



ISSN 1674-6929

CN 44-1656/R

邮发代号: 46-283

分子诊断与治疗杂志

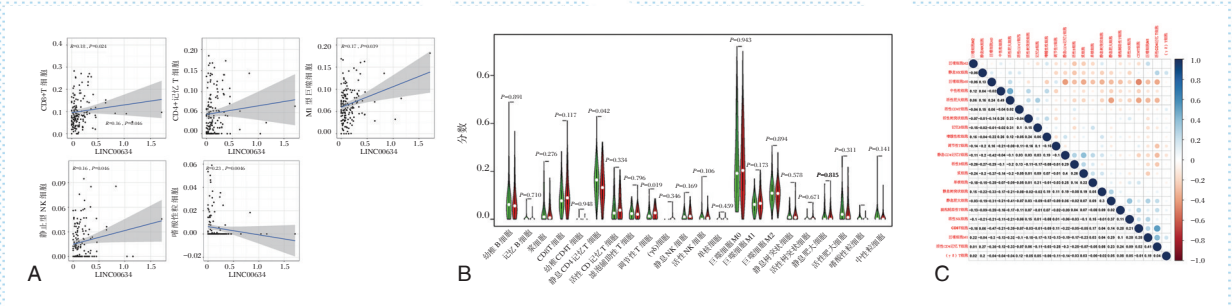
FENZI ZHENDUAN YU ZHILIAO ZAZHI

2021年10月 第13卷 第10期 总第86期

JOURNAL OF

MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Volume 13 Number 10 October 2021



注: A为 *LINC00634* 表达与免疫浸润水平之间的相关性; B为肿瘤样品中 *LINC00634* 高表达组和低表达组中 22 种免疫亚型的变化比例; C为肿瘤样品中 22 种免疫浸润细胞的相关性热图。

图(1578) *LINC00634* 表达与免疫浸润

Figure(1578) Expression of *LINC00634* and immune infiltration

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



9 771674 692211



宫国良



宫国良,《分子诊断与治疗杂志》第五届编辑委员会编委。

1980年9月出生,黑龙江省肇东市,2006年7月毕业于齐齐哈尔医学院临床医学(精神医学方向)专业,获学士学位;2009年毕业于黑龙江中医药大学中西医结合基础专业,获医学硕士学位。

2010年至2011年在广东省人民医院病理科进修一年,学习常规病理学诊断;并先后于中山大学第一附属医院、中山大学第三附属医院、复旦大学附属肿瘤医院等医院病理科进行过短期的专业培训。

现任汕头大学医学院第一附属医院副主任医师,汕头潮南民生医院病理科主任,汕头大学硕士研究生导师;广东省基层医药协会病理科分会常务委员;广东省医师学会病理科分会委员;广东省中西医结合学会病理科分会常务委员;广东省粤港澳合作促进会医药卫生大健康委员会病理联盟委员会委员;汕头市科技计划项目评审专家;分子诊断与治疗杂志编委;齐齐哈尔医学院学报审稿专家;World Journal of Surgical Oncology 审稿专家。

宫国良主任长期从事临床病理诊断学及肿瘤病理学研究,在乳腺癌转移机制研究方面形成了一定的特色和优势,近5年来承担及完成省部级及市厅级乳腺癌方向研究课题6项,其中广东省科技创新战略专项资金(纵向协同管理方向)项目1项,汕头市科技计划重点项目3项,广东省中医药局科研项目2项;以第一作者或通讯作者发表相关论文15篇,其中SCI收录5篇;主编专著1部,培养研究生3名。

分子诊断与治疗杂志

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

月刊 2021年10月 第13卷 第10期 总第86期 Monthly Volume 13 Number 10 October 2021

主管	中山大学
主办	《中国家庭医生》杂志社有限公司
承办	广州达安基因股份有限公司
总编辑	张翼鹏
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	2021年10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>Daan Gene Co., Ltd.</i>
Editor in Chief	<i>ZHANG Yipeng</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>2021.10.18</i>
Price	<i>RMB 15.00</i>



扫码订阅《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。

中国科学技术信息研究所

Institute of Scientific and Technical Information of China

北京复兴路 15 号 100038

www.istic.ac.cn

2020年12月

证书编号: 2019-G556-0386
有效期至: 2021年12月



分子诊断与治疗杂志

月刊 2021年10月 第13卷 第10期

目次

述评

阿尔茨海默病早期诊断及新技术展望 纭玲 高洪梅 李硕 等(1557)

论著

急性脑梗死静脉溶栓患者RBP、Hcy、Lpa与NIHSS评分关系及预测血管再通的效能
..... 何可 吕友梅 鲁兵 等(1561)

高通量测序法微卫星不稳定性检测评价 贾铮 徐任 张文新 等(1565)

AMS、leptin、TG预测胆囊结石合并胆总管多发结石术后复发价值
..... 郭健童 苏树英 张耿 等(1569)

LINC00634基因在结直肠癌中表达及与预后的相关性分析 马甜甜 柳家翠 段怡平等(1574)

AFP、AFP-L3%、DCP与GP73联合检测辅助诊断肝炎、肝癌临床价值
..... 潘俊均 黄仙圣 岑伟明 等(1579)

PSP、IL-10、CCL-17在新生儿早发型GBS败血症中的水平变化及临床意义
..... 王佳丽 彭文红 徐敬轩(1583)

脑脊液 β 2MG、CRP及CSF-NSE对新生儿化脓性脑膜炎的诊断价值
..... 杨夏 刘金凤 卢国增(1587)

儿童Hp感染相关性胃炎miR-146a、CRP/ALB、Th17/Treg水平监测与疗效的相关性
..... 张静 李常娟 邢雅杰(1591)

Lp-PLA2、Hcy及 γ -GGT在下肢动脉硬化闭塞症中的表达及临床意义
..... 张温温 孙灿龙 吴延庆 等(1595)

高通量测序在一罕见脊柱肋骨发育不全病例诊断中的应用 曾玉坤 丁红珂 刘玲 等(1599)

CD64、SAA及PA检测在小儿呼吸道感染鉴别诊断中的应用
..... 杜彦辉 张晓莹 蒋仁鹏 等(1603)

脐血和羊水中TNF- α 、G-CSF、MCP-1、S100B蛋白水平检测用于诊断胎膜早破胎儿脑损伤
的效果研究 段一丁 冀涛 王新彦 等(1607)

sE-SLT、sICAM-1及STAT1在小儿支气管哮喘中的表达及临床意义
..... 杨晶 薛国昌 任明星(1611)

FGF-23、ST2、CXCL16在舒张性心力衰竭患者中表达及临床意义
..... 吕书华 冯海娟 郭卫丽(1615)

CYFRA21-1、LDH联合NSE检测辅助诊断肺癌及与TNM分期的关系
..... 余剑桥 周俊 付海琴(1619)

超声分子成像在乳腺病灶良恶性鉴别诊断中的应用 田苗 高小瞻 马飞 等(1623)

lncRNA UCA1、VEGF、PKC α 于肾上腺恶性肿瘤中表达变化及与预后的关系
..... 吴悠悠 任巧霞 徐柳汀(1627)

血清 VEGF、PDGF 和 ES 水平与湿性年龄相关性黄斑变性的关系	解鹏亮 郑陆芳 董明霞 等(1631)
apoB/apoA-1、LDH 及 ALP 水平与冠心病患者主要不良心血管事件的关系	秦小敏 李四荣 刘慧 等(1635)
UA、NT-proBNP、PLR 在脑梗死静脉溶栓中动态变化及意义	孙维明 王桂华 张颖 等(1639)
HMGB1、EOS、IL-23 与慢性鼻窦炎病变范围关系及诊断价值	魏鑫鑫 许欢 闫一敏 等(1644)
2018-2019 年广州市区某院甲型流感流行病学特点和检测方法比较	黄佳斯 何宇婷 陈瑶 等(1648)
COPD 并发感染患者 PSGL-1、IL-6、膜联蛋白 A1 的临床价值研究	李国干 程宏宁 周安燕 等(1652)
不同透析方式对 MHD 患者尿毒症毒素清除、炎症因子和氧化应激状态的影响	刘绍芳 李金香 陈海燕 等(1656)
良恶性肾上腺嗜铬细胞瘤 VEGF、melanA、LncRNA HOTAIR 表达差异及与患者预后的关系	吕苏一 张磊 李山成(1660)
血清和粪便 CEA、CA199、AFP 辅助诊断结肠直肠癌的研究	唐阳 贾逸文 彭琼(1665)
系统性红斑狼疮患儿中性粒细胞亚群与外周血自噬相关基因 <i>Beclin1</i> 表达水平相关性	刘志明 郜苗苗 邵丽丽 等(1669)
p33 ^{INC1} 、PDGF-A 及 bFGF 在 ARC 患者晶状体上皮细胞中的表达及临床意义	郭清(1673)
炔雌醇环丙孕酮片联合二甲双胍治疗 PCOS 的 SHBG、GLP-2 及 PYY 水平变化	王伟 张翠云 李金英 等(1677)
卵巢癌组织中 PD-1、PD-L1 和 Cyclin D1 蛋白表达与预后的关系	杜晓丽 张东明 徐洪(1680)
Galectin-3、CF6、H-FABP 与慢性心衰患者心功能、预后的关系	黄茜雯 苏春燕 王敏 等(1685)
2 型糖尿病 VEGF、Alb 及 HbA1c 与肾脏微小血管病变的关系	赵文杰 李华峰 田霖林 等(1689)
乙肝肝硬化患者血液 miR-122、miR-181a 水平与病情严重程度的关系	崔红梅 卢坤玲 付丽坤 等(1693)
HDCP 产妇血清 APN、chemerin、sFlt-1/PlGF 与围产结局的相关性	程锦 周萍 李茗薇 等(1697)
PCR-RFLP 法检测 <i>MTRR</i> 基因 A66G 多态位点的改进	何震宇 顾取良 陈瑜丽(1701)
卵巢癌患者癌组织中 nm23-H1 和 N-cad 的表达及临床意义	章琴 黄庆(1705)
PET-1、NO 及 ALD 在肾性高血压中表达及与肾功能、血压相关性	叶杨梅 李玲芝 王伟乐(1709)
脂肪间充质干细胞外泌体 miR-212-3p 对成纤维样滑膜细胞的影响	贾丙申 于鹏 焦拓 等(1713)
创伤性关节炎患者关节液中的 VIP、SOD、NO、CXCL12 水平变化及其意义	王道煌 陈鹏 颜约军 等(1718)
伊伐布雷定联合美托洛尔治疗 CHF 及对 SCysC、Tei 指数的影响	刘金林 赵世林 肖竹青 等(1722)

综 述

N6-甲基腺嘌呤 RNA 修饰在泌尿系统肿瘤中的研究进展	李金珂 袁焰(1726)
------------------------------	--------------

专家风采

宫国良	(封二)
-----	------

实验室巡礼

汕头潮南民生医院病理科	(封三)
-------------	------

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Monthly Volume 13 Number 10 October 2021

CONTENTS

COMMENTS

- Early diagnosis of Alzheimer's disease and prospect of new technologies
YUN Ling, GAO Hongmei, LI Shuo, YANG Shuo, WANG Haitao, CUI Huijuan, LIU Huanliang, FU Yuan (1557)

ORIGINAL ARTICLES

- Relationship between RBP, Hcy, LPA and NIHSS score in patients with acute cerebral infarction undergoing intravenous thrombolysis
HE Ke, LV Youmei, LU Bing, PENG Along (1561)
- Evaluation of microsatellite instability detection by high-throughput sequencing
JIA Zheng, XU Ren, ZHANG Wenxin, HUANG Jie, QU Shoufang (1565)
- The value of AMS, leptin and TG in predicting the recurrence of gallbladder stones combined with multiple common bile duct stones
GUO Jiantong, SU Shuying, CAI Yunfeng, WANG Zhonghui (1569)
- Expression of *LINC00634* gene in colorectal cancer and its correlation with prognosis
MA Tiantian, LIU Jiacui, DUAN Yiping, CHEN Liangyue, ZHU Cuiwen, ZOU Xiaofeng (1574)
- The clinical value of combined detection of AFP, AFP-L3%, DCP and GP73 in assisting diagnosis of hepatitis and liver cancer
PAN Junjun, HUANG Xiansheng, CEN Weiming, HUANG Lixia, DU Hua, DENG Peiwen, SUI Hong (1579)
- The level changes and clinical significance of PSP, IL-10 and CCL-17 in neonatal early-onset GBS sepsis
WANG Jiali, PENG Wenhong, XU Jingxuan (1583)
- The diagnostic value of cerebrospinal fluid β 2MG, CRP and CSF-NSE for neonatal purulent meningitis
YANG Xia, LIU Jinfeng, LU Guozeng (1587)
- Correlation of miR-146a, CRP/ALB, Th17/Treg level monitoring and efficacy in children with Hp infection-related gastritis
ZHANG Jing, LI Changjuan, XING Yajie (1591)
- The expression and clinical significance of Lp-PLA2, Hcy and γ -GGT in patients with lower extremity arteriosclerosis obliterans
ZHANG Wenwen, SUN Canlong, WU Yanqing, SHI Hongtao (1595)
- Application of high-throughput sequencing in the diagnosis of a rare case of spondylocostal dysostosis
ZENG Yukun, DING Hongke, LIU Ling, YU Lihua, ZHANG Yan (1599)
- Application of CD64, SAA and PA detection in the differential diagnosis of respiratory tract infections in children
DU Yanhui, ZHANG Xiaoying, JIANG Renpeng, MA Yan, WANG Guangjun (1603)
- Detection of TNF- α , G-CSF, MCP-1 and S100B protein levels in umbilical cord blood and amniotic fluid for diagnosis of fetal brain injury caused by premature rupture of membranes
DUAN Yiding, JI Tao, WANG Xinyan, HAO Xiaoling, LI Hongxia (1607)
- Expression and clinical significance of sE-SLT, sICAM-1 and STAT1 in children with bronchial asthma
YANG Jing, XUE Guochang, REN Mingxing (1611)
- The expression and clinical significance of FGF-23, ST2 and CXCL16 in patients with diastolic heart failure
LV Shuhua, FENG Haijuan, GUO Weili (1615)
- CYFRA21-1, LDH combined with NSE detection in the auxiliary diagnosis of lung cancer and its relationship with TNM staging
YU Jianqiao, ZHOU Jun, FU Haiqin (1619)
- Application of Ultrasound Molecular Imaging in the Differential Diagnosis of Benign and Malignant Breast Lesions
MIAO Tian, GAO Xiaozhan, MA Fei, WANG Lu (1623)
- Expression changes of *lncRNA UCA1*, *VEGF*, *PKC α* in benign and malignant adrenal tumors and their relationship with prognosis
WU Youyou, REN Qiaoxia, XU Liuting (1627)
- Relationship between the levels of serum VEGF, PDGF and ES and wet age-related macular degeneration
XIE Pengliang, ZHENG Lufang, DONG Mingxia, DONG Rujiao, CHEN Fang (1631)

Relationship between apoB/apoA-1, LDH and ALP levels and main adverse cardiovascular events in patients with coronary heart disease	
<i>QIN Xiaomin, LI Sirong, LIU Hui, WANG Lilan</i>	(1635)
Dynamic changes and significance of UA, NT-proBNP and PLR in intravenous thrombolysis of cerebral infarction	
<i>SUN Weiming, WANG Guihua, ZHANG Ying, QI Xiaoru, FENG Chengfang</i>	(1639)
Relationship between HMGB1, EOS, IL-23 and the extent of chronic sinusitis and its diagnostic value	
<i>WEI Xinxin, XU Huan, YAN Yimin, YIN Zhongpu</i>	(1644)
Comparison of the epidemiological characteristics and detection methods of influenza A in a hospital in Guangzhou from 2018 to 2019	
<i>HUANG Jiasi, HE Yuting, CHEN Yao, YU Xuegao, HUANG Hao, CHEN Peisong</i>	(1648)
Clinical Value of PSGL-1, IL-6 and Annexin A1 in Patients with COPD Complicated infection	
<i>LI Guogan, CHENG Hongning, ZHOU Anyan, LIN Liangfen</i>	(1652)
Effects of different dialysis methods on uremic toxin clearance, inflammatory factors and oxidative stress in patients undergoing MHD	
<i>LIU Shaofang, LI Jinxiang, CHEN Haiyan, ZHAO Yu, ZHU Aihua</i>	(1656)
Differential expression of VEGF, melanA and lncRNA HOTAIR in benign and malignant adrenal pheochromocytoma and their relationship with prognosis	
<i>LV Suyi, ZHANG Lei, LI Shancheng</i>	(1660)
Serum and fecal CEA, CA199, AFP for the diagnosis of colorectal cancer	
<i>TANG Yang, JIA Yiwen, PENG Qiong</i>	(1666)
Relationship between peripheral blood neutrophil subsets and expression of autophagy related gene <i>Beclin1</i> in children with systemic lupus erythematosus	
<i>LIU Zhiming, GAO Miaomiao, SHAO Lili, ZHU Cuimin, LIU Xiufen</i>	(1669)
Expression and clinical significance of p33 ^{NG1} , PDGF-A and bFGF in lens epithelial cells of patients with age-related cataract	
<i>GUO Qing</i>	(1673)
Changes of SHBG, GLP-2 and PYY levels in patients with PCOS treated with ethinyl estradiol and cyproterone tablets combined with metformin	
<i>WANG Wei, ZHANG Cuiyun, LI Jinying, GONG Yuejiao, KANG Xiaojing</i>	(1677)
Relationship between the expression of PD-1, PD-L1 and Cyclin D1 protein and prognosis in ovarian cancer	
<i>DU Xiaoli, ZHANG Dongming, XU Hong</i>	(1680)
Relationship between Galectin-3, CF6, H-FABP and cardiac function and prognosis in patients with chronic heart failure	
<i>HUANG Qianwen, SU Chunyan, WANG min, WANG Jianan, HUANG Qian</i>	(1685)
Relationship between the levels of VEGF, Alb and HbA1c and renal microangiopathy in patients with type 2 diabetes	
<i>ZHAO Wenjie, LI Huafeng, TIAN Linlin, LI Xiaobing, LI Min, JU Wenwen, ZHANG Xu</i>	(1689)
Changes in miR-122 and miR-181a levels of patients with chronic hepatitis B and liver fibrosis and their relationship with the severity of liver fibrosis	
<i>CUI Hongmei, LU Kunling, FU Likun, ZHANG Lili</i>	(1693)
Correlation between HDCP maternal serum APN, chemerin, sFlt-1/PIGF and perinatal outcome	
<i>CHENG Jin, ZHOU Ping, LI Mingwei, MA Ning, WU Quan</i>	(1697)
Improvement of PCR-RFLP method for detecting <i>MTTR</i> gene A66G polymorphism	
<i>HE Zhenyu, GU Quliang, CHEN Yuli</i>	(1701)
Expression and clinical significance of nm23-H1 and N-cad in cancer tissues of patients with ovarian cancer	
<i>ZHANG Qin, HUANG Qing</i>	(1705)
Expression of PET-1, nitric oxide and aldosterone in patients with renal hypertension and their correlation with renal function and blood pressure	
<i>YE Yangmei, LI Lingzhi, WANG Weile</i>	(1709)
The Effect of fat mesenchymal stem cell exosome miR-212-3P on fibroblast synovial cells	
<i>JIA Bingshen, YU Peng, JIAO Tuo, LI Jun, LI Ming, QU Guoxin, JI Zhihua, FU Kun</i>	(1713)
Changes of VIP, SOD, NO and CXCL12 levels in synovial fluid of patients with traumatic arthritis and their significance	
<i>WANG Daohuang, CHEN Peng, YAN Yuejun, ZHENG Yan</i>	(1718)
Effects of ivabradine in combination with metoprolol on CHF and SCysC and Tei index	
<i>LIU Jinlin, ZHAO Shilin, XIAO Zhuqing, LIU Su</i>	(1722)

REVIEWS

The advance of N6-methyladenosine RNA modification in urological cancers	
<i>LI Jinke, YUAN Yan</i>	(1726)

阿尔茨海默病早期诊断及新技术展望

纭玲¹ 高洪梅¹ 李硕² 杨烁¹ 王海涛¹ 崔慧娟¹ 刘焕亮¹ 付源^{1*}

[摘要] 阿尔茨海默病是一种起病隐匿的进行性发展的神经系统退行性疾病,目前尚无有效治疗措施,因此早期诊断早期干预尤为重要。本文从基因检测、生物学标志物检测、影像学检查、新技术展望四个方面对阿尔茨海默病早期诊断的新进展进行综述。

[关键词] 阿尔茨海默病;早期诊断;分子诊断

Early diagnosis of Alzheimer's disease and prospect of new technologies

YUN Ling¹, GAO Hongmei¹, LI Shuo², YANG Shuo¹, WANG Haitao¹, CUI Huijuan¹, LIU Huanliang¹, FU Yuan^{1*}

(1. Department of Neurology, the Fourth Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, China, 150001; 2. Department of Ultrasonography, the Fourth Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, China, 150001)

[ABSTRACT] Alzheimer's disease (AD) is a progressive neurodegenerative disease with hidden onset. Due to the lack of effective therapy for AD, there is an important need for early diagnosis and intervention. This review highlights the recent advances in early AD diagnosis from the perspectives of genetic testing, biomarker detection, imaging measurement and new technology prospects.

[KEY WORDS] Alzheimer's disease; Early diagnosis; Molecular diagnosis

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种以进行性记忆丧失和认知功能障碍为特征的神经退行性疾病^[1]。细胞外 β -淀粉样蛋白(amyloid beta, A β)沉积,细胞内神经原纤维缠结(Neurofibrillary tangles, NFTs)伴神经元丢失及胶质细胞活化是AD病理特征^[2]。流行病学调查显示65岁以上人群中每10人就有一人患病,85岁以上人群中每3人就有一个患者^[3]。AD已成为全球严重的医疗和社会问题之一,给社会和家庭造成了沉重的负担。目前对AD尚无有效治疗方法,而早期诊断AD有助于早期干预及延缓疾病进展。生物化学改变发生于临床症状出现前20年,所以检测生物标志物是AD早期诊断的重要工具^[4]。本文就AD早期分子诊断

研究进展进行综述,以帮助早期治疗、早期预防。

1 基因检测

AD根据发病年龄分为早发性AD(early-onset AD, EOAD)与迟发型AD(late-onset AD, LOAD),EOAD占有AD病例5%以下,LOAD占有AD病例的95%以上^[5]。研究发现EOAD主要由 β -淀粉样蛋白前体(APP)、早老素-1(PSEN1)和早老素-2(PSEN2)基因突变引起,这些错义基因可协助早期诊断AD^[6],其突变之后可导致脑组织发生氧化损伤,引起脑内A β 的产生和清除的失衡,进而形成A β 异常沉积所形成的老年斑(Amyloid Plaque),最终出现神经元凋亡^[7]。基因突变的分

基金项目:国家自然科学基金(81500917);教育部“春晖计划”合作科研项目(HLJ2019012);黑龙江省博士后科研启动基金(LBH-Q19033);黑龙江省留学归国科学基金(LC2016033);哈尔滨医科大学伍连德青年科学基金(WLD-QN1711)

作者单位:1. 哈尔滨医科大学附属第四医院神经内科,黑龙江,哈尔滨 150001

2. 哈尔滨医科大学附属第四医院超声科,黑龙江,哈尔滨 150001

*通信作者:付源, E-mail: fuyuan2011@yahoo.com

类目前仍然具有挑战性,多项研究发现不同 EOAD 患者体内存在多个突变,如 *PSEN1* 的两个新突变 (Y256N 和 H214R)、致病性 *PSEN1* Trp165Cys 突变、*PSEN1* G209A 突变,这些基因突变位点的筛查可为临床早期诊断 AD 提供突变序列,未来还将从蛋白质组学、转录组学技术同步检查,并整合这两个组学分析的数据进一步研究其可能的致病机制^[8-11]。

载脂蛋白 E (Apolipoprotein E, APOE) 基因被广泛认为是 LOAD 的易感基因,其中 *APOE* $\epsilon 4$ 等位基因是 LOAD 发病的最强风险因素,与 AD 大脑中 A β 异常沉积密切相关^[12]。携带 *APOE* $\epsilon 4$ 基因亚型的 AD 模型小鼠脑内 A β 的异常沉积主要发生在 A β 形成早期,而不影响中晚期 A β 沉积^[13]。脂质化 apoE 与 A β 竞争性结合细胞膜表面 HSPG 受体,抑制神经细胞摄取 A β , 导致 A β 清除减慢,此作用具有浓度依赖性^[14]。*APOE* $\epsilon 4$ 转基因小鼠中炎症因子环孢素 A 和基质金属蛋白酶-9 通过加速血脑屏障周细胞的降解,引起血脑屏障破坏,进而影响血脑屏障介导的外源性 A β 的清除^[15]。此外,*APOE* $\epsilon 4$ 激活 Erk 途径、降低细胞自噬清除 tau 蛋白、诱发肿瘤坏死因子- α 分泌产生炎症反应等途径加剧 tau 蛋白异常磷酸化,导致神经元退行性改变^[16], 这些关键的病理变化可协助早期筛查 LOAD 患者。

全基因组关联研究证实了 *CD33* 基因与 AD 发病具有关联性,其表达的 CD33 蛋白在大脑中主要由小胶质细胞表达,对小胶质细胞介导的 A β 的摄取发挥抑制作用,是 LOAD 易感基因位点,利用静息状态功能磁共振成像发现 *CD33* 基因型主要影响额叶-纹状体环路中脑功能,在海马旁回中也观察到 *CD33* 基因型和 AD 之间存在相互作用,这些发现为 *CD33* 基因型对认知功能的影响提供了进一步的见解^[17-18]。此外,还有研究发现携带微管相关蛋白 tau (Microtubule-associated protein tau, *MAPT*) 基因患者脑脊液 t-tau 和 p-tau 水平显著增加,表明 *MAPT* 基因可作为早期诊断 AD 有效的筛查基因,但仍需要进一步明确其基因多态性与 AD 发病风险的相关性^[19]。所以验证这些基因准确预测疾病发生的能力并明确可能的致病机制非常重要。

2 生物学标志物检测

AD 相关生物学标志物检测主要以脑脊液检查为主,随着技术手段的进步,在外周血液等其他组织也正在试图寻找简便有效的早期诊断生物标

志物。根据国际工作组织和美国国立老化研究院建立的诊断标准,脑脊液 A β_{1-42} 水平下降、总 tau、磷酸化 tau 水平上升被认为是有效的 AD 支持性诊断标准之一。Lewczuk 等人^[20-21]报道脑脊液中 A β_{42} 降低对 AD 诊断的敏感性为 69.3%, 特异性则可达到 88.9%, A β_{42} /A β_{40} 降低的敏感性和特异性分别为 93.3% 和 100%, 在临床常规条件下脑脊液 A β_{42} /A β_{40} 代替 A β_{42} 可以提高诊断准确性,然而脑脊液生物标志物的可变性太高(包括运输、实验方法、参考值等的影响),临床界限值确定存在较大困难,下一步需要标准化实验室条件,识别和连续优化影响因素。A β_{1-42} 和 p-tau 是脑脊液生物学标志物的最佳组合,可以预测轻度认知功能障碍患者发生 AD 的总体风险,有利于对 AD 患者进行早期干预^[22]。视锥蛋白样蛋白 1 (Visinin-like protein-1, VILIP-1) 是一种神经元内钙传感蛋白,在脑损伤模型和基因阵列分析中已被证实可作为神经元损伤的指标,其可作为神经元丢失病理过程的累积结果。因此,捕捉神经元变性丢失的脑脊液标志物可能对未来的认知下降提供预测价值。据此,有研究发现脑脊液 VILIP-1 水平与情景记忆和语义记忆能力下降有关,与 AD 早期颞叶内侧萎缩病理改变具有一致性,CSF 中 VILIP-1 和 VILIP-1/A β_{42} 可作为早期 AD 患者认知功能下降的预测模型,其作用与 tau 和 tau/A β_{42} 类似,可能成为 AD 早期神经变性的有效 CSF 替代物^[23]。

由于脑脊液检测的有创性和普及难度大,而血液采集具有极大的简便性,大家开始把目光转向血液生物标志物。由于血浆中 A β 的含量较低,且干扰测量的特定血液蛋白质和其他化合物含量过高,其免疫测量和定量受到阻碍。在极轻微 AD、轻度认知功能障碍 (Mild cognitive impairment, MCI) 和健康对照组血浆中检测 t-tau 和 p-tau 蛋白水平,发现极轻微 AD 和 MCI 患者血浆 t-tau 和 p-tau 水平高于健康对照组,极轻微 AD 患者血浆 t-tau 和 p-tau 水平高于 MCI 组,并且 p-tau 相关性更显著,表明血浆 t-tau 和 p-tau 均可协助筛查早期 AD,但血浆 p-tau 水平与 AD 严重程度相关性高于血浆 t-tau^[24]。此外,有研究还发现血清 t-tau 和 p-tau181 蛋白水平与蒙特利尔评分呈负相关,此结果支持血液 t-tau 和 p-tau 作为早期 AD 的预测标志物,有可能作为未来随访 AD 患者预后的指标^[25]。分析 MCI 和 AD 患者血浆 Micro RNA 转录组, microRNA-206 表现出与认知能力下降和记忆缺陷

的强烈相关性,五年以上的纵向随访发现,microRNA-206在认知功能障碍发生之前异常增加,可用于预测MCI阶段认知能力的下降^[26]。

唾液生物学标志物检测是一种比血液更为简便的方法,利用高度敏感的Luminex分析法对唾液t-tau、p-tau和A β 42蛋白水平进行定量评估,结果显示AD患者的p-tau/t-tau比值显著增加,在S396磷酸化位点变化更明显^[27-28]。这些结果表明,唾液tau蛋白可能成为AD早期诊断的生物学标志物,甚至可应用于无症状受试者的筛查,进而为AD治疗提供更大的时间窗^[29]。此外,研究还显示AD患者的唾液A β 42水平明显高于对照组^[30]。综上所述,唾液检测可成为AD早期诊断的关键方法。下一步有必要进一步了解这些生物标志物的联用优势,进行大样本数据验证及建立可靠的临界值和标准参考物。

3 影像学检查

影像学技术发展对AD的诊断和预后判断具有重要意义。AD患者磁共振成像(Magnetic Resonance Imaging, MRI)检查的主要改变是皮质性脑萎缩和脑室扩大伴脑沟裂增宽,但由于缺乏对AD诊断的特异性,主要用于排除可引起痴呆的其他疾病。定量磁化率成像是磁共振成像中一项新兴的用于定量测量组织磁化特性的技术,利用该技术证明A β 具有抗磁性,可在磁化率图上产生强烈的对比,磁化率标测可以用来检测AD小鼠模型中A β 斑块的聚集^[31-32]。

正电子发射断层扫描淀粉样蛋白显像剂与大脑内纤维状淀粉样蛋白沉积的结合,可视化和量化大脑内淀粉样蛋白沉积,可检测AD患者大脑内A β 异常沉积,主要配体包括¹¹C和¹⁸F标记的放射性示踪剂^[33]。利用突触囊泡糖蛋白2A PET显像测定突触密度,可为阿尔茨海默病的早期诊断提供工具^[34]。氟-2-脱氧-D-葡萄糖-正电子发射断层扫描成像显示,颞顶叶、额叶和后扣带皮质中的葡萄糖代谢减少是AD的标志,中晚期出现额叶皮质受累,额叶受累与否,可作为鉴别AD早期和中晚期的标志^[35]。应用单光子发射计算机断层扫描(Single Photon Emission Computed Tomography, SPECT)技术评估脑灌注变化,发现 $\geq 94\%$ 轻度AD患者的灌注值低于健康对照组的平均值,这一结果提示绘制低灌注的地形图,可明确特定的早期灌注模式,帮助早期诊断AD^[36]。由于目前还没有确切规范的测量标准及相关案例较少,下一步需

要建立供临床使用的标准并培训阅片人。

4 新技术展望

随着视觉变异型AD(Visual variant of AD, VVAD)患者的发现,眼部标志物逐渐进入研究者的视线,有研究团队发现AD神经病理学包括视网膜A β 、tau蛋白的积聚、神经元丢失和RGC凋亡,在AD模型小鼠中发现其视网膜RGCc层凋亡细胞的存在,视网膜凋亡细胞检测技术是一种利用放射性annexin V和聚光共聚焦扫描眼底镜检测凋亡细胞的方法,可以在AD患者中无创性显示AD病理变化,这种成像技术的演变和发展可成为未来的AD诊断工具^[37-38]。

生物传感器是一种对生物物质敏感并将其浓度通过识别元件识别后经换能器转换为光、电等可测量信号进行检测的仪器,因其快速、低廉、简便、可重复使用等优点成为诊断很多疾病的有前途的工具^[39]。一种用于检测A β 蛋白的免疫磁生物传感器,利用sulfo-SMCC交联法将抗A β 抗体标记在磁性氮掺杂石墨烯表面,形成磁性免疫载体,将磁性免疫载体放置在Au电极上,在电极下方放置一个外部磁铁进行电化学A β 检测,通过电流变化测定A β 蛋白浓度,该仪器目前只在体外实验进行验证,未来可考虑对AD患者脑脊液、血液A β 蛋白浓度进行测定,对AD早期诊断有潜在的作用^[40]。虽然这些技术优势显而易见,但同时也需要解决可再生性、特异性、稳定性等方面的问题,才可能使其成为未来的有效诊断工具。

5 结语

AD目前尚无有效的治疗手段,早期诊断和干预是控制AD发生发展的重要措施。建立有效的分子诊断标志物是AD研究领域的重要难题。随着医疗新技术的不断发展,进一步发现有良好重复性及有效性,确立简便、易行的诊断方法,将会为AD诊断指明新方向。

参考文献

- [1] Gao CM, Yam AY, Wang X, et al. Abeta40 oligomers identified as a potential biomarker for the diagnosis of Alzheimer's disease[J]. PLoS One, 2010, 5(12):1-7.
- [2] Serrano-Pozo A, Frosch MP, Masliah E, et al. Neuropathological alterations in Alzheimer disease[J]. Cold Spring Harb Perspect Med, 2011, 1(1):a006189.
- [3] Newcombe EA, Camats-Perna J, Silva ML, et al. Inflammation: the link between comorbidities, genetics, and Alzheimer's

- disease[J]. *J Neuroinflamm*, 2018, 15(1):276.
- [4] Bjerke M, Engelborghs S. Cerebrospinal fluid biomarkers for early and differential Alzheimer's Disease diagnosis[J]. *J Alzheimers Dis*, 2018, 62(3):1199-1209.
- [5] Yamazaki Y, Painter MM, Bu G, et al. Apolipoprotein E as a therapeutic target in Alzheimer's Disease: a review of basic research and clinical evidence[J]. *CNS Drugs*, 2016, 30(9):773-789.
- [6] Dubois B, Feldman HH, Jacova C, et al. Advancing research diagnostic criteria for Alzheimer's disease: the IWG-2 criteria[J]. *Lancet Neurol*, 2014, 13(6):614-629.
- [7] Meraz-Ríos MA, Franco-Bocanegra D, Toral Ríos D, et al. Early onset Alzheimer's disease and oxidative stress[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2014, 2014:1-14.
- [8] Li YS, Yang ZH, Zhang Y, et al. Two novel mutations and a de novo Mutation in PSEN1 in early-onset Alzheimer's Disease[J]. *Aging Dis*, 2019, 10(4):908-914.
- [9] Van Giau V, Pyun JM, Suh J, et al. A pathogenic PSEN1 Trp165Cys mutation associated with early-onset Alzheimer's disease[J]. *BMC Neurol*, 2019, 19(1):188.
- [10] An SS, Bagyinszky E, Kim HR, et al. Novel PSEN1 G209A mutation in early-onset Alzheimer dementia supported by structural prediction[J]. *BMC Neurol*, 2016, 16:71.
- [11] Giau VV, Bagyinszky E, Youn YC, et al. APP, PSEN1, and PSEN2 mutations in Asian patients with early-onset Alzheimer Disease[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(19):1-23.
- [12] Rebeck GW, Reiter JS, Strickland DK, et al. Apolipoprotein E in sporadic Alzheimer's disease: allelic variation and receptor interactions[J]. *Neuron*, 1993, 11(4):575-580.
- [13] Liu CC, Zhao N, Fu Y, et al. ApoE4 accelerates early seeding of amyloid pathology[J]. *Neuron*, 2017, 96(5):1024-1032.
- [14] Fu Y, Zhao J, Atagi Y, et al. Apolipoprotein E lipoprotein particles inhibit amyloid-beta uptake through cell surface heparan sulphate proteoglycan[J]. *Mol Neurodegener*, 2016, 11(1):37.
- [15] 王海涛, 高洪梅, 张天骄, 等. 载脂蛋白E基因多态性在缺血性脑卒中的研究进展[J]. *卒中与神经疾病*, 2020, 27(3):395-399.
- [16] 杨烁, 赵巍, 王海涛, 付源. 载脂蛋白E及其受体调控阿尔茨海默病的研究进展[J]. *中风与神经疾病杂志*, 2018, 35(6):569-571.
- [17] Zhao L. CD33 in Alzheimer's Disease-biology, pathogenesis, and therapeutics: a mini-review[J]. *Gerontol*, 2019, 65(4):323-331.
- [18] Gong L, Xu R, Lan L, et al. The CD33 genotype associated cognitive performance was bidirectionally modulated by intrinsic functional connectivity in the Alzheimer's disease spectrum[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 115:1-8.
- [19] Babić Leko M, Willumsen N, Nikolac Perković M, et al. Association of MAPT haplotype-tagging polymorphisms with cerebrospinal fluid biomarkers of Alzheimer's disease: A preliminary study in a Croatian cohort[J]. *Brain Behav*, 2018, 8(11):e01128.
- [20] Lewczuk P, Lelental N, Spitzer P, et al. Amyloid-β 42/40 cerebrospinal fluid concentration ratio in the diagnosis of Alzheimer's Disease: validation of two novel assays[J]. *J Alzheimers Dis*, 2014, 43(1):183-191.
- [21] Vogelgsang J, Wedekind D, Bouter C, et al. Reproducibility of Alzheimer's Disease cerebrospinal fluid-bio-marker measurements under clinical routine conditions[J]. *J Alzheimers Dis*, 2018, 62(1):203-212.
- [22] Michaud TL, Kane RL, McCarten JR, et al. Risk stratification using cerebrospinal fluid biomarkers in patients with Mild Cognitive Impairment: An Exploratory Analysis[J]. *J Alzheimers Dis*, 2015, 47(3):729-740.
- [23] Tarawneh R, Lee JM, Ladenson JH, et al. CSF VILIP-1 predicts rates of cognitive decline in early Alzheimer disease[J]. *Neurology*, 2012, 78(10):709-719.
- [24] Yang CC, Chiu MJ, Chen TF, et al. Assay of plasma phosphorylated Tau protein (threonine 181) and total Tau Protein in early-stage Alzheimer's Disease[J]. *J Alzheimers Dis*, 2018, 61(4):1323-1332.
- [25] Shekhar S, Kumar R, Rai N, et al. Estimation of Tau and phosphorylated Tau181 in Serum of Alzheimer's Disease and mild cognitive impairment patients[J]. *PLoS One*, 2016, 11(7):e0159099.
- [26] Kenny A, McArdle H, Calero M, et al. Elevated plasma microRNA-206 levels predict cognitive decline and progression to Dementia from Mild Cognitive Impairment[J]. *Biomolecules*, 2019, 9(11):734.
- [27] Shi M, Sui YT, Peskind ER, et al. Salivary tau species are potential biomarkers of Alzheimer's disease[J]. *J Alzheimers Dis*, 2011, 27(2):299-305.
- [28] Pেকেles H, Qureshi HY, Paudel HK, et al. Development and validation of a salivary tau biomarker in Alzheimer's disease[J]. *Alzheimers Dement*, 2018, 11:53-60.
- [29] Gleerup HS, Hasselbalch SG, Simonsen AH. Biomarkers for Alzheimer's Disease in saliva: a systematic review[J]. *Dis Markers*, 2019, 2019:1-11.
- [30] Sabbagh MN, Shi J, Lee M, et al. Salivary beta amyloid protein levels are detectable and differentiate patients with Alzheimer's disease dementia from normal controls: preliminary findings[J]. *BMC Neurol*, 2018, 18(1):155.
- [31] Tiepolt S, Schafer A, Rullmann M, et al. Quantitative Susceptibility mapping of amyloid-beta aggregates in Alzheimer's Disease with 7T MRI[J]. *J Alzheimers Dis*, 2018, 64(2):393-404.
- [32] Gong NJ, Dibb R, Bulk M, et al. Imaging beta amyloid aggregation and iron accumulation in Alzheimer's disease using quantitative susceptibility mapping MRI[J]. *Neuroimage*, 2019, 191:176-185.
- [33] Ewers M, Sperling RA, Klunk WE, et al. Neuroimaging markers for the prediction and early diagnosis of Alzheimer's disease dementia[J]. *Trends Neurosci*, 2011, 34(8):430-442.
- [34] Bao W, Jia H, Finnema S, et al. PET Imaging for early detection of Alzheimer's Disease: from pathologic to physiologic biomarkers[J]. *PET Clin*, 2017, 12(3):329-350.

急性脑梗死静脉溶栓患者RBP、Hcy、Lpa与NIHSS评分关系及预测血管再通的效能

何可* 吕友梅 鲁兵 彭阿龙

[摘要] **目的** 探讨急性脑梗死静脉溶栓患者视黄醇结合蛋白(RBP)、同型半胱氨酸(Hcy)、脂蛋白a(Lpa)与美国国立卫生研究院卒中量表(NIHSS)评分关系及联合预测血管再通的效能。**方法** 选取2019年1月至2020年12月淮南新华医疗集团新华医院收治的84例具有静脉溶栓指征的急性脑梗死患者进行研究,均行阿替普酶静脉溶栓,根据溶栓后血管再通情况分为非再通组($n=21$)、再通组($n=63$),比较两组基线资料、RBP、Hcy、Lpa水平,应用Pearson及偏相关性分析各指标与NIHSS评分关系,应用受试者工作特征曲线(ROC)及ROC下面积(AUC)分析各指标预测血管非再通的效能。**结果** 非再通组脑卒中史与再通组比较,差异有统计学意义($P<0.05$),非再通组NIHSS评分、RBP、Hcy、Lpa高于再通组,差异有统计学意义($P<0.05$);RBP、Hcy、Lpa与NIHSS评分呈正相关($P<0.05$);偏相关性分析显示,将脑卒中史控制后,RBP、Hcy、Lpa仍与NIHSS评分相关($P<0.05$);RBP、Hcy、Lpa预测血管再通的AUC分别为0.858、0.897、0.751,RBP、Hcy联合Lpa预测血管非再通的AUC为0.912($P<0.05$)。**结论** RBP、Hcy、Lpa与急性脑梗死静脉溶栓患者神经缺损程度和静脉溶栓后血管再通情况有关,可作为预测血管再通情况的生物标志物,为临床评估病情、治疗决策等提供参考。

[关键词] RBP; Hcy; Lpa; 急性脑梗死; 静脉溶栓; 神经缺损; 血管再通

Relationship between RBP, Hcy, LPA and NIHSS score in patients with acute cerebral infarction undergoing intravenous thrombolysis

HE Ke*, LV Youmei, LU Bing, PENG Along

(Department of Neurology, Xinhua Hospital, Huainan Xinhua Medical Group, Huainan, Anhui, China, 232052)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the relationship between retinol binding protein (RBP), homocysteine (Hcy), lipoprotein a (LPA) and National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS) score in patients with acute cerebral infarction undergoing intravenous thrombolysis and the efficacy of combined prediction of vascular recanalization. **Methods** 84 cases of acute cerebral infarction patients with indications of intravenous thrombolysis in Huainan Xinhua Medical Group Xinhua Hospital from January 2019 to December 2020 were selected for the study. All patients underwent intravenous thrombolysis with altepl. According to the recanalization after thrombolysis, they were divided into the non-recanalization group ($n=21$) and the recanalization group ($n=63$). The baseline data, RBP, Hcy and LPA levels of the two groups were compared. Pearson and partial correlation were used to analyze the relationship between each indicator and NIHSS score. Receiver operating characteristic curve (ROC) and area under ROC (AUC) were used to analyze the effectiveness of each indicator in predicting the effectiveness of non-recanalization. **Results** There was a statistically significant difference between the history of stroke in the non-recanalization group and the recanalization group ($P<0.05$). The NIHSS score, RBP, Hcy, and Lpa of the non-recanalization group were higher than those of the recanalization group ($P<0.05$). RBP, Hcy, Lpa and NIHSS score were positively

基金项目:安徽省高等学校省级质量工程项目(2018jyxm 0726)

作者单位:淮南新华医疗集团新华医院神经内科,安徽,淮南 232052

*通信作者:何可, E-mail: Hk19880519@163.com

correlated ($P<0.05$). Partial correlation analysis showed that after controlling for stroke history, RBP, Hcy, and Lpa were still correlated with NIHSS score ($P<0.05$). RBP, Hcy, and Lpa predicted the AUC of recanalization were 0.858, 0.897, 0.751, respectively. The predicted AUC of non-recanalized blood vessels by Hcy combined with Lpa was 0.912. **Conclusion** RBP, Hcy, and Lpa are related to the degree of nerve defect and vascular recanalization after intravenous thrombolysis in patients with acute cerebral infarction. They can be used as biomarkers to predict vascular recanalization and provide references for clinical evaluation of the condition and treatment decisions.

[KEY WORDS] RBP; Hcy; Lpa; Acute cerebral infarction; Intravenous thrombolysis; Nerve defect; Vascular recanalization

目前静脉溶栓的血管再通率约为75.78%^[1],文献报道^[2-3]视黄醇结合蛋白(Retinol-binding protein, RBP)可以影响急性脑梗死的发生发展,同型半胱氨酸(Homocysteine, Hcy)与梗死血管血流灌注有关^[4],脂蛋白a(Lipoprotein a, Lpa)是神经功能恶化的相关因素^[5]。然而关于RBP、Hcy、Lpa联合预测血管再通效能的报道较少,本研究旨在探讨RBP、Hcy、Lpa与急性脑梗死患者美国国立卫生研究院卒中量表(National Institute of Health stroke scale, NIHSS)评分关系及联合检测对静脉溶栓患者预测血管再通的效能,结果如下。

1 对象和方法

1.1 研究对象

选取2019年1月至2020年12月淮南新华医疗集团新华医院收治的84例具有静脉溶栓指征的急性脑梗死患者进行研究。根据阿替普酶静脉溶栓后血管再通情况分为非再通组($n=21$)、再通组($n=63$)。

纳入标准:①符合急性脑梗死诊断标准^[6];②发病至入院时间 <4.5 h,无出血倾向及出血类疾病,具有静脉溶栓指征;③家属对本研究充分知情,自愿签署知情同意书。排除标准:①2个月内有颅脑手术史者;②可能伴有蛛网膜下腔出血或癫痫发作者;③颅内动脉瘤、动静脉畸形者;④血小板计数小于 $100\ 000/\text{mm}^3$ 者;⑤急性心包炎者。本研究获医院伦理委员会审核通过。

1.2 方法

1.2.1 资料收集

收集患者年龄、性别、体质量指数、发病至入院时间、饮酒史、吸烟史、高脂血症、糖尿病、冠心病、高血压、脑卒中史、梗死部位、NIHSS评分^[7],采用双人双录法,保证数据录入的准确性,其中NIHSS评分用以评估患者神经缺损程度。

1.2.2 治疗方法及血管再通评价

均行阿替普酶(KG/Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co.KG公司,批准文号S20160054)静脉溶栓,给药剂量 $0.9\ \text{mg}/\text{kg}$,最大剂量 $\leq 90\ \text{mg}$,1 min内静脉推注总剂量的10%,剩余90%在1 h内静脉滴注。根据溶栓后24 h头颅磁共振检查和TICI分级^[8]评估,0级:血管闭塞,闭塞段无正向血流;1级:严重狭窄,无明显血流;2级:闭塞段血流顺行,远端可见部分血流分支;3级:闭塞段无狭窄或无明显狭窄,血流正常,远端血管血流分支正常,2级及3级视为血管再通。

1.2.3 检测方法

于溶栓前采集患者外周静脉血5 mL,3 000 r/min离心10 min,分离血清,采用化学发光法检测RBP、Hcy、Lpa水平,试剂盒购于上海一研生物科技有限公司,严格按照试剂盒说明书操作。采用成批检测的方法,所有标本在采集后1 d内完成检测。

1.3 统计学方法

采用SPSS 22.0统计学软件处理数据,计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,行独立样本 t 检验,计数资料用 $n(\%)$ 表示,行 χ^2 检验,Pearson分析RBP、Hcy、Lpa与NIHSS评分关系,Logistic回归分析血管再通的影响因素,应用受试者工作特征曲线(ROC)及ROC下面积(AUC)分析RBP、Hcy、Lpa预测血管非再通的效能。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组基线资料、各指标比较

两组年龄、性别、体质量指数、发病至入院时间、饮酒史、吸烟史、高脂血症、糖尿病、冠心病、高血压、梗死部位比较,差异无统计学意义($P>0.05$);非再通组脑卒中史与再通组比较,差异有统计学意义($P<0.05$),非再通组NIHSS评分、RBP、Hcy、Lpa高于再通组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表1。

表1 两组基线资料、各指标比较 $[(\bar{x} \pm s), n(\%)]$

Table 1 Comparison of baseline data and indicators between the two groups $[(\bar{x} \pm s), n(\%)]$

资料	非再通组 (n=21)	再通组 (n=63)	t/ χ^2 值	P值
年龄(岁)	58.34±9.77	56.91±10.32	0.557	0.579
性别(男/女)	11/10	39/24	0.593	0.441
体质量指数(kg/m ²)	23.74±1.42	23.55±1.60	0.484	0.630
发病至入院时间(h)	3.02±0.54	2.86±0.61	1.070	0.288
饮酒史	14(66.67)	36(57.14)	0.593	0.441
吸烟史	9(42.86)	32(50.79)	0.397	0.529
既往史				
高脂血症	13(61.90)	32(50.79)	0.782	0.377
糖尿病	5(23.81)	20(31.75)	0.475	0.491
冠心病	1(4.76)	6(9.52)	0.052	0.820
高血压	4(19.05)	8(12.70)	0.130	0.719
脑卒中心	4(19.05)	1(1.59)	5.742	0.017
梗死部位				
前循环	12(57.14)	43(68.25)	0.860	0.354
后循环	9(42.86)	20(31.75)		
NIHSS评分(分)	10.64±3.03	7.18±2.21	5.638	<0.001
RBP(mg/L)	70.89±14.57	56.27±13.08	4.311	<0.001
Hcy(μ mol/L)	13.38±4.11	7.52±2.49	7.836	<0.001
Lpa(mg/dl)	41.79±12.53	30.66±10.07	4.120	<0.001

2.2 各指标与NIHSS评分关系

以两组各指标为源数据,应用Pearson分析各指标与NIHSS评分关系,结果显示,RBP($r=0.725, P<0.05$)、Hcy($r=0.730, P<0.05$)、Lpa($r=0.822, P<0.05$)与NIHSS评分呈正相关。

2.3 血管再通情况的多因素分析

将脑卒中心控制后,RBP、Hcy、Lpa仍与血管再通情况相关($P<0.05$)。见表2。

表2 血管再通情况的多因素Logistic回归方程分析

Table 2 Multivariate logistic regression equation analysis of vascular recanalization

影响因素	β 值	SE值	Wald χ^2	OR值	95%CI	P值
RBP	0.476	0.142	11.225	1.609	1.526~1.697	<0.001
Hcy	0.147	0.042	12.288	1.159	1.035~1.297	<0.001
Lpa	0.828	0.256	10.455	2.288	2.003~2.614	<0.001

2.4 各指标预测血管再通情况的效能

以非再通组为阳性样本,以再通组为阴性样本,绘制ROC曲线,应用SPSS软件的联合应用ROC模式构建各指标联合预测血管非再通的模型,结果显示,RBP、Hcy联合Lpa预测血管非再通的AUC最大($P<0.05$)。见表3、图1。

3 讨论

RBP是由肝脏合成的一种维生素转运蛋白,近年来研究发现,RBP水平升高可干扰胰岛素相

表3 ROC分析结果

Table 3 ROC analysis results

指标	AUC	95%CI	cut-off值	敏感度(%)	特异度(%)	P值
RBP	0.858	0.765~0.925	>66.56 mg/L	76.19	85.71	<0.001
Hcy	0.897	0.811~0.953	>11.21 μ mol/L	85.71	92.06	<0.001
Lpa	0.751	0.644~0.839	>38.17 mg/dl	66.67	77.78	<0.001
联合	0.912	0.829~0.963		95.24	80.95	<0.001

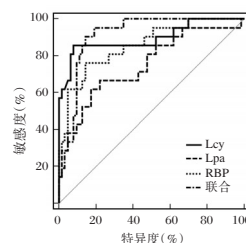


图1 各指标预测血管再通情况的效能

Figure 1 The effectiveness of various indicators in predicting vascular recanalization

关信号通路传递,参与胰岛素抵抗过程,并能引起高胰岛素血症,刺激血管平滑肌增殖,诱导动脉粥样硬化形成^[8-9]。但与急性脑梗死NIHSS评分关系及对静脉溶栓后血管再通预测效能的研究较少,本研究对此探讨发现,与血管再通患者相比,非再通患者RBP较高,提示RBP与静脉溶栓后血管再通情况有关。RBP水平升高不仅可介导炎症反应,促进炎症介质的合成与分泌,损伤血管内皮,还能引起氧化应激,对血管内皮造成氧化应激损伤,促进血小板等凝血物质在血管损伤部位的聚集和血栓形成,从而影响溶栓后血管再通情况。且本研究发现,RBP与NIHSS评分呈正相关,与王峥等^[10]报道一致,说明RBP越高,神经缺损越严重,这与梗死血管未能及时再通,血流灌注未及时恢复有关。可见检测RBP可评估患者神经缺损程度和静脉溶栓后血管再通情况,为临床评估患者病情、选取合适治疗方式提供客观依据。

Hcy是含硫氨基酸中间代谢产物,水平升高是动脉粥样硬化等心脑血管疾病的独立危险因素之一^[11]。杨帆^[12]报道显示,静脉溶栓后急性脑梗死患者病情缓解,并伴有Hcy降低,提示Hcy与静脉溶栓疗效有关。Hcy可促进脂质在血管内皮上沉积,导致血管内皮细胞通透性异常,为炎症介质在血管内皮损伤部位聚集提供条件,且Hcy可促进血管平滑肌增殖,介导粥样硬化斑块形成,同时存在金属离子前提下,Hcy可产生自由基和过氧化物,对血管内皮细胞造成氧化应激损伤,导致血管

内皮功能障碍,因此与静脉溶栓后血管再通情况有关^[13]。且Hcy越高,神经缺损越严重,故临床上对Hcy高水平患者,应警惕其神经功能恶化的发生,加强管理和干预,以改善患者预后。

Lpa是机体一种特殊的大分子脂蛋白,在外周血中浓度主要受基因控制,不受年龄、体育锻炼、性别、体质量指数等因素影响,具有理想生物标志物的特性^[14]。Lpa能通过氧化修饰作用,结合相关细胞受体,增加对乙酰化低密度脂蛋白的摄取和泡沫细胞形成,促进血栓形成,且高水平Lpa还能抵抗纤维蛋白溶解,阻止靶血管内血栓的溶解,所以会影响溶栓疗效。且本研究还发现,Lpa与NIHSS评分呈正相关,Lpa水平越高,神经缺损越严重。潘晓帆等^[15]报道,Lpa是溶栓治疗脑梗死患者神经恶化的独立危险因素,本研究观点与之相似,佐证了Lpa在神经缺损程度中所起的作用,可见检测Lpa能评估急性脑梗死患者神经缺损、预测静脉溶栓疗效。值得注意的是,本研究发现,RBP、Hcy、Lpa联合检测预测溶栓后血管再通情况的AUC最大,故建议条件允许时,对三者进行联合检测,为临床提供更可靠的参考信息。

综上,RBP、Hcy、Lpa与急性脑梗死静脉溶栓患者神经缺损程度和静脉溶栓后血管再通情况有关,可作为预测血管再通情况的生物标志物,为临床评估病情、治疗决策等提供参考。

参考文献

- [1] 阮清源,尹虹祥,魏衡,等. 静脉溶栓治疗急性脑梗死大血管闭塞患者的血管再通情况及其影响因素分析[J]. 神经损伤与功能重建, 2019,14(8):409-410,415.
- [2] 陈晓雷,程海燕,任焯,等. 血清视黄醇结合蛋白4与2型糖尿病并腔隙性脑梗死的相关性[J]. 实用医学杂志, 2020,36(9):1214-1216.
- [3] 何伟,邓伟林,罗江,等. 急性脑梗死患者血清RBP、NLR、PTX3水平与颈动脉粥样硬化斑块稳定性的关系研究[J]. 现代生物医学进展, 2020,20(13):252-255,2446.
- [4] 甄海旭,刘建文,李振. 网膜素、血清Hcy与急性冠脉综合征的相关性研究[J]. 中南医学科学杂志, 2019,47(1):44-46+51.
- [5] 吴国访,张丽,张淑沛,等. LPA、Hcy、MCP-1与缺血性卒中患者神经损伤和侧支循环的关系[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2021,13(2):199-202.
- [6] 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2018[J]. 中华神经科杂志, 2018,51(9):666-682.
- [7] 黄飞文,张俊成,吕小亮,等. 磁敏感血征预测脑梗死静脉溶栓血管再通的影响因素分析[J]. 广东医学, 2019,40(7):981-984.
- [8] Zhou W, Ye SD, Wang W. Elevated retinol binding protein 4 levels are associated with atherosclerosis in diabetic rats via JAK2/STAT3 signaling pathway[J]. World J Diabetes, 2021, 12(4):466-479.
- [9] 黄玉萍,杨思慧,龚晶. 血补体C1q、尿视黄醇结合蛋白对紫癜性肾炎患儿早期诊断及疾病预后的评估价值[J]. 中华生物医学工程杂志, 2019,25(5):542-546.
- [10] 王峥. T2DM糖尿病伴急性脑梗死ACI患者凝血功能、血清RBP4、LPA、hs-CRP的变化及其意义[J]. 中国急救复苏与灾害医学杂志, 2019,14(4):339-342.
- [11] Liu W, Wang T, Sun P, et al. Expression of Hcy and blood lipid levels in serum of CHD patients and analysis of risk factors for CHD[J]. Exp Ther Med, 2019,17(3):1756-1760.
- [12] 杨帆. 静脉溶栓前后应用瑞舒伐他汀对急性脑梗死患者神经功能及预后的影响[J]. 贵州医药, 2020,44(2):271-273.
- [13] Keller AC, Klawitter J, Hildreth KL, et al. Elevated plasma homocysteine and cysteine are associated with endothelial dysfunction across menopausal stages in healthy women[J]. J Appl Physiol (1985), 2019,126(6):1533-1540.
- [14] Pan Y, Li H, Wang Y, et al. Causal Effect of Lp(a) [Lipoprotein (a)] Level on Ischemic Stroke and Alzheimer Disease: A Mendelian Randomization Study[J]. Stroke, 2019, 50(12):3532-3539.
- [15] 潘晓帆,秦琳,韩杨,等. 阿替普酶溶栓治疗急性脑梗死早期神经功能恶化的相关危险因素分析[J]. 卒中与神经疾病, 2019,26(2):140-142,147.

(上接第1560页)

- [35] Mosconi L. Brain glucose metabolism in the early and specific diagnosis of Alzheimer's disease[J]. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2005,32(4):486-510.
- [36] Valotassiou V, Papatriantafyllou J, Sifakis N, et al. Clinical evaluation of brain perfusion SPECT with brominated areas mapping in early diagnosis of Alzheimer's Disease[J]. J Alzheimers Dis, 2015,47(3):773-785.
- [37] Javaid FZ, Brenton J, Guo L, Cordeiro MF. Visual and ocular manifestations of Alzheimer's Disease and their use as biomarkers for diagnosis and progression[J]. Front Neurol, 2016,7:55.
- [38] Lim JKH, Li QX, He Z, et al. The eye as a biomarker for Alzheimer's Disease[J]. Front Neurosci, 2016,10:536.
- [39] Brazaca LC, Sampaio I, Zucolotto V, Janegitz BC. Applications of biosensors in Alzheimer's disease diagnosis[J]. Talanta, 2020,210:1-14.
- [40] Li SS, Lin CW, Wei KC, et al. Non-invasive screening for early Alzheimer's disease diagnosis by a sensitive immunomagnetic biosensor[J]. Sci Rep, 2016,6:1-11.

高通量测序法微卫星不稳定性检测评价

贾铮¹ 徐任² 张文新¹ 黄杰^{1*} 曲守方^{1*}

[摘要] **目的** 利用人类多基因突变联合检测试剂盒(可逆末端终止测序法)检测微卫星不稳定性(MSI)检测国家参考品,评价试剂盒的微卫星不稳定性检测性能。**方法** 采用试剂盒对MSI国家参考品进行阳性参考品符合率、阴性参考品符合率和检测限项目的检测。**结果** 对MSI国家参考品中的62例样本进行检测,其中阳性参考品的结果均为微卫星高度不稳定,阴性参考品的结果均为微卫星稳定,LOD1及LOD3的20%、10%检测限参考品均检出微卫星高度不稳定,但其5%检测限参考品未检出相应的微卫星高度不稳定状态。LOD4、LOD5、LOD6及LOD7检测限参考品检测结果均为微卫星稳定。**结论** 微卫星不稳定性检测国家参考品,适用于高通量测序法的试剂盒微卫星不稳定性检测性能评价。

[关键词] 微卫星;微卫星不稳定性;错配修复;国家参考品;高通量测序法

Evaluation of microsatellite instability detection by high-throughput sequencing

JIA Zheng¹, XU Ren², ZHANG Wenxin¹, HUANG Jie^{1*}, QU Shoufang^{1*}

(1. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing, China, 100050; 2. Shanghai Yuanqi Bio-Pharmaceutical Co. Ltd, Shanghai, China, 201403)

[ABSTRACT] **Objective** To use human multi-gene mutation detection kit (reversible end-termination sequencing) to detect the national reference materials for microsatellite instability (MSI), to evaluate the kit performance. **Methods** The national reference materials were detected by the detection kit to determine the coincident rate of positive reference, the coincident rate of negative reference and the limit of detection. **Results** In 62 cases of testing samples, the results of positive reference were all microsatellite instability-high (MSI-H). The results of negative reference were all microsatellite stability (MSS). The results of LOD1 and LOD3 limit references with tumor DNA content 20% and 10% were MSI-H, but the corresponding MSI-H status was not detected with the tumor concentration of 5%. LOD4, LOD5, LOD6 and LOD7 limit references were all microsatellite stability (MSS). **Conclusion** The national reference materials for microsatellite instability could be applicable for performance evaluation of the kits by high-throughput sequencing.

[KEY WORDS] Microsatellite; Microsatellite instability; Mis Match Repair deficiency; National reference material; high throughput sequencing

微卫星(Microsatellite)是指人类基因组中的短串联重复序列,有单核苷酸、双核苷酸或高位核苷酸的重复。微卫星不稳定性是细胞内的微卫星由于重复单位的插入或缺失而导致微卫星长度的改变,包括微卫星高度不稳定(Microsatellite instability-high, MSI-H)、微卫星低度不稳定(Microsatellite instability-low, MSI-L)及微卫星稳定(micro-

satellite stability, MSS)等状态,是由错配修复(Mismatch repair, MMR)基因 *MSH2*、*MSH6*、*MLH1*、*PMS1* 和 *PMS2* 发生缺陷引起的,与肿瘤的发生密切相关^[1-2]。临床上已将 MSI 作为结直肠癌及其他实体瘤预后和制定辅助治疗方案的重要分子标志物,并用于林奇综合症(Lynch syndrome)筛查^[3-4]。美国食品药品监督管理局(FDA)批准PD-L1抑制剂

作者单位:1. 中国食品药品检定研究院体外诊断试剂检定所,北京 100050

2. 上海源奇生物医药科技有限公司,上海 201403

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

注:贾铮和徐任共为第一作者

帕博利珠单抗注射液 (Keytruda 或 Pembrolizumab), 用于治疗微卫星高度不稳定 (MSI-H) 或错配修复基因缺陷 (deficient mismatch repair, dMMR) 的实体瘤患者^[5], 这是首款依照分子标记物进行区分的抗肿瘤疗法。

目前临床检测 MSI, 主要是使用免疫组织化学方法检测肿瘤组织中错配修复基因 *MLH1*、*MSH2*、*MSH6* 及 *PMS2* 的表达^[6-7], 和国际公认的金标准-多重荧光 PCR 结合毛细管电泳方法检测特异的微卫星重复序列扩增判定 MSI 状态^[8-9]。随着高通量测序技术 (High throughput sequencing) 发展, 该技术已经成为 MSI 检测的新发展方向^[10-12]。国内已经有多家公司开发基于高通量测序平台的 MSI 检测试剂盒。本研究使用微卫星不稳定性检测国家参考品作为统一的标准, 评价 MSI 检测试剂盒 (高通量测序法) 的性能。

1 材料与方 法

1.1 参考品

MSI 检测国家参考品, 批号: 360028-201901, 中国食品药品检定研究院提供。

1.2 试剂与仪器

人类多基因突变联合检测试剂盒 (可逆末端终止测序法), 购自江苏先声医疗器械有限公司。Genomic DNA Reagents、D1000 Reagents 和 D1000 Screen-Tape, 购自美国 Agilent Technologies 公司。NextSeq 500/550 High Output Reagent Cartridge v2 (300 cycles)、NextSeq 500/550 Buffer Cartridge v2、NextSeq Accessory Box v2、NextSeq 500/550 High Output Flow Cell Cartridge v2.5 购自美国 illumina 公司。

ME220 超声打断仪, 购自美国 Covaris 公司。4 200 TapeStation 片段分析系统, 购自美国 Agilent Technologies 公司。NextSeq550Dx 基因测序仪, 购自美国 illumina 公司。

1.3 方法

1.3.1 文库构建

取不少于 100 ng 国家参考品 DNA, 转移到 Covaris 超声打断管中, 设置超声打断仪各参数后进行 DNA 片段化处理。然后将片段化 DNA 进行末端修复和接头连接, 然后进行 PCR 扩增, 制备文库。

1.3.2 杂交捕获

采用试剂盒具有特定 DNA 序列的捕获探针与文库进行杂交, 从而特异性捕获目标区域, 通过磁珠

法富集被探针捕获的目标区域 DNA 片段。将捕获文库进行 PCR 扩增。纯化后的文库使用 Agilent 4200 TapeStation 进行检测, 要求主要片段的峰值为 220 bp~350 bp 左右, 无明显小片段和大片段杂峰, 主要片段的浓度应 $>3 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 。然后获得合格的文库。

1.3.3 上机测序

将已定量合格的文库加入到试剂盒的标准化文库试剂和磁珠悬浮缓冲液, 经过洗脱缓冲液的洗脱, 获得标准化文库。标准化文库加入到 NextSeq 500/550 High Output Reagent Cartridge v2 (300 cycles) 中, 配合 NextSeq 500/550 Buffer Cartridge v2、NextSeq Accessory Box v2、NextSeq 500/550 High Output Flow Cell Cartridge v2.5, 使用 NextSeq550Dx 基因测序仪进行测序。使用“人类多基因突变联合检测试剂盒分析软件”对下机数据进行分析, 获得样本的 MSI 结果。

1.4 结果判定

根据阴性样本构建的 MSI 基线 (Baseline), 从下机数据的 bam 文件中分析样本的微卫星不稳定性。对每个样本给出微卫星不稳定的位点数目 (如果位点的 Distance >0.08 且 $P < 0.01$, 则该位点是 MSI 不定位点) 和可用的 MSI 位点数, 计算 MSI 值, 其公式为: $\text{MSI 值} = \text{MSI 不定位点数} / \text{可用的 MSI 位点数} \times 100\%$ 。当样本的 MSI 值大于等于 15% 时结果为 MSI-H, MSI 值小于 15% 时结果为 MSS。

1.5 统计学分析

使用 python 3.7 中 math、np 和 scipy 包进行数据统计分析, 计算待测样本与 MSI 基线样本间以及 MSI 基线样本间的 Jensen-Shannon (JS) 距离 (Distance), 2 组 Distance 数据间比较采用单边 t 检验进行分析 (P), 以 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 阳性参考品结果

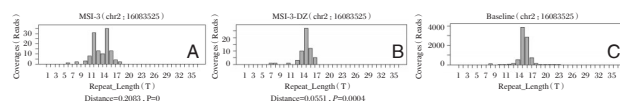
国家参考品中的 16 对阳性参考品共 32 例样本检测结果显示均为微卫星高度不稳定, 见表 1。以国家阳性参考品 MSI-3 及其配对参考品 MSI-3-对照 (MSI-3-DZ) 的 chr2: 16083525 位点的结果为例, 见图 1。在 MSI-3-DZ 和基线样本中碱基重复数 (Repeat-Length) 集中分布在 15 个串联重复 T 上, 在 MSI-3 中 12 个串联重复 T 上也有一个较高的峰值, 表明该位点发生了微卫星不稳定性, 计算该位点的重复单元长度与基线样本的 Distance 为

表1 MSI国家参考品的结果

样本名称	标示结果	MSI值(%)	MSI状态
MSI-1	MSI-H	79.65	MSI-H
MSI-1-DZ	/	4.35	MSS
MSI-2	MSI-H	67.96	MSI-H
MSI-2-DZ	/	3.57	MSS
MSI-3	MSI-H	72.38	MSI-H
MSI-3-DZ	/	1.87	MSS
MSI-4	MSI-H	69.81	MSI-H
MSI-4-DZ	/	2.68	MSS
MSI-5	MSI-H	26.67	MSI-H
MSI-5-DZ	/	2.88	MSS
MSI-6	MSI-H	67.37	MSI-H
MSI-6-DZ	/	2.68	MSS
MSI-7	MSI-H	86.49	MSI-H
MSI-7-DZ	/	6.31	MSS
MSI-8	MSI-H	60.55	MSI-H
MSI-8-DZ	/	5.26	MSS
MSI-9	MSI-H	66.09	MSI-H
MSI-9-DZ	/	3.39	MSS
MSI-10	MSI-H	68.63	MSI-H
MSI-10-DZ	/	5.22	MSS
MSI-11	MSI-H	46.90	MSI-H
MSI-11-DZ	/	6.25	MSS
MSI-12	MSI-H	52.17	MSI-H
MSI-12-DZ	/	3.48	MSS
MSI-13	MSI-H	50.00	MSI-H
MSI-13-DZ	/	4.42	MSS
MSI-14	MSI-H	38.46	MSI-H
MSI-14-DZ	/	4.35	MSS
MSI-16	MSI-H	38.53	MSI-H
MSI-16-DZ	/	0.95	MSS
MSI-17	MSI-H	65.45	MSI-H
MSI-17-DZ	/	3.61	MSS
MSI-18	MSS	4.40	MSS
MSI-18-DZ	/	6.06	MSS
MSI-19	MSS	9.73	MSS
MSI-19-DZ	/	8.00	MSS
MSI-20	MSS	9.73	MSS
MSI-20-DZ	/	9.17	MSS
MSI-LOD1-20	MSI-H	43.81	MSI-H
MSI-LOD1-10	MSI-H	18.75	MSI-H
MSI-LOD1-5	MSI-H	9.52	MSS
MSI-LOD1-DZ	/	1.87	MSS
MSI-LOD3-20	MSI-H	51.52	MSI-H
MSI-LOD3-10	MSI-H	20.43	MSI-H
MSI-LOD3-5	MSI-H	9.09	MSS
MSI-LOD3-DZ	/	1.06	MSS
MSI-LOD4-20	MSS	5.32	MSS
MSI-LOD4-10	MSS	3.30	MSS
MSI-LOD4-5	MSS	2.33	MSS
MSI-LOD4-DZ	/	4.26	MSS
MSI-LOD5-20	MSS	0.00	MSS
MSI-LOD5-10	MSS	2.04	MSS
MSI-LOD5-5	MSS	0.00	MSS
MSI-LOD5-DZ	/	1.79	MSS
MSI-LOD6-20	MSS	0.94	MSS
MSI-LOD6-10	MSS	1.82	MSS
MSI-LOD6-5	MSS	0.89	MSS
MSI-LOD6-DZ	/	0.93	MSS
MSI-LOD7-20	MSS	4.40	MSS
MSI-LOD7-10	MSS	2.78	MSS
MSI-LOD7-5	MSS	4.21	MSS
MSI-LOD7-DZ	/	4.48	MSS

Table 1 The results of national reference MSI

0.2083且 P 为0.0000(Distance>0.08且 $P<0.01$),结果为该位点是微卫星不稳定位点。MSI-3-DZ的该位点的Distance为0.0551且 P 为0.0004,结果为该位点是微卫星稳定位点。软件分析国家阳性参考品MSI-3的MSI值为72.38%(76/105),结果为MSI-H;MSI-3-DZ的MSI值为1.87%(2/107),结果为MSS。



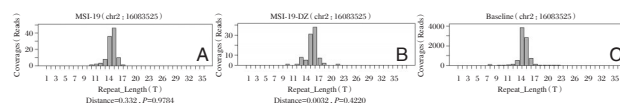
注:A为国家阳性参考品MSI-3;B为配对参考品MSI-3-对照(MSI-3-DZ);C为基线(Baseline)。

图1 国家阳性参考品MSI-3及其配对参考品MSI-3-对照的结果(chr2:16083525)

Figure 1 The results of national positive reference MSI-3 and its matched reference MSI-3-control (chr2:16083525)

2.2 阴性参考品结果

国家参考品中的3对阴性参考品共6例样本检测结果显示均为微卫星稳定,见表1。以国家阴性参考品MSI-19及其配对参考品MSI-19-对照(MSI-19-DZ)的chr2:16083525位点的结果为例,见图2。MSI-19和MSI-19-DZ与基线样本的分布情况相近,碱基重复数均集中分布在15个串联重复T上,计算该位点的Distance和 P ,结果为该位点是微卫星稳定位点。软件分析国家阴性参考品MSI-19的MSI值为9.73%,MSI-19-DZ的MSI值为8.00%,结果均为MSS。



注:A为国家阴性参考品MSI-19;B为配对参考品MSI-19-对照(MSI-19-DZ);C为基线(Baseline)。

图2 国家阴性参考品MSI-19及其配对参考品MSI-19-对照的结果(chr2:16083525)

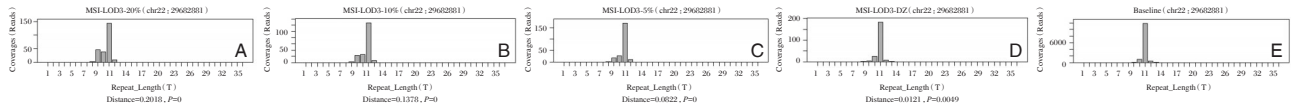
Figure 2 The results of national negative reference MSI-19 and its matched reference MSI-19-control (chr2:16083525)

2.3 检测限参考品结果

国家参考品中的6组检测限参考品共24例样本检测结果显示,对20%和10%肿瘤DNA含量的检测限参考品均能正确检出相应的微卫星不稳定性状态,而对5%肿瘤DNA含量的微卫星高度不稳定性状态的LOD1及LOD3检测限参考品未能正确检出相应的微卫星不稳定性状态,见表1。以国家检测限参考品MSI-LOD3-20%、MSI-LOD3-10%、

MSI-LOD3-5%及其配对参考品 MSI-LOD3-对照 (MSI-LOD3-DZ) 的 chr22:29682881 位点的结果为

例,见图3。MSI-LOD3-5%和 MSI-LOD3-DZ 的 MSI 值分别为 9.09% 和 1.06%, 结果为 MSS。



注:为 A 检测限参考品 MSI-LOD3-20%; 为 B 检测限参考品 MSI-LOD3-10%; C 为检测限参考品 MSI-LOD3-5%; D 为配对参考品 MSI-LOD3-对照 (MSI-LOD3-DZ); E 为基线

图3 国家检测限参考品 MSI-LOD3-20%、MSI-LOD3-10%、MSI-LOD3-5%及其配对参考品 MSI-LOD3-对照的结果 (chr22:29682881)

Figure 3 The results of national reference MSI-LOD3-20%、MSI-LOD3-10%、MSI-LOD3-5% for detection limit and their matched reference MSI-LOD3-control (chr22:29682881)

3 讨论

与传统 PCR 方法相比,高通量测序技术具有通量高、灵敏度强和特异性强等特点,可以实现对样本中多个微卫星位点和多个疾病相关基因同时检测,能够辅助肿瘤诊断、预后评估或选择治疗方案。2017年11月16日,美国FDA批准纪念斯隆·凯特琳癌症研究中心(Memorial Sloan Kettering Cancer Center, 简称 MSK)基于高通量测序技术的癌症基因检测分析平台 MSK-IMPACT™,能够一次对病人肿瘤 468 个基因的突变进行检测,并且可以检测 MSI 基因组特征,但仅限于在 MSK 中进行使用,其检测结果不与任何药物联用^[13]。2017年11月30日,美国FDA批准了 Foundation Medicine 公司针对多种实体瘤的二代测序的体外检测产品—FoundationOne CDx (F1CDx),仅允许在 Foundation Medicine 公司进行检测。该产品可以检测 5 种肿瘤中的 324 个基因的突变,也可以检测 MSI 和肿瘤突变负荷(TMB)两个基因组特征,是 FDA 批准的首款获得突破性认定的癌症高通量测序体外诊断检测产品^[14-15]。国内已有多个公司在基于高通量测序平台的肿瘤大 Panel 检测中加入 MSI 检测流程,进行试剂盒的开发和应用。国家药品监督管理局(NMPA)在 2021 年 1 月批准常州桐树生物科技有限公司的微卫星不稳定(MSI)检测试剂盒(多重荧光 PCR-毛细管电泳法),可以体外定性检测结直肠癌患者肿瘤组织 FFPE 样本的“2B3D”(BAT-25、BAT-26、D5S346、D2S123、D17S250)微卫星位点状态,但是尚未批准基于高通量测序法的 MSI 检测试剂盒。

为了更好地评价上市前的微卫星不稳定性检测试剂盒(高通量测序法)的性能,建立标准化的国家参考品是非常有必要的。本院建立的微卫星不稳定性检测国家参考品,是肿瘤组织或者细胞系和相应的配对样本,包括 MSI-H、MSI-L 及 MSS 三种状

态,其中微卫星高度不稳定的阳性参考品涵盖了不同的微卫星不定位点,检测限参考品设置 20%、10%、5% 三种不同肿瘤 DNA 含量^[16]。MSI 国家参考品采用国际公认的 MSI 金标准方法:多重荧光 PCR-毛细管电泳法进行标定,给出相应的 MSI 状态,要求高通量测序法的结果与金标准方法的结果进行比对,因此也适用于高通量测序法。对国家参考品 62 例样本的结果显示,阳性参考品的结果均为微卫星高度不稳定,阴性参考品的结果均为微卫星稳定,20%和 10% 肿瘤 DNA 含量检测限参考品的结果均符合相应的标示结果,而对 5% 肿瘤 DNA 含量的微卫星高度不稳定状态的检测限参考品 LOD1 及 LOD3 未能检出正确结果。在临床应用中 MSI 检测限一般规定为 20% 肿瘤 DNA 含量,国家参考品要求试剂盒对 20% 和 10% 肿瘤 DNA 含量的检测限参考品必须检出相应的微卫星不稳定性状态;对 5% 肿瘤 DNA 含量的检测限参考品不作要求。建立的 MSI 国家参考品,能够适用于 MSI 检测试剂盒(高通量测序法)的性能评价。

参考文献

- [1] van Velzen MJM, Derks S, van Grieken NCT, et al. MSI as a predictive factor for treatment outcome of gastroesophageal adenocarcinoma[J]. Cancer Treat Rev, 2020, 86: 102024.
- [2] Svrcak M, Lascols O, Cohen R, et al. MSI/MMR-deficient tumor diagnosis: Which standard for screening and for diagnosis? Diagnostic modalities for the colon and other sites: Differences between tumors[J]. Bull Cancer, 2019, 106(2): 119-128.
- [3] Ganesh K, Stadler ZK, Cercek A, et al. Immunotherapy in colorectal cancer: rationale, challenges and potential[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2019, 16(6): 361-375.
- [4] Latham A, Srinivasan P, Kemel Y, et al. Microsatellite instability is associated with the presence of lynch syndrome pancreatic cancer[J]. J Clin Oncol, 2019, 37: 286-295

(下转第 1573 页)

AMS、leptin、TG 预测胆囊结石合并胆总管多发结石术后复发价值

郭健童 苏树英* 张耿 蔡云峰 王忠辉

[摘要] **目的** 探讨淀粉酶(AMS)、瘦素(leptin)、甘油三酯(TG)预测胆囊结石合并胆总管多发结石术后复发价值。**方法** 选取2019年3月至2020年3月佛山市第一人民医院收治的96例胆囊结石合并胆总管多发结石患者,根据术后1年复发情况分为复发组($n=19$)、未复发组($n=77$),比较两组基线资料、术前、术后3、6个月AMS、leptin、TG水平,采用多因素Logistic回归方程分析复发的相关影响因素,采用受试者工作特征曲线(ROC)及ROC下面积(AUC)分析术后3、6个月AMS、leptin、TG预测复发的价值。**结果** 复发组乳头旁憩室与未复发组比较,差异有统计学意义($P<0.05$);复发组术后3、6个月AMS、leptin、TG高于未复发组,差异有统计学意义($P<0.05$);多因素Logistic回归分析显示,将乳头旁憩室控制后,术后3、6个月AMS、leptin、TG是复发相关独立影响因素($P<0.05$);术后6个月各指标及联合预测复发的AUC较术后3个月对应指标大,术后6个月AMS、leptin、TG及联合预测复发的AUC分别为0.853、0.886、0.826、0.924;AMS、leptin、TG高水平者复发率高于低水平者,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 胆囊结石合并胆总管多发结石术后复发患者AMS、leptin、TG升高,与复发密切相关,联合检测可作为预测复发的一个有效方案,为临床干预、随访管理等提供参考。

[关键词] AMS; leptin; TG; 胆囊结石合并胆总管多发结石

The value of AMS, leptin and TG in predicting the recurrence of gallbladder stones combined with multiple common bile duct stones

GUO Jiantong, SU Shuying*, ZHANG Geng, CAI Yunfeng, WANG Zhonghui
(Guangdong Medical University, Zhanjiang, Guangdong, China, 524023)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the value of amylase (AMS), leptin (leptin) and triglyceride (TG) in predicting the recurrence of gallbladder stones combined with multiple common bile duct stones. **Methods** A total of 96 patients with gallbladder stones and multiple common bile duct stones who were admitted Foshan First People's Hospital from March 2019 to March 2020 were selected and divided into recurrence group ($n=19$) and non-recurrence group ($n=77$) according to their recurrence at 1 year after surgery. compare the baseline data, AMS, leptin, and TG levels of the two groups before surgery, 3 months after surgery, and 6 months after surgery. The multivariate Logistic regression equation was used to analyze the relevant factors of recurrence, and the receiver operating characteristic curve was used (ROC) and area under ROC (AUC) were used to analyze the value of AMS, leptin, and TG in predicting recurrence at 3 months and 6 months after surgery. **Results** There was a statistically significant difference between the paraniplle diverticulum in the recurrence group and the non-recurrence group ($P<0.05$); the recurrence group had higher AMS, leptin, and TG at 3 months and 6 months after the operation than the non-recurrence group ($P<0.05$); Multivariate logistic regression analysis showed that after controlling the paraniplle diverticulum, AMS,

基金项目:佛山科技创新项目(1920001001305)

作者单位:广东医科大学,广东,湛江524023

*通信作者:苏树英, E-mail: Ssyng@fsyy.com

leptin, and TG were independent factors related to recurrence at 3 months after surgery and 6 months after surgery ($P<0.05$); each 6 months after surgery The AUC of the index and the combined prediction of recurrence is larger than the corresponding index at 3 months after the operation, and the AUC of AMS, leptin, TG and the combined prediction of recurrence at 6 months after the operation are 0.853, 0.886, 0.826, 0.924, respectively; AMS, leptin, and TG have high levels The recurrence rate of patients was higher than that of low-level patients ($P<0.05$). **Conclusion** The increase of AMS, leptin, and TG in patients with recurrence of gallbladder stones and multiple common bile duct stones is closely related to recurrence. Combined detection can be used as an effective plan for predicting recurrence and provide references for clinical intervention and follow-up management.

[KEY WORDS] AMS; leptin; TG; Gallbladder stones with multiple common bile duct stones

内镜下括约肌切开术(Endoscopic sphincterotomy, EST)、内镜逆行胰胆管造影(Endoscopic retrograde cholangiopancreatography, ERCP)取石后采取腹腔镜胆囊切除术(Laparoscopic cholecystectomy, LC)的“传统两步法”及LC+腹腔镜胆总管探查术(Laparoscopic common bile duct exploration, LCBDE)+术中胆道镜取石+胆总管一期缝合被认为是胆囊结石合并胆总管结石有效、方便、微创的治疗方案,但长期临床实践经验发现,两种方案治疗后,均存在复发风险,增加患者经济负担和再次手术概率,危害身体健康,因此早期预测复发意义重大^[1-2]。淀粉酶(Amylase, AMS)主要由唾液腺和胰腺分泌,结石复发时可因引起胆道梗阻、毒素堆积导致AMS的升高^[3]。瘦素(leptin)系脂肪组织分泌的一种调节新陈代谢的激素,在结石患者中水平高于健康对照人群,与胆固醇结石的形成有关^[4]。甘油三酯(Triglyceride, TG)是血脂代谢指标之一,高TG水平患者发生输尿管结石风险较低TG水平患者升高,但是否会影响胆囊结石合并胆总管多发结石患者结石的复发尚不明确^[5]。本研究探讨AMS、leptin、TG预测胆囊结石合并胆总管多发结石术后复发价值,旨在为临床预测结石复发、加强随访和管理等提供参考,报告如下。

1 资料和方法

1.1 一般资料

选取2019年3月至2020年3月佛山市第一人民医院收治的96例胆囊结石合并胆总管多发结石患者其中女51例,男45例,年龄平均(43.27±9.37)岁。根据术后1年复发情况分为复发组($n=19$)、未复发组($n=77$)。纳入标准:①伴有寒战、发热、腹痛、黄疸等一种或多种临床表现,经影像学检查证实为胆囊结石合并胆总管多发结石;②胆总管结石直径>

1.0 cm, 结石数目 ≥ 3 枚;③术后无结石残留患者;④无手术禁忌证。⑤患者及家属均知情,自愿签订知情承诺书。排除标准:①凝血功能异常者;②术前并发胰腺炎、合并急性梗阻性化脓性胆管炎者;③伴有胆管等恶性肿瘤者;④既往存在胆囊切除术、胃大切术、ERCP/EST术史者;⑤充血性心衰、心肌梗塞、严重心绞痛者;⑥妊娠期、哺乳期女性;⑦影像学检查提示存在肝内胆管结石,且肝内外胆管明显狭窄者。本研究获医院伦理委员会审核通过。

1.2 方法

1.2.1 手术方法及复发评估^[6]

行“传统两步法”或“新两步法”手术,其中“传统两步法”第一步:ERCP取石+ENBD,第二步:LC+ERCP+ENBD;“新两步法”第一步:检查性ERCP+ENBD,第二步:LCBDE+术中胆道镜取石+胆总管一期缝合,术后采取常规补液、保肝、抑酸、抗感染等对症处理。术后1个月复查确定无结石残留,而后随访期间经MRCP、CT、超声等影像学检查发现并明确胆总管结石。

1.2.2 资料收集

收集患者年龄、性别、体质量指数、平均胆总管结石直径、基础疾病、手术方式、手术时间、术中失血量、术后住院天数、术后并发症、乳头旁憩室资料。

1.2.3 检测方法

术前、术后3、6个月分别采集患者外周静脉血5 mL,应用深圳迈瑞医疗BS-600全自动生化分析仪及酶速率法检测AMS水平,应用美国伯乐公司生产的680型酶标仪及配套试剂盒检测leptin水平,应用深圳迈瑞医疗BS-600全自动生化分析仪检测TG水平。

1.4 统计学方法

数据采用SPSS 24.0处理,符合正态分布计量资料以($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较行独立样本 t 检验,组

内比较行配对 *t* 检验,计数资料用 *n*(%)表示,当例数小于 40 或理论频数 *T*<1 时采用 Fisher 确切概率法,当例数 ≥40 且理论频数 *T*>5 或 1≤*T*<5 时用 χ^2 检验,采用多因素 Logistic 回归方程分析复发的相关影响因素,采用受试者工作特征曲线(ROC)及 ROC 下面积(AUC)分析术后 3、6 个月 AMS、leptin、TG 预测复发的价值,各指标联合预测采用 Logistic 二元回归拟合分析,返回预测概率 logit(*p*),将其作为独立检验变量。以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组基线资料比较

复发组与无复发组年龄、性别、体质量指数、平均胆总管结石直径、基础疾病、手术方式、手术时间、术中失血量、术后住院天数、术后并发症比较,差异无统计学意义(*P*>0.05);复发组乳头旁憩室与未复发组比较,差异有统计学意义(*P*<0.05)。见表 1。

2.2 两组 AMS、leptin、TG 比较

两组术前 AMS、leptin、TG 比较,差异无统计学意义(*P*>0.05);复发组术后 3、6 个月 AMS、leptin、TG 高于未复发组,差异有统计学意义(*P*<0.05)。见表 2。

2.3 多因素分析

以复发情况为因变量(未复发=0,复发=1);纳入两组比较 *P*<0.05 的指标作为自变量:乳头旁憩室(无=0,有=1)、术后 3、6 个月 AMS、leptin、TG (低于两组均值=1,高于等于两组均值=2),两组术后 3 个月 AMS、leptin、TG 均值分别为 37.82 U/L、13.73 μg/L、1.93 mmol/L,两组术后 6 个月 AMS、leptin、TG 均值分别为 42.89 U/L、13.95 μg/L、2.05 mmol/L;多因素 Logistic 回归分析显示,将乳头旁憩室控制后,术后 3、6 个月 AMS、leptin、TG 是复发相关独立影响因素(*P*<0.05)。见表 3。

2.4 AMS、leptin、TG 预测复发的 ROC 曲线

以复发组术后 3、6 个月 AMS、leptin、TG 为阳性样本,以未复发组术后 3、6 个月 AMS、leptin、TG

表 1 两组基线资料比较 [($\bar{x} \pm s$), *n*(%)]

Table 1 Comparison of baseline data between the two groups

资料	复发组 (<i>n</i> =19)	未复发组 (<i>n</i> =77)	<i>t</i> / χ^2 值	<i>P</i> 值
年龄(岁)	44.68±11.07	42.92±10.39	0.653	0.515
性别(男/女)	10/9	35/42	0.315	0.575
体质量指数(kg/m ²)	23.29±1.05	23.16±1.25	0.418	0.677
平均胆总管结石直径(cm)	1.62±0.24	1.60±0.19	0.389	0.698
基础疾病				
冠心病	2(10.53)	11(14.29)	0.003	0.957
慢性呼吸系统疾病	4(21.05)	10(12.99)	0.280	0.597
高血压	3(15.79)	15(19.48)	0.002	0.967
糖尿病	5(26.32)	16(20.78)	0.045	0.831
手术方式				
传统两步法	9(47.37)	43(55.84)	0.441	0.507
新两步法	10(52.63)	34(44.16)		
手术时间(min)	121.33±14.51	118.01±12.67	0.994	0.323
术中失血量(mL)	38.24±11.07	37.93±10.85	0.111	0.912
术后住院天数(d)	14.25±2.04	13.84±2.37	0.693	0.490
术后并发症				
胆漏	2(10.53)	1(1.30)	1.780	0.182
切口感染	0(0)	1(1.30)	-	1.000
胆道狭窄	0(0)	2(2.60)	0.035	0.852
乳头出血	0(0)	3(3.90)	0.019	0.890
乳头旁憩室				
无	11(57.89)	73(94.81)	15.728	<0.001
有	8(42.11)	4(5.19)		

表 3 复发的多因素 Logistic 回归方程分析

Table 3 Multivariate logistic regression equation analysis of recurrence

影响因素	β 值	SE值	Wald χ^2	OR值	95%CI	<i>P</i> 值
术后 3 个月						
AMS	0.624	0.167	13.958	1.866	1.069~3.258	<0.001
leptin	0.352	0.102	11.894	1.422	1.249~1.618	<0.001
TG	0.908	0.258	12.382	2.479	2.351~2.614	<0.001
术后 6 个月						
AMS	0.746	0.186	16.089	2.109	1.265~3.515	<0.001
leptin	0.494	0.135	13.412	1.640	1.511~1.779	<0.001
TG	0.962	0.223	18.599	2.616	2.508~2.729	<0.001

为阴性样本,绘制 ROC 曲线显示,术后 6 个月 AMS、leptin、TG 及联合预测复发的 AUC 较术后 3 个月对应指标大。见表 4、图 1。

表 2 两组 AMS、leptin、TG 比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of AMS, leptin and TG between 2 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	AMS			leptin			TG		
		术前	术后 3 个月	术后 6 个月	术前	术后 3 个月	术后 6 个月	术前	术后 3 个月	术后 6 个月
复发组	19	65.32±18.61	46.49±12.37	59.85±18.42	12.66±3.59	15.92±2.24	16.65±2.14	1.85±0.36	2.11±0.29	2.39±0.35
未复发组	77	62.87±20.03	35.68±10.28	38.71±11.67	13.02±4.18	13.19±3.07	13.28±2.89	1.92±0.41	1.89±0.38	1.97±0.39
<i>t</i> 值		0.484	3.940	6.237	0.345	3.638	4.763	0.682	2.356	4.285
<i>P</i> 值		0.630	<0.001	<0.001	0.731	<0.001	<0.001	0.497	0.021	<0.001

表4 ROC分析结果

Table 4 ROC analysis results

指标	AUC	95%CI	cut-off 值	敏感度	特异度	P 值
术后3个月						
AMS	0.792	0.685~0.900	>40.20 U/L	0.737	0.713	<0.001
leptin	0.851	0.766~0.937	>14.20 μg/L	0.842	0.779	<0.001
TG	0.693	0.571~0.815	>1.99 mmol/L	0.790	0.623	<0.001
联合	0.901	0.826~0.975		0.847	0.857	<0.001
术后6个月						
AMS	0.853	0.738~0.968	>52.47 U/L	0.737	0.897	<0.001
leptin	0.886	0.809~0.962	>15.39 μg/L	0.842	0.792	<0.001
TG	0.826	0.717~0.936	>2.15 mmol/L	0.842	0.714	<0.001
联合	0.924	0.871~0.987		0.948	0.805	<0.001

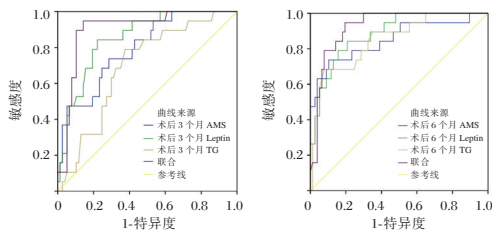


图1 ROC曲线

Figure 1 ROC curve

2.5 不同AMS、leptin、TG水平者复发率比较

由于术后6个月各指标预测复发的AUC较大,故以ROC分析各指标术后6个月cut-off值为分界,将患者分为AMS、leptin、TG高水平、低水平患者,结果显示,AMS、leptin、TG高水平者复发率高于低水平者,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表5。

表5 不同AMS、leptin、TG水平者复发率比较[n(%)]

Table 5 Comparison of recurrence rates of patients with different AMS, leptin and TG levels [n(%)]

指标	组别	n	复发	未复发	χ^2 值	P 值
AMS	高水平	22	14(63.64)	8(36.36)	31.072	<0.001
	低水平	74	5(6.76)	69(93.24)		
leptin	高水平	32	16(50.00)	16(50.00)	24.812	<0.001
	低水平	64	3(4.69)	61(95.31)		
TG	高水平	38	16(42.11)	22(57.89)	19.727	<0.001
	低水平	58	3(5.17)	55(94.83)		

3 讨论

胆囊结石合并胆总管多发结石术后复发是多种因素相互作用的结果,根据既往报道^[7],合并乳头旁憩室是复发的相关独立危险因素。本研究显示,除乳头旁憩室外,复发与未复发患者AMS水平有显著差异,将乳头旁憩室控制后,术后3个月、术后6个月AMS仍与复发相关。AMS是急性胰腺炎标志物,胆囊结石合并胆总管多发结石术后可因手术操作引起十二指肠乳头痉挛水肿,胆汁排泄受

阻而导致AMS的升高。目前普遍认为胆道感染、胆汁淤积是胆囊与胆总管结石形成的重要诱因胆汁淤积是形成结石的必要条件,胆盐和胆红素颗粒无法及时排出,发生梗阻,引起胆汁中酸性黏蛋白增多,导致胆红素钙沉淀和结石形成,因此检测AMS水平可反映胆道感染、胆汁淤积情况,从而反映结石复发的风险^[8]。ROC分析显示,术后6个月AMS预测复发的AUC大于术后3个月,并大于0.8,呈现出较高的预测价值,能为临床预测复发提供可靠参考。

Leptin对应激、脂质代谢、脂肪形成等均具有调节作用,并能影响胆囊收缩功能、胆汁蛋白成分等^[9]。本研究显示,与未复发患者比较,复发患者leptin水平升高,控制混杂因素后,仍与复发相关,提示leptin具有作为预测复发标志物的潜质。韩宇斌等^[10]报道,混合型结石复发率高于胆固醇结石与胆色素结石,血清leptin高于胆固醇结石与胆色素结石,佐证了leptin与结石的复发有关。胆囊结石合并胆总管结石患者,经过慢性下丘脑促炎反应或过度leptin刺激,使leptin受体信号通路被阻断,触发负反馈机制,导致leptin抵抗,造成leptin水平升高,影响胆固醇和胆汁酸合成分解,促使胆红素与碳酸钙表面钙离子合成胆红素钙络合物,从而导致结石形成和复发^[11]。术后3个月、术后6个月leptin预测复发的AUC分别为0.851、0.886,术后6个月稍高,更具临床参考价值。

TG是脂质的组成成分,可反映人体血液中脂肪酸含量^[12]。根据尼加提·塔西甫拉提等^[13]报道,与胆囊结石合并胆总管结石无复发患者相比,复发患者TG水平升高,本研究观点与之相似。在此基础上,本研究还发现,将混杂因素控制后,TG是复发相关独立危险因素,可作为预测复发的一个标志物。TG升高,可使胆汁中脂类平衡失常,加速胆汁中胆固醇的饱和,发生结晶、析出、结聚、成石,并抑制胆汁酸的分泌,介导胆汁淤积,诱发结石^[14]。且高TG状态下,胆汁中促成核因子和抗成核因子失衡,抑制了胆汁酸合成,并使胆汁中钙离子增多,黏多糖增多,更易产生结晶和结石^[15-16]。术后3个月TG预测复发的AUC为0.693,预测准确性有限,但至术后6个月TG预测复发的AUC为0.826,预测价值明显提高,说明检测术后6个月TG能为临床预测复发提供参考。另术后6个月AMS、leptin、TG联合预测复发的AUC达0.924,较任一单一指标高,所以建议联合检测AMS、leptin、TG对复发风险进行预测,为临床提供更准确的参考。

综上,胆囊结石合并胆总管多发结石术后复发患者 AMS、leptin、TG 升高,与复发密切相关,联合检测可作为预测复发的一个有效方案,为临床干预、随访管理等提供参考。

参考文献

[1] Borel F, Branche J, Baud G, et al. Management of Acute Gallstone Cholangitis after Roux-en-Y Gastric Bypass with Laparoscopic Transgastric Endoscopic Retrograde Cholangiopancreatography[J]. *Obes Surg*, 2019,29(2):747-748.

[2] Higa JT, Sahar N, Kozarek RA, et al. EUS-guided gallbladder drainage with a lumen-apposing metal stent versus endoscopic transpapillary gallbladder drainage for the treatment of acute cholecystitis (with videos)[J]. *Gastrointest Endosc*, 2019, 90(3):483-492.

[3] 马颖,罗艳丽,谢泽荣,等.腹腔镜胆囊切除术对胆囊结石合并急性胆囊炎患者血清 ICAM-1、IL-1、MPO 及淀粉酶水平的影响[J]. *肝胆外科杂志*, 2019,27(2):104-107.

[4] 邹旺生,陈健,张宏.胆汁及胆囊黏膜中骨桥蛋白、瘦素、内脂素及脂联素的表达及意义[J]. *中国现代医学杂志*, 2019,29(18):30-35.

[5] 肖亮,张庆卫,郭伟,等.血脂水平对患者输尿管结石发病影响的研究[J]. *微创泌尿外科杂志*, 2019,8(4):276-279.

[6] 中华医学会外科学分会胆道外科学组,中国医师协会外科医师分会胆道外科医师委员会.胆道镜在肝胆管结石病诊断与治疗中的应用专家共识(2019版)[J]. *中华消化外科杂志*, 2019,18(7):611-615.

[7] 董维峰,庞尔君,代镇岭. ERCP 联合 LC 治疗胆囊结石合

并胆总管结石临床效果及术后胆总管结石复发影响因素分析[J]. *临床误诊误治*, 2021,34(5):85-90.

[8] 杨瑞军,白筱晞.腹腔镜胆囊切除术治疗急性结石性胆囊炎的效果及对炎症因子及血清淀粉酶水平的影响[J]. *贵州医药*, 2020,44(4):579-580.

[9] 胡彦彬,王振东,赵强,等. FGF18 与骨性关节炎患者血清炎症细胞因子、脂肪细胞因子及骨关节严重程度的相关性[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2020,12(5):639-642.

[10] 韩宇斌,陈锦锋,张魁,等.检测胆结石成分对预测胆总管结石患者 ERCP 取石术后复发的应用价值[J]. *现代消化及介入诊疗*, 2019,24(8):912-914.

[11] Lee S, Lee A, Kweon OK, et al. Changes in pre- and postoperative serum leptin concentrations in dogs with gallbladder mucocele and cholelithiasis[J]. *BMC Vet Res*, 2019,15(1):215.

[12] 焦杨,丁石梅,张静,等.西格列汀联合格列齐特缓释片对 2 型糖尿病患者血糖、血脂及胰岛 β 细胞功能的影响[J]. *中华生物医学工程杂志*, 2020,26(6):541-545.

[13] 尼加提·塔西甫拉提,地力木热提·艾买提,张新峰,等.胆囊结石合并胆总管结石的相关危险因素分析[J]. *中华普通外科杂志*, 2020,35(8):633-636.

[14] Kiani Q, Farooqui F, Khan MS, et al. Association of Body Mass Index and Diet with Symptomatic Gall Stone Disease: A Case-Control Study[J]. *Cureus*, 2020,12(3):e7188.

[15] 游起军,邹夏芹,张仁虎,等.胆囊结石患者结石形态学特征及血浆脂多糖水平与急性胆源性胰腺炎的关系研究[J]. *现代生物医学进展*, 2019,19(16):3098-3101.

[16] 王超,蔡勇,杨荣权,等.泌尿系统结石成分谱及与血清 TG、TC 及 PGE2 水平的相关性[J]. *国际检验医学杂志*, 2020,41(6):690-692,697.

(上接第 1568 页)

[5] Lin A, Zhang J, Luo P. Crosstalk between the MSI status and tumor microenvironment in colorectal cancer [J]. *Front Immunol*, 2020,11:2039.

[6] Shia J. Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing for screening colorectal cancer patients at risk for hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome [J]. *J Mol Diagn*, 2008, 10: 293-300.

[7] Kawakami H, Zaanen A, Sinicrope FA. Microsatellite instability testing and its role in the management of colorectal cancer[J]. *Curr Treat Options Oncol*, 2015,16(7):30.

[8] Murphy KM, Zhang S, Geiger T, et al. Comparison of the microsatellite instability analysis system and the Bethesda panel for the determination of microsatellite instability in colorectal cancers[J]. *J Mol Diagn*, 2006,8(3):305-311.

[9] Leclerc J, Vermaut C, Buisine MP. Diagnosis of Lynch Syndrome and strategies to distinguish Lynch-related tumors from sporadic MSI/dMMR tumors [J]. *Cancers (Basel)*, 2021,13(3):467.

[10] Zheng K, Wan H, Zhang J, et al. A novel NGS-based microsatellite instability (MSI) status classifier with 9 loci for colorectal cancer patients[J]. *J Transl Med*, 2020,18(1):215.

[11] Middha S, Zhang L, Nafa K, et al. Reliable Pan-Cancer Microsatellite Instability Assessment by Using Targeted Next-Generation Sequencing Data [J]. *JCO Precis Oncol*, 2017, 2017:PO.17.00084.

[12] Pabla S, Andreas J, Lenzo FL, et al. Development and analytical validation of a next-generation sequencing based microsatellite instability (MSI) assay [J]. *Oncotarget*, 2019, 10(50):5181-5193.

[13] Li K, Luo H, Huang L, et al. Microsatellite instability: a review of what the oncologist should know [J]. *Cancer Cell Int*, 2020,20:16.

[14] Avila M, Meric-Bernstam F. Next-generation sequencing for the general cancer patient [J]. *Clin Adv Hematol Oncol*, 2019,17(8):447-454.

[15] 中国临床肿瘤学会,非小细胞肺癌专家委员会.二代测序技术在 NSCLC 中的临床应用中国专家共识(2020版)[J]. *中国肺癌杂志*, 2020, 23(9): 741-761.

[16] 张文新,黄传峰,孙楠,等.利用荧光 PCR-毛细管电泳法检测微卫星不稳定性检测国家参考品[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2020,12(5): 565-569+574.

LINC00634 基因在结直肠癌中表达及与预后的相关性分析

马甜甜¹ 柳家翠¹ 段怡平¹ 陈梁玥¹ 朱翠雯¹ 邹晓飒^{2*}

[摘要] 目的 探究 LINC00634 在结直肠癌(CRC)中的表达及其与临床病理特征、免疫浸润以及预后的关系。方法 从癌症基因组图谱(TCGA)数据库官方网站上下载 CRC 的 RNA-seq 数据及患者的临床病理信息,使用 Mann-Whitney U 检验分析 CRC 组织与正常组织之间的表达差异。分析 LINC00634 表达与患者临床病理特征的关系,利用 Kaplan-Meier 法分析 LINC00634 表达与患者预后的相关性。使用单因素和多因素 Cox 回归分析 LINC00634 表达与 CRC 患者临床预后关系。利用基因富集分析(GSEA)探索 LINC00634 在 CRC 中参与的信号途径。使用 R 4.0.2 软件评估 LINC00634 表达与肿瘤细胞免疫浸润丰度的相关性。结果 CRC 样本中 LINC00634 表达水平显著高于正常组织,差异有统计学意义($P<0.05$),LINC00634 的表达与患者的年龄、临床分期和淋巴结转移分期显著相关($\chi^2=4.326, 4.666, 6.513, P<0.05$)。LINC00634 高表达组患者的总体生存率显著低于低表达组患者,差异有统计学意义($P<0.05$)。多因素 Cox 回归分析显示,LINC00634 可以作为 CRC 患者的独立预后因素($HR=5.377, 95\%CI: 2.218\sim 13.031, P<0.05$)。GSEA 富集分析结果提示,LINC00634 主要参与 DNA 损伤修复、多条生化代谢通路,TGF 信号通路,ECM 受体相互作用通路等。LINC00634 表达与 CD8+T 细胞、CD4+记忆 T 细胞呈正相关($R>0, P<0.05$),而与嗜酸性粒细胞呈负相关($R<0, P<0.05$)。结论 LINC00634 在 CRC 中表达上调,参与多种癌症信号通路,可作为 CRC 患者的独立预后因素,是 CRC 新型分子标志物。

[关键词] CRC; LINC00634; 预后分析; 免疫浸润

Expression of LINC00634 gene in colorectal cancer and its correlation with prognosis

MA Tiantian¹, LIU Jiacui¹, DUAN Yiping¹, CHEN Liangyue¹, ZHU Cuiwen¹, ZOU Xiaofeng^{2*}

(1. Gene Diagnosis Center, Department of Radiology, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Hubei, Wuhan, China, 430071; 2. Scientific bureau, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Hubei, Wuhan, China, 430071)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the expression of LINC00634 gene in colorectal cancer (CRC) and its relationship with clinicopathological characteristics, immune infiltration, and prognosis. **Methods** RNA-seq data of (CRC) and clinicopathological information of patients were downloaded from the official website of The Cancer Genome Atlas (TCGA) database, and the expression difference between CRC tissues and normal tissues were analyzed by Mann-Whitney U test. The association between the expression of LINC00634 and the clinicopathological characteristics. The correlation between the expression of LINC00634 and the prognosis of patients was analyzed by Kaplan-Meier method. The relationship between the expression of

基金项目:国家自然科学基金(81472033、30901308);湖北省卫生健康科研基金资助(WJ2019M203);湖北省卫生和计划生育委员会联合基金项目(WJ2018H0028);湖北省卫生和计划生育委员会青年人才项目(WJ2015Q021);武汉市应用基础研究(2017060201010171);武汉大学中南医院科技创新培育基金(cxy2018031、cxy20160054);武汉大学大学生创新项目(MS2017045、S2018301747)

作者单位:1. 武汉大学中南医院基因诊断中心,湖北,武汉 430071

2. 武汉大学中南医院科研处,湖北,武汉 430071

*通信作者:邹晓飒, E-mail: xf_zou401@aliyun.com

LINC00634 and the clinical prognosis of patients with CRC was analyzed by univariate and multivariate Cox regression. Gene set enrichment analysis (GSEA) was used to explore the signaling pathway of *LINC00634* in CRC. The association between *LINC00634* expression and the abundance of tumor cell immune infiltration was evaluated using R 4.0.2 software. **Results** The expression level of *LINC00634* in CRC samples was significantly higher than that in normal tissues, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). The expression of *LINC00634* was significantly correlated with the patient's age, clinical stage and lymph node metastatic stage ($\chi^2=4.326, 4.666, 6.513, P<0.05$). The overall survival rate of patients with the high expression of *LINC00634* was significantly lower than that of patients with the low expression of *LINC00634*, the difference was statistically significant ($P<0.05$). Multivariate Cox regression analysis showed that *LINC00634* was an independent prognostic factor in patients with CRC (HR=5.377, 95% CI: 2.218~13.031, $P<0.05$). GSEA enrichment analysis results suggest that *LINC00634* is involved in DNA damage repair, TGF signaling pathway, ECM receptor interaction pathway and other pathways. The expression of *LINC00634* was positively correlated with CD8⁺T cells, CD4⁺ memory T cells ($R>0, P<0.05$), but negatively correlated with eosinophils ($R<0, P<0.05$). **Conclusion** *LINC00634* is upregulated in CRC and participates in a variety of cancer signaling pathways. *LINC00634* can be used as an independent prognostic factor for CRC patients and a new molecular marker for CRC.

[KEY WORDS] Colorectal cancer; *LINC00634*; Prognostic analysis; Immune infiltration

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是全球第四大常见肿瘤,占全世界癌症相关死亡人数的8.5%。腺癌为CRC中最常见的病理类型。CRC在我国的发病率不断上升,主要与经济发展带来的生活方式和环境的改变有关,如三高一低(高热量、高脂肪、高蛋白、低纤维)的西化生活方式^[1]。早期CRC患者的五年生存率可高达90%,由于缺乏早期诊断标志物,大多数CRC患者诊断时已处于晚期阶段,其五年生存率降至70.4%^[2]。因此,寻找CRC发生发展相关的分子标志物,对于CRC的诊断、治疗及预后有着重要的意义。人类基因转录组仅有少数RNA可作为蛋白质合成的模板,超过70%的RNA为非编码RNA,对于细胞蛋白质的合成及增殖分化起着非常重要的作用。其中,长度超过200个核苷酸的非编码RNA称为长链非编码RNA(Long non-coding RNA, lncRNA)。研究表明,许多lncRNA在各种癌症中表达失调,并与诊断和预后有关,例如,*lncRNA HOXA-AS2*在乳腺癌、胃癌等多种恶性肿瘤中均有异常表达^[3],*lncRNA DDX11-AS1*在肝癌、结直肠癌等多种恶性肿瘤中出现高表达^[4]。有研究表明,*LINC00634*通过miR-342-3p/Bcl2L1轴在食管鳞状细胞癌中发挥致癌基因的作用^[5],但是*LINC00634*在CRC发生发展中的分子机制及与预后的关系尚未阐明。本研究通过分析TCGA数据库,探索*LINC00634*在CRC中的表达、免疫浸润及预后价值。

1 资料与方法

1.1 数据的下载与处理

在TCGA数据库官方网站(<http://portal.gdc.cancer.gov/>)下载结直肠RNA-seq(level 3, HTSeq-FPKM)数据。其中包括CRC组织样本473例,正常结直肠组织样本41例。对基因表达数据进行归一化处理,并Log₂转化后用于后续分析。在TCGA数据库上下载并提取CRC患者的临床病理特征信息,删除临床信息缺失的样本。

1.2 CRC组织与正常组织之间的差异表达基因

使用R 4.0.2软件来筛选差异基因。将得到的差异基因绘制热图和火山图。

1.3 *LINC00634*表达与临床病理特征和预后的联系

根据*LINC00634*在CRC患者中表达值得中位数,将患者分为两组。利用卡方检验分析*LINC00634*与CRC患者临床特征的关系。利用Kaplan-Meier法比较两组之间总体生存的差异。使用Cox回归分析*LINC00634*的预后价值。

1.4 基因富集分析

采用基因富集分析(gene set enrichment analysis, GSEA)分析*LINC00634*在CRC发生发展中参与的信号通路。从Broad Institute网站(<http://software.broadinstitute.org/gsea/index.jsp>)下载GSEA分析软件GSEA 4.1.0,分析通路来自Molecular Signature Database(MsigDB)数据库中的c2.cp.kegg.v7.0.symbols.gmt数据集。采用加权富集法分析,

随机组合次数设为 1 000 次,所有其他参数均按默认值设置。 P 值小于 0.05 和错误发现率(false discovery rate, FDR)小于 0.05 的基因集作为显著富集的基因。

1.5 免疫浸润分析

使用 R 4.0.2 软件评估 *LINC00634* 表达与肿瘤细胞免疫浸润丰度的相关性。将 473 例肿瘤样本以中位数分为高、低表达组分析 *LINC00634* 对免疫系统微环境的影响。通过基于基因表达的反卷积算法 CIBERSORT (<http://cibersort.stanford.edu/>) 评估各组之间基因表达的相对变化。

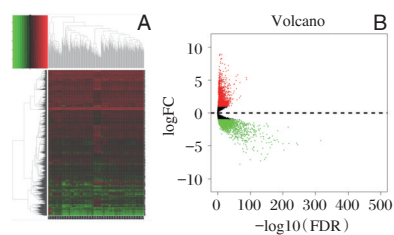
1.6 统计学分析

采用软件 SPSS 25.0 进行数据分析;计数资料以 $n(\%)$ 表示,行 χ^2 检验;Wilcoxon 秩和检验,将 CRC 患者的年龄、性别、TNM 分期等临床指标进行量化赋值,利用 Cox 比例风险回归模型进行单因素和多因素分析;生存分析采用 KM 法; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 表达差异基因

筛选差异基因后共得到 3 314 个差异表达基因(图 1),其中包含 1 933 个上调基因和 1 381 个下调基因。



注:A 为热图;B 为火山图;红色,表达上调;绿色,表达下调。

图 1 差异表达基因

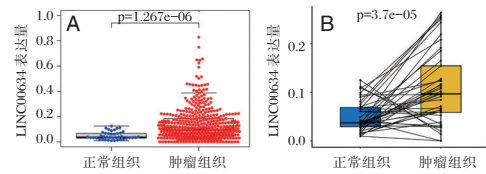
Figure 1 Differentially expressed genes

2.2 *LINC00634* 在 CRC 和正常组织中的表达

CRC 中 *LINC00634* 的表达水平与正常组织相比,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 2。

2.3 *LINC00634* 表达与 CRC 患者临床病理特征的联系

LINC00634 的表达水平与患者的年龄、临床分期和淋巴结转移显著相关($P < 0.05$),见表 1。临床 II 期患者 *LINC00634* 的表达水平与 III 期患者相比,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 3A。发生淋巴



注:A 为 *LINC00634* 在结直肠正常组织和 CRC 组织中的表达差异比较;B 为 41 对配对的 CRC 组织中 *LINC00634* 的表达比较。

图 2 *LINC00634* 在 CRC 组织中的表达分析

Figure 2 Analysis of *LINC00634* expression in colorectal cancer tissues

表 1 *LINC00634* 表达与 CRC 患者临床特征的相关性分析 [$n(\%)$]

Table 1 Correlation analysis between *LINC00634* expression and clinical characteristics of colorectal cancer patients [$n(\%)$]

临床特征		低表达例数 (%)	高表达例数 (%)	χ^2 值	P 值
年龄(岁)	≤ 65	66(18.30)	86(20.88)	4.326	0.038
	> 65	128(31.70)	108(29.12)		
性别	男	101(28.10)	103(24.48)	0.041	0.839
	女	93(21.90)	91(25.52)		
临床分期	I + II	123(31.19)	102(26.80)	4.666	0.031
	III + IV	71(18.81)	92(23.20)		
原发肿瘤分期	T ₁ +T ₂	41(11.86)	32(6.96)	1.367	0.242
	T ₃ +T ₄	153(38.14)	162(43.04)		
远处转移	M ₀	163(43.04)	164(41.49)	0.019	0.889
	M ₁	31(6.06)	30(8.51)		
淋巴结转移分期	N ₀ +N ₁	170(43.56)	151(38.92)	6.513	0.011
	N ₂ +N ₃	24(6.44)	43(11.08)		

结转移患者组 *LINC00634* 表达水平与未发生远处转移组相比,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 3B~D。

2.4 *LINC00634* 表达与 CRC 患者预后的关系

高表达 *LINC00634* 组中患者的总体生存率低于低表达组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 4。

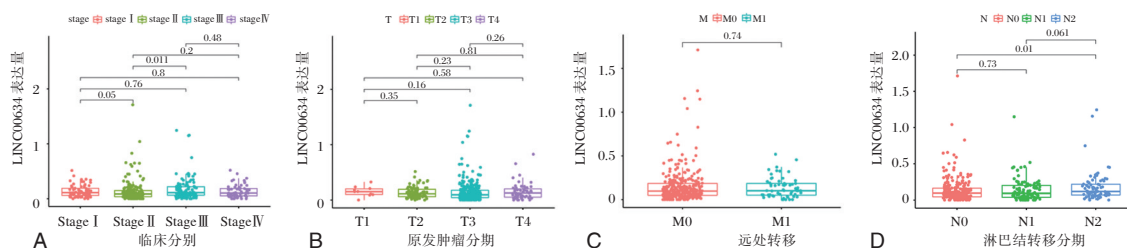
年龄、Stage 分期、T 分期、M 分期、N 分期以及 *LINC00634* 均可作为预后因素,多因素 Cox 回归分析提示,年龄、T 分期和 *LINC00634* 可以作为 CRC 患者的独立预后因素($P < 0.05$)。见表 2。

2.5 GSEA 功能富集分析

使用 GSEA 功能富集进一步了解 *LINC00634* 在 CRC 发生发展过程中参与的信号通路,富集结果。见图 5。

2.6 *LINC00634* 表达与免疫浸润

LINC00634 表达与 CD8+T 细胞、CD4+记忆 T 细胞、M1 型巨噬细胞和静止型 NK 细胞正相关($R > 0, P < 0.05$),与嗜酸性粒细胞呈负相关($R < 0,$



注:A-D为临床分期、原发肿瘤分期、远处转移、淋巴结转移分期与LINC00634表达量相关性分析。

图3 LINC00634表达量与CRC患者临床病理特征相关性分析

Figure 3 Correlation analysis between LINC00634 expression and clinicopathological characteristics of colorectal cancer patients

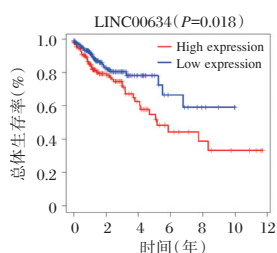


图4 LINC00634的表达与CRC患者预后的关系

Figure 4 Expression and prognosis of LINC00634 in patients with colorectal cancer

表2 单因素和多因素Cox回归分析

Table 2 Univariate and multivariate Cox regression analysis

因素	单因素Cox分析			多因素Cox分析		
	HR	95%CI	P值	HR	95%CI	P值
年龄	1.030	1.008~1.053	0.008	1.043	1.021~1.067	<0.05
性别	1.112	0.700~1.768	0.653	0.959	0.602~1.531	0.863
stage分期	2.256	1.732~2.938	<0.05	1.298	0.598~2.816	0.509
T分期	2.852	1.802~4.515	<0.05	1.789	1.024~3.128	0.041
M分期	4.450	2.745~7.214	<0.05	2.495	0.838~7.431	0.101
N分期	2.019	1.541~2.645	<0.05	1.218	0.763~1.943	0.409
LINC00634	3.367	1.563~7.252	0.002	5.377	2.218~13.031	<0.05

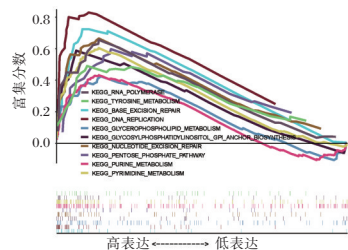


图5 GSEA功能富集分析

Figure 5 GSEA functional enrichment analysis

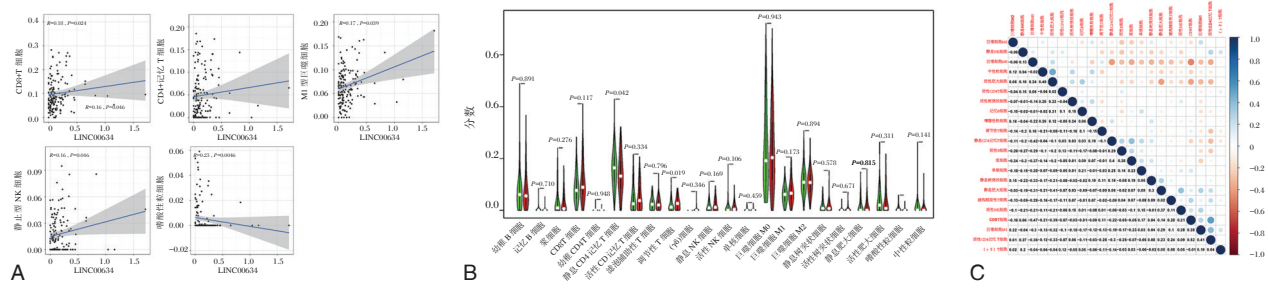
$P < 0.05$), 见图6A。调节性T细胞在LINC00634高表达组中含量增加, 而CD4+记忆T细胞和嗜酸性粒细胞含量减少, 见图6B。相关性热图显示, 在CRC中, CD8+T细胞与M0型巨噬细胞存在显著的正相关性, 而与CD4+记忆T细胞存在显著的负相关性。见图6C。

3 讨论

CRC是一种发病率和死亡率仅次于肺癌、胃癌、肝癌的恶性肿瘤, 遗传和环境因素对CRC的发生发展有重要的影响^[6]。CRC早期无症状, 大多数患者就诊时已是晚期, 治疗及预后效果不佳。检测外周血中的循环肿瘤细胞及其他与癌症有关的肿瘤标志物成本相对较低、侵入性更少, 有利于CRC的早期诊断^[7]。已有研究表明mSEPT9、环状RNA等在CRC患者血浆中特异性表达, 可作为肿瘤标志物用于CRC的筛查和早期诊断^[8-10]。

本研究结合多种生物信息学方法, 发现LINC00634在CRC组织中表达上调, 其表达水平与患者的年龄、临床分期和淋巴结转移显著相关。KEGG通路分析表明, 上调的LINC00634主要参与了DNA复制, 核苷酸切除修复, 碱基切除修复, 嘌呤、嘧啶核苷酸代谢, 磷酸戊糖途径, TGF信号通路, ECM受体相互作用通路等通路。DNA损伤修复中核苷酸切除修复与碱基切除修复为重要的修复途径, 其通路中基因表达改变及基因功能的缺失与多种肿瘤的发生发展密切相关^[11]。肿瘤的发生发展涉及大量的病理生理及生化过程, 异常的代谢途径, 如嘌呤核苷酸代谢可通过调节信号转导通路影响基因和蛋白的表达, 促进细胞恶性转化、侵袭和转移^[12], TGF信号通路参与多种疾病的发生, 包括肝癌、乳腺癌等, ECM1是一种分泌性糖蛋白, 与肿瘤发生、血管生成和表皮分化等密切相关, 通过与颗粒蛋白前体(PGRN)相互作用参与多种肿瘤的发生发展^[13]。上调的LINC00634可能通过上述途径在CRC发生发展中发挥作用, 对癌症的不良预后产生影响。

同时, 本研究揭示了LINC00634表达与CRC免疫浸润水平之间的联系。不同免疫细胞的基因



注:A为LINC00634表达与免疫浸润水平之间的相关性;B为肿瘤样品中LINC00634高表达组和低表达组中22种免疫亚型的变化比例;C为肿瘤样品中22种免疫浸润细胞的相关性热图。

图6 LINC00634表达与免疫浸润

Figure 6 Expression of LINC00634 and immune infiltration

标志物与LINC00634表达之间的关系暗示了LINC00634在调控结直肠癌免疫微环境中的重要意义。结果显示LINC00634表达与CD8+T细胞、CD4+记忆T细胞、M1型巨噬细胞和静止型NK细胞正相关,而与嗜酸性粒细胞呈负相关。这揭示LINC00634可能通过调节T细胞与NK细胞进而影响CRC。研究表明肿瘤的转移与免疫系统相关,T细胞免疫功能失衡的患者更容易发生转移^[14],转移的结肠癌患者体内Th17细胞增加,可以促进肿瘤细胞对免疫系统的耐受^[15]。可以推断,LINC00634过表达可以促进T细胞与NK细胞的免疫反应和浸润,进而影响CRC的转移与预后。

综上所述,LINC00634在CRC组织中表达显著上调,调节了CRC发生发展过程中免疫浸润细胞及各种途径中的蛋白质,并与CRC患者的恶性进展相关,提示CRC患者的不良总体生存预后,可以作为CRC患者的独立预后因素。LINC00634有望成为CRC新型分子标志物和肿瘤治疗的分子靶点。

参考文献

[1] Wu C, Li M, Meng H, et al. Analysis of status and countermeasures of cancer incidence and mortality in china [J]. Sci China Life Sci, 2019, 62(5): 640-647.
 [2] Miller KD, Siegel RL, Lin CC, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2016 [J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(4): 271-289.
 [3] Wang J, Su Z, Lu S, et al. Lncrna hoxa-as2 and its molecular mechanisms in human cancer [J]. CA Cancer J Clin, 2018, 485: 229-233.
 [4] Feng Y, Wu M, Hu S, et al. Lncrna ddx11-as1: A novel oncogene in human cancer [J]. Hum Cell, 2020, 33(4): 946-953.

[5] Zhang X, Feng Y, Gao Y, et al. Long noncoding rna linc00634 functions as an oncogene in esophageal squamous cell carcinoma through the mir-342-3p/bcl2l1 axis [J]. Technol Cancer Res Treat, 2020, 19: 1533033820928508.
 [6] Thanikachalam K, Khan G. Colorectal cancer and nutrition [J]. Nutrients, 2019, 11(1): 164.
 [7] Danese E, Montagnana M, Lippi G. Circulating molecular biomarkers for screening or early diagnosis of colorectal cancer: Which is ready for prime time? [J]. Ann Transl Med, 2019, 7(21): 610.
 [8] Yau TO, Wu CW, Dong Y, et al. MicroRNA-221 and microRNA-18a identification in stool as potential biomarkers for the non-invasive diagnosis of colorectal carcinoma [J]. Br J Cancer, 2014, 111(9): 1765-1771.
 [9] 王家立, 叶孟. 环状RNA的功能及其在结直肠癌中的作用 [J]. 生命的化学, 2020, 40(4): 520-527.
 [10] 谢英超, 周春莲, 徐伟文. ct DNA检测在结直肠癌临床诊疗中的应用进展 [J]. 分子诊断与治疗杂志, 2019, 11(2): 73-78+90.
 [11] Lu X, Chen F, Liu X, et al. Detection and clinical significance of DNA repair gene ercc8 tag snps in gastric cancer [J]. Turk J Gastroenterol, 29(4): 392-396.
 [12] Rocha R, Torres Á, Ojeda K, et al. The adenosine a1receptor regulates differentiation of glioblastoma stem-like cells to endothelial cells under hypoxia [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(4): 1228.
 [13] Li M, Wu P, Yang Z, et al. Mir-193a-5p promotes pancreatic cancer cell metastasis through srsf6-mediated alternative splicing of ogdhl and ecm1 [J]. Am J Cancer Res, 2020, 10(1): 38-59.
 [14] 李宝龙, 刘轲, 计鹏飞, 等. 结肠癌患者肿瘤微环境中T细胞亚群与肿瘤细胞转移的关系 [J]. 中国现代医学杂志, 2017, 27(9): 87-90.
 [15] Carethers JM, Murali B, Yang B, et al. Influence of race on microsatellite instability and cd8+t cell infiltration in colon cancer [J]. PloS One, 2014, 9(6): e100461.

AFP、AFP-L3%、DCP与GP73联合检测辅助诊断肝炎、肝癌临床价值

潘俊均 黄仙圣 岑伟明 黄丽霞 杜华 邓沛汶 隋洪*

[摘要] 目的 探究甲胎蛋白(AFP)、AFP-L3异质体比率(AFP-L3%)、异常凝血酶原(DCP)与高尔基体蛋白73(GP73)联合诊断肝炎、肝癌的价值。方法 选取东莞康华医院84例慢性乙型肝炎(CHB)患者作为CHB组,84例原发性肝癌(PHC)患者作为PHC组,另选40例健康志愿者作为对照组。检测对比3组血清AFP、AFP-L3%、DCP、GP73水平,分析各指标临床应用价值。结果 PHC组血清AFP、AFP-L3%、DCP、GP73水平>CHB组>对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);血清AFP($r=0.741, 0.779$)、AFP-L3%($r=0.785, 0.810$)、DCP($r=0.706, 0.728$)、GP73($r=0.812, 0.839$)与HBV-DNA、LSM呈正相关($P<0.05$);血清AFP、AFP-L3%、DCP、GP73联合诊断CHB/PHC的AUC分别为0.912、0.938,具有较高诊断效能($P<0.05$);PHC组治疗后与治疗前血清AFP、AFP-L3%、DCP、GP73水平差值(绝对值)均大于CHB组,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 AFP、AFP-L3%、DCP与GP73联合检测可为临床诊断CHB、PHC提供辅助参考。

[关键词] 慢性乙型肝炎;原发性肝癌;甲胎蛋白;AFP-L3异质体比率;异常凝血酶原;高尔基体蛋白73

The clinical value of combined detection of AFP, AFP-L3%, DCP and GP73 in assisting diagnosis of hepatitis and liver cancer

PAN Junjun, HUANG Xiansheng, CEN Weiming, HUANG Lixia, DU Hua, DENG Peiwen, SUI Hong*
(Department of Clinical Laboratory, Dongguan Kanghua Hospital, Dongguan, Guangdong China, 523000)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the value of Alpha fetoprotein (AFP), ratio of AFP-L3 isoform (AFP-L3%), Des-gamma-carboxyprothrombin (DCP) and Golgi protein 73 (GP73) in the diagnosis of hepatitis and liver cancer. **Method** A total of 84 patients with chronic hepatitis B (CHB) in Dongguan Kanghua Hospital were selected as the CHB group, 84 patients with primary carcinoma of the liver (PHC) as the PHC group, and 40 healthy volunteers were selected as the control group. The levels of serum AFP, AFP-L3%, DCP, and GP73 in the three groups were tested and compared, and the clinical application value of each indicator was analyzed. **Results** The levels of serum AFP, AFP-L3%, DCP, GP73: the PHC group > the CHB group > the control group ($P<0.05$). Serum AFP, AFP-L3%, DCP, GP73 were positively correlated with HBV-DNA and LSM ($P<0.05$). The AUC of the combination of serum AFP, AFP-L3%, DCP, and GP73 for CHB and PHC diagnosis was 0.912 and 0.938, respectively, which had high diagnostic efficiency. The difference (absolute value) of serum AFP, AFP-L3%, DCP, GP73 levels after treatment and before treatment in the PHC group was greater than that in the CHB group ($P<0.05$). **Conclusion** The combined detection of AFP, AFP-L3%, DCP and GP73 can provide an auxiliary reference for clinical diagnosis of CHB and PHC.

[KEY WORDS] Chronic hepatitis B; Primary carcinoma of the liver; Alpha fetoprotein; Ratio of AFP-L3 isoform; Des-gamma-carboxyprothrombin; Golgi protein 73

基金项目:东莞市社会科学发展(重点)项目(201950715059175)

作者单位:东莞康华医院检验科,广东,东莞 523000

*通信作者:隋洪, E-mail: 1511059224@qq.com

慢性乙型肝炎(Chronic hepatitis B, CHB)为临床最常见慢性疾病之一,报道显示,被确诊的CHB患者中有10%~20%可进一步发展为肝硬化、甚至原发性肝癌(Primary carcinoma of the liver, PHC)^[1-2]。PHC具有恶性程度高、进展速度快、侵袭性强、预后较差的特征,我国PHC病死率约为50%,早期诊断、治疗一直被认为是改善PHC患者预后的关键^[3]。目前临床公认诊断PHC的血清学标志物为甲胎蛋白(Alpha feto protein, AFP),但其在CHB及其他慢性肝脏疾病患者血清中也存在不同程度升高。近年来临床一直致力于PHC诊断标志物的研究,AFP-L3异质体比率(ratio of AFP-L3 isoform, AFP-L3%)、异常凝血酶原(Des-gamma-carboxyprothrombin, DCP)、高尔基体蛋白73(Golgi protein 73, GP73)等相继被报道,但各指标单独诊断的效能均不尽理想^[4-5]。本研究尝试探究AFP、AFP-L3%、DCP与GP73联合检测辅助诊断肝炎、肝癌临床价值。报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2020年1月至2020年12月东莞康华医院84例CHB患者作为CHB组,纳入标准:①符合CHB诊断标准^[6];②首次确诊;③自主行为能力良好,无沟通交流障碍;④患者知晓本研究,已签署同意书。选取与CHB组相近年龄段的84例PHC患者作为PHC组,纳入标准:①符合PHC^[7]诊断标准;②首次确诊;③自主行为能力良好,无沟通交流障碍;④患者知晓本研究,已签署同意书。另选与CHB组相近年龄段的40例健康志愿者作为对照组,纳入标准:①均于本院进行全身体检,未发现明显异常;②自主行为能力良好,无沟通交流障碍;③知晓本研究,已签署同意书;排除标准:①有肝脏手术史、其他肝脏疾病患者;②合并其他原发恶性肿瘤者;③严重心脑血管疾病、肺肾功能障碍者;④血液系统疾病患者;⑤肺部感染、泌尿系感染等疾病患者;⑥长期服用免疫抑制剂、激素类药物者;⑦入组前已接受相关治疗的CHB、PHC患者。3组性别、年龄、体质量指数(Body mass index, BMI)比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表1。

1.2 方法

指标检测方法:采集所有研究对象入组当天外周静脉血5 mL,离心处理后取血清,采用磁微粒

表1 3组一般资料比较 $[(\bar{x}\pm s), n(\%)]$

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

项目	PHC组 (n=84)	CHB组 (n=84)	对照组	χ^2/F 值	P值
性别(男/女)	58/26	53/31	26/14	0.678	0.712
年龄(岁)	57.63±9.81	55.86±8.45	53.64±8.16	2.735	0.067
BMI(kg/m ²)	24.38±2.29	23.91±2.36	23.63±2.05	1.756	0.175
合并症 高血压	25(29.76)	20(23.81)	-	0.759	0.384
冠心病	16(19.05)	10(11.90)	-	1.638	0.201
高脂血症	31(36.90)	25(29.76)	-	0.964	0.326
糖尿病	8(9.52)	12(14.29)	-	0.908	0.341

注:“-”表示无相关数据。

化学发光免疫分析法测定血清AFP、AFP-L3%、DCP水平,试剂盒购自北京百奥莱博科技有限公司。采用电化学发光法检测GP73水平,试剂盒购自美国R&D公司。采用美国应用生物系统公司生产的7300型实时荧光定量PCR系统进行基因扩增,测定HBV-DNA载量。入组当天采用法国Echosens公司生产的肝脏瞬时弹性扫描检测仪测定肝脏硬度值(Liver stiffness measure, LSM)。

治疗方法:CHB组患者入院后参照《慢性乙型肝炎防治指南(2019年版)》^[6]进行治疗,PHC组患者入院后参照《原发性肝癌诊疗规范(2017年版)》^[7]进行治疗,均于治疗3个月后再测定血清各指标水平。

1.3 统计学方法

数据处理采用SPSS 22.0软件;计数资料以 $n(\%)$ 描述,采用 χ^2 检验;计量资料以 $(\bar{x}\pm s)$ 描述,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两组间比较采用SNK- q 检验,两组间比较采用独立样本 t 检验;相关性分析采用Pearson相关系数模型,诊断效能分析采用受试者工作特征(ROC)曲线,获取曲线下面积(AUC),不同诊断方案间曲线下面积比较采用DeLong检验,联合诊断实施Logistic二元回归拟合,获得返回诊断概率 $\text{logit}(p)$,将其作为独立检验变量进行ROC分析; $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3组血清指标比较

3组血清AFP、AFP-L3%、DCP、GP73水平比较:PHC组>CHB组>对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表2。

2.2 CHB组、PHC组HBV-DNA、LSM比较

与CHB组比较,PHC组HBV-DNA、LSM均较高,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表3。

表2 3组血清指标水平对比 $[(\bar{x} \pm s), n(\%)]$

Table 2 Comparison of serum levels in the 3 groups

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

组别	n	AFP (ng/mL)	AFP-L3% (%)	DCP (ng/mL)	GP73 (μg/L)
PHC组	84	92.65±41.18 ^a	16.53±5.12 ^a	11.73±5.82 ^a	155.67±32.68 ^a
CHB组	84	53.62±30.57 ^a	10.46±2.38 ^a	6.37±2.35 ^a	96.74±27.54 ^a
对照组		15.63±8.45	8.17±1.65	4.06±1.12	55.69±16.78
F值		79.189	91.754	62.114	193.242
P值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与对照组对比,^a $P<0.05$ 。

表3 CHB组、PHC组HBV-DNA、LSM对比 $(\bar{x} \pm s)$

Table 3 Comparison of HBV-DNA and LSM between CHB group and PHC group $(\bar{x} \pm s)$

组别	n	HBV-DNA(IgIU/mL)	LSM(kPa)
PHC组	84	5.09±0.73	11.32±1.26
CHB组	84	3.85±0.61	7.64±1.13
t值		11.946	19.928
P值		<0.001	<0.001

2.3 血清AFP、AFP-L3%、DCP、GP73与HBV-DNA、LSM的关系

CHB、PHC患者血清AFP、AFP-L3%、DCP、GP73与HBV-DNA、LSM间呈正相关($P<0.05$)。见表4。

表4 血清AFP、AFP-L3%、DCP、GP73与HBV-DNA、LSM的关系

Table 4 The relationship between serum AFP, AFP-L3%, DCP, GP73 and HBV-DNA, LSM

指标	HBV-DNA		LSM	
	r值	P值	r值	P值
AFP	0.741	<0.001	0.779	<0.001
AFP-L3%	0.785	<0.001	0.810	<0.001
DCP	0.706	<0.001	0.728	<0.001
GP73	0.812	<0.001	0.839	<0.001

2.4 血清AFP、AFP-L3%、DCP、GP73诊断CHB、PHC的价值

绘制血清AFP、AFP-L3%、DCP、GP73诊断CHB、PHC的ROC曲线,结果显示各指标诊断CHB、

PHC的AUC均>0.7,各指标联合诊断CHB、PHC的AUC分别为0.912、0.938($P<0.05$)。见表5、图1。

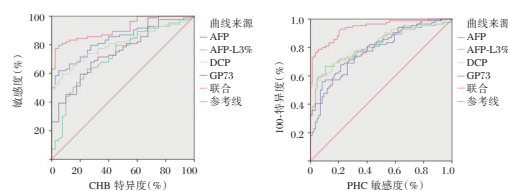


图1 各指标诊断CHB、PHC的ROC

Figure 1 ROC of CHB and PHC diagnosed by various indicators

2.5 CHB组、PHC组治疗前后血清AFP、AFP-L3%、DCP、GP73水平变化情况

PHC组治疗后与治疗前血清AFP、AFP-L3%、DCP、GP73水平差值(绝对值)均大于CHB组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表6。

表6 CHB组、PHC组治疗后血清AFP、AFP-L3%、DCP、GP73水平与治疗前差值比较 $(\bar{x} \pm s)$

Table 6 Comparison of serum AFP, AFP-L3%, DCP, and GP73 levels after treatment in CHB group and PHC group with the difference before treatment $(\bar{x} \pm s)$

组别	n	AFP差值 (ng/mL)	AFP-L3% 差值(%)	DCP差值 (ng/mL)	GP73差值 (μg/L)
PHC组	84	43.18±21.79	3.24±2.35	2.95±1.38	52.97±21.63
CHB组	84	30.81±13.16	1.57±0.81	1.46±0.62	38.64±17.19
t值		4.454	6.158	9.027	4.754
P值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

3 讨论

特异性血清分子诊断标记物是当前PHC筛查的重要手段,已广泛应用于临床工作中,且随着临床对PHC发生机制认识的不断深入,越来越多的PHC相关分子被认识并有望成为诊断和预后判断的标志物^[5]。

本研究发现,PHC患者血清AFP明显高于CHB患者,且均高于健康人群,与国内相关研究^[9-10]

表5 各指标诊断CHB、PHC的价值分析

Table 5 Analysis of the value of each index in the diagnosis of CHB and PHC

	指标	AUC	95%CI	Z值	截断值	敏感度(%)	特异度(%)	P值
诊断CHB	AFP	0.838	0.761-0.898	9.719	>41.79	61.92	95.03	<0.001
	AFP-L3%	0.725	0.637-0.801	4.630	>9.70	63.10	74.98	<0.001
	DCP	0.805	0.724-0.870	8.007	>5.46	59.52	92.51	<0.001
	GP73	0.754	0.669-0.827	5.671	>71.86	67.86	72.50	<0.001
	联合预测	0.912	0.847-0.955	16.731		77.39	97.52	<0.001
诊断PHC	AFP	0.784	0.714-0.844	8.078	>90.47	56.02	91.67	<0.001
	AFP-L3%	0.814	0.747-0.870	9.352	>13.41	66.68	89.31	<0.001
	DCP	0.826	0.760-0.880	10.167	>9.03	69.05	83.34	<0.001
	GP73	0.789	0.719-0.848	8.471	>117.34	71.43	72.62	<0.001
	联合预测	0.938	0.890-0.969	24.528		78.62	94.05	<0.001

结果一致,进一步证实 AFP 与 CHB、PHC 的发生发展密切相关。AFP 为传统血清肿瘤标志物,正常人体内几乎呈无表达状态,而在诊断 CHB 等其他良性肝病时表达却呈上升趋势,且在 80%左右的肝癌患者血清中明显升高,但其诊断敏感度较低,常与其他方法联合应用^[11]。AFP-L3%也是近年来发现的肝脏肿瘤相关标志物,既往报道^[12]显示,肝细胞肝癌患者血清 AFP-L3%水平明显高于慢性肝炎患者,其与 AFP 联合可提高对肝细胞肝癌的诊断价值。本研究发现,PHC 患者、CHB 患者的血清 AFP-L3%血清水平均处于明显高表达状态,且前者更高,与上述研究结果一致,进一步证实 AFP-L3%水平变化参与 CHB、PHC 的患病机制。此外,本研究还显示 PHC 患者血清 DCP、GP73 水平明显高于 CHB 患者,CHB 患者明显高于健康人群。其中 DCP 是肝脏产生的无凝血活性的异常凝血酶原,有学者指出,肝癌细胞内相应酶羧化异常,引起维生素 K 摄取障碍,导致 DCP 形成,其水平升高可刺激肝癌细胞浸润、转移等^[13]。GP73 为高尔基体 II 型跨膜蛋白,其表达水平受炎症因子调控,在健康人肝细胞中 GP73 表达量很少,但当肝细胞受炎症刺激发生损伤时可促进 GP73 的合成、分泌增加,并进入血液^[14]。本研究通过相关性分析,发现 CHB、PHC 患者的血清 AFP、AFP-L3%、DCP、GP73 与 HBV-DNA、LSM 间均存在明显正相关关系,其中 HBV-DNA 水平越高,提示肝脏内 HBV 活跃性越高,引起的免疫应答反应越剧烈,损伤肝细胞越严重^[15];LSM 是反映肝纤维化程度的指标,且值越大表明肝纤维化程度越高,肝细胞损伤越严重^[16]。由此可见血清 AFP、AFP-L3%、DCP、GP73 与肝细胞损伤程度密切相关,进一步证实各指标参与 CHB、PHC 的患病机制。

基于上述研究,研究尝试采用 ROC 曲线发现各指标联合具有较高诊断效能,可为临床诊断 CHB、PHC 提供更准确辅助参考,且血清 AFP、AFP-L3%、DCP、GP73 不仅能应用于 CHB、PHC 的诊断,且在评估 CHB、PHC 治疗情况方面具有一定潜力,或可能成为评估疗效的指标。

综上所述,血清 AFP、AFP-L3%、DCP、GP73 可作为辅助诊断 CHB、PHC 的标志物,各指标联合在 CHB、PHC 的诊断方面具有较高应用价值,且在评估 CHB、PHC 治疗情况方面具有一定潜力。但本研究仍存在一定不足,如为探究血清 AFP、AFP-L3%、DCP、GP73 联合鉴别诊断 CHB 和 PHC 时的应用效能,未来工作中仍需进一步探讨。

参考文献

- [1] Kanda T, Goto T, Hirotsu Y, et al. Molecular Mechanisms Driving Progression of Liver Cirrhosis towards Hepatocellular Carcinoma in Chronic Hepatitis B and C Infections: A Review [J]. *Int J Mol Sci*, 2019,20(6):1358.
- [2] 隋佳,于梦,朱淑珍,等. 外周血细胞因子在慢性乙型肝炎的治疗效果判断的价值研究[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2019,11(5):408-413.
- [3] 崔琦,董延娥,霍云龙,等. 血清 AFP、GP73、SF、DCP 联合检测在原发性肝癌诊断中的应用[J]. *中国医科大学学报*, 2019,48(5):434-436.
- [4] 童正喜,张克昌,郑奇. 血清高尔基体糖蛋白 73、甲胎蛋白、CHI3L1 在肝癌中的诊断价值及与患者预后的关系[J]. *热带医学杂志*, 2020,20(6):779-782+786.
- [5] 马碧蓝,甄广怀,司徒瑞儒. AFU、AFP-L3%和 GP73 在原发性肝癌中的应用价值[J]. *检验医学与临床*, 2020,17(5):607-609.
- [6] 王贵强,段钟平,王福生,等. 慢性乙型肝炎防治指南(2019 年版)[J]. *实用肝脏病杂志*, 2020,23(1):9-32.
- [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] 王凯,高帅. 原发性肝癌的分子诊断标记物研究进展[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2020,12(1):1-5+38.
- [9] 孙艳华,夏瑞雪,王宁,等. AFP-L3、AFP、GP73、ALP 联合检测对原发性肝癌的诊断价值研究[J]. *肝脏*, 2020,25(1):63-66.
- [10] 吕春燕,裴豪,戴亚萍,等. 血清 AFP、AFP-L3 及 PIVKA-II 联合检测在原发性肝癌诊断中的价值[J]. *标记免疫分析与临床*, 2019,26(7):1159-1162.
- [11] 吕松林. 血清 GPC3、GP73、AFP 水平联合检测对肝细胞肝癌患者诊断效能的影响[J]. *现代诊断与治疗*, 2019,30(7):1128-1129.
- [12] 张明跃,陈浩. AFP、DCP 和 AFP-L3%联合检测对肝细胞肝癌的诊断价值[J]. *癌症进展*, 2019,17(6):719-721.
- [13] Liu Z, Wu M, Lin D, et al. Des-gamma-carboxyprothrombin is a favorable biomarker for the early diagnosis of alfa-fetoprotein-negative hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma[J]. *J Int Med Res*, 2020,48(2):300060520902575.
- [14] 何静,程义壮,姜徽,等. 血清 AFP、AFP-L3 及 GP73 在原发性肝癌诊断和鉴别诊断中的应用评价[J]. *标记免疫分析与临床*, 2020,27(2):190-194.
- [15] Testoni B, Lebossé F, Scholtes C, et al. Serum hepatitis B core-related antigen (HBcrAg) correlates with covalently closed circular DNA transcriptional activity in chronic hepatitis B patients[J]. *J Hepatol*, 2019,70(4):615-625.
- [16] Kong Y, Sun Y, Zhou J, et al. Early steep decline of liver stiffness predicts histological reversal of fibrosis in chronic hepatitis B patients treated with entecavir[J]. *J Viral Hepat*, 2019,26(5):576-585.

PSP、IL-10、CCL-17在新生儿早发型GBS败血症中的水平变化及临床意义

王佳丽 彭文红 徐敬轩*

【摘要】目的 探究胰石蛋白(PSP)、白细胞介素-10(IL-10)、趋化因子17(CCL-17)在新生儿早发型B族溶血链球菌(GBS)败血症中的水平变化及临床意义。**方法** 选取丹阳市妇幼保健院2018年2月至2021年2月90例新生儿早发型GBS败血症患儿作为败血症组,另选择同期30例新生儿GBS感染患儿作为GBS组,30例健康新生儿作为健康对照组。分析血清PSP、IL-10、CCL-17水平变化及临床意义。**结果** 败血症组血清PSP、IL-10、CCL-17高于GBS组、健康对照组,GBS组高于健康对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),血清PSP、IL-10、CCL-17与新生儿GBS感染、新生儿早发型GBS败血症呈正相关($P<0.05$),联合诊断新生儿早发型GBS败血症的AUC为0.927,敏感性为90.00%,特异性为80.00%,诊断价值优于各血清指标单独诊断($P<0.05$),治愈患儿血清PSP(16.57 ± 4.38)ng/mL、IL-10(54.37 ± 13.14)pg/mL、CCL-17(368.41 ± 92.25)pg/mL低于好转患儿、无效患儿,好转患儿低于无效患儿,差异有统计学意义($P<0.05$),血清PSP、IL-10、CCL-17与疗效呈负相关($r=-0.745、-0.579、-0.476, P<0.05$)。**结论** 血清PSP、IL-10、CCL-17在新生儿早发型GBS败血症中异常升高,联合检测可作为临床辅助诊断的潜在途径,还可为评估疗效提供参考依据。

【关键词】 新生儿早发型B族溶血链球菌败血症;胰石蛋白;白细胞介素-10;趋化因子17

The level changes and clinical significance of PSP, IL-10 and CCL-17 in neonatal early-onset GBS sepsis

WANG Jiali, PENG Wenhong, XU Jingxuan*

(Department of Clinical Laboratory, Danyang Maternal and Child Health Hospital, Danyang, Jiangsu, China, 212300)

【ABSTRACT】 Objective To investigate the level changes of pancreatic stone protein (PSP), interleukin - 10 (IL - 10) and chemokine 17 (CCL - 17) in neonatal early - onset group B streptococcus hemolyticus (GBS) sepsis and clinical significance. **Methods** A total of 90 neonates with early-onset GBS sepsis from February 2018 to February 2021 in Danyang Maternal and Child Health Hospital were selected as the sepsis group, 30 neonates with GBS infection during the same period were selected as the GBS control group, and 30 healthy newborns as the healthy control group. The levels of serum PSP, IL-10, CCL-17 and their clinical significance were analyzed. **Results** Serum PSP, IL-10, CCL-17 in the study group were higher than those in the GBS control group and the healthy control group, and the GBS control group was higher than that in the healthy control group, the difference was statistically significant ($P<0.05$). Serum PSP, IL-10, CCL-17 were positively correlated with neonatal GBS infection and neonatal early-onset GBS sepsis ($P<0.05$). The AUC of combined diagnosis of neonatal early-onset GBS sepsis was 0.927, the sensitivity was 90.00%, and the specificity was 80.00%. The diagnostic value is better than the diagnosis of each serum indicator alone ($P<0.05$). The levels of serum PSP (16.57 ± 4.38) ng/mL, IL-10 (54.37 ± 13.14) pg/mL, CCL-17 ($368.41\pm$

基金项目:江苏省卫生健康委科研项目(K2019024)

作者单位:丹阳市妇幼保健院检验科,江苏,丹阳 212300

*通信作者:徐敬轩, E-mail: xjxy@163.com

92.25) pg/mL in the cured children were lower than those in the improved children and the ineffective children. The improved children are lower than that in the ineffective children, the difference is statistically significant ($P < 0.05$). Serum PSP, IL-10, CCL-17 was negatively correlated with the curative effect ($r = -0.74, -0.579, -0.476, P < 0.05$). **Conclusion** Serum PSP, IL-10, and CCL-17 are abnormally elevated in neonatal early-onset GBS sepsis. Combined detection can be used as a potential approach for clinical auxiliary diagnosis, and it can also provide a reference for evaluating the efficacy.

[KEY WORDS] Neonatal early-onset group B hemolytic streptococcal sepsis; Pancreatic stone protein; Interleukin-10; Chemokine 17

B族链球菌(Group B Streptococcus, GBS)是一种条件致病菌,是围产期母婴感染的主要病原菌之一^[1]。据统计,我国孕妇GBS带菌率高达10.1%~32.4%,新生儿早发型GBS败血症发生率在1.6%~2.1%^[2]。目前,培养法是诊断新生儿早发型GBS败血症的金标准,但检测周期较长,无法实现早期诊断及病情评估^[3]。研究证实,胰石蛋白(Pancreatic stone protein, PSP)可用于感染性疾病诊断及病情评估^[4]。白细胞介素-10(Interleukin-10, IL-10)是临床常见炎症免疫反应相关指标,可有效反映机体免疫失衡、炎症状态^[5]。趋化因子17(Chemoattractant cytokine ligand 17, CCL17)可通过趋化Th12、Th17细胞及调节性T细胞至组织损伤或感染部位,在局部炎症反应中发挥重要作用^[6]。但有关三者在新发早发型GBS败血症中的临床价值仍有待验证。为此,本研究尝试探究PSP、IL-10、CCL-17在新发早发型GBS败血症中的水平变化及临床意义。报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取丹阳市妇幼保健院2018年2月至2021年2月90例新生儿早发型GBS败血症患儿作为败血症组,其中男55例,女35例,胎龄平均(37.06±0.42)周,出生体重平均(3.36±0.51)kg。另选择同期30例新生儿GBS感染患儿作为GBS组,其中男19例,女11例,胎龄平均37.15周,出生体质量平均3.29 kg。30例健康新生儿作为健康对照组,其中男20例,女10例,胎龄平均(37.10±0.48)周,出生体重平均(3.41±0.67)kg。3组性别、胎龄、出生体质量均均衡可比,差异无统计学意义($P > 0.05$)。纳入标准:①败血症组、GBS组均经血培养证实为GBS感染,败血症组于出生≤72 h内发生败血症,且符合新生儿败血症诊断标准^[7];②健康对照组各项指标正常,且GBS培养阴性;③3组监护人均知情,签订知情

承诺书。排除标准:①伴有先天性畸形、遗传性代谢性疾病者;②合并溶血性贫血、严重缺血缺氧性脑病者;③母体阴道常见病原菌混合感染者。且本研究经院伦理委员会审批通过。

1.2 方法

血清检测方法:于入院当日清晨采集空腹静脉血3 mL,采用3 000 r/min速率离心10 min,取上清液,保存于-80℃条件下待检。采用酶联免疫吸附法检测血清PSP、IL-10、CCL-17水平,试剂盒购自美国R&B公司,操作步骤遵循说明书。败血症组治疗方法:确诊后立即给予针对性抗菌药物治疗,持续治疗7 d。疗效判定方法^[7]:临床表现及体征消失,GBS病原学检查阴性,血常规等常规生化指标复常为治愈;临床表现及体征基本消失,GBS病原学检查阴性,血常规常规生化指标有所改善但未复常为好转;临床表现及体征无明显缓解或加重为无效。

1.3 统计学分析

采用统计学软件SPSS 22.0处理数据;计量资料以($\bar{x} \pm s$)描述,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两组间比较采用LSD-t检验,两组间比较采用独立样本t检验;计数资料用n(%)表示, χ^2 检验;相关性采用Spearman相关系数模型分析;诊断效能采用受试者工作特征(ROC)曲线分析,获取曲线下面积、置信区间、敏感度、特异度及截断值;联合诊断实施Logistic二元回归拟合,返回预测概率logit(p),将其作为独立检验变量。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3组血清PSP、IL-10、CCL-17水平

3组血清PSP、IL-10、CCL-17水平比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);两两比较,败血症组血清PSP、IL-10、CCL-17高于GBS组、健康对照组,GBS组高于健康对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表1。

表1 3组血清PSP、IL-10、CCL-17水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of serum PSP, IL-10 and ccl-17 levels among the three groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	PSP(ng/mL)	IL-10(pg/mL)	CCL-17(pg/mL)
败血症组	90	20.63±6.72 ^{ab}	61.34±15.47 ^{ab}	412.77±113.59 ^{ab}
GBS组	30	13.81±4.43 ^a	45.96±12.10 ^a	308.45±84.28 ^a
健康对照组	30	5.18±1.19 ^b	10.07±3.31 ^b	69.41±17.20 ^b
F值		88.606	168.527	143.497
P值		<0.001	<0.001	<0.001

注:与健康对照组比较,^a $P<0.05$;与GBS组比较,^b $P<0.05$ 。

2.2 血清PSP、IL-10、CCL-17与新生儿GBS感染及败血症的关系

Spearman相关性分析,血清PSP、IL-10、CCL-17与新生儿GBS感染、新生儿早发型GBS败血症呈正相关($P<0.05$)。见表2。

表2 血清PSP、IL-10、CCL-17与新生儿GBS感染及早发型GBS感染败血症的关系

Table 2 Relationship between serum PSP, IL-10, ccl-17 and neonatal GBS infection

项目	新生儿早发型GBS感染		新生儿早发型GBS败血症	
	r值	P值	r值	P值
PSP	0.542	<0.001	0.678	<0.001
IL-10	0.607	<0.001	0.729	<0.001
CCL17	0.729	<0.001	0.755	<0.001

2.3 血清PSP、IL-10、CCL-17对新生儿早发型GBS败血症的诊断价值

以败血症组为阳性样本,GBS组为阴性样本,绘制ROC曲线,结果显示,血清PSP、IL-10、CCL-17诊断新生儿早发型GBS败血症的AUC分别为0.788、0.648、0.722,三者联合诊断新生儿早发型GBS败血症的AUC为0.927诊断价值优于各血清指标单独诊断($P<0.05$)。见图1。

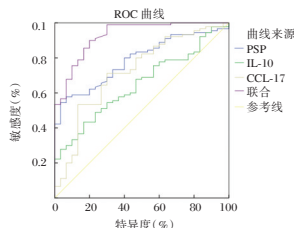


图1 血清PSP、IL-10、CCL-17对新生儿早发型GBS败血症的诊断价值

Figure 1 The diagnostic value of serum PSP, IL-10 and ccl-17 in the early-onset GBS sepsis of newborn

2.4 败血症组不同疗效患儿血清PSP、IL-10、CCL-17水平

败血症组不同疗效患儿血清PSP、IL-10、CCL-17

水平比较,差异有统计学意义($P<0.05$);治愈患儿血清PSP、IL-10、CCL-17低于好转患儿组、无效患儿组,好转患儿组低于无效患儿组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表3。

表3 败血症组不同疗效患儿血清PSP、IL-10、CCL-17水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of serum PSP, IL-10 and CCL-17 levels in children with different curative effects in Study Group ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	PSP(ng/mL)	IL-10(pg/mL)	CCL-17(pg/mL)
治愈患儿组	64	16.57±4.38 ^{ab}	54.37±13.14 ^{ab}	368.41±92.25 ^{ab}
好转患儿组	14	25.49±6.59 ^a	67.55±18.79 ^a	446.74±108.53 ^a
无效患儿组	12	36.61±10.12 ^b	91.27±22.46 ^b	609.72±149.21 ^b
F值		66.755	29.803	28.292
P值		<0.001	<0.001	<0.001

注:与无效患儿比较,^a $P<0.05$;与好转患儿比较,^b $P<0.05$ 。

2.5 血清PSP、IL-10、CCL-17与疗效的关系

Spearman相关性分析,血清PSP($r=-0.745$)、IL-10($r=-0.579$)、CCL-17($r=-0.476$)与疗效呈负相关($P<0.05$)。

3 讨论

GBS通常定植于泌尿生殖道、胃肠道,是引起新生儿肺炎、脑膜炎、败血症的常见致病菌,严重者甚至死亡,及早确诊、及时治疗、控制病情进展是降低死亡风险的关键所在^[8-9]。因此,积极探索较为可靠的指标进行早期诊断具有重要意义。

PSP是胰腺应激蛋白家族成员之一,由再生基因编码,不仅可反映胰腺损伤情况,在糖尿病、消化道肿瘤、炎症性肠病、急慢性胰腺炎中还属于急性反应蛋白,呈现出不同程度升高表达。有文献指出,PSP是判断感染严重程度的新型指标,在新生儿败血症中异常升高表达^[10]。结合查丽等^[11]报道,考虑原因为:PSP作为C型凝集素,具有特异性凝集细菌作用,可通过加快有丝分裂、细胞黏附、促进细胞聚集、抑制凋亡等途径加速感染发生,随着其水平不断升高,病情逐渐加剧,从而参与新生儿GBS感染、早发型GBS败血症发生发展。本研究还发现,血清PSP对新生儿早发型GBS败血症中具有一定诊断价值,且与疗效呈负相关,说明血清PSP不仅可以作为诊断指标,还可为临床评估疗效提供相关信息。

邢静等^[12]研究显示,血清IL-10在小儿脓毒症中呈升高表达,动态监测有利于评估脓毒症病情程

度。本研究发现,血清 IL-10 在新生儿早发型 GBS 败血症中水平较高,参与其发生发展过程。IL-10 是目前临床公认的炎症与免疫抑制细胞因子,在败血症细胞因子瀑布中发挥强大抗炎作用。在败血症条件下,内毒素、肿瘤坏死因子会刺激 Th 细胞、B 细胞、单核细胞产生、分泌 IL-10,达到抑制炎症反应的目的,但过高的抗炎介质浓度会打破促炎-抗炎系统之间的动态平衡,从而抑制机体免疫功能,导致对病原菌清除能力减弱,甚至可能引发“免疫麻痹状态”^[13]。同时,相关报道证实,GBS 表面三磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)能诱导巨噬细胞吞噬,刺激大量 IL-10 分泌,在感染早期发挥抑制炎症反应作用,但 IL-10 浓度不断升高会反馈性抑制中性白细胞抗炎效应,并超过 IL-10 的直接抗炎作用加快 GBS 增殖^[14]。本研究数据表明,血清 IL-10 对新生儿早发型 GBS 败血症单独诊断价值欠佳,需与其他指标联合诊断,还发现其与疗效之间存在负相关关系,可见血清 IL-10 可应用于疗效评估中。

CCL17 属于 CC 趋化因子之一,由巨噬细胞 M1 产生,当病原菌入侵机体,巨噬细胞 M0 接触干扰 γ 后会极化为 M1,产生过多 CCL17,参与局部炎症反应,并加剧病变所致的免疫紊乱^[15]。本研究表明,与健康新生儿、新生儿 GBS 感染患儿相比,新生儿早发型 GBS 败血症患儿血清 CCL17 水平呈显著高表达。主要是因为 GBS 定植条件下,处于休眠状态的巨噬细胞 M0 便可极化为巨噬细胞 M1,发挥抗炎作用,一旦发生 GBS 感染,M0 便会通过极化为 M2 抑制过度炎症反应,而 CCL17 上调不仅与 M1 有关,还与 M2 极化联系紧密,从而在 GBS 败血症发生发展过程中占据重要地位^[16]。提示临床可将检测血清 CCL17 水平作为早期诊断与疗效评估的重要环节,为及早确诊、制定合理治疗方案提供参考依据。

血清 PSP、IL-10、CCL-17 单独诊断价值均有较大提升空间,为此本研究初次尝试分析血清 PSP、IL-10、CCL-17 联合诊断价值,结果发现,三者联合诊断价值较各指标单独诊断显著提高,为临床早期诊断提供新思路、新途径。但本研究属于单中心、小样本分析,可能造成数据偏移,需进一步采取多中心、大样本研究,以获取更可靠的数据支持。

综上所述,血清 PSP、IL-10、CCL-17 在新生儿早发型 GBS 败血症中异常升高,联合检测可作为

临床辅助诊断的潜在途径,还可为评估疗效提供参考依据。

参考文献

- [1] 赵小娅,谢月英,周旭丽,等. B 族溶血性链球菌(GBS)感染对妊娠结局的影响[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2016, 8(3):170-173.
- [2] 林新祝,吴佳音,祝垚,等. 孕晚期阴道定植 B 族链球菌的血清型特点及其与新生儿早发型感染的相关性[J]. 中华围产医学杂志, 2020, 23(4):232-238.
- [3] Hansen R, Gibson S, De Paiva Alves E, et al. Adaptive response of neonatal sepsis-derived Group B Streptococcus to bilirubin[J]. Sci Rep, 2018, 8(1):6470.
- [4] Eggimann P, Que YA, Rebeaud F. Measurement of pancreatic stone protein in the identification and management of sepsis[J]. Biomark Med, 2019, 13(2):135-145.
- [5] 王军锋. 血清 IL-6、IL-8、IL-10、TNF- α 检测结果对预防儿童肺炎支原体肺炎的临床意义[J]. 华南预防医学, 2017, 43(1): 83-85.
- [6] Lee MC, Saleh R, Achuthan A, et al. CCL17 blockade as a therapy for osteoarthritis pain and disease [J]. Arthritis Res Ther, 2018, 20(1):62.
- [7] 中华医学会儿科学分会新生儿学组,《中华医学会中华儿科杂志》编辑委员会. 新生儿败血症诊疗方案[J]. 中华儿科杂志, 2003, 41(12):897-899.
- [8] 杨梦楠,花晓琳,金敏菲,等. 妊娠期 B 族链球菌感染现状及对母婴结局的影响[J]. 现代妇产科进展, 2019, 28(3):173-177.
- [9] Yun KW, Park SH, Cho EY, et al. Clinical features and outcomes of community-acquired late-onset sepsis: Focusing on group B Streptococcus and Escherichia coli [J]. Pediatr Int, 2019, 61(12):1210-1215.
- [10] Graf R. Pancreatic stone protein-sepsis and the riddles of the exocrine pancreas[J]. Pancreatology, 2020, 20(3):301-304.
- [11] 查丽,胡金绘,朱红利,等. 胰石蛋白对早发型新生儿败血症的早期诊断价值[J]. 中国医药导报, 2018, 15(24):88-91.
- [12] 邢静,卢艳辉,王艳飞,等. 小儿脓毒症血清 NT-proBNP、CRP、IL-10 及 TNF- α 水平变化及其与预后的关系[J]. 河北医科大学学报, 2020, 41(5):519-523.
- [13] 王婷,韦小碗,杨亮,等. 脓症患者血清 PCT、CRP、IL-6 和 IL-10 水平检测及临床意义[J]. 陕西医学杂志, 2020, 49(11):1510-1514.
- [14] 易辉,王云霞,何慧芳. B 族链球菌阳性早产病例中 IL-10 的表达及菌株血清分型的特点[J]. 中国妇幼保健, 2020, 35(13):2365-2368.
- [15] 张伟,汪宏良,柏晶妹,等. 胸腺活化调节趋化因子 17 和 CC 趋化因子受体 4 与不明原因复发性流产的相关性研究[J]. 生殖与避孕, 2015, 35(4):237-240.
- [16] 林彦青,邱晓媚,李盛勇,等. 新生儿 B 族链球菌早发型败血症与巨噬细胞极化相关细胞因子表达水平的关系[J]. 中国免疫学杂志, 2020, 36(6):729-732.

脑脊液 $\beta 2\text{MG}$ 、CRP 及 CSF-NSE 对新生儿化脓性脑膜炎的诊断价值

杨夏 刘金凤* 卢国增

[摘要] **目的** 分析脑脊液 $\beta 2$ 微球蛋白($\beta 2\text{MG}$)、C 反应蛋白(CRP)及脑脊液神经元特异性烯醇化酶(CSF-NSE)对新生儿化脓性脑膜炎的诊断价值。**方法** 选取徐州市儿童医院新生儿内科 2017 年 3 月至 2021 年 6 月收治的 105 例新生儿为研究对象,依据病原学检查结果,根据是否发生化脓性脑膜炎分为发生组(73 例)和未发生组(32 例)。将患者检测后的脑脊液 $\beta 2\text{MG}$ 、CRP 及 CSF-NSE 指标进行比较,采集不同感染类型,不同病情程度的数据,并采用受试者工作特征曲线(ROC)评估脑脊液 $\beta 2\text{MG}$ 、CRP 及 CSF-NSE 对新生儿化脓性脑膜炎的诊断价值。**结果** 比较两组患儿 $\beta 2\text{MG}$ 、CRP 及 CSF-NSE 的检测,发生组差异显著高于未发生组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。比较革兰阳性菌和革兰阴性菌 $\beta 2\text{MG}$ 、CRP 及 CSF-NSE 的检测情况,G-患儿各项指标显著低于 G+,比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。比较轻度,中度,重度情况下 $\beta 2\text{MG}$ 、CRP 及 CSF-NSE 的检测情况,重度患儿均高于轻中度患儿,差异有统计学意义($P < 0.05$),中度患儿均高于轻度患儿,差异有统计学意义($P < 0.05$)。ROC 曲线分析显示, $\beta 2\text{MG}$ 、CRP、CSF-NSE 及三项联合指标诊断新生儿化脓性脑膜炎的 ROC 曲线下面积 AUC 分别为 0.882、0.840、0.787、0.890,三项联合 AUC 均明显高于各单项指标($P < 0.05$)。**结论** 脑脊液 $\beta 2\text{MG}$ 、CRP 及 CSF-NSE 在新生儿化脓性脑膜炎中显著升高,三者联合可提高诊断新生儿化脓性脑膜炎的敏感度,准确性。

[关键词] 脑脊液 $\beta 2\text{MG}$ 、CRP 及 CSF-NSE; 新生儿化脓性脑膜炎

The diagnostic value of cerebrospinal fluid $\beta 2\text{MG}$, CRP and CSF - NSE for neonatal purulent meningitis

YANG Xia, LIU Jinfeng*, LU Guozeng

(Department of Neonatal Medicine, Xuzhou Children's Hospital, Xuzhou, Jiangsu, China, 221006)

[ABSTRACT] **Objective** To analyze the diagnostic value of cerebrospinal fluid $\beta 2$ microglobulin ($\beta 2\text{MG}$), C-reactive protein (CRP) and cerebrospinal fluid neuron-specific enolase (CSF-NSE) for neonatal purulent meningitis. **Methods** A total of 105 neonates admitted to the Department of Neonatal Medicine in Xuzhou Children's Hospital from March 2017 to June 2021 were selected as the research objects. Based on the results of pathogenic examinations and whether purulent meningitis occurred, they were divided into an occurrence group (73 cases) and a non-occurring group (32 cases). The cerebrospinal fluid $\beta 2\text{MG}$, CRP and CSF - NSE indicators were compared, data of different infection types and different disease levels were collected, and the receiver operating characteristic curve (ROC) was used to evaluate the diagnostic value of cerebrospinal fluid $\beta 2\text{MG}$, CRP and CSF-NSE for the newborn purulent meningitis. **Results** Comparing the detection of $\beta 2\text{MG}$, CRP and CSF - NSE between the two groups of children, the difference between the occurrence group was significantly higher than that of the non - occurrence group, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Comparing the detection conditions of gram - positive bacteria and gram -

基金项目:江苏省卫生健康委科研项目(LGY2018048)

作者单位:徐州市儿童医院新生儿内科,江苏,徐州 221006

*通信作者:刘金凤, E-mail:43221543@qq.com

negative bacteria, the indicators of $\beta 2\text{MG}$, CRP and CSF-NSE in children with G- were significantly lower than those with G+, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Comparing the detection of $\beta 2\text{MG}$, CRP and CSF-NSE in mild, moderate, and severe cases, severe children were higher than mild and moderate children, the difference was statistically significant ($P < 0.05$), and moderate children were higher than mild children, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). ROC curve analysis showed that $\beta 2\text{MG}$, CRP, CSF-NSE and the three combined indicators for the diagnosis of neonatal purulent meningitis in the area under the ROC curve AUC were 0.882, 0.840, 0.787, 0.890, respectively, the three combined AUCs were significantly higher than each single indicator ($P < 0.05$). **Conclusion** Cerebrospinal fluid $\beta 2\text{MG}$, CRP and CSF-NSE are significantly increased in neonatal purulent meningitis. The combination of the three can improve the sensitivity and accuracy of diagnosing neonatal purulent meningitis.

[KEY WORDS] Cerebrospinal fluid $\beta 2\text{MG}$, CRP and CSF-NSE; Neonatal purulent meningitis

新生儿化脓性脑膜炎是常见的危及新生儿生命的疾病,本病常为败血症的一部分或继发于败血症;主要表现为烦躁不安,哭闹易激惹,严重者甚至抽搐昏迷,故当患儿表现有症状时,应及时诊断治疗^[1-2]。临床上首选实验室检查,包括观察其周围血象,细菌培养,脑脊液检查;脑脊液检查是临床较常用的检查手段,脑脊液为无色透明的液体,充满在各脑室^[3]。近年来脑脊液标记物在脑膜炎的诊断中有着重要的价值,目前临床上常用的新生儿化脓性脑膜炎的辅助诊断脑脊液标记物有 $\beta 2$ 微球蛋白($\beta 2$ microglobulin),C反应蛋白(Creactive protein),脑脊液神经系统(Cerebrospinal fluid nervous system)^[4]。基于此,本研究选取新生儿化脓性脑膜炎的患者为研究对象,对脑脊液 $\beta 2\text{MG}$ 、CRP及CSF-NSE在其诊断分析上是否有价值。报告如下:

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取徐州市儿童医院新生儿内科2017年3月至2021年6月出生的1456例新生儿,根据纳入和排除标准选取105例疑似新生儿脑膜炎患者(前囟饱满、紧张,角弓反张)为研究对象,依照是否发生化脓性脑膜炎分为发生组和未发生组,发生组73例为新生儿化脓性脑膜炎患儿,未发生组32例为非新生儿化脓性脑膜炎患儿。其中发生组患儿男性42例,女性31例,患儿日龄平均为(15.4 \pm 2.1)天;脑脊液细菌培养检查:G+感染39例(包括金葡菌15例,肺炎链球菌13例,表皮葡萄球菌7例,溶血葡萄球菌4例),G-34例(大肠埃希菌25例,克雷伯杆菌7例,绿脓杆菌2例);未发生组患儿男性20例,女性12例,患儿日龄平均为(16.5 \pm 2.4)天;其疾病类型为:新生儿败血症17例,新生儿巨细胞病毒感染9例,新生儿低钙血症

4例,新生儿头颅血肿2例。两组患儿性别及年龄等临床资料比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。本研究已获得医学伦理委员会审核批准。

纳入标准:①符合《实用新生儿学》中关于新生儿化脓性脑膜炎的相关诊断标准^[5];②脑脊液培养出细菌或涂片见细菌;③患儿精神正常;④患儿及监护人均已知晓,并已签署知情同意书。排除标准:①排除有意识障碍、精神性疾病者;②排除合并心血管疾病及血液循环系统严重疾病者③排除有其他药物服用或治疗正在进行者。

1.2 方法

为所有患儿进行脑脊液标本的采集,抽取2~3 mL,采用免疫比浊法测定C反应蛋白(Creactive protein),采用速率散射比浊法检测 $\beta 2$ 微球蛋白($\beta 2$ microglobulin),采用免疫速率法检测脑脊液神经系统(Cerebrospinal fluid nervous system),立即送检并保证在1 h内完成检验;按照iQ200全自动尿沉渣分析仪的相关操作要求以及光学显微镜计数板的相关要求,实施脑脊液细胞的计数,由经验丰富的医师进行细胞检测与数据处理,两组患儿均由同一位医师进行计数检验。

1.3 评判标准

评判标准^[6]:依据患儿的临床症状和意识程度进行病情程度分级:轻度有22例,表现为皮肤黏膜出血点,嗜睡,易激惹,体温不稳定涂片染色可发现病原菌,意识尚清醒;中度有28例,表现为嗜睡、惊厥等临床症状,颅内压增高明显,意识模糊;重度有23例,表现为严重精神萎靡,意识昏迷,惊厥频繁,对光反射消失。

1.4 统计学分析

采用SPSS 22.0统计软件进行分析,计数资料以 $n(\%)$ 形式表示,行 χ^2 检验,符合正态的计量资

料用($\bar{x} \pm s$)表示,两组间用 t 检验;多组间比较采用方差分析;采用 ROC 评估 $\beta 2\text{MG}$ 、CRP 及 CSF-NSE 对新生儿化脓性脑膜炎的诊断价值;以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患儿脑脊液 $\beta 2\text{MG}$ 、CRP 及 CSF-NSE 检测指标比较

发生组的 $\beta 2\text{MG}$ 、CRP 及 CSF-N 评分均高于未发生组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 两组患儿脑脊液检验指标比较 ($\bar{x} \pm s$)
Table 1 Comparison of cerebrospinal fluid test indexes between 2 of children ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	$\beta 2\text{MG}(\text{mg/L})$	CRP(mg/L)	CSF-NSE(U/L)
发生组	73	2.99±0.54	18.05±3.91	53.76±9.45
未发生组	32	2.21±0.39	13.76±2.01	44.49±6.06
t 值		7.364	5.865	5.101
P 值		0.000	0.000	0.000

2.2 两种不同感染类型的指标比较

观察比较革兰阳性菌和革兰阴性菌 $\beta 2\text{MG}$ 、CRP 及 CSF-NSE 的检测情况,G-患儿各项指标显著低于 G+,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 两种不同感染类型的指标比较 ($\bar{x} \pm s$)
Table 2 Comparison of indicators for 2 different infection types ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	$\beta 2\text{MG}(\text{mg/L})$	CRP(mg/L)	CSF-NSE(U/L)
G+组	39	3.20±0.49	19.52±3.54	58.27±8.17
G-组	34	2.74±0.48	16.37±3.67	48.6±8.16
t 值		4.039	3.728	5.047
P 值		0.000	0.000	0.000

2.3 3种不同程度的指标比较

重度患儿 $\beta 2\text{MG}$ 、CRP 及 CSF-NSE 均高于轻中度患儿,差异有统计学意义($P < 0.05$),中度患儿 $\beta 2\text{MG}$ 、CRP 及 CSF-NSE 均高于轻度患儿,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 3种不同程度的指标比较 ($\bar{x} \pm s$)
Table 3 Comparison of 3 different levels of indicators ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	$\beta 2\text{MG}(\text{mg/L})$	CRP(mg/L)	CSF-NSE(U/L)
轻度	22	2.72±0.39 ^{ab}	15.50±3.32 ^{ab}	47.65±8.28 ^{ab}
中度	28	2.87±0.50 ^a	17.70±3.14 ^a	52.91±8.07 ^a
重度	23	3.39±0.48	20.91±3.50	60.64±7.71
F 值		13.258	15.266	14.933
P 值		0.000	0.000	0.000

注:与轻中度患儿比较,^a $P < 0.05$;中度与轻度患儿比较,^b $P < 0.05$ 。

2.4 $\beta 2\text{MG}$ 、CRP 及 CSF-NSE 检测指标对新生儿化脓性脑膜炎的诊断价值分析

ROC 曲线结果显示, $\beta 2\text{MG}$ 、CRP、CSF-NSE 及三项联合指标诊断新生儿化脓性脑膜炎 ROC 曲线下面积 AUC 分别为 0.882、0.840、0.787、0.890。三项联合指标诊断化脓性脑膜炎的价值明显更高,其敏感度、特异度分别为 84.9%、87.5%。见表 4、图 1。

表 4 $\beta 2\text{MG}$ 、CRP 及 CSF-NSE 检测指标对新生儿化脓性脑膜炎的诊断价值分析

Table 4 Analysis of the diagnostic value of $\beta 2\text{MG}$, CRP and CSF-NSE detection indexes for neonatal purulent meningitis

项目	AUC	SD	约登指数	敏感性	特异性	95%CI	P 值
$\beta 2\text{MG}$	0.882	0.035	0.707	0.658	0.906	81.2~95.1	<0.05
CRP	0.840	0.039	0.618	0.712	0.906	76.3~91.6	<0.05
CSF-NSE	0.787	0.044	0.595	0.658	0.937	70.1~87.4	<0.05
三项联合	0.890	0.034	0.724	0.849	0.875	82.3~95.6	<0.05

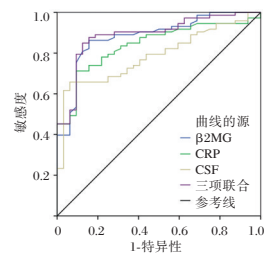


图 1 ROC 诊断价值
Figure 1 ROC curve

3 讨论

由于新生儿身体的各项器官均未发育完全,免疫功能低下,血脑屏障也没有发育完善,导致细菌很容易入侵到机体,发生新生儿化脓性脑膜炎^[7]。诊断新生儿化脓性脑膜炎的首选方法是腰椎穿刺,其穿刺出来的脑脊液白细胞数 $> 21/\text{mm}^3$ 诊断为细菌性脑膜炎的敏感性和特异性均为 80%^[8],正常脑脊液为无色透明液体,新生儿化脓性脑膜炎的患儿脑脊液呈乳白色,在炎症的情况下,脑脊液中蛋白质(包括纤维蛋白)含量和细胞数字增加,可使脑脊液形成凝块或薄膜^[9]。脑脊液标记物通常用于脑膜炎的早期诊断,脑膜炎性质的鉴别,治疗效果和预后的评估。研究显示,选择多种脑脊液标记物或脑脊液相关细胞因子联合检测,可提高灵敏性^[10]。化脓性脑膜炎中常见的诊断指标有 $\beta 2\text{MG}$ 、CRP 及 CSF-NSE^[11], $\beta 2\text{MG}$ 是 $\beta 2$ -微球

蛋白,存在于所有的核细胞中,是与HFE蛋白结合,造血系统恶性肿瘤的主要标志物,如慢淋、淋巴瘤、多发性骨髓瘤等,实体肿瘤及非肿瘤疾病也可升高, $\beta 2\text{MG}$ 与浆细胞瘤数量成正比,并与骨髓瘤分期相关^[12-13]。CRP是C-反应蛋白在健康人血清中的含量极低,在感染、炎症、组织损伤,恶性肿瘤等刺激下,升高达千倍,升降幅度与感染的程度成正相关^[14-15]。CSF-NSE是脑脊液检查,化脓性脑膜炎一般为白色浑浊液体^[16]。

本研究结果显示化脓性脑膜炎患儿 $\beta 2\text{MG}$ 、CRP及CSF-NSE水平均显著高于未发生组,则提示这三项指标与新生儿化脓性脑膜炎的发展有着密切的关系。因此,本研究将 $\beta 2\text{MG}$ 、CRP及CSF-NSE作为脑脊液标记物的联合检测。结果表明患有化脓性脑膜炎的新生儿 $\beta 2\text{MG}$ 、CRP及CSF-NSE明显比非化脓性脑膜炎的新生儿含量高,革兰阴性杆菌的新生儿化脓性脑膜炎 $\beta 2\text{MG}$ 、CRP及CSF-NSE含量显著低于革兰阳性杆菌患儿,患儿治疗前的 $\beta 2\text{MG}$ 、CRP及CSF-NSE含量均高于治疗后和非化脓性脑膜炎的患儿,而治疗后的 $\beta 2\text{MG}$ 、CRP及CSF-NSE含量和非化脓性脑膜炎患儿比较差异无统计学意义,这进一步说明,临床中运用 $\beta 2\text{MG}$ 、CRP及CSF-NSE可以较好的诊断不同感染类型和不同病情程度的新生儿化脓性脑膜炎,因为脑脊液中的蛋白含量在正常的情况下是比血浆的含量低的,而新生儿化脓性脑膜炎的患者其蛋白含量会明显在增加,脑膜受到细菌的感染之后,脑神经细胞内的酶会大量分泌,导致人体内不同的酶进入脑脊液中,所以脑脊液中的 $\beta 2\text{MG}$ 、CRP及CSF-NSE会显著上升^[17]。ROC分析结果显示, $\beta 2\text{MG}$ 、CRP、CSF-NSE及三项联合指标诊断新生儿化脓性脑膜炎ROC曲线下面积AUC分别为0.882、0.840、0.787、0.890。可知,三项联合指标诊断化脓性脑膜炎提高了敏感度、特异度,值得在临床上推广。这三项脑脊液指标可作为新生儿化脓性脑膜炎的早期检测指标,可以很好的反映出疾病的严重程度和感染类型,同时对于此疾病诊断具有一定的价值意义。

综上所述,脑脊液 $\beta 2\text{MG}$ 、CRP及CSF-NSE对新生儿化脓性脑膜炎具有一定的诊断价值,三者联合检查可提高诊断新生儿化脓性脑膜炎的敏感度、准确性,值得在临床上推广。

参考文献

- [1] Zhang Y, Sun X, Wu J, et al. Value of MRI enhanced FLAIR sequence examination combined with CSF TNF- α detection in the early diagnosis of neonatal purulent meningitis [J]. *Exp Ther Med*, 2019, 17(4):3124-3128.
- [2] Chen B, Zhai Q, Ooi K, et al. Risk Factors for Hydrocephalus in Neonatal Purulent Meningitis: A Single-Center Retrospective Analysis [J]. *J Child Neurol*, 2021, 36(6):491-497.
- [3] 夏桂丽, 李兴鹏, 费娅丽, 等. MSCT联合脑脊液检查对中枢神经系统感染的诊断鉴别价值 [J]. *中国CT和MRI杂志*, 2021, 135(1):34-36.
- [4] 孙雁, 冯丽梅, 邵明秀. 中枢神经系统感染急性期患儿脑脊液中P物质与IGF-2和ICAM-1及TNF- α 的研究 [J]. *中华医院感染学杂志*, 2020, 30(3):133-137.
- [5] 许邦礼, 康文清. 新生儿重症化脓性脑膜炎临床特征分析 [J]. *中国小儿急救医学*, 2021, 28(4):312-315.
- [6] 王欣, 杨花芳, 王媛媛, 等. 儿童化脓性脑膜炎312例临床分析 [J]. *脑与神经疾病杂志*, 2019, 27(2):16-20.
- [7] 赵金章, 刘玲, 于西萍, 等. 新生儿大肠埃希菌感染致细菌性脑膜炎脑脊液和并发症特点 [J]. *中国妇幼健康研究*, 2020, 31(8):1103-1107.
- [8] 张玲, 杨启纲, 程宏伟, 等. 脑脊液乳酸及降钙素原对诊断神经外科术后细菌性脑膜/脑室炎的应用探讨 [J]. *安徽医科大学学报*, 2019, 54(5):762-766.
- [9] 方瑞, 都鹏飞. 血清高敏C-反应蛋白联合降钙素原对足月新生儿败血症并发化脓性脑膜炎的预测价值 [J]. *重庆医学*, 2019, 48(23):66-69.
- [10] 潘志雄, 潘英, 翁璇铃, 等. 脑脊液中降钙素原和C反应蛋白单独检测和联合检测在儿童化脓性脑膜炎鉴别诊断中的价值 [J]. *现代仪器与医疗*, 2019, 25(3):35-38, 51.
- [11] 郑孟秋, 曹传顶, 丁颖, 等. 81例新生儿化脓性脑膜炎临床分析 [J]. *中国感染控制杂志*, 2020, 19(5):440-446.
- [12] 王正仕, 文超远, 李航, 等. 中枢神经系统感染患者脑脊液病原菌耐药性与免疫指标的研究 [J]. *中华医院感染学杂志*, 2020, 30(3):48-52.
- [13] 施凤泉, 丁克文, 邱洪生, 等. 脑脊液乳酸和脑脊液乳酸脱氢酶在新生儿化脓性脑膜炎中的应用价值 [J]. *吉林医学*, 2020, 41(12):20-22.
- [14] 宋文奇, 余金蓉, 陈莉, 等. 脑脊液LDH+CRP联合检测对新生儿化脓性脑膜炎的诊断价值 [J]. *西南国防医药*, 2019, 29(2):122-124.
- [15] 韩鹏. 银翘散加减汤联合美罗培南对小儿化脓性脑膜炎的疗效及对脑脊液神经元特异性烯醇化酶超敏C反应蛋白的影响 [J]. *山西医药杂志*, 2019, 48(5):550-553.
- [16] 王华伟, 吴志新, 朱雪萍, 等. 新生儿化脓性脑膜炎临床表现及实验室检查特点分析 [J]. *右江民族医学院学报*, 2019, 41(6):653-656.
- [17] 黄彩芝, 张洁, 莫丽亚, 等. 脑脊液肝素结合蛋白检测在小儿化脓性脑膜炎中的应用价值 [J]. *中华检验医学杂志*, 2019, 42(11):955-961.

儿童 Hp 感染相关性胃炎 miR-146a、CRP/ALB、Th17/Treg 水平监测与疗效的相关性

张静^{1*} 李常娟² 邢雅杰¹

[摘要] 目的 探讨微小RNA-146a(miR-146a)、C反应蛋白与白蛋白比值(CRP/ALB)、辅助性T17细胞/调节性T细胞(Th17/Treg)水平监测与儿童幽门螺杆菌(Hp)感染相关性胃炎疗效的相关性。方法 选取2017年1月至2020年1月本院80例Hp感染相关性胃炎患儿,均行奥美拉唑三联疗法治疗,根据治疗2周后疗效不同分为疗效良好组($n=65$),疗效不良组($n=15$)。对比两组临床资料,miR-146a、CRP/ALB、Th17/Treg水平,分析Hp感染相关性胃炎患儿疗效影响因素,并分析miR-146a、CRP/ALB、Th17/Treg水平对儿童Hp感染相关性胃炎疗效的预测价值。结果 疗效不良组病程 ≥ 2 年患儿比例(80.00%)高于疗效良好组(46.15%),差异有统计学意义($P<0.05$);疗效不良组miR-146a、CRP/ALB、Th17/Treg水平均高于疗效良好组,差异有统计学意义($P<0.05$);病程 ≥ 2 年、miR-146a、CRP/ALB、Th17/Treg水平均为儿童Hp感染相关性胃炎疗效的独立危险因素($P<0.05$);miR-146a、CRP/ALB、Th17/Treg水平联合预测儿童Hp感染相关性胃炎疗效的曲线下面积(AUC)为0.964,具有较高预测价值($P<0.05$)。结论 miR-146a、CRP/ALB、Th17/Treg水平与Hp感染相关性胃炎患儿疗效显著相关,且能辅助临床预测患儿疗效。

[关键词] Hp感染相关性胃炎;微小RNA-146a;C反应蛋白与白蛋白比值;辅助性T17细胞/调节性T细胞

Correlation of miR-146a, CRP/ALB, Th17/Treg level monitoring and efficacy in children with Hp infection-related gastritis

ZHANG Jing^{1*}, LI Changjuan², XING Yajie¹

(1. Department of Pediatrics, the First Hospital of Handan, Handan, Hebei, China, 056002; 2. Department of Gastroenterology, the First Hospital of Handan City, Handan, Hebei, China, 056002)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the correlation of microrna-146a (miR-146a), C-reactive protein/albumin ratio (CRP/ALB), helper T17 cells/regulatory T cells (Th17/Treg) with gastroscopic pathological changes and curative effect of Helicobacter pylori (Hp) infection associated gastritis in children. **Methods** 80 children with Hp infection related gastritis in our hospital from January 2017 to January 2020 were selected. They were all treated with omeprazole triple therapy. According to the curative effect after 2 weeks of treatment, they were divided into the good curative effect group ($n=65$) and the poor curative effect group ($n=15$). The clinical data, miR-146a, CRP/ALB, Th17/Treg levels of the two groups were compared. The influencing factors of curative effect of children with Hp infection related gastritis and the relationship between miR-146a, CRP/ALB, Th17/Treg levels and pathological changes under gastroscopy were analyzed. The predictive value of miR-146a, CRP/ALB, Th17/Treg levels and pathological changes under gastroscopy for curative effect of children with Hp infection related gastritis was analyzed. **Results** The proportion of children with course of disease ≥ 2 years (80.00%), chronic inflammation under gastroscopy (93.33%), active disease (66.67%) and intestinal metaplasia (66.67%) in the poor curative effect group were higher than those in good

基金项目:邯郸市科学技术研究与发展计划(1623208064-7)

作者单位:1. 邯郸市第一医院儿三科,河北,邯郸056002

2. 邯郸市第一医院消化一科,河北,邯郸056002

*通信作者:张静, E-mail:hdzj163@163.com

curative effect group (46.15%) ($P<0.05$). The levels of miR-146a, CRP/ALB and Th17/Treg in the poor curative effect group were higher than those in the good curative effect group ($P<0.05$). Course of disease ≥ 2 years, miR-146a, CRP/ALB, Th17/Treg levels, chronic inflammation, activity and intestinal metaplasia under gastroscopy were independent risk factors for the efficacy of Hp infection associated gastritis in children ($P<0.05$). The levels of miR-146a, CRP/ALB and Th17/Treg were positively correlated with the pathological changes of children with Hp infection related gastritis ($P<0.05$). The area under the curve (AUC) of miR-146a, CRP/ALB, Th17/Treg levels and gastroscopic pathological changes in predicting the efficacy of children with Hp infection related gastritis was 0.964, which had high predictive value. **Conclusion** The levels of miR-146a, CRP/ALB and Th17/Treg are significantly correlated with the pathological changes and curative effect of children with Hp infection associated gastritis and can assist clinical prediction of curative effect.

[KEY WORDS] Hp infection-related gastritis; microRNA-146a; CRP/ALB; Th17/Treg

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)感染是慢性胃炎的主要患病原因^[1],目前,临床研究主要以成年人胃炎感染为主^[2-3],关于儿童胃炎报道较少。新近研究^[4]指出成人人群的Hp感染多在儿童期获得,预防和根除儿童Hp感染可减少成人期相关疾病的发生。资料显示,微小RNA-146a(miRNA-146a, miR-146a)被证实参与炎症反应、细胞内信号传导和对细菌的应答等多种生物学活动,与儿童哮喘的Hp感染密切相关^[5]。C反应蛋白(C-reactive protein, CRP)与白蛋白(Albumin, ALB)比值(CRP/ALB)是评估炎症反应的标志物,与炎症程度间存在良好线性关系^[6]。但其在Hp感染相关性胃炎中的变化情况尚未明确。报道^[7]指出,辅助性T17细胞(T helper cell 17, Th17)与调节性T细胞(T regulatory cell, Treg)的平衡为人体重要免疫防御机制,Hp感染性胃溃疡患者胃黏膜形态损害可能与Th17/Treg细胞失衡有关,对其进行监测可辅助评价胃黏膜损害情况。本研究尝试探讨miR-146a、CRP/ALB、Th17/Treg水平监测与儿童Hp感染相关性胃炎疗效的相关性。报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2017年1月至2020年1月本院80例Hp感染相关性胃炎患儿,其中男51例,女29例;年龄12~16岁,平均(14.85±0.82)岁。纳入标准:①符合慢性胃炎诊断标准^[8];②均经13C尿素呼气试验确诊为Hp感染;③年龄12~16岁;④对本研究药物无禁忌;⑤无其他消化系统疾病;⑥患儿监护人知晓本研究,已签署同意书。排除标准:①血液系统疾病患儿;②恶性肿瘤患儿;③自身免疫性疾病患儿;④神经系统疾病患儿;⑤脏器功能不全者;

⑥慢性乙型肝炎、肺结核等传染性疾病患儿;⑦肺部感染、泌尿系感染等其他部位感染患儿。本研究经医院伦理委员会批准同意。

1.2 方法

治疗方法:所有患儿均行三联疗法治疗,口服奥美拉唑(辽宁亿帆药业有限公司,国药准字H20064652)0.6~1.0 mg/Kg·d,分2次(餐前口服),口服阿莫西林(涛生制药有限公司,国药准字H34022208)50 mg/(kg·d),分2次(最大剂量1 g, 2次/d),口服克拉霉素(宁夏启元国药B)有限公司,国药准字H20103113)15~20 mg/(kg·d),分2次(最大剂量0.5 g, 2次/d)。持续治疗2周,停药1月后评估疗效,参照《中药新药临床研究指导原则》制定评估标准:分为:治愈、显效、有效、无效,将治愈、显效、有效患儿纳入疗效良好组,将无效患儿纳入疗效不良组。

实验室指标检测方法:采集所有患儿入组当天(治疗前)空腹外周静脉血6 mL,取其中2 mL血液标本,离心处理后取血清,采用实时荧光免疫聚合酶链式反应(Polymerase chain reaction, PCR)检测血清miR-146a水平, RNA提取试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司,逆转录试剂盒购自美国Promega公司, PCR试剂盒购自德国Qiagen公司,检测操作均由专业人员严格按照试剂盒说明书完成,应用公式 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算miR-146a相对表达水平。取2 mL血液标本,离心处理后取血清,采用OTA-400型全自动生化分析仪(购自沈阳万泰医疗设备有限责任公司)检测血清CRP、ALB水平,并计算CRP/ALB水平。取2 mL血液标本,采用贝克曼Coulter Epics XL型流式细胞仪测定外周血Th17、Treg表达情况,并计算Th17/Treg比值。

1.3 观察指标

①两组临床资料、miR-146a、CRP/ALB、Th17/Treg水平,临床资料包括性别、年龄、病程,分析Hp感染相关性胃炎患儿疗效影响因素。②分析miR-146a、CRP/ALB、Th17/Treg水平对儿童Hp感染相关性胃炎疗效的预测价值。

1.4 统计学方法

数据处理采用SPSS 22.0软件,计数资料以n(%)描述,采用 χ^2 检验;计量资料以($\bar{x}\pm s$)描述,两组间比较采用独立样本t检验,相关性分析采用Spearman相关系数模型,通过Logistic进行多因素回归分析,预测效能分析采用受试者工作特征(ROC)曲线,获取曲线下面积(AUC),不同预测方案间曲线下面积比较采用DeLong检验,联合预测实施Logistic二元回归拟合,获得返回预测概率logit(p),将其作为独立检验变量进行ROC分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同疗效患者临床资料

本研究80例Hp感染相关性胃炎患儿治疗2周后,治愈40例,显效15例,有效10例,无效15例,疗效良好组65例,疗效不良组15例。不同疗效患者病程相比,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表1。

表1 不同疗效患者临床资料对比 [n(%)]
Table 1 Comparison of clinical data of patients with different curative effects [n(%)]

指标	疗效良好组 (n=65)	疗效不良组 (n=15)	χ^2 值	P值
性别	男	12(80.00)	2.110	0.146
	女	3(20.00)		
年龄	12~14岁	6(40.00)	0.047	0.828
	15~16岁	9(60.00)		
病程	<2年	3(20.00)	5.599	0.018
	≥2年	12(80.00)		

2.2 不同疗效患者 miR-146a、CRP/ALB、Th17/Treg 水平

疗效良好组 miR-146a、CRP/ALB、Th17/Treg水平均低于疗效不良组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表2。

2.3 儿童 Hp 感染相关性胃炎疗效影响因素

以儿童Hp感染相关性胃炎疗效为因变量(疗效良好=0,疗效不良=1),将表1、2中差异有统计学意义因素作为自变量,纳入Logistic回归分析,

表2 不同疗效患者 miR-146a、CRP/ALB、Th17/Treg 水平对比 ($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Comparison of miR-146a, CRP/ALB, Th17/Treg levels in patients with different therapeutic effects ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	miR-146a	CRP/ALB	Th17/Treg
疗效良好组	65	3.25±0.87	2.58±0.76	0.32±0.09
疗效不良组	15	4.84±1.16	3.26±1.07	0.68±0.17
t值		5.977	2.880	11.553
P值		<0.001	0.005	<0.001

结果显示病程、miR-146a、CRP/ALB、Th17/Treg水平均为儿童Hp感染相关性胃炎疗效影响因素($P<0.05$)。见表3。

表3 儿童 Hp 感染相关性胃炎疗效影响因素

Table 3 Factors influencing the curative effect of gastritis associated with Hp infection in children

因素	β 值	S.E.值	Wald χ^2	R值	95%CI	P值
病程	1.267	0.302	17.594	3.549	2.149~5.862	<0.001
miR-146a	1.643	0.311	27.908	5.170	3.525~7.584	<0.001
CRP/ALB	1.594	0.317	25.274	4.922	3.495~6.931	<0.001
Th17/Treg	1.687	0.309	29.814	5.404	4.027~7.253	<0.001

注:赋值:病程:<2年=1,≥2年=2;miR-146a、CRP/ALB、Th17/Treg水平:以平均数为界,<平均数=1,≥平均数=2。

2.4 miR-146a、CRP/ALB、Th17/Treg 水平对儿童 Hp 感染相关性胃炎疗效的预测价值

绘制 miR-146a、CRP/ALB、Th17/Treg水平对儿童Hp感染相关性胃炎疗效的预测价值的ROC曲线,显示联合预测AUC最大,且>0.9,具有良好预测效能,最佳敏感度、特异度分别为86.67%、95.38%($P<0.05$)。见表4,图1。

表4 miR-146a、CRP/ALB、Th17/Treg 水平对儿童 Hp 感染相关性胃炎疗效的预测价值

Table 4 The predictive value of miR-146a, CRP/ALB, Th17/Treg levels, and pathological changes under gastroscopy on the curative effect of children with Hp infection-related gastritis

指标	AUC	95%CI	Z值	截断值	敏感度 (%)	特异度 (%)	P值
miR-146a	0.812	0.709~0.891	4.341	>3.85	73.33	81.54	<0.001
CRP/ALB	0.757	0.648~0.846	3.800	>2.98	73.86	72.31	<0.001
Th17/Treg	0.856	0.760~0.924	6.717	>0.52	80.00	87.69	<0.001
联合预测	0.964	0.897~0.993	21.258		86.67	95.38	<0.001

3 讨论

慢性胃炎为临床最常见消化系统疾病之一,其患病率高居各种胃病首位^[10],大量研究^[11-12]证实,长期反复的Hp感染可导致胃黏膜萎缩、肠上

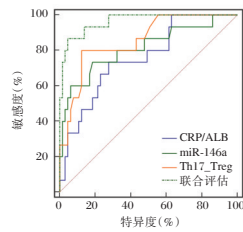


图1 各指标预测疗效的ROC曲线

Figure 1 The ROC curve of each index predicting curative effect

皮化生,甚至发生恶性病变。因此,尽早给予有效治疗对改善Hp感染相关性胃炎患者预后至关重要,而治疗过程中准确评估病情变化对调整治疗干预措施具有重要指导价值。

本研究发现,奥美拉唑三联疗法治疗疗效不良Hp感染相关性胃炎患儿病程明显高于疗效良好患儿,进一步经多因素分析发现病程 ≥ 2 年也是儿童Hp感染相关性胃炎疗效的独立危险因素之一。Hp细胞毒素能破坏胃黏膜完整性,随着患儿病程延长,Hp感染引起的胃黏膜破坏越严重,从而增加治疗难度,预后越差。

本研究还发现,疗效不良患儿miR-146a、CRP/ALB、Th17/Treg水平均高于疗效良好患儿,提示上述指标均与患儿疗效有关。miR-146a是miR-146家族成员,其基因编码位于人染色体5q33.3处,可通过抑制核因子- κ B通路活化发挥抗炎作用^[13]。国内相关研究^[14]发现,肺炎患儿外周血miR-146a水平明显升高,其表达水平与炎症因子肿瘤坏死因子- α 、白介素-6、白介素-8呈正相关,可能通过上调炎症因子表达参与疾病进展。国外一项研究^[15]显示,miR-146a能够调节受体细胞的抗感染能力,使其更容易受病原体侵袭发生感染。据此笔者推测miR-146a水平升高可促进炎症因子释放、抑制受体细胞的抗感染能力,从而促进Hp感染相关性胃炎患儿病情加重,最终影响治疗效果。研究^[16]显示,Hp细胞壁上存在脂多糖,具有诱导炎症细胞分泌炎症因子的作用,可引发胃黏膜发生炎症反应损伤。CRP是反映炎症状态的敏感性指标,有文献^[17]证实,CRP/ALB可较好预测感染性疾病的发生,且其预测效果优于单纯使用CRP、降钙素原等常规炎症标志物。Th17与Treg的动态平衡是维持机体免疫防御能力的重要机制之一,其中Th17细胞是T淋巴细胞亚群的一员,具有诱导炎症反应的作用,其表达增加可促进白细胞介素17、白细胞介素22等多种炎症因

子的产生,且能促使炎症因子在炎症部位聚集,加重炎症损伤^[18-19]。而Treg细胞是一种具有免疫抑制活性的调节性T细胞,具有抑制炎症因子分泌的作用^[20]。CRP/ALB、Th17/Treg水平升高均提示患儿局部炎症反应加重,对胃黏膜的损伤增加,病情越严重,因此治疗效果越差。

本研究进一步通过ROC曲线分析,发现miR-146a、CRP/ALB、Th17/Treg水平在预测儿童Hp感染相关性胃炎疗效方面均具有一定价值,尤其是各指标联合预测的AUC达到0.964,预测价值较高,可为临床预估患儿治疗效果提供重要参考,从而指导治疗方案的调整。

综上所述,Hp感染相关性胃炎患儿miR-146a、CRP/ALB、Th17/Treg水平越高,疗效越差,早期检测各指标水平可辅助临床预测患儿疗效。本研究存在样本量较少的不足,研究结果可能存在一定误差,仍需通过大样本研究进一步验证。

参考文献

- [1] 房涛,王歌文,赵佳华. 益胃汤加减联合三联疗法对Hp感染所致慢性胃炎患者血清炎症因子、HP清除率的影响[J]. 陕西中医, 2019, 40(11): 1598-1601.
- [2] 吕华军,金盛锋,何国栋. 慢性胃炎Hp感染与IL-18、hs-CRP、TNF- α 因子表达的相关性研究[J]. 全科医学临床与教育, 2020, 18(5): 446-448.
- [3] Kishikawa H, Ojiro K, Nakamura K, et al. Previous Helicobacter pylori infection-induced atrophic gastritis: A distinct disease entity in an understudied population without a history of eradication[J]. Helicobacter, 2020, 25(1): e12669.
- [4] 王燕妮,汤勉. 儿童胃炎Hp感染与其病理关联性分析[J]. 中国妇幼健康研究, 2020, 31(3): 351-354.
- [5] 虞华儿. 幽门螺杆菌感染与儿童哮喘发病及微小RNA-146a变化的关系[J]. 中国妇幼保健, 2020, 35(24): 4850-4852.
- [6] 庞苏迎,童天夫,李美,等. NLR、PLR及CRP/ALB对老年脑卒中相关性肺炎的诊断和预后评估价值[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(21): 2599-2603.
- [7] 李焱,管磊,袁道勇,等. 滋肾润肺平喘汤治疗哮喘缓解期疗效及对儿童Th17/Treg影响研究[J]. 陕西中医, 2021, 42(2): 204-208.
- [8] 中华医学会消化病学分会. 中国慢性胃炎共识意见(2017年,上海)[J]. 中华消化杂志, 2017, 37(11): 721-738.
- [9] 周思清,李清. 针灸疗法配合奥美拉唑三联疗法对小儿幽门螺杆菌性胃炎的疗效及其对炎症因子水平和Hp清除的影响[J]. 抗感染药学, 2019, 16(2): 349-352.
- [10] Bacha D, Walha M, Ben Slama S, et al. Chronic gastritis classifications[J]. Tunis Med, 2018, 96(7): 405-410.

(下转第1598页)

Lp-PLA2、Hcy 及 γ -GGT 在下肢动脉硬化闭塞症中的表达及临床意义

张温温 孙灿龙 吴延庆 史洪涛*

[摘要] **目的** 分析脂蛋白相关磷脂酶 A2(Lp-PLA2)、同型半胱氨酸(Hcy)及 γ -谷氨酰转肽酶(γ -GGT)在下肢动脉硬化闭塞症(ASO)中的表达及临床意义。**方法** 收集本院2017年1月至2020年1月收治的112例ASO患者纳入ASO组,另选取同期52例体检的健康老年人作为对照组。统计ASO患者中踝肱指数(ABI)大小,并比较不同人群Lp-PLA2、Hcy及 γ -GGT水平。绘制散点图,采用Spearman相关性分析法分析上述因子与ASO患者病情的相关性。**结果** ASO组Lp-PLA2、Hcy及 γ -GGT水平均显著高于对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。ASO患者Lp-PLA2、Hcy及 γ -GGT水平:I期<II期<III期,差异均有统计学意义($P<0.05$)。ABI ≤ 0.43 者50例,ABI >0.43 者62例。ABI ≤ 0.43 组Lp-PLA2、Hcy及 γ -GGT水平均显著高于ABI >0.43 组,ABI低于ABI >0.43 组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。相关性分析结果显示,Lp-PLA2、Hcy、 γ -GGT水平与ABI均呈负相关($P<0.05$)。**结论** Lp-PLA2、Hcy及 γ -GGT在ASO中呈异常表达,且与ABI具有一定相关性,通过检测上述因子可有效评估ASO患者病情严重程度。

[关键词] 脂蛋白相关磷脂酶A2;同型半胱氨酸; γ -谷氨酰转肽酶;下肢动脉硬化闭塞症

The expression and clinical significance of Lp-PLA2, Hcy and γ -GGT in patients with lower extremity arteriosclerosis obliterans

ZHANG Wenwen, SUN Canlong, WU Yanqing, SHI Hongtao*

(The First Affiliated Hospital, and College of Clinical Medicine of Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan, China, 471003)

[ABSTRACT] **Objective** To analyze the expression and clinical significance of lipoprotein-associated phospholipase A2 (Lp-PLA2), homocysteine (Hcy) and γ -glutamyl transpeptidase (γ -GGT) in patients with lower extremity arteriosclerosis obliterans (ASO). **Methods** The 112 ASO patients admitted to this hospital from January 2017 to January 2020 were selected as the ASO group. In the same period, 52 elderly people who had a physical examination were selected as the control group. The Ankle brachial index (ABI) in ASO patients was counted, and the levels of Lp-PLA2, Hcy and γ -GGT in different groups were compared. Scatter plots were drawn, and Spearman correlation analysis method was used to analyze the correlation between the above factors and the condition of ASO patients. **Results** The levels of Lp-PLA2, Hcy and γ -GGT in the ASO group were significantly higher than those in the control group, and the differences were all statistically significant ($P<0.05$). The levels of Lp-PLA2, Hcy and γ -GGT in ASO patients at stage I were significantly lower than those of patients at stage II and III, and the level of patients at stage III was the highest, and the differences were all statistically significant ($P<0.05$). 50 cases had ABI ≤ 0.43 , 62 cases had ABI >0.43 . The levels of Lp-PLA2, Hcy and γ -GGT in the ABI ≤ 0.43 group were significantly higher than those in the ABI >0.43 group, and the

基金项目:河南省科技攻关基金资助项目(LHGJ20171161)

作者单位:河南科技大学临床医学院,河南科技大学第一附属医院,河南,洛阳471003

*通信作者:史洪涛, E-mail: xueguan2000@163.com

differences were all statistically significant ($P < 0.05$). The results of correlation analysis showed that Lp-PLA2, Hcy, γ -GGT levels were negatively correlated with ABI ($P < 0.05$). **Conclusion** Lp-PLA2, Hcy and γ -GGT are abnormally expressed in ASO and have a certain correlation with ABI. The detection of the above factors can effectively assess the severity of ASO patients.

[KEY WORDS] Lipoprotein-associated phospholipase A2; Homocysteine; γ -glutamyl transpeptidase; Arteriosclerosis obliterans

下肢动脉硬化闭塞症(Arteriosclerosis obliterans, ASO)属于一种慢性疾病,主要由于动脉粥样硬化累及下肢动脉导致动脉狭窄或闭塞,从而使肢体出现缺血症状,是全身动脉硬化性疾病在下肢的表现^[1-2]。ASO病变特点以累及大中动脉为主。近年来,ASO已成为血管外科常见病与多发病,发病率约为0.6%~9.2%,多好发于老年人^[3]。药物、外科手术及血管腔内治疗等方式是临床上治疗ASO的常用手段,虽具有一定疗效,但ASO仍是导致患者截肢、致残的主要原因之一。诸多研究均证实,在ASO发生、发展过程中,脂蛋白相关磷脂酶A2(Lipoprotein associated phospholipase A2, Lp-PLA2)、同型半胱氨酸(Homocysteine, Hcy)及 γ -谷氨酰转肽酶(γ -Glutamyl transpeptidase, γ -GGT)等因子扮演着重要的角色^[4-5]。本研究将进一步阐述上述因子在不同类型、分期的ASO患者中的表达情况及其意义。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集本院2017年1月至2020年1月收治的112例ASO患者作为ASO组。纳入标准:①所有患者均符合ASO的诊断标准^[6];②临床资料完整,无缺损或丢失;③伴有间歇性跛行、下肢静息痛等下肢症状;④年龄 ≥ 60 岁,且无意识障碍。排除标准:①合并血液病、泌尿系感染者;②合并严重肝肾疾病、感染性疾病者;③下肢深静脉血栓及严重皮肤损伤或溃疡者;④动脉钙化者。男77例,女35例,平均年龄(64.63 ± 8.49)岁;平均体重指数(24.15 ± 3.23) kg/m^2 ;Fontaine分期^[7]:I期,间歇性跛行38例;II期,患肢有静息痛43例;III期,患肢有溃疡或坏疽31例。另选取同期52例体检的健康老年人作为对照组,男40例,女12例,平均年龄(65.25 ± 9.01)岁;平均体重指数(23.51 ± 2.42) kg/m^2 。两组性别、年龄等一般资料比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。本研究经医院医学伦理委员会批准通过,受试者均签署知情同意书。

1.2 方法

清晨抽取所有受检者5 mL空腹外周静脉血,置于3 000 r/min速度下离心10 min,离心半径10 cm,随后抽取上层血清,置于 -80°C 环境中保存。Lp-PLA2采用散射比浊法检测,Hcy、 γ -GGT采用酶联免疫吸附法检测,试剂盒均由南京建成生物公司提供。详细步骤严格按照说明书执行。

1.3 观察指标

①比较两组Lp-PLA2、Hcy及 γ -GGT水平。②计算ASO患者中ABI大小情况,并比较不同ABI大小及不同分期患者的Lp-PLA2、Hcy及 γ -GGT水平。ABI测量:采用8MHz多普勒听诊器先对肱动脉收缩压进行测量,随后在踝部胫前动脉、胫后动脉、腓动脉或足背动脉之间选择动脉搏动最强的血管测量踝部,所测踝部动脉与肱动脉收缩压之比为踝肱指数。参考Gregson等^[8]文献,以0.43为界限,将患者分为ABI > 0.43 组,ABI ≤ 0.43 组。

1.4 统计学方法

采用SPSS 22.0统计软件进行统计分析,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,行 t 检验;相关性采用spearman相关性分析法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ASO组、对照组Lp-PLA2、Hcy及 γ -GGT水平比较

ASO组Lp-PLA2、Hcy及 γ -GGT水平均显著高于对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表1。

表1 ASO组、对照组Lp-PLA2、Hcy及 γ -GGT水平比较
($\bar{x} \pm s$)

Table 1 comparison of Lp-PLA2, Hcy and TNF - α between ASO group and control group γ -GGT level ($\bar{x} \pm s$)				
组别	<i>n</i>	Lp-PLA2($\mu\text{g}/\text{L}$)	Hcy($\mu\text{mol}/\text{L}$)	γ -GGT(U/L)
ASO组	112	64.76 \pm 7.15	26.53 \pm 3.84	40.36 \pm 7.23
对照组	52	26.87 \pm 3.63	10.63 \pm 2.31	22.41 \pm 2.44
<i>t</i> 值		36.074	27.603	17.423
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001

2.2 ASO不同Fontaine分期患者Lp-PLA2、Hcy及γ-GGT水平比较

ASO患者Lp-PLA2、Hcy及γ-GGT水平：I期<II期<III期，差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表2。

表2 ASO不同Fontaine分期患者Lp-PLA2、Hcy及γ-GGT水平比较($\bar{x}\pm s$)

Table 2 comparison of Lp-PLA2, Hcy and Hcy in patients with different Fontaine stages of ASO γ- GGT level ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	Lp-PLA2 (μg/L)	Hcy (μmol/L)	γ-GGT (U/L)
I期	38	55.25±4.21	19.68±3.67	28.66±4.99
II期	43	63.25±7.46 ^a	27.54±2.19 ^a	41.63±8.59 ^a
III期	31	78.51±10.32 ^{ab}	33.52±6.34 ^{ab}	52.94±10.03 ^{ab}
F值		82.700	95.570	78.800
P值		<0.001	<0.001	<0.001

注：与I期比较，^a $P<0.05$ ；与II期比较，^b $P<0.05$ 。

2.3 ASO不同ABI大小患者的Lp-PLA2、Hcy、γ-GGT水平及ABI比较

ABI≤0.43者50例，ABI>0.43者62例。ABI≤0.43组Lp-PLA2、Hcy及γ-GGT水平均显著高于ABI>0.43组，ABI低于ABI>0.43组，差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表3。

表3 ASO不同ABI大小患者的Lp-PLA2、Hcy、γ-GGT水平及ABI比较($\bar{x}\pm s$)

Table 3 Comparison of Lp-PLA2, Hcy, Hcy in ASO patients with different ABI sizes γ- GGT level and ABI ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	Lp-PLA2 (μg/L)	Hcy (μmol/L)	γ-GGT (U/L)	ABI
ABI≤0.43组	50	72.63±8.14	31.71±6.11	45.63±9.84	0.25±0.06
ABI>0.43组	62	58.41±6.35	22.35±2.02	36.11±5.13	0.63±0.11
t值		10.387	11.329	6.592	21.926
P值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

2.4 Lp-PLA2、Hcy、γ-GGT水平与ABI相关性分析

相关性分析结果显示，Lp-PLA2($r=-0.587$)、Hcy($r=-0.641$)、γ-GGT($r=-0.465$)水平与ABI均呈负相关($P<0.05$)。

3 讨论

目前有关ASO发病机制的报道显示，内皮功能障碍是发生动脉粥样硬化的早期事件，与动脉粥样斑块发生、进展关系密切。近年来，“内皮损伤反应学说”备受广大学者的关注，另一种主要学说是脂质浸润学说。国内外相关研究发现，合并冠状动脉疾病的ASO比率显著高于其他疾病，高达70%^[9]。Lp-PLA2、Hcy及γ-GGT等生物学因子

与ASO之间的关系十分密切。

Lp-PLA2是一种磷脂酶超家族成员，由成熟的巨噬细胞合成分泌，肥大细胞在受到炎症刺激时会有少量分泌，该物质的分泌受到炎症介质的调节^[10]。Lp-PLA2对氧化卵磷脂具有水解作用，其生成产物会对血管内皮造成损伤，引起单核细胞浸润，使泡沫细胞发生沉积，进而促进动脉粥样硬化^[11]。吴爱成等^[12]研究发现，伴有冠状动脉粥样硬化者Lp-PLA2水平会显著上升，Lp-PLA2一定程度上参与了动脉粥样硬化的病理发展过程。Hcy是一种含硫氨基酸，是甲硫氨酸代谢的中间产物。高Hcy会导致血管内皮产生羟自由基、过氧化物等氧自由基，并且导致清除氧自由基的酶能力降低，引起蛋白质损伤，破坏弹力胶原纤维；同时可刺激血管平滑肌细胞增生，促进硬化斑块形成，是导致血管硬化的独立危险因素之一^[13]。Kozakova等^[14]通过比较有斑块ASO患者与非斑块ASO患者的Hcy水平，发现两组比较差异有统计学意义；在ASO患者不同阶段中，Hcy均发挥作用。γ-GGT主要存在于人体肝胆系统中，与肥胖、高血脂症、高血压等代谢性疾病具有一定关系。最近流行病学证实血清γ-GGT可作为预测心血管疾病的生化标志物^[15]。目前颈动脉、冠状动脉粥样硬化中均发现有γ-GGT活性表达，由于γ-GGT可催化低密度脂蛋白氧化反应，而氧低密度脂蛋白在动脉粥样硬化中具有重要作用，因此γ-GGT参与了动脉粥样硬化^[16]。进一步具体比较不同分期、ABI大小的ASO患者Lp-PLA2、Hcy及γ-GGT水平发现，不同分期、ABI大小的ASO患者上述因子水平比较差异有统计学意义。故推测Lp-PLA2、Hcy及γ-GGT水平的高低可能是评估ASO病情严重程度的有效指标。

ABI是评估周围血管闭塞性疾病病变程度的一种有效手段，其很好地消除了年龄、全身血压计动脉壁硬化等因素对下肢血压绝对值的影响，可较为准确地反映下肢动脉缺血的病变程度^[17]。本研究通过分析Lp-PLA2、Hcy、γ-GGT水平与ABI的相关性，发现Lp-PLA2、Hcy、γ-GGT水平越高者，ABI越低，呈显著负相关。ABI大小反映ASO患者严重程度，即患者ABI越低，病情越严重，同时Lp-PLA2、Hcy、γ-GGT水平越高，反之亦然。可见当Lp-PLA2、Hcy、γ-GGT水平低时，ASO的发病进度放缓。上述因子可作为评估ASO严重程度生物指标。

综上所述,Lp-PLA2、Hcy及 γ -GGT在ASO中呈异常表达,且与ABI具有一定相关性。通过检测上述因子可有效评估ASO患者病情严重程度

参考文献

- [1] 肖华,高远,李玉萍,等.动脉粥样硬化性脑梗死血清LP-PLA2、MMP-13与动脉狭窄程度的关系[J].分子诊断与治疗杂志,2021,13(2):225-228.
- [2] 高向琴,张云霞.彩色多普勒超声在下肢动脉硬化闭塞症诊断中的价值及对临床治疗指导意义研究[J].陕西医学杂志,2019,48(6):759-761.
- [3] 范则杨,王霄英.下肢动脉硬化闭塞症CTA检查的诊断思路及结构式报告[J].放射学实践,2017,32(12):1300-1305.
- [4] Baran I, Düzgün AP, Mumcuoğlu, et al. Chronic lower extremity wound infection due to *Kerstersia gyiorum* in a patient with Buerger's disease: a case report [J]. *Bmc Infect Dis*, 2017, 17(1):608.
- [5] 袁丁,赵纪春,王铁皓,等.下肢动脉硬化闭塞症最新指南解读及意义[J].中国普外基础与临床杂志,2018,25(1):31-37.
- [6] Grooms DR, Diekfuss JA, Ellis JD, et al. A Novel Approach to Evaluate Brain Activation for Lower Extremity Motor Control [J]. *J Neuroim*, 2019, 29(5):1047-1048.
- [7] 王辉,蒋永兴,田野.下肢动脉硬化闭塞症:炎症机制与抗炎治疗的研究进展[J].心血管病学进展,2020,41(2):77-80.
- [8] Gregson JM, Freitag DF, Surendran P, et al. Genetic invalidation of Lp-PLA2 as a therapeutic target: Large-scale study of five functional Lp-PLA2-lowering alleles [J]. *Europ J Prev Cardiol*, 2017, 24(5):492-504.
- [9] 霍静,姜海军,李伟,等. Hs-CRP、Hcy、 β 2-MG和UA水平在老年高血压合并下肢动脉硬化闭塞症患者中的风险评估价值[J].中国心血管杂志,2021,26(2):165-168.
- [10] 王福乐,高占峰,王淑娟.热休克蛋白27及其磷酸化在下肢动脉硬化闭塞症中的作用[J].临床和实验医学杂志,2019(16):1791-1792.
- [11] 陆怡德,吴佳宁,彭奕冰.血清Lp-PLA2水平在急性缺血性卒中患者中的临床应用[J].检验医学,2020,35(2):129-133.
- [12] 吴爱成,唐恒锋,黄国清.血清hsCRP、MCP-1、CTRP9、APN、Lp-PLA2、Fractalkine和RANTES因子水平与无症状冠状动脉粥样硬化的关系[J].心血管康复医学杂志,2018,27(5):46-48.
- [13] 李顺钧,王慧,浦苏颖,等.急性脑梗死患者血清ox-LDL、Hcy、LDL水平变化及检测临床意义[J].陕西医学杂志,2019,48(5):664-666+670.
- [14] Kozakova M, Morizzo C, Penno G, et al. Plasma Homocysteine and Cardiovascular Organ Damage in a Population with a High Prevalence of Risk Factors [J]. *J Clin Endocrinol Metabol* 2020, 105(8):1745-1746.
- [15] 高秀荣,吉宗珊,于庆智,等.血清 γ -谷氨酰转肽酶水平与老年2型糖尿病患者并发急性冠脉综合征的相关性分析[J].现代生物医学进展,2017,17(12):2271-2274.
- [16] 侯建同,鄢高亮,朱伯谦,等.血清 γ 谷氨酰转肽酶对急性冠脉综合征患者介入治疗后发生造影剂肾病的影响[J].现代医学,2017,45(1):28-32.
- [17] Kozakova M, Gastaldelli A, Morizzo C, et al. Gamma-glutamyltransferase, arterial remodeling and prehypertension in a healthy population at low cardiometabolic risk [J]. *J Hum Hypert*, 2020, 104(11):1-9.

(上接第1594页)

- [11] 柴蕴珠,王艳红,徐宏蕊.消化内科住院患者幽门螺旋杆菌感染情况[J].华南预防医学,2021,47(1):77-80.
- [12] Ansari S, Yamaoka Y. *Helicobacter pylori* Virulence Factors Exploiting Gastric Colonization and its Pathogenicity [J]. *Toxins (Basel)*, 2019, 11(11):677.
- [13] Fei Y, Chaulagain A, Wang T, et al. MiR-146a down-regulates inflammatory response by targeting TLR3 and TRAF6 in Cocksackievirus B infection [J]. *RNA*, 2020, 26(1):91-100.
- [14] 张薇,孙浩森,王洁.肺炎患儿外周血miR-146a、miR-155表达水平及其与T淋巴细胞亚群和炎症因子的关系[J].热带医学杂志,2019,19(11):1404-1407.
- [15] Nahand JS, Karimzadeh MR, Nezamnia M, et al. The role of miR-146a in viral infection [J]. *IUBMB Life*, 2020, 72(3):343-360.
- [16] 罗微,孙颖,张晓方,等.幽门螺杆菌致病因子研究新进展[J].国际免疫学杂志,2019,42(4):402-406.
- [17] 程一峰. CRP/Alb比值对胰十二指肠切除术后并发症的预测价值[D].新疆:新疆医科大学,2019.
- [18] 王娟娟,何孝亮,陈雨青. TCZ治疗对sJIA患儿外周血Th17/Treg、炎症指标的影响[J].分子诊断与治疗杂志,2020,12(11):1448-1451,1456.
- [19] Li B, Ren Q, Ling J, et al. The change of Th17/Treg cells and IL-10/IL-17 in Chinese children with Henoch-Schonlein purpura: A PRISMA-compliant meta-analysis [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2019, 98(3):e13991.
- [20] 王亚洲,何鹏,王丹虹,等.儿童支原体肺炎感染Th17/Treg平衡及IL-6/STAT3、IL-2/STAT5通路影响[J].中华医院感染学杂志,2020,30(7):1043-1047.

高通量测序在一罕见脊柱肋骨发育不全病例诊断中的应用

曾玉坤^{1,2} 丁红珂^{1,2} 刘玲^{1,2} 余丽华^{1,2} 张彦^{1,2*}

[摘要] **目的** 分析一超声结构异常胎儿可能的致病基因及突变位点,为临床遗传咨询提供指导。**方法** 对一超声检测提示脊柱发育异常的胎儿行医学外显子组测序,采用生物信息学方法针对致病基因突变位点进行氨基酸保守型分析及蛋白二、三级结构预测,鉴定其致病性。**结果** 发现与胎儿临床表现相关的致病基因 *HES7* 存在 c.674T>C (p.F225S) 纯合变异,该位点分别遗传自父母,通过分析预测,变异位点能使得蛋白质二级、三级结构相比原始结构发生较显著变化。**结论** *HES7* 基因 c.674T>C (p.F225S) 位点的纯合突变可能是导致胎儿脊柱发育异常的致病因素,与IV型脊椎肋骨发育不全(SCDO4)疾病的发生相关。

[关键词] 高通量测序; IV型脊柱肋骨发育不全; *HES7* 基因

Application of high-throughput sequencing in the diagnosis of a rare case of spondylocostal dysostosis

ZENG Yukun^{1,2}, DING Hongke^{1,2}, LIU Ling^{1,2}, YU Lihua^{1,2}, ZHANG Yan^{1,2*}

(1. Medical Genetic Center, Guangdong Women and Children Hospital, Guangzhou, Guangdong, China, 511442; 2. Maternal and Children Metabolic-Genetic Key Laboratory, Guangdong Women and Children Hospital, Guangzhou, Guangdong, China, 511442)

[ABSTRACT] **Objective** To analyze the possible pathogenic genes and mutation sites of a fetus with abnormal ultrasound structure to provide guidance for clinical genetic counseling. **Methods** Medical exome sequencing was performed on a fetus with abnormal spine dysplasia detected by ultrasound, and bioinformatics methods were used to conduct amino acid conservative analysis and protein secondary and tertiary structure prediction at the mutation site of the disease-causing gene to identify its pathogenicity. **Results** The pathogenic gene *HES7* and the homozygous variant c.674T>C (p.F225S), which are related to the clinical manifestations of the fetus, were discovered. The locus was inherited from the parents. Through analysis and prediction, the mutation site can make the secondary and tertiary structure of the protein more significant changes than the original structure. **Conclusion** The homozygous mutation at the c.674T>C (p.F225S) locus of the *HES7* gene may be a pathogenic factor leading to fetal spinal dysplasia, and is related to the occurrence of type IV spondylocostal dysostosis (SCDO4) disease.

[KEY WORDS] High-throughput sequencing; SCDO4; *HES7* gene

脊椎肋骨发育不全(spondylocostal dysostosis, SCDO)是一种以脊柱/脊椎严重分节障碍和肋骨发育不良为表现的罕见先天性疾病,一般呈常染色体隐性遗传,其临床特点主要表现为椎骨和肋

骨发育异常,包括椎骨节段异常、胸骨变短、肋骨排列异常,同时常伴肋骨减少,胸廓畸形等^[1-3]。该疾病发病机制较复杂,通过临床表型明确诊断及分型十分困难。本研究通过对一例超声结构明显

作者单位:1. 广东省妇幼保健院医学遗传中心,广东,广州 511442

2. 广东省妇幼保健院妇幼代谢与遗传病重点实验室,广东,广州 511442

*通信作者:张彦, E-mail: zhangyan1981_2003@aliyun.com

异常胎儿及其父母采用高通量测序的方法进行检测,后续针对发现的基因变异位点进行致病性预测分析,检测结果为孕妇本人及临床医生进行遗传咨询及指导提供了科学依据。

1 研究对象与方法

1.1 病例资料

孕妇,29岁,孕19周,2019年8月因超声发现胎儿脊柱发育异常来本院产前诊断中心就诊。检测结果提示:胎儿全段脊柱排列不齐,椎体大小不一,多个椎体缺失、融合,脊柱长度缩短(约56 mm)(图1)。孕妇曾有不良孕产史:2013足月曾剖宫产脊柱裂畸形患儿,2017年再次因超声发现胎儿脊柱裂引产。受检者先后进行羊水染色体核型分析及染色体微阵列基因芯片检测(chromosomal microarray, CMA),均未见异常。为进一步明确病因,通过采用高通量测序的方法针对孕妇本人及丈夫以及胎儿进行医学外显子组序列分析。



注: A 为胎儿脊柱椎体大小不一; B 为脊柱长度缩短(56.6 mm); C 为胎儿全段脊柱排列不齐,椎体大小不一,多个椎体缺失、融合。

图1 胎儿脊柱超声影像图

Figure 1 Ultrasound image of fetal spine

1.2 方法

1.2.1 DNA提取

使用乙二胺四乙酸二钾抗凝管抽取孕妇本人及丈夫外周血各3 mL。采用血液基因组DNA提取试剂盒(厦门致善生物科技股份有限公司),培养过的羊水样本采用Qiagen DNA MINI Kit 50试剂盒进行DNA提取,提取的全基因组DNA均使用nanodrop2000(Thermo,美国)检测,外周血DNA大于80 ng/ μ L,羊水DNA大于100 ng/ μ L, A260/A280在(1.8~2.0)之间,于-20 $^{\circ}$ C中保存备用。

1.2.2 羊水样本母体污染鉴定

采用荧光PCR-毛细管电泳法同时检测胎儿和母亲13个微卫星多态标记位点,防止因母源污染而引起误诊。

1.2.3 医学外显子组序列分析

将提取的孕妇及丈夫外周血全基因组DNA及羊水DNA各100 μ L,送至广州嘉检医学检测有限公

司进行与人类疾病相关的4 000个已知基因编码外显子区域及侧翼区的序列分析。测序后获得的原始数据通过使用BWA软件进行序列比对,采用GATK和Var Scan软件对变异进行识别,包括单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)、插入与缺失等进行检测、注释和统计分析。利用Annovar软件从外部数据库进行变异位点注释,以评估给定的序列变异的影响。根据数据分析结果,参考dbSNP数据库和HGMD数据库找出可能的致病突变。

1.2.4 Sanger测序验证

根据经医学外显子组高通量测序后分析结果,使用Sanger测序方法对胎儿及父母变异位点进行验证。采用Primer5软件设计引物,用聚合酶链反应(PCR)技术扩增HES7基因(NM_001165967)变异位点c.674T>C(p.F225S)相应外显子及其侧翼序列,引物由天一辉远广州基因科技有限公司合成,引物序列为:HES7-EX4F:CTTGG-TATCTCTGCGCCC, HES7-EX4R: CCTCGGGCT-GGAGTCTCTAC。按以下条件进行进行PCR扩增:LATaq预混液12.5 μ L,甜菜碱5 μ L,正、反向引物各1 μ L,样本DNA 1 μ L,无核酸水至25 μ L; PCR反应条件为94 $^{\circ}$ C预变性5 min; 94 $^{\circ}$ C变性30 s, 62 $^{\circ}$ C退火30 s, 72 $^{\circ}$ C延伸40 s,进行40个循环;最后72 $^{\circ}$ C延伸10 min。PCR产物送至天一辉远广州基因科技有限公司进行Sanger测序。

1.2.5 变异位点致病性分析

1.2.5.1 突变部分氨基酸物种间保守性分析 通过数据库查找具有代表性的不同物种间该位点氨基酸保守性分析,以期揭示突变区域是否高度保守。

1.2.5.2 蛋白质一级结构比对分析 通过TheExPASY软件的Protparam工具(<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>)对正常蛋白和突变蛋白计算主要理化性质。

1.2.5.3 蛋白二级结构比对分析 应用TheExPASY(<http://www.expasy.ch/>)和蛋白质二级结构预测软件predictprotein(<https://www.predictprotein.org/>)对蛋白二级结构进行预测和比对,分析鉴别正常与突变蛋白在变异位点附近是否会造成二级结构的改变,进而推断变异是否存在致病性。

1.2.5.4 蛋白三级结构对比分析 应用SWISS-MODEL(<http://swissmodel.expasy.org/>)对正常蛋白和突变蛋白三级结构进行预测和比对,初步推断突变对HES7蛋白三级结构的影响情况,进一步

推测变异是否存在致病性。

1.2.5.5 PolyPhen-2 软件预测变异是否存在致病性
通过登录软件 polyphen-2 在线网址 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), 按照要求输入相关信息, 对变异位点进行致病性预测分析。

2 结果

2.1 医学外显子组测序结果

2.1.1 高通量测序数据质控参数

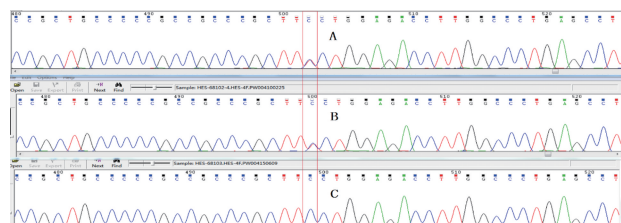
基因包检测区间覆盖有人类基因组中致病机制明确的 4 000 个相关基因, 74 566 个编码区总共含有 12 424 088 个碱基。平均覆盖深度 256+/-180X, 大于 10X 覆盖区间占 97.4%, 大于 20X 覆盖区间占 94.4%, 参考序列版本号: GRCh37/hg19。

2.1.2 相关基因医学外显子检测突变结果

通过数据分析后发现先证者 *HES7* 基因存在 (NM_001165967)c.674T>C(p.F225S)位点纯合变异。

2.2 Sanger 测序验证

对 PCR 产物进行 Sanger 测序, 发现先证者 *HES7* 基因 c.674T>C(p.F225S)纯合变异, 父母分别为该位点变异携带者, 与高通量测序结果一致。见图 2。



注: A 父亲 *HES7* 基因 c.674T>C(p.F225S)测序图; B 母亲 *HES7* 基因 c.674T>C(p.F225S)测序图; C 胎儿 *HES7* 基因 c.674T>C(p.F225S)。

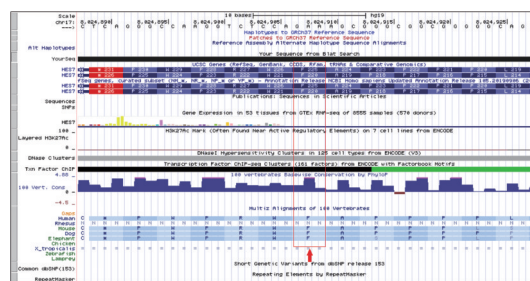
图 2 *HES7* 基因 c.674T>C(p.F225S)位点 sanger 测序图

Figure 2 Sanger sequencing of c.674T>C(p.f225s) of *HES7* gene

2.3 变异位点的致病性分析

2.3.1 突变部分氨基酸物种间保守性分析

通过查找数据库, 分析 *HES7* 基因第 225 位氨基酸在已知的不同物种间的保守性。见图 3。



注: 红色方框与箭头所指处为位点所在密码子编码氨基酸在不同物种间的保守型。

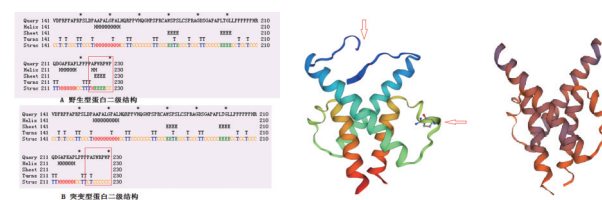
图 3 *HES7* 基因 c.674T>C(p.F225S)在不同物种间保守性分析

Figure 3 *HES7* gene c.674T>C(p.f225s) conservative analysis in different species

2.3.2 蛋白一级结构比对分析

通过 TheExPASy 软件的 ProtParam 工具计算分析正常蛋白和突变蛋白主要理化性质。见表 1。

2.3.3 蛋白二级结构及三级结构比对分析 比对发现 B 蛋白的 α 螺旋与 β 片层结构域发生了变化; C 表示野生型蛋白的三级结构, D 表示突变型蛋白的三级结构, 分析后发现 C 与 D 结构也发生了部分空间结构变化(箭头所指位置)。见图 4。



注: A 为表示野生型蛋白二级结构; B 为表示变异蛋白二级结构。

图 4 野生型与突变型蛋白质的二级结构与三级结构对比图

Figure 4 Comparison of secondary and tertiary structures of wild-type and mutant-type proteins

2.3.4 PolyPhen-2 软件初步预测结果

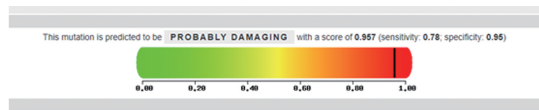
将蛋白质 ID 号与突变氨基酸位置及突变前后的氨基酸简写输入相应位置, 初步预测分值为 0.957。见图 5。

表 1 野生型及突变型理化性质对比

Table 1 physical and chemical properties between wild type and mutant type

野生型与突变型理化性质对比									
组别	分子式	相对分子质量	总原子量	理论 PI 值	消光系数	总平均亲水性	估计半衰期	脂肪系数	不稳定系数
野生型	C ¹¹²⁸ H ¹⁹⁰¹ N ³⁴⁷ O ³⁰⁴ S ⁶	25 280.21	3 586.00	10.49	21 220.00	-0.659	30 小时	74.00	76.45
突变型	C ¹¹²² H ¹⁷⁹⁷ N ³⁴⁷ O ³⁰⁶ S ⁶	25 220.11	3 577.00	10.49	21 220.00	-0.67	30 小时	74.00	76.45

注: 通过 TheExPASy 软件的 ProtParam 工具预测突变前后蛋白质一级结构理化性质相关指标的变化情况。



注:图示为使用PolyPhen-2软件预测后的可能致病性,分值越接近1,可能性越大。

图5 PolyPhen-2 预测 *HES7* 基因 c.674T>C (p.F225S) 位点变异致病可能性

Figure 5 Polyphen-2 predicted the pathogenicity of *HES7* gene c.674T>C (p.f225s)

3 讨论

SCDO 是一种罕见的先天性轴向骨骼发育异常,其在胚胎发育过程中因体节(椎骨,肋骨及相关肌腱和肌肉的前体组织)破裂而形成,脊椎肋骨发育不全可分为五型,相关类型及致病基因分别为:*DLL3*(SCDO1;MIM277300),*MESP2*(SCDO2;MIM 608681),*LFNG*(SCDO3;MIM609813),*HES7*(SCDO4;MIM613686)和*TBX6*(SCDO5;MIM122600)^[4-10]。研究发现这些基因均为 Notch 信号通路的重要组成部分,而 Notch 信号通路通过调节成骨和破骨细胞谱系细胞的分化和功能,进而对软骨形成、骨形成和破骨过程产生重要的调控作用,因而该信号通路的失控将导致骨骼发育异常^[11-13]。目前国内外与 SCDO 相关致病变异报道较为少见,亦无明确的 SCDO 发病率数据。本研究中的人类 *HES7* 基因位于 17p13.1,共有 4 个外显子,是 Notch 信号传导的直接靶基因,通过信号通路调控体节形成从而参与调控脊椎的正常发育。相关文献报道 *HES7* 基因还通过调控 *LFNG*(Notch 信号通路核心基因)等多个效应基因构成复杂的分节时钟,精密地调控体节的分节过程^[14]。Sparrow 等学者^[9]研究发现 *HES7* 基因上的致病突变会导致神经管缺陷,Bessho 等^[15]研究发现在敲除 *HES7* 基因的小鼠中因为体节分节不能完全正常进行,最终会导致肋骨和脊椎的严重畸形。

本研究中常规超声检查发现胎儿存在脊柱异常,孕妇本人又曾多次孕育脊柱异常胎儿,这些均在较大程度上提示该异常可能为某种遗传因素所导致的遗传性疾病,但常规羊水染色体及 CMA 检测结果均未发现异常。为进一步探寻可能存在的致病原因,后续采用高通量测序的方法针对胎儿、孕妇及孕妇丈夫进行家系分析,最终在 *HES7* 基因上发现了一个与胎儿超声表型密切相关的变异位点。通过分析突变位点所在氨基酸在已知不同物种间高度保守性情况,突变前后蛋白的主要理化

性质,二级结构与三级结构,结合相关软件预测结果,综合判断分析后认为该位点为致病变异位点的可能性大,与胎儿的异常表型关系较密切。

由于导致脊柱肋骨发育不全的因素十分复杂,目前国内外与 *HES7* 基因导致的 SCDO4 相关研究报道也较少见,因而针对散发、罕见的遗传疾病的诊断,如果仅凭借影像学及临床医生的经验进行诊断,明确致病因素无疑存在较大困难和漏诊风险。高通量测序的发展以及其在检测基因变异中表现出较高的灵敏度,使得这种技术在临床检测尤其是罕见单基因遗传疾病的诊断中应用越来越普遍。随着技术的进一步发展及检测成本的不断下降,高通量测序技术为今后进一步高效准确寻找到罕见遗传病的相关致病基因,为临床医生更快更有效地进行疾病诊断及后续遗传咨询提供了科学依据。本研究虽然在一定程度上发现了可能的致病基因及位点,但针对于位点的分析均基于生物信息学预测所得,进一步的蛋白表达及功能实验将更有利于进一步阐明变异位点与疾病的关系,这也是本研究下一步需要研究的内容。

参考文献

- [1] McInerney-Leo AM, Sparrow DB, Harris JE, et al. Compound heterozygous mutations in *RIPPLY2* associated with vertebral segmentation defects[J]. *Hum Mol Genet*, 2015, 24(5):1234-1242.
- [2] Dunwoodie SL. Mutation of the fucose-specific β 1, 3 N-acetylglucosaminyltransferase *LFNG* results in abnormal formation of the spine[J]. *Biochim Biophys Acta (BBA) - Molecular Basis Dis*, 2009, 1792(2):100-111.
- [3] Offiah A, Alman B, Cornier AS, et al. Pilot assessment of a radiologic classification system for segmentation defects of the vertebrae[J]. *Am J Med Genet A*, 2010, 152(6):1357-1371.
- [4] Makino Y, Takahashi Y, Tanabe R, et al. Spatiotemporal disorder in the axial skeleton development of the *Mesp2*-null mouse: A model of spondylocostal dysostosis and spondylothoracic dysostosis[J]. *Bone*, 2013, 53(1):248-258.
- [5] Edward HS, Clare LV, Rajnikant LM. Measurement of fracture kyphosis with the Oxford Cobbometer: intra- and interobserver reliabilities and comparison with other techniques[J]. *Spine*, 2005, 30(8):964-968.
- [6] Kaissi AA, Klaushofer K, Grill F. Tomographic assessment of the spine in children with spondylocostaldysostosis syndrome[J]. *Clinics*, 2010, 65(10):953-959.
- [7] Chiapparo G, Lin X, Lescroart F, et al. *Mesp1* controls the speed, polarity, and directionality of cardiovascular progenitor migration[J]. *J Cell Biol*, 2016, 213(4):463-477.

(下转第 1606 页)

CD64、SAA 及 PA 检测在小儿呼吸道感染鉴别诊断中的应用

杜彦辉 张晓莹 蒋仁鹏* 马燕 王广俊

[摘要] **目的** 分析中性粒细胞 CD64 (CD64)、血清淀粉样蛋白 A (SAA) 及血清前白蛋白 (PA) 检测在小儿呼吸道感染鉴别诊断中的应用价值。**方法** 选取 2018 年 1 月至 2020 年 5 月本院收治的 106 呼吸道感染患儿作为研究组, 根据实验室检查结果分为细菌感染组 ($n=54$) 和病毒感染组 ($n=52$)。另选取 98 例同期于本院接受健康体检且结果正常的儿童作为健康对照组。比较各组 CD64、SAA、PA 水平, 计算三者的阳性率, 采用 ROC 曲线评估联合检测诊断小儿急性细菌性呼吸道感染的效能。**结果** 研究组 CD64、SAA 水平高于对照组, PA 水平低于对照组, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。细菌感染组 CD64、SAA 水平高于病毒感染组, PA 水平低于病毒感染组, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。细菌感染组的 CD64、SAA、PA 阳性率 (96.30%、100.00%、98.15%) 高于病毒感染组 (86.54%、92.31%、90.38%), 差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。CD64、SAA、PA 三者联合检测灵敏度、特异度分别为 91.65、92.45, 高于三者单一检测 ($P<0.05$)。**结论** 测定外周血中 CD64、SAA、PA 水平, 可有效鉴别呼吸道感染类型。

[关键词] 呼吸道感染; CD64; SAA; PA

Application of CD64, SAA and PA detection in the differential diagnosis of respiratory tract infections in children

DU Yanhui, ZHANG Xiaoying, JIANG Renpeng*, MA Yan, WANG Guangjun

(Department of Pediatrics, the Third Shandong Provincial Hospital, Jinan, Shandong, China, 250031)

[ABSTRACT] **Objective** To analyze the value of cluster of differentiation 64 (CD64), serum amyloid A (SAA) and serum prealbumin (PA) detection in the differential diagnosis of respiratory tract infections in children. **Methods** The 106 children with respiratory tract infections admitted to this hospital from January 2018 to May 2020 were selected as the research group. According to the results of laboratory tests, the patients were divided into bacterial infection group ($n=54$) and virus infection group ($n=52$). In addition, 98 children who had physical examination in our hospital during the same period and had normal results were selected as the healthy control group. The levels of CD64, SAA, and PA in each group were compared, the positive rates of them were calculated, and the ROC curve was used to evaluate the efficacy of combined detection in the diagnosis of acute bacterial respiratory infections in children. **Results** The CD64 and SAA levels in the study group were higher than those in the control group, and the PA level was lower than that in the control group, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). The levels of CD64 and SAA in the bacterial infection group were higher than those in the virus infection group, and the PA level was lower than that in the virus infection group, the difference was statistically significant ($P<0.05$). The positive rates of CD64, SAA and PA in the bacterial infection group (96.30%, 100.00%, 98.15%) were higher than those in the viral infection group (86.54%, 92.31%, 90.38%), and the difference was statistically significant ($P<0.05$). The sensitivity and specificity of the combined detection of the three indicators were 91.65 and 92.45 respectively, which were significantly higher than

基金项目:山东省医药卫生科研项目(2018WS215)

作者单位:山东省立第三医院儿科,山东,济南 250031

*通信作者:蒋仁鹏, E-mail:jiangrenpeng0207@163.com

those of the single detection of CD64, SAA, and PA ($P<0.05$). **Conclusion** Determination of the levels of CD64, SAA and PA in peripheral blood can effectively identify the types of respiratory tract infections.

[KEY WORDS] Respiratory tract infection; CD64; SAA; PA

小儿呼吸道感染为临床上常见的急性炎症,主要是病毒、细菌等病原体侵犯机体所诱发。而小儿的免疫系统尚未发育完全,机体抵抗力较差,一旦发生呼吸道感染,病情会快速发展加重。若没有及时治疗,不但会对小儿的身体发育造成影响,甚至会造成死亡。呼吸道感染主要分为细菌性感染和病毒性感染,多数患儿在早期都会伴随发热的症状,其他症状并不典型,所以单纯依靠患儿表现出来的症状很难对疾病类型进行诊断及鉴别,导致延误了治疗时间^[1]。因此,选择何种实验室检测指标作为第一时间区分小儿呼吸道感染类型,对患儿的治疗有着十分重要的意义^[2-3]。既往研究发现,中性粒细胞 CD64 (Cluster of differentiation 64, CD64) 在呼吸道感染疾病中具有重要诊断价值,血清淀粉样蛋白 A (Serum amyloid A, SAA) 属于急性时相反应蛋白,当机体受到感染之后,两者含量会显著上升^[4]。同时,血清前白蛋白 (Prealbumin, PA) 的变化对呼吸道感染类型的鉴别意义重大^[5]。本文将全面分析 CD64、SAA 及 PA 检测在小儿急性细菌、病毒性呼吸道感染鉴别诊断中的应用价值,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2018 年 1 月至 2020 年 5 月本院收治的 106 呼吸道感染患儿作为研究组,根据实验室检查结果将研究组划分为细菌感染组 ($n=54$) 和病毒感染组 ($n=52$)。其中细菌感染组男 30 例,女 24 例;平均年龄 (4.69 ± 1.88) 岁。病毒感染组男 29 例,女 23 例;平均年龄 (4.94 ± 1.62) 岁。纳入标准:①均满足《医院感染诊断标准》中关于呼吸道感染的诊断标准^[6];②临床资料完整无缺漏;③经病原体血清和医学影像学检查确诊为细菌感染或病毒感染;④年龄在 0~14 岁之间;⑤未使用其他药物治疗者。排除标准:①合并重症感染的患儿;②合并免疫或血液系统疾病的患儿;③合并精神疾病的患儿;④近 3 个月内服用过布洛芬或阿司匹林的患儿;⑤过于肥胖的患儿。

另选取 98 例同期于本院接受健康体检且结果正常的儿童作为健康对照组。其中男 35 例,女 23

例;平均年龄 (4.12 ± 1.95) 岁。各组年龄、性别等基线资料比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。本研究经医院医学伦理委员会批准通过,受试者监护人均签署知情同意书。

1.2 研究方法

对照组于体检当天,研究组于检查当天抽取静脉血 3~5 mL。采用酶联免疫吸附法测定 SAA、PA,其中 PA<100 mg/L 为阳性,SAA>10 mg/L 为阳性,CD64>12.2MFI 为阳性,阳性检出率=阳性例数/总例数 $\times 100\%$ ^[7]。检测仪器为日立全自动生化分析仪检测,相关试剂盒采购于欣博盛生物科技有限公司。采用化学发光免疫法测定 CD64 水平,小鼠抗人荧光色素标记的单克隆抗体 CD64 由美国 Beckman Coulter 提供,抗体免疫组织化学试剂盒由上海嵘威达实业有限公司提供。所有操作均按试剂或仪器所配套说明书进行,由专业人员操作。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析,计量资料采用 ($\bar{x}\pm s$) 表示,采用 t 检验;计数资料采用 $n(\%)$ 表示,采用 χ^2 检验;绘制 ROC 曲线分析 CD64、SAA、PA 联合检测诊断小儿急性细菌性呼吸道感染的价值,计算 AUC 面积,以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 研究组和对照组 CD64、SAA、PA 表达水平比较

研究组 CD64、SAA 水平明显高于对照组,PA 水平明显低于对照组,差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。见表 1。

表 1 研究组和对照组 CD64、SAA、PA 表达水平比较 ($\bar{x}\pm s$)
Table 1 Comparison of expression levels of CD64, SAA and PA between study group and control group ($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	CD64(MFI)	SAA(mg/L)	PA(mg/L)
研究组	106	18.89 \pm 5.96	143.55 \pm 84.76	196.77 \pm 26.65
健康对照组	98	9.56 \pm 2.61	5.51 \pm 3.39	296.62 \pm 68.49
<i>t</i> 值		14.281	16.106	13.916
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001

2.2 细菌感染组和病毒感染组 CD64、SAA、PA 表达水平比较

细菌感染组 CD64、SAA 水平明显高于病毒感

染组, PA水平明显低于病毒感染组, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表2。

表2 细菌感染组和病毒感染组CD64、SAA、PA表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of expression levels of CD64, SAA and PA between bacterial infection group and viral infection group ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	CD64(MFI)	SAA(mg/L)	PA(mg/L)
细菌感染组	54	20.18±2.05	173.91±84.95	105.39±26.29
病毒感染组	52	14.16±2.15	120.19±59.29	247.49±66.75
t值		14.757	3.762	14.520
P值		<0.001	<0.001	<0.001

2.3 细菌感染组和病毒感染组CD64、SAA、PA的阳性率

细菌感染组的CD64、SAA、PA阳性率显著高于病毒感染组, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表3。

表3 细菌感染组和病毒感染组CD64、SAA、PA的阳性率比较[n(%)]

Table 3 Comparison of positive rates of CD64, SAA and PA between bacterial infection group and viral infection group [n(%)]

组别	n	CD64	SAA	PA
细菌感染组	54	52(96.30)	54(100.00)	53(98.15)
病毒感染组	52	42(80.76)	47(94.23)	45(90.38)
χ^2 值		6.366	5.449	5.117
P值		0.012	0.020	0.024

2.4 CD64、SAA、PA联合检测诊断小儿急性细菌性呼吸道感染的价值

CD64、SAA、PA三者联合检测灵敏度、特异度分别为91.65、92.45, 显著高于单一检测($P < 0.05$)。见表4及图1。

表4 CD64、SAA、PA联合检测诊断小儿急性细菌性呼吸道感染的价值

Table 4 diagnostic value of combined detection of CD64, SAA and PA in children with acute bacterial respiratory tract infection

预测指标	Cut-off值	灵敏度	特异度	AUC	95%CI	约登指数	P值
CD64	25.12	0.898	0.886	0.942	0.885~0.999	177.37	<0.001
SAA	24.65	0.791	0.835	0.818	0.704~0.931	161.58	<0.001
PA	23.14	0.846	0.825	0.928	0.866~0.990	166.01	<0.001
CD64+SAA+PA	24.89	0.917	0.925	0.979	0.900~1.000	183.10	<0.001
预测指数模型	23.69	0.895	0.889	0.954	0.739~0.957	171.92	<0.001

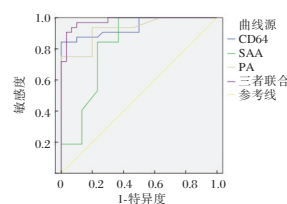


图1 ROC曲线

Figure 1 ROC curve

3 讨论

据权威数据报道, 儿科呼吸道感染就诊者约占就诊总人数的60%, 因呼吸系统疾病住院的儿童呈逐年上升的趋势^[8]。由于小儿呼吸道和肺功能尚未发育完全, 免疫功能低下, 感染症状容易反复出现, 若得不到有效治疗, 会引起并发症的出现, 患儿甚至有生命危险^[9]。呼吸道感染的病原体绝大多数是病毒或细菌, 在临床中需要针对发病原因进行治疗, 所以对小儿呼吸道感染的类型进行鉴别极为重要^[10]。

本文研究结果说明患儿发生呼吸道感染后, 机体内的CD64、SAA、PA水平均有异常改变。CD64是一种对IgG具有较高亲和力且具有介导和识别作用的免疫蛋白, 主要分布在巨噬细胞和单核细胞等抗原提呈细胞的表面, 参与免疫球蛋白的生理功能, 可在机体感染与抗感染中发挥重要作用, 并可介导体液免疫从而改善机体的免疫调节^[11]。正常人CD64表达水平较低, 当机体出现细菌病毒等感染性疾病时, 其表达迅速升高, 在中性粒细胞杀菌中发挥作用。研究显示, CD64指数能够有效反映机体感染性疾病的发生、发展过程, 且具有较高的敏感性和特异性^[12]。SAA是一种敏感的急性期反应蛋白, 当机体受感染、炎症刺激时, 肝细胞在促炎因子刺激下分泌SAA并释放入血液, 使血清SAA在短时间内迅速升高至千倍^[13]。SAA半衰期短、基础浓度低、个体差异小, 且其体内清除为非肾脏依赖性, 这些特点使SAA在炎性疾病等中的敏感性较高^[14]。PA是一种急性时相蛋白, 在肝脏中合成, 具有分子量小、半衰期短、升降明显等特点, 相对于其他白蛋白, PA对检测早期肝脏损伤程度敏感度高, 且其表达水平与机体炎症反应相关^[15]。既往学者研究指出, 当机体发生创伤的同时, 由于肝细胞受损, 血清PA也会出现降低^[16]。相关文献报道, 联合检测CD64、SAA及PA对感染性疾病患儿进行诊断, 不仅能对患儿的患病情况进行诊断, 还能对细菌性感染

与病毒性感染进行有效鉴别,并且操作简单,特异性俱佳^[17]。本研究通过绘制 ROC 曲线分析发现, CD64、SAA 及 PA 联合鉴别诊断呼吸道感染疾病的 AUC 最大,灵敏度与特异度最高,说明联合检测进行鉴别诊断的价值高,与上述文献报道相一致。

综上所述,小儿发生呼吸道感染时 CD64、SAA、PA 水平均出现异常改变,此时测定患儿外周血中 CD64、SAA、PA 水平,可有效鉴别呼吸道感染类型,有利于提高临床工作效率。

参考文献

- [1] 吴玉芹, 奎莉越, 赵晓芬, 等. C-反应蛋白, 血清淀粉酶 A 蛋白及中性粒细胞表面抗原 CD64 对新生儿感染性疾病的早期诊断价值[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2018, 10(5):327-331.
- [2] Lu L, Jin X, Zhang Q. CD35 and CD64 of Neutrophils Can Differentiate Between Bacterial and Viral Infections in Children by Simultaneous Quantitative Analysis [J]. Med Sci Monit, 2019, 25(4):7728-7734.
- [3] 查巍, 李林. SAA CRP 与 WBC 联合检测对儿童急性呼吸道细菌与肺炎支原体感染的鉴别诊断价值[J]. 安徽医学, 2020, 41(4):64-67.
- [4] 任继欣, 郭彦言. 外周血 HBP, IL-6, CD64 指数, PCT, CRP 和 SAA 水平检测在血流感染诊断中的应用价值研究[J]. 现代检验医学杂志, 2020, 35(2):62-65.
- [5] Liu Q, Gao Y, Ou Q, et al. Differential expression of CD64 in patients with Mycobacterium tuberculosis infection: A potential biomarker for clinical diagnosis and prognosis [J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(23):174-182.
- [6] 周作祥. 联合检测 CRP、PA、降钙素原及 SAA 在小儿细菌性感染中的诊断价值分析[J]. 临床检验杂志(电子版), 2018, 7(3):538.
- [7] Chen M, Remer E M, Liu X, et al. Identification of the distinguishing features of Crohn's disease and ischemic colitis using computed tomographic enterography [J]. Gastroenterol Rep, 2017, 5(3):219-225.
- [8] Sahin N, Akatli AN, Celik MR, et al. The Role of CD90 in the Differential Diagnosis of Pleural Malignant Mesothelioma, Pulmonary Carcinoma and Comparison with Calrettnn [J]. Pathol Oncol Res, 2017, 23(3):487-491.
- [9] 陈庆庆, 张骝. 张骝教授治疗小儿反复呼吸道感染经验 [J]. 陕西中医, 2019, 40(7):940-943.
- [10] Sorigue M, Santos-Gomez M, Comes M, et al. Flow Cytometry in the Differential Diagnosis of CD10-Positive Nodal Lymphomas [J]. Laborat med, 2020, 51(4):385-393.
- [11] 石新云, 许文芳, 陶学芳, 等. CD64、降钙素原、血清淀粉样蛋白 A 及 C 反应蛋白在急性感染性疾病中的诊断价值 [J]. 国际流行病学传染病学杂志, 2017, 12(1):8870-8876.
- [12] Gao X, Dan X, Rong L, et al. Application value of CD64 combined with CD14 in immunophenotyping diagnosis of acute myeloid leukemia [J]. Clin Med, 2018, 29(1):128-132.
- [13] 胡冰, 周栩平, 时英才, 等. 血清 SAA、sTREM-1、PCT 联合检测在新生儿宫内感染性肺炎中的价值 [J]. 分子诊断与治疗杂志, 2021, 13(3):441-444.
- [14] 程瑞斌, 程鹏, 周汉义. CD64 和 SAA 检测在儿童呼吸道早期细菌感染中的临床意义 [J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(8):66-68.
- [15] Sahin Nurhan, Akatli Ayse Nur, Celik Muhammet Reha, et al. The Role of CD90 in the Differential Diagnosis of Pleural Malignant Mesothelioma, Pulmonary Carcinoma and Comparison with Calrettnn [J]. Pathol oncol Res: POR, 2017, 23(3):487-491.
- [16] 王利平, 王绒. CRP、PA、PCT、SAA、GLB 及 ESR 水平检测在小儿细菌性感染诊断中的价值 [J]. 临床医学研究与实践, 2019, 4(13):130-132.
- [17] Puranik Amrutesh S, Leaf Irina A, Jensen Mark A, et al. Kidney-resident macrophages promote a proangiogenic environment in the normal and chronically ischemic mouse kidney. [J]. Sci Rep, 2018, 8(1):611-622.

(上接第 1602 页)

- [8] Sparrow DB, Faqeih EA, Sallout B, et al. Mutation of *HES7* in a large extended family with spondylocostal dysostosis and dextrocardia with situs inversus [J]. Am J Med Genet A, 2013, 161(9):2244-2249.
- [9] Bulman MP, Hattersley AT, Kusumi K, et al. Mutations in the human Delta homologue, *DLL3*, cause axial skeletal defects in spondylocostal dysostosis [J]. Nat Genet, 2000, 24(4):438-441.
- [10] Cormier AS, Staehling-Hampton K, Delventhal KM, et al. Mutations in the *MESP2* Gene Cause Spondylothoracic Dysostosis/Jarcho-Levin Syndrome [J]. Am J Human Genet, 2008, 82(6):1334-1341.
- [11] Lassiter RNT, Stark MR, Zhao T, et al. Signaling mechanisms controlling cranial placode neurogenesis and delamination [J]. Dev Biol, 2014, 389(1):39-49.
- [12] Du J, Wang X, Zhang X, et al. DNER modulates the length, polarity and synaptogenesis of spiral ganglion neurons via the Notch signaling pathway [J]. Mol Med Rep, 2018, 17(2):2357-2365.
- [13] Bray SJ. Notchsignalling in context [J]. Nat Rev Mol Cell Bio, 2016, 17(11):722-735.
- [14] 韩先卓, 刘畅. Notch 信号通路相关的人类骨发育疾病 [J]. 医学综述, 2018, 24(8):1606-1611.
- [15] Bessho Y, Sakata R, Komatsu S, et al. Dynamic expression and essential functions of *HES7* in somite segmentation [J]. Genes Dev, 2001, 15(20):2642-2647.

脐血和羊水中 TNF- α 、G-CSF、MCP-1、S100B 蛋白水平检测用于诊断胎膜早破胎儿脑损伤的效果研究

段一丁^{1*} 冀涛¹ 王新彦¹ 郝晓玲¹ 李洪霞²

[摘要] 目的 探讨脐血和羊水中肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)和S100B蛋白在胎膜早破胎儿脑受损中的诊断价值。方法 选取2019年1月至2020年9月在河北省沧州市妇幼保健院分娩的胎膜早破胎儿101例,其中伴有脑损伤胎儿40例(脑损伤组),无脑损伤胎儿61例(无脑损伤组),检测两组脐血和羊水中TNF- α 、G-CSF、MCP-1和S100B水平。结果 脑损伤组脐血TNF- α 、G-CSF、MCP-1和S100B均明显高于无脑损伤组,差异有统计学意义($P<0.05$);脑损伤组羊水TNF- α 、G-CSF和MCP-1均明显高于无脑损伤组,差异有统计学意义($P<0.05$);脑损伤组和无脑损伤组羊水S100B,比较差异无统计学意义($P>0.05$);脐血TNF- α 、G-CSF、MCP-1和S100B预测胎儿脑损伤的ROC曲线下面积分别为0.707、0.646、0.787和0.929($P<0.05$);羊水TNF- α 、G-CSF和MCP-1预测胎儿脑损伤的ROC曲线下面积分别为0.960、0.783和0.778($P<0.05$)。结论 脐血和羊水中TNF- α 、G-CSF、MCP-1、S100B蛋白在预测胎膜早破胎儿脑损伤中有一定价值,值得进一步研究。

[关键词] 肿瘤坏死因子 α ; 粒细胞集落刺激因子; 单核细胞趋化蛋白-1; S100B蛋白; 胎膜早破

Detection of TNF- α , G-CSF, MCP-1 and S100B protein levels in umbilical cord blood and amniotic fluid for diagnosis of fetal brain injury caused by premature rupture of membranes

DUAN Yiding^{1*}, JI Tao¹, WANG Xinyan¹, HAO Xiaoling¹, LI Hongxia²

(1. Department 6 of Obstetrics and Gynecology, Cangzhou maternal and child health hospital, Cangzhou, Hebei, China, 061000; 2. Operating room of Hebei Cangzhou maternal and child health hospital, Cangzhou, Hebei, China, 061000)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the diagnostic value of tumor necrosis factor α (TNF- α), granulocyte colony stimulating factor (G-CSF), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and S100B protein in cord blood and amniotic fluid in fetal brain damage caused by premature rupture of membranes. **Methods** 101 fetuses with premature rupture of membranes delivered in Cangzhou maternal and child health hospital from January 2019 to September 2020 were selected, including 40 fetuses with brain injury (brain injury group) and 61 fetuses without brain injury (brain injury group), the levels of TNF- α , G-CSF, MCP-1 and S100B in umbilical cord blood and amniotic fluid were detected in two groups. **Results** The umbilical cord blood TNF- α , G-CSF, MCP-1 and S100B in the brain injury group were significantly higher than those in the non-brain injury group ($P<0.05$); The TNF- α , G-CSF and MCP-1 in amniotic fluid of brain injury group were significantly higher than those of non-brain injury group ($P<0.05$); There was no significant difference in amniotic fluid S100B between brain injury group and non brain injury group ($P>0.05$); The ROC curves of cord blood TNF- α , G-CSF, MCP-1 and S100B predicting fetal brain injury were 0.707, 0.646, 0.787 and

基金项目:河北医学科技计划项目(193793-5)

作者单位:1. 河北省沧州市妇幼保健院产六科,河北,沧州 061000

2. 河北省沧州市妇幼保健院手术室,河北,沧州 061000

*通信作者:段一丁, E-mail:394312441@qq.com

0.929, $P < 0.05$; The area under ROC curve of amniotic fluid TNF- α , G-CSF and MCP-1 predicting fetal brain injury were 0.960, 0.783 and 0.778, $P < 0.05$. **Conclusion** TNF- α , G-CSF, MCP-1 and S100B proteins in umbilical cord blood and amniotic fluid have certain value in predicting fetal brain injury caused by premature rupture of membranes, which deserves further study.

[KEY WORDS] Tumor necrosis factor α ; Granulocyte colony stimulating factor; Monocyte chemoattractant protein-1; S100B protein; Premature rupture of membranes

早产儿在临床较为常见的一种情况,其发生率在我国约为8%,主要是因为宫内发生感染,即使存活下来,也可能有脑瘫、言语功能障碍及智力障碍等伤残,甚至有脑室周围-脑室内出血或脑室周围白质软化等导致脑损伤,严重影响新生儿的生长发育^[1]。研究显示宫内感染会导致绒毛膜羊膜炎,在发病后胎儿的免疫系统被活化体内释放出大量的炎症反应因子,大脑细胞因子在胎儿脑部表达异常,因此积极监测宫内感染形成脑损伤情况并进行干预治疗对于改善早产儿脑损伤预后具有重要的意义。近年来一系列血清学标记物的应用对于识别脑损伤并分析脑损伤进展和评估治疗效果提供了重要作用^[2]。肿瘤坏死因子 α (umor necrosis factor- α , TNF- α)、粒细胞集落刺激因子(granulocyte colony stimulating factor, G-CSF)、单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemotactic protein-1, MCP-1)均参与了炎症反映,中枢神经特异蛋白100B(central nervous system specific 100-protein, S100B)蛋白具有神经营养功能,本研究分析了脐血和羊水中TNF- α 、G-CSF、MCP-1和S100B蛋白在胎膜早破胎儿脑受损中的变化,为早期监测提供理论依据,报告如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取河北省沧州市妇幼保健院2019年1月至2020年9月期间分娩的胎膜早破胎儿101例,其中伴有脑损伤胎儿40例(脑损伤组),无脑损伤胎儿61例(无脑损伤组),两组胎儿性别、出生体质量及胎龄比较差异无统计学意义($P > 0.05$),见表1。

表1 两组一般资料比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of general data between 2 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	男/女	出生体重(kg)	胎龄(周)
脑损伤组	40	25/15	2.10 \pm 0.38	31.89 \pm 1.84
无脑损伤组	61	36/25	2.03 \pm 0.50	32.05 \pm 1.91
t/χ^2 值		0.123	0.754	-0.418
P值		0.726	0.453	0.677

纳入标准:①胎龄 < 34 周,单胎妊娠;②胎膜早破诊断均经病理学确诊;③胎儿监护人知情同意。排除标准:①产妇合并有妊娠期糖尿病、胎盘早剥、前置胎盘等并发症;②胎儿有遗传代谢性疾病、神经系统等畸形。研究经单位所在医学伦理委员会审核并批准进行。

1.2 脑损伤检查

早产儿出生后开展超声检查,采用S8 EXP便携式彩色多普勒超声诊断仪(深圳开立生物医疗科技股份有限公司)高频率凸阵小型探头检查前卤,频率(5.5~7.5)MHz,当超声检查出现脑室周围白质软化、脑梗死、脑室周围出血、基质-脑室内出血、蛛网膜下腔、小脑、基底核及桥脑等出血即可认定,对于超声检查无异常患者采用MRI或者CT检查。

1.3 脐血指标检查

在胎儿断脐从胎盘端穿刺抽取脐带血5 mL, 2 000 rpm离心10 min,分离血清待检,采用Luminex液相芯片分析仪购自上海华盈生物医药科技有限公司,测定TNF- α 、G-CSF、MCP-1浓度变化,采用酶联免疫吸附法测定S100B浓度变化,所有试剂为上海沪尚生物科技有限公司生产,其所有操作严格按照试剂盒说明书进行。

1.4 羊水指标检查

产妇确诊胎膜早破后对产妇产外、宫颈、阴道进行角度,扩张阴道并暴露宫颈,使用注射器抽取羊水3 mL, 2 500 rpm离心10 min(离心半径),取上清液检测,采用Luminex液相芯片分析仪测定TNF- α 、G-CSF、MCP-1浓度变化,采用酶联免疫吸附法测定S100B浓度变化,所有试剂为上海沪尚生物科技有限公司生产,所有操作严格按照试剂盒说明书进行。

1.5 统计学方法

采用SPSS 20.0软件包进行数据分析,正态分布的计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,行 t 检验,非正态分布计量资料以M(Q25~Q75)表示,行秩和检验;计数资料用 $n(\%)$ 表示,行 χ^2 检验;诊断价值采用受试者工作特征(ROC)曲线分析;以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组脐血 TNF-α、G-CSF、MCP-1 和 S100B 水平

脑损伤组脐血 TNF-α、G-CSF、MCP-1 和 S100B 明显高于无脑损伤组,差异比较有统计学意义

($P < 0.05$)。见表 2。

2.2 两组羊水 TNF-α、G-CSF、MCP-1 和 S100B 水平
脑损伤组羊水 TNF-α、G-CSF 和 MCP-1 明显高于无脑损伤组,差异比较有统计学意义($P < 0.05$);脑损伤组和无脑损伤组羊水 S100B 比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 3。

表 2 两组脐血 TNF-α、G-CSF、MCP-1 和 S100B 水平 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Levels of TNF-α, G-CSF, MCP-1 and S100B in cord blood of 2 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TNF-α (ng/L)	G-CSF (ng/L)	MCP-1 (ng/L)	S100B (μg/L)
脑损伤组	40	33.80±15.54	145.54±64.22	587.22(501.16~880.55)	2.10(1.41~2.55)
无脑损伤组	61	21.76±12.22	110.03±50.17	345.87(250.58~430.36)	0.96(0.67~1.80)
t/Z 值		4.343	3.110	-4.155	-5.210
P 值		0.000	0.002	0.000	0.000

表 3 两组羊水 TNF-α、G-CSF、MCP-1 和 S100B 水平 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Levels of TNF-α, G-CSF, MCP-1 and S100B in amniotic fluid of 2 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TNF-α (ng/L)	G-CSF (ng/L)	MCP-1 (ng/L)	S100B (mg/L)
脑损伤组	40	50.15±10.84	6105.55(4605.55~7354.46)	3210.03(2241.87~4604.54)	1.30(0.91~1.98)
无脑损伤组	61	20.06±8.16	3041.84(1806.71~5122.46)	2558.84(1201.58~3784.55)	1.24(0.88~1.90)
t/Z 值		15.889	-8.244	-7.106	-1.544
P 值		0.000	0.000	0.000	0.426

2.3 诊断脑损伤的价值

脐血 TNF-α、G-CSF、MCP-1 和 S100B 预测胎儿脑损伤的 ROC 曲线下面积分别为 0.707、0.646、0.787 和 0.929, ($P < 0.05$), 其中 S100B 预测价值最高。见表 4、图 1; 羊水 TNF-α、G-CSF 和 MCP-1 预测胎儿脑损伤的 ROC 曲线下面积分别为 0.960、0.783 和 0.778, $P < 0.05$, S100B 无预测价值。见表 5、图 2。

表 4 脐血 TNF-α、G-CSF、MCP-1 和 S100B 预测胎儿脑损伤的 ROC 曲线参数

Table 4 ROC curve parameters of umbilical cord blood TNF-α, G-CSF, MCP-1 and S100B predicting fetal brain injury

指标	AUC	95%CI	截断值	灵敏度	特异度	P 值
TNF-α	0.707	0.604~0.810	22.89 ng/L	0.700	0.672	0.000
G-CSF	0.646	0.536~0.756	152.95 ng/L	0.575	0.710	0.013
MCP-1	0.787	0.698~0.876	556.81 ng/L	0.625	0.836	0.000
S100B	0.929	0.861~0.990	1.45 mg/L	0.850	0.920	0.000

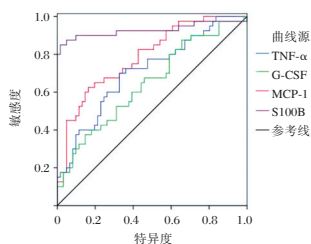


图 1 ROC 曲线

Figure 1 ROC curve

表 5 羊水 TNF-α、G-CSF、MCP-1 和 S100B 预测胎儿脑损伤的 ROC 曲线参数

Table 5 ROC curve parameters of amniotic fluid TNF-α, G-CSF, MCP-1 and S100B for predicting fetal brain injury

指标	AUC	95%CI	截断值 (ng/L)	灵敏度	特异度	P 值
TNF-α	0.960	0.921~0.989	30.15	0.870	0.900	0.000
G-CSF	0.783	0.692~0.756	4550.54	0.624	0.770	0.000
MCP-1	0.778	0.684~0.872	2891.46	0.600	0.725	0.000
S100B	0.532	0.417~0.647				0.588

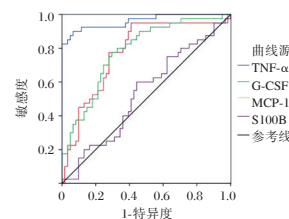


图 2 ROC 曲线

Figure 2 ROC curve

3 讨论

胎膜早破是产科最常见的并发症之一,是产妇在临产前出现的胎膜破裂,与生殖道感染密切相关,是引起围生期产妇和胎儿死亡的重要原因,稍有不慎,就会造成早产儿脑损伤或者死亡^[3]。人体的胎膜为绒毛膜和羊膜共同组成,连接细胞外基质,其发挥调节作用可以适应妊娠的进展过程,

在妊娠的中期则胎膜停止,当出现胶原纤维、基底膜或者纤维母细胞发育不良造成胎膜早破,产妇胎膜的张力与弹性变形能力均会下降^[4]。一般发生胎膜早破时均为明显临床特征,但是发展为绒毛膜羊膜炎后则临床治疗较为困难,早期诊断胎膜早破并进行最在适宜的时间终止妊娠可以降低围产期母婴患病率与死亡率,改善预后^[5]。

随着医学研究的发展与进步,早期关注胎膜早破早产儿脑损伤可以为临床提供早期的诊疗依据,但培养的时间比较长,假阴性病例也比较多,而且胎膜病例的检查也需要在产后开始,因此对于早期没有太大的意义^[6]。TNF- α 是人体最常见的炎症反应因子,可以介导炎症反应发生,在细胞因子网络中起核心作用,可以增强 T 细胞和 B 细胞的增殖和免疫蛋白的合成,具有广泛的炎症反应及免疫调节等生物活性^[7]。研究显示 TNF- α 可以激活中性粒细胞杀灭病原微生物,同时可以刺激体内胶质纤维酸性蛋白增多,其属于星形胶质细胞的主要中间丝状蛋白,与神经胶质增生有关;此外 TNF- α 还可以损伤血管内皮细胞,增加内皮通透性,促进体内过度炎症反应形成,诱导了脑细胞的凋亡,造成血脑屏障通透性升高^[8]。G-CSF 则是造血生长因子,其可以产生抗炎作用和抗凋亡作用,诱导了神经与血管再生过程,对于促进神经组织结构与功能恢复至关重要^[9]。动物学实验证实脑室周围白质损伤模型中粒细胞集落刺激因子对脑室周围白质损伤后早期的运动功能恢复有促进作用^[10-11]。MCP-1 是趋化因子家族成员之一,可以趋化并活化单核细胞因子,一般正常脑组织中含量较低,当发生缺氧、缺血时会显著升高,其阳性细胞为神经元,在星型胶质细胞中也会拜倒,可以导致巨噬细胞穿透血管内皮进入损伤的脑组织,造成了单核细胞活化导致胞浆中的游离钙与花生四烯酸分泌增多,促进炎症细胞因子朝向脑损伤区域移动,加重了血肿周围的炎症反应过程^[12-14]。S100B 蛋白则是一种分子量教小的酸性钙结合蛋白,具有调节人体内蛋白激酶 C 与钙调蛋白合成的作用,可以对细胞能量代谢产生一定的影响,并发挥神经营养功能,有着促进神经生长与修复的重大意义,其浓度的升高与降低与脑损伤程度与范围相关,是临床上脑损伤中最为常用血清学标记物。研究发现一旦人体血脑屏障破坏显著, S100B 蛋白会快速释放进入血液,但是在羊水中表达几乎没有,主要是形成脑损伤后其无法穿透胎

盘屏障分泌至羊水,这和本研究结果类似^[15-16]。本研究优势在于通过筛选早产儿脑损伤中具有预测价值的生物学标志,可以为临床早期诊断奠定一定的基础,但是本研究纳入患者数量有限,而且脑损伤会存在多种类型,本研究未能对不同类型脑损伤情况进行深入分析,还有待进一步开展多中心、大样本量论证。

综上所述,脐血和羊水中 TNF- α 、G-CSF、MCP-1、S100B 蛋白在预测胎膜早破胎儿脑损伤中有一定价值,值得进一步研究。

参考文献

- [1] 高楠. 足月前胎膜早破羊水过少的母婴结局分析[J]. 陕西医学杂志, 2016, 45(9): 1208-1209.
- [2] 刘乐,程国梅,崔世红,等. Nrf2 与足月胎膜早破合并绒毛膜羊膜炎的关系[J]. 现代妇产科进展, 2017, 26(2): 116-119.
- [3] 黄丽娇,庄晖,刘丽明. 联合检测 PCT、IL-6 和 CRP 水平在预测未足月胎膜早破患者并发绒毛膜羊膜炎及新生儿败血症的临床价值研究[J]. 中国妇幼保健, 2016, 31(17): 3471-3474.
- [4] 张展,闫欢,徐灵敏,等. 脐血细胞髓样细胞触发受体和 CD64 的变化对胎膜早破时早期新生儿感染的预测研究[J]. 中国临床医生杂志, 2016, 44(2): 55-58.
- [5] 吴玉丽,冯思思,李迎侠. 足月胎膜早破产妇产道分泌物中病原体分布情况及其与新生儿感染发生率的相关性分析[J]. 医学临床研究, 2020, 37(12): 1878-1880.
- [6] 卢红艳,张强,常明,等. 脐血及羊水生物学标志预测胎膜早破早产儿脑损伤的价值[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2016, 31(6): 452-456.
- [7] 韩梅,高梦颖,郭鹏,等. TNF- α 及 IL-1 β 在脓毒症急性肾损伤中的价值及与 NGAL 的关系[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2021, 13(1): 34-37+42.
- [8] 周爱明,田松,姚成伟. 血清 MCP-1、IL-6、TNF- α 联合检测在脑胶质瘤治疗中的临床价值[J]. 海南医学院学报, 2016, 22(22): 2685-2687.
- [9] 杨长仪,张宝泉,陈涵强. 胎膜早破新生儿脐白血细胞介素 6 和 C 反应蛋白水平与早发型新生儿败血症的关系[J]. 中国新生儿科杂志, 2017, 32(2): 110-114.
- [10] 杜文渊,于晓霞,王小莎,等. ICAM-1 和 PCT 与未足月胎膜早破并发绒毛膜羊膜炎的相关性研究[J]. 西南国防医药, 2018, 28(2): 146-148.
- [11] 杨沐铎,刘乐南,李洁,等. 中孕期羊水中细胞因子水平及解脲脲原体感染与自发性早产的关系[J]. 中华围产医学杂志, 2016, 19(4): 263-268.
- [12] 于哲,张洛英,潘大欢,等. 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[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(6): 4.
- [13] 欧伟明,张菊弟,黄润忠,等. 影响早产儿脑损伤的危险因素及神经营养药物的治疗效果观察[J]. 泰山医学院学报, 2018, 39(10): 1151-1152.

(下转第 1614 页)

sE-SLT、sICAM-1 及 STAT1 在小儿支气管哮喘中的表达及临床意义

杨晶 薛国昌 任明星*

[摘要] **目的** 分析可溶性E-选择素(sE-SLT)、可溶性细胞间粘附因子-1(sICAM-1)及信号转导和转录激活因子-1(STAT1)在小儿支气管哮喘中的表达及临床意义。**方法** 选取2015年4月至2020年4月本院收治的79例小儿支气管哮喘患者为研究组(急性期48例、缓解期31例),选取同期于本院行健康体检的79例健康儿童为对照组。比较各组血清sE-SLT、sICAM-1及STAT1表达,比较急性与缓解期患儿第1秒用力呼气容积占预计值百分比(FEV₁%)、呼气峰值流速占预计值百分比(PEF%)、1秒用力呼气容积占用力肺活量的百分比(FEV₁/FVC%),分析sE-SLT、sICAM-1及STAT1表达与肺功能指标的关联性。**结果** 研究组血清sE-SLT、sICAM-1及STAT1表达水平高于对照组,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。急性期患者血清sE-SLT、sICAM-1及STAT1表达水平高于缓解期,FVC₁%、PEF%、FEV₁/FVC%值低于缓解期,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。支气管哮喘患者血清sE-SLT、sICAM-1及STAT1表达与FVC₁%、PEF%值呈负相关关系($P < 0.05$)。**结论** sE-SLT、sICAM-1及STAT1可能共同参与了小儿支气管哮喘的病理、生理过程,临床可通过检测上述指标水平协助评估患者的肺功能状态。

[关键词] sE-SLT; sICAM-1; 小儿支气管哮喘; STAT1; 肺功能

Expression and clinical significance of sE-SLT, sICAM-1 and STAT1 in children with bronchial asthma

YANG Jing, XUE Guochang, REN Mingxing*

(Department of Pediatrics, the Ninth People's Hospital of Wuxi, Jiangsu, China, 214000)

[ABSTRACT] **Objective** To analyze the expression and clinical significance of soluble E-selectin (Soluble E-selectin, sE-SLT), soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1) and signal transduction and transcriptional activator (STAT1) in children with bronchial asthma. **Methods** The 79 patients with pediatric bronchial asthma admitted to this hospital from April 2015 to April 2020 were selected as the study group (48 cases in the acute phase, 31 cases in the remission phase). In addition, 79 healthy children who had physical examinations in the hospital during the same period were selected as the control group. The levels of serum sE-SLT, sICAM-1 and STAT1 in different groups were compared. The forced expiratory volume in one second (FEV₁%), the percentage of peak expiratory flow (PEF%), and the percentage of forced expiratory volume in first second to forced vital capacity (FEV₁/FVC%) in children at acute stage and remission stage were compared. The correlation between the expression levels of sE-SLT, sICAM-1 and STAT1 and lung function indexes were analyzed. **Results** The expression levels of serum sE-SLT, sICAM-1 and STAT1 in the study group were significantly higher than those in the control group, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The expression levels of serum sE-SLT, sICAM-1 and STAT1 in the acute phase were significantly higher than those in the remission phase. The FVC₁%, PEF%, FEV₁/FVC% values in the acute phase were significantly lower than those in the remission phase, and the differences were statistically

基金项目:江苏省卫生计生委面上项目(H2018077)

作者单位:无锡市第九人民医院儿科,江苏,无锡 214000

*通信作者:任明星, E-mail: wyysmile866@163.com

significant ($P<0.05$). The expression levels of serum sE-SLT, sICAM-1 and STAT1 in patients with bronchial asthma were negatively correlated with FVC1% and PEF% values ($P<0.05$). **Conclusion** sE-SLT, sICAM-1 and STAT1 may jointly participate in the pathological and physiological processes of patients with pediatric bronchial asthma. Clinically, the level of the above indicators can assist in evaluating the patient's pulmonary function status.

[KEY WORDS] sE-SLT; sICAM-1; Pediatric bronchial asthma; STAT1; Lung function

支气管哮喘是呼吸系统常见的慢性疾病,儿童发病率较高且大多始发于4~5岁之前^[1]。据相关研究显示,支气管哮喘的发生原因与吸入性过敏原、运动、剧烈情绪波动、食入性过敏原、呼吸道感染、化学气雾剂及冷空气等均有关,一旦不及时治疗,可引发肺炎、肺不张、气胸及纵膈气肿等并发症^[2]。据报道显示,支气管哮喘严重威胁患儿生命安危,对于支气管哮喘诊疗病情的评估是关键所在,而血清学的细胞因子分析可为支气管哮喘的诊疗提供一定的参考^[3]。基于此,本研究选择可溶性E-选择素(Soluble E-selectin, sE-SLT)、可溶性细胞间粘附因子-1(soluble intercellular adhesion molecule-1, sICAM-1)及信号转导和转录激活因子-1(Signal transduction and transcriptional activator, STAT1)进行分析,旨在探讨上述指标的表达及其与小儿支气管哮喘患者病情的关系,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2015年4月至2020年4月本院收治的79例小儿支气管哮喘患者设为研究组。其中男50例,女29例;平均年龄为(3.27±1.16)岁;根据《儿童支气管哮喘诊断与防治指南》^[4]将患儿分为急性期($n=48$)、缓解期($n=31$)。

纳入标准:①均满足中华医学会儿科学会《儿童支气管哮喘诊断与防治指南》中关于支气管哮喘的标准;②所有患者年龄均≤10岁;③患儿监护人均自愿参加本次研究,并签署相关协议书。排除标准:①存在其他系统疾病或恶性肿瘤等疾病患者;②伴随严重心、肺、肝、肾、支气管功能不全患者;③存在肺部感染者;④支气管异物者;⑤存在精神疾病无法配合本研究或依从性差者。

另选取79例同时间段于本院行健康体检的志愿者儿童设为对照组,其中男42例,女37例,平均(2.98±1.87)岁。两组性别、年龄等一般情况均无统计学意义($P>0.05$)。本研究经本院医学伦理委

员会批准通过。

1.2 检测方法

所有对象均在医生协助下完善相关检查,研究组于入院次日、对照组于体检当日清晨空腹抽取5 mL外周静脉血,静置30 min后3 000 rpm离心10 min取上层血清,取5 mL抗凝血用Ficoll密度梯度离心法提取外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC),均置入-80℃冰柜中待检。sE-SLT、sICAM-1采用酶联免疫吸附测定法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA),试剂盒由福建太阳生物技术公司生产,严格按照试剂盒说明书进行操作。STAT1采用免疫印迹法(Western Blot, WB),试剂盒由上海康朗生物科技有限公司生产,严格按照试剂盒说明书进行操作。

1.3 观察指标

比较两组血清sE-SLT、sICAM-1及STAT1表达水平。采用日本美能AS-507肺功能仪监测研究组患者肺功能,包括第1秒用力呼气容积占预计值百分比(Forced expiratory volume in one second, FEV₁%)、呼气峰值流速占预计值百分比(peak expiratory flow, PEF%)、1秒用力呼气容积占用力肺活量的百分比[FEV₁/(forced vital capacity, FVC)]%。分析支气管哮喘患者血清的sE-SLT、sICAM-1及STAT1表达水平与肺功能指标的相关性。

1.4 统计学方法

采用SPSS 22.0软件进行统计分析,计量资料采用($\bar{x} \pm s$)表示,采用 t 检验;sE-SLT、sICAM-1及STAT1表达水平与肺功能的相关性使用Pearson相关系数分析,以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 两组血清sE-SLT、sICAM-1及STAT1表达水平比较

研究组血清sE-SLT、sICAM-1及STAT1表达水平均明显高于对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表1。

表1 两组血清 sE-SLT、sICAM-1 及 STAT1 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of serum levels of Se SLT, sICAM-1 and STAT1 between the two groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	sE-SLT($\mu\text{g/L}$)	sICAM-1($\mu\text{g/L}$)	STAT1
研究组	79	20.49 \pm 3.85	274.66 \pm 32.16	3.07 \pm 0.73
对照组	79	13.18 \pm 3.31	189.72 \pm 21.72	1.05 \pm 0.38
t值		12.797	19.454	21.816
P值		<0.001	<0.001	<0.001

2.2 急性期和缓解期支气管哮喘患者血清 sE-SLT、sICAM-1 及 STAT1 表达水平比较

急性期患者血清 sE-SLT、sICAM-1 及 STAT1 表达水平均明显高于缓解期,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表2。

表2 急性期和缓解期支气管哮喘患者血清的 sE-SLT、sICAM-1 及 STAT1 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of serum levels of Se SLT, sICAM-1 and STAT1 in patients with acute and remission bronchial asthma ($\bar{x} \pm s$)

类别	n	sE-SLT($\mu\text{g/L}$)	sICAM-1($\mu\text{g/L}$)	STAT1
急性期	48	23.26 \pm 4.57	301.28 \pm 31.59	3.89 \pm 0.85
缓解期	31	16.24 \pm 4.12	213.45 \pm 28.47	2.44 \pm 0.49
t值		6.924	12.534	8.607
P值		<0.001	<0.001	<0.001

2.3 急性期和缓解期支气管哮喘患者的 FVC₁%、PEF%、FEV₁/FVC% 值

急性期 FVC₁%、PEF%、FEV₁/FVC% 值明显低于缓解期,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表3。

表3 急性期和缓解期支气管哮喘患者的 FVC₁%、PEF%、FEV₁/FVC% 值比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of fvc1, PEF and fev1/fvc% in patients with asthma in acute and remission stages ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	FEV ₁ (%)	PEF(%)	FEV ₁ /FVC(%)
急性期	48	64.28 \pm 7.33	61.23 \pm 12.45	72.35 \pm 13.84
缓解期	31	89.17 \pm 8.54	88.34 \pm 5.62	88.22 \pm 11.79
t值		13.807	11.378	5.266
P值		<0.001	<0.001	<0.001

2.4 支气管哮喘患者血清的 sE-SLT、sICAM-1 及 STAT1 表达水平与肺功能指标的相关性

Pearson 相关系数分析显示,支气管哮喘患者血清 sE-SLT、sICAM-1 及 STAT1 表达水平与 FVC₁%、PEF% 值呈负相关关系($P<0.05$)。见表4。

3 讨论

目前,关于支气管哮喘发生的病理生理机制尚不明确^[5]。相关研究指出支气管哮喘的发病与支原

表4 分析支气管哮喘患者血清的 sE-SLT、sICAM-1 及 STAT1 表达水平与肺功能的相关性

Table 4 analyzes the correlation between the expression levels of serum Se SLT, sICAM-1 and STAT1 and lung function in patients with bronchial asthma

指标	FEV ₁ (%)		PEF(%)		FEV ₁ /FVC(%)	
	r值	P值	r值	P值	r值	P值
sE-SLT	-0.865	<0.001	-0.845	<0.001	-0.923	<0.001
sICAM-1	-0.768	<0.001	-0.613	<0.001	-0.638	<0.001
STAT1	-0.882	<0.001	-0.756	<0.001	-0.685	<0.001

体侵犯宿主呼吸道组织等多方面因素有关,其中机体免疫功能紊乱是导致哮喘的重要因素^[6-8]。据文献报道,通过分析机体血清内的特异性指标的变化情况,不仅能为患者的病情评估提供量化的血清学参考指标,同时还可作为支气管哮喘的治疗提供思路^[9-10]。

sE-SLT 是介导粘附反应的重要粘附分子,主要介导血液流动状态下白细胞与血管内皮细胞的局部粘附^[11]。Liu 等^[12]研究发现,病理状态下 sE-SLT 水平改变可作为提示血管内皮细胞活化的重要标志。sICAM-1 为趋化及粘附的相关因子,属于细胞表面跨膜糖蛋白抗原,分布于淋巴、上皮、血管内皮及白细胞表面,当机体出现炎症反应时,可使 ICAM-1 表达水平上升^[13-14]。Chen 等^[15]研究表明,sICAM-1 不仅可诱导单核细胞、巨噬细胞的募集,还可加剧支气管平滑肌细胞的痉挛程度。此外研究表明,STAT1 为参与 JAK/STAT 信号转导通路的重要组成部分,STAT1 磷酸化后能够进入细胞核内,调节相关的基因表达,并产生相应的生物学效应^[16]。既往研究报道,STAT1 的活化能够促进细胞间粘附分子的基因转录,而细胞间粘附分子基因的异常表达也会造成淋巴细胞聚集,加重机体的炎症反应^[17]。Jin 等^[18]的研究显示,支气管哮喘患者上皮细胞中存在 STAT1 超表达和异常活化现象,而 STAT1 的超表达会造成细胞间粘附分子的高表达,进而调节 Th2 型细胞因子应答,从而推动一氧化氮的合成,加重支气管哮喘的炎症反应。本研究结果表明 sE-SLT、sICAM-1 及 STAT1 可能参与支气管哮喘的病理生理过程,是支气管哮喘病情加重的重要因子。sE-SLT、sICAM-1 及 STAT1 表达异常会促进炎症反应的加剧以及炎症瀑布的正反馈调节,加剧肺泡上皮腺体及平滑肌细胞的功能异常。本研究中,急性期 FVC₁%、PEF%、FEV₁/FVC% 值明显低于缓解期,这表明急性期患者的肺功能存在明显的降低,考虑为患者气

道的高反应性引起肺通气的障碍所致。由于 sE-SLT、sICAM-1 及 STAT1 的表达上升,诱发肥大细胞脱敏,从而增加了肥大细胞致敏颗粒的释放,最终促进肺泡平滑肌细胞的痉挛^[19]。相关性分析显示,支气管哮喘患者血清 sE-SLT、sICAM-1 及 STAT1 表达水平与 FVC₁%、PEF% 值呈负相关关系。这表明 sE-SLT、sICAM-1 及 STAT1 与患者的肺功能程度有关,究其原因可能是 sE-SLT、sICAM-1 及 STAT1 的改变对肺通气过程中氧合程度造成了影响,影响到气道平滑肌的痉挛,进而导致肺通气的障碍。

综上所述,sE-SLT、sICAM-1 及 STAT1 可能共同参与了小儿支气管哮喘患者的病理、生理过程,临床可通过检测上述指标水平协助评估患者的肺功能状态。

参考文献

- [1] 陈凯鹏,林惠玲,张超,等.信号转导子和转录激活子-1、干扰素调节因子-1及干扰素- γ 在支气管哮喘儿童中的表达及其临床意义[J].中国小儿急救医学,2018,25(11):834-835.
- [2] 薛满,马春利,尹春燕.孟鲁司特钠联合氨溴索对支气管哮喘患儿血清 sE-SLT 和 sICAM-1 水平的影响[J].临床和实验医学杂志,2019,18(1):72-75.
- [3] Fu WJ, Xie ZB, Zheng SF, et al. The clinical significance of PYCR1 expression in renal cell carcinoma [J]. *Medicine*, 2019,98(28):164-168.
- [4] 李会娟,梁东阁,常会娟,等.支气管哮喘患儿血清中 E 选择素,可溶性细胞黏附分子-1 和白细胞介素-25,-33 的变化及其意义[J].成都医学院学报,2019,14(6):98-101.
- [5] Sun Y, Tong Y, Haiyan XU, et al. Expression and clinical significance of serum ICAM-1, sICAM-1 and hs-CRP in patients with plasma cell mastitis [J]. *Intern J Labor Med*, 2018,9(10):353-358.
- [6] Chen G, Xie T, Chen H, et al. Expression and Clinical Significance of miR-152 and CYFRA21-1 in Ovarian Cancer Tissues [J]. *Oncologie*, 2020,22(2):83-93.
- [7] 范广来,李红林,吕艳关,等.儿童哮喘患者外周血单个核细胞中 TIPE2 的表达与临床意义[J].现代医学,2019,47(2):44-47.
- [8] Zhang Y, Qu H. Expression and clinical significance of aquaporin-1, vascular endothelial growth factor and microvessel density in gastric cancer [J]. *Medicine*, 2020,99(36):218-220.
- [9] Massimo R, Giuseppe M, Gioacchini FM, et al. Expression Levels and Clinical Significance of miR-21-5p, miR-let-7a, and miR-34c-5p in Laryngeal Squamous Cell Carcinoma [J]. *BioMed Res Intern*, 2017,31(15):1-9.
- [10] 肖奇贵,王铮,杨勤玲,等.肝癌切除术后患者血清 sP-selectin, sICAM-1 水平变化及其临床意义[J].分子诊断与治疗杂志,2020,12(9):1208-1212.
- [11] Hacking S, Vitkovski T, Jain S, et al. Clinical Significance of Program Death Ligand-1 and Indoleamine-2,3-Dioxygenase Expression in Colorectal Carcinoma [J]. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2021,29(3):201-208.
- [12] Liu Z, Liu XW, Liu SA, et al. Clinical significance of changes of expression of the Wnt/ β -catenin signaling pathway in renal clear cell carcinoma [J]. *Europ rev med pharmacol sci*, 2016,20(23):223-226.
- [13] 陈红宇,刘亚军,沈洪.炎症性肠病患者血清 IL-6、sICAM-1 及 Chemerin 的检测及临床价值[J].陕西医学杂志,2020,49(3):289-291+295.
- [14] 陈明勋,刘东亮,罗磊,林改革.大黄红藤消炎方治疗重症急性胰腺炎临床疗效及对 PCT、sICAM-1 影响分析[J].陕西中医,2018,39(9):1217-1220.
- [15] Chen SW, Li SH, Jiang WM, et al. Expression of PD-1/PD-L1 in head and neck squamous cell carcinoma and its clinical significance [J]. *International J Biolog Mark*, 2019,34(4):198-206.
- [16] Cheng GX, Mei YJ, Pan XM, et al. Expression of HER2/c-erbB-2, EGFR protein in gastric carcinoma and its clinical significance [J]. *Open Life Sci*, 2019,14(1):151-158.
- [17] Ji H, Cao M, Ren K, et al. Expression and Clinicopathological Significance of Mel-18 and Bmi-1 in Esophageal Squamous Cell Carcinoma [J]. *Technol Cancer Res Treatm*, 2017,16(6):505-512.
- [18] Jin XH, Lu S, Wang AF. Expression and clinical significance of miR-4516 and miR-21-5p in serum of patients with colorectal cancer [J]. *BMC Cancer*, 2020,20(1):43(18):236-241.
- [19] Jung YS, Lee SO. Apomorphine suppresses TNF- α -induced MMP-9 expression and cell invasion through inhibition of ERK/AP-1 signaling pathway in MCF-7 cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017,25(16):465-471.

(上接第 1610 页)

- [14] 王婷婷. 双胎妊娠绒毛膜性对母儿结局影响的临床分析 [D]. 青岛大学,2018:1-43.
- [15] 彭琼玲,刘方,李秀银,等.早期早产儿尿液 S100B 蛋白与矫正 6 月龄的神经心理发育水平的相关性研究[J].中国

保健营养,2020,30(19):11.

- [16] 张洋,王显鹤,吴祥红,等. NF-KB、S100B 蛋白在早产儿脑损伤中的早期诊断价值[J].黑龙江医药科学,2020,43(4):36-37.

FGF-23、ST2、CXCL16在舒张性心力衰竭患者中表达及临床意义

吕书华* 冯海娟 郭卫丽

[摘要] **目的** 探讨成纤维细胞生长因子-23(FGF-23)、生长刺激表达基因2蛋白(ST2)、CXC型趋化因子配体16(CXCL16)在舒张性心力衰竭(DHF)患者中表达及临床意义。**方法** 选取2019年6月至2020年12月本院收治的108例DHF患者(DHF组)及50例健康对照人群(对照组),比较两组人口学资料、FGF-23、ST2、CXCL16,比较不同舒张功能受损程度者人口学资料、FGF-23、ST2、CXCL16,采用Spearman分析、多分类Logistic回归方程分析、受试者工作特征曲线(ROC)及ROC下面积(AUC)分析分析处理数据。**结果** DHF组FGF-23、ST2、CXCL16高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);房颤、E/A、左室收缩末内径、FGF-23、ST2、CXCL16:重度>中度>轻度,差异有统计学意义($P<0.05$);FGF-23($r=0.818, P<0.05$)、ST2($r=0.754, P<0.05$)、CXCL16($r=0.706, P<0.05$)与舒张功能受损程度呈正相关;多分类Logistic回归方程分析,结果显示,将房颤、E/A、左室收缩末内径控制后,FGF-23、ST2、CXCL16仍与舒张功能受损程度相关($P<0.05$);FGF-23、ST2、CXCL16及联合预测舒张功能重度受损的AUC依次为0.820、0.827、0.764、0.954($P<0.05$)。**结论** FGF-23、ST2、CXCL16在DHF患者中水平升高,并与心脏舒张功能受损程度有关,可作为评价心脏舒张功能的生物标志物。

[关键词] FGF-23; ST2; CXCL16; 舒张性心力衰竭

The expression and clinical significance of FGF-23, ST2 and CXCL16 in patients with diastolic heart failure

LV Shuhua*, FENG Haijuan, GUO Weili

(Department of Emergency, Zhengzhou Seventh People's Hospital, Zhengzhou, Henan, China, 450000)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the expression and clinical significance of fibroblast growth factor-23 (FGF-23), growth stimulation expression gene 2 (ST2), CXC chemokine ligand 16 (CXCL16) in patients with diastolic heart failure (DHF). **Methods** A total of 108 DHF patients (DHF group) and 50 healthy controls (control group) who were admitted to our hospital from June 2019 to December 2020 were selected. The demographic data, FGF-23, ST2, and CXCL16 of the two groups were compared, and the demographic data, FGF-23, ST2, and CXCL16 of people with different degrees of diastolic dysfunction were compared. Spearman analysis, multi-class logistic regression equation analysis, receiver operating characteristic curve (ROC) and area under ROC (AUC) were used to analyze and process the data. **Results** FGF-23, ST2 and CXCL16 in the DHF group were higher than those in the control group ($P<0.05$). Comparison of atrial fibrillation, E/A, left ventricular end systolic diameter, FGF-23, ST2, and CXCL16: severe > moderate > mild ($P<0.05$). FGF-23 ($r=0.818, P<0.001$), ST2 ($r=0.754, P<0.001$), CXCL16 ($r=0.706, P<0.001$) were positively correlated with the degree of diastolic function impairment. Multi-class Logistic regression analysis showed that after controlling the atrial fibrillation, E/A, and left ventricular end-systolic diameter, FGF-23, ST2, and CXCL16 were still related to the degree of diastolic function impairment ($P<0.05$). The AUC of FGF

基金项目:河南省医学科技攻关联合共建项目(2018020858)

作者单位:郑州市第七人民医院急诊科,河南,郑州 450000

*通信作者:吕书华, E-mail:lvshuhua123@126.com

-23, ST2, CXCL16 and the combination predicting severely impaired diastolic function were 0.820, 0.827, 0.764, 0.954, respectively. **Conclusion** The levels of FGF-23, ST2, and CXCL16 are elevated in patients with DHF and are related to the degree of impaired diastolic function. They can be used as biomarkers for evaluating diastolic function.

[KEY WORDS] FGF-23; ST2; CXCL16; Diastolic heart failure

舒张性心力衰竭(Diastolic heart failure, DHF)常见于高血压、糖尿病、微血管性心肌缺血等,以左室舒张末压升高、心肌顺应性降低等为主要特征,可引起呼吸困难、液体潴留、疲乏等,严重降低患者生活质量,并威胁患者生命安全^[1]。目前多认为DHF病理生理机制涉及代谢紊乱、心肌纤维化、系统性炎症等多方面,但仍未完全阐明,因此加强对DHF研究,探索与舒张功能受损相关的生物标志物具有积极意义^[2]。成纤维细胞生长因子-23(Fibroblast Growth Factor-23, FGF-23)可调节肾脏对磷酸盐重吸收、维持血磷稳定等,参与高血压、左心室肥大、冠心病等发生与进展,并能通过激活信号传导与转录激活因子3促进心房纤维化^[3]。生长刺激表达基因2蛋白(Growth stimulation expression gene 2, ST2)、CXC型趋化因子配体16(CXC Chemokine Ligand 16, CXCL16)是近年来发现的炎性因子,其中ST2可预测急性心肌梗死后收缩性心力衰竭的发生风险,CXCL16与高血压心肌重构有关,在患者病情缓解后降低^[4-5]。但现阶段关于FGF-23、ST2、CXCL16在DHF患者中表达及临床意义的报道较少,本研究对此进行探讨,旨在为临床深入了解DHF发病机制、评估舒张功能受损程度等提供参考,报告如下。

1 资料和方法

1.1 一般资料

选取2019年6月至2020年12月本院收治的108例DHF患者(DHF组)及50例健康对照人群(对照组)。①纳入标准:DHF组符合DHF诊断标准^[6];首次确诊;入组前无相关治疗史。②排除标准:肝肾功严重不全者;急性感染类疾病者;癌症患者;收缩性心力衰竭者;妊娠期、哺乳期患者;急性心肌梗死者。本研究获本院伦理委员会审核通过,患者家属均同意知情。

1.2 方法

1.2.1 资料收集

收集受试者年龄、性别、体质量指数、饮酒史、吸烟史、血脂异常、糖尿病、高血压、冠心病、

房颤、左室射血分数、舒张早期快速充盈波和舒张晚期心房收缩波充盈速度比(E/A)、左室舒张末内径、左室收缩末内径,并参考《舒张性心力衰竭诊断和治疗专家共识》^[6]中超声心功能分级,将DHF患者舒张功能受损程度分为轻度、中度、重度。

1.2.2 各指标检测

治疗前采集受试者肘部静脉血5 mL,采用酶联免疫吸附法检测血清FGF-23、ST2、CXCL16水平,FGF-23试剂盒购于南京森贝伽生物科技有限公司,ST2试剂盒购于深圳市安提生物科技有限公司,CXCL16试剂盒购于上海瑞番生物科技有限公司,均严格按照试剂盒说明书操作进行检测。

1.3 统计学方法

数据采用SPSS 22.0处理,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 t 检验,计数资料用 $n(\%)$ 表示, χ^2 检验,采用Spearman分析FGF-23、ST2、CXCL16与舒张功能受损程度关系,采用多分类Logistic回归方程分析舒张功能受损程度的相关影响因素,采用受试者工作特征曲线(ROC)及ROC下面积(AUC)分析各指标评估舒张功能重度受损的价值。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组人口学资料、FGF-23、ST2、CXCL16比较

两组年龄、性别、体质量指数、饮酒史、吸烟史比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);DHF组FGF-23、ST2、CXCL16高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表1。

2.2 不同舒张功能受损程度者人口学资料、FGF-23、ST2、CXCL16比较

不同舒张功能受损程度患者年龄、性别、体质量指数、饮酒史、吸烟史、血脂异常、糖尿病、高血压、冠心病、左室射血分数、左室舒张末内径比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);房颤、E/A、左室收缩末内径、FGF-23、ST2、CXCL16:重度>中度>轻度,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表2。

表1 两组人口学资料、FGF-23、ST2、CXCL16比较
[($\bar{x} \pm s$), n(%)]

Table 1 Comparison of demographic data, FGF-23, ST2, CXCL16 between 2 groups [($\bar{x} \pm s$), n(%)]

资料	DHF组 (n=108)	对照组 (n=50)	t/ χ^2 值	P值
年龄(岁)	66.30±12.45	64.25±11.07	0.996	0.321
性别				
男	48(44.44)	27(54.00)	0.898	0.343
女	60(55.56)	23(46.00)		
体质量指数(kg/m ²)	23.48±1.39	23.70±1.55	0.892	0.374
饮酒史	81(75.00)	42(84.00)	1.126	0.289
吸烟史	32(29.63)	20(40.00)	1.228	0.268
FGF-23(ng/L)	59.78±16.11	32.06±10.76	11.068	<0.001
ST2(ng/mL)	39.87±10.77	15.29±4.36	15.538	<0.001
CXCL16(ng/L)	4.85±1.54	2.60±0.82	9.703	<0.001

2.3 FGF-23、ST2、CXCL16与舒张功能受损程度关系

采用 Spearman 进行相关性分析,结果显示, FGF-23 ($r=0.818, P<0.05$)、ST2 ($r=0.754, P<0.05$)、CXCL16 ($r=0.706, P<0.05$)与舒张功能受损程度呈正相关。

2.4 多分类 Logistic 回归方程分析

以舒张功能受损程度为因变量(轻度赋值为1,中度赋值为2,重度赋值为3),以 FGF-23、ST2、CXCL16为自变量(低于均值赋值为1,高于均值赋值为2,FGF-23、ST2、CXCL16均值依次为 59.78 ng/L、39.87 ng/mL、4.85 ng/L),

应用多分类 Logistic 回归方程分析显示,将房颤、E/A、左室收缩末内径控制后,FGF-23、ST2、CXCL16仍与舒张功能受损程度相关($P<0.05$)。见表3。

表3 多分类 Logistic 回归方程分析

Table 3 Multi-class logistic regression equation analysis

影响因素	β 值	SE值	Wald χ^2	OR值	95%CI	P值
FGF-23	0.507	0.135	14.082	1.660	1.068~2.579	<0.001
ST2	0.428	0.129	10.987	1.534	1.247~1.886	<0.001
CXCL16	0.513	0.141	13.236	1.670	1.577~1.769	<0.001

2.5 FGF-23、ST2、CXCL16评估舒张功能重度受损价值

以重度患者各指标为阳性样本,以轻度和中度患者各指标为阴性样本,绘制各指标评估舒张功能重度受损的 ROC 曲线显示,FGF-23、ST2联合 CXCL16 预测舒张功能重度受损的 AUC 最大($P<0.05$)。见表4、图1。

表4 ROC 分析结果

Table 4 Results of ROC analysis

指标	AUC	95%CI	cut-off 值	敏感度 (%)	特异度 (%)	P值
FGF-23	0.820	0.734~0.887	>67.24 ng/L	73.53	81.08	<0.001
ST2	0.827	0.742~0.893	>44.52 ng/mL	70.59	86.49	<0.001
CXCL16	0.764	0.673~0.840	>5.44 ng/L	58.82	83.78	<0.001
联合	0.954	0.896~0.985		82.35	94.59	<0.001

表2 不同舒张功能受损程度者人口学资料、FGF-23、ST2、CXCL16比较 [($\bar{x} \pm s$), n(%)]

Table 2 Comparison of demographic data, FGF-23, ST2, and CXCL16 of people with different degrees of diastolic dysfunction [($\bar{x} \pm s$), n(%)]

资料	轻度(n=25)	中度(n=49)	重度(n=34)	F/ χ^2 值	P值
年龄(岁)	64.52±10.14	66.12±9.69	67.87±9.13	0.889	0.414
性别					
男	12(48.00)	19(38.78)	17(50.00)	1.191	0.551
女	13(52.00)	30(61.22)	17(50.00)		
体质量指数(kg/m ²)	23.62±1.35	23.59±1.16	23.22±1.28	1.093	0.339
饮酒史	20(80.00)	34(69.39)	27(79.41)	1.509	0.470
吸烟史	7(28.00)	14(28.57)	11(32.35)	0.179	0.914
病史					
血脂异常	3(12.00)	6(12.24)	4(11.76)	0.004	0.998
糖尿病	5(20.00)	10(20.41)	9(26.47)	0.520	0.771
高血压	4(16.00)	11(22.45)	8(23.53)	0.558	0.756
冠心病	3(12.00)	5(10.20)	6(17.65)	1.012	0.603
房颤	1(4.00)	9(18.37) ^a	12(35.29) ^{ab}	8.920	0.012
左室射血分数(%)	62.58±5.79	61.97±5.84	62.33±5.25	0.105	0.9000
E/A	0.85±0.11	1.09±0.14 ^a	1.27±0.16 ^{ab}	64.271	<0.001
左室舒张末内径(mm)	47.99±5.28	48.24±6.07	48.68±5.89	0.109	0.897
左室收缩末内径(mm)	29.71±4.17	31.94±5.70 ^a	34.95±5.92 ^{ab}	6.908	0.002
FGF-23(ng/L)	42.11±11.86	56.69±14.52 ^a	77.23±18.03 ^{ab}	40.370	<0.001
ST2(ng/ml)	25.03±8.55	36.97±9.31 ^a	54.96±12.45 ^{ab}	65.017	<0.001
CXCL16(ng/L)	3.10±0.87	4.52±1.05 ^a	6.61±1.57 ^{ab}	64.483	<0.001

注:与轻度比较,^a $P<0.05$;与中度比较,^b $P<0.05$ 。

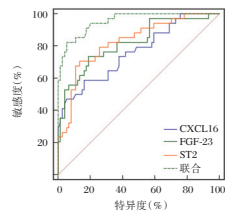


图1 ROC 曲线图

Figure 1 ROC curve

3 讨论

FGF-23是成纤维细胞生长因子家族成员之一,在急性心肌梗死患者中,高FGF-23水平者不良心血管事件发生率较高,并与高血压患者亚临床心血管损伤有关,被认为是心血管疾病的标志物^[7-8]。本研究显示,与健康人群相比,DHF患者FGF-23较高,与 von Jeinsen B等^[9]报道相似,证实 FGF-23与DHF有关。且在此基础上本研究还发现,随着舒张功能受损程度增加,FGF-23水平逐渐递增,提示 FGF-23与DHF严重程度有关。FGF-23能激活心肌细胞中钙调节神经磷酸酶/T细胞细胞核因子轴,刺激心肌产生病理性肥大和心脏重构,诱导DHF的发生,并能通过抑制血管紧张素转换酶2表达,激活肾素-血管紧张素-醛固酮系统,促进心肌纤维化,同时还能提高成骨细胞分化,促进磷酸盐介导的血管钙化,引起内皮功能障碍,肾素-血管紧张素-醛固酮系统的激活、血管钙化、内皮功能障碍均可导致心脏舒张功能降低,影响DHF的发生^[10]。可见临床通过检测 FGF23不仅评估个体DHF风险,还能了解其心脏舒张功能受损程度,从而为临床干预提供参考。

ST2基因定位于2号染色体上,是白介素-1受体家族成员之一,能通过肥大细胞、2型辅助性T细胞及其相关细胞因子等参与机体炎症反应和免疫过程^[11]。王清传等^[12]报道,ST2水平增高是心力衰竭患者1年内发生住院/再住院和心源性死亡的危险因素,能预测心力衰竭患者心血管事件危险情况。本研究显示,ST2在DHF患者中升高,与舒张功能受损程度相关,可评估患者舒张功能受损情况。ST2在DHF中机制可能有:①ST2能通过作用于肥大细胞、2型辅助性T细胞,介导炎症反应,引起动脉粥样硬化,影响心肌血供,并进一步影响心肌细胞的生存与凋亡;②ST2与心肌牵张力和纤维化有关,可介导心室重构,从而导致舒张功能障碍^[13]。ST2水平越高,舒张功能受损越严重,因此临床对ST2水平较高患者,宜注意其DHF发生风险,

及时给予干预,以改善患者预后。

CXCL16是一种趋化因子,能诱导激活CD4⁺、CD8⁺T细胞、自然杀伤细胞等向炎症和损伤部位募集,促进炎症细胞浸润^[14]。本研究显示,DHF患者CXCL16高于健康人群,随心脏舒张功能受损程度增加逐渐递增,与舒张功能受损程度有关。王延博等^[15]发现,CXCL16水平较高患者,舒张功能更差,可作为诊断DHF的标志物,佐证了CXCL16在DHF中作用。DHF发生进展过程中,机体常伴有神经-内分泌功能失调,产生肿瘤坏死因子 α 、干扰素 γ 等炎症介质,协同刺激CXCL16的产生,CXCL16又能协助炎症介质参与心室重构,并能通过C-Jun氨基末端激酶途径,激活成纤维细胞,加重心肌纤维化现象,同时DHF发生后机体血流动力学障碍可引起心肌细胞缺血缺氧,刺激了白介素-18、干扰素 γ 等炎症细胞因子的产生,使CXCL16合成分泌增加,从而形成恶性循环,影响患者舒张功能^[16]。因此在DHF治疗中,应重视慢性炎症反应的控制与纠正,降低CXCL16等炎症介质的水平,从而保护心肌细胞和心功能,改善预后。

综上,FGF-23、ST2、CXCL16在DHF患者中水平升高,并与心脏舒张功能受损程度有关,可作为评价心脏舒张功能的生物标志物,为临床干预提供参考。

参考文献

- [1] 白兴合,代玉川,刘平,等.慢性心力衰竭合并糖尿病患者血浆BNP、CRP和HbA1c的表达及与心功能分级的相关性[J].分子诊断与治疗杂志,2021,13(1):119-122+127.
- [2] 周恒,唐其柱.转录激活因子3在心血管与代谢性疾病中的作用[J].中华生物医学工程杂志,2020,26(4):375-380.
- [3] 李少川.FGF23通过ROS/STAT3/SMAD3途径促进心房纤维化[D].南昌大学,2019:3-19.
- [4] 方悦,张萌,张鹏思,等.比索洛尔联合贝那普利对收缩期高血压伴心肌重构者血清CXCL16与ET-1水平的影响[J].中国医师杂志,2019,21(11):1696-1698.
- [5] 王国良,马光,滕伟,等.血清sST2结合左心室射血分数对急性心肌梗死后心力衰竭的预测价值[J].安徽医学,2019,40(4):384-388.
- [6] 廖玉华,杨杰孚,张健,等.舒张性心力衰竭诊断和治疗专家共识[J].临床心血管病杂志,2020,36(1):1-10.
- [7] 李伟,邓向海,马强.急性ST段抬高型心肌梗死患者血清成纤维细胞生长因子23动态变化及临床意义[J].心血管病杂志,2019,38(2):124-127+132.
- [8] 林瑶,石琳,刘岩岩,等.原发性高血压患儿血浆成纤维细胞生长因子23与亚临床心血管损伤的关系[J].中华儿科杂志,2019,57(6):471-476.

(下转第1622页)

CYFRA21-1、LDH联合NSE检测辅助诊断肺癌及与TNM分期的关系

余剑桥* 周俊 付海琴

[摘要] 目的 探讨血清细胞角蛋白-19片段抗原(CY-FRA21-1)、乳酸脱氢酶(LDH)联合神经元特异性烯醇化(NSE)检测辅助诊断肺癌及与TNM分期的关系。方法 选取2016年7月至2020年11月本院收治的98例肺癌患者为肺癌组,98例良性肺疾病者为良性组,98例健康体检人群为健康组。比较不同人群血清CYFRA21-1、LDH及NSE水平,分析CYFRA21-1、LDH及NSE对肺癌患者的诊断价值。结果 CYFRA21-1、LDH及NSE水平比较:肺癌组>良性组>健康组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。血清CYFRA21-1、LDH及NSE联合检测诊断肺癌的灵敏度为91.84%、特异度为91.84%、准确度为90.82%,明显高于单一检测($P<0.05$)。随TNM分期增加,肺癌患者血清CYFRA21-1、LDH及NSE水平均呈逐渐上升趋势($P<0.05$)。不同病理类型肺癌患者血清CYFRA21-1、LDH及NSE水平比较:腺癌<鳞癌<小细胞肺癌,差异均有统计学意义($P<0.05$)。结论 血清CYFRA21-1、LDH联合NSE检测在肺癌诊断、TNM分期以及病理分型均具有一定的临床诊断价值,值得推广应用。

[关键词] FRA21-1; 肺癌; LDH; NSE; TNM分期

CYFRA21-1, LDH combined with NSE detection in the auxiliary diagnosis of lung cancer and its relationship with TNM staging

YU Jianqiao*, ZHOU Jun, FU Haiqin

(Department of Respiratory Medicine, Xuancheng Central Hospital, Xuancheng, Anhui, China, 242000)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the value of serum Cytokeratin fragment 21-1 (CYFRA21-1), lactate dehydrogenase (LDH) combined with neuron specific enolization (NSE) detection in the auxiliary diagnosis of lung cancer and its relationship with TNM staging. **Methods** The 98 patients with lung cancer admitted to this hospital from July 2016 to November 2020 were selected as the lung cancer group, 98 patients with benign lung disease were selected as the benign group, and 98 patients who had healthy physical examination were selected as the healthy group. The levels of serum CYFRA21-1, LDH and NSE in different groups were compared, and the value of CYFRA21-1, LDH and NSE in the diagnosis of lung cancer was analyzed. **Results** The levels of CYFRA21-1, LDH and NSE were as follows: the lung cancer group >the benign group >the healthy group, the difference was statistically significant ($P<0.05$). The sensitivity, specificity, and accuracy of the combined detection of serum CYFRA21-1, LDH and NSE in the diagnosis of lung cancer were 91.84%, 91.84% and 90.82% respectively, which were significantly higher than those of the single detection ($P<0.05$). With the increasing of TNM staging, serum CYFRA21-1, LDH and NSE levels of lung cancer patients showed a gradual upward trend ($P<0.05$). The levels of serum CYFRA21-1, LDH and NSE in patients with different pathological types of lung cancer were as follows: adenocarcinoma < squamous cell carcinoma < small cell lung cancer, the difference was statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** Serum CYFRA21-1,

基金项目:安徽省自然科学基金项目(1808085MH312)

作者单位:宣城市中心医院呼吸内科,安徽,宣城 242000

*通信作者:余剑桥, E-mail:276156894@qq.com

LDH combined with NSE detection has certain clinical value in the early diagnosis of lung cancer, TNM staging and pathological classification, and it is worthy of clinical application.

[KEY WORDS] CYFRA21-1; Lung cancer; LDH; NSE; TNM staging

原发性支气管肺癌是起源于支气管粘膜或腺体的癌症,简称肺癌。肺癌实际为支气管源性癌,其大多数肿瘤细胞起源于各级支气管粘膜上皮^[1]。咳嗽咳痰、痰中带血、咯血、胸痛胸闷、气促等是肺癌患者的常见症状,随着病情加重,体重会急剧下降^[2]。肺癌死亡率占所有癌症死亡率的33%左右,发病率占所有癌症发病率的12%左右,男性肺癌发病率高于女性,近年来肺癌死亡率和发病率出现明显升高趋势^[3]。吸烟是导致肺癌的主要原因,不吸烟者比吸烟者肺癌患病率低10倍左右,职业因素、空气污染以及慢性支气管炎与肺癌的发生也存在一定关系。肺癌是严重威胁人身体健康的因素,早期诊断和治疗是关键所在^[4]。本文通过应用血清细胞角蛋白-19片段抗原(Cytokeratin fragment21-1, CY-FRA21-1)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)与神经元特异性烯醇化(Neuron specific enolization, NSE)对肺癌进行联合诊断,探讨其辅助诊断价值以及其与TNM分期的关系,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2016年7月至2020年11月本院收治的98例肺癌患者设为肺癌组。其中男性患者63例,女性患者35例;平均年龄为(59.23±6.48)岁;TNM分期^[5]:I期9例,II期10例,III期41例,IV期38例;根据病理分类^[6]:鳞癌41例,腺癌24例,小细胞癌33例。纳入标准:①均符合《中国原发性肺癌诊疗规范》中关于肺癌的诊断标准,且经病理学检查、细胞学检查以及影像学检查确诊^[7];②所有患者的病理组织及影像学资料均完整。排除标准:①存在其他系统疾病或恶性肿瘤等疾病患者;②伴随严重心、肝、肾功能不全患者;③处于妊娠期女性;④存在精神疾病无法配合本研究或依从性差者。另选同期98例良性肺疾病患者设为良性组,其中67例肺炎患者,31例其他肺部疾病患者,男59例,女39例,年龄平均(58.86±6.37)岁。选取98例同时间段健康体检人群作为健康组,其中男56例,女42例,年龄平均(58.73±6.33)岁。3组一般资料比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

本研究经医院医学伦理委员会批准通过,所有受试者均签署知情同意书。

1.2 检测方法

所有对象均在医生协助下完善相关检查,于两组患者入院第2天及健康组体检当天清晨空腹抽取静脉血5 mL自然凝固后以3 000 rpm离心10 min,取血清。采用电化学发光法检测CY-FRA21-1、NSE水平,检测仪器为罗氏Cobas e601全自动电化学发光仪,试剂盒由罗氏诊断产品(上海)有限公司提供;采用速率法检测LDH水平,检测仪器为日立公司7600-10全自动生化分析仪,操作严格按照说明书进行。临界值^[8]:血清CY-FRA21-1为9.5 ng/mL,LDH为196.2 U/L,NSE为12.5 ng/mL,检测值大于临界值则为阳性,以此作为判定标准。

1.3 统计学方法

采用SPSS 22.0软件进行统计分析,计量资料采用($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 t 检验、多组间比较采用方差检验;计数资料采用 $n(\%)$ 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 不同人群血清CYFRA21-1、LDH及NSE水平比较

CYFRA21-1、LDH及NSE水平比较:肺癌组>良性组>健康组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表1。

表1 各组血清CYFRA21-1、LDH及NSE水平比较($\bar{x} \pm s$)
Table 1 Comparison of serum CYFRA21-1, LDH and NSE levels in different groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	CYFRA21-1 (ng/mL)	LDH (U/L)	NSE (ng/mL)
肺癌组	98	10.64±1.05	205.13±20.98	15.34±1.22
良性组	98	6.14±0.59	158.64±16.93	11.06±0.94
健康组	98	2.11±0.40	95.35±9.41	8.53±0.79
<i>F</i> 值		3323.82	1094.90	1162.74
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001

2.2 血清CYFRA21-1、LDH及NSE对肺癌的诊断价值

血清的CYFRA21-1、LDH及NSE联合检测诊断肺癌的灵敏度为91.84%、特异度为91.84%、准确度为90.82%,明显高于单一检测诊断结果,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表2。

表2 血清CYFRA21-1、LDH及NSE对肺癌的诊断价值
[n(%)]

Table 2 The diagnosis of serum CYFRA21-1, LDH and NSE in lung cancer [n(%)]

检查指标	n	灵敏度(%)	特异度(%)	准确度(%)
CYFRA21-1	98	72(73.47)	82(83.67)	79(80.61)
LDH	98	75(76.53)	78(79.59)	76(77.55)
NSE	98	78(79.59)	70(71.43)	71(72.45)
CYFRA21-1+LDH+NSE	98	90(91.84)	90(91.84)	89(90.82)
χ^2 值		12.073	14.156	11.168
P值		0.007	0.003	0.011

2.3 肺癌患者血清CYFRA21-1、LDH及NSE水平与TNM分期的关系比较

随着TNM分期的增加,肺癌患者血清的CYFRA21-1、LDH及NSE水平均呈逐渐上升趋势,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表3。

表3 肺癌患者血清CYFRA21-1、LDH及NSE水平与TNM分期的关系比较($\bar{x}\pm s$)

Table 3 Comparison of the relationship between serum CYFRA21-1, LDH, NSE levels and TNM stage in patients with lung cancer ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	CYFRA21-1 (ng/mL)	LDH (U/L)	NSE (ng/mL)
鳞癌	41	12.12±1.22	222.38±22.10	13.44±1.11
腺癌	24	9.25±0.83	185.46±18.92	8.25±1.63
小细胞肺癌	33	13.67±1.34	234.15±25.42	18.13±1.79
F值		97.89	34.08	359.72
P值		<0.001	<0.001	<0.001

2.4 肺癌患者血清CYFRA21-1、LDH及NSE水平与不同病理类型的关系比较

不同病理类型肺癌患者血清的CYFRA21-1、LDH及NSE水平比较:腺癌<鳞癌<小细胞肺癌,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表4。

表4 肺癌患者血清CYFRA21-1、LDH及NSE水平与不同病理类型的关系比较($\bar{x}\pm s$)

Table 4 Comparison of serum CYFRA21-1, LDH and NSE levels with different pathological types in lung cancer patients ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	CYFRA21-1 (ng/mL)	LDH (U/L)	NSE (ng/mL)
I期	9	8.23±0.64	191.46±19.33	11.28±1.20
II期	10	10.21±0.98	208.23±20.63	13.24±1.33
III期	41	11.35±1.42	215.33±20.97	15.16±1.42
IV期	38	12.62±1.22	233.68±25.41	17.64±1.73
F值		26.39	8.13	43.74
P值		<0.001	<0.001	<0.001

3 讨论

随着我国工业技术的不断发展,社会的环境

污染问题逐渐加重,我国社会人口肺癌发病率死亡率逐渐增大^[9]。早期发现肺癌并及时干预治疗,患者的死亡概率会得到降低,若未及时治疗,肺癌发生转移,引起并发症,加大治疗难度,预后情况差。目前临床上常用的检查肺癌方法为细胞学检查、肿瘤标志物检查等。进行细胞学检查会对患者造成一定的创伤,且标本采集也有一定困难存在,不利于早期诊断^[10]。使用肿瘤标志物检查具有无创、简便、快速等优点,已成为目前临床上用于疾病辅助诊断的研究方向之一^[11]。

CYFRA21-1作为细胞角蛋白19中的可溶性片段,是细胞骨架重要的组成部分,广泛存在肺上皮细胞。在正常情况下CYFRA21-1在血清中含量低,而一旦上皮细胞出现恶化,角蛋白就会在酶蛋白活性被激活时降解,而由于CYFRA21-1的可融性特征,就会致使CYFRA21-1在血清中含量升高^[12]。据不完全统计,CYFRA21-1水平升高的患者罹患癌症的概率较正常人群增加38%左右^[13]。Huang等^[14]研究显示,CYFRA21-1在血清中的表达水平与临床肿瘤分期为正相关。LDH属于氢转移酶,可催化乳酸氧化成丙酮酸,与细胞代谢、缺氧、无氧酵解、活性状态和恶性转化等密切相关。Lei等^[15]研究发现,肿瘤细胞坏死后,体内代谢转换率加快,细胞膜通透性改变,使组织酶释放进入血液,导致血清LDH活性增加。NSE为肝糖分解酶,在神经元、神经内分泌组织和周围神经组织中存在,是目前临床上用于辅助诊断肺癌的首选指标^[16]。崔丽萍等^[17]报道,NSE在对肺癌化疗诊断效果判定中是一个重要的指标存在,有助于判断患者化疗是否有效。但Lu等^[18]研究发现,红细胞与血小板中含有NSE,溶血易发现假阳性,故单一检测价值不高。

目前国内外鲜少有关于CYFRA21-1、LDH、NSE联合检测的研究,基于此,本文就CYFRA21-1、LDH、NSE进行研究。研究结果与Jiang等^[19]报道相符,说明CYFRA21-1、LDH及NSE在肺癌诊断中具有重要价值。通过分析血清CYFRA21-1、LDH及NSE对肺癌患者的诊断价值发现,三者联合检测的灵敏度、特异度、准确度均优于单一检测,提示三者联合用于肺癌检测可增加一定的敏感度。且随着TNM分期的增加,肺癌患者血清的CYFRA21-1、LDH及NSE水平均呈逐渐上升趋势,这说明CYFRA21-1、LDH及NSE在肺癌的不同发展阶段会呈现改变,会随着病情的加重而逐

渐升高,究其原因可能与CYFRA21-1、LDH及NSE水平和肿瘤负荷量存有直接联系相关。不同病理类型肺癌患者血清的CYFRA21-1、LDH及NSE水平比较:腺癌<鳞癌<小细胞肺癌,表明三者对不同病理类型的肺癌存在一定鉴别作用。因此通过检测CYFRA21-1、LDH及NSE指标水平,可对肺癌患者的病情发展进行动态监测,并及时调整临床诊疗方案。

综上所述,血清CYFRA21-1、LDH联合NSE检测在肺癌诊断、TNM分期以及病理分型均具有一定的临床诊断价值,值得推广应用。

参考文献

[1] 黄丽珍,车建华,段相会,等.非小细胞肺癌患者血清CYFRA21-1、VEGF及CEA的表达及与临床病理特征的相关性研究[J].现代生物医学进展,2018,18(7):1344-1347.

[2] Jiang ZF, Wang M, Xu JL. Thymidine kinase 1 combined with CEA, CYFRA21-1 and NSE improved its diagnostic value for lung cancer[J]. Life Sci, 2018,46(194):1-6.

[3] 许利芳,胡克.血清CEA、SCCA、CYFRA21-1、NSE与血浆D-D联合检测对肺癌诊断的临床意义[J].临床肺科杂志,2017,22(2):233-237.

[4] 金灿灿,邵世和.miR-129通过抑制T细胞因子4的表达影响肺癌A549细胞的上皮间质转化[J].江苏大学学报(医学版),2019,29(4):305-309.

[5] 刘志华,卢旭妹,容元.血清标志物CYFRA21-1、SCC、NSE、CEA及ProGRP联合检测在非小细胞性肺癌中的诊断价值[J].河北医药,2019,41(10):26-30.

[6] Jin JK, Ahn HJ, Park Y. Performances of CYFRA 21-1, Carcinoembryonic Antigen and Their Combination for Lung Cancer Diagnosis[J]. Laborat Med Online, 2020,28(19):149-152.

[7] Singh P, Barpande S, Bhavthankar J, et al. Serum Cyfra 21-1 levels in oral squamous cell carcinoma patients and its clinicopathologic correlation [J]. Indian J Dental Res, 2017, 28 (2):162-162.

[8] Ji M, Zhang LJ. Expression levels of SCCA and CYFRA 21-1 in serum of patients with laryngeal squamous cell carcinoma

and their correlation with tumorigenesis and progression [J]. Clin Transl Oncol, 2020,23(2):289-285.

[9] 王英,李佩章,刘金凤,等.血清HE4、NSE、CYFRA21-1检测在肺癌诊断及淋巴结转移监测中的价值[J].现代肿瘤医学,2019,27(1):74-77.

[10] 陈坚,王棣,向小俐,等.血清TK1、CD147、VEGF、CYFRA21-1和CEA联合检测对非小细胞肺癌的诊断价值研究[J].标记免疫分析与临床,2019,26(7):1135-1140.

[11] Tan Y, Liu L, Sun J, et al. Diagnostic value of NSE, SCC-Ag, CEA and CYFRA21-1 combined with coagulation parameters for lung cancer[J]. Oncol Progr, 2019,42(22):58-62.

[12] 王宇琛,章春芝,王大伟,等.血清Cyfra21-1、LDH、NSE水平检测在肺癌患者辅助诊断中的应用[J].分子诊断与治疗杂志,2020,12(9):1226-1229,1233.

[13] 严宏,彭安林. Cyfra21-1、NSE、SCCA和CRP在老年肺癌患者中的临床应用[J].中国老年学杂志,2016,36(8):1902-1903.

[14] Huang Q, Ding XP. Clinical Significance and Prognosis Evaluation Value of Combined Test of Serum CEA, NSE and CYFRA21-1 in Diagnosis of Lung Cancer [J]. Systems Med, 2018,16(42):106-116.

[15] Lei C, Jiaying LU. The value of serum tumor markers AFP, CYFRA21-1 and NSE in the diagnosis and prognosis of lung cancer[J]. Intern J Laborat Med, 2018, 43(18):236-241.

[16] Cui S, Zheng W, Guo W, et al. Diagnostic value of combined detection of serum HE4, CYFRA21-1, NSE and Pro-GRP in female lung cancer[J]. Intern J Laborat Med, 2018, 22:(122):147-156.

[17] 崔丽萍,张红.吉西他滨联合洛铂化疗对非小细胞肺癌患者血清CEA、CYFRA21-1及NSE指标监测的临床意义研究[J].宁夏医学杂志,2018,40(11):972-974.

[18] Lu Y, Yonghua R. Expression and clinical significance of HE4, CEA, NSE, MMP-9 and CYFRA21-1 in serum of patients with lung cancer [J]. Contemp Med, 2019, 36 (28) : 221-231.

[19] Jiang X, Wu HL, X Deng, et al. Diagnostic Value of Determination of Serum NSE and Cyfra21-1 Levels in Patients with Small Cell Lung Cancer and Non-small Cell Lung Cancer [J]. Pract J Cancer, 2018,27(33):154-158.

(上接第1618页)

[9] von Jeinsen B, Sopova K, Palapies L, et al. Bone marrow and plasma FGF-23 in heart failure patients: novel insights into the heart-bone axis[J]. ESC Heart Fail, 2019,6(3):536-544.

[10] Garcia-Fernandez N, Lavilla J, Martín PL, et al. Increased Fibroblast Growth Factor 23 in Heart Failure: Biomarker, Mechanism, or Both[J]. Am J Hypertens, 2019,32(1):15-17.

[11] McCarthy CP, Januzzi JL Jr. Soluble ST2 in Heart Failure [J]. Heart Fail Clin, 2018,14(1):41-48.

[12] 王清传,张志敏,李喆,等.血浆可溶性生长刺激表达基因2蛋白水平对门诊心力衰竭患者预后的影响[J].海军医学杂志,2020,41(5):561-563+571.

[13] 孔祥权,王志梅,高晓飞,等.急性心肌梗死后血浆可溶性生长刺激表达基因2蛋白与左心室重构的关系[J].心脏杂志,2019,31(4):414-416+421.

[14] Xing J, Liu Y, Chen T. Correlations of chemokine CXCL16 and TNF- α with coronary atherosclerotic heart disease [J]. Exp Ther Med, 2018,15(1):773-776.

[15] 王延博,林玲,李宇球,等.SDF-1、CXCL16水平在包含HFmrEF组的慢性心力衰竭患者中的变化[J].临床心血管病杂志,2018,34(3):249-254.

[16] 王康.慢性心力衰竭患者血清CXCL16与左室射血分数的关系[D].衡阳市:南华大学,2018:1-55.

超声分子成像在乳腺病灶良恶性鉴别诊断中的应用

田苗 高小瞻* 马飞 王露

【摘要】 目的 研究超声分子成像在乳腺病灶良恶性鉴别诊断中的应用效果。方法 选取2019年1月至2020年6月前往本院诊治的120例乳腺疾病患者临床资料,以病理结果为参照,对比超声分子成像、乳腺钼靶检查、超声检查鉴别诊断结果差异。结果 120例乳腺疾病患者病理结果中良性80例、恶性40例,符合率相比较,超声分子成像(95.83%)>乳腺钼靶(85.00%)>超声检查(73.33%),差异有统计学意义($P<0.05$);超声分子成像提示:乳腺恶性病灶在造影剂注入后呈高增强,而乳腺良性病灶在造影剂注入后无增强;以病理结果为参照,敏感度、特异度、准确度相比较,超声分子成像(96.25%、95.00%、95.83%)>乳腺钼靶(86.25%、82.50%、85.00%)>超声检查(77.50%、65.00%、73.33%),差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 在乳腺病灶良恶性鉴别诊断中超声分子成像取得的应用效果显著优于乳腺钼靶检查以及超声检查,值得在今后诊断工作中推广使用。

【关键词】 乳腺病灶;良恶性;鉴别诊断;超声分子成像

Application of Ultrasound Molecular Imaging in the Differential Diagnosis of Benign and Malignant Breast Lesions

TIAN Miao, GAO Xiaozhan*, MA Fei, WANG Lu

[Ultrasound Department, Second People's Hospital of Three Gorges University (Yichang Second People's Hospital), Yichang, Hubei, China, 443000]

【ABSTRACT】 Objective To study the application effect of ultrasound molecular imaging in the differential diagnosis of benign and malignant breast lesions. **Methods** The clinical data of 120 breast disease patients who visited our hospital from January 2019 to June 2020 were retrospectively analyzed. Based on the pathological results, the differences in the differential diagnosis results of ultrasound molecular imaging, mammography, and ultrasound were compared. **Results** The pathological results of 120 patients with breast disease included 80 benign and 40 malignant. Compared with the coincidence rate, molecular ultrasound imaging (95.83%)> mammography (85.00%)> ultrasound (73.33%), the difference was statistically significant ($P<0.05$); Ultrasound molecular imaging suggested that malignant breast lesions showed high enhancement after contrast agent injection, while benign breast lesions showed no enhancement after contrast agent injection; based on case results, sensitivity, specificity, and accuracy were comparable. In comparison, ultrasound molecular imaging (96.25%, 95.00%, 95.83%)> mammography (86.25%, 82.50%, 85.00%)> ultrasound (77.50%, 65.00%, 73.33%), the difference was statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** The application effect of molecular ultrasound imaging in the differential diagnosis of benign and malignant breast lesions is significantly better than that of mammography and ultrasound, and it is worthy of promotion and use in future diagnosis.

【KEY WORDS】 Breast Lesions; Benign and Malignant; Differential Diagnosis; Ultrasound Molecular Imaging

基金项目:湖北陈孝平科技发展基金科技计划项目(2020-036)

作者单位:三峡大学第二人民医院(宜昌市第二人民医院)超声科,湖北,宜昌 443000

*通信作者:高小瞻, E-mail:510521506@qq.com

乳腺疾病是目前十分常见的病症类型^[1]。乳腺病灶性质可分为良性及恶性两大类,良性病灶进展缓慢且可以通过手术彻底切除、治愈率高、患者预后好,而恶性病灶治疗困难性大、预后差^[2]。病理检查是目前国内外医学界公认的乳腺病灶良恶性鉴别诊断的“金”标准,但对患者机体形成的创伤大、患者配合性差,难以作为常规检查手段推广使用^[3]。影像学检查是乳腺疾病筛查的重要手段,包括乳腺钼靶检查、超声检查等,但因多种因素的影响使其鉴别诊断效果较差,越发无法满足诊断工作所需。超声分子成像为分子影像学的重要组成部分,超声造影剂在与特定靶点抗体或者是配体结合后能够对靶点进行成像,但目前研究尚处于基础研究阶段,很少应用于临床。故本研究拟通过研究分析超声分子成像在乳腺病灶良恶性鉴别诊断中应用价值,内容如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2019年1月至2020年6月前往本院诊治的120例乳腺疾病患者为研究对象,年龄38岁~68岁,平均年龄(53.00±15.00)岁;病症类型:乳腺病58例、导管癌30例、纤维腺瘤15例、乳腺炎7例、腺癌7例、髓样癌3例;病程时间:1.5~7.5年,平均病程时间(4.85±0.35)年;吸烟史:有吸烟55例、无吸烟65例;饮酒史:有饮酒33例、无饮酒87例。纳入标准:①患者均为女性;②均伴有乳房疼痛、乳房肿块、乳头溢液等症状表现;③均或病理证实;④均完成超声分子成像、乳腺钼靶检查、超声检查;⑤均为首次或者确诊,研究开始前未接受过相关治疗者。排除标准:①合并严重精神障碍或者是认知功能障碍者;②对超声分子成像所用造影剂过敏或者是禁忌者;③影像资料缺失者;④复诊的乳腺疾病者。本研究已经获得医院医学伦理委员会审批且乳腺疾病患者知情同意。

1.2 仪器和方法

所有乳腺疾病患者均接受超声分子成像、乳腺钼靶检查、超声检查,具体如下:①超声分子成像。仪器设备为德国西门子公司生产的ACUSON X600彩色多普勒超声诊断系统,线阵探头频率10 Hz。使用的超声造影剂为血管内皮细胞生长因子受体2(Vascular Endothelial Growth Factor Recep-

tor 2, VEGFR2)微泡造影剂(BR55),经由患者肘前静脉团注该造影剂,剂量0.25 mL/kg~0.5 mL/kg,输注速度2.5 mL/s。在造影剂注入患者体内后进行观察并持续保留45 s的影像信息,随后从造影剂注入后的第5 min开始每隔2 min保存10 s影像,至第29 min截止。超声分子成像信号强度分为以下3个级别:病灶信号强且明确为高增强;信号低但稳定结合于病灶处为低增强;与病灶周围组织相比并无稳定结合为无增强^[4]。②乳腺钼靶检查。仪器设备为德国西门子公司生产的Mammomat Novation DR全数字化乳腺X线机。具体参数设定如下:管电压40 kV~150 kV、最大管电流时间积850 nAs。拍摄所有乳腺疾病患者常规头尾位、内外侧斜位影像。利用5 M Barco全屏观察形成的影像,如有必要加摄乳腺侧围检查。③超声检查。仪器设备同超声分子成像。协助患者仰卧于扫描床,先期进行首诊以明确肿块所处位置、分布象限等信息后叮嘱其双上臂高举过头,促使整个乳房部位充分暴露于医务人员面前。检测外象限期间根据需要调整体位为侧卧位,如有必要可朝向一侧倾斜以进一步提高暴露效果。直接接触法将超声探头置于乳腺部位后以乳头为圆心向乳腺边缘按照由外向内的顺序做辐射状探查。顺时针探查360°以确保所有断面能够相互重叠。线阵探头置于乳腺中央区肿块位置后采集回波并据此辨明病灶良恶性。二维超声探查完毕后启动彩色多普勒超声成像系统进行更为深入探查。检查腋窝时叮嘱患者双手置于枕部,上臂维持外展位。

以上检查均由影像科3名具有丰富诊断经验的医师完成,在意见不一时采取协商的方式解决分歧,最终出具诊断报告。

1.3 观察指标

选取符合率、敏感度、特异度、准确度为观察指标。符合率(%)=准确诊断例数/总例数×100%。敏感度(%)=真阳性/(真阳性+假阴性)×100%^[5];特异度(%)=真阴性/(真阴性+假阳性)×100%^[6];准确度(%)=(真阳性+真阴性)/(真阳性+假阳性+真阴性+假阴性)×100%^[7]。

1.4 统计学分析

采用SPSS 25.0统计软件对数据进行处理;计数资料采用 $n(\%)$ 表示,以 χ^2 检验; $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3种影像学检查手段符合率比较

120例乳腺病变患者病理结果中良性80例、恶性40例,三种影像学检查手段符合率比较,超声分子成像(95.83%)>乳腺钼靶(85.00%)>超声检查(73.33%),差异有统计学意义($P<0.05$)。见表1。

表1 3种影像学检查手段符合率比较 [n(%)]

Table 1 Comparison of coincidence rate of three imaging examination methods [n(%)]

影像学检查手段	良性	恶性	符合率(%)
超声分子成像	77(96.25)	38(95.00)	95.83 ^{ab}
乳腺钼靶	69(86.25)	33(82.50)	85.00 ^a
超声检查	62(77.50)	26(65.00)	73.33
χ^2 值	-	-	5.478
P值	-	-	0.032

注:与超声相比较,^a $P<0.05$;与乳腺钼靶相比较,^b $P<0.05$ 。

2.2 良恶性病灶的超声分子成像

患者XX,女性,57岁,导管癌,病灶位于右乳内上象限,病灶直径0.9cm,造影剂注入前灰阶超声成像提示低回声实质性病灶,造影剂注入11min后超声分子成像中黄色箭头所示病灶高增强,蓝色箭头示为伪影。见图1~2。

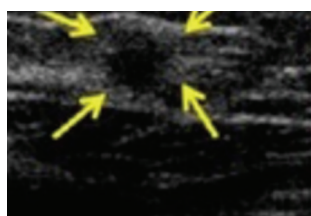


图1 造影剂注入前灰阶超声成像

Figure 1 Gray-scale ultrasound imaging before contrast agent injection

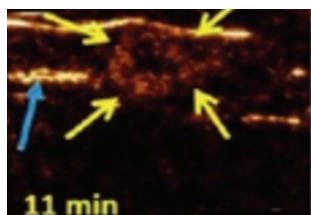


图2 造影剂注入11分钟后超声分子成像

Figure 2 Ultrasound molecular imaging 11 minutes after contrast agent injection

患者XX,女性,48岁,纤维腺瘤,病灶位于右乳外上象限,病灶直径2.1cm,造影剂注入前灰阶超声成像提示低回声实质性病灶,造影剂注入11min后超声分子成像中黄色箭头所示病灶无增强。见图3~4。

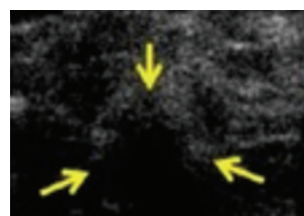


图3 造影剂注入前灰阶超声成像

Figure 3 Gray-scale ultrasound imaging before contrast agent injection

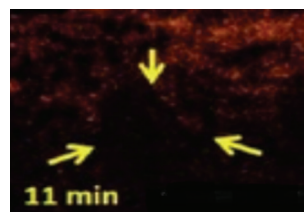


图4 造影剂注入11分钟后超声分子成像

Figure 4 Ultrasound molecular imaging 11 minutes after contrast agent injection

2.3 3组影像学检查手段诊断效能比较

以病理结果为参照,敏感度、特异度、准确度相比较,超声分子成像(96.25%、95.00%、95.83%)>乳腺钼靶(86.25%、82.50%、85.00%)>超声检查(77.50%、65.00%、73.33%),差异有统计学意义($P<0.05$)。见表2。

表2 3种影像学检查手段诊断效能比较 (%)

Table 2 Comparison of diagnostic efficiency of 3 imaging methods (%)

影像学检查手段	n	敏感度(%)	特异度(%)	准确度(%)
超声分子成像	120	96.25 ^{ab}	95.00 ^{ab}	95.83 ^{ab}
乳腺钼靶	120	86.25 ^a	82.50 ^a	85.00 ^a
超声	120	77.50	65.00	73.33
χ^2 值		6.433	7.587	5.478
P值		0.017	0.009	0.032

注:与超声相比较,^a $P<0.05$;与乳腺钼靶相比较,^b $P<0.05$ 。

3 讨论

乳腺疾病是医学界公认的严重威胁女性身心健康的“头号杀手”,尤以乳腺癌的危害性最大^[8]。由于乳腺恶性疾病发病早期缺乏特异性,获得明确诊断时往往已经进展至中晚期,因病情复杂而不得不切除整个乳房,乳房的缺失导致其形体改变,生存质量急剧下降^[9]。超声检查为我国基层医疗卫生机构乳腺疾病筛查的常用影像学检查手段^[10]。乳腺钼靶检查则是乳腺疾病诊断的首选手段,特别是近些年来分辨率显著提升下能够筛查出以往首诊无法触及的结节,“隐匿性乳腺癌”筛查效果更佳^[11]。然而,由于中国女性的乳房体积

普遍较小,腺体排列更为致密,病灶位于深部组织时难以及时检出,以上两种影像学检查手段均有较高的漏诊率。

随着分子影像学的快速发展,超声分子成像步入临床视野,使用的靶向超声造影剂表面连接有Ⅲ型酪氨酸激酶受体,在无癌变的组织中不会表达或者是仅呈低表达,但在恶性肿瘤组织中呈不同程度的高表达,故此种特定分子表达水平差异性在理论上有助于病灶良恶性质的鉴别诊断^[12]。孙睿颖等^[13]在其研究中已经证实超声分子成像能够应用于动脉粥样硬化炎性病程进展的评估工作中,而葛洁等^[14]则是通过基础研究探讨了乳腺癌分子成像的使用价值,但不足之处在于并未应用于临床。

本研究表明超声分子成像具有更高诊断效能。总结原因在于:①乳腺疾病具体类型多样且病情轻重不一,超声检查过程中除了乳头、胸大肌以及腋窝外其余部位缺乏一致性的、可重复性的标记,使得细小病灶容易被遗漏。此外,超声检查需要医务人员手动完成,后者工作经验、知识储备也会对诊断结果造成干扰。乳腺钼靶虽然分辨率较超声更高,但部分恶性乳腺疾病患者典型的局限致密型浸润、周边存有毛刺、恶性钙化特征没有充分体现,由此导致阅片时发生漏诊。②超声分子成像是将具有分子特异性的抗体或者是配体与声学造影剂有机结合,在造影剂表面构建靶向声学造影剂,注入患者体内后能够自动与靶区相结合,形成特异性的超声分子影像。该成像手段的出现预示着超声影像学已经从以往的非特异性物理成像朝着特异性靶向分子成像转变,也是今后超声影像重要的前行方向。本研究中使用的靶向超声造影剂为临床级别的VEGFR2微泡造影剂(BR55),其所具有的安全性已经获得了国内外研究的证实。当该造影剂沿着静脉血管进入到乳腺良性病灶后并无增强,而进入到乳腺恶性病灶后呈高增强,使得二者形成的超声分子成像呈现出显著的差异性,并且本研究推测超声分子成像低增强与高增强或可能与乳腺恶性病灶的病理类型有关,但由于国内尚无此方面的临床研究,故仍需证实。由于超声分子成像并未使用特殊的仪器以及探头,当前基层医疗卫生机构使用的超声设备具有较好的兼容性,为其推广使用创造了便利条件。加之超声分子成像完成后体内残余的未能够与靶点相结合的游离微泡在较短的时间内即可以

自行清除,且靶向结合微泡信号强度持续时间可达注入之后的29 min,此点也为单次造影剂成像诊断提供了可行性^[15]。

综上所述,在乳腺病灶良恶性质鉴别诊断中超声分子成像取得的应用效果显著优于乳腺钼靶检查以及超声检查,值得在今后诊断工作中推广使用。

参考文献

- [1] 王亮,彭勇,蒋宇宏. 三种影像技术联合对乳腺疾病的诊断效能研究[J]. 影像科学与光化学, 2020, 38(3): 487-490.
- [2] 陈丽莉,程晓萍,白明宇,等. 2013-2018年营口市城市户籍居民恶性肿瘤死因分析[J]. 中国全科医学, 2020, 23(27): 3427-3432.
- [3] 倪瞰,王玲,詹小林,等. 乳腺癌超声BI-RADS分级与病理检查结果对比分析[J]. 临床与实验病理学杂志, 2019, 35(5): 518-521.
- [4] 杨佳琪,吕苇,姜一弘,等. 双向靶向纳米超声造影剂在人类表皮生长因子受体2阳性乳腺癌成像中的应用研究[J]. 中华超声影像学杂志, 2020, 29(7): 623-627.
- [5] 陈炜,马大钊,李婷,等. ABVS联合手动超声在乳腺良恶性病灶鉴别诊断中的价值[J]. 中国超声医学杂志, 2020, 36(6): 492-494.
- [6] 张鑫,闵智乾,雷晓燕,等. MR动态增强MIP技术在乳腺疾病良恶性鉴别中的应用[J]. 实用放射学杂志, 2018, 34(1): 35-38.
- [7] 崔亚云,隋秀芳,叶磊,等. ARFI技术评估不同深度乳腺良恶性病灶的价值[J]. 安徽医科大学学报, 2019, 54(11): 1806-1810.
- [8] 韦美德,董家书,周格琛,等. 乳腺癌患者血清PPAR- γ 基因甲基化qPCR检测及临床意义[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2018, 10(4): 241-245+267.
- [9] 徐书星,霍庆赞,张明远,等. 血清CA153、CEA、SF、CT及Hey联合检测对乳腺癌的临床诊断价值[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(2): 190-194.
- [10] 吴巧玲. 乳腺彩超检查在育龄女性常规体检中的应用及对乳腺良恶性疾病的鉴别诊断价值[J]. 中国妇幼保健, 2020, 35(16): 3114-3116.
- [11] 姚成才,朱倩华,陈庞洲,等. 佛山市南海区适龄妇女乳腺疾病分布状况及相关因素的调查[J]. 中国妇幼保健, 2018, 33(13): 3046-3049.
- [12] Magro G, Salvatorelli L, Puzzo L, et al. Practical approach to diagnosis of bland-looking spindle cell lesions of the breast [J]. Pathologica, 2019, 111(4): 344-360.
- [13] 孙睿颖,刘娅妮,田洁,等. 超声分子成像评估血小板在动脉粥样硬化炎性病程进展中的作用[J]. 中华超声影像学杂志, 2019, 28(12): 1076-1081.
- [14] 葛洁,王健,曹旭晨. 乳腺癌分子成像的应用价值[J]. 国际医学放射学杂志, 2019, 42(2): 168-172.
- [15] Zheng F, Li P, Bachawal SV, et al. Assessment of Metastatic and Reactive Sentinel Lymph Nodes with B7-H3-Targeted Ultrasound Molecular Imaging: A Longitudinal Study in Mouse Models [J]. Mol Imaging Biol, 2020, 22(4): 1003-1011.

lncRNA UCA1、VEGF、PKC α 于肾上腺良恶性肿瘤中表达变化及与预后的关系

吴悠悠¹ 任巧霞¹ 徐柳汀^{2*}

[摘要] **目的** 探讨长链非编码RNA尿路上皮相关基因(*lncRNA UCA1*)、血管生长内皮因子(VEGF)、蛋白激酶C α (PKC α)在肾上腺良恶性肿瘤中表达变化及与预后的关系。**方法** 选取2014年1月至2018年5月本院肾上腺恶性肿瘤患者74例为恶性组、肾上腺良性肿瘤患者31例为良性组。比较两组及恶性组不同病理特征患者*lncRNA UCA1*、VEGF、PKC α 相对表达量,分析上述指标之间关系、与恶性组患者病理特征的相关性、对肾上腺良恶性肿瘤的鉴别价值及与预后的关系。**结果** 恶性组*lncRNA UCA1*、VEGF、PKC α mRNA表达水平高于良性组,差异有统计学意义($P < 0.05$);*lncRNA UCA1*与VEGF、PKC α mRNA均呈正相关性,VEGF mRNA与PKC α mRNA呈正相关性($P < 0.05$);*lncRNA UCA1*、VEGF、PKC α mRNA与恶性组肿瘤最大直径、T分期、包膜浸润、远处转移呈正相关,与分化程度呈负相关($P < 0.05$);*lncRNA UCA1*、VEGF、PKC α mRNA联合鉴别肾上腺恶性肿瘤的曲线下面积(AUC)最大,为0.907;*lncRNA UCA1*、VEGF、PKC α mRNA高表达患者3年生存率低于低表达患者($P < 0.05$)。**结论** *lncRNA UCA1*、VEGF、PKC α 在肾上腺恶性肿瘤中呈高表达,联合检测可为临床鉴别肾上腺肿瘤良恶性、评估肿瘤恶性程度、预测预后提供科学指导。

[关键词] 长链非编码RNA尿路上皮相关基因;血管生长内皮因子;蛋白激酶C α ;肾上腺良恶性肿瘤

Expression changes of *lncRNA UCA1*, VEGF, PKC α in benign and malignant adrenal tumors and their relationship with prognosis

WU Youyou¹, REN Qiaoxia¹, XU Liuting^{2*}

(1. Department of Endocrinology, the 940th Hospital of Joint Logistic Support Force, Lanzhou, Gansu, China, 730050; 2. Department of Urinary Surgery, the 940th Hospital of Joint Logistic Support Force, Lanzhou, Gansu, China, 730050)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the expression changes of long-chain non-coding RNA urothelial-related genes (*lncRNA UCA1*), vascular growth endothelial factor (VEGF) and protein kinase C α (PKC α) in benign and malignant adrenal tumors and their relationship with prognosis. **Methods** 74 patients with adrenal malignant tumor were selected as the malignant group and 31 patients with benign tumor were selected as the benign group. *lncRNA UCA1*, VEGF and PKC α were compared between the two groups. The relationship between the above indicators, the correlation with the pathological characteristics of the malignant group, the value of differential diagnosis between benign and malignant adrenal tumors and the relationship with prognosis were analyzed. **Results** The mRNA expression levels of *lncRNA UCA1*, VEGF and PKC α in the malignant group were higher than those in the benign group, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). *lncRNA UCA1* was positively correlated with VEGF and PKC α mRNA, and VEGF mRNA was

基金项目:甘肃省科技计划项目(18JR3RA061)

作者单位:1. 联勤保障部队第九四〇医院内分泌科,甘肃,兰州 730050

2. 联勤保障部队第九四〇医院泌尿外科,甘肃,兰州 730050

*通信作者:徐柳汀, E-mail: etingelisa@163.com

positively correlated with *PKC α* mRNA ($P<0.05$). *lncRNA UCA1*, *VEGF*, *PKC α* mRNA was positively correlated with the maximum diameter, T stage, capsule invasion and distant metastasis in the malignant group, and negatively correlated with the degree of differentiation ($P<0.05$). The area under the curve (AUC) of *lncRNA UCA1*, *VEGF*, and *PKC α* mRNA combined to identify adrenal malignant tumors is the largest, which is 0.907. The 3-year survival rate of patients with high expression of *lncRNA UCA1*, *VEGF* and *PKC α* mRNA was lower than that of patients with low expression ($P<0.05$). **Conclusion** *lncRNA UCA1*, *VEGF*, and *PKC α* are highly expressed in malignant adrenal tumors. Combined detection can provide scientific guidance for clinically distinguishing benign and malignant adrenal tumors, assessing the degree of tumor malignancy, and predicting prognosis.

[KEY WORDS] *lncRNA* urothelial-related genes; vascular growth endothelial factor; protein kinase α ; benign and malignant adrenal tumors

肾上腺肿瘤是常见泌尿外科肿瘤之一,具有良恶性之分,肾上腺恶性肿瘤具有远处转移、包膜浸润等多种生物学行为特点,受肾上腺组织学特性与解剖学特点影响,30%患者确诊时已出现远处转移,5年生存率仅约为44.0%,预后较差^[1-2]。既往研究表明,长链非编码RNA(long non-coding RNA, *lncRNA*)在结直肠癌^[3]、膀胱癌^[4]等多种肿瘤组织中均过度上调,与肿瘤发生、发展密切相关,已成为新的肿瘤标志物的关注焦点,而尿路上皮相关基因(urothelial carcinoma antigen 1, *UCA1*)是与泌尿系统相关的*lncRNA*。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, *VEGF*)参与病理血管生成、新生血管重塑等过程,在肿瘤病理进程中起着重要作用。蛋白激酶 α (Protein Kinase- α , *PKC α*)通过调控细胞增殖、分化、凋亡过程,参与肿瘤的形成、发生及发展。既往研究显示,*lncRNA UCA1*、*VEGF*、*PKC α* 在肾上腺嗜铬细胞瘤的鉴别诊断中均起着十分重要的作用^[5-6]。然而关于*lncRNA UCA1*、*VEGF*、*PKC α* 同时在肾上腺良恶性肿瘤患者中表达及与预后的关系研究较少。本研究尝试探讨*lncRNA UCA1*、*VEGF*、*PKC α* 于肾上腺良恶性肿瘤中表达变化及与预后的关系,旨在为临床诊治、预测预后提供循证支持。详情如下。

1 资料和方法

1.1 一般资料

选取2014年1月至2018年5月本院肾上腺恶性肿瘤患者74例为恶性组、良性肿瘤患者31例为良性组。纳入标准:①两组经手术病理组织学检查证实分别为恶性肾上腺嗜铬细胞瘤、良性肾上腺嗜铬细胞瘤;②术前均未接受放化疗、激素治疗;③研究对象均签署知情同意书;排除标准:①合并肝癌、

脑胶质瘤等其他部位恶性肿瘤者;②合并全身感染性疾病或自身免疫系统疾病者;③严重心脑血管疾病者;④凝血机制紊乱或存在活动性出血倾向者;⑤伴有严重心理障碍或精神行为异常者。

1.2 方法

1.2.1 检测方法

所有行手术治疗切除的肾上腺良、恶性肿瘤患者入院手术时均留有病理组织(3 cm×3 cm),利用液氮迅速解冻组织,置于-80℃冰箱中待检。采用上海钦诚生物科技有限公司实时荧光定量逆转录聚合酶链反应法试剂盒测定组织中*lncRNA UCA1*、*VEGF*、*PKC α* mRNA表达。

1.2.2 治疗方法

肾上腺肿瘤患者行腹腔镜手术治疗。肾上腺恶性肿瘤患者手术切除肿瘤后4周实施辅助治疗或化疗。

1.2 统计学方法

采用统计学软件SPSS 22.0处理数据,计量资料以($\bar{x}\pm s$)描述,两组间比较采用独立样本 t 检验,多组间用方差分析;计数资料用 $n(\%)$ 表示, χ^2 检验;*lncRNA UCA1*、*VEGF*、*PKC α* 相对表达量与恶性组病理特征的相关性分析采用Spearman相关系数模型;*lncRNA UCA1*、*VEGF*、*PKC α* 相对表达量对肾上腺恶性肿瘤的鉴别效能分析采用受试者工作特征(ROC)曲线;*lncRNA UCA1*、*VEGF*、*PKC α* 相对表达量与肾上腺恶性肿瘤患者预后的关系采用卡普兰-迈耶曲线(KM)分析,组间比较采用Log-rank检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组*lncRNA UCA1*、*VEGF*、*PKC α* 相对表达量恶性组*lncRNA UCA1*、*VEGF*、*PKC α* mRNA表

达水平高于良性组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表1。

表1 两组 *lncRNA UCA1*、*VEGF*、*PKCα* 表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 <i>lncRNA UCA1</i> , <i>VEGF</i> , <i>PKCα</i> in 2 groups α Comparison of relative expression ($\bar{x} \pm s$)				
组别	n	<i>lncRNA UCA1</i>	<i>VEGF</i> mRNA	<i>PKCα</i> mRNA
恶性组	74	5.49±1.40	3.49±1.10	1.23±0.36
良性组	31	3.27±1.02	1.98±0.75	0.89±0.20
t值		7.977	6.984	4.940
P值		<0.001	<0.001	<0.001

2.2 *lncRNA UCA1*、*VEGF*、*PKCα* 之间相关性

经 Pearson 相关性分析可知, *lncRNA UCA1* ($r=0.621, 0.578, P < 0.001$) 与 *VEGF*、*PKCα* mRNA 均呈正相关性, *VEGF* mRNA ($r=0.591, P < 0.001$) 与 *PKCα* mRNA 呈正相关性。

2.3 恶性组不同病理特征患者 *lncRNA UCA1*、*VEGF*、*PKCα* 相对表达量

恶性组不同性别、年龄、肿瘤数目患者 *lncRNA UCA1*、*VEGF*、*PKCα* mRNA 比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 恶性组不同肿瘤最大直径、T分期、分化程度、有无包膜浸润、远处转移患者 *lncRNA UCA1*、*VEGF*、*PKCα* mRNA 比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表2。

2.3 *lncRNA UCA1*、*VEGF*、*PKCα* 相对表达量与恶性组病理特征的相关性

经 Spearman 相关性分析可知, *lncRNA UCA1*、*VEGF*、*PKCα* mRNA 与恶性组肿瘤最大直径、T分期、包膜浸润、远处转移呈正相关性, 与分化程度呈负相关性 ($P < 0.05$)。见表3。

2.4 *lncRNA UCA1*、*VEGF*、*PKCα* 相对表达量对肾上腺恶性肿瘤的鉴别效能

绘制 ROC 曲线, 结果显示, *lncRNA UCA1*、*VEGF*、*PKCα* mRNA 及三者联合鉴别肾上腺恶性肿瘤的曲线下面积 (AUC) 分别为 0.833、0.865、0.721、0.907。见图1。

2.5 *lncRNA UCA1*、*VEGF*、*PKCα* 相对表达量与肾上腺恶性肿瘤患者预后的关系

以图4中 *lncRNA UCA1*、*VEGF*、*PKCα* mRNA 最佳截断值为界限, 将患者分为 *lncRNA UCA1* 低表达 (≤ 4.55)、高表达 (> 4.55)、*VEGF* mRNA 低表达 (≤ 3.19)、高表达 (> 3.19) 和 *PKCα* mRNA 低表达 (≤ 1.07)、高表达 (> 1.07) 患者。采用 K-M 法进行分析, 显示 *lncRNA UCA1*、*VEGF*、*PKCα* mRNA 高表达患者3年生存率低于低表达患者 ($\chi^2=4.638, P=0.031$; $\chi^2=4.728, P=0.039$; $\chi^2=7.050, P=0.008$)。见图2。

表2 恶性组不同病理特征患者 *lncRNA UCA1*、*VEGF*、*PKCα* 比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 *lncRNA UCA1*, *VEGF* and *PKCα* in patients with different pathological characteristics in malignant group α compare ($\bar{x} \pm s$)

病理特征	n	<i>lncRNA UCA1</i>	<i>VEGF</i> mRNA	<i>PKCα</i> mRNA
性别				
男	44	5.61±1.49	3.56±1.02	1.29±0.31
女	30	5.31±1.65	3.39±0.96	1.14±0.40
t值		0.814	0.721	1.815
P值		0.418	0.473	0.074
年龄(岁)				
<60	49	5.33±1.35	3.36±1.12	1.20±0.36
≥60	25	5.80±1.27	3.74±1.24	1.27±0.33
t值		1.446	1.331	0.813
P值		0.153	0.187	0.419
肿瘤最大直径(cm)				
<5	33	4.36±1.29	2.77±0.86	0.96±0.27
≥5	41	6.40±1.33	4.07±1.05	1.45±0.42
t值		6.647	5.730	5.802
P值		<0.001	<0.001	<0.001
肿瘤数目				
单发	32	5.18±1.56	3.27±1.04	1.21±0.37
多发	42	5.73±1.09	3.66±1.20	1.25±0.32
t值		1.785	1.466	0.498
P值		0.079	0.147	0.620
T分期				
T ₁ 期	22	4.08±1.25	2.12±0.77	0.97±0.26
T ₂ 期	32	5.27±1.59	3.49±0.96	1.24±0.20
T ₃ +T ₄ 期	20	7.39±2.03	5.00±1.04	1.50±0.15
F值		22.012	50.100	33.905
P值		<0.001	<0.001	<0.001
分化程度				
高分化	31	3.97±1.34	2.25±0.74	0.92±0.30
中分化	19	5.28±1.66	3.67±0.82	1.33±0.25
低分化	24	7.62±2.39	4.95±0.98	1.55±0.19
F值		27.413	69.737	42.908
P值		<0.001	<0.001	<0.001
包膜浸润				
有	35	6.32±1.42	4.76±0.92	1.49±0.38
无	39	4.75±1.17	2.35±0.73	1.00±0.27
t值		5.211	12.543	6.444
P值		<0.001	<0.001	<0.001
远处转移				
有	38	6.55±1.59	4.29±1.03	1.51±0.34
无	36	4.37±1.28	2.65±0.84	0.93±0.28
t值		6.475	7.482	7.986
P值		<0.001	<0.001	<0.001

3 讨论

lncRNA UCA1 在肿瘤细胞增殖、转移、凋亡、新陈代谢、耐药等方面起着重要调控作用。孙青凤等^[7]通过52例肾上腺癌患者手术切除的肾上腺癌组织及配对癌旁组织标本表明, *lncRNA UCA1* 在肾上腺癌组织中显

表3 *lncRNA UCA1*、*VEGF*、*PKCα* 相对表达量与恶性组病理特征的相关性

Table 3 *lncrna UCA1*, *VEGF*, *PKCα* Correlation between relative expression and pathological features of malignant group

病理特征	<i>lncRNA UCA1</i>		<i>VEGF</i> mRNA		<i>PKCα</i> mRNA	
	r 值	P 值	r 值	P 值	r 值	P 值
肿瘤最大直径	0.659	<0.001	0.675	<0.001	0.617	<0.001
T 分期	0.647	<0.001	0.661	<0.001	0.638	<0.001
分化程度	-0.683	<0.001	-0.702	<0.001	-0.629	<0.001
包膜浸润	0.691	<0.001	0.727	<0.001	0.650	<0.001
远处转移	0.674	<0.001	0.715	<0.001	0.642	<0.001

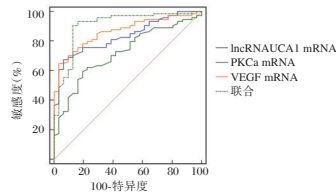


图1 ROC 曲线

Figure 1 ROC curve

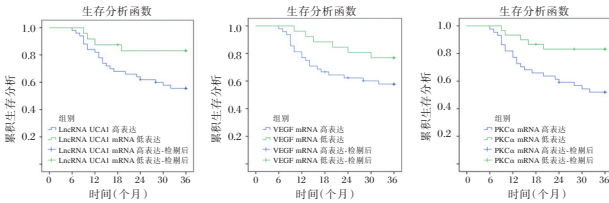


图2 *lncRNA UCA1*、*VEGF*、*PKCα* 相对表达量与肾上腺恶性肿瘤患者预后的关系

Figure 2 *lncRNA UCA1*, *VEGF*, *PKCα* Relationship between relative expression and prognosis of patients with adrenal malignant tumor

著上调,其相对表达水平与肿瘤大小、转移和分期有关,这与本研究观点相似。推测 *lncRNA UCA1* 对肾上腺恶性肿瘤患者预后亦具有一定预测价值。

VEGF 主要产生于肿瘤自身分泌及其相关基质,可提高肿瘤血管渗透性,持续蓄积血浆蛋白外渗和纤维蛋白^[8],大量研究已证实^[9-10],新基质和新血管形成是肿瘤侵袭与转移的重要基础。本研究结果与贺亮亮^[11]观点相似。说明 *VEGF* 过度表达可能参与肾上腺恶性肿瘤的发生、发展,推测 *VEGF* 可能通过促进血管生成,提高血管壁渗透性,从而调控肿瘤细胞增殖、转移、浸润等。另外,杜学谦等^[12]经 COX 法分析可知,*VEGF* 高表达是影响肾上腺肿瘤患者不良预后的独立危险因素。本研究经 K-M 曲线分析,肾上腺恶性肿瘤 *VEGF* mRNA 高表达者 3 年生存率低于低表达者,提示 *VEGF* 高表达可能预示肾上腺恶性肿瘤患者不良预后。

PKC 为 G 蛋白和酪氨酸激酶介导的细胞信号传导途径中重要信号因子,可介导多种促癌基因信号,*PKCα* 是传统型 *PKC*,在细胞恶性转化过程中扮演着重要角色^[13]。本研究指出,*PKCα* mRNA 在肾上腺恶性肿瘤患者中呈异常高表达,并与肿瘤最大直径、T 分期、包膜浸润、远处转移、分化程度均存在一定相关性,结合张昊等^[14]、姜媛等^[15]研究考虑机制可能在于 *PKC* 下游分子 P38 信号通路活化,诱导基质金属蛋白酶-9 异常高表达,促进恶性肿瘤浸润与转移。推测抑制 *PKCα* 表达可能成为一个潜在防治肾上腺恶性肿瘤的靶点。另外,本研究经 Log-Rank 检验还发现,*PKCα* mRNA 高表达可能降低肾上腺恶性肿瘤患者 3 年生存率,这可能归因于 *PKCα* 表达升高通过抑制细胞黏附连接,阻断 9-4 整合蛋白介导的半桥粒形成,防止细胞基质连接,增强肿瘤细胞活性与侵袭力,诱导肿瘤迁移、侵袭,进而上调患者死亡风险。然而 *lncRNA UCA1*、*VEGF*、*PKCα* mRNA 单一鉴别肾上腺恶性肿瘤存在一定局限性,敏感性较低,故本研究尝试绘制联合 ROC 曲线,结果显示,*lncRNA UCA1*、*VEGF*、*PKCα* mRNA 联合鉴别肾上腺恶性肿瘤的 AUC 优于上述指标单一鉴别,敏感性、特异性均有所提升。提示联合检测 *lncRNA UCA1*、*VEGF*、*PKCα* 有助于提高鉴别效能。

综上所述,*lncRNA UCA1*、*VEGF*、*PKCα* 在肾上腺恶性肿瘤中呈高表达,联合检测可为临床鉴别肾上腺肿瘤良恶性、评估肿瘤恶性程度、预测预后提供科学指导。但本研究样本量小,*lncRNA UCA1*、*VEGF*、*PKCα* 能否成为肾上腺肿瘤治疗的靶位点,还需设计更为完善的实验方案深入分析上述指标对肾上腺肿瘤的调控机制。

参考文献

- [1] Angelousi A, Nasiri-Ansari N, Karapanagioti A, et al. Expression of clock-related genes in benign and malignant adrenal tumors[J]. *Endocrine*, 2020, 68(3): 650-659.
- [2] 匡祎,张凡,李刚,等. 超声造影增强特征鉴别诊断肾上腺肿瘤良恶性的临床价值[J]. *临床超声医学杂志*, 2021, 23(1): 40-44.
- [3] Xi G, Ziyu X, Yiting L, et al. Construction of competing endogenous RNA network and identification of novel molecular biomarkers in colon cancer: A bioinformatic analysis [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2021, 100(14): e25369.
- [4] 曾繁浩,雷容,张克,等. *lncRNA* 在膀胱癌发生发展中的作用机制及其应用研究进展[J]. *山东医药*, 2020, 60(16): 88-91.

血清 VEGF、PDGF 和 ES 水平与湿性年龄相关性黄斑变性的关系

解鹏亮* 郑陆芳 董明霞 董如娇 陈芳

[摘要] **目的** 探究血清血管内皮生长因子(VEGF)、血小板衍生生长因子(PDGF)和内皮抑素(ES)水平与湿性年龄相关性黄斑变性(AMD)的关系。**方法** 选择本院2019年10月至2020年10月收治的78例湿性AMD患者(病例组)和40例健康人群(对照组),采用酶联免疫吸附法检测VEGF、PDGF、ES水平,分析各指标与湿性AMD分期的关系,并绘制受试者工作特征曲线(ROC曲线)评价各指标的诊断效能。**结果** 病例组血清VEGF、PDGF水平高于对照组,ES水平低于对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。病例组血清VEGF、PDGF水平:晚期>中期>早期,ES水平:晚期>中期>早期,两两比较差异均有统计学意义($P<0.05$)。AMD患者血清VEGF水平与PDGF水平呈正相关($P<0.05$),而血清VEGF和PDGF水平均与ES水平无关($P>0.05$)。AMD患者VEGF、PDGF水平与病情分期呈正相关($P<0.05$),ES水平与病情分期呈负相关($P<0.05$)。VEGF、PDGF、ES水平诊断AMD的曲线下面积为0.868、0.833、0.694,诊断AMD中晚期的曲线下面积为0.945、0.874、0.902。**结论** VEGF、PDGF、ES水平均与湿性AMD的发生密切相关,可作为湿性AMD潜在的诊断检测指标。

[关键词] VEGF; PDGF; ES; 湿性年龄相关性黄斑病变

Relationship between the levels of serum VEGF, PDGF and ES and wet age-related macular degeneration

XIE Pengliang*, ZHENG Lufang, DONG Mingxia, DONG Rujiao, CHEN Fang
(Tangshan Eye Hospital, Tangshan, Hebei, China, 063000)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the relationship between the levels of serum vascular endothelial growth factor (VEGF), platelet-derived growth factor (PDGF) and endostatin (ES) and wet age-related macular degeneration (AMD). **Methods** 78 patients with wet AMD (case group) and 40 healthy people (control group) in the hospital were selected from October 2019 to October 2020. Enzyme-linked immunosorbent assay was used to detect the levels of VEGF, PDGF and ES in the two groups, and the relationship between each indicator and wet AMD staging was analyzed. Receiver operating characteristic curve (ROC curve) was drawn to evaluate the diagnostic efficacy of indicator. **Results** The levels of serum VEGF and PDGF in the case group were higher than those in the control group, and the level of ES was lower than that in the control group ($P<0.05$). The levels of serum VEGF and PDGF in the case group: advanced stage > middle stage > early stage, and the level of ES: advanced stage > middle stage > early stage, with statistical significance in pairwise comparison ($P<0.05$). Serum VEGF levels in AMD patients were positively correlated with PDGF levels ($P<0.05$), while serum VEGF and PDGF levels were not related to ES levels ($P>0.05$). The levels of VEGF and PDGF in AMD patients were positively correlated with the stage of the disease ($P<0.05$), and ES levels were negatively correlated with the stage of the disease ($P<0.05$). The area under the curve for diagnosis of AMD by VEGF, PDGF, and ES levels were 0.868, 0.833, 0.694, and the area under the curve for diagnosis of ad-

基金项目:河北省重点科技研究计划项目(20181325)

作者单位:唐山市眼科医院,河北,唐山 063000

*通信作者:解鹏亮, E-mail: hu295034tang7056@163.com

vanced AMD was 0.945, 0.874, and 0.902. **Conclusion** The levels of VEGF, PDGF, and ES are closely related to the occurrence of wet AMD, and can be used as potential diagnostic testing indicators for wet AMD.

[**KEY WORDS**] VEGF; PDGF; ES; Wet age-related macular degeneration

年龄相关性黄斑变性(age-related macular degeneration, AMD)是与年龄密切相关的黄斑退行性疾病,是中老年人致盲的首要原因^[1]。AMD包括干性AMD和湿性AMD,发病机制均尚不明确,干性AMD疾病进展缓慢,湿性AMD病情则呈现渐进性发展。因湿性AMD患者存在黄斑下脉络膜血管新生并呈现病理性渗出改变,诱发血管新生的细胞因子成为湿性AMD研究的热点^[2]。其中,血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是诱发血管新生的关键细胞因子,在新生血管形成、血管渗透增加中发挥重要的作用^[3]。此外,有研究表明,血小板源性生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)、内皮抑素(endostatin, ES)在眼内病理性新生血管的形成中也发挥着举足轻重的作用^[4-5]。基于此,本研究将对湿性AMD患者血清VEGF、PDGF和ES水平及其临床意义进行分析,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选择2019年10月至2020年10月本院收治的78例湿性AMD患者为病例组。纳入标准:①符合AMD诊断标准^[6],经光学相干断层扫描、眼底荧光造影检查确诊为湿性AMD;②此前未接受AMD相关治疗;③对研究知情且签署知情同意书。排除标准:①合并白内障、青光眼、视网膜病变等其他眼部疾病;②有眼部手术史;③有玻璃体腔及球后、球周注射激素史;④合并恶性肿瘤、心脑血管疾病、活动性感染、严重代谢性疾病;⑤凝血功能异常。疾病分期标准^[6]:早期:黄斑区色素脱失,中心凹反射不清或消失,同时存在多个小的玻璃膜疣和少量中等大小的玻璃膜疣;中期:黄斑区出现浆液性和(或)出血性盘状脱离,广泛存在中等大小的玻璃膜疣,至少有1个大的玻璃膜疣,或有未涉及黄斑中心凹的地图样萎缩;晚期:视网膜下和视网膜上皮层下纤维血管增殖,盘状瘢痕。另选择同期于本院健康体检的性别、年龄与病例组相匹配40例健康者为对照组,对照组体检者既往无眼部疾病。两组性别、年龄资料比较差异无统计

学意义($P>0.05$),见表1。本研究经医院医学伦理委员会批准通过。

表1 两组一般资料比较($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Comparison of general data between 2 groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	患眼	性别 (男/女)	年龄 (岁)	病程 (月)	患眼疾病分期 (早/中/晚)
对照组	40		18/22	60.54±6.89		
病例组	78	94	36/42	62.57±7.94	6.89±1.23	20/66/8
χ^2/t 值			0.014	1.373		
<i>P</i> 值			0.905	0.172		

1.2 方法

研究对象均采集清晨空腹肘静脉血3 mL, 3 000 r/min离心10 min(离心半径10 cm),取上层清液与-80℃冰箱保存待测。采用酶联免疫吸附法检测血清VEGF、PDGF、ES水平,试剂盒购自武汉默沙克生物科技有限公司。

1.3 统计学方法

采用SPSS 19.0软件进行统计分析,计量资料以($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较行*t*检验、多组间比较行*F*检验;采用Pearson相关分析法分析AMD患者血清VEGF、PDGF、ES水平,采用Spearman相关分析法分析AMD患者血清VEGF、PDGF、ES水平与病情分期的关系,并绘制受试者工作特征曲线(ROC)评价血清VEGF、PDGF、ES对AMD的临床意义,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组血清VEGF、PDGF、ES水平比较

病例组血清VEGF、PDGF水平显著高于对照组,ES水平显著低于对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表2。

表2 两组血清VEGF、PDGF、ES水平比较($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Comparison of levels of serum VEGF, PDGF and ES between 2 groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	VEGF(ng/L)	PDGF(μ g/L)	ES(ng/L)
对照组	40	65.52±26.23	39.66±10.41	164.28±33.85
病例组	78	155.58±72.35	60.26±19.32	136.82±38.86
<i>t</i> 值		7.610	6.283	3.791
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001

2.2 病例组不同患者血清VEGF、PDGF、ES水平
病例组血清VEGF、PDGF水平:晚期>中期>

早期,ES水平:晚期>中期>早期,两两比较差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表3。

表3 病例组不同病情患者血清 VEGF、PDGF、ES 水平比较($\bar{x}\pm s$)

Table 3 Comparison of levels of serum VEGF, PDGF and ES in case group of patients with different disease status ($\bar{x}\pm s$)

病情	n	VEGF(ng/L)	PDGF($\mu\text{g/L}$)	ES(ng/L)
早期	18	70.30±33.45	41.63±15.45	176.96±25.83
中期	52	166.61±46.33 ^a	62.73±15.47 ^a	133.16±26.99 ^a
晚期	8	275.76±35.29 ^{ab}	86.17±9.00 ^{ab}	70.36±19.90 ^{ab}
F值		186.035	70.517	127.250
P值		<0.001	<0.001	<0.001

注:与早期患者比较,^a $P<0.05$;与中期患者比较,^b $P<0.05$ 。

2.3 AMD 患者血清 VEGF、PDGF、ES 水平间的关系及与病情分期的关系

AMD 患者血清 VEGF 水平与 PDGF 水平呈正相关($r=0.613, P<0.05$),而血清 VEGF 水平和 PDGF 水平的表达情况均与 ES 的表达水平无关($r=0.165, 0.197, P>0.05$)。AMD 患者 VEGF、PDGF 水平与病情分期呈正相关($r=0.754, 0.664, P<0.05$),ES 水平与病情分期呈负相关($r=-0.706, P<0.05$)。

2.4 血清 VEGF、PDGF、ES 水平对 AMD 患者的预测价值

分别以 VEGF、PDGF、ES 水平绘制诊断 AMD 患者的 ROC 曲线, AUC 对应为 0.868、0.833、0.694, 敏感性为 83.33%、57.69%、55.13%, 特异性为 92.50%、100.00%、82.50%。见图 1。

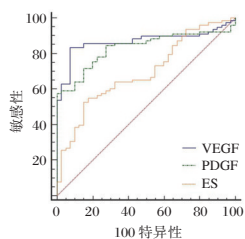


图1 ROC 曲线

Figure 1 ROC curve

2.5 血清 VEGF、PDGF、ES 水平对 AMD 中晚期患者的预测价值

分别以 VEGF、PDGF、ES 水平绘制诊断 AMD 中晚期患者的 ROC 曲线, AUC 对应为 0.945、0.874、0.902, 敏感性为 100.00%、68.33%、81.67%, 特异性为 77.78%、100.00%、88.89%。见图 2。

3 讨论

湿性 AMD 是我国患者失明的主要原因,其发

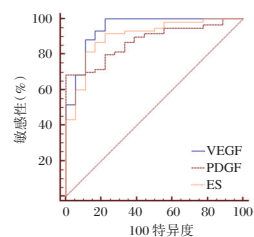


图2 ROC 曲线

Figure 2 ROC curve

病机制错综复杂,临床表现为视网膜色素上皮严重的脱位和(或)脉络膜新生血管生成^[8]。异常的脉络膜新生血管生成后会穿透脉络膜和 Bruch 膜朝向视网膜生长,出现渗出、出血等病理改变,最终导致中心视力丧失与组织瘢痕形成。有研究发现促血管生成因子与抗血管生成因子的平衡在脉络膜新生血管生成中发挥着重要作用,影响湿性 AMD 的发生、发展^[9]。

本研究结果显示,病例组血清 VEGF、PDGF 水平较对照组升高,而 ES 水平降低,说明湿性 AMD 发病后,因促血管生成因子与抗血管生成因子失衡,血清 VEGF、PDGF、ES 水平均处于异常状态。VEGF 是促进血管新生作用最强的细胞因子之一,其过度表达会增加血管渗透性,诱导血管内皮细胞增殖并以出芽的方式形成新的血管,是目前湿性 AMD 抗 VEGF 治疗的靶点^[10]。既往研究已证实 VEGF 在湿性 AMD 患者眼房水中处于高表达,参与湿性 AMD 的发病、发展^[11]。但仅有 VEGF 作用,新生血管未必能够形成结构和功能健全的血管,尚需多种信号通路和血管周围微环境的调节^[12]。PDGF、ES 是影响 AMD 促血管生成因子与抗血管生成因子平衡的重要细胞因子,其中 PDGF 正常生理状态下存在于血小板内,而湿性 AMD 新生血管形成后,血管内皮细胞开始分泌相关因子促进血管稳定和内皮细胞分化,PDGF 由崩解的血小板释放并被激活,刺激特定细胞趋化、生长,促进新生血管形成^[13]。ES 则具有抗血管增生活性,能抑制脉络膜新生血管内皮细胞的异常增殖,是控制脉络膜新生血管的靶点之一,已成功用于治疗发生脉络膜新生血管的眼部疾病^[14]。相关性分析显示,三个指标中仅 VEGF 水平与 PDGF 水平正相关,与陈焯等^[15]研究结果一致,这与 VEGF 的过度表达可刺激 PDGF 表达有关。此外,湿性 AMD 患者 VEGF、PDGF 水平与病情分期呈正相关,ES 水平与病情分期呈负相关,表明湿性 AMD

患者 VEGF 和 PDGF 水平越高、ES 水平越低病情越严重。ROC 曲线结果提示 VEGF、PDGF、ES 均可作为湿性 AMD 潜在的诊断检测指标,且以 VEGF 诊断效能最佳。病情评估时,VEGF、PDGF、ES 水平诊断湿性 AMD 中晚期的 AUC 为 0.945、0.874、0.902,且 VEGF 评估的敏感性和 PDGF 评估的特异性均达 100.00%,表明 VEGF、PDGF、ES 水平还可为湿性 AMD 病情分期提供诊断信息,筛查早期、中晚期患者,其中 VEGF 在三者指标中诊断效能最高,对病情判断更为准确。

综上所述,湿性 AMD 患者处于高 VEGF、PDGF 水平和低 ES 水平状态,三者可作为 AMD 潜在的诊断和病情评估指标,且 VEGF 对疾病诊断和病情评估的效能最高。但本研究样本量较小,且未能比较不同预后患者指标的差异,后期将进一步深入研究。

参考文献

- [1] Borrelli E, Uji A, Sarraf D, et al. Alterations in the choriocapillaris in intermediate age-related macular degeneration [J]. *Invest Ophthalmol VisSci*, 2017, 58(11): 4792-4798.
- [2] 刘彦尧,彭惠. 血管内皮生长因子受体-2 在湿性年龄相关性黄斑变性中的研究进展[J]. *重庆医科大学学报*, 2018, 43(11): 1527-1531.
- [3] 汪岭,马雪莲,王启明. 小儿视网膜母细胞瘤 VEGF、Cyclin D1 及 E-Cadherin 表达及与组织病理特征的关系[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2020, 12(11): 1452-1456.
- [4] 卢建民,孙晓晶,马翔. 适配体及其在老年性黄斑变性治疗中的应用现状[J]. *中华眼底病杂志*, 2017, 33(4): 427-431.
- [5] 张铭. 内皮抑素抑制糖尿病视网膜新生血管生成中的研究进展[J]. *中华实验眼科杂志*, 2017, 35(5): 474-477.
- [6] National Institute for Health and Care Excellence (UK). Age-related macular degeneration: diagnosis and management. London: National Institute for Health and Care Excellence (UK)[EB/OL]. 2018;82.
- [7] 晓琴,鲁占军,张天资,等. 年龄相关性黄斑变性危险因素研究进展[J]. *中国老年学杂志*, 2019, 39(19): 245-248.
- [8] 刘小琦. CFH, CFB 基因单核苷酸多态性与中国人老年黄斑变性的相关性研究[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2013, 5(1): 15-20.
- [9] 张编文,刘盛春,武明星,等. 重庆西南地区土家族年龄相关性黄斑变性血管内皮生长因子基因多态性的相关性分析[J]. *眼科*, 2019, 28(2): 136-140.
- [10] 陈丽,郝杨,张智超,等. BMP-6 与新生血管性年龄相关性黄斑变性的相关性[J]. *国际眼科杂志*, 2018, 18(11): 2092-2095.
- [11] Falcão MS, Freitas-Costa P, Beato JN, et al. Safety and effectiveness of cataract surgery with simultaneous intravitreal anti-VEGF in patients with previously treated exudative age-related macular degeneration [J]. *Acta Med Port*, 2017, 30(2): 127-133.
- [12] Merrigan SL, Kennedy BN. Vitamin D receptor agonists regulate ocular developmental angiogenesis and modulate expression of dre-miR-21 and VEGF [J]. *Br J Pharmacol*, 2017, 174(16): 2636-2651.
- [13] Zhang J, Zhang H, Chen Y, et al. Platelet-derived growth factor D promotes the angiogenic capacity of endothelial progenitor cells [J]. *Mol Med Rep*, 2019, 19(1): 125-132.
- [14] Zhang X, Li Y, Cheng Y, et al. Tat PTD-endostatin: A novel anti-angiogenesis protein with ocular barrier permeability via eye-drops [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1850(6): 1140-1149.
- [15] 陈焯,李薇薇,于小蕊,等. 渗出型年龄相关性黄斑变性患者血清新生血管调控细胞因子水平变化及意义[J]. *中华实用诊断与治疗杂志*, 2015, 29(6): 568-570.

(上接第 1630 页)

- [5] 孙青凤,郭宁宁,卢泽芬,等. lncRNA HOTAIR 在肾上腺嗜铬细胞瘤中的表达及临床意义[J]. *中国临床研究*, 2018, 31(2): 197-200.
- [6] 王亚奇,孔垂泽,张哲,等. 人肾上腺肿瘤组织中蛋白激酶 C α 和血管内皮生长因子的表达及意义[J]. *中国医科大学学报*, 2015, 44(9): 786-789, 795.
- [7] 孙青凤,杜学谦,王晓鹏,等. lncRNA HOTAIR 和 lncRNA UCA1 在肾上腺恶性肿瘤中的表达及临床意义[J]. *国际检验医学杂志*, 2020, 41(23): 2867-2870.
- [8] 林前煌,徐小虹,郭润生. YKL-40、TSH、ES、VEGF 与甲状腺癌结构性复发的相关性[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2021, 13(1): 55-58.
- [9] 徐达. USP39 调控 VEGF-A 可变剪切促进肾癌恶性增殖和血管形成的作用及机制研究[D]. 海军军医大学, 2020.
- [10] 高欣彤,史春玲,张苗,等. 肾上腺嗜铬细胞瘤 VEGF 和 iNOS 表达与临床特征的关系及相关性分析[J]. *临床误诊误治*, 2020, 33(4): 86-90.
- [11] 贺亮亮. MMP-2、MMP-9 和 VEGF 在肾癌中的表达与临床分析[J]. *中国冶金工业医学杂志*, 2019, 36(5): 577.
- [12] 杜学谦,孙青凤,田龙江. LncRNA HOTAIR、VEGF 在肾上腺恶性肿瘤组织中的表达及其预后相关性[J]. *临床肾脏病杂志*, 2021, 21(2): 130-135.
- [13] Tian X, Traub B, Xie X, et al. Opposing Oncogenic Functions of p38 Mitogen-activated Protein Kinase Alpha and Beta in Human Pancreatic Cancer Cells [J]. *Ant Res*, 2020, 40(10): 5545-5556.
- [14] 张昊,孔垂泽,辛鹏,等. PKC α 和 PLK1 在膀胱癌中的表达与相关性[J]. *解剖科学进展*, 2019, 25(6): 622-625.
- [15] 姜媛,谢海娟,王毓兴,等. PKC 介导 P38MAPK 通路调控结肠癌细胞 MMP-9 表达及侵袭的研究[J]. *中国现代医生*, 2020, 58(26): 4-7, 封3.

apoB/apoA-1、LDH及ALP水平与冠心病患者主要不良心血管事件的关系

秦小敏* 李四荣 刘慧 王丽兰

【摘要】 **目的** 分析载脂蛋白B/载脂蛋白A1 (apoB/apoA-1)、乳酸脱氢酶(LDH)及碱性磷酸酶(ALP)水平与冠心病(CHD)患者主要不良心血管事件(MACE)的关系。**方法** 选取2017年5月至2018年5月本院收治的115例冠心病患者作为研究组,根据患者预后情况将发生MACE者设为A组($n=28$),未发生MACE者设为B组($n=87$),另选取120例同期疑似冠心病住院而经冠状动脉造影证实非冠心病者为对照组。比较各组 apoB/apoA-1、LDH及ALP水平差异,采用 Logistic 回归分析影响冠心病患者发生MACE的危险因素,采用ROC曲线分析 apoB/apoA-1、LDH及ALP水平对冠心病患者发生MACE的预测价值。**结果** 研究组 apoB/apoA-1、LDH及ALP水平高于对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。A组患者血清 apoB/apoA-1、LDH及ALP水平高于B组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。Logistic回归模型分析显示:患者GRACE评分为高危、左心室射血分数为 $\geq 50\%$ 、合并高血压、糖尿病、apoB/apoA-1、LDH及ALP水平异常升高为影响冠心病患者出现MACE的危险因素($P<0.05$)。ROC曲线分析显示:apoB/apoA-1、LDH及ALP水平三者联合约登指数及曲线下面积最大,分别为:0.788、0.961。**结论** apoB/apoA-1、LDH及ALP水平异常变化与冠心病患者出现MACE有着密切联系,联合三个指标检测对评估患者病情及MACE预测有着重要作用。

【关键词】 apoB/apoA-1; LDH; ALP; 冠心病; 不良心血管事件

Relationship between apoB/apoA-1, LDH and ALP levels and main adverse cardiovascular events in patients with coronary heart disease

QIN Xiaomin*, LI Sirong, LIU Hui, WANG Lilan

(Department of Cardiology, Wuhu Fifth People's Hospital, Wuhu, Anhui, China, 241000)

【ABSTRACT】 **Objective** To analyze the relationship between apolipoprotein B/apolipoprotein A1 (apoB/apoA-1), lactate dehydrogenase (LDH) and alkaline phosphatase (ALP) levels and the main adverse cardiovascular events (MACE) in patients with coronary heart disease. **Methods** 115 patients with coronary heart disease admitted to this hospital from May 2017 to May 2018 were selected as the study group. According to the prognosis of the patients, the patients with adverse cardiovascular events were set as group A ($n=28$), those without adverse cardiovascular events were set as group B ($n=87$), and another 120 patients admitted to this hospital for suspected coronary heart disease during the same period and did not have non-coronary heart disease confirmed by coronary angiography were selected as the control group. The differences in the levels of apoB/apoA-1, LDH and ALP in each group were compared. Logistic regression was used to analyze the risk factors MACE in patients with coronary heart disease. The ROC curve was used to analyze the value of apoB/apoA-1, LDH and ALP levels in predicting MACE in patients with coronary heart disease. **Results** The levels of apoB/apoA-1, LDH and ALP in the study group were higher than those in the control group, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). The levels of serum Cys-c, SAA and CRP in group A were higher than those in group B, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). Logistic regression

基金项目:安徽省自然科学基金项目(1708085QH235)

作者单位:芜湖市第五人民医院心内科,安徽,芜湖 241000

*通信作者:秦小敏, E-mail: qinxiaomin2021@126.com

model analysis showed that the patient's GRACE score was high risk, the left ventricular ejection fraction was $\geq 50\%$, hypertension, diabetes, and the abnormal increasing in apoB/apoA-1, LDH and ALP levels were risk factors affecting MACE in patients with coronary heart disease ($P < 0.05$). ROC curve analysis showed that the Youden index and the area under the curve of combined apoB/apoA-1, LDH and ALP levels were the largest, which were 0.788 and 0.961, respectively. **Conclusion** Abnormal changes in apoB/apoA-1, LDH and ALP levels are closely related to the occurrence of MACE events in patients with coronary heart disease. The combined detection of the threeplays an important role in assessing the patient's condition and predicting MACE.

[KEY WORDS] apoB/apoA-1; LDH; ALP; Coronary heart disease; Adverse cardiovascular events

现临床对于冠心病(coronary heart disease, CHD)的治疗以药物及介入手术干预为主,但有随访调查发现,术后主要不良心血管事件(major Adverse cardiovascular events, MACE)发生率高,预后较差^[1],因此,如何降低CHD患者出现MACE,对改善预后具有重要作用。研究发现,CHD的发生与动脉粥样硬化、低密度脂蛋白胆固醇升高或高密度脂蛋白胆固醇降低有关^[2]。有文献报道,载脂蛋白B(Apolipoprotein B, apoB)及载脂蛋白A1(Apolipoprotein A1, apoA-1)是低、高密度脂蛋白的主要脂蛋白成分,对刺激动脉平滑肌增殖及参与胆固醇外周至肝脏逆转运具有重要作用;apoB/apoA-1比值可有效反映冠心病进展中脂蛋白平衡情况^[3-4]。相关报道显示,血清生化指标乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)对冠心病具有较高敏感性,对评估患者预后具有积极作用^[5]。本文就apoB/apoA-1、LDH及ALP水平对CHD患者MACE的评估价值进行探究,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2017年5月至2018年5月本院收治的115例CHD患者作为研究组。纳入标准:①满足CHD诊断标准^[6]:左主干(Left main artery, LM)、左前降支(Left anterior descending, LAD)、左回旋支(Left circumflex artery, LCX)、右冠状动脉(right coronary artery, RCA)中至少1支血管狭窄程度>

50%;②临床资料完整且真实者;排除标准:①入院前予以药物或介入治疗者;②合并急性慢性感染性疾病及恶性肿瘤患者;③未经控制的恶性心律失常者。根据患者预后情况将发生MACE者设为A组,未发生MACE者设为B组。

选取同期因疑似冠心病而住院,并经冠状动脉造影证实血管狭窄直径<50%、血流正常^[7]且临床资料完整的120例非冠心病者为对照组。两组性别、年龄等一般资料比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表1。本研究经医院伦理委员会批准,受试者签署知情同意书。

1.2 研究方法

两组均于入院后均给予对症支持治疗,收集患者临床资料,包括性别、年龄、BMI($\geq 25.0 \text{ kg/m}^2$ 即为超重, $\geq 30.0 \text{ kg/m}^2$ 即为肥胖)、高血压、糖尿病病史及吸烟史等。记录全球急性冠状动脉时间注册(global registry of acute coronary events, GRACE)^[8]评分,<108分为低危, ≥ 109 分为高危。

两组均于入院24h内采用采用宁波美康生物科技有限公司的免疫比浊法试剂盒检测apoB、apoA-1,并计算apoB/apoA-1比值;采用瑞士罗氏公司cobas 8000 c702全自动生化分析仪检测LDH、ALP水平。apoB/apoA-1判定标准^[4]:当apoB/apoA-1比值<0.7时为正常,当apoB/apoA-1比值 ≥ 0.7 为异常升高。LDH判定标准^[9]:当LDH水平<140 U/L时为正常,当LDH水平 $\geq 140 \text{ U/L}$ 时为异常升高。ALP判定标准^[10]:当ALP水平<45 U/L时为正常,当ALP水平 $\geq 45 \text{ U/L}$ 时为异常升高。

表1 两组基线资料比较 [$n(\%), (\bar{x} \pm s)$]

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

组别	n	性别(男/女)	年龄(岁)	BMI(kg/m ²)	合并疾病		既往吸烟史
					高血压	糖尿病	
研究组	115	82/33	61.09±9.77	24.46±1.30	48(41.74)	34(29.57)	71(61.74)
对照组	120	88/32	60.79±9.58	24.23±1.19	38(31.67)	29(24.17)	74(61.67)
t值/ χ^2 值	-	0.121	0.238	1.416	0.635	0.872	0.000
P值	-	0.728	0.812	0.158	0.425	0.350	0.991

1.3 随访及预后

随访时间为2年,截止至2020年5月30日。对所有CHD患者通过电话、微信等方式进行随访。CHD患者预后良好是指在观察终点(24个月)未发生MACE,反之发生则预后不良。MACE^[11]定义为:心源性死亡,非致命性心肌梗死,因心绞痛住院,非致命性脑卒中,靶血管重建。

1.4 统计学方法

以统计软件SPSS 22.0对数据进行分析,计量资料采用($\bar{x} \pm s$)表示,行*t*检验;计数资料以(%)表示, χ^2 检验,采用多元Logistic回归分析影响CHD患者出现MACE的危险因素;采用ROC曲线分析apoB/apoA-1、LDH及ALP对CHD出现MACE的预测价值,以*P*<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组 apoB/apoA-1、LDH 及 ALP 水平比较

对照组 apoB/apoA-1、LDH 及 ALP 水平均低于研究组,差异均有统计学意义(*P*<0.05)。见表2。

表2 两组 apoB/apoA-1、LDH 及 ALP 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)
Table 2 Comparison of apoB/apoA-1, LDH and ALP levels between 2 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	apoB/apoA-1	LDH(U/L)	ALP(U/L)
研究组	115	0.84±0.18	271.52±20.92	162.41±23.85
对照组	120	0.52±0.04	125.41±10.91	39.41±3.94
<i>t</i> 值		18.993	67.527	55.712
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001

2.2 A、B 组 apoB/apoA-1、LDH 及 ALP 水平比较

截至随访终点:115例患者出现MACE 28例,

其中因心绞痛入院患者14例,靶血管重建患者10例,非致命性心肌梗死4例,且发生MACE患者 apoB/apoA-1、LDH 及 ALP 水平均明显高于B组,差异均有统计学意义(*P*<0.05)。见表3。

表3 A、B 组 apoB/apoA-1、LDH 及 ALP 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)
Table 3 Comparison of apoB/apoA-1, LDH and ALP levels in group A and B ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	apoB/apoA-1	LDH(U/L)	ALP(U/L)
A组	28	0.95±0.17	286.33±26.11	171.06±25.20
B组	87	0.80±0.12	266.75±14.92	159.63±17.24
<i>t</i> 值		5.165	4.944	2.706
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	0.008

2.3 影响 CHD 患者出现 MACE 的危险因素

Logistic 回归模型分析显示:患者GRACE评分为高危、左心室射血分数为≥50%、合并高血压、糖尿病、apoB/apoA-1、LDH 及 ALP 水平异常升高为影响CHD患者出现MACE的危险因素(*P*<0.05)。见表4。

2.4 apoB/apoA-1、LDH 及 ALP 水平对 CHD 患者出现 MACE 的预测价值

apoB/apoA-1、LDH 及 ALP 三者联合曲线下面积为0.961,大于三者单独检测(*P*<0.05)。见表5、图1。

3 讨论

apoB 是低密度脂蛋白的主要结构蛋白质,可促进炎症反应及斑块形成,反映动脉粥样硬化情况。apoA-1 系高密度脂蛋白主要载脂蛋白,可参与动脉粥样硬化进程。大量临床研究发现, apoB/apoA-1 较单纯低密度脂蛋白、高密度脂蛋白等常规血脂指标评估 CHD 发生的敏感性更佳,可作为

表4 影响 CHD 患者出现 MACE 的危险因素分析

Table 4 Analysis of risk factors influencing mace events in CHD patients

变量	单因素分析			多因素分析		
	OR 值	95%CI	<i>P</i> 值	OR 值	95%CI	<i>P</i> 值
性别(男 vs 女)	1.139	0.713~1.513	0.569			
年龄(<60岁 vs ≥60岁)	1.658	0.892~3.081	0.644			
GRACE 评分(高危 vs 低危)	1.791	1.325~1.616	0.019	1.857	1.257~1.754	0.041
左心室射血分数(≥50% vs <50%)	1.716	1.236~1.497	0.010	1.598	1.364~1.885	0.023
BMI(≥25.0 kg/m ² vs <25.0 kg/m ²)	1.765	1.212~1.535	0.015	1.685	0.268~1.779	0.538
高血压(有 vs 无)	1.614	1.143~2.280	0.020	1.672	1.072~2.609	0.012
糖尿病(有 vs 无)	1.829	1.022~3.274	0.023	1.972	1.091~3.564	0.010
吸烟史(有 vs 无)	1.672	1.112~2.514	0.026	1.714	0.867~3.391	0.578
apoB/apoA-1(异常升高 vs 正常)	1.831	1.644~1.972	0.016	1.6369	1.365~1.784	0.035
LDH(异常升高 vs 正常)	1.586	1.357~1.867	0.022	1.754	1.452~1.885	0.008
ALP(异常升高 vs 正常)	1.658	1.587~1.575	0.004	1.658	1.369~1.789	0.017

表5 apoB/apoA-1、LDH及ALP水平对CHD患者出现MACE的预测价值

预测因子	敏感度	特异度	约登指数	AUC	95%CI	P值
apoB/apoA-1	0.864	0.762	0.626	0.823	0.671~0.974	<0.001
LDH	0.871	0.767	0.638	0.758	0.607~0.909	<0.001
ALP	0.893	0.731	0.624	0.890	0.799~0.982	<0.001
三者联合	0.975	0.813	0.788	0.961	0.000~1.000	<0.001

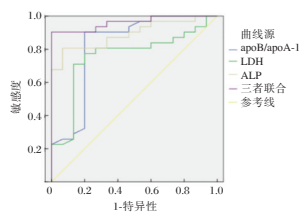


图1 ROC曲线

Figure 1 ROC curve

预测CHD发生的有效指标^[12-13]。此外,相关学者对全球52个国家,2万多例CHD患者进行病例对照研究发现,高血压、糖尿病、吸烟、apoB/apoA-1是影响心脑血管疾病的重要危险因素,降低apoB/apoA-1水平对控制心脑血管疾病的发生具有重要作用^[14]。本研究结果这与既往相关学者所做研究结果相似^[15]。apoB、apoA-1分别是代表致动脉粥样硬化与抗动脉粥样硬化的有效指征,而CHD患者疾病的发生与动脉粥样硬化关系密切,一旦病情加重,可导致apoB/apoA-1水平快速升高。本研究经多元Logistic回归分析结果证明apoB/apoA-1变化与CHD患者出现MACE关系密切,可作为评估MACE出现的有效指标。

近年来,相关研究发现,血清指标检测CHD具有较强敏感性,可有效判断冠状动脉狭窄程度,评估患者预后^[16]。LDH属氢转移酶,可催化乳酸氧化成丙酮酸,与细胞代谢、缺氧、无氧酵解、活性状态和恶性转化等密切相关,是目前临床上判断心肌受损的有效指标^[17]。相关研究指出,当心肌受损后,在24~48小时内LDH活力的敏感指数及特异性均可高达0.95以上;心肌受损后体内缺血缺氧,心肌代谢消耗加大,使心肌消耗性损伤增加,导致LDH从心肌细胞释放入血液浓度升高^[18]。ALP是一种在碱性条件下催化磷酸基团水解和转移的金属蛋白酶,临床上已证实ALP是血管钙化途径中的促进因子。由于血管钙化途径是导致动脉粥样硬化老化的重要因素,因此,积极评估ALP

水平变化对CHD患者具有重要作用。目前临床对于ALP的生理机制尚未明确,但相关学者采用多层螺旋CT研究冠状动脉钙化时发现,ALP随冠状动脉钙化加剧其水平显著升高,推测ALP可能参与CHD发生^[19]。本研究结果说明检测CHD患者LDH、ALP水平对其早期诊断及预后评估具有一定价值。此外,本研究经ROC曲线分析发现,apoB/apoA-1、LDH及ALP水平联合检测时,ROC曲线下面积最大,由此进一步提示临床可通过联合检测多项指标提高对CHD患者出现MACE的评估价值。

综上所述,apoB/apoA-1、LDH及ALP水平在CHD患者中呈异常状态,且上述指标水平是影响CHD患者出现MACE的危险因素,联合指标检测对评估患者病情有重要价值。

参考文献

- [1] 裘森涵,赵惟超,范鹏,等.基于ACC/AHA病变分型评价冠状动脉介入治疗冠心病患者的长期预后[J].中华心血管病杂志,2020,48(2):111-117.
- [2] 吴威,衣欣,蒙奕兵,等.膜联蛋白A1,sd-LDL,Angptl2与冠心病及对冠状动脉粥样硬化病变程度的诊断价值[J].分子诊断与治疗杂志,2020,12(1):92-96.
- [3] Ahn CW, Choi A, Kim JH, et al. The synergistic impact of apolipoprotein B/A-1 and lipoprotein (a) on coronary artery calcification[J]. Endocr Abstr, 2019, 12(5):218-220.
- [4] Xiaowei HU, Sun J, Zhang X, et al. Comparing the role of apolipoprotein A-1 and high density lipoprotein in coronary heart disease[J]. Acta Acad Med Wannan, 2019, 17(9):336-338.
- [5] Tanyanskiy D, Shavva VS, Dizhe E, et al. Adiponectin enhances apolipoprotein a-1 gene expression in HepG2 cells: The studying of AdipoR1 and AdipoR2-dependent signaling pathways[J]. Atherosclerosis, 2020, 25(4):315.
- [6] 杨军强.冠心病诊断、治疗中的一些临床问题(讲课提纲)——中国CHD临床经路与欧美指南的应用[C].中医,中西医结合暨非药物治疗防治心脑血管病,糖尿病,肿瘤高级论坛,2012.
- [7] 柏明成,戴闽,王玉馨,等.心电图中心碎裂QRS波对冠心病患者冠状动脉病变范围及狭窄程度诊断的临床价值[J].川北医学院学报,2019,44(3):332-334.
- [8] 王葛,赵力,李田昌.探讨不同性别老年冠心病患者临床特点及危险因素[J].中华老年心脑血管病杂志,2019,21(5):41-44.
- [9] Guo Q, Zhu Z, Wang J, et al. Preparation, stability and commutability of candidate reference materials for lactate dehydrogenase (LDH)[J]. Clin Biochem, 2021, 91(5):45-51.
- [10] Li Y, Zheng R, Gao F, et al. Association between high-density lipoprotein cholesterol and apolipoprotein A-I and severe acute pancreatitis: a case-control study[J]. Europ J Gastroenterol Hepatol, 2021, 31(16):641-643. (下转第1643页)

UA、NT-proBNP、PLR在脑梗死静脉溶栓中动态变化及意义

孙维明^{1*} 王桂华² 张颖³ 齐霄茹⁴ 冯晨芳¹

[摘要] 目的 探讨血尿酸(UA)、N末端B型利钠肽原(NT-proBNP)、血小板与淋巴细胞比值(PLR)在急性脑梗死(AIS)静脉溶栓中动态变化及意义。方法 选取沧州市人民医院105例AIS患者,均行静脉溶栓治疗,根据发病90 d改良Rankin量表评分(mRS)分为预后不良组($n=26$)、良好组($n=79$),比较两组溶栓前、溶栓后24 h、溶栓后7 d UA、NT-proBNP、PLR水平及发病90 d mRS评分,分析预后的相关影响因素,并分析溶栓后24 h、溶栓后7 d UA、NT-proBNP、PLR水平与发病90 d mRS评分关系及预测预后不良的价值。结果 不良组溶栓后24 h、溶栓后7 d UA、NT-proBNP、PLR水平均高于良好组,差异有统计学意义($P<0.05$);不良组发病后90 d mRS评分高于良好组,差异有统计学意义($P<0.05$);溶栓后24 h、溶栓后7 d UA、NT-proBNP、PLR水平与发病后90 d mRS评分间存在正相关关系($P<0.05$),与AIS患者预后显著相关($P<0.05$);溶栓后24 h、溶栓后7 d UA、NT-proBNP、PLR预测AIS患者预后不良的曲线下面积(AUC)均 >0.7 ,溶栓后7 d各指标联合预测的AUC最大,为0.953。结论 UA、NT-proBNP、PLR水平在脑梗死静脉溶栓中随着病情改善逐渐降低,与患者预后显著相关,可辅助临床预测患者预后转归方向。

[关键词] 急性脑梗死;血尿酸;N末端B型利钠肽原;血小板与淋巴细胞比值;静脉溶栓

Dynamic changes and significance of UA, NT - proBNP and PLR in intravenous thrombolysis of cerebral infarction

SUN Weiming^{1*}, WANG Guihua², ZHANG Ying³, QI Xiaoru⁴, FENG Chengfang¹

(1. Division 1, Department of cerebrovascular disease (intervention), Cangzhou people's Hospital, Cangzhou, Hebei, China, 061000; 2. Department of gastrointestinal surgery, Cangzhou people's Hospital, Cangzhou, Hebei, China, 061000; 3. Department of Neurology, Cangzhou people's Hospital, Cangzhou, Hebei, China, 061000; 4. Second District, Department of cerebrovascular disease (intervention), Cangzhou people's Hospital, Cangzhou, Hebei, China, 061000)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the dynamic changes and significance of blood uric acid (UA), N-terminal pro-B-type natriuretic peptide (NT-proBNP), platelet to lymphocyte ratio (PLR) in acute cerebral infarction (AIS) intravenous thrombolysis. **Methods** A total of 105 AIS patients from the People's Hospital of Cangzhou City were selected for intravenous thrombolysis. According to the modified Rankin scale score (mRS) at 90 days after the onset, they were divided into a poor prognosis group ($n=26$) and a good group ($n=79$). Before thrombolysis, 24 h after thrombolysis, 7 d after thrombolysis, UA, NT-proBNP, PLR levels and 90 d mRS score after thrombolysis, analysis of prognostic related factors, and analysis of 24 h after thrombolysis, 7 days after thrombolysis d The relationship between UA, NT-proBNP, PLR levels and mRS score at 90 days after the onset of onset, and the value of predicting poor prognosis. **Results** 24 hours after

基金项目:沧州市科学计划自筹经费项目(183302070)

作者单位:1.沧州市人民医院脑血管病(介入)科一区,河北,沧州061000

2.沧州市人民医院胃肠外科,河北,沧州061000

3.沧州市人民医院神经内二科,河北,沧州061000

4.沧州市人民医院脑血管病(介入)科二区,河北,沧州061000

*通信作者:孙维明, E-mail:swm_1983@126.com

thrombolysis and 7 days after thrombolysis in the poor group, the levels of UA, NT-proBNP, and PLR were higher than those in the good group ($P<0.05$); the mRS score of the bad prognosis group was higher than that in the good prognosis group at 90 days after the onset of thrombolysis ($P<0.05$); 24 hours after thrombolysis, 7 days after thrombolysis, UA, NT-proBNP, PLR levels and 90 days after the onset of mRS scores were positively correlated ($P<0.05$); 24 hours after thrombolysis, 7 days after thrombolysis UA, NT-proBNP and PLR are all significantly correlated with the prognosis of AIS patients ($P<0.05$); 24 h after thrombolysis and 7 days after thrombolysis UA, NT-proBNP, PLR predict the poor prognosis area under the curve (AUC) of AIS patients Both were >0.7 . The combined prediction of AUC of each index was the largest at 7 days after thrombolysis, which was 0.953. **Conclusion** The levels of UA, NT-proBNP, and PLR in intravenous thrombolysis of cerebral infarction gradually decrease with the improvement of the disease, and are significantly related to the patient's prognosis, which can help clinically predict the direction of the patient's prognosis.

[KEY WORDS] Acute cerebral infarction; Blood uric acid; N-terminal pro-B-type natriuretic peptide; Platelet to lymphocyte ratio; Intravenous thrombolysis

急性脑梗死(Acute ischemic stroke, AIS)为临床最常见脑血管疾病,是由脑部主要供血动脉发生严重狭窄或者闭塞导致脑部血流供应不足引发^[1]。目前,国内外脑卒中诊治指南^[2-3]均推荐早期采用静脉溶栓治疗 AIS,可获得良好疗效。但在临床工作中,多数患者在静脉溶栓 24 h 内出现症状波动,部分患者症状甚至加重,如何让患者在最有效时间窗内得到更大获益性治疗显得尤为重要。相关研究^[4]指出,血清尿酸(Uric acid, UA)水平与 AIS 患者颅内动脉狭窄程度呈正相关,且是影响 AIS 患者病情恢复的因素。N末端B型利钠肽原(N-terminal pro-brain natriuretic peptide, NT-proBNP)是敏感的心功能标志物,其水平变化与 AIS 神经功能缺损严重程度及预后有良好的相关性^[5]。此外,新近研究指出血小板与淋巴细胞比值(Platelet to lymphocyteratio, PLR)升高将增加 AIS 患者的脑梗死面积,并使预后不良发生率增加^[6]。本研究尝试探讨 UA、NT-proBNP、PLR 在 AIS 静脉溶栓中动态变化及意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2018 年 10 月至 2019 年 12 月沧州市人民医院 105 例 AIS 患者,均行阿替普酶静脉溶栓治

疗,根据发病 90 d 改良 Rankin 量表评分(modified Rankin scale, mRS)^[7]分为预后不良组(mRS 评分 >3 分, $n=26$)、良好组(mRS 评分 ≤ 3 分, $n=79$)。对比两组性别、年龄、体质量指数、合并症、吸烟及饮酒情况,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 1。

纳入标准:①参照《中国急性缺血性脑卒中诊治指南 2018》^[8]诊断为 AIS;②发病至治疗时间 ≤ 4.5 h;③首次患病;④对本研究药物无禁忌;⑤患者及家属知晓本研究,已签署同意书。排除标准:①有出血倾向者;②头部严重创伤史或手术史者;③血液系统疾病者;④恶性肿瘤患者;⑤严重心血管疾病、肝肾不全者;⑥合并其他可能影响本研究指标检测疾病者,如感染、自身免疫疾病。本研究经医院伦理委员会批准。

1.2 方法

指标检测方法:患者入院后均常规行静脉溶栓治疗分别于溶栓前、溶栓后 24 h、溶栓后 7 d 采集患者外周静脉血 5 mL,取 3 mL 血液标本以 3 500 r/min 转速离心(离心半径 5 cm)处理 5 min,取血清,采用尿酸酶法测定血清 UA 水平,试剂盒购自浙江东方基因生物制品有限公司;采用时间分辨荧光免疫层析法检测血清 NT-proBNP 水平,试剂盒购自苏州光景生物科技有限公司;取 2 mL 血

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

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

组别	n	性别 (男/女)	年龄(岁)	体质量指数 (kg/m ²)	吸烟 (是/否)	饮酒 (是/否)	合并症		
							高血压	糖尿病	高脂血症
良好组	79	48/31	59.84±5.41	24.41±1.29	30/49	24/55	37(46.84)	11(13.92)	40(50.63)
不良组	26	18/8	61.35±5.17	24.73±1.88	11/15	9/17	13(50.00)	4(15.38)	15(57.59)
χ^2/t 值		0.601	1.248	0.973	0.154	0.163	0.079	0.019	0.391
P 值		0.438	0.215	0.333	0.694	0.687	0.779	0.890	0.532

液标本,采用OTA-400型全自动生化分析仪(购自沈阳万泰医疗设备有限责任公司)检测血小板、淋巴细胞水平,并计算PLR。

1.3 统计学方法

数据处理采用SPSS 22.0软件,计数资料以 $n(\%)$ 描述,采用 χ^2 检验,等级间用 u 检验。计量资料采取Bartlett方差齐性检验与Kolmogorov-Smirnov正态性检验,均确认具备方差齐性且服从正态分布,以 $(\bar{x} \pm s)$ 描述,采用独立样本 t 检验;相关性分析采

用Pearson相关系数模型;影响因素分析采用Cox回归模型;预测效能分析采用受试者工作特征(ROC)曲线; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组UA、NT-proBNP、PLR动态变化

不良组溶栓后24 h、溶栓后7 d UA、NT-proBNP、PLR均较良好组高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表2。

表2 两组UA、NT-proBNP、PLR动态变化($\bar{x} \pm s$)

Table 2 The dynamic changes of the two groups of UA, NT-proBNP and PLR ($\bar{x} \pm s$)

指标	组别	例数	溶栓前	溶栓后24 h	溶栓后7 d
UA($\mu\text{mol/L}$)	不良组	26	428.66 \pm 67.29	357.86 \pm 59.44	349.23 \pm 31.88
	良好组	79	419.57 \pm 64.03	319.07 \pm 48.76	322.67 \pm 35.57
	t 值		0.620	3.328	3.384
P 值			0.537	0.001	0.001
NT-proBNP(pg/ml)	不良组	26	305.29 \pm 59.34	257.34 \pm 36.84	249.18 \pm 37.43
	良好组	79	310.49 \pm 55.28	219.56 \pm 33.92	208.23 \pm 40.55
	t 值		0.409	4.822	4.549
P 值			0.684	<0.001	<0.001
PLR	不良组	26	142.06 \pm 19.78	121.39 \pm 17.26	103.55 \pm 13.50
	良好组	79	146.53 \pm 21.67	106.88 \pm 14.75	90.27 \pm 10.81
	t 值		0.931	4.168	5.098
P 值			0.354	<0.001	<0.001

2.2 两组发病后90 d mRS评分比较

不良组与良好组发病后90 d mRS评分比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表3。

表3 两组发病后90 d mRS评分比较 [$n(\%)$]

Table 3 Comparison of mRS scores between the two groups at 90 d after the onset of disease [$n(\%)$]

组别	例数	1分	2分	3分	4分	5分
不良组	26	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	22(84.62)	4(15.38)
良好组	79	6(7.59)	49(62.03)	24(30.38)	0(0.00)	0(0.00)
u 值				7.661		
P 值				<0.001		

2.3 UA、NT-proBNP、PLR与mRS评分关系

Pearson分析显示,溶栓后24 h、溶栓后7 d UA、NT-proBNP、PLR与发病后90 d mRS评分呈正相关($P < 0.05$)。见表4。

2.4 预后影响因素的Cox分析

因变量:预后良好=0,预后不良=1;自变量:溶栓后24 h、溶栓后7 d UA、NT-proBNP、PLR;应用Cox回归分析显示,溶栓后24 h、溶栓后7 d UA、NT-proBNP、PLR是预后相关影响因素($P < 0.05$)。见表5。

2.5 UA、NT-proBNP、PLR预测预后的ROC曲线

阳性样本:不良组溶栓后24 h、溶栓后7 d

表4 UA、NT-proBNP、PLR与mRS评分关系

Table 4 Relationship between UA, NT-proBNP, PLR and mRS score

指标	UA		NT-proBNP		PLR	
	溶栓后24 h	溶栓后7 d	溶栓后24 h	溶栓后7 d	溶栓后24 h	溶栓后7 d
mRS评分 r 值	0.503	0.679	0.565	0.520	0.534	0.574
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

表5 预后影响因素的Cox回归分析

Table 5 Cox regression analysis of prognostic factors

影响因素	β 值	SE值	Wald χ^2	HR值	95%CI	P 值
溶栓后24 h						
UA	0.144	0.048	9.024	1.155	1.007~1.325	<0.001
NT-proBNP	0.820	0.249	10.832	2.269	2.051~2.511	<0.001
PLR	0.324	0.113	8.214	1.382	1.152~1.659	<0.001
溶栓后7 d						
UA	0.166	0.042	15.569	1.180	1.025~1.359	<0.001
NT-proBNP	0.925	0.226	16.765	2.523	2.316~2.748	<0.001
PLR	0.433	0.102	17.980	1.541	1.264~1.879	<0.001

UA、NT-proBNP、PLR;阴性样本:良好组溶栓后24 h、溶栓后7 d UA、NT-proBNP、PLR;绘制ROC曲线显示,溶栓后7 d各指标及联合的曲线下面积(Area under the curve, AUC)大于溶栓后24 h对应单一指标及联合的AUC。见表6、图1。

表6 ROC分析结果

Table 6 ROC analysis results

指标	AUC	95%CI	cut-off 值	敏感度 (%)	特异度 (%)	P 值	
溶栓后 24 h	UA	0.715	0.599~0.831	>350.86 $\mu\text{mol/L}$	61.54	70.89	<0.001
	NT-proBNP	0.804	0.715~0.892	>244.46 pg/ml	88.46	63.29	<0.001
	PLR	0.722	0.593~0.850	>115.82	46.15	97.47	<0.001
	联合	0.910	0.853~0.967		84.62	81.01	<0.001
溶栓后 7 d	UA	0.895	0.872~0.964	>332.19 $\mu\text{mol/L}$	69.23	94.94	<0.001
	NT-proBNP	0.844	0.750~0.938	>234.05 pg/ml	84.62	82.28	<0.001
	PLR	0.791	0.694~0.887	>95.82	80.77	74.68	<0.001
	联合	0.953	0.914~0.991		88.46	89.87	<0.001

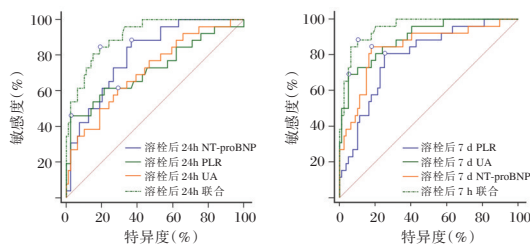


图1 UA、NT-proBNP、PLR 预测预后的 ROC 曲线

Figure 1 ROC curve of UA, NT-proBNP, PLR predicting prognosis

3 讨论

AIS 的治疗关键在于第一时间开通梗死血管, 尽早恢复缺血脑组织的血流灌注^[9]。国内外已有大量研究证实阿替普酶静脉溶栓是治疗 AIS 有效方法^[10-11]。

本研究以 AIS 静脉溶栓的不同预后为切入点, 通过对比分析发现预后不良患者的溶栓后 24 h、溶栓后 7 d 血清 UA 水平明显高于预后良好患者, 提示溶栓治疗过程中血清 UA 水平的动态变化可能与 AIS 患者的预后有关。UA 是人体嘌呤代谢的最终产物, 高 UA 水平可引起体内脂类代谢异常, 导致血液黏稠度增高, 加重动脉粥样硬化, 同时能促进血小板黏附、增加脑白质病变, 从而加重脑梗死病情^[12-13]。本研究还发现, 预后不良患者溶栓后 24 h、溶栓后 7 d 血清 NT-proBNP 水平均高于预后良好患者。NT-proBNP 属利钠肽家族成员, 是脑钠肽激素原分裂后的 N 端片段, 多见于心血管疾病的研究中^[14]。近年来研究发现, 非心力衰竭患者也可因炎症因子增加等产生心肌抑制因子, 导致血清 NT-proBNP 水平上升^[15]。而炎症反应是 AIS 发生发展过程中的关键环节之一, 大量研究证实 AIS 发生可引起多种炎症因子水平升高^[16-17]。因此 AIS 患者血清 NT-proBNP 水平处于

高表达状态, 溶栓治疗后, 随着患者病情改善炎症反应逐渐消减, 血清 NT-proBNP 水平随之降低。此外, 淋巴细胞是反映炎症状态的指标之一, 有报道指出淋巴细胞下降是脑梗死发生后的早期特征, 且是脑损伤和感染的高危标志物^[18]。而血小板是一种特殊的炎症指标, 其受到刺激时会释放炎症分子, 且血小板活化参与了动脉粥样硬化和 AIS 的病理过程, PLR 作为血小板与淋巴细胞的比值, 可反映 AIS 患者炎症状态, 且 PLR 相对于单个血液参数而言更为稳定^[19]。本研究亦发现 PLR 在 AIS 患者溶栓治疗后随病情好转逐渐降低, 说明 PLR 水平变化与 AIS 患者预后有关。本研究进一步通过相关性分析, 发现溶栓后 24 h、溶栓后 7 d UA、NT-proBNP、PLR 水平与发病后 90 d mRS 评分间存在正相关关系, 且多因素分析发现各指标均与 AIS 患者预后显著相关, 这说明 UA、NT-proBNP、PLR 升高水平均与溶栓治疗后 AIS 患者预后有关。

基于上述结果, 笔者推测溶栓后 24 h、溶栓后 7 d UA、NT-proBNP、PLR 可应用于预测 AIS 患者溶栓治疗的预后转归方向, 通过绘制 ROC 曲线对上述推测进行验证, 发现溶栓后 24 h、溶栓后 7 d UA、NT-proBNP、PLR 预测 AIS 患者预后不良的 AUC 均在 0.7 以上, 均具有一定预测价值, 特别是溶栓后 7 d 各指标联合预测的 AUC 达到 0.953, 最佳预测敏感度、特异度分别为 88.46%、89.87%, 具有较高预测效能, 可为临床早期预测患者预后转归方向提供一定参考, 从而指导医生合理制定后续治疗、干预措施。

综上所述, AIS 患者溶栓治疗后 UA、NT-proBNP、PLR 水平随着病情改善逐渐降低, 各指标水平变化与患者预后显著相关, 可作为预测患者预后转归方向的参考指标。

参考文献

- [1] Silva GS, Nogueira RG. Endovascular Treatment of Acute Ischemic Stroke [J]. *Continuum (Minneapolis)*, 2020, 26(2):310-331.
- [2] 刘汉臣, 张琦, 王杰斌. 不同时间窗阿替普酶静脉溶栓治疗急性脑梗死的疗效观察[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2021, 13(6):985-988, 993.
- [3] Berge E, Whiteley W, Audebert H, et al. European Stroke Organisation (ESO) guidelines on intravenous thrombolysis for acute ischaemic stroke [J]. *Eur Stroke J*, 2021, 6(1): I-LXII.
- [4] 赵萍, 霍会永, 曹凌, 等. 急性脑梗死患者血清尿酸水平与颅内动脉重度狭窄或闭塞的侧支循环关系分析[J]. *脑与神经疾病杂志*, 2019, 27(9):542-545.
- [5] 沙霞, 庄建华, 祝滨, 等. N末端-前B型脑钠肽与急性脑梗死病因、神经功能缺损严重度及预后的相关性分析[J]. *中风与神经疾病杂志*, 2020, 37(9):817-822.
- [6] 孙云云, 洪二春, 张桁忠. 血小板与淋巴细胞比值对阿替普酶静脉溶栓的急性缺血性脑卒中患者预后的预测价值[J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2021, 23(6):609-612.
- [7] 李宏建. 缺血病变部位对缺血性卒中患者改良 Rankin 量表评分的影响[J]. *国际脑血管病杂志*, 2019, 27(2):136.
- [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 2018 [J]. *中华神经科杂志*, 2018, 51(9):666-682.
- [9] Rabinstein AA. Update on Treatment of Acute Ischemic Stroke [J]. *Continuum (Minneapolis)*, 2020, 26(2):268-286.
- [10] 马灿灿, 张熙斌, 李晓波, 等. 高龄急性脑梗死患者阿替普酶静脉溶栓有效性、安全性及预后影响因素分析[J]. *中国卒中杂志*, 2020, 15(9):972-977.
- [11] Murao A, Endo T, Nisii T, et al. Thrombolytic recombinant tissue plasminogen activator (rt-PA) treatment in the acute ischemic stroke with limb arterial embolism; three case reports [J]. *Rinsho Shinkeigaku*, 2020, 60(3):223-228.
- [12] 吴湘军, 郑海燕, 朱亚兰. 血清同型半胱氨酸、尿酸、超敏C反应蛋白水平与腔隙性脑梗死患者颈动脉粥样硬化程度的关系探讨[J]. *实用医院临床杂志*, 2020, 17(2):220-223.
- [13] 李春芳, 苗青, 胡林壮, 等. 尿酸水平与急性脑梗死脑白质病变的相关性研究[J]. *安徽医药*, 2020, 24(1):42-47.
- [14] 田艳珍, 崔继婷, 赵金芳, 等. 血清 NT-proBNP 水平对心力衰竭心脏再同步化治疗患者临床预后的影响[J]. *临床误诊误治*, 2019, 32(4):64-68.
- [15] 张丽雅, 郭富强. 急性脑梗死患者血清 NT-proBNP 水平变化的相关因素及其临床预测价值分析[J]. *四川大学学报(医学版)*, 2019, 50(6):910-914.
- [16] Liu M, Xu Z, Wang L, et al. Cottonseed oil alleviates ischemic stroke injury by inhibiting the inflammatory activation of microglia and astrocyte [J]. *J Neuroinflammation*, 2020, 17(1):270.
- [17] 吴强, 吕晓影, 张乐国. 炎性因子在脑梗死患者血液中的检测意义 [J]. *神经损伤与功能重建*, 2019, 14(3):140-142.
- [18] 李佩湖, 隆海银, 姚辉. 中性粒细胞与淋巴细胞比值纤维蛋白原与急性脑梗死侧支循环建立的关系研究 [J]. *中国实用神经疾病杂志*, 2020, 23(20):1760-1765.
- [19] 孟锐, 李新建, 靳维华, 等. 血小板/淋巴细胞比值与急性心肌梗死近期和远期预后的相关性 [J]. *中华全科医师杂志*, 2020, 19(5):437-440.

(上接第 1638 页)

- [11] 董红志, 丛洪良, 王菁, 等. 脂蛋白(a)基因单核苷酸多态性与钙化性主动脉瓣疾病及冠心病的关系 [J]. *中华解剖与临床杂志*, 2020, 25(3):265-271.
- [12] 帕丽达·阿布来提, 沙吉旦·阿不都热衣木, 高颖. 冠状动脉粥样硬化性心脏病患者同型半胱氨酸与血脂指标的相关性分析 [J]. *中国现代医学杂志*, 2020, 30(22):72-76.
- [13] 温伟谊, 张舒媚, 刘晓剑, 等. hsCRP、apoB/apoA1、血脂表达与早发冠心病急性冠脉综合征的关系 [J]. *中国循证心血管医学杂志*, 2019, 11(3):94-98.
- [14] Vuilleumier N, Pagano S, Montecucco F, et al. Relationship between HDL Cholesterol Efflux Capacity, Calcium Coronary Artery Content, and Antibodies against Apolipoprotein A-1 in Obese and Healthy Subjects [J]. *J Clin Med*, 2019, 8(8):1225.
- [15] 黄恒贵. 心电图 QRS 波时限与血清 ApoB/ApoA- I 比值在冠心病患者冠脉病变严重程度评估中的价值 [J]. *武汉大学学报(医学版)*, 2020, 41(1):114-118.
- [16] Ashiq S, Ashiq K. The association of apolipoprotein - E (APOE) gene polymorphisms with coronary artery disease: a systematic review and meta- analysis [J]. *Egypt J Med Human Genet*, 2021, 22(16):1-8.
- [17] 贺芬, 郑艳妮, 沙海旺, 等. NT-pro BNP 与红细胞压积对脓毒症患者心肌损伤的诊断价值 [J]. *临床和实验医学杂志*, 2020, 19(20):2150-2153.
- [18] 刘杨, 王敏, 徐枫, 等. 血清碱性磷酸酶对老年冠心病患者不良心血管事件的预测价值 [J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2019, 20(6):583-586.
- [19] Yousef AM, Hammad FK, Abdelrahman HM, et al. Association between serum apolipoprotein B and diabetic retinopathy in type 2 diabetic patients [J]. *Scientific J Al-Azh Med Faculty Girls*, 2021, 5(1):73-77.

HMGB1、EOS、IL-23 与慢性鼻窦炎病变范围关系及诊断价值

魏鑫鑫* 许欢 闫一敏 尹中普

[摘要] **目的** 探讨高迁移率族蛋白 B1(HMGB1)、嗜酸性粒细胞(EOS)、白介素-23(IL-23)与慢性鼻窦炎(CRS)病变范围关系及诊断价值。**方法** 选取2019年1月至2020年12月南阳市中心医院收治的98例CRS患者(CRS组)及体检中心45例健康人群作为对照组,比较两组基线资料、HMGB1、EOS、IL-23水平,并比较各指标不同表达水平者视觉模拟评分法(VAS)、Lund-Mackay评分,应用Pearson、多因素Logistic回归方程、受试者工作特征曲线(ROC)及ROC下面积(AUC)处理分析数据。**结果** CRS组CRS家族史、HMGB1、EOS、IL-23与对照组比较,差异有统计学意义($P<0.05$);HMGB1、EOS、IL-23高水平者VAS评分、Lund-Mackay评分高于低水平者,差异有统计学意义($P<0.05$);HMGB1、EOS、IL-23与VAS评分、Lund-Mackay评分呈正相关($P<0.05$);多因素Logistic回归方程分析显示,将CRS家族史控制后,HMGB1、EOS、IL-23仍是CRS的相关危险因素($P<0.05$);HMGB1、EOS联合IL-23的AUC为0.951,高于HMGB1的0.818、EOS的0.856、IL-23的0.803。**结论** CRS患者HMGB1、EOS、IL-23较正常人群升高,与主观病情、病变范围有关,可作为诊断CRS生物标志物,从而为临床诊治提供参考信息。

[关键词] HMGB1; EOS; IL-23; 慢性鼻窦炎; 病变范围

Relationship between HMGB1, EOS, IL-23 and the extent of chronic sinusitis and its diagnostic value

WEI Xinxin*, XU Huan, YAN Yimin, YIN Zhongpu

(Department of Otolaryngology, Head and Neck Surgery, Nanyang Central Hospital, Nanyang, Henan, China, 473000)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the relationship between high mobility group protein B1 (HMGB1), eosinophils (EOS), interleukin-23 (IL-23) and the extent of chronic sinusitis (CRS) and its diagnostic value. **Methods** A total of 98 CRS patients admitted to Nanyang Central Hospital from January 2019 to December 2020 were selected as the CRS group and 45 healthy people from the physical examination center were selected as the control group. The baseline data, HMGB1, EOS, and IL-23 levels of the two groups were compared. The visual analogue scoring (VAS) and Lund-Mackay scores of people with different expression levels of each indicator were compared. Pearson, multivariate Logistic regression equation, receiver operating characteristic curve (ROC) and area under ROC (AUC) were used to process and analyze the data. **Results** Compared with the control group, the CRS family history, HMGB1, EOS and IL-23 in the CRS group showed statistically significant differences ($P<0.05$). The VAS score and Lund-Mackay score of those with high levels of HMGB1, EOS, and IL-23 were higher than those with low Levels ($P<0.05$). HMGB1, EOS, IL-23 were positively correlated with the VAS score and Lund-Mackay score ($P<0.05$). Multivariate logistic regression analysis showed that after controlling the family history of CRS, HMGB1, EOS, IL-23 were

基金项目:河南省科技发展计划项目(172102310167)

作者单位:南阳市中心医院耳鼻咽喉头颈外科一病区,河南,南阳473000

*通信作者:魏鑫鑫, E-mail: veilxun@126.com

still related risk factors for CRS ($P<0.05$). The AUC of HMGB1 and EOS combined with IL-23 was 0.951, which was higher than 0.818 of HMGB1, 0.856 of EOS, and 0.803 of IL-23. **Conclusion** HMGB1, EOS, and IL-23 in CRS patients are higher than those in the normal population, which are related to the subjective condition and lesion range, and can be used as biomarkers for the diagnosis of CRS, thereby providing reference information for clinical diagnosis and treatment.

[KEY WORDS] HMGB1; EOS; IL-23; Chronic sinusitis; Lesion range

慢性鼻窦炎(Chronic rhinosinusitis, CRS)是以鼻塞、嗅觉减退、头面部胀痛等为主要表现的鼻窦黏膜慢性炎症类疾病,并能引起睡眠障碍、精神方面等鼻部症状外的不适,与哮喘、变应性鼻炎等关系密切,严重降低患者生活质量,因此早期诊断意义重大^[1]。目前临床诊断 CRS 主要依据症状表现、CT 检查、MRI 检查等,并需排除后鼻孔息肉、鼻咽纤维血管瘤等,检查项目繁琐,不适宜于有相关症状人群的初步筛查,故有必要研究新的诊断方法。高迁移率族蛋白 B1(High mobility group protein B1, HMGB1)是一种致炎介质,在过敏性鼻炎中呈高表达,降低 HMGB1 水平,则鼻部炎症反应被改善^[2]。嗜酸性粒细胞(Eosinophils, EOS)在 CRS 患者中升高,与鼻塞、流涕、头面部胀痛及嗅觉障碍评分有关^[3]。白介素-23(Inter-leukin23, IL-23)在变应性鼻炎患者中水平升高,经有效治疗后降低,并伴有临床症状和生活质量显著改善^[4]。但现阶段关于 HMGB1、EOS、IL-23 与 CRS 病变范围关系及诊断价值的报道较少,本研究对此进行探讨,旨在为临床诊断 CRS、评估病变范围提供参考,报告如下。

1 对象和方法

1.1 研究对象

选取 2019 年 1 月至 2020 年 12 月南阳市中心医院收治的 98 例 CRS 患者(CRS 组)及体检中心 45 例健康人群作为对照组。本研究经医院伦理委员会审核通过,入组者充分知晓本研究,自愿签署知情同意书。

纳入标准:①CRS 组符合 CRS 诊断标准^[5];②入组前无相关治疗史;③均能顺利获取鼻腔分泌物;④自愿加入本研究。排除标准:①伴有鼻窦等系统原发性恶性肿瘤者;②急性鼻窦炎者;③合并急性感染类疾病者。

1.2 方法

1.2.1 资料收集

收集患者年龄、性别、体质量指数、饮酒史、吸烟史、CRS 家族史资料,采用双人双录法,并进行

数据的一致性检验。

1.2.2 各指标检测

CRS 组于治疗前,对照组于入院后清晨,在鼻道中放置无菌脱脂棉片 10 min,取出后置入冻存管,压住棉片一角后旋紧,以 13.5 cm 半径、2 000 r/min 进行 10 min 离心,弃去棉片即得鼻腔分泌物,应用酶联免疫吸附法检测 HMGB1、EOS、IL-23 水平,试剂盒购于上海酶链生物科技有限公司,均按照试剂盒说明进行操作。

1.2.3 主观病情与病变范围评估^[5]

采用视觉模拟评分法(Visual analogue scale, VAS)^[5]评估患者主观病情,评分范围 0~10 分,分值越高,主观病情越严重;采用 Lund-Mackay 评分^[6]评估病变范围,总分 0~24 分,分值与病变范围成正比。

1.3 统计学方法

数据采用 SPSS 22.0 处理,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,采用独立样本 t 检验,计数资料用 $n(\%)$ 表示,行 χ^2 检验,应用 Pearson 分析各指标与主观病情、病变范围关系,应用多因素 Logistic 回归方程分析 CRS 的相关影响因素,应用受试者工作特征曲线(ROC)及 ROC 下面积(AUC)分析各指标诊断 CRS 价值。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组基线资料、各指标比较

两组年龄、性别、体质量指数、饮酒史、吸烟史比较,差异无统计学意义($P>0.05$);CRS 组 CRS 家族史、HMGB1、EOS、IL-23 与对照组比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

2.2 各指标不同表达水平者主观病情、病变范围比较

以 CRS 组各指标均值为分界,将 CRS 组分为 HMGB1、EOS、IL-23 高水平与低水平者,结果显示, HMGB1、EOS、IL-23 高水平者 VAS 评分、Lund-Mackay 评分高于低水平者,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 2。

表1 两组基线资料、各指标比较 $[(\bar{x} \pm s), n(\%)]$
Table 1 Comparison of baseline data and indicators between 2 groups $[(\bar{x} \pm s), n(\%)]$

资料	CRS组 (n=98)	对照组 (n=45)	t/ χ^2 值	P值
年龄(岁)	40.25±12.05	38.79±10.86	0.694	0.489
性别				
男	42(42.86)	25(55.56)	1.520	0.218
女	56(57.14)	20(44.44)		
体质量指数(kg/m ²)				
偏瘦	6(6.12)	3(6.67)	1.047	0.790
正常	65(66.33)	26(57.78)		
超重	18(18.37)	11(24.44)		
肥胖	9(9.18)	5(11.11)		
饮酒史	64(65.31)	32(71.11)	0.471	0.493
吸烟史	37(37.76)	13(28.89)	1.066	0.302
CRS家族史	27(27.55)	4(8.89)	6.326	0.012
HMGB1(ng/mL)	150.68±49.19	95.87±30.02	6.900	<0.001
EOS(%)	4.64±1.49	2.03±0.66	11.239	<0.001
IL-23(pg/mL)	340.68±83.57	254.48±71.49	5.984	<0.001

表2 各指标不同表达水平者主观病情、病变范围比较 $(\bar{x} \pm s)$

Table 2 Comparison of the subjective condition and range of lesions in patients with different expression levels of various indicators $(\bar{x} \pm s)$

指标	组别	n	VAS评分(分)	t值	P值	Lund-Mackay评分(分)	t值	P值
HMGB1	高水平	39	5.26±1.35	8.646	<0.001	11.54±3.09	9.249	<0.001
	低水平	59	3.07±1.14			6.22±2.57		
EOS	高水平	32	5.11±1.97	5.611	<0.001	11.83±3.35	13.156	<0.001
	低水平	66	3.37±1.10			5.50±1.42		
IL-23	高水平	44	4.97±1.22	8.043	<0.001	10.61±3.14	7.555	<0.001
	低水平	54	3.10±1.08			6.49±2.25		

表3 多因素 Logistic 回归方程分析

Table 3 Multivariate logistic regression equation analysis

影响因素	β 值	SE值	Wald χ^2	OR值	95%CI	P值
HMGB1	0.699	0.195	12.835	2.011	1.518~2.664	<0.001
EOS	1.005	0.241	17.404	2.733	2.619~2.852	<0.001
IL-23	0.645	0.203	10.099	1.906	1.056~3.441	<0.001

2.5 各指标对 CRS 诊断价值

以 CRS 组为阳性样本,以对照组为阴性样本,绘制 ROC 曲线结果显示, HMGB1、EOS 联合 IL-23 的 AUC 为 0.951, 高于 HMGB1 的 0.818、EOS 的 0.856、IL-23 的 0.803。见表 4、图 1。

表4 ROC 分析结果

Table 4 ROC analysis results

指标	AUC	95%CI	cut-off 值	敏感度 (%)	特异度 (%)	P值
HMGB1	0.818	0.745~0.877	>123.98 ng/mL	69.39	86.67	<0.001
EOS	0.856	0.787~0.909	>3.17%	74.49	88.89	<0.001
IL-23	0.803	0.728~0.865	>303.65 pg/mL	72.45	77.78	<0.001
联合	0.951	0.902~0.980		86.73	99.95	<0.001

2.3 各指标与主观病情、病变范围关系

以 CRS 组各指标为源数据,应用 Pearson 进行相关性分析,结果显示, HMGB1($r=0.705$)、EOS($r=0.768$)、IL-23($r=0.679$)与 VAS 评分呈正相关, HMGB1($r=0.711$)、EOS($r=0.804$)、IL-23($r=0.662$)与 Lund-Mackay 评分呈正相关($P<0.05$)。

2.4 多因素 Logistic 回归方程分析

以是否有 CRS 为因变量(无赋值 0,有赋值 1),纳入两组比较 $P<0.05$ 的因素作为自变量(无 CRS 家族史赋值 0,有 CRS 家族史赋值 1; HMGB1、EOS、IL-23 低水平赋值 1,高水平赋值 1),应用多因素 Logistic 回归方程分析,结果显示,将 CRS 家族史控制后, HMGB1、EOS、IL-23 仍是 CRS 的相关危险因素($P<0.05$)。见表 3。

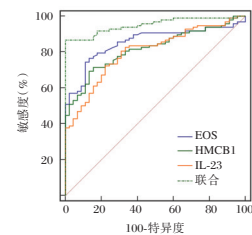


图1 各指标对 CRS 诊断价值

Figure 1 The diagnostic value of various indicators for CRS

3 讨论

HMGB1 系高度保守核蛋白之一,是一种致炎因子,可在白介素-1、肿瘤坏死因子- α 等刺激下合成分泌。本研究显示, CRS 患者 HMGB1 高于健康对照者,且 HMGB1 水平越高,患者主观病情越严重,病变范围越广,是 CRS 的相关危险因素,提示检测 HMGB1 水平可用于 CRS 诊断、主观病情、病变范围评估。Taziki MH 等^[7]报道, CRS 患者鼻腔粘膜 HMGB1 水平升高,与 CRS 发

病有关,本研究观点与之相似。HMGB1一方面能直接对鼻黏膜、鼻腔组织造成炎性损伤,另一方面能通过与核因子- κ B、TOLL样受体等转录因子相互作用,调控基因的转录、炎症细胞因子合成分泌和增殖、活化,在启动炎症级联反应中具有重要作用,从而引起鼻腔炎性细胞浸润、黏液腺体增生、胶原沉积、鳞状上皮化生等,参与CRS发病与进展^[8]。

EOS来源于骨髓的造血干细胞,可杀伤细菌、寄生虫,是过敏反应、免疫反应过程中一种重要细胞^[9]。王佳慧等^[10]报道,CRS患者EOS水平较高,在CRS发病中扮演重要角色,本研究观点与之一致。同时本研究还发现,EOS与VAS评分、Lund-Mackay评分呈正相关,将CRS家族史控制后,EOS仍是CRS的相关危险因素。EOS在鼻腔鼻窦黏膜内募集和激活主要依赖于:①上皮细胞、其他细胞表达吸引EOS的趋化因子;②鼻腔鼻窦黏膜内粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子;③内皮细胞表达黏附分子促进EOS进入黏膜固有层^[11]。EOS在鼻腔鼻窦黏膜出现并激活后,通过释放颗粒中的内容物,引起上皮细胞脱落和组织水肿,减少纤毛数量,促进炎症进展,直接或间接影响CRS的发生发展。近年来有研究^[12]提出,以EOS对ERS进行分型,分为嗜EOS和非嗜EOS,与非嗜EOS患者相比,嗜EOS患者主观病情、病变范围通常较严重,哮喘、鼻息肉等发生率较高,因此临床应加强对EOS水平较高患者管理和干预,以改善患者预后。

IL-23属于白介素-12家族成员,包括IL-23特异性p19亚单位和IL-12共享的p40亚单位,主要表达在自然杀伤T细胞、树突细胞、单核细胞等^[13]。本研究显示,CRS患者IL-23高于健康人群,与主观病情、病变范围有关,并是CRS发病相关独立影响因素,可作为诊断CRS的生物标志物。王敏等^[14]研究显示,IL-23在CRS鼻黏膜中水平高于正常鼻黏膜,佐证了IL-23与CRS有关。IL-23可促进白介素-17、白介素-1合成和分泌,并能独立于白介素-17募集中性粒细胞至炎性损伤部位,推进鼻腔鼻窦炎症反应,从而参与CRS发病^[15]。同时本研究结果显示,HMGB1、EOS联合IL-23诊断CRS的AUC大于任一单一指标,故建议联合检测三者对受检者CRS风险进行初步评估,为临床诊断CRS提供更可靠参考。

综上,CRS患者HMGB1、EOS、IL-23较正常人群升高,与主观病情、病变范围有关,可作为诊断CRS生物标志物,从而为临床诊治提供参考信息。

参考文献

- [1] 陈瑾雅,李永磊,芦二永. 通窍鼻炎方对慢性鼻窦炎患者体内Foxa2、黏蛋白MUC5AC、HIF-1 α 水平的影响[J]. 陕西中医, 2018, 39(8): 1105-1108.
- [2] 丛贾因,郑庆范,朱学伟,等. LMP-1重组质粒对过敏性鼻炎动物模型RAGE, HMGB1及TSLP表达的影响[J]. 中国实验诊断学, 2020, 24(8): 1363-1365.
- [3] 李莉,杨立新,周宁. 外周血嗜酸性粒细胞联合鼻窦CT在慢性鼻窦炎伴息肉肉诊断中的应用价值[J]. 安徽医学, 2021, 42(2): 162-165.
- [4] 王诗思,夏纪严. 固本祛风汤对变应性鼻炎患者血清IL-17和IL-23水平的影响分析[J]. 四川中医, 2020, 38(1): 172-175.
- [5] 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志编辑委员会鼻科组, 中华医学会耳鼻咽喉头颈外科学分会鼻科学组. 中国慢性鼻窦炎诊断和治疗指南(2018)[J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2019, 54(2): 81-100.
- [6] 王立英,刘强,曹震. 外周血嗜酸性粒细胞与慢性鼻-鼻窦炎并息肉肉患者嗅觉障碍的关系[J]. 广东医学, 2021, 42(4): 494-496.
- [7] Taziki MH, Azarhoush R, Taziki MM, et al. Correlation Between HMGB1 and TLR4 Expression in Sinonasal Mucosa in Patients With Chronic Rhinosinusitis [J]. Ear Nose Throat J, 2019, 98(10): 599-605.
- [8] Ciprandi G, Bellussi LM, Passali GC, et al. HMGB1 in nasal inflammatory diseases: a reappraisal 30 years after its discovery [J]. Exp Rev Clin Immunol, 2020, 16(5): 457-463.
- [9] 何进,唐昌鹏,杨菊. 血清IL-5、IL-37及EOS水平在学龄前期儿童支气管哮喘发病中变化及临床意义[J]. 热带医学杂志, 2020, 20(11): 1488-1491.
- [10] 王佳慧,孟珣,林瀚青,等. II型固有淋巴细胞在慢性鼻-鼻窦炎中的作用机制初探[J]. 国际耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2020, 44(2): 79-83.
- [11] 董春花,张英,岳光浩. CRSwNP患者YKL-40、TLR4基因表达及嗜酸性粒细胞水平与复发的相关性[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(11): 1561-1564, 1569.
- [12] 闫冰,刘畅,王阳,等. CXCL10在嗜酸性粒细胞型与非嗜酸性粒细胞型慢性鼻-鼻窦炎伴息肉肉的差异表达及意义[J]. 解剖学报, 2020, 51(5): 688-692.
- [13] Moschen AR, Tilg H, Raine T. IL-12, IL-23 and IL-17 in IBD: immunobiology and therapeutic targeting [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2019, 16(3): 185-196.
- [14] 王敏,李颖,王向东,等. IL-23在慢性鼻窦炎中的表达和作用[J]. 首都医科大学学报, 2020, 41(2): 178-182.
- [15] 刘婷,任秀敏,郝东阳,等. 变应性鼻炎患者白细胞介素23和白细胞介素27对调节性T细胞/辅助性T细胞17细胞平衡的调控作用[J]. 中国耳鼻咽喉头颈外科, 2018, 25(6): 315-319.

2018-2019年广州市区某院甲型流感流行病学特点和检测方法比较

黄佳斯^{1,2} 何宇婷² 陈瑶² 余学高² 黄浩² 陈培松^{2*}

[摘要] **目的** 分析2018至2019年广州市区某院甲型流感病毒的流行特征,评估胶体金标记免疫层析法和Real-time RT-PCR法在甲型流感病毒筛查中的临床应用。**方法** 收集2018年8月至2019年7月本院收治的12 506例流感样病例(ILI),采集其咽拭子标本,采用胶体金标记免疫层析法检测甲型流感抗原,Real-time RT-PCR法检测核酸。**结果** ILI甲型流感检出率4.19%,主要集中在1月至7月;不同性别ILI甲型流感检出率比较,差异无统计学意义($\chi^2=0.606, P>0.05$);不同年龄组间ILI甲型流感阳性率比较,差异有统计学意义($\chi^2=31.260, P<0.05$),7~17岁组阳性率最高(6.19%);Real-time RT-PCR法甲型流感病毒阳性检出率15.20%,以Real-time RT-PCR法为参考,胶体金标记免疫层析法灵敏度为10.48%,特异度为98.98%;阳性预测值为64.71%,阴性预测值为86.05%,符合率85.53%,尤登指数0.095,一致性Kappa值0.144($P<0.05$),漏检率为89.52%,假阳性率为1.02%。**结论** 胶体金标记免疫层析法存在较高的漏检率。临床上应该更加重视病原学的核酸检测,同时不断提高包括胶体金法在内快速法的灵敏度和特异度,以最大程度满足临床需求。

[关键词] 甲型流感;流行特征;胶体金标记免疫层析法;Real-time RT-PCR;灵敏度与特异度

Comparison of the epidemiological characteristics and detection methods of influenza A in a hospital in Guangzhou from 2018 to 2019

HUANG Jiasi^{1,2}, HE Yuting², CHEN Yao², YU Xuegao², HUANG Hao², CHEN Peisong^{2*}

(1. The Third Hospital of Changsha, Changsha, Hunan, China, 410000; 2. The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong, China, 510000)

[ABSTRACT] **Objective** To analyze the epidemic characteristics of influenza A virus in a hospital in Guangzhou from 2018 to 2019 and evaluate the clinical application of colloidal gold immunochromatography and Real-time RT-PCR in influenza A virus screening. **Methods** In the retrospective study, a total of 12 506 cases of influenza-like illness (ILI) admitted to the hospital from August 2018 to July 2019 were recruited. Pharyngeal swabs were collected, colloidal gold-labeled immunochromatography was used to detect influenza A antigen. Real-time RT-PCR was used to detect nucleic acid. **Results** The detection rate of ILI influenza A was 4.19%, mainly from January to July. There was no statistically significant difference in ILI influenza A detection rate of different genders ($\chi^2=0.606, P>0.05$). There was a statistically significant difference in ILI influenza A positive rate between different age groups ($\chi^2=31.260, P<0.05$), and the positive rate was the highest in the 7~17 year-old group (6.19%). Real-time RT-PCR method of influenza A virus positive detection rate is 15.20%, with Real-time RT-PCR method as a reference, the sensitivity of colloidal gold immunochromatography method is 10.48%, and the specificity is 98.98%. The positive predictive value was 64.71%, the negative predictive value was 86.05%, the coincidence rate was 85.53%. The Yoden index was 0.095, the consistent Kappa value was

基金项目:广东省自然科学基金项目(2018A0303130246)

作者单位:1.长沙市第三医院检验科,湖南,长沙410000

2.中山大学附属第一医院检验科,广东,广州510000

*通信作者:陈培松, E-mail:13570474904@163.com

0.144 ($P < 0.01$), the missed detection rate was 89.52%, and the false positive rate was 1.02%. **Conclusion** The colloidal gold labeled immunochromatography has a high rate of missed detection. Clinically, more attention should be paid to nucleic acid detection in pathogens, and the sensitivity and specificity of rapid methods including colloidal gold methods should be continuously improved to meet clinical needs to the greatest extent.

[KEY WORDS] Influenza A; Prevailing characteristics; Colloidal gold labeled immunochromatography; Real-time RT-PCR; Sensitivity and specificity

流行性感胃是指因流行性感胃病毒引起的急性呼吸道传染疾病,多为自限性,但在儿童、老年及机体免疫功能低下人群,可出现病毒性肺炎等并发症,重者可因急性呼吸窘迫综合征(Acute Respiratory Distress Syndrome, ARDS)合并多脏器功能衰竭致死。根据流感病毒核蛋白和基质蛋白抗原性的差异,可分为甲、乙、丙三型。世界卫生组织(World Health Organization, WHO)发布的最新全球流感流行病学报告^[1],2018–2019年冬春季,季节性流感以甲型流感为主。鉴于甲型流感病毒临床症状的非特异性,迫切需要一种准确的早期诊断方法,以期能早期应用抗病毒药物,及时控制病情。本研究分析了12 506例流感样病例(influenza-like illness, ILI),探讨甲型流感病毒的流行特征、流行结构和分布规律,并以Real-time RT-PCR为参考方法,分析胶体金标记免疫层析法对甲型流感病毒的检测性能。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集2018年8月1日至2019年7月31日医院门诊、急诊患者和住院患者中的ILI为研究对象,ILI的定义采取《全国流感检测方案(2017年版)》^[2]标准,即发热(体温 $\geq 38^{\circ}\text{C}$),伴咳嗽或咽痛之一者。排除标准:①非首诊患者;②已服用神经氨酸酶抑制剂类抗流感药物者;③已有明确实验证据可以解释发热原因者;④不明原因发热患者;⑤不愿或不能配合进一步检查者。共纳入12 506例患者,其中男性6 379例,女性6 127例,年龄平均(27.37 ± 23.20)岁;其中161例使用Real-time RT-PCR法检测,11654例使用胶体金标记免疫层析法检测,691例同时使用了Real-time RT-PCR法和胶体金标记免疫层析法检测。本研究经医院医学伦理委员会批准,全部入组患者均签署知情同意书。

1.2 仪器与试剂

Clearview 甲型/乙型流感病毒抗原检测试剂

盒(艾博生物医药(杭州)公司);核酸提取或纯化试剂(中山大学达安基因股份有限公司,批号:DA0623)、全自动核酸提取仪(中山大学达安基因股份有限公司,型号:Smart32);甲型流感病毒核酸检测试剂盒(中山大学达安基因股份有限公司);实时荧光定量PCR分析仪(美国ABI公司,型号:Prism7500)

1.3 方法

1.3.1 标本采集与处理

用两支灭菌棉棒同时采取疑似患者鼻拭子样本,放入无菌容器后于常温保存,并在30 min内送至检验科检测。标本采集与运输均按照《广东省流感监测方案(2017年版)》^[3]实施。

1.3.2 核酸提取

在上述灭菌棉棒中加入1 mL无菌生理盐水,震荡混匀后取300 μL 于核酸提取试剂盒,严格按照说明书操作。

1.3.3 反转录实时(Real-time RT)PCR检测流感病毒

严格按照说明书,利用一步法Real-time RT-PCR检测技术,以甲型流感病毒基因编码区的高度保守区为靶区域,设计特异性引物及荧光探针,实现对样本中流感病毒的定性检测。

1.3.4 胶体金标记免疫层析法操作流程

向软管内滴6滴Flu裂解液,将一支棉棒放入后,旋转挤压棉头,拔出棉棒,将检测试剂条放入软管,15 min后医务人员根据条带判读结果。

1.3.5 诊断标准

诊断标准采用《流行性感胃诊疗方案(2018年版)》^[4]确诊病例标准。流感临床症状加上Real-time RT-PCR和/或胶体金标记免疫层析法检测阳性诊断为甲型流感病例。当两种方法结果不一致时,以Real-time RT-PCR法检测为参考方法。

1.4 统计分析

采用SPSS 19.0统计软件包进行数据描述和统计分析,计数资料以 n 或($\%$)表示,2 \times 2四格表

总结检测结果,并计算敏感度、特异度、阳性预测值、阴性预测值、符合率及尤登指数,一致性用 Kappa 检验。如敏感度、特异度和符合率超过 90%,则认为研究方法与参考方法结果一致;一致性 Kappa 值 ≥ 0.75 表示研究方法与参考方法高度一致,Kappa ≥ 0.40 为基本一致,Kappa < 0.40 为不一致。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ILI 及甲型流感的时间分布

2018年8月到2019年7月甲型流感检出主要集中在1月到7月,最高峰在1月,其他月份以散发为主。见表1。

表1 甲型流感检出率月份分布 [n(%)]

时间	流感样病例	甲型流感	检出率
2018年8月	179	1	0.56
2018年9月	205	2	0.98
2018年10月	234	0	0.00
2018年11月	316	1	0.32
2018年12月	600	10	1.67
2019年1月	1 453	91	6.26
2019年2月	1 022	60	5.87
2019年3月	1 482	90	6.07
2019年4月	1 577	79	5.01
2019年5月	1 879	66	3.51
2019年6月	1 914	65	3.40
2019年7月	1 645	59	3.59
合计	12 506	524	4.19

2.2 不同性别 ILI 甲型流感检出率

不同性别 ILI 甲型流感检出率比较,差异无统计学意义($\chi^2=0.606, P > 0.05$)。见表2。

表2 不同性别 ILI 甲型流感检出率比较 [n(%)]

性别	流感样病例	流感病例	检出率(%)	χ^2 值	P值
男	6 379	276	4.33	0.606	0.436
女	6 127	248	4.05		

2.3 不同年龄组 ILI 甲型流感检出率

按照年龄的大小,病例共分为5个年龄组,7~17岁组阳性率最高,为6.19%,年龄 ≥ 66 岁组(4.54%)次之,不同年龄组间 ILI 甲型流感阳性率比较,差异有统计学意义($\chi^2=31.260, P < 0.05$)。见表3。

2.4 Real-time RT-PCR 和胶体金标记免疫层析法结果比较

在691例同时使用两种方法检测的 ILI 鼻咽

表3 不同年龄组 ILI 甲型流感检出率比较

Table 3 Comparison of detection rates of ILI influenza A among different age groups

年龄(岁)	流感样病例	流感病例	检出率(%)	χ^2 值	P值
0~	1 364	54	3.96	31.260	0.00
3~	1 769	76	4.30		
7~	2 198	136	6.19		
18~	6 073	208	3.42		
≥ 66	1 102	50	4.54		
合计	12 506	524	4.19		

拭子标本中,胶体金标记免疫层析法检测出甲型流感病毒17例,见表4。Real-time RT-PCR法105份阳性标本中,胶体金标记免疫层析法阳性11例,另94例未检出;而586例阴性标本中,6例胶体金标记免疫层析法阳性。与参考方法比较,胶体金标记免疫层析法灵敏度为10.48%,特异度为98.98%,阳性预测值为64.71%,阴性预测值为86.05%,符合率85.53%,尤登指数0.095,一致性 Kappa 值0.144($P < 0.01$)。

表4 Real-time RT-PCR 和胶体金标记免疫层析法结果

Table 4 Results of Real-time RT-PCR and colloidal gold labeled immunochromatography

诊断结果	Real-time RT-PCR 法			
	阳性	阴性	总数	
胶体金标记免疫层析法	阳性	11	6	17
	阴性	94	580	674
总数	105	586	691	

3 讨论

甲型流感病毒经常发生抗原转变及抗原漂移,其抗原变异直接导致人类特异性免疫失效,是引起流感世界大流行爆发的主要病原体。因此,甲型流感病毒的研究受到更多关注。该院地处广州市区,2018年8月至2019年7月甲型流感病毒病原学监测结果显示,甲型流感检出主要集中在1月到7月,最高峰在1月,其他月份以散发为主。这与北方地区多为冬季流行有所不同^[5],与广东省流感的流行特征相似^[6-8],且与我国南方地区春夏季是流感病毒主要流行季节的观点一致^[9]。由于该段时间广州的天气特征是温暖多雨,多雾霾,温差大,空气流动性差,与国内其他省市流行特征不尽相同^[10]。但本研究中甲型流感病毒的总体阳性率及峰值阳性率均低于世界卫生组织(WHO)发布的2018~2019年冬春季全球流感流行病学报告数据^[11],可能与采用的检测方法有关。

大量研究显示,年龄影响流感病毒的表达,但研究结果尚无统一定论。蒋小仙^[11]等发现25~60岁青壮年为流感高发人群,而葛爱华^[12]等则报道5~14岁学龄儿童ILI阳性率更高。本调查发现,7~17岁的学龄儿童及少年阳性率最高,其次是66岁以上老年人及3~6岁学龄前儿童。分析原因可能是学龄前儿童、学龄儿童和青少年以集体活动为主,且自我保护意识较差,一旦有流行病毒入侵,容易造成大规模的流行;而66岁以上老年人的阳性率仅次于7~17岁的学龄儿童及青少年,与国内外的研究报道^[13-14]不一致,这可能与该院接收的该年龄阶段人群多为急重症患者,常合并基础疾病,免疫力低下有关。

目前用于流感病毒的检测技术主要包括病毒分离培养法、免疫荧光技术、酶联免疫测定法、胶体金免疫层析技术、RT-PCR等。本研究采用临床上常用的两种方法(Real-time RT-PCR法和胶体金标记免疫层析法)进行甲型流感病毒检测,与参考方法比较,胶体金标记免疫层析法的灵敏度较差,漏检率高达89.52%,且存在假阳性,两种方法一致性较差。可能原因有:①流感病毒HA和NA核酸序列易发生变异引起病毒抗原漂移,导致抗原检测出现假阴性结果^[15];②胶体金标记免疫层析法的灵敏度受拭子材料、患者年龄、病程、呼吸道标本种类等影响^[16];③由于采样或实验操作导致的污染可造成胶体金标记免疫层析法假阳性;④试剂与不同的病毒、细菌及真菌可能存在交叉反应影响导致假阳性;⑤胶体金标记免疫层析法结果判读具有一定的主观性。Real-time RT-PCR检测技术通过保守区域序列扩增来实现病毒核酸的检测,具有灵敏度高、特异性强、自动化程度高和大大降低污染可能性等特点,优于胶体金标记免疫层析法^[15]。但Real-time RT-PCR检测成本较高,操作人员需要特殊培训上岗,且出于节约人力物力成本等考虑,临床实验室经常批量检测,周转时间延长,导致Real-time RT-PCR法较难常规开展。本研究中12 506例ILI使用Real-time RT-PCR法检测的比例仅为6.81%,这也正是导致总体阳性率偏低的原因。因此,临床上应该更加重视病原学的核酸检测,同时不断提高包括胶体金法在内的快速法的灵敏度和特异度,为临床流感患者提供

更加快速、准确的诊断辅助措施。

参考文献

- [1] 郭倩,陈涛. 2018~2019年冬春季全球流感流行情况[J]. 热带病与寄生虫学, 2019, 17(1):1-4+13.
- [2] 国家卫生及计划生育委员会. 全国流感监测方案(2017年版)[Z]. 2017-03-30.
- [3] 广东省卫生和计划生育委员会. 广东省流感监测方案(2017年版)[DB/OL]. (2017-05-31)[2018-06-10]. http://zwgk.gd.gov.cn/006940132/201706/t20170601_707611.html.
- [4] 国家卫生和计划生育委员会. 流行性感治疗方案(2018年版)[J]. 中国病毒病杂志, 2018, 8(2): 81-85.
- [5] 史伟,马萍,张蕾,等. 陕西省2017-2018年冬季流感流行特征[J/OL]. 西安交通大学学报(医学版):1-5(2019-12-02)[2019-12-16]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1399.R.20191129.1554.009.html>.
- [6] 康敏,谭小华,杨宇威,等. 广东省2017-2018年冬季流感流行特征研究[J]. 中华流行病学杂志, 2018, 39(8):1071-1076.
- [7] 苏雪鑫,谢璧珠,陈爱苗,等. 潮州市哨点医院2009-2014年流感监测分析[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2015, 38(4): 253-256.
- [8] 苏雪鑫,谢璧珠,陈爱苗,等. 2013年广东省潮州市流行性感流行特征分析[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2014, 34(6): 394-397.
- [9] 陈涛,杨静,汪立杰,等. 2015年中国大陆流行性感流行特征分析[J]. 热带病与寄生虫学, 2016, 14(1): 3-5.
- [10] 康燕,李晓宁,陆剑云,等. 2010-2014年广州市气象因子与流感发病关联的时间序列研究[J]. 中国病毒病杂志, 2016(4):294-299.
- [11] 蒋小仙,李均,罗琴,等. 2326例流感样病例流感病毒检测结果分析[J]. 浙江预防医学, 2016, 28(1): 63-64.
- [12] 葛爱华,许可,鲍倡俊,等. 流感样病例和核酸检测阳性率相关性分析[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2013, 33(12): 1813-1816.
- [13] Rabarison JH, Tempia S, Harimanana A, et al. Burden and Epidemiology of Influenza- and Respiratory Syncytial Virus-Associated Severe Acute Respiratory Illness Hospitalization in Madagascar, 2011-2016[J]. Influenza Other Respir Viruses, 2019, 13(2):138-147.
- [14] Zhang CQ, Zhang R, Chung PK, et al. Promoting influenza prevention for elderly people in Hong Kong using health action process approach: study protocol[J]. BMC Public Health, 2018, 18(1):1230.
- [15] Zhuo Z, Wang J, Chen W, et al. A Rapid On-Site Assay for the Detection of Influenza A by Capillary Convective PCR [J]. Mol Diagn Ther, 2018, 22(2):225-234.
- [16] Chartrand C, Leeftang MM, Minion J, et al. Accuracy of Rapid Influenza Diagnostic Tests[J]. Ann Intern Med, 2012, 156(7):500-511.

COPD并发感染患者PSGL-1、IL-6、膜联蛋白A1的临床价值研究

李国干^{1*} 程宏宁² 周安燕² 林良奋¹

[摘要] 目的 探讨慢性阻塞性肺病(COPD)并发感染患者血清中白介素-6(IL-6)、外周血中性粒细胞表面P-选择素糖蛋白配体1(PSGL-1)、及外周血单个核细胞中膜联蛋白A1的临床价值。方法 选取2018年6月至2020年11月在定安县人民医院呼吸内科治疗的COPD患者84例,COPD并发感染患者85例,同时选取83例健康体检者作为对照组。检测三组患者血清中IL-6水平,中性粒细胞表面PSGL-1表达,同时检测膜联蛋白A1 mRNA及蛋白水平。结果 COPD并发感染组血清中IL-6水平明显高于COPD组和对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);COPD并发感染组中性粒细胞表面PSGL-1表达较COPD组和对照组高,差异有统计学意义($P<0.05$);COPD并发感染组患者外周血单个核细胞中膜联蛋白A1 mRNA及蛋白均较COPD组和对照组高,差异有统计学意义($P<0.05$);COPD合并感染组死亡患者血清IL-6、PSGL-1、膜联蛋白A1 mRNA相对表达量和膜联蛋白A1蛋白相对表达量明显高于存活患者,差异有统计学意义($P<0.05$)。ROC分析显示:外周血膜联蛋白A1 mRNA、蛋白水平和IL-6、PSGL-1及其联合应用对COPD合并感染患者预后有一定的评估价值($P<0.05$)。结论 COPD并发感染患者血清中IL-6明显升高,中性粒细胞表面PSGL-1表达增加,外周血单个核细胞中膜联蛋白A1 mRNA及蛋白表达水平明显升高,有利于对COPD并发感染患者的预后做出评估。

[关键词] 慢性阻塞性肺病;P-选择素糖蛋白配体1;白介素-6;膜联蛋白A1

Clinical Value of PSGL-1, IL-6 and Annexin A1 in Patients with COPD Complicated infection

LI Guogan^{1*}, CHENG Hongning², ZHOU Anyan², LIN Liangfen¹

(1. Department of Respiratory Medicine, People's Hospital of Ding'an, Ding'an, Hainan, China, 571200;

2. Department of Respiratory Medicine, Hainan people's Hospital, Haikou, Hainan, China, 570311)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the clinical value of serum interleukin-6 (IL-6), P-selectin glycoprotein ligand - 1 (PSGL - 1) on peripheral blood neutrophils and annexin A1 in peripheral blood mononuclear cells in patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) complicated by infection. **Methods** From June 2018 to November 2020, 84 COPD patients without infection and 85 COPD patients complicated by infection treated in our hospital were selected. At the same time, 83 healthy people were selected as the control group. Serum IL-6 level, PSGL-1 expression on neutrophil surface were detected, and annexin A1 gene and protein levels were detected. **Results** The level of serum IL-6 in the COPD complicated with infection group was significantly higher than that in the COPD group and the control group ($P<0.05$). The expression of PSGL-1 on the surface of neutrophils in COPD complicated with infection group was higher than that in the COPD group and the control group ($P<0.05$). The levels of annexin A mRNA and protein in peripheral blood mononuclear cells of COPD complicated with infection group were higher than those of the

基金项目:海南自然科学基金面上项目(20168340)

作者单位:1. 定安县人民医院呼吸内科,海南,定安 571200

2. 海南省人民医院(海南医学院附属海南医院)呼吸内科,海南,海口 570311

*通信作者:李国干, E-mail:liguogan0038@163.com

COPD group and the control group ($P<0.05$). The relative expression levels of IL-6, PSG-1, annexin A1 mRNA and Annexin A1 protein in the dead patients with COPD complicated with infection were significantly higher than those in the survival patients ($P<0.05$). ROC analysis showed that the AUC (0.95ci) of annexin A1 mRNA and protein levels in peripheral blood, IL-6($P<0.05$). **Conclusion** The level of IL-6 in serum, PSGL-1 expression on the surface of neutrophils and annexin A1 mRNA and protein expression in peripheral blood mononuclear cells were significantly increased in COPD patients complicated with infection, which is beneficial to evaluate the prognosis of COPD patients complicated with infection.

[KEY WORDS] Chronic obstructive pulmonary disease; P-selectin glycoprotein ligand 1; Interleukin-6; Annexin A1

流行病学研究表明,慢性阻塞性肺病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)并发感染的发病率可超过697/1万人左右^[1]。临床上COPD合并感染的发生,能够导致患者重症肺炎、败血症或者感染性休克的发生,增加了COPD合并感染患者病死的风险^[2]。对COPD合并感染的病情评估能够为临床上相关患者的诊疗提供理论方面的参考。白介素-6(Interleukin-6, IL-6)的表达上升,能够通过诱导T淋巴细胞的功能紊乱,进而加剧肺泡上皮组织的免疫性损伤^[3];外周血中性粒细胞表面P-选择素糖蛋白配体1(P-selectinglycoproteinligand1, PSGL-1)能够提高选择素家族因子的激活程度,促进下游趋化因子的激活,最终促进其对于肺泡间质组织的浸润,促进感染性病情的进展^[4];外周血单个核细胞中膜联蛋白A1是炎症调控的相关因子,对于下游中性粒细胞或者单核细胞的募集程度具体提高作用,最终促进感染的发生^[5]。为了揭示PSGL-1、IL-6、膜联蛋白A1的表达与COPD合并感染的病情的相关性,以期为临床诊疗提供参考依据,本文探讨了PSGL-1、IL-6、膜联蛋白A1的表情况,进行如下报道。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取2018年6月至2020年11月期间在定安县人民医院呼吸内科治疗的COPD患者84例及COPD并发感染患者85例,同时将83例健康体检者作为对照组。纳入标准:①所有入组患者均符合COPD稳定期的诊断标准^[6]。②受试者及其家属知情并同意。排除标准:①合并有其他严重性疾病;②排除2周内应用过抗生素者。3组受试者一般资料比较差异无统计学意义($P>0.05$)。见表1。

1.2 实验方法

采用淋巴细胞分离液体进行外周血的分离,

表1 3组受试者一般资料比较($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Comparison of general data of three groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	男/女	年龄(岁)
对照组	83	49/34	64.58±9.23
COPD组	84	44/40	63.74±9.96
COPD并发感染组	85	46/39	63.97±9.53
χ^2/F 值		0.804	0.301
P值		0.669	0.740

去除外周血单个核细胞(Peripheral blood mononuclear cell, PBMC)血浆,PBS重新悬浮后取取白细胞层于离心管中,1 000 r/min离心15 min,加入红细胞膜裂解液,室温下放置20 min,1 000 r/min离心15 min,去除上清液体,PBS洗涤2次,加入100 μ L生理盐水预混,准备进行PSG-1检测;取患者肘部静脉血5 mL自然放置,然后测试IL-6水平。将上述搜集的液体加入96孔的酶标板中,采用ELISA法进行PSG-1及IL-6的检测。

抽取受检者的肘部静脉血并离心取上层液体,使用由北京奥维亚生物公司生产的试剂盒对其进行RNA的提取,逆转录成cDNA后进行基因的扩增;基因的合成和引物设计使用primer 5软件,其中GADPH是内参,膜联蛋白A1引物5' CAAGGACCAACTACAACC 3';下游5' TGCCTC TTCTTTAATTG3',经历45个循环后进行曲线溶解,每个孔设置3个复孔,取其平均值。抽取受检者的肘部静脉血并离心取上层液体,使用由贝克曼库尔特公司生产的UniCel DxI 800免疫发光仪器对膜联蛋白进行检测,配套试剂盒由北京九强生物公司生产。

1.3 统计学方法

使用SPSS 23.0进行数据统计分析。计量资料以($\bar{x}\pm s$)描述,多组间的比较为单因素方差分析,两两比较t检验。计数资料以n(%)描述,行 χ^2 检验。有关指标对生存预后的评估价值分析ROC。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3组患者血清中IL-6水平比较

COPD并发感染组血清IL-6、PSG-1、膜联蛋白

A1 mRNA和膜联蛋白A1水平明显高于COPD组和对照组, COPD组血清IL-6、PSG-1、膜联蛋白A1 mRNA和蛋白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 3组血清IL-6水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of serum IL-6 levels among 3 groups ($\bar{x} \pm s$)

	<i>n</i>	IL-6(ng/L)	PSG-1	膜联蛋白A1 mRNA 相对表达量	膜联蛋白A1 蛋白相对表达量
对照组	83	10.84±1.79	437.21±19.83	1.15±0.53	0.74±0.06
COPD组	84	101.70±20.42 ^a	513.87±21.37 ^a	1.35±0.78 ^a	0.81±0.12 ^a
COPD并发感染组	85	132.85±27.54 ^{ab}	532.69±24.71 ^{ab}	2.87±1.23 ^{ab}	1.57±0.64 ^{ab}
<i>F</i> 值		847.958	442.592	94.604	118.923
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000	0.000

注: 与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与COPD组比较, ^b $P < 0.05$ 。

2.2 COPD合并感染不同预后患者IL-6、PSG-1等水平比较

COPD合并感染组死亡患者血清IL-6、PSG-1、膜联蛋白A1 mRNA相对表达量和膜联蛋白A1蛋白相对表达量明显高于存活患者($P < 0.05$)。见表3。

表3 COPD合并感染不同预后患者IL-6、PSG-1等水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of IL-6 and PSG-1 levels in COPD patients with different prognosis ($\bar{x} \pm s$)

预后	<i>n</i>	IL-6(ng/L)	PSG-1	膜联蛋白A1 mRNA 相对表达量	膜联蛋白A1 蛋白相对表达量
死亡	15	150.02±23.33	550.03±21.13	2.91±0.92	1.71±0.42
存活	70	120.02±21.12	520.03±20.01	2.42±0.82	1.40±0.30
<i>t</i> 值	70	4.902	5.219	2.056	3.369
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.043	0.001

2.3 A1 mRNA、蛋白水平和IL-6、PSG-1等4指标对COPD合并感染患者不同预后的评估价值

以死亡组为阳性样本, 以存活组为阴性样本, 建立ROC曲线诊断分析模型, 结果显示: 联合应用对COPD合并感染患者不同预后的评估价值明显高于各指标单独应用, AUC(0.95CI)为0.845(0.733~0.951), 准确度为0.847(72/85)($P < 0.05$)。见表4、图1。

表4 A1 mRNA、蛋白水平和IL-6、PSG-1等4指标对COPD合并感染患者不同预后的评估价值

Table 4 the value of A1 mRNA and protein levels, IL-6, PSG-1 and other four indicators in evaluating different prognosis of COPD patients with infection

指标	AUC	0.95CI	阈值	灵敏度	特异度	约登指数	准确度(%)
膜联蛋白A1 mRNA	0.721	0.497~0.947	2.7	0.733	0.700	0.433	70.6
膜联蛋白A1 蛋白表达	0.741	0.499~0.985	1.53	0.733	0.757	0.490	75.3
IL-6	0.733	0.507~0.959	134 ng/L	0.733	0.757	0.490	75.3
PSG-1	0.706	0.468~0.937	530	0.667	0.714	0.381	70.6
联合应用	0.845	0.733~0.951		0.867	0.843	0.710	84.7

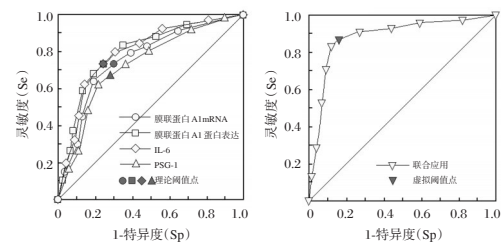


图1 ROC曲线图

Figure 1 ROC curve

3 讨论

长期的支气管哮喘、慢性支气管炎, 均能够促进COPD的发生, 在合并有基础性的糖尿病或者其他代谢性疾病的患者中, COPD合并感染的发生率可进一步的上升^[7]。临床上COPD合并感染的发生, 能够导致患者多器官功能衰竭的发生, 增加了COPD患者致残或者病死的风险^[8]。现阶段缺乏对于COPD合并感染患者病情评估的血清学指标, 虽然降钙素原能够在COPD合并感染的诊疗过程中发挥作用。但部分研究发现, 采用降钙素原评估COPD合并感染患者病情的灵敏度较低, 其评估患者病情的灵敏度不足35%, 评估的假阳性率较低^[9]。

PSGL-1 是中性粒细胞调控相关因子,其能够通过募集下游中性粒细胞酶,促进下游趋化因子的释放,最终促进炎症反应的播散;IL-6 是炎症性相关因子,其不仅能够参与到炎症反应过程中,同时 IL-6 还能够诱导 T 淋巴细胞的功能紊乱,加剧自然杀伤性 T 淋巴细胞的毒性作用。基础方面的研究还显示,IL-6 的上升能够导致肺泡血管内皮细胞的损伤,增加了炎症因子的扩散风险;膜联蛋白 A1 是炎症调控因子,其对于下游粘附素的激活,能够提高膜蛋白的结合程度,提高相关炎症性因子对于肺泡上皮细胞的粘附和损伤程度。有研究者在对 IL-6 的表达与 COPD 患者的病情关系的研究中发现,合并感染的 COPD 患者中,IL-6 的表达显著上升^[10]。

本文结果提示了 PSGL-1、IL-6、膜联蛋白 A1 的高表达均能够影响到 COPD 患者感染的病情进展。就其原因,是由于 PSGL-1、IL-6、膜联蛋白 A1 的下列方面的病理性损害有关^[11]:①PSGL-1 的上升,能够提高下游炎症性信号通路 NF-KB 的激活程度,促进肺泡支气管平滑肌细胞的炎症性浸润,最终促进支气管的痉挛和狭窄;②IL-6 的表达上升,能够提高巨噬细胞的激活程度,促进其对于肺泡间质或者上皮细胞的损伤;③膜联蛋白 A1 能够降低膜结合蛋白酶的稳定性,导致其对于肺泡上皮细胞膜溶解程度的增加。任芳等^[12]研究者也指出,合并感染的 COPD 患者中,IL-6 的表达浓度会平均上升 30% 以上,且在重症感染或者合并有其他组织器官感染的患者中,IL-6 的表达浓度可进一步的上升。对于膜联蛋白 A1 mRNA 的表达与 COPD 患者临床预后的关系分析也可见,在临床预后较差的患者中,膜联蛋白 A1 mRNA 的表达浓度可进一步的上升,提示了相关指标与 COPD 患者临床转归的关系^[13-14]。而进一步的 ROC 分析,则显示这些指标预测 COPD 患者临床转归/预后,均有比较好的应用价值,其 AUC,无论是多个指标的联合应用,还是各个指标的单独应用,都大于 0.7。

综上所述,在合并感染的 COPD 患者中,PSGL-1、IL-6、膜联蛋白 A1 及 mRNA 均显著上升,同时 PSGL-1、IL-6、膜联蛋白 A1 及 mRNA 与 COPD 患者的临床预后密切相关。临床上可以通过检测 PSGL-1、IL-6、膜联蛋白 A1 及 mRNA,进而预测 COPD 患者的临床转归情况。

参考文献

- [1] Chan K, Ng KT, Pang YK, et al. Genome Anatomy of *Streptococcus parasanguinis* Strain CIA, Isolated from a Patient with Acute Exacerbation of Chronic Obstructive Pulmonary Disease, Reveals Unusual Genomic Features [J]. *Genome Announcem*, 2015, 3(3):90-92.
- [2] Dretzke J, Blissett D, Dave C, et al. The cost-effectiveness of domiciliary non-invasive ventilation in patients with end-stage chronic obstructive pulmonary disease: a systematic review and economic evaluation [J]. *Health Technol Assessm*, 2015, 19(81):241-246.
- [3] 林燕林,张星星,高志凌,等.清热化痰法联合亚胺培南-西司他丁钠对重症肺部感染患者 IL-6、TNF- α 水平的影响 [J]. *陕西中医*, 2020, 41(7):891-893.
- [4] 蔡颖,李一鸣,陈红栓,等.慢性阻塞性肺疾病大鼠模型气道弹性及炎症因子改变 [J]. *中华临床医师杂志(电子版)*, 2016, 10(22):3390-3395.
- [5] 陈建康,严瑜,潘晓莉,等.膜联蛋白 A1 对糖尿病大鼠心功能及炎症反应的影响 [J]. *中国医科大学学报*, 2017, 46(6):532-535.
- [6] 机构地区中华医学会呼吸病学分会慢性阻塞性肺疾病学组.慢性阻塞性肺疾病诊治指南(2013 年修订版) [J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2013, 36(4):255-264.
- [7] 李秋莉.乌苯美司胶囊对 COPD 急性加重期患者气道炎症、免疫失衡和肺功能的影响 [J]. *湖南师范大学学报(医学版)*, 2017, 14(6):186-189.
- [8] 李富寿,李沛繁. COPD 患者相关炎症因子水平与其病情严重程度的相关性研究 [J]. *中南医学科学杂志*, 2020, 48(5):487-489+504.
- [9] 黄志卫,陆玲. HNL、PCT、CRP 及膜联蛋白 A1 对 COPD 合并呼吸系统感染的诊断价值 [J]. *山东医药*, 2017, 57(6):51-53.
- [10] 胡孝群,吴艳丽,吕雪英.慢性阻塞性肺病急性加重期患者营养不良与甲状腺素、炎症因子、脂联素的关系研究 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2017, 27(07):989-991.
- [11] 张运涛,程宏宁,符谄慧,等.慢性阻塞性肺病患者外周血炎症因子及细胞外基质蛋白水平的变化 [J]. *中国老年学杂志*, 2018, 38(21):5220-5222.
- [12] 任芳,郝同琴,牛丽丹,等. COPD 性高血压患者肾素-血管紧张素-醛固酮水平的临床研究 [J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2020, 12(12):1648-1651, 1656.
- [13] Mark Greer, Tobias Welte. Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Lung Transplantation [J]. *Semin respirat critic care Med*, 2020, 41(6):862-873.
- [14] Juan Marco, Figueira Gonçalves, Miguel Ángel, García Bello, Rafael, Golpe, Juan Luis, Alonso Jerez, Ignacio, García-Talavera. Impact of diabetes mellitus on the risk of severe exacerbation in patients with chronic obstructive pulmonary disease [J]. *clin Resp J*, 2020, 14(12):1208-1211.

不同透析方式对MHD患者尿毒症毒素清除、炎症因子和氧化应激状态的影响

刘绍芳* 李金香 陈海燕 赵玉 朱爱华

[摘要] 目的 探究不同透析方式对维持性血液透析(MHD)患者尿毒症毒素清除、炎症因子和氧化应激状态的影响。方法 选取本院2017年4月至2018年5月100例进行MHD的尿毒症患者为对象,随机分为2组,分别为低通量透析组和高通量透析组,每组各50例,分别应用低通量透析膜以及高通量透析膜血液透析。比较2组患者透析效果、治疗前后血液毒素指标、炎症因子和氧化应激指标变化。结果 低通量透析组、高通量透析组透析总有效率分别为78.00%、94.00%,高通量透析组透析总有效率显著高于低通量透析组($P<0.05$);2组患者治疗后Scr、BUN、P等毒素指标水平较治疗前显著下降($P<0.05$),治疗后高通量透析组患者 β_2 -MG水平显著低于治疗前($P<0.05$),而低通量透析组患者 β_2 -MG水平治疗前后差异无统计学意义($P>0.05$),治疗后高通量透析组毒素指标水平显著低于低通量透析组($P<0.05$);高通量透析组患者治疗后TNF- α 、CRP和IL-6等炎症因子水平和SOD、T-AOC和GSH-PX等氧化应激指标较治疗前显著升高($P<0.05$),低通量透析组治疗前后炎症因子和氧化应激指标水平差异无统计学意义($P>0.05$),高通量透析组炎症因子和氧化应激指标水平高于低通量透析组,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 尿毒症患者MHD时使用高通量透析方式效果优于低通量透析,其对患者血液毒素清除,炎症因子降低和氧化应激状态改善更为显著。

[关键词] 维持性血液透析;尿毒症;毒素清除;炎症因子;氧化应激

Effects of different dialysis methods on uremic toxin clearance, inflammatory factors and oxidative stress in patients undergoing MHD

LIU Shaofang*, LI Jinxiang, CHEN Haiyan, ZHAO Yu, ZHU Aihua

(Department of Emergency, Tangshan People's Hospital, Tangshan, Hebei, China, 063001)

[ABSTRACT] **Objective** To explore effects of different dialysis methods on uremic toxin clearance, inflammatory factors and oxidative stress in patients undergoing maintenance hemodialysis (MHD). **Methods** A total of 100 patients with uremia who underwent MHD in the hospital from April 2017 to May 2018 were enrolled. They were randomly divided into 2 groups (low-flux dialysis group and high-flux dialysis group), 50 cases in each group. The two groups were treated with low-flux dialysis membranes and high-flux dialysis membrane for hemodialysis, respectively. The dialysis effect, blood toxin indexes, inflammatory factors and changes of oxidative stress indexes before and after treatment were compared between the two groups. **Results** The total response rate of dialysis in high-flux dialysis group was significantly higher than that in low-flux dialysis group (94.00% vs 78.00%) ($P<0.05$). The levels of toxins indexes such as Scr, BUN and P were significantly decreased in both groups after treatment ($P<0.05$). The level of β_2 -MG in the high-flux dialysis group after treatment was significantly lower than that before treatment ($P<0.05$). The difference was not statistically significant in β_2 -MG level of the low-flux dialysis group before and after treatment ($P>0.05$). The levels of toxin indexes in the high-flux dialysis group were significantly lower than those in the low-flux dialysis group after treatment ($P<0.05$). The levels of inflammatory factors such as TNF- α , CRP and IL-6, and the

基金项目:唐山市科学技术研究与发展指导计划(101302113C)

作者单位:唐山市人民医院急诊科,河北,唐山 063001

*通信作者:刘绍芳, E-mail: nzffdp@sina.com

oxidative stress indexes such as SOD, T-AOC and GSH-PX in high-flux dialysis group were significantly increased after treatment ($P<0.05$). The difference was not statistically significant in the inflammatory factors or levels of oxidative stress indexes in the low-flux dialysis group before and after treatment ($P>0.05$). The inflammatory factors and levels of oxidative stress indexes in the high-flux dialysis group were higher than those in the low-flux dialysis group ($P<0.05$). **Conclusion** The effect of high-flux dialysis is better than that of low-flux dialysis for patients with uremia undergoing MHD, which is more effective in blood toxin clearance, decreasing inflammatory factors and improving oxidative stress status.

[KEY WORDS] Maintenance hemodialysis; Uremia; Toxin clearance; Inflammatory factor; Oxidative stress

维持性血液透析(maintenance hemodialysis, MHD)为尿毒症患者临床常用治疗方式,能够有效纠正患者代谢紊乱、水钠潴留以及酸碱水平失衡等状态,改善患者生存质量^[1]。血液净化技术逐渐完善使尿毒症患者MHD效果进一步改善。但是仍有研究显示尿毒症患者MHD时体内所处微炎症容易导致患者出现营养不良、淀粉样病变以及心血管疾病等一系列并发症^[2]。改善MHD患者预后重点即在于改善患者体内微炎症状态,达到降低相关并发症发生率目的。患者在接受MHD,透析膜性质如透析膜透析效率以及膜生物不相容性质均会影响患者毒素清除、炎症因子以及氧化应激指标水平变化,所以透析膜选取对于患者MHD透析效果提高意义重大^[3-4]。本研究比较2种方式对患者体内微炎症状态影响,为后期患者MHD透析膜选取提供相关依据。报告如下。

1 资料和方法

1.1 一般资料

选取2017年4月至2018年5月100例在本院进行MHD尿毒症患者为对象。纳入标准:①尿毒症病情诊断依据相关标准^[5];②患者接受MHD时间超过3个月且病情稳定;③患者日排尿量超过400 mL;④本研究获取患者知情同意以及本院医学伦理会批准。排除标准:①患者肝功能损伤严重;②并发活动性风湿;③并发感染性疾病;④近半年有较为严重外伤史;⑤并发免疫缺陷综合征或者肿瘤。将患者随机分为低通量透析组以及高通量透析组,每组各50例,患者分别应用低通量透析膜以及高通量透析膜血液透析。两组患者一般资料之间比较差异无统计学意义($P>0.05$)。见表1。

1.2 仪器/试剂

4008B血液透析机购自德国费森尤斯公司,7170全自动生化仪购自美国HITACHI公司,F6和F60型聚砜膜中空纤维透析器购自德国费森尤斯

表1 两组患者一般资料比较($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Comparison on general data between the 2 groups ($\bar{x}\pm s$)

项目	低通量透析组 (n=50)	高通量透析组 (n=50)	χ^2/t 值	P值
性别(男/女)	24/26	22/28	0.161	0.688
年龄(岁)	47.33±5.24	47.18±5.33	0.142	0.887
疾病类型				
糖尿病肾病	12(24.00)	10(20.00)		
慢性肾小球性肾炎	10(20.00)	12(24.00)		
慢性肾盂性肾炎	8(16.00)	8(16.00)	0.161	0.977
慢性间质性肾炎	9(18.00)	10(20.00)		
肾小球动脉硬化	11(22.00)	10(20.00)		
病程(年)	4.34±1.21	4.54±1.15	0.847	0.399
透析时间(月)	15.24±2.53	15.22±2.46	0.040	0.968

公司,炎症因子和氧化应激指标测定试剂盒均购自深圳子科生物科技有限公司。

1.3 方法

患者透析液选取碳酸氢盐,透析液流量设定为500 mL/min,血管通路选取动静脉内瘘,血流设定为200~250 mL/min,并选择肝素进行抗凝。低通量透析组患者使用低通量透析膜血液透析,患者选取超滤系数为5.5 mL/(mmHg·h·m²),膜面积为1.3 m²,型号为F6型聚砜膜中空纤维透析器进行透析。高通量透析组患者使用高通量透析膜血液透析,患者选取超滤系数为40 mL/(mmHg·h·m²),膜面积为1.3 m²,型号为F60型聚砜膜中空纤维透析器进行透析。低通量透析和高通量透析每周3次,每次透析时间为4 h,治疗周期为7个月。

1.4 观察指标

比较2组患者透析效果,治疗前后血液毒素指标,炎症因子和氧化应激指标变化。透析前后取患者空腹外周静脉血4 mL,离心后取上清。①血液毒素指标:使用全自动生化仪分析血肌酐(serum creatinine, Scr)、 β_2 微球蛋白(β_2 -microglobulin, β_2 -MG)、尿素氮(urea nitrogen, BUN)、血磷

(serium inorganic phosphorus, P)水平。②炎症因子:酶联免疫吸附法检测肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、C反应蛋白(C reactive protein, CRP)以及白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)变化。③氧化应激指标:免疫透射比浊法检测超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、总抗氧化能力(total antioxidant capacity, T-AOC)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-PX)水平。

1.5 评价标准^[6]

透析效果评价:治疗后通过患者血液中Scr、BUN、P等毒素成分下降来评价患者透析效果。显效:患者血液中Scr、BUN、P等毒素水平下降至正常范围;有效:患者血液中Scr、BUN、P等毒素水平明显下降,但还未到正常范围;无效:患者血液中Scr、BUN、P等毒素水平下降幅度不显著或者其水平增加。总有效率=显效率+有效率。

1.6 统计学方法

应用SPSS 20.0软件包进行数据处理,计数资料用 $n(\%)$ 描述,使用 χ^2 检验;计量资料用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,用 t 检验进行, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者透析效果比较

高通量透析组透析总有效率高于低通量透析组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表2。

表2 两组患者透析效果比较 [$n(\%)$]

Table 2 Comparison of dialysis effects of patients between the 2 groups [$n(\%)$]

组别	例数	显效	有效	无效	总有效率
低通量透析组	50	17(34.00)	22(44.00)	11(22.00)	39(78.00)
高通量透析组	50	27(54.00)	20(40.00)	3(6.00)	47(94.00)
χ^2 值					4.07
P 值					0.044

表3 两组患者治疗前后毒素情况比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of toxins before and after treatment between the 2 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	时间	Scr($\mu\text{mol/L}$)	β_2 -MG(mg/L)	BUN(mmol/L)	P(mmol/L)
低通量透析组	50	治疗前	927.59 \pm 104.41	25.81 \pm 3.62	27.32 \pm 4.53	2.41 \pm 0.89
		治疗后	862.64 \pm 85.53	24.85 \pm 2.53	24.52 \pm 4.71	2.05 \pm 0.53
		t 值	4.836	2.667	4.285	3.585
P 值		0.001	0.066	0.000	0.001	
高通量透析组	50	治疗前	925.49 \pm 100.33	25.74 \pm 3.56	27.41 \pm 4.49	2.43 \pm 0.86
		治疗后	814.21 \pm 67.35 ^a	19.74 \pm 4.21 ^a	20.16 \pm 3.95 ^a	1.96 \pm 0.49 ^a
		t 值	9.385	10.921	12.148	4.924
P 值		0.000	0.000	0.000	0.000	

注:与低通量透析组比较,^a $P < 0.05$ 。

2.2 两组患者治疗前后毒素情况比较

两组患者治疗后Scr、BUN、P等毒素指标水平较治疗前显著下降($P < 0.05$),治疗后高通量透析组患者 β_2 -MG水平显著低于治疗前($P < 0.05$),而低通量透析组患者 β_2 -MG水平治疗前后差异无统计学意义($P > 0.05$),高通量透析组毒素指标水平低于低通量透析组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表3。

2.3 两组患者治疗前后炎症因子比较

高通量透析组患者治疗后TNF- α 、CRP和IL-6等炎症因子水平较治疗前显著下降($P < 0.05$),低通量透析组治疗前后炎症因子水平差异无统计学意义($P > 0.05$),高通量透析组炎症因子水平低于低通量透析组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表4。

表4 两组患者治疗前后炎症因子比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Comparison of inflammatory factors before and after treatment between the 2 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	时间	TNF- α (ng/L)	CRP(mg/L)	IL-6($\mu\text{g/L}$)
低通量透析组	50	治疗前	49.33 \pm 5.32	8.64 \pm 1.51	20.69 \pm 2.41
		治疗后	50.32 \pm 4.69	9.02 \pm 1.65	21.36 \pm 3.96
		t 值	-1.398	-1.701	-1.487
P 值		0.165	0.092	0.140	
高通量透析组	50	治疗前	49.36 \pm 5.41	8.32 \pm 1.21	20.56 \pm 2.34
		治疗后	42.74 \pm 4.81 ^a	7.15 \pm 1.03 ^a	15.63 \pm 2.71 ^a
		t 值	9.161	7.387	13.806
P 值		0.000	0.000	0.000	

注:与低通量透析组比较,^a $P < 0.05$ 。

2.4 两组患者治疗前后氧化应激指标变化比较

高通量透析组患者治疗后SOD、T-AOC和GSH-PX等氧化应激指标较治疗前显著上升($P < 0.05$),低通量透析组治疗前后氧化应激指标差异无统计学意义($P > 0.05$),治疗后高通量透析组氧化应激指标高于低通量透析组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表5。

表5 两组患者治疗前后氧化应激指标变化比较 ($\bar{x} \pm s$)Table 5 Comparison of oxidative stress indexes changes before and after treatment between the 2 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	低通量透析组 (n=50)		t 值	P 值	高通量透析组 (n=50)		t 值	P 值
	治疗前	治疗后			治疗前	治疗后		
SOD ($\mu\text{U/L}$)	49.52 \pm 4.67	48.55 \pm 3.81	1.618	0.109	49.31 \pm 4.71	57.32 \pm 5.69 ^a	-10.892	0.000
T-AOC (U/mL)	25.46 \pm 3.24	24.69 \pm 2.74	1.821	0.072	25.35 \pm 3.41	29.65 \pm 4.27 ^a	-7.918	0.000
GSH-PX (U/L)	194.82 \pm 31.51	189.54 \pm 24.39	1.341	0.183	197.69 \pm 36.33	237.51 \pm 40.22 ^a	-7.356	0.000

注:与低通量透析组比较,^aP<0.05。

3 讨论

尿毒症患者因为肾功能受损导致患者血液中P、BUN、Scr等小分子毒素以及 β_2 -MG等中分子毒素水平急剧上升,在未经对症治疗时病情逐渐进展为尿毒症,致使患者出现代谢性中毒,威胁患者生命,患者常使用MHD进行治疗^[7-8]。本研究中治疗后高通量透析组患者 β_2 -MG水平显著低于治疗前,而低通量透析组患者 β_2 -MG水平治疗前后差异不显著,证实低通量透析方式在清除中分子量毒素上的局限性。高通量透析组毒素指标水平显著低于低通量透析组,说明高通量透析对于患者血液中毒素清除效果更佳。不同通量透析材料对毒素清除差异可能是由于低通量透析材料透析膜孔径较小导致其仅可以清除小分子毒素,而对于中分子毒素清除效果不佳,中分子毒素 β_2 -MG在体内浓度过高容易出现糖基化,致使患者关节出现病变甚至慢性疼痛等症,影响患者生活及生存质量^[9-10]。高通量透析所用透析膜孔径较大,通透性较好,可以将中分子毒素有效清除。本研究结果与李文静等^[6]研究结果透析总有效率趋势一致。

尿毒症患者进行MHD可以有效降低患者血液中毒素含量,改善患者生存质量,患者长期接受MHD时微炎症状态导致患者出现氧化应激异常,其会诱导患者出现心血管疾病以及相关淀粉样病变等并发症^[11]。患者体内氧化应激状态使其体内活性氧含量大幅增加,氧化和抗氧化状态失去平衡。马志宏等^[12]类似研究中选取丙二醛、GSH-PX以及过氧化物歧化酶作为氧化应激状态变化指标。本研究选取SOD、T-AOC和GSH-PX作为评价患者氧化应激状态。患者体内SOD、GSH-PX为抗氧化酶,SOD可以通过清除氧自由基来抑制脂质氧化介导的氧化作用,GSH-PX是重要的过氧化物分解酶,T-AOC则可以反映患者总抗氧化能力^[13]。本研究结果提示高通量透析组患者体内各种抗氧化酶和抗氧化物质合成加快或释放增多,可能是由于

患者体内毒素减少,代谢紊乱状态得以纠正。本研究结果,与肖白丽等^[14]研究结果不同,其认为低通量透析患者治疗后氧化应激水平增强。

研究显示过度氧化应激导致患者体内炎症反应被激活,从而刺激炎症因子释放,同时炎症因子又可以促进氧化应激反应发生^[15]。微炎症状态下患者体内巨噬细胞被激活,导致TNF- α 、CRP和IL-6等炎症因子释放,形成恶性循环加重患者病情^[16]。本研究中高通量透析组炎症因子水平显著低于低通量透析组。微炎症状态导致患者体内炎症因子经由激活机体免疫系统引起患者炎性细胞大量合成,促进炎症因子大量释放,高通量透析对于患者氧化应激状态改善较为显著,患者抗氧化能力有效提高,氧化应激状态的改善使炎性细胞合成和释放的炎症因子减少,患者体内炎症因子水平下调。

综上所述,尿毒症患者MHD时选取高通量透析方式进行血液净化可以有效清除患者血液中毒素,通过降低患者体内氧化应激水平来调节患者炎症反应,透析效果显著,临床应用价值较高。

参考文献

- [1] Adams SV, Rivara M, Streja E, et al. Sex differences in hospitalizations with maintenance hemodialysis [J]. J Am Soc Nephrol, 2017, 28(9):2721-2728.
- [2] Donadio C, Tognotti D, Caponi L, et al. β -trace protein is highly removed during haemodialysis with high-flux and super high-flux membranes [J]. BMC Nephrol, 2017, 18(1):68-72.
- [3] Atherton JG, Hains DS, Bissler JJ, et al. Generation, clearance, toxicity and monitoring possibilities of unaccounted uremic toxins for improved dialysis prescriptions [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2018, 315(667):890-902.
- [4] 缪世梅, 范亚平, 徐学康, 等. 维持性血液透析患者氧化应激、微炎症状态及其与透析时间的临床分析 [J]. 临床肾脏病杂志, 2016, 16(6):345-349.
- [5] Li X, Zhang J, Zhao W, et al. Effect of tongxinluo on nerve regeneration in mice with diabetic peripheral neuropathy [J]. Cellul molecuol biol, 2015, 61(5):103-107.

(下转第1664页)

良恶性肾上腺嗜铬细胞瘤 VEGF、melanA、LncRNA HOTAIR 表达差异及与患者预后的关系

吕苏一^{1*} 张磊² 李山成³

【摘要】目的 探讨良恶性肾上腺嗜铬细胞瘤(PCC)组织血管内皮生长因子(VEGF)、黑色素 A (melanA)、长链非编码 RNA(lncRNA)HOX 基因的反义基因间 RNA(LncRNA HOTAIR)表达差异及与患者预后的关系。**方法** 选取肥城查庄矿医院肾内科收治的 69 例恶性 PCC 为恶性组,33 例良性 PCC 为良性组。采集手术切除的良恶性 PCC 组织标本,比较两组 VEGF、melanA、LncRNA HOTAIR 表达,分析上述指标表达与恶性组临床病理特征的相关性,评价上述指标对良恶性肾上腺 PCC 的鉴别效能及与 1 年生存率的关系。**结果** 恶性组 VEGF、LncRNA HOTAIR 阳性表达率高于良性组,melanA 阳性表达率低于良性组,差异有统计学意义($P<0.05$);VEGF、melanA、LncRNA HOTAIR 表达与恶性组临床分期、浸润程度、淋巴结转移、分化程度存在一定相关性($P<0.05$);VEGF、melanA、LncRNA HOTAIR 联合鉴别恶性肾上腺 PCC 的曲线下面积(AUC)最大,为 0.919($P<0.05$)。VEGF、LncRNA HOTAIR 阳性表达患者 1 年生存率低于阴性表达患者,melanA 阳性表达患者 1 年生存率高于阴性表达患者($P<0.05$)。**结论** 恶性 PCC 患者 VEGF、LncRNA HOTAIR 表达升高,melanA 表达下降,三者联合检测可作为 PCC 良性与恶性鉴别及预后预测的潜在指标。

【关键词】 肾上腺嗜铬细胞瘤;血管内皮生长因子;黑色素 A;长链非编码 RNA HOX 基因的反义基因间 RNA

Differential expression of VEGF, melanA and lncRNA HOTAIR in benign and malignant adrenal pheochromocytoma and their relationship with prognosis

LV Suyi^{1*}, ZHANG Lei², LI Shancheng³

(1. Department of Nephrology, Feicheng Chazhuang Mine Hospital, Tai'an, Shandong, China, 271619; 2. Department of Intelligent Medicine, Shandong Provincial Third Hospital, Jinan, Shandong, China, 250031; 3. Department of Minimally Invasive Oncology, The Third Affiliated Hospital of Shandong First Medical University, Jinan, Shandong, China, 250031)

【ABSTRACT】 **Objective** To investigate the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), melanin A (melanA) and long non-coding RNA (lncRNA) HOX antisense intergenic RNA (HOTAIR) in benign and malignant adrenal pheochromocytoma (PCC) and its relationship with prognosis. **Methods** 69 cases of malignant PCC were selected as the malignant group and 33 cases of benign PCC as the benign group. The expressions of VEGF, MelanA and lncRNA HOTAIR in benign and malignant PCC were compared. The correlation between the expression of VEGF, MelanA and lncRNA HOTAIR and the clinicopathological features of the malignant group was analyzed. The differential efficacy of the above indicators for benign and malignant adrenal PCC and their relationship with 1-year survival rate were evaluated. **Results** the positive expression rate of VEGF and lncRNA HOTAIR in the malignant group was higher than

基金项目:山东省自然科学基金(ZR2016HM81)

作者单位:1. 肥城查庄矿医院肾内科,山东,泰安 271619

2. 山东省立第三医院智慧医学部,山东,济南 250031

3. 山东第一医科大学第三附属医院肿瘤微创科,山东,济南 250031

*通信作者:吕苏一, E-mail:llsyy99@163.com

that in the benign group, and the positive expression rate of MelanA was lower than that in the benign group ($P < 0.05$). The expression of VEGF, MelanA and lncRNA HOTAIR was correlated with the clinical stage, degree of invasion, lymph node metastasis and degree of differentiation in the malignant group ($P < 0.05$). The area under the curve (AUC) of VEGF, melanA, lncRNA HOTAIR combined to identify malignant adrenal PCC is the largest, 0.919. The 1-year survival rate of patients with positive expression of VEGF and lncRNA HOTAIR was lower than that of patients with negative expression, and the 1-year survival rate of patients with positive expression of MelanA was higher than that of patients with negative expression ($P < 0.05$). **Conclusion** The expression of VEGF and lncRNA HOTAIR in patients with malignant PCC is increased, and the expression of melanA is decreased. The combined detection of the three can be used as a potential indicator for the differentiation of benign and malignant PCC and prognostic prediction.

[KEY WORDS] Adrenal pheochromocytoma; Vascular endothelial growth factor; MelanA; Long non-coding RNA HOX gene antisense intergenic RNA

肾上腺嗜铬细胞瘤(Pheochromocytoma, PCC)是肾上腺较为常见肿瘤,由于其良、恶性具有相似临床表现、组织学形态及超微结构,故鉴别难度较大,严重影响临床制定针对性治疗方案及预后改善^[1-3]。因此,准确鉴别肾上腺PCC性质是目前临床亟需解决的问题。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是最为强烈的血管通透性因子,可诱导新生血管生成,参与肾细胞癌^[4]、宫颈癌^[5]等多种恶性肿瘤病理进程。黑色素A(melanA)是恶性黑色素瘤特异性免疫指标,在肾细胞癌中呈低表达。另有研究表明^[6],长链非编码RNA(Long noncoding RNA, lncRNA)在肿瘤细胞增殖、迁移、凋亡和自噬调控中亦起着重要作用。HOX基因的反义基因间RNA(HOX transcript anti-sense intergenic RNA, HOTAIR)是第一个临床发现的lncRNA,具有反式转录调控基因表达作用,在肝癌^[7]、胃癌^[8]等增殖、浸润及转移中的作用已被临床证实。本研究尝试探讨良恶性PCC患者VEGF、melanA、lncRNA HOTAIR表达差异及对患者预后的影响,旨在为临床诊治、预后评估提供潜在途径。报道如下。

1 资料和方法

1.1 一般资料

选取2017年2月至2020年2月肥城查庄矿医院肾内科收治的69例恶性PCC为恶性组,33例良性PCC为良性组,采集手术切除的良恶性PCC组织标本。其中恶性组男42例,女27例,平均年龄(43.82 ± 3.04)岁;良性组男20例,女13例,平均年龄(44.19 ± 2.85)岁。纳入标准:①两组均经手术病理组织学确诊;②所有研究对象均签署知情同意

书;排除标准:①术前有放化疗、激素治疗史者;②合并心脑血管等重要脏器器质性损害者;③合并自身免疫系统疾病或全身感染性疾病者;④合并其他部位恶性肿瘤者;⑤语言与听力功能障碍或精神行为异常者。

1.2 方法

1.2.1 检测方法

采集手术切除的良恶性PCC组织标本($3 \text{ cm} \times 3 \text{ cm}$):①使用中性的福尔马林(4%)固定,石蜡包埋,连续切片,首先采用抗体染,出现棕色,后用苏木素染核染蓝色。采用免疫组织化学法试剂盒检测VEGF、melanA表达。结果判定^[9]:每张切片均由具备丰富经验的2名病理医师根据染色范围与染色强度评分进行判断,VEGF、melanA阳性均以高倍显微镜下细胞质或细胞膜产生棕黄色或棕褐色颗粒沉着为准,其中染色范围分为1分、2分、3分、4分;染色强度分为0分(与背景接近)、1分(稍微高于背景色)、2分(显著超过背景色)、3分(出现深棕黄色)。染色范围、染色强度评分结果相加,0~3分为阴性,>3分为阳性。②采用实时荧光定量逆转录聚合酶链反应试剂盒检测lncRNA HOTAIR表达,根据Ct值判定检测结果,其中Ct值<26为阳性,26≤Ct值<29为弱阳性,Ct值≥29为阴性。

1.2.2 治疗方法

PCC患者行腹腔镜手术治疗,恶性患者手术切除肿瘤后4周接受辅助治疗或化疗。

1.3 统计学方法

采用统计学软件SPSS 22.0处理数据,计数资料用 $n(\%)$ 表示,行 χ^2 检验;VEGF、melanA、lncRNA HOTAIR表达与恶性组病理特征的相关性分析采用Spearman相关系数模型;VEGF、

melanA、LncRNA HOTAIR 表达对良恶性肾上腺 PCC 的鉴别价值分析采用受试者工作特征(ROC)曲线;VEGF、melanA、LncRNA HOTAIR 表达与恶性肾上腺 PCC 患者1年生存率的关系采用卡普兰-迈耶曲线(KM)法分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组 VEGF、melanA、LncRNA HOTAIR 阳性表达 恶性组 VEGF、LncRNA HOTAIR 阳性表达率 高于良性组, melanA 阳性表达率低于良性组($P < 0.05$)。见表1、图1。

表1 两组 VEGF、melanA、LncRNA HOTAIR 阳性率比较 [n(%)]

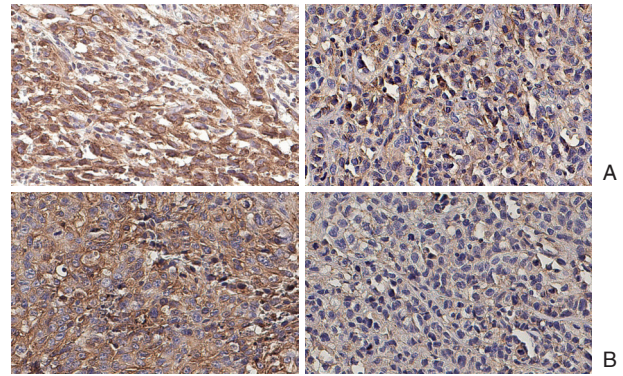
组别	n	VEGF	melanA	LncRNA HOTAIR
恶性组	69	58(84.06)	21(30.43)	41(59.42)
良性组	33	12(36.36)	29(87.88)	10(30.30)
χ^2 值		23.586	29.477	7.571
P值		<0.001	<0.001	0.006

2.2 恶性组不同临床资料患者 VEGF、melanA、LncRNA HOTAIR 阳性表达比较

恶性组不同年龄、性别、肿瘤直径、肿瘤体积患者 VEGF、melanA、LncRNA HOTAIR 阳性表达率比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);恶性组不同临床分期、分化程度、浸润程度、有无淋巴结转移患者 VEGF、melanA、LncRNA HOTAIR 阳性表达率比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表2。

表2 恶性组不同临床病理特征患者 VEGF、melanA、LncRNA HOTAIR 阳性表达比较 [n(%)]

病理特征	n	VEGF	χ^2 值	P值	melanA	χ^2 值	P值	LncRNA HOTAIR	χ^2 值	P值	
年龄(岁)	<45	38	30(78.95)	0.909	0.340	13(34.21)	0.570	0.450	21(55.26)	0.606	0.436
	≥ 45	31	28(90.32)			8(25.81)			20(64.52)		
性别	男	42	38(90.48)	2.189	0.139	14(33.33)	0.426	0.514	25(59.52)	0.001	0.983
	女	27	20(70.07)			7(25.93)			16(59.26)		
肿瘤直径(cm)	<5	41	33(80.49)	0.417	0.519	12(29.27)	0.065	0.799	24(58.54)	0.033	0.857
	≥ 5	28	25(89.29)			9(32.14)			17(60.71)		
临床分期	I+II期	22	15(68.18)	4.460	0.035	17(77.27)	33.466	<0.001	6(27.27)	13.843	<0.001
	III+IV期	47	43(91.49)			4(8.51)			35(74.47)		
肿瘤体积(cm ³)	<6	39	30(76.92)	2.293	0.130	13(33.33)	0.356	0.551	22(56.41)	0.337	0.562
	≥ 6	30	28(93.33)			8(26.67)			19(63.33)		
分化程度	高、中分化	35	26(74.29)	5.062	0.025	19(54.29)	19.085	<0.001	10(28.57)	28.033	<0.001
	低分化	34	32(94.12)			2(5.88)			31(91.18)		
浸润程度	未及浆膜	39	29(74.36)	4.742	0.029	17(43.59)	7.332	0.007	13(33.33)	25.316	<0.001
	侵及浆膜	30	29(96.67)			4(13.33)			28(93.33)		
淋巴结转移	有	32	31(96.88)	7.316	0.007	5(15.63)	6.182	0.013	28(87.50)	19.514	<0.001
	无	37	27(72.97)			16(43.24)			13(35.14)		



注:A为良恶性肾上腺 PCC 患者 VEGF 表达; B 为良恶性肾上腺 PCC 患者 melanA 表达。

图1 良恶性肾上腺 PCC 患者 VEGF、melanA 表达 (SP, ×400)

Figure 1 The expression of VEGF in patients with benign and malignant adrenal PCC was detected (SP, ×400)

2.3 VEGF、melanA、LncRNA HOTAIR 表达与恶性组临床病理特征的相关性

经 Spearman 相关性分析可知, VEGF、LncRNA HOTAIR 阳性表达与恶性组临床分期、浸润程度、淋巴结转移呈正相关,与分化程度呈负相关, melanA 阳性表达与恶性组临床分期、浸润程度、淋巴结转移呈负相关,与分化程度呈正相关($P < 0.05$)。见表3。

2.4 VEGF、melanA、LncRNA HOTAIR 表达对恶性肾上腺 PCC 的鉴别效能

绘制 ROC 曲线,结果显示, VEGF、melanA、LncRNA HOTAIR 联合鉴别恶性肾上腺 PCC 的曲

表3 VEGF、melanA、LncRNA HOTAIR 表达与恶性组临床病理特征的相关性

Table 3 Correlation between expression of VEGF, Melania, Incrna hotair and clinicopathological features of malignant group

临床病理特征	VEGF		melanA		LncRNA HOTAIR	
	r 值	P 值	r 值	P 值	r 值	P 值
临床分期	0.759	<0.001	-0.701	<0.001	0.738	<0.001
分化程度	-0.725	<0.001	0.676	<0.001	-0.703	<0.001
浸润程度	0.659	<0.001	-0.621	<0.001	0.639	<0.001
淋巴结转移	0.691	<0.001	-0.640	<0.001	0.667	<0.001

线下面积 (AUC) 为 0.919 (95% CI: 0.848~0.964), 敏感度、特异度分别为 89.86%、93.94% (P<0.05)。见图 2。

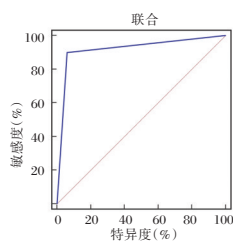


图2 ROC 曲线
Figure 2 ROC curve

2.5 VEGF、melanA、LncRNA HOTAIR 表达与肾上腺 PCC 患者 1 生存率的关系

随访 1 年, 恶性肾上腺 PCC 患者脱落 2 例。VEGF、melanA、LncRNA HOTAIR 阳性表达患者 1 年生存率低于阴性表达患者 ($\chi^2=7.655, P=0.006; \chi^2=5.012, P=0.025$), melanA 阳性表达患者 1 年生存率高于阴性表达患者 ($\chi^2=4.724, P=0.030$), 见图 3。

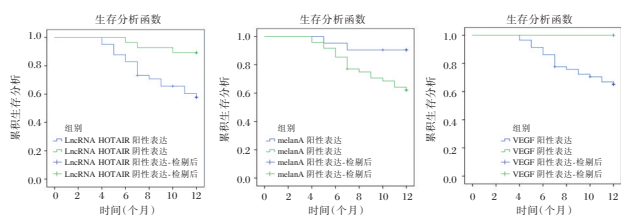


图3 VEGF、melanA、LncRNA HOTAIR 表达与肾上腺 PCC 患者 1 生存率的关系

Figure 3 Relationship between VEGF, Melania, Incrna hotair expression and 1 survival rate in adrenal PCC patients

3 讨论

本研究中, 恶性 PCC 患者 VEGF 阳性表达率高于良性 PCC 患者, 并与患者临床分期、浸润程度、淋巴结转移存在正相关性, 与分化程度存在负

相关性。VEGF 可提高微血管通透性, 诱导血管内皮细胞异常增殖, 加快新生血管形成, 进而促进肿瘤细胞生长、浸润及转移^[10]。

既往研究表明^[11], VEGF 在多种恶性肿瘤尤其是出现浸润和转移的恶性肿瘤中表达率超出 80.0%。结合贺亮亮^[12]研究考虑上述结果产生机制可能在于 VEGF 通过结合肿瘤细胞表面受体, 可活化下游信号通路, 直接调控肿瘤干细胞形成、增殖等进程, 同时, 其通过血管通透性, 可介导基质溶解、新血管网构建、管腔形成等肿瘤血管形成过程, 从而参与恶性 PCC 细胞增殖、浸润及转移过程。提示对存在 VEGF 高表达 PCC 患者需警惕其存在恶性倾向可能性。

melanA 在血管周细胞瘤、多数类固醇肿瘤 (包括 PCC) 及黑色素细胞病变中表达, 吕祥瑞等^[13]通过免疫组织化学法检测可知, 恶性 PCC 患者 melanA 表达较低, 并与患者临床分期、浸润程度、淋巴结转移、分化程度存在一定相关性, 支持本研究观点, 可见 melanA 表达变化可为 PCC 性质临床鉴别提供新的医学思路。推测提高 melanA 表达可能是阻断 PCC 恶变、浸润、转移的重要途径。

另外, 本研究结果还发现, 本研究提出, LncRNA HOTAIR 在恶性 PCC 患者中呈高表达, 且与临床分期、浸润程度、淋巴结转移、分化程度有关, 与孙青凤等^[14]研究相似。LncRNA HOTAIR 是一种促癌基因, 在多种恶性肿瘤中表达升高, 具有早期鉴别肿瘤、术后监测肿瘤复发及作为特异药物治疗靶点的潜在价值^[15]。这可能归因于 LncRNA HOTAIR 不仅可调控 HOXD 启动子相关蛋白的组蛋白修饰, 激活原癌基因, 破坏原癌基因与抑癌基因平衡, 还能靶向调控雷帕霉素靶蛋白信号通路, 提高葡萄糖同型转运蛋白-1 表达, 强化癌细胞无氧糖酵解获能能力, 从而参与肿瘤细胞生长、增殖、侵袭、转移调控。说明 LncRNA HOTAIR 与恶性 PCC 发生、发展存在一定关系, 可能作为恶性 PCC 鉴别生物标志物, 为后续研究及治疗提供新靶点。进一步明确证明三者联合鉴别恶性 PCC 的 AUC 为 0.919, 优于单独指标鉴别, 提示三者联合有助于提高恶性 PCC 鉴别效能, 具有一定推广实用性。

此外, 本研究通过 Log-Rank 检验还表明, VEGF、LncRNA HOTAIR 高表达、melanA 低表达可能降低恶性 PCC 患者 1 年生存率, 这可能与 VEGF、melanA、LncRNA HOTAIR 异常表达可能诱导肿瘤细胞异常增殖、加剧浸润深度、上调局部或

远处转移风险,从而引起不良预后有关。由此可见,VEGF、LncRNA HOTAIR 表达对恶性 PCC 预后亦具有一定预测价值。但本研究局限性在于纳入样本量小,未分析 VEGF、melanA、LncRNA HOTAIR 三者之间相关性及在 PCC 中的具体作用机制,今后需进一步开展大样本研究论证所得结果。

综上所述,恶性 PCC 患者 VEGF、LncRNA HOTAIR 表达升高, melanA 表达下降,三者联合检测可为临床鉴别 PCC 性质、评估病理特征、预测预后提供循证支持。

参考文献

- [1] Kang S, Oh YL, Park SY. Distinguishing pheochromocytoma from adrenal adenoma by using modified computed tomography criteria[J]. *Abdom Radiol (NY)*, 2021,46(3):1082-1090.
- [2] 张冲,赵安超,刘月. 磁共振成像与 CT 在肾上腺嗜铬细胞瘤诊断中的价值比较[J]. *实用医学影像杂志*, 2019, 20(2):177-179.
- [3] 高银娟. MSCT 及 3.0MRI 在肾上腺肿瘤鉴别诊断中的应用价值[D]. 广西医科大学, 2019.
- [4] 陶丹,蒋国松,黄超. 靶向调控血管内皮生长因子选择性剪接对肾细胞癌的作用研究[J]. *临床泌尿外科杂志*, 2019, 34(8):591-597,601.
- [5] 苏文芳. GOLPH3 和 VEGF 在宫颈瘤组织中的表达及临床意义[J]. *蚌埠医学院学报*, 2021, 46(2):169-172.
- [6] 曾繁浩,雷容,张克,等. LncRNA 在膀胱癌发生发展中的作用机制及其应用研究进展[J]. *山东医药*, 2020,60(16):88-91.
- [7] Duan Y, Chen J, Yang Y, et al. LncRNA HOTAIR contributes Taxol-resistance of hepatocellular carcinoma cells via activating AKT phosphorylation by down-regulating miR-34a [J]. *Biosci Rep*, 2020, 40(7):BSR20201627.
- [8] Wei Z, Chen L, Meng L, et al. LncRNA HOTAIR promotes the growth and metastasis of gastric cancer by sponging miR-1277-5p and upregulating COL5A1[J]. *Gastric Cancer*, 2020, 23(6):1018-1032.
- [9] 霍亚杰,康志强,何丽,等. 抑制素 α 、A103、钙网膜蛋白联合检测在肾上腺皮质腺瘤与肾上腺良性嗜铬细胞瘤鉴别诊断中的应用价值[J]. *实验与检验医学*, 2019,37(5):802-805.
- [10] 谢云鹏,柳新,刘兵,等. TGF- β 1、Smad7 及 VEGF 在脑胶质瘤中表达及与病理特征、预后的关系[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2021, 13(1):38-42.
- [11] 高欣彤,史春玲,张苗,等. 肾上腺嗜铬细胞瘤 VEGF 和 iNOS 表达与临床特征的关系及相关性分析[J]. *临床误诊误治*, 2020,33(4):86-90.
- [12] 贺亮亮. MMP-2、MMP-9 和 VEGF 在肾癌中的表达与临床分析[J]. *中国冶金工业医学杂志*, 2019,36(5):577.
- [13] 吕祥瑞,方卓宁. melanA VEGF Syn 在肾上腺嗜铬细胞瘤组织中的表达及临床价值[J]. *临床心身疾病杂志*, 2020, 26(5):7-11,24.
- [14] 孙青凤,杜学谦,王晓鹏,等. lncRNA HOTAIR 和 lncRNA UCA1 在肾上腺恶性肿瘤中的表达及临床意义[J]. *国际检验医学杂志*, 2020, 41(23):2867-2870.
- [15] Zhang S, Wang B, Xiao H, et al. LncRNA HOTAIR enhances breast cancer radioresistance through facilitating HSPA1A expression via sequestering miR-449b-5p[J]. *Thorac Cancer*, 2020, 11(7):1801-1816.

(上接第 1659 页)

- [6] 李文静,史聪,宋培,等. 不同通量透析膜对维持性血液透析患者氧化应激状态及血清炎症因子的影响[J]. *中国临床研究*, 2018, 31(4):486-489.
- [7] Lekawanvijit S, Kompa AR, Krum H. Protein-bound uremic toxins: a long overlooked culprit in cardiorenal syndrome [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2016, 311(1):52-62.
- [8] Kamiński TW, Pawlak K, Karbowska M, et al. Indoxyl sulfate-the uremic toxin linking hemostatic system disturbances with the prevalence of cardiovascular disease in patients with chronic kidney disease[J]. *Bmc Nephrol*, 2017, 18(1):35-47.
- [9] Panichi V, Rocchetti MT, Scatena A, et al. Long term variation of serum levels of uremic toxins in patients treated by post-dilution high volume on-line hemodiafiltration in comparison to standard low-flux bicarbonate dialysis: results from the REDERT study[J]. *J Nephrol*, 2017, 30(4):583-591.
- [10] 杨颖,刘峻,李芊,等. 不同超滤量对高通量血液透析尿毒症毒素清除的影响[J]. *国际泌尿系统杂志*, 2014, 34(5):669-673.
- [11] Song KK, Zhao DL, Wang YD, et al. Analysis of factors associated with death in maintenance hemodialysis patients: a multicenter study in China [J]. *Chinese Med J*, 2017, 130(8):885-891.
- [12] 马志宏,胡文博,贾顺莲,等. 高通量与低通量血液透析对糖尿病肾病透析患者氧化应激、细胞免疫功能和微炎症状态的影响[J]. *现代生物医学进展*, 2017, 17(30):173-176.
- [13] 崔学彬,邹婷,唐小铁,等. 高通量透析对糖尿病肾病维持性血液透析患者相关指标的影响[J]. *中外医学研究*, 2018, 16(3):41-43.
- [14] 肖白丽,隋小妮,张云静,等. 不同透析膜对维持性血液透析患者骨矿物质代谢及微炎症状态的影响[J]. *中国血液净化*, 2013, 12(7):379-383.
- [15] Yang X, Huo F, Liu B, et al. Crocin inhibits oxidative stress and pro-inflammatory response of microglial cells associated with diabetic retinopathy through the activation of PI3K/Akt signaling pathway[J]. *J Molec Neurosci*, 2017, 61(4):581-589.
- [16] 任克军,王青,胡顺金,等. 微炎症状态对腹膜透析患者营养状况的影响[J]. *实用医学杂志*, 2015, 31(3):427-429.

血清和粪便 CEA、CA199、AFP 辅助诊断结直肠癌的研究

唐阳 贾逸文 彭琼*

[摘要] **目的** 探讨粪便癌胚抗原(CEA)、糖类抗原 199(CA199)、甲胎蛋白(AFP)对结直肠癌的诊断效能。**方法** 选取2017年1月至2021年3月本院收治的132例结直肠癌患者(结直肠癌组)、50例结直肠息肉患者(息肉组)、50例肠镜检查未见异常的住院患者(对照组),比较各组外周血和粪便CEA、CA199、AFP水平,应用受试者工作特征曲线(ROC)及ROC下面积(AUC)分析外周血和粪便各指标诊断结直肠癌的效能,并比较粪便不同CEA、CA199、AFP水平者结直肠癌发生率。**结果** 外周血CEA、CA199水平比较:结直肠癌组>息肉组>对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);结直肠癌组外周血AFP高于息肉组、对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);粪便CEA、CA199、AFP:结直肠癌组>息肉组>对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);与外周血各指标相比,粪便各指标诊断结直肠癌的AUC较大($P<0.05$);外周血各指标联合、粪便各指标联合诊断结直肠癌的AUC大于对应标本单一指标,且粪便各指标联合的AUC大于外周血各指标联合的AUC($P<0.05$);CEA、CA199、AFP高水平者结直肠癌发生率高于低水平者($P<0.05$)。**结论** 结直肠癌、结直肠息肉、健康对照人群粪便与外周血CEA、CA199、AFP具有相同的变化趋势,粪便CEA、CA199、AFP诊断结直肠癌的价值更高,可作为结直肠癌的无创性检查项目。

[关键词] 粪便; CEA; CA199; AFP; 结直肠癌

Serum and fecal CEA, CA199, AFP for the diagnosis of colorectal cancer

TANG Yang, JIA Yiwen, PENG Qiong*

(Department of Gastroenterology, Hefei First People's Hospital, Hefei, Anhui, China, 230000)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the diagnostic efficacy of fecal carcinoembryonic antigen (CEA), carbohydrate antigen 199 (CA199), and alpha-fetoprotein (AFP) for colorectal cancer. **Methods** From January 2017 to March 2021, 132 patients with colorectal cancer (colorectal cancer group), 50 patients with colorectal polyps (polyp group), and 50 hospitalized patients with no abnormalities in colonoscopy (Control group) were selected. The levels of CEA, CA199, and AFP in peripheral blood and feces in each group were compared. Receiver operating characteristic curve (ROC) and area under ROC (AUC) were used to analyze the efficacy of peripheral blood and feces in the diagnosis of colorectal cancer, and to compare the incidence of colorectal cancer in feces with different levels of CEA, CA199, and AFP. **Results** The peripheral blood CEA and CA199 levels in the colorectal cancer group were higher than those in the polyp group and the control group. The peripheral blood CEA and CA199 in the polyp group were higher than those in the control group ($P<0.05$). The peripheral blood AFP in the colorectal cancer group was higher than that in the polyp group and the control group ($P<0.05$). Fecal CEA, CA199, and AFP levels in the colorectal cancer group were higher than those in the polyp group and the control group, and the fecal CEA, CA199, and AFP in the polyp group were higher than those in the control group ($P<0.05$). Compared with the indicators of peripheral blood, the AUC of fecal indicators for the diagnosis of colorectal cancer is larger. The AUC of the combined

基金项目:安徽省合肥市卫生计生应用医学科研项目(hwk2018zd008)

作者单位:合肥市第一人民医院消化内科,安徽,合肥 230000

*通信作者:彭琼, E-mail:pq_is@aliyun.com

diagnosis of colorectal cancer by the combination of peripheral blood indicators and the combined fecal indicators is greater than the single indicator of the corresponding specimen, and the combined AUC of the fecal indicators is greater than the combined AUC of the peripheral blood indicators; The incidence of colorectal cancer in patients with high levels of CEA, CA199 and AFP was higher than that of patients with low levels ($P < 0.05$). **Conclusion** Colorectal cancer, colorectal polyps, and healthy controls have the same trend of changes in feces and peripheral blood CEA, CA199, and AFP. Fecal CEA, CA199, and AFP are more valuable in diagnosing colorectal cancer and can be used as a non-invasive examination for colorectal cancer.

[KEY WORDS] Feces; serum; CEA; CA199; AFP; Colorectal Cancer

结直肠癌是我国发病率、死亡率最高的恶性肿瘤之一,严重危害患者生命健康,早期诊断与治疗是改善预后的重要策略^[1]。随着对癌症相关分子标志物研究的逐步加深,合理的检测及应用结直肠癌相关分子标志物已经成为现阶段临床实践的重要部分。癌胚抗原(Carcinoembryonic Antigen, CEA)、糖类抗原 199 (Carbohydrate Antigen 199, CA199)、甲胎蛋白(Alpha-fetoprotein, AFP)是肿瘤一级筛查中常用的无创性标志物,在肺癌、卵巢癌、肝癌、结直肠癌等外周血中水平升高,有助于恶性肿瘤的诊断^[2-4]。但长期临床工作经验发现,受临床分期、炎症反应、良性病变等因素影响,检测以上标志物在外周血中表达存在敏感度、特异性不足的局限,可能贻误病情,影响疾病转归。本研究前期小样本的预试验表明,检测结直肠癌患者粪便 CEA、CA199、AFP 可提高诊断效能,但仍需大样本量的进一步验证。基于此本研究探讨粪便 CEA、CA199、AFP 与结直肠癌诊断效能,旨在为临床医师提供参考及指导,报告如下。

1 资料和方法

1.1 一般资料

选取 2017 年 1 月至 2021 年 3 月本院收治的 132 例结直肠癌患者(结直肠癌组)、50 例结直肠息肉患者(息肉组)、50 例肠镜检查未见异常的住院患者(对照组)。其中结直肠癌组女 71 例,男 61 例,年龄平均(50.86±7.19)岁,体质量指数平均(23.19±0.81)kg/m²;息肉组女 29 例,男 21 例,年龄平均(50.16±7.86)岁,体质量指数平均(23.32±0.79)kg/m²;对照组女 25 例,男 25 例,年龄平均(49.87±7.39)岁,体质量指数平均(23.49±0.71)kg/m²。各组性别、年龄、体质量指数比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。结直肠癌组 T1 分期 52 例, T2 分期 80 例;低分化 39 例,中分化 47 例,高分化 46 例。

纳入标准:①符合结直肠癌诊断标准^[5];②T1、T2 分期;首次确诊,既往无相关治疗史;③年龄>18 岁。排除标准:①远处转移者;②血液系统疾病者;③妊娠期者;④合并急性感染类疾病者;⑤伴有其他系统恶性肿瘤者。

1.2 方法

采集患者清晨空腹静脉血 5 mL, 3 000 r/min 离心 10 min, 保存上清用于检测外周血各指标表达;并采集粪便标本 10 g, 按照粪便重量:萃取液体积=1:49 加入专用萃取液,充分震荡混匀,取 5 mL 匀浆 8 500 r/min 离心 5 min,取上清用于检测粪便各指标表达。采用酶联免疫吸附法检测 CEA 水平,试剂盒购于上海康朗生物科技有限公司;采用化学发光法检测 CA199 水平,试剂盒购于上海三抒生物科技有限公司;采用免疫层析法检测 AFP 水平,试剂盒购于武汉明德生物科技有限公司。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 22.0 处理数据,计量资料符合正态分布以($\bar{x} \pm s$)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,应用受试者工作特征曲线(ROC)及 ROC 下面积(AUC)分析外周血和粪便各指标诊断结直肠癌的效能。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组外周血 CEA、CA199、AFP 比较

外周血 CEA、CA199 水平比较:结直肠癌组>息肉组>对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$);结直肠癌组外周血 AFP 高于息肉组、对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$);息肉组、对照组 AFP 比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

2.2 各组粪便 CEA、CA199、AFP 比较

粪便 CEA、CA199、AFP:结直肠癌组>息肉组>对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

表1 各组外周血CEA、CA199、AFP比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of CEA, CA199 and AFP in peripheral blood of each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	CEA(ng/mL)	CA199(u/mL)	AFP($\mu\text{g/L}$)
结直肠癌组	132	3.41±1.12 ^{ab}	32.64±10.63 ^{ab}	5.65±1.37 ^{ab}
息肉组	50	1.90±0.61 ^a	24.56±8.03 ^a	3.92±1.26
对照组	50	1.24±0.39	16.33±5.15	3.68±1.59
F值		122.639	60.365	50.188
P值		<0.001	<0.001	<0.001

注:与对照组比较,^a $P<0.05$;与息肉组比较,^b $P<0.05$ 。

表2 各组粪便CEA、CA199、AFP比较 ($\bar{x} \pm s, \mu\text{g/g}$)

Table 2 Comparison of stool CEA, CA199 and AFP in each group ($\bar{x} \pm s, \mu\text{g/g}$)

组别	n	CEA	CA199	AFP
结直肠癌组	132	32.87±10.25 ^{ab}	78.68±25.13 ^{ab}	5.21±1.68 ^{ab}
息肉组	50	16.03±5.89 ^a	35.25±11.64 ^a	2.64±0.79 ^a
对照组	50	5.03±1.57	21.49±6.62	1.78±0.57
F值		230.858	186.103	145.949
P值		<0.001	<0.001	<0.001

注:与对照组比较,^a $P<0.05$;与息肉组比较,^b $P<0.05$ 。

2.3 各指标不同标本诊断结直肠癌的价值

分别以结直肠癌组外周血、粪便各指标为阳性样本,以息肉组和对照组外周血、粪便各指标为阴性样本,绘制ROC曲线显示,与外周血各指标相比,粪便各指标诊断结直肠癌的AUC较大($P<0.05$);应用Logistic二元回归ROC模型显示,外周血各指标联合、粪便各指标联合诊断结直肠癌的AUC大于单一指标,且粪便各指标联合的AUC大于外周血各指标联合的AUC($P<0.05$)。见表3、图1。

表3 ROC分析结果
Table 3 ROC analysis results

指标	AUC	95%CI	cut-off值	敏感度 (%)	特异度 (%)	P值
CEA						
外周血	0.805	0.748-0.854	>3.13 $\mu\text{g/L}$	56.82	93.00	<0.001
粪便	0.926	0.885-0.956	>22.11 $\mu\text{g/g}$	85.61	91.00	<0.001
CA199						
外周血	0.772	0.712-0.824	>30.36 kU/L	65.91	83.00	<0.001
粪便	0.945	0.907-0.970	>58.04 $\mu\text{g/g}$	87.88	96.00	<0.001
AFP						
外周血	0.775	0.716-0.827	>4.92 $\mu\text{g/L}$	75.76	67.00	<0.001
粪便	0.920	0.877-0.952	>3.77 $\mu\text{g/g}$	79.55	97.00	<0.001
外周血各指标联合	0.841	0.788-0.886		77.27	79.00	<0.001
粪便各指标联合	0.951	0.915-0.975		90.15	87.00	<0.001

2.4 粪便中各指标不同水平者结直肠癌发生率比较

结果显示,CEA、CA199、AFP高水平者结直肠癌发生率高于低水平者($P<0.05$)。见表4。

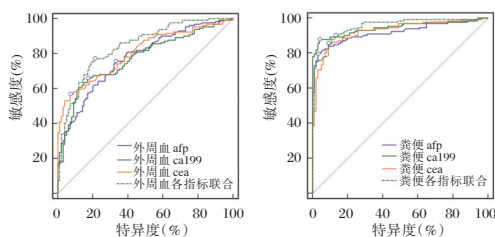


图1 各指标不同标本诊断结直肠癌的价值

Figure 1 The value of different specimens of various indicators in the diagnosis of colorectal cancer

表4 粪便中各指标不同水平者结直肠癌发生率比较 [n(%)]

Table 4 Comparison of the incidence of colorectal cancer in feces with different levels of indicators [n(%)]

指标	组别	n	结直肠癌	非结直肠癌	χ^2 值	P值
CEA	高水平	122	113(92.62)	9(7.38)	133.917	<0.001
	低水平	110	19(17.27)	91(82.73)		
CA199	高水平	120	116(96.67)	4(3.33)	160.312	<0.001
	低水平	112	16(14.29)	96(85.71)		
AFP	高水平	108	105(97.22)	3(2.78)	133.985	<0.001
	低水平	124	27(21.77)	97(78.23)		

3 讨论

结肠镜和病理活检是诊断结直肠癌有效手段,但存在侵入性、有创性的不足。随着分子生物学和肿瘤分子发病机制认识的加深,人们发现结直肠癌的发生进展是由于抑癌和促癌物质的积累或遗传物质后天改变引起,一旦发生结直肠癌,肿瘤自身代谢可合成分泌多种物质,并在粪便中稳定存在,因此检测粪便中肿瘤标志物具有理论可行性^[6]。

CEA是一种人类胚胎抗原特性的酸性蛋白,形成于细胞浆中,通过细胞膜分泌至细胞外,然后进入外周血、尿液、粪便等^[7]。印海娟等^[8]报道,胃癌患者血清CEA高于良性病变者、健康对照者,可用于胃癌的筛查。经过大量^[9-11]报道,不仅胃癌患者外周血CEA升高,肺癌、乳腺癌、结直肠癌等其他恶性肿瘤中亦可检测到血清CEA的升高,因此CEA被认为是一种广谱肿瘤标志物。但关于粪便CEA在结直肠癌中应用的报道鲜见,本研究结果提示粪便CEA对结直肠癌的诊断价值更高,当粪便CEA>22.11 $\mu\text{g/g}$ 时,诊断结直肠癌的敏感为85.61%,特异度为91.00%,呈现出一定的诊断价值。结直肠癌是一种消化系统病变,粪便是反映消化道病变的一个窗口,从大肠黏膜脱落标志物来源

于肿瘤,并能持续释放。人来结直肠上皮更新速度为每小时1%,若肿瘤以正常速度更新,则脱落在肠道上皮细胞总量中有 $\geq 1\%$ 来自肿瘤,所以对结直肠癌的敏感性更高,可作为结直肠癌的一个诊断标志物。

CA199分布于胰腺、肠、肝等,在血清中以唾液黏蛋白形式存在,在外周血中升高见于消化道炎症、肿瘤等^[12]。既往关于粪便CA199检测诊断肿瘤的报道鲜见,本研究对此探讨发现,与息肉、对照组比较,结直肠癌患者外周血和粪便CA199均显著升高,且粪便CA199诊断AUC较高,更具临床应用价值。由于CA199在血清中含量高低与肿瘤分期有关,结直肠癌患者由于疾病分期的原因,可能仍处于正常范围,所以诊断结直肠癌的敏感度降低^[13]。当粪便CA199 $>58.04 \mu\text{g/g}$ 时,诊断结直肠癌的AUC为0.945,敏感度为87.88%,特异度为96.00%,每个参数均高于外周血对应的CA199,具有作为结直肠癌诊断标志的潜质。

AFP具有运输功能、免疫抑制等多项效应,主要由胎儿卵黄囊、肝细胞合成,在胎儿血液循环中浓度较高,至出生后2~3个月明显降低,难以在外周血中检出,所以健康成人血清中AFP含量较低^[14]。汤俊等^[15]报道,结直肠癌患者血清AFP高于结直肠良性疾病和健康人群,本研究观点与之相似。且本研究还发现,结直肠癌患者粪便AFP高于息肉者、对照人群,提示检测粪便AFP可能有助于结直肠癌的诊断。同时外周血各指标联合、粪便各指标联合诊断结直肠癌的AUC大于对应标本单一指标,粪便各指标联合的AUC大于外周血各指标联合的AUC,所以建议联合检测粪便CEA、CA199、AFP,以提供更可靠的参考信息,便于临床医师做出正确的决策。值得注意的是,由于本研究纳入的均为结直肠疾病患者,无其他患病人群,各检测指标是否在其他肿瘤患者出现异常尚不明确,因此粪便CEA、CA199、AFP是否能作为大样本量人群筛查标志物仍需后续前瞻性报道的论证。

综上,结直肠癌、结直肠息肉、健康对照人群粪便与外周血CEA、CA199、AFP保持相同的变化趋势,其中粪便CEA、CA199、AFP诊断结直肠癌的价值更高,可作为结直肠癌的无创性、便捷性诊断标志物。

参考文献

- [1] 中国临床肿瘤学会(CSCO)结直肠癌专家委员会. 结直肠癌分子标志物临床检测中国专家共识[J]. 中华胃肠外科杂志, 2021, 24(3): 191-197.
- [2] 汤乔雅, 宫郡茗, 马艳凌. CEA、NSE、SCCA联合miR-21检测与肺癌患者临床病理特征、疗效及预后的相关性研究[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2019, 11(6): 508-512.
- [3] 王秀, 刘真, 吴晶晶, 等人附睾蛋白4、CA199、LPA在卵巢癌中的表达及与临床病理特征的相关性[J]. 蚌埠医学院学报, 2021, 46(2): 183-186, 190.
- [4] 程书平, 李明, 谭诗云. 血清AFP、PIVKA-II、GGT、GGT/ALT检测对原发性肝癌的诊断价值[J]. 山东医药, 2021, 26(1): 61-65.
- [5] 中华人民共和国卫生和计划生育委员会医政医管局, 中华医学会肿瘤学分会. 中国结直肠癌诊疗规范(2015版)[J]. 中华消化外科杂志, 2015, 14(10): 783-799.
- [6] 冷晓旭, 房静远. 粪便标志物DNA和RNA筛查结直肠癌特性分析[J]. 中华医学杂志, 2020, 100(42): 3373-3376.
- [7] Kim BC, Bae JH, Park SM, et al. Is ascites CEA a risk factor for peritoneal carcinomatosis in colorectal cancer?: a long-term follow-up study[J]. Int J Colorectal Dis, 2020, 35(1): 147-155.
- [8] 印海娟, 董涛, 张素英, 等. 血清糖链抗原724、糖链抗原19-9与癌胚抗原联合检测对胃癌诊断价值研究[J]. 临床军医杂志, 2021, 49(2): 160-161, 163.
- [9] 庞芳宁, 白槟, 杨鹏, 等. 肿瘤标志物CEA、CA₁₉₉、CA₁₂₅联合检测对胃癌筛查价值及与TNM分期的关系[J]. 陕西医学杂志, 2020, 49(8): 1040-1044.
- [10] 杨丽娜, 芮勇宇. 血脂水平与血清肿瘤标志物联合检测在乳腺癌诊断中的应用价值[J]. 中华生物医学工程杂志, 2020, 26(3): 263-267.
- [11] 唐丹丹, 何家富, 曾宪升, 等. 肺癌致胸腔积液胸水CEA和CA125水平及临床价值[J]. 热带医学杂志, 2019, 19(11): 1392-1395.
- [12] Yu H. Reference intervals for gastrointestinal tumor markers (AFP, CEA, CA199 and CA724) in healthy adults of Han nationality in Chongqing by Roche ECLIA system[J]. Scand J Clin Lab Invest, 2019, 79(7): 484-490.
- [13] Huang D, Lin Q, Song J, et al. Prognostic Value of Pretreatment Serum CA199 in Patients with Locally Advanced Rectal Cancer Treated with CRT Followed by TME with Normal Pretreatment Carcinoembryonic Antigen Levels[J]. Dig Surg, 2021, 38(1): 24-29.
- [14] Luo P, Wu S, Yu Y, et al. Current Status and Perspective Biomarkers in AFP Negative HCC: Towards Screening for and Diagnosing Hepatocellular Carcinoma at an Earlier Stage[J]. Pathol Oncol Res, 2020, 26(2): 599-603.
- [15] 汤俊, 黄春锦, 陈玺. 老年结直肠癌患者血清内CEA、AFP、CA50、CA199和CA724的表达及意义[J]. 实用癌症杂志, 2019, 34(3): 397-399, 406.

系统性红斑狼疮患儿中性粒细胞亚群与外周血自噬相关基因 *Beclin1* 表达水平相关性

刘志明* 郜苗苗 邵丽丽 朱翠敏 刘秀芬

[摘要] **目的** 探讨系统性红斑狼疮(SLE)患儿中性粒细胞亚群与外周血自噬相关基因 *Beclin1* (*Beclin1*)的相关性。**方法** 选取2018年01月至2019年12月期间就诊于本院儿科并确诊为SLE的56例患儿为研究对象,纳入为SLE组,根据SLE活动度评分表(SLEDAI)分为活动期(32例)和非活动期(24例);对照组为同期健康体检儿童25例。对比两组之间白细胞、中性粒细胞、淋巴细胞、血红蛋白、抗dsDNA抗体、ANA抗体、抗Sm抗体、APL阳性、补体C3、低密度粒细胞(LDGs)、SLEDAI评分以及外周血 *Beclin1* 的表达水平。**结果** SLE组患儿的LDGs比例、抗dsDNA抗体比例、SLEDAI评分及 *Beclin1* 均明显高于对照组,补体C3水平低于对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。活动期SLE患儿的补体C3水平较非活动期患儿低,LDGs比例、抗dsDNA抗体比例、SLEDAI评分及 *Beclin1* 均高于非活动期患儿,差异有统计学意义($P<0.05$)。Pearson相关分析结果显示,SLE患儿的LDGs比例与SLEDAI评分($r=0.245, P=0.033$)及 *Beclin1* ($r=0.356, P=0.002$)呈正相关,而与补体C3、抗dsDNA抗体则无明显相关性。**结论** SLE患儿表现为LDGs升高和 *Beclin1* 高表达,二者在SLE的发生发展过程中可能存在正向相关作用。

[关键词] 系统性红斑狼疮;低密度粒细胞; *Beclin1*; 相关性

Relationship between peripheral blood neutrophil subsets and expression of autophagy related gene *Beclin1* in children with systemic lupus erythematosus

LIU Zhiming, GAO Miaomiao, SHAO Lili, ZHU Cuimin, LIU Xiufen

(Department of Pediatrics, Cangzhou Central Hospital, Cangzhou, Hebei, China, 061000)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the relationship between neutrophil subsets and peripheral blood autophagy related gene *Beclin1* in children with systemic lupus erythematosus (SLE). **Methods** 56 children with SLE diagnosed in pediatrics of our hospital from January 2018 to December 2019 were selected as the research objects, and they were divided into the active stage (32 cases) and inactive stage (24 cases) according to SLE activity rating scale (SLEDAI). 25 cases of healthy children in the same period were selected as the control group. White blood cells, neutrophils, lymphocytes, hemoglobin, anti dsDNA antibody, ANA antibody, anti SM antibody, APL positive, complement C3, low density granulocyte (LDGs) and SLEDAI scores were measured and compared. The level of *Beclin1* in peripheral blood was detected by real-time quantitative RT-qPCR. Pearson correlation was used to analyze the correlation among the parameters. **Results** The proportion of LDGs, anti dsDNA antibody, SLEDAI score and *Beclin1* in the SLE group were significantly higher than those in the control group, while complement C3 level in the SLE group was lower than that in control group ($P < 0.05$). The level of complement C3 in the active SLE patients was lower than that in the inactive SLE patients, while the proportion of LDGs, anti dsDNA antibody, SLEDAI score and *Beclin1* in the active SLE patients were higher than that in the inactive SLE patients ($P < 0.05$). The results of pearson correlation analysis showed that the proportion of LDGs in children with SLE was positively correlated with SLEDAI score ($r=0.245, P=$

基金项目:河北省卫生健康委科研基金项目(20200302)

作者单位:沧州市中心医院儿科,河北,沧州 061000

*通信作者:刘志明, E-mail: czyslzm@163.com

0.033) and Beclin1 ($r=0.356, P=0.002$), but there was no significant correlation with complement C3 and anti dsDNA antibody. **Conclusion** Children with SLE show increased LDGs and high-level expression of Beclin1.

LDGs and Beclin1 may have a positive correlation in the occurrence and development of SLE.

[KEY WORDS] Systemic lupus erythematosus; Low density granulocyte; Beclin1; Correlation

系统性红斑狼疮(Systemic Lupus Erythematosus, SLE)是一种对患者全身多个系统和器官都能产生影响的自身免疫性疾病,多通过影响心血管而导致患者死亡,儿童SLE情况比成人少,但其后果往往更为严重,表现出更多的并发症和更高的死亡率,预后更差^[1-2]。SLE作用机制复杂,可能与感染、紫外线照射、免疫调节异常及遗传等多种因素相关,加之儿童特殊的生理状态,治疗上存在很多困难和挑战,传统治疗方法只能缓解病情,至今尚无特效治疗手段^[3-4]。因此,探讨SLE的发病机理对该病的诊断与治疗具有较广泛的意义。中性粒细胞在SLE发生发展中扮演重要的角色^[5],其亚型低密度粒细胞(low density granulocyte, LDGs)最初由Hacbarth发现存在于SLE成人患者外周血单核细胞(PBMCs)制备物中,后续相继从鼠和猪的血液中能分离到LDGs,在特定状态下,其释放防御素、蛋白酶、促炎因子及抗菌肽的能力提升,刺激内皮细胞受损并释放出更多的肿瘤坏死因子、IL-6、IL-8及干扰素(IFNs)^[6-7]。而自噬相关基因Beclin1(Autophagy related gene Beclin1, Beclin1)是自噬重要的调控因子,在调控自噬体合成方面具有重要作用^[8]。由此说明LDGs和Beclin1在SLE的发生发展过程中可能存在相互作用,但目前未见二者关系的相关报道。本研究以SLE患儿为研究对象,探讨LDGs与其外周血Beclin1表达的相关性,以期找到影响儿童SLE的新的标志物。

1 对象和方法

1.1 研究对象

选取2018年01月至2019年12月期间就诊本院儿科的确诊为SLE的患儿56例为研究对象(SLE组),其中男性10例,女性46例,年龄平均(11.26 ± 2.38)岁。另选取同期年龄、性别匹配的健康体检儿童25例作为对照组,其中男性6例,女性19例,年龄平均(11.42 ± 2.43)岁。本研究经本院伦理委员会审批,所有受试者或家属均充分知情并签署知情同意书。

SLE组入选标准:①符合1997年美国风湿病学会(ARC)修订的SLE诊断标准^[9];②年龄小于18周岁。排除标准:①患有其他免疫或风湿性相

关疾病者;②患有肝脏疾病、糖尿病或其他血脂紊乱疾病者;③不能按照方案要求配合研究者。另外,通过SLE活动度评分表(SLEDAI)对SLE活动性进行评分^[10],总分超过9分,则认为SLE处于活动期,反之,则为非活动期。结果有32例SLE患儿处于活动期,剩余24例为非活动期。

1.2 试剂和仪器

Ficoll-Hypaque人淋巴细胞分离液(生产厂家:天津灏洋生物制品科技有限公司);Trizol(生产厂家:Invitrogen公司);大容量cDNA逆转录Kti(200 Reactions)(生产厂家:Applied Biosystems);荧光定量PCR目标基因和内参GAHDP(Primer Premier 5.0软件设计,Invitrogen公司合成);PCR扩增系统(购自Applied Biosystems)。

1.3 标本收集及人外周血单核细胞(PBMC)分离

清晨空腹条件下,以含有二胺四乙酸(EDTA-K₂)抗凝剂的采集管采集所有研究对象采集外周静脉血2ml,应用Ficoll-Hypaque并按照操作说明,采取密度梯度离心法分离PBMC,并采用贴壁法去除PBMC,收集剩余的淋巴细胞,用于总RNA的提取。

1.4 总RNA提取

在液氮中进行细胞研磨使其呈粉末状,加入Trizol 1 mL,于室温下放置5 min;加入氯仿0.2 mL并混合均匀后,于4℃,12 000 r/min条件下离心10分钟,取最上层溶液约500 μ L,置于另一离心管中,每1 mL Trizol试剂加入0.5 mL异丙醇,室温放置20 min后,4℃,12 000 r/min再次离心10 min,弃上清液;加入提前预冷的75%乙醇1 mL,混合均匀后,4℃,12 000 r/min离心3分钟,弃上清液,干燥5到10 min后,加入约20~50 μ L DPEC水溶解;通过紫外分光光度法检测RNA溶液的浓度和纯度。

1.5 Beclin1基因表达测定

1.5.1 反应体系

配制含有5 \times gDNA Eraser Buffer、gDNA Eraser及总RNA的反应混合液,再分装到每个反应管中,最后加入RNA样品,于42℃作用2 min或室温5 min,即得RNA反应液;冰浴条件下,取RNA反应液10 μ L,分别加入RT Primer Mix、Prime Script RT Enzyme Mix I各1 μ L及5 \times PrimeScript Buffer 2

(for Real Time) 4 μ L,最后加入双蒸水使总量为 20 μ L,37 $^{\circ}$ C,反应条件为 15 min, 85 $^{\circ}$ C 5 s,4 $^{\circ}$ C循环。

1.5.2 实时定量 RT-PCR

目的基因和内参 GAPDH 分别扩增 40 个循环,二者反应体系和条件相同。扩增序列见表 1。反应体系:Sybergreen 10 μ L,上下游引物(10 μ mol/L)各 0.8 μ L,cDNA1.5 μ L,加双蒸水至 20 μ L。PCR 反应条件:95 $^{\circ}$ C,2 min;95 $^{\circ}$ C,15s,60 $^{\circ}$ C,1 min,40 个循环;所得产物保存于 4 $^{\circ}$ C 条件。经实时定量 PCR 测定,通过内标物进行均一化处理,计算 Δ CT 值。

表 1 扩增系列

Table 1 Amplification series

名称	序列
GAPDH	正向:5'-TGAAGGTCGGAGTCAACGGATTGGT-3' 反向:5'-AAATGAGCCCCAGCCTTCTCCATG-3'
Beclin1	正向:5'-GGAGGCGTGATGGTGAAC-3' 反向:5'-CTCACAACAGCCTGTGAGGT-3'

1.5.3 PCR 产物半定量分析

于电泳槽中加入 1.5%琼脂糖凝胶及 0.5 \times TBE 电泳液至超过胶面。然后取 PCR 扩增产物 10 μ L,加入 2 μ L 6 \times loading Buffer 并混合均匀后注入凝胶孔内。接通电极,当上样缓冲液中的溴酚蓝迁移至 DNA 片段分离的合适距离时(耗时约 40 min),关闭电源。取出凝胶,用数字成像系统进行扫描分析,计算 Beclin1 的相对密度值,代表其 mRNA 的相对表达水平。

1.6 实验室相关参数

血常规参数主要包括白细胞、中性粒细胞、淋巴细胞及血红蛋白等;风湿免疫参数主要包括抗 dsDNA 抗体、ANA 抗体、抗 Sm 抗体和 APL 阳性;以及补体 C3、LDGs 及 SLEDAI 评分。

1.7 统计学处理

通过 SPSS 25.0 进行统计分析,计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,采用 *t* 检验进行比较;组间计数资料用 *n*(%)表示,行 χ^2 检验。应用 Pearson 相关进行相关分析。*P*<0.05 为差异有统计意义。

2 结果

2.1 两组患儿基本参数比较

SLE 组患儿的 LDGs 比例、抗 dsDNA 抗体比例、SLEDAI 评分及 Beclin1 均明显高于对照组,补体 C3 水平低于对照组,差异有统计学意义(*P*<

0.05);两组患儿的血常规参数、ANA 抗体、抗 Sm 抗体和 APL 阳性比例,比较差异无统计学意义(*P*>0.05)。见表 2。

表 2 两组患儿基本参数比较 $[(\bar{x} \pm s), n(\%)]$

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

参数	SLE 组 (56 例)	对照组 (25 例)	<i>t</i> / χ^2 值	<i>P</i> 值
白细胞($\times 10^9/L$)	3.40 \pm 1.23	3.69 \pm 1.47	0.922	0.359
中性粒细胞($\times 10^9/L$)	5.21 \pm 3.22	5.06 \pm 3.11	0.196	0.845
淋巴细胞($\times 10^9/L$)	1.26 \pm 0.68	1.52 \pm 0.79	1.511	0.135
血小板($\times 10^9/L$)	84.18 \pm 21.45	91.32 \pm 24.20	1.330	0.187
血红蛋白(g/L)	93.08 \pm 19.12	96.83 \pm 20.12	0.802	0.425
抗 dsDNA 抗体	33(58.93)	7(28.00)	6.614	0.010
ANA 抗体	52(92.86)	20(80.00)	2.893	0.089
抗 Sm 抗体	19(33.93)	9(36.00)	0.033	0.856
APL 阳性	17(30.36)	7(28.00)	0.046	0.830
补体 C3(g/L)	0.54 \pm 0.12	1.06 \pm 0.26	9.556	<0.001
LDGs 比例(%)	12.26 \pm 3.08	3.70 \pm 1.18	18.042	<0.001
SLEDAI(分)	8.95 \pm 2.23	7.58 \pm 1.78	2.708	0.008
Beclin1	1.52 \pm 0.54	0.90 \pm 0.32	6.428	<0.001

2.2 不同活动分期患儿参数比较

活动期 SLE 患儿的补体 C3 水平较非活动期患儿低,而 LDGs 比例、抗 dsDNA 抗体比例、SLEDAI 评分及 Beclin1 均高于非活动期患儿,差异有统计学意义(*P*<0.05)。见表 3。

表 3 不同活动分期患儿参数比较 $[(\bar{x} \pm s), n(\%)]$

Table 3 Comparison of parameters of children with different activity stages $[(\bar{x} \pm s), n(\%)]$

组别	<i>n</i>	补体 C3 (g/L)	LDGs 比例 (%)	抗 dsDNA 抗体	SLEDAI (分)	Beclin1
活动期	32	0.44 \pm 0.12	14.35 \pm 3.67	23(71.88)	9.58 \pm 2.74	1.81 \pm 0.72
非活动期	24	0.68 \pm 0.18	9.47 \pm 2.25	9(37.50)	8.11 \pm 1.72	1.14 \pm 0.35
<i>t</i> / χ^2 值		5.657	6.139	5.171	2.457	4.59
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	0.023	0.017	<0.001

2.3 各参数间相关性分析

Pearson 相关可知,SLE 患儿的 LDGs 比例与 SLEDAI 评分及 Beclin1 呈正相关(*P*<0.05),与补体 C3、抗 dsDNA 抗体则无明显相关性(*P*>0.05)。见表 4。

表 4 各参数间相关性分析

Table 4 Correlation Analysis among parameters

参数	LDGs 比例		Beclin1	
	<i>r</i> 值	<i>P</i> 值	<i>r</i> 值	<i>P</i> 值
补体 C3	-0.135	0.245	-0.187	0.106
抗 dsDNA 抗体	0.126	0.278	0.164	0.157
SLEDAI	0.245	0.033	0.138	0.234
LDGs 比例	1.000		0.356	0.002
Beclin1	0.356	0.002	1.000	

3 讨论

尽管 SLE 患者生存率已明显提高,但其长期经受病情迁延反复的折磨,身心健康都严重受损,而目前尚无 SLE 根治方法^[11]。SLE 具有明显的地域差异,可能与遗传、种族及环境等有关;而儿童 SLE 较成年患者具有更高的疾病活动度、更早的脏器受累和更多的免疫抑制剂应用,可能是儿童 SLE 患者病死率高的原因^[12]。

本研究发现 LDGs、抗 dsDNA 抗体比例升高及补体 C3 水平下降是儿童患 SLE 的表现特征。而活动期 SLE 患儿的补体 C3 水平较非活动期患儿低,LDGs 比例、抗 dsDNA 抗体比例、SLEDAI 评分均高于非活动期患儿;提示 LDGs 可能是影响 SLE 活动的关键因素。国内外研究发现,83%的 LDGs 水平升高的 SLE 患者出现血管炎、滑膜炎等皮肤受累典型症状;LDGs 数量的增加,可能是 SLE 患者动脉粥样硬化发病的基础^[8,13]。这均说明 LDGs 是活动性 SLE 的重要标志物。其作用机制还不清楚,可能是^[14]:①LDGs 通过释放中性粒细胞胞外诱捕网(NETs),在抗菌的同时导致患者自身免疫性疾病的发生;②LDGs 是 IFNs 的促进剂,而 IFNs 在 SLE 发病中具有重要作用,且 IFN- α 可反过来使 LDGs 杀死内皮细胞和合成 IFN- α 的能力得到增强。但相关性分析中,SLE 患儿的 LDGs 比例与 SLEDAI 评分相关性较弱,可能与研究纳入的病例数相对较少有关,有待更进一步研究予以证实。

自噬受多种基因调控,不同病理状态下表现不同^[15]。Beclin1 是自噬的必要标志之一,约有 40%~70% 的散发性卵巢癌、乳腺癌和前列腺癌患者缺失 Beclin1 等位基因,而 Beclin1 的稳定转染可激发细胞的自噬功能,抑制肿瘤细胞系的成瘤性^[16]。研究证明,SLE 患者的外周血淋巴细胞中 Beclin1 表达上调,尤以活动期 SLE 更为显著。本研究结果与上述研究相符,提示 Beclin1 可能在儿童 SLE 的活动中发挥一定作用,但未发现 Beclin1 与 SLEDAI 的明显相关性,可能与样本数相对偏少有关。另外,SLE 患儿的 LDGs 与 Beclin1 呈正相关,推测可能与 NETs 的形成有关,SLE 状态刺激下,LDGs 通过多条不同通路释放 NETs,其中就包括自噬,而 Beclin1 则是重要的自噬基因^[6]。有研究通过曲美他嗪抑制小鼠自噬功能,可减少其 NETs 生成^[17]。但关于 LDGs 与 Beclin1 的相关研究报道仍

较少,其作用机制仍需进一步研究。

综上,SLE 患儿 LDGs 和 Beclin1 表达水平显著升高,二者在 SLE 的发生发展过程中可能存在相互作用,临床可加以利用,或可为 SLE 治疗提供新的途径。但本研究因纳入样本较少,未能深入阐明 LDGs 和 Beclin1 间作用机制,有待后续更大规模、更加深入的研究。

参考文献

- [1] 潘海峰,冷瑞雪,吴国翠,等.重大自身免疫性疾病的流行病学研究进展[J].中华疾病控制杂志,2018,22(11):1093-1095+1105.
- [2] 李文英,廖湘平. IRF5 与 SLE 的关系及在免疫细胞中的作用研究进展[J].中南医学科学杂志,2020,48(3):315-319.
- [3] 邓江红,李彩凤.提高对儿童系统性红斑狼疮的认识[J].协和医学杂志,2020,11(3):276-282.
- [4] 周燕青,郭茹茹.儿童系统性红斑狼疮预后的影响因素研究进展[J].国际儿科学杂志,2016,43(10):743-747.
- [5] 彭婷,裴华.自噬相关基因 mTOR 信号通路在系统性红斑狼疮发病机制中的作用[J].医学研究生学报,2020,33(1):62-66.
- [6] 周丽彬,周剑涛,丁海峰.低密度粒细胞在自身免疫性疾病中的病理生理作用[J].分子诊断与治疗杂志,2016,8(1):66-69.
- [7] 汤成婕,疏龙强,吴缘开,等.中性粒细胞的免疫抑制亚群及功能和机制研究进展[J].细胞与分子免疫学杂志,2020,36(9):833-842.
- [8] 李悦,王荃,刘聪颖,等. Beclin 1 调控心肌自噬与心血管疾病关系的研究进展[J].长春中医药大学学报,2018,34(4):805-808.
- [9] 陈志强摘,彭世瑜校.美国风湿病学会对系统性红斑狼疮修订的最新标准[J].国际皮肤性病学期刊,1998,24(6):367-368.
- [10] 彭学标.系统性红斑狼疮患者自噬相关基因的表达[J].中国麻风皮肤病杂志,2010,26(2):87-88.
- [11] 王红,袁飞飞,戴子薇,等.系统性红斑狼疮患者负性情绪与生活质量典型相关分析[J].中国卫生统计,2019,36(6):802-805.
- [12] 殷蕾,周纬.系统性红斑狼疮危象[J].中国小儿急救医学,2020,27(5):324-329.
- [13] Eve, Mary, Dorothy, et al. Juvenile-onset systemic lupus erythematosus: Update on clinical presentation, pathophysiology and treatment options[J]. Clin Immunol, 2019, 209:1-12.
- [14] López P, Rodríguez-Carrio J, Martínez-Zapico A, et al. Low-density granulocytes and monocytes as biomarkers of cardiovascular risk in systemic lupus erythematosus[J]. Rheumatology (Oxford), 2020, 59(7):1752-1764.
- [15] 王超,潘庆军,刘华锋.系统性红斑狼疮中自噬现象研究进展[J].中国免疫学杂志,2014,(10):1413-1415.
- [16] Ladouceur A, Tessier-Cloutier B, Clarke AE, et al. Cancer and Systemic Lupus Erythematosus[J]. Rheum Dis Clin North Am, 2020, 46(3):533-550.
- [17] 候月辉,朱哲,李覃,等.曲美他嗪抑制自噬减少中性粒细胞胞外核酸网形成[J].中国药理学通报,2020,36(4):527-534.

p33^{ING1}、PDGF-A 及 bFGF 在 ARC 患者晶状体上皮细胞中的表达及临床意义

郭清

[摘要] 目的 分析 p33^{ING1}、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)及血小板源性生长因子 A(PDGF-A) 在年龄相关性白内障(ARC)患者晶状体上皮细胞中的表达及临床意义。方法 选取 2018 年 4 月至 2019 年 4 月本院收治的 67 例 ARC 患者作为 ARC 组,选取同期来院就诊的 70 例近视矫正手术者作为对照组。采用连续环形撕囊法取下 ARC 组和对照组人晶状体中央直径 5 mm 范围内的前囊膜,比较两组 p33^{ING1}、bFGF、PDGF-A mRNA 表达水平,测定各组氧化应激因子[丙二醛(MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)], Pearson 分析 p33^{ING1}、bFGF、PDGF-A mRNA 表达水平与氧化应激因子的相关性。结果 ARC 组 p33^{ING1} 表达水平低于对照组,PDGF-A 及 bFGF mRNA 表达水平高于对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。ARC 组 GSH-Px 水平低于对照组,MDA 水平高于对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。Pearson 分析结果显示:ARC 患者 p33^{ING1} mRNA 表达与 GSH-Px 水平呈正相关关系($P < 0.05$),与 MDA 水平呈负相关关系($P < 0.05$);PDGF-A 及 bFGF mRNA 表达水平与 GSH-Px 水平呈负相关关系($P < 0.05$),与 MDA 水平呈正相关关系($P < 0.05$)。结论 p33^{ING1}、PDGF-A 及 bFGF mRNA 水平在 ARC 患者晶状体上皮细胞中呈异常表达,三者水平与 ARC 患者氧化应激呈明显相关性,检测其水平有利于临床病情评估。

[关键词] p33^{ING1}; bFGF; PDGF-A; 年龄相关性白内障; 晶状体上皮细胞

Expression and clinical significance of p33^{ING1}, PDGF-A and bFGF in lens epithelial cells of patients with age-related cataract

GUO Qing

(Chaoju Ophthalmology Hospital, Inner Mongolia, Hohhot, China, 010050)

[ABSTRACT] **Objective** To analyze the expression and clinical significance of p33^{ING1}, basic fibroblast growth factor (bFGF) and platelet derived growth factor-A (PDGF-A) in lens epithelial cells of patients with age-related cataract (ARC). **Methods** The 67 patients with ARC admitted to this hospital from April 2018 to April 2019 were selected as the ARC group. In the same period, 70 patients who came to the hospital for myoporthosis operation were selected as the control group. The continuous circular capsulorhexis was used to take the anterior capsule within 5 mm from the central diameter of the human lens of patients in the ARC group and the control group. The p33^{ING1}, bFGF, PDGF-A mRNA expression levels of patients between the two groups were compared. The oxidative stress factors [malondialdehyde (MDA), glutathione peroxidase (GSH-Px)] were measured in two groups. Pearson was used to analyze the correlation between the expression levels of p33^{ING1}, bFGF and PDGF-A mRNA and oxidative stress factors. **Results** The expression level of p33^{ING1} in the ARC group was lower than that in the control group, and the expression levels of PDGF-A and bFGF mRNA were higher than those in the control group. The differences were statistically significant ($P < 0.05$). The level of GSH-Px in the ARC group was lower than that in the control group, and the level of MDA

基金项目:内蒙古自治区卫生和计划生育委员会医疗卫生科研计划项目(201802032)

作者单位:内蒙古朝聚眼科医院,内蒙古,呼和浩特 010050

通信作者:郭清, E-mail: guoqing8041@163.com

was higher than that in the control group, the differences were statistically significant ($P < 0.05$). Pearson analysis showed that $p33^{ING1}$ mRNA expression in ARC patients was positively correlated with GSH-Px level ($P < 0.05$), and negatively correlated with MDA level ($P < 0.05$). The *PDGF-A* and *bFGF* mRNA expression levels were negatively correlated with GSH-Px level ($P < 0.05$), and positively correlated with MDA level ($P < 0.05$).

Conclusion The levels of $p33^{ING1}$, *PDGF-A* and *bFGF* mRNA are abnormally expressed in lens epithelial cells of patients with ARC. The levels of the three indicators are significantly correlated with oxidative stress in patients with ARC. The detection of their levels is beneficial to clinical assessment.

[KEY WORDS] $p33^{ING1}$; bFGF; PDGF-A; Age-related cataract; Lens epithelial cells

白内障为晶状体发生混浊,阻碍光线进入眼内,从而对视力造成影响的一种眼病^[1]。年龄相关性白内障(age-related cataract, ARC)发生频率较高,是导致老年人盲目的主要原因^[2]。近年来,国内外学者均从静态到动态对晶状体的相关化学成分、含量和代谢进行了大量研究,但迄今为止有关ARC的发病机制仍未完全清晰。生长抑制因子1(inhibitor of growth 1, INGI)定位于人染色体13q33-34,其编码的蛋白产物为核蛋白^[3]。INGI mRNA有INGIa、INGIb、INGIc多种不同的变位剪接模式,编码着 $p47^{INGIa}$ 、 $p33^{INGIb}$ 、 $p24^{INGIc}$ 三种不同的蛋白质^[4]。有研究认为 $p33^{INGI}$ 的过表达可促进由“血清饥饿”诱导的细胞凋亡,但关于其与ARC的关系鲜有报道^[5]。碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)存在于多种动物和人的眼组织中,近来研究发现其与白内障关系密切^[6]。血小板源性生长因子A(Platelet derived growth factor-A, PDGF-A)作为一种由多种细胞产生分泌的活性多肽,与多种眼科疾病的关系一直是临床关注焦点^[7]。本研究就 $p33^{INGI}$ 、PDGF-A及bFGF在年龄相关性白内障患者晶状体上皮细胞中的表达及临床意义进行分析,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 基线资料

选取2018年4月至2019年4月本院收治的67例ARC患者作为ARC组,其中男37例,女30例,平均年龄(69.31 ± 5.44)岁。纳入标准:(1)符合ARC的诊断标准^[5]:①年龄在50岁及以上者;②使用晶状体混浊分级系统II(lens opacity classification system II, LOCS II)^[8]确定为皮质型晶状体混浊、核型晶状体混浊和后囊下型晶状体混浊,并排除对视力无影响的点状混浊;③日常生活视力在0.7以下;④白内障手术后人工晶状体和无晶状体

眼者或患者双眼中有1眼满足ARC诊断标准也可诊断为ARC。⑤纳入研究前1个月内未服用过影响激素水平、免疫功能的药物。排除标准:①视力下降原因包括角膜疾病、眼底疾病等的患者;②精神系统异常者;③依从性差者。

对照组选取同期来院进行准分子激光屈光性角膜切削术治疗的近视者70例,39例,女31例,平均年龄(68.45 ± 5.41)岁。纳入标准:①眼部功能无异常,无任何眼部疾病;②最佳矫正视力在0.5及以上者;③晶状体无混浊。所有标本的采集均获得患者本人同意并签署知情同意书,本研究经医院伦理委员会批准通过。ARC组与对照组基线资料比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

1.2 方法

1.2.1 晶状体上皮细胞前处理

采用连续环形撕囊法取下ARC组和对照组人晶状体直径约为5 mm内的前囊膜,95% NaCl溶液冲洗好后,置于EP管,保存于 -80°C 冰柜中备用。

1.2.2 $p33^{INGI}$ 、PDGF-A及bFGF检测

采用实时荧光定量PCR法进行检测:取上述液氮保存的晶状体上皮细胞组织,按照Trizol试剂盒说明书操作提取组织总RNA,按照miRNA反转录试剂盒操作步骤将2 μg RNA反转录为cDNA,之后按照SYBR Green RCR master mix试剂说明配反应体系并加样。RT q-PCR反应体系共为20 μL : SYBR Premix Ex Taq II (2 \times) 10 μL , cDNA 2.0 μL , 上下游引物各0.8 μL , ROX Reference Dye II (50 \times) 0.4 μL , 双蒸水 ddH₂O 6.0 μL 。完成后将其放入荧光定量PCR仪上进行反应,程序设定为:95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 共41个循环,72 $^{\circ}\text{C}$ 终延伸10 min。反应结束后整理数据,并对所得数据Ct值进行分析,采用 $2^{-\Delta\text{Ct}}$ ^[14]算法计算 $p33^{INGI}$ 、PDGF-A及bFGF mRNA的相对表达量^[9]。

1.3 氧化应激因子水平测定

取出提前备好的标本,分离3 mm×3 mm,加入磷酸缓冲液(pH 7.3),涡旋震荡,-4℃环境下进行离心。检测指标为丙二醛(Malondialdehyde, MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(Glutathione peroxidase, GSH-Px),检测方法为酶联免疫吸附试验。

1.4 统计学方法

应用SPSS 20.0统计学软件进行分析,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,行t检验;相关性采用Pearson分析,以P<0.05为差异有统计学意义。

2. 结果

2.1 ARC组与对照组p33^{ING1}、PDGF-A及bFGF mRNA表达比较

ARC组p33^{ING1}表达水平低于对照组,PDGF-A及bFGF mRNA表达水平高于对照组,差异均有统计学意义(P<0.05)。见表1。

表1 两组p33^{ING1}、PDGF-A及bFGF mRNA表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of p33^{ING1}, PDGF-A and bFGF mRNA expression levels between 2 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	p33 ^{ING1} mRNA	PDGF-A mRNA	bFGF mRNA
ARC组	67	0.44±0.13	1.06±0.25	265.62±15.18
对照组	70	0.87±0.21	0.54±0.13	134.09±14.07
t值		14.335	15.368	52.627
P值		<0.001	<0.001	<0.001

2.2 ARC组与对照组氧化应激水平比较

ARC组GSH-Px水平低于对照组,MDA水平高于对照组,差异均有统计学意义(P<0.05)。见表2。

表2 ARC组与对照组氧化应激水平比较($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of oxidative stress level between arc group and control group ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	MDA (μmol/mg)	GSH-Px (μmol/g)
ARC组	67	18.09±2.34	0.36±0.04
对照组	70	6.98±1.13	0.87±0.08
t值		35.624	46.869
P值		<0.001	<0.001

2.3 ARC患者p33^{ING1}、PDGF-A及bFGF mRNA表达与氧化应激水平的相关性

ARC患者p33^{ING1} mRNA表达与GSH-Px水平呈正相关关系(P<0.05),与MDA水平呈负相关关系(P<0.05);PDGF-A及bFGF mRNA表达水平与GSH-Px水平呈负相关关系(P<0.05),与MDA水平呈正相关关系(P<0.05)。见表3。

表3 ARC患者p33^{ING1}、PDGF-A及bFGF mRNA表达与氧化应激水平的相关性分析

Table 3 Correlation Analysis of p33^{ING1}, PDGF-A and bFGF mRNA expression and oxidative stress level in patients with ARC

指标	MDA		GSH-Px	
	r值	P值	r值	P值
p33 ^{ING1} mRNA	-0.659	<0.001	0.674	<0.001
PDGF-A mRNA	0.864	<0.001	-0.798	<0.001
bFGF mRNA	0.749	<0.001	-0.854	<0.001

3 讨论

ARC发生机制十分复杂,虽然通过手术能很好地使该症患者恢复视力,但是在疾病发展和治疗过程中,可导致多数患者的生活质量明显下降。同时由于手术潜在的风险也给患者带来了严重的身心负担,因此更全面更深入地探讨该病的病因及防治方法显得尤为迫切^[10]。晶状体接受外界环境影响最早的部位是位于晶状体前囊下的晶状体上皮细胞,当此类细胞发生改变的同时也会诱发晶状体发生改变,相关学者认为ARC的发生与此类细胞的改变有很大程度的关联性^[11-12]。

在一例紫外线、H₂O₂及钙离子载体引导的白内障晶状体离体实验中,发现了晶状体上皮细胞中存在着大量的凋亡细胞,这一发现有力地佐证了晶状体上皮细胞的凋亡可能是各种白内障发生的共同细胞学基础这一理论^[13]。p33^{ING1}是近年来新发现的一种生长抑制基因,具有促进细胞凋亡、抑制细胞生长的作用^[14]。研究发现,p33^{ING1}表达受抑制将增加NIH3T3细胞的集落形成、延长二倍体成纤维细胞的生存时间^[15]。而p33^{ING1}表达下调则可抑制细胞凋亡,控制细胞生长速度,并促进细胞逃离生长监控,导致细胞过度增生而发生病变。本研究中可见ARC患者晶状体上皮细胞中p33^{ING1} mRNA呈低表达,p33^{ING1} mRNA与GSH-Px水平呈正相关,与MDA水平呈负相关,与既往文献报道结果相一致^[16]。提示p33^{ING1} mRNA可能参与ARC晶体混浊的过程。

PDGF-A是功能最强的生长因子之一,其通过自分泌或旁分泌调节,对多种疾病的进展至关重要,并与患者不良预后相关。文献指出,正常人房水内PDGF-A主要功能是维持晶状体上皮细胞的正常增殖和分化,为晶状体实现正常功能提供基础^[17]。本研究中,ARC患者PDGF-A水平高于对

对照组, *PDGF-A* 水平与 *GSH-Px* 水平呈负相关, 与 *MDA* 水平呈正相关。 *PDGF-A* 通过影响晶状体上皮细胞质内钙离子的浓度实现对晶状体上皮细胞的调节, 而一旦 *PDGF-A* 浓度发生异常, 其将发挥有丝分裂作用导致晶状体上皮细胞不正常的增殖^[18-19]。因此, 可以推测 *PDGF-A* 的水平及分布不正常很可能是导致晶状体上皮细胞发生异变, 导致白内障发生的原因之一。

本研究结果中, *ACR* 患者晶状体上皮细胞中 *PDGF-A* mRNA 水平的表达显著升高, 且 *PDGF-A* mRNA 表达水平与 *GSH-Px* 水平呈负相关关系, 与 *MDA* 水平呈正相关关系, 可见 *PDGF-A* mRNA 与 *ARC* 的发生关系密切, 并发挥了重要作用。晶状体代谢过程中会通过多种方式分泌一些细胞因子, 弥补氧化应激对其造成的伤害, 进而为细胞的正常生长、分化提供支持, 在这些细胞因子中 *p33^{ING1}*、*PDGF-A* 及 *bFGF* mRNA 的价值和地位不容小觑, 三者有望成为评价 *ACR* 发生、病情进展的标志性指标。

综上所述, *p33^{ING1}*、*PDGF-A* 及 *bFGF* mRNA 水平在 *ARC* 患者晶状体上皮细胞中呈异常表达, 三者水平与 *ARC* 患者氧化应激呈明显相关性, 检测其水平有利于临床病情评估。

参考文献

- [1] Stuart K, Mingguang H. Risk factors for age-related cataract: Editorial[J]. Clin Exp Ophthalmol, 2018, 46(4):327-328.
- [2] Id TG, Grivet D, Id GT, et al. Using Optical Quality Analysis System for predicting surgical parameters in age-related cataract patients[J]. PLoS ONE, 2020, 15(10):1463-1469.
- [3] 张红振, 王二丽. 白内障患者 NOS, DPP 及 TFAR19 蛋白的表达及临床意义[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(12):1727-1731.
- [4] Li XH, Li D, Liu C, et al. p33ING1b regulates acetylation of p53 in oral squamous cell carcinoma via SIR2[J]. Canc Cell Internat, 2020, 20(1):1232-1236.
- [5] Singh J, Sharma K, Frost EE, et al. Role of PDGF-A-Activated ERK Signaling Mediated FAK-Paxillin Interaction in Oligodendrocyte Progenitor Cell Migration[J]. J Molec Neurosci, 2019, 34(9):8495-8499.
- [6] 凌宇, 彭子春, 唐琪, 等. rb-bFGF 滴眼液与羟糖苷滴眼液对年龄相关性白内障术后泪膜稳定性及干眼症状的影响[J]. 国际眼科杂志, 2018, 18(1):104-107.
- [7] Patel R, Zenith RK, Chandra A, et al. Novel Mutations in the Crystallin Gene in Age-Related Cataract Patients from a North Indian Population[J]. Mol Syndromol, 2017, 46(32):1891-1895.
- [8] Lin CH, Shih CC. Potential Protective Activities of Extracts of *Phellinus linteus* and the Altered Expressions of *GSTM3* on Age-Related Cataract[J]. Evidence-based Complem Altern Med, 2021, 32(19):1-9.
- [9] Aslam S, Khosa T, Akbar A, et al. Single Nucleotide Polymorphism (rs7543472) in *EPHA2* gene is associated with Age-related Cataract in subjects enrolled from Multan in Southern Punjab: a case-control study[J]. J Pakist Med Assoc, 2020, 46(58):431-435.
- [10] 吴小玲, 陈晓雅, 谭丽容, 等. 白内障手术患者术后发生感染性眼内炎相关因素和围术期护理[J]. 中华医院感染学杂志, 2018, 28(4):578-581.
- [11] Jeria S, Aggarwal A, Singh K, et al. Assessment of Age-related Cataract using Scheimpflug Imaging System and its Correlation with Phacoemulsification Parameters[J]. J Clin Diagn Res, 2020, 14(6):1600-1605.
- [12] Cui YL, Yu X N, Zhang X, et al. Association of *IGF1R* polymorphisms (rs1546713) with susceptibility to age-related cataract in a Han Chinese population[J]. Internat J Ophthalmol, 2020, 13(3):469-472.
- [13] Gong Y, Zhang X, Chen R, et al. Cytoplasmic expression of C-MYC protein is associated with risk stratification of mantle cell lymphoma[J]. PeerJ, 2017, 5(2):3457-3461.
- [14] 张余黄, 殷鹏飞, 姚书鹏. 人胃癌组织中生长抑制因子 p33ING1 的表达及其与患者临床病理参数的关系[J]. 海南医学, 2019, 30(22):2890-2893.
- [15] 朱博, 宋超, 王丹娜, 等. p33ING1 在胃癌中的表达及其临床意义[J]. 蚌埠医学院学报, 2018, 43(2):26-29.
- [16] Gouveia L, Betsholtz C, Andrae J. PDGF-A signaling is required for secondary alveolar septation and controls epithelial proliferation in the developing lung[J]. Development, 2018, 145(7):161976.
- [17] Scheuer T, Klein LS, C Bühner, et al. Transient Improvement of Cerebellar Oligodendroglial Development in a Neonatal Hyperoxia Model by PDGFA Treatment[J]. Developm Neurobiol, 2019, 15(23):78-79.
- [18] Ahmed I, Sozmen M. Expression of PDGF-A, PDGFRA, integrin subunit alpha V and selectin E is increased in canine cutaneous fibrosarcomas[J]. Biotechn Histochem, 2020, 46(89):316-321.
- [19] Schfer KH, Saffrey MJ, Burnstock G. Trophic actions of 2-chloroadenosine and bFGF on cultured myenteric neurones[J]. Neuroreport, 2019, 24(6):937-941.

炔雌醇环丙孕酮片联合二甲双胍治疗PCOS的SHBG、GLP-2及PYY水平变化

王伟^{1*} 张翠云² 李金英¹ 宫月娇³ 康晓静¹

[摘要] **目的** 分析炔雌醇环丙孕酮片联合二甲双胍治疗多囊卵巢综合征(PCOS)的性激素结合球蛋白(SHBG)、胰高血糖素样肽-2(GLP-2)及酪酪肽(PYY)水平变化。**方法** 选取本院2018年6月至2019年9月收治的106例PCOS患者作为研究组,其中I型患者13例,II型患者19例,III型患者43例,IV型患者31例,另选取同期在本院门诊体检的120例健康人群作为健康对照组。比较不同人群、不同时期SHBG、GLP-2及PYY水平变化趋势,采用Pearson分析,绘制散点图,分析治疗前SHBG、GLP-2及PYY水平与患者病情程度的相关性。**结果** 治疗前研究组SHBG、GLP-2及PYY水平均显著低于健康对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。治疗前不同亚型SHBG、GLP-2及PYY水平显示:IV型>III型>II型>I型,差异有统计学意义($P<0.05$)。Pearson相关性分析结果显示:治疗前SHBG、GLP-2及PYY水平与PCOS病程分型呈正相关($P<0.05$)。PCOS患者治疗后SHBG、GLP-2及PYY水平明显高于治疗前,差异均有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 炔雌醇环丙孕酮片联合二甲双胍治疗PCOS患者临床疗效显著,可提升患者SHBG、GLP-2及PYY水平,检测上述水平可为临床评估PCOS患者病情进展情况提供参考。

[关键词] SHBG; GLP-2; PYY; PCOS

Changes of SHBG, GLP-2 and PYY levels in patients with PCOS treated with ethinyl estradiol and cyproterone tablets combined with metformin

WANG Wei^{1*}, ZHANG Cuiyun², LI Jinying¹, GONG Yuejiao³, KANG Xiaojing¹

(1. Department of Obstetrics and Gynecology, Qinhuangdao Workers' Hospital, Qinhuangdao, Hebei, China, 066200; 2. Department of Internal Medicine, Qinhuangdao Workers' Hospital, Qinhuangdao, Hebei, China, 066200; 3. Department of Ultrasound, Qinhuangdao Workers' Hospital, Qinhuangdao, Hebei, China, 066200)

[ABSTRACT] **Objective** To analyze changes of sex hormone-binding globulin (SHBG), glucagon like peptide-2 (GLP-2) and Peptide YY (PYY) levels in patients with polycystic ovary syndrome (PCOS) treated with ethinyl estradiol and cyproterone tablets combined with metformin. **Methods** A total of 106 patients with PCOS admitted to this hospital from June 2018 to September 2019 were selected as the study group, including 13 cases in type I, 19 cases in type II, 43 cases in type III and 31 cases in type IV. In addition, 120 healthy people who had physical examination in the outpatient clinic of this hospital during the same period were selected as the healthy control group. The changes of SHBG, GLP-2 and PYY levels in different groups and different periods were compared. Pearson analysis and scatter plot were used to analyze the correlation between the levels of SHBG, GLP-2 and PYY before treatment and the patient's condition. **Results** Before treatment, the levels of SHBG, GLP-2 and PYY in the study group were significantly lower than those in the healthy control group, and the differences were all statistically significant ($P<0.05$). The different subtypes and the severity of

基金项目:秦皇岛市科学技术研究与发展计划任务书(201805A098)

作者单位:1. 秦皇岛市工人医院妇产科,河北,秦皇岛 066200

2. 秦皇岛市工人医院内科,河北,秦皇岛 066200

3. 秦皇岛市工人医院超声科,河北,秦皇岛 066200

*通信作者:王伟, E-mail:cb18703353889@163.com

the disease before treatment showed that the levels of SHBG, GLP-2 and PYY increased significantly with the severity of the disease, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). The Pearson correlation analysis showed that before treatment, the levels of SHBG, GLP-2 and PYY were positively correlated with the type of PCOS course ($P<0.05$). The levels of SHBG, GLP-2 and PYY after treatment in PCOS patients were significantly higher than those before treatment, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** Ethinyl estradiol and cyproterone tablets combined with metformin have a significant clinical effect in the treatment of patients with PCOS, which can increase the levels of SHBG, GLP-2 and PYY in patients. The detection of the three can provide a reference for clinical assessment of the progress of patients with PCOS.

[KEY WORDS] SHBG; GLP-2; PYY; PCOS

多囊卵巢综合征(polycystic ovary syndrome, PCOS)是引起不排卵性不孕的主要原因^[1]。PCOS具有月经紊乱、痤疮、不孕、胰岛素抵抗等临床表现,对患者身体健康造成严重不良影响^[2]。目前,临床对于该类患者的治疗以降低雄激素及胰岛素水平为目标。如何早期明确PCOS疾病进展,并有效治疗及控制该疾病是目前研究热点^[3]。相关研究发现,性激素结合球蛋白(sex hormone-binding globulin, SHBG)可运输游离状态的雄激素,阻止雄激素发挥生物活性^[4]。研究显示,胰高血糖素样肽-2(Glucagon like peptide-2, GLP-2)对肠粘膜具有调节作用,可改善肠粘膜通透性,从而使胰岛素抵抗改善^[5]。酪酪肽(Peptidyy, PYY)系临床上用于判断影响糖代谢的因子,近年来研究报道其在PCOS患者中呈低表达状态^[6]。本研究对PCOS患者的资料进行整理分析,旨在探讨炔雌醇环丙孕酮片联合二甲双胍治疗PCOS的SHBG、GLP-2及PYY水平变化情况,为临床诊治提供理论指导。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取本院2018年6月至2019年9月收治的106例PCOS患者作为研究组,平均年龄(29.01 ± 8.42)岁,平均BMI(26.84 ± 1.72) kg/m^2 。纳入标准:①所有患者均符合PCOS^[7]的诊断标准;②临床资料完整且未中途退出研究者。排除标准:①近六个月口服避孕药、降压药、激素药物治疗者;②对本研究使用药物过敏者;③依从性差者。根据多囊卵巢综合征中国诊疗指南^[8]将PCOS患者进行分型:I型患者13例,II型患者19例,III型患者43例,IV型患者31例。选取同期在本院门诊体检的120例健康人群作为健康对照组,平均年龄(29.83 ± 8.12)岁,平均BMI(26.57 ± 1.66) kg/m^2 。两组一般资料比较差异无统计学意义($P>0.05$)。本研究经医院伦理委员

会批准,受试者均签署知情同意书。

1.2 治疗方法

PCOS患者以炔雌醇环丙孕酮片(德国拜耳医药保健有限公司,国药准字J20140114)联合二甲双胍(中美上海施贵宝制药有限公司,国药准字H20023370)治疗,其中,炔雌醇环丙孕酮片使用方法为每天口服一片,连续使用二十一天后停药,直至月经来潮第五天开始继续使用,连续使用三个周期;二甲双胍治疗方式为每天口服三次,每次500 mg,连续治疗三个月。

1.3 测定方法

对照组于体检当日、研究组于治疗前后空腹状态抽取肘静脉血3 mL,采用电化学发光分析仪(美国罗氏公司E411型)检测SHBG,采用酶联免疫吸附试验(瑞典雷度公司CDE68型)测定GLP-2、PYY水平,以上检测由相关操作人员严格按照说明书进行。

1.4 统计学分析

采用SPSS 22.0软件进行统计分析,计量资料采用($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用 t 检验,多组间比较采用 F 检验;计数资料采用 $n(\%)$ 表示,采用 χ^2 检验;采用Pearson法对各参数进行相关性分析,绘制散点图评价,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 治疗前两组SHBG、GLP-2及PYY水平比较

治疗前研究组SHBG、GLP-2及PYY水平均显著低于健康对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表1。

2.2 不同亚型患者治疗前SHBG、GLP-2及PYY水平比较

治疗前不同亚型SHBG、GLP-2及PYY水平显示:IV型>III型>II型>I型,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表2。

表1 治疗前两组 SHBG、GLP-2 及 PYY 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of SHBG, GLP-2 and PYY levels between the two groups before treatment ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	SHBG(nmol/L)	GLP-2(ng/mL)	PYY(pg/mL)
研究组	106	46.85±15.32	10.74±5.46	55.31±18.21
健康对照组	120	73.51±22.06	16.03±2.08	86.15±18.42
t 值		10.148	9.838	12.627
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

表2 不同亚型 SHBG、GLP-2 及 PYY 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of SHBG, GLP-2 and PYY levels in different subtypes ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	SHBG(nmol/L)	GLP-2(ng/mL)	PYY(pg/mL)
I 型	13	33.06±2.84	7.06±1.03	40.06±2.89
II 型	19	41.06±5.71 ^a	9.34±1.48 ^a	51.37±5.17 ^a
III 型	43	50.87±6.31 ^{ab}	13.84±1.97 ^{ab}	60.08±7.04 ^{ab}
IV 型	31	57.42±4.75 ^{abc}	15.06±1.94 ^{abc}	70.06±3.51 ^{abc}
F 值		76.75	88.55	107.76
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

注:与 I 型比较,^a*P*<0.05;与 II 型比较,^b*P*<0.05;与 III 型比较,^c*P*<0.05。

2.3 治疗前 SHBG、GLP-2 及 PYY 水平与 PCOS 患者病程分型相关性

相关性分析结果显示,治疗前 SHBG、GLP-2 及 PYY 水平均与 PCOS 患者病程分型呈正相关 (*P*<0.05)。见表 3。

表3 治疗前 SHBG、GLP-2 及 PYY 水平与 PCOS 患者病程分型相关性

Table 3 Correlation between SHBG, GLP-2 and PYY levels and course of PCOS before treatment

指标	r 值	P 值
SHBG	0.972	<0.001
GLP-2	0.899	<0.001
PYY	0.915	<0.001

2.4 治疗前后 PCOS 患者 SHBG、GLP-2 及 PYY 水平比较

PCOS 患者治疗后 SHBG、GLP-2 及 PYY 水平明显高于治疗前,差异均有统计学意义 (*P*<0.05)。见表 4。

表4 治疗前两组 SHBG、GLP-2 及 PYY 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Comparison of SHBG, GLP-2 and PYY levels between the two groups before treatment ($\bar{x} \pm s$)

时间	SHBG(nmol/L)	GLP-2(ng/mL)	PYY(pg/mL)
治疗前	46.85±15.32	10.74±5.46	55.31±18.21
治疗后	70.21±20.06	15.26±2.51	83.06±19.33
t 值	9.528	7.744	10.758
P 值	<0.001	<0.001	<0.001

3 讨论

近年来 PCOS 的发病率明显升高,其不仅会对女性不孕造成严重影响,还会导致社会生育率降低,影响国民发展^[9]。因此,早期防治 PCOS,积极评估病情、制定合理治疗方案对改善 PCOS 患者预后具有重要意义。

GLP-2 水平是临床上公认的与胰岛素抵抗关系密切的指标,其对肠道粘膜损伤的恢复,肠粘膜屏障功能的保护和减少肠道菌群移位、抑制内毒素吸收等均具有积极作用,可协同改善胰岛素抵抗^[10]。目前对于 GLP-2 水平与 PCOS 患者的发病机制逐渐受到临床关注。PYY 系肠道分泌的胃肠激素,可通过蛋白偶联作用于下丘脑摄食中枢,阻断摄食神经,抑制食欲,延缓胃排空增加饱腹感,使体内能量处于平衡状态^[11]。研究显示,胰岛素抵抗可影响机体肠道改变,使胰岛素靶器官敏感性降低,从而影响血糖代谢,考虑 PYY 与胰岛素抵抗具有一定相关性^[12]。本研究根据最新国际诊断标准,进一步完善 PCOS 患者亚型分型发现,PCOS 患者 SHBG、GLP-2 及 PYY 水平较健康体检者明显降低,且随着病程分型而升高,与上述研究相似,说明以上指标可反映 PCOS 患者疾病程度,可作为疾病程度的评估指标。

研究显示,PCOS 患者发病机制与雄激素水平异常升高及胰岛素抵抗有关,治疗时应以降低雄激素与胰岛素为主^[13]。炔雌醇环丙孕酮片联合二甲双胍是治疗该疾病的有效药物,一方面可抑制黄体生成素减少卵巢雄性激素合成,提高睾酮代谢;另一方面可增强组织器官对药物的敏感性,纠正患者胰岛素抵抗,协同改善激素水平^[14]。本研究中,PCOS 患者治疗后 SHBG、GLP-2 及 PYY 水平明显高于治疗前,证实对患者采用炔雌醇环丙孕酮片联合二甲双胍治疗临床疗效显著。但由于本研究时间短,纳入样本量有限,关于炔雌醇环丙孕酮片联合二甲双胍治疗升高 PCOS SHBG、GLP-2 及 PYY 水平的分子机制尚未明确,后期将进一步扩大样本量进行深入研究。

综上所述,炔雌醇环丙孕酮片联合二甲双胍治疗 PCOS 患者临床疗效显著,可提升 SHBG、GLP-2 及 PYY 水平,检测上述水平可为临床评估 PCOS 患者病情进展情况提供可靠参考。

(下转第 1684 页)

卵巢癌组织中PD-1、PD-L1和Cyclin D1蛋白表达与预后的关系

杜晓丽^{1*} 张东明² 徐洪³

[摘要] **目的** 研究上皮性卵巢癌组织中程序性死亡受体-1(PD-1)、程序性死亡因子1配体(PD-L1)和细胞周期素D1(Cyclin D1)蛋白表达及其与预后的关系。**方法** 选取2016年9月至2017年9月于廊坊市人民医院接受手术治疗的88例上皮性卵巢癌患者,术中采集患者的癌组织和癌旁组织样本各88份。western blot检测样本组织中PD-1、PD-L1和Cyclin D1蛋白相对表达水平;分析PD-1、PD-L1和Cyclin D1蛋白表达与病理特征之间的关系。**结果** 癌组织中PD-1、PD-L1和Cyclin D1蛋白表达水平显著高于癌旁组织,差异均有统计学意义($P<0.05$)。I~II期和G₁~G₂级患者癌组织中PD-1、PD-L1、Cyclin D1蛋白相对表达水平均显著低于III~IV期和G₃级患者,差异均有统计学意义($P<0.05$)。PD-1、PDL-1和Cyclin D1高表达组3年生存率显著低于PD-1、PDL-1和Cyclin D1低表达组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。Pearson相关性分析显示,癌组织中PD-1和PDL-1蛋白表达与Cyclin D1均呈显著的正相关关系($r=0.332, 0.306; P<0.05$)。**结论** 上皮性卵巢癌患者癌组织中PD-1、PD-L1和Cyclin D1蛋白表达与肿瘤的恶性进展有关,有望指导临床靶向治疗药物的研发。

[关键词] 上皮性卵巢癌;程序性死亡受体-1;程序性死亡因子1配体;细胞周期素D1

Relationship between the expression of PD-1, PD-L1 and Cyclin D1 protein and prognosis in ovarian cancer

DU Xiaoli^{1*}, ZHANG Dongming², XU Hong³

(1. Department of Gynecology, Langfang People's Hospital, Langfang, Hebei, China, 065000; 2. 61267 Army Health Company, Beijing, China, 101100; 3. Key Laboratory of Organ Fibrosis in Hebei Province, Tangshan, Hebei, China, 063210)

[ABSTRACT] **Objective** To study the expression of programmed cell death protein 1 (PD-1), programmed death factor 1 ligand (PD-L1) and cyclin D1 (Cyclin D1) proteins in epithelial ovarian cancer (EOC) and their relationship with prognosis. **Methods** During the period from September 2016 to September 2017, 88 EOC patients who received surgical treatment in Langfang People's hospital were enrolled. 88 tumor tissues and adjacent tissues samples were collected during the operation. The relative expression levels of PD-1, PD-L1 and Cyclin D1 proteins in cancer tissues and adjacent tissues of EOC patients were detected by Western blot. The relative expression levels of PD-1, PD-L1 and Cyclin D1 protein in patients with different clinicopathological characteristics were compared. **Results** The expression levels of PD-1, PD-L1 and Cyclin D1 proteins in cancer tissues were higher than those in adjacent tissues, there were significant difference ($P<0.05$). The relative expression levels of PD-1, PD-L1 and Cyclin D1 proteins in cancer tissues of patients at stage I~II and grade G₁-G₂ were lower than those at stage III~IV and grade G₃, the difference was statistical

基金项目:河北省科技支撑计划项目(14277742D)

作者单位:1. 廊坊市人民医院妇科,河北,廊坊 065000

2. 61267部队卫生连,北京 101100

3. 河北省器官纤维化重点实验室,河北,唐山 063210

*通信作者:杜晓丽, E-mail: duxiaoli112233@163.com

significance ($P<0.05$). The 3-year survival rate in PD-1, PD-L1 and Cyclin D1 high-expression patients were lower than that in PD-1, PD-L1 and Cyclin D1 low-expression patients, the difference was statistical significance ($P<0.05$). Pearson correlation analysis showed that the protein expression of PD-1 and PDL-1 in cancer tissues was positively correlated with Cyclin D1 ($r=0.332, 0.306; P<0.05$). **Conclusion** The expression levels of PD-1, PD-L1 and Cyclin D1 in epithelial ovarian cancer tissue are related to the malignant progression of the tumor, which is expected to guide the development of clinical targeted therapy drugs.

[KEY WORDS] Epithelial ovarian cancer; Programmed cell death protein 1; Programmed death 1 ligand; Cyclin D1

卵巢癌是一种常见的妇科恶性肿瘤,以上皮性卵巢癌较为多见,临床主要采用手术联合术前或术后化疗,但术后仍有50%~70%的复发率,预后较差^[1-2]。有研究认为,上皮性卵巢癌的发生与机体免疫功能紊乱引起的肿瘤细胞免疫逃逸有关^[3]。程序性死亡因子1/程序性死亡因子1配体(programmed death 1/programmed death 1 ligand, PD-1/PDL-1)是一组可以调控T细胞活化的关键负性共刺激分子,在机体的细胞免疫中发挥重要作用^[4]。既往研究显示,当PD-1和其受体PDL-1结合时,可以降低已经被抗原活化的效应T细胞的活性,使得T细胞的增殖受到抑制,从而使肿瘤发生免疫逃逸^[5]。细胞周期素D1(Cyclin D1)是调控肿瘤细胞增殖的重要蛋白,可以通过调控肿瘤细胞的分裂增殖,导致细胞癌变^[6]。基于此,本研究推测PD-1/PDL-1和Cyclin D1表达与上皮性卵巢癌的发生和进展关系密切,可能与患者预后关系密切。因此,本研究分析了PD-1/PDL-1和Cyclin D1蛋白在上皮性卵巢癌中的表达,并进一步分析了其表达水平与预后之间的关系,现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取2016年9月至2017年9月于廊坊市人民医院接受手术治疗的88例上皮性卵巢癌患者,平均年龄(53.36 ± 5.01)岁。纳入标准:①所有患者均符合美国肿瘤综合协作网(national comprehensive cancer network, NCCN)2016年颁布的《2016 NCCN卵巢癌临床实践指南(第1版)》^[7]中上皮性卵巢癌的诊断标准;②所有患者病历资料均完整;③均为首次诊断出卵巢癌;④均获得患者或其家属知情同意。排除标准:①存在严重心脑血管、肝、肾疾病,无法耐受手术治疗者;②术前化疗者;③存在精神疾病;④合并其它系统恶性肿瘤者。按国际妇产科联盟(International Federation of Obstetrics and Gyn-

aecology, FIGO)临床分期^[8]: I、II期40例, III、IV期48例;病理分级:G₁、G₂级50例, G₃级38例。本研究经过医院伦理委员会批准同意实施。

1.2 治疗方法

所有患者均参考《2016 NCCN卵巢癌临床实践指南(第1版)》进行手术治疗,根据FIGO分期, I~II期患者行全面分期手术, III~IV期患者行肿瘤细胞减灭术治疗,术中取患者癌组织和癌旁组织(距离癌组织边缘>5 cm)。

1.3 检测指标

取患者卵巢癌癌组织和癌旁组织,剪刀剪碎后使用细胞裂解液提取总蛋白,使用BCA法测定蛋白浓度后,使用SDS-PAGE电泳提取总蛋白,半干法将蛋白转移到PVDF膜后,加入5%脱脂牛奶封闭,再加入一抗(PD-1、PDL-1和Cyclin,稀释比例均为1:1 000)孵育,室温下缓慢摇动30 min后,放入4℃恒温箱中过夜,取出后使用TBST洗涤3遍后,放入二抗反应液中,室温孵育2 h,曝光后以GAPDH(货号:6C5;批号:ab8245;购自:艾博抗(上海)贸易有限公司,稀释比例1:100 0)为内参蛋白,计算PD-1、PDL-1和Cyclin蛋白的相对表达水平。根据PD-1、PDL-1和Cyclin蛋白表达的中位数进行分组^[9],以高于中位数为高表达组,低于中位数为低表达组。

1.4 随访

自患者手术之日起开始随访,术后第1年每3个月经门诊或电话随访,之后2年内每6个月复查1次,以后至少每年复查一次,随访统计患者生存情况(生存、复发、死亡等),随访时间截止2020年9月,共36个月。

1.5 统计学分析

使用SPSS 22.0统计软件进行数据分析,计量资料以($\bar{x}\pm s$)表示,行 t 检验;计数资料以 $n(\%)$ 表示,行 χ^2 检验;生存资料采用Log-rank χ^2 检验;以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 癌组织及癌旁组织中 PD-1、PDL-1 和 Cyclin D1 蛋白表达水平比较

癌组织中 PD-1、PDL-1 和 Cyclin D1 蛋白表达水平显著高于癌旁组织,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 癌组织及癌旁组织中 PD-1、PDL-1 和 Cyclin D1 蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	PD-1	PDL-1	Cyclin D1
癌组织	88	0.78±0.15	0.82±0.16	0.74±0.12
癌旁组织	88	0.23±0.04	0.27±0.05	0.25±0.04
t 值		17.714	16.405	19.369
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

2.2 不同临床病理特征卵巢癌组织中 PD-1、PDL-1 和 Cyclin D1 蛋白表达

FIGO 分期 I、II 期患者癌组织中 PD-1、PDL-1 和 Cyclin D1 蛋白相对表达显著低于 III、IV 期患者,差异均有统计学意义($P < 0.05$),病理分级 G₁~G₂ 级患者癌组织中 PD-1、PDL-1 和 Cyclin D1 蛋白相对表达显著低于 G₃ 级患者,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

2.3 PD-1 表达对患者预后影响

随访 3 年,失访 15 例患者,共获得 73 例患者的生存资料,失访率为 17.05%。采用中位数法将获得生存资料的 73 例患者分为 PD-1 高表达组($n=38$)和低表达组($n=35$)。PD-1 高表达组 3 年生存率,中位生存时间,显著低于 PD-1 低表达组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 3、图 1。

2.4 PDL-1 表达对患者预后影响

采用中位数法将获得生存资料的 73 例患者分为 PDL-1 高表达组($n=37$)和低表达组($n=36$)。PDL-1 高表达组 3 年生存率,中位生存时间,显著

表 3 PD-1 表达对患者预后影响 [$n(\%)$]

组别	n	1 年生存率	2 年生存率	3 年生存率
PD-1 高表达组	38	30(78.95)	22(57.89)	12(31.58)
PD-1 低表达组	35	31(88.57)	26(74.29)	20(57.14)
χ^2 值		1.242	2.074	4.378
P 值		0.265	0.150	0.036

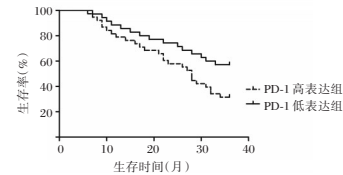


图 1 PD-1 表达对患者预后影响

Figure 1 Effect of PD-1 expression on prognosis of patients
 低于 PDL-1 低表达组的,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 4、图 2。

表 4 PDL-1 表达对患者预后影响 [$n(\%)$]

组别	n	1 年生存率	2 年生存率	3 年生存率
PDL-1 高表达组	37	30(81.08)	21(56.76)	11(29.73)
PDL-1 低表达组	36	31(86.11)	27(75.00)	21(58.33)
χ^2 值		0.349	2.355	5.285
P 值		0.555	0.125	0.022

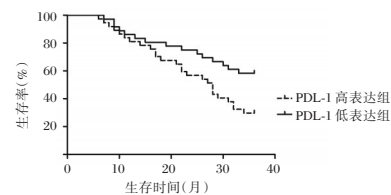


图 2 PDL-1 表达对患者预后影响

Figure 2 Effect of PDL-1 expression on prognosis of patients

2.5 Cyclin D1 表达对患者预后影响

采用中位数法将获得生存资料的 73 例患者分为 Cyclin D1 高表达组($n=35$)和低表达组($n=38$)。Cyclin D1 高表达组 2 年和 3 年生存率,中位生存时间,显著低于 Cyclin D1 低表达组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 5、图 3。

表 2 不同临床病理特征卵巢癌组织中 PD-1、PDL-1 和 Cyclin D1 蛋白表达 ($\bar{x} \pm s$)

病理特征	n	PD-1	t 值	P 值	PDL-1	t 值	P 值	Cyclin D1	t 值	P 值
年龄(岁)	≥50	0.80±0.17	1.532	0.129	0.85±0.18	1.971	0.052	0.76±0.13	1.839	0.069
	<50	0.75±0.12			0.78±0.14			0.71±0.12		
FIGO 分期	I~II 期	0.71±0.17	4.062	<0.001	0.76±0.18	3.322	0.001	0.68±0.13	4.300	<0.001
	III~IV 期	0.84±0.13			0.87±0.13			0.79±0.11		
病理分级	G ₁ ~G ₂	0.73±0.17	3.239	<0.002	0.78±0.18	2.770	0.007	0.70±0.14	3.269	0.002
	G ₃	0.84±0.14			0.88±0.15			0.79±0.11		

表5 Cyclin D1 表达对患者预后影响 [n(%)]

Table 5 The effect of cyclin D1 expression on prognosis of patients [n(%)]

组别	n	1年生存率	2年生存率	3年生存率
Cyclin D1 高表达组	35	27(77.14)	19(54.29)	10(28.57)
Cyclin D1 低表达组	38	34(89.47)	29(76.32)	22(57.89)
χ^2 值		2.037	3.984	6.276
P值		0.154	0.049	0.012

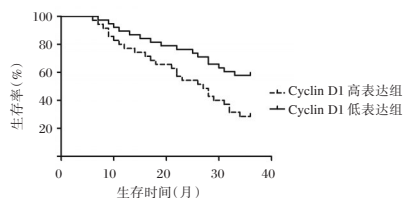


图3 Cyclin D1 表达对患者预后影响

Figure 3 Effect of Cyclin D1 expression on prognosis of patients

2.6 癌组织中 PD-1、PDL-1 和 Cyclin D1 蛋白表达之间的相关性

Pearson 相关性分析显示,癌组织中 PD-1 和 PDL-1 蛋白表达与 Cyclin D1 均呈显著的正相关关系($r=0.332, 0.306; P<0.05$)。

3 讨论

卵巢癌是一种常见的生殖系统恶性肿瘤,其发病机制复杂,与肿瘤的微环境改变和细胞免疫逃逸有关。本研究结果说明 PD-1、PDL-1 和 Cyclin D1 蛋白表达异常升高可能通过调节卵巢癌细胞的恶性生物学行为,促进肿瘤的恶性进展。PD-1/PDL-1 是新近发现的与免疫逃逸有关的基因,PD-1 和其配体 PD-L1 结合可以抑制免疫检查点,激活 PD-1 细胞内的免疫受体酪氨酸抑制基序,减少 T 淋巴细胞的活化和增殖,使得细胞免疫受到抑制,导致肿瘤细胞出现恶性增殖。Cyclin D1 基因是一种细胞周期调控基因,可以调控 G1 期细胞上的 pRb 蛋白,pRb 在 G1 期处于低磷酸化状态,能与转录因子 E2F 等结合,调控细胞周期。钟亚春等^[10]研究显示,乳腺癌患者 PD-1/PDL-1 异常表达与肿瘤的恶性进展有关,可以诱导肿瘤细胞逃避机体的免疫监控。Gwak 等^[11]研究显示,Cyclin D1 可以反映肿瘤细胞的增殖活性,评估抗肿瘤效应。结合本研究结果,说明 PD-1 和 PDL-1 可能通过抑制 T 淋巴细胞功能,改变卵巢癌的微环境,使卵巢癌细胞出现失控增殖,进一步恶化。

本研究生存分析结果显示,PD-1、PD-L1 和 Cyclin D1 蛋白高表达组患者生存率均显著低于低

表达组。研究结果变化可能是因为 PD-1 可以与其配体 PD-L1 结合,抑制 T 细胞的活化,负调控免疫应答;同时随着肿瘤的进展,肿瘤细胞表达的 PD-1 逐渐升高,导致肿瘤免疫逃逸现象更为明显,使得肿瘤细胞增殖和分化完全不受控制,进展迅速,导致患者生存期显著缩短。Mandai 等^[12]研究表明,靶向 PD-1/PD-L1 的肿瘤免疫治疗有望通过改变肿瘤局部的免疫反应,发挥抗肿瘤作用,PD-1 和 PD-L1 蛋白对卵巢癌的预后有着较为重要的影响,有望作为临床新药研发的新靶点。Irawan 等^[13]研究显示,Cyclin D1 蛋白表达水平与肿瘤细胞的有丝分裂进程有关,Cyclin D1 蛋白表达升高,反映肿瘤恶性程度较高,预后较差。建方方等^[14]研究表明,上调 Cyclin D1 蛋白表达可以缩短肿瘤的细胞周期,Cyclin D1 表达升高与卵巢癌细胞恶性增殖有关,其高表达可以降低患者的生存率。

本研究 Pearson 相关性分析结果显示,癌组织中 PD-1 和 PDL-1 蛋白表达与 Cyclin D1 均呈显著的正相关关系。Zhu 等^[15]研究显示,食管鳞状细胞癌组织中 Cyclin D1 与 PD-L1 呈负相关,提示 Cyclin D1 与 PD-L1 之间存在某种相互调控作用。已有研究显示,卵巢癌癌组织中 PD-1、PDL-1 和 Cyclin D1 蛋白均为异常高表达,且与肿瘤的恶性进展和生存时间缩短有关^[16-17]。本研究结果与已有研究存在部分差异,可能是与 PD-1、PDL-1 和 Cyclin D1 高表达参与乳腺癌恶性进展的调控方式存在差异有关。

综上所述,上皮性卵巢癌患者癌组织中 PD-1、PD-L1 和 Cyclin D1 蛋白表达水平显著升高,随着肿瘤的进展 PD-1、PD-L1 和 Cyclin D1 的相对表达量逐渐升高,且 PD-1、PD-L1 和 Cyclin D1 蛋白高表达患者预后较差。

参考文献

- [1] van Zyl B, Tang D, Bowden NA. Biomarkers of platinum resistance in ovarian cancer: what can we use to improve treatment[J]. End Relat Cancer, 2018, 25(5):303-318.
- [2] 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.
- [3] Kim JY, Cho CH, Song HS. Targeted therapy of ovarian cancer including immune check point inhibitor[J]. Korean J Intern Med, 2017, 32(5):798-804.
- [4] Khunger M, Rakshit S, Pasupuleti V, et al. Incidence of pneumonitis with use of programmed death 1 and programmed death-ligand 1 inhibitors in non-small cell lung can-

- cer: a systematic review and meta-analysis of trials [J]. *Chest*, 2017, 152(2):271-281.
- [5] Remon J, Chaput N, Planchard D. Predictive biomarkers for programmed death-1/programmed death ligand immune checkpoint inhibitors in nonsmall cell lung cancer [J]. *Curr Opin Oncol*, 2016, 28(2):122-129.
- [6] Li R, Li Z, Dai C, et al. Chrysophanol inhibits proliferation and induces apoptosis through NF- κ B/cyclin D1 and NF- κ B/Bcl-2 signaling cascade in breast cancer cell lines [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(3):4376-4382.
- [7] 卢淮武, 谢玲玲, 林仲秋. 《2016 NCCN 卵巢癌临床实践指南(第1版)》解读[J]. *中国实用妇科与产科杂志*, 2016, 5(8):761-768.
- [8] Javadi S, Ganeshan DM, Qayyum A, et al. Ovarian cancer, the revised figo staging system, and the role of imaging [J]. *AJR Am J Roentgenol*, 2016, 206(6):1351-60.
- [9] 杨普, 古学萍, 张中冕, 等. 骨桥蛋白在胃癌患者血清中的表达及其对肿瘤转移的作用[J]. *中华实验外科杂志*, 2014, 31(7):1570-1572.
- [10] 钟亚春, 陆璇, 杨泳, 等. PD-1, PDL-1 和 T 淋巴细胞亚群在乳腺癌中的表达及价值[J]. *重庆医学*, 2019, 48(18):80-83+88.
- [11] Gwak H, Kim Y, An H, et al. Metformin induces degradation of cyclin D1 via AMPK/GSK3 β axis in ovarian cancer [J]. *Mol Carcinog*, 2017, 56(2):349-358.
- [12] Mandai M, Hamanishi J, Abiko K, et al. Anti-PD-L1/PD-1 immune therapies in ovarian cancer: basic mechanism and future clinical application [J]. *Int J Clin Oncol*, 2016, 21(3):456-461.
- [13] Irawan C, Cahyanur R, Lisnawati L, et al. The Difference in the Cyclin D1 expression in advanced stage nasopharyngeal cancer based on treatment response: a retrospective cohort study [J]. *Acta Med Indones*, 2020, 52(2):147-154.
- [14] 建方方, 刘华, 冯炜炜, 等. CXCL5 通过上调 Cyclin D1 促进卵巢癌细胞增殖[J]. *现代妇产科进展*, 2018, 27(4):17-20.
- [15] Zhu G, Li X, Li J, et al. Arsenic trioxide (ATO) induced degradation of Cyclin D1 sensitized PD-1/PD-L1 checkpoint inhibitor in oral and esophageal squamous cell carcinoma [J]. *J Cancer*, 2020, 11(22):6516-6529.
- [16] 薛春燕, 谢荃沁, 徐云, 等. PD-L1 和 PD-L2 在卵巢癌组织中的表达及对患者预后判断的价值[J]. *现代免疫学*, 2020, 40(1):3-10.
- [17] 宋艳, 佐晶, 黄璇, 等. 配对盒基因 2 和细胞周期蛋白 D1 在晚期卵巢浆液性腺癌中的表达及临床意义[J]. *中华肿瘤杂志*, 2017, 39(12):891-895.

(上接第 1679 页)

参考文献

- [1] 席彦东, 沈自旺, 白虹. PCOS 患者 IL-17A, Betatrophin, 可溶性 CD68 表达水平及与卵巢功能的关系[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2020, 12(10):64-68.
- [2] 陈德军, 徐一玲, 廉红梅, 等. 二甲双胍联合炔雌醇环丙孕酮片对多囊卵巢综合征患者糖链抗原 125 及胰岛素抵抗的影响[J]. *中国临床药理学杂志*, 2020, 35(18):415-417.
- [3] 李琳. 多囊卵巢综合征运用二甲双胍联合炔雌醇环丙孕酮片治疗的临床效果研究[J]. *世界最新医学信息文摘(连续型电子期刊)* 2020, 20(51):18-19.
- [4] Pourteymour Fard Tabrizi Z, Miraj S, Tahmasebian S, et al. Plasma Levels of miR-27a, miR-130b, and miR-301a in Polycystic Ovary Syndrome [J]. *Int J Mol Cell Med*, 2020, 9(3):198-206.
- [5] Akram V, Fouzieh S, Nariman M, et al. Evaluation of angiopoietin-like protein 3 (ANGPTL3) levels in polycystic ovary syndrome [J]. *Life Sci*, 2020, 263(11):1185.
- [6] Ozgokce C, Elci E, Yildizhan R. C-Reactive Protein, Fibrinogen, Leptin, and Adiponectin Levels in Women with Polycystic Ovary Syndrome [J]. *J Obstetr Gynecol India*, 2020, 12(9):415-417.
- [7] 高競. PCOS 的诊断标准[J]. *国外医学. 妇产科学分册*, 2000, 27(2):425.
- [8] 中华医学会妇产科学分会内分泌学组及指南专家组. 多囊卵巢综合征中国诊疗指南[J]. *中华妇产科杂志*, 2018, 65(1):2-6.
- [9] Budihastuti UR, Melinawati E, Sulistyowati S, et al. Difference of Cyclooxygenase-2 (COX2) Expression in Endometrium Between Patients with Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) and Fertile Women [J]. *Fertil Reprod*, 2019, 15(3):507-508.
- [10] Fouani FZ, Fadaei R, Moradi N, et al. Circulating levels of Meteorin-like protein in polycystic ovary syndrome: A case-control study [J]. *PLoS ONE*, 2020, 15(4):2319.
- [11] Saljoughi F, Nasri K, Bayani M. Gingival crevicular fluid levels of visfatin in patients with chronic periodontitis and polycystic ovary syndrome [J]. *Obstetr, Gynecol Sci*, 2020, 63(1):432.
- [12] Bari F, Catalano A, F Bellone, et al. Vitamin D, Bone Metabolism, and Fracture Risk in Polycystic ovary Syndrome [J]. *Metabolites*, 2021, 11(2):116.
- [13] 王立霞, 李燕, 王晓倩, 等. 探讨二甲双胍与炔雌醇环丙孕酮片治疗多囊卵巢综合征的疗效及其对性激素、血糖的影响[J]. *中国性科学*, 2019, 28(2):73-76.
- [14] 杨鹿鸣, 董士中, 马艳庆. 二甲双胍联合炔雌醇环丙孕酮片治疗多囊卵巢综合征的效果及对相关激素分泌水平的影响[J]. *中国医学工程*, 2019, 27(1):63-65.

Galectin-3、CF6、H-FABP与慢性心衰患者心功能、预后的关系

黄茜雯¹ 苏春燕² 王敏¹ 王佳南¹ 黄倩^{3*}

[摘要] **目的** 研究血清半乳糖凝集素-3(Galectin-3)、偶联因子6(CF6)及心型脂肪酸结合蛋白(h-FABP)水平与慢性心衰患者心功能、预后的关系。**方法** 选取2016年1月至2018年1月本院收治的124例慢性心衰患者(根据美国纽约心脏病学会对CHF患者进行心功能分级,Ⅱ级42例、Ⅲ级37例、Ⅳ级45例)作为研究组,另选取130例同期于本院接受健康体检且结果正常者作为对照组。比较各组间Galectin-3、CF6及H-FABP表达水平差异,记录慢性心衰患者预后情况,采用ROC曲线分析Galectin-3、CF6及H-FABP单项及联合检测水平对慢性心衰患者预后不良的预测价值。**结果** 研究组患者Galectin-3、CF6及H-FABP水平均显著高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。Galectin-3、CF6及H-FABP水平:Ⅳ级组>Ⅲ级组>Ⅱ级组,差异有统计学意义($P<0.05$)。截至随访结束,根据预后情况分为预后良好组($n=91$)及预后不良组($n=33$)。预后良好组患者Galectin-3、CF6及H-FABP水平明显低于预后不良组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。Galectin-3、CF6及H-FABP水平及三者联合曲线下面积分别为0.839、0.789、0.763、0.963,以三者联合曲线下面积检测最大($P<0.05$)。**结论** Galectin-3、CF6及H-FABP水平在慢性心衰患者中呈异常表达状态,临床工作者可通过加强监测这三项指标评估疾病进展及预后。

[关键词] Galectin-3; CF6; H-FABP; 慢性心衰

Relationship between Galectin-3, CF6, H-FABP and cardiac function and prognosis in patients with chronic heart failure

HUANG Qianwen¹, SU Chunyan², WANG min¹, WANG Jianan¹, HUANG Qian^{3*}

(1. Department of Cardiology, Quanzhou First Hospital Affiliated to Fujian Medical University, Quanzhou, Fujian, China, 362000; 2. Department of Laboratory Medicine, Quanzhou First Hospital Affiliated to Fujian Medical University, Quanzhou, Fujian, China, 362000; 3. Department of Teaching and Research Section of Physiology, Basic Medicine, Quanzhou Medical College, Quanzhou, Fujian, China, 362000)

[ABSTRACT] **Objective** To study the relationship between serum galectin-3 (Serum galectin-3, Galectin-3), coupling factor 6 (CF6) and heart fatty acid binding protein (h-FABP) levels, the heart function and prognosis of patients with chronic heart failure. **Methods** The 124 patients with chronic heart failure admitted to this hospital from April 2016 to April 2018 were selected (According to the standards of the New York Society of Cardiology, the cardiac function of patients with CHF was classified, 42 cases in grade II, 37 cases in grade III, and 45 cases in grade IV) as the study group. In addition, 130 patients who had health examination in this hospital during the same period and had normal results were selected as the control group. The differences in the expression levels of Galectin-3, CF6 and H-FABP between the groups were compared, and the prognosis of the patients with chronic heart failure was recorded. ROC curve was used to analyze the

基金项目:泉州市科技计划项目(2018Z066)

作者单位:1. 福建医科大学附属泉州第一医院心内科,福建,泉州 362000

2. 福建医科大学附属泉州第一医院检验科,福建,泉州 362000

3. 泉州医学高等专科学校基础医学部生理教研室,福建,泉州 362000

*通信作者:黄倩, E-mail: yasmin8488@163.com

values of single and combined detection of Galectin-3, CF6 and H-FABP levels in predicting the poor prognosis of patients with chronic heart failure. **Results** The levels of Galectin-3, CF6 and H-FABP in the study group were significantly higher than those in the control group, and difference was statistically significant ($P < 0.05$). The levels of Galectin-3, CF6 and H-FABP were as follows: grade IV group > grade III group > grade II group, and difference was statistically significant ($P < 0.05$). As of the end of the follow-up, according to the prognosis, they were divided into a good prognosis group ($n=91$) and a poor prognosis group ($n=33$). The levels of Galectin-3, CF6 and H-FABP in the good prognosis group were significantly lower than those in the poor prognosis group, and difference was statistically significant ($P < 0.05$). The areas under the Galectin-3, CF6 and H-FABP curves and the area under the combined curve of the three were 0.839, 0.789, 0.763, 0.963, respectively, and the area under the combined curve of the three was the largest ($P < 0.05$). **Conclusion** Galectin-3, CF6 and H-FABP levels show abnormal expression in patients with chronic heart failure. Clinicians can strengthen the monitoring of these three indicators to assess disease progression and prognosis.

[KEY WORDS] Galectin-3; CF6; H-FABP; Chronic heart failure

慢性心力衰竭(chronic heart failure, CHF)是由心肌梗死、心肌病、血流动力学负荷过重、炎症等原因引起初始心肌损伤,造成心肌结构和功能的变化,最后导致心室泵血或充盈功能低下的一组临床综合征^[1]。CHF具有较高的死亡率,严重威胁患者生命安危^[2]。早期对CHF患者进行干预,对改善预后具有重要意义。血清半乳糖凝集素-3(Serum galectin-3, Galectin-3)是临床上评价炎症反应与心肌纤维化表现的有效指标,研究发现其与CHF患者疾病进展及预后关系密切^[3]。偶联因子6(coupling factor 6, CF6)作为氨基酸组成的ATP酶,在急性心梗、肺动脉高压等疾病中呈高表达状态^[4]。心型脂肪酸结合蛋白(heart fatty acid binding protein, h-FABP)是近年来新发现的心肌损伤标志物,其在急性冠脉综合征、心梗等疾病临床诊断中已获得重要临床价值^[5]。本研究就CHF患者与Galectin-3、CF6及H-FABP水平心功能、预后的关系进行研究,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2016年1月至2018年1月本院收治的124例CHF患者作为研究组。纳入标准:①符合CHF诊断标准^[6];②临床资料完整;排除标准:①合并急性心力衰竭、恶性心律失常、肺源性心脏病、先天性心脏病及其他心脏瓣膜病等;②合并肝、肾疾病、严重感染及恶性肿瘤;③近一个月内层出现急性心梗者;④中途退出研究者。根据美国纽约心脏病学会^[6]对CHF患者进行心功能分级,Ⅱ级:42例,Ⅲ级:37例,Ⅳ级:45例。另选取130例同期于本院

接受健康体检且结果正常者作为对照组。两组组一般资料比较差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性,见表1。本研究经医院医学伦理委员会批准通过,受试者或其家属均签署知情同意书。

表1 2组患者临床资料($\bar{x} \pm s$)
Table 1 Clinical data of two groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	男/女	平均年龄	BMI(kg/m ²)
研究组	124	69/55	60.85±9.01	24.34±2.75
对照组	130	78/52	60.73±8.86	23.75±2.95
χ^2/t 值	-	0.493	0.107	1.646
P值	-	0.482	0.914	0.100

1.2 观察指标

1.2.1 Galectin-3、CF6及H-FABP检测

对照组于体检当日、研究组于入院次日抽取受检者清晨空腹静脉血3 mL,置于肝素锂抗凝管中,在低温离心机中离心(3 000 r/min, 15 min)。取400 μ L血浆送检,采用酶联免疫吸附测定Galectin-3、H-FABP水平,试剂盒选择上海鑫乐生物科技有限公司;采用放免分析法测定CF6,试剂盒由美国Phoenix Pharmaceuticals Inc提供;操作过程严格按照说明书进行。

1.2.2 预后

患者出院后每隔三个月进行一次微信、电话等方式随访,记录患者预后情况,包括:心衰再住院、恶性心律失常、心衰恶化、死亡等,均视为预后不良;随访为期2年或患者出现死亡,随访截止日期为2020年1月30日。

1.3 统计学处理

采用统计软件SPSS 22.0进行统计分析,计数资料以 $n(\%)$ 表示,行 χ^2 检验;计量资料使以($\bar{x} \pm s$)

表示,组间比较采用 *t* 检验、多组间比较采用 *F* 检验,采用 ROC 曲线分析 Galectin-3、CF6 及 H-FABP 水平对 CHF 患者预后不良的预测价值,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组 Galectin-3、CF6 及 H-FABP 水平比较

研究组患者 Galectin-3、CF6 及 H-FABP 水平高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 两组 Galectin-3、CF6 及 H-FABP 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)
Table 2 Comparison of galectin-3, CF6 and H-FABP levels between the two groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	Galectin-3 (ng/mL)	CF6 (pg/mL)	H-FABP (μg/L)
研究组	124	21.06±7.43	484.37±68.49	36.71±8.56
对照组	130	5.31±0.24	188.18±25.49	10.03±2.84
<i>t</i> 值	-	24.158	46.078	33.651
<i>P</i> 值	-	<0.001	<0.001	<0.001

2.2 不同心功能等级患者 Galectin-3、CF6 及 H-FABP 水平比较

Galectin-3、CF6 及 H-FABP 水平:IV 级组>III 级组>II 级组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 不同心功能等级患者 Galectin-3、CF6 及 H-FABP 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)
Table 3 Comparison of galectin-3, CF6 and H-FABP levels in patients with different cardiac function grades ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	Galectin-3 (ng/mL)	CF6 (ng/L)	H-FABP (μg/L)
II 级	42	15.21±1.58	422.09±6.21	30.23±2.08
III 级	37	20.11±3.85 ^a	453.16±21.34 ^a	37.14±4.52 ^a
IV 级	45	27.29±3.37 ^{ab}	568.16±45.68 ^{ab}	42.41±3.89 ^{ab}
<i>F</i> 值	-	171.40	283.73	123.88
<i>P</i> 值	-	<0.001	<0.001	<0.001

注:与 II 级组比较,^a $P < 0.05$;与 III 级组比较,^b $P < 0.05$ 。

2.3 124 例 CHF 患者预后及 Galectin-3、CF6 及 H-FABP 水平比较

截至随访结束,124 例 CHF 患者共 33 例(26.21%)出现预后不良情况,根据患者预后情况分为预后良好组($n=91$)及预后不良组($n=33$)。预后良好组患者 Galectin-3、CF6 及 H-FABP 水平明显低于预后不良组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 4。

2.4 Galectin-3、CF6 及 H-FABP 水平对 CHF 患者预后不良的预测价值

Galectin-3、CF6 及 H-FABP 水平及三者联合曲线下面积分别为 0.839、0.789、0.763、0.963,以三者联合曲线下面积检测最大($P < 0.05$)。见表 5 及图 1。

表 4 预后良好组与预后不良组 Galectin-3、CF6 及 H-FABP 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)
Table 4 Comparison of galectin-3, CF6 and H-FABP levels between good prognosis group and poor group ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	Galectin-3 (ng/mL)	CF6 (ng/L)	H-FABP (μ/L)
预后良好组	91	16.62±3.52	426.85±27.41	33.82±2.85
预后不良组	33	33.30±4.41	532.68±60.34	44.67±6.11
<i>t</i> 值	-	21.751	13.405	13.464
<i>P</i> 值	-	<0.001	<0.001	<0.001

表 5 Galectin-3、CF6 及 H-FABP 水平对 CHF 患者预后不良的预测价值
Table 5 predictive value of galectin-3, CF6 and H-FABP levels for poor prognosis in patients with CHF

预测因子	敏感度	特异度	AUC	95%CI	<i>P</i> 值
Galectin-3	0.798	0.746	0.839	0.718~0.960	<0.001
CF6	0.754	0.811	0.789	0.646~0.932	<0.001
H-FABP	0.763	0.796	0.763	0.588~0.937	<0.001
三者联合	0.952	0.736	0.963	0.905~1.000	<0.001

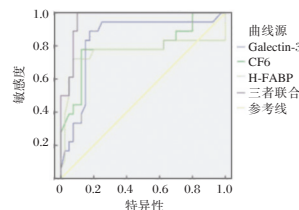


图 1 ROC 曲线
Figure 1 ROC curve

3 讨论

目前对于 CHF 的发病机制尚未明确,研究显示其与冠心病、高血压、感染、劳累等多种因素有关^[7]。现临床对于 CHF 的治疗主要以降低病死率及主要不良心血管事件为主。近年来医疗技术水平虽不断提升,但该疾病的病死率依旧居高不下,如何早期准确评估 CHF 患者疾病情况是现临床研究热点^[8]。

Galectin-3 系半乳糖凝集家族成员之一,广泛存在于线虫到人类等高级动物中,其在细胞与细胞、细胞与基质之间起特异性粘附作用,参与细胞的增殖、分化和局部免疫调节和凋亡等,并与炎症反应、肿瘤生长密切相关^[9]。既往学者研究表明,Galectin-3 参与 CHF 疾病进程,且与患者预后关系密切^[10]。CF6 系线粒体 ATP 酶的亚单位,主要参与 ATP 进程及能量物质转换。研究发现,当机体损伤、组织缺氧及细胞凋亡时均可导致 CF6 生成增加^[11]。H-FABP 是一种存在于细胞及长链脂肪酸的蛋白质,其广泛分布在脂肪、肝脏、心脏等脂肪酸代谢活跃组织中。

H-FABP通过长链脂肪酸将脂肪酸从细胞中转出,并经氧化分解成ATP以便为心肌细胞供能^[12]。

本研究结果发现,研究组患者 Galectin-3、CF6及H-FABP水平显著高于对照组。Wu等^[13]对CHF患者进行研究发现,Galectin-3水平随患者病情恶化显著升高,是预测CHF患者预后情况的早期血清标志物。相关学者曾在动物实验中发现,敲除CHF小鼠 Galectin-3基因后,心肌细胞不再衰竭^[14]。本研究发现 Galectin-3水平与CHF患者心功能分级呈正相关,且预后不良组患者其水平升高尤为显著,与以往文献报道结果相似。考虑与CHF病程进展时,心肌细胞衰竭加剧,导致炎性介质广泛激活释放到血液中,刺激中性粒及巨噬细胞分泌 Galectin-3,导致其水平升高有关^[15]。本研究中可见CF6水平随着CHF患者病情的加重而显著升高,说明CF6水平参与CHF疾病进程。考虑其机制与CF6通过对前列环素的抑制,扰乱血管因子平衡,促使心肌内微血管收缩,加重血管内皮受损,导致疾病进展有关。验证既往文献结果,发现缺氧可诱发心肌及内皮细胞损伤,导致细胞膜通透性增强,引起全身性血管内皮受损,促使CF6生成释放进入血液中,故探究CF6可作为心衰诊治及预后的有效指标^[16-17]。本研究对CHF患者H-FABP水平进行研究,发现其水平变化与CHF患者心功能及预后关系密切,提示其参与疾病病理过程。郗汇聪等^[18]研究显示,一旦心肌受损,体内氧化应激机制增强,会影响脂肪酸供能,导致心肌中H-FABP上升并大量释放。既往临床对于 Galectin-3、CF6及H-FABP三者水平共同参与CHF患者预后的研究较为少见,本研究进一步采用ROC曲线进行预测,发现三者联合检测诊断曲线下面积值最大,证实 Galectin-3、CF6及H-FABP指标对CHF的评估效能,说明联合三指标检测可作为预测患者预后不良的有效手段。

综上所述,Galectin-3、CF6及H-FABP水平在慢性心衰患者中呈异常表达状态,临床工作者可通过加强监测这三项指标评估疾病进展及预后。

参考文献

[1] 吕俊芳,朱明军.加味三仁汤治疗冠心病慢性心力衰竭三焦湿热证临床研究[J].陕西中医,2018,39(5):596-598.
[2] 朱胜男.慢性心衰预后与BNP水平的相关性及ROC价值曲线分析[J].中国老年保健医学,2020,18(5):51-53+56.

[3] 许卓帆,郑韶欣,叶贤区,等.慢性心力衰竭患者血清sST2、Galectin-3水平变化及临床意义[J].中国循证心血管医学杂志,2020,12(1):52-54+58.
[4] 杨慧敏.CHD-PAH患儿CFHR2、T-bet mRNA、CF6的变化及其意义[J].实验与检验医学,2019,37(3):459-461+476.
[5] 徐晓玲,殷明刚.心型脂肪酸结合蛋白对急性心肌梗死患者早期心功能参数评价价值[J].华南预防医学,2019,45(5):436-439.
[6] 中华医学会心血管病学分会,中华心血管病杂志编辑委员会.慢性心力衰竭诊断治疗指南[J].中华心血管病杂志,2007,35(12):1076-1095.
[7] 谢启海,李宏松,王立芳,等.不同程度CHF患者血清炎症因子的变化及发病机制研究[J].医学临床研究,2019,36(11):2084-2087.
[8] 姚影,冯丽娇,冯海斌.探讨联检血浆B钠尿肽(BNP),肌钙蛋白I(cTnI)和C反应蛋白(CRP)水平对慢性心力衰竭(CHF)患者疗效观察及预后评估的临床意义[J].首都食品与医药,2020,27(9):117-118.
[9] Han R, Li K, Li L, et al. Expression of microRNA-214 and galectin-3 in peripheral blood of patients with chronic heart failure and its clinical significance [J]. Exp Therap Med, 2020, 19(2):1322-1328.
[10] Fernando ML, Krithika B, Silambanan S. Galectin-3: A Novel Biomarker of Left Ventricular Remodelling in Chronic Heart Failure[J]. 2020, 25(7):364-365.
[11] 林强,魏天龙,罗练,等.PCI术后肺部感染患者血清miR-146a、Galectin-3表达及与抗感染疗效的关系[J].分子诊断与治疗杂志 2020, 12(11):1582-1586.
[12] Kurbonov AK, Gadaev AG, Nurillaeva NM, et al. Galectin-3: role in the formation of various hemodynamic phenotypes of heart failure and interaction with some neurohumoral factors[J]. Russ J Cardiol, 2020, 25(7):3476.
[13] Wu C, Lv Z, Li X, et al. Galectin-3 in Predicting Mortality of Heart Failure: A Systematic Review and Meta-Analysis [J]. Heart Surg Forum, 2021, 24(2):327-332.
[14] Wang H, Zhang J, Shi CF, et al. Distribution of traditional Chinese medicine syndromes in type 2 diabetes mellitus with chronic heart failure: A clinical study [J]. Medicine, 2020, 99(30):21091.
[15] Soyulu K, Cerik IB, Aksan G, et al. Evaluation of ivabradine in left ventricular dyssynchrony and reverse remodeling in patients with chronic heart failure [J]. J Arrhythm, 2020, 36(6):518.
[16] Rba P. Chronic heart failure - health and social problem [J]. J Educa, Health and Sport, 2020, 10(4):47.
[17] Dakhil AS. Assessment of Novel Cardiovascular biomarkers in patients with chronic heart failures [J]. Internat J Resear Pharm Sci, 2019, 10(4):3728-3732.
[18] 郗汇聪,陈礴,候海文.联合检测血清脂脂肪酸结合蛋白和微小RNA-499在急性心肌梗死预警中的价值[J].中南医学科学杂志,2020,48(3):266-268.

2型糖尿病 VEGF、Alb 及 HbA1c 与肾脏微小血管病变的关系

赵文杰* 李华峰 田霖林 李晓冰 李敏 鞠文文 张旭

【摘要】目的 研究2型糖尿病血管内皮生长因子(VEGF)、尿白蛋白及糖化血红蛋白与肾脏微小血管病变的关系。**方法** 选取2019年1月至2020年6月本院收治的160例2型糖尿病患者作为研究组,另选取155例同期于本院进行健康体检且检查结果正常者作为对照组。比较两组VEGF、尿白蛋白及糖化血红蛋白的表达水平,计算研究组合并肾脏微小血管病变发生率,采用多元Logistic回归分析影响糖尿病患者并发肾脏微小血管病变的危险因素。**结果** 研究组VEGF、尿白蛋白及糖化血红蛋白水平均高于对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。2型糖尿病合并肾脏微小血管病变患者53例(33.12%),归为合并组,未合并肾脏微小血管病变患者107例(66.88%),归为未合并组。合并组VEGF、尿白蛋白及糖化血红蛋白水平均高于未合并组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。吸烟、LDL-C、FPG、VEGF、尿白蛋白及糖化血红蛋白为糖尿病并发肾脏微小血管病变的单因素($P<0.05$)。FPG、VEGF、尿白蛋白及糖化血红蛋白水平异常为影响糖尿病并发肾脏微小血管病变的独立危险因素($P<0.05$)。**结论** VEGF、尿白蛋白及糖化血红蛋白水平在2型糖尿病合并肾脏微小血管病变中呈异常表达,监测三者有助于患者病情变化的评估。

【关键词】 2型糖尿病; VEGF; 尿白蛋白; 糖化血红蛋白; 肾脏微小血管病变

Relationship between the levels of VEGF, Alb and HbA1c and renal microangiopathy in patients with type 2 diabetes

ZHAO Wenjie*, LI Huaifeng, TIAN Linlin, LI Xiaobing, LI Min, JU Wenwen, ZHANG Xu

(Department of Endocrinology, the Third Affiliated Hospital of Qiqihar Medical University, Qiqihar, Heilongjiang, China, 161000)

【ABSTRACT】 Objective To study the relationship between the levels of vascular endothelial growth factor (VEGF), urinary albumin and glycosylated hemoglobin and renal microvascular disease in patients with type 2 diabetes. **Methods** The 160 patients with type 2 diabetes who were admitted to the hospital from January 2019 to June 2020 were selected as the study group. In addition, 155 patients who had physical examination in this hospital during the same period and had normal results were selected as the control group. The expression levels of VEGF, urinary albumin and glycosylated hemoglobin between two groups were compared. The incidence of renal microvascular disease in the study group was calculated, and multivariate logistic regression was used to analyze the risk factors of renal microvascular disease in diabetic patients. **Results** The levels of VEGF, urinary albumin and glycosylated hemoglobin in the study group were higher than those in the control group, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). 53 cases (33.12%) with type 2 diabetes combined with renal microvascular disease were classified as the combined group, and 107 cases (66.88%) without renal microvascular disease were classified as the non-combined group. The levels of urinary albumin and glycosylated hemoglobin in the combined group were higher than those in the non-combined group, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). Smoking, LDL-C, FPG, VEGF,

基金项目:齐齐哈尔医学院院内基金项目(QMSI2019Z-22)

作者单位:齐齐哈尔医学院附属第三医院内分泌一科,黑龙江,齐齐哈尔 161000

*通信作者:赵文杰, E-mail:13684528135@163.com

urinary albumin and glycosylated hemoglobin were the single factors affecting diabetes complicated with renal microvascular disease ($P < 0.05$). Abnormal levels of FPG, VEGF, urinary albumin and glycosylated hemoglobin were independent risk factors affecting diabetes complicated with renal microvascular disease ($P < 0.05$). **Conclusion** The levels of VEGF, urinary albumin and glycosylated hemoglobin are abnormally expressed in patients with type 2 diabetes and renal microvascular disease. Monitoring the three is helpful for the evaluation of the patient's condition changes.

[KEY WORDS] Type 2 diabetes; VEGF; Urinary albumin; Glycosylated hemoglobin; Renal microvascular disease

随着人们生活水平的不断提高,糖尿病的发病率呈逐年上升趋势,其中以2型糖尿病最为常见。据报道,我国是全球糖尿病患病数最多的国家,截至2013年,我国糖尿病患病率已高达10.9%,且仍在不断增加^[1-2]。微血管病变属于糖尿病特征性的慢性并发症,以微血管结构和功能改变、基底膜增厚为特征,容易引起糖尿病肾病、糖尿病视网膜膜病变等微血管病变,严重影响患者身体健康^[3]。对糖尿病患者发生肾脏微血管病变进行早期诊断具有重要意义^[4]。血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)是一种血管内皮促分裂因子,与血管的形成关系十分紧密^[5]。研究发现,糖尿病肾脏微小血管发生病变与VEGF有关,糖化血红蛋白是诊断和治疗糖尿病的主要指标之一,尿白蛋白是监测肾小球功能有无异常的重要指标^[6]。本文主要对2型糖尿病患者VEGF、尿白蛋白及糖化血红蛋白与肾脏微小血管病变的关系进行研究,旨在为2型糖尿病患者发生肾脏微小血管病变的早期诊疗提供参考。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2019年1月至2020年6月本院收入治疗的160例2型糖尿病患者作为研究组,其中男87例,女73例,平均年龄(52.96 ± 9.45)岁。纳入标准:①均需满足世界卫生组织中关于2型糖尿病的诊断标准^[7],且经血糖及糖耐量试验等检查确诊;②病历资料完整无缺损;排除标准:①有血液系统疾病者;②有恶性肿瘤等终末期疾病者;③有严重脏器功能异常者;④有风湿免疫系统疾病或血液系统疾病者;⑤有活动性感染疾病者。另选取155例同期于本院进行健康体检检查结果正常者作为对照组。其中男性90例,女性65例,平均年龄(47.49 ± 6.99)岁。两组基本资料比较差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。本研究经医院医学伦

理委员会批准通过,受试者均签署知情同意书。

1.2 方法

抽取所有受试者清晨空腹静脉血3~5 mL,在低温离心机中离心(3 000 r/min, 15 min)后分离血清,取出备用。VEGF采用酶联免疫吸附法检测,试剂盒购自中国武汉博士德生物工程有限公司。糖化血红蛋白采用Beckma Coulter LX-20全自动生化检测仪进行检测。尿白蛋白定量分析测定采用化学发光法测定,试剂盒由北京科美东雅生物技术有限公司提供。另对研究组进行空腹血糖(Fasting blood glucose, FPG)及总胆固醇(Total cholesterol, TC)、甘油三酯(Tri-glyceride, TG)、高密度脂蛋白胆固醇(High density liprotein cholesterol, HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(Low Density Lipoprotein, LDL-C)检测。以上检验均由专业人员进行操作。

1.3 观察指标

①比较不同人群中VEGF、尿白蛋白及糖化血红蛋白的表达水平;②计算研究组合并肾脏微小血管病变率,根据患者是否合并肾脏微小血管病变划分为合并组与未合并组。肾脏微小血管病变判断^[8]:连续3次测24 h尿微量白蛋白排泄率 $> 20 \mu\text{g}/\text{min}$ 。比较合并组和未合并组的VEGF、尿白蛋白及糖化血红蛋白的表达水平;③分析影响2型糖尿病患者发生肾脏微小血管病变的危险因素。

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,采用 t 检验;计数资料以 $n(\%)$ 表示,采用 χ^2 检验;采用多元Logistic回归分析影响糖尿病患者并发肾脏微小血管病变的危险因素,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 VEGF、尿白蛋白及糖化血红蛋白在不同人群中的表达情况

研究组中VEGF、尿白蛋白及糖化血红蛋白表

达水平平均高于对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表1。

表1 VEGF、尿白蛋白及糖化血红蛋白在不同人群中的表达情况($\bar{x} \pm s$)

Table 1 expression of VEGF, urinary albumin and glycosylated hemoglobin in different population ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	糖化血红蛋白(%)	尿白蛋白(mg/L)	VEGF(mg/L)
研究组	160	11.95±1.16	89.33±21.75	117.32±11.66
对照组	155	5.51±0.40	29.42±4.54	65.91±5.26
t值		65.449	33.590	50.168
P值		<0.001	<0.001	<0.001

2.2 VEGF、尿白蛋白及糖化血红蛋白在合并组与未合并组中的表达情况

本次研究中2型糖尿病合并肾脏微小血管病变患者53例(33.12%),归为合并组,未合并肾脏微小血管病变患者107例(66.88%),归为未合并组。合并组中VEGF、尿白蛋白及糖化血红蛋白表达水平平均高于未合并组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表2。

表2 VEGF、尿白蛋白及糖化血红蛋白在合并组与未合并组中的表达情况($\bar{x} \pm s$)

Table 2 expression of VEGF, urinary albumin and glycosylated hemoglobin in combined group and non combined group ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	糖化血红蛋白(%)	尿白蛋白(mg/L)	VEGF(mg/L)
合并组	53	13.11±1.07	105.48±11.79	128.98±10.89
未合并组	107	11.38±0.94	81.33±6.49	111.54±6.77
t值		7.186	10.616	10.635
P值		<0.001	<0.001	<0.001

2.3 影响2型糖尿病患者并发肾脏微小血管病变的单因素

单因素分析结果显示,吸烟、LDL-C、FPG、VEGF、尿白蛋白及糖化血红蛋白均与糖尿病患者并发肾脏微小血管病变有关($P < 0.05$)。见表3。

表3 影响2型糖尿病患者并发肾脏微小血管病变的单因素分析 [$n(\%)$, ($\bar{x} \pm s$)]

表3 影响2型糖尿病患者并发肾脏微小血管病变的单因素分析 [$n(\%)$, ($\bar{x} \pm s$)]

Table 3 single factor analysis of renal microvascular disease in patients with type 2 diabetes mellitus [$n(\%)$, ($\bar{x} \pm s$)]

因素	合并组(n=53)	未合并组(n=107)	χ^2/t 值	P值	
年龄(岁)	<65	29(54.72)	59(55.14)	0.002	0.960
	≥65	24(45.28)	48(44.86)		
性别	男	26(49.06)	61(57.01)	0.904	0.342
	女	27(50.49)	46(42.99)		
吸烟	有	39(73.58)	47(43.93)	12.542	<0.001
	无	14(26.42)	60(56.07)		
高血压病史	有	38(71.70)	67(62.62)	1.296	0.255
	无	15(28.30)	40(37.38)		
TC(mmol/L)	5.36±1.12	5.71±1.33	1.338	0.184	
TG(mmol/L)	1.82±0.31	1.79±0.47	0.349	0.727	
HDL-C(mmol/L)	1.23±0.34	1.41±0.77	1.377	0.171	
LDL-C(mmol/L)	4.85±1.16	3.16±0.92	7.561	<0.001	
FPG(mmol/L)	10.31±1.12	11.64±1.25	5.290	<0.001	
糖化血红蛋白(%)	12.33±1.07	9.99±0.94	14.607	<0.001	
尿白蛋白(mg/L)	91.26±11.79	56.19±6.49	22.878	<0.001	
VEGF(pg/L)	134.59±10.89	99.76±6.77	23.915	<0.001	

2.4 影响2型糖尿病患者并发肾脏微小血管病变的多因素

FPG、VEGF、尿白蛋白及糖化血红蛋白水平异常为影响糖尿病患者并发肾脏微小血管病变的独立危险因素($P < 0.05$)。见表4。

3 讨论

糖尿病属于临床常见的内分泌代谢疾病,严重危害着人类的生命健康^[9]。相关研究显示,中国人群糖尿病患病率从2002年的4.2%迅速上升至2010年的11.6%,目前我国糖尿病患者超过1.14亿^[10]。糖尿病患者机体代谢较差,细胞免疫功能低下,随着病情进展会导致肾脏损害,发生肾脏微小血管病变等并发症。大约有25%~40%的糖尿病患者在今后期会发展为糖尿病肾病,这也是导致糖尿病患者终末期肾衰竭的原因之一^[11]。因此,及时明确诊断糖尿病患者是否发生肾脏微小血管病变,采取积极干预措施具有重要意义^[12-13]。

表4 影响2型糖尿病患者并发肾脏微小血管病变的多因素分析

Table 4 multivariate analysis of renal microvascular disease in patients with type 2 diabetes mellitus

影响因素	回归系数	标准误	Wald χ^2 值	OR值	95%CI	P值
吸烟(无 vs 有)	2.136	1.923	5.952	8.466	0.195~366.897	0.213
LDL-(<3.4 mmol/L vs >3.4 mmol/L)	1.958	1.026	6.689	7.367	0.986~55.034	0.694
FPG(3.9~6.1 mmol/L vs >6.1 mmol/L)	1.594	0.291	5.285	4.923	2.783~8.709	<0.001
糖化血红蛋白(4%~6% vs >6%)	2.097	1.062	7.089	8.142	1.016~65.269	<0.001
尿白蛋白(<20 mg/L vs >20 mg/L)	1.594	0.291	5.285	4.923	2.783~8.709	<0.001
VEGF(41.5~91.1 pg/L vs >91.1 pg/L)	1.838	0.491	5.963	6.284	2.400~16.451	<0.001

国内外文献报道称2型糖尿病合并肾脏微血管病变患者的VEGF、尿白蛋白及糖化血红蛋白水平均明显升高^[14]。本文中,2型糖尿病患者的VEGF、尿白蛋白及糖化血红蛋白表达水平均高于健康人群,且合并肾脏微血管病变患者中的VEGF、尿白蛋白及糖化血红蛋白表达水平均高于单纯糖尿病患者,与上述文献报道相一致。说明了VEGF、尿白蛋白及糖化血红蛋白与肾脏微血管病变存在一定关系,是评估患者是否发生肾脏微血管病变的重要指标。考虑为糖尿病患者的糖化血红蛋白异常升高时患者的血液粘稠度高,容易引起微血管灌注不足及组织细胞缺氧,损伤机体内皮细胞,引起肾脏微血管病变发生。糖化血红蛋白作为人体血糖和血红蛋白的结合产物,临床上常通过测定血液中糖化血红蛋白含量反映糖尿病患者在过去3个月内的糖尿病控制情况以及微血管的病情变化^[15]。糖化血红蛋白不受血糖单次升高或降低的影响,能够较为全面地了解患者三月内血糖控制水平。据相关文献报道,尿白蛋白对糖尿病肾脏的早期损伤诊断有临床价值,当患者的血糖控制不佳时,机体长期高血糖可导致肾小球基底膜增厚,肾小球功能受损,导致尿液的尿白蛋白增加^[16]。除此之外,糖尿病患者机体中高糖、糖基化终产物等升高还会对血管内皮细胞造成损伤,从而使得VEGF的表达被激活,VEGF的表达水平也是控制糖尿病血管病变的关键因素^[17]。本文通过多元Logistic回归分析,可知FPG、VEGF、尿白蛋白及糖化血红蛋白水平异常为影响糖尿病患者并发肾脏微血管病变的危险因素,提示在临床诊治中,对于合并上述危险因素者,可通过采取相应预防手段,降低并发肾脏微血管病变率。

综上所述,VEGF、尿白蛋白及糖化血红蛋白水平在2型糖尿病合并肾脏微血管病变患者中远高于正常人群及单纯糖尿病患者,VEGF、尿白蛋白及糖化血红蛋白的高水平与肾脏微血管病变的发生具有一定联系,临床可根据其表达水平对患者病情变化进行有效评估。

参考文献

- [1] 刘东伟,潘少康,刘章锁.糖尿病肾病的临床危险因素[J].中国实用内科杂志,2017,37(3):189-191.
- [2] 王晓红,左淑丽.糖化白蛋白,糖化血红蛋白与糖尿病微血管病变的关系及临床意义[J].中国综合临床,2021,37(2):171-174.
- [3] 贾哲,杨文文,杨雅昊,等.转化生长因子- β 在糖尿病微血管病变发病中作用的机制研究进展[J].山东医药,2019,59(30):103-106.
- [4] Mari M, Riina R, Line LR, et al. Doxycycline modulates VEGF-A expression: Failure of doxycycline-inducible lentivirus shRNA vector to knockdown VEGF-A expression in transgenic mice[J]. PLoS ONE, 2018, 13(1):019.
- [5] 刘英华,高晓丽,张小坤,等.托拉塞米联合心脉隆注射液对慢性心力衰竭患者VEGF、BNP、NGAL、ICAM-1影响研究[J].陕西医学杂志,2018,47(10):1322-1324.
- [6] 魏贯峰,张彦东.2型糖尿病微血管病变患者血清VEGF、Hcy、HbA1c水平变化及临床意义[J].医学理论与实践,2021,34(11):1936-1938.
- [7] 姚向飞,蔡东,权皎洁.2型糖尿病肾病患者外周血IGF-1、TGF- β 和VEGF水平及临床意义[J].解放军医药杂志,2017,37(6):1714.
- [8] Zhang Q, Fang W, Ma L, et al. VEGF levels in plasma in relation to metabolic control, inflammation, and microvascular complications in type-2 diabetes: A cohort study[J]. Medicine, 2018, 97(15):415.
- [9] 赵艾苹,魏剑芬,王建荣,等.糖尿病微血管病变患者血清25-OH维生素D3水平的变化及其影响因素[J].中国医师杂志,2019,21(1):112-114.
- [10] 陈道强,吴玲,龚源.HbA1c、MA1b联合Cys-C检测在糖尿病肾病诊断、病情评估中的应用[J].分子诊断与治疗杂志,2021,13(9):1507-1510.
- [11] Wang Z, Du Z, Zhu F. Glycosylated hemoglobin is associated with systemic inflammation, hypercoagulability, and prognosis of COVID-19 patients[J]. Diab Res Clin Pract, 2020, 14(5):305-309.
- [12] 李思佳,孙小蒙.血管内皮生长因子与糖尿病肾病关系的研究进展[J].医学综述,2019,25(3):105-109.
- [13] Wang Z, Chen X, Qi C, et al. The Relationship Between Lipoprotein A and Glycosylated Hemoglobin and The Degree of Coronary Artery Stenosis in Non-Diabetic Coronary Heart Disease Patients[J]. Cardiol Vascul Res, 2019, 3(4):1-11.
- [14] Suo M, Wen D, Wang W, et al. Comparative Study on Hemoglobin A1c, Glycated Albumin and Glycosylated Serum Protein in Aplastic Anemia Patients with Type 2 Diabetes Mellitus[J]. Bios Rep, 2020, 40(5):946-947.
- [15] 许娜,郭淑芹,张云良,等.2型糖尿病患者血清SFRP5、脂联素水平与尿蛋白的关系临床研究[J].中国中西医结合肾病杂志,2017,18(2):148-150.
- [16] 王中雄,曾炼坤,沈永棋.血管内皮生长因子及同型半胱氨酸水平与2型糖尿病患者微血管病变的关系[J].国际医药卫生导报,2021,27(4):547-550.
- [17] Marcinak J, Cao C, Lee D, et al. Fasigliam for glycemic control in patients with type 2 diabetes: a phase 3, placebo-controlled study[J]. Diab, Obesity Metab, 2017, 19(12):88-108.

乙肝肝纤维化患者血液 miR-122、miR-181a 水平与病情严重程度的关系

崔红梅* 卢坤玲 付丽坤 张利利

[摘要] **目的** 探讨慢性乙型肝炎(CHB)肝纤维化患者血液 miR-122、miR-181a 水平变化及与肝纤维化严重程度的关系。**方法** 选择2018年3月至2020年5月本院收治的186例CHB患者作为CHB组,选取100例同期查体的健康体检者作为对照组。检测两组血液 miR-122、miR-181a 水平及肝脏生化指标,根据肝纤维化分期将CHB患者分为S0(25例)、S1(44例)、S2(35例)、S3(52例)、S4(30例),比较不同分期患者 miR-122、miR-181a 水平差异。**结果** CHB组天冬氨酸氨基转移酶(AST)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、总胆红素(TBIL)等生化指标及 miR-122、miR-181a 表达水平均显著高于对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。随着肝纤维化分期的升高,CHB患者 ALT、AST、TBIL 等肝生化指标及 miR-181a 表达升高,miR-122 表达水平降低($P<0.05$)。Pearson 相关性分析显示,miR-122 与 CHB 患者 ALT、AST、TBIL 等肝生化指标呈负相关($P<0.05$),miR-181a 与肝生化指标呈正相关($P<0.05$)。Spearman 相关性分析示,miR-122 与肝纤维化程度呈负相关($P<0.05$),miR-181a 与肝纤维化程度呈正相关($P<0.05$)。ROC 曲线显示,miR-122、miR-181a 表达水平诊断严重肝纤维化(S3-S4)的曲线下面积分别为 0.851、0.783,当截点值为 3.26、1.42 时,约登指数最大。**结论** 慢性乙肝肝纤维化患者伴有 miR-122、miR-181a 水平的变化,且与肝纤维化程度相关,临床可将血液 miR-122、miR-181a 作为评估纤维化程度的参考指标。

[关键词] 慢性乙型肝炎; 肝纤维化; miR-122; miR-181a

Changes in miR-122 and miR-181a levels of patients with chronic hepatitis B and liver fibrosis and their relationship with the severity of liver fibrosis

CUI Hongmei*, LU Kunling, FU Likun, ZHANG Lili

(Department of Gastroenterology, the First Hospital of Qinhuangdao, Qinhuangdao, Hebei, China, 066000)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the changes in miR-122 and miR-181a levels of patients with chronic hepatitis B (CHB) and liver fibrosis and their relationship with the severity of liver fibrosis. **Methods** A total of 186 patients with CHB (CHB group) and 100 healthy individuals (control group) were enrolled in this study from March 2018 to May 2020. The levels of miR-122, miR-181a and liver biochemical indicators in the two groups were measured. According to the grade of liver fibrosis, the patients were divided into S0 (25 cases), S1 (44 cases), S2 (35 cases), S3 (52 cases), and S4 (30 cases). The levels of miR-122 and miR-181a in patients with different grades were compared. **Results** The expression levels of biochemical indicators [aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), total bilirubin (TBIL)], miR-122 and miR-181a in the CHB group were significantly higher than those in the control group ($P<0.05$). With the increase of liver fibrosis grading, ALT, AST, TBIL and miR-181a were increased, while miR-122 was decreased in the CHB group, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). Pearson correlation analysis showed that miR-122 was negatively correlated with ALT, AST and TBIL ($P<0.05$), while miR-181a was positively correlated with the liver biochemical indicators ($P<0.05$). Spearman correlation analysis showed

基金项目:秦皇岛市科学技术局科技计划(201602A144)

作者单位:秦皇岛市第一医院消化内科,河北,秦皇岛 066000

*通信作者:崔红梅, E-mail: cuihongmei198@163.com

that miR-122 was negatively correlated with the severity of liver fibrosis ($P<0.05$), while miR-181a was positively correlated with liver fibrosis ($P<0.05$). The ROC curve showed that the area under the curve (AUC) values of miR-122 and miR-181a for diagnosis of severe liver fibrosis (S3-S4) were 0.851 and 0.783, respectively. When the cut-off values were 3.26 and 1.42, the Youden index was the greatest. **Conclusion** There are changes in the levels of miR-122 and miR-181a in patients with CHB and liver fibrosis, which are related to the severity of liver fibrosis. Clinically, miR-122 and miR-181a can be used as reference indicators for evaluating the severity of liver fibrosis.

[KEY WORDS] Chronic hepatitis B; Liver fibrosis; miR-122; miR-181a

在我国,乙肝病毒感染是肝病的主要病因,流行病学报道,在全世界范围内,30%的肝硬化及45%的肝癌患者是由慢性乙型肝炎(Chronic hepatitis B, CHB)发展而来^[1]。目前认为,肝纤维化的诊断、分期对评估慢性肝病程度及乙肝抗病毒治疗具有重要指导意义,对于延缓肝硬化、肝癌的进展均有积极作用^[2]。当前肝脏病理学检查仍是肝纤维化诊断的金标准,但肝脏病理学诊断为创伤性检查,有较大的并发症发生风险^[3]。microRNA是一种广泛存在的非编码小RNA,对蛋白表达具有调节作用,参与细胞生长、分化、代谢等多种生理学功能。miR-122位于18q21.31位点,是肝脏组织中表达量最丰富的RNA,研究表明其在肝细胞生长、脂质代谢、病毒感染等多种生物学过程中均发挥调控作用^[4]。miR-181a是miR-181家族成员,位于9号染色体正链上,研究表明miR-181可直接靶向肝分化转录调节因子,调节肝细胞的生长及增殖^[5]。本研究初步探讨miR-122、miR-181a对肝纤维化程度评估的价值,以期对肝纤维化病情的评估及治疗提供一定参考。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2018年3月至2020年5月本院收治的186例CHB患者作为CHB组。纳入标准:①符合《慢性乙型肝炎防治指南》^[6],乙型肝炎表面抗原阳性6个月及以上;②行肝脏组织病理检查;③对本研究知情并签署知情同意书。排除标准:①其他类型病毒性肝炎者、酒精性肝炎者;②接受抗病毒或抗纤维化治疗者;③存在药物性肝损伤者;④合并恶性肿瘤者。CHB组患者中男性120例,女性66例,平均(44.88±8.52)岁。另选取本院100例同期健康体检者作为对照组。对照组受试者中男性66例,女性34例,平均(45.27±8.96)岁,两组性别组成及年龄比较差异无统计学意义($P>0.05$)。本

研究经医院医学伦理委员会批准通过。

1.2 方法

血清生化检测:对照组于体检当日、CHB患者于行肝组织病理学检查当日采集5 mL空腹静脉血,抗凝后提取血清,采用全自动生化分析仪检测天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)、丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、总胆红素(total bilirubin, TBIL)等肝生化指标。

肝脏组织病理学检查:CHB组患者行超声引导下肝脏穿刺及组织病理学检查,标本长度>1.0 cm,至少包括6个汇管区,参考国际Scheuer系统规定的标准^[7]进行肝纤维化分期,其中S0(25例)、S1(44例)、S2(35例)、S3(52例)、S4(30例)。

miR-122、miR-181a表达水平:采集患者外周空腹静脉血,抗凝处理,采用血液RNA提取试剂盒提取标本中总RNA,采用反转录试剂盒将总RNA转换成cDNA,采用实时荧光定量聚合酶链式反应技术检测miR-122、miR-181a表达,内参为U6,引物序列如下:miR-122(正向引物:5'-TGC-GCTGGAGTGTGACAATGGT-3',反向引物:通用引物);miR-181a(正向引物:5'-AACATTCAAC-GCTGTCGGTGAGT-3',反向引物:通用引物);U6(正向引物:5'-GCTTCGGCAGCACATATACTAAAT-3',反向引物:5'-CGCTTCACGAATTTGCGTGCAT-3')。采用相对定量法计算表达水平, $\Delta Ct = \text{目的扩增 Ct 值} - \text{U6 Ct 值}$,以 $2^{-\Delta Ct}$ 表示为目的产物的表达水平。

1.3 统计学分析

采用SPSS 19.0统计软件进行数据处理与统计分析,计数资料以 $n(\%)$ 表示,行 χ^2 检验;计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,组间比较行独立样本 t 检验、多组间比较采用F检验;采用Pearson及Spearman相关性分析指标间的相关性;绘制受试者特征工作曲线(ROC)分析指标诊断价值,以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组受试者临床资料及 miR-122、miR-181a 表达水平比较

CHB 组 ALT、AST、TBIL 等生化指标及 miR-122、miR-181a 表达水平均高于对照组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 两组受试者临床资料及 miR-122、miR-181a 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	ALT (U/L)	AST (U/L)	TBIL ($\mu\text{mol/L}$)	miR-122	miR-181a
CHB 组	186	75.48 \pm 10.71	55.98 \pm 15.71	19.38 \pm 4.71	3.37 \pm 0.62	1.53 \pm 0.32
对照组	100	22.41 \pm 5.28	24.15 \pm 5.99	10.22 \pm 3.96	1.24 \pm 0.33	0.45 \pm 0.20
<i>t</i> 值		46.575	19.500	16.552	31.988	30.669
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

2.2 不同肝纤维化分期患者临床资料及 miR-122、miR-181a 表达水平比较

随着肝纤维化分期的升高, CHB 患者 ALT、AST、TBIL 等肝生化指标及 miR-181a 表达升高, miR-122 表达水平降低 ($P < 0.05$)。见表 2。

2.3 miR-122、miR-181a 表达水平与临床资料、肝纤维化分期的相关性

Pearson 相关性分析示, miR-122 与 CHB 患者 ALT、AST、TBIL、肝纤维化程度等呈负相关 ($P < 0.05$), miR-181a 与肝生化指标呈正相关 ($r_1 = 0.501$, $r_2 = 0.444$, $r_3 = 0.370$, $r_4 = 0.396$, P 均 < 0.05)。Spearman 相关性分析示, miR-122 与肝纤维化程度呈负相关 ($P < 0.05$), miR-181a 与肝纤维化程度呈正相关 ($P < 0.05$)。

2.4 miR-122、miR-181a 表达水平对肝纤维化程度的评估价值分析

ROC 曲线示, miR-122、miR-181a 表达水平诊断严重肝纤维化 (S3~S4) 的曲线下面积分别为

0.851、0.783, 当截点值为 3.26、1.42 时, 约登指数最大 (0.566、0.516)。见表 3、图 1。

表 3 miR-122、miR-181a 表达水平诊断严重肝纤维化 (S3~S4) 的价值分析

Table 3 Value of miR-122 and miR-181a in the diagnosis of severe liver fibrosis (S3-S4)

指标	AUC	截点值	约登指数	灵敏度	特异性	95%CI	<i>P</i> 值
miR-122	0.851	3.26	0.566	0.768	0.798	0.796~0.906	<0.001
miR-181a	0.783	1.42	0.516	0.829	0.687	0.718~0.848	<0.001

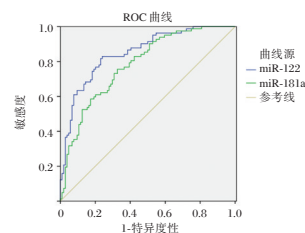


图 1 miR-122、miR-181a 表达水平诊断严重肝纤维化 (S3~S4) 的价值分析

Figure 1 Value of miR-122 and miR-181a in the diagnosis of severe liver fibrosis (S3-S4)

3 讨论

miR-122 在肝脏组织中高度表达, 约占全部 miRNA 的 70%。miR-122 主要由肝脏细胞释放, 研究表明, 肝细胞过表达 miR-122 可抑制 HBV DNA 的复制, 降低病毒对肝细胞的损伤^[8]。miR-122 可抑制肝星状细胞增殖, 减少肝脏胶原的产生从而抑制纤维化的产生^[9]。本研究结果显示, 与健康对照组比较, CHB 组 miR-122 的表达明显升高, 这一结果与 Liu 等人^[10]研究结果类似。miR-181a 是一种广泛存在于细胞中的 miRNA, 研究表明其在细胞分化、生长及程序性死亡方面发挥重要作用^[11]。目前 miR-181a 与肝纤维化之间的关系尚未完全阐释清楚, 推测可能与其介导肝脏炎症从而

表 2 不同肝纤维化分期患者临床资料及 miR-122、miR-181a 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison on clinical data and expression levels of miR-122 and miR-181a among patients with different stages of liver fibrosis ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	ALT (U/L)	AST (U/L)	TBIL ($\mu\text{mol/L}$)	miR-122	miR-181a
S0	25	48.52 \pm 8.45	25.16 \pm 4.71	13.52 \pm 3.26	4.52 \pm 0.86	0.85 \pm 0.12
S1	44	55.17 \pm 10.22 ^a	33.96 \pm 6.82 ^a	13.88 \pm 4.71	4.01 \pm 0.85	1.02 \pm 0.20 ^a
S2	35	79.52 \pm 12.74 ^{ab}	75.14 \pm 10.27 ^{ab}	21.71 \pm 5.11 ^{ab}	3.22 \pm 0.74 ^{ab}	1.66 \pm 0.43 ^{ab}
S3	52	92.14 \pm 13.18 ^{abc}	68.12 \pm 12.71 ^{abc}	20.96 \pm 5.26 ^{ab}	2.85 \pm 0.39 ^{abc}	1.98 \pm 0.40 ^{abc}
S4	30	94.17 \pm 22.17 ^{ab}	70.59 \pm 13.52 ^{ab}	26.85 \pm 6.12 ^{abd}	2.56 \pm 0.45 ^{ab}	1.90 \pm 0.42 ^{ab}
<i>F</i> 值		98.111	165.727	41.205	47.790	79.990
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注: 与 S0 期比较, ^a $P < 0.05$; 与 S1 期比较, ^b $P < 0.05$; 与 S2 期比较, ^c $P < 0.05$; 与 S3 期比较, ^d $P < 0.05$ 。

影响肝纤维化进程有关。既往有研究表明 miR-181a 与巨噬细胞活化后白细胞介素-1 β 、肿瘤坏死因子- α 、转化生长因子- β 1 等炎症因子水平呈相关关系^[12]；而肝纤维化过程本质上是胞外基质合成及降解失衡的过程，miR-181a 可激活炎症因子亢进导致肝脏炎症损伤，同时也可调节肝星状细胞活性，促进基质胶原降解合成的失衡，促进肝纤维化进程。

本研究结果显示，不同肝纤维化水平 CHB 患者中，随着肝纤维化程度的升高，miR-122 的表达降低，且其水平与肝纤维化程度呈负相关。分析其原因可能为 miR-122 主要由肝脏细胞释放，肝纤维化程度越高，肝细胞损伤范围越大，肝细胞合成 miR-122 能力降低，其抑制肝纤维化的作用减弱，肝纤维化进展更快，两者形成恶性循环。既往国外开展的一项研究表明，与 CHB 患者相比，肝硬化患者 miR-122 表达量明显降低，其表达水平与肝功能指标呈负相关^[13]。国内开展的一项研究表明，随着肝纤维化程度的升高，miR-122 表达量降低，其与 HBV-DNA 载量、ALT、AST 等肝功能指标呈正相关，而与肝纤维化程度呈负相关^[14]。本研究与上述研究结果类似。本研究中 CHB 患者 miR-181a 表达升高，且随着肝纤维化程度的升高，其表达呈现升高趋势，推测 miR-181a 可能与 HBV 感染后炎症因子产生的肝脏损伤及肝纤维化进程有关，其高表达或可促使炎症亢进、肝脏损伤及肝纤维化进程。既往陈婧等人^[15]开展的一项研究证实 CHB 患者 miR-181a 表达升高，且随着肝硬化分期的加重，整体呈现升高趋势。但徐艺丹等人^[16]开展的一项动物研究证实，肝脏纤维化小鼠 miR-181 表达降低，且随着分期程度升高呈下降趋势。本研究与前者研究结果类似，两者研究存在差异的原因可能为研究对象差异所致。

目前肝硬化前期的肝纤维化评估是逆转肝病病变的关键，组织病理学检查是金标准，但鉴于其风险，其临床应用有较大的限制。本研究结果显示提示两者对肝硬化严重程度有一定参考价值。

综上，慢性乙肝肝纤维化患者伴有 miR-122、miR-181a 水平的变化，且与肝纤维化程度相关，临床可将其作为评估纤维化程度的参考指标。本研究局限性在于样本量较少，未来仍有待进一步扩大样本进行研究。

参考文献

[1] Fung J, Lung M, Chan A, et al. Trends in liver transplanta-

tion for chronic hepatitis B in the era of highly potent antiviral therapies over the past two decades[J]. *Liver Trans*, 2020, 7(10):224-227.

[2] Xie G, Wang X, Wei R, et al. Serum metabolite profiles are associated with the presence of advanced liver fibrosis in Chinese patients with chronic hepatitis B viral infection[J]. *BMC Med*, 2020, 18(1):859-862.

[3] Lung YM. Fibrosis evolution in chronic hepatitis B e antigen-negative patients across a 10-year interval[J]. *J Viral Hepat*, 2019, 7(7):552-556.

[4] miR-122、miR-150 在隐匿性乙型肝炎鉴别诊断中的研究[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2019, 11(5):418-421.

[5] Jin H, Li C, Dong P, et al. Circular RNA cMTO1 Promotes PTEN Expression Through Sponging miR-181b-5p in Liver Fibrosis[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8(11):714.

[6] 中华医学会肝病学分会, 中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南(2015年版)[J]. *中国肝脏病杂志: 电子版*, 2015, 7(3):1-18.

[7] Scheuer PJ, Maggi G. Hepatic fibrosis and collapse: histological distinction by orcein staining[J]. *Histopathology*, 2010, 4(5):487-490.

[8] Aydin Y, Kurt R, Song K, et al. Hepatic Stress Response in HCV Infection Promotes STAT3 - Mediated Inhibition of HNF4A-miR-122 Feedback Loop in Liver Fibrosis and Cancer Progression[J]. *Cancers*, 2019, 11(10):1407.

[9] Teng KY, Barajas JM, Hu P, et al. Role of B Cell Lymphoma 2 in the Regulation of Liver Fibrosis in miR-122 Knock-out Mice[J]. *Biology*, 2020, 9(7):157.

[10] Liu H, He B, Hu W, et al. Prenatal dexamethasone exposure induces nonalcoholic fatty liver disease in male rat offspring via the miR-122/YY1/ACE2 - MAS1 pathway [J]. *Biochem Pharmacol*, 2021, 185(1):114420.

[11] Panoutsopoulou K, Avgeris M, Magkou P, et al. miR-181a overexpression predicts the poor treatment response and early-progression of serous ovarian cancer patients [J]. *Int J Cancer*, 2020, 9(7):748.

[12] Lou G H. MiR-122 modification enhances the therapeutic efficacy of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells against liver fibrosis[J]. *J Cell Mol Med*, 2017, 9(7):741-745.

[13] Franck M, Schütte K, Malfertheiner P, et al. Prognostic value of serum microRNA-122 in hepatocellular carcinoma is dependent on coexisting clinical and laboratory factors Conflict-of-interest statement [J]. *World J Gastroenterol*, 2020, 26(1):415-417.

[14] 刘娇, 刘青, 王大明, 等. 慢性乙型肝炎患者血清外泌体 miR-122, miR-146a 表达与 HBV DNA 载量的相关性[J]. *肝脏*, 2020, 25(10):24-28.

[15] 陈靖, 郑琦, 曾达武, 等. 细胞 Toll 样受体 4/微小核糖核酸-181a 在慢性乙型肝炎肝纤维化进程中的动态表达及临床意义[J]. *中华传染病杂志*, 2018, 36(8):466-472.

[16] 徐艺丹, 韩银淑. miR-181 通过抑制 Egr1 在肝脏纤维化中的作用[J]. *现代预防医学*, 2020, 47(6):137-142.

HDCP产妇血清APN、chemerin、sFlt-1/PIGF与围产结局的相关性

程锦 周萍* 李茗薇 马宁 吴泉

[摘要] **目的** 探讨妊娠期高血压(HDCP)产妇血清脂联素(APN)、chemerin、可溶性血管内皮生长因子受体-1(sFlt-1)与胎盘生长因子(PIGF)比值与围产结局的相关性。**方法** 选取2019年1月至2021年1月在安徽理工大学第一附属医院分娩的102例HDCP产妇作为研究组,另选取63例同期健康产妇作为对照组,比较两组血清APN、chemerin、sFlt-1/PIGF水平,探讨上述指标在HDCP中的诊断效能,并分析上述指标与围产结局的相关性。**结果** 研究组APN明显低于对照组,Chemerin、sFlt-1/PIGF高于对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。血清APN、Chemerin、sFlt-1/PIGF联合诊断HDCP曲线下面积(AUC)为0.965,明显高于单种指标诊断效能($P<0.05$)。多因素Logistic回归分析显示,收缩压(SBP)、舒张压(DBP)、Chemerin、sFlt-1/PIGF是影响HDCP产妇出现不良围产结局的危险因素,APN为保护因素($P<0.05$)。**结论** 血清APN、chemerin、sFlt-1/PIGF可作为临床诊断HDCP的有效指标,且上述指标与不良围产结局有密切关系,提示临床需给予针对性早期干预,改善围产结局。

[关键词] 妊娠期高血压;脂联素;chemerin;可溶性血管内皮生长因子受体-1;胎盘生长因子

Correlation between HDCP maternal serum APN, chemerin, sFlt-1/PIGF and perinatal outcome

CHENG Jin, ZHOU Ping*, LI Mingwei, MA Ning, WU Quan

(Department of Obstetrics and Gynecology, the First Affiliated Hospital of Anhui University of Technology; Huainan First People's Hospital, Huainan, Anhui, China, 232007)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the correlation of serum adiponectin (APN), chemerin and soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 (sFlt-1) to placental growth factor (PIGF) ratio with perinatal outcomes of puerperae with hypertensive disorder complicating pregnancy (HDCP). **Methods** A total of 102 puerperae with HDCP who delivered in the First Affiliated Hospital of Anhui University of Science and Technology were selected as the study group between January 2019 and January 2021. Meanwhile, 63 healthy puerperae were selected as the control group. The levels of serum APN, chemerin and sFlt-1/PIGF were compared between the two groups. The diagnostic efficiencies of the above indicators for HDCP were discussed, and their correlation with perinatal outcomes was analyzed. **Results** The APN level in the study group was significantly lower than that in the control group, while chemerin and sFlt-1/PIGF were higher than those in the control group ($P<0.05$). The area under the curve (AUC) of serum APN combined with chemerin and sFlt-1/PIGF in the diagnosis of HDCP was 0.965, which was significantly higher than the diagnosis efficiency of a single indicator ($P<0.05$). Multivariate Logistic regression analysis showed that systolic blood pressure (SBP), diastolic blood pressure (DBP), chemerin and sFlt-1/PIGF were risk factors for adverse perinatal outcomes in puerperae with HDCP, and APN was a protective factor ($P<0.05$). **Conclusion** Serum APN, chemerin, and sFlt-1/PIGF can be used as effective indicators for clinical diagnosis of HDCP, and the

基金项目:安徽省卫生厅科研计划项目(2019SEYL013)

作者单位:安徽理工大学第一附属医院·淮南市第一人民医院妇产科,安徽,淮南 232007

*通信作者:周萍, E-mail:zhouping0708@163.com

above indicators are closely related to poor perinatal outcomes, suggesting that targeted early intervention is needed to improve perinatal outcomes.

[KEY WORDS] Hypertensive disorder complicating pregnancy; Adiponectin; Chemerin; Soluble vascular endothelial growth factor receptor-1; Placental growth factor

妊娠期高血压(hypertensive disorder complicating pregnancy, HDCP)为妊娠期特有疾病,流行病学数据显示 HDCP 造成孕妇病死率在妊娠相关疾病致死中占比高达 10%~16%,目前尚无研究明确其发病机制^[1-2]。Chemerin 因子在孕产妇肾脏组织中呈高表达,云翠兰等^[3]研究提出 Chemerin 因子参与机体炎性反应,诱发、加重 HDCP 发生发展。可溶性血管内皮生长因子受体-1(soluble vascular endothelial growth factor receptor-1, sFlt-1)及胎盘生长因子(placental growth factor, PIGF)在子宫胎盘血管重塑中具有重要作用,二者比值是反映 HDCP 患者发生子痫的重要指标,而 HDCP 产妇在发生子痫后则会增加不良围产结局发生率^[4]。脂联素(adiponectin, APN)是近年来发现的脂肪组织分泌的蛋白质激素,其异常情况与高血压、脂代谢异常密切相关^[5]。当前研究中多探讨 APN、Chemerin、sFlt-1/PIGF 在 HDCP 中的表达情况,较少分析上述指标与 HDCP 产妇不良围产结局的关系。本研究将分析 APN、Chemerin、sFlt-1/PIGF 指标与 HDCP 产妇围产结局相关性,旨在为改善围产结局提供客观依据。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2019 年 1 月至 2021 年 1 月在安徽理工大学第一附属医院生产的 102 例 HDCP 产妇作为研究组。纳入标准:①妊娠史明确;②研究组符合 HDCP 相关诊断标准^[6];③单胎妊娠。排除标准:①胎儿畸形者;②医学和非医学原因导致的妊娠丢失;③资料不完整者。另选取同期 63 例健康产妇作为对照组,对照组产检均显示健康,无妊娠期合并症。两组一般资料比较差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 1。本研究符合《赫尔辛基宣言》,所有受试者均签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 标本采集

所有受试者均在临产前抽取 5 mL 空腹外周

表 1 一般资料比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	年龄(岁)	孕龄(d)	体质量(BMI, kg/m ²)
研究组	102	28.78±4.58	269.64±6.55	22.57±3.69
对照组	63	28.61±4.63	271.33±6.17	23.04±3.56
t 值		0.231	1.646	0.806
P 值		0.818	0.102	0.422

静脉血,室温凝固后在 3 000 r/min 速度下离心 15 min,取血清在-80℃保存待检。

1.2.2 分组标准^[7]

围产结局中含有以下之一的则定义为不良围产结局:胎死宫内、异位妊娠、出生缺陷、低出生体重、胎儿发育迟滞、胎膜早破、新生儿窒息等。

1.2.3 生化指标检测

采用酶化学法(全自动生化分析仪,型号:迈瑞 BS-280,南京贝登医疗股份有限公司生产)测定 sFlt-1、PIGF,试剂盒均购自福建新大陆生物技术有限公司。采用 ELISA 法检测 Chemerin、APN 水平,试剂盒分别购自上海语纯生物科技有限公司、上海瑞番生物科技有限公司。比较两组一般临床资料,包括 BMI、收缩压(systolic blood pressure, SBP)、舒张压(diastolic blood pressure, DBP)、低密度脂蛋白(Low density lipoprotein, LDL)、高密度脂蛋白(High density lipoprotein, HDL)、总胆固醇(total cholesterol, TC)。其中 LDL、HDL、TC 均采用上述全自动生化分析仪检测,试剂盒均购自福建新大陆生物技术有限公司,严格按照试剂盒说明书操作。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析,计量资料采用($\bar{x} \pm s$)表示,行 t 检验;计数资料采用 n(%)表示,行 χ^2 检验;绘制受试者工作曲线(ROC)以评价 APN、Chemerin、sFlt-1/PIGF 在 HDCP 中的诊断效能;以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组生化指标比较

研究组 APN 明显低于对照组,Chemerin、sFlt-1/PIGF 明显高于对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表 2。

表2 两组生化指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of biochemical indexes between 2 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	APN($\mu\text{g/L}$)	Chemerin(pg/L)	sFlt-1/PIGF
对照组	63	9.87 \pm 1.83	9.23 \pm 1.61	17.93 \pm 4.37
研究组	102	6.32 \pm 1.22	24.12 \pm 6.21	29.67 \pm 7.68
t值		14.950	23.049	12.516
P值		<0.001	<0.001	<0.001

2.2 血清 APN、Chemerin、sFlt-1/PIGF 在 HDCP 中的诊断效能

APN、Chemerin、sFlt-1/PIGF 三者联合诊断 HDCP AUC 为 0.965, 明显高于单种指标诊断效能 ($P < 0.05$)。见表 3、图 1。

表3 APN、Chemerin、sFlt-1/PIGF 在 HDCP 中的诊断效能

Table 3 Diagnostic efficiencies of APN, Chemerin and sFlt-1/PIGF for HDCP

指标	AUC	敏感性(%)	特异性(%)	截断点
APN($\mu\text{g/L}$)	0.859	69.84	94.12	8.60
Chemerin(pg/L)	0.872	90.48	89.22	21.97
sFlt-1/PIGF	0.875	96.83	67.65	25.95
联合	0.965	87.30	93.14	0.52

注:联合标准(平行试验):APN \leq 8.60 $\mu\text{g/L}$ 或 Chemerin \geq 21.97 pg/L 或 sFlt-1/PIGF \geq 25.95。

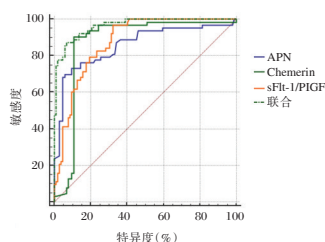


图1 APN、Chemerin、sFlt-1/PIGF 在 HDCP 中的诊断效能

Figure 1 Diagnostic efficiencies of APN, Chemerin and sFlt-1/PIGF for HDCP

2.3 不同围产结局产妇一般资料比较

随访结果显示,84例为正常围产结局,18例出现不良围产结局,正常围产结局及不良围产结局组年龄、BMI、LDL、HDL、TC水平比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$),但两组SBP、DBP、APN、Chemerin、sFlt-1/PIGF比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表4。

2.4 多因素分析

经多因素 Logistic 回归分析,以 SBP、DBP、APN、Chemerin、sFlt-1/PIGF 为自变量,以 HDCP 产妇围产结局(不良=1,正常=0)为应变量,结果显示 SBP、DBP、Chemerin、sFlt-1/PIGF 是导致 HDCP 产

表4 不同围产结局产妇一般资料比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Comparison of general data between puerperae with different perinatal outcomes ($\bar{x} \pm s$)

指标	正常围产结局组 (n=84)	不良围产结局组 (n=18)	t值	P值
年龄(岁)	28.64 \pm 3.15	29.41 \pm 3.62	0.916	0.362
BMI(kg/m^2)	22.56 \pm 2.31	22.64 \pm 2.42	0.132	0.895
SBP(mmHg)	141.26 \pm 6.59	158.33 \pm 9.71	14.531	<0.001
DBP(mmHg)	95.64 \pm 5.33	101.33 \pm 5.49	4.089	<0.001
LDL(mmol/L)	3.34 \pm 0.41	3.32 \pm 0.43	0.186	0.853
HDL(mmol/L)	1.43 \pm 0.15	1.44 \pm 0.17	0.251	0.803
TC(mmol/L)	1.76 \pm 0.21	1.77 \pm 0.25	0.177	0.860
APN($\mu\text{g/L}$)	6.53 \pm 1.09	5.33 \pm 1.17	4.185	<0.001
Chemerin(pg/L)	21.36 \pm 5.29	37.03 \pm 5.69	11.256	<0.001
sFlt-1/PIGF	27.13 \pm 3.69	41.55 \pm 5.22	13.909	<0.001

妇出现不良围产结局的危险因素,APN为保护因素 ($P < 0.05$)。见表5。

表5 影响不良围产结局多因素分析

Table 5 Multivariate analysis of adverse perinatal outcomes

因素	β 值	SE值	Wald χ^2 值	OR值	95%CI	P值
SBP(mmHg)	0.394	0.158	6.218	1.483	1.088~2.021	0.013
DBP(mmHg)	0.257	0.119	4.664	1.293	1.024~1.633	0.031
APN($\mu\text{g/L}$)	-0.319	0.125	6.513	0.727	0.569~0.929	0.011
Chemerin(pg/L)	0.326	0.133	6.008	1.385	1.068~1.798	0.015
sFlt-1/PIGF	0.383	0.129	8.815	1.467	1.139~1.889	0.003

3 讨论

HDCP 为产科常见并发症,随着孕周进展, HDCP 患者肾血管不可避免发生痉挛,肾血流量明显减少,肾脏灌注压也随之降低,严重者肾小球出现梗死,损伤基底膜,影响胎盘血流。而胎盘血管出现痉挛后血流阻力明显增大,胎盘灌注不足则会出现胎盘微血管血栓,进一步导致胎盘绒毛栓塞、坏死,使胎儿出现生长受限、低体重等不良围产结局。云翠兰等^[8]研究显示,Chemerin 可参与多种高危妊娠疾病。叶夏斌等^[9]研究指出,sFlt-1、PIGF 水平变化与 HDCP 病情严重程度具有一定相关性。吴畏等^[10]研究显示,APN 与 HDCP 病情严重程度具有一定相关性。这些研究进一步佐证本研究中提出的 HDCP 者 APN 低于健康者,Chemerin、sFlt-1/PIGF 高于健康者的结果。APN 是一种重要的心血管保护性脂肪因子,可作为判断血管内皮细胞受损的有效指标。APN 可抑制炎症介质产生,降低对血管内皮细胞的损伤,其水平降低时提示血管内皮细胞受损,血管舒张功能异常,全身小动脉痉挛,导致 HDCP 发生^[11]。Chemerin 为近年

来发现的新脂肪细胞因子,由白色脂肪组织分泌,可通过受体 CMKLR1 趋化巨噬细胞,聚集在血管内皮,分泌炎性细胞,损伤血管内皮细胞,进一步引发血管痉挛性收缩,发生高血压^[12]。PIGF 主要生物学功能为诱导机体中血管内皮细胞激活、迁移、增殖,并促进血管生成,增加血管通透性;sFlt-1 主要生物学功能为降低 PIGF 生物学功能,进一步影响血管壁通透性及完整性,导致血管生成障碍;sFlt-1/PIGF 比值越大,抗血管生成效力越大,促进血压升高^[13-14]。本研究还发现,血清 APN、Chemerin、sFlt-1/PIGF 联合诊断 HDCP 效能明显高于单种指标诊断效能,提示临床联合检测以上三个指标可为 HDCP 早期诊断提供有效依据。

本研究经多因素 Logistic 回归分析,结果显示 SBP、DBP、Chemerin、sFlt-1/PIGF 是导致 HDCP 产妇出现不良围产结局的危险因素,APN 为保护因素,与 Yang 等^[15]研究结果相似。提示临床需要针对 SBP、DBP、Chemerin、sFlt-1/PIGF 升高、APN 降低者给予针对性干预及治疗,改善妊娠结局。HDCP 病因复杂,且随着疾病严重程度的增加,母体中环境也随之恶化,SBP、DBP 控制不佳者可能发展为子痫前期甚至子痫,出现持续性蛋白尿及血压升高、头痛、水肿、呼吸困难、腹痛剧烈等,增加不良围产结局发生率。APN 为心血管保护性脂肪因子,ANP 水平升高可抑制成熟巨噬细胞活性,逆转炎症因子对内皮功能的损害,改善围产结局^[16-17]。Chemerin 可与膜上 ChemerinR 结合,促进抑制 G 蛋白活化,进一步抑制腺苷酸环化酶活性,减少 cAMP 生成,诱导钙离子释放,血管收缩,升高血压,增加不良围产结局发生率^[18]。

综上所述,APN、chemerin、sFlt-1/PIGF 的监测可为 HDCP 的诊断提供有效依据,且与不良围产结局密切相关,提示临床需给予针对性早期干预,改善围产结局。

参考文献

- [1] Xiong T, Mu Y, Liang J, et al. Hypertensive disorders in pregnancy and stillbirth rates; a facility-based study in China [J]. Bull World Health Organ, 2018, 96(8): 531-539.
- [2] Walentowicz-Sadlecka M, Domaracki P, Sadlecki P, et al. Assessment of the sFlt-1 and sFlt-1/25(OH)D Ratio as a Diagnostic Tool in Gestational Hypertension (GH), Preeclampsia (PE), and Gestational Diabetes Mellitus (GDM) [J]. Dis Mark, 2019, 6(5): 5870239.
- [3] Yang X, Quan X, Lan Y, et al. Serum chemerin level in women with PCOS and its relation with the risk of spontaneous abortion [J]. Gynecol Endocrinol, 2018, 34(10): 864-867.
- [4] 中华医学会妇产科学分会妊娠期高血压疾病学组. 妊娠期高血压疾病诊治指南(2015) [J]. 中华围产医学杂志, 2016, 3(19): 161-168.
- [5] 唐桂艳, 杨钦琳, 罗婉君, 等. 妊娠剧吐与不良围产结局相关性的荟萃分析 [J]. 妇产与遗传(电子版), 2017, 7(4): 21-26.
- [6] 程惠, 周曙光. PLGF、IL-6 与妊娠期高血压病情程度及母婴结局的相关性 [J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(5): 674-677.
- [7] Agius A, Sultana R, Camenzuli C, et al. An update on the genetics of pre-eclampsia [J]. Minerva Ginecol, 2018, 70(4): 465-479.
- [8] 云翠兰, 刘惠琴, 张志杰, 等. 脂肪因子 Chemerin 在产科高危妊娠疾病中的研究进展 [J]. 中国计划生育学杂志, 2019, 27(10): 1411-1415.
- [9] 叶夏斌, 吴星梅. Kyn/Trp、PIGF、sFlt-1 及 ACR 值与妊娠期高血压疾病的关系 [J]. 中国妇幼健康研究, 2019, 30(6): 687-690.
- [10] 吴畏, 周燕, 戴素蓉, 等. 肌酐比值、 β -痕迹蛋白、脂联素与妊娠期高血压病情程度及与妊娠结局的关联性分析 [J]. 实用医院临床杂志, 2020, 17(6): 94-97.
- [11] Alsnes IV, Vatten LJ, Frasca A, et al. Hypertension in pregnancy and offspring cardiovascular risk in young adulthood: prospective and sib-ling studies in the HUNT Study (Nord-Trøndelag Health Study) in Norway [J]. Hypertension, 2017, 69(4): 591-598.
- [12] 伍立群, 李波, 肖凤仪, 等. 脂肪细胞因子 Chemerin 表达水平对妊娠期高血压的影响 [J]. 检验医学与临床, 2017, 9(10): 39-41.
- [13] Delitala AP, Fanciulli G, Maioli M, et al. Subclinical hypothyroidism, lipid metabolism and cardiovascular disease [J]. Eur J Intern Med, 2017, 38(1): 17-24.
- [14] Magee LA, Von Dadelszen P. State-of-the-Art diagnosis and treatment of hypertension in pregnancy [J]. Mayo Clin Proc, 2018, 93(11): 1664-1677.
- [15] Yang X, Yao J, Wei Q, et al. Role of chemerin/CMKLR1 in the maintenance of early pregnancy [J]. Front Med, 2018, 12(5): 525-532.
- [16] Bian X, Biswas A, X Huang, et al. Short-Term Prediction of Adverse Outcomes Using the sFlt-1 (Soluble fms-Like Tyrosine Kinase 1)/PIGF (Placental Growth Factor) Ratio in Asian Women With Suspected Preeclampsia [J]. Hypertension, 2019, 74(1): 164-172.
- [17] 王莉, 陈小菊, 郑林媚, 等. 脂联素、MMP-9、胎盘生长因子在子痫前期患者中的表达水平及与妊娠结局相关性研究 [J]. 中国优生与遗传杂志, 2018, 26(1): 9-12.
- [18] Hamlaoui ML, Ayachi A, Dekaken A, et al. Relationship of metabolic syndrome and its components with thyroid dysfunction in Algerian patients [J]. Diabet Metab Syndr, 2018, 12(1): 1-4.

PCR-RFLP法检测 *MTRR* 基因 A66G 多态位点的改进

何震宇* 顾取良 陈瑜丽

[摘要] **目的** 对现有检测 *MTRR* 基因 A66G 多态位点的 PCR-RFLP 法进行改进,避免因 *Nde*I 酶切不完全可能导致的基因型误判。**方法** 设计 1 对 PCR 引物,上游引物 3' 端倒数第 3 位含错配碱基,下游引物结合位置位于一个天然的 *Nde* I 识别序列 (CATATG) 72 nt 之后,使用该对引物扩增包含 *MTRR* 基因 A66G 多态位点的靶序列,将多态位点相关的原序列 AATRTG (R 为多态位点碱基 A/G) 变为 CATRTG,以便通过限制性核酸内切酶 *Nde* I 消化来甄别多态位点碱基具体为 A 还是 G,多态位点下游 315 nt 处含有天然的 *Nde* I 识别序列作为内对照酶切位点,PCR 产物用 *Nde* I 消化制作限制性酶切图谱以判断基因型。**结果** PCR 可成功扩增预期大小为 478 bp 的靶片段,在用 *Nde* I 消化 PCR 产物制作而成的限制性酶切图谱中,凭借小于 PCR 产物的 2 种特征性酶切条带可明确判断各样品基因型,即便酶切不完全即出现 PCR 产物残留或酶切中间产物时,基因型的判断也不受干扰,分型结果得到基因测序支持。使用该法检测了 100 例样品,检得 *MTRR* 基因 A66G 多态位点 3 种基因型即 AA、AG、GG 的频率分别为 0.57、0.34、0.09; A 和 G 等位基因频率分别为 0.74 和 0.26,符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡 ($\chi^2=1.355$, $P=0.508$)。**结论** 本方法由于内对照酶切位点的引入,能克服传统 PCR-RFLP 法使用 *Nde* I 酶检测 *MTRR* 基因 A66G 多态位点酶切不完全可能导致的基因型误判。

[关键词] 甲硫氨酸合成酶还原酶; 基因分型; 聚合酶链反应-限制性片段长度多态性

Improvement of PCR-RFLP method for detecting *MTRR* gene A66G polymorphism

HE Zhenyu*, GU Quliang, CHEN Yuli

(School of Life Sciences and Biopharmaceutics, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou, Guangdong, China, 510006)

[ABSTRACT] **Objective** To improve the existing PCR - RFLP method for detecting A66G polymorphic locus of *MTRR* gene to avoid genotype misjudgment that may be caused by incomplete *Nde* I digestion. **Methods** A pair of primers for PCR was designed. The 3'-terminal antepenultimate of the forward primer contains mismatched base, and the binding position of the downstream primer is 72 nt behind a natural *Nde* I recognition sequence (CATATG). The target sequence of A66G polymorphic locus of *MTRR* gene was amplified by this pair primers. The polymorphic locus - related original sequence AATRTG (R=A/G) was changed into CATRTG, in order to use the restriction endonuclease *Nde* I digestion to identify whether the polymorphic base is A or G, an intrinsic *Nde* I recognition sequence CATATG at 315 nucleotides downstream of the polymorphic locus was used as the internal control. PCR products were digested by *Nde* I to produce restriction enzyme digestion maps to identify genotypes. **Results** The target fragment of 478 bp was amplified by PCR, the restriction enzyme digestion map was made from the PCR products digested with *Nde* I. The genotype of each sample can be identified by the characteristic bands smaller than the PCR products in the restriction enzyme digestion map. Even if the digestion is incomplete, the residue of the PCR products or the intermediate products of the digestion can help to determine the genotype. the genotyping method was further

基金项目:广东省科技计划项目(公益研究与能力建设专项资金项目)(2015A030401098)

作者单位:广东药科大学生命科学与生物制药学院,广东,广州 510006

*通信作者:何震宇, E-mail: jdbshzy@163.com

confirmed by gene sequencing. 100 samples were detected. The frequencies of the three genotypes of *MTRR* gene A66G polymorphism, namely AA, AG, and GG were 0.57, 0.34, and 0.09, respectively. The frequencies of A and G alleles were 0.74 and 0.26, respectively, in line with the Hardy-Weinberg genetic balance ($\chi^2=1.355, P=0.508$). **Conclusion** Due to the introduction of endogenous control restriction site, this method can overcome the genotype misjudgment that may be caused by the incomplete restriction of the A66G polymorphic site of the *MTRR* gene using the *Nde* I enzyme in the traditional PCR-RFLP method.

[KEY WORDS] Methionine synthase reductase; Genotyping; Polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism

甲硫氨酸合成酶还原酶又叫5-甲基四氢叶酸-同型半胱氨酸甲基转移酶还原酶(5-methyltetrahydrofolate homocysteine methyltransferase reductase, *MTRR*),在同型半胱氨酸重新甲基化为甲硫氨酸的过程中发挥着重要作用,是叶酸代谢网络的关键酶之一^[1]。*MTRR*基因A66G多态性(rs1801394位点)会引起其编码的酶蛋白第22位氨基酸由异亮氨酸变为甲硫氨酸(I22M),导致*MTRR*的活性及同型半胱氨酸的甲基化速率降低,从而引起多种相关疾病的发生,如唇腭裂^[2]、先天性心脏病、无脑儿或者脊柱裂^[3]、自然流产^[4]、早产^[5]、H型高血压^[6]等。因此,检测*MTRR*基因A66G多态性,对相关疾病的发病风险预测及临床研究均有重要意义。

目前有多种方法可检测*MTRR*基因A66G多态性,包括扩增阻滞突变系统聚合酶链反应^[7]、高分辨率溶解曲线^[6]、SNaPshot测序^[8]及聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP)^[2,9]等。本研究旨在对现有检测*MTRR*基因A66G多态位点的PCR-RFLP法进行改进,通过改变引物的设计,使得野生型等位基因A、突变型等位基因G来源的PCR产物均在多态位点外包含一个*Nde* I识别位点,以期将它作为*Nde* I酶切的内对照从而避免传统方法因*Nde* I酶切不完全即残留PCR产物时可能造成的基因型误判。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

口腔拭子基因组提取试剂盒购自天根生化科技有限公司;2×EasyTaq PCR SuperMix (+dye)购自北京全式金生物技术有限公司;引物自行设计(序列见图1),委托生工生物工程股份有限公司合成;Fastdigest *Nde* I购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司;DNA分子量标准DNA Marker I购自北京

庄盟国际生物基因科技有限公司。

1.2 研究对象

口腔拭子标本100例,采自广东药科大学女性志愿者,平均年龄为(21.87±0.58)岁,事先均签署了知情同意书。

1.3 基因组DNA的制备

准备医用消毒棉签,志愿者先用清水漱口,然后手持棉签伸进口腔,在腮帮子上反复擦拭10次,取出棉签,按试剂盒的说明书步骤提取基因组DNA。

1.4 引物设计

根据NCBI中*MTRR*基因(登录号:NG_008856.1)及dbSNP数据库的相关序列信息,采用primer premier 5.0软件辅以人工修改设计引物。引物与模板的关系见图1,图中第1位碱基为NG_008856.1序列中第6712位碱基,图中第46位碱基R(A/G)为多态位点碱基,上游引物Fo、下游引物Re分别与基因组序列同向、反向。

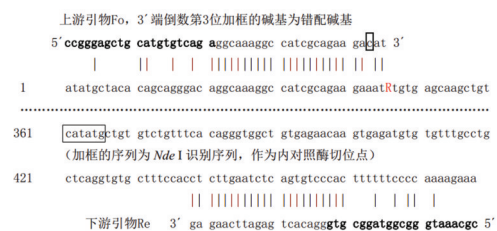


图1 PCR的模板序列、引物序列及引物与模板结合位置示意图

Figure 1 Template sequence, primer sequence and primer-template binding location of PCR

1.5 PCR扩增及产物的电泳鉴定

PCR体系总体积50 μL,其中2×EasyTaq PCR Super Mix 25 μL、上下游引物各10 pmol、基因组DNA 1 μL, ddH₂O补足体积。PCR反应条件:94℃预变性4 min;94℃30 s,60℃30 s,72℃30 s,35个循环;72℃延伸7 min。PCR产物使用1.5%的琼脂糖凝胶电泳进行鉴定。

1.6 PCR产物的酶切分型

酶切反应体系 30 μL, 其中 10×FastDigest Green Buffer 2 μL、FastDigest *Nde* I 1 μL、PCR产物 5~10 μL、ddH₂O 补足体积, 37℃水浴消化 1 h, 然后 65℃水浴保温 5 min 以灭活内切酶。酶切产物经 3.0%的琼脂糖凝胶电泳进行检测, 根据限制性酶切图谱中的特征条带确定每份样品 *MTRR* 基因 A66G 多态位点的基因型。

1.7 测序验证

挑选本法检出的 3 种基因型样品, PCR 扩增其 478 bp 的靶序列委托生工生物工程股份有限公司进行序列测定。

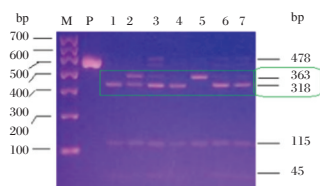
1.8 统计学处理

采用 SPSS 24.0 统计学软件, 计数资料以例数和频数表示, 采用 χ^2 检验进行 Hardy-weinberg 遗传平衡吻合度检测以确定样本是否具有群体代表性, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 *MTRR* 基因 A66G 多态位点 PCR 产物的电泳鉴定

PCR 产物理论大小为 478 bp, 结果符合预期。见图 2。



注: M: DNA 分子量标准; P: PCR 产物; 1、3、4、6、7 为野生型纯合子 AA; 2 为杂合子 AG; 5 为突变型纯合子 GG。

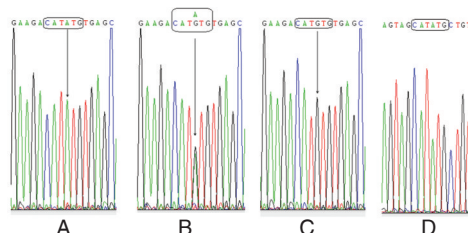
图 2 改进的 PCR-RFLP 鉴定 *MTRR* 基因 A66G 位点基因型之电泳图谱

Figure 2 The electrophoresis map for identificating genotypes of A66G locus of *MTRR* gene by improved PCR-RFLP

2.2 *MTRR* 基因 A66G 多态位点 PCR 产物酶切图谱及基因型判断

电泳图谱里只出现 363 bp 特征性酶切条带的为突变型纯合子 GG 样品, 如图 2 中的 5 号样品; 只出现 318 bp 特征性酶切条带的为野生纯合子 AA 样品, 如图 2 中的 1、4 号样品; 363、318 bp 两种条带同时出现时, 需区分杂合子 AG 样品和因酶切不完全残留 363 bp 条带的野生型纯合子 AA 样品, 图 2 中的 3、6、7 号样品的 363 bp 条带为弱带或痕量

带, 且还伴有痕量的 478 bp PCR 产物残留带, 应属于酶切不完全的情形, 故其基因型均为野生纯合子 AA, 相反, 图 2 中的 2 号样品的两条条带均很明显, 363 bp 条带亮度强于 318 bp 条带, 样品的基因型为杂合子 AG。见图 3。



注: a、b、c 中圈住的序列里下方有箭头的为多态位点碱基, d 中框住的为内对照酶切位点。a、b、c 相应的基因型分别为野生型纯合子 AA, 杂合子 AG, 突变型纯合子 GG。

图 3 *MTRR* 基因 A66G 位点 3 种基因型样品测序峰图

Figure 3 Sequencing maps of three genotypes of A66G Locus of *MTRR* gene

2.3 Hardy-Weinberg 遗传平衡检验

本研究检测到 AA、AG、GG 3 种基因型样品的例数分别为: 57、34、9, 相应的基因型频率分别为 0.57、0.34、0.09。等位基因 A 的频率为 0.74, 等位基因 G 的频率为 0.26。经 Hardy-Weinberg 遗传平衡检验, $\chi^2 = 1.355$ ($P = 0.508$)。

3 讨论

采用 PCR-RFLP 法检测 *MTRR* 基因 A66G 多态位点的既有做法是通过错配上游引物及完全与模板配对的下游引物进行 PCR, 再用限制性核酸内切酶 *Nde* I 消化 PCR 产物制作酶切图谱分辨基因型。上游引物 3' 端倒数第 3 位的错配碱基 C 把基因组原序列 AATRTG (R 为多态位点碱基) 改变成 PCR 产物中的序列 CATRTG, 当 R 为野生型等位基因 A 时, 其可被 *Nde* I 切割, 反之, 当 R 为突变型等位基因 G 时, 其不能被 *Nde* I 切割。该方法最早可追溯到 Wilson A 等的研究^[10], 其所用引物扩增的 PCR 产物长度为 66 bp, 使用 *Nde* I 消化 PCR 产物, A 等位基因的 PCR 产物会被切割成 44 bp 和 22 bp 的片段, G 等位基因的 PCR 产物不会被切割, 仍然保持 66 bp 的条带, Rai V 课题组也曾使用这对引物进行研究^[11]。由于上游引物需在多态位点附近引入错配碱基创造 *Nde* I 酶切位点, 其位置基本固定, 一些研究人员通过改变下游引物的位置, 获得了比 66 bp 更长的 PCR 产物用于分型, 这

些 PCR 产物的长度为 145 bp、151 bp、182 bp 不等^[12-14]。所有这些方法获得的 PCR 产物中除了多态位点相关序列 CATRTG 外,没有额外的 *Nde* I 识别序列,当野生型等位基因 A 的 PCR 产物没有被 *Nde* I 完全消化的时候,其残留的 PCR 产物很可能会造成样品携带 G 等位基因的假象,基因型 AA 样品会被当作基因型 AG 样品对待,这种类似的弊端在针对其他基因多态位点的 PCR-RFLP 分型法中已有报道^[15]。

快速限制性核酸内切酶(简称快酶)FastDigest *Nde* I 消化 PCR 产物的时间 ≥ 60 min,而绝大多数快酶可以在 5~15 min 内完成对 PCR 产物的消化,意味着 *Nde* I 切割 PCR 产物的效率相对较低,出现酶切不完全的概率较大,为了避免既有方法因 *Nde* I 酶切不完全可能导致的基因型误判,建立一种监测酶切程度的体系很有必要,在 PCR 产物中引入内对照酶切位点能很好地监测 PCR 产物是否酶切完全,在其它基因多态位点的检测中已有一定的应用^[16]。本研究结果表明该设计既能很好地监测酶切是否完全,又能很好地通过特征性酶切条带来判断基因型。本研究对上游引物的长度也作出了相应的调整,既有研究的上游引物长度为 20~26 nt 不等的普通引物,本研究的上游引物为长达 45 nt 的长链引物,其中 5'端的 CCGGGAGCTGCATGTGT-CAGAGG 为附加序列,它来自通用测序引物 pGEX3',与模板毫不相关,只起到增加 PCR 产物长度的作用,使得表征 G 等位基因的特征性酶切条带(363 bp)与表征 A 等位基因的特征性酶切条带(318 bp)在琼脂糖凝胶电泳图谱上有良好的区分度。下游引物的 5'端也附加了一段与模板无关的序列,它来自通用测序引物 CMV-F,旨在缩小上、下游引物退火温度的差异,从而保证 PCR 的效率。

总之,本研究经过独特的引物设计,成功地在 PCR 产物中引入了内对照酶切位点,且 PCR 产物、表征 A 等位基因的特征性酶切条带、表征 G 等位基因的特征性酶切条带彼此之间具有良好的区分度,不仅可以监测酶切是否完全,而且在酶切不完全的情况下,能够根据两种等位基因的特征性酶切条带的具体情况判断样品的基因型,在相关的科学研究和临床检测中有一定的推广应用价值。

参考文献

[1] 马利敏,阮林海,刘洪超,等. *MTRR* 基因 A66G 多态性与

儿童急性淋巴细胞白血病关系的 Meta 分析[J]. 肿瘤防治研究, 2015, 42(8):824-828.

- [2] Wang W, Jiao XH, Wang XP, et al. *MTR*, *MTRR*, and *MTHFR* Gene Polymorphisms and Susceptibility to Nonsyndromic Cleft Lip With or Without Cleft Palate [J]. *Genet Test Mol Biomarkers*, 2016, 20(6):297-303.
- [3] 包燕,钱碧霞,谢妮. 个体化补充叶酸对新生儿出生缺陷的影响[J]. 中国妇幼健康研究, 2019, 30(3):338-341.
- [4] 史淑琼,钟进,郭晓玲,等. 佛山地区叶酸利用能力与不良妊娠结局相关性的研究[J]. 中国优生与遗传杂志, 2017, 25(11):84-85.
- [5] 王瑞,吴淑贞,陈娟,等. 叶酸代谢基因多态性及血浆同型半胱氨酸水平与新生儿早产、出生体重的关系[J]. 中国当代医药, 2019, 26(5):4-7.
- [6] 任燕,何玉红,曹敏娟. *MTHFR* 与 *MTRR* 基因相关突变与 H 型高血压相关性分析[J]. 延安大学学报(医学科学版), 2018, 16(3):73-76.
- [7] 邢金芳,贾莉婷,袁恩武,等. 扩增阻碍突变系统聚合酶链反应同时检测 *MTHFR* 和 *MTRR* 基因多态性[J]. 中国妇幼保健, 2014, 29(8):1255-1257.
- [8] 赵薇薇,胡昌明,燕启江,等. 用于 *MTHFR* 基因和 *MTRR* 基因位点多态性检测的引物组、其检测方法和应用[P]. 广东:CN104962621A, 2015-10-07.
- [9] 安海莲,吴兆洋,吴光,等. 延边地区朝鲜族和汉族人群 *MTRRA66G* 基因多态性与脑梗死的关系[J]. 山东医药, 2016, 56(42):46-48.
- [10] Wilson A, Platt R, Wu Q, et al. A common variant in methionine synthase reductase combined with low cobalamin (vitamin B12) increases risk for spina bifida [J]. *Mol Genet Metab*, 1999, 67(4):317-323.
- [11] Rai V, Yadav U, Kumar P, et al. Analysis of methionine synthase reductase polymorphism (A66G) in Indian Muslim population[J]. *Indian J Hum Genet*, 2013, 19(2):183-187.
- [12] Barbosa PR, Stabler SP, Machado AL, et al. Association between decreased vitamin levels and *MTHFR*, *MTR* and *MTRR* gene polymorphisms as determinants for elevated total homocysteine concentrations in pregnant women[J]. *Eur J Clin Nutr*, 2008, 62(8):1010-1021.
- [13] Aksoy-Sagirli P, Erdenay A, Kaytan-Saglam E, et al. Association of Three single nucleotide polymorphisms in *MTR* and *MTRR* genes with lung cancer in a turkish population [J]. *Genet Test Mol Biomarkers*, 2017, 21(7):428-432.
- [14] Zhu H, Wicker NJ, Shaw GM, et al. Homocysteine remethylation enzyme polymorphisms and increased risks for neural tube defects[J]. *Mol Genet Metab*, 2003, 78(3):216-221.
- [15] 刘雪梅,骆子义. Gilbert 综合征及 Crigler-Najjar 综合征诊断方法[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2016, 8(3):201-205.
- [16] Griffioen PH, de Jonge R, van Zelst BD, et al. Detection and allele-frequencies of the 833T>C, 844ins68 and a novel mutation in the cystathionine beta-synthase gene [J]. *Clin Chim Acta*, 2005, 354(1-2):191-194.

卵巢癌患者癌组织中 nm23-H1 和 N-cad 的表达及临床意义

章琴¹ 黄庆^{2*}

[摘要] **目的** 探讨卵巢癌患者癌组织中第23株被检测的基因H1(nm23-H1)蛋白、神经型钙粘附蛋白(N-cad)表达及其临床意义。**方法** 采用免疫组化法检测2011年1月至2013年12月间采集的118例卵巢癌患者组织中nm23-H1、N-cad表达情况。分析nm23-H1、N-cad表达阳性率与卵巢癌病理分级、淋巴结转移间的关系;比较临床病理特征之间的nm23-H1、N-cad表达差异和两组间的生存率。**结果** 转移者nm23-H1表达阳性率低于无转移组($P<0.05$)、N-cad表达阳性率高于无转移组($P<0.05$);nm23-H1低表达组较高表达组浆液型腺癌比例高、病理分级中Ⅲ级比例高、FIGO分期中Ⅲ~Ⅳ比例高($P<0.05$)。N-cad低表达组病理分级中Ⅲ级比例低、FIGO分期中Ⅲ~Ⅳ比例低($P<0.05$);nm23-H1低表达组3年生存率低于高表达组($P<0.05$),N-cad低表达组3年生存率高于高表达组($P<0.05$)。**结论** 卵巢癌组织中的nm23-H1及N-cad表达与卵巢癌发生进展相关,从而可影响卵巢癌患者的生存期。

[关键词] 卵巢癌;蛋白表达;nm23-H1;神经型钙粘附蛋白

Expression and clinical significance of nm23-H1 and N-cad in cancer tissues of patients with ovarian cancer

ZHANG Qin¹, HUANG Qing^{2*}

(1. Department of Obstetrics and Gynecology, First People's Hospital of Jingzhou, Jingzhou, Hubei, China, 434000; 2. Department of Obstetrics and Gynecology, Wuhan Asia Heart Disease General Hospital, Wuhan, Hubei, China, 430022)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the expressions and clinical significance of nm23-H1 protein and N-cadherin (N-cad) in cancer tissues of patients with ovarian cancer. **Methods** Immunohistochemistry was used to detect the expressions of nm23-H1 and N-cad in cancer tissues of 118 patients with ovarian cancer collected from January 2011 to December 2013. The relationship between positive expression rates of nm23-H1 and N-cad and pathological grade and lymph node metastasis of ovarian cancer was analyzed. The expressions of nm23-H1 and N-cad among clinicopathological features and the survival rate between the two groups were compared. **Results** The positive rate of nm23-H1 expression in metastasis group was lower than that in non-metastasis group ($P<0.05$) while the positive rate of N-cad expression was higher than that in non-metastasis group ($P<0.05$). The proportion of serous adenocarcinoma was higher, the proportion of grade III in pathological grade was higher and the proportion of III~IV in FIGO stage was higher in nm23-H1 low expression group compared with nm23-H1 high expression group ($P<0.05$). The proportion of grade III in pathological grade was lower and the proportion of III~IV in FIGO stage was lower in N-cad low expression group ($P<0.05$). The 3-year survival rate in nm23-H1 low expression group was lower than that in high expression group ($P<0.05$) while the 3-year survival rate in N-cad low expression group was higher than that in high expression group ($P<0.05$). **Conclusion** The expressions of nm23-H1 and N-cad in ovarian cancer tissues are related to the occur-

基金项目:湖北省自然科学基金(2018CBD0173)

作者单位:1.荆州市第一人民医院妇产科,湖北,荆州 434000

2.武汉亚洲心脏病总医院妇产科,湖北,武汉 430022

*通信作者:黄庆, E-mail:acf2018f@163.com

rence and progression of ovarian cancer, thus affecting the survival time of patients with ovarian cancer.

[KEY WORDS] Ovarian cancer; Protein expression; nm23-H1; N-cadherin

卵巢癌是临床常见恶性肿瘤之一,其发病率位居女性生殖系统恶性肿瘤第三位,死亡率位居妇科恶性肿瘤第一位^[1]。相关研究显示,由于卵巢癌发病隐匿,且目前缺乏有效的普查和早期诊断方法,约有70%以上的患者就诊时发现肿瘤已处于晚期,预后极差^[2]。恶性肿瘤的转移和侵袭与患者的预后密切相关,是患者死亡的直接原因之一,而第23株被检测的基因H1(non-metastatic-23gene, nm23-H1)是一个重要的肿瘤转移抑制基因^[3]。毛帅等学者^[4]的一项研究表明,槲皮素(quercetin)可上调肝癌细胞的nm23-H1抑制肝癌侵袭转移能力,间接证明了nm23-H1对癌细胞转移的抑制作用。上皮细胞-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)参与肿瘤的发生及转移,神经型钙粘附蛋白(N-cadherin, N-cad)具有间充质细胞的特征,有研究显示其对妊娠滋养细胞肿瘤的发生、恶变有一定影响^[5]。基于此,本研究探究卵巢癌组织中nm23-H1基因编码的蛋白及N-cad表达及其临床意义,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

卵巢癌组织标本均来自于2011年1月至2013年12月间本院收治的118例卵巢癌患者。根据卵巢癌病理分为I组($n=49$)、II组($n=40$)、III组($n=29$),全部随访者98例根据淋巴结转移分为转移组($n=35$)和无转移组($n=63$),分析nm23-H1蛋白、N-cad表达阳性率与卵巢癌病理分级、淋巴结转移间的关系;以阳性++级及以上为高表达(nm23-H1高表达组, $n=69$; N-cad高表达组, $n=34$)、以阳性++级以下为低表达(nm23-H1低表达组, $n=49$; N-cad低表达组, $n=84$)。

纳入标准:所有患者均经病理检查确诊为卵巢癌;年龄>18岁者。排除标准:合并其他恶性肿瘤者;其他卵巢疾病者。所有患者术前均未接受放疗、激素治疗等新辅助抗肿瘤治疗,早期患者采用手术治疗为主,晚期患者均接受新辅助化疗及姑息性减瘤术。患者平均年龄(51.61 ± 10.65)岁,≤60岁者44例、>60岁者74例;绝经前者43例、绝经后者75例;病理类型:浆液型腺癌71例、

黏液型腺癌39例、其他8例;病理分级:I级49例、II级40例、III级29例,国际妇产科联盟(International Federation of Gynecology And Obstetrics, FIGO)分期:I~II期47例、III~IV期71例。

1.2 检测方法

所有卵巢癌组织标本均采用免疫组化链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连结法(streptavidin-peroxidase, SP)法^[6]:所有病例标本均经石蜡包埋,用切片机5 μm连续切片,温箱烤干,切片经常规二甲苯脱蜡,梯度酒精脱水干燥,用3%过氧化氢去内源性过氧化物酶,用pH6.0枸橼酸缓冲液抗原修复,血清工作液封闭10 min后,加兔抗人nm23-H1单克隆抗体(北京博奥森生物技术有限公司生产),4℃冰箱孵育过夜后,加入生物素标记二抗,再用二氨基联苯(diaminobenzidine, DAB)显色,苏木精复染,梯度乙醇脱水、二甲苯透明、干燥后封片;利用光学显微镜观察肿瘤细胞的染色情况。若细胞质或者是细胞核内部出现棕黄色的颗粒,则将nm23-H1和N-cad标记为阳性,用符号“+”代表,若没有观察到棕黄色颗粒,则将其标记为阴性,用符号“-”代表^[7]。

1.3 评估标准

阳性染色为胞浆(少数为胞浆和胞核)有细小棕色颗粒沉着,阴性切片中无棕色物质出现;阳性程度^[8]按阳性细胞所占比例分为4级:0(-)、1%~30%(+)、31%~60%(++)、>60%(+++);无病生存期指首次化疗日期开始至出现局部复发和(或)远处转移的时间^[9]。

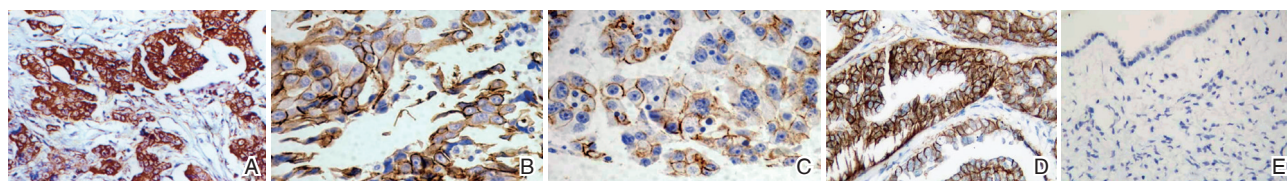
1.4 统计学方法

采用SPSS 19.0统计软件进行数据分析,计量数据以($\bar{x} \pm s$)表示,行 t 检验,计数数据以 $[n(\%)]$ 表示,行 χ^2 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 卵巢癌组织中nm23-H1及N-cad表达情况

118例卵巢癌均为恶性肿瘤, nm23-H1阳性表达率为78.81%(93/118);其中-级25例、+级24例、++级37例、+++级32例,见图1-A。N-cad阳性表达率为38.98%(46/118);其中-级72例、+级12例、++级19例、+++级15例,见图1 B-E。



注: A为++卵巢组织中的nm23-H1表达; B为肿瘤转移者转移部位N-cad表达; C为卵巢组织中的N-cad表达,阳性++; D为卵巢组织中的N-cad表达,阳性+++; E为卵巢组织中的N-cad表达,阴性。

图1 卵巢癌患者癌组织的nm23-H1、N-cad表达(苏木精-伊红染色,×400)

Figure 1 Expression of nm23-H1 and N-cad in cancer tissues of patients with ovarian cancer(苏木精-伊红染色,×400)

2.2 nm23-H1 和 N-cad 表达与肿瘤转移的关系

随访40个月,获得全部随访资料者98例,失访率16.95%(20/118),其中转移者35例,无转移者63例;转移者nm23-H1表达阳性率低于无转移组($P<0.05$),转移者N-cad表达阳性率高于无转移组($P<0.05$),见表1。

表1 nm23-H1 和 N-cad 表达与肿瘤转移的关系 [n(%)]

Table 1 Relationship between expressions of nm23-H1 and N-cad and tumor metastasis [n(%)]

指标	n	阳性率	χ^2 值	P值	
nm23-H1	转移	35	14(40.00)	34.082	0.000
	无转移	63	59(93.65)		
N-cad	转移	35	22(62.86)	5.539	0.019
	无转移	63	24(38.09)		

2.3 nm23-H1 表达与卵巢癌临床病例特征关系

nm23-H1低表达组较高表达组浆液型腺癌比例高、病理分级中Ⅲ级比例高、FIGO分期中Ⅲ~Ⅳ比例高($P<0.05$);nm23-H1低表达组与高表达组,差异无统计学意义($P>0.05$)。N-cad低表达组病理分级中Ⅲ级比例低、FIGO分期中Ⅲ~Ⅳ比例低($P<0.05$),N-cad低表达组与高表达组,比较差异无统计学意义($P>0.05$),见表2。

2.4 生存分析

本研究随访时间自首次化疗日期,末次随访

日期为2018年4月,随访40个月。获得全部随访资料者98例,卵巢癌患者1年、3年生存率分别为98.98%(97/99)、82.47%(80/97);nm23-H1和N-cad低表达组与高表达组1年生存率对比差异无统计学意义($P>0.05$);nm23-H1低表达组3年生存率低于高表达组($P<0.05$),N-cad低表达组3年生存率高于高表达组($P<0.05$),见表3。

表3 nm23-H1 和 N-cad 表达与生存率的关系 [n(%)]

Table 3 Relationship between expressions of nm23-H1 and N-cad and survival rate [n(%)]

组别	n	1年生存率	3年生存率		
nm23-H1	低表达组	49	38(77.55)	28(57.14)	
	高表达组	69	59(85.51)	52(75.36)	
	χ^2 值	-	1.240	4.356	
N-cad	低表达组	84	71(84.52)	62(73.81)	
	高表达组	34	26(76.47)	18(52.94)	
	χ^2 值	-	1.073	4.828	
		P值	-	0.300	0.028

3 讨论

人类的nm23基因定位于17号染色体长臂上,该基因编码具有二磷酸核苷激酶活性的蛋白质,对肿瘤的增殖、分化、侵袭及转移起重要作用^[10]。相关研究指出,nm23基因编码的蛋白几乎存在于所有正

表2 nm23-H1、N-cad 表达与卵巢癌临床病理特征关系 [n(%)]

Table 2 Relationship between nm23-H1、N-cad expression and clinicopathological features of ovarian cancer [n(%)]

临床病理特征	n	nm23-H1		χ^2 值	P值	N-cad		χ^2 值	P值	
		低表达组(n=49)	高表达组(n=69)			低表达组(n=84)	高表达组(n=34)			
年龄	≤60岁	44	21(47.73)	23(52.27)	1.111	0.292	29(65.91)	15(34.09)	0.953	0.329
	>60岁	74	28(37.84)	46(62.16)			55(74.32)	19(25.68)		
病理类型	浆液型腺癌	71	41(57.75)	30(42.25)	23.634	0.000	53(74.65)	18(25.35)	1.098	0.578
	黏液型腺癌	39	4(10.26)	35(89.75)			26(66.67)	13(33.33)		
	其他	8	4(50.00)	4(50.00)			5(62.50)	3(37.50)		
病理分级	I	49	8(16.33)	41(83.67)	22.058	0.000	43(87.76)	6(12.24)	11.655	0.003
	II	40	23(57.50)	17(42.50)			25(62.50)	15(37.50)		
	III	29	18(62.07)	11(37.93)			16(55.17)	13(44.83)		
FIGO分期	I~II	47	18(38.30)	29(61.70)	4.279	0.039	39(82.98)	8(17.02)	5.296	0.021
	III~IV	71	41(57.75)	30(42.25)			45(63.38)	26(36.62)		

常细胞中,而在高分化肿瘤细胞中的表达较高,在低分化及具有高度转移潜能的肿瘤细胞中不表达或仅有微弱表达^[11]。既往 *nm23* 基因家族研究较多,目前已知 *nm23* 基因家族包括 H1~H10 等 10 个基因,其中 *nm23-H1* 基因与肿瘤转移关系密切^[12]。

nm23 抑制基因的 2 个重要作用分别是参与二磷酸鸟苷转化,排斥肿瘤细胞微管蛋白的聚合与结局,影响细胞骨架状态以抑制肿瘤细胞移动;参与 G 蛋白调控的跨膜信息传递,阻断生长信号传导、组织细胞分化及癌基因转化^[13]。因此,*nm23* 抑制基因在卵巢癌发生进展及肿瘤转移中,均起抑制作用。在临床分期方面,低表达组 III~IV 期比例也高于高表达组,因此 *nm23-H1* 蛋白表达也与卵巢癌病情进展有关,*nm23-H1* 的高表达水平能够下调卵巢肿瘤细胞的生长速率。近年来有研究发现,基质金属蛋白酶是卵巢癌敏感性标志物,对于评判肿瘤转移、复发具有重要作用^[14]。基质金属蛋白酶可通过调节细胞外基质和基底膜来影响肿瘤细胞的侵袭和扩散^[15]。本研究结果也显示,肿瘤转移组 *nm23-H1* 表达总阳性率明显低于无转移组。

肿瘤的发生发展是一个复杂的病理过程,是多基因、多因素共同作用的结果。而 N-cad 作为间质细胞相关标志物,其作用于肿瘤的机制考虑主要与 EMT 相关^[16]。本研究结果显示 N-cad 增高与卵巢癌发生有关。且 N-cad 高表达组在肿瘤低分化、FIGO III~IV 期中占比更高。同时,肿瘤转移者 N-cad 阳性率更高。刘心等学者^[17]的观点认为,高表达的 N-cad 可促使 EMT,使相对静止的肿瘤细胞变为有运动能力的细胞,因此其在肿瘤转移中也发挥作用。

肿瘤术后复发转移往往会大幅度缩短患者生存期,也是多数患者的直接致死原因。在预后随访方面,N-cad 与 *nm23-H1* 蛋白表达呈现出完全相反的趋势。N-cad 高表达组 1 年生存率、3 年生存率均低于低表达组,提示 N-cad 高表达确能使卵巢癌患者预后不良风险提高;而 *nm23-H1* 低表达组 1 年、3 年生存率则均低于高表达组。上述结果说明 *nm23-H1* 高表达抑制肿瘤进展和转移有益于延长患者生存期。而 N-cad 蛋白高表达则会导致肿瘤复发转移风险增高,在临床诊治中,尤其是肿瘤根治术后监测两指标水平变化既有利于预测转移复发潜在风险,也有利于早期发现转移复发予以治疗。

综上所述,卵巢癌组织中的 *nm23-H1* 蛋白及 N-cad 高表达均能影响肿瘤细胞分化、干扰临床病

情进展,从而影响卵巢癌患者的生存期。

参考文献

- [1] 狄文,胡媛. 卵巢癌的大数据研究[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2018, 34(1):18-22.
- [2] 张爽爽,夏庆民,郑荣寿,等. 中国 2010 年卵巢癌发病与死亡分析[J]. 中国肿瘤, 2016, 25(3):169-173.
- [3] 初桂伟,王利伟,赵月,等. 转移抑制基因 *nm23-H1* 在结肠癌患者组织中的表达及其临床意义[J]. 解放军预防医学杂志, 2018, 36(9):94-96, 119.
- [4] 毛帅,张继红,邓量,等. Quercetin 上调 *Nm23-H1* 表达抑制肝细胞癌的侵袭转移[J]. 中华普通外科杂志, 2016, 31(6):493-496.
- [5] 付熙,李燕,丁岩. 上皮型钙粘蛋白和层粘连蛋白在妊娠滋养细胞肿瘤的临床价值[J]. 新疆医科大学学报, 2017, 40(9):1165-1168, 1171.
- [6] 刘伟,黄超,邢伟. 大肠癌中 *Survivin* 和 *nm23-H1* 的表达及其联合检测的临床意义[J]. 临床和实验医学杂志, 2016, 15(22):2076-2074.
- [7] 刘翠云,董惠,成慧,等. 探讨 *nm23-H1*、*VEGF-C* 和 *CD31* 在甲状腺乳头状癌中表达的相关性[J]. 诊断病理学杂志, 2017, 24(4):284-287.
- [8] Kim I. *NM 23-H1* gene expression of a migration suppressor in gastric lymphoma[J]. J Clin Oncol, 2017, 35(4):39.
- [9] 李苓,秦莉,焦淑红,等. *AIB1* 蛋白在卵巢癌组织中的表达及其临床意义[J]. 国际肿瘤学杂志, 2017, 44(12):902-906.
- [10] 钱希铭,王晓明,高亚英,等. 小细胞肺癌患者化疗前后血清 *ProGRP*、*CEP350*、*NSE* 含量评估及其与疾病预后的关系[J]. 海南医学院学报, 2016, 22(16):1848-1850.
- [11] 龚晓瑾,王磊,鞠佳妮,等. *E-cadherin*、*nm23* 在食管鳞癌患者中的表达及其意义[J]. 新疆医科大学学报, 2017, 40(11):1438-1441.
- [12] 汪根莲,林爱琴,段仁杰,等. *nm23-H1* 和 *p53* 基因在子宫内膜异位症患者异位组织中的表达及意义[J]. 皖南医学院学报, 2016, 35(01):5-7.
- [13] 顾桂源,王维格,黄山. 甲状腺微小乳头状癌组织中 *Bax*、*nm23* 蛋白的表达及临床意义[J]. 中国医药导报, 2017, 14(36):29-32, 181.
- [14] 付立业,田昕,李妍,等. 基质金属蛋白酶-9 及血管内皮生长因子在卵巢癌组织中的表达及临床意义[J]. 现代肿瘤医学, 2017, 25(22):3665-3669.
- [15] 郑海霞,崔永言,申东兰,等. *nm23-H1* 基因转染对肺癌细胞 *MMP-9* 和 *TIMP-1* 表达的影响[J]. 临床肿瘤学杂志, 2015, 20(2):104-107.
- [16] 林路,赵卫东,何玉,等. *E-cadherin*、 β -*catenin*、*N-cadherin* 在卵巢浆液性癌中的表达及意义[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2015, 24(1):95-100.
- [17] 刘心,徐颖娟,杨畅,等. 钙黏素和整合素在卵巢上皮性癌中的研究进展[J]. 实用肿瘤学杂志, 2017, 31(6):548-553.

PET-1、NO及ALD在肾性高血压中表达及与肾功能、血压相关性

叶扬梅¹ 李玲芝¹ 王伟乐^{2*}

[摘要] **目的** 探讨血浆内皮素(PET-1)、一氧化氮(NO)及醛固酮(ALD)在肾性高血压中的表达及与肾功能、血压的相关性。**方法** 选取2018年10月至2020年10月本院收治的60例肾性高血压患者作为观察组,选取同期在本院体检的48例原发性高血压患者设为原发性高血压组,另选取同期在本院进行健康体检的48例无高血压的健康人群设为对照组。比较三组PET-1、NO、ALD水平,分析水平PET-1、NO、ALD水平与肾功能指标、血压的相关性,绘制ROC曲线,分析PET-1、NO、ALD单独检测及三者联合检测对发生肾性高血压的预测价值。**结果** 3组PET-1、NO及ALD水平:观察组>原发性高血压组>对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。PET-1、NO及ALD水平与肾性高血压患者肾功能相关指标(BUN、Cr、Cystatin C、BMG、UA)呈正相关($P<0.05$),与肾性高血压患者血压呈正相关($P<0.05$)。PET-1、NO、ALD水平及三者联合曲线下面积分别为0.854、0.843、0.860、0.993,各指标曲线下面积以联合检测最大。**结论** PET-1、NO及ALD与肾性高血压患者肾功能、血压相关,临床工作中可通过对高血压人群加强联合PET-1、NO及ALD检测,以提高早期肾性高血压的诊断率。

[关键词] PET-1; NO; 醛固酮; 肾性高血压; 肾功能; 血压

Expression of PET-1, nitric oxide and aldosterone in patients with renal hypertension and their correlation with renal function and blood pressure

YE Yangmei¹, LI Lingzhi¹, WANG Weile^{2*}

(1. Department of Nephrology, the Eighth People's Hospital of Hefei, Hefei, Anhui, China, 238000;
2. Department of Nephrology, the First People's Hospital of Hefei, Hefei, Anhui, China, 230001)

[ABSTRACT] **Objective** To study the expression of endothelin (PET-1), nitric oxide (NO) and aldosterone (ALD) in patients with renal hypertension and their correlation with renal function and blood pressure. **Methods** A total of 60 patients with renal hypertension admitted to this hospital from October 2018 to October 2020 were selected as the observation group, 48 patients with essential hypertension who had physical examination in this hospital during the same period were selected as the essential hypertension group, and 48 healthy people without hypertension were selected as the control group. The levels of PET-1, NO and ALD in the three groups were compared, the correlations between the levels of PET-1, NO and ALD, renal function index and blood pressure were analyzed. The ROC curve was drawn to analyze the predictive value of PET-1, NO and ALD as well as the combined detection of the three in the occurrence of renal hypertension. **Results** The levels of PET-1, NO and ALD in the three groups were as follows: the observation group > the essential hypertension group > the control group, the difference was statistically significant ($P<0.05$). The levels of PET-1, NO and ALD were positively correlated with renal function indexes (BUN, Cr, Cystatin C, BMG, UA) in patients with renal hypertension ($P<0.05$). The levels of PET-1, NO and ALD were positively correlated with

基金项目:安徽省自然科学基金(16808085MH216)

作者单位:1. 合肥市第八人民医院肾内科,安徽,合肥 238000

2. 合肥市第一人民医院肾脏内科,安徽,合肥 230001

*通信作者:王伟乐, E-mail:280552189@qq.com

the blood pressure of patients with renal hypertension ($P<0.05$). The areas under the curves of PET-1, NO, ALD and the combined curve of the three were 0.854, 0.843, 0.860, 0.993, respectively. The area under the combined detection curve was the largest. **Conclusion** PET-1, NO and ALD are related to renal function and blood pressure in patients with renal hypertension. Clinically, the combined PET-1, NO and ALD detection can be strengthened in hypertensive populations to improve the diagnosis rate of early renal hypertension.

[Key words] PET-1; NO; Aldosterone; Renal hypertension; Renal function; Blood pressure

肾性高血压是慢性肾衰竭患者常见症状之一,主要由为肾实质性疾病,如慢性肾小肾炎、肾盂肾炎等疾病引起血压升高。这些疾病的发生、发展均可引发高血压,进而加重肾脏损伤程度,其与患者本身的肾脏疾病相互影响,形成恶性循环^[1]。肾性高血压的发病机制为肾素-血管紧张素系统激活而引起水钠滞留,并导致肾分泌的抗高血压物质降低^[2]。因此,生物学的指标水平在肾性高血压中的表达情况逐渐受到广大学者的重视。血浆内皮素(Endothelin, PET-1)广泛存在于血管内皮及机体各组织及细胞中,起到维持血管张力、调节心血管功能的作用,而血管内皮细胞可不断生成一氧化氮(Nitric Oxide, NO),以维持血管舒张度,以维持血管张力^[3]。醛固酮(Aldosterone, ALD)属于盐皮质激素家族,对调节机体水盐代谢、血压、激素等具有重要意义^[4]。本研究旨在探讨PET-1、NO及ALD在肾性高血压中的表达及与肾功能、血压的相关性,现研究报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2018年10月至2020年10月本院收治的60例肾性高血压患者作为观察组。纳入标准:①均符合《原发性肾小球疾病分型中慢性肾炎诊断标准》^[5],确诊为原发性慢性肾炎;②均为合并肾性高血压;③临床资料无缺失;④年龄在18岁以上,80岁以下。排除标准:①纳入研究前进行过影响PET-1、NO及ALD的降压药、避孕药等相关药物者;②合并其他恶性肿瘤及重要器官严重疾病者;③治疗依从性不佳者,对本研究配合度不高者;④由妊娠期或中毒症引起的高血压。选取同期在本院体检的48例原发性高血压患者设为原发性高血压组。另选取同期在本院进行健康体检的48例无高血压的健康人群设为对照组。三组一般资料比较差异无统计学意义($P>0.05$),见表1。本研究经医院医学伦理委员会批准通过,所有受试者签署知情同意书。

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

Table 1 comparison of three sets of general information [$n(\%)$, ($\bar{x}\pm s$)]

组别	<i>n</i>	男/女	平均年龄(岁)	平均BMI(kg/m ²)
观察组	60	41(68.33)/19(31.67)	63.51±3.57	25.14±1.05
原发性高血压组	48	33(68.75)/15(31.25)	63.58±3.62	25.09±1.01
对照组	48	35(72.92)/13(27.08)	63.61±3.65	24.88±0.98
<i>F</i> 值		0.308	0.010	0.940
<i>P</i> 值		0.857	0.989	0.392

1.2 方法

所有对象均在平躺或静卧3 h以上后,站立位空腹抽取静脉血3 mL,3 000 r/min离心,持续5 min分离血清及血浆,样本置于-20℃下保存待检,检测血尿素氮(Blood urea nitrogen, BUN)、肌酐(Creatinine, Cr)、胱抑素C(Cystatin C)、B-2微球蛋白(β 2-microglobulin, BMG)、尿酸(Uric acid, UA)水平。使用化学发光法检测PET-1、ALD水平,仪器及配套试剂盒为郑州安图公司提供的AutO2000。采用光电比色法测定NO,试剂盒由北京军事医学科学院提供。仪器均经过校标和质控以确保结果准确性,相关操作严格按照实验流程进行。PET-1正常范围:43~70 pg/L^[6];NO正常范围:0.024~0.045(μ mol/mL)^[7];ALD正常范围在151~170 pg/mL^[8]。

1.3 观察指标

比较三组PET-1、NO及ALD水平,并分析这三项指标与肾功能、血压之间的相关性,采用ROC曲线分析PET-1、NO及ALD检测及三者联合检测对发生肾性高血压的预测价值。

1.4 统计学方法

采用SPSS 22.0软件进行统计分析,计数资料通过(%)表示,采用 χ^2 检验;计量资料采用($\bar{x}\pm s$)表示,两组间比较行*t*检验、多组间比较行*F*检验;PET-1、NO及ALD与肾功能、血压之间的相关性采用Pearson相关分析;绘制ROC曲线分析PET-1、NO及ALD检测及三者联合检测对肾性高血压的预测价值,分析并计算ROC曲线下面积等

指标,以评价预测准确性。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3组 PET-1、NO 及 ALD 水平比较

3组 PET-1、NO 及 ALD 水平:观察组 > 原发性高血压组 > 对照组,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表2。

表2 3组 PET-1、NO 及 ALD 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	PET-1(pg/L)	NO($\mu\text{mol/mL}$)	ALD(pg/mL)
观察组	60	128.68 \pm 42.58	0.069 \pm 0.008	354.11 \pm 18.14
原发性高血压组	48	94.51 \pm 27.41	0.058 \pm 0.003	259.54 \pm 13.65
对照组	48	64.47 \pm 20.41	0.041 \pm 0.002	189.29 \pm 12.07
F 值		52.460	365.780	1615.500
P 值		0.001	0.001	0.001

2.2 PET-1、NO 及 ALD 水平与肾性高血压患者肾功能的相关性

PET-1、NO 及 ALD 水平与肾性高血压患者肾功能相关指标(BUN、Cr、Cystatin C、BMG、UA)呈正相关($P < 0.05$)。见表3。

表3 PET-1、NO 及 ALD 水平与肾性高血压患者肾功能的相关性

因素	PET-1		NO		ALD	
	r 值	P 值	r 值	P 值	r 值	P 值
BUN	0.831	0.024	0.814	0.011	0.784	0.015
Cr	0.864	0.005	0.789	0.007	0.774	0.004
Cystatin C	0.785	0.010	0.852	0.025	0.689	0.026
BMG	0.699	0.012	0.654	0.014	0.754	0.032
UA	0.824	0.008	0.721	0.008	0.789	0.018

2.3 PET-1、NO 及 ALD 水平与肾性高血压患者血压的相关性

PET-1、NO 及 ALD 水平与肾性高血压患者血压呈正相关($P < 0.05$)。见表4。

表4 PET-1、NO 及 ALD 水平与肾性高血压患者血压的相关性

因素	PET-1		NO		ALD	
	r 值	P 值	r 值	P 值	r 值	P 值
收缩压	0.754	0.011	0.823	0.012	0.887	0.018
舒张压	0.773	0.015	0.814	0.006	0.718	0.021

2.4 PET-1、NO、ALD 水平及三者联合检测发生肾性高血压的预测价值

采用 ROC 曲线分析 PET-1、NO 及 ALD 水平及三者联合检测发生肾性高血压的预测价值, PET-1、NO、ALD 水平及三者联合曲线下面积分别为 0.854、0.843、0.860、0.993,各指标曲线下面积以联合检测最大。见表5及图1。

表5 PET-1、NO、ALD 水平及三者联合检测发生肾性高血压的预测价值

预测指标	最佳临界值	灵敏度	特异度	AUC	95%CI
PET-1	25.10	0.619	0.628	0.854	0.725~0.985
NO	26.41	0.720	0.735	0.843	0.721~0.965
ALD	25.42	0.758	0.714	0.860	0.729~0.991
三者联合检测	27.59	0.895	0.899	0.993	0.000~1.000
预测指数模型	1.586	0.587	0.760	0.895	0.734~0.994

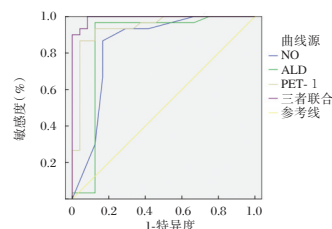


图1 ROC 曲线

Figure 1 ROC curve

3 讨论

肾性高血压为继发性高血压,易并发心血管方面的严重并发症,随着疾病发展还可能会发展成恶性高血压。有学者研究指出,肾性高血压的主要发病机制为:肾内灌注压降低和肾实质疾病等因素使球旁细胞释放大量肾素,引起肾素-血管紧张素-醛固酮系统高活动水平^[9]。及时发现和治疗肾脏原发病成为临床控制、根治高血压的主要目标。

相关研究分析了原发性高血压患者及肾性高血压患者血浆中 PET-1 水平,发现肾性高血压患者 PET-1 水平明显要高于原发性高血压患者^[10]。本研究发现,在肾性高血压患者 PET-1 表达水平较高,且 PET-1 与肾性高血压患者肾功能相关指标(BUN、Cr、Cystatin C、BMG、UA)及血压(收缩压、舒张压)呈正相关。可见随着 PET-1 水平的升高,肾性高血压患者肾功能相关指标、血压随之升高,PET-1 肾性高血压患者肾功能、血压之间有密切联系,与既往文献报道结果一致^[11]。

NO是一类血管活性物质,分布于肾小球、集合管等部位,其为临床公认的血管调节因子^[12],但NO在肾性高血压中的水平的相关研究鲜有报道。NO在颅内动脉粥样硬化、原发性高血压等疾病中均呈高表达状态^[13]。本研究结果证实NO参与肾性高血压的发病过程,NO与肾性高血压患者的肾功能相关指标、血压水平之间存在显著相关性。

ALD作为检测心血管损害的重要指标之一,逐渐受到各界学者的重视。有学者通过动物实验,指出ALD参与高血压病情发生、发展的过程,并会对肾脏造成不可逆的损害^[14]。ALD的大量分泌可致使钠水滞留,不利于血压、细胞外液正常循环从而增加外周阻力,加重肾脏负担。本研究结果与Conway等学者^[8]报道结果一致。

Lee等学者^[15]指出,肾病发展为晚期肾病主要以肾性高血压引起的肾损害为主要诱因,若对肾性高血压进行早期诊断,并予以相应的干预措施,可延缓肾病发展。本研究采用ROC曲线分析PET-1、NO及ALD单独检测及三者联合检测对肾性高血压发生的预测价值,发现联合三者检测灵敏度、特异度较高。但由于本研究未对肾性高血压及原发性高血压进行随访,未了解其预后情况,PET-1、NO及ALD水平变化对预测发生肾性高血压的价值仍有待进一步研究。

综上所述,PET-1、NO及ALD水平越高肾性高血压患者肾功能相关指标、血压越高。提示临床工作中可通过对高血压人群加强联合PET-1、NO及ALD检测,尽早制定诊疗方案,阻碍疾病进一步进展,利于患者预后。

参考文献

- [1] 周源,王明军,谭敏谊,等. 水解酪蛋白肽粉抗肾性高血压大鼠心肌重构作用研究[J]. 中国药师, 2019, 22(10): 1819-1823.
- [2] 郑颖,蔡广研,陈香美. 《ISH2020全球高血压实践指南》对我国肾性高血压管理的启示[J]. 中华医学杂志, 2020, 100(42): 3281-3284.
- [3] Senft RA, Freret ME, Sturrock N, et al. Neurochemically and Hodologically Distinct Ascending VGLUT3 versus Serotonin Subsystems Comprise the r2- Pet1 Median Raphe[J]. J Neuroscience, 2021, 41(12): 1667-1670.
- [4] Wichmann CW, Goh YW, Parslow AC, et al. Synthesis and validation of [18F]mBPET-1, a fluorine-18 labelled mTOR inhibitor derivative based on a benzofuran backbone [J]. EJNMMI Radioph Chem, 2020, 5(1): 158-15.
- [5] Sheu TC, Holt D, Moole V, et al. Renal artery bypass including aortic graft for renovascular hypertension [J]. J Pediatr Surg Case Rep, 2019, 49(11): 101-295.
- [6] Abulizi M, Sifaoui I, Wuliya-Gariepy M, et al. 18F-sodium fluoride PET/MRI myocardial imaging in patients with suspected cardiac amyloidosis [J]. J Nucl Cardiol, 2019, 15(8): 1-10.
- [7] Mccall T B, Boughtonsmith N K, Palmer R M, et al. Synthesis of nitric oxide from L-arginine by neutrophils. Release and interaction with superoxide anion [J]. Biochem J, 2019, 30(1): 293-296.
- [8] Conway S P, Dudley N, Sheridan P, et al. Haemochromatosis and aldosterone deficiency presenting with Yersinia pseudotuberculosis septicaemia [J]. Postgrad med J, 2018, 29(761): 174-176.
- [9] 陈道强,吴玲,龚源. HbA1c、MA1b联合Cys-C检测在糖尿病肾病诊断、病情评估中的应用[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2021, 13(9): 1507-1510.
- [10] Evci M, Tevlek A, Aydin H M, et al. Synthesis of temperature and light sensitive mixed polymer brushes via combination of surface-initiated PET-ATRP and interface-mediated RAFT polymerization for cell sheet application [J]. Appl Surf Sci, 2020, 511(1): 145-150.
- [11] Primus C P, Clay T, Al-Khayfawee A, et al. P4192Re-classification improvement using 18F-FDG PET CT in the diagnosis of infective endocarditis over the modified Duke's criteria [J]. Europ Heart J, 2018, 46(1): 1-3.
- [12] Tebbi A, Guittet O, Cottet M H, et al. TAp73 induction by nitric oxide: regulation by checkpoint kinase 1 (CHK1) and protection against apoptosis [J]. J Biol Chem, 2020, 19(43): 56-59.
- [13] Harutyunyan EH, Safonova TN, Kuranova IP, et al. The binding of carbon monoxide and nitric oxide to leghaemoglobin in comparison with other haemoglobins [J]. J molec biol, 2019, 23(1): 152-161.
- [14] Joseph JJ, Pohlman NK, Zhao S, et al. The Association of Serum Aldosterone and Plasma Renin Activity with Ambulatory Blood Pressure in African Americans: The Jackson Heart Study [J]. Circulation, 2021, 14(25): 69-70.
- [15] Lee CK, Wang TD, Lee YH, et al. Efficacy and Safety of Renal Denervation for Patients with Uncontrolled Hypertension in Taiwan: 3-Year Results From the Global SYMPLICITY Registry - Taiwan (GSR - Taiwan) [J]. Acta Card Sin, 2019, 35(6): 14-78.

脂肪间充质干细胞外泌体 miR-212-3p 对成纤维样滑膜细胞的影响

贾丙申* 于鹏 焦拓 李君 李明 曲国欣 纪志华 付昆

[摘要] **目的** 探讨脂肪间充质干细胞(ADSCs)外泌体 miR-212-3p 对类风湿性关节炎成纤维样滑膜细胞 RA-FLS 增殖、迁移和侵袭的影响及其作用机制。**方法** 收集海南医学院第一附属医院类风湿性关节炎(RA)患者和健康者血清各 20 例,采用 RT-qPCR 检测血清中 miR-212-3p 的表达情况。体外细胞可分为 4 组:RA-FLS 细胞单独培养(NC 组)、RA-FLS 细胞+Exo-ADSCs 共培养(Exo 组)、RA-FLS 细胞+沉默外泌体 miR-212-3p 共培养(Exo-antagomiR-212-3p 组)、敲降 RA-FLS 细胞 SMAD1+沉默外泌体 miR-212-3p 共培养(si-SMAD1+Exo-antagomiR-212-3p 组)。外源性调节 ADSCs 细胞中 miR-212-3p 和 RA-FLS 细胞中 SMAD1 的表达水平后,将 ADSCs 外泌体与 RA-FLS 细胞共培养,CCK-8 和 Transwell 分别检测 RA-FLS 细胞增殖活力、迁移和侵袭能力;采用双荧光素酶报告基因验证 miR-212-3p 与 SMAD1 之间的靶向关系。**结果** 与健康者相比,miR-212-3p 在 RA 患者血清中低表达,差异有统计学意义($P < 0.05$);与 NC 组相比,Exo 组中 miR-212-3p 表达显著上调,增殖活力、迁移和侵袭显著降低,差异无统计学意义(均 $P > 0.05$);miR-212-3p 能够靶向结合 SMAD1 的 3' UTR;同时与 NC 组相比,Exo 组及 si-SMAD1+Exo-antagomiR-212-3p 组中 SMAD1 相对表达、RA-FLS 细胞增殖活力、迁移和侵袭数显著降低,差异无统计学意义(均 $P < 0.05$),而 Exo-antagomiR-212-3p 组中 SMAD1 相对表达、RA-FLS 细胞增殖活力、迁移和侵袭数与 NC 组比较,差异无统计学意义(均 $P > 0.05$)。**结论** ADSCs 外泌体 miR-212-3p 在 RA 患者和 RA-FLS 细胞中低表达,其通过靶向下调 SMAD1 抑制 RA-FLS 细胞增殖、迁移和侵袭。

[关键词] 类风湿性关节炎;滑膜细胞;脂肪间充质干细胞移植;外泌体;miR-212-3p;SMAD1

The Effect of fat mesenchymal stem cell exosome miR-212-3P on fibroblast synovial cells

JIA Bingshen*, YU Peng, JIAO Tuo, LI Jun, LI Ming, QU Guoxin, JI Zhihua, FU Kun

(Department of Joint Trauma, the First Affiliated Hospital of Hainan Medical University, Haikou, Hainan, China, 570102)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the effect of ADSCs exosome miR-212-3P on the proliferation, migration and invasion of RA-FLS cells and its mechanism. **Methods** Collect 20 serums of patients with rheumatoid arthritis (RA) and healthy people, and the expression of miR-212-3p in the serum was detected by RT-qPCR. In vitro cells can be divided into 4 groups: RA-FLS cells cultured alone (NC group), RA-FLS cells + Exo-ADSCs co-culture (Exo group), RA-FLS cells + silent exosomes miR-212-3p co-culture (Exo-antagomiR-212-3p group), knockdown RA-FLS cells SMAD1+silent exosomes miR-212-3p co-cultured (si-SMAD1+Exo-antagomiR-212-3p group). After exogenously regulating the expression level of miR-212-3p in ADSCs cells and SMAD1 in RA-FLS cells, ADSCs exosomes were co-cultured with RA-FLS cells, and the proliferation activity of RA-FLS cells was measured by CCK-8 and Transwell respectively, Migration and invasion ability; At the same time, dual luciferase reporter gene was used to verify the targeting relationship between miR-212-3p and SMAD1. **Results** Compared with healthy individuals, miR-212-3p was

基金项目:白求恩医学科学研究基金资助项目(N187CS)

作者单位:海南医学院第一附属医院关节创伤外科,海南,海口 570102

*通信作者:贾丙申, E-mail:m963456@126.com

underexpressed in the serum of RA patients ($P<0.05$); compared with NC group, miR-212-3p expression was significantly up-regulated in Exo group, and proliferation activity, migration and invasion were significantly reduced (All $P<0.05$); miR-212-3p can target the 3'UTR of SMAD1; at the same time, compared with the NC group, the relative expression of SMAD1, in the Exo and si-SMAD1+Exo-antagomiR-212-3p groups RA-FLS cell proliferation activity, migration and invasion numbers were significantly reduced (all $P<0.05$), while the relative expression of SMAD1, RA-FLS cell proliferation activity, migration and invasion numbers in the Exo-antagomiR-212-3p group were not significantly different from those in the NC group (All $P>0.05$).

Conclusion ADSCs exosome miR-212-3p was low expressed in RA patients and RA-FLS cells, and it inhibited RA-FLS cell proliferation, migration and invasion by targeting down regulation of SMAD1.

[KEY WORDS] Rheumatoid arthritis; Adipose mesenchymal stem cell; Exosomes; miRNAs; Tissue engineering

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种慢性全身性自身免疫性疾病。临床表现为滑膜慢性炎症性增生和肥大及手足关节损伤^[1]。研究证实,成纤维样滑膜细胞(fibroblast-like synovio-cytes, FLS)在RA的发病过程中发挥关键作用,其增殖和侵袭能力的增强与RA的发展密切相关^[2-3]。因此,探究调控RA-FIS细胞增殖和侵袭迁移的分子机制对于改善RA至关重要。近期研究证实,脂肪间充质干细胞(adipose mesenchymal stem cell, ADSC)可通过改变早期适应性T细胞反应来调节实验性自身免疫性关节炎^[4];ADSCs分泌的外泌体能够降低骨关节炎软骨细胞的炎症反应^[5]。此外有文献报道,外泌体miRNAs在RA中发挥重要调控作用^[6],miR-212-3p定位于17p13.3,参与调控多种疾病的发展,且能够抑制RA-FLS细胞增殖,促进其凋亡^[7]。但鲜有文献报道ADSC外泌体对RA-FLS细胞生物学行为的影响及作用。本研究将从细胞水平探究ADSC外泌体中miR-212-3p对RA-FLS细胞行为的调控及其分子机制。

1 材料与方 法

1.1 标本来源与试剂

收集海南医学院第一附属医院骨科类风湿性关节炎(RA)患者(20例)和健康者(20例)血清,患者均已签署知情同意书,并通过医院伦理委员会批准。人正常滑膜细胞FLS、人类类风湿性关节炎滑膜细胞RA-FLS和ADSCs细胞购于北纳生物细胞库。DMEM和胎牛血清购自美国Biological Industries公司;Lipofectamine 2000购于日本TaKaRa公司;CCK-8试剂盒购于日本同仁公司;Transwell小室购买于美国Corning Incorporated公司;双荧光素酶报告基因检测试剂盒购于Promega公司;RT-qPCR

引物、antagomiR-212-3p、miR-212-3p mimics及阴性寡核苷酸由上海吉玛制药技术有限公司提供;抗体均购自美国CST公司。

1.2 ADSCs细胞培养及外泌体分离

将ADSCs细胞于含10%胎牛血清的DMEM培养基中培养,或在培养液中加入antagomiR-212-3p;培养24h后收集培养液,4℃、800g离心10min沉淀细胞,再于12000g离心20min清除细胞碎片。收集上清,于4℃、100000g离心2h收集沉淀,用PBS洗涤1次,最后用200μL PBS重悬外泌体沉淀,-80℃保存备用。

1.3 RA-FLS细胞培养及转染

RA-FLS细胞培养于含10%胎牛血清的DMEM培养基中,然后置于37℃、5%CO₂培养箱中进行培养。根据Lipofectamine 2000转染试剂说明书分别转染阴性对照物(NC)、miR-212-3p mimics和si-SMAD1质粒。分为NC组:RA-FLS细胞单独培养;Exo组:RA-FLS细胞+Exo-ADSCs共培养;Exo-antagomiR-212-3p组:RA-FLS细胞+沉默外泌体miR-212-3p共培养;si-SMAD1+Exo-antagomiR-212-3p组:敲降RA-FLS细胞SMAD1+沉默外泌体miR-212-3p共培养。

1.4 RT-qPCR

采用Trizol法提取血清及细胞中总RNA,反转录成cDNA;用StepOnePlus™仪进行qPCR反应,以U6作为内参,反应条件为:95℃30s,95℃5s,60℃30s,循环40次。实验重复3次。结果采用2^{-ΔΔCt}法进行计算。引物序列见表1。

1.5 Western blotting

收集并提取各组细胞总蛋白,BCA法检测蛋白浓度,再进行SDS-PAGE凝胶电泳,分离目的条带。用湿式转移法将蛋白转印至PVDF膜上,将

表1 RT-qPCR引物序列

Target	Sequence
U6	F: 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3'
	R: 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'
miR-212-3p	F: 5'-GGTAACAGTCTCCAGTCA-3'
	R: 5'-GCAATTGCACTGGATACG-3'

PVDF膜置于5%脱脂奶粉中,室温封闭1.5 h;加入一抗(1:1 500),4℃孵育过夜;次日,加入HRP二抗(1:3 000),37℃孵育1 h,加入ECL显色进行凝胶成像,并用Image J对蛋白条带进行定量分析。

1.6 CCK-8

将RA-FLS细胞以每孔加入100 μL(10⁴个/孔)接种于96孔板,每孔再加10 μL ADSCs细胞外泌体悬液。于检测前1 h,每孔加入10 μL CCK-8溶液混匀,于培养箱中孵育1~4 h。用酶标仪测定450 nm处的光密度(OD)值。

1.7 Transwell

将密度为1×10⁵个/mL细胞悬液和10 μL ADSCs细胞外泌体悬液接种于预先包被Matrigel基质胶的Transwell上室。下室加250 μL含10%胎牛血清的完全培养基,培养48 h,取出小室,棉签擦去上室细胞,4%的多聚甲醛固定下室细胞15 min,结晶紫染色15 min,PBS洗净,干燥后置于倒置显微镜下观察拍照。

1.8 双荧光素酶报告

根据Starbase数据库预测miR-212-3p与SMAD1的结合序列,同时构建SMAD1突变型载体,分别将SMAD1野生型和突变型载体与miR-212-3p、miR-NC共转293T细胞。按照双荧光素酶报告基因说明书进行检测各组荧光素酶活性。

1.9 统计学分析

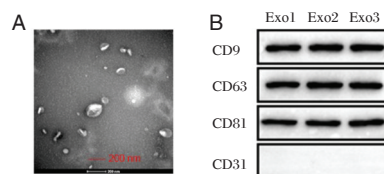
采用SPSS 20.0软件进行数据统计分析,采用GraphPad Prism 7.0软件绘图。所有实验均重复3次及以上,计量数据采用($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用*t*检验,多组间比较采用单因素方差分析,以*P*<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 成功分离ADSCs细胞外泌体

培养ADSCs细胞并分离培养液上清中的外泌体,透射电子显微镜观察分离的外泌体(图1A)。采用Western blotting检测发现外泌体特异性标志

物CD9、CD63和CD81均表达阳性,而阴性标志物CD31未表达(外泌体不表达CD31、CD116和CD34等内皮性或造血性表面标记物)(图1B)。



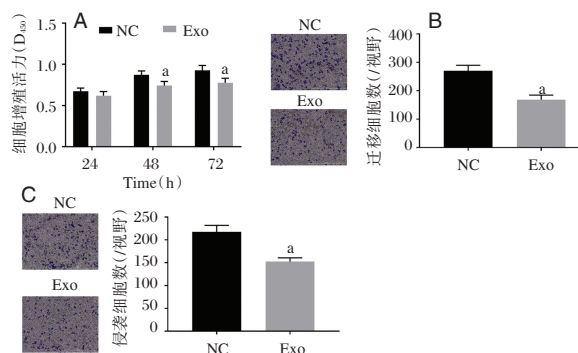
注:A为透射电子显微镜观察ADSCs细胞培养液中分离的外泌体;B为Western blotting检测外泌体标志物。

图1 成功分离的ADSCs细胞外泌体

Figure 1 The exosomes of ADSCs cells were successfully isolated

2.2 ADSCs细胞外泌体抑制RA-FLS细胞增殖、迁移和侵袭

在48、72 h时,Exo组RA-FLS细胞增殖活力较NC组显著降低,差异有统计学意义(*P*<0.05)(图2A);与NC组相比,Exo组迁移和侵袭能力明显降低(*P*<0.05)。(图2B和2C)。



注:A为CCK-8实验检测RA-FLS细胞增殖活力;B、C为Transwell实验检测RA-FLS细胞迁移和侵袭能力(结晶紫染色,×100)。与NC组比,**P*<0.05。

图2 ADSCs细胞外泌体抑制RA-FLS细胞增殖、迁移和侵袭

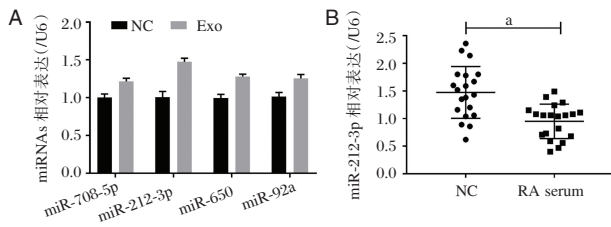
Figure 2 ADSCs cell exosome inhibited the proliferation, migration and invasion of RA-FLS cells

2.3 ADSCs细胞外泌体上调RA-FLS细胞中miR-212-3p的表达

与NC组相比,Exo组中miR-708-5p、miR-212-3p、miR-650及miR-92a的表达水平均显著上调,差异有统计学意义(*P*<0.05)。(图3A)。miR-212-3p在RA患者血清中的表达水平显著低于健康组血清,差异有统计学意义(*P*<0.05)。(图3B)。

2.4 miR-212-3p靶向下调SMAD1的表达

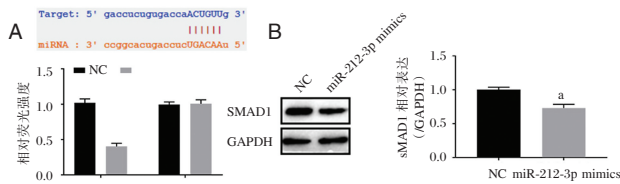
与NC组相比,miR-212-3p mimics与SMAD1-



注:A为RT-qPCR检测RA-FLS细胞中差异表达的miRNAs的表达水平;B为RT-qPCR检测RA患者和健康志愿者血清中miR-212-3p的表达水平。与NC组比较,* $P<0.05$ 。

图3 ADSCs细胞外泌体上调RA-FLS细胞中miR-212-3p的表达
Figure 3 ADSCs cell exosome upregulated the expression of miR-212-3p in RA-FLS cells

Wt质粒共转293T细胞时荧光素酶活性显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$) (图4A);而miR-212-3p mimics与SMAD1-Mut质粒共转时荧光素酶活性与NC组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。miR-212-3p过表达组中SMAD1的表达水平显著低于NC组,差异有统计学意义($P<0.05$)。(图4B)。



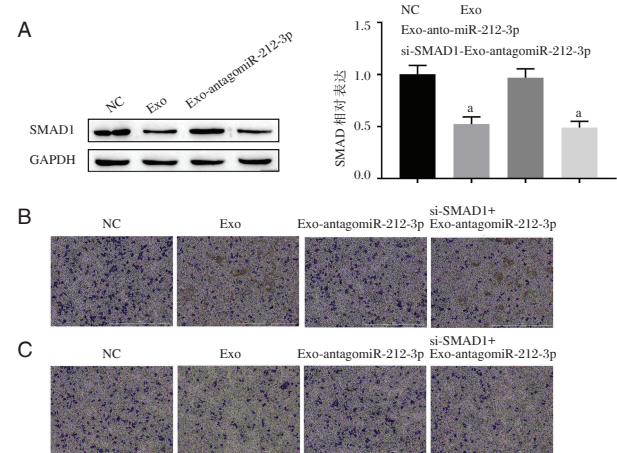
注:A为Starbase和双荧光素酶报告基因验证miR-212-3p和SMAD1之间的靶向关系。B为Western blotting检测过表达miR-212-3p后SMAD1的表达水平。与NC组比,* $P<0.05$ 。

图4 miR-212-3p靶向下调SMAD1的表达
Figure 4 miR-212-3p targeted downregulate the expression of SMAD1

2.5 ADSCs细胞外泌体miR-212-3p通过SMAD1抑制RA-FLS细胞增殖、迁移和侵袭

与NC组,Exo及si-SMAD1+Exo-antagomiR-212-3p组中SMAD1的表达水平比较,差异均有统计学意义($P<0.05$),Exo-antagomiR-212-3p组中SMAD1表达水平,差异无统计学意义($P=0.657$),

见图5A。与NC组,Exo组及si-SMAD1+Exo-antagomiR-212-3p组RA-FLS细胞迁移数和侵袭数均显著降低($P<0.05$),Exo-antagomiR-212-3p组中RA-FLS细胞迁移数和侵袭数较NC组,差异无统计学意义($P>0.05$),见图5B、图5C和表2和表3。CCK-8结果显示,处理24h时,各组之间差异无统计学意义;而当处理48h与72h时,相比于NC组,Exo及si-SMAD1+Exo-antagomiR-212-3p组RA-FLS细胞活力显著降低,而Exo-antagomiR-212-3p组中RA-FLS细胞活力比较差异无统计学意义($P>0.05$),见表2。



注:A为各组RA-FLS细胞中SMAD1的表达情况;B和C为Transwell实验检测各组RA-FLS细胞迁移和侵袭能力(结晶紫染色, $\times 100$);与NC组相比,* $P<0.05$ 。

图5 ADSCs细胞外泌体miR-212-3p下调SMAD1抑制RA-FLS细胞增殖、迁移和侵袭
Figure 5 ADSCs cell exosome miR-212-3p inhibited the proliferation, migration and invasion of RA-FLS cells by downregulating SMAD1

3 讨论

RA已成为最常见的结缔组织疾病之一。其主要病理改变为滑膜组织增厚,大量炎性细胞浸润,间质严重水肿,严重破坏关节软骨和骨骼,以及血管生成。RA已成为致残和丧失劳动力的主

表2 Transwell实验结果($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Transwell experimental results ($\bar{x}\pm s$)

组别	NC	Exo	Exo-antagomiR-212-3p	si-SMAD1+Exo-antagomiR-212-3p
迁移细胞数/视野	253±19	159±14	236±17	176±20
t值		15.22	17.23	19.76
P值		0.002	0.977	0.004
侵袭细胞数/视野	207±23	126±18	198±20	115±26
t值		16.67	21.24	24.88
P值		0.006	0.700	0.004

表3 CCK-8实验结果 ($\bar{x} \pm s$)
Table 3 CCK-8experimental results ($\bar{x} \pm s$)

组别		NC	Exo	Exo-antagomiR-212-3p	si-SMAD1+Exo-antagomiR-212-3p
细胞增值 活力(OD450)	24 h	0.56±0.19	0.53±0.14	0.55±0.15	0.54±0.14
	48 h	0.78±0.12	0.6±0.18	0.77±0.11	0.67±0.15
	72 h	0.87±0.15	0.78±0.14	0.84±0.13	0.76±0.14
t值		-	1.043	1.267	1.056
P值		-	0.007	0.856	0.006

要原因之一^[8]。RA-FLS细胞是参与RA滑膜组织发展的主要细胞群,在RA发病机制中起着至关重要的作用,有助于类风湿血管的形成^[9]。有文献报道,通过体外扩增培养自体ADSCs细胞及全身输注,能够治疗自身免疫性疾病,如多发性硬化、多发性肌炎和RA等^[10]。此外有文献证实,ADSCs细胞来源的外泌体在疾病发展过程中扮演着重要角色。例如,在乳腺癌细胞模型中,ADSCs细胞外泌体通过Wnt信号通路促进乳腺癌细胞迁移^[11]。本研究发现,ADSCs细胞来源的外泌体能够抑制RA-FLS细胞增殖、迁移和侵袭。

研究证实,ADSCs细胞来源的外泌体中含有丰富的miRNAs,并在疾病发展过程中发挥重要调控作用。例如,人ADSCs细胞来源的外泌体miRNAs是诱导A2780和SKOV-3卵巢癌细胞抗增殖信号转导的关键因子^[12]。同时研究证实,miRNAs在RA的发展过程中具有重要调控作用。例如,miR-124a靶向PI3K/NF-κB通路抑制RA-FLS细胞增殖和炎性反应^[13];miR-506通过靶向下调TLR4抑制RA-FLS细胞增殖,且诱导凋亡^[14];miR-320a靶向MAPK-ERK1/2信号通路抑制RA-FLS细胞增殖^[15]。有研究报道,miR-212-3p在RA患者滑膜组织、血清和RA-FLS细胞中低表达,过表达miR-212-3p能够显著抑制RA-FLS细胞增殖^[7]。本研究的结果与以前的研究结果相似,发现miR-212-3p在RA患者血清中低表达。此外,本研究发现ADSCs外泌体能够通过提高RA-FLA细胞miR-212-3p的表达水平抑制RA-FLS细胞增殖、迁移和侵袭,而敲降miR-212-3p后,能够回复ADSCs外泌体对RA-FLS细胞增殖、迁移和侵袭的抑制作用。这说明ADSCs细胞通过分泌外泌体miR-212-3p上调RA-FLS细胞中miR-212-3p的表达,进而抑制RA-FLS细胞恶性生物学行为。

SMAD1蛋白是SMADs细胞质蛋白家族重要成员,是TGF-α/SMADs信号通路的重要递质。Chen等人^[16]研究表明,SMAD1在前列腺癌中高

表达,抑制SMAD1的表达可抑制前列腺癌细胞增殖、迁移和侵袭。本研究发现,miR-212-3p可靶向结合SMAD1的3'UTR;同时,回复实验证实,miR-212-3p通过靶向下调SMAD1进而抑制RA-FLS细胞增殖、迁移和侵袭。

综上所述,miR-212-3p在ADSCs细胞外泌体中高表达,ADSCs细胞通过分泌外泌体miR-212-3p上调RA-FLS细胞中miR-212-3p的表达水平,且靶向下调SMAD1的表达水平,进而抑制RA-FLS细胞增殖、迁移和侵袭。

参考文献

- [1] 于守杰,张振春,厉彦山,等. 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[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020,12(6):808-812.
- [2] Li P, Tao SS, Zhao MQ, et al. Association Study of Matrix Metalloproteinases Gene Polymorphisms with Susceptibility to Rheumatoid Arthritis: A Meta-Analysis[J]. Immun investigations, 2015,44(7):603-615.
- [3] Yu FY, Xie CQ, Jiang CL, et al. MiR-92a inhibits fibroblast-like synovocyte proliferation and migration in rheumatoid arthritis by targeting AKT2[J]. J biosc, 2018,43(5):911-919.
- [4] Lopez-Santalla M, Mancheno-Corvo P, Menta R, et al. Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Modulate Experimental Autoimmune Arthritis by Modifying Early Adaptive T Cell Responses[J]. Stem Cells, 2015,33(12):3493-3503.
- [5] Tofino-Vian M, Guillen MI, Perez Del Caz MD, et al. Microvesicles from Human Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells as a New Protective Strategy in Osteoarthritic Chondrocytes[J]. Cell physiol biochem, 2018,47(1):11-25.
- [6] Wang L, Wang C, Jia X, et al. Circulating Exosomal miR-17 Inhibits the Induction of Regulatory T Cells via Suppressing TGFBR II Expression in Rheumatoid Arthritis [J]. Cell Physiol Biochem, 2018,50(5):1754-1763.
- [7] Liu Y, Zhang XL, Li XF, et al. miR-212-3p reduced proliferation, and promoted apoptosis of fibroblast-like synovocytes via down-regulating SOX5 in rheumatoid arthritis [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018,22(2):461-471.
- [8] Burmester GR, Pope JE. Novel treatment strategies in rheumatoid arthritis [J]. Lancet (London, England), 2017,389(10086):2338-2348. (下转第1721页)

创伤性关节炎患者关节液中的VIP、SOD、NO、CXCL12水平变化及其意义

王道煌^{1*} 陈鹏² 颜约军¹ 郑衍¹

[摘要] 目的 探讨创伤性关节炎患者关节液中血管活性肠肽(VIP)、超氧化物歧化酶(SOD)、一氧化氮(NO)、趋化因子-12(CXCL-12)水平变化及其意义。方法 选取屯昌县人民医院骨科诊治的120例创伤性关节炎患者(病例组)、60例因外伤需要实施膝关节韧带手术的患者作为对照组;采集两组患者的膝关节液检测VIP、SOD、NO、CXCL12水平,据X线检查结果对病例组进行K-L分级,其中1级33例、2级41例、3级35例、4级11例,分析不同K-L分级患者上述指标的差异及上述指标与膝关节功能的相关性。结果 病例组的关节液中VIP、NO、CXCL12高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),病例组的关节液中SOD低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$);K-L低分级(1级~2级)患者的关节液中VIP、NO、CXCL12低于K-L高分级(3级~4级)患者($P < 0.05$),K-L低分级(1级~2级)患者关节液中SOD高于K-L高分级(3级~4级),差异均有统计学意义($P < 0.05$);治疗后,创伤性关节炎患者关节液中的疼痛、僵硬、关节功能、WOMAC评分均较治疗前显著的降低($P < 0.05$);经线性相关分析,创伤性关节炎患者关节液VIP、NO、CXCL12与WOMAC评分呈显著正相关性($P < 0.05$);SOD与WOMAC评分呈显著的负相关关系($P < 0.05$)。结论 创伤性关节炎患者关节液中的VIP、SOD、NO、CXCL12水平与患者膝关节功能、膝关节病变程度有关。

[关键词] 创伤性关节炎; 关节液; 血管活性肠肽; 超氧化物歧化酶; 一氧化氮; 趋化因子-12

Changes of VIP, SOD, NO and CXCL12 levels in synovial fluid of patients with traumatic arthritis and their significance

WANG Daohuang^{1*}, CHEN Peng², YAN Yuejun¹, ZHENG Yan¹

(1. Second Department of surgery, Tunchang people's Hospital, Tunchang, Hainan, China, 571600;

2. Department of hand microsurgery, Hainan people's Hospital, Haikou, Hainan, China, 570311)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the changes of vasoactive intestinal peptide (VIP), superoxide dismutase (SOD), nitric oxide (NO) and chemokine-12 (CXCL-12) levels in synovial fluid of patients with traumatic knee arthritis. **Methods** 120 patients with traumatic knee arthritis (case group) and 60 patients with knee ligament surgery due to trauma were selected as the control group in Tun County People's Hospital. The levels of VIP, SOD, NO and CXCL12 were detected in the knee fluid of the two groups. According to the results of X-ray examination, k-L grading was performed, including 33 cases of grade 1, 41 cases of grade 2, 35 cases of grade 3 and 11 cases of grade 4. And to analyze the differences of the above indexes in patients with different K-L grades and the correlation between the above indexes and knee function. **Results** The VIP, NO and CXCL12 in the joint fluid of the case group were higher than those in the control

基金项目:海南省自然科学基金面上项目(20168309)

作者单位:1. 屯昌县人民医院外二科,海南,屯昌 571600

2. 海南省人民医院(海南医学院附属海南医院)显微手外科,海南,海口 570311

*通信作者:王道煌, E-mail: wangdaohuang6814@163.com

group ($P<0.05$). The SOD in the joint fluid of the case group was lower than that of the control group ($P<0.05$). The VIP, NO, and CXCL12 in synovial fluid of patients with low KL grades (grades 1 to 2) were lower than those of patients with high KL grades (grades 3 to 4) ($P<0.05$), and patients with low KL grades (grades 1 to 2) SOD in synovial fluid was higher than KL high grade (grade 3 to 4), and the difference was statistically significant ($P<0.05$); After treatment, the pain, stiffness, joint function, and WOMAC scores in the joint fluid of patients with traumatic knee arthritis were significantly lower than those before treatment ($P<0.05$); linear correlation analysis, joint fluid of patients with traumatic knee arthritis There was a significant positive correlation between VIP, NO and CXCL12 and WOMAC scores ($P<0.05$). There was a significant negative correlation between SOD and WOMAC scores ($P<0.05$). **Conclusion** The levels of VIP, SOD, NO and CXCL12 in the joint fluid of patients with traumatic arthritis are related to the knee joint function and the degree of knee joint disease.

[KEY WORDS] Traumatic knee arthritis; Joint fluid; Vasoactive intestinal peptide; Superoxide dismutase; Nitric oxide; Chemokine-12

创伤性关节炎由创伤引起,临床表现主要为关节疼痛与运动的功能障碍,病理变化主要为继发性地关节软骨增生与硬化及关节软骨地退化与变性,任何年龄阶段均可发病^[1]。相关文献^[2-3]提示骨关节炎发病过程中炎性因子具有重要的参与作用,因而关节液中炎性细胞因子表达及其对创伤性关节炎发生、发展进程均具有研究价值。血管活性肠肽(vasoactive intestinal peptide, VIP)主要存在于软骨及骨等各种组织,研究^[4]提示VIP具有改善大鼠关节炎、抑制软骨和骨破坏的作用。趋化因子12(chemokine-12, CXCL12)在炎症时存在异常表达并可能参与了骨关节炎的发生、发展过程^[5]。本研究深入探讨了创伤性膝关节炎患者关节液中VIP、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、一氧化氮(nitric oxide, NO)、CXCL12水平变化及其意义,现汇报如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取屯昌县人民医院骨科2018年3月至2020年12月诊治的120例创伤性膝关节炎患者(病例组)、60例因外伤需要实施膝关节韧带手术的患者作为对照组。病例组,男65例、女55例,年龄27~75岁,平均(53.20±15.00)岁,其中左膝60例、右膝60例,据X线检查结果进行K-L分级:1级33例、2级41例、3级35例、4级11例。对照组,男35例、女25例,年龄23~72岁,平均(52.00±13.70)岁,其中左膝33例、右膝27例。两组患者年龄、性别、患侧分布比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。

纳入标准:①创伤性膝关节炎患者诊断标准参考《骨关节炎诊治指南》(2014版)、美国风湿病协会制定的标准^[6];②患者年龄范围19~75岁;③具有患侧膝关节外伤病史;④对照组患者均为受伤后2周以内的患者,需要实施韧带修复手术,无膝关节损伤;⑤均在本院接受关节镜下膝关节清理手术;⑥所有患者及家属均知情同意;⑦本研究符合相关医学伦理规定。排除标准:①骨肿瘤疾病、骨结核;②合并心肝肾疾病;③伴有精神及认知功能障碍;④伴有病毒感染、全身感染性疾病;⑤伴有其他系统的重大疾病。

1.2 指标检测方法

患者平卧位屈膝90°,穿刺点取内、外侧膝眼,消毒铺巾,7号穿刺针抽取1 mL关节液;酶联免疫吸附法(ELISA)检测关节液VIP、CXCL12水平;硝酸还原酶法检测NO水平;化学比色法检测SOD水平。

1.3 膝关节功能评价

对比两组患者治疗前、治疗后1个月的美国西部Ontario和McMaster大学骨关节炎指数评分(Osteoarthritis Index scores of Ontario and McMaster Universities in the western United States, WOMAC)^[7]的变化,该量表主要包括疼痛、僵硬、关节功能三项内容,共计24个项目,总分越高表示患者的病情越严重。

1.4 统计学方法

统计软件采用SPSS 16.0版本。计量资料采用($\bar{x}\pm s$)表示,两组间比较采用 t 检验;计数资料用 $n(\%)$ 表示,用 χ^2 检验;相关性分析采用Pearson线性相关分析法;以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组关节液中的实验室指标比较

病例组的关节液中VIP、NO、CXCL12高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),病例组的关节液中SOD低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表1。

表1 两组关节液中的实验室指标比较($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Comparison of laboratory parameters in synovial fluid between 2 groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	VIP (pg/mL)	SOD (mIU/L)	NO (μ mol/L)	CXCL12 (ng/mL)
病例组	120	390.51 \pm 120.62	122.01 \pm 28.43	16.41 \pm 4.18	7.30 \pm 2.11
对照组	60	277.62 \pm 83.02	173.81 \pm 31.02	5.20 \pm 1.76	3.81 \pm 0.77
<i>t</i> 值		6.516	-11.186	19.888	12.392
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000	0.000

2.2 不同K-L分级的病例组患者关节液中的实验室指标比较

K-L低分级(1级~2级)患者的关节液中VIP、NO、CXCL12低于K-L高分级(3级~4级)患者($P<0.05$),K-L低分级(1级~2级)患者关节液中SOD高于K-L高分级(3级~4级),差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表2。

表2 不同K-L分级的病例组患者关节液中的实验室指标比较($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Comparison of laboratory indexes in synovial fluid of patients with different K-L grades ($\bar{x}\pm s$)

K-L 分级	<i>n</i>	VIP (pg/mL)	SOD (mIU/L)	NO (μ mol/L)	CXCL12 (ng/mL)
1级~2级	74	342.81 \pm 113.82	131.72 \pm 27.21	12.01 \pm 4.11	5.64 \pm 1.88
3级~4级	46	467.23 \pm 106.41	106.43 \pm 26.52	23.49 \pm 3.90	9.97 \pm 2.06
<i>t</i> 值		5.969	5.003	15.167	11.823
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000	0.000

2.3 病例组患者治疗前后膝关节功能评价

治疗后,创伤性膝关节炎患者关节液中的疼痛、僵硬、关节功能、WOMAC评分均较治疗前显著的降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表3。

表3 病例组患者治疗前后膝关节功能评价($\bar{x}\pm s$,分)

Table 3 evaluation of knee joint function in case group before and after treatment ($\bar{x}\pm s$, points)

时间	<i>n</i>	疼痛	僵硬	关节功能	总分
治疗前	120	14.84 \pm 5.11	3.67 \pm 1.20	42.85 \pm 10.57	61.36 \pm 15.29
治疗后	120	4.20 \pm 0.88	0.89 \pm 0.41	11.72 \pm 2.94	16.81 \pm 4.22
<i>t</i> 值		22.478	24.015	31.082	30.767
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000	0.000

2.4 病例组患者治疗前膝关节功能评分与关节液中VIP、NO、CXCL12、SOD的相关性

经线性相关分析,创伤性膝关节炎患者关节液VIP($r=0.574$)、NO($r=0.339$)、CXCL12($r=0.620$)与WOMAC评分呈显著正相关性($P<0.05$);SOD($r=-0.481$)与WOMAC评分呈显著的负相关关系($P<0.05$)。

3 讨论

近年来由于人们运动方式及生活水平的提高,意外损伤及运动损伤的机会逐渐升高,创伤性关节炎的发病率也呈明显上升趋势^[8]。但截至目前,关于创伤性关节炎的发病机制仍存在争议,临床医师对创伤性关节炎病变进展缺乏准确的预测性,临床早期诊断较难并缺乏特异性的有效干预措施。

本研究结果显示病例组的关节液中VIP、NO、CXCL12高于对照组,病例组的关节液中SOD低于对照组。上述结果说明创伤性关节炎患者中存在VIP、NO、CXCL12及SOD的异常表达。NO、SOD等活性自由基具有调控氨基酸、胶原蛋白脂链的一级结构的作用,使软骨组织出现炎症变性,进而损伤关节软骨^[13]。可能是由于关节软骨基质的降解过程具有多种炎性细胞因子参与,关节组织的代谢产物与关节滑液的组分具有一致性,进而加重关节软骨的破坏^[9-12]。因而,关节液中生物标记物的检测可能成为创伤性骨关节特异性诊断的方法,探寻可靠、有价值的生物标记物可能成为一种早于影像学监测创伤性关节炎进展的重要方法。

不同K-L分级患者关节液指标比较发现K-L分级(1级~2级)患者的关节液中VIP、NO、CXCL12低于(3级~4级)患者,K-L分级(1级~2级)患者关节液中SOD高于(3级~4级)。上述结果说明更高分级的创伤性关节炎关节液中VIP、NO、CXCL12较低,但自由基SOD活性更高,提示存在较高炎症反应应激状态^[13]。CXCL12激活相关活化蛋白激酶通路诱导环氧合酶-2、软骨细胞基质金属蛋白酶-13等因子的表达,诱发关节炎生物学改变^[14]。VIP可以抑制基质金属蛋白酶的表达,以及抑制趋化因子介导的白细胞迁移和抑制炎症细胞的增殖^[15],进而保护关节组织,因而更高K-L分级的关节炎患者VIP水平较低。在关节炎反应的刺激下NO与超氧自由基反应生成亚硝酸根离子,进而加剧严重炎症反应,增强相关炎症

递质对关节软骨的降解,加重病情^[16]。

相关性研究发现创伤性关节炎患者关节液VIP、NO、CXCL12与WOMAC评分呈显著正相关性;SOD与WOMAC评分呈显著的负相关关系。该结果说明创伤性关节炎与VIP、SOD、NO、CXCL12水平与患者膝关节功能、膝关节病变程度有关,临床可通过评估上述因子水平对疾病进展及治疗效果。此外,该结果也说明VIP、NO、CXCL12可作为创伤性关节炎的保护性因素,局部注射上述因子可能有助于缓解创伤性关节炎的进展。

综上所述,创伤性关节炎患者关节液中的VIP、SOD、NO、CXCL12水平与患者膝关节功能、膝关节病变程度有关。

参考文献

- [1] 陈立涛,张磊,周谨,等.臭氧治疗膝关节创伤性关节炎前瞻性研究[J].河北医科大学学报,2020,41(12):1469-1472.
- [2] 钟李青,丁少波,胡润凯,等.骨痹汤对骨关节炎模型大鼠血清炎症细胞因子及PI3K/Akt/mTOR信号通路的影响[J].国际中医中药杂志,2021,43(4):357-362.
- [3] 陶可,李虎. CKLF1在关节炎发病过程中作用的研究进展[J].国际免疫学杂志,2020,43(4):419-424.
- [4] 郭彦德.血管活性肠肽和NF-κB信号通路在骨关节炎中的作用机制[J].基因组学与应用生物学,2020,10(2):46-48.
- [5] 曾云好,庄载世,黄良善.乳香宣经方治疗膝骨性关节炎62例[J].浙江中医杂志,2018(8):591-591.
- [6] 谢庆云,符培亮,陈宜,等.晚期膝骨关节炎患者外周血中趋化因子表达谱的特征分析[J].成都医学院学报,2017,12(4):59-63.
- [7] Siqueira MB, Frangiamore S, Klika AK, et al. Comparison of Synovial Fluid Cytokine Levels between Traumatic Knee Injury and End - Stage Osteoarthritis [J]. J Knee Surgery, 2017, 30(2):128-133.
- [8] 于佳,赵国平,秦庆发,等.踝关节微创融合术对足踝创伤性关节炎临床疗效及对远期足踝功能影响研究[J].临床医药文献电子杂志,2020,7(A4):60,62.
- [9] 胡芯源,曹珊,陈文明,等.连翘苷元通过抑制TLR4介导的NF-κB信号通路减轻大鼠骨关节炎软组织损伤和基质降解[J].免疫学杂志,2021,37(2):115-121.
- [10] 高坤,陈大字,张勇,等.牛膝醇提物调控滑膜成纤维细胞外泌体抑制软骨细胞外基质降解[J].中国组织工程研究,2021,25(23):5.
- [11] Old AB, Long WJ, Scott WN. Revision of Total Knee Arthroplasties Performed in Young, Active Patients with Post-traumatic and Osteoarthritis [J]. J Knee Surg, 2017, 30(9):905-908.
- [12] 钟浩博,郑少伟,黎旭,等.肩关节组织和滑液生长素释放肽信使核糖核酸和蛋白表达与肩袖撕裂和冻结肩严重程度的相关性研究[J].中华创伤骨科杂志,2020,22(5):432-437.
- [13] 梁子聪,易艾晶,王恒,等.鹿角壮骨胶囊对兔膝关节模型关节液中HA,NO,SOD水平及关节病理形态的影响[J].黔南民族医学学报,2020,33(3):159-163.
- [14] 覃银莹,覃怡,钟好,等.磷脂酰肌醇3激酶/蛋白激酶B/基质金属蛋白酶-9信号通路在芬太尼抑制人胃癌细胞侵袭和迁移中的作用[J].中华实验外科杂志,2021,38(3):417-420.
- [15] 尹宏,陈庆春,苏艳蓉,等.重症高血压脑出血并发应激性胃溃疡影响因素及GAS、MTL、SS、CCK-8、VIP水平变化意义[J].分子诊断与治疗杂志,2020,12(2):156-160.
- [16] 程国强.探析右美托咪定对老年骨科手术病人炎症反应及氧化应激指标的影响[J].中国保健营养,2020,30(1):56-57.

(上接第1717页)

- [9] Qin B, Yang M, Fu H, et al. Body mass index and the risk of rheumatoid arthritis: a systematic review and dose - response meta-analysis [J]. Arthrit Res therap, 2015, 17:86.
- [10] Ra JC, Kang SK, Shin IS, et al. Stem cell treatment for patients with autoimmune disease by systemic infusion of culture-expanded autologous adipose tissue derived mesenchymal stem cells [J]. J transl Med, 2011, 9:181.
- [11] Lin R, Wang S, Zhao RC. Exosomes from human adipose-derived mesenchymal stem cells promote migration through Wnt signaling pathway in a breast cancer cell model [J]. Mol cell biochem, 2013, 383(1-2):13-20.
- [12] Reza AM, Choi YJ, Yasuda H, et al. Human adipose mesenchymal stem cell-derived exosomal-miRNAs are critical factors for inducing anti - proliferation signalling to A2780 and SKOV-3 ovarian cancer cells [J]. Sci Rep, 2016:6.
- [13] Yang B, Ge Y, Zhou Y, et al. miR-124a inhibits the proliferation and inflammation in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes via targeting PIK3/NF-kappaB pathway [J]. Cell biochem funct, 2019.
- [14] Li D, Zhou Q, Hu G, et al. MicroRNA-506 inhibits rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes proliferation and induces apoptosis by targeting TLR4 [J]. Biosci Rep, 2019.
- [15] Lin K, Su HY, Jiang LF, et al. Influences of miR-320a on proliferation and apoptosis of fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis through targeting MAPK - ERK1/2 [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(5):1907-14.
- [16] Wang Y, Sun B, Zhao X, et al. Twist1-related miR-26b-5p suppresses epithelial-mesenchymal transition, migration and invasion by targeting SMAD1 in hepatocellular carcinoma [J]. Oncotarget, 2016, 7(17):24383-401.

伊伐布雷定联合美托洛尔治疗 CHF 及对 SCysC、Tei 指数的影响

刘金林* 赵世林 肖竹青 刘素

[摘要] **目的** 探讨伊伐布雷定联合美托洛尔治疗慢性心力衰竭(CHF)的临床效果及对血清胱抑素C(CysC)、Tei指数的影响。**方法** 选择2017年6月至2019年6月北京市大兴区中西医结合医院136例CHF患者,根据治疗方案分为行美托洛尔治疗的对照组和行伊伐布雷定联合美托洛尔治疗的观察组,治疗12周后,比较两组临床疗效、6 min步行距离试验(6MWT)、生活质量综合评定量表-74(GQOLI-74)量表评分、Tei指数、左室收缩末期内径(LVESD)、左室舒张末期内径(LVEDD)以及左室射血分数(LVEF)水平,比较治疗前后血清CysC、NT-proBNP水平。**结果** 治疗后,观察组总有效率高于对照组,GQOLI-74评分、6MWT值、LVEF值均大于对照组,Tei指数、LVESD、LVEDD值及血清CysC、NT-proBNP均低于对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。Tei指数和血清CysC与LVESD、LVEDD及NT-proBNP呈正相关($P<0.05$),与LVEF呈负相关($P<0.05$)。**结论** 伊伐布雷定联合美托洛尔治疗CHF能够降低患者血清CysC、NT-proBNP水平,改善心肌细胞功能,疗效明显。

[关键词] 伊伐布雷定;慢性心力衰竭;心室重塑

Effects of ivabradine in combination with metoprolol on CHF and SCysC and Tei index

LIU Jinlin*, ZHAO Shilin, XIAO Zhuqing, LIU Su

(Beijing Daxing District Hospital of Integrated Chinese and Western Medicine, Beijing, China, 100076)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the effects of ivabradine combined with metoprolol on the clinical effect and serum CysC, Tei index in patients with chronic heart failure (CHF). **Methods** From June 2017 to June 2019, 136 patients with CHF from the Daxing District Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine in Beijing were selected. According to the treatment plan, they were divided into the control group treated with metoprolol and the observation group treated with ivabradine combined with metoprolol. After 12 weeks of treatment, the efficacy of the two groups of patients was compared. 6 min minute-walk test (6MWT), Generic Quality of Life Inventory-74 (GQOLI-74), Tei index, LVESD, LVEDD and LVEF, serum CysC, NT-proBNP levels were monitored and compared before and after treatment. **Results** After treatment, the total effective rate in the observation group was higher than that in the control group, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). The GQOLI-74 score, 6MWT value, LVEF values in the observation group were higher than those in the control group, the Tei index, LVESD, LVEDD values, serum CysC and Nt-proBNP in the observation group were lower than those in the control group, with statistical significance ($P<0.05$). Tei index and serum CysC were positively correlated with LVESD, LVEDD and NT-proBNP ($P<0.05$), and negatively correlated with LVEF ($P<0.05$). **Conclusion** Ivabradine combined with metoprolol in the treatment of CHF patients can reduce the levels of serum CysC and NT-proBNP, and improve the function of cardiomyocytes, and the efficacy is obvious.

[KEY WORDS] Ivabradine; Chronic heart failure; Ventricular remodeling

基金项目:北京中医药科技发展资金项目(JJ2018-28)

作者单位:北京市大兴区中西医结合医院,北京 100076

*通信作者:刘金林, E-mail:liuchangliu2001@sina.com

慢性心力衰竭(chronic heart failure, CHF)是心脏结构或功能异常导致心室充盈和射血能力受损,引发心肌功能损害、心室结构改变的临床综合征。CHF病死率高,预后不良。临床上治疗该病多采用强心类药物,其中, β -受体阻滞剂疗效显著^[1]。但临床使用 β -阻滞剂药物常受到一定限制,很多患者服用剂量不足,导致心衰反复发作^[2]。伊伐布雷定可控制窦性心律时心率,因其无负性肌力、负性传导作用,不良反应少,降低心率作用显著,故在心血管疾病中逐渐被应用^[3]。近年来,关于伊伐布雷定对心脏正性作用的研究多局限于其对心率和心功能的影响,较少关注其对心室重构的影响。相关研究多认为伊伐布雷定可改善CHF患者的心功能和预后,但单个研究样本量较小、治疗疗程和随访时间不统一,报道结果也不完全一致^[4]。本研究观察伊伐布雷定与美托洛尔联合治疗CHF的疗效以及对血清CysC、Tei指数的影响,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2017年6月至2019年6月北京市大兴区中西医结合医院136例CHF患者。纳入标准:符合《中国心力衰竭诊断和治疗指南2014》^[5]中CHF的诊断标准,存在心衰症状和/或体征,近30d病情稳定;超声检查心功能不全,经标准化抗心力衰竭治疗后心率(Heart Rate, HR)仍不能控制在75次/min以下,左室射血分数(Left ventricular ejection fraction, LVEF) $\leq 40\%$ 且纽约心脏协会(New York Heart Association, NYHA)心功能分级为II~IV级^[6];年龄18~75周岁;临床应用ACEI/ARB、利尿剂等药物,近30d内未调整用药剂量;知情同意。排除标准:近3个月内服用伊伐布雷定或对该药物过敏;合并心肌炎、心脏瓣膜病等器质性心脏病;伴有严重器质性系统障碍疾病;在试验开始前60d内,有心肌梗死病史,试验开始前30d内,有短暂性脑缺血或脑卒中病史;依从性差。利用随机数字法分为观察组和对照组各68例。本研究经院伦理委员会批准。两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

两组均行常规的CHF治疗,包括他汀类、ACEI/ARB、洋地黄、醛固酮受体拮抗剂等药物治疗,高血压患者实施降压。在此基础上,对照组患者口服美

表1 两组患者一般资料比较 [$n(\%)$, ($\bar{x}\pm s$)]
Table 1 Comparison of general data between the two groups [$n(\%)$, ($\bar{x}\pm s$)]

项目	观察组 ($n=68$)	对照组 ($n=68$)	χ^2/t 值	P 值	
性别	男	43(63.24)	46(67.65)	0.293	0.719
	女	25(36.76)	22(32.35)		
年龄(岁)		62.15 \pm 7.84	63.72 \pm 6.11	1.289	0.822
	心率(次/分)	79.32 \pm 9.41	79.94 \pm 7.13	0.164	0.867
合并疾病	高血压	25(36.76)	32(47.06)	1.480	0.297
	糖尿病	14(20.59)	7(10.29)	2.297	0.159
	冠心病	53(77.94)	47(69.12)	1.360	0.331
	血脂异常	31(45.59)	33(48.53)	0.117	0.732
心功能分级	II级	37(54.41)	41(60.29)		
	III级	27(39.71)	24(35.29)	0.717	0.473
	IV级	4(5.88)	3(4.42)		
药物	β 受体阻滞剂	45(66.18)	44(64.71)	0.033	0.857
	ACEI/ARB	55(80.88)	58(85.29)	0.471	0.648
	利尿剂	56(82.35)	59(86.76)	0.507	0.636
	地高辛	15(22.06)	17(25.00)	0.163	0.840
	他汀类	35(51.47)	32(47.06)	0.265	0.732
	吸烟史	48(70.59)	50(73.53)	0.146	0.849
	饮酒史	45(66.18)	52(76.47)	1.762	0.255

托洛尔缓释片(AstraZeneca AB, 国药准字J20150045)治疗,初始剂量23.75 mg/次,1次/d;1周内增加剂量至47.5 mg/次,1次/d,最大剂量 ≤ 190 mg/次,1次/d。观察组在此基础上加用伊伐布雷定(法国Les Laboratoires Servier,批准文号H20150273)治疗,口服,初始剂量5 mg/次,2次/d,之后依据病情可增加至7.5 mg/次,2次/d。两组均行12周治疗。

1.3 观察指标及评价、检测方法

1.3.1 临床疗效

治疗12周后,疗效评价以NYHA心功能分级及临床症状改善程度为标准^[6]。显效:NYHA分级改善 ≥ 2 级;有效:NYHA分级改善1级,临床症状与体征部分改善;无效:NYHA分级无变化。总有效=显效+有效。

1.3.2 6 min 步行距离试验(6 min Minutes Walk Test, 6MWT)^[7]

比较两组治疗前后6MWT。6MWT:6 min患者在20 m直线水平空间内往返行走的最大距离。

1.3.3 生活质量综合评定量表-74(Generic Quality of Life Inventory-74, GQOLI-74)量表评分^[8]

进行生活质量评定,GQOLI-74量表共74个条目,包括4个方面(躯体、心理、社会功能和物质生活状态),总分100分,得分与生活质量正相关。

1.3.4 Tei指数、左室收缩末期内径(Left ventricular end-systolic dimension, LVESD)、左心室舒张末

内径(Left ventricular end diastolic diameter, LVEDD)以及LVEF水平。

采用IE33多功能心脏彩色超声多普勒检测仪(荷兰 Philips 公司),2.5~3.5 MHz 心脏探头,置于患者胸部心尖处连续测量三个心动周期,并求LVESD、LVEDD及LVEF的平均值。于心尖四腔切面检测获取等容收缩与舒张时间,于心尖五腔切面检测获取左心室射血时间,Tei 指数=左心室等容收缩与舒张时间之和/左心室射血时间。

1.3.5 血清胱抑素 C(Cystatin C, CysC)、N 末端 B 型钠尿肽(N-terminal pro-B-type natriuretic peptide, NT-proBNP)水平

采集患者入院后第二 d 清晨空腹静脉血 5.0 mL。采用德国西门子全自动特定蛋白分析仪与其配套试剂盒以免疫比浊法测定血清 CysC 水平;采用罗氏 E170 电化学发光仪及配套试剂监测 NT-proBNP 水平。试剂盒均购自北京利德曼生化股

份公司,严格按照试剂盒说明操作。

1.4 统计学方法

以 SPSS 17.0 统计学软件进行数据分析。计数资料以 $n(\%)$ 表示,行 χ^2 检验;计量数据以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,行 t 检验。以 Pearson 相关性分析进行简单线性相关分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 临床疗效比较

治疗后,观察组总有效率高于对照组,GQOLI-74 评分、6MWT 值均大于对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

2.2 心脏彩色超声检查各观测指标变化比较

治疗后,两组 Tei 指数及 LVESD、LVEDD 值降低,LVEF 值升高,观察组 Tei 指数及 LVESD、LVEDD 值均低于对照组,LVEF 值均高于对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 3。

表 2 两组临床疗效及 GQOLI-74 评分、6MWT 值比较 [$n(\%), \bar{x} \pm s$]

Table 2 Comparison of clinical efficacy, GQOLI-74 score and 6MWT value between 2 groups [$n(\%), \bar{x} \pm s$]

组别	n	显效	有效	无效	总有效率	GQOLI-74 评分		6MWT/m	
						治疗前	治疗 12 周	治疗前	治疗 12 周
观察组	68	44(64.71)	20(29.41)	4(5.88)	64(94.12)	54.61±7.48	73.97±5.61 ^a	355.66±33.67	611.48±47.29 ^a
对照组	68	35(51.47)	15(22.06)	18(26.47)	50(73.53)	54.92±6.89	65.10±4.72 ^a	361.26±37.21	537.26±48.31 ^a
χ^2/t 值					10.550	2.367	23.922	0.889	26.753
P 值					0.001	0.662	0.014	0.382	<0.001

注:与治疗前比较,^a $P < 0.05$ 。

表 3 两组心脏彩色超声检查各指标变化比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of the changes of each index of B-ultrasound before and after treatment between the two groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Tei 指数		LVESD/mm		LVEDD(mm)		LVEF(%)	
		治疗前	治疗 12 周	治疗前	治疗 12 周	治疗前	治疗 12 周	治疗前	治疗 12 周
观察组	68	0.82±0.92	0.42±0.12 ^a	58.44±4.35	44.16±2.52 ^a	64.10±8.28	48.94±5.84 ^a	36.59±3.47	51.98±4.01 ^a
对照组	68	0.79±0.11	0.53±0.07 ^a	58.84±4.59	49.88±2.72 ^a	64.19±8.14	53.03±6.41 ^a	36.48±3.77	44.67±3.21 ^a
t 值		0.247	4.622	0.867	19.788	0.534	0.748	0.422	4.601
P 值		0.801	<0.001	0.862	<0.001	0.59	0.462	0.683	<0.001

注:与治疗前比较,^a $P < 0.05$ 。

2.3 血清 CysC、NT-proBNP 水平比较

治疗后,两组血清 CysC、NT-proBNP 较治疗前降低,观察组血清 CysC、NT-proBNP 均低于对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 4。

2.4 Tei 指数和血清 CysC 与心脏彩色超声各指标及 NT-proBNP 相关性分析

Tei 指数与 LVESD、LVEDD 及 NT-proBNP 呈正相关($r_1=0.812, r_2=0.597, r_3=0.241, P < 0.001$),与 LVEF 呈负相关($r_4=-0.933, P < 0.001$)。血清 CysC 与 LVESD、LVEDD 及 NT-proBNP 呈正相关($r_5=$

表 4 两组血清 CysC、Gal-3、NT-proBNP 水平比较 [$(\bar{x} \pm s)$]

Table 4 Comparison of serum CysC, Gal-3 and NT proBNP levels between the two groups before and after treatment [$(\bar{x} \pm s)$]

组别	n	CysC(mg/L)		NT-proBNP(pg/L)	
		治疗前	治疗 12 周	治疗前	治疗 12 周
观察组	68	1.54±0.20	0.82±0.14 ^a	1623.92±474.82	911.84±262.60 ^a
对照组	68	1.52±0.31	1.22±0.17 ^a	1641.89±586.96	1205.43±373.88 ^a
t 值		1.479	21.304	1.742	10.778
P 值		0.141	0.001	0.082	0.001

注:与治疗前比较,^a $P < 0.05$ 。

0.729, $r_6=0.240$, $r_7=0.073$, $P<0.05$), 与 LVEF 呈负相关($r_8=0.812$, $P<0.001$)。

3 讨论

心室结构重塑与 CHF 发生关系密切,而机体免疫功能损伤、神经内分泌系统紊乱是导致心室重构的重要因素^[9]。本研究治疗后观察组总有效率高于对照组, GQOLI-74 评分、6MWT 大于对照组,说明观察组方案治疗 CHF 可有效提高患者心功能,改善其生活质量,增强其运动能力。 β_1 受体阻滞剂美托洛尔可缓解儿茶酚胺对心肌的毒性,降低交感神经活性,提高 β 受体的激动作用,增强心肌收缩反应、舒张功能,但部分患者存在不耐受或禁忌症^[10]。伊伐布雷定可有效降低心率,延长心室舒张时间,降低心肌耗氧量,改善心室充盈,减小缺血性心肌顿抑及抑制心肌重塑作用,改善心功能。伊伐布雷定可提高冠脉灌注,降低心肌氧耗,提高一氧化氮生物利用度,延缓或逆转心肌凋亡,抑制心室重构,且副作用少^[11]。周海涛等^[12]证明,伊伐布雷定联合美托洛尔治疗重度 CHF 较单纯美托洛尔疗效更好。

治疗后观察组 Tei 指数及 LVESD、LVEDD 值均低于对照组, LVEF 值均高于对照组,说明观察组方案治疗 CHF 可显著降低左室 Tei 指数,增强心室功能。Tei 指数可准确反映心室及心脏整体功能。Bryan 等^[13]以伊伐布雷定治疗 CHF 患者,结果表明,患者心功能及运动能力明显增强。本研究治疗后,观察组血清 CysC、NT-proBNP 均低于对照组,说明观察组方案治疗 CHF 可显著改善心衰定量标志物水平。CysC 可经抑制内源性半胱氨酸蛋白酶活性保护弹力纤维,促进胶原纤维降解,影响心室和血管壁重塑。CysC 可降低心肌顺应性,导致心功能不全,间接反映心力衰竭严重程度。伊伐布雷定能够降低 CHF 患者血清 CysC 水平,抑制 CysC 对胶原纤维结构、弹力纤维结构的降解和破坏作用,减缓基质代谢,减少心室扩大,从而延缓心功能衰竭进展。NT-proBNP 是产生于心肌细胞的多肽类物质,其水平与心力衰竭程度正相关,可预测心肌功能改变。NT-proBNP 血清值水平降低则可能是由于伊伐布雷定抑制心肌细胞分泌前脑钠肽,进而改善了心肌缺血状态,抑制心肌重塑。Tondi 等^[14]将伊伐布雷定应用于 CHF 患者,结果表明患者心率、NT-proBNP

显著改善。钱海燕等^[15]证明,伊伐布雷定可有效改善 CHF 患者 LVEF、心率、6 min 步行距离及血浆 NT-proBNP 水平。本研究中 Tei 指数和血清 CysC 与 LVESD、LVEDD、LVEF 及 NT-proBNP 呈正相关,与 LVEF 呈负相关,提示伊伐布雷定可能经控制心肌重塑进而有效改善心肌细胞功能,提高疗效。

综上所述,伊伐布雷定联合美托洛尔治疗 CHF 患者能够降低患者血清 CysC、NT-proBNP 水平,控制心肌重塑,有效改善心肌细胞功能,其疗效明显,值得临床推广应用。

参考文献

- [1] 段洪强, 闫鹏, 祁娜. 血清 GDF-15、sST2 与慢性心力衰竭患者心功能的相关性分析及对预后的评估[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2021, 13(3): 453-456.
- [2] Tuyyab F, Khadim R, Farhan S, et al. Efficacy of Ivabradine, Metoprolol alone vs Ivabradine plus Metoprolol (combination) for Heart Rate Reduction and Heart Rate Variability during Computed Tomography Coronary Angiography: A Randomized Controlled Trial[J]. Pakist Arm Forces Med J, 2018, 68(Suppl-1): S1-4.
- [3] Boehm M, Komajda M, Borer JS, et al. Duration of chronic heart failure affects outcomes with preserved effects of heart rate reduction with ivabradine: findings from SHIFT[J]. Europ J heart fail, 2018, 20(2): 373-381.
- [4] Bocchi EA. The complementary and synergistic role of combining β -blockers and ivabradine in patients with chronic heart failure[J]. MEDICOGRAPHIA, 2018, 40(1): 53-57.
- [5] 中华医学会心血管病学分会, 中华心血管病杂志编辑委员会. 中国心力衰竭诊断和治疗指南 2014[J]. 中华心血管病杂志, 2014, 42(2): 98-122.
- [6] 秦晓毅. 2010 年 NICE 慢性心力衰竭诊治指南更新的解读[J]. 心血管病学进展, 2011, 32(4): 490-492.
- [7] 齐喜玲, 许海燕, 于子凯, 等. 六分钟步行试验在经导管主动脉瓣置换术后心脏康复中的指导价值[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2019, 21(7): 695-698.
- [8] 张娜, 谢新生, 刘长凤, 等. 认知行为干预对恶性淋巴瘤患者心理弹性及生活质量的影响[J]. 癌症进展, 2021, 19(12): 1276-1279, 1283.
- [9] Hartmann C, Bosch NL, de Aragão ML, et al. The effect of ivabradine therapy on heart failure patients with reduced ejection fraction: a systematic review and meta-analysis[J]. Intern J clin pharm, 2018, 40(6): 1443-1453.
- [10] Packer M. Does a target dose or a target heart rate matter to outcomes when prescribing β -blockers to patients with chronic heart failure?[J]. Circul: Cardio Qualit Outcom, 2018, 11(4): e004605.

(下转第 1730 页)

N6-甲基腺嘌呤 RNA 修饰在泌尿系统肿瘤中的研究进展

李金珂 袁焰*

[摘要] 在表观遗传修饰方面,与DNA甲基化修饰类似, RNA甲基化修饰为一个很有潜力的研究方向。作为最常见的RNA甲基化修饰形式, m6A修饰在许多疾病特别是肿瘤中发挥着重要作用。m6A由甲基转移酶催化,去甲基酶去除,并与m6A结合蛋白相互作用。本综述在现有研究的基础上,对m6A修饰在泌尿系肿瘤中可能存在的调控网络进行描述,着重讨论m6A修饰相关的调控分子作为泌尿系肿瘤治疗、诊断及预后的新靶点,以期探索泌尿系肿瘤的发病机制提供新的方向,并为开发有效的泌尿系肿瘤治疗方案提供策略。

[关键词] 泌尿系肿瘤; RNA甲基化; N6-甲基腺嘌呤

The advance of N6-methyladenosine RNA modification in urological cancers

LI Jinke, YUAN Yan*

(Department of Organ Transplantation, Renmin Hospital of Wuhan University, Hubei, Wuhan, China, 430060)

[ABSTRACT] In epigenetic modification, similar to DNA methylation, RNA methylation is a potential research direction. As the most common form of RNA methylation, N6-methyladenosine (m6A) methylation plays an important role in many diseases, especially in tumors. m6A is catalyzed by methyltransferase, removed by demethylase and interacts with m6A-binding proteins. Based on the existing research, this review describes the possible regulatory network of m6A methylation in urological cancers, and focuses on the regulatory molecules related to m6A modification as a new target for the treatment, diagnosis and prognosis of urological cancers, providing a new direction for exploring the pathogenesis of urinary tract tumors.

[KEY WORDS] Urological cancers; RNA methylation; N6-methyladenosine

2019年1月国家癌症中心发布了2015年恶性肿瘤流行情况分析,结果显示主要的泌尿系肿瘤按发病率顺序排列为前列腺腺癌、膀胱(或肾盂输尿管)癌、肾细胞癌、睾丸癌和阴茎癌^[1]。阐明表观遗传改变的原因和结局是了解癌症发生和发展的重要前提。“表观遗传学”的概念旨在解释在胚胎发育和组织动态平衡期间,如何从同一基因组产生不同的细胞表型。虽然表观遗传学的全部范围尚未确定,但通常被定义为化学修饰,主要包括DNA和RNA甲基化、组蛋白修饰、非编码RNA修饰和染色质重排。

DNA甲基化和组蛋白修饰已经得到了很好的研究。而在近十年里RNA甲基化已经成为生物学中的一个热门话题。常见的RNA甲基化位点包括5-甲基胞嘧啶、7-甲基鸟嘌呤、1-甲基鸟嘌呤、2-甲基鸟嘌呤、6-甲基鸟嘌呤、N1-甲基腺嘌呤和N6-甲基腺嘌呤(N6-methyladenine, m6A)。m6A是各种RNA甲基化修饰中最常见的,其在肿瘤的发病机制中起着关键作用^[2]。本文就m6A修饰与泌尿系统肿瘤的关系,特别是其作为泌尿系统肿瘤生物标志物和治疗靶点的作用和机制作一综述,旨在为临床诊断治疗泌尿系肿瘤提供新的方向。

基金项目:国家自然科学基金(81972408);武汉市应用基础前沿项目(2018060401011321)

作者单位:武汉大学人民医院器官移植科,湖北,武汉 430060

*通信作者:袁焰, E-mail: dryuan1218@whu.edu.cn

1 m6A 修饰机制

m6A 修饰是动态和可逆的,主要由“写入器”、“擦除器”和“阅读器”介导发挥生物学效应。可逆性意味着 RNA 可以在甲基转移酶催化作用下甲基化,在去甲基酶催化作用下去甲基化,这种现象称为动态平衡。“写入器”,由甲基转移酶样 3 (methyltransferase like 3, *METTL3*)、甲基转移酶样 14 (methyltransferase like 14, *METTL14*) 及相关辅助因子 RNA 结合序列蛋白 15 (RNA binding motif protein 15, *RBM15*)、Wilms 肿瘤相关蛋白 (Wilms tumour 1-associating protein, *WTAP*) 和 vir 样 m6A 甲基转移酶相关蛋白 (vir like m6A methyltransferase associated, *VIRMA*) 共同组成了 m6A 甲基转移酶复合物 (methyltransferase complex, *MTC*)^[3]。“擦除器”,即去甲基化酶,主要包括肥胖相关蛋白 (Fat mass and obesity associated protein, *FTO*) 和 AlkB 同系物 5 (AlkB Homolog 5, *ALKBH5*),催化去除 RNA 的 m6A 修饰^[3]。另一个重要的家族是阅读器,它可以识别 m6A 修饰,与其绑定,并执行不同的生物学功能^[4]。阅读器主要为含有 YTH 结构域的蛋白质。“阅读器”可以促进 RNA 的衰减或增强 RNA 的稳定性,促进翻译,并影响各种靶 mRNA 的剪接和核输出^[5]。

2 m6A 修饰在前列腺癌中的研究进展

2015 年全国前列腺癌总发病率为 10.23/10 万较 2011 年总发病率 7.1/10 万呈现上升趋势,发病率处于泌尿系统肿瘤中第一位^[1]。使用血清 PSA 检测前列腺癌缺乏敏感性和特异性,导致频率相对较高且不必要的前列腺穿刺活检。对于晚期转移前列腺癌患者,大约 30% 的患者进展为去势抵抗型前列腺癌 (castration resistant prostate cancer, *CRPC*)。解决这些困境需要开发更多有效的分子标记物^[6]。

多个课题组发现 m6A 修饰水平在前列腺癌中呈现增高趋势^[7-9],尤其是骨转移的患者^[10]。有研究人员在 *CRPC* 的中检测到 m6A 修饰水平升高和 *VIRMA* 过表达;功能上,*VIRMA* 提升 m6A 修饰水平,促进致癌 *lncRNAs* *CCAT1* 和 *CCAT2* 的表达,增强前列腺癌的侵袭性表型^[11]。

对于前列腺癌患者预后的判断,m6A 修饰相关调控基因同样扮演着重要的角色。多项研究表明单基因 *METTL3* 或 *VIRMA* 的高表达预示着前

列腺癌患者预后不良^[7-11]。或许单基因判断预后缺乏特异性,同样存在研究提示 *VIRMA*、*CCAT1* 和 *CCAT2* 作为一组变量,或者 *IGF2BP3*、核不均一核糖核蛋白 A2/B1 (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1, *HNRNPA2B1*)、*METTL14* 和拷贝数变异的 *ALKBH5* 作为基因组合,它们的表达是前列腺癌患者预后的独立预测因素^[11-12]。

3 m6A 修饰在膀胱癌中的研究进展

膀胱癌是我国泌尿外科临床上最常见的肿瘤之一,2015 年全国男性膀胱癌总发病率为 8.83/10 万^[1]。目前诊断膀胱癌最可靠的方法是侵入性的膀胱镜检,因此迫切需求非侵入性筛查和诊断方法。

研究发现 mRNA 的动态 m6A 修饰及其调控蛋白在膀胱癌的恶性转化、生长、进展、化疗药物的敏感性等方面发挥关键作用^[13-17]。具体机制上,*METTL3* 和 *ALKBH5* 介导 CUB 结构域蛋白 1 (CUB domain containing protein 1, *CDCP1*) mRNA 的 m6A 修饰,而阅读器 *YTHDF1* 优先识别 *CDCP1* mRNA 上的 m6A 位点,促进 *CDCP1* 翻译,促进化学致癌物诱导恶性转化细胞和膀胱癌细胞的生长和进展^[15]。同样存在 *METTL3/YTHDF2*-m6A 修饰调控通路,其通过直接降解抑癌基因 SET 结构域蛋白 7 (SET domain containing 7, *SETD7*) 与 Kruppel 样因子 4 (Kruppel like factor 4, *KLF4*) 的 mRNA,促进膀胱癌的进展^[17]。进一步研究确定 AF4/FMR2 家族蛋白 4 (AF4/FMR2 family member 4, *AFAFF4*)、*MYC*、*NF-κB* 途径的两个关键调控因子 (*IKBKB* 和 *RELA*) 为 *METTL3* 介导的 m6A 修饰的直接靶点^[13]。*METTL3* 和 *ALKBH5* 协同调节使 m6A 修饰在整合素亚基 6 (integrin subunit alpha 6, *ITGA6*) 转录本中高度富集,YTH 结构域家族蛋白 1 (YTH domain family protein 1, *YTHDF1*) 和 YTH 结构域家族蛋白 3 (YTH domain family protein 3, *YTHDF3*) 与其结合,促进 *ITGA6* mRNA 的翻译,影响膀胱癌细胞的粘附、迁移和侵袭表型^[14]。一项研究发现 *FTO* 具有抑制膀胱癌细胞增殖和迁移的功能,同时 *FTO* 具有加强化疗药物顺铂对膀胱癌的细胞毒性作用^[16]。这些特异性调控机制为膀胱癌的潜在治疗靶点提供了新的见解。

肿瘤细胞中一小部分具有长期致瘤能力的细胞,即肿瘤起始细胞或肿瘤干细胞,在癌症的发展和化疗抵抗性中起着关键作用,是导致肿瘤复发、

转移的根源。多项研究发现 m6A 修饰在调控膀胱肿瘤起始细胞或肿瘤干细胞中起关键作用^[18-19]。*METTL14* 和 m6A 修饰参与 NOTCH 受体 1 (notch receptor 1, *NOTCH1*) mRNA 的 RNA 稳定性,而 *NOTCH1* 在膀胱肿瘤起始细胞的增殖、自我更新、转移和肿瘤发生能力中起重要作用。*METTL3* 调控 *AFF4* mRNA 上 m6A 修饰,进而促进 *AFF4* 的表达, *AFF4* 与 SRY-box 转录因子 2 (SRY-box transcription factor 2, *SOX2*) 和 *MYC* 基因启动子区域相结合,促进 *SOX2* 和 *MYC* 的转录表达,增强膀胱肿瘤干细胞的自我更新及体内的致癌能力。

RNA m6A 修饰不单单调控 mRNA 的表达,在特定的环境下也影响非编码 RNA 的成熟。研究人员第一次发现 *METTL3* 通过调控非编码 RNA 中 m6A 修饰影响肿瘤形成^[20];研究通过证实 *METTL3* 可能通过与微处理器蛋白 (microprocessor complex subunit, *DGCR8*) 相互作用,并以依赖 m6A 的方式正向调节 *pri-miR221/222* 成熟,进而导致磷酸酯酶与张力蛋白同源物 (phosphatase and tensin homolog, *PTEN*) 的表达降低,最终在膀胱癌中发挥致癌作用。

4 m6A 修饰在肾细胞癌中的研究进展

肾细胞癌是一种从分子水平、基因组水平、组织病理学水平和临床水平上都具有很强异质性的恶性肿瘤。目前,临床尚无广泛接受用于肾细胞癌诊断和监测的肿瘤标志物。而如果能早期发现和监测这种隐匿性实体恶性肿瘤将有效改善其预后。一项研究首次绘制了人肾透明细胞癌 m6A 修饰全转录组图谱,为阐明 m6A 介导的基因表达调控机制奠定了基础^[21]。

研究提示 *METTL3* 可能是肾细胞癌发生、发展和预后的一个新的标志物^[22]。*METTL3* 通过调控上皮细胞-间质转化 (epithelial mesenchymal transition, EMT) 和 PI3K-Akt-mTOR 通路来抑制细胞增殖、迁移和侵袭功能,减少细胞 G0/G1 阻滞,并减缓体内肾细胞癌的生长。*METTL14* 的表达与肾透明细胞癌患者临床病理分期呈负相关,与患者总生存期呈正相关,有潜力作为肾透明细胞癌的临床生物标志物^[23]。同样有研究人员证明, *METTL14* 调控嘌呤受体 P2X 6 (purinergic receptor P2X 6, *P2RX6*) mRNA 上 m6A 的修饰,影响 *P2RX6* 的翻译,而 ATP 可以可能通过 *P2RX6* 促进

肾癌细胞的进展^[24]。进一步研究表明 ATP-*P2RX6* 可能通过调节 Ca²⁺ 介导的 p-ERK1/2/MMP9 信号通路,促进肾癌细胞的迁移和侵袭^[24]。研究人员将亚甲基四氢叶酸脱氢酶 2 (methyltetrahydrofolate dehydrogenase 2, *MTHFD2*) 介导 m6A 修饰和肿瘤细胞的代谢状态联系起来^[25]。*MTHFD2*, 一个参与单碳代谢的线粒体酶,促进缺氧诱导因子 2 α (hypoxia inducible factor-2 α , *HIF-2 α*) mRNA 的 m6A 修饰,增强 *HIF-2 α* 翻译;而 *HIF-2 α* 翻译的增强反过来可以促进有氧糖酵解,在肾细胞癌中能够形成一个正的前馈回路,促进代谢重编程和肿瘤生长。

m6A 去甲基酶 *ALKBH5* 和 *FTO* 同样在肾透明细胞癌中异常表达,为判断预后和开发有效的靶向治疗提供了策略^[26-27]。细胞中过表达 *FTO* 降低 PPARG 共激活剂 1 α (PPARG coactivator 1 alpha, *PGC-1 α*) mRNA 转录本中 m6A 修饰水平,增加 *PGC-1 α* 的表达,从而恢复线粒体活性,诱导氧化应激和活性氧自由基的产生,并抑制肿瘤生长。同样 *ALKBH5* 通过依赖 m6A 修饰的方式稳定 AURORA 激酶 B (aurora kinase B, *AURKB*) mRNA,调节 *AURKB* 的表达,体外促进肾癌细胞的增殖、集落形成、迁移和侵袭,并促进体内肿瘤的生长^[28]。

随着生物信息学技术的发展,越来越多的研究集中在多基因模型对肿瘤进行早期检测和预测肿瘤的复发、进展和转移。多项研究从肿瘤基因组图谱 (the cancer genome atlas, TCGA) 数据库中提取 m6A 修饰调控分子的表达数据及其相关的临床信息,结果显示 m6A 调控分子在不同临床病理特征的肾细胞癌中存在差异表达^[29-32]。调控机制上双基因表达情况与癌症相关的途径、生物学过程和标志方面显著相关,包括“细胞粘附分子 (cellular adhesion molecules, CAMs)”、“白细胞迁移”、“Wnt/b-catenin 信号”^[29]。一组研究人员还构建包括 *METTL3*、*METTL14* 和 *HNRNPA2B1* 三基因风险评估模型,该模型可以预测 TCGA 患者的总生存期^[31]。这些基于生物信息学的研究旨在建立和验证 m6A 相关的风险基因作为肾透明细胞癌患者的预后因素。

5 m6A 修饰在睾丸癌中的研究进展

睾丸生殖细胞瘤在 20~40 岁的年轻男性中非常普遍,是这个年龄男性中最常见的致命实体瘤之一。甲胎蛋白和人绒毛膜促性腺激素是睾丸癌

诊疗计划的重要生物标志物,特别是对睾丸生殖细胞癌患者的随访,但敏感性低(<50%)限制了它们的应用。表观遗传学对于睾丸癌诊断和疗效评估的潜在效能目前正在研究中。

一项研究为进一步的破译 m6A 修饰在睾丸生殖细胞瘤中的作用提供了起点^[33]。*METTL3*、*ALKBH5*、*YTH* 结构域包含蛋白 1 (YTH domain containing protein 1, *YTHDC1*)、*YTHDF1*、*YTHDF2* 和不均一核糖核蛋白 C (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C, *HNRNPC*) 是睾丸生殖细胞瘤中 m6A 修饰的主要写入器、擦除器和阅读器。一项研究结果表明 *METTL3* 通过调节 EMT 相关基因的表达参与睾丸生殖细胞瘤细胞的增殖、迁移和侵袭,并可能在激活睾丸生殖细胞瘤的肿瘤免疫应答中发挥作用^[34]。证实 *METTL3* 可以作为睾丸生殖细胞瘤患者的独立预后标志物。另外,研究人员确定 *VIRMA* 和 *YTHDF3* 通过依赖 m6A 修饰调控促进精原细胞瘤形成,并且两者表达水平的高低可作为准确区分了精原细胞瘤和非精原细胞瘤,成为睾丸生殖细胞瘤患者新的候选生物标志物^[35]。

6 展望

在泌尿系恶性肿瘤患者中检测到失调的 m6A 修饰水平以及异常表达的 m6A 相关调控通路的结果为泌尿系肿瘤提供了新的研究方向。m6A 修饰调控分子在泌尿系肿瘤的发生、发展过程中起重要作用,为理解泌尿系肿瘤表观遗传调控提供了新的视角。调控分子及新的信号通路可作为泌尿系肿瘤患者预后分层的潜在生物标志物,有助于开发一种新的方法来更好地抑制肿瘤的进展,并可帮助临床医生实现群体患者的精准治疗。

然而,癌症表观遗传学的研究仍处于起始阶段。从上述有限的研究表明 m6A 相关调控基因在泌尿系统肿瘤中有不同的表达模式。即使相同的肿瘤类型,调控机制却不同,可能的原因是由于研究队列的方法学差异和组织学模式的差异。因此,需要更多高质量的研究来比较这项或这组生物标记物在每个病例中的敏感性、特异性、阳性和阴性预测价值;并分析其在大的临床环境中从有限的样本中得出的结果是否具有有效的价值及可重复性。以期达到使 m6A 修饰相关分子靶标被临床应用,朝着精准靶向治疗的方向迈出一大步。

参考文献

- [1] 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.
- [2] 裴雨晴,崔巍. m6A RNA 甲基化在肿瘤中的研究进展[J]. 中华医学杂志, 2020, 100(7):556-560.
- [3] 常卫东,魏康宁,王丽,等. mRNA 的 N6-甲基腺嘌呤研究进展[J]. 河南农业科学, 2019, 48(1):1-5, 56.
- [4] Zhao Y, Shi Y, Shen H, et al. m6A-binding proteins: the emerging crucial performers in epigenetics[J]. J Hematol Oncol, 2020, 13(1):35.
- [5] Huang H, Weng H, Chen J. The Biogenesis and Precise Control of RNA m6A Methylation[J]. Trends Genet, 2020, 36(1):44-52.
- [6] 冯国亮,张建伟,徐泉泉,等. IGF-IR 与前列腺癌发生发展及预后的关系[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(3):327-331.
- [7] Cai J, Yang F, Zhan H, et al. RNA m6A Methyltransferase METTL3 Promotes The Growth Of Prostate Cancer By Regulating Hedgehog Pathway[J]. Onco Targets Ther, 2019, 12:9143-9152.
- [8] Ma XX, Cao ZG, Zhao SL. m6A methyltransferase METTL3 promotes the progression of prostate cancer via m6A-modified LEF1[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2020, 24(7):3565-3571.
- [9] Yuan Y, Du Y, Wang L, et al. The M6A methyltransferase METTL3 promotes the development and progression of prostate carcinoma via mediating MYC methylation[J]. J Cancer, 2020, 11(12):3588-3595.
- [10] Li E, Wei B, Wang X, et al. METTL3 enhances cell adhesion through stabilizing integrin $\beta 1$ mRNA via an m6A-HuR-dependent mechanism in prostatic carcinoma[J]. Am J Cancer Res, 2020, 10(3):1012-1025.
- [11] Barros-Silva D, Lobo J, Guimarães-Teixeira C, et al. VIRMA-Dependent N6-Methyladenosine Modifications Regulate the Expression of Long Non-Coding RNAs CCAT1 and CCAT2 in Prostate Cancer[J]. Cancers (Basel), 2020, 12(4):771.
- [12] Ji G, Huang C, He S, et al. Comprehensive analysis of m6A regulators prognostic value in prostate cancer[J]. Aging (Albany NY), 2020, 12(14):14863-14884.
- [13] Cheng M, Sheng L, Gao Q, et al. The m6A methyltransferase METTL3 promotes bladder cancer progression via AFF4/NF- κ B/MYC signaling network[J]. Oncogene, 2019, 38(19):3667-3680.
- [14] Jin H, Ying X, Que B, et al. N6-methyladenosine modification of ITGA6 mRNA promotes the development and progression of bladder cancer[J]. EBioMed, 2019, 47:195-207.
- [15] Yang F, Jin H, Que B, et al. Dynamic m6A mRNA methylation reveals the role of METTL3-m6A-CDCP1 signaling axis in chemical carcinogenesis[J]. Oncogene, 2019, 38(24):4755-4772.

- [16] Wen L, Pan X, Yu Y, et al. Down-regulation of FTO promotes proliferation and migration, and protects bladder cancer cells from cisplatin-induced cytotoxicity [J]. *BMC Urol*, 2020, 20(1):39.
- [17] Xie H, Li J, Ying Y, et al. METTL3/YTHDF2 m6A axis promotes tumorigenesis by degrading SETD7 and KLF4 mRNAs in bladder cancer [J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(7):4092-4104.
- [18] Gu C, Wang Z, Zhou N, et al. Mettl14 inhibits bladder TIC self-renewal and bladder tumorigenesis through N6-methyladenosine of Notch1 [J]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1):168.
- [19] Gao Q, Zheng J, Ni Z, et al. The m6A Methylation-Regulated AFF4 Promotes Self-Renewal of Bladder Cancer Stem Cells [J]. *Stem Cells Int*, 2020, 2020:8849218.
- [20] Han J, Wang JZ, Yang X, et al. METTL3 promote tumor proliferation of bladder cancer by accelerating pri-miR221/222 maturation in m6A-dependent manner [J]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1):110.
- [21] Chen Y, Zhou C, Sun Y, et al. m6A RNA modification modulates gene expression and cancer-related pathways in clear cell renal cell carcinoma [J]. *Epigenomics*, 2020, 12(2):87-99.
- [22] Li X, Tang J, Huang W, et al. The M6A methyltransferase METTL3: acting as a tumor suppressor in renal cell carcinoma [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(56):96103-96116.
- [23] Wang Q, Zhang H, Chen Q, et al. Identification of METTL14 in Kidney Renal Clear Cell Carcinoma Using Bioinformatics Analysis [J]. *Dis Markers*, 2019, 2019:5648783.
- [24] Gong D, Zhang J, Chen Y, et al. The m6A-suppressed P2RX6 activation promotes renal cancer cells migration and invasion through ATP-induced Ca²⁺ influx modulating ERK1/2 phosphorylation and MMP9 signaling pathway [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1):233.
- [25] Green NH, Galvan DL, Badal SS, et al. MTHFD2 links RNA methylation to metabolic reprogramming in renal cell carcinoma [J]. *Oncogene*, 2019, 38(34):6211-6225.
- [26] Zhuang C, Zhuang C, Luo X, et al. N6-methyladenosine demethylase FTO suppresses clear cell renal cell carcinoma through a novel FTO-PGC-1 α signalling axis [J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(3):2163-2173.
- [27] Strick A, von Hagen F, Gundert L, et al. The N6-methyladenosine (m6A) erasers alkylation repair homologue 5 (ALKBH5) and fat mass and obesity-associated protein (FTO) are prognostic biomarkers in patients with clear cell renal carcinoma [J]. *BJU Int*, 2020, 125(4):617-624.
- [28] Zhang X, Wang F, Wang Z, et al. ALKBH5 promotes the proliferation of renal cell carcinoma by regulating AURKB expression in an m6A-dependent manner [J]. *Ann Transl Med*, 2020, 8(10):646.
- [29] Wang J, Zhang C, He W, et al. Effect of m6A RNA Methylation Regulators on Malignant Progression and Prognosis in Renal Clear Cell Carcinoma [J]. *Front Oncol*, 2020, 10:3.
- [30] Chen J, Yu K, Zhong G, et al. Identification of a m6A RNA methylation regulators-based signature for predicting the prognosis of clear cell renal carcinoma [J]. *Cancer Cell Int*, 2020, 20:157.
- [31] Zhao Y, Tao Z, Chen X. Identification of a three-m6A related gene risk score model as a potential prognostic biomarker in clear cell renal cell carcinoma [J]. *PeerJ*, 2020, 8:e8827.
- [32] Zhang QJ, Luan JC, Song LB, et al. m6A RNA methylation regulators correlate with malignant progression and have potential predictive values in clear cell renal cell carcinoma [J]. *Exp Cell Res*, 2020, 392(1):112015.
- [33] Nettersheim D, Berger D, Jostes S, et al. N6-Methyladenosine detected in RNA of testicular germ cell tumors is controlled by METTL3, ALKBH5, YTHDC1/F1/F2, and HNRNPC as writers, erasers, and readers [J]. *Andrology*, 2019, 7(4):498-506.
- [34] Luo Y, Sun Y, Li L, et al. METTL3 May Regulate Testicular Germ Cell Tumors Through EMT and Immune Pathways [J]. *Cell Transplant*, 2020, 29:963689720946653.
- [35] Lobo J, Costa AL, Cantante M, et al. m6A RNA modification and its writer/reader VIRMA/YTHDF3 in testicular germ cell tumors: a role in seminoma phenotype maintenance [J]. *J Transl Med*, 2019, 17(1):79.

(上接第 1725 页)

- [11] Dodd K, Lampert BC. The use and indication of ivabradine in heart failure [J]. *Heart fail clin*, 2018, 14(4): 493-500.
- [12] 周海涛, 毕剑波, 张定国. 美托洛尔联合伊伐布雷定对重度心力衰竭合并窦性心动过速患者心功能的影响 [J]. *心脑血管病防治*, 2020, 20(5):460-463.
- [13] Bryan RS, Huang B, Liu G, et al. Impact of ivabradine on the cardiac function of chronic heart failure reduced ejection fraction: Meta-analysis of randomized controlled trials [J]. *Clin Cardiol*, 2021, 44(4): 463-471.
- [14] Tondi L, Fragasso G, Spoladore R, et al. Real-life indications to ivabradine treatment for heart rate optimization in patients with chronic systolic heart failure [J]. *J Card Med (Hagerstown)*, 2018, 19(7): 351-356.
- [15] 钱海燕, 黄凯, 胡志成, 等. 伊伐布雷定治疗老年心力衰竭患者的疗效观察 [J]. *中华老年医学杂志*, 2017, 36(2): 121-125.

汕头潮南民生医院病理科

汕头潮南民生医院位于广东省汕头市潮南区,是一家民营三级乙等医院,委托汕头大学医学院第一附属医院全面经营管理,开放床位数1500张,是粤东地区最大的民营医院。病理科成立于2006年,目前有医技人员8人,其中高级职称2人,中级职称2人,初级职称4人,负责日常病理诊断及科研、教学等任务。虽然建科时间不长,但发展较快,现已成为汕头市南区(濠江、潮南、潮阳区)开展项目最齐全、规模最大的病理科。科室现开展常规组织学活检、术中冰冻、各种细胞学检查、细胞学石蜡包埋检查、特殊染色、免疫组化检测、肾脏穿刺病理检查及分子病理学检测,最大限度的满足了本院及周边地区临床诊疗的需求,其中甲状腺细针穿刺液基细胞学诊断在潮南区率先开展,填补本地区的空白。2019年成立潮南区域病理诊断中心和远程会诊中心,承担周边兄弟医院的病理诊断及会诊工作;2019年7月被评为“广东省基层医院病理科规范化建设示范单位”,得到同行的广泛认可。



在科室管理上,以医疗卫生技术为导向,重视人员的继续教育工作,把提高医疗服务质量作为一切工作的中心。科室人员先后有5名医技人员在大型三甲医院病理科进修,引进先进病理科的管理制度,并与国内多家医疗机构病理科建立远程会诊平台,极大的提高了病理科的服务能力。

我科现有汕头大学硕士研究生导师1名,培养专业型临床病理专业研究生,为病理专业人才培养做出了贡献;科研教学方面,近5年来,主持省广东省科技创新战略专项资金(纵向协同管理方向)项目1项,主持汕头市科技计划重点项目4项,广东省中医药局项目2项;发表中文核心期刊20篇,其中SCI收录论文5篇,主编著作1部,副主编著作1部。

服务于基层,立足于基层,我们将以极大的热情和不断的努力为基层百姓做出最为精确的病理诊断。

学科带头人宫国良,汕头大学医学院第一附属医院副主任医师,汕头潮南民生医院科主任,汕头大学医学院硕士生导师,长期从事病理诊断工作。广东省基层医药协会病理科分会常务委员;广东省医师学会病理科分会委员;广东省中西医结合学会病理科分会委员;广东省粤港澳合作促进会医药卫生大健康委员会病理联盟委员会委员;分子诊断与治疗杂志编委;齐齐哈尔医学院学报审稿专家;World Journal of Surgical Oncology 审稿专家。



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，广州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。

