 |

2.2 细菌感染与病毒感染患儿血清 MMP-9、AQP4、PC 水平比较

细菌感染患儿血清 MMP-9、AQP4 水平高于病毒感染患儿,PC 水平低于病毒感染患儿,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见表 3。

表 3 细菌感染与病毒感染患儿血清 MMP-9、AQP4、PC 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

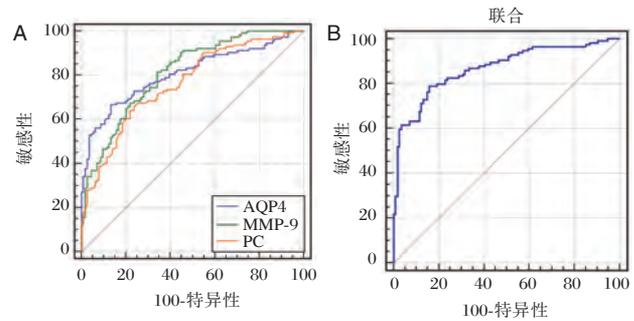
Table 3 Comparison of serum MMP-9, AQP4 and PC levels in children with bacterial infection and viral infection ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | <i>n</i> | MMP-9($\mu\text{g/L}$) | AQP4($\mu\text{g/L}$) | PC(mg/L) |
|------------|----------|--------------------------|-------------------------|-----------------|
| 细菌感染患儿 | 42 | 626.31 \pm 204.55 | 52.17 \pm 16.48 | 3.05 \pm 0.64 |
| 病毒感染患儿 | 72 | 372.10 \pm 113.29 | 21.25 \pm 7.03 | 4.12 \pm 0.73 |
| <i>t</i> 值 | | 8.549 | 13.927 | 7.891 |
| <i>P</i> 值 | | <0.001 | <0.001 | <0.001 |

2.3 血清 MMP-9、AQP4、PC 对 ICNS 的诊断价值

绘制血清 MMP-9、AQP4、PC 对 ICNS 诊断价值 ROC 曲线, MMP-9 曲线下面积 (area under curve,

AUC) 为 0.810, 95% CI 为 0.753~0.859, 当截断值 > 284.10 $\mu\text{g/L}$ 时, 敏感性为 81.58%、特异性为 65.79%; AQP4 AUC 为 0.808, 95% CI 为 0.750~0.857, 当截断值 > 18.94 $\mu\text{g/L}$ 时, 敏感性为 66.67%、特异性为 86.84%; PC AUC 为 0.763, 95% CI 为 0.702~0.816, 当截断值 \leq 4.03 mg/L 时, 敏感性为 64.04%、特异性为 78.07%; 血清 MMP-9、AQP4、PC 联合 AUC 为 0.869, 95% CI 为 0.818~0.910, 敏感性为 78.95%、特异性为 84.21%。见图 1。



注: A. 血清 MMP-9、AQP4、PC 对 ICNS 的诊断价值; B. 血清 MMP-9、AQP4、PC 联合对 ICNS 的诊断价值。

图 1 血清 MMP、AQP4、PC 对 ICNS 的单一及联合诊断价值图

Figure 1 The value of serum MMP-9, AQP4, PC for single and combined diagnosis of ICNS

2.4 血清 MMP-9、AQP4、PC 对 ICNS 感染类型的鉴别诊断价值

绘制血清 MMP-9、AQP4、PC 对细菌感染与病毒感染的鉴别诊断价值 ROC 曲线。MMP-9 AUC 为 0.805, 95% CI 为 0.721~0.873, 当截断值 > 569.68 $\mu\text{g/L}$ 时, 敏感性为 57.14%、特异性为 93.06%; AQP4 AUC 为 0.780, 95% CI 为 0.693~0.853, 当截断值 > 42.52 $\mu\text{g/L}$ 时, 敏感性为 56.20%、特异性为 93.06%; PC AUC 为 0.749, 95% CI 为 0.659~0.825, 当截断值 \leq 3.50 mg/L 时, 敏感性为 66.67%、特异性为 76.39%。血清 MMP-9、AQP4、PC 联合 AUC 为 0.831, 95% CI 为 0.750~0.895, 敏感性为 59.52%、特异性为 98.61%。见图 2。

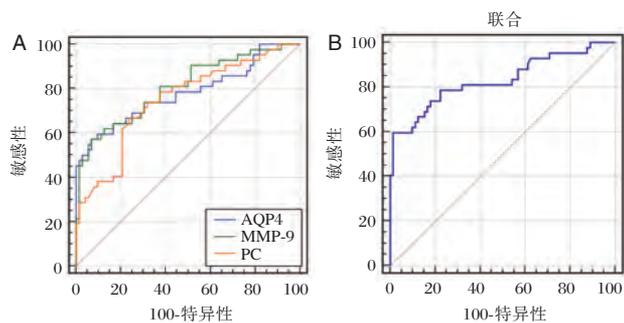
2.5 不同预后患者患儿血清 MMP-9、AQP4、PC 水平比较

预后不良患儿血清 MMP-9、AQP4 水平高于预后良好患儿, PC 水平低于预后良好患儿, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 4。

2.6 血清 MMP-9、AQP4、PC 与预后的关系

Logistic 多因素回归分析, 血清 MMP-9、

AQP4、PC 与预后显著相关, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), 见表 5。



注: A. 血清 MMP-9、AQP4、PC 对 ICNS 感染类型的鉴别; B. 诊断价值血清 MMP-9、AQP4、PC 联合对 ICNS 感染类型的鉴别诊断价值。

图 2 血清 MMP-9、AQP4、PC 对 ICN 感染单及联合诊断价值图

Figure 2 Single and combined diagnostic value of serum MMP-9, AQP4 and PC for ICNS infection

表 4 不同预后患者患儿血清 MMP-9、AQP4、PC 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of serum MMP-9, AQP4 and PC levels in children with different prognosis ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | n | MMP-9 ($\mu\text{g/L}$) | AQP4 ($\mu\text{g/L}$) | PC (mg/L) |
|--------|----|------------------------------|-----------------------------|-------------------------|
| 预后不良患儿 | 21 | 581.49 \pm 187.55 | 49.73 \pm 15.11 | 3.11 \pm 0.69 |
| 预后良好患儿 | 93 | 439.63 \pm 123.46 | 28.78 \pm 9.34 | 3.87 \pm 0.72 |
| t 值 | | 4.282 | 8.178 | 4.401 |
| P 值 | | <0.001 | <0.001 | <0.001 |

表 5 血清 MMP-9、AQP4、PC 与预后的关系

Table 5 Relationship between serum MMP-9, AQP4, PC and prognosis

| 变量 | β 值 | S.E. 值 | Wald/ χ^2 值 | OR 值 | 95%CI | P 值 |
|-------|-----------|--------|------------------|-------|--------------|--------|
| MMP-9 | 1.671 | 0.614 | 7.407 | 5.318 | 2.789~10.140 | <0.001 |
| AQP4 | 1.872 | 0.505 | 13.743 | 6.502 | 3.512~12.038 | <0.001 |
| PC | -0.432 | 0.138 | 9.806 | 0.649 | 0.457~0.922 | <0.001 |

3 讨论

ICNS 发病机制较为复杂, 普遍认为, 其与机体炎性反应、髓鞘遭受破坏、脑膜炎性反应等因素有关^[7-8]。甚至其可影响脑血管及脑代谢的自我调节, 增加严重脑水肿发生风险, 最终对神经元产生非逆转性弥散、局灶性脑损伤。因此, 早期明确诊断, 根据 ICNS 类型予以个性化干预措施是降低致残率与病死率, 改善预后的关键。

Roine I 等^[9]研究发现, MMP-9 通过降低基底膜蛋白降解, 可破坏血脑屏障, 加重脑组织外液体、蛋白等成分侵袭, 增加继发性组织水肿发生风险。刘感哲等^[10]通过对比研究发现, 血清 MMP-9 在 ICNS 细菌感染患儿中呈异常高表达状态, 支持本研究观点。提示血清 MMP-9 可能参与 ICNS 发生及病情发展过程中。ICNS 早期, 病毒、细菌等各种病原体及其产物在病症部位可引发炎症反应, 加重炎症反应细胞浸润, 进而导致血清 MMP-9 过度表达, 而血清 MMP-9 异常高表达可诱导白细胞介素 6、白细胞介素 8 等炎症细胞因子释放, 加重炎症水平对血脑屏障的浸润, 提高血脑屏障通透性, 加剧脑组织损伤, 从而加快病情进展。经 ROC 曲线进一步证实, 血清 MMP-9 诊断细菌与病毒感染的特异性高达 93.06%, 可见血清 MMP-9 水平有望成为 ICNS 患儿针对性治疗的新靶点。最后, 经 Logistic 多因素回归分析, 血清 MMP-9 高水平可能是 ICNS 患儿遗留神经系统后遗症、预后不良的危险因素, 可能与血清 MMP-9 对 CD4⁺T 淋巴细胞具有抗原提成效应, 能强化血脑屏障中细胞外基质成分的吞噬作用有关。

AQP4 是大脑主要水通道蛋白, 在前脑、间脑、中脑、小脑、脑干等部位表达最为丰富。本研究数据表明, 血清 AQP4 水平高表达可能增加 ICNS 细菌感染发生率, 与朱磊等^[11]研究结果存在相似之处。细菌侵袭会激活机体炎症反应, 释放大量促炎因子, 刺激单核细胞分泌趋化因子, 诱导中性粒细胞聚集, 增加血清 AQP4 含量, 加重血脑屏障功能损伤。通过绘制 ROC 曲线进一步证实, 血清 AQP4, 具有成为 ICNS 早期诊断的特异性血清标志物的潜力, 便于为临床实施有效对症处理提供更加细化的指导。另外, 近年来, 多项研究证实, AQP4 在脑水肿发生、发展中发挥关键作用^[12-13]。本研究发现, 血清 AQP4 水平高表达易增加 ICNS 患儿预后不良发生风险。

黄燕婷^[14]报道指出, PC 不仅可调节机体凝血及纤溶平衡, 还能通过抗炎、抗凋亡机制, 调节微循环, 减轻器官功能障碍, 从而参与多种疾病病理生理过程的调控。通过酶联免疫吸附试验检测, 血清 PC 水平在 ICNS 细菌感染患儿中呈异常低表达, 与王燕等^[15]观点基本一致。PC 水平升高一方面能削弱趋化因子对中性粒细胞的募集作用, 缓解内皮细胞损害, 进而避免胶质细胞、神经元、血

管损伤;另一方面,可直接减少炎症因子水平,拮抗炎性物质、纤维蛋白渗出,降低脑膜炎后遗症发生可能性。然而血清PC诊断ICNS及其感染类型的敏感性均<70.0%,诊断效果有限,故本研究采用联合诊断模式,血清MMP-9、AQP4、PC联合诊断ICNS及其感染类型AUC均大于血清指标单一诊断,且特异性均>84.0%,说明三者联合可为ICNS及其感染类型提供诊断依据。

综上可知,血清MMP-9、AQP4、PC异常表达是ICNS患儿预后不良独立危险因素,对ICNS及其感染类型鉴别与诊断具有一定价值。

参考文献

- [1] McCarthy MW, Kalasauskas D, Petraitis V, et al. Fungal Infections of the Central Nervous System in Children[J]. *J Pediatric Infect Dis Soc*, 2017, 6(3): e123-e133.
- [2] 世淑兰,杨艳飞,李荣杰,等. 脑脊液TNF- α 、IL-6、NSE在小儿中枢神经系统感染中的诊断价值[J]. *国际检验医学杂志*, 2018, 39(12): 1470-1472.
- [3] Sekeyová Z, Danchenko M, Filipčík P, et al. Rickettsial infections of the central nervous system[J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2019, 13(8): e0007469.
- [4] 王艳萍,华颖,王健彪,等. 手足口病并脑炎患儿白细胞介素-1 β 、水通道蛋白4变化的意义[J]. *中华实用儿科临床杂志*, 2018, 33(18): 1407-1410.
- [5] 王宝,孙媛,宋康,等. 应激性高血糖对颅脑损伤患者炎症状态和外周血乳酸、MMP-9水平以及28天死亡率的影响[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2019, 11(1): 39-43.
- [6] 张金山,李龙,陈震,等. 肝外门静脉梗阻对抗凝血因子水平的影响[J]. *中华小儿外科杂志*, 2019, 40(2): 163-166.
- [7] Wohlfert EA, Blader IJ, Wilson EH. Brains and Brawn: Toxoplasma Infections of the Central Nervous System and Skeletal Muscle[J]. *Trends Parasitol*, 2017, 33(7): 519-553.
- [8] 熊学琴,胡家胜,刘智胜,等. 乳酸脱氢酶和中性粒细胞CD64与脑脊液 β 2微球蛋白检测对小儿中枢神经系统感染的诊断分析[J]. *中华医院感染学杂志*, 2017, 27(22): 5247-5250.
- [9] Roine I, Pelkonen T, Lauhio A, et al. Changes in MMP-9 and TIMP-1 concentrations in cerebrospinal fluid after 1 week of treatment of childhood bacterial meningitis[J]. *J Clin Microbiol*, 2015, 26(5): 90-93.
- [10] 刘感哲,罗涛,王娟. 中枢神经系统感染患儿血清、脑脊液MMP-9和IL-1 β 水平变化分析[J]. *基因组学与应用生物学*, 2017, 36(12): 4853-4860.
- [11] 朱磊,朱俊岭,辛鑫,等. 水通道蛋白-4和神经元特异性烯醇化酶在手足口病中表达及临床意义[J]. *中华实用诊断与治疗杂志*, 2018, 32(12): 1172-1174.
- [12] Guan Y, Li L, Chen J, et al. Effect of AQP4-RNAi in treating traumatic brain edema: Multi-modal MRI and histopathological changes of early stage edema in a rat model[J]. *Exp Ther Med*, 2020, 19(3): 2029-2036.
- [13] Li YN, Gao ZW, Li R, et al. Aquaporin 4 regulation by ginsenoside Rb1 intervenes with oxygen-glucose deprivation/reoxygenation-induced astrocyte injury[J]. *Med (Baltimore)*, 2019, 98(42): e17591.
- [14] 黄燕婷. 血浆蛋白C和蛋白S在静脉血栓栓塞患者体内表达水平[J]. *国际医药卫生导报*, 2018, 24(11): 1625-1626.
- [15] 王燕,刘伟,李斌,等. 化脓性脑膜炎及病毒性脑膜炎患儿血清、脑脊液中蛋白C水平变化[J]. *山东医药*, 2016, 56(39): 69-71.

(上接第789页)

- [11] Yuan ZG, Wang ZY, Xia MY, et al. Diffusion Kurtosis Imaging for Assessing the Therapeutic Response of Transcatheter Arterial Chemoembolization in Hepatocellular Carcinoma[J]. *J Cancer*, 2020, 11(8): 2339-2347.
- [12] 李宏翔,许乙凯,张静,等. 体素不相干运动DWI预测肝癌微血管侵犯的价值[J]. *临床放射学杂志*, 2018, 37(09): 1475-1479.
- [13] Sun H, Xu Y, Song A, et al. Intravoxel Incoherent Motion MRI of Rectal Cancer: Correlation of Diffusion and Perfusion Characteristics With Prognostic Tumor Markers[J]. *Am J Roentgenol*, 2018, 210(4): W139-W147.
- [14] Zhu SC, Liu YH, Wei Y, et al. Intravoxel incoherent motion diffusion-weighted magnetic resonance imaging for predicting histological grade of hepatocellular carcinoma: Comparison with conventional diffusion-weighted imaging[J]. *World J Gastroenterol*, 2018, 24(8): 929-940.
- [15] Yang SH, Lin J, Lu F, et al. Evaluation of antiangiogenic and antiproliferative effects of sorafenib by sequential histology and intravoxel incoherent motion diffusion-weighted imaging in an orthotopic hepatocellular carcinoma xenograft model[J]. *J Magn Reson Imaging*, 2017, 45(1): 270-280.
- [16] Wei C, Chen YL, Li XX, et al. Diagnostic Performance of MR Imaging-based Features and Texture Analysis in the Differential Diagnosis of Ovarian Thecomas/Fibrothecomas and Uterine Fibroids in the Adnexal Area[J]. *Acad Radiol*, 2020, S1076-6332(20): 30022-2.
- [17] Szychoł E, Youssef A, Ganeshan B, et al. Predicting Outcome in Childhood Diffuse Midline Gliomas Using Magnetic Resonance Imaging Based Texture Analysis[J]. *J Neuroradiol*, 2020, S0150-9861(20): 30131-0.
- [18] Zhou W, Zhang L, Wang K, et al. Malignancy characterization of hepatocellular carcinomas based on texture analysis of contrast-enhanced MR images[J]. *J Magn Reson Imaging*, 2017, 45(5): 1476-1484.

· 论 著 ·

复发性流产孕妇血清25(OH)D水平与炎症因子、自身免疫抗体及T淋巴细胞亚群分布的相关性分析

郝月兰^{1*} 刘辉² 吕明云¹ 滕怀香¹

[摘要] 目的 探讨复发性流产(RSA)孕妇血清25-羟维生素D[25(OH)D]水平与炎症因子、自身免疫抗体及T淋巴细胞亚群分布的相关性分析。方法 2018年1月至2019年12月间在本院进行清宫术的复发性流产孕妇40例作为复发性流产组,同期在本院进行人工流产的健康女性40例作为对照组,检测两组孕妇的血清25(OH)D水平,对比不同25(OH)D水平的复发性流产孕妇血清炎症因子白介素-6(IL-6)水平、外周血自身免疫抗体[抗心磷脂抗体(ACA)、抗子宫内膜抗体(AEMAb)、抗HCG抗体(AHCGAb)、抗核抗体(ANA)、甲状腺过氧化物酶抗体(TPOAb)]表达阳性情况及T淋巴细胞亚群[CD3⁺、CD3⁺CD4⁺、CD3⁺CD8⁺T淋巴细胞]分布情况的差异。结果 复发性流产组孕妇血清中25(OH)D的水平低于对照组孕妇,差异有统计学意义($P<0.05$)。低25(OH)D组孕妇血清中IL-6水平(11.30 ± 1.67 vs 15.62 ± 2.39 pg/mL)低于高25(OH)D组,外周血中ACA、AEMAb、AHCGAb、ANA、TPOAb的阳性率及CD3⁺、CD3⁺CD4⁺T淋巴细胞的分布比例高于高25(OH)D组孕妇。两组间CD3⁺CD8⁺T淋巴细胞分布比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。复发性流产孕妇血清25(OH)D水平与炎症因子、自身免疫抗体及T淋巴细胞亚群分布均存在直接相关关系($r=0.384$ 、 -0.409 、 -0.322 、 -0.295 、 -0.311 、 -0.503 、 -0.437 、 -0.399)。结论 25(OH)D水平降低在RSA发生过程中扮演重要角色,可能与其影响机体免疫炎症反应的机制相关。

[关键词] 复发性流产; 25-羟维生素D; 炎症因子; 自身免疫抗体; T淋巴细胞亚群

Correlation analysis of serum 25-hydroxyvitamin D level and distribution of inflammatory factors, autoimmune antibodies and T lymphocyte subsets in pregnant women with recurrent miscarriage

HAO Yuelan^{1*}, LIU Hui², LV Mingyun¹, TENG Huaixiang¹

(1. Department of Reproductive Medicine, Rizhao City Maternal and Child Health Hospital Rizhao, Shandong, China, 276826; 2. Department of Reproductive Medicine, Rizhao People's Hospital, Rizhao, Shandong, China, 276826)

[ABSTRACT] Objective To explore the correlation analysis of serum 25-hydroxyvitamin D [25(OH)D] levels in pregnant women with recurrent miscarriage (RSA) and the distribution of inflammatory factors, autoimmune antibodies and T lymphocyte subsets. Methods From January 2018 to December 2019, 40 pregnant women with recurrent miscarriages in our hospital were recruited as the recurrent abortion group, and 40 healthy women who underwent artificial abortion in our hospital during the same period were used as the control group. The difference of serum inflammatory factor interleukin-6 (IL-6) level, peripheral blood autoimmune antibody [anticardiolipin antibody (ACA), anti-endometrial antibody (AEMAb), anti HCG antibody (AHCGAb), antinuclear antibody (ANA), thyroid peroxidase antibody (TPOAb)] positive

作者单位:1.日照市妇幼保健院生殖医学科,山东,日照 276826

2.日照市人民医院生殖医学科,山东,日照 276826

*通信作者:郝月兰, E-mail: hyl6506@126.com

expression and distribution of T lymphocyte subsets [CD3⁺, CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺ T lymphocytes] were analyzed and compared. **Results** Serum level of 25 (OH) D in the RSA group was lower than that in the control group ($P<0.05$). Serum levels of IL-6 of the low 25 (OH) D group were lower than those of the high 25 (OH) D group. Positive rate of ACA, AEMAb, AHCGAb, ANA, TPOAb and distribution ratio of CD3⁺、CD3⁺CD4⁺ T lymphocytes in peripheral blood in the low 25 (OH) D group were higher than those in the high 25 (OH) D group ($P<0.05$), and there were no significant difference in distribution ratio of CD3⁺CD8⁺T lymphocytes between two groups ($P>0.05$). Correlation analysis showed that serum 25 (OH) D level in RSA women was correlated with the distribution of inflammatory cytokines, autoimmunity antibodies and T lymphocyte subpopulations. **Conclusion** The reduction of 25(OH)D level plays an important role in the occurrence of RSA, which may be related to the mechanism that affects the body's immune and inflammatory response.

[KEY WORDS] Recurrent spontaneous abortion; 25-hydroxyvitamin D; Inflammatory cytokines; Autoimmune antibody; T lymphocyte subsets

复发性流产(Recurrent spontaneous abortion, RSA)是指连续发生2次或2次以上的自然流产,目前认为其病因主要包括染色体异常、母体生殖道异常、母体内分泌异常等^[1-2],但部分RSA孕妇上述各项检查均正常、具体病因不明,探索不明病因RSA孕妇的发病机制是当下妇产科研究的重点。近年研究^[3-4]发现维生素D在胚胎种植的免疫调节中发挥重要作用,且足量的维生素D可提高体外受精成功率。关于维生素D在RSA发生中扮演的角色尚未有明确定论,25-羟维生素D[25(OH)D]是维生素D的活性成分,文中探讨RSA孕妇血清中25(OH)D的表达情况,进一步探讨25(OH)D与机体免疫炎症的内在联系,旨在明确不明病因RSA孕妇的可能致病因素并为后续临床干预提供新思路。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2018年1月至2019年12月间在本院进行清宫的复发性流产孕妇40例作为RSA组,年龄22~35(28.94±5.23)周岁,体质指数(23.71±3.04)kg/m²,月经周期(28.49±4.51)d;选取同期在本院进行人工流产的健康女性40例作为对照组,年龄21~38(28.67±5.51)周岁,体质指数(23.59±3.21)kg/m²,月经周期(28.52±4.88)d。均为无疾病状况下本人要求进行流产术、本人签署知情同意书。两组孕妇在年龄、体质指数、月经周期的分布,差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。研究计划得到本院伦理委员会批准。

纳入标准:①符合中华医学会妇产科学分会产科学组制定的《复发性流产诊治的专家共识》^[5]

中对RSA的定义;②既往无RSA针对性治疗史;③患者年龄20~50周岁;④夫妻双方染色体核型均正常;⑤月经周期规律,入组前3个月内无维生素D服用史;⑥本人签署知情同意书。排除标准:①合并盆腔生殖道器质性疾

1.2 方法

1.2.1 血清25-羟维生素D、炎症因子水平检测

清宫术实施前24h,留取两组孕妇的空腹外周静脉血标本约5.0mL,室温静置24h后留取上层血清。应用USA BIO-RAD 680型全自动酶标仪、酶联免疫吸附法试剂盒(上海西唐公司)检测血清中25(OH)D的水平,按照20ng/mL作为阈值将复发性流产组孕妇分为高25(OH)D组(16例)、低25(OH)D组(24例)。采用酶联免疫吸附法(上海西唐公司)检测复发性流产孕妇血清中炎症因子白介素-6(IL-6)。

1.2.2 自身免疫抗体水平检测

RAS孕妇的空腹外周静脉血标本同1.2,采用间接免疫荧光法试剂盒(北京生东科技公司)检测其中抗心磷脂抗体(ACA)、抗子宫内膜抗体(AEMAb)、抗HCG抗体(AHCGAb)、抗核抗体(ANA)的阳性表达情况,采用化学发光免疫分析法(贝克曼库尔特公司)检测甲状腺过氧化物酶抗体(TPOAb)的阳性表达情况。

1.2.3 T淋巴细胞亚群分布情况检测

RAS的空腹外周静脉血标本同1.2,采用USA BD FACSCanto II流式细胞仪及相应试剂(BD公司)检测CD3⁺、CD3⁺CD4⁺、CD3⁺CD8⁺、CD19⁺、CD56⁺T淋巴细胞的分布情况。

1.3 统计学方法

使用软件 SPSS 20.0 对数据进行处理, 两组间计数资料以 $n(\%)$ 表示, 比较采用 χ^2 检验; 计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 独立样本比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组血清 25(OH)D 水平比较

RSA 组孕妇血清中 25(OH)D 的水平为 (18.39 ± 2.76) ng/mL, 正常组孕妇血清中 25(OH)D 的水平为 (34.72 ± 5.19) ng/mL。 RSA 组孕妇血清中

25(OH)D 的水平显著低于对照组孕妇, 差异有统计学意义 ($t=25.406, P=0.000$)。

2.2 不同 25(OH)D 水平 RSA 患者炎症因子、T 淋巴细胞亚群比较

低 25(OH)D 组孕妇血清中 IL-6 水平低于高 25(OH)D 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。 低 25(OH)D 组孕妇外周血中 CD3⁺、CD3⁺CD4⁺T 淋巴细胞的分布比例高于高 25(OH)D 组孕妇, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。 两组间 CD3⁺CD8⁺T 淋巴细胞分布比例的差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。 见表 1。

表 1 不同 25(OH)D 水平 RSA 患者炎症因子、T 淋巴细胞亚群比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of inflammatory cytokines and T lymphocyte subsets between RSA patients with different 25(OH) d levels ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | <i>n</i> | IL-6(pg/mL) | CD3 ⁺ (%) | CD3 ⁺ CD4 ⁺ (%) | CD3 ⁺ CD8 ⁺ (%) |
|-------------|----------|-------------|----------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| 低 25(OH)D 组 | 24 | 11.30±1.67 | 73.48±3.29 | 45.83±5.19 | 25.81±4.52 |
| 高 25(OH)D 组 | 16 | 15.62±2.39 | 68.36±3.40 | 36.20±4.56 | 25.76±4.19 |
| <i>t</i> 值 | | 9.371 | 6.844 | 8.816 | 0.051 |
| <i>P</i> 值 | | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.480 |

2.3 不同 25(OH)D 水平 RSA 患者自身免疫抗体比较

低 25(OH)D 组孕妇外周血中 ACA、AEM-

Ab、AHCGAb、ANA、TPOAb 的阳性率高于高 25(OH)D 组孕妇, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。 见表 2。

表 2 不同 25(OH)D 水平 RSA 患者外周血自身免疫抗体阳性率的比较 [$n(\%)$]

Table 2 Comparison of autoantibody positive rates in peripheral blood between RSA patients with different 25(OH) d levels [$n(\%)$]

| 组别 | <i>n</i> | ACA | AEMAb | AHCGAb | ANA | TPOAb |
|-------------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 低 25(OH)D 组 | 24 | 14(58.33) | 12(50.00) | 13(54.17) | 11(45.83) | 14(58.33) |
| 高 25(OH)D 组 | 16 | 4(25.00) | 3(18.75) | 3(18.75) | 2(12.50) | 4(25.00) |
| χ^2 值 | | 4.310 | 4.000 | 5.017 | 4.862 | 4.310 |
| <i>P</i> 值 | | 0.038 | 0.046 | 0.025 | 0.027 | 0.038 |

2.4 相关性分析

Pearson 检验发现, RSA 孕妇血清中 25(OH)D 的水平与 IL-6 的水平呈正相关 ($P < 0.05$); 与 ACA、AEMAb、AHCGAb、ANA、TPOAb、CD3⁺、CD3⁺CD4⁺T 淋巴细胞的分布比例的水平呈负相关, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。 见表 3。

3 讨论

维生素 D 缺乏是一个世界性问题, 且在妊娠期女性中也普遍存在。 维生素 D 的基础功能是调节钙磷代谢, 最新研究认为其也参与免疫、生殖等

生理过程^[6-7]。 Li N^[8] 的研究发现, RSA 妇女的母-胎界面维生素 D 及其受体表达减少, 推测维生素 D 缺乏是导致 RSA 发生的重要因素之一。 本研究发现 RSA 组孕妇血清中 25(OH)D 的水平较正常流产孕妇有显著降低, 说明异常低水平的 25(OH)D 与 RSA 的发生有关, 低水平的 25(OH)D 可能通过影响炎症反应及免疫应答来参与 RSA 的发病。 基于此, 本研究将进一步从炎症反应、自身免疫抗体、T 淋巴细胞亚群三方面展开阐述。

母胎界面中免疫耐受的建立是保证胎儿生长发育的基础, 分布在母胎界面的 Th1/Th2 细胞对

表3 RSA孕妇25(OH)D与炎症因子、自身免疫抗体及T淋巴细胞亚群分布的相关性

Table 3 Correlation between 25 (OH) D and inflammation cytokine, autoimmune antibodies and T lymphocyte subsets distribution in RSA pregnant women

| 指标 | r 值 | P 值 |
|--|--------|-------|
| IL-6 | 0.384 | 0.012 |
| ACA | -0.409 | 0.008 |
| AEMAb | -0.322 | 0.018 |
| AHCGAb | -0.295 | 0.024 |
| ANA | -0.311 | 0.020 |
| TPOAb | -0.503 | 0.003 |
| CD3 ⁺ T 细胞 | -0.437 | 0.005 |
| CD3 ⁺ CD4 ⁺ T 细胞 | -0.399 | 0.010 |

母胎免疫耐受的建立至关重要。Th1 细胞分泌的细胞因子 IL-2、TNF- α 等可调控细胞增殖分化并能量代谢、为胎儿生长发育提供良好的环境,但过高的 Th1 细胞因子水平会引起免疫排斥、增加胎盘植入难度^[9]。Th2 细胞分泌 IL-6 等细胞因子,可刺激 B 细胞活性并降低排斥作用,增加母胎之间的适应性及相容性^[10]。本研究发现,低 25 (OH)D 组孕妇血清中 IL-6 的水平较低且 RSA 孕妇血清 25(OH)D 水平与 IL-6 的水平呈正相关,结合 IL-6 在免疫耐受维持中的作用分析,25 (OH)D 表达减少可能抑制 Th2 细胞因子 IL-6 的释放,进而影响妊娠的维持。

RSA 孕妇母胎界面免疫应答的异常多伴有自身免疫功能异常。朱晓芳^[11]、严兆华^[12]的研究均证实 RSA 的出现与自身抗体的异常高表达相关。ACA、ANA、TPOAb 属于组织特异性抗体,可能通过激活全身免疫系统引起母胎界面免疫调节异常; AEMAb、AHCGAb 属于生殖免疫抗体,有研究^[13]发现孕 12 周以前的早期流产孕妇上述自身免疫抗体的阳性率显著高于晚期流产者。此外, T 细胞亚群异常是 RSA 患者自身免疫应答异常的另一特征, Ren J^[14]的证实人类蜕膜组织中存在大量淋巴细胞,当 CD4⁺T 淋巴细胞被异常激活时可能对滋养细胞产生潜在毒性。

综上所述,可得出结论: RSA 孕妇存在 25 (OH)D 异常低水平,且与机体免疫炎症反应紊乱

程度密切相关,低水平的 25(OH)D 可能由此参与 RSA 的发生发展。关于 25(OH)D 表达改变对胚胎细胞各种生物学行为的直接影响,有待后续基础研究进一步明确。

参考文献

- [1] 刘祥举. 自然流产的遗传学检测研究进展[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2019, 1(4): 338-342.
- [2] Dikbas L, Dur R, Tas İH, et al. Low transcriptional activity of PON2 in recurrent abortion: A novel therapeutic agent? [J]. J Gynecol Obstet Hum Reprod, 2018, 47(8): 379-383.
- [3] 兰婷. 维生素 D 与冻融胚胎移植结局关系的研究进展[J]. 国际生殖健康/计划生育杂志, 2018, 37(2): 128-132.
- [4] 王馥新,高靓,石燕,等. 血清维生素 D 水平与体外受精-胚胎移植长方案新鲜周期妊娠结局的相关性研究[J]. 生殖医学杂志, 2019, 28(2): 117-122.
- [5] 中华医学会妇产科学分会产科学组. 复发性流产诊治的专家共识[J]. 中华妇产科杂志, 2016, 7(1): 3-9.
- [6] Laganà AS, Vitale SG, Ban Frangež H, et al. Vitamin D in human reproduction: the more, the better? An evidence-based critical appraisal [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2017, 21(18): 4243-4251.
- [7] Colonese F, La Rosa VL, Laganà AS, et al. Comment on: "Is there a role for vitamin D in human reproduction?" [J]. Horm Mol Biol Clin Investig, 2017, 29(1): 37-38.
- [8] Li N, Wu HM, Hang F, et al. Women with recurrent spontaneous abortion have decreased 25 (OH) vitamin D and VDR at the fetal - maternal interface [J]. Braz J Med Biol Res, 2017, 50(11): e6527.
- [9] Gao Y, Wang PL. Increased CD56 (+) NK cells and enhanced Th1 responses in human unexplained recurrent spontaneous abortion[J]. Genet Mol Res, 2015, 14(4): 18103-18109.
- [10] Zhu L, Chen H, Liu M, et al. Treg/Th17 Cell Imbalance and IL-6 Profile in Patients With Unexplained Recurrent Spontaneous Abortion[J]. Reprod Sci, 2017, 24(6): 882-890.
- [11] 朱晓芳,张海燕,何丽,等. 抗心磷脂抗体及抗子宫内膜抗体与复发性流产的关系探讨[J]. 重庆医学, 2018, 47(2): 249-251.
- [12] 严兆华. 复发性自然流产患者自身抗体和甲状腺功能的检测及临床意义[J]. 中国实用医药, 2019, 14(2): 29-31.
- [13] 丁林丽,邬巧霞. 复发性流产患者子宫动脉血流参数水平及其与自身抗体、胰岛素抵抗的相关关系[J]. 中国医师杂志, 2018, 20(6): 909-911.
- [14] Ren J, Zeng W, Tian F, et al. Myeloid-derived suppressor cells depletion may cause pregnancy loss via upregulating the cytotoxicity of decidual natural killer cells [J]. Am J Reprod Immunol, 2019, 81(4): e13099.

宫颈癌患者组织 β -catenin、Wnt1 表达及与新辅助化疗疗效的关系

谭建媛* 阳莉 罗安莉

[摘要] **目的** 探讨宫颈癌患者组织 β -连环蛋白(β -catenin)、Wnt1 表达及与新辅助化疗疗效的关系。**方法** 选取2015年10月至2019年10月本院116例宫颈癌患者作为研究组,选取95例良性子宫肌瘤患者作为对照组。比较两组组织 β -catenin、Wnt1 表达情况及研究组不同临床病理特征、化疗疗效组织 β -catenin、Wnt1 表达情况,并分析其与临床病理特征及新辅助化疗疗效关系。**结果** 研究组组织 β -catenin、Wnt1 表达高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);研究组不同肿瘤直径、淋巴结转移、组织分化、FIGO分期患者 β -catenin、Wnt1 表达比较,差异有统计学意义($P<0.05$);研究组组织 β -catenin、Wnt1 表达与肿瘤直径、淋巴结转移、FIGO分期呈正相关,与组织分化呈负相关($P<0.05$);化疗后研究组CR患者 β -catenin、Wnt1 表达低于PR、SD、PD患者($P<0.05$);Logistic分析显示, β -catenin、Wnt1 与新辅助化疗疗效有关($P<0.05$)。**结论** 宫颈癌患者组织 β -catenin、Wnt1 呈高表达,其表达情况与临床病理特征、新辅助化疗疗效密切相关,有利于宫颈癌早期鉴别诊断及指导临床治疗。

[关键词] 宫颈癌; β -catenin; Wnt1; 新辅助化疗; 紫杉醇; 顺铂

Expressions of β -catenin and Wnt1 in cervical cancer patients and their relationship with the efficacy of neoadjuvant chemotherapy

TAN Jianyuan*, YANG Li, LUO Anli

(Department of Gynecology, the first people's Hospital of Yibin, Yinbin, Sichuan, China, 644000)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the expression of β -catenin and Wnt1 in patients with cervical cancer and their relationship with the efficacy of neoadjuvant chemotherapy. **Methods** From October 2015 to October 2019, 116 patients with cervical cancer in our hospital were selected as the study group, and 95 patients with benign uterine fibroids were selected as the control group. The expressions of β -catenin and Wnt1 in the two groups were compared with the clinical and pathological characteristics of the study group and the expression of β -catenin and Wnt1 in the chemotherapy efficacy group, and their relationship with the clinicopathological characteristics and the efficacy of neoadjuvant chemotherapy were analyzed. **Results** The expressions of β -catenin and Wnt1 in the study group were higher than those in the control group, the difference was statistically significant ($P<0.05$). The expressions of β -catenin and Wnt1 in patients with different tumor diameters, lymph node metastasis, tissue differentiation, FIGO staging, and parauterine infiltration were compared in the study group, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). The expressions of β -catenin and Wnt1 in the study group were positively correlated with tumor diameter, lymph node metastasis, FIGO stage, and parauterine infiltration, and negatively correlated with tissue differentiation ($P<0.05$). The expressions of β -catenin and Wnt1 in CR patients in the study group after chemotherapy were lower than those in PR, SD, and PD patients ($P<0.05$). Logistic analysis showed that β -catenin and Wnt1 were related to the efficacy of neoadjuvant chemotherapy ($P<0.05$). **Conclusion** β -catenin and Wnt1 are

基金项目:宜宾市科技项目(3062016Y0008)

作者单位:四川省宜宾市第一人民医院妇科,四川,宜宾 644000

*通信作者:谭建媛, E-mail:657653813@qq.com

highly expressed in patients with cervical cancer, the expression of β -catenin and Wnt1 is closely related to the clinicopathological characteristics and the efficacy of neoadjuvant chemotherapy, which is beneficial to the early differential diagnosis of cervical cancer and to guide clinical treatment.

[KEY WORDS] Cervical cancer; β -catenin; Wnt1; Neoadjuvant chemotherapy; Paclitaxel; Cisplatin

宫颈癌是全球第二大女性恶性肿瘤,数据显示,我国新发病例占发展中国家25%,且趋于年轻化,如何有效防治其发生发展是肿瘤科医生及医学界亟待解决问题之一^[1-2]。化疗是当前治疗宫颈癌有效手段,特别是新辅助化疗,能显著降低肿瘤分期,延长生存期限,提高生活质量,但相关研究发现,30%以上Ⅲ~Ⅳ期患者对新辅助化疗不敏感^[3-4],因此及时、准确评估新辅助化疗疗效对临床调整化疗方案具有积极临床意义。新近研究发现,Wnt/ β -catenin信号通路参与宫颈癌发生发展,其中以Wnt1、 β -连环蛋白(β -catenin)最受关注^[5-6],但关于其与宫颈癌新辅助化疗疗效关系仍缺乏循证支持,故本研究检测宫颈癌及良性子宫肌瘤患者组织 β -catenin、Wnt1表达,分析其与新辅助化疗疗效关系,以期为临床确定合理化疗方案提供参考。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取2015年10月至2019年10月本院116例宫颈癌患者作为研究组,年龄26~75岁;体质指数(BMI)19~24 kg/m²;选取95例良性子宫肌瘤患者作为对照组,年龄24~76岁;BMI18~25 kg/m²。本研究征得本院伦理委员会审核通过,患者及家属知晓并签署同意书。

1.2 纳入与排除标准

研究组纳入标准:①符合宫颈癌诊断标准^[7],结合病理学检查确诊宫颈癌;年龄>18岁;②属国际妇产科联盟(FIGO) I a~II b期;③入院前1个月无其他抗肿瘤治疗;④具备明确化疗指征。对照组纳入标准:①符合良性子宫肌瘤诊断标准^[8],表现为白带增多、经期延长、下腹坠胀、阴道流血、腰痛等症状;②术后病理结果证实良性子宫肌瘤。排除标准:①肝、心、肾等脏器器质性病变;②妊娠期及哺乳期女性;③合并其他恶性肿瘤;④近期接受放疗及手术者;临床资料不完整者。

1.3 方法

1.3.1 检测方法

①标本采集。采集宫颈癌及良性子宫肌瘤患

者手术期间切除组织,约100 mg,生理盐水清洗血迹,保存于液氮中备用。②主要设备与仪器。Wnt1及 β -catenin一抗购自湖南远泰生物科技有限公司,Electsys2010电化学发光仪(瑞士Roche公司),组织总蛋白提取试剂盒(上海邦奕生物科技有限公司)。③实时定量PCR(RT-PCR)。取手术切除组织进行石蜡包埋,提取组织总RNA, DNA酶I处理并纯化,3 μ g RNA及Superscript进行逆转录,生成cDNA,通过SYBP green染料法进行定量检测,设计Wnt1、 β -catenin扩增引物序列,见表1,RT-PCR扩增条件:94 $^{\circ}$ C, 5 min, 10个PCR循环[94 $^{\circ}$ C, 20 s, 60 $^{\circ}$ C, 20 s, 72 $^{\circ}$ C, 20 s, 82 $^{\circ}$ C, 5 s]。各样品目基因及管家基因分别进行PCR反应,根据绘制梯度稀释DNA标准曲线,直接生成各样品目基因及管家基因浓度结果,Wnt1 mRNA模板拷贝数以 β -catenin为内参得出校正后mRNA相对值。

1.3.2 治疗方法

宫颈癌患者均采取新辅助化疗,静脉滴注135 mg/m²紫杉醇(四川协力制药股份有限公司,国药准字H20073913),3 h后,静脉滴注80 mg/m²顺铂(江苏豪森药业集团有限公司,国药准字H20010743),1 d,前后两天水化,3天一疗程,每个疗程间隔21 d,连续化疗3个疗程。

1.3.3 疗效评价

化疗3个疗程后进行疗效评价。按照世界卫生组织(World health organization, WHO)实体瘤评价标准评价^[9],包含完全缓解(Complete response, CR)、部分缓解(Partial response, PR)、疾病稳定(Stable disease, SD)、疾病进展(Progressive disease, PD)等4个等级,据此发现10例CR、56例PR,30例SD,20例PD。

1.4 观察指标

①两组组织 β -catenin、Wnt1表达。②研究组不同临床病理特征组织 β -catenin、Wnt1表达。③ β -catenin、Wnt1表达与临床病理特征相关性。④研究组不同化疗疗效组织 β -catenin、Wnt1表达。⑤ β -catenin、Wnt1表达与化疗疗效关系。

1.5 统计学处理

采用SPSS 22.0软件进行处理数据,计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,行 t 检验,多组间比较用单因素方差分析,计数资料以 $n(\%)$ 表示,行 χ^2 检验,Spearman分析 β -catenin、Wnt1表达与临床病理特征相关性,Logistic分析 β -catenin、Wnt1与新辅助化疗疗效关系, $P < 0.05$ 表明差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组临床资料

两组年龄、BMI、生育史、吸烟史、肿瘤直径等资料比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表1。

表1 两组临床资料 [$n(\%)$, $(\bar{x} \pm s)$]
Table 1 clinical data of 2 groups [$n(\%)$, $(\bar{x} \pm s)$]

| 临床资料 | 研究组 ($n=116$) | 对照组 ($n=95$) | t/χ^2 值 | P 值 |
|-------------------------------|--------------------|-------------------|--------------|-------|
| 年龄(岁) | 50.48±10.33 | 51.27±9.59 | 0.571 | 0.569 |
| BMI(kg/m^2) | 21.51±1.12 | 21.38±1.33 | 0.771 | 0.442 |
| 生育史 | 104(89.66) | 86(91.49) | 0.044 | 0.833 |
| 吸烟史 | 13(11.21) | 10(10.53) | 0.025 | 0.875 |
| 肿瘤直径(cm) | | | | |
| ≥ 4 | 60(51.72) | 45(47.37) | 0.396 | 0.529 |
| < 4 | 56(48.28) | 50(52.63) | | |
| 淋巴结转移 | | | | |
| 有 | 32(27.59) | - | | |
| 无 | 84(72.41) | - | | |
| 组织分化 | | | | |
| 低分化 | 42(36.21) | - | | |
| 中、高分化 | 74(63.79) | - | | |
| FIGO分期 | | | | |
| I a | 18(15.52) | - | | |
| II a | 58(50.00) | - | | |
| II b | 40(34.48) | - | | |
| 病理类型 | | | | |
| 鳞癌 | 63(54.31) | - | | |
| 腺癌 | 32(27.59) | - | | |
| 腺鳞癌 | 21(18.10) | - | | |

2.2 两组组织 β -catenin、Wnt1表达水平

研究组组织 β -catenin、Wnt1表达水平高于对照组($P < 0.05$)。见表2。

2.3 研究组不同临床病理特征 β -catenin、Wnt1表达水平的比较

研究组不同肿瘤直径、淋巴结转移、组织分化、FIGO分期患者 β -catenin、Wnt1表达比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表3。

表2 两组组织 β -catenin、Wnt1表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of expression levels of β -catenin and wnt1 in 2 groups ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | n | Wnt1($2^{-\Delta\Delta c}$) | β -catenin($2^{-\Delta\Delta c}$) |
|-------|-----|-------------------------------|---|
| 研究组 | 116 | 16.47±4.94 | 34.24±10.27 |
| 对照组 | 95 | 11.50±3.44 | 23.95±7.21 |
| t 值 | | 8.295 | 8.242 |
| P 值 | | < 0.001 | < 0.001 |

2.4 β -catenin、Wnt1表达水平与临床病理特征相关性

研究组组织 β -catenin、Wnt1表达与肿瘤直径、淋巴结转移、FIGO分期呈正相关,与组织分化呈负相关($P < 0.05$)。见表5。

2.5 研究组不同化疗疗效组织 β -catenin、Wnt1表达水平

化疗前研究组不同疗效患者 β -catenin、Wnt1表达比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),化疗后研究组CR患者 β -catenin、Wnt1表达低于PR、SD、PD患者($P < 0.05$)。见表6。

2.6 β -catenin、Wnt1与新辅助化疗疗效关系

Logistic分析显示, β -catenin、Wnt1与新辅助化疗疗效有关($P < 0.05$)。见表7。

3 讨论

目前,宫颈癌的鉴别诊断及疗效评估多依赖于影像学、实验室检查,虽具有一定适用价值,但也存在不足之处,如影像学检查易受医师个人经验、费用等因素影响,实验室检查则存在取材质量不一、时间长等问题^[10]。因此,探索一种高效、准确鉴别手段对宫颈癌早期诊断及防治具有重要意义。

宫颈癌是多基因、多因素、多阶段参与的生物学过程,当前证据证明,宫颈癌形成与Wnt/ β -catenin信号通路密切相关^[11]。Wnt1是Wnt通路始动蛋白,其可刺激Wnt/ β -catenin信号通路,致使下游靶基因过度表达,最终导致肿瘤细胞过度增长。而 β -catenin是Wnt信号向细胞核传递过程中的信号分子,疾病状态下,游离 β -catenin进入细胞核,调控靶基因表达,参与肿瘤细胞生长、侵袭^[12]。靳妍霞等^[13]发现宫颈癌患者癌组织Wnt1、 β -catenin呈高表达,与本研究结论相符,提示Wnt1、 β -catenin异常表达可能与宫颈癌发生、发展有关。郑小妹等^[14]学者报道,随病理分级、肿瘤直

表3 研究组不同临床病理特征 β-catenin、Wnt1 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of expression levels of β - catenin and wnt1 in different clinicopathological features of the study groups ($\bar{x} \pm s$)

| 临床病理特征 | n | Wnt1 ($2^{-\Delta\Delta C}$) | F/t 值 | P 值 | β-catenin ($2^{-\Delta\Delta C}$) | F/t 值 | P 值 |
|----------|----|--------------------------------|---------|--------|-------------------------------------|--------|--------|
| 年龄(岁) | | | | | | | |
| ≥46 | 62 | 16.41±4.33 | 0.150 | 0.881 | 34.30±9.99 | 0.064 | 0.949 |
| <46 | 54 | 16.53±4.24 | | | 34.18±10.11 | | |
| 肿瘤直径(cm) | | | | | | | |
| ≥4 | 60 | 18.84±5.65 | 4.816 | <0.001 | 38.11±11.73 | 3.667 | <0.001 |
| <4 | 56 | 14.10±4.89 | | | 30.37±10.95 | | |
| 淋巴结转移 | | | | | | | |
| 有 | 32 | 19.12±4.38 | 5.256 | <0.001 | 39.56±11.85 | 5.310 | <0.001 |
| 无 | 84 | 13.82±5.02 | | | 28.92±8.68 | | |
| 组织分化 | | | | | | | |
| 低分化 | 42 | 19.67±5.91 | 6.953 | <0.001 | 38.89±10.45 | 4.447 | <0.001 |
| 中、高分化 | 74 | 13.27±3.98 | | | 29.59±11.03 | | |
| FIGO 分期 | | | | | | | |
| I a | 18 | 12.12±3.64 | 400.815 | <0.001 | 25.87±7.76 | 12.114 | <0.001 |
| II a | 58 | 15.59±4.65 | | | 35.74±10.72 | | |
| II b | 40 | 21.70±6.51 | | | 41.11±12.33 | | |
| 病理类型 | | | | | | | |
| 鳞癌 | 63 | 16.37±4.91 | 0.404 | 0.669 | 34.21±10.26 | 0.165 | 0.848 |
| 腺癌 | 32 | 17.11±5.13 | | | 33.99±10.20 | | |
| 腺鳞癌 | 21 | 15.93±4.80 | | | 34.52±10.36 | | |

表4 β-catenin、Wnt1 表达水平与临床病理特征相关性

Table 4 Correlation between expression level of β - catenin and wnt1 and clinicopathological characteristics

| 病理特征 | β-catenin | | Wnt1 | |
|---------|-----------|--------|--------|--------|
| | r 值 | P 值 | r 值 | P 值 |
| 肿瘤直径 | 0.598 | <0.05 | 0.613 | <0.001 |
| 淋巴结转移 | 0.663 | <0.001 | 0.722 | <0.001 |
| 组织分化 | -0.605 | <0.001 | -0.643 | <0.001 |
| FIGO 分期 | 0.674 | <0.001 | 0.705 | <0.001 |

径增加及淋巴结转移, β-catenin 表达逐渐升高, 提示 β-catenin 在宫颈癌发生发展起着关键作用。

β-catenin 高表达可降低细胞上皮组织间黏附能力, 增加细胞侵袭能力, 加快癌细胞转移, 导致宫颈癌病情进一步恶化^[15]。进一步研究发现 β-catenin、Wnt1 异常高表达可作为评估宫颈癌患者病情程度的指标之一。

近年来随临床对 Wnt/β-catenin 信号通路研究不断深入, 部分学者发现, 其水平升高是影响恶性肿瘤化疗疗效危险因素, 并指出阻断其表达可抑制 Wnt 信号所致 Wnt/β-catenin 信号通路激活, 诱导肿瘤细胞凋亡, 促进疾病良好转归^[16]。胡文勇等^[17]认为, 抑制 Wnt/β-catenin 信号通路有助于增

表5 研究组不同化疗疗效组织 β-catenin、Wnt1 表达水平比较

Table 5 Comparison of expression levels of β-catenin and wnt1 in different chemotherapy effect tissues of study group ($\bar{x} \pm s$)

| 疗效分级 | n | Wnt1 ($2^{-\Delta\Delta C}$) | | β-catenin ($2^{-\Delta\Delta C}$) | |
|------|----|--------------------------------|------------|-------------------------------------|-------------|
| | | 化疗前 | 化疗后 | 化疗前 | 化疗后 |
| CR | 10 | 15.53±4.60 | 12.44±3.73 | 33.39±11.85 | 22.78±6.84 |
| PR | 56 | 16.35±4.05 | 14.89±4.46 | 33.95±11.38 | 26.61±7.99 |
| SD | 30 | 16.89±3.97 | 18.56±5.57 | 34.89±10.29 | 35.57±10.67 |
| PD | 20 | 17.11±3.56 | 21.67±4.26 | 34.73±10.42 | 40.33±12.10 |
| F 值 | | 0.467 | 14.572 | 0.081 | 15.366 |
| P 值 | | 0.706 | <0.001 | 0.970 | <0.001 |

表6 β -catenin、Wnt1 与新辅助化疗疗效关系Table 6 Relationship between β -catenin, wnt1 and neoadjuvant chemotherapy

| 因素 | β 值 | S.E. 值 | Wald/ χ^2 值 | P 值 | OR 值 | 95%CI |
|------------------|-----------|--------|------------------|--------|-------|--------------|
| β -catenin | 1.046 | 0.424 | 6.081 | <0.001 | 2.845 | 1.212~6.678 |
| Wnt1 | 1.512 | 0.611 | 6.127 | <0.001 | 4.538 | 2.034~10.123 |

强骨肉瘤细胞化疗敏感性,改善患者生存期,为临床调整化疗方案提供理论参考。由此可见,Wnt/ β -catenin 信号通路可为肿瘤分子靶向治疗提供新手段,但关于其在宫颈癌新辅助化疗中作用尚无相关研究,故本研究对此进行探讨结果发现 β -catenin、Wnt1 可作为评估宫颈癌新辅助化疗的指标之一。

综上所述,宫颈癌患者组织 β -catenin、Wnt1 呈高表达,其表达情况与临床病理特征、新辅助化疗疗效密切相关,有利于宫颈癌早期鉴别诊断及指导临床治疗。

参考文献

- [1] Ding YX, Cheng Y, Sun QM, et al. Mechanical characterization of cervical squamous carcinoma cells by atomic force microscopy at nanoscale[J]. Med Oncol, 2015, 32(3): 71.
- [2] 蓝家富. 防城港市 2292 例女性宫颈 HPV 感染与基因分型分析[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2019, 11(3): 204-208.
- [3] 李娜, 李辉, 马春雨, 等. 紫杉醇联合顺铂新辅助化疗与同步放疗在局部晚期宫颈癌中的疗效评价[J]. 中国妇产科临床杂志, 2019, 20(3): 227-229.
- [4] Benson R, Pathy S, Kumar L, et al. Locally advanced cervical cancer neoadjuvant chemotherapy followed by concurrent chemoradiation and targeted therapy as maintenance: a phase II study[J]. J Cancer Res Ther, 2019, 15(6): 1359-1364.
- [5] Chen M, Li L, Zheng PS, et al. Sall4 promotes the tumorigenicity of cervical cancer cells through activation of the wnt/ β -catenin pathway via ctnnb1 [J]. Cancer Sci, 2019, 110(9): 2794-2805.
- [6] Zhang L, Li Y, Sona L, et al. Long non-coding rna rp11-480I12.5 promotes cervical carcinoma progression by regulating the wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. Oncol Lett, 2020, 19(1): 469-475.
- [7] 中华医学会病理学分会, 女性生殖系统疾病学组, 中国优生科学协会阴道镜和宫颈病理学分会, 等. 宫颈癌及癌前病变病理诊断规范[J]. 中华病理学杂志, 2019, 48(4): 265-269.
- [8] 子宫肌瘤的诊治中国专家共识专家组, 妇产科相关专家组. 子宫肌瘤的诊治中国专家共识[J]. 中华妇产科杂志, 2017, 52(12): 793-800.
- [9] 杨利, 徐志渊, 李济时, 等. 顺铂加卡培他滨诱导化疗治疗局部晚期鼻咽癌的疗效及毒副反应[J]. 现代肿瘤医学, 2018, 26(4): 516-519.
- [10] 李诗韵, 饶进军. 下调 SUZ12 抑制人宫颈癌细胞的增殖及作用机制[J]. 中国热带医学, 2019, 19(3): 209-214.
- [11] 文丽芳, 丁洁. 5-氟尿嘧啶在 HPV 阳性宫颈癌细胞凋亡信号通路 Wnt/ β -catenin 中的作用及与 T 淋巴细胞的相关性[J]. 免疫学杂志, 2019, 35(6): 526-531.
- [12] Sato M, Yamamoto H, Hatanaka Y, et al. Wnt/ β -catenin signal alteration and its diagnostic utility in basal cell adenoma and histologically similar tumors of the salivary gland [J]. Pathol Res Pract, 2018, 214(4): 586-592.
- [13] 靳妍霞, 赵军峰, 郭纪红, 等. 吉西他滨对宫颈癌患者癌组织血管新生能力和 wnt 通路影响的临床观察[J]. 中国性科学, 2019, 28(9): 33-36.
- [15] 郑小妹, 李伟宏, 吴丹梅, 等. 宫颈癌患者 β -Catenin、Vimentin、Ezrin 及 P63 水平与临床病理特征及预后的关系[J]. 肿瘤药学, 2017, 7(4): 416-420.
- [16] Li H, Jiao S, Li X, et al. Therapeutic effects of antibiotic drug tigecycline against cervical squamous cell carcinoma by inhibiting wnt/ β -catenin signaling [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015, 467(1): 14-20.
- [17] 张熙, 王光杰, 张娟, 等. 盐酸戊乙奎醚对肝缺血再灌注致肺损伤的保护作用[J]. 热带医学杂志, 2018, 18(8): 1048-1050, 1046, 1132.
- [19] 胡文勇, 莫金君, 李军, 等. Wnt- β -catenin 信号通路对骨肉瘤细胞化疗敏感性研究[J]. 现代生物医学进展, 2015, 15(29): 5633-5636, 5657.

miR-26a 靶向 ADAM10 对类风湿关节炎滑膜成纤维细胞增殖及迁移的影响

于守杰* 张振春 厉彦山 张丽丽

[摘要] 目的 探讨 miR-26a 对类风湿关节炎滑膜成纤维细胞增殖及迁移的影响及分子机制。方法 实验设置对照(Con)组、脂多糖(LPS)组、LPS+miR-NC组、LPS+miR-26a组、LPS+pcDNA3.1组、LPS+pcDNA3.1-ADAM10组、LPS+miR-26a+pcDNA3.1组、LPS+miR-26a+pcDNA3.1-ADAM10组。实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)检测 miR-26a 表达水平;细胞计数试剂盒 8(CCK-8)检测细胞活性;克隆形成实验检测细胞克隆形成数;蛋白质印迹(Western blot)法检测解整合素金属蛋白酶 10(ADAM10)、细胞增殖核抗原 Ki67(Ki-67)、神经钙黏蛋白(N-cadherin)、上皮钙黏蛋白(E-cadherin)蛋白表达;Transwell 检测细胞迁移;双荧光素酶报告实验验证 miR-26a 和 ADAM10 的靶向关系。结果 与对照组相比,LPS 组 miR-26a 表达水平显著降低,细胞活性显著升高,克隆形成数及迁移细胞数显著升高,Ki67、N-cadherin 表达水平显著升高,E-cadherin 表达水平显著降低($P<0.05$)。过表达 miR-26a 抑制类风湿关节炎滑膜成纤维细胞增殖、迁移。miR-26a 靶向 ADAM10,过表达 ADAM10 逆转了 miR-26a 对类风湿关节炎滑膜成纤维细胞增殖、迁移的抑制作用。结论 过表达 miR-26a 可能通过靶向下调 ADAM10 抑制类风湿关节炎滑膜成纤维细胞的增殖、迁移。

[关键词] miR-26a; ADAM10; 类风湿关节炎; 滑膜成纤维细胞; 增殖; 迁移

Effects of miR-26a targeting ADAM10 on the proliferation and migration of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts

YU Shoujie, ZHANG Zhenchun, LI Yanshan, ZHANG Lili

(Department of rheumatology, linyi people's hospital, Linyi, Shangdong, China, 276000)

[ABSTRACT] Objective To investigate the effect and mechanism of miR-26a on the proliferation and migration of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. **Methods** Experimental settings: control (Con) group, lipopolysaccharide (LPS) group, LPS+miR-NC group, LPS+miR-26a group, LPS+pcDNA3.1 group, LPS+pcDNA3.1-ADAM10 group, LPS+miR-26a+ pcDNA3.1 group, LPS+miR-26a+pcDNA3.1-ADAM10 group. Real-time fluorescent quantitative PCR (RT-qPCR) was used to detect miR-26a expression. Cell Counting Kit 8 (CCK-8) was used to detect cell viability; clone formation test was used to detect the number of cell clone formation. Western blot was used to detect the expression of a disintegrin and metalloproteinase 10 (ADAM10), cell proliferation nuclear antigen Ki67 (Ki-67), neurocadherin (N-cadherin), and epithelial cadherin (E-cadherin) protein expression. Transwell was used to detect cell migration; dual luciferase reporting experiment was used to verify the targeting relationship between miR-26a and ADAM10. **Results** Compared with the control group, the expression of miR-26a in the LPS group was significantly reduced, the cell activity, the number of colony formation, the number of migrating cells, the expressions of Ki67 and N-cadherin were significantly increased, and the expression of E-cadherin was significantly decreased ($P<0.05$). Overex-

基金项目:临沂市科技发展项目(201515002)

作者单位:山东省临沂市人民医院风湿免疫科,山东,临沂 276000

*通信作者:于守杰, E-mail:ysj13395393966@163.com

pression of miR-26a can inhibit the proliferation and migration of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. miR-26a targets ADAM10, overexpression of ADAM10 can reverse the inhibitory effect of miR-26a on the proliferation and migration of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. **Conclusions** Overexpression of miR-26a may inhibit the proliferation and migration of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts by targeting down-regulation of ADAM10.

[KEY WORDS] miR-26a; ADAM10; rheumatoid arthritis; fibroblast-like synoviocyte; proliferation; migration

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种以关节滑膜浸润性增生、关节软骨和骨质破坏为主要病理改变的慢性自身免疫性疾病^[1]。成纤维样滑膜细胞(fibroblast-like synoviocyte, FLS)在RA中起重要作用,FLS的异常增殖造成的滑膜增生可造成关节畸形,进而加重RA,严重危害患者身体健康^[2]。因此,通过抑制FLS的异常增殖、迁移从而抑制滑膜增生是改善关节炎的重要途径。研究表明miRNA可通过参与调控FLS的增殖、迁移影响RA进展^[3]。李广科等^[4]研究发现RA患者关节滑液及外周血中miR-26a异常高表达,其与病情活动程度及炎症程度密切相关,miR-26a的异常表达可能与病变滑膜组织及浸润细胞的分泌有关。但miR-26a影响RA的具体机制尚不清楚。解整合素金属蛋白酶10(a disintegrin and metalloproteinase 10, ADAM10)属于ADAM家族,是一种跨膜蛋白,研究报道沉默ADAM10可促进类风湿关节炎滑膜成纤维细胞凋亡,减少炎性因子的分泌^[5]。抑制ADAM10可抑制类风湿关节炎中成纤维样滑膜细胞的迁移和侵袭^[6]。因此,本实验旨在研究miR-26a对RA-FLS增殖、迁移的影响及机制是否与ADAM10有关。

1 材料与方法

1.1 材料

类风湿性关节炎成纤维滑膜细胞系MH7A购自美国ATCC;胎牛血清、DMEM培养基购自武汉益普生物科技有限公司;脂多糖(LPS)购自上海广锐生物科技有限公司;荧光定量试剂盒购自上海恒斐生物科技有限公司;细胞计数试剂盒8(CCK-8)购自杭州仟诺生物科技有限公司;RIPA蛋白裂解液、二辛可宁酸(bicinchoninic acid, BCA)试剂盒购自上海源叶生物科技有限公司;ADAM10、Ki-67、N-cadherin、E-cadherin、GAPDH抗体及山羊抗兔IgG-HRP购自上海恒斐生物科技有限公司;Transwell小室购自上海研卉生物科技有限公司;双荧光

素酶报告基因检测试剂盒购自北京索莱宝公司。

1.2 细胞处理与分组

MH7A细胞用含10%胎牛血清的DMEM培养基在37℃恒温培养箱培养,取对数生长期细胞,用1 μg/mL的LPS处理MH7A记为LPS组,正常培养的细胞作为对照(Con)组;将miR-NC、miR-26a、pcDNA3.1、pcDNA3.1-ADAM10分别转染至MH7A中,再用1 μg/mL的LPS处理,记为LPS+miR-NC组、LPS+miR-26a组、LPS+pcDNA3.1组、LPS+pcDNA3.1-ADAM10组。将miR-26a分别与pcDNA3.1、pcDNA3.1-ADAM10共转染至MH7A中,再用1 μg/mL的LPS处理,记为LPS+miR-26a+pcDNA3.1组、LPS+miR-26a+pcDNA3.1-ADAM10组。

1.3 CCK-8检测细胞增殖活性

将细胞以 1×10^4 个/孔接种于96孔板,培养24 h时每孔中加入10 μL CCK-8试剂,孵育2 h,酶标仪检测490 nm波长处的吸光度值(OD)。细胞增殖活性(%)=实验组OD值/空白对照组OD值 $\times 100\%$ 。

1.4 克隆形成实验检测细胞克隆形成数

调整细胞浓度为 1×10^4 个/mL,以每孔100个接种于六孔板中,每组设3个复孔,培养2周出现肉眼可见克隆时终止培养,PBS清洗2遍,甲醇固定15 min,吉姆萨染色30 min,在低倍光学显微镜下计数 >50 个细胞的集落。

1.5 Transwell检测细胞迁移

将600 μL培养液和100 μL细胞悬液加入Transwell小室的下室和上室,放入细胞培养箱中培养24 h,4%多聚甲醛固定30 min,PBS溶液冲洗2次,室温下加入0.1%结晶紫染色30 min。冲洗2次,用无菌棉球轻轻擦去上室表面细胞,显微镜下随机观察5个视野,计算细胞迁移数目。

1.6 双荧光素酶报告实验验证miR-26a和ADAM10的靶向关系

构建含miR-26a结合位点的ADAM10野生型和突变型载体荧光素酶表达载体,将其分别与miR-NC、

miR-26a 共转染至细胞 MH7A 中, 转染 48 h 后, 根据双荧光素酶报告基因检测试剂盒说明检测荧光素酶活性。

1.7 统计学分析

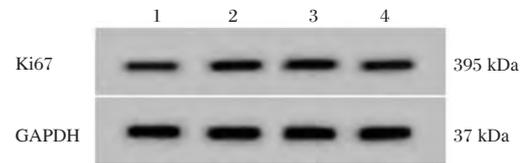
采用 SPSS 20.0 软件进行数据分析, 计量资料用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组比较行 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-26a 对类风湿关节炎滑膜成纤维细胞增殖的影响

与对照组相比, LPS 组 miR-26a 表达水平显著

降低, 细胞活性显著升高, 克隆形成数显著升高, Ki67 表达水平显著升高 ($P < 0.05$); 与 LPS+miR-NC 组相比, LPS+miR-26a 组 miR-26a 表达水平显著升高, 细胞活性显著降低, 克隆形成数显著降低, Ki67 表达水平显著降低 (图 1, 表 1)。



注: 1. Con; 2. LPS; 3. LPS+miR-NC; 4. LPS+miR-26a。

图 1 Ki67 蛋白的表达

Figure 1 Ki67 protein expression

表 1 miR-26a 对类风湿关节炎滑膜成纤维细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effects of miR-26a on the proliferation of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts ($\bar{x} \pm s$)

| 分组 | <i>n</i> | miR-26a | OD 值 | 克隆形成数 | Ki67 |
|---------------|----------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|
| Con 组 | 9 | 0.95±0.05 | 0.43±0.03 | 50.04±5.54 | 0.20±0.02 |
| LPS 组 | 9 | 0.25±0.02 ^a | 1.21±0.08 ^a | 122.58±9.73 ^a | 0.76±0.05 ^a |
| LPS+miR-NC 组 | 9 | 0.26±0.02 | 1.20±0.08 | 123.07±8.07 | 0.76±0.04 |
| LPS+miR-26a 组 | 9 | 0.82±0.04 ^{bc} | 0.61±0.04 ^{bc} | 66.60±6.21 ^{bc} | 0.34±0.03 ^{bc} |
| <i>F</i> 值 | | 992.816 | 380.765 | 225.177 | 555.333 |
| <i>P</i> 值 | | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |

注: 与 Con 相比, ^a $P < 0.05$; 与 LPS 相比, ^b $P < 0.05$; 与 LPS+miR-NC 相比, ^c $P < 0.05$ 。

2.2 miR-26a 对类风湿关节炎滑膜成纤维细胞迁移的影响

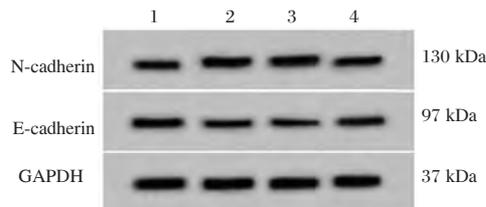
与对照组相比, LPS 组迁移细胞数显著升高, N-cadherin 表达水平显著升高, E-cadherin 表达水平显著降低 ($P < 0.05$); 与 LPS+miR-NC 组相比, LPS+miR-26a 组迁移细胞数显著降低, N-cadherin 表达水平显著降低, E-cadherin 表达水平显著降低 (图 2, 表 2)。

表 2 miR-26a 对类风湿关节炎滑膜成纤维细胞迁移的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of miR-26a on the migration of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts ($\bar{x} \pm s$)

| 分组 | <i>n</i> | 迁移细胞数 | N-cadherin | E-cadherin |
|---------------|----------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Con 组 | 9 | 51.64±4.86 | 0.29±0.03 | 0.71±0.04 |
| LPS 组 | 9 | 129.27±6.73 ^a | 0.84±0.06 ^a | 0.17±0.01 ^a |
| LPS+miR-NC 组 | 9 | 129.03±6.77 | 0.85±0.06 | 0.18±0.01 |
| LPS+miR-26a 组 | 9 | 68.22±5.50 ^{bc} | 0.37±0.03 ^{bc} | 0.54±0.03 ^{bc} |
| <i>F</i> 值 | | 407.921 | 357.967 | 964.444 |
| <i>P</i> 值 | | 0.000 | 0.000 | 0.000 |

注: 与 Con 相比, ^a $P < 0.05$; 与 LPS 相比, ^b $P < 0.05$; 与 LPS+miR-NC 相比, ^c $P < 0.05$ 。



注: 1. Con; 2. LPS; 3. LPS+miR-NC; 4. LPS+miR-26a。

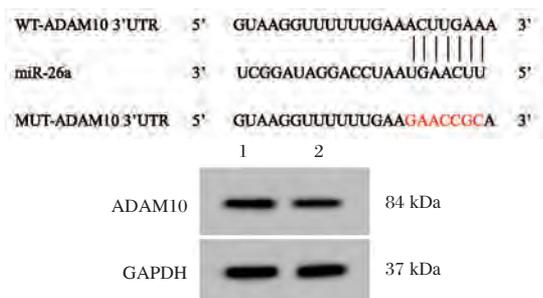
图 2 N-cadherin、E-cadherin 蛋白的表达

Figure 2 N-cadherin and E-cadherin protein expression

2.3 miR-26a 靶向 ADAM10

TargetScan 数据库预测显示 miR-26a 与 AD-

AM10 存在结合位点 (图 3)。荧光素酶报告实验显示, 与 miR-NC 组相比, miR-26a 组中转染 ADAM10 野生型表达载体的细胞荧光素酶活性显著降低 ($P < 0.05$); 而转染 ADAM10 突变型表达载体的细胞荧光素酶活性比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (表 3)。与 miR-NC 组相比, miR-26a 组 ADAM10 表达水平显著降低 ($P < 0.05$) (表 4)。



注: 1. miR-NC; 2. miR-26a。

图3 miR-26a靶向ADAM10(A)及ADAM10蛋白(B)的表达

Figure 3 miR-26a targets ADAM10 (A) and ADAM10 protein (B) expression

表3 双荧光素酶实验 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Double luciferase experiments ($\bar{x} \pm s$)

| 分组 | n | WT-ADAM10 | MUT-ADAM10 |
|----------|---|-----------|------------|
| miR-NC组 | 9 | 1.00±0.06 | 0.99±0.05 |
| miR-26a组 | 9 | 0.16±0.01 | 0.96±0.06 |
| t值 | | 41.429 | 1.152 |
| P值 | | 0.000 | 0.266 |

表4 miR-26a调控ADAM10的表达 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 miR-26a regulates ADAM10 expression ($\bar{x} \pm s$)

| 分组 | n | ADAM10 |
|---------|---|-----------|
| miR-NC | 9 | 0.58±0.03 |
| miR-26a | 9 | 0.21±0.01 |
| t值 | | 35.101 |
| P值 | | 0.000 |

表5 ADAM10对类风湿关节炎滑膜成纤维细胞增殖、迁移的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Effects of ADAM10 on the proliferation and migration of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts ($\bar{x} \pm s$)

| 分组 | n | OD值 | 克隆形成数 | 迁移细胞数 | Ki67 | N cadherin | E cadherin |
|------------------------------|---|-----------|-------------|-------------|-----------|------------|------------|
| LPS+miR 26a +pcDNA3.1 | 9 | 0.61±0.04 | 66.58±5.79 | 68.23±5.55 | 0.33±0.03 | 0.37±0.04 | 0.54±0.03 |
| LPS+miR 26a +pcDNA3.1 ADAM10 | 9 | 1.05±0.11 | 108.24±7.35 | 114.15±7.32 | 0.57±0.04 | 0.68±0.05 | 0.27±0.02 |
| t值 | | 11.278 | 13.357 | 14.997 | 14.400 | 14.524 | 22.465 |
| P值 | | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |

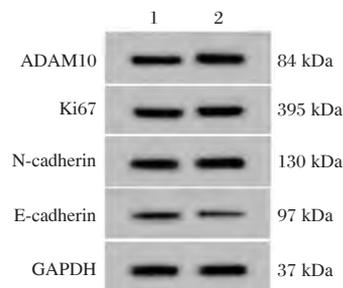
表6 ADAM10能逆转miR-26a对类风湿关节炎滑膜成纤维细胞增殖、迁移的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 6 ADAM10 can reverse the effect of miR-26a on the proliferation and migration of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts ($\bar{x} \pm s$)

| 分组 | n | ADAM10 | OD值 | 克隆形成数 | 迁移细胞数 | Ki67 | N-cadherin | E-cadherin |
|----------------------|---|------------------------|------------------------|---------------------------|--------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| LPS+pcDNA3.1组 | 9 | 0.54±0.04 | 1.22±0.07 | 122.60±9.71 | 129.28±6.81 | 0.76±0.05 | 0.83±0.06 | 0.18±0.01 |
| LPS+pcDNA3.1-ADAM10组 | 9 | 1.18±0.12 ^a | 1.55±0.13 ^a | 161.73±10.04 ^a | 172.72±7.03 ^a | 1.15±0.11 ^a | 1.24±0.12 ^a | 0.06±0.01 ^a |
| t值 | | 15.179 | 6.705 | 8.405 | 13.315 | 9.683 | 9.168 | 25.456 |
| P值 | | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |

2.4 ADAM10对类风湿关节炎滑膜成纤维细胞增殖、迁移的影响

与LPS+pcDNA3.1组相比, LPS+pcDNA3.1-ADAM10组ADAM10表达水平显著升高, 细胞活性显著升高, 克隆形成数及迁移细胞数显著升高, Ki67、N-cadherin表达水平显著升高, E-cadherin表达水平显著降低 ($P<0.05$) (图4, 表5)。

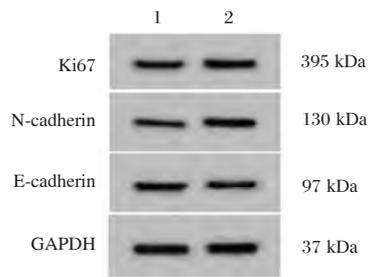


注: 1. LPS+pcDNA3.1; 2. LPS+pcDNA3.1-ADAM10。

图4 ADAM10、Ki67、N-cadherin、E-cadherin蛋白的表达
Figure 4 Expression of ADAM10, Ki67, N-cadherin, and E-cadherin proteins

2.5 ADAM10能逆转miR-26a对类风湿关节炎滑膜成纤维细胞增殖、迁移的影响

与LPS+miR-26a+pcDNA3.1组相比, LPS+miR-26a+pcDNA3.1-ADAM10组细胞活性显著升高, 克隆形成数及迁移细胞数显著升高, Ki67、N-cadherin表达水平显著升高, E-cadherin表达水平显著降低 ($P<0.05$)。见表6、图5。



注: 1. LPS+miR-miR-26a+pcDNA3.1; 2. LP+miR-26a+pcDNA3.1-ADAM10。

图5 Ki67、N-cadherin、E-cadherin 蛋白的表达

Figure 5 Ki67, N-cadherin, E-cadherin protein expression

3 讨论

RA是自身免疫性疾病,其主要的病理特点是滑膜增生并侵蚀关节软骨和骨质,最终导致关节破坏畸形;FLS在RA的发生发展中起重要作用,寻找与FLS相关的RA治疗靶点,通过阻断滑膜增生和骨质侵蚀来阻断或延缓RA的进展对治疗RA具有重要的理论与现实意义^[7]。且miR-26a可改善大鼠的关节炎^[8]。为研究miR-26a是否影响FLS进而影响RA,本实验用LPS处理MH7A细胞模拟RA体内环境,结果显示LPS可诱导FLS增殖和迁移,表明类风湿关节炎滑膜成纤维细胞模型建立成功。且本实验结果显示miR-26a表达水平显著降低,与前人研究结果相符。本实验结果提示miR-26a可能是与FLS相关的RA靶点。

已有研究报道RA血清中ADAM10高表达,ADAM10可介导类风湿关节炎中的单核细胞迁移和粘附^[9]。ADAM10是托珠单抗治疗RA疗效的预测指标^[10]。表明ADAM10不仅影响RA发生发展,还可作为其预测指标。而本实验结果显示,过表达ADAM10可促进类风湿关节炎滑膜成纤维细胞增殖、迁移。表明ADAM10可参与调控RA-FLS的增殖、迁移。此外,还有研究报道miR-152可通过靶向ADAM10抑制RA-FLS增殖并诱导凋亡^[11]。为研究miR-26a影响RA-FLS增殖、迁移的机制是否与ADAM10有关,本实验通过TargetScan数据库预测miR-26a可能的靶mRNA,结果显示miR-26a与ADAM10的3'UTR存在结合位点,双荧光素酶报告实验表明miR-26a靶向负调控ADAM10表达。本实验同时过表达ADAM10和miR-26a后,结果显示过表达ADAM10逆转了miR-26a对RA-FLS增

殖、迁移的抑制作用。提示,miR-26a可能通过调控ADAM10影响RA-FLS增殖、迁移。

综上所述,过表达miR-26a可能通过靶向下调ADAM10抑制类风湿关节炎滑膜成纤维细胞的增殖、迁移。为通过靶向抑制FLS的异常增殖、迁移从而抑制滑膜增生是改善类风湿关节炎提供了新靶点和理论依据。

参考文献

- [1] 陈丹娜,刘冬冬,徐建华,等. 类风湿关节炎 survivin, CD95及PTEN相关信号分子研究进展[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2014, 6(3): 211-216.
- [2] Jia W, Wu W, Yang D, et al. Histone demethylase JMJD3 regulates fibroblast-like synoviocyte-mediated proliferation and joint destruction in rheumatoid arthritis [J]. FASEB J, 2018, 32(7):4031-4042.
- [3] Liu J, Fei D, Xing J, et al. MicroRNA-29a inhibits proliferation and induces apoptosis in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes by repressing STAT3. [J]. Biomed Pharmacother, 2017, 96:173-181.
- [4] 李广科,李娟,赵亚伟,等. RA患者关节滑液及外周血中miR-26a和TLR3的表达[J]. 热带医学杂志, 2018, 18(5): 593-597.
- [5] 王培,楚天舒,阎磊,等. siRNA沉默ADAM10基因对类风湿关节炎滑膜成纤维细胞凋亡的影响[J]. 中国医药生物技术, 2019, 14(2): 136-141.
- [6] Li D, Xiao Z, Wang G, et al. Knockdown of ADAM10 inhibits migration and invasion of fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis[J]. Mol Med Rep, 2015,12(4):5517-5523.
- [7] Yan ZF, Zhao XY, Liu W, et al. UCA1 impacts progress of rheumatoid arthritis by inducing the apoptosis of fibroblast-like synoviocyte[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018, 22(4):914-920.
- [8] Jiang C, Zhu W, Xu J, et al. MicroRNA-26a negatively regulates toll-like receptor 3 expression of rat macrophages and ameliorates pristane induced arthritis in rats [J]. Arthritis Res Ther, 2014, 16(1): R9.
- [9] Isozaki T, Ishii S, Nishimi S, et al. A disintegrin and metalloprotease-10 is correlated with disease activity and mediates monocyte migration and adhesion in rheumatoid arthritis [J]. Transl Re, 2015, 116(3): 244-253.
- [10] Isozaki T, Nishimi S, Nishimi A, et al. A disintegrin and metalloproteinase (ADAM)-10 as a predictive factor for tocilizumab effectiveness in rheumatoid arthritis [J]. Mod Rheumatol, 2017, 27(5): 782-786.
- [11] Guo J, Du J, Fei D, et al. miR-152 inhibits rheumatoid arthritis synovial fibroblast proliferation and induces apoptosis by targeting ADAM10 [J]. Int J Mol Med, 2018, 42(1): 643-650.

miRNA-193b、Lp-PLA2、miR-146a与阿尔茨海默病严重程度的关系及预测疗效的价值

尚晓峰* 冉秀荣 李虹

【摘要】目的 探讨miRNA-193b、Lp-PLA2、miR-146a与阿尔茨海默病(AD)严重程度的关系及预测疗效的价值。**方法** 选取2016年1月至2019年6月本院收治的114例AD患者,根据病情分为轻度组($n=35$)、中度组($n=49$)、重度组($n=30$),比较各组miRNA-193b mRNA、Lp-PLA2、miR-146a mRNA水平、简易精神状态检查量表(MMSE)、神经精神问卷(NPI)评分,采用Spearman分析各指标与病情分级的相关性,采用Pearson分析各指标与MMSE、NPI评分的相关性,采用接收者操作特征(ROC)曲线及ROC下面积(AUC)分析各指标预测疗效的价值。**结果** miRNA-193b mRNA与病情分级呈负相关,与MMSE评分呈正相关;与NPI评分呈负相关;Lp-PLA2、miR-146a mRNA与病情分级呈正相关,与MMSE评分呈负相关,与NPI评分呈正相关,差异有统计学意义($P<0.05$);miRNA-193b mRNA与Lp-PLA2、miR-146a mRNA呈负相关,Lp-PLA2与miR-146a mRNA呈正相关($P<0.05$);miR-146a mRNA预测疗效的AUC为0.796,高于miRNA-193b mRNA预测疗效AUC的0.766及Lp-PLA2预测疗效AUC的0.741,但低于3指标联合的AUC($P<0.05$)。**结论** miRNA-193b、Lp-PLA2、miR-146a与AD严重程度显著相关,3者可相互影响,共同参与AD病情进展,检测3者表达有望成为预测疗效的新型方案。

【关键词】 miRNA-193b; Lp-PLA2; miR-146a; 阿尔茨海默病; ROC

The relationship between miRNA-193b, Lp-PLA2, miR-146a and the severity of Alzheimer's disease and the value of predicting efficacy

SHANG Xiaofeng*, RAN Xiurong, LI Hong

(Department of general medicine, shangqiu first people's hospital, Shangqiu, Henan, China, 476000)

【ABSTRACT】 Objective To investigate the relationship between miRNA-193b, Lp-PLA2, miR-146a and the severity of Alzheimer's disease (AD) and the value of predicting efficacy. **Methods** From January 2016 to June 2019, 114 patients with AD who were treated in our hospital were selected, and divided into mild group ($n=35$), moderate group ($n=49$) and severe group ($n=30$) according to the condition, the levels of miRNA-193b mRNA, Lp-PLA2, miR-146a mRNA, Mini Mental State Examination Scale (MMSE), and Neuropsychiatric Questionnaire (NPI) scores in each group were compared, Spearman was used to analyze the correlation between each index and disease grade, and Pearson was used to analyze the correlation between each index and MMSE and NPI scores, the receiver operating characteristic (ROC) curve and the area under the ROC (AUC) were used to analyze the predictive value of each index. **Results** miRNA-193b was negatively correlated with disease grade, positively correlated with MMSE score, and negatively correlated with NPI score. Lp-PLA2, miR-146a was positively correlated with the disease grade, negatively correlated with the MMSE score, and positively correlated with the NPI score ($P<0.05$). miRNA-193b was negatively correlated with Lp-PLA2 and miR-146a, Lp-PLA2 was positively correlated with miR-146a ($P<0.05$). The AUC of miR-146a predictive effect was 0.796, which was higher than that of miRNA-193b predictive effect AUC of 0.766 and Lp-PLA2 predictive effect AUC of 0.741, but lower than the combined AUC of the three indicators ($P<0.05$). **Conclusion** miRNA-193b, Lp-PLA2, and miR-146a are significantly related to the severity of

基金项目:河南省医学科技攻关计划项目(2011030040)

作者单位:商丘市第一人民医院全科医学科,河南,商丘476000

*通信作者:尚晓峰, E-mail: Shangxf1984@163.com

AD. The three can interact with each other and participate in the progression of AD. The detection of the expression of the three is expected to become a new method for predicting the efficacy.

[KEY WORDS] miRNA-193b; Lp-PLA2; miR-146a; Alzheimer's disease; ROC

脂蛋白相关磷脂酶 A2 (lipoprotein-associated phospholipase A2, Lp-PLA2) 被证实与 (Alzheimer's disease, AD) 患病风险增加有关, 并在 AD 患者治疗后明显降低^[1]。微小核糖核酸-146a (microRNA-146a, miR-146a) 在 AD 动物的海马中表达显著增加, 故推测可能与 AD 有关^[2]。微小核糖核酸-193b (microRNA-193b, miR-193b) 是 AD 患者和正常人群的外周血转录差异表达基因之一, 与 AD 发病有关^[3]。且国外相关报道^[4]显示, miR-146a 等多种微小 RNA 与 AD 患者认知功能和大脑皮质变化有关, 有作为认知功能变化、治疗效果预测标志物的潜质。且曹舸等^[5]研究发现, 心肌梗死患者微小 RNA 表达与 Lp-PLA2 呈正相关, 可调控 Lp-PLA2 水平。因此推测 miRNA-193b、Lp-PLA2、miR-146a 可能以 AD 为媒介, 具有某种关系, 共同参与了 AD 发病, 但现阶段关于三者之间关系及其在 AD 病程作用报道的鲜见。鉴于此本研究将探讨 miRNA-193b、Lp-PLA2、miR-146a 与 AD 严重程度的关系及预测疗效的价值, 报告如下。

1 资料和方法

1.1 一般资料

选取 2016 年 1 月至 2019 年 6 月本院收治的 114 例 AD 患者, 根据病情分为轻度组 ($n=35$)、中度组 ($n=49$)、重度组 ($n=30$)。入组患者法定监护人均对本研究知情, 自愿签署知情同意书。本实验经医院伦理委员会批准。

纳入标准: ①符合 AD 诊断标准^[6]; ②临床痴呆量表 (Clinical Dementia Scale, CDR) ≥ 0.5 分; ③Hachineski 缺血指数 < 4 分; ④年龄 ≥ 65 岁; ⑤无急慢性感染类疾病。排除标准: ①其他疾病的导致的痴呆或认知功能障碍者; ②合并谵妄者; ③有药物滥用史者; ④以往有严重创伤性脑损伤者; ⑤有抑郁症、精神分裂症者; ⑥合并帕金森病者。

1.2 方法

1.2.1 病情严重程度评估^[7]

采用 CDR 量表评估、简易精神状态检查量表 (Mini-mental State Examination, MMSE)、神经精神问卷 (Neuropsychiatric Inventory, NPI) 评估。

1.2.2 标本采集与检测

于患者入院后治疗前, 采集空腹静脉血 5 mL, 3 000 r/min 离心 15 min, 采用南京诺曼生物技术有限公司免疫增强发光法检测血浆 Lp-PLA2 水平; 采用荧光定量 PCR 法检测血清 miRNA-193b mRNA、miR-146a mRNA 表达。

1.2.3 治疗方法

盐酸多奈哌齐片 (重庆植恩药业有限公司, 国药准字 H20010723) 5 mg/次, 1 次/d, 临睡前口服; 薯蓣健脾益智合剂由本院中药室统一煎制成真空包装, 250 mL/袋, 15 ml/次, 2 次/d, 口服。共治疗 2 个月。

1.2.4 疗效判断

根据临床疗效总评量表 (Clinical Global Impression, CGI) -- 疗效指数 (Efficacy index, EI)^[8] 评估疗效, 分为显效、有效、稍有效、无效或恶化, 其中显效、有效、稍有效为总有效。

1.3 统计学方法

采用 SPSS22.0 软件进行处理数据, 符合正态分布的计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较以单因素方差分析, 两两比较以 LSD-*t* 检验, 计数资料用 $n(\%)$ 表示、 χ^2 检验, 采用 Spearman 分析 miRNA-193b mRNA、Lp-PLA2、miR-146a mRNA 与病情分级的相关性, 采用 Pearson 分析各指标与 MMSE、NPI 评分的相关性, 采用接收者操作特征 (Receiver operating characteristic, ROC) 曲线及 ROC 下面积 (Area under the curve, AUC) 分析各指标预测疗效的价值。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 组一般资料比较

3 组年龄、病程、体质量指数、性别、受教育层次、合并疾病等资料比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

2.2 比较各组 miRNA-193b mRNA、Lp-PLA2、miR-146a mRNA 水平及 MMSE、NPI 评分

轻度组、中度组、重度组随着病情加重, miRNA-193b mRNA、MMSE 评分依次降低, Lp-PLA2、miR-146a mRNA、NPI 评分依次升高 ($P < 0.05$)。见表 2、图 1。

表1 各组临床资料对比 [n(%), ($\bar{x}\pm s$)]
Table 1 Comparison of clinical data of 3 groups [n(%), ($\bar{x}\pm s$)]

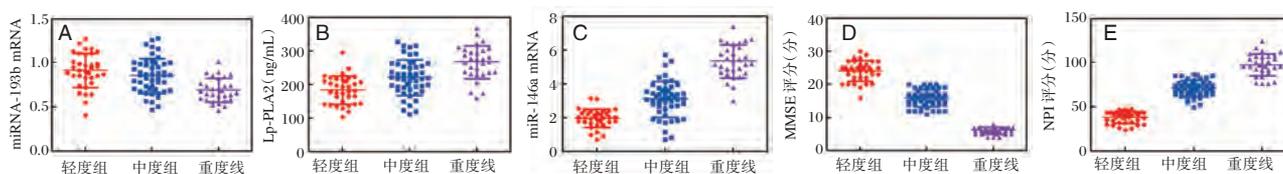
| 资料 | 轻度组(n=35) | 中度组(n=49) | 重度组(n=30) | F/ χ^2 值 | P值 |
|---------------------------|------------|------------|------------|---------------|-------|
| 年龄(岁) | 72.49±7.38 | 72.69±8.57 | 69.06±8.03 | 0.105 | 0.917 |
| 病程(月) | 28.97±9.11 | 29.26±8.75 | 27.46±9.03 | 0.401 | 0.671 |
| 体质量指数(kg/m ²) | 22.26±2.01 | 22.07±1.89 | 22.51±1.72 | 0.508 | 0.603 |
| 性别(男/女) | 16/19 | 20/29 | 12/18 | 0.275 | 0.872 |
| 受教育层次 | | | | | |
| 小学及以下 | 5(14.29) | 4(8.16) | 3(10.00) | | |
| 初中 | 16(45.71) | 24(48.98) | 15(50.00) | 2.023 | 0.918 |
| 高中 | 10(28.57) | 18(36.73) | 10(33.33) | | |
| 大专及以上学历 | 4(11.43) | 3(6.12) | 2(6.67) | | |
| 合并疾病 | | | | | |
| 高脂血症 | 5(14.29) | 7(14.29) | 4(13.33) | 0.017 | 0.992 |
| 糖尿病 | 7(20.00) | 11(22.45) | 5(16.67) | 0.387 | 0.824 |
| 心脏病 | 1(2.86) | 2(4.08) | 2(6.67) | 0.578 | 0.749 |
| 高血压 | 2(5.71) | 4(8.16) | 3(10.00) | 0.417 | 0.812 |

表2 比较各组 miRNA-193b mRNA、Lp-PLA2、miR-146a mRNA 及 MMSE、NPI 评分 ($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Comparison of miRNA-193b mRNA, Lp-PLA2, miR-146a mRNA, MMSE, and NPI scores in each group ($\bar{x}\pm s$)

| 组别 | 例数 | miRNA-193b mRNA | Lp-PLA2(ng/mL) | miR-146a mRNA | MMSE 评分(分) | NPI 评分(分) |
|-----|----|-------------------------|----------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 轻度组 | 35 | 0.96±0.23 ^{ab} | 185.64±47.93 ^{ab} | 1.86±0.54 ^{ab} | 23.84±3.49 ^{ab} | 41.22±8.59 ^{ab} |
| 中度组 | 49 | 0.87±0.19 ^a | 223.51±50.29 ^a | 3.05±1.01 ^a | 15.15±3.02 ^a | 71.18±10.35 ^a |
| 重度组 | 30 | 0.66±0.15 | 259.14±55.83 | 5.36±1.17 | 6.45±1.27 | 96.54±12.48 |
| F 值 | | 20.156 | 16.790 | 114.257 | 302.453 | 227.992 |
| P 值 | | <0.001 | <0.001 | <0.001 | <0.001 | <0.001 |

注:与重度组相比, ^aP<0.05;与中度组相比, ^bP<0.05。



注:A为miRNA-193b mRNA水平;B为Lp-PLA2水平;C为miR-146a mRNA水平;D为MMSE评分;E为NPI评分。

图1 miRNA-193b mRNA、Lp-PLA2、miR-146a mRNA 水平及 MMSE、NPI 评分

Figure 1 miRNA-193b mRNA, Lp-PLA2, miR-146a mRNA levels and MMSE, NPI scores

2.3 分析各指标与病情分级、MMSE、NPI 评分的相关性

miRNA-193b mRNA ($r=-0.358$)与病情分级呈负相关(见图2A), Lp-PLA2 ($r=0.377$)、miR-146a mRNA ($r=0.749$)(见图2B、C)与病情分级呈正相关(P 均<0.05); miRNA-193b mRNA ($r=0.413$)与MMSE评分呈正相关(见图2D), Lp-PLA2 ($r=-0.339$)、miR-146a mRNA ($r=-0.707$)与MMSE评分呈负相关(P 均<0.05)(见图2E、F); miRNA-193b mRNA ($r=-0.348$)与NPI评分呈负相关(见图2G), Lp-PLA2 ($r=0.390$)、miR-146a mRNA ($r=0.609$)与

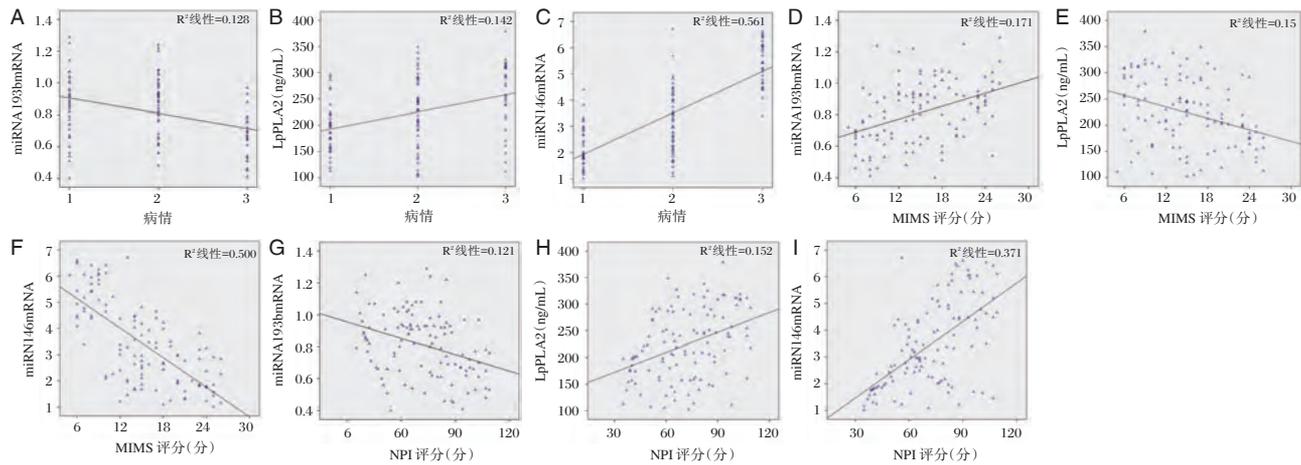
NPI评分呈正相关(P 均<0.05)(见图2H、I)。(病情分级赋值:1=轻度,2=中度,3=重度)。

2.4 miRNA-193b mRNA、Lp-PLA2、miR-146a mRNA 之间的相关性

miRNA-193b mRNA 与 Lp-PLA2 ($r=-0.235, P=0.012$)、miR-146a mRNA ($r=-0.337, P<0.001$)呈负相关, Lp-PLA2 与 miR-146a mRNA 呈正相关($r=0.287, P=0.002$)。

2.5 比较不同疗效者 miRNA-193b mRNA、Lp-PLA2、miR-146a mRNA 水平

总有效患者 miRNA-193b mRNA 高于无效或



注: A 为 miRNA-193b mRNA 与病情分级相关性; B 为 Lp-PLA2 与病情分级相关性; C 为 miR-146a mRNA 与病情分级相关性; D 为 miRNA-193b mRNA 与 MMSE 评分相关性; E 为 Lp-PLA2 与 MMSE 评分相关性; F 为 miR-146a mRNA 与 MMSE 评分相关性; G 为 miRNA-193b mRNA 与 NPI 评分相关性; H 为 Lp-PLA2 与 NPI 评分相关性; I 为 miR-146a mRNA 与 NPI 评分相关性。

图 2 各指标与病情分级、MMSE、NPI 评分的相关性

Figure 2 Correlation between each index and disease grade, MMSE, NPI score

恶化患者, Lp-PLA2、miR-146a mRNA 低于无效或恶化患者 (P 均 < 0.05)。见表 3。

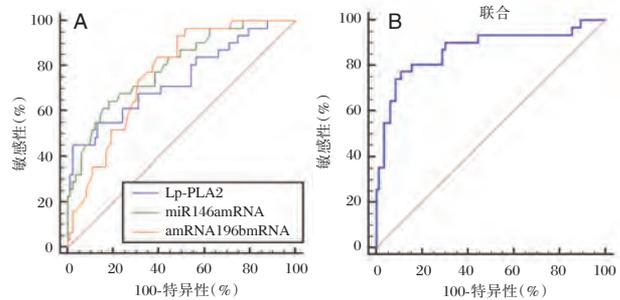
表 3 比较不同疗效者 miRNA-193b mRNA、Lp-PLA2、miR-146a mRNA 水平 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of miRNA-193b mRNA, Lp-PLA2, miR-146a mRNA levels in patients with different curative effects ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | <i>n</i> | miRNA-193b mRNA | Lp-PLA2 (ng/mL) | miR-146a mRNA |
|------------|----------|-----------------|-----------------|---------------|
| 总有效 | 83 | 0.88±0.22 | 213.36±57.44 | 3.06±0.85 |
| 无效或恶化 | 31 | 0.73±0.11 | 242.41±68.99 | 3.91±1.07 |
| <i>t</i> 值 | | 3.624 | 2.272 | 4.418 |
| <i>P</i> 值 | | <0.001 | 0.025 | <0.001 |

2.6 分析各指标预测疗效的价值

miR-146a mRNA 预测疗效的 AUC 为 0.796 (95%CI: 0.710 ~ 0.866), 截断值为 > 3.73 , 敏感度为 64.52%, 特异度为 81.93% ($P < 0.05$); miRNA-193b mRNA 预测疗效的 AUC 为 0.766 (95%CI: 0.678 ~ 0.840), 截断值为 ≤ 0.87 , 敏感度为 93.55%, 特异度为 51.81% ($P < 0.05$); Lp-PLA2 预测疗效的 AUC 为 0.741 (95%CI: 0.651 ~ 0.819), 截断值为 > 245.95 ng/mL, 敏感度为 45.16%, 特异度为 97.59% ($P < 0.05$); 各指标联合检测的 AUC 为 0.870 (95%CI: 0.794 ~ 0.926), 敏感度为 77.42%, 特异度为 89.16% ($P < 0.05$)。见图 3。



注: A. 各指标预测疗效的 ROC 曲线; B. 各指标联合检测的 ROC 曲线。

图 3 ROC 曲线

Figure 3 ROC curve

3 讨论

miRNA-193b 是微小核糖核酸成员之一, 与恶性肿瘤、心肌缺血再灌注损伤等有关, 以往研究指出, 其在 AD 患者中呈低表达, 有望成为 AD 早期诊断的生物标志物^[9]。本研究检测发现 miRNA-193b mRNA 与病情分级、认知功能均有关。可见从基因水平上调 miRNA-193b mRNA 表达可能为预防 AD 病情进展提供了一个新靶点。Kong Y 等^[10]报道显示, 与正常动物相比, miRNA-193 在 AD 动物大脑中表达降低。Yang TT 等^[11]临床实验指出, miRNA-193 在 AD 患者血清中表达低于正常人群。均支持本研究结论。

miR-146a 亦是微小核糖核酸成员之一, 和多种神经系统肿瘤、脑血管疾病等有关, 近年来报

道发现, miR-146a 还与帕金森病、AD 等神经系统变性疾病有关^[12]。因此本研究发现 miR-146a mRNA 参与 AD 病情进展与认知功能损害,提示采用相关药物或技术抑制 miR-146a mRNA 表达可能为预防 AD 病情进展提供了一个新思路。Xue L 等^[13]报道显示,与对照人群相比,AD 患者的血 miR-146a 水平明显更高,本研究观点与之相似。miR-146a 的表达受核因子- κ B 的调控,当 miR-146a 高表达时,可反映核因子- κ B 信号通路被激活,而核因子- κ B 信号通路的激活已被证实与 AD 神经退行病变息息相关,故 miR-146a 可能是联系核因子- κ B 信号通路、AD 神经退行病变的桥梁之一,从而影响 AD 患者病情^[14]。同时本研究还发现,miR-146a mRNA 预测疗效可为临床选取合适的预测疗效指标提供参考。

本研究结果提示靶向 Lp-PLA2,降低 Lp-PLA2 表达,可能有助于 AD 病情的改善,能为抗 AD 药物的研发提供参考。Lp-PLA2 作为一种促炎物质,可增加神经元凋亡率,且还能介导氧化应激反应,除对神经元造成直接损伤外,还能通过其导致的血管损伤,间接诱发神经缺血、坏死,从而参与 AD 病情的进展。同时 Lp-PLA2 预测疗效能为临床预测疗效提供循证依据。

本研究提示 3 指标可相互影响,共同参与 AD 病情的进展。但由于研究观点的新颖性,尚不明确 3 个指标相互影响的详细机制,有待后续的进一步探讨。此外 ROC 分析显示,miRNA-193b、Lp-PLA2、miR-146a 联合预测疗效的 AUC 高于任一单一指标,联合检测 3 个指标能为临床提供更可靠的参考信息。本研究不足之处在于,未具体观察抑制或上调 miRNA-193b、Lp-PLA2、miR-146a 表达对病情的影响,故靶向各指标是否真正意义上有助于防止 AD 病情进展仍需后续的进一步探讨。

综上所述,miRNA-193b、Lp-PLA2、miR-146a 与 AD 严重程度显著相关,3 者可相互影响,共同参与 AD 病情进展,检测 3 者表达有望成为预测疗效的新型方案。

参考文献

[1] 李卓然,魏新华,江新青. 影像技术和分子检测技术在阿尔茨海默病诊断中的应用研究进展[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2019, 11(2):146-151.

- [2] Arena A, Iyer AM, Milenkovic I, et al. Developmental Expression and Dysregulation of miR-146a and miR-155 in Down's Syndrome and Mouse Models of Down's Syndrome and Alzheimer's Disease [J]. *Curr Alzheimer Res*, 2017, 14(12):1305-1317.
- [3] Rahman MR, Islam T, Zaman T, et al. Identification of molecular signatures and pathways to identify novel therapeutic targets in Alzheimer's disease: Insights from a systems biomedicine perspective [J]. *Genomics*, 2020, 112(2):1290-1299.
- [4] Maldonado-Lasuncion I, Atienza M, Sanchez-Espinosa MP, et al. Aging-Related Changes in Cognition and Cortical Integrity are Associated With Serum Expression of Candidate MicroRNAs for Alzheimer Disease [J]. *Cereb Cortex*, 2019, 29(10):4426-4437.
- [5] 曹舸,余惠,范景秀,等. 急性心肌梗死患者体内 miR-208 表达与心肌损伤、血小板活化的相关性分析 [J]. 疑难病杂志, 2019, 18(01):31-34.
- [6] International Working Group. Advancing research diagnostic criteria for Alzheimer's disease: the IWG-2 criteria [J]. *Lancet Neurol*, 2014, 13(6):614-629.
- [7] 姚春娟,乔凌亚,徐小林. 阿尔茨海默病照料者焦虑、抑郁和睡眠现况及其影响因素分析 [J]. 护士进修杂志, 2018, 33(13):1155-1159.
- [8] 王朔,王高华,刘学兵,等. 伏硫西汀治疗抑郁障碍临床疗效评价 [J]. 神经损伤与功能重建, 2019, 14(08):402-404.
- [9] Zhang J, Niu J, Tian B, et al. microRNA-193b protects against myocardial ischemia-reperfusion injury in mouse by targeting mastermind-like 1 [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(8):14088-14094.
- [10] Kong Y, Wu J, Zhang D, et al. The Role of miR-124 in *Drosophila* Alzheimer's Disease Model by Targeting Delta in Notch Signaling Pathway [J]. *Curr Mol Med*, 2015, 15(10):980-989.
- [11] Yang TT, Liu CG, Gao SC, et al. The Serum Exosome Derived MicroRNA-135a, -193b, and -384 Were Potential Alzheimer's Disease Biomarkers [J]. *Biomed Environ Sci*, 2018, 31(2):87-96.
- [12] Slota JA, Booth SA. MicroRNAs in Neuroinflammation: Implications in Disease Pathogenesis, Biomarker Discovery and Therapeutic Applications [J]. *Noncoding RNA*, 2019, 5(2):E35.
- [13] Xue L, Luo S, Ding H, et al. Upregulation of miR-146a-5p is associated with increased proliferation and migration of vascular smooth muscle cells in aortic dissection [J]. *J Clin Lab Anal*, 2019, 33(4):e22843.
- [14] Zhang W, Shao M, He X, et al. Overexpression of microRNA-146 protects against oxygen-glucose deprivation/recovery-induced cardiomyocyte apoptosis by inhibiting the NF- κ B/TNF- α signaling pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(1):1913-1918.

β2-MG、Hcy、Cys-C检测在2型糖尿病视网膜病变诊断中的价值

陈斌 齐晓玲* 徐礼五 胡文文 黄培培

[摘要] 目的 探讨血清β2微球蛋白(β2-MG)、同型半胱氨酸(Hcy)、胱抑素C(Cys-C)联合检测对2型糖尿病视网膜病变(DR)的诊断价值。方法 收集本院2018年1月至2020年2月收治的2型糖尿病(T2DM)患者173例,根据眼底病变分组,NDR组(国际临床分级1期)T2DM无视网膜病变者61例,NPDR组(国际临床分级2~4期)非增殖期糖尿病视网膜病变者53例,PRD组(国际临床分级5期)增殖期糖尿病视网膜病变者59例。比较各组血清β2-MG、Hcy、Cys-C水平,Pearson法分析DR患者血清β2-MG、Hcy、Cys-C相关性,Logistic多元回归法分析DR危险因素,绘制ROC曲线。结果 各组T2DM病程、SBP、HbA1C、β2-MG、Hcy、Cys-C等指标比较,PRD组>NPDR组>NDR组,差异有统计学意义($P<0.05$)。血清β2-MG、Hcy、Cys-C与DR患者T2DM病程、SBP、HbA1C均呈正相关($P<0.05$),且DR患者血清β2-MG、Hcy、Cys-C指标相关性分析亦均呈正相关($P<0.05$)。Logistic多元回归分析,T2DM病程、SBP、HbA1C、β2-MG、Hcy、Cys-C为T2DM患者并发DR的独立危险因素($P<0.05$)。DR患者β2-MG、Hcy、Cys-C及三项指标联检诊断曲线下面积(AUC)分别为0.762,0.735,0.887,0.935;3项指标联检诊断效能明显高于血清β2-MG、Hcy、Cys-C单项检测,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 血清β2-MG、Hcy、Cys-C均为DR危险因素,其指标水平均可反DR患者病情程度,且三项指标联检对DR诊断价值良好。

[关键词] 糖尿病视网膜病变;β2微球蛋白;血清胱抑素C;同型半胱氨酸;相关性

β2-MG、Hcy、Cys-C detection in the diagnosis of type 2 diabetic retinopathy

CHEN Bin, QI Xiaoling*, XU Liwu, HU Wenwen, HUANG Peipei

(Department of Endocrinology, Huainan First People's Hospital, Huainan, Anhui, China, 232007)

[ABSTRACT] Objective To investigate the diagnostic value of combined detection of serum β2 microglobulin (β2-MG), homocysteine (Hcy), cystatin C (Cys-C) for type 2 diabetic retinopathy (DR). **Methods** 173 patients with type 2 diabetes mellitus (T2DM) admitted in our hospital from January 2018 to February 2020 were grouped according to the condition of fundus lesions in T2DM patients. NDR group (international clinical grade 1) T2DM 61 patients without retinopathy, 53 patients (international clinical grade 2~4) with non-proliferative diabetic retinopathy, and 59 patients with proliferative diabetic retinopathy in PRD group (international clinical grade 5). The serum β2-MG, Hcy, Cys-C levels of each group were compared, the correlation DR serum β2-MG, Hcy, Cys-C was analyzed by Pearson method, the risk factors were analyzed by multiple regression method, and the ROC curve was drawn. **Results** The T2DM disease course, SBP, HbA1C, β2-MG, Hcy, Cys-C and other indexes of each group were compared. The difference was statistically significant between PRD group>NPDR group>NDR group ($P<0.05$). Serum β2-MG, Hcy, Cys-C were positively correlated with DR patients' T2DM course, SBP, HbA1C ($P<0.05$), and DR patients' serum β2-MG, Hcy, Cys-C index correlation analysis were also positively correlated ($P<0.05$). Logistic multiple

基金项目:安徽省淮南市科技局科技计划项目(2018B54)

作者单位:淮南市第一人民医院内分泌科,安徽,淮南232007

*通信作者:齐晓玲, E-mail:weizhoulsk49709@163.com

regression analysis showed that the course of T2DM, SBP, HbA1C, β 2-MG, Hcy, and Cys-C were independent risk factors for DR in patients with T2DM ($P<0.05$). After ROC curve analysis, the area under the diagnostic curve (AUC) of β 2-MG, Hcy, Cys-C and three indicators of DR patients was 0.762, 0.735, 0.887 and 0.935 respectively. The diagnostic efficacy of the three indicators was significantly higher than that of serum β 2-MG, Hcy, Cys-C single test, the difference was statistically significant ($P<0.05$). Conclusion Serum β 2-MG, Hcy, Cys-C are DR risk factors, and their index levels can reflect the disease status of DR patients, and the joint detection of three indicators is of good value in the diagnosis of DR.

[KEY WORDS] Diabetic retinopathy; β 2 microglobulin; Serum cystatin C; Homocysteine; Correlation

糖尿病视网膜病变(Diabetic retinopathy, DR)是2型糖尿病(Type 2 Diabetes Mellitus, T2DM)患者常见的并发症且, DR是造成30~70岁人群致盲的第一原因^[1]。尽管眼底照相、眼底荧光血管造影等手段可确诊DR,但仍缺乏简便、直观的生化指标来提供视网膜病变的相关信息。因此,寻找预测视网膜病变的指标十分必要,能为临床诊断DR提供参考。研究已明确^[2-3],血清 β 2微球蛋白(β 2-microglobulin, β 2-MG)、同型半胱氨酸(Homocysteine, Hcy)、胱抑素C(Cystatin C, Cys-C)与T2DM肾病发生及病情进展均有密切关联。Migdalis等^[4]研究,糖尿病肾病与DR均属糖尿病性微血管并发症,两种并发症病因机制相近。本研究将探析 β 2-MG、Hcy、Cys-C与DR发病的相关性,为防治T2DM视网膜病变提供简易、可靠的生物学诊断指标。

1 资料和方法

1.1 一般资料

收集本院2018年1月至2020年2月收治的T2DM患者173例,符合“WHO糖尿病诊断标准”制定T2DM标准^[5],男性106例,女性67例,年龄35~73岁,平均年龄(53.88 \pm 5.41)岁。均行眼底照相检查,按照DR国际临床分级标准^[6]分组,NDR组(1期)T2DM无视网膜病变者61例,NPDR组(2~4期)非增殖期糖尿病视网膜病变者53例,PRD组(5期)增殖期糖尿病视网膜病变者59例。本研究经医院医学理论委员会讨论批准。

纳入标准:①符合2型糖尿病和视网膜病变的诊断标准;②患者自愿同意调查研究,并签署知情同意书。排除标准:①有其它眼内疾病,或有眼外伤,或进行过眼部手术;②酒精药物滥用;③糖尿病酮症酸中毒;④肾小球滤过率小于65 mL/(min \cdot 1.73 m);⑤心脑血管疾病者;⑥甲状腺功能亢进或减退;⑦妊娠妇女。

1.2 诊断标准

DR国际临床分级诊断标准:行免散瞳眼底照片或眼底荧光造影检测,1期:T2DM患者眼底未见异常改变;2期:眼底微动脉瘤轻度形成;3期:微动脉瘤形成且,存在轻于重度NPDR的中度表现;4期:未见PRD体征,但伴有任一四象限>20处视网膜内出血,2个象限存在静脉串珠样异常,或伴有视网膜内微血管异常(Intraretinal microvascular abnormality, IRMA);5期:新生血管形成和(或)玻璃体出血或视网膜出血改变。2~4期为非增殖期糖尿病视网膜病变,5期为增殖期糖尿病视网膜病变。

1.3 方法

记录各组T2DM患者年龄、性别、病程、收缩压(Systolic blood pressure, SBP)、舒张压(Diastolic blood pressure, DBP)等基线资料,禁食6 h,于清晨抽取静脉血5 ml,均采用全自动生化分析仪(日立7600)检测,葡萄糖氧化酶法检测空腹血糖(Fasting plasma glucose, FPG)水平,酶法检测高密度脂蛋白胆固醇(High density lipoprotein cholesterol, HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(Low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)、总胆固醇(Total cholesterol, TC)、甘油三酯(Triglyceride, TG),血肌酐(Serum creatinine, SCr)、尿素氮(Blood urea nitrogen, BUN),高压液相法测定糖化血红蛋白(glycosylated hemoglobin, HbA1c),免疫增强比浊法测定 β 2-MG、Cys-C,循环酶法测定Hcy。

1.5 统计学方法

采用SPSS 20.0软件进行分析,正态计量数据用($\bar{x} \pm s$)表示,非正态数据采用Median(IQR)表示,组间比较采用 t 检验或方差分析,计数数据采用 $n(\%)$ 表示,组间比较采用 χ^2 检验,若理论频数 <5 ,采用Fisher确切概率法检验,相关性分析采用Pearson法,分析视网膜病变发生的危险因素时,采用Logistic回归分析法,Graphpad软件制作ROC

曲线, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组临床资料比较

各组年龄、性别、DBP、FPG、HDL-C、LDL-C、TC、TG、SCr、BUN等指标比较, 差异无统计学意

义 ($P > 0.05$), PRD组 T2DM 病程明显大于 NPDR 组与 NDR 组, SBP、HbA1C、 β 2-MG、Hcy、Cys-C 水平明显高于 NPDR 组与 NDR 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); NPDR 组 T2DM 病程、SBP、HbA1C、 β 2-MG、Hcy、Cys-C 与 NDR 组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 各组临床资料比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of clinical data of each group ($\bar{x} \pm s$)

| 指标 | NDR 组 (n=61) | NPDR 组 (n=53) | PRD 组 (n=59) | F 值/ χ^2 值 | P 值 |
|--------------------|--------------|---------------------------|-----------------------------|-----------------|-------|
| 年龄(岁) | 53.67±5.29 | 54.18±5.37 | 53.82±5.51 | 0.13 | 0.876 |
| 男/女 | 38/23 | 32/21 | 36/23 | 0.046 | 0.977 |
| T2DM 病程(年) | 5.16±1.73 | 7.22±1.85 ^a | 8.34±1.94 ^{a,b} | 46.11 | <0.01 |
| SBP(mmHg) | 119.64±10.61 | 130.27±14.73 ^a | 139.64±13.24 ^{a,b} | 36.23 | <0.01 |
| DBP(mmHg) | 75.36±11.73 | 78.61±12.35 | 80.14±12.64 | 2.39 | 0.095 |
| HbA1C(%) | 8.16±0.95 | 8.93±1.16 ^a | 9.75±1.24 ^{a,b} | 30.22 | <0.01 |
| FPG(mmol/L) | 8.58±1.05 | 8.91±1.22 | 9.12±1.36 | 3.02 | 0.052 |
| HDL-C(mmol/L) | 1.08±0.11 | 1.10±0.09 | 1.12±0.13 | 1.92 | 0.150 |
| LDL-C(mmol/L) | 2.59±0.41 | 2.61±0.45 | 2.72±0.47 | 1.47 | 0.233 |
| TC(mmol/L) | 4.56±0.58 | 4.46±0.71 | 4.37±0.68 | 1.26 | 0.287 |
| TG(mmol/L) | 1.72±0.33 | 1.78±0.41 | 1.86±0.35 | 2.24 | 0.109 |
| SCr(μ mol/L) | 68.68±11.54 | 70.38±12.52 | 72.36±13.84 | 1.27 | 0.284 |
| BUN(mmol/L) | 6.18±0.56 | 6.22±0.61 | 6.35±0.79 | 1.07 | 0.345 |
| β 2-MG(mg/L) | 2.28±0.61 | 2.74±0.53 ^a | 3.38±0.73 ^{a,b} | 45.77 | <0.01 |
| Hcy(μ mol/L) | 11.67±2.41 | 14.21±2.52 ^a | 18.59±2.81 ^{a,b} | 109.44 | <0.01 |
| Cys-C(mg/L) | 0.84±0.12 | 0.97±0.15 ^a | 1.27±0.19 ^{a,b} | 119.21 | <0.01 |

注:与 NDR 组比较^a $P < 0.05$,与 NPDR 组^b $P < 0.05$ 。

2.2 血清 β 2-MG、Hcy、Cys-C 相关性分析

血清 β 2-MG 与 T2DM 病程、SBP、HbA1C、Hcy、Cys-C 呈正相关 ($P < 0.05$); 血清 Hcy 与 T2DM 病程、SBP、HbA1C、 β 2-MG、Cys-C 呈正相关 ($P < 0.05$); 血清 Cys-C 与 T2DM 病程、SBP、HbA1C、 β 2-MG、Hcy 呈正相关 ($P < 0.05$), 表 2。

表 2 血清 β 2-MG、Hcy、Cys-C 相关性分析

Table 2 Correlation analysis of serum β 2-MG, Hcy, Cys-C

| 指标 | β 2-MG | | Hcy | | Cys-C | |
|--------------|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | r 值 | P 值 | r 值 | P 值 | r 值 | P 值 |
| T2DM 病程 | 0.458 | <0.01 | 0.385 | 0.011 | 0.368 | 0.017 |
| SBP | 0.225 | 0.043 | 0.276 | 0.041 | 0.288 | 0.039 |
| HbA1C | 0.334 | 0.026 | 0.318 | 0.031 | 0.357 | 0.022 |
| β 2-MG | - | - | 0.576 | <0.01 | 0.624 | <0.01 |
| Hcy | 0.576 | <0.01 | - | - | 0.635 | <0.01 |
| Cys-C | 0.624 | <0.01 | 0.635 | <0.01 | - | - |

2.3 DR 相关因素 Logistic 多元回归分析

以 DR 作为因变量, 将表 1 中 T2DM 病程、SBP、HbA1C、 β 2-MG、Hcy、Cys-C 等 $P < 0.05$ 指标作为自

变量, 行 Logistic 多元回归分析, 结果证实, T2DM 病程、SBP、HbA1C、 β 2-MG、Hcy、Cys-C 均为 T2DM 患者并发 DR 的独立危险因素 ($P < 0.05$), 表 3。

表 3 DR 相关因素 Logistic 多元回归分析

Table 3 Logistic multiple regression analysis of DR-related factors

| 变量 | β 值 | SE 值 | P 值 | OR 值 | 95%CI |
|--------------|-----------|-------|-------|-------|-------------|
| T2DM 病程 | 0.515 | 0.217 | 0.039 | 1.583 | 1.028~2.516 |
| SBP | 0.047 | 0.013 | 0.031 | 1.251 | 1.073~1.448 |
| HbA1C | 0.931 | 0.416 | 0.045 | 1.543 | 1.274~1.959 |
| β 2-MG | 0.876 | 0.257 | 0.024 | 1.294 | 1.123~1.578 |
| Hcy | 0.517 | 0.086 | 0.037 | 1.718 | 1.425~2.073 |
| Cys-C | 0.168 | 0.064 | 0.013 | 1.187 | 1.039~1.328 |

2.4 血清 β 2-MG、Hcy、Cys-C 诊断 DR 的 ROC 曲线分析

经 ROC 曲线分析可知, 三项指标联检诊断 AUC 为 0.935, DR 诊断显著高于血清 β 2-MG、Hcy、Cys-C 单项指标检查结果 ($P < 0.05$), 表 4、图 1。

表4 血清 β 2-MG、Hcy、Cys-C诊断DR的ROC曲线分析Table 4 ROC curve analysis of serum β 2-MG, Hcy, Cys-C diagnosis of DR

| 指标 | AUC | SE值 | P值 | OOP | 特异性 | 敏感度 | 约登指数 |
|------------------------|------------------------|-------|-------|--------|-------|-------|-------|
| β 2-MG | 0.762 | 0.032 | <0.01 | >2.71 | 82.16 | 66.87 | 0.592 |
| Hcy | 0.735 | 0.029 | <0.01 | >16.34 | 77.35 | 47.26 | 0.485 |
| Cys-C | 0.887 | 0.021 | <0.01 | >1.05 | 65.18 | 84.36 | 0.667 |
| β 2-MG+Hcy+Cys-C | 0.935 ^{a,b,c} | 0.018 | <0.01 | - | 81.53 | 93.18 | - |

注:与 β 2-MG比较^a P <0.05,与Hcy比较^b P <0.05,与Cys-C比较^c P <0.05。

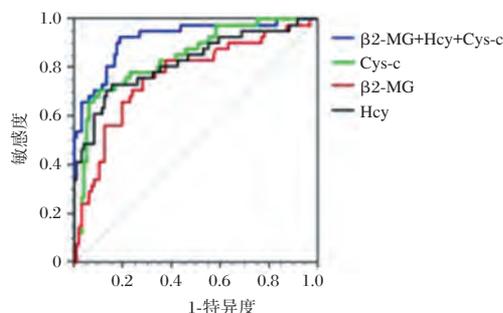


图1 血清 β 2-MG、Hcy、Cys-C及三项联检诊断DR的ROC曲线分析

Figure 1 ROC curve analysis of serum β 2-MG, Hcy, Cys-C and three joint tests for diagnosis of DR

3 讨论

糖尿病并发微血管损伤时视网膜极易产生病变,并且病变治愈率很低,而且一旦发生就会难以逆转^[7],因此尽早诊断并给予有效早期治疗是防止该病的重要手段。 β 2-MG已被确认为诊断糖尿病并发肾病的早期指标,该指标敏感、相当准确^[8]。相关研究表明^[9], β 2-MG水平在糖尿病视网膜病变患者中普遍提高。另外, β 2-MG联合HbA1C可在一定程度上预测糖尿病患者并发微血管病变的可能性,这对诊治糖尿病、预防相关并发症有很大作用。本研究结果显示,DR病情严重程度提高,其患者 β 2-MG亦升高,且血清 β 2-MG对T2DM并发DR的诊断效能较好,可有效评估DR损伤情况。该结果与胡丽等^[10]研究相符。但影响 β 2-MG水平变化的原因众多,如白血病、红斑狼疮等均可导致血清 β 2-MG升高^[11]。对此单纯以 β 2-MG作为DR损伤评估标准尚有不足,建议配合其他指标联合运用。

研究认为^[12],Hcy升高属糖尿病肾病、动脉粥样硬化及糖尿病神经病变独立危险因素。曹辉彩等^[13]研究,视神经萎缩、视网膜病变及相关微血管硬化均与高同型半胱氨酸血症相关。本研究相关

性分析结果提示血清Hcy在T2DM患者并发DR过程均有参与,同时Hcy也是DR早期诊断敏感指标。新进研究指出^[14],Cys-C与老年性黄斑变性、冠心病、视网膜病变也存在很大相关性,并起着很重要的中介作用。动物研究证实^[15],Cys-C可参与血管壁、细胞外基质重塑,同时Cys-C可影响炎性细胞。本研究证实,血清Cys-C可预测评估T2DM并发DR与否,有利于DR早期诊疗。

随临床对DR病理机制研究深入,发现糖尿病患者并发DR过程中神经元退行性病变、血管壁重构、微血管血栓成形及机体氧化应激等病理生理过程均与 β 2-MG、Hcy、Cys-C有关^[16]。本研究将血清 β 2-MG、Hcy、Cys-C作为DR联检指标,明显高于 β 2-MG、Hcy、Cys-C单项诊断效能,提示同时 β 2-MG、Hcy、Cys-C三项联合检查有利于DR病情程度评估,为DR防治提供诊断依据。且血清 β 2-MG、Hcy、Cys-C生化指标的收集、检查方式便捷,定期测定T2DM患者 β 2-MG、Hcy、Cys-C水平,对动态监测DR发生及防控具有重要价值。

综上所述,血清 β 2-MG、Hcy、Cys-C均为DR危险因素,其指标水平均可反DR患者病情程度,且三项指标联检对DR诊断价值良好。

参考文献

- [1] 魏文文,杨秀芬,顾虹,等.北京德胜社区2型糖尿病人群中糖尿病视网膜病变与糖尿病周围神经病变的相关性研究[J].中华眼科杂志,2017,53(7):509-513.
- [2] 杨娜,刘禄,魏容.血清胱抑素C、 β 2-微球蛋白和同型半胱氨酸在糖尿病肾病中的诊断价值[J].中国卫生检验杂志,2017,27(6):836-838,841.
- [3] Chen H, Li H. Clinical Implication of Cystatin C and β 2-Microglobulin in Early Detection of Diabetic Nephropathy. [J]. clin lab, 2017, 63(2):241-247.
- [4] Migdalis I, Czupryniak L, Lalic N, et al. Diabetic Microvascular Complications[J]. Int J Endocrinol, 2018, 2018:1-2.
- [5] World Health Organization. Definition, diagnosis and classifi-

(下转第826页)

下调 miR-9 对 LPS 诱导的大鼠心肌细胞炎症因子分泌的影响和机制

李媛莉^{1*} 赵继波² 张三明³

[摘要] 目的 研究 miR-9 在脓毒症大鼠心肌组织中的表达及其对 LPS 诱导的大鼠心肌细胞炎症因子分泌的影响和机制。方法 构建脓毒症大鼠模型, qRT-PCR 检测大鼠心肌组织中 miR-9 表达变化。在大鼠心肌细胞中转染 miR-9 inhibitor, 给予 LPS 处理, qRT-PCR 检测 miR-9 表达, CCK-8 检测细胞活力, ELISA 法检测细胞培养液上清中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平, Western blot 检测细胞中 p65、p-p65 蛋白表达水平。NF- κ B 信号激活剂处理转染 miR-9 inhibitor 以后的大鼠心肌细胞, 给予 LPS 刺激, 检测细胞活力和细胞培养液上清中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平。结果 脓毒症大鼠心肌组织中 miR-9 表达水平升高。LPS 处理以后的大鼠心肌细胞中 miR-9 表达水平升高, 细胞活力下降, 细胞分泌的 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 增多, 细胞中 p-p65 蛋白表达水平升高。转染 miR-9 inhibitor 后的 LPS 条件下心肌细胞中 miR-9 表达水平降低, 细胞活力升高, 细胞分泌的 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 减少, 细胞中 p-p65 蛋白表达水平减少。NF- κ B 信号激活剂可以逆转 miR-9 inhibitor 对 LPS 条件下大鼠心肌细胞活力和分泌 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 影响。结论 miR-9 在脓毒症大鼠心肌组织中高表达, 下调其表达可以抑制 LPS 诱导的大鼠心肌细胞炎症因子分泌, 作用机制与抑制 NF- κ B 信号激活有关。

[关键词] 脓毒症; miR-9; 炎症; NF- κ B 信号

The effect and mechanism of down-regulation of miR-9 on LPS-induced inflammatory factor secretion in rat cardiomyocytes

LI Yuanli^{1*}, ZHAO Jibo², ZHANG Sanming³

(1. ICU, the first affiliated hospital of hebei north university, Zhangjiakou, Hebei, China, 075000; 2. Department of anesthesiology, the first affiliated hospital of hebei north university, Zhangjiakou, Hebei, China, 075000; 3. Department of cardiovascular medicine, the first affiliated hospital of hebei north university, Zhangjiakou, Hebei, China, 075000)

[ABSTRACT] **Objective** To study the expression and mechanism of miR-9 in myocardial tissue of sepsis rats and its effect on the secretion of inflammatory factors induced by LPS in rat myocarditis. **Methods** A rat model of sepsis was constructed, and the expression of miR-9 in rat myocardium was detected by qRT-PCR. MiR-9 inhibitor was transfected into rat cardiomyocytes, treated with LPS, miR-9 expression was detected by qRT-PCR, cell viability was detected by CCK-8, and TNF- α , IL-6, IL-1 β level were detected by ELISA, the p65, p-p65 protein expression levels in cells were detected by western blot. Rat cardiomyocytes transfected with miR-9 inhibitor were treated with NF- κ B signal activator and stimulated with LPS to detect cell viability and TNF- α , IL-6 and IL-1 β levels in the cell culture supernatant. **Results** The level of miR-9 in myocardial tissue of sepsis rats increased. After LPS treatment, the expression level of miR-9 in rat

作者单位: 1. 河北北方学院附属第一医院 ICU, 河北, 张家口 075000

2. 河北北方学院附属第一医院麻醉科, 河北, 张家口 075000

3. 河北北方学院附属第一医院心血管内科, 河北, 张家口 075000

*通信作者: 李媛莉, E-mail: 30994470@qq.com

cardiomyocytes increased, the cell viability decreased, the TNF- α , IL-6, IL-1 β secreted by the cells increased, and the p-p65 protein expression level in the cells increased. After transfection with miR-9 inhibitor and stimulated by LPS, the expression level of miR-9 in cardiomyocytes decreased, cell viability increased, TNF- α , IL-6, IL-1 β secreted by cells decreased, and p-p65 protein expression level in cells cut back. NF- κ B signal activator can reverse the effect of miR-9 inhibitor on the viability and secretion of TNF- α , IL-6 and IL-1 β in rat cardiomyocytes under LPS conditions. Conclusion miR-9 was highly expressed in myocardial tissues of septic rats. Down-regulating miR-9 expression can inhibit LPS-induced inflammatory factor secretion in rat myocardial cells. The mechanism of action is related to the inhibition of NF- κ B signal activation.

[KEY WORDS] Sepsis; miR-9; Inflammation; NF- κ B signaling

脓毒症是一种由于微生物感染而引起的宿主炎症损伤的相关疾病,脓毒症引起的心肌损伤是临床上常见的并发症^[1]。脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)是常见的促脓毒症诱导因子,其也是体外模拟脓毒症心肌细胞损伤的诱导因子。miRNA是在生命体内广泛存在的非编码RNA,其大小约为20 nt,序列高度保守,具有多种生物学作用,参与人类疾病的进展^[2]。研究显示,脓毒症的发生也与miRNA的异常表达有关,miRNA异常表达与脓毒症心肌细胞炎症因子分泌等有关^[3]。miR-9在人体内的多个组织和细胞中表达,具有调控细胞生长、组织炎症等功效。有研究表明,miR-9在脓毒症中表达上调,敲除miR-9可以减少脓毒症小鼠血清中炎症因子水平,延长小鼠的生存时间^[4]。miR-9在心肌细胞中表达,下调其表达改善缺氧诱导的心肌细胞损伤^[5]。NF- κ B信号通路广泛参与人体内炎症反应、细胞增殖等过程,其在脓毒症中过度激活,下调其激活水平可以减轻脓毒症心肌损伤^[6]。本研究探讨miR-9在脓毒症大鼠心肌组织中的表达变化,探讨下调miR-9对LPS诱导的大鼠心肌细胞炎症损伤的影响和机制,为靶向基因治疗脓毒症大鼠心肌损伤和研究脓毒症分子发生机制提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

SPF雄性成年大鼠购自维通利华实验动物中心,体重200~220 g。大鼠心肌细胞H9C2购自武汉普诺赛生命科技有限公司;inhibitor control、miR-9 inhibitor购自上海吉玛制药技术有限公司;引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成;TNF- α 检测试剂盒购自上海瑞番生物科技有限公司;p65、p-p65抗体购自美国Abcam;IL-6检测试剂盒购自艾美捷科技有限公司;LPS购自美国Sigma;IL-1 β 检测试剂盒购自上海岚派生物科技有限公司。

1.2 脓毒症模型构建^[7]

大鼠分成2组,每组9只,为Model和Normal组。

1.3 qRT-PCR检测脓毒症心肌组织中miR-9表达

用Trizol提取心肌组织中的总RNA,反转录合成cDNA。以cDNA为模板进行qRT-PCR反应,miR-9以U6作为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算miR-9相对表达量。

1.4 心肌细胞转染和分组处理

用含有10 μ g/mL的LPS细胞培养液培养细胞(LPS组);LPS+Anti-NC、LPS+Anti-miR-9组心肌细胞在实验开始前12 h分别转染inhibitor control、miR-9 inhibitor;Control组细胞正常培养。分别将Anti-NC、Anti-miR-9共转染至心肌细胞,加入含有10 μ g/mL的LPS细胞培养液培养细胞,分别记作LPS+Anti-NC组、LPS+Anti-miR-9组。

1.5 CCK-8检测细胞活力

将心肌细胞按照“1.4”分组方法接种到96孔板内(2×10^3 个/孔),每孔添加10 μ L的CCK-8溶液,继续放在37 $^{\circ}$ C孵育2 h,以酶标仪测定450 nm的OD值。

1.6 ELISA法检测细胞培养液上清中TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平

Control、LPS、LPS+Anti-NC、LPS+Anti-miR-9组细胞培养24 h以后,收集培养液上清,分别用TNF- α 检测试剂盒、IL-6检测试剂盒、IL-1 β 检测试剂盒检测TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平,步骤完全按照试剂盒操作说明进行。

1.7 Western blot检测细胞中p65、p-p65蛋白表达水平

Control、LPS、LPS+Anti-NC、LPS+Anti-miR-9组细胞培养24 h,收集细胞,提取细胞总蛋白,BCA法检测浓度,加入Loading Buffer混合,沸水煮5 min。SDS-PAGE凝胶电泳,转膜,室温封闭2 h,分别加入一抗稀释液与二抗稀释液,滴加ECL显色,应用Image J分析蛋白条带的灰度值,以 β -actin作为参照,分析蛋白相对表达变化。p65、p-p65一抗

分别以1:1 000和1:800稀释,二抗以1:2 000稀释。

1.8 NF- κ B 信号激活剂对下调 miR-9 影响心肌细胞分泌炎症因子的作用检测

心肌细胞转染 miR-9 inhibitor 以后,用含有 10 μ g/mL 的 LPS 和 1 μ mol/L 的 NF- κ B 信号激活剂 PMA 细胞培养液培养,记为 LPS+Anti-miR-9+PMA 组,以 LPS+Anti-miR-9 组作为对照,CCK-8 检测细胞活力,ELISA 法检测细胞培养液上清中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平,Western blot 检测细胞中 p65、p-p65 蛋白表达水平,步骤同上。

1.9 统计学分析

用 SPSS 21.0 软件进行数据分析,计量资料用($\bar{x}\pm s$)表示,两组数据用独立样本 *t* 检验,多组差异比较用单因素方差, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-9 在脓毒症大鼠心肌组织中高表达

脓毒症大鼠心肌组织中 miR-9 表达水平明显高于正常大鼠,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

表 1 脓毒症大鼠心肌组织中 miR-9 表达水平($\bar{x}\pm s$)
Table 1 Expression level of Mir-9 in myocardium of septic rats ($\bar{x}\pm s$)

| 组别 | miR-9 水平 |
|------------|-----------------|
| Normal | 1.00 \pm 0.08 |
| Model | 2.15 \pm 0.16 |
| <i>t</i> 值 | 18.18 |
| <i>P</i> 值 | <0.001 |

2.2 miR-9 inhibitor 下调 LPS 条件下心肌细胞中 miR-9 表达水平

LPS 处理以后的心肌细胞中的 miR-9 表达水平升高;转染 miR-9 inhibitor 后的心肌细胞经过 LPS 处理以后,细胞中的 miR-9 表达水平下降,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 2。

表 2 miR-9 inhibitor 转染前后 LPS 条件下心肌细胞中 miR-9 表达水平($\bar{x}\pm s$)

| 组别 | TNF- α (pg/mL) | IL-6 (pg/mL) | IL-1 β (pg/mL) | OD 值(细胞活力) |
|----------------|-----------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|------------------------------|
| Control | 223.54 \pm 12.05 | 165.24 \pm 13.28 | 104.41 \pm 10.22 | 0.45 \pm 0.04 |
| LPS | 1456.27 \pm 125.26 ^a | 1205.10 \pm 110.36 ^a | 954.28 \pm 72.30 ^a | 0.32 \pm 0.03 ^a |
| LPS+Anti-NC | 1420.31 \pm 104.42 | 1156.72 \pm 103.32 | 968.51 \pm 63.25 | 0.31 \pm 0.04 |
| LPS+Anti-miR-9 | 869.97 \pm 65.14 ^b | 647.98 \pm 43.75 ^b | 559.76 \pm 60.43 ^b | 0.42 \pm 0.05 ^b |
| <i>F</i> 值 | 403.40 | 349.10 | 462.61 | 106.69 |
| <i>P</i> 值 | <0.001 | <0.001 | <0.001 | <0.001 |

注:与 Control 比较,^a $P<0.05$;与 LPS+Anti-NC 比较,^b $P<0.05$ 。

表 2 miR-9 inhibitor 转染前后 LPS 条件下心肌细胞中 miR-9 表达水平($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Expression levels of Mir-9 in myocardial cells before and after transfection with Mir-9 inhibitor ($\bar{x}\pm s$)

| 组别 | miR-9 水平 |
|----------------|------------------------------|
| Control | 1.00 \pm 0.10 |
| LPS | 1.96 \pm 0.13 ^a |
| LPS+Anti-NC | 1.99 \pm 0.15 |
| LPS+Anti-miR-9 | 0.98 \pm 0.12 ^b |
| <i>F</i> 值 | 160.30 |
| <i>P</i> 值 | <0.001 |

注:与 Control 比较,^a $P<0.05$;与 LPS+Anti-NC 比较,^b $P<0.05$ 。

2.3 下调 miR-9 减少 LPS 诱导的心肌细胞分泌炎症因子

LPS 处理以后的心肌细胞活力降低,细胞分泌的 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 增多;转染 miR-9 inhibitor 后的心肌细胞经过 LPS 处理以后,细胞分泌的 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 减少,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 3。

2.4 下调 miR-9 抑制 LPS 诱导的心肌细胞中 NF- κ B 信号通路激活

LPS 处理以后的心肌细胞中 p-p65 蛋白表达水平增多;转染 miR-9 inhibitor 后的心肌细胞经过 LPS 处理以后,细胞中 p-p65 蛋白表达水平减少,差异有统计学意义($P<0.05$)。见图 1、表 4。

2.5 NF- κ B 信号激活剂逆转下调 miR-9 抑制 LPS 条件下心肌细胞分泌炎症因子作用

NF- κ B 信号激活剂 PMA 处理下调 miR-9 的心肌细胞,经 LPS 诱导以后,细胞中的 p-p65 蛋白表达水平升高,细胞分泌的 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。见图 2、表 5。

表 3 miR-9 inhibitor 转染前后 LPS 条件下心肌细胞分泌的 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平和细胞活力($\bar{x}\pm s$)

Table 3 Levels of TNF-, IL-6, IL-1 secreted by cardiomyocytes and cell activity before and after transfection with Mir-9 inhibitor ($\bar{x}\pm s$)

| 组别 | TNF- α (pg/mL) | IL-6 (pg/mL) | IL-1 β (pg/mL) | OD 值(细胞活力) |
|----------------|-----------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|------------------------------|
| Control | 223.54 \pm 12.05 | 165.24 \pm 13.28 | 104.41 \pm 10.22 | 0.45 \pm 0.04 |
| LPS | 1456.27 \pm 125.26 ^a | 1205.10 \pm 110.36 ^a | 954.28 \pm 72.30 ^a | 0.32 \pm 0.03 ^a |
| LPS+Anti-NC | 1420.31 \pm 104.42 | 1156.72 \pm 103.32 | 968.51 \pm 63.25 | 0.31 \pm 0.04 |
| LPS+Anti-miR-9 | 869.97 \pm 65.14 ^b | 647.98 \pm 43.75 ^b | 559.76 \pm 60.43 ^b | 0.42 \pm 0.05 ^b |
| <i>F</i> 值 | 403.40 | 349.10 | 462.61 | 106.69 |
| <i>P</i> 值 | <0.001 | <0.001 | <0.001 | <0.001 |

注:与 Control 比较,^a $P<0.05$;与 LPS+Anti-NC 比较,^b $P<0.05$ 。

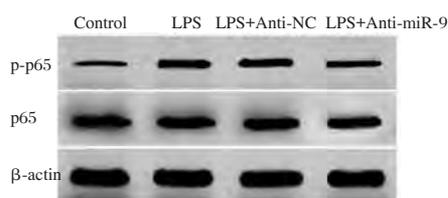


图1 Western blot 检测 miR-9 inhibitor 对 LPS 条件下心肌细胞中 p-p65、p65 蛋白表达影响

Figure 1 The effect of Mir-9 inhibitor on the expression of P-P65 and P65 protein in myocardial cells under LPS condition was detected by Western blot

表4 miR-9 inhibitor 转染前后 LPS 条件下心肌细胞中 p-p65、p65 表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Expression levels of P-P65 and P65 in myocardial cells before and after transfection with Mir-9 inhibitor ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | p65 | p-p65 |
|----------------|-----------|------------------------|
| Control | 0.89±0.09 | 0.23±0.03 |
| LPS | 0.87±0.07 | 0.76±0.07 ^a |
| LPS+Anti-NC | 0.88±0.10 | 0.74±0.05 |
| LPS+Anti-miR-9 | 0.86±0.11 | 0.31±0.04 ^b |
| F 值 | 0.15 | 233.39 |
| P 值 | 0.96 | <0.001 |

注:与 Control 比较, ^aP<0.05;与 LPS+Anti-NC 比较, ^bP<0.05。

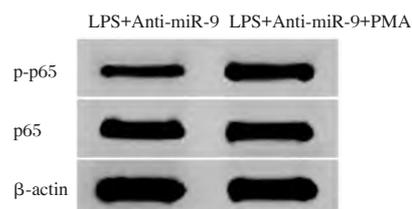


图2 Western blot 检测 NF-κB 信号激活剂对下调 miR-9 影响 LPS 条件下心肌细胞中 p-p65 蛋白表达作用

Figure 2 Western blot analysis of the effect of NF- B signal activator on the expression of P-P65 protein in myocardial cells under the condition of down-regulating Mir-9 and LPS

3 讨论

miRNA 在自然界中广泛存在,是一类没有编

码功能的小分子 RNA,miRNA 具有多种功能,在各种细胞生长、代谢、炎症等过程中发挥作用。研究报道显示,多种疾病的发生与 miRNA 的表达有关,miRNA 可能是疾病治疗和诊断的分子标记物^[8]。脓毒症的发生也受到 miRNA 的调控作用,其表达改变与脓毒症损伤有关^[9]。miR-9 是目前发现的人体内普遍表达的调节因子,在肿瘤等多种疾病中发挥作用^[10]。最近的研究表明,miR-9 与脓毒症有关,其在脓毒症中表达上调,敲除 miR-9 改善脓毒症小鼠炎症,下调 miR-9 还可以抑制巨噬细胞炎症因子分泌^[4]。miR-9 是一种心肌损伤促进因子,其在缺氧、缺血心肌细胞损伤中发挥促进作用^[5]。本次的实验表明,miR-9 在脓毒症大鼠心肌组织中表达上调,说明 miR-9 可能与脓毒症大鼠心肌损伤有关,这与上述研究报道结果相符合。

脓毒症是一种全身性的炎症反应,脓毒症心肌损伤是常见的脓毒症连续过程。研究显示,脓毒症发生时,心肌细胞释放大量的炎症因子,促进炎症损伤。LPS 是脓毒症的促进因子,其可以在体外诱导心肌细胞损伤,促进心肌细胞释放炎症因子^[11]。TNF-α、IL-6、IL-1β 是常见的脓毒症炎症因子,其可以促进炎症发生,诱导心肌损伤^[12]。本次的实验结果表明,LPS 处理以后的大鼠心肌细胞分泌的 TNF-α、IL-6、IL-1β 增多,细胞活力下降,而下调 miR-9 可以逆转 LPS 对大鼠心肌细胞 TNF-α、IL-6、IL-1β 分泌和细胞活力的影响,这说明下调 miR-9 具有抑制 LPS 诱导的心肌细胞损伤和炎症因子分泌的作用。

本实验还表明,LPS 处理以后的心肌细胞中 p-p65 蛋白水平升高,p65 蛋白表达没有变化,而下调 miR-9 可以降低心肌细胞中 p-p65 蛋白表达水平,miR-9 作用机制可能与 p-p65 有关。p-p65 是 p65 的磷酸化形式,p65 是 NF-κB 信号转导通路的关键亚单位^[13]。NF-κB 是一个多功能调控因子,其激活后可以诱导组织炎症发生^[14]。研究报道显示,脓毒症中 NF-κB 过度激活,而抑制 NF-κB 信号可以

表5 NF-κB 信号激活剂处理 miR-9 inhibitor 转染后 LPS 条件下心肌细胞中 p-p65、p65 表达水平、细胞活力和分泌的 TNF-α、IL-6、IL-1β 水平 ($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Expression levels of P-P65 and P65, cell activity, and secretion of TNF-, IL-6 and IL-1 in myocardial cells treated with NF- B signal activator after Mir-9 inhibitor transfection ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | p65 | p-p65 | TNF-α(pg/mL) | IL-6(pg/mL) | IL-1β(pg/mL) | OD 值(细胞活力) |
|--------------------|-----------|------------------------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|------------------------|
| LPS+Anti-miR-9 | 0.87±0.12 | 0.34±0.05 | 875.36±52.17 | 684.20±55.32 | 570.86±43.31 | 0.44±0.06 |
| LPS+Anti-miR-9+PMA | 0.85±0.10 | 0.79±0.09 ^a | 1395.47±109.94 ^a | 1105.58±92.36 ^a | 1034.01±85.52 ^a | 0.36±0.02 ^a |
| t 值 | 0.36 | 12.36 | 12.09 | 11.07 | 13.67 | 3.58 |
| P 值 | 0.72 | <0.001 | <0.001 | <0.001 | <0.001 | 0.003 |

注:与 LPS+Anti-miR-9 比较, ^aP<0.05。

改善脓毒症心肌损伤^[15]。

综上所述,miR-9在脓毒症大鼠心肌组织中高表达,下调miR-9可以抑制LPS诱导的心肌细胞分泌炎症因子,其作用机制与下调NF- κ B信号激活水平有关。miR-9在脓毒症心肌损伤中可能发挥促进作用,靶向抑制miR-9可能是减轻脓毒症心肌损伤的途径。本次实验结果为研究脓毒症心肌损伤发生机制提供了参考。在以后实验中会探讨miR-9通过何种靶向机制影响调控NF- κ B信号激活进而影响炎症发生。

参考文献

- [1] Yang C, Xia W, Liu X, et al. Role of TXNIP/NLRP3 in sepsis-induced myocardial dysfunction[J]. *Int J Mol Med*, 2019, 44(2):417-426.
- [2] 何本夫,朱成全,肖烈钢,等. EBV-miRNA-BHRF1-1对鼻咽癌细胞p53基因表达的影响[J]. *华南预防医学*, 2014, 40(1):34-37.
- [3] Mirna M, Paar V, Rezar R, et al. MicroRNAs in Inflammatory Heart Diseases and Sepsis-Induced Cardiac Dysfunction: A Potential Scope for the Future[J]. *Cells*, 2019, 8(11):1-12.
- [4] Zhen J, Chen W, Zhao L, et al. A negative Smad2/miR-9/ANO1 regulatory loop is responsible for LPS-induced sepsis[J]. *Bio Pharmacol*, 2019, 116(7):109016-109023.
- [5] Zheng J, Peng B, Zhang Y, et al. miR-9 knockdown inhibits hypoxia-induced cardiomyocyte apoptosis by targeting Yap1[J]. *Life Sci*, 2019, 219(15):129-135.
- [6] Sun LJ, Qiao W, Xiao YJ, et al. Naringin mitigates myocardial strain and the inflammatory response in sepsis-induced myocardial dysfunction through regulation of PI3K/AKT/NF- κ B pathway[J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 75(10):105782-105791.
- [7] Sidonia B, Horatiu R, Vlad L, et al. Hypothermia Effects on Liver and Kidney Oxidative Stress Parameters in an Experimental Model of Sepsis in Rats[J]. *J Vet Res*, 2020, 64(1):187-195.
- [8] 郭学军,高欣,陈苑. miRNA-144在原发性肝癌中的表达水平及对小鼠肝癌模型肠道菌群的影响[J]. *热带医学杂志*, 2019, 19(12):1494-1498,1511.
- [9] Vasilescu C, Dragomir M, Tanase M, et al. Circulating miRNAs in sepsis-A network under attack: An in-silico prediction of the potential existence of miRNA sponges in sepsis[J]. *PLoS ONE*, 2017, 12(8):e0183334-e01855.
- [10] Boubaker NS, Cicchillitti L, Said R, et al. The clinical and prognostic value of miR-9 gene expression in Tunisian patients with bladder cancer[J]. *Mol Biol Rep*, 2019, 46(5):4743-4750.
- [11] Chen L, Liu P, Feng X, et al. Salidroside suppressing LPS-induced myocardial injury by inhibiting ROS-mediated PI3K/Akt/mTOR pathway in vitro and in vivo[J]. *J Cell Mol Med*, 2017, 21(12):3178-3189.
- [12] Ji ZR, Xue WL, Zhang L, et al. Schisandrin B Attenuates Inflammation in LPS-Induced Sepsis Through miR-17-5p Down-regulating TLR4[J]. *Inflammation*, 2019, 42(2):731-739.
- [13] Le F, Zhang JY, Liu W, et al. The levels of NF- κ B p50 and NF- κ B p65 play a role in thyroid carcinoma malignancy in vivo[J]. *J Int Med Res*, 2018, 46(10):4092-4099.
- [14] Yao J, Du X, Chen S, et al. Rv2346c enhances mycobacterial survival within macrophages by inhibiting TNF- α and IL-6 production via the p38/miRNA/NF- κ B pathway[J]. *Emerg Microbes Infect*, 2018, 7(1):108874-108889.
- [15] Yu X, Jia B, Wang F, et al. α -adrenoceptor activation by norepinephrine inhibits LPS-induced cardiomyocyte TNF- α production via modulating ERK1/2 and NF- κ B pathway[J]. *J Cell Mol Med*, 2014, 18(2):263-273.

(上接第821页)

- cation of diabetes mellitus and its complications. WHO/NCD/NCS, 1999:31-32.
- [6] Chen Z, Zhang SS. Analysis of international clinical diabetic retinopathy disease severity scale[J]. *Int J Ophthalmol*, 2011, 11(8):1394-1401.
- [7] Berque I, Patrick Le Ménez, Razon P, et al. Management of Diabetic Retinopathy[J]. *Klinische Monatsblätter Für Augenheilkunde*, 2018, 235(4):363-363.
- [8] 吴冰,王贺元.血清Cys-C、 β 2-MG、尿M-ALB与HbA1c联合检测在早期诊断糖尿病肾病中的意义[J]. *中国实验诊断学*, 2017, 21(4):647-648.
- [9] 周莉,吉媛红,田斌,等.尿液 β 2-MG对糖尿病患者视网膜病变的预测价值[J]. *医学临床研究*, 2018, 35(9):1771-1772.
- [10] 胡丽,皮银珍,刘罗坤.血清胱抑素c及B₂微球蛋白对2型糖尿病视网膜病变预测价值研究[J]. *现代诊断与治疗*, 2016, 27(13):2463-2464.
- [11] Khan R, Singh S, Surya J, et al. Age of Onset of Diabetes and Its Comparison with Prevalence and Risk Factors for Diabetic Retinopathy in a Rural Population of India[J]. *Ophthalmic Res*, 2019, 61(4):236-242.
- [12] 胡志坚,江永青,虞建新,等.2型糖尿病患者Hcy、HbA1c、MAU与肾脏微血管病变的关系探讨[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2011, 3(1):25-28.
- [13] 曹辉彩,邸星惠.2型糖尿病视网膜病变患者缺血修饰白蛋白和同型半胱氨酸水平的表达及相关性研究[J]. *河北医药*, 2019, 41(7):73-76.
- [14] Joobin Khadamy, Gholamhossein Yaghoobi, Abbas Hosseini Rad,等.糖尿病患者血清胱抑素C和急性反应指标与视网膜病变严重程度相关性研究(英文)[J]. *国际眼科杂志*, 2018, 18(3):20-25.
- [15] 闫丰华,焦禄安,郑加军,等.黄芪多糖对糖尿病模型大鼠视网膜病变及血清胱抑素C的影响[J]. *热带医学杂志*, 2019, 19(7):813-816.
- [16] 韩文莉,马威.胱抑素c及同型半胱氨酸与2型糖尿病视网膜病变的相关性研究[J]. *长治医学院学报*, 2019, 33(1):29-32.

· 论 著 ·

SLE及LN患者血清C1q的表达水平及意义

张明娇¹ 吴勇^{2*}

[摘要] **目的** 检测系统性红斑狼疮(SLE)病人血清中C1q浓度,分析其与疾病活动等的相关性,探讨其在狼疮肾炎(LN)早期诊断中的意义。**方法** 将160例SLE患者按照狼疮肾炎(LN)诊断标准分为LN组和无LN组,并选取50例同期类风湿关节炎(RA)患者作为疾病对照组,50例健康体检者作为健康对照组;检测补体1q(C1q)、补体3(C3)、补体4(C4)、抗核小体抗体(AnuA)、抗双链DNA(ds-DNA)抗体等项目,分析比较各组之间C1q的浓度,并将C1q与多种临床、实验室指标做相关性分析;分析C1q、抗ds-DNA抗体、AnuA三者联合检测在LN中的诊断价值。**结果** SLE组C1q浓度低于疾病对照组及健康体检组,差异有统计学意义($P<0.05$);在SLE组中,LN患者与无LN患者的血清C1q水平比较,差异有统计学意义($P<0.05$);SLE活动期患者血清C1q水平低于稳定组,SLE患者血清C1q水平与血清总IgM浓度呈正相关性($P<0.05$),与C3、SLEDAI积分、血沉呈现负相关性($P<0.05$),与年龄、性别、C4、C-反应蛋白(CRP)、肌酐、以及尿素等无相关性。联合血清C1q、抗ds-DNA抗体及AnuA诊断LN的准确性、灵敏度及特异度均较高($P<0.05$)。**结论** 血清C1q与SLE病情活动相关,测定SLE患者血清C1q浓度,对LN的早期诊断具有十分重要的参考价值,通过联合检测血清C1q、抗ds-DNA抗体、AnuA可提高诊断效能。

[关键词] 系统性红斑狼疮;狼疮肾炎;C1q

Changes of serum complement C1q level in patients with systemic lupus erythematosus and lupus nephritis and its significance

ZHANG Mingjiao¹, WU Yong^{2*}

(1. Department of Rheumatology and Immunology, The Third Affiliated Hospital of Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong, China, 510630; 2. Clinical Medical Laboratory Center, The First Affiliated Hospital of Jinan University, Guangzhou, Guangdong, China, 510630)

[ABSTRACT] **Objective** To detect serum complement 1q level in patients with systemic lupus erythematosus (SLE) and to analyze its correlation with disease activity, and finally to discuss its significance in the diagnosis of lupus nephritis (LN). **Methods** 160 cases of SLE patients were collected and divided into two groups on the basis of LN criterion; 50 patients with rheumatoid arthritis (RA) in other rheumatic disease group and 50 cases in normal control group were collected. C1q, complement3 (C3), complement4 (C4), anti-nucleosome antibody (AnuA), antibody to double-stranded DNA (ds-DNA) and other items were detected, the differences among the groups were analyzed. **Results** The C1q level of SLE patients was, which was lower than disease control group and healthy control, and the discrepancies between two sets were statistically different ($P<0.05$); When it comes to SLE group, the levels of serum C1q in LN patients and non LN patients were and respectively, and the difference was statistically significant ($P<0.05$); There was positive correlation between C1q and serum immunoglobulin M (IgM) in SLE patients ($P<0.05$), negative correlation with C3, SLEDAI score, blood sedimentation ($P<0.05$) and there was no correlation between C1q and age, gen-

作者单位: 1. 南方医科大学第三附属医院风湿免疫科, 广东, 广州 510630

2. 暨南大学附属第一医院检验科, 广东, 广州 510630

*通信作者: 吴勇, E-mail: 13711179078@139.com

der, C4, CRP, urea and creatinine. Compared with the diagnostic accuracy, sensitivity and specificity of a single index, those three indexes were higher, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Conclusion Serum C1q was associated with SLE disease activity, C1q levels can be used as reference for the diagnosis of LN, the combined detection of serum C1q, antibody to double-stranded DNA (ds-DNA) and AnuA can improve the diagnostic accuracy, sensitivity and specificity.

[KEY WORDS] Systemic lupus Erythematosus; Lupus Nephritis; Complement C1q

系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)是一种以T淋巴细胞功能异常、B淋巴细胞高度活化、产生大量针对自身抗原的抗体为突出表现的自身免疫性疾病,其发病与遗传、环境及雌激素、肠道菌群等多种因素有关^[1-2]。狼疮肾炎(Lupus nephritis, LN)是SLE比较严重且最常见的脏器损害,尽早了解肾脏受损程度对于提高SLE的疗效及患者生存质量十分重要^[3-5]。目前,临床上判断LN分型及损伤部位主要依靠肾活检,该操作作为有创检查以及风险高、并发症多,因此,寻找能正确反映早期肾损伤、监测病情、指导治疗及预后判断的血清学标志物是迫切需要的。

补体1q(complement 1q, C1q)作为补体经典途径被激活的第一个补体亚基,是连接固有免疫应答与适应性免疫应答的纽带,参与SLE等多种自身免疫性疾病的发生、发展^[6]。检测血清中抗核小体抗体(Antinucleosome antibody, AnuA)能够辅助诊断LN,抗双链DNA(double stranded-DNA, ds-DNA)抗体是目前实验室最常用的SLE诊断及病情判断自身抗体指标,其滴度与疾病活动性相关,两者作为LN的诊断标志物在敏感性或特异性上均不理想。近年研究发现血清C1q与SLE病情发生及进展具有密切的关系,因此本文将探讨SLE中血清C1q表达水平及其在LN诊断以及SLE病情活动中等的价值,为C1q在SLE发病机制的研究及LN的实验室诊断提供参考。

1 材料与方法

1.1 一般材料

收集2017年1月至2019年6月南方医科大学第三附属医院及暨南大学第一附属医院确诊的门诊及住院SLE患者160例,均符合1997年美国风湿病学会修订的SLE分类标准^[7],同时按照系统性红斑狼疮疾病活动指数(systemic lupus erythematosus disease activity index, SLEDAI)评分^[8]分为病情活动组25例(SLEDAI \geq 5分),病情稳定组135例(SLEDAI $<$ 5分)。LN判断标准为肾活检确诊、连续性蛋白尿,尿蛋白定量 \geq 0.5 g/24 h、管型尿或者肾功能指标异常。依据此标准分为LN组53例,无LN组107例。另外收集其他风湿病50例作为疾病对照组,其中原发性干燥综合征(primary sjogren's syndrome, pSS)15例、类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)20例、皮肌炎/多肌炎(dermatomyositis and polymyositis, DM/PM)15例均符合风湿病诊断标准。收集同一时期来院体检者50例作为健康对照组,平均年龄(42.32 \pm 12.25)岁,男女性别之比为1:9,与实验组年龄、性别比例相近,各组间年龄及性别差异无统计学意义,见表1。

1.2 仪器与试剂

C1q采用免疫透射比浊法检测,试剂盒由上海北加生化试剂有限公司提供,血清免疫球蛋白M(immunoglobulin M, IgM)、免疫球蛋白G(immu-

表1 受检者临床资料比较($\bar{x} \pm s$)
Table 1 Clinical data of subjects ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | n | 男 | 女 | χ^2 值 | P值 | 年龄 | t/F值 | P值 |
|-------|-----|----|-----|------------|-------|-------------------|--------|--------|
| SLE组 | 160 | 14 | 136 | | | 35.89 \pm 16.44 | | |
| 疾病对照组 | 50 | 7 | 43 | 0.887 | 0.642 | 40.06 \pm 15.82 | 1.531 | 0.2182 |
| 健康体检组 | 50 | 5 | 45 | | | 42.32 \pm 12.25 | | |
| 病情活动组 | 25 | 2 | 23 | 0.063 | 0.802 | 34.43 \pm 16.08 | 0.4542 | 0.6503 |
| 病情稳定组 | 135 | 12 | 113 | | | 36.07 \pm 16.67 | | |
| LN组 | 53 | 4 | 49 | 0.312 | 0.577 | 35.81 \pm 17.18 | 0.4770 | 0.6340 |
| 无LN组 | 107 | 11 | 96 | | | 37.18 \pm 17.06 | | |

noglobulin G, IgG)、免疫球蛋白 A (immunoglobulin A, IgA)、补体 3 (complement3, C3)、补体 4 (complement4, C4) 采用免疫比浊法测定, 试剂购自罗氏诊断产品(上海)有限公司, 仪器均采用罗氏 C501 全自动生化分析仪(罗氏, 瑞士)检测, 抗 ds-DNA 抗体、AnuA 采用纳米粒磁微粒化学发光法, 试剂由苏州浩欧博生物有限公司提供; 肌酐、尿素均采用酶法; C-反应蛋白(C-reactive protein, CRP)采用荧光免疫层析法; 血沉采用自然沉降法; 所有实验严格按照标准操作规程进行操作。

1.3 统计学方法

应用 Graph Pad Prism5 软件进行数据处理, 计数资料采用 χ^2 检验, 计量资料分别采用 t 检验和方差分析进行多组间均数比较。血清中 C1q 表达水平与各临床指标的关系选用 Pearson 和 Spearman 相关分析。根据血清 C1q 表达水平建立 Logistic 回归模型, 绘制 ROC 评估血清 C1q 对 LN 的诊断效能 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血清 C1q 在 SLE 组、LN 组、无 LN 组、疾病对照组、健康对照组的表达水平

血清 C1q 在 3 组结果比较: SLE 组 < 疾病对照组 < 健康对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); LN 组血清 C1q 水平显著低于无 LN 组、疾病对照组以及健康对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 C1q 在不同组别患者血清中表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | <i>n</i> | 浓度(mg/L) | <i>F/t</i> 值 | <i>P</i> 值 |
|--------|----------|--------------|--------------|------------|
| SLE 组 | 160 | 164.79±58.20 | | |
| 疾病对照组 | 50 | 193.69±81.10 | 7.727 | 0.0006 |
| 健康对照组 | 50 | 197.69±50.10 | | |
| LN 组 | 53 | 150.23±48.20 | 1.979 | 0.0495 |
| 无 LN 组 | 107 | 173.68±79.22 | | |
| 病情活动组 | 25 | 158.42±44.23 | 2.295 | 0.0231 |
| 病情稳定组 | 135 | 178.39±39.16 | | |

2.2 血清 C1q 水平与 SLE 患者临床指标的关系

分析表明 SLE 患者的 C1q 与血清 IgM 浓度呈正相关性 ($P < 0.05$), 与 C3、SLEDAI 积分、血沉呈现负相关性 ($P < 0.05$), 与年龄、性别、C4、抗 ds-DNA 抗体、AnuA、CRP、肌酐、尿素等无相关性。见表 3。

表 3 血清 C1q 水平与 SLE 患者临床指标的关系

Table 3 The connection between serum C1q level and SLE patients' clinical indicators

| 临床参数 | C1q | |
|--------------------|------------|------------|
| | <i>r</i> 值 | <i>P</i> 值 |
| 年龄 | -0.193 | 0.257 |
| 性别 | -0.598 | 0.231 |
| C3(g/L) | -0.615 | <0.001 |
| C4(g/L) | -0.051 | 0.763 |
| CRP(mg/L) | 0.114 | 0.513 |
| 血沉(mm/h) | -0.302 | 0.027 |
| IgM(g/L) | 0.643 | <0.001 |
| IgG(g/L) | 0.102 | 0.547 |
| IgA(g/L) | -0.061 | 0.717 |
| SLE-DAI 积分 | -0.410 | 0.012 |
| 抗 ds-DNA 抗体(IU/mL) | 0.543 | 0.508 |
| 抗核小体抗体(RU/mL) | 0.254 | 0.446 |
| 肌酐(μ mol/L) | 0.135 | 0.185 |
| 尿素(mmol/L) | -0.119 | 0.460 |

2.3 C1q 在不同活动度 SLE 患者中表达及治疗前后对比分析

SLE 患者病情活动组血清中 C1q 水平明显低于疾病稳定组 ($P < 0.05$), 差异有统计学意义, 见表 4。本研究将 25 例活动期患者进行随访, 经三个月的常规治疗, 所有患者病情均明显缓解, 对比治疗前, 治疗后 SLE 患者血清 C1q 水平明显升高, SLEDAI 评分明显降低, 两者均 $P < 0.05$, 见表 4。

表 4 活动期 SLE 患者治疗前后血清 C1q 水平及 SLEDAI 评分比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 The comparison of serum C1q and SLEDAI score of SLE patients before and after treatment ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 浓度(mg/L) | SLEDAI 评分 |
|------------|--------------|------------|
| 治疗前 | 158.42±44.23 | 15.50±1.98 |
| 治疗后 | 183.30±39.42 | 9.10±1.3 |
| <i>t</i> 值 | 2.113 | 13.51 |
| <i>P</i> 值 | 0.0406 | <0.0001 |

2.4 C1q、AnuA、抗 ds-DNA 抗体联合检测灵敏度及特异性

与单一指标诊断性能进行对比, 3 种检测指标联合诊断 LN 的准确性、敏感性及特异性较高, AUC 为 0.906 9 ($P < 0.001$), 见表 5。

3 讨论

SLE 是典型的系统性自身免疫性疾病, 以产生多种针对自身核酸及其结合蛋白的抗体, 形成自

表5 C1q、AnuA、抗 ds-DNA 抗体联合检测的准确性、敏感性 & 特异性

Table 5 The diagnostic accuracy, sensitivity and specificity of combined detection of serum C1q, anti-ds-DNA antibody and AnuA

| 项目 | AUC | 准确性(%) | 敏感性(%) | 特异性(%) | Asymptotic sig. |
|----------------------|--------|--------|--------|--------|-----------------|
| C1q | 0.7644 | 78.75 | 73.58 | 81.31 | 0.045 |
| AnuA | 0.7457 | 75.63 | 75.47 | 75.70 | 0.023 |
| 抗 ds-DNA 抗体 | 0.8182 | 79.38 | 83.01 | 77.57 | 0.002 |
| AnuA+抗 ds-DNA 抗体 | 0.8676 | 84.38 | 81.13 | 85.98 | <0.001 |
| C1q+AnuA+抗 ds-DNA 抗体 | 0.9069 | 91.25 | 92.45 | 90.65 | <0.001 |

身抗原-抗体免疫复合物为特征。SLE 发病率高、病情复杂,常累及全身多器官、多系统。几乎所有晚期 SLE 患者均会并发由免疫复合物介导的肾脏损害,早期诊断、了解其活动程度并进行有效干预是延缓 LN 进入终末期肾病的有效途径。

C1q 是补体经典途径起始因子 C1 的亚基,其与多种配体结合是机体激活补体、清除凋亡细胞、免疫复合物等的重要途径。若体内 C1q 水平下降,则凋亡细胞清除受限,凋亡细胞继发坏死,导致自身抗原物质增多,伴随大量自身抗体产生,免疫复合物沉积于肾组织,形成恶性循环,加速了肾炎发生发展。本研究结果提示 C1q 一方面可能与体内存在抗 C1q 抗体有关,抗 C1q 抗体结合 C1q 并抑制其正常功能的发挥,并且形成的免疫复合物随血液循环沉积于肾脏,激活补体,炎症细胞浸润并释放大量弹性蛋白酶、基质金属蛋白酶等损伤组织^[9-10]。另一方面随着病情进展,C1q 的大量消耗也将导致其浓度降低。因此,C1q 水平的减低可能参与了 LN 的发病。

本研究分析结果推测在疾病早期,SLE 患者体内产生大量 IgM 抗体与相应抗原结合形成免疫复合物激活补体 C1q。同时,C1q 水平与 C3、SLEDAI 积分、血沉呈现负相关性,提示血清 C1q 水平可作为 SLE 活动评估指标,随着疾病进展其水平越低,肾脏损害可能越严重,因此动态监测血清 C1q 浓度能有效反应 SLE 病情。本研究还追踪 25 例入院时处于活动期的 SLE 患者,经过三个月的治疗,对比前后血清 C1q 水平发现,治疗后患者 C1q 水平明显增高,可能由于免疫抑制剂抑制了致病性抗体的滴度,导致免疫复合物形成减少,C1q 消耗少而导致其水平升高。目前,临床尚没有血清标志物能确诊 LN,本研究中将 SLE 中特异抗体与 C1q 联合诊断 LN,结果表明 3 种指标联合检测的灵敏度和特异度较单项及 AnuA、抗 ds-DNA 抗体联合检测更高。

综上所述,血清 C1q 水平在一定程度上反映

病情活动性,活动期患者血清 C1q 浓度降低,如治疗后浓度升高,则提示治疗方案有效不需调整,因此,动态监测血清 C1q 水平的变化,可作为 SLE 患者病情活动及疗效评估的一项可靠指标。将来还需要进一步阐明 C1q 在 SLE 发病中的作用机制,并且需要将多种生物标志物联合在大样本中检测来筛选更有效的诊断及预后判断标志物。

参考文献

- [1] Fenton K. The effect of cell death in the initiation of lupus nephritis[J]. Clin Exp Immunol, 2015, 179(1):11-16.
- [2] Collison J. Gut microbiota linked to kidney disease in SLE[J]. Nat Rev Rheumatol, 2019 15(4):188.
- [3] Lorenz G, Desai J, Anders HJ. Lupus nephritis: update on mechanisms of systemic autoimmunity and kidney immunopathology[J]. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2014, 23(3):211-217.
- [4] Hammad A, Yahia S, Laimon W, et al. Angiotensin-converting enzyme in sertion/deletion gene polymorphism in Egyptian children with systemic lupus erythematosus: a possible relation to proliferativenephritis[J]. Lupus, 2017, 26(7):762-767.
- [5] Xu R, Li Q, Liu R, et al. Association Analysis of the MHC in Lupus Nephritis[J]. Am Soc Nephrol, 2017, 28(11):3383-3394.
- [6] Guo J, Gao Y, Wang Y, et al. Investigation of C1-complex regions reveals new C1Q variants associated with protection from systemic lupus erythematosus, and affect its transcript abundance[J]. Sci Rep, 2018, 8(1):8048-8056.
- [7] Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus[J]. Arthritis Rheum, 1997, 40(9):1725.
- [8] Jesus D, Matos A, Henriques C, et al. Derivation and validation of the SLE Disease Activity Score (SLE-DAS): a new SLE continuous measure with high sensitivity for changes in disease activity[J]. Ann Rheum Dis, 2019, 78(3):365-371.
- [9] Liaskos C, Rentouli S, Simopoulou T, et al. Anti-C1q autoantibodies are frequently detected in patients with systemic sclerosis associated with pulmonary fibrosis[J]. Br J Dermatol, 2019, 188(1): 138-146.
- [10] Birmingham DJ, Bitter JE, Ndnkwe EG, et al. Relationship of circulating anti-C3b and C1q IgG to lupus nephritis and its flare[J]. Clin J Am Soc Nephrol, 2016, 11(1):47-53.

· 论 著 ·

恩必普治疗对 ICVD 患者血液流变学、血清 chemerin 和 Hcy 水平的影响

王丽轩* 洪震 张乐国 贾建普 张俊玲

[摘要] 目的 观察恩必普治疗对缺血性脑血管疾病(ICVD)患者血液流变学、血清趋化素(chemerin)及同型半胱氨酸(Hcy)水平的影响。方法 选取本院收治的72例ICVD患者,利用数字表法随机分为2组,各36例,对照组接受常规治疗,实验组于其基础上加用恩必普,比较2组治疗前后血液流变学[红细胞聚集指数、纤维蛋白原(FBG)、血浆黏度(PV)、低切全血黏度(nbl)与高切全血黏度(nbh)]、血清 chemerin 与 Hcy 水平、美国国立卫生研究院卒中量表(NIHSS)评分、日常生活能力(Barthel)变化及不良反应发生率。结果 实验组治疗后红细胞沉降率、FBG、PV、nbl、nbh明显低于对照组($P<0.05$);实验组治疗后血清 chemerin 与 Hcy 水平显著低于对照组($P<0.05$);实验组治疗后 NIHSS 评分显著低于对照组($P<0.05$), Barthel 评分显著高于对照组($P<0.05$);2组不良反应总发生率比较无显著差异($P>0.05$)。结论 恩必普可有效改善 ICVD 患者血液流变学、chemerin 与 Hcy 表达情况,疗效显著,且具有较高安全性。

[关键词] 恩必普;缺血性脑血管疾病;血液流变学;趋化素;同型半胱氨酸

Effects of Butylphthalide on hemorheology, levels of serum chemerin and Hcy in ICVD patients

WANG Lixuan*, HONG Zhen, ZHANG Leguo, JIA Jianpu, ZHANG Junling

(Department of neurology, Cangzhou central hospital, Cangzhou, Hebei, China, 061001)

[ABSTRACT] Objective To observe effects of Butylphthalide on hemorheology, levels of serum chemerin and homocysteine (Hcy) in patients with ischemic cerebral vascular disease (ICVD). Methods Seventy-two ICVD patients who were admitted to the hospital were divided into two groups by random number table method, 36 cases in each group. The control group was given routine treatment, while experimental group was given Butylphthalide on basis of control group. The hemorheology [erythrocyte aggregation index, fibrinogen (FBG), plasma viscosity (PV), low cut whole blood viscosity (nbl), high cut whole blood viscosity (nbh)], levels of serum chemerin and Hcy, changes in scores of National Institute of Health stroke scale (NIHSS) and Activities of Daily Living (Barthel), and incidence of adverse reactions before and after treatment were compared between the two groups. Results After treatment, erythrocyte sedimentation rate, FBG, PV, nbl and nbh in both groups were significantly decreased. And the above indexes in experimental group were significantly lower than those in control group ($P<0.05$). After treatment, levels of serum chemerin and Hcy in both groups were significantly decreased. And the above indexes in experimental group were significantly lower than those in control group ($P<0.05$). After treatment, NIHSS scores in both groups were significantly decreased, while Barthel scores were significantly increased ($P<0.05$). NIHSS score of experimental group was significantly lower than that of control group, while Barthel score was significantly higher than that of control

基金项目:沧州市科技计划项目任务书(131302052)

作者单位:沧州市中心医院神经内二科 河北,沧州 061001

*通信作者:王丽轩, E-mail: 122696109@qq.com

group ($P < 0.05$). There was no significant difference in overall incidence of adverse reactions between the two groups ($P > 0.05$). **Conclusion** Butylphthalide can effectively improve hemorrheology, expression of chemerin and Hcy in ICVD patients, with significant curative effect and high safety.

[KEY WORDS] Butylphthalide; ICVD; Hemorrheology; Chemokine; Hcy

缺血性脑血管疾病(ischemic cerebral vascular disease, ICVD)主要病理基础为动脉粥样硬化,临床可采取抗凝药物、扩张血管药物、溶栓药物及抗血小板药物等进行治疗,但存在脑出血风险,其中扩张血管药物能加重脑水肿,增加治疗难度^[1-3]。恩必普属于新型抗脑缺血治疗药物,能够通过有效清除自由基等各类途径,对ICVD病理发展产生干预作用。以往报道称,恩必普能够促进脑梗塞部位微血管增生,提高缺血区域内脑血流量,不仅可以重建微循环,促进梗塞面积缩小,同时还能减轻局部脑缺血引起的脑水肿^[4]。本文探讨恩必普治疗对ICVD患者血液流变学、血清趋化素(chemerin)及同型半胱氨酸(Homocysteine, Hcy)水

平的影响,以期为ICVD治疗方案的选择提供一定依据。现汇报如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2018年2月至2019年3月本院收治的72例ICVD患者。利用数字表法随机分为2组,各36例。实验组年龄52~74岁,平均年龄(58.74±8.65),体质指数(BMI)为(23.04±2.48);对照组年龄50~73岁,平均年龄(57.23±8.57),体质指数(BMI)为(23.12±2.51)。2组性别、年龄、体质指数(BMI)及疾病类型等基线资料比较无显著差异($P > 0.05$)。见表1。

表1 2组基线资料比较($n=36$) [$n(\%)$, ($\bar{x} \pm s$)]

Table 1 Comparison of baseline data between 2 groups [$n(\%)$, ($\bar{x} \pm s$)]

| 组别 | 性别($n=36$) | | 年龄(岁) | BMI(kg/m^2) | 疾病类型($n=36$) | |
|--------------|--------------|-----------|------------|-------------------------------|----------------|-----------|
| | 男 | 女 | | | 急性脑梗塞 | TIA |
| 实验组 | 21(58.33) | 15(41.67) | 58.74±8.65 | 23.04±2.48 | 20(55.56) | 16(44.44) |
| 对照组 | 23(63.89) | 13(36.11) | 57.23±8.57 | 23.12±2.51 | 19(52.78) | 17(47.22) |
| χ^2/t 值 | 0.234 | | 0.744 | 0.136 | 0.056 | |
| P 值 | 0.629 | | 0.459 | 0.892 | 0.813 | |

纳入标准:①与《中国脑血管病防治指南》^[5]中ICVD有关诊断标准相符,并经头颅电脑断层扫描(Computed Tomography, CT)或磁共振成像(Magnetic Resonance Imaging, MRI)证实;②发病时间 < 3 d,按照TOAST分型法分为急性脑梗塞与短暂脑缺血发作(Transient ischemic attack, TIA);③对研究知情并同意参与。排除标准:①伴随感染性疾病或者风湿免疫性疾病;②合并严重脏器(比如心肝肾等)功能损伤;③合并脑外伤或者脑出血;④恶性肿瘤患者;⑤近3个月内接受过抗凝药物治疗;⑥对研究所用药物过敏。

1.2 方法

1.2.1 治疗方法

对照组接受常规治疗:20 mL舒血宁(国药准字:Z13020795,生产厂家:神威药业集团有限公司)加入250 mL葡萄糖溶液(国药准字:

20023196生产厂家:青岛华仁药业股份有限公司)以静脉滴注方式给药,1次/d;结合病情采取常规降糖、降压、降脂等对症支持治疗措施。实验组于上述基础上服用恩必普(国药准字:H20050299,生产厂家:石药集团恩必普药业有限公司)200 mg,3次/d。2组均连续治疗2周为1疗程,共1疗程。

1.2.2 检测方法

分别在治疗前与治疗1疗程后,抽取患者晨起空腹静脉血5 mL,使用3 000 r/min速率离心10 min,分离血清后放在 -80°C 环境中储存备用,通过全自动血液流变分析仪(型号:MVIS-2035)进行红细胞沉降率、纤维蛋白原(Fibrinogen, FBG)、血浆黏度(plasma viscosity, PV)、低切全血黏度(Low cut whole blood viscosity, nb1)与高切全血黏度(High cut whole blood viscosity, nbh)。采取全自动

生化分析仪(型号:日立7080)与相关配套原装试剂,以循环酶法进行血清Hcy检测,以酶联免疫吸附法进行血清chemerin检测。

1.3 观察指标

观察2组治疗前后血液流变学(红细胞沉降率、FBG、PV、nbl、nbh)、血清chemerin与Hcy水平、美国国立卫生研究院卒中量表(National Institute of Health stroke scale, NIHSS)评分、日常生活能力(Barthel)变化及不良反应发生率(恶心、腹部不适等)。NIHSS评分越高,预示患者神经功能缺损情况越严重。Barthel评分标准:生活能力好:>60分;部分障碍:20~60分;严重受限:<20分^[6]。

表2 2组治疗前后血液流变学、血清chemerin与Hcy水平比较

Table 2 Comparison of blood rheology, serum chemerin and Hcy levels between 2 groups before and after treatment

| 项目 | 实验组(n=36) | | t值 | P值 | 对照组(n=36) | | t值 | P值 |
|----------------|------------|------------|-------|-------|------------|------------|-------|--------|
| | 治疗前 | 治疗后 | | | 治疗前 | 治疗后 | | |
| FBG(g/L) | 4.67±0.82 | 2.53±0.42 | 0.733 | 0.466 | 4.81±0.80 | 3.57±0.64 | 8.151 | <0.001 |
| PV(mPa·s) | 3.20±0.58 | 1.54±0.29 | 0.369 | 0.713 | 3.15±0.57 | 2.08±0.36 | 7.009 | <0.001 |
| nbl(mPa·s) | 12.96±2.38 | 8.84±1.53 | 0.215 | 0.831 | 12.84±2.36 | 10.05±1.94 | 2.938 | 0.005 |
| nbh(mPa·s) | 7.02±1.35 | 5.13±1.01 | 0.187 | 0.852 | 7.08±1.37 | 6.07±1.15 | 3.685 | <0.001 |
| 红细胞沉降率(mm/h) | 37.65±6.12 | 28.03±4.25 | 0.562 | 0.576 | 36.84±6.10 | 32.17±6.02 | 3.371 | 0.001 |
| chemerin(ng/L) | 32.04±5.73 | 21.18±4.05 | 0.141 | 0.888 | 31.85±5.70 | 26.34±4.28 | 5.254 | <0.001 |
| Hcy(μmol/L) | 21.48±4.02 | 10.28±1.84 | 0.968 | 0.337 | 20.57±3.96 | 15.62±2.97 | 9.171 | <0.001 |

2.2 2组治疗前后NIHSS评分、Barthel评分比较

治疗前,2组NIHSS评分、Barthel评分比较无显著差异($P>0.05$);实验组治疗后NIHSS评分显著低于对照组($P<0.05$),Barthel评分显著高于对照组($P<0.05$),见表3。

表3 2组治疗前后NIHSS评分、Barthel评分比较
(n=36)

Table 3 Comparison of NIHSS score and Barthel score before and after treatment in 2 groups (n=36)

| 组别 | NIHSS评分 | | Barthel评分 | |
|-----|------------|-----------|------------|-------------|
| | 治疗前 | 治疗后 | 治疗前 | 治疗后 |
| 实验组 | 14.36±2.37 | 7.05±1.32 | 42.78±7.63 | 64.58±10.35 |
| 对照组 | 15.01±2.40 | 8.56±1.45 | 43.12±7.84 | 54.76±9.43 |
| t值 | 1.156 | 4.620 | 0.186 | 4.208 |
| P值 | 0.252 | <0.001 | 0.853 | <0.001 |

2.3 2组不良反应发生率比较

2组不良反应较轻微,总发生率比较无显著差异($P>0.05$),见表4。

1.4 统计学处理

使用SPSS 19.0软件处理数据,计数资料以n(%)表示,采用卡方 χ^2 检验;计量资料以($\bar{x}\pm s$)表示,应用t检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2组治疗前后血液流变学、血清chemerin与Hcy水平比较

治疗前,2组血液流变学指标、血清chemerin与Hcy水平比较,差异无统计学意义($P>0.05$);实验组治疗后红细胞沉降率、FBG、PV、nbl、nbh、血清chemerin与Hcy水平明显低于对照组($P<0.05$),见表2。

表4 2组不良反应发生率比较 [n=36, n(%)]

Table 4 Comparison of the incidence of adverse reactions in 2 groups [n=36, n(%)]

| 组别 | n | 恶心 | 腹部不适 | 总发生率 |
|------------|----|---------|---------|---------|
| 实验组 | 36 | 1(2.78) | 1(2.78) | 2(5.56) |
| 对照组 | 36 | 1(2.78) | 0(0.00) | 1(2.78) |
| χ^2 值 | | | | 0.000 |
| P值 | | | | 1.000 |

3 讨论

以往研究表明,发生ICVD后,血液流变学异常(血浆黏度增加)属于造成神经元损伤重要影响因素,这类状态会持续存在于发病后比较长时间,同时认为积极改善血液流变学、预防血栓、减轻神经细胞损伤等于患者救治及改善预后中具有重要意义^[7]。恩必普通用名为丁苯酞软胶囊,为近年来国内研发制造出来的新药,可起到改善脑缺血区域内微循环作用,加快血管增长,提高缺血区脑血

流^[8]。本研究结果与纪海茹等^[9]研究观点相符。说明恩必普能增强 ICVD 患者血液流变学指标改善程度,其机制可能是因为丁苯酞抑制了黄嘌呤-黄嘌呤氧化酶(xanthine oxidase, XOD)反应系统里面超氧阴离子自由基产生过程,通过减弱氧化应激反应等途径优化血管内皮功能,增加局部血流量。相关报道称,脂肪因子能通过自分泌、旁分泌以及内分泌方式调控部分身体功能,并且参与疾病发生,包括动脉粥样硬化疾病与代谢综合征等^[10]。而 Chemerin 属于脂肪细胞因子,且为 G 蛋白偶联受体(G Protein-Coupled Receptors, GPCRs)趋化因子受体 1(Chemokine receptor 1, CMKLR1)的天然配体,大量存在于人类炎性体液内。有研究指出,炎症组织里面 Chemerin 存在表达现象,且对巨噬细胞以及表达 CMKLR1 的相应抗原递呈细胞具有趋化能力,观察 Chemerin 抗炎特性发现,Chemerin 可能在人体动脉粥样硬化疾病与炎症反应中起着重要作用^[11]。亦有研究表明,Chemerin 可能作为一种急性时相蛋白,在人体应激条件下呈现反应性增高改变,该变化可能与致动脉粥样硬化因子产生有关,从而参与 ICVD 发生^[12]。ICVD 出现时,储存 Chemerin 的相应血小板活化,并且缺血损伤导致多种丝氨酸酶类得以被激活,提高了循环系统内 Chemerin 水平。相关报道称,血清 Hcy 表达增加为缺血性脑卒中主要危险因素^[13]。亦有研究指出,血清 Hcy 表达水平升高可以促进人体内氧自由基生成,提高内皮细胞凋亡速率,导致内皮细胞出现结构与功能变化,并且减少内皮细胞增殖,提高炎症因子分泌水平,诱发炎症反应,最终造成动脉粥样硬化^[14-15]。本研究结果提示恩必普可有效抑制 ICVD 患者 chemerin 与 Hcy 表达,起到改善动脉粥样硬化与机体炎症作用。以往报道称,丁苯酞软胶囊用于血管性痴呆治疗,可改善患者脑缺血引起的认知功能损伤,起到保护脑功能作用^[16]。本研究结果表明在常规治疗上加用恩必普,能够有效促进 ICVD 患者神经功能与生活能力恢复,并提示恩必普的使用不会引发严重不良反应,具有较高安全性。

综上,在常规治疗基础上应用恩必普治疗 ICVD,能更有效改善患者血液流变学指标,抑制血清 chemerin 与 Hcy 表达,减轻动脉粥样硬化以及炎症反应,促进神经功能恢复,且应用安全。

参考文献

- [1] 李邦林,贾汉伟,李靖,李刚. 缺血性脑卒中患者单个核细胞 TLR3、IRF-3、IFN- γ mRNA 表达及临床意义[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(02):207-211.
- [2] Alqahtani F, Aljohani S, Tarabishy A, et al. Incidence and Outcomes of Myocardial Infarction in Patients Admitted With Acute Ischemic Stroke[J]. Stroke, 2017, 48(11):2931-2938.
- [3] Krause N, Brand RJ, Arah OA, et al. Occupational Physical Activity and 20-year Incidence of Acute Myocardial Infarction: Results from the Kuopio Ischemic Heart Disease Risk Factor Study[J]. Scand J Work Environ Health, 2015, 41(2):124-139.
- [4] 李同凯,郑会城,高伟,等. 丁苯酞联合纳洛酮治疗后循环缺血性眩晕症的疗效观察[J]. 医学研究生学报, 2014, 27(8):839-841.
- [5] 中华医学会神经病学分会. 中国脑血管病防治指南[M]. 北京:人民卫生出版社, 2007:46.
- [6] 佟秀霞,侯爱民,赵艳晶. 老年急性缺血性脑卒中患者延迟就诊相关影响因素及预后分析[J]. 中国老年学杂志, 2017, 37(14):3458-3460.
- [7] Khan AR, Abdulhak AAB, Alastal Y, et al. Cardio-Protective Role of Ischemic Postconditioning in Acute Myocardial Infarction: A Systematic Review and Meta-analysis[J]. Am Heart J, 2014, 168(4):512-521.
- [8] 杨毅,官俏兵,郭丽,等. 缺血缺氧条件下丁苯酞促进人脐静脉内皮细胞形成血管的体外实验及机制研究[J]. 中华神经科杂志, 2018, 51(6):464-469.
- [9] 纪海茹,孔维,孔令伟,等. 脑缺血再灌注损伤后血脑屏障结构与功能的变化及丁苯酞预处理的干预作用[J]. 中国病理生理杂志, 2014, 30(11):2079-2083.
- [10] 贺燕林,郝宏毅,哈若水,等. 原发性高血压患者心外膜脂肪体积与颈动脉粥样硬化的关系[J]. 临床心血管病杂志, 2015, 31(2):221-224.
- [11] 郭佳,关智媛,孙守元,等. 迷走神经电刺激对大鼠中动脉阻断/再灌注大鼠脑损伤及脑组织中 p-CREB 表达的影响[J]. 解放军医学杂志, 2017, 42(8):702-706.
- [12] 李学敏,陈文文,金维,等. 经颅直流电刺激联合认知功能训练治疗缺血性脑卒中后失语症临床效果观察[J]. 临床误诊误治, 2019, 32(8):80-85.
- [13] 殷艳玲,马娟,韩楠楠,等. MMP-9、IL-1 β 等炎症因子水平变化与急性脑梗死相关性分析及其意义分析[J]. 医学分子生物学杂志, 2018, 15(5):344-347.
- [14] 丁玉峰,刘世芬,牛建一,等. 舒血宁注射液联合丁苯酞软胶囊联合治疗缺血性脑卒中的临床效果分析[J]. 中药药理与临床, 2016, 32(4):138-141.
- [15] 郭刚,李建辉,战丽萍,等. 丁苯酞注射液对伴有认知障碍的脑梗死急性期患者脑血流灌注和认知功能的影响[J]. 中华神经医学杂志, 2018, 17(5):484-490.
- [16] 尹春丽,王耀伍,吕佩源,等. 丁苯酞联合尤瑞克林对急性脑梗死患者缺血低灌注区面积的影响及临床疗效评价[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2016, 23(6):565-567.

单细胞转录组测序技术在类风湿性关节炎的研究进展

李琼¹ 陈宇婷¹ 接力刚³ 毋静³ 杜红延^{2*}

[摘要] 类风湿性关节炎(RA)是常见的自身免疫性疾病,由于其参与的细胞种类众多发病机制复杂,目前仍然机制未明。单细胞研究技术的出现为从细胞基础上研究免疫耐受的破坏和促炎通路失调提供了新的手段,并可能从根本上改变对风湿病发病机制的分子通路的理解。单细胞转录组测序(sc RNA-seq)可以解决普通转录组技术不能精确到细胞类型的问题,对组织中的细胞进行独立分析,提供无偏倚的结果,为细胞亚群的鉴定提供更多 mRNA 信息。这项技术在 RA 的广泛应用为展示滑膜细胞的异质性,鉴定致病细胞群以及揭示疾病发生发展的机制提供了有力的工具。本文将主要围绕目前 sc RNA-seq 在 RA 中的研究进展进行阐述 sc RNA-seq 的原理和常用的测序平台以及在 RA 研究中所取得的成果。

[关键词] 单细胞转录组测序;类风湿性关节炎;细胞亚群鉴定;细胞异质性

Research progress of single cell RNA sequencing technology in rheumatoid arthritis

LI Qiong¹, CHEN Yuting¹, JIE Ligang³, WU Jing³, DU Hongyan^{2*}

(1. First College of Clinical Medicine, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong, China, 510515; 2. School of Laboratory Medicine and Biotechnology, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong, China, 510515; 3. Department of Rheumatology and Clinical Immunology, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong, China, 510282)

[ABSTRACT] The pathogenesis of rheumatoid arthritis (RA), one of the most prevalent autoimmune diseases, is still unknown due to its complex disease-associated cell composition and function. Technological advances are enabling the analysis of single cell data, which could provide researchers with opportunities to study the breakdown of immune tolerance and dysregulated pro-inflammatory pathways on a cell-by-cell basis, and fundamentally change our understanding of the molecular pathways that underpin the pathogenesis of rheumatic diseases. Single cell RNA-sequencing (sc RNA-seq) can reduce the bias that bulk RNA-seq cannot be accurate to cell type by performing independent sequencing of every cell within a tissue, and provide more transcriptome information for cell clustering. The wide application of this technology in RA also provides a powerful tool for identifying synovial cell heterogeneity and pathogenic cell groups, and revealing the mechanism of disease. This article focuses on the current research progress of sc RNA-seq in RA, including the basic principle, common platforms, and achievements in RA.

[KEY WORDS] Single cell RNA-sequencing; Rheumatoid arthritis; identification of cell subsets; Cell heterogeneity

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是常见的自身免疫性疾病,主要累及四肢小关节,造成关节破坏和畸形、丧失劳动力甚至危及生命^[1,2]。据统计

计,世界范围内 RA 发病率约为 0.5%~1.0%,在我国约为 0.4%,患者超过 500 万^[1,3]。患者的关节滑膜中存在多种免疫细胞和成纤维细胞,其中特定细胞亚

基金项目:国家自然科学基金(81601397, 81102688);广东省自然科学基金(2016A030313624)

作者单位:1. 南方医科大学第一临床医学院,广东,广州 510515

2. 南方医科大学检验与生物技术学院,广东,广州 510515

3. 南方医科大学珠江医院检验科,广东,广州 510282

通信作者:杜红延, E-mail: dhy48321@smu.edu.cn

群介导的免疫反应失调可能在RA发病机制中起重要作用。

单细胞转录组测序(single cell RNA sequence, sc RNA-seq)能够从单个细胞分辨率下为人们展示细胞在各种环境下的状态以及功能,打破以往利用有限的细胞标记物对细胞异质性研究的局限性^[4,5]。基于sc RNA-seq的“人类细胞图谱”项目的开展也将加深对人体组织中处于不同分化或疾病状态细胞的理解^[6]。这项技术在RA的应用也为鉴定组织中浸润性免疫细胞亚群和致病性驻留细胞亚群,以及揭示疾病机制提供有力工具。本文将对sc RNA-seq技术原理、常用的测序平台以及在RA中的研究进展进行综述。

1 单细胞转录组测序(sc RNA-seq)技术

sc RNA-seq的一般流程包括单细胞悬液的制备、细胞捕获及裂解、逆转录及cDNA扩增、文库构建及测序等,其中关键的两个步骤为细胞捕获与分子定量。细胞捕获最常用的方法是利用微孔、微流或者微滴的技术;而定量主要有基于全长或者标签两种方法:前者获取每个转录本覆盖度一致且独特的全长片段;后者则是通过标签探针,捕获RNA的5'或3'端序列进行定性定量分析^[7]。

2009年汤富酬团队首次报道了sc RNA-seq^[8],后又出现如Smart-seq2、MARS-seq、CEL-seq、Drop-seq、inDrop和10X Chromium等技术。其中Smart-seq2可得到全长的mRNA序列,而MARS-seq、CEL-seq、Drop-seq、inDrop和10X Chromium是将标签整合到cDNA中^[9]。不同的方法在原理以及灵敏度上有所差异,故应该结合具体的生物学问题选择最适合的平台。而Smart-seq2的主要优势在于可以得到的mRNA全长信息^[5,10]。

sc RNA-seq数据在细胞层面的分析主要包括细胞聚类和细胞轨迹推测,前者通过降维、无监督聚类的算法对基因表达相似的细胞进行分群;而后者则是使用最小生成树的策略,对细胞进行排序,模拟出细胞的分化轨迹。在基因层面的分析主要包括分析差异基因表达、鉴定细胞标记、结合时间轨迹分析基因表达的变化情况、以及分析基因共表达模块和调控网络等^[11]。此外,测序数据还可以结合单细胞甲基化、染色质的可及性以及表面蛋白等数据共同分析,为疾病机制研究提供更加全面的策略^[12]。

2 常用测序平台

目前研究常用的平台包括基于微滴的inDrop^[13]、Drop-seq^[14]、10x Genomics^[15]、基于微孔的BD Rhapsody^[16]等高通量平台,以及基于微流的C1 system (Fluidigm)^[17]平台等。InDrop、Drop-seq和10x Genomics均将细胞与微球包裹在微液滴中,用微球上独特的条形码区分细胞。这些平台的主要差异在于条形码的使用数量和微球的物理特性,如Drop-seq比inDrop的条形码更多,可以处理更多的细胞,但缺点是细胞捕获效率低(约1%)。而inDrop和10x Genomics平台的微球由水凝胶构成,捕获效率更高(前者约10%;后者约50%)^[18]。10x Genomics还可同时实现单细胞表面蛋白测定^[19]和TCR/BCR测序^[20]。BD Rhapsody平台在微孔中收集细胞,细胞溶解后释放的mRNA与细胞标记结合,同时系统还使用UMI序列标记mRNA,以减少扩增偏差;可以实现靶向测序,降低实验成本^[9];可以结合BD AbSeq assays同时分析转录组和蛋白质,为细胞分群提供更可靠的依据^[16]。C1 system (Fluidigm)则是将单个细胞分配到各自反应室,通过显微镜来区分细胞状态,计算捕获细胞的数量,然后对细胞进行裂解、RNA逆转录和预扩增以及后续测序分析,其优势在于可以得到全长mRNA的信息,但捕获细胞数量少、成本高且周期长^[17]。

3 sc RNA-seq在类风湿关节炎研究中的应用

3.1 绘制滑膜组织细胞图谱

高通量sc RNA-seq为细胞图谱的建立奠定了技术基础,已发表的来自小鼠和健康人群各种组织的细胞图谱也为进一步研究病理组织中的细胞提供了包括细胞标记物和细胞功能在内的理论依据^[21-22]。随着sc RNA-seq在RA中的广泛应用,对滑膜细胞功能与状态的理解也更加深入。2018年,Stephenson等^[23]开发了一种低成本的微流控技术,对RA患者膝关节滑膜组织中的细胞进行了Drop-Seq,利用无监督聚类的算法,结合细胞特异性标记物,将20387个细胞细分成了包括3种成纤维细胞、3种T细胞、NK细胞等在内的13个细胞亚群,首次展现出一个全面的滑膜组织细胞图谱。Zhang等^[24]利用流式细胞分选技术将CD4⁺T细胞、B细胞、单核细胞和成纤维细胞分选出来分别进行CEL-Seq2,并整合RNA-seq得到的数据,确定并阐述了4种成纤

维细胞亚群、4种单核细胞亚群、3种CD4⁺T细胞亚群、3种CD8⁺T细胞亚群和4种B细胞亚型的特征。研究者进一步对与疾病相关的基因如炎症反应和干扰素基因等在每群细胞的差异或公共表达进行了分析,为寻找疾病干预靶点提供了思路。

3.2 鉴定关键细胞亚群

在针对疾病不同特征如持续的炎症以及关节的破坏等发生机制的研究中,将scRNA-seq技术应用于关注的细胞群体也可以帮助研究者寻找靶向性更高的治疗方式。为了分析成纤维细胞的异质性,Mizoguchi等^[25]对RA和骨关节炎(osteoarthritis, OA)患者滑膜组织的成纤维细胞进行了Smart-Seq2,结合表面蛋白的结果,确定了在RA中显著扩增的成纤维细胞亚群。这群细胞定位在滑膜的血管周围,基因功能分析也揭示了其在免疫细胞募集和破骨细胞形成上的潜在作用。在针对巨噬细胞的研究中,Kuo等^[26]报道了HBEGF⁺炎症巨噬细胞,这群细胞显著表达促进炎症反应的基因NR4A3、PLAUR和CXCL2,以及生长因子HBEGF和EREG,而对该群巨噬细胞-成纤维细胞作用轴的干扰也成为RA治疗的新方向。Stephan等^[27]证实了分化的CX3CR1⁺巨噬细胞的存在,这群细胞表达Trem2和Vsig4等免疫基因,并可以在滑膜衬里形成一个内部免疫屏障,抑制关节的炎症反应。此外,为了鉴定出能够分化为破骨细胞的亚群,研究者分选了CX3CR1^{hi}Ly6C^{int}细胞,在BD Rhapsody平台进行了测序,发现了由Foxm1因子调节的具有破骨细胞特征的细胞群体,也证实了Foxm1具有调控特定巨噬细胞向破骨细胞分化的作用^[28]。

3.3 单细胞多组学应用

单细胞多组学测序可以通过优化和整合基因组、表观遗传、转录组和蛋白质组提供的不同数据,全面分析单个细胞的独特基因型、表型以及潜在的调控机制^[29]。在RA中,单细胞多组学的应用集中于转录组和蛋白组。在一项鉴定RA中扩增CD4⁺T细胞克隆的定性和定量的特征的研究中,Ishigaki等^[30]对RA患者和健康人的外周血中的CD4⁺T细胞进行了单细胞TCR分析,并对外周血与滑膜中显著扩增的CD4⁺T细胞克隆进行了scRNA-seq分析,由此追踪同一克隆内基因表达的变化。此外,为了分析并验证更加稳定的细胞分群,转录组数据可以结合bulkRNA-seq以及单细胞表面蛋白的数

据。比如在鉴定RA患者中驱动炎症的细胞亚群时,可以利用典型相关性分析算法整合bulkRNA-seq和scRNA-seq数据,同时应用质谱流式细胞技术进行分群与验证^[24]。既往研究已经表明DNA的甲基化和组蛋白修饰等是RA发病的关键因素,因此未来对单细胞表观遗传和转录组的综合分析也将有助于理解RA的调控机制^[31]。

3.4 scRNA-seq数据挖掘

基于scRNA-seq的数据挖掘已经广泛应用于肿瘤的研究,帮助研究者发现新的思路或验证假说^[32]。RA的数据挖掘也已逐渐开展,Gawel等^[33]对关节炎小鼠模型的关节和淋巴结的scRNA-seq数据进行了系统性分析,发现信号通路、潜在的生物标记物以及药物靶点等在各种细胞类型中存在差异,并构建了疾病相关细胞类型和相互作用的网络模型,用于系统性地分析可靠的生物标记物和药物。在一项验证外周血与关节炎反应存在差异的meta分析中,研究者也补充了scRNA-seq的数据挖掘,发现了血液和关节中共存的4种细胞群炎症反应表达谱的差异,为假设提供了更多的支持证据^[34]。基于同样的思路,Lewis等^[35]完善了免疫途径在各种细胞亚群差异性激活的研究。进一步的分析提示WNT、TGF- β 、Fc ϵ RI以及ERBB信号通路对成纤维细胞的转变起到调节作用,而这些变化的通路则可能为两种疾病的治疗提供方向^[36]。

4 总结与展望

ScRNA-seq测序除了有助于鉴定细胞亚群,还可预测细胞在疾病进展中的分化状态。目前已经成功对不同阶段OA患者的软骨细胞进行测序和拟时间轨迹分析,揭示了疾病不同阶段的基因表达谱变化,这提示在有关RA的研究中也可以根据患者的不同发病阶段分析基因表达谱的改变,寻找可能的干预靶点^[37]。此外单细胞空间转录组的出现也可以在不丢失细胞空间信息的前提下研究细胞与微环境的相互作用,识别不同细胞群在其空间背景下的特定功能^[38]。因此,随着scRNA-seq技术的完善以及在RA中的广泛应用对骨膜组织内的细胞状态的研究将更加深入。且结合单细胞多组学以及空间转录组的信息,可从基因、表观遗传、转录组、蛋白组以及组织微环境层面全面分析RA的发病机制,为疾病分期、发现新的治疗靶点和确定疾病早期诊断标记物提供理论依据。

参考文献

- [1] Smolen JS, Aletaha D, McInnes I B. Rheumatoid arthritis[J]. *Lancet*, 2016,388(10055):2023-2038.
- [2] Boissier M C, Biton J, Semerano L, et al. Origins of rheumatoid arthritis[J]. *Joint Bone Spine*, 2019.
- [3] Li ZG. A new look at rheumatology in China--opportunities and challenges [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2015, 11 (5) : 313-317.
- [4] Carr HL, Turner JD, Major T, et al. New Developments in Transcriptomic Analysis of Synovial Tissue [J]. *Front Med (Lausanne)*, 2020,7:21.
- [5] Cheung P, Khatri P, Utz PJ, et al. Single-cell technologies - studying rheumatic diseases one cell at a time [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2019,15(6):340-354.
- [6] Regev A, Teichmann SA, Lander ES, et al. The Human Cell Atlas[J]. *Elife*, 2017,6.
- [7] Potter SS. Single-cell RNA sequencing for the study of development, physiology and disease [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2018, 14(8):479-492.
- [8] Tang F, Barbacioru C, Wang Y, et al. mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell[J]. *Nat Methods*, 2009, 6(5):377-382.
- [9] See P, Lum J, Chen J, et al. A Single-Cell Sequencing Guide for Immunologists[J]. *Front Immunol*, 2018,9:2425.
- [10] Andrews TS, Hemberg M. Identifying cell populations with scRNASeq[J]. *Mol Aspects Med*, 2018,59:114-122.
- [11] Rostom R, Svensson V, Teichmann S A, et al. Computational approaches for interpreting scRNA-seq data[J]. *FEBS Lett*, 2017,591(15):2213-2225.
- [12] Song Y, Xu X, Wang W, et al. Single cell transcriptomics: moving towards multi-omics [J]. *Analyst*, 2019, 144 (10) : 3172-3189.
- [13] Klein A M, Mazutis L, Akartuna I, et al. Droplet barcoding for single-cell transcriptomics applied to embryonic stem cells [J]. *Cell*, 2015,161(5):1187-1201.
- [14] Macosko EZ, Basu A, Satija R, et al. Highly Parallel Genome-wide Expression Profiling of Individual Cells Using Nanoliter Droplets[J]. *Cell*, 2015,161(5):1202-1214.
- [15] Zheng GX, Terry JM, Belgrader P, et al. Massively parallel digital transcriptional profiling of single cells [J]. *Nat Commun*, 2017,8:14049.
- [16] Shum EY, Walczak EM, Chang C, et al. Quantitation of mRNA Transcripts and Proteins Using the BD Rhapsody™ Single-Cell Analysis System[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019,1129:63-79.
- [17] Gong H, Do D, Ramakrishnan R. Single-Cell mRNA-Seq Using the Fluidigm C1 System and Integrated Fluidics Circuits [J]. *Methods Mol Biol*, 2018,1783:193-207.
- [18] Zhang X, Li T, Liu F, et al. Comparative Analysis of Droplet-Based Ultra-High-Throughput Single-Cell RNA-Seq Systems [J]. *Mol Cell*, 2019,73(1):130-142.
- [19] Stoeckius M, Hafemeister C, Stephenson W, et al. Simultaneous epitope and transcriptome measurement in single cells [J]. *Nat Methods*, 2017,14(9):865-868.
- [20] De Simone M, Rossetti G, Pagani M. Single Cell T Cell Receptor Sequencing: Techniques and Future Challenges [J]. *Front Immunol*, 2018,9:1638.
- [21] Han X, Wang R, Zhou Y, et al. Mapping the Mouse Cell Atlas by Microwell-Seq[J]. *Cell*, 2018,173(5):1307.
- [22] Park JE, Botting RA, Domínguez CC, et al. A cell atlas of human thymic development defines T cell repertoire formation [J]. *Science*, 2020,367(6480).
- [23] Stephenson W, Donlin LT, Butler A, et al. Single-cell RNA-seq of rheumatoid arthritis synovial tissue using low-cost microfluidic instrumentation [J]. *Nat Commun*, 2018,9(1):791.
- [24] Zhang F, Wei K, Slowikowski K, et al. Defining inflammatory cell states in rheumatoid arthritis joint synovial tissues by integrating single-cell transcriptomics and mass cytometry [J]. *Nat Immunol*, 2019,20(7):928-942.
- [25] Mizoguchi F, Slowikowski K, Wei K, et al. Functionally distinct disease-associated fibroblast subsets in rheumatoid arthritis [J]. *Nat Commun*, 2018,9(1):789.
- [26] Kuo D, Ding J, Cohn IS, et al. HBEGF(+) macrophages in rheumatoid arthritis induce fibroblast invasiveness [J]. *Sci Transl Med*, 2019,11(491).
- [27] Culemann S, Grüneboom A, Nicolás-ávila J Á, et al. Locally renewing resident synovial macrophages provide a protective barrier for the joint [J]. *Nature*, 2019,572(7771):670-675.
- [28] Hasegawa T, Kikuta J, Sudo T, et al. Identification of a novel arthritis-associated osteoclast precursor macrophage regulated by FoxM1 [J]. *Nat Immunol*, 2019,20(12):1631-1643.
- [29] Hu Y, An Q, Sheu K, et al. Single Cell Multi-Omics Technology: Methodology and Application [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2018,6:28.
- [30] Ishigaki K, Shoda H, Kochi Y, et al. Quantitative and qualitative characterization of expanded CD4+T cell clones in rheumatoid arthritis patients [J]. *Sci Rep*, 2015,5:12937.
- [31] Tseng C C, Lin Y Z, Lin C H, et al. Next-Generation Sequencing Profiles of the Methylome and Transcriptome in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Rheumatoid Arthritis [J]. *J Clin Med*, 2019,8(9).
- [32] Yu X, Chen YA, Conejo-Garcia JR, et al. Estimation of immune cell content in tumor using single-cell RNA-seq reference data [J]. *BMC Cancer*, 2019,19(1):715.
- [33] Gawel DR, Serra-Musach J, Lilja S, et al. A validated single-cell-based strategy to identify diagnostic and therapeutic targets in complex diseases [J]. *Genome Med*, 2019,11(1):47.
- [34] Lee EJ, Lilja S, Li X, et al. Bulk and single cell transcriptomic data indicate that a dichotomy between inflammatory pathways in peripheral blood and arthritic joints complicates biomarker discovery [J]. *Cytokine*, 2020,127:154960.
- [35] Lewis MJ, Barnes MR, Blighe K, et al. Molecular Portraits of Early Rheumatoid Arthritis Identify Clinical and Treatment Response Phenotypes [J]. *Cell Rep*, 2019,28(9):2455-2470.
- [36] Cai S, Ming B, Ye C, et al. Similar Transition Processes in Synovial Fibroblasts from Rheumatoid Arthritis and Osteoarthritis: A Single-Cell Study [J]. *J Immunol Res*, 2019,2019:4080735.
- [37] Ji Q, Zheng Y, Zhang G, et al. Single-cell RNA-seq analysis reveals the progression of human osteoarthritis [J]. *Ann Rheum Dis*, 2019,78(1):100-110.
- [38] Fan Z, Chen R, Chen X. Spatial DB: a database for spatially resolved transcriptomes [J]. *Nucleic Acids Res*, 2020,48(D1):D233-D237.

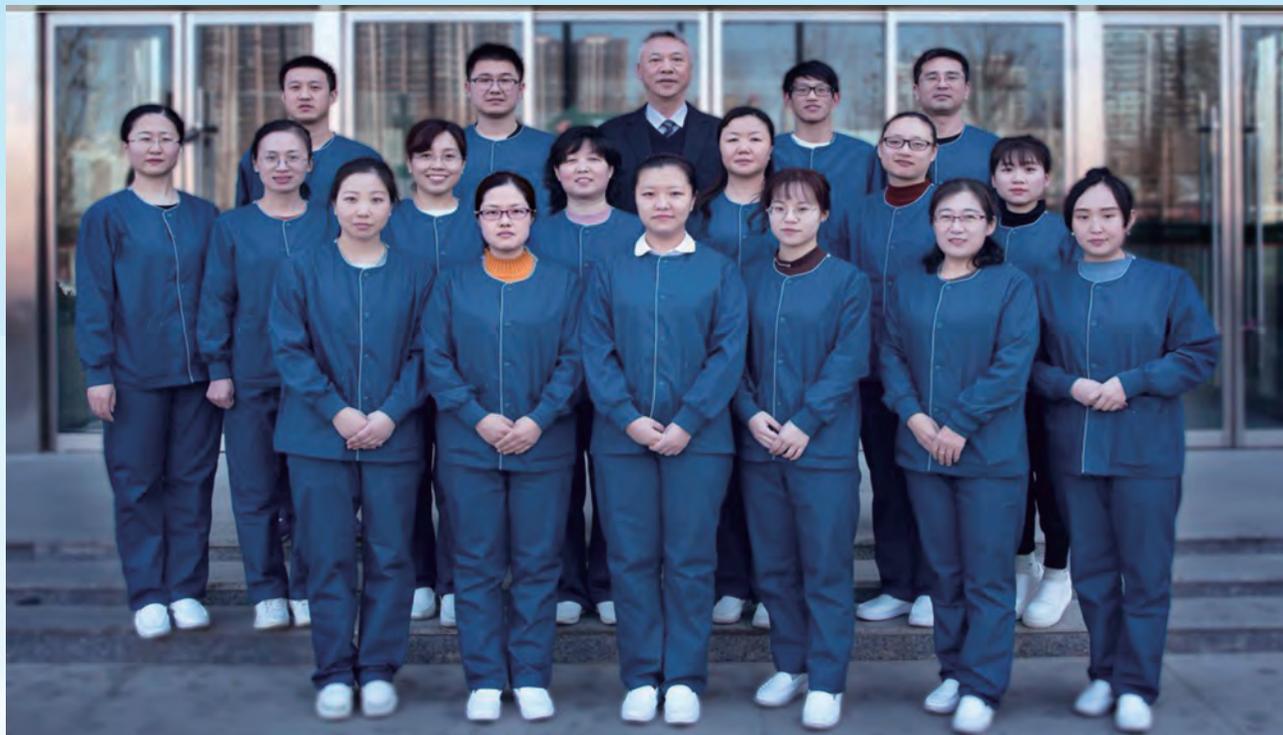
实验室巡礼

石家庄市第五医院检验科

石家庄市第五医院检验科位于河北省石家庄市裕华区塔南路42号,检验科建筑总面积1800 m²,其中检验大厅400 m²。检验科承担着临床检验、科研与教学等任务,分为临检、生化、免疫、微生物、分子生物学等专业。检验科为河北省临床重点专科,实验诊断学为石家庄市医学重点学科。2004年本院成为省会首家通过生物安全二级实验室验收单位;2006年PCR实验室通过了卫生部临检中心的技术验收;2017年本院成为河北省首家医疗机构中HIV确证实验室;2018年获得中国合格评定国家认可委员会(CNAS)颁发的实验室认可证书,成为河北省第五家通过ISO15189认可医学实验室科室有一支高学历的优秀团队,现有职工32人,其中正高级职称5人,副高级职称7人,中级职称6人,医学博士1人,医学硕士11人,本科学历13人,人员结构合理,为学科的发展提供了充足的人才储备。检验科拥有仪器182台(件),其中5万元以上仪器40台(件),各种仪器设备总价值达到5000多万元。

石家庄市第五医院是一所传染病专科医院,检验科研究方向紧紧围绕医院传染病专科特色,以传染病实验室诊断为主要研究内容,研究乙肝母婴传播发生机制与阻断策略、细菌与病毒耐药分子机制及检测技术、结核分枝杆菌复合群特异性新基因鉴定、乙肝血清学标志物定量检测临床意义、新冠病毒核酸与抗体检测临床意义等,为有效控制各种传染病做出了巨大贡献。2010年以来获得科研项目15项,总科研经费近千万元。其中参加艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治科技重大专项子课题2项,参加国际合作课题4项,主研省部级科研项目5项。获得科技奖励15项(其中全军科技进步一等奖1项、河北省科技进步二等奖3项)。发表学术论文100余篇,其中SCI论文30余篇,出版学术著作15部,获得国家发明专利4项。近5年共培养9名硕士毕业生,在读全日制硕士研究生6名;在职博士研究生1名。

学术带头人戴二黑是石家庄市第五医院副院长,并担任中华医学会检验医学分会委员、中国医师协会检验医师分会委员、中国老年保健医学研究会检验医学分会常委、河北省医学会检验医学分会主任委员等职务。自1984年一直从事病原微生物学研究,目前研究方向为乙肝母婴阻断、细菌与病毒耐药机制与分子诊断研究。



杂志简介：

《分子诊断与治疗杂志》于 2009 年 5 月创刊，是由中山大学主管，《中国家庭医生》杂志社有限公司主办，中山大学达安基因股份有限公司承办的面向国内外公开发行的分子医学权威性刊物，也是我国第一份以分子诊断与治疗学科为主要内容的分子医学专业学术期刊。本刊以传播分子医学理念、报道分子医学前沿、倡导分子医学创新、促进分子医学进步为办刊宗旨。主要刊登我国医学分子诊断和分子治疗相关领域中的基础理论研究、临床实践和技术方法的最新研究成果以及国内分子医学新技术、新理论和新进展等方面的文章。目前有编委及审稿专家 80 余人。在编委会和审稿专家及编辑部的共同努力下，于 2016 年被收录为“中国科技核心期刊”（中国科技论文统计源期刊）。

目前有“述评”、“论著”、“综述”、“前沿进展”、“专家笔谈”、“讲座”、“动态”和“专栏”等栏目。涵盖基因诊断、免疫诊断、核酸分子诊断、蛋白分子诊断、信号分子诊断、分子影像诊断、诊断仪器应用、基因治疗、核酸分子治疗、蛋白分子治疗等内容。

