



ISSN 1674-6929  
CN 44-1656/R  
邮发代号: 46-283

# 分子诊断与治疗杂志

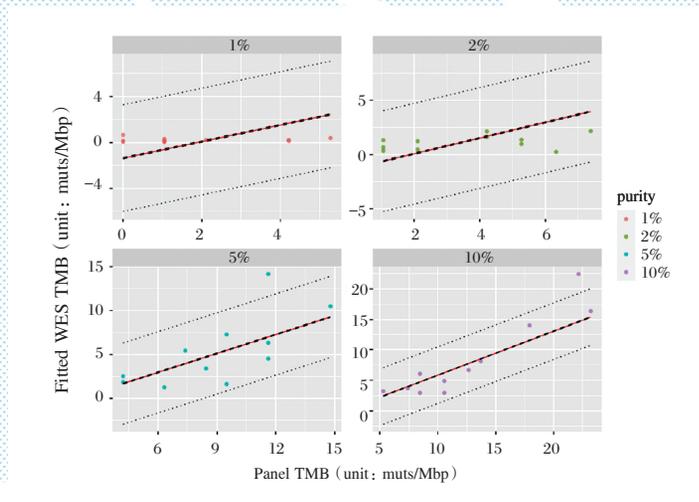
FENZI ZHENDUAN YU ZHILIAO ZAZHI

2021年4月 第13卷 第4期 总第80期

JOURNAL OF

MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Volume 13 Number 4 April 2021



注:图上的每个点表示一个参考品,横坐标是 Panel TMB 值,纵坐标是国家参考品说明书给出的 wes TMB 标准值。红色线表示回归方程  $WES = -1.3719 + 0.7214 * Panel$ ,虚线表示 90% 预测区间。

图(P516) 试剂盒 TMB 检测一致性评价结果

Figure(P516) Consistency evaluation results of Panel TMB detection

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



## 邱峰



邱峰, 1982年6月出生, 主任技师, 硕士研究生导师。2005年毕业于广东医科大学获学士学位, 2018年获广州中医药大学中西医结合基础专业医学博士学位。

现任南方医科大学第七附属医院(南方医科大学南海医院)党委办公室主任兼医学检验科副主任、输血科主任; 广东省科技咨询专家库成员; 广东省基金项目评审专家; 广东省药品监督管理局认证中心审评专家; 佛山市医疗卫生系统科研评审专家; 佛山市临检质控中心专家组成员; 担任中国医药教育学会基层医药教育专委会常

委、中国医院协会医疗联合体工作委员会委员、广东省医疗器械管理学会临床体外诊断产品专委会副主任委员、广东省免疫学会临床免疫检验专委会常委、广东省精准医学应用学会微生态医学分会常委、广东省肝病学会检验分会常委、广东省保健协会检验医学专委会常委、广东省中西医结合学会检验医学专委会委员、广东省医师协会检验分会委员、广东省抗癌协会肿瘤分子诊断委员会委员等。

获评广东省中医院“朝阳人才”、“优秀共产党员”; 南方医科大学第七附属医院“优秀管理干部”、“优秀科主任”、“优秀党务工作者”等荣誉称号。

邱峰博士擅长医学检验实验室和临床基因扩增实验室的建设及管理、县域紧密型医共体建设、医院全面预算管理等。科研方面致力于阴道菌群微生态对宫颈局部免疫清除 HPV 的影响和机制研究及中药单体抗动脉粥样硬化机制研究, 主持和参与国家自然科学基金等各级课题 16 项。以第一和通讯作者发表论文 30 余篇 (SCI 6 篇)。主编专著 1 本, 副主编 1 本, 发明实用新型专利 1 项。

# 分子诊断与治疗杂志

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

月刊 2021 年 4 月 第 13 卷 第 4 期 总第 80 期 Bimonthly Volume 13 Number 4 April 2021

主管 中山大学  
主办 《中国家庭医生》杂志社有限公司  
承办 中山大学达安基因股份有限公司

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 4 月 18 日  
定价 RMB 15.00 元

**Responsible Institution** Sun Yat-sen University  
**Sponsor** China Family Doctors Magazine Publisher Co., Ltd.  
**Organizer** Da An Gene Co., Ltd. of SunYat-sen University  
**Editor in Chief** ZHANG Yipeng  
**Consultant** SHEN Ziyu  
**Editor in Chief** LI Ming  
**Managing Director** JIANG Xiwen  
**Associate Editor** LIU Yue  
**Editorial Office** <JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY> Editorial Office  
**Editors** LI Xiaolan LI Caizhen MO Yuanhao  
**Editing** China Family Doctors Magazine Publisher Co., Ltd.

**Add** 11 Fl., Xianglong Building, 179# Tian he bei Lu, Guangzhou, China 510620  
**Tel** (020) 32290789-206, 32290789-201  
**E-mail** jmdt@vip.163.com  
**CSSN** ISSN 1674-6929  
CN 44-1656/R  
**Printing** TianYi Yofus Technology Co., Ltd.  
**Publish Date** 2021.4.18  
**Price** RMB 15.00



扫码订阅《分子诊断与治疗杂志》



# 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](http://www.istic.ac.cn)

2020年12月



# 分子诊断与治疗杂志

月刊 2021年4月 第13卷 第4期

## 目次

### 述评

女性阴道微生态与HPV感染相关性研究进展 ..... 郑介婷 张子康 操龙斌 等(509)

### 论著

肿瘤突变负荷检测一致性评价 ..... 孙楠 黄传峰 张文新 等(514)

多重PCR病原体分子检测技术在下呼吸道感染诊断中的应用价值  
..... 叶泽辉 郭惠玲 陈茂生 等(518)

高血压脑出血GSN、CCCK-18、NSE水平变化对神经功能的影响  
..... 张培松 刘怀新 任松涛 等(522)

成骨不全XV型WNT1基因突变影响成骨细胞分化的机制 ..... 张拔山 李荣 王文锋 等(526)

lncRNA H19和lncRNA GAS5在急性缺血性脑卒中的表达及临床意义  
..... 李鹏飞 王蕾 李帆 等(531)

Th17/Treg细胞及相关细胞因子水平与带状疱疹患者疼痛程度及并发后遗神经痛的相关性  
..... 宋铁军 王亚斐 徐海丰 等(535)

肥胖患者外周血miR-155表达与非酒精性脂肪肝病发病的关系 ..... 万红 燕树勋 闫诏 等(539)

US-BACT、US-WBC及B-WBC在诊断细菌性尿路感染中的应用  
..... 陶炜 刘万宗 董小康 等(543)

胃蛋白酶原1、G-17、HP-IgG检测,结合胃黄色素瘤对诊断和萎缩性胃炎准确性分析  
..... 陈亚军 罗俊 韩怡(547)

子痫前期患者血清CTRP3、CTRP9与病情的相关性 ..... 吴梦菲 蒋瑶 张亚慧 等(551)

SOD、TGF- $\beta$ 1、Vasohibin-1在口腔鳞状细胞癌诊断及预后评估中的价值  
..... 班晨 王钟华 安峰(555)

新型金属蛋白酶ADAMTS家族在缺血性脑血管疾病中的诊断价值  
..... 张霞军 袁红萍 谭俊华(559)

基于生物信息学分析LOXL2在肺腺癌中的表达及临床意义 ..... 全静雯 刘嘉慧 周泉 等(564)

SIVD患者SicAM-1、sCD40L、ADMA、ALP水平变化与认知功能相关性 ..... 程明 陶珍 唐吉刚(568)

组织miR-1243、LGR5、miR-146a在PTC肿瘤恶性生物学特征评估中价值  
..... 游庆华 叶慧英 王佳 等(573)

CD133、HER2及PODXL水平变化与胃癌病理特征、预后关系 ..... 杨明 邢坤 王晓艳 等(577)

TET1介导5-羟甲基胞嘧啶表达抑制突变型IDH1过表达胶质瘤细胞增殖、迁移和侵袭  
..... 雷梓 陈建功 何颖 等(582)

脂蛋白 a 与脑小血管病变合并认知功能障碍的相关性研究 ..... 窦荣花 王雯 邱志新 等(586)

舌下腺囊肿 D-D、IL-6、MMP-2 表达及临床意义 ..... 张启红 李春杨 营栋(590)

CysC、 $\beta$ 2-MG、IL-1 $\beta$ 、IL-18 对高血压患者早期肾损伤的预测价值 ..... 陈曦 张娜 胡广梅(594)

dNLR、PLR 对非小细胞肺癌根治术患者预后评估 ..... 徐彪 沙纪名 赵旭东 等(598)

多模态磁共振对宫颈癌分期及盆腔淋巴结转移的诊断价值..... 赵耀 曾小松(602)

CTCs、HSP32、HSP27 在食管癌同步放化疗中动态变化及临床意义 ..... 郑杰 葛曦 马志宇(606)

腹腔镜肝癌切除术标本 BNIP-3、EpCAM、FNDC5 在术后复发中的预测价值  
..... 田国标 陈晓波 张建国(610)

胃癌患者血清 p53、PDCD-5、survivin 表达水平及其联合应用的价值  
..... 符白玉 林怡 徐琪 等(615)

LncRNA ROR 在脂肪源性干细胞中的过表达对面部皮肤老化的影响  
..... 梁书旗 吴新军 李岩 等(619)

不同剂量布地奈德对 AECOPD 患者肺功能和 PCT、MMP-9 及 TIMP-1 水平的影响  
..... 张冬芹 田祥 刘素芬 等(623)

EOS、25(OH)D3 及 SS 水平变化与哮喘患儿病情关系 ..... 徐孟霞 刘霞 王静静 等(627)

妊娠期糖尿病患者血清和胎盘氧化应激相关蛋白表达水平与妊娠结局的关系  
..... 谈炯新 李蕊 郭绮棱 等(631)

PTA 患者关节液中 IL-1、TGF- $\beta$  及 TNF- $\alpha$  的表达及临床意义 ..... 冯文涛 李松伦 何玉祥(635)

E-cadherin、COX-2 及 TRACP5b 与原发骨巨细胞瘤患者复发的关系  
..... 向勇 周伟 罗亮 等(638)

肺结核感染患者中 TRF、IAP 及 HMGB1 的表达及意义 ..... 王月彩 戎燕筱 王显雷 等(643)

子痫前期外周血 GLUT-1 表达水平与代谢指标的相关性 ..... 罗沛芬 陈小兰 黄文(647)

血清 ApoA-I、CD40L、VCAM-1 水平与老年 SP 患者 SHG 及预后相关性  
..... 沈晶晶 刘建华 曹亮(651)

定量降低主食 GL 对 GDM 并发高脂血症患者的影响 ..... 韩晔 张前 任阳 等(655)

PA、TGF- $\beta$ 1 及 ACTH 在创伤性骨折中的表达及临床意义 ..... 何峰 张文菊 唐毓金 等(659)

子痫前期患者孕早期 PAPP-A、PIGF 及 25(OH)D3 水平与疾病相关性研究  
..... 杨隽 蔡贞玉 盛威 等(663)

血清铜蓝蛋白、胰岛素抵抗指数与肝硬化患者 Child-Pugh 分级的关系  
..... 郑能 陈炎 于力力 等(667)

APN、TNF- $\alpha$  及 Fibroscan 受控衰减参数在非酒精性脂肪肝中的变化  
..... 高美丽 何文艳 安红杰 等(671)

## 综 述

中耳胆脂瘤的发病机制研究进展 ..... 周赫 赵苗森 马继伟 等(675)

## 专家风采

邱峰 ..... (封二)

## 实验室巡礼

南方医科大学第七附属医院医学检验科 ..... (封三)

# JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Monthly Volume 13 Number 4 April 2021

---

## CONTENTS

### COMMENTS

- Research progress on the relationship between vaginal microecology and HPV infection  
*ZHENG Jieting, ZHANG Zikang, CAO Longbin, ZHANG Zhao, QIU Feng* ..... (509)

### ORIGINAL ARTICLES

- Consistency evaluation of tumour mutation burden detection  
*SUN Nan, HUANG Chuanfeng, ZHANG Wenxin, HUANG Jie, QU Shoufang* ..... (514)
- Application value of multiplex PCR pathogen molecular detection technology in the diagnosis of lower respiratory tract infection  
*YE Zehui, GUO Huiling, CHEN Maosheng, LI Xiaoyue* ..... (518)
- The effect of GSN, CCK-18, NSE level changes on nerve function in hypertensive cerebral hemorrhage  
*ZHANG Peisong, LIU Huaixin, REN Songtao, LI Xin, ZHANG Peikai, SHI Chuanying* ..... (522)
- Osteogenesis imperfecta XV type *WNT1* gene mutation affects the mechanism of osteoblast differentiation  
*ZHANG Bashan, LI Rong, WANG Wenfeng, ZHOU Xueming, LUO Beijing, ZHU Zinian, ZHANG Xibo, DING Aijiao* ..... (526)
- Expression and clinical significance of lncRNA H19 and lncRNA GAS5 in acute ischemic stroke  
*LI Pengfei, WANG Lei, LI Fan, CHENG Yingying, ZHANG Chunbing* ..... (531)
- Correlation of Th17/Treg cell and related cytokine levels with pain degree and sequelae neuralgia in patients with herpes zoster  
*SONG Tiejun, WANG Yafei, XU Haifeng, WANG Xinmei, YANG Huijun* ..... (535)
- Relationship between the expression of miR-155 in peripheral blood and the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease in obese patients  
*WAN Hong, YAN Shuxun, YAN Zhao, ZHANG Shengwei, WANG Xian* ..... (539)
- Application of US-BACT, US-WBC and B-WBC in the diagnosis of bacterial urinary tract infection  
*TAO Wei, LIU Wanzong, DONG Xiaokang, WANG Hui* ..... (543)
- Pepsinogen 1, G-17, HP-IgG detection, combined with gastric xanthoma to diagnose the accuracy of atrophic gastritis  
*CHEN Yajun, LUO Jun, HAN Yi* ..... (547)
- Correlation between serum CTRP3, CTRP9 and disease severity in patients with preeclampsia  
*WU Mengfei, JIANG Yao, ZHANG Yahui, JIA Suhong* ..... (551)
- Value of SOD, TGF- $\beta$ 1, vasohibin-1 in the diagnosis and prognosis evaluation of oral squamous cell carcinoma  
*BAN Chen, WANG Zhonghua, AN Feng* ..... (555)
- Diagnostic value of novel metalloproteinase ADAMTS family in ischemic cerebral vascular disease  
*ZHANG Xiajun, YUAN Hongping, TAN Junhua* ..... (559)
- Bioinformatics analysis of *LOXL2* gene expression and its prognostic value in lung adenocarcinoma  
*QUAN Jingwen, LIU Jiahui, ZHOU Quan, LI Linhai* ..... (564)
- Correlation study of changes of serum SicAM-1, sCD40L, ADMA, ALP and cognitive function in SIVD patients  
*CHENG Ming, TAO Zhen, TANG Jigang* ..... (568)
- Value of tissue miR-1243, LGR5, miR-146a in the evaluation of malignant biological characteristics of papillary thyroid carcinoma  
*YOU Qinghua, YE Huiying, WANG Jia, XU Dongxiang* ..... (573)
- The relationship between the changes of CD133, HER2 and PODXL levels and the pathological characteristics and prognosis of gastric cancer  
*YANG Ming, XING Kun, WANG Xiaoyan, SONG Yanfang* ..... (577)
- Effects of 5-hydroxymethylcytosine on biological behavior of IDH mutant glioma  
*LEI Zi, CHENG Jiagong, HE Ying, LI Rui, WU Yingying* ..... (582)

Study on the correlation between lipoprotein(a) and cerebral small vessel disease with cognitive dysfunction <i>DOU Ronghua, WANG Wen, QIU Zhixin, XU Xiaodong, JING Haifang, WANG Xuejing, WANG Aiqing</i> .....	(586)
Clinical significance of D-D, IL-6, MMP-2 in sublingual gland cyst <i>ZHANG Qihong, LI Chunyang, YING Dong</i> .....	(590)
The predictive value of CysC, $\beta$ 2-MG, IL-1 $\beta$ and IL-18 on early renal injury in patients with hypertension <i>CHEN Xi, ZHANG Na, HU Guangmei</i> .....	(594)
Evaluation of dNLR and PLR on the prognosis of patients undergoing radical resection of non-small cell lung cancer <i>XU Biao, SHA Jiming, ZHAO Xudong, CAO Wei, WU Junxu, ZHOU Xiao, XU Shengsong</i> .....	(598)
Diagnostic value of multimodal magnetic resonance imaging in cervical cancer staging and pelvic lymph node metastasis <i>ZHAO Yao, ZENG Xiaosong</i> .....	(602)
Dynamic changes and clinical significance of CTCs, HSP32, HSP27 in concurrent radiotherapy and chemotherapy of esophageal cancer <i>ZHENG Jie, GE Xi, MA Zhiyu</i> .....	(606)
The predictive value of BNIP-3, EpCAM, FNDC5 of laparoscopic liver cancer resection specimens in postoperative recurrence <i>TIAN Guobiao, CHEN Xiaobo, ZHANG Jianguo</i> .....	(610)
Application value of combined detection of serum p53, PDCD-5 and survivin in gastric cancer <i>FU Baiyu, LIN Yi, XU Qi, ZHANG Jiwei</i> .....	(615)
Effect of lncRNA ROR overexpression in adipose-derived stem cells on facial skin aging <i>LIANG Shuqi, WU Xinjun, LI Yan, LI Jian</i> .....	(619)
Effect of different doses of budesonide on lung function and levels of PCT, MMP-9 and TIMP-1 in patients with AECOPD <i>ZHANG Dongqin, TIAN Xiang, LIU Sufen, WANG Lixian, FU Xiaoli</i> .....	(623)
Correlation between the changes of EOS, 25(OH)D3 and SS levels and the severity of asthma in children <i>XU Mengxia, LIU Xia, WANG Jingjing, JIANG Zhong</i> .....	(627)
Relationship between the expression of oxidative stress-related proteins in serum and placenta of pregnant women with gestational diabetes mellitus and pregnancy outcomes <i>TAN Jiongxin, LI Rui, GUO Qiling, LIU Huaichang, XIAO Lei</i> .....	(631)
Expressions and clinical significance of IL-1, TGF- $\beta$ and TNF- $\alpha$ in the joint fluid of patients with post-traumatic arthritis <i>FENG Wentao, LI Songlun, HE Yuxiang</i> .....	(635)
Relationship between the levels of E-cadherin, COX-2 and TRACP5b and the recurrence of patients with primary giant cell tumor of bone <i>XIANG Yong, ZHOU Wei, LUO Liang, YANG Yunkang</i> .....	(638)
Expression and significance of TRF, IAP and HMGB1 in patients with pulmonary tuberculosis infection <i>WANG Yuecai, RONG Yanxiao, WANG Xianlei, ZHANG Jingmei, SUN Yang, SU Yuanyuan</i> .....	(643)
Correlation between the expression level of GLUT-1 in peripheral blood and metabolic indexes in preeclampsia <i>LUO Peifen, CHEN Xiaolan, HUANG Wen</i> .....	(647)
Correlation between the serum ApoA-I, CD40L and VCAM-1 levels and stress hyperglycemia in elderly patients with severe pneumonia and prognosis <i>SHEN Jingjing, LIU Jianhua, CAO Liang</i> .....	(651)
Effects of quantitatively reducing staple food GL on patients with GDM complicated by hyperlipidemia <i>HAN Ye, ZHANG Qian, REN Yang, LI Dan, WANG Yajuan, JIANG Manhong, LIU Lihua</i> .....	(655)
Expression and clinical significance of PA, TGF- $\beta$ 1 and ACTH in traumatic fractures <i>HE Feng, ZHANG Wenju, TANG Yujin, LIU Jia</i> .....	(659)
Study on the correlation between PAPP-A, PIGF and 25(OH)D3 levels and disease in early pregnancy of patients with preeclampsia <i>YANG Jun, CAI Zhenyu, SHENG Wei, YANG Na</i> .....	(663)
Relationship between serum ceruloplasmin, insulin resistance index and Child-Pugh classification in patients with liver cirrhosis <i>ZHENG Neng, CHEN Yan, YU Lili</i> .....	(667)
Changes of APN, TNF- $\alpha$ and fibroscan controlled attenuation parameters in patients with non-alcoholic fatty liver disease <i>GAO Meili, HE Wenyan, AN Hongjie, TIAN Xuemei, XU Jinfeng, REN Yanping</i> .....	(671)

## REVIEWS

Research of progress on the pathogenesis of middle ear cholesteatoma <i>ZHOU He, ZHAO Miaomiao, MA Jiwei, XI Yue, ZHAO Miaoqing</i> .....	(675)
--	-------

## 女性阴道微生态与HPV感染相关性研究进展

郑介婷<sup>1</sup> 张子康<sup>2</sup> 操龙斌<sup>2</sup> 张召<sup>3</sup> 邱峰<sup>2\*</sup>

**[摘要]** 女性阴道微生态具有特殊、庞杂、动态演变等特性。健康的阴道微生物群(VM)与各类免疫细胞及保护性蛋白共同构成了女性粘膜生殖道的先天防御系统。随着近年微生物多组学技术的普及,阴道微生态在人乳头瘤病毒(HPV)等各类妇科感染性疾病发生、发展过程中的重要性被不断揭示,但两者之间的关系仍未明确。本文将回顾阴道微生态与常见妇科感染性疾病之间的相关性研究,并重点对HPV感染的发展与进程中阴道微生态的变化、宫颈局部免疫与HPV清除转归的关系进行评述与总结,以期临床工作者提供新的见解。

**[关键词]** 阴道微生态; 妇科感染; HPV病毒

### Research progress on the relationship between vaginal microecology and HPV infection

ZHENG Jieting<sup>1</sup>, ZHANG Zikang<sup>2</sup>, CAO Longbin<sup>2</sup>, ZHANG Zhao<sup>3</sup>, QIU Feng<sup>2\*</sup>

(1. School of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong, China, 510515; 2. Department of Laboratory Medicine, The seventh Affiliated Hospital of Southern Medical University, Foshan, Guangdong, China, 528244; 3. Center of Human Microecology Engineering and Technology of Guangdong Province, Guangzhou, Guangdong, China, 510535)

**[ABSTRACT]** The vaginal microecology has the characteristics of special, complex, dynamic evolution. The healthy vaginal microbiota (VM), various immune cells and protective proteins together constitute the innate defense system of the female mucosal reproductive tract. With the popularization of microbial multi-omics technology in recent years, the importance of vaginal microecology in the occurrence and development of various gynecological infectious diseases such as human papilloma virus (HPV) has been continuously revealed, but the relationship between the two is still unclear. This article will review the research on the correlation between vaginal microecology and common gynecological infectious diseases and focus on the development and progress of HPV infection, the changes in vaginal microecology, the relationship between cervical local immunity and HPV clearance outcome, to provide clinicians with new insights.

**[KEY WORD]** The vaginal microbiota; Gynecological infections; HPV

2006年至今,全球发表微生物相关学术论著总数超过5 000篇,是全球自然科学界中关注的热点<sup>[1]</sup>。随着培养组学、高通量测序技术等人体微生态领域的广泛应用,肠道、生殖泌尿道、口腔、皮肤等部位的微生物在宿主及环境中的各种作用逐渐被揭

示<sup>[2-3]</sup>。其中,女性阴道内正常菌群种类丰富、数量庞大,有序定殖在管壁上皮粘膜表面,有效抵御着感染和有害环境的形成<sup>[4]</sup>。这些微生物相互制约、相互协作,共同维持阴道微生态的动态平衡<sup>[5]</sup>。近期,阴道微生态与各种妇科疾病之间的相关研究越来越多,

基金项目:国家自然科学基金青年项目(82003786);广东省科技厅基础与应用基础研究基金项目(2019A1515110338);佛山市中医药领域科技攻关专项(2020001005585)

作者单位:1. 南方医科大学中医药学院,广东,广州 510515

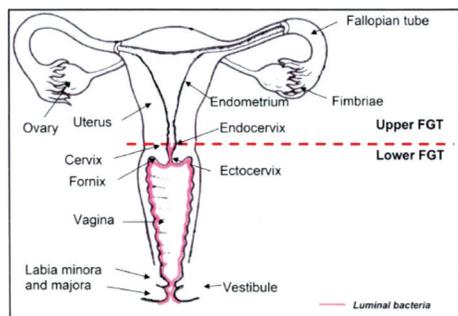
2. 南方医科大学第七附属医院医学检验科,广东,佛山 528244

3. 广东省人体微生态工程技术研究中心,广东,广州 510535

\*通信作者:邱峰, E-mail: QFSFL@126.com

阴道微生物、阴道免疫调节作用和宿主基因之间的相互作用和关系也不断被报道<sup>[6-7]</sup>。

女性生殖道微生态可分为外生殖道微生态区系统和内生殖道微生态区系统,而外阴菌群是整个生殖道菌群最复杂的区域(图1)。研究报告显示,全球75%的女性曾患过生殖道感染,30%的生殖道感染者会发展为妇科重大疾病,这些均与阴道微生态的稳定密切相关<sup>[8]</sup>。临床发现,90%以上的宫颈癌病例与HPV感染有关,但影响HPV持续存在的因素尚清楚<sup>[9]</sup>。近期研究表明,HPV感染与阴道微环境关系密切<sup>[10]</sup>。本文拟对女性阴道微生态菌群多样性的研究进展及其与生殖道感染性疾病的关系,尤其是与本团队长期研究的HPV感染相关的研究进行综述,以期明确女性阴道微生物菌群在女性生殖道健康和疾病中的作用,并展望多种微生态制剂治疗方法在女性生殖健康领域的应用。



注:摘自 Natalia Nikolaitchouk (2009): the femal genital tract microbiota composition relation to innate immune factors, and effects of contraceptives.

图1 女性生殖道微生态在分布区域示意图

Figure 1 Schematic diagram of distribution area of female reproductive tract microecology

## 1 阴道微生态及其检测方法

阴道微生物组成复杂、动态变化性强,是引起女性泌尿生殖道感染的主要来源<sup>[11]</sup>。女性阴道微生态系统是由阴道微生物、内分泌调节系统、阴道解剖结构及宫颈局部免疫系统共同组成,形成一条天然的微生态屏障。正常情况下,健康的阴道中含有大量的乳酸菌与其他微生物<sup>[12]</sup>。阴道微生态的组成和变化受众多因素影响,其中女性激素水平的变化是最重要的内部影响因素<sup>[13]</sup>。在健康女性的某一段时间内,阴道微生物的组成却是一致和稳定的,这也是保证和维持女性生殖健康的主要屏障之一<sup>[14]</sup>。

阴道微生态检测目前主要分为两大类:一类是基于镜检的临床诊断检测,另一类是基于高通量的基础研究检测。临床诊断检测主要通过涂片染色镜检及病原菌培养两种方法对阴道分泌物进行检测,可明确阴道感染的类型<sup>[15]</sup>。分泌物样本的培养是另外一种临床诊断常用方法,常见的病原菌、支原体、衣原体、酵母菌等均可通过培养的方法进行鉴定<sup>[16-17]</sup>。而基础领域研究阴道微生态的主要方法,是基于高通量测试技术、LC-MS技术为主的新型检测方法。高通量测序主要包括16S rRNA检测、宏基因组检测、宏转录组检测。宏基因组检测可以达到种的水平,并提供更多的菌种代谢相关性信息<sup>[18]</sup>。

## 2 阴道微生态与常见妇科感染

### 2.1 细菌性阴道病与阴道微生态

细菌性阴道病(Bacterial vaginosis, BV)是育龄期妇女最常见的阴道感染性疾病之一。它本质上是一种由乳杆菌减少、阴道纤毛菌与阴道加德纳氏菌等厌氧菌增多引起的阴道微生态失调综合征<sup>[19]</sup>。随着对阴道微生态的持续关注与研究,引起BV发生的细菌种属逐渐被发现,BV的致病与诱发其他妇科感染性疾病的机制越来越明确。BV患者阴道内比正常女性多出40多个属<sup>[11]</sup>,这些微生物的增加可产生大量蛋白降解酶,破坏阴道与宫颈粘膜屏障,促使大量外部微生物进入阴道环境,诱导一系列其他妇科感染。根据现有的研究结果,BV并不是女性阴道中某一种或几种细菌与宿主相互作用的结果,而是由多种微生物组成的病原性微生物群落造成的,其具体的机制还需要更多的研究人员关注<sup>[20]</sup>。

### 2.2 外阴阴道假丝酵母菌与阴道微生态

外阴阴道假丝酵母菌病(Vulvovaginal candidiasis, VVC)主要由白色念球菌、光滑念球菌、热带假丝酵母、近平滑念球菌等引起。有趣的是,与正常人群相比,VVC阴道内优势菌群没有显著差异,这可能与细菌、真菌不同的代谢与生长模式有关。有报道显示,无论是口服还是阴道内使用基于乳酸菌的益生菌,均没有得到有效的治疗数据<sup>[11]</sup>。而Reid G等<sup>[21]</sup>人研究表明特定乳杆菌菌株对复杂型VVC的预防与治疗效果显著。深入探究VVC患者阴道微生态的结构及其与宿主的相互作用关系,对阐明VVC的发病机制具有重要作用。

### 2.3 滴虫性阴道炎与阴道微生态

滴虫性阴道炎(Trichomonal vaginitis, TV)与阴道微生态的相关性研究较少。目前有报道称,阴道滴虫的存在会消耗阴道上皮细胞的糖原,导致宫颈上皮组织坏死,促进阴道与宫颈粘膜表面的破坏,大大增加 HPV 等病毒的入侵与定植<sup>[22]</sup>。但 Meng 等<sup>[23]</sup>人研究发现 TV 与 HPV 感染无相关性;Ghosh 等<sup>[24]</sup>人也发现 TV 与宫颈癌的发生和演变不具有相关性。目前,TV 的发生发展与阴道微生态的关系不明,还需更多的工作者关注。

### 2.4 宫颈炎与宫颈微生态

支原体、衣原体、淋病奈瑟氏菌感染是宫颈炎的主要诱导因素,促使子宫内粘性脓液增多。研究表明,宫颈微生物的结构不同于阴道微生物,其总体数量与类型均低于阴道微生物,这可能与宫颈所具有的独特环境有关<sup>[11]</sup>。Marrazzo 等<sup>[25]</sup>人的研究发现,BV 合并宫颈炎患者阴道内产 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的乳杆菌减少,但阴道其他优势菌没有显著变化,这表明引起宫颈炎的各种病原体的定植可能与产生 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的乳杆菌有密切相关,并影响阴道的自净功能。宫颈炎的发生必然与阴道微生态多样性密切相关,为此需要更多的基础研究与临床工作者更细致深入的探究。

## 3 阴道微生态与宫颈 HPV 感染不同进程

近年来,大量文献报道阴道微生态中微生物的种类结构和环境的变化与 HPV 初次感染、HPV 持续感染、宫颈粘膜局部免疫、鳞状上皮内病变、宫颈上皮内瘤样病变等密切相关<sup>[26-27]</sup>。如图 2 所示,阴道微生态的失调会促使 HPV 易感、而 HPV 感染也会加速阴道微生态的紊乱,但两者之间的关系尚不完全清楚。考虑到现在临床上对持续性 HPV 感染并没有特别好的治疗方法,细致的探究 HPV 感染进程中阴道微生态的具体变化与相互影响的机制,有助于探究以预防和治疗为主的阴道微生态制剂通过纠正阴道微生态的平衡,激活宫颈局部免疫自我清除 HPV 病毒的可能性。

毕庆庆等<sup>[28]</sup>人发现 HPV 阴性组和 HPV 感染后转阴患者的阴道微生物类型相对单一,主要以厚壁菌门、乳杆菌为主;但 HPV 持续感染患者的阴道微生物多样性非常复杂,不动杆菌属、普雷沃菌

属、假单胞菌属和鞘氨醇单胞菌属等具有显著统计学差异。王秀芳等<sup>[29]</sup>人发现 HR-HPV 感染患者的菌群密集度分级、菌群多样性、乳酸菌分级、需氧菌性阴道病、细菌性阴道病、外阴阴道假丝酵母菌病检出率与低危型性人乳头病毒感染者均具有显著的统计学差异。罗燕艳等<sup>[30]</sup>对 334 例门诊 HPV 感染患者的检测数据进行分析,发现宫颈 HR-HPV 感染者的阴道微生态失衡会影响阴道清洁度、菌群多样性、优势菌、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 及 PH 值等。

某些阴道微生物菌株可能在 HPV 感染后发挥保护或致病作用,从而抑制或促进宫颈癌的发展。例如,卷曲乳杆菌对预防鳞状上皮内瘤病变具有保护作用,以及占优势的惰性乳杆菌可抑制 CST IV 的发展等<sup>[31]</sup>。这些结果都为以微生态制剂为主的新型 HPV 感染治疗提供了很好的理论参考意义。然而,当前的主要问题集中在 HPV 感染前后阴道微生态各种差异究竟是如何加速或者抑制 HPV、上皮细胞病变,各个不同的菌株究竟是通过什么途径来影响宫颈局部免疫,这个过程中宫颈免疫、微生物、代谢物、微环境、上皮细胞等究竟是如何相互影响的? 这些难点可能需要相关基础研究和临床诊断工作者继续探究,为有效治疗持续性 HPV 感染患者、为预防 HPV 感染提供更多、更好的手段。



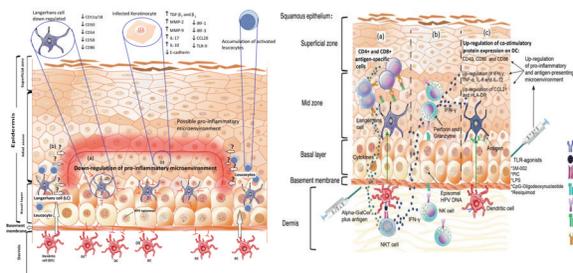
注:摘自 Rebecca M. Brotman(2014): Interplay Between the Temporal Dynamics of the Vaginal Microbiota and Human Papillomavirus Detection.

图 2 阴道菌群与 HPV 感染与否不同进程的相对丰度的热图菌群类型与丰度的差异

Figure 2 The differences in the relative abundance of vaginal flora and flora types and abundances of different processes with or without HPV infection

#### 4 阴道生态、宫颈局部免疫在 HPV 感染后清除中的作用

临床发现 HPV 持续感染最终导致宫颈癌的患者只占少数,大多数 HPV 感染可被宿主快速清除,即阴性转归,原因未明<sup>[32]</sup>。近期越来越多的证据表明,阴道菌群、HPV 感染进程和宫颈局部免疫系统相互作用,密切影响阴道环境的稳态和女性下阴道的健康<sup>[33]</sup>。宿主粘膜免疫反应和生殖器炎症在清除性传播感染疾病的病原体及预防再次感染方面发挥重要作用。有数据表明 HPV 的宿主免疫清除与女性生殖道中的 Th1 促炎应答相关,体外实验发现外周血 CD8<sup>+</sup>T 细胞与 HPV 蛋白的应答相关<sup>[34]</sup>。这些结果表明宿主免疫应答对 HPV 的免疫清除必不可少。除了宿主自身的免疫系统外,由阴道菌群等组成的阴道微环境在实现阴道上皮细胞的保护和阴道局部免疫微环境的稳定过程中是否也发挥了作用? 见图 3。



注:摘自 Alfredo Amador-Molina (2013): Role of Innate Immunity against Human Papillomavirus (HPV) Infections and Effect of Adjuvants in Promoting Specific Immune Response.

图 3 HPV 感染后人体免疫微环境的变化及其激活的免疫清除过程

Figure 3 Changes of human immune microenvironment after HPV infection and the process of activated immune clearance

临床发现 HPV 感染的妇女常伴各种下生殖道病原体的感染。这可能是由于 BV 阳性的女性免疫力相比 BV 阴性的女性更低,因而更容易感染 HPV<sup>[35]</sup>。阴道微生物群的结构是动态的,并且可以发生 CST 之间的转变。Brotman 等发现 HPV 阳性女性阴道的菌群主要集中在 CSTs III 和 CSTs IV,并指出 CST II 和加氏乳杆菌(*L. gasseri*)可能与快速清除急性 HPV 感染有关,可作为潜在的治疗菌用于维持子宫颈的健康<sup>[36]</sup>。因此,我们团队推测阴道菌群与 HPV 感染后的转归和预后密切相关。

阴道微生物中的部分细菌产生的脂肪酸、脂多糖代谢物可直接识别激活 NF- $\kappa$ B。尽管如此,基于 HPV 感染的相关阴道菌群对宫颈局部免疫的调控机制的研究还寥寥无几,因此,明确影响 HPV 感染转归和预后的关键阴道菌群及其作用机制具有重大意义。我们团队推测阴道菌群可以通过 SAFA 等代谢产物激活宿主 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路并调节宫颈局部免疫,从而帮助宿主清除 HPV 感染,而阴道菌群失调则可能是 HPV 逃逸宿主免疫的重要机制(相关研究正在开展)。

#### 5 结论与展望

目前,大量的基础与临床研究工作已经证明,女性阴道生态与以 HPV 感染为代表的妇科感染性疾病密切相关。但与阴道宿主拥有的数以百万计的微生物相比,现在我们对阴道微生态的研究还过于肤浅。通过深入了解阴道微生物群影响各种妇科感染的具体过程,有可能最大限度地提高女性的第一道防线,这将最终有助于开发实用和低成本的治疗法,以减少性传播感染,特别是 HPV 等病毒的易感性。同时,随着各种现代高通量测序技术与生物信息分析技术的发展,“阴道微生物—阴道/宫颈局部免疫激活—外源感染体的清除”这个过程的机制将会被逐步揭开。此外,伴随着各种针对阴道炎症的微生态制剂的深入开发与大队列的临床探究,在改善女性阴道微生态整体环境,必将为以 HPV 为代表的妇科感染性疾病的的治疗、为宫颈病变甚至宫颈癌的预防提供一条安全又有效的新途径。笔者相信,随着女性对妇科保健意识的提升、对 HPV 等疫苗的大范围接受以及微生态制剂的广泛推广,我国的妇科感染性疾病、宫颈癌等发病率将会大幅度下降。

#### 参考文献

- [1] Kährström C, Pariente N, Weiss U. Intestinal microbiota in health and disease[J]. *Nature*, 2016, 535(7610): 47.
- [2] Uzbay T. Germ-free animal experiments in the gut microbiota studies[J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2019, 49: 6-10.
- [3] Chee WJY, Chew SY, Than LTL. Vaginal microbiota and the potential of *Lactobacillus* derivatives in maintaining vaginal health[J]. *Microb Cell Fact*, 2020, 19(1): 203.
- [4] Wan de wijert JHHM. The vaginal microbiome and sexually transmitted infections are interlinked: Consequences for treatment and prevention [J]. *PLoS Med*, 2017, 14 (12) : e1002478.

- [5] Libertucci J, Young VB. The role of the microbiota in infectious diseases[J]. *Nat Microbiol*, 2019, 4: 35-45.
- [6] Roxana JH, Xia, Matthew LS, et al. Vaginal Microbiota of Adolescent Girls Prior to the Onset of Menarche Resemble Those of Reproductive-Age Women[J]. *mBio*, 2015, 6(2): e00097-15.
- [7] Andrea Ries Thurman, Jill L. Schwartz, Jacques Ravel, et al. Vaginal microbiota and mucosal pharmacokinetics of tenofovir in healthy women using tenofovir and tenofovir/levonorgestrel vaginal rings[J]. *PLoS One*, 2019, 14(5): e0217229.
- [8] Hickey RJ, Zhou X, Settles ML, et al. Vaginal Microbiota of Adolescent Girls Prior to the Onset of Menarche Resemble Those of Reproductive - Age Women [J]. *mBio*, 2015, 6(2): e00097-15.
- [9] Hu Z, Ma D. The precision prevention and therapy of HPV-related cervical cancer: new concepts and clinical implications[J]. *Cancer Med*, 2018, 7(10): 5217-5236.
- [10] Wei ZT, Hong-Liang Chen, Chun-Feng Wang, et al. Depiction of Vaginal Microbiota in Women With High-Risk Human Papillomavirus Infection [J]. *Front Public Health*, 2020, 8: 587298.
- [11] 凌宗欣. 女性生殖道微生物群落菌群多样性变化与生殖道感染的相关性[D]. 杭州:浙江大学. 2012年.
- [12] Farage M, Maibach H. Lifetime changes in the vulva and vagina[J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2016, 273:195-202.
- [13] 蒋楠. 阴道微生态与高危型人乳头瘤病毒感染的相关性研究[D]. 杭州:浙江大学. 2018.
- [14] Anahtar MN, Byrne EH, Doherty KE, et al. Cervicovaginal bacteria are a major modulator of host inflammatory responses in the female genital tract[J]. *Immunity*, 2015, 42(5): 965-976.
- [15] 陈琼娣,李晶,李远珍. 两种不同检测方法在阴道分泌物检测诊断中的应用比较[J]. *实用医技杂志*, 2020, 27(11): 1466-1468.
- [16] 吴全裕,谢正慧,吴勇,等. 超高倍显微镜法和培养法检测阴道分泌物支原体结果比较[J]. *国际检验医学杂志*, 2013, 34(1): 83-95.
- [17] 叶伟丽,李绪黎,陈莉. 细菌性阴道病患者阴道分泌物直接涂片法与培养法检测比较[J]. *中华妇产科杂志*, 1997, (8): 55-56.
- [18] 戴媛媛,马筱玲. 宏基因组二代测序技术在临床病原学诊断中的应用[J]. *临床检验杂志*, 2021, 39(1): 1-5.
- [19] Nasioudis D, Linhares IM, Ledger WJ, et al. Bacterial vaginosis: a critical analysis of current knowledge [J]. *BJOG*, 2017, 124(1): 61-69.
- [20] Christina A. Muzny, Jane R. Schwebke. Pathogenesis of Bacterial Vaginosis: Discussion of Current Hypotheses [J]. *J Infect Dis*, 2016, 214(1): S1-S5.
- [21] 钟燕, Inge Tarnow, 隋龙. 鼠李糖乳杆菌 GR-1 和罗伊氏乳杆菌 RC-14 防治阴道炎的研究进展[J]. *国际妇产科学杂志*, 2013, 40(5): 428-431.
- [22] 闵秋思,徐琳,李秋萍,等. 阴道微生态与宫颈 HPV 感染及 CIN 相关性研究进展[J]. *现代肿瘤医学*, 2020, 28(12): 2146-2149.
- [23] 孟龄婷,薛艳,岳婷,等. HPV 感染与 BV、VVC、TV 的相关性基于 1261 例妇科门诊患者的临床研究[J]. *中华妇产科杂志*, 2016, 51(10): 730-733.
- [24] Ghosh I, Muwonge R, Mittl S, et al. Association between high risk human papillomavirus infection and co-infection with *Candida* spp. and *Trichomonas vaginalis* in women with cervical premalignant and malignant lesions[J]. *J Clin Virol*, 2017, 87:43-48.
- [25] Marrazzo JM, Wiesenfeld HC, Murray PJ, et al. Risk factors for cervicitis among women with bacterial vaginosis [J]. *J Infect Dis*, 2006, 193: 617-624.
- [26] Liqin Cheng, Norenhag J, Yue O. O. Hu, et al. Vaginal microbiota and human papillomavirus infection among young Swedish women[J]. *npj Biofilms Microbiomes*, 2020, 6: 9.
- [27] Mykhaylo Usyk, Christine P. Zolnik, Philip E. Castle, et al. Cervicovaginal microbiome and natural history of HPV in a longitudinal study[J]. *PLoS Pathog*, 2020, 16(3): e1008376.
- [28] 毕庆庆,朱婕,张磊,等. 女性生殖道菌群改变与人乳头瘤病毒持续感染的相关性研究[J]. *中国全科医学*, 2021, 24(9):1102-1106.
- [29] 王秀芳,赵辉. 人乳头瘤病毒感染和阴道微生态状况对宫颈鳞状上皮内病变的影响[J/OL]. *中华医院感染学杂志*, 2021, (2):268-271.
- [30] 罗燕艳,罗小婉,栾峰,等. 宫颈 HR-HPV 感染与阴道微生态的关系研究[J]. *检验医学与临床*, 2020, 17(24): 3585-3587.
- [31] Oh HY, Kim BS, Seo SS, et al. The association of uterine cervical microbiota with an increased risk for cervical intraepithelial neoplasia in Korea [J]. *Clin Microbiol Infect*, 2015, 21(7): 674.e1-674.e9.
- [32] Hall MT, Simms KT, Lew JB, Smith MA, Saville M, Canfell K. Projected future impact of HPV vaccination and primary HPV screening on cervical cancer rates from 2017-2035: Example from Australia[J]. *PLoS One*, 2018, 13(2): e0185332.
- [33] Ehrström S, Daroczy K, Rylander E, Samuelsson C, Johansson U, Anzén B, Pålsson C. Lactic acid bacteria colonization and clinical outcome after probiotic supplementation in conventionally treated bacterial vaginosis and vulvovaginal candidiasis[J]. *Microbes Infect*, 2010, 12(10): 691-699.
- [34] Farhat S, Nakagawa M, Moscicki AB. Cell-mediated immune responses to human papillomavirus 16 E6 and E7 antigens as measured by interferon gamma enzyme-linked immunospot in women with cleared or persistent human papillomavirus infection[J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2009, 19(4):508-512.
- [35] Guo YL, You K, Qiao J, et al. Bacterial vaginosis is conducive to the persistence of HPV infection [J]. *Int J STD AIDS*, 2012, 23(8): 581-584.
- [36] Brotman RM, Shardell MD, Gajer P, et al. Interplay between the temporal dynamics of the vaginal microbiota and human papillomavirus detection [J]. *J Infect Dis*, 2014, 210(11): 1723-1733.

## 肿瘤突变负荷检测一致性评价

孙楠 黄传峰 张文新 黄杰\* 曲守方\*

**[摘要]** 目的 使用肿瘤突变负荷(TMB)检测国家参考品,评价基于高通量测序法的肿瘤突变负荷检测试剂盒的TMB检测一致性。方法 使用TMB检测试剂盒(可逆末端终止测序法)检测肿瘤突变负荷检测国家参考品中11对来自肿瘤组织永生化的细胞系和配对白细胞永生化的细胞系。首先将DNA打断,进行末端修复、加接头和PCR扩增等步骤后构建文库;然后将文库杂交捕获;最后使用Next-Seq550 Dx测序仪进行测序。结果 经试剂盒检测,得到TMB-1%、TMB-2%、TMB-5%和TMB-10%的TMB检测国家参考品的Panel-TMB值。22个TMB-5%和TMB-10%参考品的标准TMB值落在试剂盒检测计算的WES-TMB理论值90%预测区间的比例为90.9%(20/22)。结论 研制的国家参考品,能够满足肿瘤突变负荷检测试剂盒的TMB检测一致性评价的要求。

**[关键词]** 肿瘤突变负荷;免疫治疗;生物标志物;程序性死亡受体1/程序性死亡配体1;全外显子测序

### Consistency evaluation of tumour mutation burden detection

SUN Nan, HUANG Chuanfeng, ZHANG Wenxin, HUANG Jie\*, QU Shoufang\*

(National Institutes for Food and Drug Control, Beijing, China, 100050)

**[ABSTRACT]** **Objective** The consistency of tumor mutation burden (TMB) detection was evaluated using the TMB national reference and TMB assay kit based on high throughput sequencing (NGS). **Methods** 11 pairs of immortalized cell lines from tumor tissues and paired leukocyte immortalized cell lines in national reference materials were tested for TMB using TMB detection kit (reversible terminators for sequencing). First, the library was constructed by shearing DNA, end repair, adapter ligation, PCR amplification and so on. Then the library was hybridized and captured. Finally, the NextSeq550 Dx sequencer was used for sequencing. **Results** The panel TMB values of TMB-1%, TMB-2%, TMB-5% and TMB-10% of the national reference products were obtained. The proportion of the standard TMB values of TMB-5% and TMB-10% reference products in the 90% prediction interval of the theoretical WES-TMB values calculated by the kit was 90.9% (20/22). **Conclusion** The developed national reference can meet the requirements of TMB consistency evaluation of the tumor mutation burden detection kit.

**[KEY WORDS]** Tumor mutation burden; Immunotherapy; Biomarkers; PD-1/PD-L1; Whole exome sequencing

肿瘤突变负荷(tumour mutation burden, TMB)是指特定基因组区域每百万碱基(Mb)的体细胞突变数目,包括点突变和插入缺失。随着对肿瘤的发生发展及免疫抵抗等机制的研究不断深入,

免疫治疗被迅速引入到肿瘤的临床治疗实践中。肿瘤突变负荷作为新的潜在的生物标记物,可以用来预测细胞程序性死亡受体1/程序性死亡配体1(Programmed cell death-1/Programmed cell death-li-

基金项目:中国食品药品检定研究院学科带头人培养基金(2019X3);肿瘤突变负荷(TMB)标准化研究(2019X3)

作者单位:中国食品药品检定研究院,北京100050

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

黄杰, E-mail: jhuang5522@126.com

注:孙楠和黄传峰共为第一作者

gand 1, PD-1/PD-L1) 抑制剂的治疗作用,能更好地区分免疫治疗的获益人群<sup>[1-2]</sup>。研究发现在非小细胞肺癌和有错配修复缺陷的结直肠癌患者中,较高的 TMB 与更好的总体存活率相关<sup>[3-4]</sup>。

目前 TMB 的检测方法主要为全外显子 (Whole Exome Sequencing, WES) 测序和试剂盒 (Panel) 靶向测序<sup>[5-6]</sup>, 而 WES 是公认的 TMB 检测金标准。试剂盒 (Panel) 靶向测序方法存在一定挑战, 随着检测平台不同 (Illumina 平台、Proton 平台及华大 BGI 平台), 各家试剂盒所检测的靶向基因不同, 其临界值 (Cut-off 值) 也会出现差异<sup>[7-8]</sup>。为了评价试剂盒 Panel 靶向测序与 WES 检测一致性, 中国食品药品检定研究院建立了肿瘤突变负荷检测 (TMB) 国家参考品, 其中用于 TMB 检测的参考品可以作为检测的标准, 用于评价肿瘤突变负荷检测试剂盒的 TMB 检测一致性。

## 1 材料与方法

### 1.1 样本

肿瘤突变负荷检测国家参考品, 由中国食品药品检定研究院 (简称中检院) 提供。

### 1.2 试剂与仪器

核酸纯化试剂和 TMB 检测试剂盒 (可逆末端终止测序法), 购自南京世和医疗器械有限公司; KAPA Library Quant Kit (illumina) Universal qPCR Mix, 购自美国 KAPA Biosystems 公司; 测序试剂盒, 购自美国 Illumina 公司。超声破碎仪, 比利时 Diagenode 公司; Qubit<sup>®</sup>4.0 荧光定量仪, 美国 Life Technology 公司; Nextseq 550 DX 测序仪, 美国 Illumina 公司。

### 1.3 TMB 检测的国家参考品 panel-TMB 检测

11 对细胞系是肿瘤患者的肿瘤组织永生化细胞系 (TMB-H) 和配对白细胞永生化细胞系 (TMB-BL)。取每一对细胞系, 使肿瘤细胞 (TMB-H) 基因组 DNA 所占的体积比例分别为 0%, 1%, 2%, 5% 和 10%, 其配对白细胞 (TMB-BL) 基因组 DNA 所占的体积比例分别为 100%, 99%, 98%, 95% 和 90%, 最终配制为每对细胞的 5 个样本 (TMB-n-0%、TMB-n-1%、TMB-n-2%、TMB-n-5% 和 TMB-n-10%)。取国家参考品基因组 DNA, 包括: DNA 经超声打断, 末端补平修复, 3' 末端腺苷化, 两端加上文库接头, 文库性扩增后与外显子芯片进行捕获富集, 洗脱掉未富集的片段后进行扩增, 质控合格后上机测序。测序平台使用 Nextseq 550 Dx。使用试剂盒

分析软件的肿瘤突变负荷分析模块分析样本的 TMB 结果。

### 1.4 试剂盒 TMB 检测一致性评价

根据 TMB 国家参考品使用说明书提供的附件 (1-filterMc3.py) 对数据集进行样本及突变过滤。按照说明书附件提供的命令生成 IDT 扩展 50 碱基 (base pair, bp) 与编码序列 (Coding DNA Sequence, CDS) 扩展 2bp 的交集 bed (Browser Extensible Data) 文件。使用说明书附件 (2-restrainRegions.sh) 提取癌症基因组图谱 (The cancer genome atlas, TCGA) WES 区域的突变。使用说明书附件 (3-calculateWesTmb.py) 计算 TCGA 样本 WES 的 TMB 值。使用说明书附件代码 (2-restrainRegions.sh), 提取 TCGA Panel 区域的突变。过滤 Panel 中的剪接突变 (splice mutation) 和驱动突变 (driver mutation)。计算 TCGA 样本 Panel 的 TMB 值, 合并 TCGA 样本 WES 和 Panel 的 TMB 值。使用说明书附件 (5-createLinearRegModel.R) 建立 TCGA 数据 WES 和 Panel TMB 的线性回归方程, 并得到 90% 置信区间和预测区间的文件。使用该模型对国家参考品在试剂盒的 Panel TMB 结果进行预测。

## 2 结果

### 2.1 TMB 检测国家参考品的 Panel-TMB 值

统计试剂盒检测范围内肿瘤基因的突变, 去除种系突变, 保留外显子区域的突变, 并去除驱动突变, TMB 检测国家参考品的 Panel-TMB 值。见表 1。

### 2.2 试剂盒 TMB 检测一致性评价结果

TCGA 数据库 MC3 数据集的样本总数为 10295 个, 每个样本均有 WES 检测数据。经过对上述样本数据进行质控, 剔除质控不合格数据, 剩余可用于分析 WES TMB 的样本数据为 6701 个, 覆盖 24 个癌种。建立 TCGA WES TMB 和 Panel TMB 的线性回归方程是:  $WES = -1.3719 + 0.7214 * Panel$ , Pearson 相关系数为 0.99, Spearman 相关系数为 0.80, 见图 1。结果表明用于 TMB 检测的国家参考品中 22 个 TMB-5% 和 TMB-10% 参考品, 其标准 TMB 值落在试剂盒检测计算的 WES-TMB 理论值 90% 预测区间的比例为 90.9% (20/22), 满足 TMB 检测国家参考品的要求: 不低于 90%, 见图 2。对细胞比例为 1% 和 2% 的国家参考品样本的标准 TMB 值仅供参考, 不纳入上述的计算。

表1 TMB检测国家参考品结果

Table 1 The result of national reference materials for

TMB detection			
序号	样本号	Panel_TMB 值	2%标准 TMB 值
1	TMB-1-0%	/	/
2	TMB-1-1%	0	0.13
3	TMB-1-2%	4.22	1.60
4	TMB-1-5%	11.61	14.21
5	TMB-1-10%	22.16	22.46
6	TMB-2-0%	/	/
7	TMB-2-1%	1.06	0.13
8	TMB-2-2%	2.11	1.22
9	TMB-2-5%	9.50	7.28
10	TMB-2-10%	17.94	14.00
11	TMB-4-0%	/	/
12	TMB-4-1%	1.06	0.13
13	TMB-4-2%	4.22	2.12
14	TMB-4-5%	14.77	10.51
15	TMB-4-10%	23.21	16.37
16	TMB-5-0%	/	/
17	TMB-5-1%	0	0.65
18	TMB-5-2%	1.06	1.32
19	TMB-5-5%	7.39	5.43
20	TMB-5-10%	8.44	6.06
21	TMB-6-0%	/	/
22	TMB-6-1%	4.22	0.22
23	TMB-6-2%	5.28	0.96
24	TMB-6-5%	8.44	3.41
25	TMB-6-10%	12.66	6.66
26	TMB-7-0%	/	/
27	TMB-7-1%	0	0.06
28	TMB-7-2%	1.06	0.34
29	TMB-7-5%	9.50	1.63
30	TMB-7-10%	10.55	2.93
31	TMB-8-0%	/	/
32	TMB-8-1%	1.06	0.04
33	TMB-8-2%	2.11	0.46
34	TMB-8-5%	4.22	2.51
35	TMB-8-10%	7.39	3.66
36	TMB-9-0%	/	/
37	TMB-9-1%	4.22	0.13
38	TMB-9-2%	6.33	0.25
39	TMB-9-5%	6.33	1.26
40	TMB-9-10%	8.44	2.93
41	TMB-11-0%	/	/
42	TMB-11-1%	5.28	0.38
43	TMB-11-2%	5.28	1.37
44	TMB-11-5%	11.61	4.53
45	TMB-11-10%	10.55	4.91
46	TMB-12-0%	/	/
47	TMB-12-1%	1.06	0.31
48	TMB-12-2%	7.39	2.15
49	TMB-12-5%	11.61	6.34
50	TMB-12-10%	13.72	8.13
51	TMB-13-0%	/	/
52	TMB-13-1%	2.11	0.22
53	TMB-13-2%	1.06	0.65
54	TMB-13-5%	4.22	1.84
55	TMB-13-10%	5.28	3.21

注：2%标准 TMB 值为突变变异最大体细胞等位基因频率 (MSAF) ≥ 2% 的突变计算的 TMB 值。

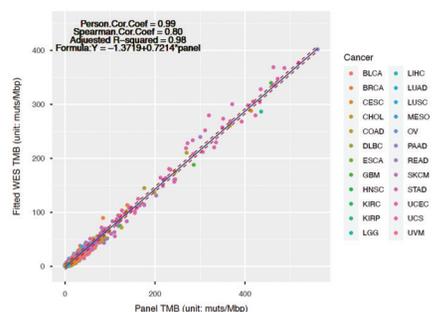
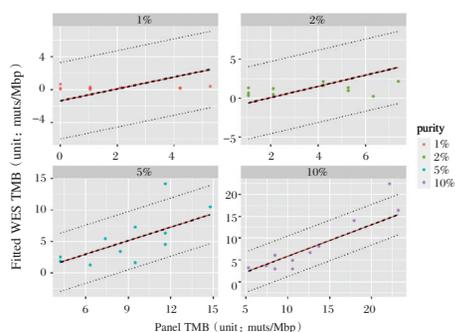


图1 所有癌种 WES 和 Panel TMB 线性回归图

Figure 1 Linear regression of WES and Panel TMB for all cancer types



注：图上的每个点表示一个参考品，横坐标是 panel TMB 值，纵坐标是国家参考品说明书给出的 wes TMB 标准值。红色线表示回归方程  $WES = -1.3719 + 0.7214 * Panel$ ，虚线表示 90% 预测区间。

图2 试剂盒 TMB 检测一致性评价结果

Figure 2 Consistency evaluation results of Panel TMB detection

### 3 讨论

2017年,美国食品和药物管理局(FDA)批准的首个商业检测 TMB 的基因检测 Panel: FoundationOne CDx (F1CDx),覆盖了 324 个基因以及两个预测免疫检查点抑制剂疗效的微卫星不稳定 (MSI) 和 TMB<sup>[9]</sup>。2019年 FDA 批准美国首个针对 TMB 的癌症全外显子测序体外诊断产品 - NantHealth 公司 Omics Core, 可检测癌症组织中的总体肿瘤突变负荷 (TMB) 和 468 个癌症相关基因的体细胞突变<sup>[10]</sup>。而我国已经有多个公司开展了肿瘤突变负荷 (TMB) 的诊断试剂产品的研发。但是目前 TMB 检测缺乏统一标准,亟需开展肿瘤突变负荷 (TMB) 标准化研究,对不同诊断试剂研发企业的 Panel-TMB 差异进行评估。

为建立 TMB 检测统一的标准,中检院建立相应的国家参考品,制定了 WES 计算 TMB 指标的规则,即以编码区 ±2 bp 的区间内的非同义单核苷酸突变或插入缺失突变作为 WES 捕获测序样本

的 TMB 指标的计数基础,不区分是否驱动基因突变,可以是 splice 功能突变。试剂盒可以将突变变异最大体细胞等位基因频率(MSAF) $\geq 1\%$  的突变计算的 TMB 指标为参考指标;但是为了匹配不同的突变过滤策略,中检院同时给出 MSAF $\geq 2\%$ 、 $3\%$ 、 $4\%$ 及 $5\%$ 要求下的标准 TMB。中检院建立了 Panel 的 TMB 回报结果的规则。Panel 的 TMB 指标都可以与 WES 的 TMB 指标形成线性回归关系。研究报导,使用小 Panel 捕获测序,匹配针对性优化的 TMB 算法,可以达到与 WES 中 TMB 指标的较强相关性。学者 J. Budczies 从理论模拟和实际数据验证推知了 Panel 大小,TMB 检出数值对 Panel 的 TMB 检出相对 WES 的 TMB 指标的 CV 变化趋势,CV 变化趋势分别与 Panel 大小和 TMB 值的平方根成反比<sup>[11]</sup>。从标准化 TMB 检测的角度,中检院建议试剂盒 Panel 检测提供的 TMB 指标进行自适应的转化来给出与 WES 的标准 TMB 指标适配的检测结果。国家参考品的结果包含两部分内容:样本的标准 TMB 值(WES 的 TMB 值)和按照 Panel 自身参数估计的该数值的 90%置信区间。

TCGA 是美国国家癌症研究所(NCI)和美国人类基因组研究所(NHGRI)共同开发的大型肿瘤研究项目,旨在通过应用高通量和多组学的肿瘤基因组分析技术,加深人类对肿瘤的认知,从而提高肿瘤的预防、诊断和治疗。TCGA 数据库包括转录组(RNA Seq 或表达谱芯片)、基因组(外显子或全基因组测序)、表观遗传(甲基化芯片)和蛋白组等多组学数据<sup>[12]</sup>。目前 TCGA 数据库包含 33 类癌种,约 10 000 例 tumor-normal 成对的外显子数据<sup>[13]</sup>。TCGA 提供了大量肿瘤样本 WES 数据,可用于探索验证 panel 捕获区域与 WES 全外显子捕获区域 TMB 值的线性一致性。通过 TCGA 建模预测过程,建立 TCGA 数据 WES 和 Panel TMB 的线性回归方程,然后按照 Panel 自身参数估计的标准 TMB 值(WES 的 TMB 值)的 90%预测区间,然后计算样本的标准 TMB 值落在试剂盒检测计算的 WES-TMB 理论值 90%预测区间的比例,用于评价 panel 的 TMB 检测一致性。

本研究采用 Panel 的检测方法,对国家参考品中 TMB 检测参考品进行了 TMB 的检测,用于试剂盒(Panel)的 TMB 检测一致性评价。结果表明 TMB-5%和 TMB-10%参考品的标准 TMB 值落在试剂盒检测计算的 WES-TMB 理论值 90%预测区

间的比例为 90.9%,满足了 TMB 检测国家参考品的要求:即比例应不低于 90%。研制的 TMB 国家参考品,能够满足肿瘤突变负荷检测试剂盒的 TMB 检测一致性评价的要求,为 TMB 检测的标准化研究提供可靠的工具,具有重要的意义。

## 参考文献

- [1] 石海林,何天基,刘峰,等.基于TCGA数据库分析肿瘤突变负荷在肌层浸润性膀胱癌预后评估中的价值[J]. 癌变·畸变·突变, 2020, 32(6): 430-437+443.
- [2] 王军委,许昱,魏素菊.肺癌免疫治疗中肿瘤突变负荷(TMB)临床指导意义的研究进展[J]. 中国免疫学杂志, 2019, 35(14): 1784-1790.
- [3] Hellmann MD, Ciuleanu TE, Pluzanski A, et al. Nivolumab plus Ipilimumab in Lung Cancer with a High Tumor Mutational Burden[J]. N Engl J Med, 2018, 378(22):2093-2104.
- [4] Newman J, Seetharamu N, Saif MW. Burden of Proof: Evaluating the Efficacy of Tumor Mutational Burden (TMB) in Predicting Response to Immune Checkpoint Inhibitors [J]. Cancer Med J, 2020, 3(Suppl 2):17-21.
- [5] Hatakeyama K, Nagashima T, Ohshima K, et al. Characterization of tumors with ultralow tumor mutational burden in Japanese cancer patients [J]. Cancer Sci, 2020, 111(10): 3893-3901.
- [6] 童琳,丁宁,李佳旻,等.晚期非小细胞肺癌患者肿瘤突变负荷与靶向治疗疗效相关性[J]. 中国临床医学, 2019, 26(4):538-542.
- [7] 郭伟,尹高菲,段翰源,等.头颈部鳞状细胞癌肿瘤突变负荷相关因素分析[J]. 中国耳鼻咽喉头颈外科, 2020, 27(1):13-16.
- [8] 中国抗癌协会肿瘤标志专业委员会遗传性肿瘤标志物协作组,中国抗癌协会肿瘤病理专业委员会分子病理协作组.肿瘤突变负荷检测及临床应用中国专家共识(2020年版)[J]. 中国癌症防治杂志, 2020, 12(5):485-494.
- [9] Woodhouse R, Li M, Hughes J, et al. Clinical and analytical validation of FoundationOne Liquid CDx, a novel 324-GenecfDNA-based comprehensive genomic profiling assay for cancers of solid tumor origin [J]. PLoS One, 2020, 15(9): e0237802.
- [10] Zhong Y, Xu F, Wu J, et al. Application of Next Generation Sequencing in Laboratory Medicine[J]. Ann Lab Med, 2021, 41(1):25-43.
- [11] Budczies J, Allgäuer M, et al, et al. Optimizing panel-based tumor mutational burden (TMB) measurement [J]. Ann Oncol, 2019, 30(9): 1496-1506.
- [12] Gao J, Ciriello G, Sander C, et al. Collection, integration and analysis of cancer genomic profiles: from data to insight [J]. Curr Opin Genet Dev, 2014, 24:92-98.
- [13] 李鑫,李梦玮,张依楠,等.常用肿瘤基因分析方法及基于TCGA数据库的分析应用[J]. 遗传, 2019, 41(3):234-242.

## 多重PCR病原体分子检测技术在下呼吸道感染诊断中的应用价值

叶泽辉<sup>1</sup> 郭惠玲<sup>1</sup> 陈茂生<sup>1</sup> 李小悦<sup>2\*</sup>

**[摘要]** 目的 分析多重PCR病原体分子检测技术在下呼吸道感染诊断中的应用价值。方法 随机选取2019年1月至2019年12月于两家医院接受治疗的128例下呼吸道感染患者作为研究对象,提取患者的痰液标本后分别使用多重PCR和直接免疫荧光法进行病原体检测,对比不同检查方式的检查结果。结果 128例患者经多重PCR检测后共检出阳性标本92份(71.88%),其中检测到两种或两种以上病原体的有12份(9.38%),以FluA病原体的阳性率最高为39.84%。128例患者经直接免疫荧光法检测后共有56份(43.75%)标本为病原体阳性,其中有5份(3.91%)标本检测到两种或两种以上病原体,以FluA病原体的阳性率最高为25%。多重PCR检测的总灵敏度(95.00%)和准确率(98.77%)均明显高于直接免疫荧光法检测的总灵敏度(67.11%)和准确率(89.40%),差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),特异度(99.36% & 96.77%)相比,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。结论 相较于传统的直接荧光免疫法检测,多重PCR病原体分子检测在下呼吸道感染中发挥出了较好的诊断价值,具有较高的灵敏度和特异度,应当在临床中广泛应用及推广。

**[关键词]** 下呼吸道感染; 病原体; 多重PCR; 诊断

### Application value of multiplex PCR pathogen molecular detection technology in the diagnosis of lower respiratory tract infection

YE Zehui<sup>1</sup>, GUO Huiling<sup>1</sup>, CHEN Maosheng<sup>1</sup>, LI Xiaoyue<sup>2\*</sup>

(1. Emergency Department of Dongguan People's Hospital, Dongguan, Guangdong, China, 523059; 2. Department of Critical Care Medicine, Fifth Affiliated (Zhuhai) Hospital of Zunyi Medical University, Guiyang, Guizhou, China, 519100)

**[ABSTRACT]** **Objective** To analyze the application value of multiplex PCR pathogen molecular detection technology in the diagnosis of lower respiratory tract infections. **Methods** A total of 128 patients with lower respiratory tract infections who were treated in two hospitals from January 2019 to December 2019 were randomly selected as the research objects. After extracting the sputum samples of the patients, multiplex PCR and direct immunofluorescence were used to detect pathogens. The results from different inspection methods were compared. **Results** A total of 92 positive specimens (71.88%) were detected in 128 patients using multiplex PCR detection. Among them, two or more pathogens were detected in 12 samples (9.38%). The highest positive rate of FluA pathogen was 39.84%. A total of 56 (43.75%) specimens of 128 patients were pathogen-positive using the direct immunofluorescence detection, of which 5 specimens (3.91%) were detected with two or more pathogens, and the highest positive rate for the FluA pathogen was 25%. The total sensitivity (95.00%) and accuracy (98.77%) of multiplex PCR detection were significantly higher than the total sensitivity (67.11%) and accuracy (89.40%) of direct immunofluorescence detection, the difference was statistically

基金项目:国家自然科学基金(81960361)

作者单位:1. 东莞市人民医院急诊综合病区, 广东, 东莞 523059

2. 遵义医科大学第五附属(珠海)医院重症医学科, 贵州, 贵阳 519100

\*通信作者: 李小悦, E-mail: euyeyu1983@126.com

significant ( $P < 0.05$ ), compared with the specificity (99.36% & 96.77%), the difference was not statistically significant ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** Compared with traditional direct fluorescence immunoassay detection, multiplex PCR pathogen molecular detection has a better diagnostic value in lower respiratory tract infections, with higher sensitivity and specificity, and should be widely used and promoted in clinical practice.

[KEY WORDS] Lower respiratory tract infection; Pathogen; Multiplex PCR; Diagnosis

下呼吸道感染作为临床中常见的呼吸道感染疾病类型,具有较高的发病率和死亡率,随着近年来各类抗菌药物的发明和广泛应用,下呼吸道感染的致病菌病原谱也不断变化,增加了临床诊断及治疗的难度<sup>[1]</sup>。传统的培养法是下呼吸道感染病原体检测的金标准,但由于整个培养过程较为复杂,因此耗时较长,不利于临床早期治疗,容易延误患者的病情<sup>[2]</sup>。目前,直接免疫荧光法和间接免疫荧光法在下呼吸道感染病原体中的检测也发挥出了较好的应用效果,但诊断的灵敏度和特异度仍相对较低<sup>[3]</sup>。随着现代分子生物学技术的快速发展,病原体分子检测技术在临床中的诊断研究也逐渐增多,尤其是基于分子遗传水平的核酸检测技术,已经成为了病原体检测技术中的主流。多重PCR是在传统PCR基础上发展的一种检测方法,可以同时实现多种病原体的同时检测,近年来在下呼吸道感染的病原体检测中发挥出了较好的应用价值<sup>[4]</sup>。基于此,本研究将提取患者的痰液标本后分别使用多重PCR和直接免疫荧光法进行病原体检测,对比不同检查方式的检查结果,期望以此来为下呼吸道感染的早期诊断提供依据,现将报道如下。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

随机选取2019年1月至2019年12月于2家医院重症医学科接受治疗的128例下呼吸道感染患者作为研究对象,男73例,女55例,平均年龄(45.69±15.26)岁。其中包括社区获得性肺炎44例、慢性支气管炎急性加重31例、院内获得性肺炎29例、肺心病14例、慢性阻塞性肺疾病10例,排除活动性肺结核、吸入性肺炎、阻塞性肺炎或发病前2周接受过住院治疗的患者。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 标本采集及处理

针对所有患者进行痰液标本培养,于患者入院后24 h内使用吸痰管经由患者的鼻孔插入鼻咽部,连接黏液收集器后采集患者的痰液标本,标本提取后使用漩涡混合器将其打散,使用离心机离心10

min,转速设定为1 500 r/min,将沉淀物使用pH值为7.2的磷酸缓冲盐溶液(PBS)10 mL进行洗涤,共计洗涤2次,随后使用1 mL的PBS缓冲液将其调成悬液,使用法国生物梅里埃公司的全自动核酸提取仪器(easyMAG)对本标本进行自动核酸提取,并放置于PCR管中保存。所有痰液标本均送检进行微生物病原学诊断。

#### 1.2.2 免疫荧光法

将标本离心沉淀后制片,放置于常温条件下自然干燥,使用冷丙酮固定10 min后取出,待冷丙酮完全挥发,采用荧光标记的呼吸道病毒单克隆抗体检测标本的病原体,检测试剂盒购进于美国Chemicon公司,具体操作步骤按照试剂盒说明要求进行操作,以2个及以上完整细胞内有明亮黄色荧光判定为阳性。

#### 1.2.3 多重PCR检测

根据美国国立生物技术信息中心(NCBI)公布的病原体目的序列找到各病原体的相对保守区域,并对引物进行设计,引物序列见表1。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequence

病原体	引物序列
RSV	Forward Sequence: 5'-GTGTAATGGAACAGACGC-3' Reverse Sequence: 5'-GACCTTAGATACGGGAAT-3'
ADV	Forward Sequence: 5'-TGGGCGTACATGCACATCG-3' Reverse Sequence: 5'-GGATGTCAAAGTAAGTGCT-3'
FluA	Forward Sequence: 5'-TTCTAACCGAGGTCGAAACGT-3' Reverse Sequence: 5'-CAGGATTGGTCTGTCTTTAGC-3'
FluB	Forward Sequence: 5'-AAGGACATTCAAAGCCAA-3' Reverse Sequence: 5'-AGTTCTCCGTGACCAGT-3'
PIV1	Forward Sequence: 5'-TACCTATGACATCAACGAC-3' Reverse Sequence: 5'-TCAAATACTAAATCTTCTA-3'
PIV2	Forward Sequence: 5'-CTGAGAAAAGAAGATTATGC-3' Reverse Sequence: 5'-CTGTTGTATTGGAAGAGA-3'
PIV3	Forward Sequence: 5'-GGAGCATGTGTCTATCTG-3' Reverse Sequence: 5'-CGTTTACTCTTTCGGTTG-3'

同时于中国食品药品检定研究院购买个病原体的对应参考品,通过对参考品的梯度稀释使用各引物进行检测,针对无法有效扩增的病原体浓度即为该位点的扩增灵敏度。对其他的呼吸道病原进行收集和检测,确保本研究内所使用的引物并不

会对病原核酸产生扩增作用,确定特异度,并将所有检测靶点的正向和反向引物混合为反转录引物混合液和PCR引物混合液。PCR扩增后使用遗传分析仪对样品的PCR产物进行毛细电泳片段分离,分析各样品的峰形图,所有病原体的PCR产物片段长度与参考大小之间的差距不得超过1.5 bp,阴性质控品和阳性质控品的峰形图。见图1~2。

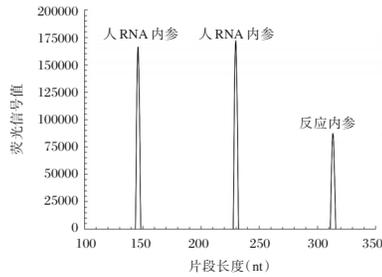


图1 阴性质控品峰形图

Figure 1 Peak shape of quality control products

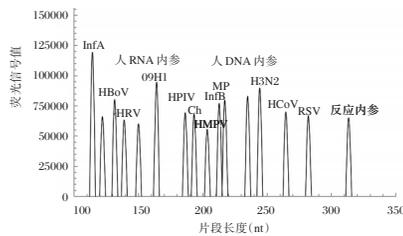


图2 阳性质控品峰形图

Figure 2 Peak shape of positive quality control products

### 1.3 统计学处理

使用SPSS 22.0统计软件对数据进行处理,计数资料用n(%)表示,用 $\chi^2$ 检验,计量资料用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,用t检验,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 下呼吸道感染患者的多重PCR检测结果

通过对128例患者的多重PCR检测结果分析,发现病原体阳性92份(71.88%),其中有12份标本检测到两种或两种以上病原体,占比9.38%,以FluA病原体的阳性率最高为39.84%,其次依次为PIV1、PIV2、ADV、RSV和FluB等。见表2。

### 2.2 下呼吸道感染患者的直接免疫荧光法检测结果

128例患者检测结果发现共有56份(43.75%)标本为病原体阳性,其中有5份(3.91%)标本检测到两种或两种以上病原体,其中以FluA病原体的阳性率最高为25%,其次依次为PIV1、PIV2、RSV、ADV和FluB等。见表3。

### 2.3 多重PCR与直接免疫荧光法的检测价值对比

多重PCR检测的总灵敏度和准确率明显高于直接免疫荧光法检测的总灵敏度和准确率,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),特异度相比,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。见表4。

表2 下呼吸道感染患者的多重PCR检测结果 [n(%)]

Table 2 Multiplex PCR test results of patients with lower respiratory tract infection [n(%)]

病原体	阳性			阴性		
	真阳性	假阳性	阳性率	假阴性	真阴性	阴性率
RSV	11(8.59)	0(0.00)	11(8.59)	0(0.00)	117(91.41)	117(91.41)
ADV	10(7.81)	2(1.56)	12(9.38)	1(0.78)	115(89.84)	116(90.63)
FluA	48(37.50)	3(2.34)	51(39.84)	1(0.78)	76(59.39)	77(60.16)
FluB	9(7.03)	0(0.00)	9(7.03)	2(1.56)	117(91.41)	119(92.97)
PIV1	16(12.50)	0(0.00)	16(12.50)	1(0.78)	111(86.72)	112(87.50)
PIV2	12(9.38)	0(0.00)	12(9.38)	1(0.78)	115(89.84)	116(90.63)
PIV3	8(6.25)	0(0.00)	8(6.25)	0(0.00)	120(93.75)	120(93.75)

表3 下呼吸道感染患者的直接免疫荧光法检测结果 [n(%)]

Table 3 Direct immunofluorescence test results of patients with lower respiratory tract infection [n(%)]

病原体	阳性			阴性		
	真阳性	假阳性	阳性率	假阴性	真阴性	阴性率
RSV	4(3.13)	4(3.13)	8(6.25)	7(5.47)	113(88.28)	120(93.75)
ADV	4(3.13)	3(2.34)	7(5.47)	8(6.25)	113(88.28)	121(94.53)
FluA	22(17.19)	10(7.81)	32(25.00)	27(21.09)	69(53.91)	96(75.00)
FluB	4(3.13)	2(1.56)	6(4.69)	7(5.47)	115(89.84)	122(95.31)
PIV1	8(6.25)	2(1.56)	10(7.81)	9(7.03)	109(85.16)	118(92.19)
PIV2	5(3.91)	3(2.34)	8(6.25)	8(6.25)	112(87.50)	120(93.75)
PIV3	4(3.13)	1(0.78)	5(3.91)	4(3.13)	119(92.97)	123(96.09)

表4 多重PCR与直接免疫荧光法的检测价值对比(%)  
Table 4 Comparison of detection value between multiplex PCR and direct immunofluorescence (%)

病原体	多重PCR			直接免疫荧光法		
	灵敏度	特异度	准确率	灵敏度	特异度	准确率
RSV	100.00	100.00	100.00	50.00	96.58	91.41
ADV	83.33	98.29	97.66	57.14	97.41	91.41
FluA	94.12	96.20	96.88	68.75	87.34	71.09
FluB	100.00	100.00	98.44	66.67	98.29	92.97
PIV1	100.00	100.00	99.22	80.00	98.20	91.41
PIV2	100.00	100.00	99.22	62.50	97.39	91.41
PIV3	100.00	100.00	100.00	80.00	99.17	96.09
合计	95.00	99.36	98.77	67.11	96.77	89.40

### 3 讨论

急性呼吸道感染作为全球面临的严重公共卫生问题之一,感染的病原体具有多样性,其中有70%是由病毒所引发<sup>[5]</sup>。下呼吸道感染作为呼吸道感染中的常见类型,相关临床研究发现,下呼吸道感染的病原体分布较为广泛,发达国家以病毒感染为主,而发展中国家以细菌感染为主<sup>[6]</sup>。有报道指出,下呼吸道感染病原体的构成较为复杂,且患者的临床症状缺乏特异性,传统的病原学诊断主要是通过病原体的分离培养进行诊断,但该方法花费的时间较长,且鉴定数量有限,因此已经无法满足临床诊断的需求<sup>[7]</sup>。随着临床诊断技术的不断发展,免疫荧光法在临床中的应用也日益广泛,并在病毒和衣原体抗原的检测中发挥出了较好的应用效果,具有较高的特异度,但灵敏度却相对较低。20世纪80年代,PCR技术被广泛应用于分子诊断领域,并从最初的传统PCR逐渐发展至多重PCR、反转录PCR和实时定量PCR等,而检测的扩增能力和准确性均有所提升,而其中的多重PCR技术在呼吸道病毒感染患者的病原体筛查中发挥出了积极的作用<sup>[8]</sup>。张海邻等<sup>[9]</sup>在研究中发现,PCR技术的检出率为58.37%,明显高于直接免疫荧光法检测的41.53%,说明PCR技术在下呼吸道感染的病原体检测中发挥出了较好的应用效果。

本研究结果说明与传统的直接免疫检测方法相比,多重PCR可以有效提高临床诊断的灵敏度和准确率,具有较好的诊断价值。刘馨玉等<sup>[10]</sup>在研究发现多重PCR诊断的敏感度和特异度分别为94.74%和84.38%,均明显高于间接免疫荧光法,与本文的研究结果一致。郑凯文等<sup>[11]</sup>在研究中使用多重PCR对下呼吸道感染的病原体进行了检测,结果发现多重PCR检测共计检出13种病原体,传

统培养法仅检出8种,且多重PCR检测的阳性率为79.41%,灵敏度为100%,检测时间比传统培养法缩短了至少1d,进一步证实了多重PCR可以有效实现对下呼吸道感染病原体的检测,与本文的研究结果相似。

综上所述,相较于传统的直接荧光免疫法检测,多重PCR病原体分子检测在下呼吸道感染中发挥出了较好的诊断价值,具有较高的灵敏度和特异度,应当在临床中广泛应用及推广。

### 参考文献

- [1] 邢艳利,谭智,李鸣,等.呼吸内科住院患者下呼吸道感染病原菌分布及耐药情况分析[J].现代预防医学,2016,43(5):189-191.
- [2] Das S, Dunbar S, Tang YW. Laboratory Diagnosis of Respiratory Tract Infections in Children - the State of the Art [J]. Front Microbiol, 2018, 9:2478.
- [3] 谢国艳,高志生,秦云,等.上海崇明地区儿童急性下呼吸道感染的流行特点与临床特征分析[J].诊断学理论与实践,2016,15(4):410-414.
- [4] 刘晓萌,周立,王振虹,等.支气管异物并下呼吸道感染患儿病原菌多重PCR检测结果分析[J].精准医学杂志,2020,35(3):250-252.
- [5] Abdinasir A, Amal B, Amira A, et al. Fourth meeting of the Eastern Mediterranean Acute Respiratory Infection Surveillance (EMARIS) network and first scientific conference on acute respiratory infections in the Eastern Mediterranean Region, 11-14 December, 2017, Amman, Jordan [J]. J Infect Public Health, 2020, 13(3):451-456.
- [6] 陈静宜,廖飞,冯磊.2016年玉溪市某院儿童下呼吸道感染细菌菌群分布及耐药性分析[J].分子诊断与治疗杂志,2018,10(3):148-152.
- [7] 孙志豪,张荣华,钟超珍.东莞市2017-2018年儿童下呼吸道感染病例监测结果[J].分子诊断与治疗杂志,2019,11(4):329-337.
- [8] Wojno KJ, Baunoch D, Luke U, et al. Multiplex PCR Based Urinary Tract Infection (UTI) Analysis Compared to Traditional Urine Culture in Identifying Significant Pathogens in Symptomatic Patients [J]. Urology, 2020, 136:119-126.
- [9] 张海邻,陈小芳,吕芳芳,等.多重PCR技术检测儿童下呼吸道感染病毒和不典型病原体的价值[J].温州医科大学学报,2017,47(11):791-795.
- [10] 刘馨玉,李萌,石璞玉,等.多重实时荧光定量PCR对下呼吸道感染病原体检测分析[J].中华肺部疾病杂志(电子版),2019,12(5):559-562.
- [11] 郑凯文,黄晓园,陈渡波,等.基于多重PCR和第二代高通量测序技术快速检测下呼吸道感染病原微生物方法的建立和应用[J].国际检验医学杂志,2020,41(17):2066-2070.

# 高血压脑出血 GSN、CCCK-18、NSE 水平变化对神经功能的影响

张培松<sup>1</sup> 刘怀新<sup>1\*</sup> 任松涛<sup>1</sup> 李鑫<sup>1</sup> 张培凯<sup>2</sup> 时传迎<sup>3</sup>

**[摘要]** **目的** 探究高血压脑出血(HCH)患者凝溶胶蛋白(GSN)、Caspase切割的细胞角蛋白18(CCCK-18)、神经元特异性烯醇化酶(NSE)水平变化情况,并分析其对患者神经功能的影响。**方法** 选取本院HCH患者108例,根据出院时神经功能恢复情况分为恢复良好组(85例)与恢复不良组(23例),比较两组一般资料、研究组不同病情患者入院时血清GSN、CCCK-18、NSE水平,分析各指标临床意义。**结果** 恢复不良组年龄、发病至入院时间、出血量(>30 mL)、神经功能缺损程度(重度)、合并糖尿病(是)、房颤史(有)均大于恢复良好组,差异均有统计学意义( $P<0.05$ );血清CCCK-18、NSE水平随出血量增加、神经功能缺损程度增加呈逐渐升高趋势,GSN水平随出血量增加、神经功能缺损程度增加呈逐渐降低趋势( $P<0.05$ );Spearman相关性分析显示,入院时血清CCCK-18、NSE水平与出血量( $r=0.766, 0.711$ )、神经功能缺损程度( $r=0.767, 0.704$ )呈正相关,血清GSN与出血量、神经功能缺损程度( $r=-0.846, -0.872$ )呈负相关( $P<0.05$ );恢复不良组入院时、治疗7 d后血清CCCK-18、NSE水平高于恢复良好组,GSN水平低于恢复良好组,差异有统计学意义( $P<0.05$ );恢复良好组治疗7 d后血清CCCK-18、NSE水平低于入院时,GSN水平高于入院时( $P<0.05$ );Logistic回归分析显示,年龄、发病至入院时间、合并糖尿病、房颤史、入院时、治疗7 d后血清GSN、CCCK-18、NSE是HCH患者神经功能恢复的影响因素( $P<0.05$ )。**结论** HCH患者GSN、CCCK-18、NSE水平变化是神经功能恢复的影响因素。

**[关键词]** 高血压脑出血;凝溶胶蛋白;Caspase切割的细胞角蛋白18;神经元特异性烯醇化酶

## The effect of GSN, CCCK-18, NSE level changes on nerve function in hypertensive cerebral hemorrhage

ZHANG Peisong<sup>1</sup>, LIU Huaixin<sup>1\*</sup>, REN Songtao<sup>1</sup>, LI Xin<sup>1</sup>, ZHANG Peikai<sup>2</sup>, SHI Chuanying<sup>3</sup>

(1. Department of Neurosurgery, Liaocheng People's Hospital, Liaocheng, Shandong, China, 252000;

2. Department of Neurosurgery, Liaocheng Third People's Hospital, Liaocheng, Shandong, China, 252000;

3. Department of Imaging, Liaocheng People's Hospital, Liaocheng, Shandong, China, 252000)

**[ABSTRACT]** **Objective** To investigate the changes of gelsolin (GSN), caspase-cleaved cytokeratin-18 (CCCK-18) and neuronal-specific enolase (NSE) levels in patients with hypertensive cerebral hemorrhage (HCH), and to analyze the effects on the neurological function of patients. **Methods** A total of 108 HCH patients in our hospital were selected and divided into a good recovery group (85 cases) and a poor recovery group (23 cases) according to the recovery of neurological function at the time of discharge. The general data of the two groups and the serum GSN, CCCK-18 and NSE levels of patients with different conditions in the study group when admitted to the hospital were compared, and the clinical significance of each indicator was analyzed. **Results** The age, time from onset to hospital admission, blood loss (>30 mL), degree of neuro-

基金项目:2017年山东省医疗卫生科技发展计划项目(2017WS329);聊城市人民医院科研院级基金(LYQN201924)

作者单位:1.聊城市人民医院神经外科,山东,聊城 252000

2.聊城市第三人民医院神经外科,山东,聊城 252000

3.聊城市人民医院影像科,山东,聊城 252000

\*通信作者:刘怀新, E-mail:466515783@qq.com

logical impairment (severe), diabetes (yes), and atrial fibrillation history (yes) in the poor recovery group were greater than those in the good recovery group, and the differences were statistically significant ( $P<0.05$ ). Serum CCCK-18 and NSE levels showed a gradual increase trend with the increase in bleeding volume and neurological deficit. The GSN level showed a gradual decrease trend with the increase in bleeding volume and neurological deficit ( $P<0.05$ ). Spearman correlation analysis showed that serum CCCK-18 and NSE levels at admission were positively correlated with blood loss ( $r=0.766, 0.711$ ) and the degree of neurological impairment ( $r=0.767, 0.704$ ). Serum GSN was negatively correlated with blood loss and neurological impairment ( $r=-0.846, -0.872$ ) ( $P<0.05$ ). serum CCCK-18 and NSE levels in the poor recovery group were higher than those in the good recovery group at admission and 7 days after treatment, and the GSN level was lower than that in the good recovery group, and the difference was statistically significant ( $P<0.05$ ). The level of serum CCCK-18 and NSE in the good recovery group was lower than those at admission, and the level of GSN was higher than that at admission ( $P<0.05$ ). Logistic regression analysis showed that age, time from onset to admission, diabetes mellitus, history of atrial fibrillation, time of admission, serum GSN, CCCK-18, and NSE after 7 days of treatment were the influencing factors of neurological function recovery in HCH patients ( $P<0.05$ ). **Conclusion** Changes in the levels of GSN, CCCK-18, and NSE in HCH patients are influencing factors for the recovery of neurological function.

[KEY WORDS] HCH; GSN; CCCK-18; NSE

高血压脑出血 (Hypertensive cerebral hemorrhage, HCH) 是高血压病最严重的并发症之一,可引起偏瘫、失语,甚至引起休克、脑疝,严重威胁患者生命健康<sup>[1-2]</sup>。在临床上对 HCH 患者病情进行准确评估具有重要意义,可指导疾病的诊疗<sup>[3]</sup>。相关研究指出,脑出血患者血清 Caspase 切割的细胞角蛋白 18 (caspase-cleaved cytokeratin-18, CCCK-18) 水平明显升高,与患者 30 d 死亡率明显相关<sup>[4]</sup>。神经元特异性烯醇化酶 (Neuronal-specific enolase, NSE) 是反映神经纤维损伤的标志物,在神经纤维破裂和膜完整性破坏的过程中,其水平可明显升高<sup>[5]</sup>。凝溶胶蛋白 (Gelsolin, GSN) 被证实具有清除机体损伤后释放的肌动蛋白的作用,可保护神经组织<sup>[6]</sup>。基于此,本研究尝试探讨 HCH 患者 GSN、CCCK-18、NSE 水平变化情况,并分析其对患者神经功能的影响。报告如下。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选取本院 2018 年 1 月至 2019 年 12 月 HCH 患者 108 例,其中男 63 例,女 45 例;年龄平均 (57.08±5.69) 岁。根据出院时神经功能恢复情况分为两组,神经功能恢复情况采用格拉斯哥预后量表 (Glasgow outcome scale, GOS)<sup>[7]</sup> 评分判定,GOS 评分 <4 分为预后不良,4~5 分为预后良好。其中 85 例患者恢复良好,纳入恢复良好组,23 例恢复不良,纳入恢复不良组。

纳入标准:①符合 HCH 诊断标准<sup>[8]</sup>;②首次发

病;③发病至入院 <24 h;④对本研究药物无禁忌;⑤无脑部创伤及手术史;⑥发病前认知功能良好;⑦患者或其家属知晓本研究,已签署同意书。排除标准:①脑梗死患者;②恶性肿瘤患者;③严重心肺肝肾功能障碍者;④伴有严重感染性疾病者;⑤血液系统疾病患者;⑥需行外科手术治疗者。

### 1.2 方法

治疗方法:所有患者入院后均给予甘露醇注射液、依达拉奉注射液、奥美拉唑注射液等治疗,常规予以心电监护、吸氧、保持呼吸道通畅。

指标检测方法:所有患者均于入院时(治疗前)、治疗 7 d 后采集静脉血 5 mL,离心处理后取血清,采用酶联免疫吸附法检测血清 GSN、CCCK-18、NSE,试剂盒购自广州易科生物科技有限公司。

### 1.3 观察指标

①比较两组一般资料,采用美国国立卫生研究院卒中量表<sup>[9]</sup> (National Institute of Health stroke scale, NIHSS) 评定神经功能缺损程度,分为轻度患者 (<7 分,32 例)、中度患者 (7~15 分,43 例)、重度患者 (>15 分,33 例)。②不同出血量、神经功能缺损程度患者入院时血清 GSN、CCCK-18、NSE 水平。③两组入院时、治疗 7 d 后血清 GSN、CCCK-18、NSE 水平。

### 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  $\chi^2$  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,多组间比较采用单因素方差分析;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,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 两组一般资料

两组年龄、发病至入院时间、出血量、神经功能缺损程度、合并糖尿病、房颤史比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表 1。

### 2.2 不同病情患者入院时血清 GSN、CCCK-18、NSE 水平

血清 CCCK-18、NSE 水平随出血量增加、神经功能缺损程度增加呈逐渐升高趋势,GSN 水平随出血量增加、神经功能缺损程度增加呈逐渐降低趋势( $P < 0.05$ )。见表 2。

### 2.3 入院时血清 GSN、CCCK-18、NSE 水平与出血量、神经功能缺损程度相关性

入院时血清 CCCK-18、NSE 水平与出血量( $r = 0.766, 0.711$ )、神经功能缺损程度( $r = 0.767, 0.704$ )呈正相关,血清 GSN 与出血量、神经功能缺损程度( $r = -0.846, -0.872$ )呈负相关( $P < 0.05$ )。见图 1。

### 2.4 两组入院时、治疗 7 d 后血清 GSN、CCCK-18、NSE 水平

恢复不良组入院时、治疗 7 d 后血清 CCCK-18、NSE 水平高于恢复良好组,GSN 水平低于恢复良好组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );恢复良好组治疗 7 d 后血清 CCCK-18、NSE 水平低于入院时,GSN 水平高于入院时( $P < 0.05$ )。见表 3。

### 2.5 HCH 患者神经功能恢复的影响因素

Logistic 回归分析,年龄、发病至入院时间、合并糖尿病、房颤史、入院时、治疗 7 d 后血清 GSN、

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

Table 1 Comparison of general data between the 2 groups

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

资料	恢复不良组 ( $n=23$ )	恢复良好组 ( $n=85$ )	$t/\chi^2$ 值	$P$ 值
年龄(岁)	61.74±6.17	52.43±5.02	7.503	<0.001
性别			0.040	0.843
男	13(56.52)	50(58.82)		
女	10(43.48)	35(41.18)		
BMI(kg/m <sup>2</sup> )	24.86±1.93	24.29±2.06	1.193	0.236
发病至入院时间(h)	3.18±0.24	2.31±0.20	17.716	<0.001
出血部位			0.493	0.920
基底核区	11(47.83)	34(40.00)		
小脑	3(13.04)	13(15.29)		
额顶或颞叶	6(26.09)	24(28.24)		
脑干	3(13.04)	14(16.47)		
出血量(mL)			3.468	0.001
<15	3(13.04)	37(43.53)		
15~30	7(30.43)	33(38.82)		
>30	13(56.52)	15(17.65)		
神经功能缺损程度			3.072	0.002
轻度	2(8.70)	30(35.29)		
中度	8(34.78)	35(41.18)		
重度	13(56.52)	20(23.53)		
合并糖尿病			5.348	0.021
是	8(34.78)	10(11.76)		
否	15(65.22)	75(88.24)		
房颤史			6.269	0.012
有	8(34.78)	9(10.59)		
无	15(65.22)	76(89.41)		

CCCK-18、NSE 是 HCH 患者神经功能恢复的影响因素( $P < 0.05$ )。见表 4。

## 3 讨论

本研究发现,HCH 患者入院时的出血量越多、神经功能缺损程度越严重,其血清 CCCK-18 水平越高,进一步经相关性分析发现血清 CCCK-18 水

表 2 不同病情患者入院时血清 GSN、CCCK-18、NSE 水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Comparison of serum levels of GSN, CCCK-18 and NSE in patients with different conditions at admission ( $\bar{x} \pm s$ )

指标	出血量			F 值	P 值	神经功能缺损程度			F 值	P 值
	<15 mL	15~30 mL	>30 mL			轻度患者	中度患者	重度患者		
GSN(mg/L)	72.25±7.03	58.97±6.27	45.18±5.08	153.861	<0.001	74.10±8.26	192.08±25.14	12.43±3.06	151.627	<0.001
CCCK-18( $\mu$ /L)	196.34±28.77	241.06±32.56	296.15±37.10	77.909	<0.001	61.38±5.71	236.23±30.29	19.15±3.22	82.030	<0.001
NSE(ng/mL)	13.08±3.11	19.42±3.47	22.86±4.05	69.615	<0.001	45.54±5.19	287.39±36.37	21.77±3.79	74.613	<0.001

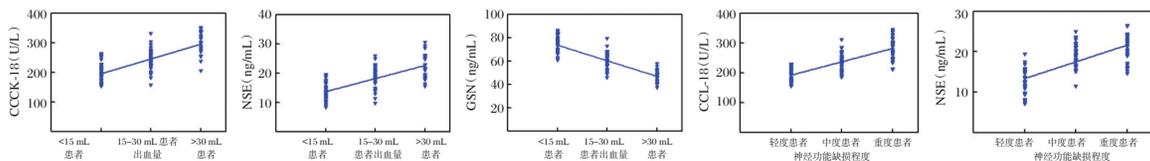


图 1 入院时血清 GSN、CCCK-18、NSE 水平与出血量、神经功能缺损程度相关性

Figure 1 Correlation between serum GSN, CCCK-18 and NSE levels and the amount of blood loss and the degree of neurological impairment at admission

表3 两组入院时、治疗7 d后血清GSN、CCCK-18、NSE水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 3 Comparison of serum GSN, CCCK-18 and NSE levels between 2 groups on admission and 7 days after treatment ( $\bar{x} \pm s$ )

时间	组别	n	GSN (mg/L)	CCCK-18 (U/L)	NSE (ng/mL)
入院时	恢复不良组	23	40.31±7.12	298.77±39.24	24.02±5.78
	恢复良好组	85	65.72±12.39	222.55±31.15	16.32±3.51
	t值		9.404	9.829	8.017
	P值		<0.001	<0.001	<0.001
治疗7 d后	恢复不良组	23	44.26±10.15	285.46±43.26	21.87±6.30
	恢复良好组	85	78.69±15.56	134.97±29.57	10.41±2.25
	t值		10.031	19.471	13.931
	P值		<0.001	<0.001	<0.001

平与出血量、神经功能缺损程度呈正相关关系,提示血清CCCK-18可能作为评估HCH患者病情的标志物。CCCK-18是CK-18通过半胱天冬酶的作用在不同位点被切割释放出的凋亡标志蛋白,HCH患者出血量越大,对神经细胞的损害越严重,神经细胞凋亡越多,血清CCCK-18水平越高。

本研究还发现,血清NSE水平同样与HCH患者入院时出血量、神经功能缺损程度呈正相关。NSE是一种二聚体酶,主要表达与神经纤维线粒体或神经元细胞膜内,正常状态下人体血清NSE水平极低,在异常病理状态的损伤下,神经纤维膜破坏,NSE无法与细胞内肌动蛋白结合而释放至

表4 HCH患者神经功能恢复的影响因素

Table 4 Factors influencing neurological function recovery in patients with HCH

变量	$\beta$ 值	S.E.	Wald $\chi^2$ 值	OR值	95%CI	P值	
年龄	1.710	0.513	11.111	5.529	3.725~8.206	<0.001	
发病至入院时间	1.874	0.567	10.925	6.515	4.102~10.347	<0.001	
合并糖尿病	1.360	0.448	9.214	3.896	2.519~6.025	<0.001	
房颤史	1.534	0.491	9.762	4.637	3.021~7.118	<0.001	
入院时	GSN	-0.744	0.217	11.742	0.475	0.278~0.813	<0.001
	CCCK-18	1.810	0.503	12.953	6.112	2.851~13.104	<0.001
	NSE	1.880	0.557	11.388	6.551	3.429~12.517	<0.001
治疗7 d后	GSN	-0.581	0.189	9.436	0.560	0.346~0.905	<0.001
	CCCK-18	2.083	0.616	11.434	8.028	4.022~16.026	<0.001
	NSE	2.064	0.574	12.930	7.877	4.376~14.180	<0.001

注:因变量赋值,恢复良好=0,恢复不良=1;自变量赋值,合并糖尿病:否=0,是=1;房颤史:无=0,有=1;年龄、发病至入院时间、入院时、治疗7 d后血清GSN、CCCK-18、NSE以所有患者平均值为界:≤平均值=1,>平均值=2。

细胞间隙,进而透过血脑屏障进入血液循环,引起血清NSE水平明显升高<sup>[10]</sup>。相关研究<sup>[11]</sup>证实血清NSE是反映脑组织实质性损伤的敏感性指标,与HCH患者病情密切相关。支持本研究结果。

此外,新近研究<sup>[12]</sup>指出急性脑出血患者血清GSN明显降低,与患者神经功能缺损、出血量及预后密切相关,早期监测可作为判断病情和评估预后的重要指标。但GSN与HCH患者病情的关系尚未明确,本研究发现HCH患者血清GSN水平随出血量增加、神经功能缺损程度增加呈逐渐降低,其表达水平与HCH病情呈负相关关系。GSN是细胞骨架蛋白的重要成分,在人体内主要起清除肌动蛋白的作用,当机体发生组织损伤时大量肌动蛋白被释放,可阻塞微循环、促进血栓形成,加重组织损伤,GSN则能迅速清除肌动蛋白从而降低其损伤作用,GSN还可与促炎因子和大量生物活性结合,以清除这些因子造成的毒性作用,降低对机体的损害<sup>[13]</sup>。笔者认为,HCH出血量越大、神经功能缺损程度越

严重,机体消耗的GSN量越多,从而导致血清GSN水平明显降低。本研究通过多因素分析发现入院时、治疗7 d后血清GSN、CCCK-18、NSE均是HCH患者神经功能恢复的影响因素,进一步证实GSN、CCCK-18、NSE参与HCH的病情进展。

综上所述,血清GSN、CCCK-18、NSE水平变化与HCH患者病情密切相关,且是影响患者神经功能恢复的影响因素。本研究为单中心研究,样本量较少,研究结果仍需通过多中心、大样本研究进一步验证。

### 参考文献

- [1] Ziai WC, Thompson CB, Mayo S, et al. Intracranial Hypertension and Cerebral Perfusion Pressure Insults in Adult Hypertensive Intraventricular Hemorrhage: Occurrence and Associations With Outcome[J]. Crit Care Med, 2019, 47(8):1125-1134.
- [2] 王丹,王新志,陈婧,等.早期免疫营养干预对高血压脑出血患者免疫功能影响[J].华南预防医学, 2019, 45(6):540-543.

# 成骨不全 XV 型 *WNT1* 基因突变影响成骨细胞分化的机制

张拔山<sup>1\*</sup> 李荣<sup>1</sup> 王文锋<sup>1</sup> 周雪明<sup>2</sup> 罗北京<sup>1</sup> 朱梓年<sup>1</sup> 张锡波<sup>1</sup> 丁爱娇<sup>1</sup>

**[摘要]** 目的 探讨成骨不全(OI)XV型患者中,*WNT1* c.110T>C/p.I37T和c.505G>T/p.G169C错义突变对 *WNT1*/β-catenin 信号通路影响成骨细胞增殖分化的机制。方法 构建野生型 *WNT1*、*WNT1* c.110T>C 突变体、*WNT1* c.505G>T 突变体、*WNT1* c.884C>A 突变体(阳性对照)和空质粒(载体,阴性对照)转染成骨前细胞(MC3T3-E1)。MTS法检测 *WNT1* 基因突变对细胞活性的影响,实时定量PCR(qPCR)和免疫印迹法(WB)分别检测 *BMP2* 和 *RANKL*(成骨细胞和破骨细胞分化标志物)的表达。采用qPCR、WB和免疫荧光(IF)检测成骨细胞中 *WNT1* 的 mRNA、蛋白表达水平与 *WNT1*/β-catenin 信号通路相关的蛋白表达水平。结果 转染24 h后,*WNT1* 野生型细胞活性显著高于空载组、c.505G>T及c.884C>A突变组,转染48 h后,c.110T>C和c.505G>T突变细胞活性较 *WNT1* 野生型细胞显著降低,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。与野生型细胞株相比,c.110T>C和c.505G>T突变株中 *BMP2* 基因的表达显著水平降低,*RANKL* 基因的表达显著升高,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。*WNT1* mRNA 在空载组,突变型组和野生型组中的表达量与空载组相比,*WNT1* 在突变型组和野生型组中表达显著上升,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。与野生型细胞株相比,突变细胞株中非磷酸化β-catenin及磷酸化GSK-3β的表达水平较野生型显著下调,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。结论 *WNT1* c.110T>C和c.505G>T突变可能通过抑制 *WNT1*/β-catenin 信号通路影响成骨细胞增殖和成骨表型,这可能与OI有关。

**[关键词]** 成骨不全;成骨细胞;*WNT1*;基因突变;β-catenin

## Osteogenesis imperfecta XV type *WNT1* gene mutation affects the mechanism of osteoblast differentiation

ZHANG Bashan<sup>1\*</sup>, LI Rong<sup>1</sup>, WANG Wenfeng<sup>1</sup>, ZHOU Xueming<sup>2</sup>, LUO Beijing<sup>1</sup>, ZHU Zinian<sup>1</sup>, ZHANG Xibo<sup>1</sup>, DING Aijiao<sup>1</sup>

(1. Clinical laboratory, Affiliated Dongguan People's Hospital, Southern Medical University, Dongguan, Guangdong, China, 523059; 2. Department of Orthopedic, Affiliated Dongguan People's Hospital, Southern Medical University, Dongguan, Guangdong, China, 523059)

**[ABSTRACT]** **Objective** To explore the effects of *WNT1* c.110T>C/p.I37T and c.505G>T/p.G169C missense mutations on the mechanism of the proliferation and differentiation of osteoblasts in the *WNT1*/β-catenin signaling pathway in XV patients with osteogenesis imperfecta (OI). **Methods** The wild-type *WNT1*, *WNT1* c.110T>C mutant, *WNT1* c.505G>T mutant, *WNT1* c.884C>A mutant (positive control), and empty vector (negative control) plasmids were constructed and transfected into preosteoblast (MC3T3-E1) cells. MTS assay was used to assess the effect of *WNT1* mutation on cell activity, and the expressions of *BMP2* and *RANKL* (osteoblast and osteoclast differentiation markers) were detected using quantitative real-time PCR (RT-qPCR) and western blotting (WB). Finally, qPCR, WB, and immunofluorescence (IF) assays were

基金项目:东莞市社会科技发展资助项目(2018507150011653)

作者单位:1. 南方医科大学附属东莞人民医院检验科,广东,东莞 523059

2. 南方医科大学附属东莞人民医院骨科,广东,东莞 523059

\*通信作者:张拔山, E-mail: zbsdgy@163.com

used to detect mRNA, protein expression levels of WNT1, and proteins expression levels related to the WNT1/ $\beta$ -catenin signaling pathway in osteoblasts. **Results** Activity of Wnt1 wild-type cells was significantly higher than that of the empty vector group, c.505G>T and c.884C>a mutation groups at 24h after transfection ( $P<0.05$ ). The activity of c.110T>C and c.505G>T mutation cells were significantly lower than that of Wnt1 wild-type cells at 48h after transfection ( $P<0.05$ ). Compared with wild-type cell lines, the expression of BMP2 gene in c.110T>C and c.505G>T mutant strains significantly decreased, and the expression of RANKL gene significantly increased ( $P<0.05$ ). The expression levels of Wnt1 mRNA in the empty vector group, mutant and wild type groups were, respectively. Compared with the empty vector group, the expression levels of Wnt1 mRNA in the mutant group and wild type group were significantly higher ( $P<0.05$ ). Compared with the wild-type cell line, the expression levels of non-phosphorylated  $\beta$ -Catenin and phosphorylated GSK-3  $\beta$  in the mutant cell line were significantly lower than those in the wild-type cell line, the difference was statistically significant ( $P<0.05$ ). **Conclusion** WNT1 c.110T>C and c.505G>T mutations may alter osteoblast proliferation and osteogenic phenotype related to OI by inhibiting the WNT1/ $\beta$ -catenin signaling pathway.

[KEY WORDS] Osteogenesis imperfecta; Osteoblast; WNT1; Gene Mutation;  $\beta$ -catenin

成骨不全(Osteogenesis Imperfecta, OI)是一组遗传性结缔组织疾病,其特点是儿童早期脆性增加、骨量减少和骨折频繁<sup>[1]</sup>。目前认为大约90%的OI病例是由coll1a1和coll1a2的常染色体显性突变引起的。然而,大约20%~25%的中度至重度OI患者在其他基因中存在致病性突变<sup>[2]</sup>。突变如SERPINF1、P3H1、CRTAP、PPIB、BMP1、FKBP10、SP7、PLOD2、TMEM38B、PLOD2、P4HB、SPARC和SEC24等被认为与常染色体隐性OI病例密切相关<sup>[3]</sup>。此外,研究表明WNT1突变影响成骨细胞活性,导致OI患者骨量紊乱、脆性骨折和进行性骨异常<sup>[4]</sup>。WNT1是Wnt蛋白家族的一员,在调节骨量和维持骨代谢的动态平衡方面起着重要作用。体外实验表明,WNT1缺陷可导致骨形成显著减少,而WNT1过度表达可促进骨形成<sup>[5]</sup>。在OI中,研究表明WNT1的双等位基因突变导致隐性OI,而WNT1杂合子突变与显性遗传家族中的早发性骨质疏松症相关<sup>[6]</sup>。目前为止,已超过27种导致WNT1突变的疾病<sup>[7]</sup>。然而,大多数WNT1突变的生物学功能尚未阐明。典型的WNT1通路通过与细胞表面的frizzles和LRP5受体结合来启动信号级联,导致非磷酸化 $\beta$ -catenin在细胞中的积累,并作为转录因子来刺激WNT信号通路下游靶基因的转录<sup>[8]</sup>。因此,本研究构建了WNT1野生型、WNT1 c.110T>C、WNT1 c.505G>T和WNT1 c.884C>A突变质粒(阳性对照),并将其转染成骨细胞(MC3T3-E1),研究突变对MC3T3-E1细胞中WNT1/ $\beta$ -catenin通路激活的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞培养

在添加10%胎牛血清的 $\alpha$ -DMEM中培养成骨前细胞(MC3T3-E1)。细胞在37 $^{\circ}$ C的培养箱中在5%的二氧化碳和90%的湿度下生长。

### 1.2 质粒构建与转染

利用通用生物系统公司(General Biosystems, Inc.)合成野生型WNT1、突变型WNT1 c.110T>C、WNT1 c.505G>T和WNT1 c.884C>A质粒,以空质粒(载体)为阴性对照,c.884C>A为阳性对照。为研究突变对MC3T3-E1细胞的影响,在转染前将细胞以 $5\times 10^5$ 的密度接种到6孔板中并培养24小时。根据制造商的说明,使用lipofectin3000将WNT1 c.110T>c、c.505G>T和c.884C>a转染到每个孔中的细胞。

### 1.3 荧光定量PCR(qPCR)

用TRIzol试剂(美国英杰)从MC3T3-E1细胞中分离总RNA。用随机引物,用M-MLV逆转录酶将总RNA反转录成cDNA。WNT1、BMP2和RANKL使用SYBR实时PCR主混合试剂盒(日本东洋纺)进行扩增,特异引物如下:WNT1正向:5'-CGATGGGGGTATTGGAAC-3',WNT1反向:5'-CCGGATTTGGTATCAGAC-3',BMP2正向:5'-GGGACCCTGTTCTAGT-3',BMP2反向:5'-TCAATCAGATTCAGAC-3',RANKL正向:5'-AGGCTGGGCCAAGATCTCTA-3',RANKL反向:5'-GTCTGTAGGTACGCTTCCCG-3'。WNT1、BMP2和RANKL的相对表达用 $2^{-\Delta\Delta ct}$ 法计算。以GAPDH为内对照:GAPDH正向:5'-ATCAAGTGGGGTGAT-

GCTGG-3',反向:5'-CCTGCTTCACCACC TTCTT-GA-3'。此外,进行了三个独立的分析。

#### 1.4 免疫印迹法

用添加蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的 RIPA 缓冲液裂解细胞。蛋白质浓度用蛋白定量试剂盒(美国皮尔斯)定量。蛋白质(40  $\mu$ g/样品)在 10% SDS-聚丙烯酰胺梯度凝胶上分离并转移到 PVDF 膜。用 5% 牛血清白蛋白(BSA)封闭后,将原代 WNT1、non-p- $\beta$ -catenin、GSK-3 $\beta$ 、p-GSK-3 $\beta$ 、BMP2 和 RANKL 抗体和相应的 HRP 二级抗体。用化学发光试剂(美国默克密理博)观察印迹。用 Image-Pro 软件将蛋白质的相对表达标准化为 GADPH。

#### 1.5 免疫荧光法

用 WNT1 c.110T>C、c.505G>T 和 c.884C>A 载体转染细胞,转染 72 h 后,用 4% 多聚甲醛固定细胞,用 0.5% Triton-100 渗透,用 5% BSA 封闭。接下来,细胞用 WNT1、 $\beta$ -catenin、non-p- $\beta$ -catenin、GSK-3 $\beta$  和 p-GSK-3 $\beta$  一级抗体和 FITC 结合的二级抗体培养。荧光显微镜下观察阳性信号。DNA 用 4',6-二氨基-2-苯基吡啶染色 5 min。

#### 1.6 3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-5-(3-羧甲氧基苯基)-2-(4-磺苯基)-2H 四唑盐(MTS)分析

转染前,将细胞以  $1 \times 10^4$  个细胞/孔的密度接种在 96 孔板中 24 小时。用 WNT1 c.110T>C、c.505G>T 和 c.884C>A 质粒转染细胞。转染后,细胞继续在添加有 20  $\mu$ L CellTiter 96 水溶液试剂的  $\alpha$ -DMEM (100  $\mu$ L) 中培养 4 小时。在 492 nm 处使用 96 孔板阅读器(美国伯乐)测定细胞活力。

#### 1.7 统计学方法

使用 SPSS 23.0 统计软件处理数据;计量资料以 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间两比较采用 Tukey 检验;以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 WNT1 c.110T>C 和 c.505G>T 突变影响 MC3T3-E1 的增殖

MC3T3-E1 细胞转染 24 h 后,WNT1 野生型细胞活性显著高于空载组、c.505G>T 及 c.884C>A 突变组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。转染 48 h 后,野生型细胞在 490 nm 处检测到的吸光度(OD)值为 ( $0.512 \pm 0.029$ ),而 c.110T>C 和 c.505G>T 突变型细胞 OD 值分别为 ( $0.440 \pm 0.042$ )、( $0.458 \pm 0.014$ ),

各组间 OD 值比较,差异有统计学意义( $F = 4.324$ ,  $P < 0.05$ ),且 WNT1 野生型细胞活性显著高于 c.110T>C 和 c.505G>T 突变型细胞,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见图 1。

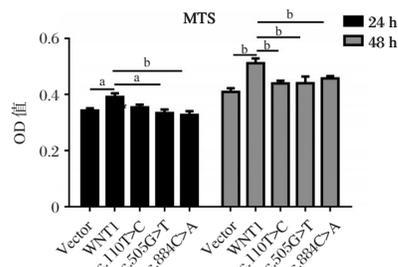


图1 WNT1 c.110T>C、c.505G>T 和 c.884C>A 质粒转染 MC3T3-E1 细胞 24、48 h 的存活率

Figure 1 Viability of MC3T3-E1 cells after transfection with Vector, WNT1 c.110T>C, c.505G>T, and c.884C>A plasmids at 24 and 48 h

### 2.2 WNT1 c.110T>C 和 c.505G>T 突变影响成骨细胞标志物的表达

BMP2 mRNA 的表达水平在 WNT1 野生型细胞,c.110G>T 突变细胞,c.505C>A 突变细胞以及 c.884C>A 突变细胞的表达量与突变细胞株比较,BMP2 在野生型细胞株中表达显著升高差异有统计学意义( $F = 376.210$ ,  $P < 0.05$ );RANKL mRNA 的表达量在 WNT1 野生型细胞,c.110G>T 突变细胞,c.505C>A 突变细胞以及 c.884C>A 突变细胞与突变细胞株比较,RANKL mRNA 在野生型细胞株中表达显著降低,差异有统计学意义( $F = 25.940$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ),见图 2A、2B。WB 结果在蛋白水平上证实,与突变细胞株相比,BMP2 mRNA 在 WNT1 野生型细胞株中显著高表达( $F = 480.532$ ,  $P < 0.05$ ),而 RANKL mRNA 在 WNT1 野生型细胞株中显著低表达,差异有统计学意义( $F = 201.510$ ,  $P < 0.05$ ),见图 2C、图 2D、图 2E。

### 2.3 WNT1 c.110T>C 和 c.505G>T 突变影响 WNT/ $\beta$ -catenin 信号通路

WNT1 mRNA 的表达水平在空载组,c.110T>C 突变型组,c.505G>T 突变型组和野生型组细胞中的表达量与空载组比较,WNT1 在野生型组与突变型组细胞中表达显著升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )(图 3A)。WB 和 IF 分析表明,WNT1 的相对灰度值(integrated density value, IDV)在野生型组细胞,c.110T>C 突变型组细胞与 c.505G>T 突变型组细胞与转染空载组细胞相比,WNT1 在野生

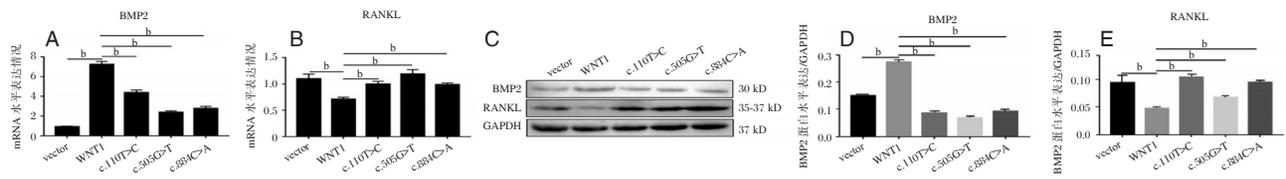


图2 WNT1 突变对 MC3T3-E1 细胞 BMP2 和 RANKL mRNA 及蛋白表达水平的影响

Figure 2 Effects of WNT1 mutation on the mRNA and protein expression levels of BMP2 and RANKL in MC3T3-E1 cells

型和突变型细胞中表达上升,差异有统计学意义 ( $P<0.05$ )。见图 3B、3C 和图 4。非磷酸化  $\beta$ -catenin(non-p- $\beta$ -catenin)的 IDV 在 WNT1 野生型细胞, c.110T>C 突变细胞株, c.505G>T 突变细胞株及 c.884C>A 突变细胞株与 WNT1 野生型细胞相比,转染突变 WNT1 基因的细胞中 non-p- $\beta$ -catenin 的表达

显著下调差异有统计学意义 ( $P<0.05$ );磷酸化 GSK-3 $\beta$ (p-GSK-3 $\beta$ )的 IDV 在 WNT1 野生型细胞, c.110T>C 突变细胞株, c.505G>T 突变细胞株及 c.884C>A 突变细胞株与 WNT1 野生型细胞相比,转染突变 WNT1 基因的细胞中 p-GSK-3 $\beta$  的表达显著下调,差异有统计学意义 ( $P<0.05$ )。见图 3D、3E 和图 4。

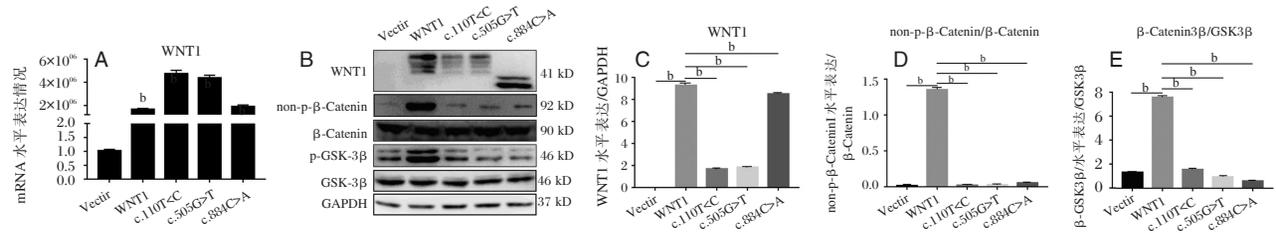
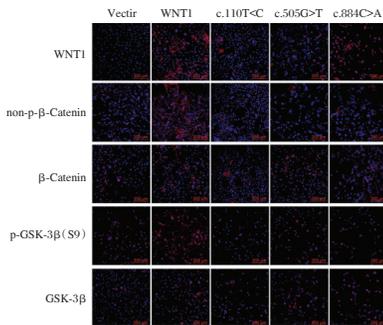


图3 转染 WNT1 野生型和突变质粒的细胞中 WNT1 的 mRNA 和蛋白表达水平及与 WNT/ $\beta$ -catenin 信号通路

Figure 3 The mRNA and protein expression levels of WNT1 and important factors related to the WNT/ $\beta$ -catenin signaling pathway in cells transfected with WNT1 wild-type and mutant plasmids



注:蓝色代表细胞核,红色代表蛋白质。

图4 WNT1 和与 WNT/ $\beta$ -catenin 信号通路相关蛋白表达水平

Figure 4 Protein expression levels of WNT1 and important proteins related to the WNT/ $\beta$ -catenin signaling pathway detected

### 3 讨论

以往研究表明,在四个独立家谱的外周血样本中发现 4 个新的 WNT1 杂合突变 (c.110T>C、c.505G>T、c.385G>A 和 c.506G>A) 与 OI 相关<sup>[4]</sup>。其中,位于外显子 2 的错义突变 (WNT1 c.110T>C) 可导致异亮氨酸转化为苏氨酸。此外,外显子 3 的错义突变 (c.505G>T) 导致半胱氨酸取代甘氨酸。目

前,这些突变的生理意义尚不清楚。本研究结果显示,突变 c.110T>C 和 c.505G>T 能够抑制 MC3T3-E1 细胞活性。同时研究揭示了 WNT1 c.110T>C 和 c.505G>T 突变对成骨细胞增殖和 WNT1/ $\beta$ -catenin 信号通路的影响。野生型 WNT1 可诱导成骨细胞分化标志物 BMP2 的表达,抑制破骨细胞分化标记物 RANKL,激活 WNT1/ $\beta$ -catenin 信号通路,但当 WNT1 c.110T>C 和 c.505G>T 突变时,这些效应明显受抑制。此外,骨质疏松症是 OI 患者的一个重要特征<sup>[9]</sup>。研究表明, BMP2 和 RANKL 分别诱导成骨细胞和破骨细胞分化<sup>[10-11]</sup>, WNT1 缺陷小鼠的成骨细胞活力降低,并与骨折表型相关<sup>[12]</sup>。本研究结果说明 WNT1 的 c.110T>C 和 c.505G>T 突变导致成骨细胞发育不良,抑制骨形成,容易增加骨质疏松和骨折的风险。

此外,研究还表明, WNT1 突变可通过使典型 WNT 途径失活而导致骨结构的变化<sup>[13]</sup>。尽管一些突变形式诱导 WNT1 信号通路的激活,但 WNT 信号通路下游目标基因的表达失调,会导致成骨细胞矿化受损<sup>[6]</sup>。WNT 与 Frizzled/LRP5/6 复合物共同激活 WNT/ $\beta$ -catenin 信号通路,介导  $\beta$ -catenin 的激活,进

而激活下游基因的表达。当存在 WNT 信号时, GSK-3 $\beta$  介导的  $\beta$ -catenin 水解被抑制,  $\beta$ -catenin 的下游靶基因可以被激活<sup>[14]</sup>。本研究结果显示, 与野生型 WNT1 组相比, c.110T>C 和 c.505G>T 突变降低了 GSK-3 $\beta$  和非  $\beta$ -catenin 水平, 提示 WNT1 的 c.110T>C 和 c.505G>T 突变可能与 WNT 激活减少和典型 WNT/ $\beta$ -catenin 信号通路的激活降低有关, 然而确切的机制还需要进一步的研究。

综上所述, WNT1 基因 c.110T>C 和 c.505G>T 突变对 WNT 信号通路的影响可能是导致 OI 的原因。WNT1 c.110T>C 和 c.505G>T 突变可作为 OI 早期筛查的候选靶点参考。

### 参考文献

- [1] 郭奕斌, 艾阳, 蒋玮莹. 一罕见成骨不全IV型的基因诊断[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2013, 5(1): 12-14.
- [2] Bardai G, Moffatt P, Glorieux F H, et al. DNA sequence analysis in 598 individuals with a clinical diagnosis of osteogenesis imperfecta: diagnostic yield and mutation spectrum [J]. Osteoporos Int, 2016, 27(12): 3607-3613.
- [3] Liu Y, Song L, Ma D, et al. Genotype-phenotype analysis of a rare type of osteogenesis imperfecta in four Chinese families with WNT1 mutations[J]. Clin Chim Acta, 2016, 461: 172-180.
- [4] Kausar M, Siddiqi S, Yaqoob M, et al. Novel mutation G324C in WNT1 mapped in a large Pakistani family with severe recessively inherited Osteogenesis Imperfecta [J]. J Biomed Sci, 2018, 25(1): 82.
- [5] Joeng KS, Lee YC, Lim J, et al. Osteocyte-specific WNT1 regulates osteoblast function during bone homeostasis [J]. J Clin Inv, 2017, 127(7): 2678-2688.
- [6] Laine C M, Joeng K S, Campeau P M, et al. WNT1 mutations in early-onset osteoporosis and osteogenesis imperfecta [J]. N Engl J Med, 2013, 368(19): 1809-1816.
- [7] Lu Y, Ren X, Wang Y, et al. Novel WNT1 mutations in children with osteogenesis imperfecta: Clinical and functional characterization [J]. Bone, 2018, 114: 144-149.
- [8] Kang H, Aryal A C S, Marini J C. Osteogenesis imperfecta: new genes reveal novel mechanisms in bone dysplasia [J]. Transl Res, 2017, 181: 27-48.
- [9] Landsmeer-Beker EA, Massa GG, Maaswinkel-Mooy PD, et al. Treatment of osteogenesis imperfecta with the bisphosphonate olpadronate [J]. Eur J Pediatr, 1997, 156(10): 792-794.
- [10] Kim KM, Jeon WJ, Kim EJ, et al. CRTC2 suppresses BMP2-induced osteoblastic differentiation via Smurf1 expression in MC3T3-E1 cells [J]. Life Sci, 2018, 214: 70-76.
- [11] Imai R, Sato T, Iwamoto Y, et al. Osteoclasts Modulate Bone Erosion in Cholesteatoma via RANKL Signaling [J]. J Assoc Res Otolaryngol, 2019, 20(5): 449-459.
- [12] Joeng KS, Lee YC, Jiang MM, et al. The swaying mouse as a model of osteogenesis imperfecta caused by WNT1 mutations [J]. Hum Mol Genet, 2014, 23(15): 4035-4042.
- [14] Baarsma HA, Koenigshoff M, Gosens, R. The WNT signaling pathway from ligand secretion to gene transcription: Molecular mechanisms and pharmacological targets [J]. Pharmacol Ther, 2013, 138(1): 66-83.

(上接第 525 页)

- [3] 尹艳霞, 尚文俊, 郭华, 等. 轴突生长抑制因子 A、核因子-kB p65 对急性高血压脑出血患者病情及预后的评估 [J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(8): 1056-1059+1068.
- [4] Lorente L, Martín MM, Pérez-Cejas A, et al. Association between serum levels of caspase-cleaved cytokeratin-18 and early mortality in patients with severe spontaneous intracerebral hemorrhage [J]. BMC Neurosci, 2018, 19(1): 23.
- [5] 李琳瑕, 王树泉, 王斌, 等. 高血压脑出血患者 TIMP-1、MMP-9、NSE、IL-18 水平变化对神经功能影响 [J]. 心脑血管病防治, 2019, 19(4): 307-310.
- [6] 杨学丽, 王新兰, 丁小强. 凝溶胶蛋白、轴突生长抑制因子 A 与急性脑出血患者病情及预后的关系 [J]. 现代医学, 2019, 47(5): 586-589.
- [7] Prasad GL, Anmol N, Menon GR. Outcome of Traumatic Brain Injury in the Elderly Population: A Tertiary Center Experience in a Developing Country [J]. World Neurosurg, 2018, 111(1): e228-e234.
- [8] 北京市中西医结合学会神经科专业委员会. 高血压性脑出血急性期中西医结合诊疗专家共识 [J]. 中国全科医学, 2016, 19(30): 3641-3648.
- [9] Chalos V, van der Ende NAM, Lingsma HF, et al. National Institutes of Health Stroke Scale: An Alternative Primary Outcome Measure for Trials of Acute Treatment for Ischemic Stroke [J]. Stroke, 2020, 51(1): 282-290.
- [10] 刘兆敏, 李丽, 向森林, 等. 高胆红素血症新生儿脑脊液 NSE 及胆红素水平变化与远期神经发育的关系 [J]. 热带医学杂志, 2019, 19(6): 747-750.
- [11] 刘君, 蒋永明, 严明生, 等. 血清 NSE、SF 及 SP 水平与高血压脑出血术后转归的关系分析 [J]. 解放军预防医学杂志, 2020, 38(3): 59-61.
- [12] 李爱华, 赵新春, 孟宪举. 急性脑出血患者血清 GSN、Nogo-A 水平变化及临床意义 [J]. 山东医药, 2020, 60(25): 10-13.
- [13] 姜克文, 李武雄, 任光辉, 等. HICH 患者 LP(a), GSN, HCY, vWF, sCD40L 水平的变化及其意义 [J]. 实验与检验医学, 2019, 37(3): 399-402.

# lncRNA H19 和 lncRNA GAS5 在急性缺血性脑卒中的表达及临床意义

李鹏飞<sup>1</sup> 王蕾<sup>2</sup> 李帆<sup>2</sup> 程迎迎<sup>1</sup> 张春兵<sup>1,2\*</sup>

**[摘要]** **目的** 本研究旨在检测长链非编码 RNA H19 和生长阻滞特异转录物 5(GAS5)在急性缺血性脑卒中(IS)患者单个核细胞(PBMC)、大鼠中动脉闭塞模型(MCAO)大鼠脑皮质组织和氧糖剥夺再灌注(OGD/R)模型 PC12 细胞的表达水平,探讨其作为 IS 分子诊断指标的可行性。**方法** 收集 23 例 IS 组患者和 33 例健康对照外周血,提取 PBMC,采用实时定量 PCR(qPCR)检测 PBMC 中 lncRNA H19 和 GAS5 的表达水平。进一步构建大鼠 MCAO 模型和 PC12 细胞 OGD/R 模型,qPCR 分别检测 lncRNA H19 和 GAS5 在大鼠脑皮质和 PC12 细胞中的表达。**结果** qPCR 结果显示,IS 组患者 PBMC 的 lncRNA H19 表达水平显著高于对照组,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。IS 组患者 PBMC 中的 lncRNA GAS5 表达水平显著高于对照组,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。和假手术组相比,MCAO 模型大鼠缺血脑皮质 lncRNA H19 和 lncRNA GAS5 表达水平显著升高,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。细胞实验结果表明,PC12 细胞在 OGD/R 后,lncRNA H19 和 lncRNA GAS5 表达水平显著升高,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。**结论** lncRNA H19 和 lncRNA GAS5 在 IS 表达升高,有望成为诊断 IS 的生物标志物。

**[关键词]** lncRNA H19; lncRNA GAS5; 氧糖剥夺再灌注

## Expression and clinical significance of lncRNA H19 and lncRNA GAS5 in acute ischemic stroke

LI Pengfei<sup>1</sup>, WANG Lei<sup>2</sup>, LI Fan<sup>2</sup>, CHENG Yingying<sup>1</sup>, ZHANG Chunbing<sup>1,2\*</sup>

(1. Department of Clinical Laboratory, Jiangsu Province Hospital of Chinese Medicine, Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, Jiangsu, China, 210029; 2. The First School of Clinical Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, Jiangsu, China, 210023)

**[ABSTRACT]** **Objective** To examine the expression levels of long non-coding RNA (lncRNA) H19 and growth arrest-specific transcript 5 (GAS5) in the peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from acute ischemic stroke (IS) patients, cortex of rats with middle cerebral artery occlusion (MCAO) model, oxygen, and glucose deprivation/reoxygenation (OGD/R)-treated PC12 cells and further evaluate their potential as biomarkers for the diagnosis of IS. **Methods** Blood from 23 acute IS patients and 33 healthy controls were collected. PBMC were isolated by Ficoll lymphocytes separation medium. Quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR) methods were used to detect the expression levels of lncRNA H19 and GAS5. Furthermore, rats were established by MCAO model and PC12 cells were subjected to OGD/R to simulate cerebral ischemia and reperfusion injury. The levels of lncRNA H19 and GAS5 were also assessed in cortex of MCAO rats and PC12 cells subjected to OGD/R using RT-qPCR. **Results** Compared with the healthy control, the expression levels of lncRNA H19 were significantly upregulated in IS patients ( $P<0.05$ ). The expression levels

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81403136);江苏省“333 工程第二层次人才”培养项目(BRA2018088);江苏省中医院高峰学术人才培养工程资助项目(y2018rc38)

作者单位:1. 江苏省中医院南京中医药大学附属医院检验科,江苏,南京 210029

2. 南京中医药大学第一临床医学院,江苏,南京 210023

\*通信作者:张春兵, E-mail: zzzcb99\_nj@163.com

of lncRNA GAS5 were also significantly upregulated in IS patients ( $P<0.05$ ). Compared with the sham control, the expression levels of lncRNA H19 and lncRNA GAS5 were significantly increased in the cortex from MCAO rats ( $P<0.05$ ). The cell experiment results showed that the levels of lncRNA H19 and lncRNA GAS5 were increased significantly in OGD/R PC12 cells ( $P<0.05$ ). The expressions of lncRNA H19 and lncRNA GAS5 in IS are elevated, and they are expected to be biomarkers for the diagnosis of IS.

[KEY WORDS] lncRNA H19; lncRNA GAS5; Oxygen glucose deprivation/reperfusion

脑卒中(stroke),中医称之为“中风”,是好发于中老年人的一种多发病、常见病与难治病。中国卒中协会2019年发布的《中国脑卒中防治报告2018》概要显示:近30年来,我国脑卒中的发病率以平均每年8.3%的速度不断上升,并有明显的年轻化趋势<sup>[1]</sup>。临床上,脑卒中分为缺血性脑卒中(ischemic stroke, IS)和出血性脑卒中(hemorrhagic stroke, HS)两大类,其中IS作为主要类型,约占87%。目前,迫切需要寻找到高敏感、高特异的IS生物标志物。长链非编码RNA(Long non-coding RNA, lncRNA)是一种功能性非编码RNA,其长度超过200个核苷酸,位于细胞核和胞浆内。已知lncRNA有调控基因转录、参与基因转录后调控和参与调控蛋白质翻译及翻译后修饰等功能<sup>[2]</sup>。尽管IS患者存在众多差异表达的lncRNAs<sup>[3-4]</sup>,但尚未有公认和明确的生物标志物。本文研究了lncRNA H19和生长阻滞特异转录物5(growth arrest-specific transcript 5, GAS5)与IS的关系,进一步通过体内外实验检测lncRNA H19和GAS5在IS患者、大脑中动脉闭塞(MCAO)模型大鼠和氧糖剥夺再灌注(OGD/R)模型PC12细胞中的表达,探讨其是否可以作为IS发病早期风险评估以及病情判断的指标。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

收集2019年4月22日至2019年5月15日在江苏省中医院确诊的急性初发缺血性脑卒中患者23例为IS组。纳入标准:诊断符合2018版中国急性缺血性脑卒中诊治指南<sup>[5]</sup>,并同时经影像学检查证实。排除标准:①短暂性脑缺血发作、出血性脑梗死等神经系统疾病者;②合并心、肺、肾、肝功能不全者;③有手术史、肿瘤病史者。同期选择江苏省中医院健康体检者33例为对照组。排除既往有脑卒中史、手术史、头部外伤史或神经系统疾病者以及有基础疾病者。本研究经南京中医药大学附属医院伦理委员会批准,所有患者知情同意。

### 1.2 标本采集

IS患者入院24h内采集外周血2mL(EDTA-K<sub>2</sub>抗凝),一部分抗凝血由XS-800I全血细胞分析仪检测白细胞数(WBC),一部分用于单个核细胞(PBMC)分离;普通促凝血2mL,分离血清。同时收集在本院体检的健康人外周血。

### 1.3 PBMC分离

将1mL EDTA抗凝血与1mL生理盐水混匀;2mL Ficoll细胞分离液(天津灏洋公司)加入到15mL离心管中;按照说明书提取PBMC;加入1mL TriZol试剂(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)涡旋混匀后-80℃保存。

### 1.4 生化指标检测

AU5800全自动生化分析仪(美国 Beckman 公司)测定血清甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、空腹血糖(GLU)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)含量。

### 1.5 大鼠及分组

选择SPF级健康雄性Sprague-Dawley(SD)大鼠(北京维通利华公司,许可证号:SCXK(京)2016-0011),体重为(270±20)g,饲养在温度为(22±2)℃和湿度为(55±5)%的房间中,12h/12h关/开光照周期。大鼠随机分为假手术组和模型组,每组5只。

### 1.6 MCAO模型

运用Zea Longa改良栓线法<sup>[6]</sup>构建大鼠MCAO模型。以Zea Longa确立的五分法对各组大鼠进行神经功能评分<sup>[6]</sup>,评分≥2分者为造模成功,并将评分为1分或5分者剔除。再灌注24h后,麻醉大鼠,取出大脑,快速分离出约100mg缺血脑皮质,置于1.5mL无酶EP管中-80℃保存待测。

### 1.7 PC12细胞培养和OGD/R模型的建立

大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞株PC12购自北京协和细胞资源中心。含100U/mL青霉素、100μg/mL链霉素和10%胎牛血清的DMEM高糖培养基培养PC12细胞,常规置于含5%CO<sub>2</sub>的37℃培养箱。PC12细胞按密度1×10<sup>4</sup>/mL接种于12孔板,正常培养基培养24h后,弃上清,更换无糖DMEM培养

基。将培养皿和氧浓度监测仪置于 MIC-101 型细胞缺氧装置(美国 Billups-rothenberg 公司),用含 95% N<sub>2</sub>和 5% CO<sub>2</sub>的混合气体通气(20 L/min,持续 10 min),将缺氧小室置于 37℃ CO<sub>2</sub>培养箱中继续培养 6 h。结束后,将 12 孔板中液体弃去,换成正常培养基,置于 CO<sub>2</sub>培养箱中常规培养 24 h 以再灌注。同时正常培养基和培养条件的细胞作为对照。

### 1.8 RNA 提取和实时荧光定量 PCR

将 PBMC、脑皮质和 PC12 细胞用 Trizol 提取总 RNA。Biophotometer plus 核酸蛋白测定仪(德国 Eppendorf 公司)检测所提取 RNA 的浓度和纯度。按照 PrimeScript™ RT reagent Kit 反转录试剂盒(大连 TaKaRa 公司)说明书,反应体系总体积 20 μL,反

转录体系为:4 μL 5×Prime Script buffer, 1 μL Prime-Script RT mix I, 1 μL Oligo dT Primer, 4 μL Random 6 mers, 1 μg 总 RNA, DEPC 水至 20 μL。反应程序为:42℃ 20 min, 99℃ 5 min, 4℃ 5 min。实时定量 PCR 检测 lncRNA H19 和 GAS5 的表达水平。25 μL 反应体系为:12.5 μL TB Green Premix Ex Taq II, 1 μL cDNA, 1 μL 上游引物, 1 μL 下游引物, 0.5 μL ROX Reference Dye II, 10 μL ddH<sub>2</sub>O。反应程序为:95℃ 预变性 10 min 后, 95℃ 30 sec, 60℃ 30 sec, 72℃ 30 sec, 循环数为 35。以 GAPDH 为内参。采用 Quantstudio Dx 荧光定量扩增仪(美国 ABI 公司)进行检测分析。目的基因表达倍数按 2<sup>-ΔΔCt</sup> 的公式计算得到。所有反应重复三次。所用引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 primers list

名称	上游引物	下游引物
人 H19	GGAGTCTGGCAGGAGTGATG	ACCAAAAGTGACCGGGATGA
人 GAS5	CCTGTGAGGTATGGTGTCTGG	CTGTGTGCCAATGGCTTGAG
大鼠 H19	GATGGAGAGGACAGAAGGACAGT	GAGAGCAGCAGAGATGTGTTAGC
大鼠 GAS5	TCTCACAGGCAGTTCTGTGG	ATCCATCCAGTCACCTCTGG
人 GAPDH	GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT	GGCTGTTGTCACTTCTCATGG
大鼠 GAPDH	GGCAAGTTCAACGGCACAG	ACGCCAGTAGACTCCACGAC

### 1.9 统计处理

采用 SPSS 21.0 软件对数据进行统计。采用 Shapiro-Wilk 法检验分析数据是否符合正态分布,符合正态分布的计量资料以( $\bar{x} \pm s$ )表示,两组比较使用 *t* 检验,方差不齐时采用 Welch's *t* 检验;非正态分布数据用中位数[M(P25~P75)]表示,两组间比较采用 Mann-Whitney U 检验;计数资料用 *n*(%)表示,用  $\chi^2$  检验。以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 两组临床资料特征比较

IS 组患者与健康对照相比,年龄、性别以及 TG 含量上比较,差异无统计学意义(*P*>0.05)。IS 组 WBC、GLU 水平显著增高,HDL-C、LDL-C 和 TC 含量均显著降低,差异有统计学意义(*P*<0.05)。见表 2。

### 2.2 lncRNA H19 和 GAS5 在各组外周血 PBMC 中的表达水平

lncRNA H19 在 IS 组外周血中的表达水平高于 lncRNA H19 在对照组的表达水平,差异有统计学意义(*P*<0.05),见图 1A。和对照组相比,IS 患者 PBMC 中 lncRNA GAS5 表达显著升高 差异有统计学意义(*P*<0.05)。见图 1B。

表 2 两组临床资料特征比较 [( $\bar{x} \pm s$ ), *n*(%)]

Table 2 Demographic and clinical characteristics of IS patients and control group [( $\bar{x} \pm s$ ), *n*(%)]

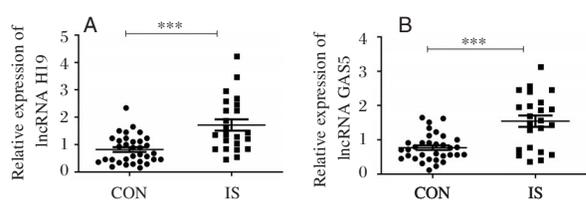
参数	对照组( <i>n</i> =33)	IS 组( <i>n</i> =23)	<i>t</i> / $\chi^2$ /Z 值	<i>P</i> 值
年龄(岁)	61.24±1.42	60.04±3.13	0.348	0.73
男性(例数)	16 (48.48)	15 (65.22)	1.536	0.22
WBC(10 <sup>9</sup> /L)	5.85±0.23	7.37±0.55	2.864	0.01
GLU(mmol/L)	4.88(4.57~5.31)	5.52(4.73~7.98)	-2.262	0.02
HDL-C(mmol/L)	1.41±0.04	1.23±0.05	2.713	0.01
LDL-C(mmol/L)	3.36±0.11	2.83±0.16	2.901	0.01
TG(mmol/L)	1.75±0.18	1.47±0.15	1.096	0.28
TC(mmol/L)	5.08±0.12	4.17±0.18	4.412	<0.05

### 2.3 MCAO 模型大鼠缺血脑组织中 lncRNA H19 和 GAS5 的表达

和假手术组相比,MCAO 模型大鼠缺血侧脑皮质中 lncRNA H19 表达水平显著增加,差异有统计学意义(*P*<0.05)。见图 2A。MCAO 大鼠缺血侧脑皮质中 GAS5 表达水平显著升高,差异有统计学意义(*P*<0.05)。见图 2B。

### 2.4 OGD/R 模型 PC12 细胞中 lncRNA H19 和 GAS5 的表达

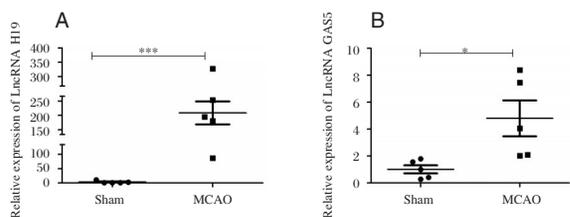
与对照组相比,OGD/R 处理的 PC12 细胞其 lncRNA H19 表达倍数显著增加,差异有统计学意义(*P*<0.05)。见图 3A。OGD/R 处理 PC12 细胞



注: IS组与对照组比较, \*\*\* $P < 0.001$

图1 两组PBMC lncRNA H19(A)和GAS5(B)的表达

Figure 1 The expression of lncRNA H19 and Gas5 in PBMC from IS patients and control group

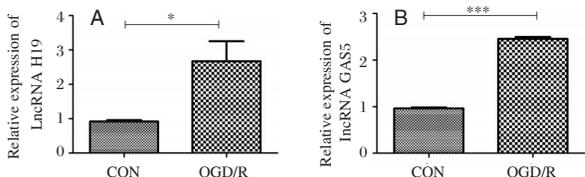


注: MCAO组和假手术组比较, \*\*\* $P < 0.001$ , \* $P < 0.05$

图2 MCAO模型大鼠缺血侧脑皮质中 lncRNA H19 (A) 和 GAS5 (B) 的表达

Figure 2 The expression of lncRNA H19 and GAS5 in cortex from MCAO rats and sham group

GAS5表达倍数显著升高, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见图3B。



注: OGD/R组与对照组比较, \*\*\* $P < 0.001$ , \* $P < 0.05$ 。

图3 OGD/R模型PC12细胞中 lncRNA H19和GAS5的表达

Figure 3 The expression of lncRNA H19 and GAS5 in OGD/R-treated PC12 cells and control group

### 3 讨论

脑卒中危害严重, 尤其见于中老年人。本团队前期研究鉴定了IS患者外周血差异表达miRNAs, 探讨了miR-106b-5p、miR-199a-5p在诊断、治疗IS患者<sup>[7-8]</sup>的意义, 但是miR-106b-5p和miR-199a-5p受到何种分子调控仍不清楚。

lncRNAs是一类转录本长度大于200 bp的RNA, 位于细胞核内或胞质中, 以RNA形式在表观遗传学上、转录及转录后等多种层面调控基因的表达。

多个临床研究和动物实验发现, IS发生后脑组织和血液中lncRNAs的表达水平发生了显著改变,

可能作为IS的潜在标志物<sup>[9]</sup>。最近的一项研究表明, lncRNA SNHG15和linc-FAM98A-3在IS患者表达升高<sup>[10]</sup>。另一项研究发现, IS患者PBMC中lncRNA MIAT表达升高, 且升高与美国国立卫生研究院卒中量表(National Institute of Health stroke scale)评分、改良RANKIN量表(mRS)评分、脑梗死体积和预后显著相关<sup>[11]</sup>。尽管有关lncRNAs作为IS诊断标志物的研究取得了巨大的进步, 但lncRNAs还未明确, 且缺乏详细的机制探讨。

lncRNA H19促进或抑制IS的作用仍存争议。多个体外实验结果提示, lncRNA H19表达升高后通过引起动脉粥样硬化<sup>[12]</sup>和激活自噬<sup>[13]</sup>促进IS的发生。然而, 最新的研究表明, lncRNA H19高表达可保护PC12细胞免遭OGD/R诱导的损伤<sup>[14]</sup>。本研究发现, lncRNA H19在IS中表达升高。有文献报道, OGD/R处理过的原代神经元细胞lncRNA GAS5表达升高, 通过失活Notch1信号通路降低神经细胞的存活<sup>[15]</sup>。降低脑部lncRNA GAS5的表达, 可减少脑梗死体积, 改善神经功能<sup>[16]</sup>。这些研究提示lncRNA GAS5高表达促进IS的发生。也有研究报道, lncRNA GAS5可增加THP-1单核细胞的凋亡, 促进动脉粥样硬化的发生<sup>[17]</sup>。本文研究发现, GAS5在IS患者PBMC中表达升高。那么, lncRNA GAS5是否参与外周免疫调节值得深入研究。

本研究存在以下缺陷。样本量少, 由于入组患者基础病和病因多样, 需要加大样本量证实lncRNA H19和GAS5的诊断价值。尤其对于不同病因和分型的IS患者, 如能明确lncRNAs, 将具有非常重要的临床价值; 缺乏IS后PBMCs中lncRNA H19和GAS5不同时间点表达特征的研究; lncRNA H19和GAS5如何调控miR-106b-5p和miR-199a-5p的表达, 促进IS的发生, 与免疫的关系如何, 都是未来研究的重点。

综上所述, lncRNA H19和GAS5联合检测有望成为IS的一个早期辅助诊断指标。lncRNA H19和GAS5在IS中的作用机制和诊断价值值得深入研究。

### 参考文献

[1] 王陇德, 刘建, 杨弋, 等. 我国脑卒中防治仍面临巨大挑战——中国脑卒中防治报告2018概要[J]. 中国循环杂志, 2019, 34(2):105-119.  
 [2] 黄佳欣, 邵婷如, 陈跃川, 等. 长链非编码RNA在口腔鳞状细胞癌中的研究进展[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2018, 10(2):120-124.

## Th17/Treg细胞及相关细胞因子水平与带状疱疹患者疼痛程度及并发后遗神经痛的相关性

宋铁军 王亚斐 徐海丰 王心妹 杨会君\*

**[摘要]** **目的** 探究带状疱疹(HZ)患者辅助性T细胞17(Th17)/调节性T细胞(Treg)及相关细胞因子与疼痛程度及并发后遗神经痛(PHN)的关系。**方法** 纳入本院皮肤科收治的168例HZ患者,其中44例合并PHN作为PHN组,其余124例患者作为HZ组,另选择同期健康志愿者80例作为对照组,流式细胞仪分析各组Th17、Treg细胞相对计数并计算Th17/Treg比率,酶联免疫吸附试验(ELISA)检测相关细胞因子及血清疼痛介质水平,Spearman检验分析各指标相关性。**结果** PHN组VAS评分及病情程度评分显著高于HZ组,差异有统计学意义( $P<0.05$ );3组WS、CS、HP及CP、SP、VGF和CGRP水平比较,PHN组>HZ组>对照组( $P<0.05$ ); $\beta$ -EP、NT比较,PHN组>HZ组>对照组,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。各组外周血Th17细胞、Th17/Treg及细胞因子IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-17、IL-23、TNF- $\alpha$ 水平比较,PHN>HZ>对照组,差异有统计学意义( $P<0.05$ );各组外周血Treg细胞、IL-10、TGF- $\beta$ 1水平比较,PHN组<HZ组<对照组,差异具统计学意义( $P<0.05$ )。h17/Treg、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-17、IL-10、IL-23、TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 1与PHN、VAS评分及神经损伤(WS、CS、HP、CP)存在相关性( $P<0.05$ )。**结论** HZ患者存在外周血Th17/Treg比率明显升高及相关细胞因子水平异常的情况,并与患者并发PHN、疼痛及病情加重和神经损伤密切相关。

**[关键词]** 带状疱疹;后遗神经痛;辅助性T细胞17;调节性T细胞;细胞因子

### Correlation of Th17/Treg cell and related cytokine levels with pain degree and sequelae neuralgia in patients with herpes zoster

SONG Tiejun, WANG Yafei, XU Haifeng, WANG Xinmei, YANG Huijun\*

(Department of Dermatology, Qinhuangdao First Hospital, Qinhuangdao, Hebei, China, 06600)

**[ABSTRACT]** **Objective** To explore the relationship between helper T cell 17 (Th17)/regulatory T cell (Treg) and related cytokines, pain degree and postoperative neuralgia (PHN) in patients with herpes zoster (HZ). **Methods** Among the 168 patients with HZ admitted to the dermatology department of our hospital, 44 patients were combined with PHN as the PHN group, the remaining 124 patients were regarded as the HZ group, and 80 healthy volunteers during the same period were selected as the control group. Flow cytometry was used to analyze the relative counts of Th17 and Treg cells in each group and the calculated Th17/Treg ratio, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to detect the levels of related cytokines and serum pain mediators, and Spearman test was used to analyze the correlation of each indicator. **Results** The VAS score and disease severity score of the PHN group were significantly higher than those of the HZ group, and the difference was statistically significant ( $P<0.05$ ). Comparison of the levels of WS, CS, HP and CP, SP, VGF and CGRP in the three groups, PHN group>HZ group>control group ( $P<0.05$ ). Comparison of  $\beta$ -EP and NT, PHN group>HZ group>control group, the difference was statistically significant ( $P<0.05$ ). Comparison of the levels of peripheral blood Th17 cells, Th17/Treg and cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17, IL-23, TNF- $\alpha$  in each group, PHN>HZ>control group, the difference was statistically significant ( $P<0.05$ ). The levels of Treg cells, IL-10 and TGF- $\beta$ 1 in peripheral blood of each group were compared, PHN group <HZ group <control

基金项目:秦皇岛市科技局项目(201902A190)

作者单位:秦皇岛市第一医院皮肤科,河北,秦皇岛066000

\*通信作者:杨会君, E-mail: yichui20088qn@163.com

group, the difference was statistically significant ( $P<0.05$ ). Th17/Treg, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17, IL-10, IL-23, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1 are related to PHN, VAS score and nerve damage (WS, CS, HP, CP) ( $P<0.05$ ). **Conclusion** HZ patients have significantly higher peripheral blood Th17/Treg ratios and abnormal levels of related cytokines, which are closely related to patients with PHN, pain, aggravation, and nerve damage.

[KEY WORDS] Herpes zoster; Postoperative neuralgia; Helper T cell 17; Regulatory T cell; Cytokine

带状疱疹(Herpes zoster, HZ)为带状疱疹病毒引起的感染性皮肤病,可长期潜伏于人体脊髓神经后根神经节的神经细胞中,若病毒激活可导致患者皮肤和外周神经侵犯并引发炎症反应。带状疱疹后神经痛(postherpetic neuralgia, PHN)为HZ引起的难治性神经病理疼痛综合征,其在HZ中发生率较高,疼痛持续时间长,严重影响了患者的生活质量<sup>[1-2]</sup>。近年来研究显示<sup>[3-4]</sup>,T细胞介导的免疫反应在水痘-带状疱疹病毒的潜伏、发病、复发过程中存在重要作用。辅助性T细胞17(Th17)、调节性T细胞(Treg)及其相关细胞因子在免疫性疾病、感染性疾病、肿瘤等多种疾病中具有重要作用,二者在免疫系统功能调节、细胞分化等过程中相互联系、相互制约<sup>[5]</sup>。另有研究显示<sup>[6]</sup>,PHN患者多容易出现细胞因子紊乱,且异常表达的细胞因子可加剧疼痛并造成神经系统损伤。因此,本研究对HZ患者外周血Th17/Treg细胞及相关细胞因子水平与疼痛程度及并发PHN的关系进行了探究,以期对PHN的发病机制、临床诊疗提供参考。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

纳入本院皮肤科2018年11月至2020年11月收治的168例带状疱疹患者,其中合并PHN的44例患者作为PHN组,男性25例,女性19例,平均年龄( $46.2\pm 3.4$ )岁,病程平均( $3.7\pm 0.7$ )d;未合并PHN的124例HZ患者作为HZ组,男性72例,女性52例,平均年龄( $45.8\pm 3.3$ )岁,病程,平均( $3.7\pm 0.5$ )d;另选择同期于本院门诊健康体检的志愿者80例作为对照组,均自愿参与本研究。三组性别、年龄比较差异无统计学意义( $P>0.05$ ),具有可比性。本研究获得本院医学伦理委员会批准通过。

纳入标准:①患者临床症状和体征符合HZ及PHN的诊断标准<sup>[7]</sup>;②患者及(或)家属对本研究知情同意并签署知情同意书;③发病时间7d内;④能够配合完成研究。排除标准:①合并其他自身免疫性疾病者;②合并严重肝、肾、心等脏

器及系统病变者;③合并严重感染、恶性肿瘤患者;④近期应用免疫球蛋白、激素、免疫抑制剂者

### 1.2 方法

1.2.1 视觉模拟评分(visual analogue scale, VAS)、病情程度评分评估<sup>[8]</sup>

通过VAS评分评估所有患者疼痛程度<sup>[8]</sup>,以0~10分表示,0分为无痛,1~3分轻微疼痛,4~6分为疼痛明显但患者尚能忍受,7~10分为强烈疼痛且难以忍受。根据水泡数目、水泡簇数、瘙痒疼痛、红斑面积、烧灼感及水泡变化共计6个因子评估病情严重程度,分数越高,疼痛越严重;其中,<6分,轻度;6~12分,中度;>12分,重度。

### 1.2.2 感觉定量测定

依照Limits法<sup>[9]</sup>,以此测定热觉(warm sensation, WS)、冷觉(cold sensation, CS)、热痛觉(heat pain, HP)及冷痛觉(cold pain, CP)。

### 1.2.3 血清疼痛介质水平测定

所有研究对象均于入院当日清晨抽取3 mL空腹静脉血,3 000 r/min离心15 min分离血清,-20℃保存待测。采用酶联免疫吸附实验(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)测定血清 $\beta$ -内啡肽( $\beta$ -endorphin,  $\beta$ -EP)、血浆P物质(substance P, SP)、神经降压素(neurotensin, NT)、神经生长因子诱导蛋白(Nerve Growth Factor Inducible, VGF)、降钙素基因相关肽(Calcitonin gene-related peptide, CGRP)水平,试剂盒购自上海连迈生物工程有限公司。严格依照试剂盒说明书执行各项操作。

### 1.2.4 Th17/Treg细胞流式细胞术测定

Treg细胞检测:所有研究对象均于入院当日清晨抽取3 mL空腹静脉血,分离单核细胞,磷酸缓冲液重悬单核淋巴细胞,依照Epics XL-MCL流式细胞仪(美国Beckman Coulter公司)及相关说明书进行上机操作,试剂盒由仪器公司配套提供。

Th17细胞检测:磷酸缓冲液重悬单核淋巴细胞,调整浓度约为 $1\times 10^6$ 个/mL,依次加入固定液、破膜剂和抗体混合液,避光孵育、离心,磷酸缓冲

液冲洗。重悬,上机检测,荧光数据以获得荧光强度>3 000个体细胞阳性,并以每个细胞的平均荧光强度表示。

### 1.2.5 Th17/Treg 相关细胞因子水平测定

采用ELISA法检测白细胞介素1 $\beta$ (Interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、IL-6、IL-10、IL-17、IL-23、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (Tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )及转化生长因子- $\beta$ 1(Transforming growth factor- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 1)水平,试剂盒购自奥地利Bender Medsystems公司。

### 1.3 统计学分析

采用SPSS 20.0统计学软件进行数据分析,计量资料以( $\bar{x} \pm s$ )表示,两两比较采用 $t$ 检验,组内比较采用LSD- $t$ 检验,多组间比较采用单因素方差分析;通过Spearman相关系数分析两变量之间的相关性。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组VAS评分、病情程度评分及感觉定量测定结果比较

PHN组VAS评分及病情程度评分显著高于HZ组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );三组患者WS、CS、HP及CP、SP、VGF和CGRP水平比较,PHN组>HZ组>对照组, $\beta$ -EP、NT比较:PHN组>HZ组>对照组,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表1。

### 2.2 各组Th17/Treg细胞及相关细胞因子水平比较

各组外周血Th17细胞、Th17/Treg及细胞因子IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-17、IL-23、TNF- $\alpha$ 水平比较,PHN>HZ>对照组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );各组外周血Treg细胞、IL-10、TGF- $\beta$ 1水平比较,PHN组<HZ组<对照组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表2。

### 2.3 Th17/Treg细胞及相关细胞因子与PHN、VAS评分及神经损伤的相关性分析

Spearman相关性分析,Th17/Treg、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-17、IL-23、TNF- $\alpha$ 与PHN、VAS评分及神经损伤

表1 各组VAS评分、病情程度评分及感觉定量测定结果比较( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Comparison of VAS scores, disease severity scores and sensory quantitative measurement results in each group ( $\bar{x} \pm s$ )

指标	对照组 (n=80)	HZ组 (n=124)	PHN组 (n=44)	F/t值	P值
VAS评分(分)	-	5.3 $\pm$ 1.8	8.1 $\pm$ 2.1	8.477	0.000
病情程度评分(分)	-	4.4 $\pm$ 1.3	9.2 $\pm$ 1.5	20.193	0.000
WS	1.3 $\pm$ 0.3	4.7 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	5.2 $\pm$ 0.2 <sup>ab</sup>	96.747	0.000
CS	1.6 $\pm$ 0.3	5.9 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	6.3 $\pm$ 0.2 <sup>ab</sup>	116.593	0.000
HP	1.4 $\pm$ 0.1	2.0 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	2.3 $\pm$ 0.1 <sup>ab</sup>	56.921	0.000
CP	1.8 $\pm$ 0.1	3.3 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	3.5 $\pm$ 0.1 <sup>ab</sup>	107.517	0.000
$\beta$ -EP(pg/mL)	17.7 $\pm$ 1.6	8.4 $\pm$ 0.8 <sup>a</sup>	5.9 $\pm$ 0.6 <sup>ab</sup>	61.764	0.000
SP(pg/mL)	2.3 $\pm$ 0.2	4.2 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>	6.6 $\pm$ 0.7 <sup>ab</sup>	52.829	0.000
NT(pg/mL)	10.6 $\pm$ 1.1	5.7 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup>	3.3 $\pm$ 0.4 <sup>ab</sup>	55.784	0.000
VGF(pg/mL)	4.2 $\pm$ 0.5	7.9 $\pm$ 0.8 <sup>a</sup>	13.7 $\pm$ 1.5 <sup>ab</sup>	53.740	0.000
CGRP(pg/mL)	3.1 $\pm$ 0.4	4.6 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>	7.9 $\pm$ 0.8 <sup>ab</sup>	48.000	0.000

注:与对照组相比,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与HZ组相比,<sup>b</sup> $P < 0.05$ 。

表2 各组Th17/Treg细胞及相关细胞因子水平比较( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Comparison of Th17/Treg cells and related cytokine levels in each group ( $\bar{x} \pm s$ )

指标	对照组 (n=80)	HZ组 (n=124)	PHN组 (n=44)	F值	P值
Th17(%)	0.8 $\pm$ 0.2	2.0 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>	2.4 $\pm$ 0.7 <sup>ab</sup>	19.657	0.000
Treg(%)	2.5 $\pm$ 0.4	1.8 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	1.4 $\pm$ 0.3 <sup>ab</sup>	19.677	0.000
Th17/Treg	0.3 $\pm$ 0.1	1.1 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	1.5 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	33.941	0.000
IL-1 $\beta$ (pg/mL)	5.6 $\pm$ 1.2	57.1 $\pm$ 7.4 <sup>a</sup>	90.8 $\pm$ 10.6	27.585	0.000
IL-6(pg/mL)	3.6 $\pm$ 0.7	21.3 $\pm$ 2.3 <sup>a</sup>	38.5 $\pm$ 3.5 <sup>ab</sup>	87.455	0.000
IL-10(pg/mL)	0.30 $\pm$ 0.11	0.20 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	0.15 $\pm$ 0.06 <sup>ab</sup>	10.707	0.000
IL-17(pg/mL)	8.6 $\pm$ 1.0	30.2 $\pm$ 3.6 <sup>a</sup>	42.0 $\pm$ 3.8 <sup>ab</sup>	76.027	0.000
IL-23(pg/mL)	0.03 $\pm$ 0.01	0.14 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	0.25 $\pm$ 0.03 <sup>ab</sup>	62.225	0.000
TGF- $\beta$ 1 (pg/mL)	0.55 $\pm$ 0.09	0.41 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	0.33 $\pm$ 0.04 <sup>ab</sup>	19.979	0.000
TNF- $\alpha$ (ng/mL)	90.2 $\pm$ 10.1	165.9 $\pm$ 16.2 <sup>a</sup>	199.5 $\pm$ 20.7 <sup>ab</sup>	42.445	0.000

注:与对照组相比,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与HZ组相比,<sup>b</sup> $P < 0.05$ 。

(WS、CS、HP、CP)、SP、VGF和CGRP存在正相关性,与 $\beta$ -EP、NT存在负相关性( $P < 0.05$ );IL-10、TGF- $\beta$ 1与PHN、VAS评分及神经损伤(WS、CS、HP、CP)存在负相关性,与 $\beta$ -EP、NT存在正相关性( $P < 0.05$ )。见表3。

表3 Spearman相关性分析结果

Table 3 Spearman correlation analysis results

项目	PHN	VAS	WS	CS	HP	CP	$\beta$ -EP	SP	VGF	CGRP	NT
Th17/Treg	0.405	0.416	0.488	0.396	0.412	0.387	-0.390	0.378	0.504	0.407	-0.463
IL-1 $\beta$	0.482	0.308	0.394	0.480	0.343	0.405	-0.408	0.395	0.481	0.473	-0.492
IL-6	0.366	0.457	0.404	0.458	0.409	0.393	-0.432	0.458	0.304	0.459	-0.387
IL-10	-0.504	-0.432	-0.448	-0.476	-0.481	-0.492	0.373	-0.483	-0.375	-0.501	0.396
IL-17	0.390	0.377	0.385	0.451	0.307	0.438	-0.407	0.461	0.428	0.386	-0.471
IL-23	0.408	0.405	0.320	0.382	0.416	0.366	-0.476	0.470	0.502	0.362	-0.484
TGF- $\beta$ 1	-0.351	-0.472	-0.383	-0.472	-0.328	-0.407	0.388	-0.345	-0.330	-0.435	0.452
TNF- $\alpha$	0.425	0.493	0.426	0.495	0.340	0.481	-0.485	0.408	0.421	0.306	-0.495

注: $P$ 均 $< 0.05$ 。

### 3 讨论

近年来研究提示<sup>[10]</sup>, PHN患者存在 $\beta$ -EP、SP、NT、VGF和CGRP等多种疼痛介质的异常变化。 $\beta$ -EP与NT为镇痛相关神经递质,可提高疼痛阈值,减轻疼痛感觉;CGRP可抑制P物质分解,增加炎性介质水平,增加微循环通透性,从而加重机体疼痛;SP和VGF为介导神经病理性疼痛的神经调节肽,可提高神经元兴奋,增加患者疼痛感<sup>[11-13]</sup>。本研究中,PHN患者较未发生PHN的HZ患者及健康志愿者出现明显变化,提示HZ患者疼痛介质水平异常与PHN发生相关。PHN患者存在明显的周围神经纤维数量减少,并且其减少程度与温度觉缺失程度存在密切相关性。本研究中,在PHN患者皮疹区域存在明显的冷、热觉及冷、热痛觉阈值较正常人群升高的情况,提示发生PHN的患者相对于其他HZ患者存在更加严重的感觉缺失(神经功能缺损)。

Th17和Treg细胞均为CD4<sup>+</sup>T细胞的重要亚群,二者各自分化、相互平衡,其水平失衡在多种疾病的发生发展中存在重要作用。Th17为机体炎性细胞,可分泌IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-17、IL-23等炎性因子参与疾病的发生发展;Treg细胞则可通过分泌IL-10、TGF- $\beta$ 1等抑制性因子负性调节机体免疫应答,发挥保护机体自身耐受的作用。研究认为<sup>[14]</sup>,Th17和Treg细胞在感染性疾病中存在双面效应。本研究探究患者急性期Th17、Treg细胞及其相关细胞因子水平,以分析HZ患者并发PHN过程中两种CD4<sup>+</sup>T细胞及相关细胞因子的变化和失衡情况。本研究结果显示,与HZ患者及健康志愿者均存在明显差异。因此,在HZ患者尤其是发生PNH的患者中存在Th17细胞数量增加,并导致炎性因子过量释放,导致机体免疫防御机制被破坏,引发神经损伤,加重局部疼痛反应。徐清榜等<sup>[15]</sup>研究认为,Th17细胞与HZ病程相关,在HZ及PHN发病及发展中起着重要作用,这与本研究结果相类似。通过相关性分析结果显示,外周血Th17/Treg及其相关细胞因子与PHN、疼痛程度、感觉缺失程度、疼痛介质水平均存在明显相关性,进一步证实Th17/Treg比率失衡及其相关细胞因子水平异常可能是PHN发生及病情迁延不愈的关键因素。

本研究存在一定的局限性,全身细胞免疫状态受基础疾病和多种因素的影响,而机体感染和损伤的免疫反应是一个动态变化过程,随着疾病发生机体可能

存在不同的细胞免疫状态,因而存在个体差异较大的情况,而细胞因子的来源也存在一定的多元性。本研究积极排除细胞免疫状态可能受明显影响的情况,以为临床研究PHN的免疫机制提供有效依据。综上所述,HZ患者存在外周血Th17/Treg比率明显升高及相关细胞因子水平异常的情况,并与患者并发PHN、疼痛及病情加重和神经损伤密切相关。

### 参考文献

- [1] Wang XX, Zhang Y, Fan BF. Predicting Postherpetic Neuralgia in Patients with Herpes Zoster by Machine Learning: A Retrospective Study[J]. Pain Ther, 2020,9(2):627-635.
- [2] 郭玉娜,倪家骧,武百山,等.带状疱疹急性期患者后遗神经痛的相关因素分析[J].贵州医科大学学报,2019,44(3):346-349.
- [3] 赵阳,沈伟钦,黄晓雯,等. Th17, Treg细胞及其相关细胞因子在带状疱疹患者治疗前后外周血中的检测[J]. 中国皮肤性病杂志,2016,30(5):460-463.
- [4] 陈琳,卓锦钊,姚东文. 香丹止痛方联合西药治疗肝郁气滞血瘀PHN患者的疗效观察及对Th17/Treg细胞平衡的影响[J]. 中国中西医结合杂志,2019,39(10):1199-1203.
- [5] 鲁冰,任东升,栗明. 左卡尼汀联合血液透析对尿毒症患者Treg/Th17细胞、血清炎症因子和肾功能指标的影响[J]. 分子诊断与治疗杂志,2019,11(2):117-121.
- [6] Cohem E. Herpes Zoster and Postherpetic Neuralgia[J]. Clin Infer Dis, 2020:cia1192.
- [7] Bader MS. Herpes zoster: diagnostic, therapeutic, and preventive approaches[J]. Postgrad Med, 2013,125(5):78-91.
- [8] Dayan RR, Peleg R. Herpes zoster-typical and atypical presentations[J]. Postgrad Med, 2017, 129(6):567-571.
- [9] 毛思中,董为伟. 正常人的温度觉、振动觉定量检查[J]. 中华神经志,1999,32(4):256-257.
- [10] Rokni GR, Rathod D, Tabarestani M, et al. Postherpetic neuralgia and recalcitrant cystic lesions following herpes zoster: A case report and review of treatment options[J]. Dermatol Ther, 2020,33(4):e13793.
- [11] 吴为民,王秀玲,姜彬彬. 丁香膏+通络益气中药联合椎管内阻滞治疗顽固性带状疱疹后遗神经痛疗效及对T淋巴细胞亚群、 $\beta$ -内啡肽的影响[J]. 现代中西医结合杂志,2017,26(30):3348-3350.
- [12] 刘先岭,王静静,智明明,等. 泛昔洛韦对带状疱疹患者血清Th细胞因子、P物质水平的影响[J]. 山东医药,2016,56(42):88-90.
- [13] 周艳. 带状疱疹后神经痛患者血清CGRP水平与疼痛、抑郁的关系[J]. 山东医药,2016,56(46):88-90.
- [14] Kim MS, Kim DJ, Na CH, et al. A Study of the Changes of T Helper 17 Cells and Regulatory T Cells in Herpes Zoster. [J]. ANN dermatol, 2017,29(5):578-585.
- [15] 徐清榜,姚尚龙,郑小岚,等. 带状疱疹相关性疼痛患者外周血中Th17细胞及转录因子的变化[J]. 基础医学与临床,2017,37(1):111-113.

## 肥胖患者外周血 miR-155 表达与非酒精性脂肪肝病发病的关系

万红 燕树勋\* 闫诏 张胜威 王娴

**[摘要]** **目的** 研究肥胖患者外周血 miR-155 表达与非酒精性脂肪肝病(NAFLD)发病的关系。**方法** 选择2017年10月至2019年5月期间本院收治的94例单纯性肥胖患者作为肥胖组,另取50例超重患者及50例健康者作为超重组及对照组,检测外周血中 miR-155、细胞因子信号转导抑制物1(SOCS1)、核因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)的表达水平,评估肥胖组患者是否发生NAFLD。**结果** 3组外周血中 miR-155、NF- $\kappa$ B 的表达水平比较:肥胖组>超重组>对照组,差异有统计学意义( $P<0.05$ );SOCS1 表达水平比较:肥胖组<超重组<对照组,差异有统计学意义( $P<0.05$ );肥胖组患者外周血中 miR-155 与 SOCS1 具有负相关关系( $r=-0.384$ ,  $P<0.05$ ),与 NF- $\kappa$ B 具有正相关关系( $r=0.427$ ,  $P<0.05$ );肥胖组中 NAFLD 患者外周血中 miR-155、NF- $\kappa$ B 的表达水平显著高于非 NAFLD 患者,SOCS1 的表达水平显著低于 NAFLD 患者,差异有统计学意义( $P<0.05$ );肥胖组中“miR-155 表达水平 $\geq$ 中位数患者”的 ALT、AST、TC、TG、LDL-C、HDL-C、hs-CRP、F-INS、HOMA-IR 水平均高于“miR-155 表达水平<中位数患者”,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。**结论** 肥胖患者外周血中 miR-155 表达增加与 NAFLD 发病有关,调控 SOCS1 及 NF- $\kappa$ B 是 miR-155 参与 NAFLD 发病的可能机制。

**[关键词]** 肥胖;非酒精性脂肪肝病;miR-155;细胞因子信号转导抑制物1;核因子- $\kappa$ B

### Relationship between the expression of miR-155 in peripheral blood and the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease in obese patients

WAN Hong, YAN Shuxun\*, YAN Zhao, ZHANG Shengwei, WANG Xian

(Second Ward, Department of Endocrinology, First Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou, Henan, China, 450000)

**[ABSTRACT]** **Objective** To investigate the relationship between the expression of miR-155 in peripheral blood and the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) in obese patients. **Methods** From October 2017 to May 2019, 94 cases of simple obesity patients in our hospital were selected as the obesity group, 50 cases of overweight patients and 50 cases of healthy people were selected as the overweight group and the control group. The expression levels of miR-155, SOCS1 and NF- $\kappa$ B in peripheral blood were detected, whether NAFLD occurred in obese patients was evaluated. **Result** Comparison of the expression levels of miR-155 and NF- $\kappa$ B in the peripheral blood of the three groups: obesity group >overweight>control group, the difference was statistically significant ( $P<0.05$ ). Comparison of SOCS1 expression level: obesity group <overweight <control group, the difference was statistically significant ( $P<0.05$ ). The peripheral blood miR-155 in the obese group had a negative correlation with SOCS1 ( $r=-0.384$ ,  $P<0.05$ ), and a positive correlation with NF- $\kappa$ B ( $r=0.427$ ,  $P<0.05$ ). In the obesity group, the expression levels of miR-155 and NF- $\kappa$ B in the peripheral blood of NAFLD patients were significantly higher than those of non-NAFLD patients, and the expression levels of SOCS1 were significantly lower than those of NAFLD patients, and the difference was statistical-

基金项目:河南省中医药科学研究专题课题项目(20-21ZY3007)

作者单位:河南中医药大学第一附属医院内分泌科二病区,河南,郑州 450000

\*通信作者:燕树勋, E-mail: qiai196510@163.com

ly significant ( $P<0.05$ ). In the obese group, the levels of ALT, AST, TC, TG, LDL-C, HDL-C, hs-CRP, F-INS, and HOMA-IR of "miR-155 expression level  $\geq$  median patients" were higher than those of "miR-155 patients with expression level  $<$ median", the difference was statistically significant ( $P<0.05$ ).

**Conclusion** The increased expression of miR-155 in the peripheral blood of obese patients is related to the pathogenesis of NAFLD, and regulation of SOCS1 and NF- $\kappa$ B is a possible mechanism for miR-155 to participate in the pathogenesis of NAFLD.

**[KEY WORDS]** Obesity; Nonalcoholic fatty liver disease; miR-155; Cytokine signal transduction inhibitor 1; Nuclear factor kappa B

随着我国经济发展及国民生活水平提高,肥胖的发病率呈逐年升高趋势。肥胖会增加糖尿病、高血压病、脂代谢紊乱、非酒精性脂肪肝病(Nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)等疾病的发病率,对患者的健康造成危害<sup>[1-2]</sup>。目前的研究认为,NAFLD与肥胖具有高度共病率,胰岛素抵抗是两者共同的病理生理特征<sup>[3-4]</sup>,但造成肥胖患者发生NAFLD的机制尚未完全阐明。微小RNA(microRNA, miR)是一族具有广泛生物学功能的非编码RNA,对胰岛素敏感性、脂代谢、炎症反应等均具有调控作用。一项NAFLD相关的动物实验发现miR-155在NAFLD的发病过程中参与炎症反应的激活及胰岛素抵抗的加剧<sup>[5]</sup>;另有一项肥胖相关的临床研究发现肥胖患者外周血中miR-155的表达增加<sup>[6]</sup>。但miR-155在肥胖患者发生NAFLD中的作用尚不明确。因此,本研究将以肥胖患者为对象,分析外周血中miR-155表达水平与NAFLD发病的关系。

## 1 对象与方法

### 1.1 对象

选择2017年10月至2020年6月期间本院收治的单纯性肥胖患者共94例作为肥胖组,包括男性52例、靶向42例,平均年龄( $29.39\pm 6.92$ )岁;超重组共50例,包括男性28例、女性22例,平均年龄( $31.91\pm 8.28$ )岁,纳入标准:①年龄 $\geq 18$ 岁;②符合《中国成人肥胖症防治专家共识》<sup>[7]</sup>中单纯性肥胖的诊断;③完成肝脏瞬时弹性扫描仪(Fibroscan)检查;④留取外周静脉血标本;排除标准:①合并病毒性肝炎、酒精性肝病、药物性肝损伤;②合并恶性肿瘤、自身免疫性疾病;③接受降脂、降压、降糖治疗的患者。另取同期在本院体检的健康者共50例,包括男性30例、女性20例,平均年龄( $30.39\pm 9.14$ )岁作为对照组。3组一般资料

的比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。所有患者及家属均知情同意。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 外周血 miR-155、SOCS1、NF- $\kappa$ B 表达水平的检测

取3组外周静脉血,EDTA抗凝后采用全血RNA提取试剂盒(赛默飞世尔公司)提取RNA。采用一步加A法miR反转录试剂盒(哈尔滨海基生物科技公司)将进行反转录,得到cDNA后采用荧光定量PCR检测,分别扩增miR-155及U6,以U6为内参、计算miR-155的表达水平;采用RT-PCR反转录试剂盒(哈尔滨海基生物科技公司)将进行反转录,得到cDNA后采用荧光定量PCR检测,分别扩增SOCS1、NF- $\kappa$ B及 $\beta$ -actin,以 $\beta$ -actin为内参、计算SOCS1及NF- $\kappa$ B的表达水平。

#### 1.2.2 NAFLD 的评估及诊断

参照《脂肪性肝病诊疗规范化的专家建议(2019修订版)》<sup>[8]</sup>中NAFLD的诊断标准,结合实验室检查、Fibroscan检查对NAFLD进行评估和诊断。

### 1.3 生化指标的检测

采用全自动生化分析仪检测丙氨酸氨基转移酶(ALT)、门冬氨酸氨基转移酶(AST)、总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、超敏C反应蛋白(hs-CRP)、空腹胰岛素(F-INS)、空腹血糖(FBG),按照公式 $F-INS \times FBG / 22.5$ 计算胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)。

### 1.4 统计学方法

采用SPSS 22.0软件进行统计学处理,计量资料以( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间比较采用方差分析,组内用LSD-t进行比较,两组间比较采用t检验;相关性分析采用Pearson检验;miR-155对NAFLD的诊断价值采用ROC曲线分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 3组外周血 miR-155、SOCS1、NF-κB 表达水平的比较

3组外周血中 miR-155、NF-κB 的表达水平比较:肥胖组>超重组>对照组,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。SOCS1 表达水平比较:肥胖组<超重组<对照组,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。见表1。

表1 3组外周血 miR-155、SOCS1、NF-κB 表达水平的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Comparison of expression levels of miR-155, SOCS1 and NF-κB in peripheral blood of three groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	miR-155	SOCS1	NF-κB
肥胖组	94	1.68±0.70 <sup>ab</sup>	0.62±0.15 <sup>ab</sup>	1.77±0.47 <sup>ab</sup>
超重组	50	1.27±0.32 <sup>a</sup>	0.85±0.19 <sup>a</sup>	1.32±0.35 <sup>a</sup>
对照组	50	1.00±0.21	1.00±0.25	1.00±0.22
F值		29.356	69.928	67.996
P值		<0.001	<0.001	<0.001

注:与对照组比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ ;与超重组比较,<sup>b</sup> $P<0.05$ 。

### 2.2 肥胖组中 NAFLD 患者和非 NAFLD 患者外周血 miR-155、SOCS1、NF-κB 表达水平的比较

肥胖组中 NAFLD 患者外周血中 miR-155、NF-κB 的表达水平显著高于非 NAFLD 患者,SOCS1 的表达水平显著低于非 NAFLD 患者,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。见表2。

表2 肥胖组中 NAFLD 患者和非 NAFLD 患者外周血 miR-155、SOCS1、NF-κB 表达水平的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Comparison of expression levels of miR-155, SOCS1 and NF-κB in peripheral blood between NAFLD patients and non NAFLD patients in obesity group ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	miR-155	SOCS1	NF-κB
NAFLD 患者	52	1.93±0.83	0.49±0.12	1.98±0.39
非 NAFLD 患者	42	1.38±0.28	0.78±0.20	1.51±0.62
t值		4.106	8.701	4.481
P值		<0.001	<0.001	<0.001

### 2.3 外周血 miR-155 表达水平对肥胖组患者 NAFLD 的诊断价值

ROC 曲线下面积为 0.6575 ( $P=0.008$ )。根据约登指数最大值确定最佳截断值为 1.606,该截断值诊断 NAFLD 的灵敏度为 78.57%、特异性为 50.00%。见图1。

### 2.4 肥胖组中不同 miR-155 表达水平患者生化指标的比较

肥胖组中 miR-155 表达水平 $\geq$ 中位数患者的

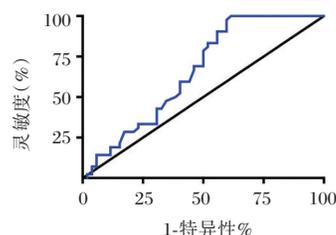


图1 外周血 miR-155 表达水平诊断肥胖组患者 NAFLD 的 ROC 曲线

Figure 1 ROC curve of peripheral blood miR-155 expression level in diagnosis of NAFLD in obese patients

ALT、AST、TC、TG、LDL-C、hs-CRP、F-INS、HOMA-IR 水平均高于 miR-155 表达水平<中位数患者,差异有统计学意义( $P<0.05$ );miR-155 表达水平 $\geq$ 中位数患者的 HDL-C 水平与 miR-155 表达水平<中位数患者比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。见表3。

表3 肥胖组中不同 miR-155 表达水平患者生化指标的比较  
Table 3 Comparison of biochemical indexes of patients with different miR-155 expression levels in obesity group

生化指标	miR-155 表达水平 $\geq$ 中位数 (n=47)	miR-155 表达水平<中位数 (n=47)	t值	P值
ALT(U/L)	71.39±13.84	60.59±11.34	4.138	<0.001
AST(U/L)	66.52±14.24	59.51±10.94	2.672	0.009
TC(mmol/L)	6.22±1.34	5.57±1.38	2.317	0.023
TG(mmol/L)	3.44±0.89	2.78±0.65	4.106	<0.001
LDL-C(mmol/L)	4.88±1.16	4.14±0.83	3.557	0.001
HDL-C(mmol/L)	1.02±0.36	1.13±0.41	1.382	0.170
hs-CRP(mg/L)	8.48±1.94	7.15±1.66	3.571	0.001
F-INS(U/L)	12.59±3.47	10.39±2.52	3.517	0.001
HOMA-IR	3.98±0.93	3.25±0.88	3.909	<0.001

## 3 讨论

肥胖与 NAFLD 具有较高的共病率,胰岛素抵抗是两种疾病共同的病理生理特征,但造成肥胖患者发生 NAFLD 的机制尚未完全阐明。MiR 能够在转录后水平调节基因表达并产生相应的生物学效应,多种 miR 表达改变与肥胖和 NAFLD 的发病有关。Tryggestad JB 的临床研究证实,肥胖患者外周血中 miR-155 的表达水平明显增加<sup>[6]</sup>;王媛媛等的动物实验证实,NAFLD 小鼠肝脏中 miR-155 的表达水平明显增加<sup>[5]</sup>。本研究对肥胖组、超重组、对照组的外周血 miR-155 表达水平进行了检测及比较,与超重组及对照组比较,肥胖组患者外周血中 miR-155 的表达水平明显增加,与 Tryggestad JB 的研究结果一致。

炎症反应激活是影响胰岛素生物信号转导的重要因素,在肥胖及NAFLD的发病过程中均涉及机体微炎症反应的激活<sup>[9-10]</sup>。核因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)是调控炎症反应的核心转录因子,能够促进多种炎症细胞因子的表达并介导炎症反应的级联放大激活<sup>[11]</sup>。根据王媛媛等<sup>[5]</sup>的报道,miR-155靶向抑制细胞因子信号转导抑制物1(suppressor of cytokine signaling, SOCS1)的表达、削弱SOCS1对NF- $\kappa$ B的抑制功能,进而增加NF- $\kappa$ B表达并引起炎症反应。MiR-155/SOCS1/NF- $\kappa$ B的炎症反应调控轴类风湿性关节炎、气道上皮炎症等模型中得到证实<sup>[12]</sup>。本研究在肥胖患者中发现外周血SOCS1的表达水平降低且与miR-155呈负相关、NF- $\kappa$ B的表达水平增加且与miR-155呈正相关,另外肥胖组中NAFLD患者SOCS1的表达水平低于非NAFLD患者、NF- $\kappa$ B的表达水平高于非NAFLD患者。由此推断miR-155在肥胖发病过程中参与SOCS1/NF- $\kappa$ B的调控,通过调控SOCS1/NF- $\kappa$ B能够进一步参与NAFLD的发病。

炎症反应激活引起胰岛素抵抗后,机体会代偿性出现高胰岛素血症,进而引起脂代谢紊乱、促进肝脏内脂肪沉积并发生NAFLD<sup>[13]</sup>。本研究已经证实肥胖组中NAFLD患者外周血中miR-155表达水平更高,进一步通过ROC曲线分析发现miR-155对肥胖患者NAFLD具有诊断价值,但诊断的灵敏度和特异性较弱,仍需今后继续扩大样本量来探究更优的诊断截断值。

在此基础上,本研究结果显示:随着miR-155表达增加,肥胖患者ALT、AST、TC、TG、LDL-C、hs-CRP、F-INS、HOMA-IR水平均明显增加,表明miR-155的高表达能够引起肝功能异常、脂代谢紊乱、炎症激活及高胰岛素血症,均与NAFLD的发病密切相关,这也与miR-155表达增加参与肥胖患者NAFLD发病的结果吻合。

综上所述,肥胖患者外周血中miR-155表达增加与NAFLD发病有关,miR-155的高表达与肝功能异常、脂代谢紊乱、炎症激活及高胰岛素血症均存在相关关系,并且调控SOCS1及NF- $\kappa$ B是miR-155参与NAFLD发病的可能机制。但本研究的研究数据均停留在临床样本检测的阶段,尚缺乏动物实验和细胞实验进行验证,今后应完善相应的动物实验和细胞实验,并为阐明肥胖患者发

生NAFLD的分子机制提供依据。

## 参考文献

- [1] 李嘉琛,吕筠,高萌,等.中国成年人BMI和腰围与主要慢性病风险的关联研究[J].中华流行病学杂志,2019,40(12):1541-1547.
- [2] 夏云婷,吴延莉,王丽敏,等.2013年中国超重肥胖成人BMI水平低估情况[J].中华疾病控制杂志,2019,23(8):938-944.
- [3] 吴挺丰,廖献花,钟碧慧.中国部分地区非酒精性脂肪性肝病的流行情况[J].临床肝胆病杂志,2020,36(6):1370-1373.
- [4] 耿妍,鲁晓岚,耿燕,等.肠道菌群紊乱在大鼠非酒精性脂肪肝中的作用机制[J].分子诊断与治疗杂志,2020,12(12):1626-1630.
- [5] 王媛媛,杨扬,梅金玉,等.miR-155及SOCS1蛋白在酒精性脂肪肝小鼠肝脏中的表达[J].安徽医科大学学报,2017,52(12):1752-1756.
- [6] Tryggestad JB, Teague AM, Sparling DP, et al. Macrophage-Derived microRNA - 155 Increases in Obesity and Influences Adipocyte Metabolism by Targeting Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma [J]. Obesity (Silver Spring), 2019, 27(11):1856-1864.
- [7] 中华医学会内分泌学分会肥胖学组.中国成人肥胖症防治专家共识[J].中华内分泌代谢杂志,2011,27(9):711-717.
- [8] 中国研究型医院学会肝病专业委员会,中国医师协会脂肪性肝病专家委员会,中华医学会肝病学会脂肪肝与酒精性肝病学组,等.脂肪性肝病诊疗规范化的专家建议(2019年修订版)[J].临床肝胆病杂志,2019,35(11):2426-2430.
- [9] Pedersen JS, Rygg MO, Kristiansen VB, et al. Nonalcoholic Fatty Liver Disease Impairs the Liver-Alpha Cell Axis Independent of Hepatic Inflammation and Fibrosis [J]. Hepatol Commun, 2020, 4(11):1610-1623.
- [10] Della Torre S. Non-alcoholic Fatty Liver Disease as a Canonical Example of Metabolic Inflammatory - Based Liver Disease Showing a Sex-Specific Prevalence: Relevance of Estrogen Signaling[J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2020, 11:572490.
- [11] Hao YR, Tang FJ, Zhang X, et al. Suppression of NF- $\kappa$ B activation by PDLIM2 restrains hepatic lipogenesis and inflammation in high fat diet induced mice [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 503(2):564-571.
- [12] Mortazavi-Jahromi SS, Aslani M, Omidian S, et al. Immunopharmacological effect of beta - d - mannuronic acid (M2000), as a new immunosuppressive drug, on gene expression of miR - 155 and its target molecules (SOCS1, SHIP1) in a clinical trial on rheumatoid arthritis patients [J]. Drug Dev Res, 2020, 81(3):295-304.
- [13] Dewidar B, Kahl S, Pafili K, et al. Metabolic liver disease in diabetes - From mechanisms to clinical trials [J]. Metabolism, 2020, 111S:154299.

# US-BACT、US-WBC 及 B-WBC 在诊断细菌性尿路感染中的应用

陶炜<sup>1</sup> 刘万宗<sup>1</sup> 董小康<sup>1</sup> 王惠<sup>2\*</sup>

**[摘要]** **目的** 探究尿沉渣细菌计数(US-BACT)、白细胞计数(US-WBC)及血 WBC(B-WBC)在诊断细菌性尿路感染(UTI)中的应用。**方法** 分析 2017 年 1 月至 2020 年 12 月在本院进行检查的 104 例疑似 UTI 患者的病历资料,比较感染和非感染患者 US-BACT、US-WBC、B-WBC 水平,并分析其对 UTI 的诊断价值。**结果** 104 例疑似细菌性 UTI 患者经尿液细菌培养显示有 72 例确诊为细菌性 UTI。尿液标本共分离培养出病原菌 81 株,其中革兰氏阳性菌 10 株(12.35%),革兰氏阴性菌 71 株(87.65%)。根据尿细菌培养结果分为感染组(72 例)和非感染组(32 例)。感染组 US-BACT、US-WBC、B-WBC 水平显著高于对照组,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。ROC 曲线分析显示,US-BACT、US-WBC、B-WBC 及联合诊断细菌性 UTI 的 AUC 分别为 0.902、0.806、0.756、0.945,联合诊断 AUC 最高。**结论** US-BACT、US-WBC、B-WBC 对 UTI 诊断有参考意义,且三者联合能提高诊断价值。

**[关键词]** 尿沉渣细菌计数;尿白细胞;血白细胞;细菌性尿路感染

## Application of US-BACT, US-WBC and B-WBC in the diagnosis of bacterial urinary tract infection

TAO Wei<sup>1</sup>, LIU Wanzong<sup>1</sup>, DONG Xiaokang<sup>1</sup>, WANG Hui<sup>2\*</sup>

(1. Wuhu Fifth People's Hospital of Anhui Province, Clinical Laboratory, Wuhu, Anhui, China, 241000;

2. Wuhu Center for Disease Control and Prevention, Quality management division, Wuhu, Anhui, China, 241000)

**[ABSTRACT]** **Objective** To explore the application of urinary sediment bacterial count (US-BACT), white blood cell count (US-WBC) and blood WBC (B-WBC) in the diagnosis of bacterial urinary tract infection (UTI). **Methods** A total of 104 suspected UTI patients examined in our hospital from January 2017 to December 2020 were recruited for the study. The levels of US-BACT, US-WBC, and B-WBC in infected and non-infected patients were compared and the UTI Diagnostic value was analyzed. **Results** Urine bacterial culture of 104 patients with suspected bacterial UTI showed that 72 patients were diagnosed with bacterial UTI. A total of 81 pathogenic bacteria were isolated and cultured from urine specimens, including 10 Gram-positive bacteria (12.35%) and 71 Gram-negative bacteria (87.65%). According to the results of urine bacteria culture, they were divided into the infection group (72 cases) and the non-infection group (32 cases). The levels of US-BACT, US-WBC and B-WBC in the infection group were significantly higher than those in the control group ( $P<0.05$ ). The ROC curve analysis showed that the AUC of US-BACT, US-WBC, B-WBC, and combined diagnosis of bacterial UTI were 0.902, 0.806, 0.756, 0.945, respectively, and combined diagnosis AUC was the highest. **Conclusion** US-BACT, US-WBC, and B-WBC have reference significance for the diagnosis of UTI, and the combination of the three can improve the diagnostic value.

**[KEY WORDS]** Urine sediment bacterial count; Urine white blood cell; Blood white blood cell; Bacterial urinary tract infection

基金项目:安徽省 2016 年公益性技术应用研究联动计划项目(1604f0804007)

作者单位:1.安徽省芜湖市第五人民医院检验科,安徽,芜湖 241000

2.芜湖市疾病预防控制中心质量管理科,安徽,芜湖 241000

\*通信作者:王惠, E-mail:871045231@qq.com

尿细菌定量培养是诊断细菌性尿路感染(Bacterial urinary tract infection, UTI)的金标准,然而其检测时间较长,易延误治疗时机<sup>[1]</sup>。使病情逐渐发展为慢性UTI,对患者的预后产生不良影响。故建立其他高效、快速及准确的诊断方式对UTI的治疗意义重大。既往已有报道<sup>[2]</sup>表示,定量分析尿沉渣中的细菌、白细胞等有形成分对疑似UTI的诊断有价值。此外,血常规是临床检查疾病最常见的一种方式,其中血白细胞计数(blood White blood cell count, B-WBC)用途最多,其水平升高多见于急性细菌感染、白血病及严重组织损伤中<sup>[3]</sup>,对UTI的诊断有一定价值。然而临床虽然对尿沉渣细菌计数(Urinary sediment Bacterial count, US-BACT)、尿沉渣白细胞计数(Urinary sediment White blood cell count, US-WBC)及B-WBC对UTI的诊断价值有所报道,但三者联合对UTI的诊断价值报道尚少。故选取疑似细菌性UTI进行分析,探究US-BACT、US-WBC及B-WBC对细菌性UTC的诊断价值,报道结果如下。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选取分析2017年1月至2020年12月在本院检验科进行检查的104例疑似细菌性UTI患者的病历资料,其中男46例,女58例,平均年龄(55.46±14.83)岁。根据是否细菌性UTI感染将104例患者分为两组,感染组72例,非感染组32例。纳入标准:临床资料完整。排除标准:①烧伤、胰腺炎等非泌尿系统感染者;②严重创伤、癌症等影响WBC者。

### 1.2 方法

女性清洗外阴和尿道口周围后自然排尿,男性自然排尿,采集晨中段尿10 mL,30 min送至实验室检查。取5 μL充分混匀的尿液,定量接种于血琼脂平板和中国蓝平板,置于35℃恒温箱中孵育18~24 h。计算每毫升尿液生长菌落数,并参照《尿路感染临床微生物实验室诊断》<sup>[4]</sup>对培养结果进行判定采用法国梅里埃公司生产的VITEK-compact2全自动细菌鉴定仪对菌落菌株进行鉴定,排除生殖道正常菌群,若尿液标本有3种及以上的细菌生长,为可疑污染,重新送检。

### 1.3 观察指标

尿液细菌接种后,应用UF-1000i全自动尿沉

渣分析仪进行检测,记录细菌和US-WBC检测结果。采集患者空腹静脉血2 mL,使用全自动血液分析仪(日本希森美康,型号:SYSMEX-4000i)检测血液中WBC水平。

### 1.4 统计学处理

采用统计软件SPSS 22.0处理数据;计数资料用 $n(\%)$ 表示;符合正态分布的计量资料,用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,行独立样本 $t$ 检验;各指标的诊断价值采用受试者工作特征(receiver operating characteristic, ROC)曲线。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 尿液细菌培养结果

104例疑似细菌性UTI患者经尿液细菌培养显示有72例确诊为细菌性UTI。尿液标本共分离培养出病原菌81株。81株阳性标本中检出革兰氏阳性菌10株(12.35%),其中主要以粪肠球菌和屎肠球菌为主;革兰氏阴性菌71株(87.65%),其中主要以大肠埃希菌为主。见表1。

表1 尿液细菌培养结果 [ $n(\%)$ ]

Table 1 results of urine bacterial culture [ $n(\%)$ ]

病原菌	种类	株数(构成比)
革兰氏阳性菌	粪肠球菌	5(6.17)
	链球菌属	2(2.47)
	屎肠球菌	3(3.70)
革兰氏阴性菌	大肠埃希菌	56(69.14)
	铜绿假单胞菌	2(2.47)
	肺炎克雷伯菌	8(9.88)
	奇异变形杆菌	2(2.47)
	其他	3(3.70)

### 2.2 两组US-BACT、US-WBC、B-WBC水平比较

感染组US-BACT、US-WBC、B-WBC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US-BACT、US-WBC、B-WBC水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Comparison of the levels of US-BACT, US-WBC and B-WBC between the two groups ( $\bar{x} \pm s$ )

分组	$n$	US-BACT (/μL)	US-WBC (/μL)	B-WBC (×10 <sup>6</sup> /L)
感染组	72	1152.22±798.44	208.55±182.76	12.55±3.72
非感染组	32	170.13±85.93	36.59±22.64	9.13±2.86
$t/Z$ 值		6.457	4.911	4.566
$P$ 值		0.000	0.000	0.000

### 2.3 US-BACT、US-WBC、B-WBC单独诊断及三项联合诊断对细菌性UTI的ROC曲线分析

ROC曲线分析显示单一诊断三项联合的AUC高于US-WBC、B-WBC( $P < 0.05$ )。见表3、图1。

表3 US-BACT、US-WBC、B-WBC单独诊断及三项联合诊断对细菌性UTI的ROC曲线分析

Table 3 ROC curve analysis of us-bact, us-wbc and b-wbc for bacterial UTI

指标	AUC	S值	95%CI	cut-off值	约登指数	敏感性(%)	特异性(%)	P值
US-BACT( $\mu\text{L}$ )	0.902	0.029	0.845~0.959	291.455	0.792	79.2	100	0.000
US-WBC( $\mu\text{L}$ )	0.806	0.041	0.725~0.887	72.135	0.625	62.5	100	0.000
B-WBC( $\times 10^9/\text{L}$ )	0.756	0.053	0.651~0.860	10.705	0.468	50.0	96.8	0.000
联合	0.945	0.021	0.905~0.985	631.516	0.847	84.7	100	0.000

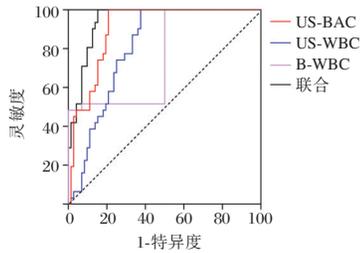


图1 US-BACT、US-WBC、B-WBC单独诊断及三项联合诊断对细菌性UTI的ROC曲线

Figure 1 ROC curve of bacterial UTI for US-BACT, US-WBC, B-WBC alone diagnosis and three combined diagnosis

### 3 讨论

UTI为泌尿系统常见疾病,包括膀胱炎、尿道炎、无症状细菌尿等一系列疾病,典型症状为尿频、尿急、尿痛等。目前UTI主要采用抗生素进行治疗,然而抗生素应用不当会使细菌产生耐药性,不使用抗生素导致的延误治疗又可能会使其逐渐转化为慢性UTI,对患者长期造成影响<sup>[5]</sup>。本研究采用尿液细菌培养的金标准进行检测发现,尿液细菌培养可准确检测出UTI,并且能明确感染菌种。然而尿液细菌培养虽为是细菌性UTI的金标准,但需2~3d才能得到诊断结果,若在这期间不加以干预或盲目采用抗生素进行干预,则会造成治疗延误或抗生素滥用;同时,细菌培养要求较高的技术、设备、仪器等,使其的应用受到一定限制<sup>[6]</sup>。因此,临床需尽早对UTI进行诊断,以确保患者获得及时有效的治疗,同时避免抗生素的滥用。尿沉渣检测<sup>[7]</sup>是临床直观、简便辅助诊断UTI的常用方法,包括显微镜镜检和尿沉渣分析仪两种方式,但显微镜镜检标本处理繁杂、检验人员劳动强度大,易疲劳,容易导致忽略一些有临床意义的有形成份,故本研究中采用全自动尿沉渣分析仪对尿沉渣中BACT、WBC进行检测。

尿沉渣分析仪检测BACT可通过细菌散点图来反映,革兰氏阴性菌的散点图较为集中,革兰氏阳性菌的散点图较为松散。何云霄等<sup>[8]</sup>在尿沉渣细菌定量计数筛查泌尿系感染的报道中表示,尿沉渣细菌定量计数与中段尿细菌培养的一致性较强,Kappa值

达0.830,提示尿沉渣细菌定量计数用于诊断泌尿系统感染较为准确、可靠。目前,关于尿沉渣分析仪检测的BACT对UTI诊断的临界值仍存在争议。虞培娟等<sup>[9]</sup>在尿液有形成分对细菌性UTI诊断的报道中表示,BACT的临界值为143.5/ $\mu\text{L}$ ,特异性为55.3%,假阳性率为44.7%。沈张平等<sup>[10]</sup>在Sysmex UF-1000i尿液分析仪诊断细菌性UTI的报道中表示,细菌计数诊断UTI的AUC为0.873,临界值为900/ $\mu\text{L}$ ,灵敏度为80%,特异度为94%。本研究中ROC曲线分析显示,US-BACT诊断细菌性UTI的AUC为0.902,与Van d Z W C等<sup>[11]</sup>报道中US-WBC的临界值为230/ $\mu\text{L}$ 相近。提示US-BACT、US-WBC对UTI的诊断价值较高,一定程度上可减少尿液细菌培养对病情的延误。并且推测本研究结果中US-BACT临界值与其他研究报道结果不同可能是纳入样本的年龄、性别差异,以及US-BACT无法有效区分污染菌和致病菌,死菌和活菌导致的<sup>[12-13]</sup>。

文献<sup>[9]</sup>报道表示,US-WBC诊断UTI的临界值为27.5/ $\mu\text{L}$ ,特异性为92.7%,假阴性率为30.8%。吴苑等<sup>[14]</sup>报道则表示,US-WBC诊断UTI的AUC为0.784,最佳临界值为119.25/ $\mu\text{L}$ ,敏感度为58.0%,特异度为86.1%。本研究结果中US-WBC诊断UTI的敏感度较低,推测可能为该指标本身易受多种因素干扰导致的。WBC是反映感染状态的一个血液指标,因此对血液中WBC进行检测可辅助诊断UTI。本研究中感染组B-WBC水平显著高于对照组,敏感度仍较低。张树琛等报道<sup>[15]</sup>表示,B-WBC诊断细菌性UTI的临界值为9.79,与本研究结果差别不大,但敏感度同样较低。因此要快速、准确的筛查出UTI需联合多种指标共同检测,以提高诊断的敏感度。

综上所述,US-BACT、US-WBC、B-WBC均对UTI诊断有参考意义,且三者联合能提高诊断价值,可弥补尿细菌学培养诊断的不足。本研究局限性在于研究样本量较少,未对不同性别、不同年龄的患者进行分层研究,后期可增加样本量进行不同年龄、性别的研究,以提高US-BACT、US-WBC、B-WBC对UTI的诊断价值。

## 参考文献

- [1] Kranz J, Schmidt S, Lebert C, et al. Uncomplicated Bacterial Community-acquired Urinary Tract Infection in Adults [J]. *Dtsch Arztebl Int*, 2018, 4(50):866-873.
- [2] 邹慧青,张玲,王厚照.全自动尿液分析仪在测定尿路感染患者尿液细菌分布情况及白细胞计数中的应用价值[J].*中国医学装备*, 2019, 16(11):107-109.
- [3] 徐玉秀,张成伟,鹿勇.血常规参数,血浆D-二聚体在败血症诊断及预后应用[J].*分子诊断与治疗杂志*, 2020, 12(1):64-68.
- [4] 田晓波,于珊,金静,等.随机尿沉渣检测对社区获得性尿路感染诊断价值分析[J].*国际检验医学杂志*, 2019, 40(23):2841-2844+2849.
- [5] 麻志恒,倪建俐,高志生,等.基于“脾主升清”理论观察健脾清化方联合抗菌素治疗慢性尿路感染的疗效[J].*辽宁中医杂志*, 2018, 45(11):2328-2330.
- [6] 余建洪,李玉梅,王修全,等.自贡地区尿培养中分离菌的临床分布及耐药性分析[J].*中国抗生素杂志*, 2019, 44(9):90-96.
- [7] 张海玉,冯莉,王娜.尿沉渣分析仪联合显微镜镜检检测浆膜腔积液诊断恶性肿瘤的比较[J].*空军医学杂志*, 2018, 34(5):45-48.
- [8] 何云霄.尿沉渣细菌定量计数筛查对于泌尿系感染诊断的临床价值[J].*中国卫生检验杂志*, 2018, 28(16):2010-2011.
- [9] 虞培娟,张果琳,严茹红,等.尿液有形成分分析联合血清降钙素原检测在尿路感染诊断中的应用价值[J].*检验医学*, 2018, 33(4):299-304.
- [10] 沈张平,樊春笋. Sysmex UF-1000i 尿液分析仪细菌通道参数在诊断尿路感染中的应用价值[J].*检验医学与临床*, 2019, 16(21):3094-3095,3099.
- [11] Van d Z WC, Hessels J, Canbolat F, et al. Evaluation of the Sysmex UF-1000i urine flow cytometer in the diagnostic work-up of suspected urinary tract infection in a Dutch general hospital [J]. *Clin Chem Lab Med*, 2010, 48(12):1765-1771.
- [12] 王刚强,王金华,路蔓,等.西安地区健康成人尿液有形成分参考区间的建立[J].*现代检验医学杂志*, 2020, 35(1):111-114,119.
- [13] 杨静,邓小燕,黎柳婷.广州地区健康成人尿有形成分分析仪的参考区间测定[J].*中华医学杂志*, 2018, 98(38):3087-3089.
- [14] 吴苑,郑微,李靖,等.尿液中肝素结合蛋白和白介素6及白细胞计数水平对细菌性尿路感染诊断的应用价值[J].*中华检验医学杂志*, 2019, 42(4):312-317.
- [15] 张树琛,王杉,朱凤霞,等.血清降钙素原检测对尿路感染的临床诊断价值[J].*中国预防医学杂志*, 2017, 18(4):263-265.

(上接第534页)

- [3] Lu D, Ho ES, Mai H, et al. Identification of blood circular RNAs as potential biomarkers for acute ischemic stroke [J]. *Front Neurosci*, 2020, 14:81.
- [4] Ruan W, Wu J, Su J, et al. Altered lncRNAs transcriptomic profiles in atherosclerosis-induced ischemic stroke [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2020 Jul 11.
- [5] 彭斌,吴波.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.
- [6] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1):84-91.
- [7] Li P, Shen M, Gao F, et al. An antagomir to MicroRNA-106b-5p ameliorates cerebral ischemia and reperfusion injury in rats via inhibiting apoptosis and oxidative stress [J]. *Mol Neurobiol*, 2017, 54(4):2901-2921.
- [8] Li P, Teng F, Gao F, et al. Identification of circulating microRNAs as potential biomarkers for detecting acute ischemic stroke [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2015, 35(3):433-447.
- [9] He W, Wei D, Cai D, et al. Altered long Non-Coding RNA transcriptomic profiles in ischemic stroke [J]. *Hum Gene Ther*, 2018, 29(6):719-732.
- [10] Deng QW, Li S, Wang H, et al. Differential long noncoding RNA expressions in peripheral blood mononuclear cells for detection of acute ischemic stroke [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2018, 132(14):1597-1614.
- [11] Zhu M, Li N, Luo P, et al. Peripheral blood leukocyte expression of lncRNA MIAT and its diagnostic and prognostic value in ischemic stroke [J]. *J Stroke Cerebrovasc*, 2018, 27(2):326-337.
- [12] Huang Y, Wang L, Mao Y, et al. Long Noncoding RNA-H19 contributes to atherosclerosis and induces ischemic stroke via the upregulation of acid phosphatase 5 [J]. *Front Neurol*, 2019, 10:32.
- [13] Wang J, Cao B, Han D, et al. Long Non-coding RNA H19 induces cerebral ischemia reperfusion injury via activation of autophagy [J]. *Aging Dis*, 2017, 8(1):71-84.
- [14] Yuan Y, Zheng Z. Geniposide protects PC-12 cells against oxygen and glucose deprivation-induced injury by up-regulation of long-noncoding RNA H19 [J]. *Life Sci*, 2019, 216:176-182.
- [15] Zhao RB, Zhu LH, Shu JH, et al. GAS5 silencing protects against hypoxia/ischemia-induced neonatal brain injury [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 497(1):285-291.
- [16] Chen F, Zhang L, Wang E, et al. lncRNA GAS5 regulates ischemic stroke as a competing endogenous RNA for miR-137 to regulate the Notch1 signaling pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 496(1):184-190.
- [17] 韦贵将,杨峻,韦叶生.长链非编码RNA GAS5在动脉粥样硬化及相关疾病发生发展中的作用[J].*分子诊断与治疗杂志*, 2020, 12(4):401-405.

## 胃蛋白酶原1、G-17、HP-IgG检测,结合胃黄色素瘤对诊断萎缩性胃炎准确性分析

陈亚军<sup>1</sup> 罗俊<sup>2</sup> 韩怡<sup>1\*</sup>

**[摘要]** 目的 探究胃蛋白酶原1(PG1)、胃泌素17(G-17)、幽门螺杆菌IgG抗体(HP-IgG)检测,结合胃黄色素瘤对诊断萎缩性胃炎准确性。方法 选择并分析2017年8月到2020年12月来本院消化科就诊的102例萎缩性胃炎患者作为实验组,并选取同期来体检的健康者50例作为对照组、住院后胃镜诊断为慢性非萎缩性胃炎患者50例作为非萎缩性胃炎组,检测并比较三组患者PG1、G-17、HP-IgG水平,并采用内镜检查患者是否带有胃黄色素瘤,并采用Roc曲线分析其对萎缩性胃炎的诊断价值。结果 实验组的PG1、G-17水平小于非萎缩性胃炎组、对照组( $P<0.05$ ),HP-IgG、胃黄色素瘤检测率大于非萎缩性胃炎组、对照组,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。PG1、G17、胃黄色素瘤检测率、HP-IgG、诊断萎缩性胃炎的价值的AUC分别为0.707、0.975、0.64、0.896,四项联合诊断萎缩性胃炎的价值的AUC为0.991,诊断萎缩性胃炎的价值准确性高,根据最佳临界值,PG1敏感度为63.7%,特异度为74%;G17敏感度为89.2%,特异度为100%;胃黄色素瘤检测率敏感度为46.1%,特异度为82%;HP-IgG敏感度为80.4%,特异度为94%;联合敏感度为100%,特异度为96%。结论 PG1、G17、HP-IgG检测,结合胃黄色素瘤对诊断萎缩性胃炎有较高的准确性。

**[关键词]** 胃蛋白酶原1;胃泌素17;幽门螺杆菌IgG抗体;胃黄色素瘤;萎缩性胃炎

### Pepsinogen 1, G-17, HP-IgG detection, combined with gastric xanthoma to diagnose the accuracy of atrophic gastritis

CHEN Yajun<sup>1</sup>, LUO Jun<sup>2</sup>, HAN Yi<sup>1\*</sup>

(1. Department of Gastroenterology, Fuyang Hospital Affiliated to Anhui Medical University, Fuyang, Anhui, China, 233000; 2. Department of Clinical Laboratory, Fuyang Hospital Affiliated to Anhui Medical University, Fuyang, China, 233000)

**[ABSTRACT]** **Objective** To explore the accuracy of pepsinogen 1 (PG1), gastrin 17 (G-17), Helicobacter pylori IgG antibody (HP-IgG) detection, combined with gastric xanthoma to diagnose atrophic gastritis. **Methods** We selected and analyzed 102 patients with atrophic gastritis who came to the Gastroenterology Department of our hospital from August 2017 to December 2020 as the experimental group, and selected 50 healthy patients who received physical examination during the same period as the control group. After hospitalization, 50 patients with chronic non-atrophic gastritis diagnosed by gastroscopy were selected as the non-atrophic gastritis group. The levels of PG1, G-17, and HP-IgG in the three groups were detected and compared, and endoscopy was used to check whether the patients had gastric xanthoma, and the Roc curve was used to analyze its diagnostic value for atrophic gastritis. **Results** The levels of PG1 and G-17 in the experimental group were lower than those in the non-atrophic gastritis group and the control group ( $P<0.05$ ), and the detection rates of HP-IgG and gastric xanthoma were higher than those in the non-atrophic gastritis group and the control group. The differences were statistically significant ( $P<0.05$ ). The AUC of PG1, G17, detection rate and HP-

基金项目:2019年安徽省高校科学研究项目(KJ2019A0094)

作者单位:1. 安徽医科大学附属阜阳医院消化内科,安徽,阜阳 233000

2. 安徽医科大学附属阜阳医院检验科,安徽,阜阳 233000

\*通信作者:韩怡, E-mail: 1196125609@qq.com

IgG、value in diagnosis of atrophic gastritis were 0.707, 0.975, 0.64, 0.896, the AUC of the value of four combined diagnoses of atrophic gastritis was 0.991. The diagnostic value of atrophic gastritis is highly accurate. According to the best cut-off value, the sensitivity of PG1 is 63.7% and the specificity is 74%. The sensitivity of G17 is 89.2% and the specificity is 100%. The sensitivity of gastric xanthoma detection rate was 46.1% and the specificity was 82%. The sensitivity of HP-IgG was 80.4% and the specificity was 94%. The combined sensitivity was 100% and the specificity was 96%. **Conclusion** PG1、G17、HP-IgG detection combined with gastric yellow melanoma has a high accuracy in the diagnosis of atrophic gastritis.

**[KEY WORDS]** Pepsinogen 1; Gastrin 17; Helicobacter pylori IgG antibody; Melanoma; atrophic gastritis

慢性胃炎是临床中最常见的疾病,萎缩性胃炎是慢性胃炎的一种,其主要表现为胃脘部胀满、疼痛不适、恶心、呕吐、反酸、烧心、嗝气、食欲不振、大便溏稀等。萎缩性胃炎是一种多致病因素性疾病及癌前病变,有研究显示,80%以上的胃癌患者伴有萎缩性胃炎,所以早期诊断萎缩性胃炎具有重大意义<sup>[1]</sup>。胃蛋白酶原1(pepsinogen1, PG1)、胃泌素17(Gastrin 17, G-17)、幽门螺杆菌 IgG 抗体(Helicobacter pylori IgG antibody, HP-IgG)是萎缩性胃炎的主要标志物<sup>[2-4]</sup>。胃黄色素瘤是吞噬类脂质的巨噬细胞在胃黏膜局灶性聚集形成的瘤样增生,有研究显示,萎缩性胃炎可能是胃黄色素的病因之一,而胃黄色素瘤可能是萎缩性胃炎胃黏膜病变的另一种表现形式<sup>[5]</sup>。近年来,对于 PG1、G-17、HP-IgG 结合胃黄色素瘤对萎缩性胃炎的诊断价值报道较少,基于此,本研究通过探究 PG1、G-17、HP-IgG 检测,结合胃黄色素瘤对诊断萎缩性胃炎准确性,为临床工作提供依据。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选择 2017 年 8 月到 2020 年 12 月来本院消化科就诊的 102 例萎缩性胃炎患者作为实验组,其中男 57 人,女 45 人,平均年龄(53.44±16.48)岁;并另选同期来体检的健康者 50 例作为对照组、住院后胃镜诊断为慢性非萎缩性胃炎患者 50 例作为非萎缩性胃炎组,其中男 29 人,女 21 人,平均年龄(53.12±15.72)岁。三组受检者的一般资料比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。见表 1。

### 1.2 纳入标准

纳入标准:①符合中华医学会制定的《慢性胃炎基层诊疗指南(2019 年)》中的萎缩性胃炎诊断标准<sup>[6]</sup>;②患者年龄>18 岁;③心功能分级≤Ⅱ级;④基本资料完整,能够配合完成本次研究者;⑤知

表 1 3 组受检者的一般资料比较 [ $n(\%)$ , ( $\bar{x}\pm s$ )]

Table 1 Comparison of general data between 3 groups [ $n(\%)$ , ( $\bar{x}\pm s$ )]

组别	n	性别 (男/女)	年龄	住院时间 (d)	高血压	糖尿病
实验组	102	57/45	53.44±16.48	8.54±4.14	86(84.31)	65(63.72)
非萎缩性 胃炎组	50	30/20	53.69±16.58	8.98±4.11	40(80.00)	32(64.00)
对照组	50	29/21	53.12±15.72	9.78±3.79	41(82.00)	33(66.00)
$\chi^2/t$ 值		0.074	0.015	1.575	0.653	0.415
P值		0.912	0.985	0.210	0.789	0.362

情并签署知情同意书者。排除标准:①合并感染性疾病者;②恶性肿瘤者;③免疫系统疾病者;④血液系统疾病;⑤存在严重心律失常或瓣膜疾病者;⑥智力或认知障碍不能配合本研究者。

### 1.3 检测方法

三组患者均抽空腹静脉血 5 mL,抽血前一天晚上 12 点之后禁饮禁食,血液在 2 000 r/min 下离心 5 min,取上层清液,PG1、G-17、HP-IgG 采用酶联免疫吸附法检测,胃蛋白酶原-I、G-17 检验试剂盒由必欧翰生物技术(合肥)有限公司提供;HP-Ab 检验试剂盒由艾博生物医药(杭州)有限公司提供,操作步骤严格按照说明书方法进行操作。

三组患者均进行胃镜检查,应用 Olympus EVIS LUCERA SPECTRUM、EVIS LUCERA ELITE 电子内镜系统配备的 GIF-H260、GIF-H290 等电子内镜,以及 Fujifilm EPX-4400、EPX-4450HD 系统配备的 EG-450WR、EG-600WR 等电子内镜。受检者检查前晚 10 时后禁食,检查前 10 min 含服达克罗宁胶浆,在清醒或静脉麻醉状态下行胃镜检查。检测患者的胃黏膜是否有胃黄色素瘤。

### 1.4 统计学方法

采用统计软件 SPSS 22.0 处理数据,计数资料用  $n(\%)$  表示;符合正态分布的计量资料用 ( $\bar{x}\pm s$ ) 表示,三组间比较采用  $t$  检验;诊断价值通过受试

者工作特征曲线(receiver operator characteristic curve, ROC 曲线)评估,曲线下面积(area under curve, AUC)0.5~0.7时诊断准确性低,0.7~0.9时有一定准确性,>0.9 准确性较高。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 3组患者PG1、G-17、HP-IgG检测及胃黄色素瘤检测结果比较

实验组的PG1、G-17低于非萎缩性胃炎组、对照组,差异有统计学意义( $P<0.05$ );实验组的HP-IgG、胃黄色素瘤检测率大于非萎缩性胃炎组、对照组,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。见表2。

表2 3组患者PG1、G-17、HP-IgG检测及胃黄色素瘤检测结果比较 [ $n(\%)$ , ( $\bar{x}\pm s$ )]

组别	$n$	PG1	G-17	HP-IgG	胃黄色素瘤检测率
实验组	102	40.21±8.57	6.16±2.24	69.61±25.42	47(46.08)
非萎缩性胃炎组	50	68.45±12.23	12.41±3.62	45.84±15.78	12(24.00)
对照组	50	71.24±10.22	14.81±4.19	34.81±12.94	9(18)
$\chi^2/t$ 值		223.098	145.926	53.829	8.956
$P$ 值		<0.001	<0.001	<0.001	0.001

### 2.2 PG1、G-17、HP-IgG检测,结合胃黄色素瘤对萎缩性胃炎诊断价值的roc曲线分析

ROC曲线分析显示,四项联合诊断萎缩性胃炎的价值的AUC为0.991,故联合诊断萎缩性胃炎的价值准确性高。可见表3、图1。

### 2.3 胃镜影像下黄色素瘤病变

胃镜影像图。见图2。

## 3 讨论

萎缩性胃炎又称慢性萎缩性胃炎,属于慢性胃炎的一种,是指胃黏膜上皮和腺体萎缩、数目减少、黏膜变薄、肌层增厚,或伴有肠上皮化生或异型增

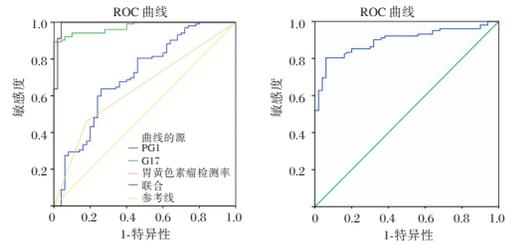


图1 PG1、G-17、HP-IgG检测,结合胃黄色素瘤对萎缩性胃炎诊断价值的Roc曲线

Figure 1 PG1, G-17, HP-IgG Roc curve of diagnostic value of gastric melanoma in wilting gastritis

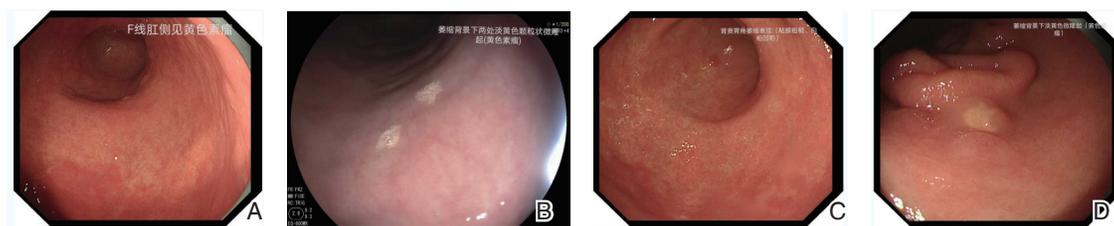
生为特征的慢性消化系统疾病;该病的临床表现有胃脘部胀满、疼痛不适、恶心、呕吐、反酸、烧心、嗝气、食欲不振、大便溏稀等,少数病情严重患者会出现贫血、消瘦、乏力、营养不良等症状,但其无特异性体征,临床中无法根据患者体征对患者进行确诊,有研究显示,80%以上的胃癌患者伴有萎缩性胃炎,所以早期诊断萎缩性胃炎具有重大意义<sup>[7]</sup>。

胃黄色素瘤是吞噬类脂质的巨噬细胞在胃黏膜局灶性聚集形成的瘤样增生,有研究显示,萎缩性胃炎可能是胃黄色素的病因之一,而胃黄色瘤可能是萎缩性胃炎胃黏膜病变的另一种表现形式<sup>[8]</sup>。胃蛋白酶原1(PG1)是由分泌腺细胞分泌而成的蛋白酶原,其主要作用是在胃腔内经反应转化成胃蛋白酶,以此来将外来蛋白质分解,有研究显示反映胃黏膜腺体和细胞的数量,也间接反映胃黏膜不同部位的分泌功能<sup>[9]</sup>。当胃黏膜发生病理变化时,血清PG含量也随之改变,因此,监测血清中PG的浓度可以作为监测胃黏膜状态的手段<sup>[10]</sup>;胃泌素17(G-17)又称为促胃液素,是由胃窦部及十二指肠近端黏膜中G细胞分泌的一种胃肠激素,其主要作用是刺激胰液、胃酸和胆汁的分泌,其对于胃蛋白酶原有一定的刺激作用,有研究显示,G-17对判断胃窦病变的轻重和胃酸分泌情况有着较高的价值<sup>[11-12]</sup>;幽门螺杆菌IgG抗体(HP-IgG)是人体因幽门螺杆菌而产生的特异性抗体,有研究显示,幽门螺杆菌感染是慢性胃炎的主要病因<sup>[13-14]</sup>。

表3 PG1、G-17、HP-IgG检测,结合胃黄色素瘤对萎缩性胃炎诊断价值的AUC

Table 3 PG1, G-17, HP-IgG AUC of diagnostic value of gastric melanoma in wilting gastritis

检验项目	AUC	标准误	渐近显著性水平	95%CI	最佳临界值	灵敏度(%)	特异度(%)	约登指数
PG1	0.707	0.046	0	0.616~0.799	18.0027	0.377	63.7	74
G17	0.975	0.01	0	0.955~0.995	8.77	0.892	89.2	100
胃黄色素瘤检测率	0.64	0.046	0.005	0.55~0.731	1.5	0.281	46.1	82
HP-IgG	0.896	0.025	0	0.847~0.946	48.085	0.744	80.4	94
联合	0.991	0.008	0	0.976~1	58.465	0.96	100	96



注:A为F线肛侧见黄色素瘤;B为萎缩背景下两处淡黄色颗粒状微隆起(黄色素瘤);C为胃窦胃角萎缩表现;D为萎缩背景下淡黄色微隆起(黄色素瘤)。

图2 胃镜影像图

Figure 2 Effect of gastroscopy

本研究结果显示四项联合诊断准确性高。可知PG1、G17、HP-IgG检测,结合胃黄色素瘤对诊断萎缩性胃炎有较高的准确性。龙丹<sup>[15]</sup>的研究结果也显示,胃癌患者PG I、PG II水平明显低于慢性非萎缩性胃炎患者、慢性萎缩性胃炎患者,慢性萎缩性胃炎患者PG I、PG II水平明显低于慢性非萎缩性胃炎患者;其原因可能是萎缩性胃炎患者胃黏膜内固有的腺体萎缩,胃黄色瘤的发生可能与胃黏膜长期慢性炎症和细胞老化有关,这些因素可干扰局部脂质代谢并导致黏膜细胞破裂坏死,坏死细胞的细胞膜释放大量脂质,因局部脂质过多和脂质代谢转运障碍,大量脂质沉积而被局部组织细胞和单核-巨噬细胞吞噬,形成充满脂质的泡沫细胞,泡沫细胞大量堆积进而形成黄色瘤。上述胃黄色瘤的形成机制与既往研究和本研究发现的萎缩性胃炎的存在及其严重程度和年龄与胃黄色瘤之间存在相关性、是胃黄色瘤的独立危险因素结论相一致,由此推测萎缩性胃炎可能是胃黄色瘤发生的病因之一<sup>[16]</sup>。

综上所述,PG1、G17、HP-IgG检测,结合胃黄色素瘤对诊断萎缩性胃炎有较高的准确性。目前,国内外对于诊断萎缩性胃窦炎的最佳临界值尚未有明确报道,本研究PG1、G-17、HP-IgG比值指标临界值的敏感性、特异性和准确性较高,但仍需要通过大样本的研究进行验证。

## 参考文献

[1] 张强,黄明河.慢性萎缩性胃炎伴胃癌前病变辨治思路[J].中国中医药信息杂志,2018,25(2):118-120.

[2] Smith MD, Harley ME, Kemp AJ, et al. CCPG1 Is a Non-canonical Autophagy Cargo Receptor Essential for ER-Phagy and Pancreatic ER Proteostasis[J]. Developmental Cell, 2018, 44(2):217-232.

[3] 刘阳,刘文,刘婕,等.健胃消痞汤联合雷贝拉唑治疗慢性萎缩性胃炎的临床疗效及对血清G-17、ET-1、胃蛋白酶原、

EGF及NO水平的影响[J].现代生物医学进展,2018,18(2):297-300+333.

- [4] 张顶花,卢干珍.中枢神经系统脱髓鞘病患者的临床特征及与血清HP-IgG、AQP4抗体的相关性研究[J].川北医学院学报,2020,35(1):110-113.
- [5] 李华珊,高峰,张杰.胃黄色瘤及幽门螺杆菌核酸联合分型检测与胃良性疾病严重程度之间的关系[J].中国医刊,2019,54(10):1075-1078.
- [6] 中华医学会,中华医学会杂志社,中华医学会消化病学分会,等.慢性胃炎基层诊疗指南(2019年)[J].中华全科医师杂志,2020,19(9):768-775.
- [7] 李多,王锐,于永强,等.雷贝拉唑、阿莫西林、克拉霉素联合枳术宽中胶囊治疗老年幽门螺杆菌阳性慢性萎缩性胃炎[J].山东医药,2018,58(3):78-80.
- [8] 张淑芳,姚萍.胃黄色瘤相关危险因素的分析[J].国际消化病杂志,2019,39(3):211-215.
- [9] 王羨,王红霞,潘俊斐,等.lncRNA Tmevpg1对小鼠自噬和JAK-STAT信号通路关键信号分子表达水平的影响[J].中国细胞生物学学报,2019,41(7):1308-1319.
- [10] 汪湃,冯世兵.PG I、PG II、ET、CGRP在Hp感染的消化性溃疡患者血清中的变化及其意义[J].四川医学,2019,40(1):93-96.
- [11] 刘冬,徐娟,张承顺.幽门螺杆菌阳性慢性萎缩性胃炎患者吹气定量检测值与PG、G-17的关系探讨[J].现代消化及介入诊疗,2020,25(2):174-177+182.
- [12] 黄喜顺,苏军凯,邓立新,等.PG、G-17、CA72-4、CEA联合检测在胃癌筛查中的应用[J].西北国防医学杂志,2019,40(6):341-346.
- [13] 颜卫荣,林艳,马玲敏,等.血清胃蛋白酶原联合幽门螺杆菌IgG抗体检测在胃癌早期诊断中的应用价值[J].中国卫生检验杂志,2019,29(11):1321-1323.
- [14] 董磊,夏猛,尚康兴,等.胃癌患者手术前后血清VEGF、MMP-2、MMP-9水平变化及其临床意义[J].分子诊断与治疗杂志,2020,12(9):97-101.
- [15] 龙丹.慢性萎缩性胃炎和胃癌患者GI、PGII、G-17水平及Hp IgG抗体检测及诊断分析[J].中国社区医师,2020,36(13):111-112.
- [16] 李俊.血清幽门螺杆菌抗体、胃蛋白酶原、胃泌素-17检测[J].中国肿瘤,2019,28(8):629-635.

## 子痫前期患者血清 CTRP3、CTRP9 与病情的相关性

吴梦菲 蒋瑶 张亚慧 贾素红\*

**[摘要]** **目的** 探讨子痫前期(PE)患者外周血血清 C1q/肿瘤坏死因子相关蛋白 3(CTRP3)、C1q/肿瘤坏死因子相关蛋白 9(CTRP9)水平与 PE 病情的相关性。**方法** 选取 2018 年 10 月至 2019 年 12 月本院妇产科收治的 PE 患者 84 例作为研究对象,按病情严重程度分为轻度组(49 例),重度组(35 例)。另选取同期健康妊娠孕妇 40 例纳入健康组。比较 3 组外周血血清 CTRP3、CTRP9、可溶性血管内皮生长因子受体-1(sFlt-1)水平,分析 3 者与 PE 病情严重程度相关性。测定 3 组外周血糖脂相关指标甘油三酯(TG)、胆固醇(TC)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL)及胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)水平,pearson 分析其与 CTRP3、CTRP9、sFlt-1 水平相关性。对不同妊娠结局 PE 患者血清 CTRP3、CTRP9、sFlt-1 水平进行比较。**结果** 重度组患者 CTRP3、CTRP9 水平明显低于轻度组,sFlt-1 水平明显高于轻度组,TG、TC、LDL、HOMA-IR 水平明显高于轻度组,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。PE 患者 CTRP3、CTRP9 水平与 TG、TC、HOMA-IR 呈负相关( $P<0.05$ ),sFlt-1 水平与 TG、TC、LDL、HOMA-IR 呈正相关( $P<0.05$ )。轻度组不良妊娠结局发生率为 28.57%,明显低于重度组的 51.43%,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。不良妊娠结局 PE 患者 CTRP3、CTRP9 水平相比无不良妊娠 PE 患者明显降低,sFlt-1 水平明显升高,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。**结论** 外周血 CTRP3、CTRP9 水平与 PE 患者病情严重程度及妊娠结局密切相关,检测二者水平对于缓解该病进展及降低妊娠不良结局发生率有积极意义。

**[关键词]** 子痫前期; CTRP3、CTRP9

### Correlation between serum CTRP3, CTRP9 and disease severity in patients with preeclampsia

WU Mengfei, JIANG Yao, ZHANG Yahui, JIA Suhong\*

(Department of Obstetrics and Gynecology, the Second Affiliated Hospital of Suzhou University, Suzhou, Jiangsu, China, 215000)

**[ABSTRACT]** **Objective** To explore the correlation between serum C1q tumor necrosis factor-related protein 3 (CTRP3), CTRP9 levels in peripheral blood and the severity in patients with preeclampsia (PE). **Methods** A total of 84 PE patients admitted to the Department of Obstetrics and Gynecology in our hospital from October 2018 to December 2019 were enrolled as the research objects. According to disease severity, they were divided into the mild group (49 cases) and the severe group (35 cases). Another 40 healthy pregnant women were enrolled as the healthy group. The levels of serum CTRP3, CTRP9 and soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 (sFlt-1) in peripheral blood were compared among the three groups. And the correlation among the three indicators and PE severity was analyzed. The levels of peripheral blood glucose-lipid related indexes [triglyceride (TG), total cholesterol (TC), low-density lipoprotein cholesterol (LDL), homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR)] in the three groups were detected. And their correlation with CTRP3, CTRP9 and sFlt-1 was analyzed by Pearson. The serum CTRP3, CTRP9 and sFlt-1 levels of PE patients with different pregnancy outcomes were compared. **Results** The levels of

基金项目:江苏省重点研发计划资助项目(BE2018652)

作者单位:苏州大学附属第二医院妇产科,江苏,苏州 215000

\*通信作者:贾素红, E-mail:zhao657056liang24@163.com

CTRP3 and CTRP9 in the severe group were significantly lower than those in the mild group, sFlt-1 level was significantly higher than that in the mild group, and levels of TG, TC, LDL and HOMA-IR were significantly higher than those in the mild group ( $P < 0.05$ ). The levels of CTRP3 and CTRP9 were negatively correlated with TG, TC and HOMA-IR ( $P < 0.05$ ), while sFlt-1 level was positively correlated with TG, TC, LDL, and HOMA-IR ( $P < 0.05$ ). The incidence of adverse pregnancy outcomes in the mild group was significantly lower than that in the severe group (28.57% vs 51.43%) ( $P < 0.05$ ). The levels of CTRP3 and CTRP9 in PE patients with adverse pregnancy outcomes were significantly lower than those without adverse pregnancy outcomes, and the level of sFlt-1 was significantly increased, and the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The levels of peripheral blood CTRP3 and CTRP9 are closely related to disease severity and pregnancy outcomes in PE patients. The detection of the levels of the two is of positive significance for alleviating the progression of the disease and reducing the incidence of adverse pregnancy outcomes.

[KEY WORDS] Preeclampsia; CTRP3, CTRP9

子痫前期(preeclampsia, PE)指妊娠20周后,孕妇产生的蛋白尿、高血压、胰岛素抵抗及动脉粥样硬化等情况,为妊娠期常见并发症之一,发病率可达10%左右<sup>[1]</sup>。患者常伴有恶心呕吐、腹部不适等临床症状。PE如不及时干预可发展为重度子痫,导致全身多处器官损伤,严重威胁母婴健康,为导致孕妇死亡的第2原因<sup>[2]</sup>。目前临床对于PE的治疗主要通过控制病情延长孕周以改善母婴预后<sup>[3]</sup>。PE的发病机制尚未十分清楚,近年来越来越多研究表明,其与胰岛素抵抗、血管内皮功能及糖脂代谢异常密切相关<sup>[4]</sup>。通过合适的血清学指标对PE病情进行评估对于该疾病的临床治疗十分重要,然而临床尚缺乏特异性诊断指标。补体C1q/肿瘤坏死因子相关蛋白(C1q tumor necrosis factor related protein, CTRP)为脂肪因子超家族,研究表明其与脂联素结构具有相似性,可调节脂代谢,同时具有良好的抗炎作用,可有效地缓解动脉粥样硬化的发生,与糖脂代谢及胰岛素抵抗密切相关<sup>[5]</sup>。本研究拟对PE患者外周血血清CTRP3及CTRP9水平进行检测,分析二者与PE病情的相关性,现报告如下。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选取2018年10月至2019年12月本院妇产科收治的PE患者84例作为研究对象,其中轻度49例,重度35例。纳入标准:①符合《妇产科学》第八版<sup>[6]</sup>中相关PE诊断及分级标准:轻度、重度;②病史资料完整者;③无高血压、糖尿病史及其他出血性疾病史;④单胎妊娠且近期无手术史者;⑤近期末服用可能干扰本试验药物治疗者。排除标准:①存在严重肝、肾等脏器损伤患者;②传染性疾病及血液系统疾病患者;③合并内分

泌功能障碍者;④多胎妊娠、宫内感染、胎膜早破者。另选取本院同期健康体检孕妇40例纳入健康组。三组一般资料比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),见表1。本研究经本院医学伦理委员会批准通过,受试者自愿加入研究并签署知情同意书。

表1 3组一般资料比较( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Comparison of general data among 3 groups( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	年龄(岁)	BMI(kg/m <sup>2</sup> )	抽血孕周(周)	孕次(次)
健康组	40	29.32±3.12	21.51±2.15	32.85±2.45	1.88±0.34
轻度组	49	29.47±3.24	22.01±2.34	33.10±2.64	1.92±0.37
重度组	35	29.10±3.08	21.89±2.47	33.06±2.55	1.85±0.31
F值		0.140	0.538	0.116	0.435
P值		0.869	0.586	0.891	0.648

### 1.2 方法

#### 1.2.1 血样采集

所有患者及健康体检孕妇于清晨抽取空腹外周静脉血5 mL, 3 000 r/min离心10 min后用于相关指标检测。

#### 1.2.2 检测方法

①CTRP3及CTRP9、可溶性血管内皮生长因子受体1(soluble fms-like tyrosine kinase receptor 1, sFlt-1)水平采用酶联免疫吸附沉淀法,试剂盒购自上海西塘生物科技有限公司,严格按照试剂盒操作步骤进行检测。②甘油三酯(Triglyceride, TG)、血清总胆固醇(Serum total cholesterol, TC)、低密度脂蛋白胆固醇(Low Density Lipoprotein, LDL)水平采用Hitachi7170S全自动生化分析仪(日立公司)测定。

### 1.3 观察指标

①比较3组外周血血清CTRP3、CTRP9及sFlt-1水平差异;②比较3组外周血TG、TC、LDL水平差异;③根据是否发生不良妊娠情况将PE患者分为不良妊娠结局组及无不良妊娠结局组。其中不良妊娠



### 3 讨论

研究表明,脂肪因子广泛参与机体各种病理生理进程,如糖脂代谢、炎症反应等,对机体动态平衡过程有较好的调节作用<sup>[7]</sup>。大多数脂肪因子具有促炎作用,仅少数因子如CTRP蛋白家族具有抗炎作用,其中CTRP3通过对脂多糖及Toll受体结合的抑制作用,抑制炎症因子的表达,提高胰岛素敏感性,达到调节机体糖脂代谢的作用<sup>[8]</sup>。CTRP3通过抑制磷酸烯醇丙酮酸羧化激酶(Phosphoenolpyruvate carboxykinase, PEPCK)及葡萄糖-6磷酸酶(glucose-6-phosphatase, G6Pase)的生成速度抑制机体糖异生过程,达到降低血糖的效果<sup>[10]</sup>。现代研究认为PE为全身性炎症疾病,高水平CTRP3可通过对血管内皮细胞中黏附分子及巨噬细胞所产生细胞因子的抑制作用减轻炎症反应,缓解病情的进展<sup>[11]</sup>。

CTRP9与脂联素具有相似的生物学功能,主要由脂肪组织分泌。研究证实,CTRP9可通过AKT-ERK1/2通路激活骨骼肌细胞对葡萄糖的大量摄取以降低血糖<sup>[12]</sup>。动物研究表明,CTRP9转基因小鼠胰岛素抵抗水平明显减轻,其与AMPK信号通路增强加速脂肪酸氧化,机体代谢速率增加有关<sup>[13]</sup>。CTRP9还可通过影响炎症因子的表达影响机体代谢反应,利用慢病毒对CTRP9过表达小鼠巨噬细胞进行转染后,其胞内CTRP9水平明显升高而炎症因子水平明显降低<sup>[14]</sup>。sFlt-1可通过对血管内皮生长因子跨膜受体的阻断作用抑制血管内皮细胞生长。胎盘sFlt-1分泌过量可抑制血液循环中VEGF及PLGF与细胞表面受体结合,导致内皮功能紊乱,引起妊娠期高血压等疾病<sup>[15]</sup>。本研究结果显示,随着病情严重程度增加,PE患者sFlt-1水平明显升高,表明sFlt-1对PE的产生及进展可能存在一定影响。

本研究Pearson相关性分析表明PE患者TG、TC、HOMA-IR水平与CTRP3、CTRP9呈负相关,与sFlt-1呈正相关。PE患者TG、TC、LDL、HOMA-IR水平的异常反映了患者机体糖脂代谢紊乱,而CTRP3及CTRP9对血糖血脂具有良好的调控作用,CTRP3、CTRP9低表达为高血压高血脂产生的独立危险因素,进一步提示CTRP3、CTRP9可能通过对糖脂代谢的调控作用间接导致了PE的产生及进展。本研究结果提示利用三者对PE患者妊娠结局的预测可能具有一定的价值。

综上所述,PE患者外周血血清CTRP3、CTRP9

水平与病情严重程度及妊娠结局密切相关,CTRP3、CTRP9可能通过调控机体糖脂代谢参与PE的产生及进展过程。

### 参考文献

- [1] Alrahmani L, Willrich M A V. The Complement Alternative Pathway and Preeclampsia [J]. *Current Hypert Rep*, 2018, 20(5):40.
- [2] 黄海燕, 顾艳, 顾冬梅, 等. 母血、乳汁中CTRP3水平与重度子痫前期的相关性研究 [J]. *南通大学学报(医学版)*, 2020, 40(5): 450-452.
- [3] Henderson JT, Thompson JH, Burda BU, et al. Preeclampsia Screening: Evidence Report and Systematic Review for the US Preventive Services Task Force [J]. *JAMA*, 2017, 317(16): 1668-1683.
- [4] 李园园, 田晓予, 杨雪, 等. 子痫前期预测指标及症状前治疗的研究进展 [J]. *中国计划生育学杂志*, 2020, 28(5): 782-786.
- [5] Li Y, Wright GL, Peterson JM. C1q/TNF-Related Protein 3 (CTRP3) Function and Regulation [J]. *Comprehensive Physiology*, 2017, 7(3): 863-878.
- [6] 谢幸, 苟文丽. 妇产科学. 第8版 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2013:124-133.
- [7] Stern JH, Rutkowski JM, Scherer PE. Adiponectin, Leptin, and Fatty Acids in the Maintenance of Metabolic Homeostasis through Adipose Tissue Crosstalk [J]. *Cell Metab*, 2016, 23(5): 770-784.
- [8] Bai B, Ban B, Liu Z, et al. Circulating C1q complement/TNF-related protein (CTRP) 1, CTRP9, CTRP12 and CTRP13 concentrations in Type 2 diabetes mellitus: In vivo regulation by glucose [J]. *PLoS one*, 2017, 12(2).
- [9] Elsaid HH, Elgohary MN, Elshabrawy AM. Complement c1q tumor necrosis factor-related protein 3 a novel adipokine, protect against diabetes mellitus in young adult Egyptians [J]. *Diabetes Metab syndr*, 2018, 13(1): 434-438.
- [10] Moradi N, Fadaei R, Khamseh ME, et al. Serum levels of CTRP3 in diabetic nephropathy and its relationship with insulin resistance and kidney function [J]. *PLoS One*, 2019, 14(4).
- [11] Amraoui F, Spijkers L, Hassani LH, et al. SFlt-1 elevates blood pressure by augmenting endothelin-1-mediated vasoconstriction in mice [J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): e91897.
- [12] Li J, Zhang P, Li T, et al. CTRP9 enhances carotid plaque stability by reducing pro-inflammatory cytokines in macrophages [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 458(4): 890-895.
- [13] Forouhi N, Saedisomeolia A, Djalali M, et al. Serum C1q and tumor necrosis factor (TNF)-related protein 9 in women with Polycystic Ovary Syndrome [J]. *Diabet Metab syndr*, 2016, 10(2): S131-S134.
- [14] Aksin Ş, Andan C. Protein-9 (CTRP9) levels associated with C1q tumor necrosis factor in obese preeclamptic, non-obese preeclamptic, obese and normal pregnant women [J]. *J Matern Fetal Neonat Med*, 2020, 42(1): 1-8.
- [15] Acar D, Tayyar A, Yuksel A, et al. Increased maternal C1q/TNF-related protein-1 (CTRP-1) serum levels in pregnancies with preeclampsia [J]. *J maternal-fetal neonat med*, 2020, 33(4): 639-644.

## SOD、TGF- $\beta$ 1、Vasohibin-1 在口腔鳞状细胞癌诊断及预后评估中的价值

班晨\* 王钟华 安峰

**[摘要]** 目的 探讨超氧化物歧化酶(SOD)、转化生长因子(TGF- $\beta$ 1)联合血管生成抑制蛋白-1(VASH-1)检测在口腔鳞状细胞癌诊断、预后评估中的价值。方法 选取2015年5月至2018年5月本院收治的70例口腔黏膜鳞状细胞癌患者,取上述患者口腔鳞状细胞癌组织标本70份(观察组)及距离肿瘤2 cm的癌旁正常组织(对照组)。对比SOD、TGF- $\beta$ 1、VASH-1在不同组织中的表达情况,分析三者与患者病理特征的关系。对纳入研究的对象随访2年,分析影响患者2年预后死亡的相关危险因素。结果 观察组SOD低表达率、TGF- $\beta$ 1高表达率、Vasohibin-1阳性表达率均明显高于对照组,差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。SOD、TGF- $\beta$ 1、Vasohibin-1表达与口腔鳞状细胞癌患者临床分期、淋巴结转移、分化程度、肿瘤大小有关( $P<0.05$ )。SOD低表达、TGF- $\beta$ 1高表达及VASH-1表达阳性的患者死亡率更高( $P<0.05$ )。TNM(Ⅲ~Ⅵ期)、有淋巴结转移、分化程度(中-低分化)、肿瘤大小( $\geq 2$  cm)、SOD(低表达)、TGF- $\beta$ 1(高表达)、VASH-1(阳性表达)为影响口腔鳞状细胞癌患者2年预后生存的独立危险因素( $P<0.05$ )。结论 SOD、TGF- $\beta$ 1、Vasohibin-1联合检测可显著提高口腔鳞状细胞癌诊断率,三者表达水平可作为了解患者病情发展、评估术后转归的重要指标。

**[关键词]** SOD; TGF- $\beta$ 1; Vasohibin-1; 口腔鳞状细胞癌

### Value of SOD, TGF- $\beta$ 1, vasohibin-1 in the diagnosis and prognosis evaluation of oral squamous cell carcinoma

BAN Chen\*, WANG Zhonghua, AN Feng

(Department of Stomatology, the First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou, Hebei, China, 075000)

**[ABSTRACT]** **Objective** To explore the value of superoxide dismutase (SOD), transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) combined with vasohibin-1 (VASH-1) in the diagnosis and evaluation of prognosis of oral squamous cell carcinoma. **Method** 70 patients with oral mucosal squamous cell carcinoma who were admitted to our hospital from May 2015 to May 2018 May were selected. Seventy specimens of oral squamous cell carcinoma in the above patients (observation group) and normal tissue adjacent to the cancer 2cm away from the tumor (control group) were taken. The expressions of SOD, TGF- $\beta$ 1, and VASH-1 in different tissues were compared, and the relationship between the three and the pathological characteristics of patients was analyzed. The subjects included in the study were followed up for 2 years. The related risk factors that affect the 2-year prognostic death of patients were analyzed. **Result** The low expression rate of SOD, the high expression rate of TGF- $\beta$ 1, and the positive expression rate of vasohibin-1 in the observation group were significantly higher than those in the control group, the difference is statistically significant ( $P<0.05$ ). The expression of SOD, TGF- $\beta$ 1, vasohibin-1 was related to the clinical stage, lymph node metastasis, differentiation degree and tumor sizes in patients with oral squamous cell carcinoma ( $P<0.05$ ). The mortality of patients

基金项目:张家口市2020年市级科技计划自筹经费项目(2021054D)

作者单位:河北北方学院附属第一医院口腔科,河北,张家口 075000

\*通信作者:班晨, E-mail: li916406zhang825@163.com

with low SOD expression, high TGF- $\beta$ 1 expression and positive VASH-1 expression was higher ( $P < 0.05$ ). TNM (stage III~VI), lymph node metastasis, degree of differentiation (medium-low differentiation), tumor size ( $\geq 2$  cm), SOD (low expression), TGF- $\beta$ 1 (high expression), VASH-1 (positive expression) were independent risk factors that affect the 2-year prognostic survival patients with oral squamous cell carcinoma ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The combined detection of SOD, TGF- $\beta$ 1, and vasohibin-1 can significantly improve the diagnosis rate of oral squamous cell carcinoma. The levels of the three can be used as important indicators in understanding the patient's disease development and evaluating postoperative outcome.

**[KEY WORDS]** SOD; TGF- $\beta$ 1; Vasohibin-1; Oral squamous cell carcinoma

口腔鳞状细胞癌死亡率较高,是威胁人类健康的恶性肿瘤之一。该病发病机制尚未明确,较多学者研究指出口腔癌的发生多与患者不良饮食习惯有关<sup>[1]</sup>。目前口腔鳞状细胞癌的发生及病程中相关分子机制的认识尚不够深入,导致临床诊断率不理想,因此寻找新的生物标志物对提高口腔鳞状细胞癌的诊断率,改善患者预后意义重大。已有研究证实,转化生长因子(Transforming growth factor- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 1)参与了肿瘤复发、浸润和转移过程中的关键环节<sup>[2]</sup>。血管生成抑制蛋白-1(Vasohibin-1, VASH-1)在乳腺癌、胃癌等恶性肿瘤中呈高表达状态已得到较多研究证实<sup>[3-4]</sup>,而VASH-1与口腔鳞状细胞癌的关系研究报道较少。超氧化物歧化酶(Superoxide Dismutase, SOD)是近年来受广大学者关注的标志物之一,有研究指出SOD与恶性肿瘤生物学行为存在显著相关性<sup>[5]</sup>。本研究旨在探讨SOD、TGF- $\beta$ 1联合VASH-1检测在口腔鳞状细胞癌诊断、预后评估中的价值,现报告如下。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

对2015年5月至2018年5月本院收治的口腔黏膜鳞状细胞癌患者的临床资料进行整理、分析。纳入标准:①所有患者均经手术或穿刺活检结合影像学检查(显微镜下可见增生的上皮突破基膜向深层浸润形成不规则条索形癌巢),证实为口腔鳞状细胞癌<sup>[6]</sup>;②影像资料、临床资料完整;③纳入研究前未进行过放、化疗治疗。排除标准:①合并其他恶性肿瘤及重要器官严重疾病者;②阿尔兹海默症者、精神障碍者。

根据纳入排除标准纳入70例患者(70份口腔黏膜鳞状细胞癌标本,设为观察组)。其中男40例,女30例;平均年龄(55.73 $\pm$ 3.51)岁;根据TNM分期<sup>[7]</sup>分为I~II期42例,III~VI期28例;组织学分化程度:中-高分化33例,低分化37例。同时选取上述患者

的癌旁正常组织(距癌组织3 cm处)设为对照组。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 SOD、TGF- $\beta$ 1检测方法

纳入研究的对象均在次日清晨空腹抽取静脉血3 mL,离心10 min,分离血清及血浆,样本置于-20 $^{\circ}$ C下保存待检。采用酶联免疫吸附法检测SOD、TGF- $\beta$ 1水平。相关试剂盒采购于北京中杉金桥生物技术有限公司。SOD参考范围值:242~620 U/L, >620 U/L视为高表达<sup>[8]</sup>;TGF- $\beta$ 1参考范围值:140~183 pg/mL, >183 pg/mL视为高表达<sup>[9]</sup>。

#### 1.2.2 VASH-1检测方法

采用S-P免疫组化染色,将口腔黏膜鳞状细胞癌标本和癌旁正常组织标本经常规石蜡切片、脱水,对VASH-1进行检测,整个实验操作过程严格按照说明进行,检测完成后由2位高年资医师采用双盲法阅片。兔抗人VASH-1多克隆抗体采购自圣克鲁生物技术(上海)有限公司。

### 1.3 VASH-1阳性判定标准

VASH-1阳性判断标准<sup>[10]</sup>:肿瘤细胞胞质或细胞核中出现棕黄色或棕褐色颗粒。染色强度评分:0分(无色)、1分(淡黄色)、2分(棕黄色)、3分(棕褐色);根据两者相乘结果进行评判:小于3分(-)、3分(+)、4分(++)、5分(+++)。阳性率=阳性例数/总例数 $\times$ 100%。

### 1.4 随访

本研究随访从患者术后开始,以患者死亡或本研究的随访时间结束(截止时间:2020年5月)。随访时间分布在5~48个月,平均随访时间(20.12 $\pm$ 2.55)个月(方式:来院复查及电话随访)。

### 1.5 统计学方法

采用SPSS 22.0软件进行统计分析,计量资料采用( $\bar{x} \pm s$ )描述,采用 $t$ 检验;计数资料通过 $n(\%)$ 表示,采用 $\chi^2$ 检验;采用多元Logistic回归分析影响口腔鳞状细胞癌患者2年预后生存的相关危险因素;以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

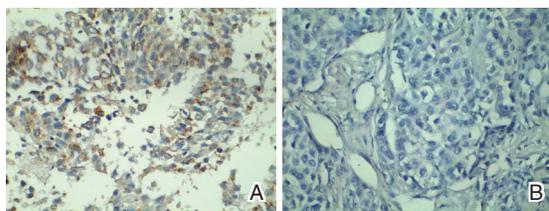
### 2.1 SOD、TGF-β1、VASH-1在不同组织中的表达情况

观察组 SOD 低表达率、TGF-β1 高表达率、Vasohibin-1 阳性表达率均明显高于对照组差异有统计学意义( $P<0.05$ )。见表1、图1。

表1 SOD、TGF-β1、VASH-1在不同组织中的表达情况 [n(%)]

Table 1 expression of SOD, TGF-β1 and vash-1 in different tissues [n(%)]

组别	n	SOD		TGF-β1		VASH-1	
		高表达	低表达	高表达	低表达	阳性	阴性
观察组	70	29(41.43)	41(58.57)	45(64.29)	25(35.71)	41(58.57)	29(41.43)
对照组	70	55(78.57)	15(21.43)	12(17.14)	58(82.86)	17(24.29)	53(85.86)
χ <sup>2</sup> 值		20.119		32.226		16.955	
P值		<0.001		<0.001		<0.001	



注:A: VASH-1 阳性表达; B: VASH-1 阴性表达。

图1 免疫组化染色图 (SP, ×500)

Figure 1 immunohistochemical staining (SP, ×500)

### 2.3 口腔鳞状细胞癌患者不同 SOD、TGF-β1、VASH-1 表达的预后情况

随访结果显示: 70例口腔鳞状细胞癌患者2年生存率为35.71%(25/70), SOD低表达、TGF-β1高表达及VASH-1表达阳性的患者死亡率更高( $P<0.05$ )。见表3。

### 2.4 影响口腔鳞状细胞癌2年预后生存的单多因素

TNM(Ⅲ~Ⅵ期)、有淋巴结转移、分化程度(中-

### 2.2 SOD、TGF-β1、VASH-1与口腔鳞状细胞癌病情进展的关系

SOD、TGF-β1、VASH-1表达水平与口腔鳞状细胞癌患者年龄、性别无相关性( $P>0.05$ ), 与口腔鳞状细胞癌患者临床分期、淋巴结转移、分化程度、肿瘤大小呈正相关( $P<0.05$ )。见表2。

表3 口腔鳞状细胞癌患者不同 SOD、TGF-β1、Vasohibin-1 表达的预后情况 [n(%)]

Table 3 prognosis of patients with oral squamous cell carcinoma with different expressions of SOD, TGF-β1 and vasohibin-1 [n(%)]

指标	不同表达	n	生存(n=25)	死亡(n=45)	χ <sup>2</sup> 值	P值
SOD	低表达	41	8(32.00)	33(73.33)	11.315	<0.001
	高表达	29	17(68.00)	12(26.67)		
TGF-β1	低表达	25	20(80.00)	5(11.11)	33.220	<0.001
	高表达	45	5(20.00)	40(88.89)		
VASH-1	阴性	29	22(88.00)	7(15.56)	34.760	<0.001
	阳性	41	3(12.00)	38(84.44)		

低分化)、肿瘤大小( $\geq 2$  cm)、SOD(低表达)、TGF-β1(高表达)、VASH-1(阳性表达)为影响口腔鳞状细胞癌患者2年预后生存的独立危险因素( $P<0.05$ )。见表4。

表2 SOD、TGF-β1、VASH-1与口腔鳞状细胞癌病情进展的关系

Table 2 Relationship between SOD, TGF-β1, vash-1 and progression of oral squamous cell carcinoma [n(%)]

病理参数	n	SOD		χ <sup>2</sup> 值	P值	TGF-β1		χ <sup>2</sup> 值	P值	VASH-1		χ <sup>2</sup> 值	P值	
		高表达 (n=29)	低表达 (n=41)			高表达 (n=45)	低表达 (n=25)			阳性 (n=41)	阴性 (n=29)			
年龄(岁)	≥65	39	14(48.28)	25(60.98)	1.110	0.292	27(60.00)	12(48.00)	0.938	0.333	25(60.78)	14(48.28)	1.110	0.292
	<65	31	15(51.75)	16(39.02)			18(40.00)	13(52.00)			16(39.02)	15(51.75)		
性别(例)	男	40	18(62.07)	22(53.66)	0.491	0.484	25(55.56)	15(60.00)	0.130	0.719	22(53.66)	18(62.07)	0.491	0.484
	女	30	11(37.93)	19(46.34)			20(44.44)	10(40.00)			19(46.34)	11(37.93)		
临床分期	I~II期	42	22(75.86)	20(48.78)	5.191	0.023	22(48.89)	20(80.00)	6.481	0.011	20(48.78)	22(75.86)	5.191	0.023
	III~VI期	28	7(2.41)	21(51.22)			23(51.11)	5(20.00)			21(51.22)	7(24.14)		
淋巴结转移	有	31	7(2.41)	24(58.54)	8.146	0.004	25(55.56)	6(24.00)	6.486	0.011	24(58.54)	7(24.14)	8.146	0.004
	无	39	22(75.86)	17(41.46)			20(44.44)	19(76.00)			17(41.46)	22(75.86)		
分化程度	中-高分化	33	20(68.97)	13(31.1)	9.463	0.002	15(33.33)	18(72.00)	9.643	0.002	13(31.71)	20(68.97)	9.463	0.002
	低分化	37	9(31.03)	28(68.29)			30(66.67)	7(28.00)			28(68.29)	9(31.03)		
肿瘤大小(cm)	≥2	37	8(27.59)	29(70.73)	12.689	0.001	31(68.89)	6(24.00)	12.996	<0.001	29(70.73)	8(27.59)	12.689	<0.001
	<2	33	21(7.24)	12(29.27)			14(31.11)	19(76.00)			12(29.27)	21(72.41)		

表4 影响口腔鳞状细胞癌2年预后生存的单多因素

Table 4 single and multiple factors influencing 2-year prognosis and survival of oral squamous cell carcinoma

变量	单因素分析			多因素分析		
	OR 值	95%CI	P 值	OR 值	95%CI	P 值
年龄(≥65岁 vs <65)	1.656	0.410~1.624	0.830	-	-	-
性别(男 vs 女)	1.568	0.567~1.598	0.705	-	-	-
TNM(Ⅲ~Ⅵ期 vs Ⅰ~Ⅱ期)	1.798	1.517~1.94	0.028	1.258	1.467~1.339	0.028
淋巴结转移(有 vs 无)	1.628	1.385~1.756	0.001	1.368	1.231~1.992	<0.001
分化程度(中-低分化 vs 高分化)	1.627	1.527~1.857	0.011	1.586	1.324~1.885	0.025
肿瘤大小(≥2 cm vs <2 cm)	1.524	1.285~1.685	0.014	1.356	1.254~1.758	0.021
SOD(低表达 vs 高表达)	1.268	1.235~1.456	0.019	1.354	1.372~1.698	<0.001
TGF-β1(高表达 vs 低表达)	1.358	1.342~1.568	0.001	1.647	1.247~1.654	0.034
VASH-1(阳性表达 vs 阴性表达)	1.425	1.458~1.687	0.023	1.221	1.247~1.657	<0.001

### 3 讨论

提高口腔鳞状细胞癌的早期诊断率,对改善患者预后,延长其生存期至关重要。而寻找口腔鳞状细胞癌发生、发展中的重要基因及相互作用蛋白,是防治肿瘤生长及增殖的重点和热点之一。本研究结果显示:在口腔鳞状细胞癌组织中,SOD表达水平要明显低于癌旁正常组织。由此可知,在口腔鳞状细胞癌发生、发展的过程中SOD表达量发生显著变化。研究结果显示,SOD表达水平低的患者预后死亡率更高,这一研究结果与Madhuresh K等<sup>[11]</sup>学者报道结果一致。

TGF-β1是由Treg细胞分泌产生的细胞因子,它通过参与多种免疫细胞的调控作用下调机体免疫应答反应。既往研究表明,TGF-β1在宫颈癌、乳腺癌等恶性肿瘤中均呈高表达状态<sup>[12]</sup>。国外较多文献证实<sup>[13]</sup>,上皮间质转化为上皮来源肿瘤的侵袭、转移提供了条件。本研究发现,在有淋巴结转移、TNM(Ⅲ~Ⅵ期)、分化程度(中-低分化)、肿瘤大小(≥2 cm)的口腔鳞状细胞癌患者中,TGF-β1呈高表达状态,这一研究结果与既往文献报道结果一致<sup>[14]</sup>。

随着广大学者对肿瘤抗血管治疗方面的基础及相关研究逐渐重视,发现VASH-1参与调控肿瘤内皮细胞血管生成因子的生成和释放,对肿瘤的发生、发展、转移起重要作用<sup>[15]</sup>。本研究结果显示,口腔鳞状细胞癌组织中VASH-1阳性表达率显著高于癌旁正常组织,且发现VASH-1的表达与患者病理特征密切相关。通过对口腔鳞状细胞癌患者进行术后随访,结果发现VASH-1阳性表达的患者生存率要明显低于阴性表达的患者,因此推断VASH-1可作为检测口腔鳞状细胞癌发生、发展的潜在标志物,并可作为评估患者病情发展、术后转

归的重要指标。

综上所述,联合SOD、TGF-β1、Vasohibin-1三者检测,可显著提高口腔鳞状细胞癌诊断率,三者可作为了解患者病情发展、评估术后转归的重要指标,为早发现、早诊断、早治疗口腔鳞状细胞癌开辟新思路。后续将完善研究方法,扩大病例样本、延长研究时间,以了解SOD、TGF-β1、Vasohibin-1不同表达对口腔鳞状细胞癌患者远期生存率的影响。

### 参考文献

- [1] 戴德华,陈胡杰,王璇,等.舌鳞状细胞癌组织中COX-2, VEGF, MMP-9和Bcl-2表达水平及临床意义[J].解放军医药杂志, 2017, 4(29):18-21.
- [2] Grauzan S, Brock AM, Holmes CO, et al. NEDD9 stimulated MMP9 secretion is required for invadopodia formation in oral squamous cell carcinoma[J]. Oncotarget, 2018, 9(39): 25503-25516.
- [3] 郝媛媛,程亮亮,于显凤.同步放化疗联合泰欣生治疗进展期食管癌的临床疗效及安全性分析[J].保健医学研究与实践, 2019, 16(4):64-70.
- [4] Singh P, Srivastava AN, Sharma R, et al. Circulating MicroRNA-21 Expression as a Novel Serum Biomarker for Oral Sub-Mucous Fibrosis and Oral Squamous Cell Carcinoma[J]. Apjcp, 2018, 19(4):1053-1057.
- [5] Stewart M, Topf MC, Curry JM, et al. Oral Squamous Cell Carcinoma in Young Patients-A Case-Control Analysis[J]. Int J Radiat Res, 2018, 100(5):1356-1357.
- [6] 张凯,薛惠英,张雪芹. TGF-β1, MMP-3及Collagen III在POP患者子宫主韧带组织中的表达及意义[J].分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(1):39-43.
- [7] Bhuyan L, Sarangi S, Das BK, et al. Proliferative Index in Invasive Tumor Front of Oral Squamous Cell Carcinoma: A Potential Prognostic Indicator [J]. J Contemp Dent Pract, 2018, 19(2):170-176.

# 新型金属蛋白酶 ADAMTS 家族在缺血性脑血管疾病中的诊断价值

张霞军\* 袁红萍 谭俊华

**[摘要]** **目的** 探究含 I 型血小板结合蛋白基序的解聚蛋白样金属蛋白酶(ADAMTS)家族在缺血性脑血管疾病(ICVD)中的诊断价值。**方法** 选取本院 ICVD 患者 104 例为观察组[急性脑梗死(ACI) 70 例、短暂性脑缺血发作(TIA) 34 例], 同期健康体检者 52 例为对照组。比较两组血清 ADAMTS 家族指标(ADAMTS-1、ADAMTS-4、ADAMTS-12、ADAMTS-13)水平, 对比观察组 ACI 与 TIA 患者 ADAMTS 家族指标水平, 以及与美国国立卫生院卒中量表(NIHSS)评分关系, 分析其对 ACI、TIA 的鉴别诊断价值。**结果** 观察组血清 ADAMTS-1、ADAMTS-4、ADAMTS-12 水平高于对照组, 与 NIHSS 评分呈正相关( $r=0.872、0.870、0.754$ ), ADAMTS-13 水平低于对照组与 NIHSS 评分呈负相关( $r=-0.807$ ), 差异有统计学意义( $P<0.05$ ); 血清 ADAMTS 家族各指标对 ICVD 的诊断 AUC 分别为 0.797、0.785、0.829、0.732, 联合诊断敏感度为 86.54%、特异度为 80.77%; 观察组 ACI 与 TIA 患者血清 ADAMTS-1、ADAMTS-4、ADAMTS-12、ADAMTS-13 水平比较, 差异有统计学意义( $P<0.05$ ); 血清 ADAMTS 家族各指标联合鉴别诊断 ACI、TIA 的 AUC 最大为 0.901, 高于任一指标单独诊断。**结论** 新型金属蛋白酶 ADAMTS 家族可作为 ICVD 高危人群筛选标志, 对 TIA、ACI 鉴别诊断有较高应用价值。

**[关键词]** 新型金属蛋白酶; 急性脑梗死; 短暂性脑缺血发作

## Diagnostic value of novel metalloproteinase ADAMTS family in ischemic cerebral vascular disease

ZHANG Xiajun\*, YUAN Hongping, TAN Junhua

(Department of Clinical Laboratory, Danyang People's Hospital of Jiangsu Province, Danyang, Jiangsu, China, 212300)

**[ABSTRACT]** **Objective** To explore the diagnostic value of a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type 1 motifs (ADAMTS) family in ischemic cerebral vascular disease (ICVD). **Methods** 104 cases of ICVD patients in our hospital were selected as the observation group [70 cases of acute cerebral infarction (ACI), 34 cases of transient ischemic attack (TIA)], and 52 cases of healthy physical examination during the same period were selected as the control group. The serum levels of ADAMTS family indicators (ADAMTS-1, ADAMTS-4, ADAMTS-12, and ADAMTS-13) were compared between the two groups. The ADAMTS family index levels of patients with ACI and TIA in the observation group were compared, and the relationship with the National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS) score was compared, and its value in the differential diagnosis of ACI and TIA was analyzed. **Results** The serum levels of ADAMTS-1, ADAMTS-4, and ADAMTS-12 in the observation group were higher than those in the control group, and were positively correlated with the NIHSS score ( $r=0.872, 0.870, 0.754$ ). The ADAMTS-13 level lower than the control group was negatively correlated with the NIHSS score ( $r=-0.807$ ), and the difference was statistically significant ( $P<0.05$ ). The AUC of the serum ADAMTS family indicators for the diagnosis of ICVD were 0.797,

基金项目: 苏州市临床重点病种诊疗技术专项项目(LCZX201513)

作者单位: 江苏省丹阳市人民医院检验科, 江苏, 丹阳 212300

\*通信作者: 张霞军, E-mail: lipingshi2021@163.com

0.785, 0.829, 0.732, respectively. The sensitivity of combined diagnosis was 86.54% and the specificity was 80.77%. There were statistically significant differences in serum ADAMTS-1, ADAMTS-4, ADAMTS-12, and ADAMTS-13 levels between ACI and TIA patients in the observation group ( $P < 0.05$ ). The maximum AUC of the combined differential diagnosis of ACI and TIA by serum ADAMTS family indicators was 0.901, which was higher than any single indicator diagnosis. **Conclusion** The ADAMTS family of novel metalloproteinases can be used as screening markers for high-risk groups of ICVD, and has high application value in the differential diagnosis of TIA and ACI.

**[KEY WORDS]** Novel metalloproteinase; Acute cerebral infarction; Transient ischemic attack

缺血性脑血管疾病(Ischemic cerebral vascular disease, ICVD)为世界范围内位于第二位的致死性疾病,主要包括急性脑梗死(Acute cerebral infarction, ACI)、短暂性脑缺血发作(Transient ischemic attack, TIA)。前者多需行血管内介入治疗,后者保守治疗即可痊愈,但二者早期症状相似且常规影像学无明显特征<sup>[1-2]</sup>。近年来,随着研究不断深入,发现含I型血小板结合蛋白基序的解聚蛋白样金属蛋白酶(A disintegrin and metallo-proteinase with thrombospondin motifs, ADAMTS)参与ICVD发病发展过程,对斑块稳定性产生一定影响<sup>[3]</sup>。研究新型金属蛋白酶ADAMTS家族水平或可为临床鉴别诊断TIA、ACI提供参考。本研究初次尝试分析ADAMTS家族在缺血性脑血管疾病(ICVD)中的诊断价值,旨在为完善临床诊疗机制提供参考。

## 1 资料与方法

### 1.1 研究对象及选取标准

选取本院2017年2月至2020年5月缺血性脑血管病患者104例作为观察组,包括急性脑梗死(ACI)患者70例、短暂性脑缺血发作(TIA)患者34例;另选同期健康体检者52例作为对照组。纳入标准:①观察组经头颅CT、血管造影检查确诊;②近2周内未服用影响凝血、纤溶系统药物。排除标准:①无症状性脑梗死;②脑血管病家族史;③伴有脑外伤、脑动脉瘤及出血性疾病者;④伴有急性冠脉综合征、外周血管病者。其中观察组男55例,女49例,年龄平均(56.56±6.69)岁。对照组男29例,女23例,年龄平均(57.82±6.15)岁。两组性别、年龄比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。研究经本院伦理委员会审核评议同意,所有研究对象均知情,并签订同意书。

### 1.2 方法

于清晨采集观察组患者治疗前和对照组空腹

静脉血4 mL,离心取血清,采用残余胶原结合实验(R-CBA)测定受检者血清ADAMTS-1、ADAMTS-4、ADAMTS-12、ADAMTS-13水平。

### 1.3 观察指标

①比较两组血清ADAMTS家族指标水平。②血清ADAMTS家族指标水平对ICVD的诊断价值。③观察组ACI、TIA患者血清ADAMTS家族指标水平。④分析观察组血清ADAMTS家族指标与NIHSS评分相关性<sup>[4]</sup>。⑤分析血清ADAMTS家族指标与ACI发生的关系,以是否发生ACI、TIA作为因变量(未发生=0,发生=1),将合并高脂血症、高Hcy血症、血清ADAMTS-1、ADAMTS-4、ADAMTS-12、ADAMTS-13作为自变量(合并高脂血症:否=0,是=1;合并高Hcy血症:否=0,是=1;血清ADAMTS-1、ADAMTS-4、ADAMTS-12、ADAMTS-13以观察组所有ICVD患者平均值为界:(≤平均值=1, >平均值=2)。⑥血清ADAMTS家族指标对ACI与TIA的鉴别诊断价值。

### 1.4 统计学分析

采用统计学软件SPSS 19.0处理数据;计数资料以 $n(\%)$ 描述,采用 $\chi^2$ 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Pearson相关系数模型;预测效能分析采用ROC曲线,获取曲线下面积不同预测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,返回预测概率 $\text{logit}(p)$ ,将其作为独立检验变量。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 两组血清ADAMTS家族指标水平比较

观察组血清ADAMTS-1、ADAMTS-4、ADAMTS-12水平高于对照组,ADAMTS-13水平低于对照组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表1。

表1 两组血清 ADAMTS 家族指标水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Comparison of serum ADAMTS family index levels between 2 groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	ADAMTS-1 (ng/mL)	ADAMTS-4 (ng/mL)	ADAMTS-12 (ng/mL)	ADAMTS-13 (ng/mL)
观察组	104	32.31±10.14	96.47±25.17	48.23±16.01	37.69±10.03
对照组	52	11.06±3.62	50.29±13.59	14.27±4.74	58.72±15.46
t值		14.633	12.348	14.950	10.232
P值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

2.2 血清 ADAMTS 家族指标水平对 ICVD 的诊断价值

ADAMTS-1、ADAMTS-4、ADAMTS-12、ADAMTS-13 敏感度为 86.54%，特异度为 80.77%，优于各指标单独诊断，差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 2。

2.3 观察组 ACI 与 TIA 患者临床资料、血清 ADAMTS 家族指标水平比较

观察组 ACI 与 TIA 患者合并高脂血症、高 Hcy 血症、NIHSS 评分、血清 ADAMTS-1、ADAMTS-4、ADAMTS-12、ADAMTS-13 水平比较，差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 3。

2.4 观察组血清 ADAMTS 家族指标与 NIHSS 评分相关性

观察组血清 ADAMTS-1、ADAMTS-4、ADAMTS-12 与 NIHSS 评分呈正相关 ( $r = 0.872, 0.870, 0.754, P < 0.05$ )，ADAMTS-13 与 NIHSS 评分呈负相关 ( $r = -0.807, P < 0.05$ )。见图 1。

2.5 血清 ADAMTS 家族指标与 ACI、TIA 相关性

Logistic 回归分析，血清 ADAMTS-1、ADAMTS-4、ADAMTS-12、ADAMTS-13 与 ACI、TIA 发生显著相关，差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 4。

表2 血清 ADAMTS 家族指标对 ICVD 的诊断价值

Table 2 The diagnostic value of serum ADAMTS family indicators for ICVD

指标	AUC	95%CI	Z值	截断值	截断值敏感度(%)	截断值特异度(%)	P值
ADAMTS-1	0.797	0.726-0.857	8.574	>22.30 ng/mL	65.38	88.46	<0.001
ADAMTS-4	0.785	0.713-0.847	7.842	>67.99 ng/mL	75.00	73.08	<0.001
ADAMTS-12	0.829	0.760-0.884	10.013	>33.14 ng/mL	70.19	90.38	<0.001
ADAMTS-13	0.732	0.655-0.800	5.140	≤56.12 ng/mL	95.19	44.23	<0.001
联合	0.883	0.822-0.929	11.320	-	86.54	80.77	<0.001

表3 观察组 ACI 与 TIA 患者临床资料比较 [ $n(\%)$ , ( $\bar{x} \pm s$ )]

Table 3 Comparison of clinical data between ACI and TIA patients in the observation group [ $n(\%)$ , ( $\bar{x} \pm s$ )]

资料	ACI 患者 (n=70)	TIA 患者 (n=34)	t/χ² 值	P 值
年龄(岁)	57.49±6.12	55.63±7.26	1.367	0.175
性别	男	19(55.88)	0.182	0.670
	女	34(48.57)		
BMI(kg/m²)	25.13±1.71	24.85±1.88	0.758	0.450
合并高血压	是	17(50.00)	0.301	0.584
	否	31(44.29)		
合并高脂血症	是	12(35.29)	13.521	<0.001
	否	19(27.14)		
合并高 Hcy 血症	是	13(38.24)	6.296	0.012
	否	25(35.71)		
NIHSS 评分(分)	9.84±2.45	5.05±1.12	10.843	<0.001
血清 ADAMTS 家族指标 (ng/mL)	ADAMTS-1	48.76±15.46	8.565	<0.001
	ADAMTS-4	110.88±30.12	7.911	<0.001
	ADAMTS-12	62.47±20.20	5.734	<0.001
	ADAMTS-13	26.24±8.34	8.209	<0.001

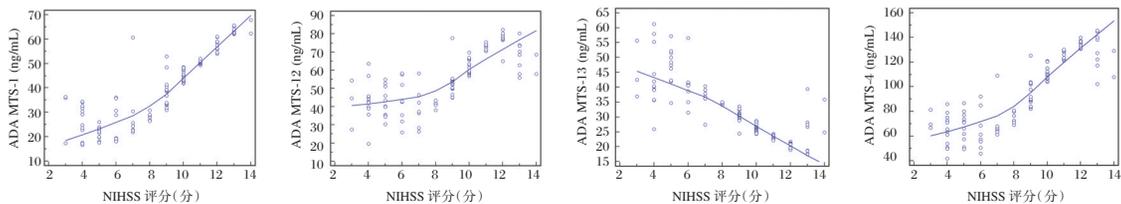


图1 观察组血清 ADAMTS 家族指标与 NIHSS 评分相关性

Figure 1 The correlation between serum ADAMTS family indicators and NIHSS score in the observation group

表4 血清 ADAMTS 家族指标与 ACI、TIA 发生的关系

Table 4 The relationship between serum ADAMTS family indicators and the occurrence of ACI、TIA

变量	ACI					TIA						
	$\beta$ 值	S.E.值	Wald $\chi^2$ 值	OR值	95%CI	P值	$\beta$ 值	S.E.值	Wald $\chi^2$ 值	OR值	95%CI	P值
ADAMTS-1	1.498	0.429	12.188	4.471	2.467~8.104	<0.001	1.190	0.398	8.939	3.287	1.726~6.259	<0.001
ADAMTS-4	1.968	0.514	14.665	7.159	3.602~14.228	<0.001	1.765	0.527	11.219	5.843	2.803~12.178	<0.001
ADAMTS-12	1.746	0.480	13.225	5.729	3.049~10.765	<0.001	1.527	0.469	10.595	4.603	2.457~8.622	<0.001
ADAMTS-13	-0.565	0.163	11.999	0.569	0.372~0.869	<0.001	-0.878	0.286	9.430	0.416	0.215~0.803	<0.001

注:因NIHSS评分与ADAMTS-1、ADAMTS-4、ADAMTS-12、ADAMTS-13相关系数 $r$ 均>0.7,共同纳入Logistic回归方程时多重共线性较强,故将NIHSS评分剔除。

### 2.6 血清 ADAMTS 家族指标对 ACI 与 TIA 的鉴别诊断价值

ADAMTS - 1、ADAMTS - 4、ADAMTS - 12、

ADAMTS-13联合诊断的敏感度为84.29%,特异度为82.35%,优于各指标单独诊断,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),见表5、图2。

表5 血清 ADAMTS 家族指标对 ACI 与 TIA 的鉴别诊断价值

Table 5 The value of serum ADAMTS family indicators in the differential diagnosis of ACI and TIA

指标	AUC	95%CI	Z值	截断值	截断值敏感度(%)	截断值特异度(%)	P值
ADAMTS-1	0.807	0.718~0.878	7.026	>33.70 ng/mL	77.14	82.35	<0.001
ADAMTS-4	0.805	0.716~0.877	6.759	>73.52 ng/mL	90.00	61.76	<0.001
ADAMTS-12	0.837	0.751~0.902	8.488	>50.22 ng/mL	78.57	79.41	<0.001
ADAMTS-13	0.792	0.701~0.865	6.201	≤33.06 ng/mL	67.14	79.41	<0.001
联合	0.901	0.827~0.951	13.436	-	84.29	82.35	<0.001

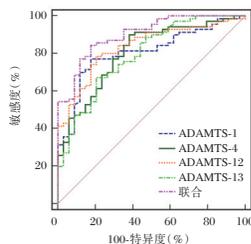


图2 血清 ADAMTS 家族指标对 ACI 与 TIA 的诊断价值  
Figure 2 The value of serum ADAMTS family indicators in the differential diagnosis of ACI and TIA

### 3 讨论

国内外研究发现<sup>[5-6]</sup>,ADAMTS 家族与心脑血管系统多种疾病发生、发展密切相关,其有望成为心脑血管疾病的标志蛋白及药物治疗靶点。本研究结果发现,ICVD 患者血清 ADAMTS-1、ADAMTS-4、ADAMTS-12 水平呈高表达,血清 ADAMTS-13 水平呈低表达。分析其原因,ADAMTS-1 通过酶解血管基质蛋白,促进血管平滑肌增殖与移位,进而参与动脉血管壁损伤;ICVD 患者应激状态下,ADAMTS-4 可从平滑肌细胞中移位至细胞核,参与平滑肌细胞凋亡,破坏血管功能及血管结构完整性。Ren P 等<sup>[7]</sup>研究也指出,敲除 ADAMTS-4 基因小鼠的主动脉弹性纤维受到破坏。ADAMTS-12 可解除软骨基质蛋白(Cartilage oligomeric matrix

protein,COMP)对血管平滑肌细胞的迁移、黏附抑制作用,致使血管内膜增厚,造成 ICVD 发生。而 ADAMTS-13 具有抗血栓性质,可将 VWF 多聚体切割成小的非活性片段,用于调节机体循环中凝血生理过程,ADAMTS-13 表达水平降低可引起 ICVD 发生。另外,Schuppner R 等<sup>[8]</sup>实施的前瞻性队列研究指出 ADAMTS-13 与缺血性脑卒中相关。由此推测,ADAMTS 家族指标可能在 ICVD 发生、发展中起着重要作用,检测 ADAMTS 家族指标可帮助临床识别 ICVD 高危个体,指导临床早期诊治。

既往研究显示<sup>[9]</sup>,约 12% 的 TIA 患者 7 d 内可进展为 ACI,故及时鉴别 ICVD 类型,对临床预防脑缺血不良事件发生至关重要。近年来有报道指出<sup>[10]</sup>,ADAMTS 在动脉粥样硬化疾病发生、发展中起到重要作用。本研究结果与刘美霞等<sup>[11]</sup>研究结果相似。上述结果产生机制可能为,当 TIA 患者血管内皮受损时,大分子、具有强大止血功能的超大分子量血管性血友病因子(ULVWF)被释放,进而引起 ADAMTS13 消耗性降低,此推测同先前报道的急性缺血性脑卒中小鼠中 ADAMTS13 活性降低相一致<sup>[12]</sup>。现有研究表明,ADAMTS-12 基因同细胞内膜增厚、血管炎症反应有关<sup>[13]</sup>。作者推测高 ADAMTS-12 水平,致使其基因蛋白功能活性改变,在炎症反应、血管平滑肌迁移等方面发生作用,

促进动脉粥样硬化发生发展过程,进而加速脑梗死发生;Li H等<sup>[14]</sup>经小鼠模型证明,大鼠大脑中动脉短暂闭塞后,星形胶质细胞中 ADAMTS-1 mRNA 呈高表达,且肿瘤坏死因子- $\alpha$ 等炎症反应介质能上调星形胶质细胞中 ADAMTS-1 表达水平,致使神经细胞由基膜上脱落、凋亡;ADAMTS-4 作为炎症反应调节酶,其表达水平升高可能加速动脉粥样硬化易损斑块形成和继发性血栓形成,具体机制有待今后深入分析。因 ADAMTS 家族单一指标诊断鉴别 ACI、TIA 存在一定局限性,故本研究采取联合诊断模式,结果显示,ADAMTS 家族指标联合诊断 AUC 最大为 0.901,高于任一指标单独诊断。

综上,随着临床对 ADAMTS 家族在 ACI、TIA 中的作用机制研究深入,将为 ICVD 诊治及新型抗血栓药物研发提供更多有利证据。

## 参考文献

- [1] Kahl A, Blanco I, Jackman K, et al. Cerebral ischemia induces the aggregation of proteins linked to neurodegenerative diseases[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1):2701.
- [2] 李占增,任英巧,伍淑玲,等. hs-CRP、NF- $\kappa$ B、VCAM-1 与缺血性脑血管病病情及预后关系[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2020, 12(8):1034-1038.
- [3] 王东,刘发俊. ADAMTS-13 与 hs-CRP 水平在急性心肌梗死患者经皮冠状动脉介入术后无复流现象的相关性研究[J]. *心脑血管病防治*, 2018, 18(1):7-9.
- [4] 袁大华,杜朴,王玉凯. 血清 PTX-3、CTRP9、MIF 水平与缺血性脑卒中患者神经功能及短期预后的关系[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2020, 12(7):935-939.
- [5] Arning A, Jeibmann A, Köhnemann S, et al. ADAMTS genes and the risk of cerebral aneurysm [J]. *J Neurosurg*, 2016, 125(2):269-274.
- [6] 邓先明,陈光忠. 解聚蛋白样金属蛋白酶-4 与颈动脉及冠状动脉易损斑块关系的研究进展[J]. *中国脑血管病杂志*, 2020, 17(10):627-630+635.
- [7] Ren P, Hughes M, Krishnamoorthy S, et al. Critical Role of ADAMTS-4 in the Development of Sporadic Aortic Aneurysm and Dissection in Mice[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):12351.
- [8] Schuppner R, Dirks M, Grosse GM, et al. ADAMTS-13 Activity Predicts Outcome in Acute Ischaemic Stroke Patients Undergoing Endovascular Treatment [J]. *Thromb Haemost*, 2018, 118(4):758-767.
- [9] 王兴萍,岳学静,程度,等. 单核细胞/高密度脂蛋白胆固醇比值评估高血压患者并发急性脑梗死预后价值[J]. *华南预防医学*, 2020, 46(1):66-68.
- [10] 李亚玲. ADAMTS 家族在动脉粥样硬化性疾病中的研究进展[J]. *卒中与神经疾病*, 2018, 25(1):95-97.
- [11] 刘美霞,周龙,朱祖欣,等. ADAMTS13 和 vWF 在急性和慢性脑血管病患者血浆中的表达及其临床意义[J]. *医学临床研究*, 2020, 37(1):64-67.
- [12] South K, Denorme F, Salles-Crawley II, et al. Enhanced activity of an ADAMTS - 13 variant (R568K/F592Y/R660K/Y661F/Y665F) against platelet agglutination in vitro and in a murine model of acute ischemic stroke [J]. *J Thromb Haemost*, 2018, 16(11):2289-2299.
- [13] Wei JL, Fu W, Hettinghouse A, et al. Role of ADAMTS-12 in Protecting Against Inflammatory Arthritis in Mice By Interacting With and Inactivating Proinflammatory Connective Tissue Growth Factor[J]. *Arthr Rheum*, 2018, 70(11):1745-1756.
- [14] Li H, Zhou Y, Song W, et al. Expression of ADAMTS - 1 mRNA in myocardium of viral heart disease mice and its clinical significance[J]. *Exp Ther Med*, 2019, 17(1):153-158.
- [8] Adamopoulos A, Landskron L, Heidebrecht T, et al. Crystal structure of the tubulin tyrosine carboxypeptidase complex VASH1-SVBP[J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2019, 26(7):567-570.
- [9] Pinheiro NM, Carneiro ACDM, Crema VO. Rho GTPases are Involved on Regulation of Cytodifferentiation of SCC - 4 Oral Squamous Cell Carcinoma Cell Line: A Preliminary Study [J]. *APJCP*, 2020, 21(1):64-78.
- [10] Kim H, Yang JM, Ahn SH, et al. Potential Oncogenic Role and Prognostic Implication of MicroRNA - 155 - 5p in Oral Squamous Cell Carcinoma [J]. *Anticancer Res*, 2018, 38(9):5193-5200.
- [11] Madhuresh K, Kabita C, Swapan Kumar P, et al. Computer-assisted morphometric image analysis of cells of normal oral epithelium and oral squamous cell carcinoma [J]. *Jomfp*, 2018, 21(11):24-29.
- [12] 赵景娟,夏琳,付晶,等. miR-138-5 p 靶向 ZEB2 抑制食管鳞状细胞癌细胞的转移能力[J]. *医学分子生物学杂志*, 2020, 17(2):121-128.
- [13] Yamanouchi R, Harada K, Ferdous T, et al. Low carbonyl reductase 1 expression is associated with poor prognosis in patients with oral squamous cell carcinoma [J]. *Mol Clin Oncol*, 201815(22):64-69.
- [14] Beovide CAV, Koerich LN, Da SAD, et al. Cell proliferation markers at the invasive tumor front of oral squamous cell carcinoma: comparative analysis in relation to clinicopathological parameters of patients [J]. *J Appl Oral Sci*, 2017, 25(3):318-323.
- [15] Kannar V, Raja V, Suresh TN. Evaluation of platelet indices in oral squamous cell carcinoma [J]. *Cancer Invest*, 2017, 6(1):40-43.

(上接第 558 页)

# 基于生物信息学分析 *LOXL2* 在肺腺癌中的表达及临床意义

全静雯 刘嘉慧 周泉 李林海\*

**[摘要]** **目的** 基于多数据库探讨 *LOXL2* 在肺腺癌中的表达水平差异和临床意义。**方法** 利用 UALCAN 分析平台对 *LOXL2* 基因在 TCGA 数据库中的 mRNA 表达量进行泛癌分析;利用 Oncomine 和 GEPIA 数据库对 *LOXL2* 基因在肺腺癌中的表达进行荟萃分析;使用 K-Mplot 对肺腺癌中 *LOXL2* 表达量与预后关系进行分析;利用 UALCAN 分析 *LOXL2* 基因表达水平与临床特征的关系;使用 MEXPRESS 数据库对 *LOXL2* 启动子区域甲基化水平进行分析;使用 String 数据库构建相关蛋白网络并进行功能富集分析。**结果** 多个数据库分析显示 *LOXL2* 在肺腺癌组织中表达水平高于正常组织 ( $P < 0.05$ ), 且与 TNM 分型相关;高表达 *LOXL2* 的肺腺癌患者总生存率和首次进展时间低于 *LOXL2* 低表达患者 ( $P < 0.05$ )。UALCAN 与 MEXPRESS 数据库分析表明, *LOXL2* 基因启动子区域甲基化水平在肿瘤组织中较高。String 数据库分析显示, *MFAP5*, *MFAP2*, *FBLN5*, *PCOLCE*, *ELN*, *LOX*, *LOX1*, *LOX3*, *BMP1*, *TLL1* 等与 *LOXL2* 关系密切。**结论** 通过挖掘并分析肿瘤基因数据库信息表明, *LOXL2* 在肺腺癌组织中呈高表达, 且与患者预后不良相关, 为后续深入研究 *LOXL2* 在肺腺癌进行过程中的作用提供重要理论依据。

**[关键词]** *LOXL2*; 肺腺癌; 数据挖掘; 预后

## Bioinformatics analysis of *LOXL2* gene expression and its prognostic value in lung adenocarcinoma

QUAN Jingwen, LIU Jiahui, ZHOU Quan, LI Linhai\*

(Department of Laboratory Medicine, General Hospital of Southern Theatre Command of PLA, Guangzhou, Guangdong, China, 510010)

**[ABSTRACT]** **Objective** To explore the expression pattern and clinical significance of *LOXL2* in lung adenocarcinoma based on multi-database analysis. **Methods** UALCAN was used to analyze the mRNA expression of *LOXL2* in TCGA database for pan-cancer analysis. *LOXL2* gene expression in lung adenocarcinoma was analyzed using Oncomine and GEPIA database. K-Mplot was used to analyze the relationship between *LOXL2* expression and prognosis in lung adenocarcinoma. The relationship between *LOXL2* expression and HCC clinical characteristics was evaluated using UALCAN; DNA methylation in *LOXL2* gene was assessed using online MEXPRESS tool and protein-protein interaction networks and functional enrichment analysis were analyzed using String database. **Results** The expression level of *LOXL2* in lung adenocarcinoma tissues was higher than that in normal tissues based on multiple databases ( $P < 0.05$ ), and was related to TNM classification ( $P < 0.05$ ). The OS and PPS of patients with high expression of *LOXL2* were significantly lower than those with low expression of *LOXL2* ( $P < 0.05$ ). Analysis of UALCAN database and MEXPRESS database showed that the methylation level of *LOXL2* gene promoter region is higher in tumor tissues. Analysis in the String database showed that *MFAP5*, *MFAP2*, *FBLN5*, *PCOLCE*, *ELN*, *LOX*, *LOX1*, *LOX3*, *BMP1* and *TLL1* are closely related to *LOXL2*. **Conclusion** By exploring and analyzing information from the tumor gene database, it was shown that *LOXL2* was strongly expressed in the tissues of lung adenocarcinoma and was associated with poor

基金项目:国家自然科学基金(31901035),广东省自然科学基金(2020A1515010951)

作者单位:中国人民解放军南部战区总医院检验科,广东,广州 510010

\*通信作者:李林海, E-mail: mature.303@126.com

patient prognosis, providing an important theoretical basis for an in-depth study of the role of *LOXL2* in the progression of lung adenocarcinoma.

[KEY WORDS] *LOXL2*; Lung Adenocarcinoma; Datamining; Prognosis

肺癌(Lung cancer)是目前我国死亡率最高的恶性肿瘤之一,近年来发病率和死亡率持续升高,患者的5年生存率小于15%<sup>[1]</sup>。肺癌可分为非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)和小细胞肺癌(small cell lung cancer, SCLC),NSCLC包括鳞癌、腺癌、大细胞癌和腺鳞癌。关于肺癌已经有大量研究<sup>[2-3]</sup>,但是其分子机制仍不完全清楚。因此,探索和发现肺癌发生和进展的分子调控机制,找到肺癌在潜移默化发展过程中的基因调控网络,进而在分子水平上预防或阻断肺癌的进展就显得尤为重要。赖氨酸氧化酶样蛋白(Lysyl oxidase-like protein 2, *LOXL2*)是赖氨酸氧化酶家族的重要成员,属于胺氧化酶类分子,其基因定位于染色体8P21.2-P21.3,由前体5ze3双链构成<sup>[4]</sup>。*LOXL2*在细胞外基质中通过参与弹性蛋白的形成<sup>[5]</sup>,在诱导上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)、维持结构完整、增强细胞运动、促进肿瘤发生发展等过程中发挥作用<sup>[6]</sup>。本研究通过多种数据库进行数据挖掘,分析*LOXL2*基因在肺腺癌(lung adenocarcinoma, LUAD),中的表达水平及预后意义,为后续研究*LOXL2*基因在肺腺癌发生发展中的作用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 *LOXL2* 基因在不同癌种中的表达

在UALCAN数据库中进行TCGA Gene Analysis,基因检索*LOXL2*,选择肺腺癌,检出结果中运用泛癌表达分析(pan-cancer view)。OncoPrint(www.oncoPrint.org)数据库收集分析肿瘤样本的基因表达谱芯片数据,同时提供转录组数据。通过OncoPrint数据库分析*LOXL2*基因在不同癌种中的表达,临界值设定条件为 $P$  value <0.05和Gene Rank Top 10%。使用GEPIA(Gene Expression Profiling Interactive Analysis)分析*LOXL2*基因在肺腺癌中的表达差异。GEPIA平台包括来自TCGA和GTEx(Genotype-Tissue Expression)数据库的肿瘤组织和正常组织的RNA测序数据,基因检索(Enter gene name)中输入*LOXL2*,之后点击Boxplot功能,查看其在肿瘤组织和正常组织中的表达情况。

### 1.2 利用UALCAN数据库分析*LOXL2*表达量与临床特征

通过UALCAN数据库分析*LOXL2*在肺组织中不同分类的表达情况,包括正常人及原位癌病患间的表达差异,基于患者TP53突变情况不同的表达差异,再观察肺腺癌患者在性别、年龄、种族、癌症分期、淋巴转移分型等方面的表达差异。使用cBioportal数据库下载TCGA数据进行验证。

### 1.3 KM Plotter数据库分析*LOXL2*表达量与预后

通过KM Plotter中收录的表达*LOXL2*基因的肺腺癌样本,使用Survival选项,分别绘制样本表达与生存时间关系的Kaplan-Meier曲线,包括总生存率(overall survival, OS)与首次进展时间(first progression, FP)(OS Log-rank  $P=7E-12$ , FP Log-rank  $P=5.1E-08$ )。

### 1.4 *LOXL2*基因在肺腺癌启动子甲基化水平的变化

通过MEXPRESS(<https://mexpress.be/>)数据库分析肺腺癌中,*LOXL2*基因启动子区域CpG岛甲基化水平的差异。仅选取有甲基化数据的样本进行分析,以肺腺癌组织和正常组织分为两组进行比较。

### 1.5 与*LOXL2*相关的蛋白以及功能分析

STRING(<https://string-db.org/>)数据库用于构建蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络,可生成有关基因功能的假设,分析基因列表并为进行功能分析。本研究中设置蛋白相互作用网络来源为:物理相互作用,基因共表达,基因共定位,基因富集分析和网站预测。利用String数据库对*LOXL2*信号转导通路进行了初步探索,以构建相关蛋白网络图。

### 1.6 统计学分析

采用统计学软件SPSS for Windows 23.0进行统计分析;两组间比较采用 $t$ 检验。两组以上比较采用one-way ANOVA单因素方差分析,其中两比较采用 $P$ 检验(Newman-keuls法)生存分析使用Kaplan-Meier法进行检验;以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 *LOXL2*在不同肿瘤类型中的表达情况

UALCAN数据库结果显示,除少数癌种外,其余癌种的*LOXL2*基因表达水平中位数,肿瘤组均

高于正常组,见图1。使用GEPIA数据库综合TCGA和GTEx的483例肺腺癌和347例正常肺组织分析, *LOXL2*在肺癌组织中表达显著高于肺部正常组织差异倍数为1.78倍, adjust 值为2.42E-23, 见图2A。在Oncomine数据库中,有4项研究的数据表明, *LOXL2*在肺腺癌组织中高表达差异倍数分别为2.386, 2.612, 1.767和1.682。见图2B。

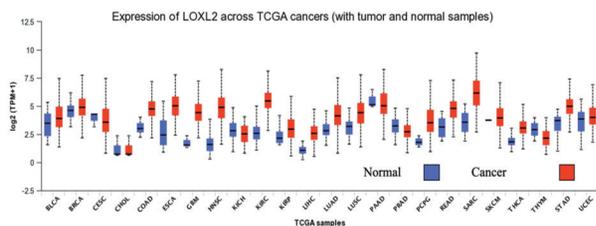
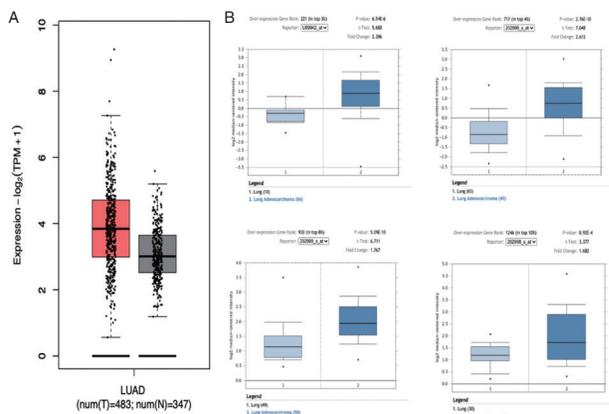


图1 不同类型肿瘤组织中 *LOXL2* 的表达水平

Figure 1 The expression levels of *LOXL2* in different types of cancers



注:A为基于GEPIA2数据库分析肺腺癌中 *LOXL2* 的 mRNA 表达量; B为Oncomine数据库中4个不同数据集中 *LOXL2* 的 mRNA 水平。

图2 *LOXL2* 在肺腺癌与正常组织表达差异

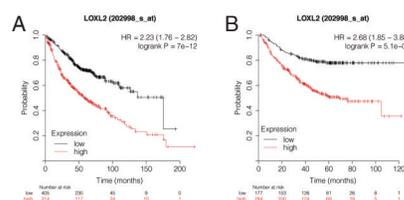
Figure 2 Differential expression of *LOXL2* in lung adenocarcinoma and normal tissues

## 2.2 *LOXL2* 表达水平与肺腺癌患者预后关系

Kaplan-Meier 生存分析结果显示在肺腺癌患者中,高表达的 *LOXL2* 预示着较短的总生存率(OS)与首次进展时间(FP)。见图3。

## 2.3 基于临床特征讨论 *LOXL2* 的表达情况差异

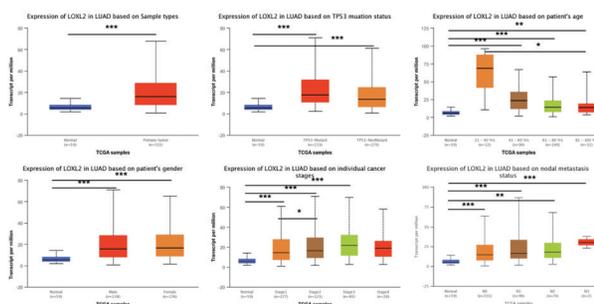
与正常组织相比 *LOXL2* 在肺腺癌组织中高表达,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。UALCAN 结果显示 *LOXL2* 的表达与 TP53 突变、性别、年龄和淋巴结转移情况无关( $P > 0.05$ )。在 II 期肺腺癌患者中, *LOXL2* 的表达水平较 I 期肺腺癌患者升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见图4。



注:A为总生存率; B为首次进展时间。

图3 *LOXL2* 表达状态与肺腺癌预后的关系

Figure 3 The relationship between *LOXL2* expression and the prognosis of lung adenocarcinoma



注:箱形图显示 *LOXL2* 在正常和肺腺癌、TP53 基因突变肺腺癌患者、不同年龄肺腺癌患者、不同性别肺腺癌患者和不同分期肺腺癌患者和不同淋巴结转移情况肺腺癌患者组织中的相对表达量。箱型图使用平均值±标准误差表示,  $P < 0.05$ ;  $P < 0.01$ ;  $P < 0.001$ 。

图4 TCGA 数据库中 *LOXL2* mRNA 水平在不同临床特征分组中的表达量差异

Figure 4 The expression level of *LOXL2* mRNA in the TCGA database in different clinical feature groups

cBioportal 数据库中 508 例 LUAD 样本的临床数据数据显示 *LOXL2* 表达与肿瘤分期有关,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表1。

表1 单因素分析 *LOXL2* 基因表达与肺癌临床病理特征关系

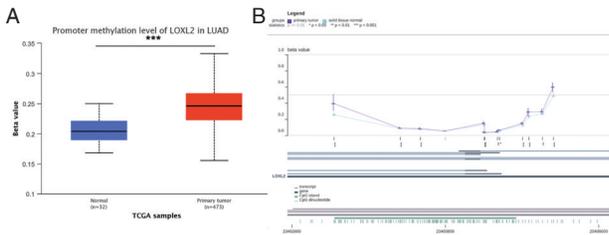
Table 1 Uaildation of the relationship between *LOXL2* gene expression and clinicopathological characteristics of 508 lung caner samples

病理	例数	$\chi^2$ 值	P 值
AJCC 病理分期			
I 期	275	3.723	0.011
II 期	123		
III 期	83		
IV 期	27		

## 2.4 肺腺癌中 *LOXL2* 基因启动子区域甲基化水平分析

UALCAN 数据库分析 *LOXL2* 基因启动子区域甲基化水平结果显示,在肿瘤组织中的启动子甲基化水平高于正常组织中 *LOXL2* 基因的启动子甲基化水平,见图5。使用 MEXPRESS 数据库对 *LOXL2* 基因启动子区域中 CpG 岛的甲基化水

平进行分析发现,肺腺癌组织中 CpG 岛中的甲基化水平明显高于正常组织(图 5)。



A: 箱形图显示了 *LOXL2* 基因启动子区域在正常和肺腺癌样品中的甲基化水平; B: *LOXL2* 基因启动子区域中 CpG 岛的甲基化水平。\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ 。

图 5 正常组织和肺腺癌组织中 *LOXL2* 基因启动子区域的甲基化水平

Figure 5 The methylation level of the *LOXL2* gene promoter region in normal tissues and lung adenocarcinoma tissues

### 2.5 构建 *LOXL2* 相互作用蛋白网络

通过 String 数据库分析得到与 *LOXL2* 相关作用的蛋白网络,见图 6,选取蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 相关且  $P$  值为  $7.81e-13$  的数个蛋白质,使平均网络局部聚类系数为 0.879,得到蛋白质有 MFAP5, MFAP2, FBLN5, PCOLCE, ELN, LOX, LOX1, LOX3, BMP1, TLL1 等 10 个,主要参与的生物学过程有细胞外基质组成,多细胞生物体发育,蛋白质修饰等。

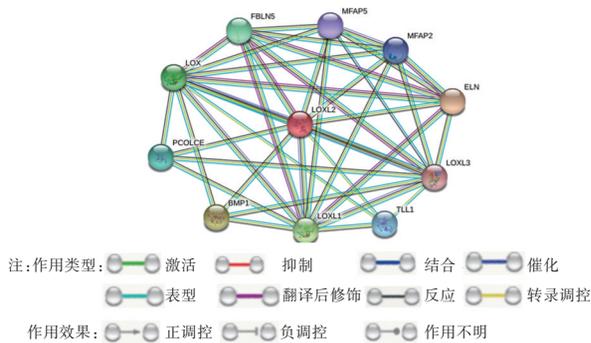


图 6 *LOXL2* 在肺腺癌中的蛋白质-蛋白质相互作用网络  
Figure 5 Protein-protein interaction network of *LOXL2* in lung adenocarcinoma

## 3 讨论

*LOXL2* 是 *LOX* 家族的重要成员,是一种铜依赖胺氧化酶,可将原胺底物氧化为活性醛类<sup>[7]</sup>,能催化细胞外基质胶原与弹性蛋白交联<sup>[8]</sup>,在肿瘤的侵袭转移中有重要作用。研究发现 *LOXL2* 在癌症中的作用与通过细胞外基质影响癌细胞的侵袭有

关。Zhan<sup>[9]</sup>等发现, *LOXL2* 及其拼接异构体 L2Δ13 能促进细胞骨架重组和通过联合细胞质肌动蛋白结合蛋白 (cytoplasmic actin-binding proteins) 如 ezrin 入侵食道癌细胞; Schmelzer<sup>[5]</sup> 研究发现, *LOXL2* 通过胶原和弹性蛋白的交联,在细胞外基质重建、肿瘤生长和纤维化过程中发挥中心作用。而杨永宾<sup>[10]</sup>将 *LOXL2* 基因沉默后,胃癌细胞株 *BGC823* 增殖受到抑制,也侧面反映了 *LOXL2* 基因的生物学特性。在 pyMT 乳腺癌模型中, Salvador<sup>[11]</sup>等研究发现 *LOXL2* 在多瘤病毒中间 T 抗原 (pyMT) 细胞中,调节 *snail1* 的表达水平,介导其侵袭,并且影响 pyMT 细胞的肺转移,但是不影响 ECM 生物力学特性。邵兵<sup>[12]</sup>等发现,在肝癌病例中, *LOXL2* 可能通过促进 *SNAIL*, 抑制 *LLGL2*, 从而促进 EMT 和 VM 形成,发挥促进肿瘤细胞的侵袭、迁移能力及构成管道样结构的功能; Ikenaga<sup>[13]</sup>等实验发现,在肝成纤维化过程中,抑制 *LOXL2* 可减弱肝实质及肝胆管纤维化过程,并可促其逆转;但是 *LOXL2* 在肺癌特别是肺腺癌中的研究较少。

本研究结果提示 *LOXL2* 的异常表达与 LUAD 发生密切相关,但与 TP53 突变、性别、年龄和淋巴结转移等临床特征无明显关系。生存分析表明 *LOXL2* 的表达水平增高是肺腺癌患者预后的危险因素。研究还说明 *LOXL2* 在肺腺癌中的高表达,不是由于基因甲基化水平降低这种表观遗传学改变而造成的,需要进一步寻找和分析其在肿瘤组织中高表达的原因。有研究报道 *LOXL1* 能够促进 NSCLC 细胞的成瘤<sup>[14]</sup>并诱导 NSCLC 细胞转移<sup>[15]</sup>, 因此 *LOXL1* 可能通过与 *LOXL2* 相互作用,共同在肺腺癌中发挥致癌作用。这些结果说明,在肺腺癌中, *LOXL2* 的高表达可能异常激活了 EMT 等信号通路,并且通过其调控肿瘤细胞转移而促进肿瘤的发展,其具体的分子机制仍然需要进一步实验验证。

*LOXL2* 在各种肿瘤中的作用效果并不完全一致,综合本文的数据研究发现 *LOXL2* 与肺腺癌发生发展有密切联系,但 *LOXL2* 是否能促进肺腺癌的发生发展还需进一步的实验验证。由于数据挖掘能力有限,以及日新月异的数据库收纳成果,结论存在一定局限性,本文仅为进一步的研究提供思路。

(下转第 572 页)

# SIVD患者SicAM-1、sCD40L、ADMA、ALP水平变化与认知功能相关性

程明<sup>1</sup> 陶珍<sup>2\*</sup> 唐吉刚<sup>1</sup>

**[摘要]** 目的 研究皮质下缺血性脑血管(SIVD)患者血清SicAM-1、sCD40L、ADMA、ALP水平变化与认知功能的相关性。方法 收集2018年3月至2020年6月162例SIVD患者作为研究对象,根据轻重程度划分为重症组(62例)和轻症组(100例),同时选取54例健康人作为对照组,进行三组间血清SicAM-1、sCD40L、ADMA、ALP指标情况比较及三组间简易智能精神状态量表(MMSE)情况比较,分析MMSE、SicAM-1、sCD40L、ADMA、ALP之间两两相关性,同时分析认知功能障碍的相关影响因素。结果 三组患者的血清SicAM-1、sCD40L、ADMA、ALP指标比较,重症组>轻症组>对照组,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。而在MMSE情况上表现为重症组<轻症组<对照组,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。MMSE与血清SicAM-1、sCD40L、ADMA、ALP各个之变之间形成负相关性,其中与SicAM-1呈极低负相关( $r=-0.273$ ),与sCD40L、ALP呈低度负相关( $r=-0.434, -0.365$ ) ( $P<0.05$ );与ADMA中度负相关( $r=-0.657$ ) ( $P<0.05$ )。血清各个指标之间呈中度正相关( $P<0.05$ )。进行输入式多元线性logistic回归分析ADMA、年龄、胆固醇、肌酐是SIVD患者认知功能障碍的独立危险因素,其它各项为保护因素。结论 SicAM-1、sCD40L、ADMA、ALP水平变化与认知功能之间呈负相关关系,其浓度升高认知功能障碍加剧。

**[关键词]** SIVD; 认知功能; ADMA; ALP水平; 相关性

## Correlation study of changes of serum SicAM-1, sCD40L, ADMA, ALP and cognitive function in SIVD patients

CHENG Ming<sup>1</sup>, TAO Zhen<sup>2\*</sup>, TANG Jigang<sup>1</sup>

(1. Department of Neurology, 960 Hospital of The Joint Logistic Support Force of the Chinese People's Liberation Army, Jinan, Shan dong, China, 250031; 2. Department of Neurology, 971 Naval Hospital, Qingdao, Shan dong, China, 266071)

**[ABSTRACT]** **Objective** To study the correlation between changes in serum levels of SicAM-1, sCD40L, ADMA, ALP and cognitive function in patients with subcortical ischemic cerebrovascular (SIVD). **Methods** A retrospective collection of 162 patients with SIVD from March 2018 to June 2020 as the research objects, and divided into severe group (62 cases) and mild group (100 cases) according to their severity, and 54 healthy people were selected as the control group. To compare the serum SicAM-1, sCD40L, ADMA, ALP indicators between the three groups and the MMSE between the three groups, analyze the correlation between MMSE, SicAM-1, sCD40L, ADMA, ALP, and analyze the cognitive function Relevant influencing factors of obstacles. **Results** Comparison of serum SicAM-1, sCD40L, ADMA, ALP indexes of the three groups of patients, severe group > mild group > control group, the differences were statistically significant ( $P<0.05$ ). In the case of MMSE, it showed that the severe group < the mild group < the control group, and the difference was statistically significant ( $P<0.05$ ). MMSE has a negative correlation with changes in serum SicAM-1, sCD40L, ADMA, and ALP. Among them, there is a very low negative correlation with SicAM-1 ( $r=-$

基金项目:国家重点研发计划子项目(2019YFC160630504)

作者单位:1.中国人民解放军联勤保障部队第九六〇医院神经内科,山东,济南250031

2.海军第971医院神经内科,山东,青岛266071

\*通信作者:陶珍, E-mail:taozhen90@126.com

0.273), and a low negative correlation with sCD40L and ALP ( $r = -0.434, -0.365$ ) ( $P < 0.05$ ); moderately negatively correlated with ADMA ( $r = -0.657$ ) ( $P < 0.05$ ). There was a moderate positive correlation among serum indexes ( $P < 0.05$ ). Input multiple linear logistic regression analysis was performed to analyze that ADMA, age, cholesterol, and creatinine are independent risk factors for cognitive dysfunction in patients with SIVD, and the others are protective factors. **Conclusion** SicAM-1, sCD40L, ADMA, ALP level changes and cognitive function There is a negative correlation between them, and the increase in the concentration increases the cognitive dysfunction.

**[KEY WORDS]** SIVD; Cognitive function; ADMA; ALP level; Correlation

临床实践中,研究炎症因子与皮质下缺血性脑血管(Subcortical ischemic cerebrovascular disease, SIVD)患者认知功能障碍的相关性的因子主要是以血清 S-100 $\beta$  蛋白,肿瘤坏死因子 $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ),白细胞介素 6(interleukin-6, IL-6)水平,白细胞介素 1(Interleukin-1 $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ ),高敏 C 反应蛋白(high-sensitivity C-reactive protein, hs-CRP)等为主,而较少应用细胞间粘附因子(intercellular cell adhesion molecule-1, SicAM-1),血清可溶性 CD40 配体(soluble CD40 ligand, sCD40L),血清非对称性二甲基精氨酸(Asymmetric dimethylarginine, ADMA),血清碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)进行研究,后两者甚少<sup>[1-2]</sup>。近些年来,有研究指出 ADMA 变化、ALP 变化与认知功能障碍有着密切关系,诸如阿尔茨海默症、记忆障碍等,但与 SIVD 的研究相对较少<sup>[3-4]</sup>。本实验就此问题进行研究,报告如下。

## 1 一般资料

### 1.1 资料与方法

收集 2018 年 3 月至 2020 年 6 月 162 例 SIVD 患者作为研究对象,根据轻重程度划分为重症组(62 例)和轻症组(100 例),同时选取 54 例健康人

作为对照组,三组患者在性别、年龄、身高、体重等指标上比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。见表 1。

纳入标准:①头颅 MRI 显示皮质下腔隙性脑梗死、脑白质病变;②有认知功能损害;③年龄 $>18$  岁;④资料完整。排除标准:①存在恶性肿瘤患者;②脑肿瘤、脑外伤、脑卒中等疾病;③有感染性疾病患者;④严重心血管疾病患者。本研究符合世界医学会《赫尔辛基宣言》<sup>[5]</sup>。

### 1.2 方法

采用酶联免疫吸附法检测血清 sCD40L(由上海康朗生物科技有限公司生产,型号规格为 96T/Kit, 8 $\times$ 12 wells)、ADMA(SimpleStep ELISA<sup>®</sup> Custom ELISA 试剂盒,由英国 Abcam(上海)贸易有限公司生产),用双抗体夹心法检测血清 SicAM-1(由上海信裕生物科技有限公司生产),采用全自动生化分析仪测定血清 ALP(由上海信裕生物科技有限公司生产)。采用简易智能精神状态量表(Minimum Mental State Examination, MMSE)<sup>[5]</sup>对受试者精神和认知功能损害程度进行评估,主要包括定向力、注意力、记忆力、计算力、语言能力等方面,一共 30 分,27~30 分表示正常,21~26 分表示轻症认知障碍,10~20 分表中度认知障碍,小于 10 为重症认知障碍,量表评分由两名自身医师共同评价。

表 1 3 组患者一般情况比较 [ $n(\%)$ , ( $\bar{x} \pm s$ )]

Table 1 Comparison of general conditions between 3 groups [ $n(\%)$ , ( $\bar{x} \pm s$ )]

组别	重症组( $n=62$ )	轻症组( $n=100$ )	对照组( $n=54$ )	$\chi^2/F$ 值	$P$ 值
性别(男/女)	39/23	66/34	34/20	0.221	0.896
年龄(岁)	69.16 $\pm$ 9.12	70.58 $\pm$ 8.96	68.89 $\pm$ 8.79	0.811	0.446
高血压	53(85.50)	61(61.00)	31(57.40)	13.481	0.001
糖尿病	21(33.90)	30(30.00)	13(24.10)	0.940	0.625
抽烟史	53(85.50)	61(61.00)	17(31.50)	33.823	0.000
饮酒史	19(30.60)	28(28.00)	16(29.60)	0.137	0.934
身高(cm)	156.35 $\pm$ 15.49	155.87 $\pm$ 14.98	156.78 $\pm$ 15.09	0.066	0.936
体重(kg)	62.45 $\pm$ 14.89	61.59 $\pm$ 15.17	63.41 $\pm$ 14.98	0.261	0.770
总胆固醇( $\mu\text{mol/L}$ )	4.68 $\pm$ 0.93	4.89 $\pm$ 0.96	4.75 $\pm$ 1.12	0.927	0.397
尿素氮( $\mu\text{mol/L}$ )	6.98 $\pm$ 1.25	5.89 $\pm$ 1.24	4.83 $\pm$ 1.21	43.860	0.000
肌酐( $\mu\text{mol/L}$ )	73.58 $\pm$ 1.89	69.15 $\pm$ 1.65	63.58 $\pm$ 1.58	496.415	0.000
血糖( $\mu\text{mol/L}$ )	5.86 $\pm$ 1.35	5.41 $\pm$ 1.12	5.06 $\pm$ 1.06	6.790	0.001

### 1.3 观察指标

比较三组患者血清 SicAM-1、sCD40L、ADMA、ALP 指标及其 MMSE 情况及其相关性,同时应用二元 logistics 分析认知功能障碍的相关影响因素。

### 1.4 统计学分析

采用 SPSS 25.0 软件行数据统计分析;计数资料以  $n(\%)$  表示,行  $\chi^2$  检验;计量资料以  $(\bar{x} \pm s)$  表示,三组数据采用单因素方差检验并进行事后多重检验;采用 Spearson 相关分析 MMSE 与血清 SicAM-1、sCD40L、ADMA、ALP 指标相关性,采用

多元线性 logistics 回归分析影响 SIVD 患者认知功能的相关因素,以  $P < 0.05$  差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 3 组间血清 SicAM-1、sCD40L、ADMA、ALP 表达水平比较

3 组患者的血清 SicAM-1、sCD40L、ADMA、ALP 指标比较,重症组 > 轻症组 > 对照组,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。3 组 MMSE 比较,重症组 < 轻症组 < 对照组,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 2。

表 2 3 组间血清 SicAM-1、sCD40L、ADMA、ALP 指标情况比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Comparison of serum sicAM-1, sCD40L, ADMA, ALP and MMSE among 3 groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	SicAM-1 (ng/mL)	sCD40L (ng/mL)	ADMA (ng/mL)	ALP (U/L)	MMSE (分)
重症组	62	441.58±108.47 <sup>ab</sup>	7.58±1.84 <sup>ab</sup>	1.89±0.35 <sup>ab</sup>	91.56±16.98 <sup>ab</sup>	7.59±2.39 <sup>ab</sup>
轻症组	100	379.28±106.78 <sup>a</sup>	6.25±1.62 <sup>a</sup>	1.15±0.32 <sup>a</sup>	75.89±13.48 <sup>a</sup>	21.36±3.47 <sup>a</sup>
对照组	54	312.56±97.43	3.56±1.58	0.69±0.28	65.74±15.28	27.25±1.58
F 值		21.789	85.768	21.960	4.327	783.196
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与对照组比,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与轻症组比<sup>b</sup> $P < 0.05$ 。

### 2.2 相关性分析

MMSE 与血清 SicAM-1、sCD40L、ADMA、ALP 各个之变之间形成负相关性,其中与 SicAM-1 呈极低负相关,相关系数为 -0.273,与 sCD40L、ALP 呈低度负相关,相关系数为 -0.434、-0.365,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ );与 ADMA 中度负相关,相关系数为 -0.657,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。血清各个指标之间呈中度正相关,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),见表 3。从相关矩阵图来看,MMSE 与血清各个指标之间形成线性负相关关系。见图 1。

表 3 MMSE、SicAM-1、sCD40L、ADMA、ALP 之间两两相关性

Table 3 Pairwise correlations among MMSE, Sicam-1, sCD40L, ADMA and ALP

指标	参数	SicAM-1	sCD40L	ADMA	ALP	MMSE
SicAM-1	r 值	1	0.567 <sup>a</sup>	0.549 <sup>a</sup>	0.648 <sup>a</sup>	-0.273 <sup>a</sup>
	P 值		0.000	0.000	0.000	0.000
sCD40L	r 值	0.567 <sup>a</sup>	1	0.732 <sup>a</sup>	0.680 <sup>a</sup>	-0.434 <sup>a</sup>
	P 值	0.000		0.000	0.000	0.000
ADMA	r 值	0.549 <sup>a</sup>	0.732 <sup>a</sup>	1	0.721 <sup>a</sup>	-0.657 <sup>a</sup>
	P 值	0.000	0.000		0.000	0.000
ALP	r 值	0.648 <sup>a</sup>	.680 <sup>a</sup>	0.721 <sup>a</sup>	1	-0.365 <sup>a</sup>
	P 值	0.000	0.000	0.000		0.000
MMSE	r 值	-0.273 <sup>a</sup>	-0.434 <sup>a</sup>	-0.657 <sup>a</sup>	-0.365 <sup>a</sup>	1
	P 值	0.000	0.000	0.000	0.000	

注:<sup>a</sup> $P < 0.05$ ,差异有统计学意义。

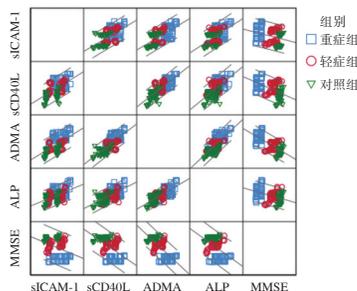


图 1 相关矩阵图

Figure 1 Correlation matrix

### 2.3 多元线性 logistics 回归

多元线性 logistic 回归分析显示,ADMA、年龄、胆固醇、肌酐是 SIVD 患者认知功能障碍的独立危险因素。见表 4。

## 3 讨论

SicAM-1 属于内皮细胞受到刺激之后释放出的一种炎性因子,其含量的升高反映内皮细胞损伤程度,损伤程度越高患者 SicAM-1 水平就越高,这可能与患者血脑屏障被破坏相关。张琳等人 (2019) 并不认同该种观点,其选取的 83 例 SIVD 患者作为受试者,其通过多元线性回归,认为 SicAM-1 水平与 SIVD 患者认知能力无相关性<sup>[6]</sup>。但是,周兴盛等人 (2019) 认为 SicAM-1 水平与 SIVD 患者认知能力直接相关,患者认知障碍越严

表4 模型系数<sup>a</sup>

Table 4 Model coefficients

因素	未标准化系数		标准化系数	t 值	P 值	95%CI	共线性统计	
	$\beta$ 值	S.E. 值	$\beta'$ 值				容差	VIF
(常量)	52.272	20.805		2.512	0.015	10.417~94.126		
SicAM-1	0.009	0.008	0.113	1.262	0.213	-0.006~0.025	0.423	2.364
sCD40L	0.057	0.482	0.014	0.118	0.906	-0.912~1.026	0.246	4.073
ADMA	-7.148	2.311	-0.416	-3.093	0.003	-11.797~-2.499	0.186	5.379
ALP	0.013	0.070	0.025	0.180	0.858	-0.128~0.153	0.167	5.987
性别	0.154	1.297	0.008	0.118	0.906	-2.456~2.763	0.717	1.394
年龄	0.224	0.094	0.231	2.393	0.021	0.036~0.413	0.360	2.781
身高	0.092	0.049	0.171	1.855	0.070	-0.008~0.191	0.395	2.531
体重	0.008	0.049	0.014	0.169	0.866	-0.091~0.108	0.460	2.175
胆固醇	2.059	0.846	0.247	2.435	0.019	0.358~3.760	0.326	3.065
尿素氮	-0.310	0.670	-0.049	-0.463	0.646	-1.659~1.038	0.304	3.289
肌酐	-0.969	0.306	-0.433	-3.163	0.003	-1.585~-0.353	0.180	5.563
血糖	-0.104	0.662	-0.015	-0.157	0.876	-1.437~1.229	0.378	2.648
高血压	0.474	1.303	0.027	0.364	0.717	-2.147~3.096	0.606	1.649
糖尿病	0.141	1.173	0.008	0.120	0.905	-2.219~2.500	0.744	1.344
抽烟史	-1.315	1.377	-0.073	-0.955	0.344	-4.086~1.455	0.579	1.728

注:<sup>a</sup>因变量:MMSE。

重, SicAM-1 含量会随着上升<sup>[7]</sup>。国外部分研究人员也持相同看法, Sanchez A R 等人(2019)认为, 内皮细胞功能障碍和随后的炎症导致血管认知障碍(VCI)的发生, 而 SicAM-1 会在内皮细胞功能障碍中上调, 促进炎症反应的发生<sup>[8]</sup>。Garcia Delatorre P(2019)则直接将 SicAM-1 作为老年人血管认知障碍的一个生物标志物, 同时指出 SicAM-1 和 VCI 之间是模棱两可<sup>[9]</sup>。为此, 研究 SicAM-1 与认知功能之间的相关机理有待进一步探究。

sCD40L 通过氧化应激反应, 降低活性氮的使用, 损伤患者血管内皮细胞再生能力, 或通过上调 SicAM-1 而诱发炎症反应, 损伤患者大脑神经元和神经突, 导致患者认知功能的下降<sup>[10]</sup>。本实验来看, 重症组患者的 sCD40L 要高于轻症组和对照组, 其症状越严重该含量越高。ADMA 是内皮型一氧化氮合酶抑制剂, 通过与底物左旋精氨酸竞争性结合一氧化氮合酶活性部位, 从而导致 NO 生成减少, 导致内皮功能障碍, 影响认知功能。

ALP 作为一种钙化剂, 容易造成血管钙化, 在心肝肺等脏器中发挥着重要作用, 是诊断肾功能障碍、骨骼代谢性疾病、胆道阻塞等相关疾病的生化指标。临床研究实践中, ALP 作为炎症因子, 被广泛应用到脑血管疾病等当中, 如余青龙等<sup>[11]</sup>人(2018)就从脑卒中合并血管认知功能障碍研究中指出血清 SAA、BDNF、ALP 水平与认知功能障碍之间有关, 这与本文的研究较为一致。血清 ALP 与 SIVD 患者认知功能障碍有关, 是脑白质脱髓鞘、腔隙性脑梗死

等引起的小动脉硬化所致, 而 ALP 是血管平滑肌细胞钙化的物质, 能通过内膜钙化造成动脉硬化, 影响患者的认知功能。

logistic 回归模型来看, ADMA、年龄、胆固醇、肌酐是 SIVD 患者认知功能障碍的独立危险因素, 其中 ADMA 是与内皮细胞功能障碍相关, 直接影响患者的认知功能障碍。有相关研究指出, 随着年龄的增加认知功能障碍的发生几率会增加, MMSE 评分会随着下降, 这说明年龄是影响认知障碍的关键因素<sup>[12]</sup>。大脑中是含有胆固醇含量最高的器官, 大约占到人体胆固醇总量的 25%~30%, 是细胞膜、髓鞘的主要成分, 其含量的升高会导致  $\beta$  淀粉样蛋白的生成增加, 触发进行性认知功能障碍<sup>[13]</sup>。肌酐异常在一定程度上也反映认知障碍的程度情况, 相关研究表明肌酐清除率与认知障碍呈正比, 即认知障碍组的相关数值要低于认知正常组<sup>[14]</sup>。本实验中, 重症组、轻症组与对照组的肌酐情况相比, 呈从高到低的层次变化, 即重症组>轻症组>对照组, 与相关研究相符合。

综上所述, SicAM-1、sCD40L、ADMA、ALP 水平变化与认知功能之间呈负相关关系, 其浓度升高认知功能障碍加剧。回归分析可知, ADMA、年龄、胆固醇、肌酐是 SIVD 患者认知功能障碍的独立危险因素。

#### 参考文献

- [1] 宋莉莉, 倪明珠, 王瑶, 等. 皮质下缺血性血管病患者血清 sCD40L 水平变化及其与认知功能的相关性研究[J]. 中国实用神经疾病杂志, 2019, 22(22):2465-2471.

- [2] 陈杰华, 马海燕. 硬膜外阻滞麻醉术对结肠癌根治术患者认知功能及炎症蛋白表达的影响研究[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2019, 11(4): 315-319+337.
- [3] 倪明珠, 余锋, 刘文灿, 等. 皮下缺血性血管病患者血清 ADMA 变化及其对轻度认知损害的影响[J]. 安徽医科大学学报, 2018, 53(2): 279-283.
- [4] 方向阳, 陈清, 陆玫, 等. 社区老年人认知功能障碍与衰弱的关系研究[J]. 中国全科医学, 2018, 21(2): 185-189.
- [5] Nahler G. Declaration of Helsinki [M]. Dictionary of Pharmaceutical Medicine. Springer Vienna, 2009.
- [6] 张琳, 王超, 王红, 等. 皮下缺血性血管病患者血清炎症因子水平及其与认知功能损害的关系[J]. 广西医学, 2019, 41(16): 2013-2016+2021.
- [7] 周兴盛, 高山, 王京娥, 等. 伴认知功能障碍脑梗死患者血清可溶性细胞间黏附分子 1 水平与认知功能损害的关系[J]. 广西医学, 2019, 41(17): 2171-2173.
- [8] Gregory MA, Manuel-Apolinar L, Sánchez-García S, et al. Soluble Intercellular Adhesion Molecule-1 (sICAM-1) as a Biomarker of Vascular Cognitive Impairment in Older Adults [J]. Dement Geriatr Cogn Disord, 2019, 47(4-6): 243-253.
- [9] Gregory MA, Manuel-Apolinar L, Sánchez-García S, et al. Soluble Intercellular Adhesion Molecule-1 (sICAM-1) as a Biomarker of Vascular Cognitive Impairment in Older Adults [J]. Dement Geriatr Cogn Disord, 2019, 47(4-6): 243-253.
- [10] Hope S, Hoseth E, Dieset I, et al. Inflammatory markers are associated with general cognitive abilities in schizophrenia and bipolar disorder patients and healthy controls [J]. Schizophr Res, 2015, 165(2-3): 188-194.
- [11] 余青龙, 任娟, 周奇卿. 血清 SAA、BDNF、ALP 水平与脑卒中后并发血管性认知功能障碍的关系[J]. 实用预防医学, 2018, 25(5): 565-568.
- [12] 高智玉, 杨团峰, 朱莎, 等. 慢性焦虑、抑郁对老年轻型急性缺血性卒中患者伴发认知功能障碍的影响研究[J]. 中国全科医学, 2018(7): 874-878.
- [13] Rajan KB, Barnes LL, Wilson RS, et al. Apolipoprotein E Genotypes, Age, Race, and Cognitive Decline in a Population Sample [J]. J Am Geriatr Soc, 2019, 67(4): 734-740.
- [14] Kim SJ, Han KT, Jang SY, Park EC, et al. The association between low level of high-density lipoprotein cholesterol and mood disorder using time-dependent analysis [J]. J Affect Disord, 2018, 225(1): 317-325.

(上接第 567 页)

## 参考文献

- [1] 陈万青, 孙可欣, 郑荣寿, 等. 2014 年中国分地区恶性肿瘤发病和死亡分析[J]. 中国肿瘤, 2018, 27(1): 1-14.
- [2] 杨寿艳, 邓彬兵, 孟雄, 等. 肺癌患者血清 miRNA-4534 水平和病理分期与预后的关系[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(10): 1319-1322+1327.
- [3] 郭喜喜, 王振华, 胡红军, 等. miR-766-3p 调控肺癌细胞增殖、迁移、侵袭的分子机制[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(12): 1621-1625.
- [4] Zhang X, Wang Q, Wu J, et al. Crystal structure of human lysyl oxidase-like 2 (hLOXL2) in a precursor state [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2018, 115(15): 3828-3833.
- [5] Schmelzer C, Heinz A, Troilo H, et al. Lysyl oxidase-like 2 (LOXL2)-mediated cross-linking of tropoelastin [J]. FASEB J, 2019, 33(4): 5468-5481.
- [6] Almacellas-Rabaiget O, Monaco P, Huertas-Martinez J, et al. LOXL2 promotes oncogenic progression in alveolar rhabdomyosarcoma independently of its catalytic activity [J]. Cancer Lett, 2020, 474: 1-14.
- [7] Jourdan-Le SC, Tronecker H, Bogic L, et al. The LOXL2 gene encodes a new lysyl oxidase-like protein and is expressed at high levels in reproductive tissues [J]. J Biol Chem, 1999, 274(18): 12939-12944.
- [8] 展平, 谢海燕. 赖氨酰氧化酶样蛋白 2 在肺腺癌患者中的预后价值[J]. 肿瘤学杂志, 2017, 23(11): 973-977.
- [9] Zhan XH, Jiao JW, Zhang HF, et al. LOXL2 Upregulates Phosphorylation of Ezrin to Promote Cytoskeletal Reorganization and Tumor Cell Invasion [J]. Cancer Res, 2019, 79(19): 4951-4964.
- [10] 杨永宾, 赵伟, 吴胜春, 等. LOXL2 基因沉默对人胃癌细胞株 BGC823 增殖的影响及其机制[J]. 山东医药, 2016, 56(7): 36-38.
- [11] Salvador F, Martin A, Lopez-Menendez C, et al. Lysyl Oxidase-like Protein LOXL2 Promotes Lung Metastasis of Breast Cancer [J]. Cancer Res, 2017, 77(21): 5846-5859.
- [12] 邵兵, 赵秀兰, 刘铁菊, 等. 肝细胞肝癌中 LOXL2 过表达与转移及预后的相关性[J]. 临床与实验病理学杂志, 2016, 32(2): 123-127.
- [13] Ikenaga N, Peng Z, Vaid KA, et al. Selective targeting of lysyl oxidase-like 2 (LOXL2) suppresses hepatic fibrosis progression and accelerates its reversal [J]. Gut, 2017, 66(9): 1697-1708.
- [14] Zeltz C, Pasko E, Cox TR, et al. LOXL1 Is Regulated by Integrin alpha11 and Promotes Non-Small Cell Lung Cancer Tumorigenicity [J]. Cancers (Basel), 2019, 11(5): 705.
- [15] Lee GH, Kim DS, Chung MJ, et al. Lysyl oxidase-like-1 enhances lung metastasis when lactate accumulation and monocarboxylate transporter expression are involved [J]. Oncol Lett, 2011, 2(5): 831-838.

# 组织 miR-1243、LGR5、miR-146a 在 PTC 肿瘤恶性生物学特征评估中价值

游庆华<sup>1</sup> 叶慧英<sup>1</sup> 王佳<sup>1</sup> 徐冬香<sup>2\*</sup>

**[摘要]** **目的** 探讨组织微小 RNA-1243(miR-1243)、富含亮氨酸重复序列的 G 蛋白偶联受体 5(LGR5)、微小 RNA-146a(miR-146a)在甲状腺乳头状癌(PTC)肿瘤恶性生物学特征评估中的价值。**方法** 选取 2017 年 1 月至 2020 年 8 月本院收治的 104 例 PTC 患者组织为癌组织组,并取其癌旁组织作为癌旁组织组。采用分化程度、T 分期、淋巴结转移评估 PTC 恶性生物学特征,采用实时荧光定量 PCR 检测癌组织、癌旁组织的 miR-1243、miR-146a 表达,采用免疫组化检测 LGR5 表达,比较癌组织、癌旁组织的 miR-1243、LGR5、miR-146a 表达,并对数据进行统计学分析。**结果** 癌组织 miR-1243 表达低于癌旁组织,LGR5、miR-146a 表达高于癌旁组织,差异有统计学意义( $P<0.05$ );癌组织 LGR5 阳性率显著高于癌旁组织,差异均有统计学意义( $62.50\%v.4.81\%$ , $P<0.05$ );miR-1243 与 LGR5( $r=-0.570$ , $P<0.001$ )、miR-146a( $r=-0.708$ , $P<0.001$ )呈负相关,LGR5 与 miR-146a 呈正相关( $r=0.726$ , $P<0.001$ );miR-1243 与 T 分期、淋巴结转移呈负相关( $P<0.05$ );LGR5、miR-146a 与 T 分期、淋巴结转移呈正相关( $P<0.05$ )。**结论** 组织 miR-1243、LGR5、miR-146a 可作为评估 PTC 肿瘤恶性生物学特征的分子标志物,为 PTC 靶向治疗、临床决策等提供重要参考信息。

**[关键词]** miR-1243; LGR5; miR-146a; PTC; 肿瘤恶性生物学特征

## Value of tissue miR-1243, LGR5, miR-146a in the evaluation of malignant biological characteristics of papillary thyroid carcinoma

YOU Qinghua<sup>1</sup>, YE Huiying<sup>1</sup>, WANG Jia<sup>1</sup>, XU Dongxiang<sup>2\*</sup>

(1. Department of Pathology, Shanghai Pudong Hospital, Shanghai, China, 201399; 2. Department of Endocrinology, Shanghai Pudong Hospital, Shanghai, China, 201399)

**[ABSTRACT]** **Objective** To investigate the value of tissue microRNA-1243 (miR-1243), leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptor 5 (LGR5), and microRNA-146a (miR-146a) (miR-146a) in the evaluation of the malignant biological characteristics of papillary thyroid carcinoma (PTC). **Methods** A total of 104 PTC patients admitted to our hospital from January 2017 to August 2020 were selected. The malignant biological characteristics of PTC were evaluated by the degree of differentiation, T staging, and lymph node metastasis. Real-time fluorescent quantitative PCR was used to detect the expression of miR-1243 and miR-146a in cancer tissues and adjacent tissues, and the expression of LGR5 was detected by immunohistochemistry. The expressions of miR-1243, LGR5 and miR-146a in cancer tissues and adjacent tissues were compared, and the data were analyzed statistically. **Results** The expression of miR-1243 in cancer tissues was lower than that in adjacent tissues, and the expressions of LGR5 and miR-146a were higher than those in adjacent tissues. The difference was statistically significant ( $P<0.05$ ). The positive rate of LGR5 in cancer tissues was significantly higher than that in adjacent tissues, and the difference was statistically significant ( $62.50\%$  vs  $4.81\%$ ,

基金项目:上海市浦东新区卫生系统重要薄弱学科资助(PWZbr-2017-20)

作者单位:1.上海市浦东医院病理科,上海市 201399

2.上海市浦东医院内分泌科,上海市 201399

\*通信作者:徐冬香, E-mail: dongxiangxu888@163.com

$P<0.05$ ). miR-1243 was negatively correlated with LGR5 ( $r=-0.570$ ,  $P<0.001$ ), miR-146a ( $r=-0.708$ ,  $P<0.001$ ), and LGR5 was positively correlated with miR-146a ( $r=0.726$ ,  $P<0.001$ ). miR-1243 was negatively correlated with T staging and lymph node metastasis ( $P<0.05$ ). LGR5 and miR-146a were positively correlated with T staging and lymph node metastasis ( $P<0.05$ ). **Conclusion** Tissue miR-1243, LGR5, miR-146a can be used as molecular markers to assess the malignant biological characteristics of PTC tumors and provide important reference information for PTC targeted therapy and clinical decision-making.

**[KEY WORDS]** miR-1243; LGR5; miR-146a; PTC; Malignant biological characteristics of tumor

甲状腺乳头状癌(Papillary thyroid carcinoma, PTC)约占全部甲状腺癌的80%~90%,大多预后良好,但存在肿瘤局部侵袭和淋巴结转移患者治疗效果及预后较差,威胁患者生命安全,因此准确评估PTC肿瘤恶性生物学特征意义重大<sup>[1]</sup>。微小RNA(microRNA, miR)是广泛存在于生物体内的非编码小分子RNA,可调控机体60%蛋白质编码基因的转录翻译,从而调控细胞分化、增殖、凋亡<sup>[2]</sup>。其中miR-1243在PTC组织中表达显著降低<sup>[3]</sup>,miR-146a与癌细胞增殖、侵袭、迁移有关<sup>[4]</sup>。富含亮氨酸重复序列的G蛋白偶联受体5(Leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptor 5, LGR5)是具有七次跨膜结构受体超家族成员,能通过上皮间质转化等途径影响多种恶性肿瘤的侵袭性<sup>[5]</sup>。本研究采用自身癌组织、癌旁组织对照研究的方法,探讨miR-1243、LGR5、miR-146a在PTC肿瘤恶性生物学特征评估中价值,为临床治疗决策等提供参考,报告如下。

## 1 资料和方法

### 1.1 一般资料

选取2017年1月至2020年8月本院收治的104例PTC患者组织为癌组织组,取其癌旁组织(癌旁2 cm)为癌旁组织组,其中女87例,男17例;平均年龄( $40.27\pm 8.09$ )岁;体质量指数,平均( $23.15\pm 1.42$ ) $\text{kg}/\text{m}^2$ ;肿瘤直径 $<2$  cm 38例, $\geq 2$  cm 66例;分化程度低分化18例,中分化30例,高分化56例;T分期T1期21例,T2期39例,T3期28例,T4期16例;淋巴结转移无74例,有30例。采用分化程度、T分期、淋巴结转移评估PTC恶性生物学特征<sup>[1]</sup>。

纳入标准:①符合PTC诊断标准<sup>[6]</sup>;②首次确诊,无PTC相关治疗史。③所有患者及家属均知情同意。排除标准:①合并其他系统原发性恶性肿瘤者;②伴有血液系统疾病者;③妊娠期、哺乳期患者;④凝血4项异常者;⑤合并感染疾病者。

### 1.2 方法

入组患者标本获取前均未接受抗PTC治疗,采用实时荧光定量聚合酶链式反应检测组织miR-1243、miR-146a表达,以U6作为内参,miR-1243、miR-146a表达量用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算;采用免疫组化检测组织LGR5表达,染色强度评分<sup>[6]</sup>:未着色、浅黄色、棕黄色、棕褐色依次取0、1、2、3分;阳性细胞比例: $\leq 5\%$ 、5% (不包含)~25%、25% (不包含)~50%、 $>50\%$ 依次取0、1、2、3分,LGR5阳性标准为染色强度评分与阳性细胞比例评分之积 $\geq 2$ 分,分值越高,LGR5表达水平越高。

### 1.3 观察指标

①比较癌组织和癌旁组织miR-1243、LGR5、miR-146a表达。②分析miR-1243、LGR5、miR-146a之间的相关性。③比较不同病理特征患者癌组织miR-1243、miR-146a表达。④比较不同病理特征患者癌组织LGR5阳性率。⑤分析癌组织miR-1243、LGR5、miR-146a与肿瘤恶性生物学特征的相关性。

### 1.4 统计学方法

采用SPSS 22.0处理数据,计量资料以( $\bar{x}\pm s$ )表示,两组间比较采用独立样本 $t$ 检验,多组间比较采用单因素方差分析;计数资料用 $n(\%)$ 表示,行 $\chi^2$ 检验,用Pearson分析miR-1243、LGR5、miR-146a之间的相关性,Spearman分析miR-1243、LGR5、miR-146a与病理特征的关系。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 两组miR-1243、LGR5、miR-146a表达水平比较  
癌组织miR-1243表达低于癌旁组织,LGR5、miR-146a表达高于癌旁组织,差异有统计学意义( $P<0.05$ );癌组织LGR5阳性率为62.50% (65/104),显著高于癌旁组织的4.81% (5/104) ( $\chi^2=77.516$ ,  $P<0.001$ )。见表1。

表1 两组 miR-1243、LGR5、miR-146a 表达水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Comparison of the expression levels of miR-1243, LGR5, and miR-146a between the two groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	miR-1243	LGR5(分)	miR-146a
癌组织	104	1.31±0.12	4.15±1.03	1.24±0.30
癌旁组织	104	1.85±0.24	1.34±0.51	0.66±0.13
t值		20.523	24.933	18.091
P值		<0.001	<0.001	<0.001

## 2.2 miR-1243、LGR5、miR-146a 之间的相关性

以癌组织 miR-1243、LGR5、miR-146a 表达为源数据进行 Pearson 相关性分析,结果显示,miR-1243 与 LGR5( $r=-0.570, P<0.001$ )、miR-146a( $r=-0.708, P<0.001$ )呈负相关,LGR5 与 miR-146a 呈正相关( $r=0.726, P<0.001$ )。见图 1。

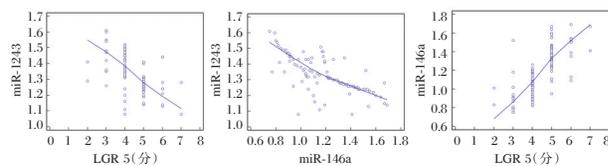


图1 miR-1243、LGR5、miR-146a 之间的相关性

Figure 1 Correlation among miR-1243, LGR5, miR-146a

## 2.3 不同病理特征患者癌组织 miR-1243、miR-146a 比较

不同年龄、体质量指数、性别、肿瘤直径、分化程度患者癌组织 miR-1243、miR-146a 表达比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ );不同 T 分期、淋巴结转移患者癌组织 miR-1243、miR-146a 表达比较,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。见表 2。

表2 不同病理特征患者癌组织 miR-1243、miR-146a 比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Comparison of miR-1243 and miR-146a in cancer tissues of patients with different pathological characteristics ( $\bar{x} \pm s$ )

资料	例数	miR-1243	t/F 值	P 值	miR-146a	t/F 值	P 值	
年龄(岁)	< 65 岁	89	1.30±0.25	1.019	0.311	1.26±0.35	1.465	0.146
	≥65 岁	15	1.37±0.22			1.12±0.29		
体质量指数(kg/m <sup>2</sup> )	正常	45	1.29±0.26	0.80	0.562	1.25±0.32	2.180	0.118
	超重	33	1.35±0.24			1.31±0.37		
	肥胖	26	1.29±0.30			1.13±0.30		
性别	男	17	1.39±0.28	1.389	0.168	1.19±0.31	0.626	0.533
	女	87	1.29±0.27			1.25±0.37		
肿瘤直径	< 2 cm	38	1.24±0.30	1.897	0.063	1.31±0.35	1.725	0.088
	≥2 cm	66	1.35±0.28			1.20±0.29		
分化程度	低分化	18	1.23±0.29	1.174	0.313	1.19±0.27	1.176	0.313
	中分化	30	1.30±0.25			1.21±0.25		
	高分化	56	1.34±0.27			1.27±0.20		
T 分期	T1	21	1.78±0.15	135.239	<0.001	0.71±0.24	92.026	<0.001
	T2	39	1.42±0.17			1.02±0.29		
	T3	28	1.05±0.16			1.36±0.31		
	T4	16	0.88±0.12			2.26±0.37		
淋巴结转移	无	74	1.52±0.25	14.382	<0.001	0.97±0.24	19.258	<0.001
	有	30	0.79±0.19			2.15±0.37		

## 2.4 不同病理特征患者癌组织 LGR5 比较

不同年龄、体质量指数、性别、肿瘤直径、分化程度患者癌组织 LGR5 阳性率比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ );不同 T 分期、淋巴结转移患者癌组织 LGR5 阳性率比较,差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。见表 3。

## 2.5 癌组织 miR-1243、LGR5、miR-146a 与肿瘤恶性生物学特征的相关性

采用 Spearman 进行相关性分析,结果显示,miR-1243 与 T 分期呈负相关淋巴结转移呈负相关( $r_1=-0.515, r_2=-0.479, P<0.05$ );LGR5、miR-146a 与 T 分期呈正相关( $r_1=0.603, r_2=0.482, P<0.05$ ),与淋巴结转移呈正相关( $r_1=0.652, r_2=0.493, P<0.05$ )。

## 3 讨论

miR-1243 系 miR 家族成员之一,目前关于 miR-1243 在恶性肿瘤领域的研究较少,仍处于探索阶段<sup>[7]</sup>。体外培养的 PTC 细胞,采用 miRNA 抑制物沉默 miR-1243 后,可促进 PTC 细胞的增殖,并增强 PTC 细胞迁移能力,呈现出促癌作用<sup>[8]</sup>。既往研究已明确,丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 1 (Akt1)和丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 2 (Akt2)可通过影响甲状腺癌细胞的自噬行为,而调控其增殖、侵袭及凋亡行为产生<sup>[9]</sup>。而转染 miR-1243 模拟物可抑制 Akt1 和 Akt2 表达,减少 PTC 细胞的迁移数,转染 miR-1243 抑制剂则可促进 Akt1 和 Akt2 表达,增加 PTC 细胞的迁移数,提示 miR-1243 是通

表3 不同病理特征患者癌组织LGR5比较 [n(%)]  
Table 3 Comparison of LGR5 in cancer tissues of patients with different pathological characteristics [n(%)]

资料	例数	LGR5		$\chi^2$ 值	P值
		阳性	阴性		
年龄(岁)					
<65岁	89	55(61.80)	34(38.20)	0.130	0.719
≥65岁	15	10(66.67)	5(33.33)		
体质量指数(kg/m <sup>2</sup> )					
正常	45	28(62.22)	17(37.78)	0.030	0.985
超重	33	21(46.67)	12(26.67)		
肥胖	26	16(35.56)	10(22.22)		
性别					
男	17	11(64.71)	6(35.29)	0.042	0.837
女	87	54(62.07)	33(37.93)		
肿瘤直径					
<2 cm	38	24(63.16)	14(36.84)	0.011	0.916
≥2 cm	66	41(62.12)	25(37.88)		
分化程度					
低分化	18	11(61.11)	7(38.89)	0.024	0.988
中分化	30	19(63.33)	11(36.67)		
高分化	56	35(62.50)	21(37.50)		
T分期					
T1	21	8(38.10)	13(61.90)	10.762	0.013
T2	39	23(58.97)	16(41.03)		
T3	28	20(71.43)	8(28.57)		
T4	16	14(87.50)	2(12.50)		
淋巴结转移					
无	74	41(55.41)	33(44.59)	5.509	0.019
有	30	24(80.00)	6(20.00)		

过靶向抑制 Akt1 和 Akt2 表达而调节 PTC 细胞恶性生物学行为的<sup>[10]</sup>。可见采用 miR 技术调控 miR-1243 表达可影响 PTC 细胞的恶性生物学特征,为 PTC 的靶向性防治和细胞侵袭行为评估提供了一个新思路。但 miR-1243 是否还能通过其他途径调控 PTC 肿瘤恶性生物学特征尚不明确,仍需后续更多报道的论证。

LGR5 基因定位于染色体 12q21.1,是 G 蛋白偶联受体家族成员之一<sup>[11]</sup>。本研究显示,癌组织 LGR5 阳性率高于癌旁组织,与徐宁等<sup>[12]</sup>报道相似,佐证了 LGR5 与 PTC 有关。同时在以上研究基础上,本研究还发现,LGR5 与 T 分期、淋巴结转移呈正相关,表明 LGR5 对 PTC 侵袭行为具有正向促进作用。PTC 细胞增殖过程中,微环境中干细胞生长因子分泌增多,结合 LGR5 受体后,激活了 Wnt 信号通路,促进上皮间质化进程和细胞增殖、存活,持续性的激活 Wnt 信号可导致“遗传调控门控基因”缺失,从而促进肿瘤的发生和进展<sup>[13]</sup>。且 LGR5 还能介导血管内皮生长因子表达,促进血管新生,增加肿瘤微血管密度,为肿瘤细胞生长和侵袭提供养分<sup>[14]</sup>。因此临床上对 LGR5 表

达水平较高的患者,应警惕病情进展的风险,必要时采用相关措施与强化治疗,以改善患者预后。

miR-146a 定位于第 5 号染色体 LOC285628 基因的第二个外显子上,与 miR 家族其他成员部分功能相似,具有调控细胞增殖、凋亡的作用<sup>[15]</sup>。但目前关于 miR-146a 在甲状腺癌中的表达尚存在争议,李文祥等<sup>[16]</sup>报道,与甲状腺良性疾病相比,PTC 组织 miR-146a 表达显著升高,本研究观点与之相似。且 miR-146a 与 T 分期呈正相关,并与淋巴结转移呈正相关,可作为评估 PTC 恶性生物学行为的分子标志物。由于本研究 T1+T2 较多,T3+T4 较少,在早期机体适应性和应激性反馈刺激下,miR-146a 较癌旁组织升高,以抵抗癌症,至晚期时,机体这种调控机制失代偿,从而出现 miR-146a 的降低,但这一观点的可靠性仍有待后续研究的进一步论证。另 miR-1243、LGR5、miR-146a 之间具有显著的相关性,表明各指标可相互影响,共同参与 PTC 的发病和进展。

综上,组织 miR-1243、LGR5、miR-146a 可作为评估 PTC 肿瘤恶性生物学特征的分子标志物,为 PTC 靶向治疗、临床决策等提供重要参考信息。

## 参考文献

- [1] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 甲状腺癌诊疗规范(2018年版)[J]. 中华普通外科学文献(电子版), 2019, 13(1):1-15.
- [2] 冯燕枝,张景臣,刘薇. 三阴性乳腺癌中 miR-135b、LZTS1 表达水平对评估新辅助化疗疗效的价值[J]. 热带医学杂志, 2020, 20(4):525-529+566.
- [3] Zhang J, Liu Y, Liu Z, et al. Differential expression profiling and functional analysis of microRNAs through stage I-III papillary thyroid carcinoma[J]. Int J Med Sci, 2013, 10(5):585-92.
- [4] 陈辉国,周亚夫,颜建华,等. 肺癌 miR-146a 表达及其对细胞增殖,侵袭及迁移的影响[J]. 临床肿瘤学杂志, 2020, 25(3):37-42.
- [5] 张璐,姚岚. LGR5 对宫颈癌细胞上皮间质转化的影响及潜在机制研究[J]. 临床和实验医学杂志, 2018, 17(5):475-479.
- [6] 中国抗癌协会甲状腺癌专业委员会(CATO). 甲状腺微小乳头状癌诊断与治疗中国专家共识(2016版)[J]. 中国肿瘤临床, 2016, 43(10):405-411.
- [7] 张诺,郭明蔚,陈桂武,等. 益赛普联合柳氮磺吡啶治疗强直性脊柱炎疗效及 miR-29a、miR-146a 的变化[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(5):587-591.
- [8] 底旺,冀宏,李清怀. 微小 RNA-1243 在甲状腺乳头状癌组织的表达及其对人甲状腺癌细胞株 TPC-1 增殖和迁移的影响[J]. 中华实验外科杂志, 2018, 35(11):2125-2127.

# CD133、HER2 及 PODXL 水平变化与胃癌病理特征、预后关系

杨明<sup>1\*</sup> 邢坤<sup>1</sup> 王晓艳<sup>2</sup> 宋艳芳<sup>3</sup>

**[摘要]** 目的 研究 CD133、人表皮生长因子受体 2(HER2)及足糖萼蛋白(PODXL)表达与胃癌病理特征关系及其对预后生存的预测价值。**方法** 收集 80 例胃癌患者的临床资料作为胃癌组,另选取同期本院健康体检者 74 例作为对照组,采用免疫组化方法检测两组受检者 CD133、HER2 及 PODXL 蛋白表达情况,并对 CD133、HER2 及 PODXL 蛋白表达与胃癌临床病理特征、预后生存进行统计分析。**结果** 胃癌组 CD133、HER2 及 PODXL 阳性表达率高于对照组,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。CD133 阳性、阴性表达者肿瘤直径、分化程度、TNM 分期及淋巴结转移比较差异有统计学意义( $P<0.05$ )。PODXL 阳性表达者肿瘤分化程度、TNM 分期均明显高于 PODXL 阴性表达者,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。术后对患者进行 1 年随访,其中死亡 13 例,死亡率为 16.25%。多元 Logistic 回归分析结果显示,肿瘤分化程度低、TNM 分期 III~IV、合并淋巴结转移、CD133、HER2 及 PODXL 阳性表达是影响胃癌患者预后死亡的危险因素( $P<0.05$ )。采用 ROC 曲线分析 CD133、HER2 及 PODXL 单项及联合检测对胃癌患者预后生存的预测价值,CD133、HER2 及 PODXL 单项及联合检测曲线下面积分别为 0.746、0.686、0.711、0.871。**结论** CD133、HER2 及 PODXL 在胃癌中存在异常表达,推测 CD133、HER2 及 PODXL 参与了胃癌组织增生、分化及发展过程,临床上可通过检测三者表达情况对患者病情进展及预后进行评估。

**[关键词]** 胃癌; CD133; PODXL 蛋白; HER2

## The relationship between the changes of CD133, HER2 and PODXL levels and the pathological characteristics and prognosis of gastric cancer

YANG Ming<sup>1\*</sup>, XING Kun<sup>1</sup>, WANG Xiaoyan<sup>2</sup>, SONG Yanfang<sup>3</sup>

(1. Department of General Surgery, Zhoukou Infectious Disease Hospital, Zhoukou, Henan, China, 466000; 2. Department of Laboratory Medicine, Zhoukou Infectious Disease Hospital, Zhoukou, Henan, China, 466000; 3. Department of Pathology, Zhoukou Central Hospital, Zhoukou, Henan, China, 466000)

**[ABSTRACT]** **Objective** To study the relationship between the expression of CD133, human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) and podoxalysin (PODXL) and the pathological characteristics of gastric cancer and its predictive value for prognostic survival. **Method** The clinical data of 80 patients with gastric cancer (gastric cancer group) were collected. In addition, 74 patients who underwent physical examination in our hospital during the same period were selected as the control group. Immunohistochemical method was used to detect the expression of CD133, HER2, and PODXL protein in the two groups. And the CD133, HER2 and PODXL protein expression and the clinicopathological characteristics and prognostic survival of gastric cancer were analyzed. **Result** The positive expression rates of CD133, HER2 and PODXL in the gastric cancer group were higher than those in the control group, and the difference was statistically significant ( $P<$

基金项目:河南省医学科技攻关计划(201803513)

作者单位:1. 周口市传染病医院普外科,河南,周口 466000

2. 周口市传染病医院检验科,河南,周口 466000

3. 周口市中心医院病理科,河南,周口 466000

\*通信作者:杨明, E-mail: yangming202107@163.com

0.05). There were statistically significant differences between patients with CD133 positive or negative expression in tumor diameter, degree of differentiation, TNM stage and lymph node metastasis ( $P < 0.05$ ). The degree of tumor differentiation and TNM stage in patients with positive expression of PODXL were significantly higher than those with negative expression of PODXL ( $P < 0.05$ ). The patients were followed up for 1 year after the operation, 13 cases died, and the mortality rate was 16.25%. The results of multivariate logistic regression analysis showed that the low tumor differentiation, the TNM stage III~IV, the combined lymph node metastasis, the positive expression of CD133, HER2 and PODXL were risk factors affecting the death prognosis of patients with gastric cancer ( $P < 0.05$ ). The ROC curve was used to analyze the predictive value of CD133, HER2 and PODXL alone and combined detection of them for the prognostic survival of patients with gastric cancer. The area under the curves of single CD133, HER2 and PODXL and the curve of combined detection were 0.746, 0.686, 0.711, 0.871, respectively. **Conclusion** CD133, HER2 and PODXL are abnormally expressed in gastric cancer. It is speculated that CD133, HER2 and PODXL are involved in the proliferation, differentiation and development of gastric cancer tissue. Clinically, the progress and prognosis of patients can be evaluated by detecting the expression of these three.

**[KEY WORDS]** Gastric cancer; CD133; PODXL protein; HER2

胃癌是起源于胃黏膜上皮的恶性肿瘤。近年来,胃癌死亡率呈上升趋势,发病年龄有明显的年轻化趋势<sup>[1]</sup>。早期胃癌多无特异性临床症状,这也是早期诊断率不高的原因之一<sup>[2]</sup>。CD133是目前研究较多的肿瘤标志物。既往研究发现,CD133在胃肠肿瘤侵袭、转移中可能具有重要作用<sup>[3]</sup>。人表皮生长因子受体2(human epidermal growth factor receptor 2, HER2)也是肿瘤标志物之一,其阳性表达可使细胞信号转导系统活化,加快癌细胞增殖、分化<sup>[4]</sup>。而足糖萼蛋白(podocalyxin-like protein, PODXL)是CD34家族唾液酸糖蛋白,临床相关文献显示该因子与多种肿瘤的侵袭、浸润及不良预后具有一定相关性<sup>[5]</sup>。本研究将对CD133、HER2及PODXL蛋白表达与胃癌病理特征关系及其预后生存的预测价值进行探讨,以期对胃癌患者靶向治疗提供帮助。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

回顾性分析本院2017年6月至2019年6年收治且经病理活检确诊的胃癌患者的临床资料。纳入标准:①均符合胃癌诊断标准<sup>[6]</sup>;②临床资料完整,无缺损或丢失;③均行胃癌根治术;④所有患者均自愿参与本次研究且签署知情同意书。排除标准:①合并肝肾功能缺陷;②术后3个月内死亡者;③合并精神疾病者;④合并慢性系统疾病者。

最终共纳入80例患者,男性46例,女性34例,年龄37~67岁,平均年龄(62.14±11.58)岁;TNM分期<sup>[7]</sup>: I~II期17例, III~IV期63例;淋巴结

转移58例;远处转移7例。同期选取在本院进行健康体检的74例健康体检者作为对照组,男性41例,女性33例,年龄36~68岁,平均年龄(62.97±11.88)岁,两组患者一般资料比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),具有可比性。

### 1.2 方法

采用链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶(Streptomyacin avidin peroxidase, S-P)免疫组化染色,标本均用甲醛溶液浸泡,常规脱水、透明、浸蜡、石蜡包埋,4.0 μm厚度连续切片。主要试剂:兔抗人CD133单克隆抗体、兔抗人HER2单克隆抗体;PODXL蛋白采用GTVision III抗鼠/兔通用型免疫组化检测试剂盒。上述抗体及SP法超敏试剂盒均由福州迈新生物技术开发公司生产。检测过程严格按照说明进行。一抗阴性对照使用PBS(磷酸盐缓冲液)进行代替。

染色结果判断<sup>[8]</sup>:根据阳性细胞百分比、染色强度判定。0分、1分、2分、4分。染色强度判定:无色为0分,淡黄色为1分,棕黄色为2分,棕褐色为3分。总积分:上述2项评分的乘积。综合判定结果为显色与阳性细胞比例量化指标乘积:0~3分为阴性(-),4~5分为弱阳性(+),6~7分为中度阳性(++),8~12分为强阳性(+++)。

### 1.3 观察指标

①比较不组别CD133、HER2及PODXL蛋白表达情况。②分析CD133、HER2及PODXL蛋白表达与胃癌临床病理特征的关系。③对患者进行1年电话随访,分析其预后生存情况,并分析CD133、HER2及PODXL蛋白表达对胃癌患者预后生存的预测价值。

### 1.4 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析,计数资料以  $n(\%)$  表示,采用  $\chi^2$  检验;计量资料以  $(\bar{x} \pm s)$  描述,采用  $t$  检验;采用多元 Logistic 回归分析影响胃癌患者预后生存的独立危险因素;采用 ROC 曲线分析 CD133、HER2 及 PODXL 对胃癌患者预后生

存的预测价值;以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

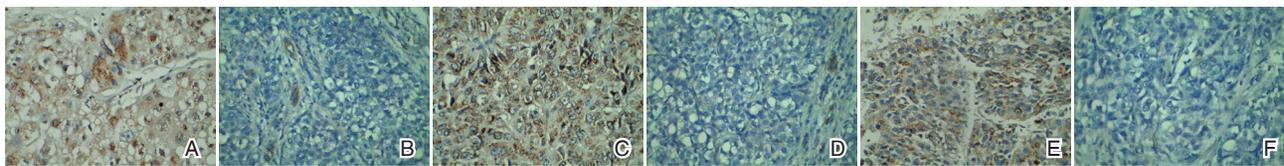
## 2 结果

### 2.1 不同组别 CD133、HER2 及 PODXL 蛋白表达

胃癌组 CD133、HER2 及 PODXL 阳性表达率均高于对照组,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 1、图 1。

表 1 不同组别 CD133、HER2 及 PODXL 蛋白表达 [ $n(\%)$ ]  
Table 1 Expression of CD133, HER2 and podxl in different groups [ $n(\%)$ ]

组别	n	CD133		HER2		PODXL	
		阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性
胃癌组	80	49(61.25)	31(38.75)	19(23.75)	61(76.25)	69(86.25)	11(13.75)
对照组	74	7(9.46)	67(90.54)	1(1.35)	73(98.65)	6(8.11)	68(91.89)
$\chi^2$ 值		17.744		17.067		93.955	
P 值		<0.001		<0.001		<0.001	



注:A 为胃癌患者 CD133 蛋白表达。B 为正常人群 CD133 蛋白表达。C 为胃癌患者 HER2 蛋白表达。D 为正常人群 HER2 蛋白表达。E 为胃癌 PODXL 蛋白表达。F 为正常人群 PODXL 蛋白表达。

图 1 CD133、HER2 及 PODXL 蛋白在不同人群中的表达情况 (SP, ×400)

Figure 1 expression of CD133, HER2 and podxl proteins in different populations (SP, ×400)

### 2.2 CD133、HER2 及 PODXL 蛋白表达与胃癌临床病理特征的关系

CD133 阳性与阴性表达者年龄、性别、肿瘤位置比较差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 但 CD133 阳性与阴性表达者肿瘤直径、分化程度、TNM 分期及淋巴结转移比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。PODXL 阳性表达者肿瘤分化程度、TNM 分期均明显高于 PODXL 阴性表达者, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 2。

### 2.3 影响胃癌患者预后死亡的危险因素分析

术后对患者进行 1 年随访, 其中死亡 13 例, 死亡率为 16.25%。多元 Logistic 回归分析结果显示, 肿瘤分化程度低、TNM 分期 III~IV、合并淋巴结转移、CD133、HER2 及 PODXL 阳性表达是影响胃癌患者预后死亡的危险因素 ( $P < 0.05$ )。见表 3。

### 2.4 CD133、HER2 及 PODXL 单项及联合检测对胃癌患者预后生存的预测价值

ROC 曲线分析示, 以 CD133、HER2 及 PODXL

表 2 CD133、HER2 及 PODXL 蛋白表达与胃癌临床病理特征的关系 [ $n(\%)$ ]

Table 2 Relationship between CD133, HER2 and podxl protein expression and clinicopathological features of gastric cancer [ $n(\%)$ ]

临床病理特征	n	CD133 阳性 (n=49)	$\chi^2$ 值	P 值	HER2 阳性 (n=19)	$\chi^2$ 值	P 值	PODXL 阳性 (n=69)	$\chi^2$ 值	P 值
年龄(岁)	<50	48	30(62.50)	0.079	10(20.83)	0.564	0.453	43(89.58)	1.124	0.289
	≥50	32	19(59.38)					9(28.13)		
性别	男	51	28(54.90)	2.389	12(23.53)	0.004	0.951	45(88.24)	0.468	0.494
	女	29	21(72.41)					7(24.14)		
肿瘤直径(cm)	<3	37	18(48.65)	4.606	8(21.62)	0.172	0.678	30(81.08)	1.551	0.213
	≥3	43	31(72.09)					11(25.58)		
分化程度	低	7	1(14.29)	7.129	6(85.71)	16.265	0.001	4(57.14)	5.480	0.019
	中~高	73	48(65.75)					13(17.81)		
TNM 分期	I~II	17	5(29.41)	9.220	2(11.76)	1.712	0.191	11(64.71)	8.449	0.004
	III~IV	63	44(69.84)					17(26.98)		
淋巴结转移	有	58	40(68.97)	5.290	18(31.03)	6.180	0.013	52(89.66)	2.062	0.151
	无	22	9(40.91)					1(4.55)		
肿瘤位置	贲门、胃体	56	36(64.29)	0.725	10(17.86)	3.579	0.058	50(89.29)	10451	0.228
	胃窦	24	13(54.17)					9(37.50)		

表3 影响胃癌患者预后死亡的危险因素分析

Table 3 Analysis of risk factors affecting the prognosis and death of gastric cancer patients

变量	单因素分析			多因素分析		
	OR 值	95%CI	P 值	OR 值	95%CI	P 值
性别:男(参照组:女)	1.239	0.989~1.552	0.724	-	-	-
年龄:≥50岁(参照组:<50岁)	1.250	0.871~1.793	0.697	-	-	-
肿瘤直径:≥3 cm(参照组:<3 cm)	1.260	0.850~1.868	0.514	-	-	-
肿瘤分化程度:低(参照组:中高)	1.644	1.312~2.059	0.014	1.730	1.254~2.386	<0.001
TNM分期:Ⅲ~Ⅳ(参照组:Ⅰ~Ⅱ)	1.650	1.289~2.113	0.023	1.749	1.261~2.426	<0.001
淋巴结转移:有(参照组:无)	1.398	1.062~1.839	0.021	2.330	1.778~3.054	<0.001
肿瘤位置:贲门、胃体(参照组:胃窦)	1.121	0.756~1.662	0.541	-	-	-
CD133 阳性(参照组:阴性)	1.960	1.595~2.048	0.007	1.842	1.111~3.055	<0.001
HER2 阳性(参照组:阴性)	1.692	1.269~2.257	0.002	2.401	1.775~3.247	<0.001
PODXL 阳性(参照组:阴性)	1.571	1.253~1.970	0.014	2.575	1.949~3.401	<0.001

联合检测曲线下面积最大,为 0.871。见表 4、图 2。

表 4 CD133、HER2 及 PODXL 蛋白单项及联合检测对胃癌患者预后生存的预测价值

Table 4 The predictive value of single and combined detection of CD133, HER2 and podxl on prognosis and survival of patients with gastric cancer

预测因子	最佳临界值	敏感度	特异度	ROC 曲线下面积	95%CI
CD133	17.65	0.718	0.435	0.746	0.583~0.909
HER2	16.92	0.507	0.865	0.686	0.510~0.861
PODXL	15.98	0.612	0.712	0.711	0.537~0.886
三者联合	19.87	0.971	0.802	0.871	0.772~0.971

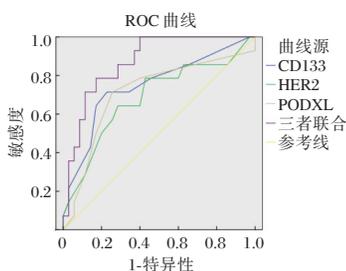


图 2 CD133、HER2 及 PODXL 单项及联合检测曲线分析  
Figure 2 Analysis of single and combined detection curves of CD133, HER2 and podxl

### 3 讨论

据相关统计发现,全球每年胃癌病例正逐年增加,该病对人类的生命安全造成严重威胁<sup>[9]</sup>。随着医疗技术的不断进步与发展,胃癌的治疗水平逐渐提升,但仍有大部分患者死于复发与转移。因此,早期诊断和寻找合适的生物标志物,对患者预后具有重要意义。近年来,CD133、HER2 及 PODXL 蛋白等生物分子检验成为了临床的热门研究<sup>[10]</sup>。

CD133 是一个相对分子量为 120×10<sup>3</sup> 的 5 次跨膜糖蛋白,在不同肿瘤组织或胚胎组织中的表达情

况存在一定差异<sup>[11]</sup>。Maiti 等<sup>[12]</sup>研究发现,CXCR4 能通过 PI3K/Akt 通路上调肿瘤起始细胞标志物 CD133 的表达;而 CD133<sup>+</sup>细胞可增强胃癌增殖与侵袭能力。本组研究发现胃癌组 CD133 阳性表达率更高,表明阳性表达率越高,CD133 蛋白含量越高;且肿瘤直径越大、分化程度高、TNM 分期越高、有淋巴结转移,其 CD133 阳性表达率越高,与 Roy 等<sup>[13]</sup>报道基本相符。

HER2 是肿瘤重要的生物标记物之一。其在胃癌中的阳性表达率不尽一致。Park 等<sup>[14]</sup>研究显示 HER2 阳性表达率为 22.1%。HER2 表达与胃癌的部分临床病理特征可能具有一定关系。Mitsuda 等<sup>[15]</sup>报道发现,分化程度低、有淋巴结转移者 HER2 阳性表达率更高。本组研究与上述文献报道相符,这可能与 HER-2 通过多种信号途径介导恶性肿瘤细胞的生物学行为有关。

PODXL 是富含负电荷的唾液酸糖蛋白。近年来,大量研究显示 PODXL 蛋白在多种肿瘤的转移、发展中具有重要作用,其具体机制尚未明确<sup>[16]</sup>。本组研究通过分析不同组织中 PODXL 表达发现,胃癌组织中 PODXL 阳性表达率显著高于正常胃组织。说明 PODXL 在胃癌发生、发展中发挥重要作用。进一步分析 PODXL 表达与胃癌临床病理特征的关系发现,其阳性表达率与肿瘤分化程度、TNM 分期关系密切。可见 PODXL 蛋白在高中分化及后期的患者中表达水平较高,推测 PODXL 蛋白通过介导侵袭,参与了胃癌细胞的生存及凋亡。

为深入了解胃癌患者预后情况,本研究对 80 例胃癌患者预后情况进行相关研究发现,肿瘤分化程度低、TNM 分期Ⅲ~Ⅳ、合并淋巴结转移、CD133、HER2 及 PODXL 阳性表达均是影响胃癌患者预后死亡的独立危险因素,这可能与临床分

期增高,患者病情加重,疾病进展严重,影响治疗效果有关。而通过ROC曲线分析显示,CD133、HER2及PODXL联合对胃癌患者预后生存的预测价值最佳,进一步提示联合检测三指标可作为预测患者预后生存的有效手段。此外,本研究中存在一些不足之处在于纳入样本量较少,研究结果难免存在偏倚,后续仍将继续深入研究。

综上所述,CD133、HER2及PODXL在胃癌中阳性表达率高,推测CD133、HER2及PODXL参与了胃癌组织增生、分化及发展过程,临床上可通过检测三者表达情况对患者病情进展及预后进行评估。

### 参考文献

- [1] 董磊,夏猛,尚康兴,等.胃癌患者手术前后血清VEGF, MMP-2, MMP-9水平变化及其临床意义[J].分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(9):97-101.
- [2] Chao OS, Chang T, Di Bella MA, et al. The HDAC6 Inhibitor Tubacin Induces Release of CD133+ Extracellular Vesicles From Cancer Cells[J]. J Cell Biochem, 2017, 118(12):4414-4424.
- [3] Li P, Karaczyn AA, Mcglauffin R, et al. Novel roles for podocalyxin in regulating stress myelopoiesis, Rap1a, and neutrophil migration[J]. Exp Hematol, 2017, 50:77-88.e6.
- [4] 丁志,周祥,徐锐,等.术前辅助化疗对胃癌患者手术并发症及生活质量的影响[J].解放军医药杂志, 2019, 31(1):28-31.
- [5] Mancebo G, Sole-Sedeno JM, Pino O, et al. Prognostic impact of CD133 expression in Endometrial Cancer Patients[J]. Sci Rep, 2017, 7(1):7687.
- [6] Schulten HJ, Hussein D. Array expression meta-analysis of cancer stem cell genes identifies upregulation of PODXL especially in DCC low expression meningiomas [J]. Plos One, 2019, 14(5):e0215452.
- [7] 白建伟,李岩,王峰,等.绿原酸调控胃癌SGC-7901细胞Bax和Caspase-3蛋白诱导细胞凋亡的作用[J].医学分子生物学杂志, 2018, 15(3):56-57.
- [8] Klempner SJ, Chao J. Toward Optimizing Outcomes in Her2-positive Gastric Cancer: Timing and Genomic Context Matter [J]. Ann Oncol, 2018, 29(4):801-802.
- [9] Seo S, Ryu MH, Ahn JY, et al. Loss of HER2 positivity after anti-HER2 chemotherapy in HER2-positive gastric cancer patients: Results of GASTric cancer HER2 reassessment study 3 (GASTHER3)[J]. J Clin Oncol, 2017, 35(4\_suppl):27-28.
- [10] Laura C, Gianmaria M, Angela B, et al. Characterizing Metastatic HER2-Positive Gastric Cancer at the CDH1 Haplotype [J]. Int J Mol Sci, 2017, 19(1):47-49.
- [11] Katsutoshi S, Daisuke I, Yuji F, et al. Monitoring the HER2 copy number status in circulating tumor DNA by droplet digital PCR in patients with gastric cancer [J]. Gastric Cancer, 2017, 5(11):12167.
- [12] Maiti A, Hait NC. Abstract 39: LCN2, CD133 expressions in breast cancer spinal bone metastasis and CD151, TWIST1, EPHA2 in lung metastasis: Prognostic value and organ-specific relapse [J]. Cancer Res, 2018, 78(13 Supplement):39-40.
- [13] Roy S, Lu K, Nayak MK, et al. Activation of D 2 Dopamine Receptors in CD133+ve Cancer Stem Cells in Non-small Cell Lung Carcinoma Inhibits Proliferation, Clonogenic Ability, and Invasiveness of These Cells [J]. J Biol Chem, 2017, 292(2):435-445.
- [14] Park H, Uronis H, Kang YK, et al. Determinants of response of HER2+ gastric cancer (GC) vs gastroesophageal junction adenocarcinoma (GEJ) to margetuximab (M) plus pembrolizumab (P) post trastuzumab (T) [J]. Ann Oncol, 2019, 30(9):485.
- [15] Mitsuda Y, Morita K, Kashiwazaki G, et al. RUNX1 positively regulates the ErbB2/HER2 signaling pathway through modulating SOS1 expression in gastric cancer cells [J]. entif Sci Rep, 2018, 8(1):6423.
- [16] Amir BB, Amir S, Syahida A. CD133: beyond a cancer stem cell biomarker [J]. J Drug Target, 2018, 18(1):114-115.

(上接第576页)

- [9] 刘涛,赵艳红,王利萍,等.丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶激活的长链非编码RNA对甲状腺癌细胞凋亡和自噬行为的影响[J].中南大学学报(医学版), 2018, 43(7):747-753.
- [10] 冀宏,底旺,李清怀.微小RNA-1243直接靶向丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶1和丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶2调节甲状腺乳头状癌TPC-1细胞迁移[J].中华实验外科杂志, 2018, 35(11):2048-2050.
- [11] Leung C, Tan SH, Barker N. Recent Advances in Lgr5+ Stem Cell Research[J]. Trends Cell Biol, 2018, 28(5):380-391.
- [12] 徐宁,王小保,马运涛,等.甲状腺乳头状癌组织LGR5、Cath-D表达变化及其与患者临床病理特征的关系[J].山东医药, 2019, 59(31):23-26.
- [13] Tempest N, Baker AM, Wright NA, et al. Does human endometrial LGR5 gene expression suggest the existence of another hormonally regulated epithelial stem cell niche [J]. Hum Rep, 2018, 33(6):1052-1062.
- [14] Xi HQ, Zhang KC, Li JY, et al. RNAi-mediated inhibition of Lgr5 leads to decreased angiogenesis in gastric cancer [J]. Oncotarget, 2017, 8(19):31581-31591.
- [15] Watany MM, Hagag RY, Okda HI. Circulating miR-21, miR-210 and miR-146a as potential biomarkers to differentiate acute tubular necrosis from hepatorenal syndrome in patients with liver cirrhosis: a pilot study [J]. Clin Chem Lab Med, 2018, 56(5):739-747.
- [16] 李文祥,章焱华,吕冠,等. miRNA-146a在桥本甲状腺炎合并乳头状甲状腺癌组织中的表达及其对甲状腺癌K1细胞的调控作用[J].癌症进展, 2019, 17(5):529-532, 558.

# TET1 介导 5-羟甲基胞嘧啶表达抑制突变型 IDH1 过表达胶质瘤细胞增殖、迁移和侵袭

雷梓<sup>1</sup> 陈建功<sup>2</sup> 何颖<sup>1</sup> 李睿<sup>1</sup> 吴莹莹<sup>1\*</sup>

**[摘要]** **目的** 探讨 TET1 介导的 5-羟甲基胞嘧啶(5hmC)表达对异柠檬酸脱氢酶 1(IDH1)突变的 U251 胶质瘤细胞生物学行为的影响。**方法** 构建 R132H 突变型 IDH1 (IDH1<sup>R132H</sup>)过表达载体,转染 U251 人胶质瘤细胞系,实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)及蛋白质免疫印迹(WB)检测 IDH1<sup>R132H</sup>及 TET1 表达水平,免疫荧光检测 5hmC 表达水平。IDH1<sup>R132H</sup>过表达载体与 TET1 过表达载体共转染 U251 细胞,RT-qPCR 和 WB 检测 TET1 表达水平,利用 CCK8 实验检测肿瘤细胞增殖能力,划痕实验检测肿瘤细胞迁移能力,transwell 小室实验检测肿瘤细胞侵袭能力,流式细胞实验检测肿瘤细胞周期及细胞凋亡。**结果** 在 IDH1<sup>R132H</sup>过表达 U251 细胞中,TET1 及 5hmC 表达水平降低,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。IDH1<sup>R132H</sup>过表达 U251 细胞中过表达 TET1 后,5hmC 水平升高,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),同时抑制肿瘤细胞的增殖、迁移、侵袭能力,促进肿瘤细胞凋亡( $P<0.05$ )。**结论** TET1 介导的 5hmC 表达能抑制 IDH1<sup>R132H</sup>过表达 U251 胶质瘤细胞的增殖、侵袭、迁移能力,促进肿瘤细胞凋亡。

**[关键词]** IDH 突变; U251 胶质瘤细胞; TET1; 5hmC

## Effects of 5-hydroxymethylcytosine on biological behavior of IDH mutant glioma

LEI Zi<sup>1</sup>, CHENG Jianguo<sup>2</sup>, HE Ying<sup>1</sup>, LI Rui, WU Yingying<sup>\*</sup>

(1. Department of pathology, The First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming, Yunnan, China, 650032; 2. Department of pathology, Guanganan People's Hospital, Wenshan, Yunnan, 663300)

**[ABSTRACT]** **Objective** To investigate the effect of TET1-mediated 5-hydroxymethylcytosine (5hmC) expression on the biological behavior of U251 glioma cells with isocitrate dehydrogenase 1 (IDH1) mutation. **Methods** The R132H mutant IDH1 (IDH1<sup>R132H</sup>) overexpression vector was constructed, transfected into the U251 human glioma cell line, and the expression levels of IDH1<sup>R132H</sup> and TET1 were detected by real-time fluorescent quantitative PCR (RT-qPCR) and Western blotting (Western Blotting, WB). 5hmC expression level was detected by immunofluorescence. IDH1<sup>R132H</sup> overexpression vector and TET1 overexpression vector were co-transfected into U251 cells, TET1 expression level was detected by RT-qPCR and WB, tumor cell proliferation ability was detected by CCK8 experiment, tumor cell migration ability was detected by scratch test, and tumor cell invasion ability was detected by transwell chamber experiment. Ability, flow cytometry test to detect tumor cell cycle and apoptosis were detected by flow cytometry. **Results** In IDH1<sup>R132H</sup> overexpressing U251 cells, the expression levels of TET1 and 5hmC decreased, and after overexpressing TET1 in IDH1<sup>R132H</sup> overexpressing U251 cells, the 5hmC level increased, inhibiting the proliferation, migration and invasion of tumor cells, and promoting tumor cell apoptosis. **Conclusion** TET1-mediated 5hmC expression can inhibit the proliferation, invasion and migration of U251 glioma cells overexpressing IDH1<sup>R132H</sup>, and promote tumor cell apoptosis.

**[KEY WORDS]** IDH mutation; Glioma; U251 cells; TET1; 5hmC

基金项目:云南省教育厅科学研究基金项目(2018JS210);云南省科技厅省基础研究计划(昆医联合专项)[2019FE001(-211)]国家自然科学基金(8166010413)

作者单位:1. 昆明医科大学第一附属医院病理科,云南,昆明 650032

2. 广南县人民医院,云南,文山 663300

\*通信作者:吴莹莹, E-mail:yingying19850902@163.com

注:雷梓和陈建功共同第一作者

胶质瘤是最常见的原发性脑部肿瘤之一,呈浸润性生长,恶性程度高,其中胶质母细胞瘤具有更高的复发率、致残率、死亡率,严重威胁着人类健康<sup>[1]</sup>。异柠檬酸脱氢酶(isocitrate dehydrogenase, IDH)突变是胶质瘤发生发展中重要的分子事件并且可作为分子分型的依据<sup>[2]</sup>。IDH1最常见的突变是R132H,占所IDH突变的80%。有研究显示IDH1突变是胶质瘤发生过程中的早期事件,在胶质瘤的进展以及复发过程中也起到了重要作用<sup>[3]</sup>。TET家族蛋白(ten-eleven translocation protein family, TETs)是一种依赖 $\alpha$ -酮戊二酸和Fe<sup>2+</sup>而发挥催化活性的双加氧酶。TETs是催化DNA去甲基化过程中的第一步,可将5-甲基胞嘧啶(5-hydroxymethylcytosine, 5mC)转化为5-羟甲基胞嘧啶(5-hydroxymethylcytosine, 5hmC)非甲基化形式<sup>[4]</sup>。TET蛋白介导的DNA脱甲基化在胶质瘤中起到非常重要的作用<sup>[5]</sup>。本研究拟探讨TEF1介导的5-羟甲基胞嘧啶(5hmC)表达对异柠檬酸脱氢酶1(IDH1)突变的U251胶质瘤细胞生物学行为的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞和主要试剂

人胶质瘤细胞U251购自武汉普诺赛公司;胎牛血清(FBS)购自Gibco公司;Trizol试剂盒、逆转录试剂盒购自Invitrogen公司;IDH1-R132H突变质粒及TET1过表达质粒由汉恒生物公司合成;CCK-8试剂盒、凋亡检测试剂盒购自东仁化学公司;细胞周期检测试剂盒购自七海生物公司;Transwell小室、Matrigel基质胶购自美国Corning公司;IDH1抗体、TET1抗体、5hmC抗体购自Abcam公司。

### 1.2 细胞培养与转染

U251细胞使用含10% FBS的DMEM(H)培养基置于37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱培养。按照Lipofectamine 2000转染试剂盒说明书,细胞融合度达到50%时, IDH1<sup>R132H</sup>突变质粒及阴性对照质粒转染细胞,转染6 h后更换新鲜培养基,继续培养48 h,收集细胞检测IDH1、TET1表达水平。细胞转染IDH1-R132H质粒48 h后,继续转染TET1过表达质粒及过表达对照质粒,转染48 h用于后续检测5hmC表达水平及进行功能实验。

### 1.3 qRT-PCR检测TET1 mRNA表达

Trizol试剂盒提取RNA,分光光度计测RNA浓度,按照逆转录试剂盒说明合成cDNA,qRT-PCR扩增目的基因,检测TET1 mRNA的表达水平,以GAPDH作为内部参照,引物序列见表1。

表1 PCR扩增引物及条件

Table 1 Primers and conditions for PCR amplification			
基因	引物序列(5'-3')	产物片段 (bp)	退火温度 (℃)
TET1	F:CTGTTGCTACTGATATGAG	103	60
	R:TGTGAAGAATGTGGAATG		
GAPDH	F:AAAGGGTCATCATCTCTG	80	60
	R:GCTGTTGTCATACTTCTC		

### 1.4 蛋白免疫印迹法检测IDH1、TET1蛋白表达

RIPA裂解液裂解细胞,离心后收集细胞总蛋白,根据BCA试剂盒说明书进行蛋白浓度测定;SDS-PAGE电泳后转移至PVDF膜上,室温封闭1 h,加入一抗(IDH1抗体,TET1抗体),4℃冰箱中过夜后室温复温,加入酶标二抗,室温孵育2 h。TBST洗膜后,ECL显色,吸干膜上的水分,化学发光信号凝胶成像仪采集图像。

### 1.5 免疫荧光法检测5hmC表达水平

制备细胞爬片,使用4%多聚甲醛固定,PBS漂洗,室温通透20 min;5%正常羊血清室温封闭,加入一抗(5hmC抗体),4℃冰箱过夜;TBST漂洗,加入荧光标记二抗,避光、室温孵育2 h;滴加50  $\mu$ L的抗淬灭封片剂(含DAPI)封片,荧光显微镜下观察结果。

### 1.6 CCK-8法检测细胞增殖

转染48 h后消化细胞,将细胞接种至96孔板内,每孔接种1 000个细胞,每组3孔重复,每孔加入10  $\mu$ L CCK-8试剂后培养箱内孵育2 h,使用酶标仪450 nm波长下检测吸光度。

### 1.7 细胞划痕实验检测细胞迁移

Ibidi划痕插件培养皿置于24孔板中;胰酶消化收集细胞,调整悬液浓度为 $2.5 \times 10^4$ 个/mL;在插件左右孔中各加入100  $\mu$ L的细胞悬液;当细胞贴壁后将插件拔出,0、12、24 h倒置显微镜下观察细胞伤口愈合情况并拍照。

### 1.8 Transwell侵袭小室实验检测细胞侵袭

使用Matrigel均匀铺在Transwell膜上,37℃干胶;小室上室内加入细胞悬液,下室内加入含20% FBS的无双抗DMEM(H)完全培养基,培养箱内

培养 48 h。4%多聚甲醛固定液固定 10 min, 结晶紫染色 30 min 后 PBS 清洗, 显微镜下随机选取 5 个视野观察并拍照。

### 1.9 细胞周期检测

收集细胞, 70%预冷乙醇 4℃固定过夜, PBS 清洗后, 离心收集细胞; 用 500 μL 结合缓冲液重悬细胞, 每管加入 12.5 μL PI 和 10 μL RnaseA 室温避光孵育后流式细胞仪下检测细胞周期。

### 1.10 细胞凋亡检测

收集细胞, 用 100 μL 流式凋亡结合缓冲液重悬细胞, 加入 5 μL AnnexinV-FITC 染色液和 5 μL PI 染色液后室温避光孵育 15 min 后; PBS 将每管液体量补至 1 mL 后流式细胞分选仪下检测细胞凋亡。

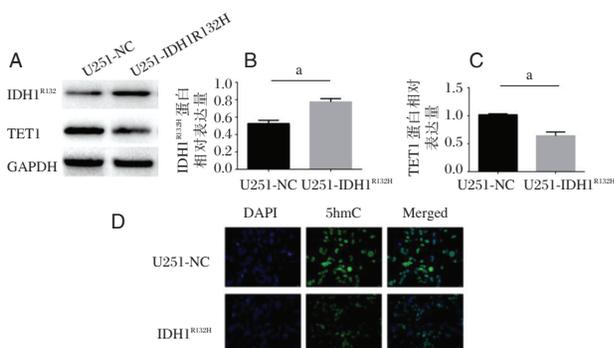
### 1.11 统计学处理

采用 SPSS16.0 软件进行数据统计学分析, 计量资料用 ( $\bar{x} \pm s$ ) 描述, 两组间比较通过 *t* 检验, 以 *P*<0.05 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 Western blot 检测结果

Western blot 检测结果显示: 与 U251-NC 细胞相比, U251-IDH<sup>R132H</sup> 细胞中 IDH1 蛋白表达水平显著升高, 差异有统计学意义 (*P*<0.05) (图 1A、B), TET1 蛋白表达水平显著下降, 差异有统计学意义 (*P*<0.05) (图 1A、C), 免疫荧光检测显示 U251-IDH<sup>R132H</sup> 细胞中 5hmC 的蛋白表达显著降低, 差异有统计学意义 (*P*<0.05) (图 1D)。

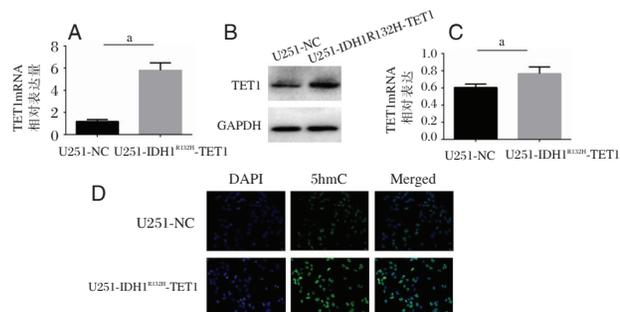


注:A 为与 U251-NC 细胞相比, U251-IDH<sup>R132H</sup> 细胞中 IDH1 蛋白表达水平显著升高, TET1 蛋白表达水平显著下降。B、C 为与 U251-NC 组相比 U251-IDH<sup>R132H</sup> 组 IDH1 表达水平升高、TET1 表达水平下降。<sup>a</sup>*P*<0.05。D 为免疫荧光图。

图 1 Western blot 检测结果  
Figure 1 Western blot results

### 2.2 人胶质瘤 U251 细胞过表达 IDH1<sup>R132H</sup> 与 TET1, TET1 及 5hmC 表达水平上调

Western blot 检测结果显示: 与 U251-NC 细胞相比, U251-IDH<sup>R132H</sup>-TET1 细胞中 TET1 mRNA 及蛋白表达水平显著升高, 差异有统计学意义 (*P*<0.05) (图 2A、B、C), 免疫荧光检测显示 U251-IDH<sup>R132H</sup>-TET1 细胞中 5hmC 的蛋白表达显著上调, 差异有统计学意义 (*P*<0.05) (图 2D)。



注:A 为 RT-PCR 检测图; B、C 为 WB 检测示 TET1 蛋白表达水平显著升高。<sup>a</sup>*P*<0.05。D 为免疫荧光图。

图 2 U251 细胞过表达 IDH1<sup>R132H</sup> 及 TET1 后 TET1 及 5hmC 表达水平

Figure 2 Expression levels of TET1 and 5HMC after overexpression of IDH1<sup>R132H</sup> and TET1 in U251 cells

### 2.3 过表达 IDH1<sup>R132H</sup> 与 TET1 促进 U251 细胞增殖、迁移、侵袭能力。

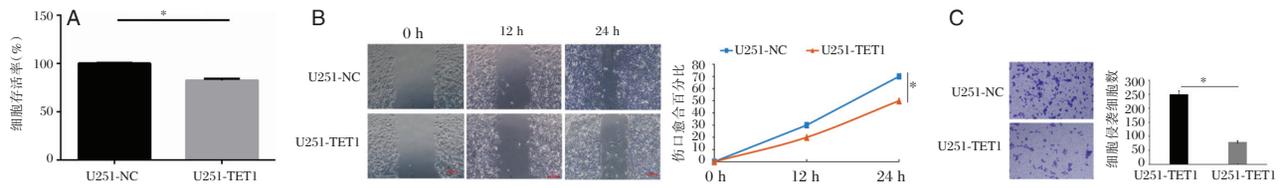
与 U251-NC 细胞相比, U251-IDH<sup>R132H</sup>-TET1 (U251-TET1) 细胞存活率降低, 差异有统计学意义 (*P*<0.05) (图 3A), 迁移能力降低, 侵袭能力降低, 差异有统计学意义 (*P*<0.05) (图 3B、C)。

### 2.4 过表达 IDH1<sup>R132H</sup> 与 TET1 对 U251 细胞周期及凋亡的影响

与 U251-NC 细胞相比, U251-IDH<sup>R132H</sup>-TET1 细胞 G1 期明显增加, S 期和 G2 期明显减少, 差异有统计学意义 (*P*<0.05)。细胞凋亡实验结果显示与 U251-NC 细胞相比, U251-IDH<sup>R132H</sup>-TET1 细胞凋亡明显增加, 差异有统计学意义 (*P*<0.05)。见图 4。

## 3 讨论

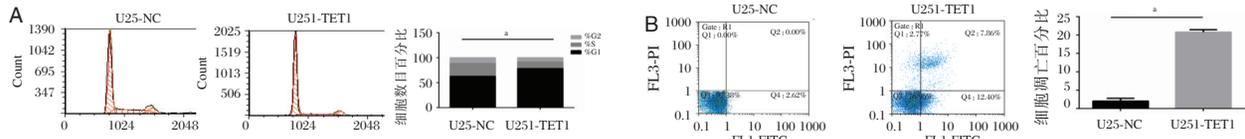
IDH 1 和 IDH 2 在人类恶性肿瘤的发生和发展中所起的重要作用<sup>[6-7]</sup>。现有研究表明, IDH 酶通常催化异柠檬酸的脱羧作用生成 α-酮戊二酸 (α-KG), 在此过程中产生还原型辅酶 II (NADPH), IDH 1 是人大脑及其他组织中 NADPH 的主要来源。NADPH 通过减少氧化谷胱甘肽来



注:A为细胞增殖实验结果;B为细胞划痕实验结果;C为细胞侵袭实验结果。与U251-TET1比较,\* $P<0.05$ 。

图3 过表达IDH1<sup>R132H</sup>与TET1促进U251细胞增殖、迁移、侵袭能力

Figure 3 Overexpression of IDH1<sup>R132H</sup> and TET1 promoted the proliferation, migration and invasion of U251 cells



注:A为细胞周期结果图。B为细胞凋亡实验结果图,与U251-NC细胞相比,U251-IDH<sup>R132H</sup>-TET1细胞凋亡明显增加\* $P<0.05$ 。

图4 过表达IDH1<sup>R132H</sup>与TET1对U251细胞周期及凋亡的影响

Figure 4 Effects of overexpression of IDH1<sup>R132H</sup> and TET1 on cell cycle and apoptosis of U251 cells

保护机体免受氧化损伤。IDH 1 通过异柠檬酸氧化脱羧生成NAPDH以防止脂质过氧化和DNA氧化损伤<sup>[8]</sup>。因此,野生型IDH1和IDH2在管理氧化应激对各种细胞损伤反应的程度上起着重要作用。IDH1突变赋予了一种新的酶活性,催化 $\alpha$ -KG还原成假定的共代谢物D-2-羟基谷氨酸(D2HG)。D2HG能抑制几种 $\alpha$ -KG依赖性双加氧酶活性,包括组蛋白去甲基化酶及10-11易位-双加氧酶(TET)家族<sup>[9]</sup>。TET蛋白在腺苷三磷酸及二价铁和 $\alpha$ -KG存在的情况下通过它的结构域能够催化5-mC转变成5-hmC<sup>[10]</sup>。5mC和5hmC表观遗传标记的功能的重要性及其调控作用已在许多生物学过程中得到确认<sup>[11]</sup>。5hmC被发现存在于不同种类的细胞内,特别在干细胞和中枢神经细胞内的含量非常高,5-hmC作为DNA去甲基化多重步骤中重要的中间产物,其水平在肿瘤的发生和发展过程中发生显著变化<sup>[12]</sup>。多项研究提示IDH突变导致肿瘤发生的一个主要机制是抑制TET酶以及由此引起的以5hmC为代表的DNA去甲基化动力学失调。据此,本研究探讨TEF1介导的5-羟甲基胞嘧啶(5hmC)表达对异柠檬酸脱氢酶1(IDH1)突变的U251胶质瘤细胞生物学行为的影响。

课题组先将IDH1-R132H突变质粒转入胶质瘤U251细胞中,观察IDH1突变对细胞中TET1以及5hmC表达水平的影响,结果显示IDH突变可显著抑制TET1及5hmC的表达。随后将TET1过表达质粒转入IDH1-R132H突变U251细胞中,结果显示TET1过表达引起了5hmC水平的升高,显著抑制了胶质瘤细胞的生长、增殖,促进胶质瘤细胞

的凋亡。相关研究发现,5hmC表达下降是促进肿瘤进展的表观遗传学特征<sup>[13]</sup>,Xu等也在液相质谱分析中发现,IDH突变导致5hmC下降,IDH1<sup>R132H</sup>的表达通过抑制TET1和TET2酶的活性而降低5hmC在HEK293细胞中的丰度<sup>[14]</sup>。这些发现与本组得出的结果一致,表明IDH突变导致肿瘤发生的一个主要机制是抑制TET酶以及由此引起的以5hmC为代表的DNA去甲基化动力学失调,可能为胶质瘤的靶向治疗提供新思路。

### 参考文献

- [1] Mesfin FB, Al-Dhahir MA. Gliomas [M]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2021.
- [2] Philip B, Yu DX, Silvis MR, et al. Mutant IDH1 Promotes Glioma Formation In Vivo[J]. Cell Rep, 2018, 23(5):1553-1564.
- [3] Núñez FJ, Mendez FM, Kadiyala P, et al. IDH1-R132H acts as a tumor suppressor in glioma via epigenetic up-regulation of the DNA damage response[J]. Sci Transl Med, 2019, 11(479): eaaq1427.
- [4] Seethy A, Pethusamy K, Chattopadhyay I, et al. TETology: Epigenetic Mastermind in Action[J]. Appl Biochem Biotechnol, 2021.
- [5] Bian EB, Zong G, Xie YS, et al. TET family proteins: new players in gliomas[J]. J Neurooncol, 2014, 116(3):429-435.
- [6] Le Rhun E, Preusser M, Roth P, et al. Molecular targeted therapy of glioblastoma[J]. Cancer Treat Rev, 2019, 80:101896.
- [7] Waitkus MS, Diplas BH, Yan H. Biological Role and Therapeutic Potential of IDH Mutations in Cancer[J]. Cancer Cell, 2018, 34(2):186-195.
- [8] Pramono AA, Rather GM, Herman H, et al. NAD- and NADPH-Contributing Enzymes as Therapeutic Targets in Cancer: An Overview[J]. Biomolecules, 2020, 10(3):358.

# 脂蛋白 a 与脑小血管病变合并认知功能障碍的相关性研究

窦荣花<sup>1\*</sup> 王雯<sup>1</sup> 邱志新<sup>2</sup> 许晓冬<sup>2</sup> 景海芳<sup>1</sup> 王雪静<sup>1</sup> 王爱卿<sup>1</sup>

**【摘要】**目的 探讨脂蛋白 a(Lp(a))与脑小血管病变(CSVD)合并认知功能障碍的相关性。方法 选择2012年1月至2017年1月本院收治的200例CSVD患者的临床资料,根据是否合并认知功能障碍分为A组(148例,合并认知功能障碍)、B组(52例,未合并认知功能障碍),并选取100例同期体检正常者纳入健康对照组,采用免疫透射比浊法测定3组患者血清Lp(a)水平,并比较3组患者简易精神状态评价量表(MMSE)、蒙特利尔认知评估量表(MoCA)、生活能力评估表(ADL)与Lp(a)相关性。**结果** 3组患者的空间与执行能力、注意力、语言能力、抽象能力、命名能力、延迟记忆能力、定向力等MoCA各子项及MoCA总分比较:A组<B组<对照组,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。3组受检者血清Lp(a)比较:A组>B组>对照组,差异有统计学意义( $P<0.05$ );ADL评分、MMSE评分比较:A组<B组<对照组,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。Lp(a)与MoCA评分、MMSE评分、ADL评分明显负相关( $r_1=-0.237$ 、 $r_2=-0.214$ 、 $r_3=-0.305$ , $P<0.05$ )。**结论** Lp(a)升高促进CSVD患者认知功能障碍,与患者认知功能障碍程度负相关性。

**【关键词】** 脂蛋白 a; 脑小血管病变; 认知功能障碍; 相关性

## Study on the correlation between lipoprotein (a) and cerebral small vessel disease with cognitive dysfunction

DOU Ronghua<sup>1\*</sup>, WANG Wen<sup>1</sup>, QIU Zhixin<sup>2</sup>, XU Xiaodong<sup>2</sup>, JING Haifang<sup>1</sup>, WANG Xuejing<sup>1</sup>, WANG Aiqing<sup>1</sup>  
(1. Department of Neurology, Cangzhou Hospital of Integrated Chinese and Western Medicine, Cangzhou, Hebei, China, 061001; 2. Department of Neurological Rehabilitation, Cangzhou Hospital of Integrated Chinese and Western Medicine, Cangzhou, Hebei, China, 061001)

**【ABSTRACT】 Objective** To investigate the correlation between lipoprotein (a) (Lp (a)) and cerebral small vessel disease (CSVD) with cognitive dysfunction. **Methods** The clinical data of 200 patients with CSVD admitted to our hospital from January 2012 to January 2017 were retrospectively analyzed. According to whether they were combined with cognitive dysfunction, they were divided into group A (148 cases with cognitive dysfunction) and group B (52cases, without cognitive dysfunction), and 100 patients with normal physical examination during the same period were selected into the healthy control group. Serum Lp (a) levels of the three groups of patients were measured by immunoturbidimetric method. The three groups of patients with the Mini Mental State Evaluation Scale (MMSE), the Montreal Cognitive Assessment Scale (MoCA), the Living Ability Assessment Scale (ADL) and the correlation with Lp (a) were compared and analyzed. **Results** The spatial and executive ability, attention, language ability, abstract ability, naming ability, delayed memory ability, orientation ability and the total scores of MoCA of the patients in groups A and B were lower than those in the control group, and group A was lower than group B, the difference was statistically significant

基金项目:河北省医学科学研究重点课题(201711192)

作者单位:1. 河北省沧州中西医结合医院神经内科,河北,沧州 061001

2. 河北省沧州中西医结合医院神经康复科,河北,沧州 061001

\*通信作者:窦荣花, E-mail: abc2078861@126.com

( $P<0.05$ ); the serum Lp (a) level of patients in groups A and B was higher than that in the control group, and group A was higher than that in group B, the difference was statistically significant ( $P<0.05$ ); The scores of ADL and MMSE in group B were lower than those in the control group, and group A was lower than group B, the difference was statistically significant ( $P<0.05$ ); Lp (a) was significantly negatively correlated with MoCA score, MMSE score, and ADL score ( $r_1=-0.237$ ,  $r_2=-0.214$ ,  $r_3=-0.305$ ,  $P<0.05$ ). **Conclusion** Elevated Lp (a) promotes cognitive dysfunction in patients with CSVD and is negatively correlated with the degree of cognitive dysfunction in patients.

**[KEY WORDS]** Lipoprotein (a); Cerebral small vessel disease; Cognitive dysfunction; Correlation

脑小血管病(cerebral small vessel disease, CSVD)是指脑部小动脉、小静脉、毛细血管等小血管病变导致脑出血、脑梗死等临床症状,且多伴发认知功能障碍,导致患者的注意力及执行能力等多方面生活工作能力下降,影响患者生活质量<sup>[1]</sup>。认知功能障碍的发病机制目前尚缺乏良好的治疗方法,及早诊断、早期干预是预防认知功能障碍的关键措施<sup>[2]</sup>。高脂血症血脂浓度与脑血管病、认知功能障碍有密切关系,脂蛋白a(lipoprotein a, Lp(a))是血脂中的重要成分,能促进动脉粥样硬化斑块形成和形成血栓,导致血管性疾病的发生<sup>[3]</sup>。有研究发现<sup>[4]</sup>血清Lp(a)含量增高是缺血性脑卒中的危险因素,对其进行监测和调控可以降低脑卒中的发病率。国内外研究Lp(a)分别与缺血性脑梗塞、认知功能障碍关系的文献较多,但研究Lp(a)水平与CSVD合并认知功能障碍的文献较少。本研究通过探讨Lp(a)水平与CSVD变合并认知功能障碍严重程度的相关性,为患者治疗方案制定提供理论依据。现报道如下。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选择2012年1月至2017年1月本院收治的200例CSVD患者的临床资料,根据是否合并认知功能障碍分为A组(148例,合并认知功能障碍)、B组(52例,未合并认知功能障碍)。A组中男88例、女60例,平均年龄( $60.86\pm 5.24$ )岁,合并冠心病20例,合并高血压35例,合并糖尿病23例,饮酒史41例。B组中男31例、女21例,平均年龄( $61.52\pm 5.68$ )岁,合并冠心病7例,合并高血压11例,合并糖尿病8例,饮酒史13例。并选取100例同期体检正常者纳入健康对照组,其中男59例、女41例,平均年龄( $60.93\pm 5.29$ )岁。三组受检者性别、年龄比较差异无统计学意义( $P>0.05$ ),具有可比性。

纳入标准:①符合《2013年中国脑小血管病诊治专家共识》<sup>[5]</sup>中制定的CSVD诊断标准;②经颅脑MRI确诊;③所有患者或家属签署知情同意书。排除标准:①大面积脑梗死;②颅内、外大血管病变及心源性栓塞;③代谢性疾病、中毒、缺氧等其他原因所引起的脑白质异常表现者;④合并系统性疾病者。本实验经医院伦理委员会同意批准。

CSVD患者分组标准:简易精神状态评价量表(Mini-mental State Examination, MMSE)<sup>[6]</sup>、蒙特利尔认知评估量表(Montreal Cognitive Assessment, MoCA)<sup>[7]</sup>评分 $\leq 25$ 分纳入A组,反之纳入B组。

### 1.2 方法

采集三组受检者空腹外周静脉血,3 000 r/min离心10 min,收集上清,采用免疫透射比浊法测定患者血清Lp(a)水平,仪器使用日本生产日立7600型全自动生化分析仪,试剂盒购自浙江奥的特生物技术有限公司试剂品牌,所有操作严格按照试剂盒说明书进行。

### 1.3 观察指标

①采用MoCA评估<sup>[7]</sup>受检者认知功能,包含空间与执行能力、注意力、语言能力、抽象能力、命名能力、延迟记忆能力和定向力等维度,满分30分,26分以上为认知正常。评分越低代表认知功能越低。②采用MMSE评价受检者认知功能障碍,包含定向力、注意力、计算力、即刻及短期记忆、语言及听从指令的能力等维度,满分为30分,0~9分表示重度障碍,10~20为中度障碍,21~25分为轻度障碍,26分以上为认知正常。③采用生活能力评估表(activities of daily living scale, ADL)<sup>[8]</sup>评估受检者生活照顾及生活独立能力,0~20分表示极度功能缺陷、生活完全需要依赖,20~40分为生活需要很大帮助;40~60分为生活需要帮助;60分以上生活基本自理。

### 1.4 统计学方法

采用SPSS 22.0统计软件进行数据分析。计数资料用 $n(\%)$ 表示,行 $\chi^2$ 检验;计量资料以( $\bar{x}\pm s$ )

表示,多组间行单因素方差分析,两组间比较行 *t* 检验。相关性分析采用 Pearson 相关分析。以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 三组受检者 MoCA 评分比较

3 组患者的空间与执行能力、注意力、语言能力、抽象能力、命名能力、延迟记忆能力、定向力等

MoCA 各子项及 MoCA 总分比较: A 组<B 组<对照组,差异有统计学意义(*P*<0.05)。见表 1。

### 2.2 3 组受检者血清 Lp(a) 水平、ADL 评分、MMSE 评分比较

3 组受检者血清 Lp(a) 比较: A 组>B 组>对照组,差异有统计学意义(*P*<0.05); ADL 评分、MMSE 评分比较: A 组<B 组<对照组,差异有统计学意义(*P*<0.05)。见表 2。

表 1 3 组受检者 MoCA 评分比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Comparison of MoCA scores between 3 groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	<i>n</i>	空间与执行能力	注意力	语言能力	抽象能力	命名能力	延迟记忆能力	定向力	MoCA 总分
A 组	148	2.36±0.84	1.58±0.58	3.20±0.81	1.08±0.85	1.07±0.50	1.97±0.93	3.74±1.24	14.99±3.11
B 组	52	3.19±0.69	2.04±0.39	3.52±0.80	1.77±0.61	1.50±0.51	3.40±0.85	4.46±0.80	19.88±1.97
对照组	100	4.51±0.90	3.29±0.75	4.06±1.01	3.29±0.80	3.10±0.72	4.37±1.28	4.90±1.24	27.52±1.54
<i>F</i> 值	-	196.805	232.515	28.508	230.935	369.891	160.673	30.011	750.346
<i>P</i> 值	-	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

表 2 3 组受检者血清 Lp(a) 水平、ADL 评分、MMSE 评分比较 [*n*(%), ( $\bar{x} \pm s$ )]

Table 2 Comparison of Serum Lp(a) level, ADL score, MMSE score between 3 groups [*n*(%), ( $\bar{x} \pm s$ )]

组别	<i>n</i>	Lp(a)(mmol/L)	ADL 评分(分)	MMSE 评分(分)
A 组	148	215.73±58.11	28.45±9.56	15.03±6.68
B 组	52	120.49±13.79	52.78±12.52	20.23±4.90
对照组	100	103.86±10.68	74.70±12.86	27.58±1.55
<i>F</i> 值	-	245.374	506.924	174.016
<i>P</i> 值	-	<0.001	<0.001	<0.001

### 2.3 CSVD 患者认知功能障碍与血清 Lp(a) 的相关性

Pearson 分析结果显示,血清 Lp(a) 与空间与执行能力、注意力、语言能力、命名能力等 MoCA 子项评分无明显相关性(*P*>0.05),与抽象能力、延迟记忆能力、定向力等 MoCA 子项评分明显负相关(*P*<0.05);血清 Lp(a) 与 MoCA 总分、MMSE 评分、ADL 评分明显负相关性(*P*<0.05)。见表 3。

表 3 CSVD 患者认知功能障碍与血清 Lp(a) 的相关性

Table 3 Correlation between cognitive dysfunction and serum lipoprotein a in patients with CSVD

Lp(a)	MoCA 评分								MMSE	ADL
	空间与执行能力	注意力	语言能力	抽象能力	命名能力	延迟记忆能力	定向力	总分		
<i>r</i> 值	-0.107	-0.120	-0.084	-0.156	-0.125	-0.207	-0.158	-0.237	-0.214	-0.305
<i>P</i> 值	0.131	0.090	0.236	0.028	0.078	0.003	0.025	0.001	0.002	<0.001

## 3 讨论

随着我国人口的老齡化,作为老年人群多发的 CSVD 患者逐年增多,CSVD 导致的认知功能障碍降低了患者的生活自理能力,严重影响着老年人的身心健康及生活质量,给家庭及社会的造成了严重的经济负担加家庭负担<sup>[9]</sup>。

CSVD 被越来越多的学者关注,其发病因素、发病机制、诊断与治疗等研究取得了很大的进展,年龄、高血压、糖尿病、饮酒、高血脂等都是导致 CSVD 高发的危险因素<sup>[10]</sup>。近年来多项研究表明动脉粥样硬化的缺血性脑卒中与高血脂症的关系密切,同时发现不同类型的脑血管病存在不同的脂质代谢紊乱,同时阿尔茨海默病、血管性痴呆等

认知功能障碍发病率也与高血脂症密切相关<sup>[11-12]</sup>。Lp(a) 是一种含有纤溶酶原样载脂蛋白 a 的低密度脂蛋白胆固醇样颗粒,通过二硫键与 ApoB-100 相连,与其他类型脂蛋白水平无相关性,在血液中稳定存在<sup>[13]</sup>。Lp(a) 能够进入血液循环并沉积在血管壁上,抑制组织型纤溶酶原激活剂(t-PA)、链激酶(SK)的活性及纤维蛋白原水解,从而干扰纤溶系统的正常功能。此外,Lp(a) 能促进动脉粥样硬化斑块、血栓形成及病变部位炎症反应,形成动脉粥样硬化、狭窄。脑部小血管是维持大脑微环境稳定、运输营养物质、构成血脑屏障的重要作用,小血管由脑内小穿支动脉、小动脉、小静脉以及毛细血管组成,血管管道狭小,当血栓经过血液循环流经脑小血管时,易引发血管栓塞,使脑组织血氧

供给不足,导致脑卒中、脑出血,中枢神经系统受到损伤,造成认知功能障碍<sup>[14-15]</sup>。

MoCA评分、MMSE评分是评价认知功能的重要量表,评分越高认知功能越好,相反认知功能障碍患者得分越低。本研究结果显示,A组患者MoCA评分、MMSE评分、ADL评分明显低于B组患者,Pearson相关分析显示,血清Lp(a)与MoCA总分、MMSE评分、ADL评分呈负相关,提示血清Lp(a)水平与CSVD患者合并认知功能障碍有关,分析原因可能为CSVD导致血清Lp(a)水平异常升高,脑损伤越严重患者血清Lp(a)水平越高,脑组织损伤后,血管内皮细胞受到损伤,激活凝血系统,导致Lp(a)代谢减少,进一步增加Lp(a)水平,形成恶性循环,加剧脑损伤,促进认知功能障碍发展有关<sup>[16]</sup>。

综上所述,Lp(a)参与了CSVD患者认知功能障碍病情的发展,Lp(a)水平升高,提示患者认知功能障碍加重,患者的生活自理能力降低。因此对于CSVD伴认知功能障碍患者应早期积极控制Lp(a)水平,降低Lp(a)水平,延缓脑小血管病合并认知功能障碍的病程,提高患者的生存能力,减少治疗费用,从而减轻社会负担及经济负担。本方法简单易行,易于推广。

### 参考文献

- [1] 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. 中国脑小血管病诊治共识[J]. 中华神经科杂志, 2015,48(10):838-844.
- [2] 胡康,张红,胡蓉. 脑小血管病患者发生认知功能障碍的危险因素与护理干预对策[J]. 实用医院临床杂志, 2018(3):134-137.
- [3] Orsó E, Schmitz G. Lipoprotein(a) and its role in inflammation, atherosclerosis and malignancies [J]. Clin Res Cardiol Suppl, 2017, 12(Suppl 1):31-37.
- [4] 蒲瑞雪,徐万清,刘明,等. 联合检测血清及脑脊液Lp(a)诊断脑出血和脑梗死的临床意义[J]. 西南国防医药, 2019(9):909-911.
- [5] 脑小血管病诊治专家共识组. 脑小血管病的诊治专家共识[J]. 中华内科杂志, 2013,52(10):893-896.
- [6] 李建红,卢静,汪子琪,等. 卡比多巴-左旋多巴控释片对帕金森病合并睡眠障碍患者精神行为症状、认知障碍及对日常生活能力的影响[J]. 解放军医药杂志, 2019, 31(5):61-64.
- [7] 康婧,耿文清,姜拥军,等. 蒙特利尔认知评估量表和国际人类免疫缺陷病毒痴呆量表在男男同性性行为人类免疫缺陷病毒感染不同认知功能障碍筛查中的应用[J]. 中华传染病杂志, 2020, 38(6):348-352.
- [8] Liu L, Li HZ, Chen C, et al. Application of Activities of Daily Living Scale in Mild Psychiatric Impairment Assessment [J]. J Foren Med, 2018,34(1):44-48.
- [9] 董艺,李袁婧,王永祥,等. 脑小血管病与认知功能障碍[J]. 中华行为医学与脑科学杂志, 2018, 27(8):684-687.
- [10] 孔祥增,王彦永,王晓,王铭维,刘娜. 不同类型脑小血管病患者认知功能损害特征及危险因素分析[J]. 中国全科医学, 2017,20(5):543-548.
- [11] 贾东佩,朱凤俊,任应国. 脂蛋白相关磷酸酶A2和炎症蛋白在诊断脑梗死后血管性痴呆及判断预后中的应用[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020,12(1):55-58+73.
- [12] 张伟彬,阮清伟,姚锋,等. 中晚期阿尔茨海默病与血管性痴呆患者血浆A $\beta$ 及tau蛋白水平的比较研究[J]. 阿尔茨海默病及相关病, 2019,2(2):350-354.
- [13] 侯云,张秀兰. 血清脂蛋白a与冠心病心肌梗死的研究进展[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2019,17(15):2288-2290.
- [14] Labudovic D, Kostovska I, Tosheska Trajkovska K, et al. Lipoprotein(a) - Link between Atherogenesis and Thrombosis [J]. Prague Med Rep, 2019,120(2-3):39-51.
- [15] Nordestgaard BG, Langsted A. Lipoprotein(a) as a cause of cardiovascular disease: insights from epidemiology, genetics, and biology [J]. J Lipid Res, 2016,57(11):1953-1975.
- [16] 杨璐颖,王灵芝,陈棉. 新生儿缺血缺氧性脑病D-二聚体和脂蛋白a水平及其与病情严重程度和脑损伤的关系[J]. 重庆医学, 2020,49(12):1969-1972.
- [9] Stasik S, Juratli TA, Petzold A, et al. Exome sequencing identifies frequent genomic loss of TET1 in IDH-wild-type glioblastoma [J]. Neoplasia, 2020, 22(12):800-808.
- [10] Huang Y, Rao A. Connections between TET proteins and aberrant DNA modification in cancer [J]. Trends Genet, 2014, 30(10):464-474.
- [11] Pfeifer GP, Kadam S, Jin SG. 5-hydroxymethylcytosine and its potential roles in development and cancer [J]. Epigenetics Chromatin, 2013, 6(1):10.
- [12] Lio CJ, Yue X, Lopez-Moyado IF, et al. TET methylcytosine oxidases: new insights from a decade of research [J]. J Biosci, 2020, 45:21.
- [13] Lian CG, Xu Y, Ceol C, et al. Loss of 5-hydroxymethylcytosine is an epigenetic hallmark of melanoma [J]. Cell, 2012, 150(6):1135-1146.
- [14] Xu W, Yang H, Liu Y, et al. Oncometabolite 2-hydroxyglutamate is a competitive inhibitor of  $\alpha$ -ketoglutarate-dependent dioxygenases [J]. Cancer Cell, 2011, 19(1):17-30.

(上接第585页)

## 舌下腺囊肿 D-D、IL-6、MMP-2 表达及临床意义

张启红\* 李春杨 营栋

**【摘要】**目的 探讨舌下腺囊肿 D-二聚体(D-D)、白介素-6(IL-6)、基质金属蛋白酶-2(MMP-2)表达及临床意义。方法 选取2015年10月至2020年10月本院104例舌下腺囊肿患者作为观察组,另选取40例健康体检者作为对照组,对比两组D-D、IL-6、MMP-2水平,分析D-D、IL-6、MMP-2与舌下腺囊肿的关系,并根据舌下腺囊肿患者复发情况分为复发( $n=15$ )与未复发( $n=89$ ),对比两组临床资料、手术前后D-D、IL-6、MMP-2水平,分析复发影响因素及D-D、IL-6、MMP-2对复发的预测价值。结果 观察组D-D、IL-6、MMP-2水平高于对照组,差异有统计学意义( $P<0.05$ );D-D、IL-6、MMP-2与舌下腺囊肿有关( $P<0.05$ );复发患者术前、术后7d D-D、IL-6、MMP-2水平均高于未复发患者,差异有统计学意义( $P<0.05$ );病程、囊肿直径、吸烟、饮酒、手术前后D-D、IL-6、MMP-2均为舌下腺囊肿复发影响因素( $P<0.05$ );术后7d D-D、IL-6、MMP-2均高于术前,且术后7d联合预测价值更高,AUC为0.894,最佳敏感度、特异度分别为80.00%、86.52%。结论 D-D、IL-6、MMP-2在舌下腺囊肿中呈高表达,可作为早期筛查指标,对指导临床采取干预措施,预防术后复发具有重要意义。

**【关键词】** 舌下腺囊肿;基质金属蛋白酶-2;白介素-6;D-二聚体

### Clinical significance of D-D, IL-6, MMP-2 in sublingual gland cyst

ZHANG Qihong\*, LI Chunyang, YING Dong

(Department of Stomatology, Huainan Chaoyang Hospital, Huainan, Anhui, China, 232000)

**【ABSTRACT】** Objective To investigate the expression and clinical significance of D-dimer (D-D), interleukin-6 (IL-6) and matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in sublingual gland cysts. **Methods** From October 2015 to October 2020, 104 patients with sublingual gland cysts in our hospital were selected as the observation group, and 40 healthy subjects were selected as the control group. The levels of D-D, IL-6, MMP-2 between the two groups were compared, and the relationship between D-D, IL-6, MMP-2 and sublingual gland cysts was analyzed. According to the recurrence of sublingual gland cysts, patients were divided into recurrence ( $n=15$ ) and non-recurrence ( $n=89$ ) groups. The clinical data of the two groups, the levels of D-D, IL-6, and MMP-2 before and after surgery were compared, and the factors affecting recurrence and the predictive value of D-D, IL-6, and MMP-2 on recurrence were analyzed. **Results** The levels of D-D, IL-6 and MMP-2 in the observation group were higher than those in the control group, and the difference was statistically significant ( $P<0.05$ ). D-D, IL-6, MMP-2 were related to sublingual gland cysts ( $P<0.05$ ). The levels of D-D, IL-6 and MMP-2 in patients with recurrence before and 7 days after operation were higher than those of patients without recurrence, and the difference was statistically significant ( $P<0.05$ ). The course of disease, cyst diameter, smoking, drinking, D-D, IL-6, and MMP-2 before and after the operation were all influencing factors for the recurrence of sublingual gland cysts ( $P<0.05$ ). The D-D, IL-6, and MMP-2 at 7 days after operation were all >before operation, and the combined predictive value was higher at 7 days after operation. The AUC was 0.894, and the best sensitivity and specificity were 80.00% and 86.52%, respectively. **Conclusion** D-D, IL-6, and MMP-2 are highly expressed in sublingual gland cysts, which can be used as early screening indicators and are of great significance for guiding clinical interventions and preventing postoperative recurrence.

**【KEY WORDS】** Sublingual gland cyst; Matrix metalloproteinase-2; interleukin-6; D-dimer

基金项目:2018年安徽省医学会急诊临床研究项目(ky2018003)

作者单位:淮南朝阳医院口腔科,安徽,淮南 232000

\*通信作者:张启红, E-mail:kqk3067@sina.com

舌下腺囊肿为口腔颌面外科涎腺疾病中常见类型,部分囊肿可经口底组织突入颌下表现为颌颈部或颌下肿块,易导致误诊误治发生<sup>[1-2]</sup>。既往研究显示,D-二聚体(D-dimer,D-D)与口腔颌面部间隙感染的发生、发展具有相关性,监测D-D水平可辅助临床诊断口腔颌面部间隙感染,评估疾病预后<sup>[3]</sup>。基质金属蛋白酶-2(Matrix metalloproteinase-2,MMP-2)已被证实同与涎腺腺样囊性癌浸润生长有关,对肿瘤生长、浸润具有促进作用<sup>[4]</sup>。白介素-6(Interleukin-6,IL-6)为机体炎症反应重要介质,在口腔鳞癌患者中呈高表达水平<sup>[5]</sup>。而三者是否同舌下腺囊肿发生发展具有相关性,尚未见有研究报道。基于此,本研究首次探讨舌下腺囊肿D-D、IL-6、MMP-2表达及临床意义。分析如下。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选取2015年10月至2020年10月本院104例舌下腺囊肿患者作为观察组,另选取40例健康体检者作为对照组。对照组男19例,女21例,平均年龄(34.70±7.36)岁;观察组男46例,女58例,平均年龄(33.69±7.95)岁;囊肿直径0.5~3.2 cm,平均(18.71±5.03)cm。两组性别、年龄等比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

纳入标准:①术前穿刺检查以及术后病理确诊为舌下腺囊肿<sup>[5]</sup>;②无血栓及出血性疾病;③患者或家属知情本研究并签署同意书;④无麻醉禁忌者。排除标准:①年龄较小无法配合麻醉;②长期应用激素药物者;③术前存在感染者;④颈部、头面部放疗史;⑤伴有严重口腔溃疡者;⑥不符合舌下腺及囊肿切除术手术指征者。本实验经医院伦理委员会批准。

### 1.2 方法

①基线资料:收集所有入组研究对象性别、年龄、体质量指数(BMI)、病程、囊肿直径、病变类型、吸烟及饮酒情况等临床资料。②手术治疗:研究对象均接受舌下腺及囊肿切除术治疗。协助患者取半卧位,依照病情程度选择局部或全身麻醉;选择口内入路方式,沿囊肿表面轻柔切开口底黏膜组织,切口同下颌舌侧牙龈平衡,贯穿囊肿前后缘,注意保持囊壁完整;钝性分离黏膜,剥离周围腺体及囊壁,探明舌神经,完整摘除舌下腺及囊肿,结扎断端;止血、冲洗术野后缝合。③实验室

检查:分别于术前、术后7 d采集患者静脉血5 mL,以转速2 000 rpm离心20 min,取血清,保存于-20℃环境中。采用酶联免疫吸附法测定IL-6水平,采用免疫比浊法测定D-D水平,采用免疫组化法检测MMP-2水平。④复发标准:术后半年内,X线曲面断层检查见手术部位组织呈分叶状外形,经穿刺内容物检查抽出浅红色黏稠液。

### 1.3 观察指标

①比较两组D-D、IL-6、MMP-2水平。②分析D-D、IL-6、MMP-2与舌下腺囊肿的关系。③分析舌下腺囊肿患者D-D、IL-6、MMP-2水平的相关性。④比较术后半年内,复发与未复发患者手术前后D-D、IL-6、MMP-2水平。⑤分析舌下腺囊肿术后复发影响因素。⑥D-D、IL-6、MMP-2对舌下腺囊肿术后复发的预测价值。

### 1.4 统计学分析

采用SPSS 22.0软件进行数据处理,计数资料以 $n(\%)$ 描述,采用 $\chi^2$ 检验,计量资料以 $(\bar{x}\pm s)$ 描述,两组间比较用 $t$ 检验,舌下腺囊肿术后复发影响因素通过Logistic进行多因素回归分析,D-D、IL-6、MMP-2对舌下腺囊肿术后复发的预测效能分析采用受试者工作特征(ROC)曲线,不同预测方案间曲线下面积比较采用DeLong检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 两组D-D、IL-6、MMP-2水平比较

观察组D-D、IL-6、MMP-2水平高于对照组,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。见表1。

表1 两组D-D、IL-6、MMP-2水平比较( $\bar{x}\pm s$ )

Table 1 Comparison of the levels of D-D, IL-6 and MMP-2 between 2 groups ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	<i>n</i>	D-D(mg/L)	IL-6(ng/L)	MMP-2
观察组	104	0.63±0.27	14.85±3.26	356.94±87.24
对照组	40	0.45±0.20	10.41±2.94	214.87±50.69
<i>t</i> 值		3.828	7.516	9.677
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001

### 2.2 D-D、IL-6、MMP-2与舌下腺囊肿的相关性

以舌下腺囊肿发生与否作为因变量(未发生=0,发生=1),将D-D、IL-6、MMP-2纳入Logistic回归方程,分析可知,舌下腺囊肿患者D-D与IL-6、MMP-2水平呈正相关关系,IL-6与MMP-2水平呈正相关关系( $r=0.814, 0.693, 0.779, P<0.05$ )。见表2、图1。

表2 D-D、IL-6、MMP-2与舌下腺囊肿的关系

Table 2 The relationship between D-D, IL-6, MMP-2 and sublingual gland cyst

因素	$\beta$ 值	S.E.	Wald $\chi^2$	OR值	95%CI	P值
D-D	1.685	0.327	26.542	5.391	3.185~9.124	<0.05
IL-6	1.542	0.362	18.149	4.675	2.841~7.692	<0.05
MMP-2	1.618	0.301	28.886	5.042	3.074~8.269	<0.05

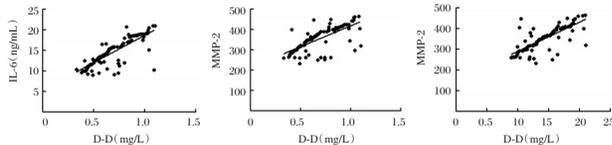


图1 舌下腺囊肿患者D-D、IL-6、MMP-2水平的相关性  
Figure 1 The correlation of D-D, IL-6 and MMP-2 levels in patients with sublingual gland cysts

### 2.3 复发与未复发患者临床资料及手术前后D-D、IL-6、MMP-2水平比较

复发与未复发患者病程、囊肿直径、吸烟及饮酒率相比,差异有统计学意义( $P<0.05$ );复发患者术前、术后7 d D-D、IL-6、MMP-2水平均高于未复发患者,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。见表3。

表3 复发与未复发患者临床资料及手术前后D-D、IL-6、MMP-2水平比较( $\bar{x}\pm s$ )

Table 3 Clinical data of relapsed and non-relapsed patients and comparison of D-D, IL-6 and MMP-2 levels before and after surgery ( $\bar{x}\pm s$ )

指标	复发 (n=15)	未复发 (n=89)	$\chi^2/t$ 值	P值	
性别	男	7(46.67)	0.042	0.837	
	女	8(53.33)			39(43.82)
年龄	$\leq 18$ 岁	8(53.33)	0.014	0.906	
	$>18$ 岁	7(46.67)			46(51.69)
BMI	$\leq 23$ kg/m <sup>2</sup>	10(66.67)	0.039	0.845	
	$>23$ kg/m <sup>2</sup>	5(33.33)			57(64.04)
病程	$\leq 3$ 个月	5(33.33)	5.029	0.025	
	$>3$ 个月	10(66.67)			32(35.96)
囊肿直径	$\leq 3$ cm	5(33.33)	5.891	0.015	
	$>3$ cm	10(66.67)			59(66.29)
病变类型	单纯型	12(80.00)	0.358	0.720	
	口外型	1(6.67)			6(6.74)
	哑铃型	2(13.33)			7(7.87)
吸烟	是	9(60.00)	6.044	0.014	
	否	6(40.00)			67(75.28)
饮酒	是	10(66.67)	7.392	0.007	
	否	5(33.33)			62(69.66)
D-D(mg/L)	术前	0.69 $\pm$ 0.12	2.436	0.017	
	术后7 d	0.58 $\pm$ 0.19			0.62 $\pm$ 0.10
IL-6(ng/L)	术前	15.92 $\pm$ 2.04	2.464	0.015	
	术后7 d	14.07 $\pm$ 2.92			14.67 $\pm$ 1.78
MMP-2(ng/mL)	术前	372.14 $\pm$ 20.15	3.434	0.001	
	术后7 d	302.84 $\pm$ 70.39			354.38 $\pm$ 18.26
			3.523	0.001	

### 2.4 舌下腺囊肿术后复发影响因素分析

以舌下腺囊肿术后复发与否作为因变量(未复发=0,复发=1),将表3、表4中差异有统计学意义的指标纳入Logistic回归方程,分析可知,病程、囊肿直径、吸烟、饮酒、手术前后D-D、IL-6、MMP-2均为舌下腺囊肿复发影响因素( $P<0.05$ )。见表4。

表4 舌下腺囊肿术后复发影响因素分析

Table 4 Analysis of influencing factors for postoperative recurrence of sublingual gland cyst

因素	$\beta$ 值	S.E.	Wald $\chi^2$	OR值	95%CI	P值
病程	1.623	0.331	24.049	5.069	2.745~9.362	<0.05
囊肿直径	1.718	0.341	25.369	5.571	3.026~10.256	<0.05
吸烟	1.793	0.375	22.865	6.008	3.174~11.374	<0.05
饮酒	1.723	0.326	27.926	5.600	2.879~10.892	<0.05
D-D						
术前	1.600	0.331	23.369	4.954	3.125~7.852	<0.05
术后7 d	1.595	0.301	28.039	4.930	2.941~8.263	<0.05
IL-6						
术前	1.794	0.375	22.883	6.013	4.126~8.762	<0.05
术后7 d	1.647	0.326	25.513	5.189	3.012~8.941	<0.05
MMP-2						
术前	1.831	0.321	32.524	6.238	3.941~9.874	<0.05
术后7 d	1.722	0.294	34.303	5.595	3.052~10.258	<0.05

### 2.5 D-D、IL-6、MMP-2对舌下腺囊肿术后复发的预测价值

ROC曲线显示AUC值:术后7 d D-D、IL-6、MMP-2均 $>$ 术前,且术后7 d联合预测价值更高,AUC为0.941,最佳敏感度、特异度分别为87.12%、95.51%。见图2、表5。

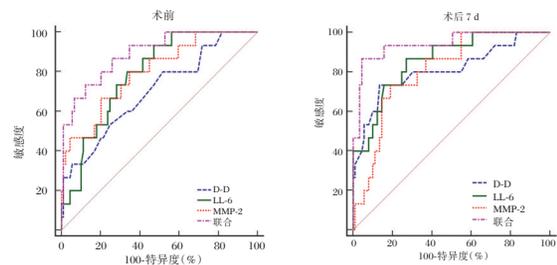


图2 不同时期ROC曲线

Figure 2 ROC curve in different periods

## 3 讨论

本研究发现,舌下腺囊肿患者血清MMP-2处于显著高表达状态,提示其可能在舌下腺囊肿发生过程中发挥正向调节作用。基底膜为舌下腺囊肿发生过程中必须克服的生理屏障,MMP-2通过降解舌下腺体细胞外基质成分,以及原血管基底膜,促进舌下腺体淋巴管及血管结构发育,进而有助于舌下腺体组织中血管生长,形成舌下腺囊

表5 D-D、IL-6、MMP-2对舌下腺囊肿术后复发的预测价值

Table 5 The predictive value of D-D, IL-6, and MMP-2 for postoperative recurrence of sublingual gland cyst

指标		AUC	95%CI	Z值	截断值	敏感度(%)	特异度(%)	P值
D-D	术前	0.701	0.604-0.787	2.627	>0.64 mg/L	53.33	75.28	<0.001
	术后7 d	0.810	0.721-0.880	4.236	>0.55 mg/L	73.33	86.52	<0.001
IL-6	术前	0.787	0.696-0.861	5.402	>14.79 ng/L	80.00	66.29	<0.001
	术后7 d	0.858	0.776-0.919	7.181	>12.87 ng/L	86.67	73.03	<0.001
MMP-2	术前	0.797	0.707-0.870	4.704	>369.19 ng/mL	66.67	79.78	<0.001
	术后7 d	0.804	0.715-0.876	5.732	>265.17 ng/mL	73.33	80.90	<0.001
	术前联合诊断	0.890	0.813-0.943	8.846		73.33	87.64	<0.001
	术后7 d联合诊断	0.941	0.877-0.978	12.496		87.12	95.51	<0.001

肿。本研究还发现,MMP-2与舌下腺囊肿有关,在舌下腺囊肿的发生过程中发挥促进作用。

IL-6主要在组织细胞胞浆中表达,推测舌下腺囊肿患者血清IL-6水平升高原因,可能是病毒侵袭感染,致使机体细胞因子网络失调,IL-6表达水平发生改变,随着IL-6浓度增加,引发局部炎症反应,对组织细胞损伤发挥介导作用,诱导细胞分化增殖,导致舌下腺开口阻塞,分泌物潴留<sup>[6-7]</sup>。陈丹丹等<sup>[8]</sup>报道显示,卵巢异位囊肿患者IL-6水平升高,可刺激T、B淋巴细胞发生增殖与分化,致使盆腔局部纤维化、粘连,认为炎症在囊肿发生、发展中具有重要作用,同本研究结果具有相似性,均认为血清IL-6水平升高为舌下腺囊肿发生危险因素。

D-D为交联纤维蛋白于纤溶酶作用下裂解产生的分子标志物,其水平异常升高,代表机体继发纤溶亢进,该状态可为瘤体生长创造有利条件<sup>[9]</sup>。作者推测舌下腺囊肿患者血清D-D水平较高原因,舌下腺囊肿可能激活机体凝血系统,导致血小板活性增加、血管内皮细胞损伤,以及纤溶蛋白溶解异常,舌下腺囊肿状态下机体血管内活化血栓形成及纤维溶解活动,可致使D-D水平升高。

目前,舌下腺及囊肿切除术为临床治疗舌下腺囊肿最直接有效的方法,在控制疾病进展、改善患者预后方面具有重要作用<sup>[10-11]</sup>。但也可能因舌下腺腺体组织残留、术后瘢痕愈合等导致舌下腺囊肿复发,本研究发现,舌下腺囊肿患者经舌下腺及囊肿切除术术后仍存在一定早期复发率。本研究发现各指标均具有良好预测效能,且术后7 d D-D、IL-6、MMP-2的AUC>术前,其原因可能在于术后7 d与复发时间间隔更短,可较为准确地反映舌下腺囊肿组织病理变化情况,进而提高预测效能。

综上,舌下腺囊肿患者D-D、IL-6、MMP-2水平呈高表达,各指标变化同舌下腺囊肿发生具有相关性,可为术后复发情况提供有效参考。

### 参考文献

- [1] Chen JX, Zenga J, Emerick K, et al. Sublingual gland excision for the surgical management of plunging ranula [J]. Am J Otolaryngol, 2018, 39(5):497-500.
- [2] Lee RJ, Tong EL, Patel R, et al. Malignant sublingual gland tumors: demographics, prognostic factors, and treatment outcomes [J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol, 2016, 121(2):180-187.
- [3] 徐菲菲, 黄林剑, 褚涵文, 等. D二聚体和纤维蛋白原在口腔颌面部间隙感染中的表达及意义[J]. 中国口腔颌面外科杂志, 2020, 18(5):417-420.
- [4] 王璐. 联合检测血清 E-cad, MMP-2 及 VEGF 的表达对涎腺腺样囊性癌的诊断价值[J]. 贵阳医学院学报, 2017, 42(2):241-243, 246.
- [5] 钱娟娟, 冯红超, 宋宇峰. 口腔鳞癌中NF-κBp65, IL-6表达与巨噬细胞极化的关系[J]. 实用口腔医学杂志, 2020, 36(1):10-14.
- [6] 兰梅, 杨建军, 雷易. 老年2型糖尿病合并尿路感染患者病原菌分布及血糖水平与炎症因子变化研究[J]. 华南预防医学, 2020, 46(2):192-194.
- [7] 郭宁, 冯莹, 胡志伟, 等. 康复新液联合胸腺五肽局部应用对口腔溃疡的疗效及对血清TNF-α、IL-6、SOD、SIgA、IgG的影响[J]. 现代生物医学进展, 2018, 18(3):545-548+596.
- [8] 陈丹丹, 刘海伦, 江彩霞, 等. 子宫腺肌病/卵巢异位囊肿炎性压力及其与临床特征相关性研究[J]. 国际妇产科学杂志, 2018, 45(5):587-593.
- [9] Yu J, Li D, Lei D, et al. Tumor-Specific D-Dimer Concentration Ranges and Influencing Factors: A Cross-Sectional Study [J]. PLoS One, 2016, 11(11):e0165390.
- [10] Zhao GR, Ji P, Zhao HW, et al. Modified L-shaped surgical approach to excision of the sublingual gland [J]. Br J Oral Maxillofac Surg, 2015, 53(8):725-729.
- [11] 赵怡芳, 贾俊. 舌下腺囊肿手术的疗效与并发症[J]. 中国实用口腔科杂志, 2019, 12(2):77-81.

## CysC、 $\beta$ 2-MG、IL-1 $\beta$ 、IL-18对高血压患者早期肾损伤的预测价值

陈曦 张娜 胡广梅\*

**【摘要】**目的 探究胱抑素C(CysC)、 $\beta$ 2-微球蛋白( $\beta$ 2-MG)、白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、白细胞介素-18(IL-18)对高血压患者早期肾损伤的预测价值。**方法** 选取2015年3月至2020年9月本院高血压早期肾损伤患者74例为观察组,及同期单纯高血压患者36例为对照组。比较两组CysC、 $\beta$ 2-MG、IL-1 $\beta$ 、IL-18,分析CysC、 $\beta$ 2-MG、IL-1 $\beta$ 、IL-18与血压相关性、肾损伤影响因素及各指标对肾损伤的预测价值。**结果** 两组年龄、性别、体质量指数、TC、TG、FBG、LDL-C、HDL-C、尿酸、尿素氮比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ );两组高血压病程、血压控制情况、SBP、DBP比较,差异有统计学意义( $P<0.05$ );观察组CysC、 $\beta$ 2-MG、IL-1 $\beta$ 、IL-18水平高于对照组,差异有统计学意义( $P<0.05$ );CysC、 $\beta$ 2-MG、IL-1 $\beta$ 、IL-18与SBP、DBP呈正相关( $P<0.05$ );CysC、 $\beta$ 2-MG、IL-1 $\beta$ 、IL-18是高血压早期肾损伤的重要危险因素( $P<0.05$ );CysC、 $\beta$ 2-MG、IL-1 $\beta$ 、IL-18单一检测AUC值分别为0.798、0.842、0.753、0.788,联合预测AUC为0.854,略高于 $\beta$ 2-MG单独预测,显著高于CysC、IL-1 $\beta$ 、IL-18单独预测,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。**结论** CysC、 $\beta$ 2-MG、IL-1 $\beta$ 、IL-18与高血压患者血压水平高度相关,联合检测水平变化可作为临床预测早期肾损伤发生的重要途径,对诊治预防具有重要应用价值。

**【关键词】** 胱抑素C;  $\beta$ 2-微球蛋白;白细胞介素-1 $\beta$ ;白细胞介素-18;联合检测;高血压;早期肾损伤;预测价值

### The predictive value of CysC, $\beta$ 2-MG, IL-1 $\beta$ and IL-18 on early renal injury in patients with hypertension

CHEN Xi, ZHANG Na, HU Guangmei\*

(Department of Hypertension, The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang, China, 830054)

**【ABSTRACT】** **Objective** To explore the predictive value of cystatin C (CysC),  $\beta$ 2-microglobulin ( $\beta$ 2-MG), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), and interleukin-18 (IL-18) in early renal injury in patients with hypertension. **Methods** A total of 74 patients with hypertension and early renal injury in our hospital from March 2015 to September 2020 were selected as the observation group, and 36 patients with simple hypertension during the same period were selected as the control group. The CysC,  $\beta$ 2-MG, IL-1 $\beta$ , IL-18 in the two groups were compared. The correlation between CysC,  $\beta$ 2-MG, IL-1 $\beta$ , IL-18 and blood pressure, the influencing factors of renal injury and the predictive value of each indicator on renal injury were analyzed. **Results** There was no significant difference in age, gender, body mass index, TC, TG, FBG, LDL-C, HDL-C, uric acid, and urea nitrogen between 2 groups ( $P>0.05$ ). The duration of hypertension and blood pressure control in 2 groups were compared with SBP, DBP, the difference was statistically significant ( $P<0.05$ ). The levels of CysC,  $\beta$ 2-MG, IL-1 $\beta$  and IL-18 in the observation group were higher than those in the control group, and the difference was statistically significant ( $P<0.05$ ). Cys C,  $\beta$ 2-MG, IL-1 $\beta$ , IL-18 are positively correlated with

基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金(2014211C028)

作者单位:新疆医科大学第一附属医院心脏中心高血压科,新疆,乌鲁木齐 830054

\*通信作者:胡广梅, E-mail: hgmmary@126.com

SBP and DBP ( $P<0.05$ ). Cys C,  $\beta 2$ -MG, IL-1 $\beta$ , IL-18 are important risk factors for early renal injury in hypertension ( $P<0.05$ ). Cys C,  $\beta 2$ -MG, IL-1 $\beta$ , IL-18 single detection of AUC values is 0.798, 0.842, 0.753, 0.788. The combined predicted AUC is 0.854, which is slightly higher than that of  $\beta 2$ -MG alone and significantly higher than that of Cys C, IL-1 $\beta$ , and IL-18 alone, and the difference was statistically significant ( $P<0.05$ ). **Conclusion** Cys C,  $\beta 2$ -MG, IL-1 $\beta$ , and IL-18 are highly correlated with blood pressure levels in patients with hypertension. Combined detection of changes in levels can be used as an important way to predict the occurrence of early renal injury in clinic, and has important application value for diagnosis, treatment, and prevention.

**[KEY WORDS]** Cystatin C;  $\beta 2$ -microglobulin; Interleukin-1 $\beta$ ; Interleukin-18; Combined detection; Hypertension; Early kidney injury; Predictive value

高血压是临床常见慢性疾病,发病率高达30%~57%,极易引起肾损伤,但起病隐匿,缺乏特异性表现,若病情发展至不可逆肾损害会严重影响患者生命安全<sup>[1]</sup>。临床早期寻找高血压肾损伤敏感性指标对准确评估、延缓终末期肾衰竭进程具有重要价值<sup>[2]</sup>。多个研究表明,胱抑素C(CystatinC, CysC)、 $\beta 2$ -微球蛋白( $\beta 2$ -Microglobulin,  $\beta 2$ -MG)、白细胞介素-1 $\beta$ (Interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、白细胞介素-18(Interleukin-18, IL-18)在创伤性、妊娠高血压所致肾损伤中会呈明显异常变化,可作为早期预测的生物标志物<sup>[3-4]</sup>。CysC、 $\beta 2$ -MG是内源性标志物,对肾小管重吸收功能及肾小球滤过率的反应较敏感<sup>[5]</sup>;IL-1 $\beta$ 、IL-18是作用较强趋化因子,可促进多种炎症因子表达,加重高血压肾损伤。但临床尚无上述4项联合检测预测高血压患者早期肾损伤,基于此,本研究初次尝试分析CysC、 $\beta 2$ -MG、IL-1 $\beta$ 、IL-18联合检测在高血压患者早期肾损伤中的应用价值。现报告如下。

## 1 资料和方法

### 1.1 一般资料

选取本院2015年3月至2020年9月高血压早期肾损伤患者74例作为观察组,另选择同期单纯高血压患者36例作为对照组。纳入标准:①均符合高血压相关标准<sup>[6]</sup>;②收缩压(Systolic Blood Pressure, SBP)/舒张压(Diastolic Blood Pressure, DBP) $\geq 140/90$  mmHg;③高血压早期肾损伤患者肾小球滤过率(Glomerular Filtration Rate, GFR) $< 90$  mL/(min $\cdot 1.73$  m<sup>2</sup>);④经本院医学伦理委员会批准;⑤均签署知情同意书。排除标准:①合并肾萎缩、多囊肾、马蹄肾等其他明确肾脏损伤;②合并泌尿系统、糖尿病、风湿病、恶性肿瘤性疾病、急性炎症反应、脑血管疾病或冠心病;③妊娠或哺乳期女性。

### 1.2 方法

均于入院1 d内进行检查:①血清因子水平,

采集5 mL空腹静脉血,以3 000 r/min的速度离心10 min,离心半径为12 cm,分离得到血清;采用免疫增强比浊法测定CysC,试剂盒购自南京诺尔曼生物技术有限公司;采用酶联免疫吸附法测定IL-1 $\beta$ 、IL-18水平,试剂盒购自上海哈灵生物科技有限公司。② $\beta 2$ -MG水平,排空晨尿,饮水500 mL,留取1 h尿液进行检测,采用免疫增强比浊法测定,试剂盒购自南京诺尔曼生物技术有限公司。

### 1.3 观察指标

①比较两组CysC、 $\beta 2$ -MG、IL-1 $\beta$ 、IL-18水平。②分析CysC、 $\beta 2$ -MG、IL-1 $\beta$ 、IL-18与血压水平的相关性。③分析高血压患者早期肾损伤的影响因素。④分析CysC、 $\beta 2$ -MG、IL-1 $\beta$ 、IL-18单一及联合检测对高血压早期肾损伤的预测价值。

### 1.4 统计学方法

采用SPSS 22.0对数据进行分析;计数资料以 $n(\%)$ 表示,行 $\chi^2$ 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Pearson线性相关系数模型;采用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,不同预测方案间曲线下面积比较采用DeLong检验,联合检测进行Logistic二元回归拟合,返回预测概率 $\text{logit}(p)$ ,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 两组一般资料比较

两组年龄、性别、体质量指数、TC、TG、FBG、LDL-C、HDL-C、尿酸、尿素氮比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ );两组高血压病程、血压控制情况、SBP、DBP比较,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。见表1。

### 2.2 两组CysC、 $\beta 2$ -MG、IL-1 $\beta$ 、IL-18水平比较

观察组CysC、 $\beta 2$ -MG、IL-1 $\beta$ 、IL-18水平高于对照组,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。见表2。

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

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

资料	观察组 (n=74)	对照组 (n=36)	t/ $\chi^2$ 值	P值
年龄(岁)	55.31±5.29	56.48±6.14	1.032	0.304
性别				
男	48(64.86)	25(69.44)	0.228	0.633
女	26(35.14)	11(30.56)		
体质量指数 (kg/m <sup>2</sup> )	23.45±1.66	23.73±2.02	0.772	0.442
高血压病程(年)	10.13±2.04	6.27±1.48	10.121	<0.001
血压控制情况				
控制	46(62.16)	31(86.11)	6.615	0.010
未控制	28(37.84)	5(13.89)		
SBP(mmHg)	145.27±13.49	126.20±11.27	7.325	<0.001
DBP(mmHg)	97.31±7.36	85.18±6.13	8.546	<0.001
TC(mmol/L)	4.63±1.02	4.49±1.10	0.658	0.512
TG(mmol/L)	2.02±0.54	1.95±0.52	0.803	0.423
FBG(mmol/L)	5.08±1.14	4.96±1.07	0.528	0.598
LDL-C(mmol/L)	2.85±0.72	2.70±0.76	1.007	0.316
HDL-C(mmol/L)	1.16±0.37	1.21±0.40	0.648	0.519
尿酸( $\mu$ mol/L)	331.74±75.49	323.56±62.78	0.562	0.575
尿素氮( $\mu$ mol/L)	5.85±1.77	5.62±1.84	0.631	0.529

表2 两组CysC、 $\beta$ 2-MG、IL-1 $\beta$ 、IL-18水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Comparison of serum CysC,  $\beta$ 2-MG, IL-1 $\beta$  and IL-18 levels between the two groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	CysC (mg/L)	$\beta$ 2-MG ( $\mu$ g/L)	IL-1 $\beta$ (ng/L)	IL-18 ( $\mu$ g/L)
观察组	74	1.42±0.26	4.05±1.03	121.67±20.34	95.59±23.47
对照组	36	0.93±0.22	2.28±0.72	98.36±15.21	53.17±17.56
t值		9.733	9.259	6.066	9.606
P值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

### 2.3 CysC、 $\beta$ 2-MG、IL-1 $\beta$ 、IL-18与血压水平的关系

经 Pearson 相关性分析, CysC ( $r=0.587$ 、 $0.645$ )、 $\beta$ 2-MG ( $r=0.576$ 、 $0.631$ )、IL-1 $\beta$  ( $r=0.603$ 、 $0.507$ )、IL-18 ( $r=0.617$ 、 $0.630$ )与 SBP、DBP 呈正相关( $P<0.05$ ),见图1。

### 2.4 高血压患者早期肾损伤的影响因素

经 Logistic 回归分析,高血压病程、血压控制情

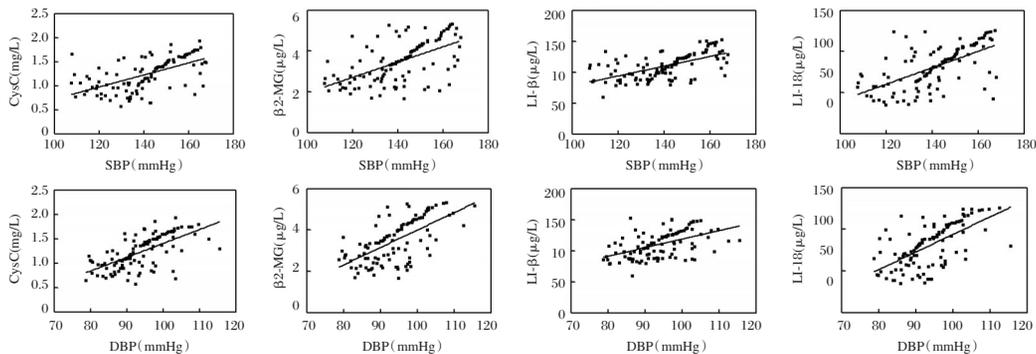


图1 CysC、 $\beta$ 2-MG、IL-1 $\beta$ 、IL-18与血压水平的关系

Figure 1 The relationship between CysC,  $\beta$ 2-MG, IL-1 $\beta$ , IL-18 and blood pressure levels

况、CysC、 $\beta$ 2-MG、IL-1 $\beta$ 、IL-18 是高血压患者早期肾损伤的重要危险因素( $P<0.05$ )。见表3。

表3 高血压患者早期肾损伤的影响因素

Table 3 Influencing factors of early renal injury in patients with hypertension

变量	$\beta$ 值	S.E.值	Wald $\chi^2$	OR值	95%CI	P值
高血压病程	1.356	0.503	7.270	3.882	2.749~5.481	<0.001
血压控制情况	1.608	0.427	14.174	4.991	3.028~8.226	<0.001
SBP	1.789	0.512	12.208	5.983	3.271~10.943	<0.001
DBP	1.621	0.489	10.983	5.056	2.805~9.114	<0.001
CysC	1.646	0.397	17.190	5.186	3.615~7.440	<0.001
$\beta$ 2-MG	1.501	0.406	13.671	4.487	2.302~8.745	<0.001
IL-1 $\beta$	1.522	0.378	16.215	4.582	2.078~10.103	<0.001
IL-18	1.671	0.409	16.695	5.318	2.346~12.057	<0.001

### 2.5 CysC、 $\beta$ 2-MG、IL-1 $\beta$ 、IL-18对高血压早期肾损伤的预测价值

ROC 曲线显示 CysC、 $\beta$ 2-MG、IL-1 $\beta$ 、IL-18 联合预测 AUC 为 0.854,略高于  $\beta$ 2-MG 单独预测,显著高于 CysC、IL-1 $\beta$ 、IL-18 单独预测,95%CI: 0.774~0.914,敏感度为 77.03%,特异度为 83.33%。见图2、表4。

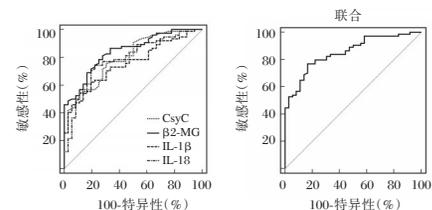


图2 CysC、 $\beta$ 2-MG、IL-1 $\beta$ 、IL-18对高血压早期肾损伤的预测价值

Figure 2 The predictive value of CysC,  $\beta$ 2-MG, IL-1 $\beta$ , and IL-18 on early renal injury of hypertension

## 3 讨论

传统尿素氮、肌酐等肾功能评估指标易受到年龄、饮食、运动等条件影响,临床应积极寻找

表4 CysC、 $\beta$ 2-MG、IL-1 $\beta$ 、IL-18对高血压早期肾损伤的预测价值Table 4 The predictive value of serum CysC,  $\beta$ 2-MG, IL-1 $\beta$  and IL-18 on early renal injury of hypertension

指标	AUC	95%CI	Z值	截断值	敏感度(%)	特异度(%)	P值
CysC	0.798	0.710-0.868	6.854	>1.19 mg/L	75.68	69.44	<0.001
$\beta$ 2-MG	0.842	0.760-0.905	9.158	>3.28 $\mu$ g/L	78.38	75.00	<0.001
IL-1 $\beta$	0.753	0.661-0.830	5.491	>117.12 ng/L	62.16	80.56	<0.001
IL-18	0.788	0.700-0.860	6.288	>69.65 $\mu$ g/L	74.32	77.78	<0.001
联合	0.854	0.774-0.914	9.926	-	77.03	83.33	<0.001

更加敏感指标评估病情。高血压早期肾功能损伤与肾脏血管壁压力增大、血流冲击内皮所致炎症状态及直接肾小管功能损伤密切相关<sup>[7-8]</sup>。李志恒等<sup>[9]</sup>学者研究表明,CysC、 $\alpha$ 1-MG等指标可作为高血压肾损伤过程中的辅助检测指标,且多指标联合检测敏感性高达90.7%,可用于肾损害的早期发现与病情监测。基于此,本研究对高血压早期肾损伤患者CysC、 $\beta$ 2-MG、IL-1 $\beta$ 、IL-18水平进行检测分析,其中血清CysC是由机体核细胞分泌,可自由透过肾小球滤过膜,并在肾脏近曲小管被降解<sup>[10]</sup>; $\beta$ 2-MG在体内99%被肾脏近曲小管降解为氨基酸,正常情况下尿液中含量较少,对于肾损伤患者,肾小球滤过功能受损,CysC、 $\beta$ 2-MG分解受限,其水平升高<sup>[11]</sup>;而IL-1 $\beta$ 、IL-18均为临床常见炎症因子,能反映炎症反应活跃状态,充分考虑肾损伤与微炎症反应的关联性,二者水平也会明显升高。上述因素均证实,与单纯高血压患者比较,4个因子水平均呈现明显异常升高状态。

以上述研究为基础,本研究进一步分析CysC、 $\beta$ 2-MG、IL-1 $\beta$ 、IL-18水平与肾损伤相关性,血清CysC分泌速率较为稳定,不易受到饮食运动、代谢情况的影响,主要与肾小球滤过率有关,因此CysC是反映早期肾小球滤过率变化的可靠内源性标志物。当高血压患者肾脏发生早期轻微损伤时,血清CysC水平会发生大幅度升高<sup>[12]</sup>;而 $\beta$ 2-MG广泛分布于有核细胞表面,会被肾小管上皮细胞重吸收,其水平维持在一定范围内,但本研究中 $\beta$ 2-MG水平逐渐升高,是由于肾损伤会导致肾小管重吸收功能受损,从而影响 $\beta$ 2-MG的正常代谢,明显提升尿液中 $\beta$ 2-MG浓度,是肾小球滤过功能减退的重要指标<sup>[13-14]</sup>。徐丽霞等<sup>[15]</sup>学者指出,炎症因子间相互作用会进一步损害血管内皮功能,导致肾脏血管路径变窄,形成血管斑块,降低血管壁弹性,并反作用于血压水平。从而进一步证实上述4项因子水平与病情程度具有密切相关性,且是高血压

患者发生肾损伤的独立危险因素。

本研究结果显示CysC、 $\beta$ 2-MG、IL-1 $\beta$ 、IL-18单一检测AUC值均较高,当上述4个因子水平均高于各自截断值时,提示高血压患者可能发生早期肾损伤。另外,本研究进一步结果表明联合预测AUC值略高于 $\beta$ 2-MG单独预测,显著高于CysC、IL-1 $\beta$ 、IL-18单独预测,提示联合检测能提高对高血压早期肾损伤的预测价值。因此临床应积极检测高血压患者CysC、 $\beta$ 2-MG、IL-1 $\beta$ 、IL-18水平,并据此制定针对性治疗方案改善肾功能,调整微炎症状态,延缓肾脏损伤进程。

综上所述,CysC、 $\beta$ 2-MG、IL-1 $\beta$ 、IL-18与高血压患者血压水平高度相关,联合检测水平变化可作为临床预测早期肾损伤发生的重要途径,对诊治预防具有重要应用价值。但本研究样本量较小,仍有一定局限性,临床进一步研究过程中应尽量扩大样本量,提高研究可信性。

## 参考文献

- [1] 余信强,张苏川.原发性高血压病人早期肾损伤影响因素的临床研究[J].蚌埠医学院学报,2019,44(2):167-170.
- [2] Bavishi C, Bangalore S, Messerli FH. Reply: Adequate Blood Pressure Control and Monitoring Acute Kidney Injury in Older Hypertensive Patients[J]. J Am Coll Cardiol, 2017, 70(1):120.
- [3] 粮琳璐.血清脂质运载蛋白、胱抑素C和尿 $\beta$ 2微球蛋白在妊娠高血压患者早期肾损伤诊断中的价值[J].中国临床医生杂志,2017,45(6):55-58.
- [4] 王磊.急性创伤性肾损伤患者尿中性粒细胞明胶酶脂质运载蛋白、肾损伤分子1和白细胞介素18水平及诊断意义[J].临床误诊误治,2017,30(11):82-85.
- [5] 龚伦彬,谢祥红,杜宇.血清CYS-C与CRP在原发性高血压肾损害早期诊断中价值探讨[J].中国实验诊断学,2017,21(3):417-420.
- [6] Jones NR, McCormack T, Constanti M, et al. Diagnosis and management of hypertension in adults: NICE guideline update 2019[J]. Br J Gen Pract, 2020, 70(691):90-91.

## dNLR、PLR 对非小细胞肺癌根治术患者预后评估

徐彪\* 沙纪名 赵旭东 曹炜 吴君旭 周晓 徐盛松

**【摘要】目的** 探索术前中性粒细胞与淋巴细胞比例(dNLR)、血小板-淋巴细胞比值(PLR)对非小细胞肺癌根治术患者预后的评估价值。**方法** 选取2016年4月至2019年3月期间本院收治的148例非小细胞肺癌根治术患者,根据术后预后情况分为预后良好组( $n=98$ ),预后不良组( $n=50$ ),经二元Logistic回归分析影响患者预后因素,再进行dNLR、PLR检测,用ROC曲线分析,各项预测方式判定患者预后价值性。**结果** 经二元Logistic回归分析,dNLR $\geq 1.53$ 、PLR $\geq 122$ 是影响NSCLC患者预后的独立因子。经ROC曲线分析,dNLR预测的AUC为0.813,预测灵敏度80.6%,特异度82.0%;PLR预测的AUC为0.833,预测灵敏度82.7%,特异度84.0%;dNLR联合PLR预测AUC为0.970,预测灵敏度98.0%,特异度96.0%,均具有一定准确率。经Kaplan-Meier分析,高水平dNLR、PLR者的死亡率高于低水平dNLR、PLR者,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。**结论** dNLR、PLR可作为评估非小细胞肺癌根治术患者预后重要参考指标。

**【关键词】** 生存期;血小板计数/淋巴细胞计数;非小细胞肺癌根治术;预后;预测

### Evaluation of dNLR and PLR on the prognosis of patients undergoing radical resection of non-small cell lung cancer

XU Biao\*, SHA Jiming, ZHAO Xudong, CAO Wei, WU Junxu, ZHOU Xiao, XU Shengsong

(Department of Cardiothoracic Surgery, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Anhui, Hefei, China, 230000)

**【ABSTRACT】 Objective** To explore the preoperative neutrophil to lymphocyte ratio (dNLR) and platelet-lymphocyte ratio (PLR) in evaluating the prognosis of patients undergoing radical resection of non-small cell lung cancer. **Methods** A selection of 148 patients undergoing radical resection of non-small cell lung cancer admitted to our hospital from April 2016 to March 2019 were divided into a good prognosis group ( $n=98$ ) and a poor prognosis group ( $n=50$ ) according to the postoperative prognosis. After binary logistic regression analysis of factors affecting the patient's prognosis, dNLR and PLR were detected, and ROC curve analysis was used to determine the prognostic value of the patients. **Results** After binary logistic regression analysis, dNLR  $\geq 1.53$  and PLR  $\geq 122$  are independent factors affecting the prognosis of NSCLC patients. According to ROC curve analysis, the AUC predicted by dNLR is 0.813, the prediction sensitivity is 80.6%, and the specificity is 82.0%; the AUC predicted by PLR is 0.833, the prediction sensitivity is 82.7%, and the specificity is 84.0%. The prediction AUC of dNLR combined with PLR is 0.970, the prediction sensitivity is 98.0%, and the specificity is 96.0%, both of which have a certain accuracy. According to Kaplan-Meier analysis, the mortality of patients with high levels of dNLR and PLR was higher than that of patients with low levels of dNLR and PLR, and the difference was statistically significant ( $P<0.05$ ). **Conclusion** dNLR and PLR can be used as important reference indicators for evaluating the prognosis of patients undergoing radical resection of non-small cell lung cancer.

**【KEY WORDS】** Survival period; Platelet count/lymphocyte count; Radical resection of non-small cell lung cancer; Prognosis; Prediction

基金项目:安庆市2018年第二批自筹经费科技计划项目(2018Z2019)

作者单位:安徽医科大学第二附属医院心胸外科,安徽,合肥230000

\*通信作者:徐彪, E-mail:xb18949834593@126.com

非小细胞肺癌根治术(Non Small Cell Lung Cancer; NSCLC)发病率占肺癌81%,是我国发病率、死亡率最高的恶性肿瘤<sup>[1]</sup>,而手术仍是目前主要根治性手段。经数据分析,术后生存率36%~82%,差异性较大,为了更准确预测患者预后,需合理选择评估指标<sup>[2]</sup>。有学者发现,癌症恶化与外周血炎症状态存在一定相关性,直接影响肺癌患者生存、转移、复发<sup>[3]</sup>。而血小板-淋巴细胞比值(Platelet Lymphocyte Ratio, PLR)、中性粒细胞与淋巴细胞比例(Neutrophil to lymphocyte ratio, dNLR)是反映炎症状态常用指标,其中PLR不仅能够反映机体炎症水平,也在结直肠癌、胃癌中具有较高预测价值,但运用于肺癌研究中报道较少。dNLR是全身炎症反应的标志物之一,可反映多种肿瘤预后,但关于其术前预测价值研究较少。为此本文便针对dNLR、PLR术前预测价值进行了深入探索,并分析了两者指标单方面和联合筛查在NSCLC患者预后判定中作用性以及对其生存率的预测性。

## 1 资料和方法

### 1.1 一般资料

分析本院在2016年4月至2019年3月期间收治的148例非小细胞肺癌根治术患者基本资料。男性84例,女性64例;年龄:<60岁56例,≥60岁92例;手术方式:肺叶切除102例,亚肺叶切除46例;肿瘤分期:Ⅱ期70例,Ⅲ-Ⅳ期78例。同时根据148例患者术后预后情况分为预后良好组( $n=98$ ),预后不良组( $n=50$ )。纳入标准:①符合NSCLC临床诊断标准<sup>[4]</sup>,且经术后病理活检确诊,具有完整临床资料;②随访资料完整可用;③术前未进行辅助化疗干预;④患者已知情同意本次试验。排除标准:①近期存在自身免疫性疾病和感染史;②近一周内曾使用过刺激骨髓造血系统药物;③术前有骨髓造血系统病、血液系统病者;④伴发第二原发恶性肿瘤者。符合《赫尔辛基宣言》的伦理审查。

### 1.2 方法

筛查方式:通过电子病案管理系统收集患者各项资料,包括年龄、性别、肿瘤分期、手术方案、神经侵犯情况以及dNLR、PLR水平值。运用日本希森美康公司提供SYSMEX XE-2100型号全自动血细胞分析仪检测dNLR、PLR水平值。检测2个浓度水平(高低两种)的质控品。PLR=血小板计数/淋巴细胞计数计算得到;dNLR=绝对嗜中性粒细胞数/

(白细胞数-绝对嗜中性粒细胞数)。dNLR最佳分界点为1.53<sup>[5]</sup>,dNLR≥1.53判定为预后不良者,dNLR<1.53判定为预后良好者;PLR最佳分界点为122<sup>[6]</sup>,PLR≥122判定为预后不良者,PLR<122判定为预后良好者。准确率=(a+d)/(a+b+c+d);灵敏度= $a/(a+b)*100%$ ;特异度= $d/(c+d)*100%$ ;误诊率= $b/(a+b)*100%$ ;漏诊率= $c/(c+d)*100%$ 。

### 1.3 观察指标

①对比预后良好组和预后不良组的各项资料;②以术后恢复情况作为判定依据,分析术前dNLR、PLR以及联合预测的价值性,并用ROC曲线分析三种预测方式在判定患者预后的价值性;③分析dNLR、PLR以及联合法在预测患者生存情况中作用性。总生存期(Overall survival, OS)是指患者确诊为NSCLC后至随访1年因任何原因死亡的时间。

### 1.4 统计学处理

采用SPSS 20.0统计学软件处理;计数资料用 $n(\%)$ 表示,行 $\chi^2$ 检验;影响患者预后因素采用二元Logistic回归分析;dNLR、PLR、联合的预测价值评估采用ROC曲线分析,当AUC>0.9时预测准确性高;Kaplan-Meier法绘制生存曲线;组间生存差异比较运用log-rank检验;以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 两组一般资料比较

两组性别、年龄、手术方式、神经侵犯情况、肿瘤分期情况比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ ),两组dNLR、PLR比较,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。见表1。

### 2.2 分析影响NSCLC患者预后因素

dNLR≥1.53、PLR≥122是影响NSCLC患者预后的独立因子( $P<0.05$ )。见表2。

### 2.3 各项方式的准确性对比

dNLR预测准确率为81.08%(120/148),PLR预测准确率为83.11%(123/148),联合预测准确率为97.30%(144/148),联合预测准确率虽高于单方面准确率,差异无统计学意义( $\chi^2=0.017$ ;  $P<0.05$ )。见表3。

### 2.4 ROC曲线分析

ROC曲线分析显示,dNLR预测的AUC为0.813,PLR预测的AUC为0.833,dNLR联合PLR预测AUC为0.970,均有一定准确率,见表4。图1。

表1 两组一般资料比较 [n(%)]

Table 1 Comparison of two general data [n(%)]

指标	分类	预后良好组 (n=98)	预后不良组 (n=50)	$\chi^2$ 值	P值
性别	男性	56(57.14)	28(56.00)	0.018	0.894
	女性	42(42.86)	22(44.00)		
年龄	<60岁	38(38.78)	18(36.00)	0.108	0.742
	≥60岁	60(61.22)	32(64.00)		
手术方式	亚肺叶切除	31(31.63)	15(30.00)	0.041	0.839
	肺叶切除	67(68.37)	35(70.00)		
神经侵犯	有	25(25.51)	12(24.00)	0.040	0.841
	无	73(74.49)	38(76.00)		
肿瘤分期	II期	47(47.96)	23(46.00)	0.051	0.821
	III~IV期	51(52.04)	27(54.00)		
血管侵袭	有	20(20.41)	10(20.00)	0.003	0.953
	无	78(79.59)	40(80.00)		
dNLR	≥1.53	19(19.39)	41(82.00)	53.845	<0.05
	<1.53	79(80.61)	9(18.00)		
PLR	≥122	17(17.35)	42(84.00)	61.356	<0.05
	<122	81(82.65)	8(16.00)		

表2 分析影响 NSCLC 患者预后因素

Table 2 Analysis of factors affecting the prognosis of NSCLC patients

相关因素	$\beta$ 值	S.E.	Wald	OR值	95%CI	P值
dNLR≥1.53	3.796	0.788	23.226	44.524	9.509~208.476	<0.05
PLR≥122	4.043	0.790	26.227	57.020	12.133~267.968	<0.05

表3 各项方式的准确性对比

Table 3 Comparison of accuracy of various methods

预后情况	dNLR 预测		PLR 预测		联合预测	
	预后良好	预后不良	预后良好	预后不良	预后良好	预后不良
预后良好	79(a)	19(b)	81(a)	17(b)	96(a)	2(b)
预后不良	9(c)	41(d)	8(c)	42(d)	2(c)	48(d)
$\chi^2$ 值	0.042		0.043		0.483	
P值	0.838		0.836		0.487	

表4 dNLR、PLR 预测及两项联合对患者预后情况的预测价值

Table 4 Predictive value of dNLR, PLR and the combination of the two on the prognosis of patients

预测项目	AUC	标准误	95%CI	敏感度 (%)	特异度 (%)	约登指数	P值
dNLR 预测	0.813	0.039	0.736~0.890	80.6	82.0	0.626	<0.05
PLR 预测	0.833	0.037	0.760~0.906	82.7	84.0	0.667	<0.05
联合预测	0.970	0.018	0.934~1.000	98.0	96.0	0.940	<0.05

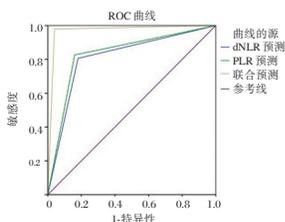


图1 各项预测方式在判定预后情况的ROC曲线  
Figure 1 ROC curve of various prediction methods in judging prognosis

### 2.5 对比不同指标含量的死亡率

148例患者经1年随访,20例(13.51%)死亡,中位生存时间为(10.49±0.86)个月。术前经dNLR预测<1.53与≥1.53患者的OS分别为3例(3.41%)、17例(28.33%),两组比较,差异有统计学意义( $\chi^2=18.963, P<0.05$ )。术前经PLR预测<122与≥122患者的OS分别为4例(4.49%)、16例(27.12%),两组比较,差异有统计学意义( $\chi^2=15.539, P<0.05$ )。联合预测dNLR<1.53、PLR<122与dNLR≥1.53、PLR≥122患者的OS分别为0、27例(34.00%),两组对比死亡率,差异有统计学意义( $\chi^2=64.729, P<0.05$ ),见图2。

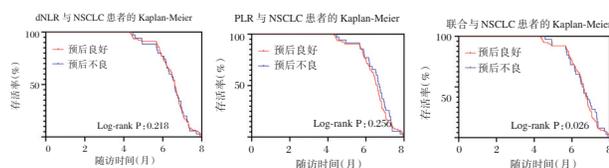


图2 PLR、dNLR及联合预估 NSCLC 的Kaplan-Meier分析  
Figure 2 Kaplan-Meier analysis of NSCLC estimated by dNLR, PLR and dNLR combined with PLR

### 3 讨论

NSCLC是肺癌患者常见类型。肺虽拥有强大呼吸储备功能,但不具备痛觉分布神经,无法及时察觉病症,大多就诊者均处于中晚期,不仅增加手术风险,导致诊断困难,再加上部分患者因手术风险高、经济困难等因素影响,无法及时诊疗,难以确定手术方案,从而错过最佳治疗时机,故需尽早开展术前检测。血清学筛查具有创伤小、易获取、方便、简便等优势,相比于其他筛查方式,更值得推广。

杨栋梁<sup>[7]</sup>学者研究显示,肿瘤微环境及炎症反应在肿瘤发生、发展中起到重要意义,故需注重炎症因子筛查,从而了解预后情况。本研究结果说明dNLR、PLR水平能够在一定程度上预测患者预后情况,可作为独立影响因子。dNLR是常见炎症因子之一,代表了抗肿瘤与促肿瘤因素之间的平衡,能够直接反映淋巴细胞和全血中性粒细胞比值,发挥着主要抗肿瘤免疫效应,高水平状态提示机体存在T淋巴细胞活化抑制,机体免疫反应降低,有利于肿瘤生长和转移,故能够在一定程度上反映NSCLC患者预后状态<sup>[8-9]</sup>。PLR能够产生转化生长因子- $\beta$ 和血小板源性内皮生长因子,此类因子有利于肿瘤细胞生长,进入血液循环后,可与循环肿瘤细胞聚合物结合,产生转化生长因

子,引起肿瘤转移,实现免疫逃逸,通过监测水平值变化,能够了解机体炎症状态和免疫状态,在评估病情预后中具有一定作用<sup>[10-11]</sup>。此外,本次结果进一步说明两者指标联合进行术前筛查,更具有预测价值。这说明dNLR、PLR虽作为独立影响因子,但单独作为预测指标具有局限性,故需选择联合筛查法<sup>[12]</sup>。同时本研究通过Kaplan—Meier法分析,dNLR、PLR与患者预后存在一定相关性。结果说明dNLR、PLR不仅对早期手术效果评价具有较好预测价值,对远期疗效评估也有较好预测作用,将dNLR、PLR联合预测能够了解病情发生、发展情况,推广于预后评估中具有显著作用性<sup>[13]</sup>。

综上所述,外周血中dNLR、PLR因易获取、价格低廉、检测方便开始广泛推广于临床,在评估非小细胞肺癌根治术患者预后中具有重要意义,有助于术后风险分层评判,提供个体化指导建议。但本次研究仍存在一定局限性,首先本次随访时间只有12个月,相对而言较短。其次,样本量较少,为了更深入地了解dNLR、PLR评估预后作用性,需后期扩大样本、增加随访时间进一步探索。

## 参考文献

- [1] 李晓锋,张冠军,汪园园,等. 非小细胞肺癌EGFR、ALK和ROS1基因联合检测及突变共存分析[J]. 分子诊断与治疗杂志,2018,10(6):378-384.
- [2] 施萍,杜永亮. 外周血中性粒细胞与淋巴细胞比值与初诊晚期非小细胞肺癌患者预后的关系研究[J]. 实用心脑血管病杂志,2020,28(3):71-75.
- [3] 童晶涛,张欢乐,郑璐,等. 血小板和淋巴细胞的比值、中性粒细胞和淋巴细胞的比值与非小细胞肺癌的临床病理学关系及预后效果研究[J]. 中国卫生检验杂志,2019,29(24):3020-3023.
- [4] 李东航,姚颀,耿庆. 中国临床肿瘤学会肺癌诊疗指南(2018版)更新解读[J]. 临床外科杂志,2019,27(1):36-39.
- [5] 黄金兰,郑诗豪,欧启水. 术前外周血NLR,dNLR及LMR在胶质母细胞瘤患者预后评估中的价值分析[J]. 福建医科大学学报,2017,51(6):404-409.
- [6] 刁鹏,黄庆,李昌林,等. 术前NLR、PLR在非小细胞肺癌患者预后中的价值[J]. 肿瘤预防与治疗,2019,32(3):212-220.
- [7] 王晓东,景鹏宇,崔凯,等. 术前外周血中性粒细胞淋巴细胞比值对I-III期非小细胞肺癌患者预后的影响[J]. 陕西医学杂志,2019,48(12):1612-1615.
- [8] Mezquita L, Auclin E, Charrier M, et al. MA 05.03 The Early Monitoring of Derived Neutrophil-To Lymphocyte Ratio (dNLR) Could Be a Surrogate Marker of Benefit of Immunotherapy in NSCLC[J]. J Thorac Oncol, 2017,12(11):S1815-S1816.
- [9] 尉素贞,徐爱晖. NLR和PLR对小细胞肺癌患者预后的评估[J]. 临床肺科杂志,2018,23(12):2251-2255.
- [10] 杨栋梁,周胜年,汪会进,等. 中性粒细胞/淋巴细胞比值对非小细胞肺癌淋巴结转移的预测价值[J]. 安徽医学,2020,41(6):702-704.
- [11] 杨琼,吴春龙,沈益敏,等. 术前NLR,dNLR水平对非小细胞肺癌根治术患者预后的预测价值[J]. 浙江医学,2019,41(19):2054-2059+2066.
- [12] Russo A, Franchina T, Ricciardi GRR, et al. Baseline neutrophilia, derived neutrophil-to-lymphocyte ratio (dNLR), platelet-to-lymphocyte ratio (PLR), and outcome in non small cell lung cancer (NSCLC) treated with Nivolumab or Docetaxel[J]. J Cell Physiol, 2018,233(10):6337-6343.
- [13] 李向敏,张兰兰,毛志远,等. 中性粒细胞-淋巴细胞比值,血小板-淋巴细胞比值对预测晚期非小细胞肺癌患者化疗疗效及预后的意义[J]. 空军医学杂志,2020,36(4):317-321.
- [7] 李延玲,王杨威,王永刚,等. 伴有高血压的急性肾损伤患者临床及病理分析[J]. 中国实验诊断学,2018,22(7):1186-1188.
- [8] 张璐,丁国华. 急性肾损伤导致慢性肾脏病的机制及防治[J]. 实用医院临床杂志,2017,14(2):11-15.
- [9] 李志恒,徐超. 血、尿指标联合检测在原发性高血压患者肾损害早期发现的临床价值[J]. 中国综合临床,2017,33(11):998-1002.
- [10] 占小锋,汪妍,张长磊,等. 胱抑素C与CKD-EPI 2012在老年高血压肾损伤患者中的研究进展[J]. 中国心血管杂志,2020,25(3):274-277.
- [11] Zhang L, Sun J, Zhang M, et al. The significance of combined detection of CysC, urinary mAlb and  $\beta$ 2-MG in diagnosis of the early renal injury in pregnancy-induced hypertension syndrome[J]. Saudi J Biol Sci, 2019,26(8):1982-1985.
- [12] 陈红,高正兰. Cys C在慢性肾脏病患者早期肾功能损害中的临床价值[J]. 热带医学杂志,2017,17(8):1047-1050.
- [13] 李海燕. CysC、 $\alpha$ 1-MG及 $\beta$ 2-MG在慢性阻塞性肺疾病患者的检测价值及与缺氧所致肾损伤的相关性[J]. 分子诊断与治疗杂志,2020,12(4):516-519.
- [14] Wang R, Hu H, Hu S, et al.  $\beta$ 2-microglobulin is an independent indicator of acute kidney injury and outcomes in patients with intracerebral hemorrhage [J]. Medicine (Baltimore), 2020,99(8):e19212.
- [15] 徐丽霞,常娟,茅宇峰,等. Cys C及炎症因子在高血压肾病早期诊断评估中的价值研究[J]. 中国医药导刊,2017,19(8):768-771.

(上接第597页)

# 多模态磁共振对宫颈癌分期及盆腔淋巴结转移的诊断价值

赵耀\* 曾小松

**【摘要】**目的 探讨多模态核磁共振检查(MRI)对宫颈癌患者的疾病分期及淋巴结转移情况的诊断价值。方法 选择本院2018年1月至2020年12月期间收治的诊断为宫颈癌的患者46例,所有患者通过术后病理学检查后确诊。以病理学检查结果为标准进行疾病FIGO分期和淋巴结转移的判定,采用多模态MRI检查,完成常规MRI平扫、弥散加权成像(DWI)以及动态增强扫描(DCE),对比多模态MRI分期结果和淋巴结转移情况与病理结果,判断多模态MRI检测宫颈癌患者的诊断价值。结果 根据术后病理学检查结果的分期为I期患者占26.1%(12/46),II期患者占43.5%(20/46),III期患者占17.4%(8/46),IV期患者占10.9%(5/46)。多模态MRI检查分期结果为I期13例,II期为18例,III期为10例,IV为5例;与术后病理检查结果对比后,多模态MRI对IV期宫颈癌患者的诊断准确性、敏感性、特异性、阳性预测值、阴性预测值均为100.00%,高于III、II、I期宫颈癌诊断( $P<0.05$ )。46例患者经过手术共检查131个淋巴结,其中63个淋巴结发生转移,68个淋巴结未发生转移,多模态MRI检查后诊断有60个淋巴结出现转移,诊断的准确性为93.1%,诊断的敏感性为95.00%,诊断特异性为91.56%。结论 多模态MRI检查对宫颈癌患者的疾病分期和淋巴结转移情况的诊断具有较高的准确性,能够清晰全面的显示病灶情况,有效识别疾病分期,可作为宫颈癌诊断的重要手段,值得临床推广。

**【关键词】** 宫颈癌;核磁共振;弥散加权成像;动态增强扫描

## Diagnostic value of multimodal magnetic resonance imaging in cervical cancer staging and pelvic lymph node metastasis

ZHAO Yao\*, ZENG Xiaosong

(CT/MRI Room, Suzhou Hospital Affiliated to Anhui Medical University, Suzhou, Anhui, China, 234000)

**【ABSTRACT】** **Objective** To explore the diagnostic value of multimodal magnetic resonance imaging (MRI) in cervical cancer patients with stage-by-stage lymph node metastasis. **Methods** 46 patients with cervical cancer diagnosed in our hospital from January 2017 to June 2019 were selected. All patients were confirmed by pathological examination after operation. The FIGO staging and lymph node metastasis of cervical cancer were determined according to pathological examination results. Conventional MRI plain scan, diffusion-weighted imaging (DWI) and dynamic contrast-enhanced scanning (DCE) were performed by multi-modal MRI. The diagnostic value of multi-modal MRI in detecting cervical cancer patients was evaluated by comparing the staging results of multi-modal MRI and lymph node metastasis with pathological results. **Results** According to the results of postoperative pathology, 26.1% (12/46) of stage I patients, 43.5% (20/46) of stage II, 17.4% (8/46) of stage III, and stage IV 10.9% (5/46). The results of multimodal MRI examination were 13 cases in stage I, 18 cases in stage II, 10 cases in stage III, and 5 cases in stage IV. Compared with the results of postoperative pathological examination, multimodal MRI showed the diagnosis of stage IV cervical cancer. The diagnostic accuracy, sensitivity, specificity, positive predictive value, and negative predictive val-

基金项目:安徽省重点研究与开发计划(202004j07020026)

作者单位:安徽医科大学附属宿州医院CT/MRI室,安徽,宿州234000

\*通信作者:赵耀, E-mail:hd63568@163.com

ue were all 100.00%, which was higher than the diagnosis of stage III, II and I cervical cancer ( $P < 0.05$ ). A total of 131 lymph nodes were examined in 46 patients after surgery, of which 63 lymph nodes had metastasis and 68 lymph nodes had no metastasis. After multimodal MRI, 60 lymph nodes were diagnosed with metastasis. The accuracy of diagnosis was 93.1%, and the diagnosis was sensitive. The sensitivity of diagnosis was 95.00%, and the specificity of diagnosis was 91.56%. **Conclusion** Multimodal MRI examination has high accuracy in the diagnosis of cervical cancer staging and lymph node metastasis. It can clearly and comprehensively display the lesion and effectively identify the disease staging. It is worthy of clinical promotion.

[KEY WORDS] Cervical cancer; MRI; DEI; DCE

宫颈癌是病死率排名第二的妇科常见恶性肿瘤,病死率仅次于乳腺癌,且呈年轻化的趋势,严重威胁了女性的生命健康<sup>[1]</sup>。宫颈癌患者的预后差且极易转移复发,主要与疾病的病例类型有关,宫颈癌主要为腺癌,且多为内生型,可向宫颈组织的深层浸润侵袭血管和淋巴<sup>[2]</sup>,导致血行和淋巴结转移,且腺癌对放疗的敏感度低,因此疗效不理想。宫颈癌的预后和治疗方法的选择不仅仅跟疾病的分期有关,盆腔的淋巴结的转移情况也是影响宫颈癌患者治疗方法选择的重要影响因素<sup>[3]</sup>,相关研究表明<sup>[4]</sup>,宫颈癌 I b 期的患者中有 11.5% 的患者会出现盆腔淋巴结转移,因此对于这部分患者,合理的淋巴结清扫手术是改善预后的重要方法。目前对于宫颈癌患者早期诊断检测主要通过常规 CT 或 MRI,而常规以淋巴结短径超过 1 cm 作为淋巴结转移的标准<sup>[5]</sup>,因此导致对疾病的分期和淋巴结的转移的诊断敏感性较差。多模态 MRI 是一种通过在结构 MRI 信息成像的基础上融合多种功能性 MRI 成像的新型检查技术,可对患者的病情进行综合性评价,本研究通过多模态 MRI 技术评估了宫颈癌患者的疾病分期和淋巴结转移情况,为宫颈癌的早期诊断、疗效评价提供一种新的参考。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选择本院 2018 年 1 月至 2020 年 12 月期间收治的诊断 of 宫颈癌的患者 46 例,所有患者入院后均采用多模态 MRI 检查,并经过宫腔镜或分段诊断性刮宫诊断为宫颈癌<sup>[6]</sup>,所有患者术后经病理学检查后确诊,具有完整的病历资料。患者平均年龄为 (51.3±5.8) 岁。排除标准为:①具有 MRI 或手术的禁忌症无法完成治疗或参与研究;②拒绝或未能够完成多模态 MRI 检查;③临床资料不完整、术后未获得病理检查结果者。本次研究获得医院伦理委员会批准,所有患者及家属自愿签署知情同意书。

### 1.2 检测方法

所有患者均采用飞利浦 Ingenia 3.0T 全身磁共振成像系统对患者进行多模态 MRI 检测。患者完成检查前适当饮水,保持膀胱充盈适度,并建立静脉通道。多模态 MRI 检测共完成常规 T1、T2 平扫、弥散加权成像(DWI)以及动态增强扫描(DCE),包括常规体位的冠状位、矢状位、轴位。平扫:矩阵 256×256,扫描野(FOV) 300 mm×250 mm,层厚 3.0 mm,层间距 1.0 mm, T1W1: SE 序列,重复时间(TR)400 ms,回声时间(enTE)9~10 ms; T2W1: TSE 序列,TR 5 500 ms,TE 90 ms, T2WI 矢状位像为 Blade 序列和呼吸门控,TR3600 ms, TE 85 ms,激励次数 1 次。DWI: 弥散加权因子取值 0 以及 1 000 s/mm<sup>2</sup>, TR 3 800 ms, TE 75 ms, FOV 250 mm×200 mm,层间距 1.0 mm,厚度 3.0 mm,激励次数 3 次,测量 ADC 值并绘制 ADC 图。DCE-MRI: FLASH-3D-VIBE-FS 序列,参数设置: FOV 300 mm×250 mm,矩阵 256×256,层厚 3.0 mm,层间距 1.0 mm,TR 4.2 ms,TE 2.5 ms,激励次数 1 次;采用自动触发经高压注射器通过静脉通道注射钆喷酸葡胺(Gd-DTPA)造影剂,剂量 0.1 g/kg,注射速度为 2.5 mL/s,共注射 20 mL,注射前采集动态增强时相,注射后选择 30、60、90、120、180 s 的动态增强图像,采集时间 18 s,间隔 12 s,后经工作站处理图像,绘制时间-信号强度曲线。

### 1.3 研究方法

所有患者的检查结果均由 2 名副主任医师以上专家在不知道病理结果的情况下独立进行阅片,对结果进行综合评价,两者结果有异议时交第三位上级医生阅片后讨论做出判定。MRI 图像显示淋巴结最短径超过 0.5 cm,判定为淋巴结转移。所有患者在完成多模态 MRI 检查后 2 周内进行手术治疗,对患者进行淋巴结清扫术,判断是否出现淋巴结转移,术后及时将标本进行病理检查,根据 FIGO2009 分期进行病理分级分期判断<sup>[7]</sup>。

### 1.4 统计学分析

采用 SPSS 22.0 软件进行数据处理分析, 计数资料以  $n(\%)$  表示, 采用  $\chi^2$  检验, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 患者临床特征分布

接触性阴道出血 18 例、阴道脓性分泌物 13 例、腰骶部疼痛 9 例、不规则阴道排液 6 例, 其中合并子宫肌瘤 6 例, 合并宫腔积液 3 例。其中 8 例患者采用全子宫切除术, 16 例患者采用筋膜外扩大子宫切除术, 22 例患者采用广泛性子官切除术。有 31 例 67.4% 的患者为鳞癌, 10 例 21.7% 的患者为腺癌, 5 例 10.9% 的患者为腺鳞癌; 根据 FIGO2009 标准, I 期患者占 26.1% (I a 期 5 例, I b 期 7 例), II 期患者占 43.5% (II a 期 8 例, II b 期 12 例), III 期患者占 17.4%, IV 期患者占 13.0%; 高分化患者占 37.0%, 中分化患者占 41.3%, 低分化患者占 21.7%。

### 2.2 多模态 MRI 检查对宫颈癌患者的结果及诊断价值

与术后病理检查结果对比后, 多模态 MRI 对 I 期宫颈癌患者的诊断准确性为 89.13%, 其中漏诊 2 例, 误诊 3 例; 对 II 期宫颈癌患者的诊断准确性为 91.30%, 其中漏诊 3 例, 误诊 1 例; 对 III 期宫颈癌患者的诊断准确性为 91.30%, 其中漏诊 1 例, 误诊 3 例; 对 IV 期宫颈癌患者的诊断准确性为 100.00%, 未发生误诊漏诊。对 IV 期宫颈癌患者的诊断准确性高于 I 期、II 期及 III 期 ( $P < 0.05$ )。见表 1。

表 1 患者多模态 MRI 检查级诊断价值分析

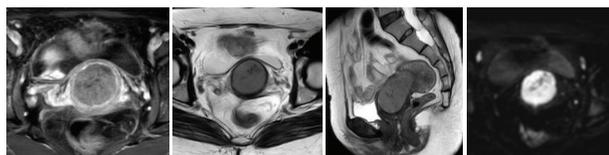
Table 2 Analysis of the diagnostic value of patients with multimodal MRI

分期	病理分期	多模态 MRI 分期	准确性 (%)	敏感性	特异性	阳性预测值	阴性预测值
I	12	13	89.13	76.92	93.94	83.33	91.18
II	20	18	91.30	94.44	89.29	85.00	96.15
III	8	10	91.30	70.00	97.22	87.50	92.11
IV	5	5	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
	$\chi^2_{(I-IV)}$ 值		11.495	26.091	6.249	18.186	9.227
	$P_{(I-IV)}$ 值		0.000	0.000	0.012	0.000	0.002
	$\chi^2_{(II-IV)}$ 值		9.096	5.719	11.316	16.216	3.926
	$P_{(II-IV)}$ 值		0.003	0.017	0.000	0.000	0.048
	$\chi^2_{(III-IV)}$ 值		9.096	35.294	2.819	13.333	8.214
	$P_{(III-IV)}$ 值		0.003	0.000	0.093	0.000	0.004

### 2.2 患者淋巴结转移结果分析

46 例患者经过手术共检查 131 个淋巴结, 其中 63 个淋巴结发生转移, 68 个淋巴结未发生转移, 多模

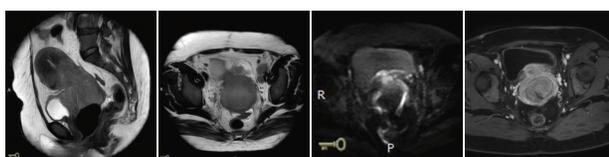
态 MRI 检查后诊断有 60 个淋巴结出现转移, 诊断的准确性为 93.10%, 诊断的敏感性为 95.00%, 诊断特异性为 91.56%, 淋巴结转移的诊断情况。见图 1~3。



注: T2WI 矢状位, T2WI 横断位, 宫颈稍高信号肿块, 弥散受限, 动态增强呈相对低强化, 未见阴道受累及宫旁浸润。

图 1 影像诊断宫颈癌 IB 期

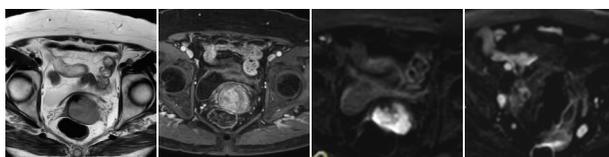
Figure 1 Imaging diagnosis of stage IB cervical cancer



注: 宫颈巨大肿块, 侵犯膀胱后壁, 矢状位 T2WI 及横断 T2WI 均不能明确诊断, DWI, 可见膀胱内壁弥散高信号。

图 2 影像诊断宫颈癌 IV 期

Figure 2 Imaging diagnosis of stage IV cervical cancer



注: T2WI 宫颈稍高信号肿块, 动态增强扫描早期成不均匀强化, 弥散受限, 同时, 盆腔内可见多发较大淋巴结, 弥散受限。

图 3 影像诊断盆腔内淋巴结转移

Figure 3 Imaging diagnosis of lymph node metastasis in the pelvic cavity

## 3 讨论

大量研究表明, 宫颈癌的发生与人乳头瘤病毒感染、人工流产以及宫颈炎症有较强的相关性, 尽管目前宫颈癌预防观念的推进和筛查技术的进步, 使得宫颈癌的病死率降低, 但是由于宫颈癌早期症状不明显, 且宫颈管和宫颈肌层的病变不易发现, 尤其是对于盆腔淋巴结的转移情况判断受限, 导致宫颈癌患者的预后仍较差<sup>[8-9]</sup>, 目前宫颈癌患者的 5 年生存率仅为 55.5%, 分期越高患者的生存率越低, 因此术前对宫颈癌分期的准确判断, 不但会影响患者的治疗方式的选择, 还会直接影响患者的预后。

宫颈癌患者的 DWI 的信号图像与测得的 ADC 值与细胞密度密切相关, 由于肿瘤组织的异常增生能力导致细胞密度高、胞外间隙小、组织液的压力升高, 使肿瘤组织的水分子的布朗运动受限<sup>[10]</sup>, 因此

DWI往往获得高信号,而ADC值低,受累的组织器官等均能够获得DWI的高信号表现,而盆腔淋巴结转移及肿瘤的扩散均能够获得与原发病灶相同表现的信号,因此对于宫旁侵袭、炎症反应、瘤周水肿以及淋巴结转移均具有更好的优势<sup>[11]</sup>。DCE检查不仅能够显示肿瘤与正常组织的血供状态,还能够反映宫颈癌不同阶段的特点,如早期病变大量新血管生成,血管内皮功能不全、通透性增加<sup>[12]</sup>,因此可在增强早期出现明显强化,并迅速达到峰值,因此迅速强化也可作为恶性病变的特点;而在疾病的中晚期,对比剂在肿瘤组织内逐渐廓清,而正常组织则逐渐强化,形成信号差异<sup>[13]</sup>;延时增强扫描则能够更好的显示对宫体、阴道及周围脏器组织的关系<sup>[14]</sup>,此外,肿瘤旁组织的静脉丛较丰富及水肿形成会导致瘤体边缘模糊,而DCE检测能够更准确的提示宫旁浸润情况,能够提高诊断和分期的有效性<sup>[15]</sup>。

本结果提示间质浸润小于3 mm,误诊因为多发囊肿误判或因为病灶于宫颈前壁,误判为突破宫颈口,出现宫旁肿块;Ⅱ期宫颈癌患者漏诊均因病灶较小,且合并盆腔积液或盆腔炎,误诊因为患者合并瘢痕子宫;对Ⅲ期宫颈癌患者漏诊主要因绝经后子宫萎缩,肿块侵犯阴道,误判为侵犯阴道超过1/3;误诊主要由于肿瘤侵犯阴道前壁和间质,同时与膀胱分界不明显,误判盆腔粘连。本组研究结果与部分研究结果保持一致<sup>[16]</sup>。研究中5例Ⅳ期患者的诊断未发生误诊漏诊,但由于Ⅲ、Ⅳ期患者例数较少,因此需要今后的大样本研究进行评估评价。此外本次研究发现多模态MRI检查后诊断淋巴结出现转移的准确性为93.1%,诊断的敏感性为95.00%,诊断特异性为91.56%,具有较高的诊断价值,但本次研究以0.5 cm为界定标准,有部分淋巴结转移时直径小于0.5 cm或有患者出现淋巴结反应性增生,因此导致存在对淋巴结诊断的误差。

综上所述,多模态MRI对于宫颈癌患者的术前病理分期和淋巴结转移具有较高的准确性,具有一定的诊断价值,尤其是对于早期的宫颈癌患者,有助于术前早期诊断、分期和治疗的选择,对提高患者预后具有重要意义。

## 参考文献

- [1] Lee SI, Atri M. 2018 FIGO Staging System for Uterine Cervical Cancer: Enter Cross-sectional Imaging [J]. Radiology. 2019, 292(1):15-24.
- [2] Koh WJ, Abu-Rustum NR, Bean S, et al. Cervical cancer, version 3.2019, NCCN clinical practice guidelines in oncology [J]. J Natl Compr Canc Netw, 2019, 17(1): 64-84.
- [3] Devine C, Viswanathan C, Faria S, et al. Imaging and Staging of Cervical Cancer [J]. Semin Ultrasound CT MR, 2019, 40(4):280-286.
- [4] Lucia F, Visvikis D, Desseroit MC, et al. Prediction of outcome using pretreatment 18F-FDG PET/CT and MRI radiomics in locally advanced cervical cancer treated with chemoradiotherapy [J]. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2018, 45(5):768-786.
- [5] Haldorsen IS, Lura N, Blaakær J, et al. What Is the Role of Imaging at Primary Diagnostic Work-Up in Uterine Cervical Cancer [J]. Curr Oncol Rep, 2019, 21(9):77.
- [6] 胡菲菲,何俊勇,何礼霞,等. 2014~2018年中国宫颈癌临床实践指南的方法学质量评价 [J]. 中国循证医学杂志, 2019, 19(8):989-993.
- [7] Kumar T, Achkar S, Haie-Meder C, et al. Curiethérapie guidée par imagerie multimodale: l'exemple du cancer du col utérin [Multimodal imaging guided brachytherapy: the example of cervical cancer] [J]. Cancer Radiother, 2019, 23(6-7):765-772.
- [8] 张鹏飞,周保成,周哲,等. let-7d-5p 调控 HPV16 阳性宫颈癌细胞侵袭、迁移及凋亡的分子机制 [J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(7):892-896.
- [9] 梅琳琳,王雅莉,田晓娜,等. 宫颈病变与 Treg 转录因子表达及细胞因子水平的关系 [J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(11):1484-1487+1492.
- [10] 尚靳,孙洪赞,辛军,等. PET/CT 与 PET/MR 在诊断宫颈癌原发灶及评价盆腔淋巴结转移的比较研究 [J]. 中国医学影像技术, 2018, 34(1):94-98.
- [11] Moro F, Gui B, Arciuolo D, et al. Fusion imaging of ultrasound and MRI in the assessment of locally advanced cervical cancer: a prospective study [J]. Int J Gynecol Cancer. 2020, 30(4):456-465.
- [12] Meyer HJ, Purz S, Sabri O, et al. Cervical Cancer: Associations between Metabolic Parameters and Whole Lesion Histogram Analysis Derived from Simultaneous 18F-FDG-PET/MRI [J]. Contrast Media Mol Imaging, 2018, 20(18):50-63.
- [13] 邢曜耀. 多模态 MRI 在子宫内膜癌分期诊断中的价值及影响因素的研究 [D]. 江苏:苏州大学, 2018.
- [14] Wang T, Sun H, Han F, et al. Evaluation of parametrial infiltration in cervical cancer with voxel-based segmentation of integrated 18F-FDG PET/MRI images: A preliminary study [J]. Eur J Radiol, 2019, 118:147-152.
- [15] Li X, Wu S, Li D, et al. Intravoxel Incoherent Motion Combined With Dynamic Contrast-Enhanced Perfusion MRI of Early Cervical Carcinoma: Correlations Between Multimodal Parameters and HIF-1 $\alpha$  Expression [J]. J Magn Reson Imaging, 2019, 50(3):918-929.
- [16] 杜立新,李志刚,元建鹏,等. 多模态 MRI 在宫颈癌精确诊断中的应用 [J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2018, 39(14):9-14.

## CTCs、HSP32、HSP27在食管癌同步放化疗中动态变化及临床意义

郑杰\* 葛曦 马志宇

**【摘要】**目的 探讨循环肿瘤细胞(CTCs)、热休克蛋白(HSP)32、HSP27在食管癌(EC)同步放化疗中动态变化及临床意义。**方法** 选取本院收治的107例EC同步放化疗患者,根据同步放化疗后肿瘤组织病理反应分为完全缓解组( $n=42$ )、非完全缓解组( $n=63$ )。比较两组外周血CTCs、HSP32、HSP27变化并分析临床意义。**结果** 随化疗进行,CTCs、HSP32、HSP27呈降低趋势,完全缓解组低于非完全缓解组,差异均有统计学意义( $P<0.05$ );化疗1、2个疗程后CTCs、HSP32、HSP27均是非完全缓解的相关因素,且化疗2个疗程后数据预测价值更高( $P<0.05$ );CTCs、HSP32、HSP27高危患者生存率低于低危患者,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。**结论** EC患者同步放化疗中外周血CTCs、HSP32、HSP27动态变化可预测同步放化疗疗效及预后转归,对指导临床个体化完善治疗方案具有重要意义。

**【关键词】** 循环肿瘤细胞;热休克蛋白;食管癌

### Dynamic changes and clinical significance of CTCs, HSP32, HSP27 in concurrent radiotherapy and chemotherapy of esophageal cancer

ZHENG Jie\*, GE Xi, MA Zhiyu

(Department of Radiotherapy, General Hospital of Wanbei Coal Power Group, Suzhou, Anhui, China, 234000)

**【ABSTRACT】** **Objective** To investigate the dynamic changes and clinical significance of circulating tumor cells (CTCs), heat shock protein (HSP) 32, and HSP27 in concurrent radiotherapy and chemotherapy of esophageal cancer (EC). **Methods** A total of 107 EC patients with concurrent radiotherapy and chemotherapy were selected. According to the pathological response of tumor tissue after concurrent radiotherapy and chemotherapy, they were divided into the complete remission group ( $n=42$ ) and the incomplete remission group ( $n=63$ ). The changes in peripheral blood CTCs, HSP32, and HSP27 of the two groups before and after treatment were compared and the clinical significance was analyzed. **Results** With the progress of chemotherapy, CTCs, HSP32, and HSP27 showed a decreasing trend, and the complete remission group was lower than that of the incomplete remission group, and the difference was statistically significant ( $P<0.05$ ). CTCs, HSP32 and HSP27 after 1 and 2 courses of chemotherapy were all related factors for incomplete remission, and the predictive value of the data after 2 courses of chemotherapy was higher ( $P<0.05$ ). The survival rate of CTCs, HSP32, HSP27 high-risk patients was lower than that of low-risk patients, and the difference was statistically significant ( $P<0.05$ ). **Conclusion** The dynamic changes of peripheral blood CTCs, HSP32 and HSP27 during concurrent radiotherapy and chemotherapy of EC patients can predict the curative effect and prognosis of concurrent radiotherapy and chemotherapy, which is of great significance for guiding the clinical individualized treatment plan.

**【KEY WORDS】** Circulating tumor cells; Heat shock protein; Esophageal cancer

基金项目:安徽省自然科学基金项目(190808MH275)

作者单位:安徽皖北煤电集团总医院放疗科,安徽,宿州 234000

\*通信作者:郑杰, E-mail: zzzj3695@126.com

食管癌(Esophageal carcinoma, EC)是临床常见、多发消化系统肿瘤疾病。目前手术是EC主要治疗方案,但其起病隐匿,多数患者确诊时已进展至中晚期丧失最佳手术时机,需采用放化疗治疗。目前胃镜下采集肿瘤组织活检是评价EC放化疗反应性“金标准”,为有创性、侵入性操作。已有研究证实,循环肿瘤细胞(Circulating tumor cells, CTCs)是恶性细胞转移重要因素之一,其恶性组织中阳性率在EC化疗后显著降低<sup>[1]</sup>。热休克蛋白(Heat shock protein, HSP)是一组在机体组织内广泛分布的高度保守蛋白,其中热休克蛋白(HSP)32、HSP27是近年新发现HSPs家族重要成员,其参与多种肿瘤疾病的发生发展及耐药等过程<sup>[2]</sup>。基于此,外周血CTCs、HSP32、HSP27在EC同步放化疗中的动态变化或可为临床完善EC同步放化疗疗效及预后病情转归评价机制提供参考。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选取2016年3月至2020年1月本院收治的107例EC同步放化疗患者资料。所有患者均完成放疗计划,并接受2个疗程的同步化疗和2个疗程的巩固化疗计划,但有2例患者治疗完成后拒绝行病理检查,可分析病例105例。胃镜下病理活检显示,42例获病理组织完全缓解,63例非完全缓解,根据同步放化疗后肿瘤组织病理反应分为完全缓解组( $n=42$ )、非完全缓解组( $n=63$ )。

纳入标准:①经病理诊断确诊<sup>[3]</sup>;②属EC晚期患者,丧失手术治疗时机;③首次确诊,且入组前未经放化疗、免疫治疗等相关治疗;④患者、家属知情理解签署同意书。排除标准:①濒死状态,不耐受放化疗者;②继发性EC;③食管穿孔者;④伴肝肾心功能严重缺陷者。本实验经伦理委员会批准。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 治疗

①化疗:紫杉醇(Hospira Australia Pty Ltd, H20150351),  $135 \text{ mg/m}^2$ , 第1 d;顺铂(江苏豪森药业集团有限公司, 国药准字H20010743),  $20 \text{ mg/m}^2$ , 第2~5 d, 静滴, 21天为1个周期。②放疗:采用医科达6MV Precise直线加速器三维适形(3D-CRT)或适形调强(IMRT)的方法对患者进行治疗。同期化疗2个疗程,巩固化疗2个疗程。

#### 1.2.2 检查

①病理学检查,放疗第4周采用胃镜辅助取病灶组织活检,根据《实体瘤疗效评价标准简介》<sup>[4]</sup>将同步放化疗后病理缓解分完全缓解(病灶完全消失,活检未见肿瘤)、非完全缓解。②CTCs检测:采用抗凝真空管抽取晨空腹肘静脉血5 mL,免疫荧光染色鉴定CTCs。③HSP32、HSP27检测:采用非抗凝真空管采集肘空腹静脉血2 mL,离心(半径10 cm, 转速3 500 r/min, 时间15 min),采集上层血清,采用上海臻科生物科技有限公司酶联免疫试剂盒测HSP32、HSP27水平。

#### 1.3 统计学处理

采用统计学软件SPSS19.0处理数据,计数资料以 $n(\%)$ 描述,采用 $\chi^2$ 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,多组间用方差分析;Logistic回归方程分析影响因素;预测效能分析采用受试者工作特征曲线(ROC);卡普兰-迈耶曲线(KM)分析生存率,进行Log-Rank检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

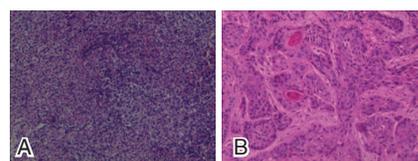
## 2 结果

### 2.1 一般资料

两组性别、年龄、体质量指数、饮食习惯、放疗模式、治疗前卡氏评分(KPS评分)、病灶位置一般资料比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。见表1。

### 2.2 CTCs、HSP32、HSP27动态变化

完全缓解组化疗1、2个疗程后,CTCs、HSP32、HSP27低于非完全缓解组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );不同时间点比较,两组化疗1、2个疗程CTCs、HSP32、HSP27均呈降低趋势,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表2、图1。



注:A为完全缓解;B为部分缓解。

图1 不同疗效患者的病理检查结果(SP,  $\times 100$ )

Figure 1 Pathological examination results of patients with different curative effects (SP,  $\times 100$ )

### 2.3 非完全缓解影响因素分析

Logistic结果显示,化疗1、2个疗程后CTCs、HSP32、HSP27均是非完全缓解的相关影响因素( $P < 0.05$ )。见表3。

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

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

一般资料	完全缓解组(n=42)	非完全缓解组(n=63)	t/ $\chi^2$ 值	P值	
年龄	54.67±6.44	53.71±5.89	0.788	0.432	
性别	男	26(61.90)	38(60.32)	0.027	0.870
	女	16(38.10)	25(39.68)		
体质量指数年龄	19.68±1.01	20.03±1.02	1.729	0.087	
饮食习惯	素食	8(19.05)	12(19.05)	0.032	0.984
	肉食	16(38.10)	23(36.51)		
	均衡	18(42.82)	28(44.44)		
放疗模式	三维适形放疗	16(38.10)	24(38.10)	0.000	1.000
	调强放疗	26(61.90)	39(61.90)		
治疗前 KPS 评分	功能状态	71.35±3.54	72.61±3.72	1.733	0.086
	体力状态	83.46±4.15	84.67±3.79	1.543	0.126
病灶位置	上胸段	11(26.19)	16(25.40)	0.031	0.985
	中胸段	19(45.24)	28(44.44)		
	下胸段	12(28.57)	19(30.16)		

表2 两组 CTCs、HSP32、HSP27 动态变化 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Dynamic changes of CTCs, HSP32 and HSP27 of the two groups ( $\bar{x} \pm s$ )

指标	组别	n	治疗前	化疗1个疗程后	化疗2个疗程后
CTCs	完全缓解组	42	11.03±3.07	4.55±1.72 <sup>a</sup>	3.04±1.24 <sup>ab</sup>
	非完全缓解组	63	10.86±2.59	6.89±2.36 <sup>a</sup>	5.59±2.05 <sup>ab</sup>
	t值		0.306	5.519	7.222
	P值		0.760	<0.001	<0.001
HSP32(ng/mL)	完全缓解组	42	56.89±11.68	43.06±5.18 <sup>a</sup>	40.35±6.25 <sup>ab</sup>
	非完全缓解组	63	54.97±10.32	50.15±4.99 <sup>a</sup>	48.24±5.07 <sup>ab</sup>
	t值		0.886	7.025	7.111
	P值		0.378	<0.001	<0.001
HSP27(ng/mL)	完全缓解组	42	65.49±10.36	53.64±7.11 <sup>a</sup>	51.66±4.97 <sup>ab</sup>
	非完全缓解组	63	63.89±12.04	58.65±6.32 <sup>a</sup>	57.03±5.02 <sup>ab</sup>
	t值		0.705	3.784	5.391
	P值		0.483	<0.001	<0.001

注:与同组化疗前对比,<sup>a</sup>P<0.05;与同组化疗1个疗程后对比,<sup>b</sup>P<0.05。

表3 非完全缓解影响因素分析

Table 3 Logistic regression equation analysis of factors affecting incomplete remission

影响因素	$\beta$ 值	SE值	Wald $\chi^2$ 值	OR值	95%CI	P值	
化疗1个疗程后	CTCs	0.961	0.225	18.257	2.615	2.361~2.897	<0.001
	HSP32	0.393	0.115	11.680	1.481	1.168~1.879	<0.001
	HSP27	0.357	0.123	8.422	1.429	1.204~1.696	<0.001
化疗2个疗程后	CTCs	0.973	0.207	22.091	2.646	2.402~2.914	<0.001
	HSP32	0.724	0.214	11.437	2.062	1.598~2.661	<0.001
	HSP27	0.580	0.187	9.633	1.787	1.614~1.978	<0.001

2.4 预测非完全缓解的 ROC

以非完全缓解为阳性样本,以完全缓解为阴性样本,进行ROC分析,获取不同时间点各指标预测非完全缓解的ROC曲线显示,各指标化疗2个疗程后的AUC大于化疗1个疗程;化疗2个疗程后预测非完全缓解的AUC从大到小依次为CTCs、HSP27、HSP32。见图2、表4。

2.5 6个月生存率

由于化疗2个疗程后各指标预测非完全缓解

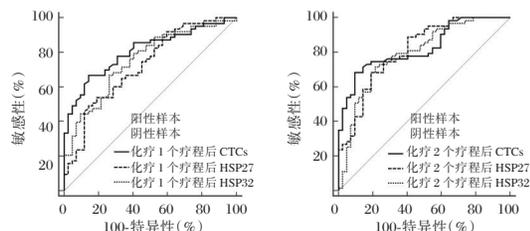


图2 预测非完全缓解的 ROC

Figure 2 ROC predicted by CTCs, HSP32, and HSP27 for incomplete remission

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	
化疗1个疗程后	CTCs	0.808	0.720~0.878	>6.78	66.67	85.71	<0.001
	HSP32	0.753	0.629~0.807	>48.3 ng/mL	66.67	73.81	<0.001
	HSP27	0.724	0.629~0.807	>58.98 ng/mL	53.970	80.95	<0.001
化疗2个疗程后	CTCs	0.826	0.739~0.893	>4.51	68.25	90.48	<0.001
	HSP32	0.793	0.703~0.866	>43.9 ng/mL	71.43	78.57	<0.001
	HSP27	0.810	0.722~0.880	>55.38 ng/mL	68.25	80.95	<0.001

的 AUC 大于各指标化疗 1 个疗程,故采用化疗 2 个疗程 ROC 分析的 cut-off 值作为分界点,将患者分为 CTCs 高危(>4.51)和低危(≤4.51)、HSP32 高危(>43.9 ng/mL)和低危(≤43.9 ng/mL)、HSP27 高危(>55.38 ng/mL)和低危(≤55.38 ng/mL),随访 6 个月,失访 2 例,采用 K-M 曲线分析,结果显示,CTCs、HSP32、HSP27 高危患者生存率低于低危患者( $\chi^2=10.654、5.277、12.725, P$  均<0.05)。见图 3。

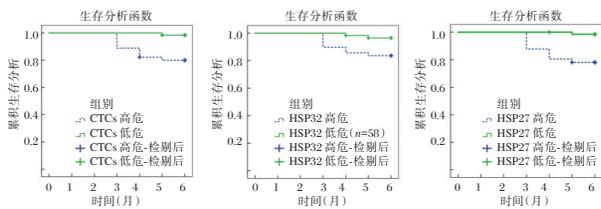


图3 患者6个月生存率

Figure 3 6-month survival rate of CTCs, HSP32, HSP27 high-risk and low-risk patients

### 3 讨论

数据显示,全球每年有近 30 万人病死于 EC,而我国属 EC 高发国之一,每年平均病死人数近 15 万<sup>[5-6]</sup>。随医疗技术进步,晚期 EC 患者经放化疗治疗的疗效得到不断提升,但如何动态评价疗效以指导临床个体化完善治疗方案,仍是当前急需解决问题之一。

胃镜下肿瘤组织活检是临床诊断、评估疗效的“金标准”。有学者对新辅助放疗后 EC 组织病理特征进行研究,根据病理反应分轻、中、重度,病理反应越重,患者预后越好,反之越差<sup>[7]</sup>。EC 患者经同步放化疗后胃镜下病理活检可良好显示治疗效果,但有 2 例患者因担心胃镜下病理活检有创性及介入性可能影响病情康复而拒绝接受病理检查,客观说明此方法存在一定局限性。外周血生化指标检测具有操作简单、安全性高、可重复性强等优势被临床广泛应用于各种的疾病的诊断及预后评估等层面。CTCs 是临床评估恶性肿瘤复发

转移风险及预后的常用外周血指标,但正常情况下外周血内恶性细胞数量极少,不易检测,目前尚缺乏 CTCs 标准检测方法,其中细胞计数法、核酸检测法是 CTCs 主要检测方法,前者主要借助流式细胞术及免疫细胞化学技术,后者包含逆转录聚合酶链式反应及聚合酶链反应技术<sup>[8]</sup>。核酸检测法无法观察细胞形态学,且取样时污染、假基因影响等可出现假阳性,有学者研究提出,与此技术对比,细胞学免疫富集法既能有效分离恶性细胞,又能满足临床对细胞表型分析要求<sup>[9]</sup>。本研究外周血 CTCs 检测结果符合放化疗杀灭恶性细胞的特征,主要是因化疗具有放疗增敏作用,放化疗能提升对原发灶局部控,同时化疗可直接杀灭部分 CTCs。

此外,肿瘤患者外周血 CTCs 含量及预后与其侵袭转移活性有关,而 HSPs 家族与恶性肿瘤发生发展、侵袭转移活性关系密切<sup>[10-11]</sup>。HSP32 已被临床证实,在 EC 组织中高表达,且表达程度与肿瘤淋巴结转移呈正相关<sup>[12]</sup>。本研究结果与此近似,EC 患者血清 HSP32 普遍升高,完全缓解组显著降低,其水平变化可能与病情有关。相关研究显示,HSP27 水平升高与肝癌细胞、乳腺癌细胞等侵袭、转移活性呈正相关,与大肠癌等侵袭、转移活性呈负相关<sup>[13]</sup>。但 HSP27 在 EC 中机制不明,学者彭辉等<sup>[14]</sup>发现,在低分化食管腺癌组织中 HSP27 高表达,促进恶性细胞侵袭;而学者饶翔等<sup>[15]</sup>研究中,HSP27 高表达与恶性细胞浸润深度呈负相关。本研究 EC 患者血清 HSP27 水平随治疗进行呈降低趋势,分析与部分研究不一致原因可能与所选病例分期不同有关。CTCs、HSP32、HSP27 高危患者生存率低于低危患者,说明 CTCs、HSP32、HSP27 同时或可应用于 EC 同步放化疗患者的预后评估。

综上所述,EC 患者外周血 CTCs、HSP32、HSP27 在同步放化疗后显著降低,且完全缓解及预后较好患者降低更显著,此结果对指导临床个体化完善治疗方案具有重要意义。(下转第 614 页)

## 腹腔镜肝癌切除术标本 BNIP-3、EpCAM、FNDC5 在术后复发中的预测价值

田国标\* 陈晓波 张建国

**[摘要]** **目的** 探讨腹腔镜肝癌切除术标本 B 细胞淋巴瘤/白血病-2 和腺病毒 E1B19 000 相互作用蛋白 3 (BNIP-3)、上皮细胞黏附分子 (EpCAM)、Ⅲ 型纤连蛋白结构域 5 (FNDC5) 在术后复发中的预测价值。**方法** 选取 2017 年 1 月至 2020 年 3 月本院收治的 122 例腹腔镜肝癌切除术患者, 根据术后 6 个月复发情况分为复发组 ( $n=18$ )、未复发组 ( $n=104$ ), 比较癌组织和癌旁组织 BNIP-3 mRNA、EpCAM mRNA、FNDC5 mRNA, 并比较复发组、未复发组癌组织 BNIP-3 mRNA、EpCAM mRNA、FNDC5 mRNA, 采用非条件 Logistic 回归方程分析术后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 BNIP-3 mRNA、EpCAM mRNA、FNDC5 mRNA 预测术后复发的价值。**结果** 癌组织标本 BNIP-3 mRNA 较癌旁组织显著降低, EpCAM mRNA、FNDC5 mRNA 较癌旁组织显著升高, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ); 复发组与未复发组肝癌家族史比较, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ); 复发组 BNIP-3 mRNA 较未复发组显著降低 ( $P<0.05$ ), EpCAM mRNA、FNDC5 mRNA 较未复发组显著升高, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ); 有肝癌家族史者术后复发的风险可能是无肝癌家族史者的 1.173 倍, BNIP-3 mRNA、EpCAM mRNA、FNDC5 mRNA 高于均值者术后复发的风险分别是低于均值者的 0.222、1.103、3.627 倍 ( $P<0.05$ ); BNIP-3 mRNA、EpCAM mRNA、FNDC5 mRNA 预测术后复发的 AUC 分别为 0.823、0.775、0.845, BNIP-3 mRNA 联合 FNDC5 mRNA 的 AUC 为 0.954 ( $P<0.05$ )。**结论** 标本 BNIP-3 mRNA、EpCAM mRNA、FNDC5 mRNA 可作为腹腔镜肝癌切除术后复发的分子标志物, 为临床提供重要的参考信息。

**[关键词]** BNIP-3 mRNA; EpCAM mRNA; FNDC5 mRNA; 术后复发

### The predictive value of BNIP-3, EpCAM, FNDC5 of laparoscopic liver cancer resection specimens in postoperative recurrence

TIAN Guobiao\*, CHEN Xiaobo, ZHANG Jianguo

(General Surgery, Pinggu Hospital, Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, Beijing, China, 101200)

**[ABSTRACT]** **Objective** To evaluate possibility of using the B cell lymphoma/leukemia-2 and adenovirus E1B19 000 interacting protein 3 (BNIP-3), epithelial cell adhesion molecule (EpCAM), fibronectin type III domain-containing protein 5 (FNDC5) in laparoscopic hepatectomy specimens for the prediction of postoperative recurrence. **Methods** We selected 122 patients undergoing laparoscopic liver cancer resection in our hospital from January 2017 to March 2020 and divided them into a recurrence group ( $n=18$ ) and a non-recurrence group ( $n=104$ ) according to their recurrence at 6 months after surgery. Comparison of BNIP-3 mRNA, EpCAM mRNA, FNDC5 mRNA in cancer tissues and adjacent tissues, and comparison of BNIP-3 mRNA, EpCAM mRNA, FNDC5 mRNA in cancer tissues of recurrence group and non-recurring group, Unconditional Logistic regression equation was used to analyze the related factors of postoperative recurrence. Receiver operating characteristic curve (ROC) and area under ROC (AUC) were used to analyze the value of BNIP-3 mRNA, Ep-

基金名称:首都医学发展科研基金联合攻关项目(17-02-12)

作者单位:首都医科大学附属北京友谊医院平谷医院普外科,北京 101200

\*通信作者:田国标, E-mail:ttw77123@163.com

*CAM* mRNA and *FNDC5* mRNA in predicting postoperative recurrence. **Results** The mRNA levels of *BNIP-3* in cancer tissues were significantly lower than those in paracancerous tissues, while the mRNA levels of *EpCAM* and *FNDC5* were significantly higher than those in paracancerous tissues ( $P<0.05$ ). The difference in family history of liver cancer between the recurrence group and the non-recurrence group was statistically significant ( $P<0.05$ ). *BNIP-3* mRNA in the recurrence group was significantly lower than that in the non-recurrence group, while *EpCAM* mRNA and *FNDC5* mRNA in recurrence group were significantly higher than those in the non-recurrence group ( $P<0.05$ ). The risk of postoperative recurrence in patients with family history of HCC was 1.173 times higher than that in patients without family history of HCC. The risk of postoperative recurrence in patients with *BNIP-3* mRNA, *EpCAM* mRNA and *FNDC5* mRNA higher than the average was 0.222, 1.103 and 3.627 times lower than that in patients with family history of HCC ( $P<0.05$ ). The AUCs of *BNIP-3* mRNA, *EpCAM* mRNA and *FNDC5* mRNA in predicting postoperative recurrence were 0.823, 0.775 and 0.845, The AUC of *BNIP-3* mRNA combined with *FNDC5* mRNA was 0.954 ( $P<0.05$ ). **Conclusion** *BNIP-3* mRNA, *EpCAM* mRNA and *FNDC5* mRNA can be used as molecular markers for recurrence after laparoscopic hepatectomy, providing important clinical reference information.

**[KEY WORDS]** *BNIP-3* mRNA; *EpCAM* mRNA; *FNDC5* mRNA; Postoperative recurrence

腹腔镜肝癌切除术具有创伤小的特点,是治疗肝癌的重要方法之一,对改善患者生存期具有积极作用,但术后复发可导致不良预后,因此探寻预测术后复发的标志物,对及早甄别术后复发高危人群,并制定相关干预措施具有重要的指导意义。B细胞淋巴瘤/白血病-2和腺病毒E1B19 000相互作用蛋白3(B cell lymphoma/leukemia-2 and adenovirus E1B19 000 interacting protein 3, *BNIP-3*)主要分布于内质网和线粒体,与肝癌病理分期有关<sup>[1]</sup>。上皮细胞黏附分子(Epithelial cell adhesion molecule, *EpCAM*)主要表达于部分正常上皮细胞和大多恶性上皮细胞表面,与胃癌等恶性肿瘤的侵袭性有关,且*EpCAM*蛋白高表达肝癌患者与低表达者相比,肝移植术后5年生存率显著降低,与肝癌肝移植患者肿瘤复发有关,但是否与腹腔镜肝癌切除术后复发相关仍有待探讨<sup>[2-3]</sup>。Ⅲ型纤连蛋白结构域5(Fibronectin type Ⅲ domain-containing protein 5, *FNDC5*)与碳水化合物和脂质代谢有关,在胰腺癌组织中表达显著高于癌旁组织,与临床分期、淋巴结转移等病理特征有关<sup>[4]</sup>。本研究探讨腹腔镜肝癌切除术标本*BNIP-3* mRNA、*EpCAM* mRNA、*FNDC5* mRNA在术后复发中的预测价值,报告如下。

## 1 对象和方法

### 1.1 研究对象

选取2017年1月至2020年3月本院收治的122例腹腔镜肝癌切除术患者,其中临床分期Ⅰ期59例,Ⅱ期63例,Child分级A级109例,B级13

例。根据术后6个月复发情况分为复发组( $n=18$ )、未复发组( $n=104$ ),并取癌旁3 cm组织作为癌旁组。

纳入标准:①符合原发性肝癌诊断标准<sup>[5]</sup>;②行腹腔镜肝癌切除术者;③入组前无肝癌相关治疗史;④无转移肿瘤。排除标准:①凝血功能障碍者;②门静脉有癌栓者;③麻醉禁忌症者;④腹水、黄疸、白蛋白/球蛋白比值倒置者;⑤肿瘤边缘达第一、二或第三肝门者;⑥既往有肝脏手术史者。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 治疗与复发

入组患者均行腹腔镜肝癌切除术治疗,术前统计患者年龄、性别、体质量指数、饮酒史、吸烟史、肝癌家族史、Child分级、肿瘤直径、血清丙氨酸氨基转移酶(Alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸转氨酶(Aspartate aminotransferase, AST)、总胆红素(Total bilirubin, TBil)、临床分期、合并疾病资料,术后门诊定期复查随访,每3个月复查一次肝功能、肝脏超声及血清甲胎蛋白,发现异常者进一步行增强CT或肝脏超声造影检查,一旦发现复发即为终点,未复发者继续随访至术后6个月。

#### 1.2.2 各指标检测

取术中切除的肝癌组织、癌旁组织,采用实时荧光定量聚合酶链式反应(Polymerase chain reaction, PCR)检测*BNIP-3* mRNA、*EpCAM* mRNA、*FNDC5* mRNA表达,检测基因相对表达量 $=2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。

#### 1.3 观察指标

①比较癌组织、癌旁组织标本*BNIP-3* mRNA、*EpCAM* mRNA、*FNDC5* mRNA表达。②比较复发

组、未复发组年龄、性别、体质量指数、饮酒史、吸烟史、肝癌家族史、Child 分级、肿瘤直径、ALT、AST、TBil、临床分期、合并疾病分布。③比较复发组、未复发组癌组织 *BNIP-3* mRNA、*EpCAM* mRNA、*FNDC5* mRNA 表达。④分析术后复发的相关影响因素。⑤分析 *BNIP-3* mRNA、*EpCAM* mRNA、*FNDC5* mRNA 预测术后复发的价值。

### 1.4 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件处理数据, 计量资料以 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 两组间比较采用独立样本 *t* 检验, 计数资料用 *n*(%) 表示, 用  $\chi^2$  检验, 采用非条件 Logistic 回归方程分析术后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 *BNIP-3* mRNA、*EpCAM* mRNA、*FNDC5* mRNA 预测术后复发的价值。P<0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 不同组织标本 *BNIP-3* mRNA、*EpCAM* mRNA 比较

癌组织标本 *BNIP-3* mRNA 较癌旁组织 (P<0.05), *EpCAM* mRNA、*FNDC5* mRNA 较癌旁组织升高, 差异均有统计学意义 (P<0.05)。见表 1。

表 1 不同组织标本 *BNIP-3* mRNA、*EpCAM* mRNA、*FNDC5* mRNA 比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Comparison of *BNIP-3* mRNA, *EpCAM* mRNA and *FNDC5* mRNA in different tissue specimens ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	<i>BNIP-3</i> mRNA	<i>EpCAM</i> mRNA	<i>FNDC5</i> mRNA
癌组织	122	1.03±0.45	4.55±1.26	21.16±6.77
癌旁组织	122	2.16±0.57	1.72±0.83	5.15±1.04
<i>t</i> 值		17.187	20.717	25.818
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001

### 2.2 两组临床资料比较

组间年龄、性别、体质量指数、饮酒史、吸烟史、Child 分级、肿瘤直径、ALT、AST、TBil、临床分期、合并疾病比较, 差异无统计学意义 (P>0.05); 复发组与未复发组肝癌家族史比较, 差异有统计学意义 (P<0.05)。见表 2。

### 2.3 两组癌组织 *BNIP-3* mRNA、*EpCAM* mRNA、*FNDC5* mRNA 比较

复发组 *BNIP-3* mRNA 较未复发组显著降低, *EpCAM* mRNA、*FNDC5* mRNA 较未复发组显著升高, 差异有统计学意义 (P<0.05)。见表 3。

表 2 两组临床资料对比 [*n*(%), ( $\bar{x} \pm s$ )]

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

资料	复发组 (n=18)	未复发组 (n=104)	<i>t</i> / $\chi^2$ 值	<i>P</i> 值
年龄(岁)	52.44±11.15	50.87±9.89	0.610	0.543
性别(男/女)	11/7	68/36	0.123	0.726
体质量指数(kg/m <sup>2</sup> )	24.18±1.97	23.86±2.14	0.592	0.555
饮酒史	14(77.78)	90(86.54)	0.369	0.543
吸烟史	10(55.56)	64(61.54)	0.230	0.631
肝癌家族史	4(22.22)	5(4.81)	4.500	0.034
Child 分级				
A	15(83.33)	94(90.38)	0.232	0.630
B	3(16.67)	10(9.62)		
肿瘤直径				
<5 cm	13(72.22)	85(81.73)	0.379	0.538
5~8 cm	5(27.78)	19(18.27)		
肝功能				
ALT(IU/L)	51.77±12.68	47.63±13.52	1.210	0.229
AST(IU/L)	52.68±15.14	48.91±16.44	0.908	0.366
TBil(μmol/L)	18.98±5.23	16.52±6.79	1.462	0.146
临床分期				
I	8(44.44)	51(49.04)	0.130	0.719
II	10(55.56)	53(50.96)		
合并疾病				
高脂血症	2(11.11)	12(11.54)	0.121	0.728
糖尿病	2(11.11)	3(2.88)	0.964	0.326
心脏病	1(5.56)	3(2.88)	0.017	0.897
高血压	1(5.56)	15(14.42)	0.424	0.515

表 3 两组癌组织 *BNIP-3* mRNA、*EpCAM* mRNA、*FNDC5* mRNA 比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 3 Comparison of *BNIP-3* mRNA, *EpCAM* mRNA and *FNDC5* mRNA in cancer tissues between 2 groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	<i>BNIP-3</i> mRNA	<i>EpCAM</i> mRNA	<i>FNDC5</i> mRNA
复发组	18	0.52±0.21	5.46±1.17	29.15±6.37
未复发组	104	1.12±0.59	4.39±1.05	19.78±5.16
<i>t</i> 值		4.256	3.925	6.863
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001

### 2.4 术后复发影响因素的 Logistic 回归方程分析

以术后复发情况为因变量, 0=未复发, 1=复发; 纳入肝癌家族史、*BNIP-3* mRNA、*EpCAM* mRNA、*FNDC5* mRNA 作为自变量, 将连续变量以两组均值为分界进行分层和赋值, 应用逐步回归分析策略, 结果显示, 有肝癌家族史者术后复发的风险可能是无肝癌家族史者的 1.173 倍, *BNIP-3* mRNA、*EpCAM* mRNA、*FNDC5* mRNA 高于均值者术后复发的风险分别是低于均值者的 0.222、1.103、3.627 倍 (P<0.05)。见表 4。

### 2.5 *BNIP-3* mRNA、*EpCAM* mRNA、*FNDC5* mRNA 预测术后复发的 ROC

ROC 曲线结果显示, *BNIP-3* mRNA 敏感度最

表4 术后复发影响因素的Logistic回归方程分析  
Table 4 Logistic regression equation analysis of influencing factors of postoperative recurrence

影响因素	赋值	β值	SE值	Wald χ <sup>2</sup>	OR值	95%CI	P值
肝癌家族史							
无	0				1.000		
有	1	0.159	0.046	11.969	1.173	1.036~1.327	<0.05
<i>BNIP-3</i> mRNA							
≤1.03	1				1.000		
>1.03	2	-1.507	0.405	13.840	0.222	0.154~0.319	<0.05
<i>EpCAM</i> mRNA							
≤4.55	1				1.000		
>4.55	2	0.098	0.031	9.947	1.103	1.015~1.198	<0.05
<i>FNDC5</i> mRNA							
≤21.16	1				1.000		
>21.16	2	1.288	0.355	13.173	3.627	2.819~4.667	<0.05

高, *FNDC5* mRNA 特异度最高, *BNIP-3* mRNA 联合 *FNDC5* mRNA 预测术后复发的 AUC 为 0.954。见图 1、表 5。

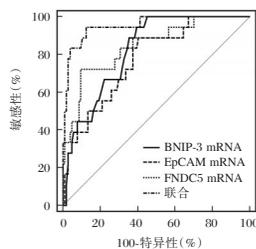


图1 *BNIP-3* mRNA、*EpCAM* mRNA、*FNDC5* mRNA 预测术后复发的 ROC

Figure 1 The ROC of postoperative recurrence predicted by *BNIP-3* mRNA, *EpCAM* mRNA and *FNDC5* mRNA

### 3 讨论

*BNIP-3* 属于 Bcl-2 家族蛋白中 BH3-only 亚家族, 具有 TM 跨膜结构区和 BH3 结构域, 对细胞生存具有多途径的调控作用<sup>[6]</sup>。本研究显示, 与癌旁组织相比, 癌组织 *BNIP-3* mRNA 显著降低, 与肝癌有关。且复发患者 *BNIP-3* mRNA 较未复发者低, 具有预测术后复发标志物的潜质。*BNIP-3* 可通过 BH3 结构域与抗凋亡蛋白形成异二聚体, 抑制抗凋亡蛋白的抗凋亡功能, 从而介导细胞凋亡, 且 *BNIP-3* 的 BH3

结构域还能与抗凋亡蛋白形成异二聚体, 变构激活促凋亡蛋白表达, 并起到促进凋亡作用<sup>[7-8]</sup>。*BNIP-3* mRNA 高于均值者术后复发的风险是低于均值者的 0.222 倍, 呈现出保护因子效应。可见 *BNIP-3* mRNA 表达降低者肿瘤细胞凋亡被抑制, 肿瘤细胞恶性生物学行为更强, 当 *BNIP-3* mRNA ≤ 0.93 时, 临床应警惕患者腹腔镜肝癌切除术后复发的发生, 及早制定应对措施, 最大程度改善患者预后。

近年来随着肿瘤干细胞学说的提出, 越来越多报道指出肝癌是一种肿瘤干细胞相关性疾病<sup>[9]</sup>。*EpCAM* mRNA 定位于人染色体 4q GA733-2, 可编码为上皮细胞 I 型跨膜糖蛋白, 具有表皮细胞黏附分子功能, 是肿瘤干细胞的一种标志物<sup>[10]</sup>。陈明等<sup>[11]</sup>报道, 早期肝癌术后未复发患者 *EpCAM* 蛋白阳性率显著低于复发患者, 与本研究结论相似, 不同的是, 本研究是从基因水平检测的, 但均表明 *EpCAM* 与肝癌术后复发的有关。因此检测标本 *EpCAM* mRNA 表达, 可预测腹腔镜肝癌切除术后复发的风险, 为临床提供重要的参。

*FNDC5* mRNA 是新发现的一种因子, 是过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$  辅激活因子的靶蛋白之一, 可将白色脂肪转化为棕色脂肪, 调控慢性代谢疾病的发生<sup>[12]</sup>。唐楠等<sup>[13]</sup>报道, 发生脉管侵犯的肝癌组织中 *FNDC5* mRNA 表达显著高于无脉管侵犯者, 与肝癌细胞侵袭性有关, 本研究观点与之相似, 佐证了 *FNDC5* mRNA 的促癌作用。但张学玲<sup>[14]</sup>的研究显示, 乳腺癌患者癌组织 *FNDC5* 蛋白表达低于癌旁组织和良性疾病者, 本研究数据变化趋势与之不同, 其原因一方面可能是, *FNDC5* mRNA 存在组织特异性, 在不同肿瘤中表达存在差异, 与不同的受体结合或作用于下游不同靶基因, 可产生不同的作用; 另一方面, 肝癌属于消化系统肿瘤, *FNDC5* mRNA 的受体相对缺乏, 从而导致 *FNDC5* mRNA 水平升高。本研究显示, *BNIP-3* mRNA、*EpCAM* mRNA、*FNDC5* mRNA 不仅能避免主观性, 还能为临床提供量化的参考信息。遗憾的

表5 ROC分析结果  
Table 5 ROC analysis results

指标	AUC	95%CI	cut-off 值	敏感度 (%)	特异度 (%)	P 值
<i>BNIP-3</i> mRNA	0.823	0.743~0.886	≤0.93	94.44	60.58	<0.001
<i>EpCAM</i> mRNA	0.775	0.691~0.846	>4.19	88.89	59.62	<0.001
<i>FNDC5</i> mRNA	0.845	0.768~0.904	>26.97	72.22	90.38	<0.001
<i>BNIP-3</i> mRNA 联合 <i>FNDC5</i> mRNA	0.954	0.900~0.984		94.44	91.50	<0.001

是,本研究观点较为新颖,缺乏更多相似报道的论证,这一推测可靠性仍有待后续研究的进一步探讨。另从本研究结果可知,*BNIP-3* mRNA、*EpCAM* mRNA、*FNDC5* mRNA 均与术后复发有关,但三者之间是否有关系及是否协同参与了术后复发的发生尚不明确,有待后续的探讨观察。

综上,标本 *BNIP-3* mRNA、*EpCAM* mRNA、*FNDC5* mRNA 可作为腹腔镜肝癌切除术后复发的分子标志物,为临床提供重要的参考信息。

### 参考文献

- [1] 邱延松,辛磊,王磊,等. 腺病毒结合蛋白3在肝细胞癌中的表达与缺氧及临床预后的相关性[J]. 中华实验外科杂志, 2020,37(7):1297-1299.
- [2] 贾长河,谢毅,宋晓霞,等. 上皮细胞黏附分子和紧密连接蛋白在胃癌中的表达及临床意义[J]. 中华老年医学杂志, 2019,38(6):649-653.
- [3] 禹琛,毛雨鸽,程倩,等. 肿瘤干细胞标志物 EpCAM 在肝癌肝移植患者中的表达及其与肿瘤复发转移的关系[J]. 中华普通外科杂志, 2018,33(1):61-64.
- [4] 肖怀腾,张德国,周顺昌,等. FNDC5/Irisin 在胰腺癌中的表达及其与临床病理特征的关系[J]. 中华肝胆外科杂志, 2019,25(12):921-924.
- [5] 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.
- [6] Barut O, Karakeçi A, Ozan T, et al. The role of apoptosis and the effect of epidermal growth factor on proapoptotic BNIP 3 in an experimental rat priapism model [J]. Turk J Med Sci, 2018,48(1):191-195.
- [7] 李永刚. 胃癌组织中自噬相关蛋白 FUNDC1 和 BNIP3 表达的临床意义[D]. 兰州:兰州大学, 2019:8-19.
- [8] 李芳芳,陈莉,张先娟,等. microRNA-182-5p 靶向 BNIP3 抑制卵巢癌细胞增殖和迁移的研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2020,36(7):792-795.
- [9] 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.
- [10] Yang J, Isaji T, Zhang G, et al. EpCAM associates with integrin and regulates cell adhesion in cancer cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2020,522(4):903-909.
- [11] 陈明,王旭林,邢人伟,等. 早期肝癌患者细胞免疫功能、血清 VEGF 表达及 CTC 微转移与术后复发的相关性[J]. 重庆医学, 2020,49(3):356-359+364.
- [12] Christodoulatos GS, Spyrou N, Kadillari J, et al. The Role of Adipokines in Breast Cancer: Current Evidence and Perspectives [J]. Curr Obes Rep, 2019,8(4):413-433.
- [13] 唐楠,黄飞,张德国,等. 鸢尾素 FNDC5 在肝癌组织中的表达及与肿瘤侵袭的关系[J]. 中华普通外科杂志, 2020,35(2):146-149.
- [14] 张学玲. 乳腺癌患者鸢尾素表达水平及其临床意义的初步研究[D]. 青岛:青岛大学, 2019:3-14.

(上接第 609 页)

### 参考文献

- [1] 刘珂,徐成胜,张余飞. 晚期食管癌放疗中循环肿瘤细胞的临床意义[J]. 热带医学杂志, 2018,18(12):1585-1589.
- [2] Romanucci M, Massimini M, Ciccarelli A, et al. HSP32 and HSP90 Immunoreactivity, in Relation to Kit Pattern, Grading, and Mitotic Count in Canine Cutaneous Mast Cell Tumors [J]. Vet Pathol, 2017,54(2):222-225.
- [3] 中国肿瘤科相关专家小组(统称). 安徽省食管癌分级诊疗指南(2016版)[J]. 安徽医学, 2018,39(1):5-20.
- [4] 张百红,岳红云. 实体瘤疗效评价标准简介[J]. 国际肿瘤学杂志, 2016,43(11):845-847.
- [5] 顾秀英,郑荣寿,夏长发,等. 中国预期寿命与癌症发病率和死亡率的相互影响:基于人群的聚类分析[J]. 癌症, 2019,38(1):26-41.
- [6] Middleton DR S, Bouaoun L, Hanisch R, et al. Esophageal cancer male to female incidence ratios in Africa: A systematic review and meta-analysis of geographic, time and age trends [J]. Cancer Epidemiol, 2018,53(1):119-128.
- [7] 谭黎杰,林栋. 食管癌新辅助治疗时代关于病理反应预测与食管保留策略的思考[J]. 中华消化外科杂志, 2019,18(6):528-531.
- [8] 陈威鹏,李印,袁东风,等. 食管鳞癌外周循环肿瘤细胞与临床病理特征的关系[J]. 中华实验外科杂志, 2019,36(3):546-549.
- [9] 孙力超,杨婧,孙立新,等. 采用肝癌球体细胞筛选鉴定识别肝癌干细胞的单抗[J]. 实用肿瘤学杂志, 2019,33(3):193-199.
- [10] 宋正凯,范加社,邵强,等. 食管鳞癌患者术前循环肿瘤细胞与临床病理的关系[J]. 中国肿瘤临床与康复, 2018,25(11):1284-1287.
- [11] 于洋,薛莹,仓顺东. 热休克蛋白 A2、IGFBP? 2 在胰腺癌患者的表达及与临床病理特征相关性[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020,12(3):371-375.
- [12] 杨蕾. 热休克蛋白 HSP32、HSP27 在食管鳞癌转移中作用的研究[D]. 西安:第四军医大学, 2015:1-83.
- [13] Wang J, Wang G, Cheng D, et al. Her2 promotes early dissemination of breast cancer by suppressing the p38 - MK2 - Hsp27 pathway that is targetable by Wip1 inhibition [J]. Oncogene, 2020,39(40):6313-6326.
- [14] 彭辉,张潇,刘涛,等. 食管鳞状细胞癌组织中 HSP27 蛋白表达与患者临床病理参数相关性研究[J]. 新疆医科大学学报, 2019,42(4):443-445.
- [15] 饶翔,杨丞. 鼻咽癌组织 HSP27 与  $\beta$ -catenin 及 Vimentin 表达相关性研究[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2017,24(3):183-187.

# 胃癌患者血清 p53、PDCD-5、survivin 表达水平及其联合应用的价值

符白玉\* 林怡 徐琪 张杰伟

**[摘要]** **目的** 探讨胃癌患者血清 p53、程序性细胞死亡分子-5(PDCD-5)、细胞凋亡抑制蛋白存活素(survivin)表达水平及其联合应用的价值。**方法** 选择2012年9月到2015年9月在本院被确诊的108例胃癌患者,收集同期同年龄阶段健康体检者的54例血清样本作为对照组。分析胃癌患者的一般资料,包括年龄、性别、TNM分期、肿瘤大小、肿瘤分化程度、肿瘤浸润深度以及有无淋巴结转移;采用ELISA检测血清样品中 p53、PDCD-5 和 survivin 表达水平;治疗后随访患者的生存时间;采用单因素生存分析 Kaplan-Meier 绘制生存曲线。**结果** 与对照组相比,胃癌患者血清中 PDCD-5 的表达水平显著下降 ( $P<0.05$ ), p53 和 survivin 的表达水平显著升高 ( $P<0.05$ );胃癌组患者血清 p53、PDCD-5 和 survivin 的表达水平与肿瘤直径、分化程度、浸润深度、TNM 分期以及是否合并淋巴结转移有关 ( $P<0.05$ );生存分析显示,胃癌患者血清中 p53、survivin 高表达患者3年总生存率和无病生存率显著低于 p53、survivin 低表达患者 ( $P<0.05$ );PDCD-5、survivin 高表达患者3年总生存率和无病生存率显著高于 PDCD-5、survivin 低表达患者 ( $P<0.05$ )。**结论** 胃癌患者血清 p53、survivin 低表达且 PDCD-5 高表达可以提高其3年总生存率和无病生存率,临床有望作为其预后标识物。

**[关键词]** 胃癌; p53; 程序性细胞死亡分子-5; 细胞凋亡抑制蛋白存活素

## Application value of combined detection of serum p53, PDCD-5 and survivin in gastric cancer

FU Baiyu\*, LIN Yi, XU Qi, ZHANG Jiewei

(Department of Gastroenterology, First Affiliated Hospital of Hainan Medical College, Haikou, Hainan, China, 570102)

**[ABSTRACT]** **Objective** To explore the expression levels of serum p53, programmed cell death molecule-5 (PDCD-5) and survivin and their combined application value in patients with gastric cancer. **Methods** A total of 108 patients with gastric cancer who were diagnosed in our hospital from September 2012 to September 2015 were selected. Serum samples of 54 healthy examiners of the same age group at the same time were collected as the control group. The general data of patients with gastric cancer were analyzed, including age, gender, TNM staging, tumor size, tumor differentiation degree, tumor invasion depth and presence or absence of lymph node metastasis. The expression levels of p53, PDCD-5 and survivin in serum samples were detected by ELISA. Survival time of patients was followed up after treatment. Survival curve drawn by Kaplan-Meier was analyzed by univariate survival analysis. **Results** Compared with the control group, the expression level of PDCD-5 in the serum of patients with gastric cancer was significantly decreased ( $P<0.05$ ), and the expression levels of p53 and survivin were significantly increased ( $P<0.05$ ). The expression levels of p53, PDCD-5 and survivin in the gastric cancer group were related to the tumor diameter, differentiation degree, invasion depth, TNM staging and the presence or absence of lymph node metastasis ( $P<0.05$ ). Survival analysis showed

基金项目:海南省自然科学基金资助项目(20168328)

作者单位:海南医学院第一附属医院消化内科,海南,海口 570102

\*通信作者:符白玉, E-mail:185433565@qq.com

that the three-year overall survival rate and the disease-free survival of gastric cancer patients with high PDCD-5 expression in serum was significantly higher than that of patients with the low PDCD-5 expression ( $P<0.05$ ). The three-year overall survival rate and the disease-free survival of patients with high p53 expression were significantly lower than those of patients with low p53 expression ( $P<0.05$ ). The three-year overall survival rate and the disease-free survival of patients with high survivin expression were significantly lower than those of patients with low survivin expression ( $P<0.05$ ). **Conclusions** The Low expression of p53 and survivin and the high expression of PDCD-5 in patients with gastric cancer can improve the 3-year overall survival rate and disease-free survival rate, and it is clinically expected to be used as a prognostic marker.

**[KEY WORDS]** Gastric cancer; p53; Programmed cell death molecule-5; Surviving

胃癌是一种常见的消化道恶性肿瘤,起源于胃黏膜上皮,早期无特异性症状,就诊时往往已处于疾病发展中晚期,临床预后较差<sup>[1]</sup>。目前,化疗是胃癌的主要治疗手段之一,但化疗带来的副作用(恶心、呕吐、骨髓抑制等)会导致患者出现各种身体和心理问题,严重影响了化疗效果和生活质量<sup>[2-3]</sup>。寻找新的能够指导胃癌临床治疗的分子标识物,正确评估胃癌患者的病情,有助于及时调整治疗方案,减少复发转移,尽可能提高治疗的有效性<sup>[4]</sup>。p53是一种常见的抑癌基因,与多种恶性肿瘤(胃癌、肺癌、乳腺癌等)的发生发展相关<sup>[5]</sup>。程序性细胞死亡分子-5(programmed cell death molecule-5, PDCD-5)是近年来发现的一种抗肿瘤分子,可以促进肿瘤细胞的凋亡<sup>[6]</sup>。细胞凋亡抑制蛋白存活素(survivin)是近年来发现的一种凋亡抑制蛋白,对肿瘤的形成和分化具有重要作用,可作为多种肿瘤治疗的新靶点<sup>[7]</sup>。本研究分析了胃癌患者血清中 p53、PDCD-5 和 survivin 的表达及其联合检测与预后之间的关系,旨在明确其在胃癌治疗和预后中的应用价值。

## 1 材料与方法

### 1.1 一般资料

选择2012年9月到2015年9月在本院确诊的108例胃癌患者,男63例,女45例,平均年龄( $52.63\pm 11.28$ )岁。纳入标准:经影像和病理组织学确诊为胃癌患者;均获得患者及其家属知情同意,本研究经医院医学伦理委员会审核。排除标准:并发其它恶性肿瘤者;合并明显肝肾功能不全、心、脑血管疾病者;合并精神系统疾病者。根据病理组织学分级:低分化52例,中分化29例,高分化27例;肿瘤直径 $\leq 5$  cm 51例,直径 $> 5$  cm 57例;TNM分期:I期14例,II期28例,III期38例,IV期28例;肿瘤浸润深度:T<sub>1</sub>期10例,T<sub>2</sub>期28例,T<sub>3</sub>期46例,T<sub>4</sub>期24例;合并淋巴结转移53例,无

淋巴结转移55例。选择同期在该院体检的54名健康者为健康对照组,男32例,女22例,平均年龄( $51.36\pm 11.75$ )岁,2组年龄、性别等一般资料比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

### 1.2 试剂与仪器

PDCD-5(JK--ELISA-01494)、p53(JK--ELISA-02577)和survivin(JK--ELISA-00805)酶联免疫吸附试剂盒购自上海晶抗生物工程有限公司;多功能酶标检测仪(iMark)购自美国Bio-Rad公司;高速离心机(AVANTI J-15)购自美国Beckman Coulter公司。

### 1.3 治疗方法

所有纳入患者均进行常规的支持治疗和FOLFOX4方案化疗。于第1d静滴85 mg/m<sup>2</sup>奥沙利铂(oxaliplatin, L-OHP);第1、2d静推5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-Fu)(400 mg/m<sup>2</sup>),持续静注5-Fu(600 mg/m<sup>2</sup>)22 h,21 d为1个周期。

### 1.4 检测指标

治疗前,对所有入选的胃癌患者空腹抽血3 mL,离心(3 000 r/min, 10 min,)分离得到血清,-80℃保存备用。采用ELISA检测所有血清样品中PDCD-5、p53和survivin表达水平,严格参照试剂盒说明操作。

### 1.5 随访

患者自病理确诊之日起开始门诊复查或电话随访,治疗后1年内每3个月门诊复查1次,2年内半年复查1次,以后至少每年复查一次,随访截止2018年9月,共计随访36个月。随访记录患者复发情况、生存时间及随访时状态(存活、死亡或其他)等。

### 1.6 统计学处理

采用SPSS 17.0软件对数据进行分析,计量资料以( $\bar{x}\pm s$ )表示,两组间采用 $t$ 检验,多组间采用方差分析;若以上条件不满足则考虑非参数Mann-Whitney  $U$ 检验;采用Kaplan-Meier绘制生存曲线,分析PDCD-5、p53和survivin表达与预后生存之间的关系,分别以3年总生存率和3年无病生存率作

为观察终点,总生存率表示随访终点所有患者的生存状态;无病生存率表示随访终点所有患者的无事件生存状态,比较采用Log-rank  $\chi^2$  检验,以  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 胃癌患者血清中 p53、PDCD-5 和 survivin 表达水平

与对照组相比,胃癌患者血清中 PDCD-5 的表达水平显著下降 ( $P < 0.05$ ), p53 和 survivin 的表达水平显著升高,差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),见表 1。

表 1 胃癌患者血清中 p53、PDCD-5 和 survivin 表达水平 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Expression levels of p53, PDCD-5 and survivin in serum of patients with gastric cancer ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	PDCD-5 (ng/mL)	p53 (IU/mL)	survivin (ng/L)
对照组	54	1.58±0.14	0.24±0.07	76.43±15.47
胃癌组	108	0.79±0.82	0.52±0.11	113.86±16.39
t 值		7.018	17.045	14.231
P 值		0.000	0.000	0.000

### 2.2 不同基本特征胃癌患者血清中 p53、PDCD-5 和 survivin 的表达

胃癌组患者血清 PDCD-5、p53 和 survivin 的表达水平与患者年龄、性别无关,差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ );与肿瘤直径、分化程度、浸润深度、TNM 分期以及是否合并淋巴结转移相关,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 2。

### 2.3 p53、PDCD-5 和 survivin 的表达与胃癌患者预后分析

生存分析显示,胃癌患者血清中 p53、survivin 高表达患者 3 年总生存率和无病生存率显著低于 p53、

survivin 低表达患者 ( $P < 0.05$ ); PDCD-5、survivin 高表达患者 3 年总生存率和无病生存率显著高于 PDCD-5、survivin 低表达患者 ( $P < 0.05$ )。见表 3。

## 3 讨论

胃癌是起源于胃黏膜上皮的恶性肿瘤,死亡率高,预后尤其是中晚期预后差,临床上尚缺乏有效的治疗药物和方法<sup>[8]</sup>。已有研究表明,胃癌患者的预后与其病理分期、组织类型、生物学行为以及治疗手段相关,但这些临床病理特征具有一定滞后性及局限性<sup>[9]</sup>。p53 是抑癌基因家族主要的成员之一,在癌组织中常发生突变,导致其功能失活,转化为癌基因,促进肿瘤的恶性转化<sup>[10]</sup>。本研究发现,胃癌患者血清中 p53 表达水平升高,与上述研究一致,表明机体野生型的抑癌基因 p53 可能发生突变,导致其功能失活,进一步证实 p53 的表达与胃癌的发生发展密切相关。闫美凤等<sup>[11]</sup>分析了 p53 在胃癌组织中的表达,发现 p53 的表达与胃癌患者的组织分化程度、TNM 分期、淋巴结转移等相关,与本研究结果一致,表明胃癌患者血清中 p53 突变后,可能通过调控机体多种信号通路促进恶性肿瘤细胞的增殖表达,进一步证实 p53 的表达与胃癌的恶性发展相关,有望作为其预后标识物。PDCD-5 是一种凋亡相关蛋白,可以抑制多种肿瘤细胞(胃癌、非小细胞肺癌、前列腺癌等)的生长,促进其凋亡,还可以对放疗起协同作用<sup>[12]</sup>。Wang 等<sup>[13]</sup>分析了胃癌患者血清 PDCD-5 水平与 CD133 阳性表达之间的关系,发现血清 PDCD-5 水平与患者预后显著相关,有望作为 CD133 阳性表达胃癌患者治疗的新靶标。本研究中胃癌患者血

表 2 不同基本特征胃癌患者血清中 p53、PDCD-5 和 survivin 的表达 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Expression levels of p53, PDCD-5 and survivin in serum of patients with gastric cancer with different basic features ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	PDCD-5	t 值	P 值	p53	t 值	P 值	survivin	t 值	P 值	
年龄(岁)	≤50	50	0.81±0.12	1.807	0.074	0.51±0.06	1.581	0.117	112.56±13.54	1.074	0.286
	>50	58	0.77±0.11								
性别	男	63	0.78±0.10	1.068	0.288	0.53±0.08	1.348	0.181	114.08±12.56	0.566	0.573
	女	45	0.80±0.09								
肿瘤直径(cm)	≤5	51	0.81±0.08	2.771	0.007	0.49±0.06	4.323	0.000	109.43±12.56	3.102	0.003
	>5	57	0.77±0.07								
肿瘤分化程度	高中分化	56	0.75±0.08	5.501	0.000	0.55±0.05	5.661	0.000	117.88±13.14	4.010	0.000
	低分化	52	0.84±0.09								
TNM 分期	I~II 期	42	0.85±0.08	6.333	0.000	0.47±0.06	6.755	0.000	105.54±11.24	5.196	0.000
	II~III 期	66	0.75±0.08								
肿瘤浸润深度	T <sub>1</sub> ~T <sub>2</sub>	49	0.85±0.08	6.467	0.000	0.48±0.06	6.304	0.000	105.82±11.92	5.276	0.000
	T <sub>3</sub> ~T <sub>4</sub>	59	0.75±0.08								
淋巴结转移	是	53	0.75±0.07	5.522	0.000	0.54±0.06	4.712	0.000	118.65±13.74	4.472	0.000
	否	55	0.83±0.08								

表3 p53、PDCD-5 和 survivin 表达与胃癌患者生存率 ( $\bar{x} \pm s$ )Table 3 Analysis of expression levels of p53, PDCD-5, survivin and survival rate of patients with gastric cancer ( $\bar{x} \pm s$ )

项目	例数	3年生存率(%)	$\chi^2$ 值	P值	3年无病生存率(%)	$\chi^2$ 值	P值
PDCD-5(+)	49	47.98	5.222	0.022	31.31	5.521	0.019
PDCD-5(-)	49	32.65			18.37		
p53(+)	49	30.61	6.651	0.010	16.33	6.806	0.009
p53(-)	49	50.07			33.40		
survivin(+)	49	28.57	6.744	0.009	14.29	6.837	0.008
survivin(-)	49	52.14			35.54		
PDCD-5(+)且p53(-)	38	55.26	12.480	0.002	39.47	10.375	0.006
PDCD-5(+)或p53(-)	18	38.89			22.22		
PDCD-5(-)且p53(+)	42	25.97	11.162	0.001	11.91	10.225	0.006
PDCD-5(+)且survivin(-)	41	51.22			41.43		
PDCD-5(+)或survivin(-)	14	42.86	20.912	0.000	22.22	16.974	0.000
PDCD-5(-)且survivin(+)	43	22.04			11.63		
p53(-)且survivin(-)	44	56.97	28.924	0.000	39.19	27.000	0.000
p53(-)或survivin(-)	14	35.71			21.43		
p53(+)且survivin(+)	40	20.00	28.924	0.000	7.500	27.000	0.000
PDCD-5(+)且p53(-)且survivin(-)	33	57.58			42.42		
PDCD-5(+)或p53(-)或survivin(-)	28	29.06	28.924	0.000	28.57	27.000	0.000
PDCD-5(-)且p53(+)且survivin(+)	37	16.76			5.41		

注：“+”表示高表达，“-”表示低表达。

清中 PDCD-5 表达水平下降,进一步证实其可能通过某种调控机制调控的胃癌生物学行为。Zhuge 等<sup>[14]</sup>分析了 PDCD-5 与机体关键信号通路 p53 之间的关系,发现 PDCD-5 是 p53 的上游调节子,可以通过调节 p53 稳态,激活 Caspase-3,诱导细胞凋亡。田景中等<sup>[15]</sup>研究发现,PDCD-5 是胃癌组织中的一种重要凋亡诱导蛋白,可以诱导胃癌组织凋亡。本研究结果表明,PDCD-5 可能通过调节 p53 介导的细胞凋亡途径,诱导胃癌组织的凋亡,临床有望作为其治疗靶点。

survivin 是一种凋亡抑制基因,可以抑制细胞色素 C 从线粒体释放,与 Caspase-3、Caspase-7 结合从而抑制 Caspase 的活性,阻断由各种信号诱发细胞凋亡的级联反应<sup>[16]</sup>。本研究提示 survivin 可能通过促进胃癌组织增殖,抑制其凋亡,参与胃癌的形成与分化。本研究采用生存分析发现,p53 低表达、PDCD-5 高表达和 survivin 低表达胃癌患者具有更高的生存期,可以显著提高其3年总生存率和无病生存率,其中 survivin 低表达患者的总生存率和无病生存率最高,采用联合检测发现 p53、PDCD-5 和 survivin 可以共同调控胃癌的细胞恶性生物学行为,与胃癌患者的预后密切相关,临床可采用 survivin 作为其预后标识物,在条件允许范围内可同时检测三种蛋白的表达联合检测,以提高其预后预测。

综上所述,胃癌患者血清中 p53 和 survivin 表达量显著增加,PDCD-5 表达量显著下降,且其表

达量与肿瘤直径、分化程度、浸润深度、TNM 分期以及淋巴结转移相关。PDCD-5 高表达且 p53 低表达且 survivin 低表达可以提高患者的生存期以及3年总生存率和无病生存率,临床有望作为其预后标识物。但 p53、PDCD-5 和 survivin 之间的相互作用机制,是否共同调控机体信号通路参与胃癌的发生发展,目前尚不清楚,有待于进一步研究。本研究不足之处为样本量较少,但本研究为临床胃癌的预后提供了一定的理论依据。

#### 参考文献

- [1] 王翠翠,郑金峰,周露婷,等.胃癌 CyclinD1、PTEN 表达及与化疗药物耐药性关系的研究[J].分子诊断与治疗杂志,2014,6(7):233-238.
- [2] Fujitani K, Yang HK, Mizusawa J, et al. Gastrectomy plus chemotherapy versus chemotherapy alone for advanced gastric cancer with a single non-curable factor (REGATTA): a phase 3, randomised controlled trial[J]. Lancet Oncol, 2016, 17(3):309-318.
- [3] Yuan DD, Zhu ZX, Zhang X, et al. Targeted therapy for gastric cancer: current status and future directions (Review) [J]. Oncol Rep, 2016, 35(3):1245-1254.
- [4] Kucera R, Smid D, Topolcan O, et al. Searching for new biomarkers and the use of multivariate analysis in gastric cancer diagnostics[J]. Ant Res, 2016, 36(4):1967-1971.
- [5] Wang D, Wang W, Song CL, et al. The roles of serum PDCD5 in circulating CD133 positive cells of the patients with gastric cancer[J]. Tumor Biol, 2016, 37(9):11799-11804.

(下转第 622 页)

# LncRNA ROR 在脂肪源性干细胞中的过表达对面部皮肤老化的影响

梁书旗<sup>1</sup> 吴新军<sup>2</sup> 李岩<sup>2</sup> 李建<sup>3\*</sup>

**[摘要]** **目的** 探讨长链非编码 RNA ROR(LncRNA ROR)在人脂肪源性干细胞中的过表达对面部皮肤老化的影响。**方法** 选取2018年1月至2019年1月本院收治的40例面部老化就医者作为研究组,同时选取同期到本院健康体检者40例作为对照组。采用实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测LncRNA ROR在两组研究对象脂肪源性干细胞中的表达水平。比较两组研究对象面部皮肤的斑点、皱纹、皮肤纹理及紫外线色斑情况。采用Pearson法分析LncRNA ROR表达水平与面部指标的相关性。**结果** 与对照组比较,研究组LncRNA ROR的表达水平显著升高( $P<0.05$ )。与对照组比较,研究组斑点、皱纹、皮肤纹理、紫外线色斑评分结果显著升高( $P<0.05$ )。采用Pearson法分析LncRNA ROR表达水平与面部斑点、皱纹、皮肤纹理、紫外线色斑呈正相关( $P<0.05$ ), $r$ 值分别为0.446、0.527、0.394、0.415。**结论** LncRNA ROR在脂肪源性干细胞中的过表达与面部皮肤老化的发生发展呈显著正相关。

**[关键词]** LncRNA ROR; 脂肪源性干细胞; 面部皮肤; 临床意义

## Effect of lncRNA ROR overexpression in adipose-derived stem cells on facial skin aging

LIANG Shuqi<sup>1</sup>, WU Xinjun<sup>2</sup>, LI Yan<sup>2</sup>, LI Jian<sup>3\*</sup>

(1. Renzhi college, Sanquan college, Xinxiang Medical College, Xinxiang, Henan, China, 453003; 2. The second ward of general surgery, the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical College, Weihui, Henan, China, 453100; 3. Department of Cosmetology and Plastic Surgery, the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical College, Weihui, Henan, China, 453100)

**[ABSTRACT]** **Objective** To investigate the effect of overexpression of lncRNA ROR in adipose-derived stem cells on facial skin aging. **Methods** Forty patients with facial aging who were treated in our hospital from January 2018 to January 2019 were selected as the study group, and 40 people who underwent health examinations in our hospital during the same period were selected as the control group. Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to detect the expression level of lncRNA ROR in adipose-derived stem cells in two groups of subjects. The facial skin spots, wrinkles, skin texture, and UV stains of the two groups of subjects were compared. The correlation between lncRNA ROR expression level and facial indicators was analyzed by Pearson analysis. **Results** Compared with the control group, the expression level of lncRNA ROR in the study group was significantly increased ( $P<0.05$ ). Compared with the control group, the scores of spots, wrinkles, skin texture, and ultraviolet spots in the study group were significantly increased ( $P<0.05$ ). The Pearson analysis showed that the expression of lncRNA ROR was positively correlated with facial spots, wrinkles, skin texture, and ultraviolet staining ( $P<0.05$ ). The  $r$  values were 0.446, 0.527, 0.394, and 0.415, respectively. **Conclusion** The overexpression of lncRNA ROR in adipose-derived stem cells is significantly positively correlated with the occurrence and development of facial skin aging.

**[KEY WORDS]** lncRNA ROR; Adipose-derived stem cells; Facial skin; Clinical significance

基金项目:河南省医学科技攻关计划项目(2018063251)

作者单位:1. 新乡医学院三全学院仁智书院,河南,新乡 453003

2. 新乡医学院第一附属医院普通外科二病区,河南,卫辉 453100

3. 新乡医学院第一附属医院美容整形科,河南,卫辉 453100

\*通信作者:李建, E-mail: 8190694@qq.com

脂肪源性干细胞是一类具有分化作用的多功能的干细胞,近年来在各种损伤修复中发挥极其重要的作用<sup>[1-2]</sup>,其生物学功能在面部皮肤的保护和抗衰老中作用尤其突出<sup>[3]</sup>。随着社会的进步和经济的高速发展,人们生活的压力越来越大,皮肤老化的速度也越来越快,主要表现为皮肤胶原蛋白减少,失去弹性,皱纹加深,色素沉着,皮肤变得越来越粗糙,因在工作中需要注重形象,所以人们逐渐的开始实施自我保护,提高皮肤的光滑程度和细胞的饱满程度<sup>[4-5]</sup>。有研究表明,LncRNA ROR 在人脂肪源性干细胞中的表达起到一定的调控作用,上调的 LncRNA ROR 可能通过正向调控解耦联蛋白-1(Uncoupled protein-1,UCP1)和 PR 结构域蛋白 16(PR domain protein 16,PRDM16)的表达,从而促进脂肪源性干细胞的棕色化<sup>[6]</sup>。本实验旨在研究 LncRNA ROR 在人脂肪源性干细胞中的表达对面部皮肤的影响及临床意义。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选取 2018 年 1 月至 2019 年 1 月本院收治的 40 例面部老化就医者作为研究组。其中男 20 例,平均年龄(32.44±3.25)岁;女 20 例,平均年龄(34.25±4.25)岁。同时选取同期到本院健康体检者 40 例作为对照组,其中男 19 例,平均年龄(36.72±3.41)岁;女 21 例,平均年龄(35.30±4.26)岁。各组研究对象临床资料比较差异无统计学意义( $P>0.05$ ),具有可比性。本研究经本院伦理委员会批准,所有研究对象知情且签署同意书。

纳入标准:①大腿有大量的皮下脂肪;②没有严重的心脑血管、肝、肾等疾病;③没有进行过面部手术,患者主动就医。排除标准:①有免疫功能障碍性疾病患者;②体质属于瘢痕者;③孕妇及哺乳期女性;④年龄未满 18 岁。

### 1.2 实验材料

Trizol 试剂盒(美国 Invitrogen 公司);Prime-Script™RT 试剂盒、SYBR Premix Ex Taq 试剂盒(日本 TaKaRa 公司)

### 1.3 患者脂肪干细胞的制备

选择大腿外侧部脂肪细胞,对吸脂部位进行局部麻醉。使用吸脂针,连接螺旋注射器,由深层向浅层逐层逐渐抽吸 100 mL,保证脂肪完整。之后脂肪组织用无菌生理盐水冲洗,直至无残留血色全部

洗净,用眼科镊剔除可见的血管和纤维结缔组织,拣选出脂肪颗粒,然后眼科剪充分剪碎,分装至离心管中,离心 5 min。离心后弃上层油脂及下层冲洗液,将脂肪层重新收集至离心管中,向脂肪组织中加入无菌的体积分数 0.1% 的 I 型胶原酶,在 37℃ 恒温摇床震荡 45 min,直到脂肪成糊状,离心 10 min。离心后组织由上而下依次分为脂肪层、生理盐水层、沉淀层 3 层。取各个离心管内沉淀层,以 70 μm 筛网过滤,离心 5 min,弃上清,加入 20 mL 生理盐水,调整细胞浓度为(0.5~1.0)×10<sup>9</sup>/L,备用。

### 1.4 实时荧光定量聚合酶链反应(Quantitative Real-time PCR,qRT-PCR)检测 LncRNA ROR 的表达水平

采集 Trizol 法提取细胞中的总 RNA,应用 Nanodrop2000c 超微量分光光度计检测 RNA 浓度与纯度。LncRNA ROR 正向引物 5'-GTTCCAAA-CACATCGCCACT-3',反向引物 5'-GGAGTCAG-GAGAAGGTGCTG-3';GAPDH 正向引物 5'-AACGGATTGGTTCGTATTG-3',反向引物 5'-GGAA-GATGGT GATGGGATT-3',引物由上海生工生物工程股份有限公司设计合成。参照反转录试剂盒说明书将总 RNA 合成 cDNA,以 cDNA 为模板进行 qRT-PCR 反应,参照实时荧光定量 PCR 试剂盒配置反应体系,反应条件:95℃ 预变性 5 min,95℃ 变性 30 s,60℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 30 s,共 40 次循环。以 GAPDH 为内参,采用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法计算 LncRNA ROR 的相对表达量。

### 1.5 观察指标

应用 VISIA 皮肤图像分析仪对两组研究对象面部斑点、皱纹、皮肤纹理、紫外线色斑进行评分。皮肤检测前清理面部,并保持测量环境温度、湿度、光照相对恒定,清理面部 15 min 后应用 VISIA 皮肤图像分析仪拍摄测试者左侧面、正面、有侧面三个角度面部图像,尽可能避免毛发及反光部位干扰,自动生成绝对分值,绝对分值大小表示所选定区域皮肤特征面积、密度和强度的综合考量结果,由计算机计算出检测者三个角度同一皮肤特征绝对分值的总和,分值越高说明面部皮肤老化情况越严重<sup>[7]</sup>。所有皮肤检测均由经过系统培训的同一个人进行操作,符合现行皮肤检测基本规范。

### 1.6 统计学处理

采用 SPSS 21.0 进行统计学分析,符合正态分布的计量资料以( $\bar{x}\pm s$ )表示,两组间比较采用独立样本 *t* 检验;采用 Pearson 法分析 LncRNA ROR 与面部皮

肤指标的相关性。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 两组一般资料比较

对照组与研究组比较,年龄范围、平均年龄比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。见表1。

表1 两组一般资料对比( $\bar{x} \pm s$ )

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

组别	<i>n</i>	年龄范围(岁)	平均年龄(岁)
对照组	40	27~48	35.42±4.35
研究组	40	25~45	36.81±3.37
<i>t</i> 值			1.598
<i>P</i> 值			0.114

### 2.2 两组 LncRNA ROR 表达水平比较

与对照组比较,研究组 LncRNA ROR 的表达水平显著升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表2。

表2 两组 LncRNA ROR 表达水平比较( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Comparison of LncRNA ROR expression levels between the two groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	<i>n</i>	LncRNA ROR
对照组	40	1.02±0.13
研究组	40	2.56±0.25
<i>t</i> 值		34.565
<i>P</i> 值		0.000

### 2.3 两组相关指标比较

与对照组比较,研究组斑点、皱纹、皮肤纹理、紫外线色斑评分结果显著升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表3。

表3 两组相关指标比较( $\bar{x} \pm s$ )

Table 3 Comparison of related indicators between the two groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	<i>n</i>	斑点	皱纹	皮肤纹理	紫外线色斑
对照组	40	40.44±5.86	53.43±6.52	50.36±6.82	20.28±8.31
研究组	40	60.33±7.89	65.31±7.62	63.71±7.30	35.41±10.20
<i>t</i> 值		12.800	7.492	8.452	7.273
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000	0.000

### 2.4 LncRNA ROR 表达水平与面部指标的相关性

采用 Pearson 法分析 LncRNA ROR 表达水平与面部指标斑点、皱纹、皮肤纹理、紫外线色斑的相关性,结果显示,LncRNA ROR 表达水平与斑点、皱纹、皮肤纹理、紫外线色斑呈正相关( $P < 0.05$ )。见表4。

## 3 讨论

面部皮肤老化是一种皮肤质量下降的现象,涉及复杂的生物学过程,是由于长期慢性损伤多导致的,分为内源性和外源性老化,主要表现为皮

表4 LncRNA ROR 表达水平与面部指标的相关性

Table 4 Correlation between LncRNA ROR expression level and facial indicators

指标	LncRNA ROR	
	<i>r</i> 值	<i>P</i> 值
斑点	0.446	0.000
皱纹	0.527	0.000
皮肤纹理	0.394	0.000
紫外线色斑	0.415	0.000

肤松弛、皱纹加深、色素增加、毛孔扩大等,甚至可能导致皮肤表面出现粉刺、紫癜、疙瘩等。皮肤老化也表现在温度调节、免疫反应、表皮重建、感觉能力、汗腺分泌、维生素合成和血管生成等皮肤功能方面,这就导致皮肤对紫外线变得敏感,也进一步促进皮肤老化<sup>[8]</sup>。皮肤老化还可引起多种皮肤病的发生,甚至引起皮肤恶性肿瘤的进一步发展。皮肤的老化主要反映在细胞水平,等同于细胞老化,老化细胞的特征主要有下面这些,例如细胞的代谢、形态和内容物发生改变<sup>[9]</sup>。老化的细胞尽管丧失了细胞增殖和分化能力,但仍具有一定的代谢活性。细胞老化是一种不可逆的过程,所以采取措施延缓细胞老化是保持皮肤重要方法,这样也有利于身体健康<sup>[10]</sup>。

在临床中,皮肤老化的治疗方法有很多,主要是药物治疗和激光治疗,但这些方法均不能从源头上改变发病的机理,且容易造成不良后果。脂肪源性干细胞具有更新复制和分化的能力,与其他干细胞相比,脂肪源性干细胞数量多,且提取比较方便,所以不仅可以在皮肤的损伤部位长时间保留,并且可以通过其分化特征发挥生物学功能<sup>[11]</sup>。有研究表明,单纯的干细胞条件培养基也能够能够在创伤愈合方面发挥积极作用<sup>[12]</sup>。

真皮白色脂肪组织(Dermis white adipose tissue, dWAT)是皮肤屏障中的防线,其不仅会对毛囊再生带来直接影响,同时在皮肤纤维化、伤口愈合及抵抗皮肤感染等过程中也具有协调功能<sup>[13]</sup>。而真皮中有大量具有分化能力的真皮成纤维细胞(Dermal fibroblasts, dFB),是不成熟脂肪细胞的主要来源,不成熟脂肪在刺激下会进一步转化为dWAT等成熟脂肪组织,这也是婴幼儿皮肤饱满而富有弹性的根本原因,白色脂肪组织会随着人体年龄的增加而减少,而表现为逐渐衰老。转化生长因子- $\beta$ (Transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )信号通路是生物学中经典信号通路之一,有研究显示,随

着 dFB 抗菌能力及转化成脂肪细胞能力不断下降, TGF- $\beta$  信号处于不断激活状态, 使得真皮成纤维细胞并非向脂肪组织发展而是向纤维组织发展<sup>[14]</sup>。

LncRNA 在人脂肪干细胞脂向分化中存在差异表达<sup>[15]</sup>。LncRNA ROR 是位于人的 18 号染色体, 是一种非编码 RNA。栗颖利等<sup>[16]</sup> 研究报道, LncRNA ROR 参与了棕色脂肪细胞分化作用, 在脂肪源性干细胞中发挥非编码基因的生物学作用。本研究结果。提示 LncRNA ROR 过表达可能参与面部皮肤老化的发生发展, 而其机制可能与 LncRNA ROR 过表达通过正向调控 UCPI 和 PRDM16 的表达, 促使脂肪源性干细胞棕色化, 以及 LncRNA ROR 过表达参与 TGF- $\beta$  信号通路的过度激活, 并促使真皮成纤维细胞应激性向纤维组织转化, 共同导致 dWAT 过度减少而加速面部皮肤老化有关。

综上所述, LncRNA ROR 过表达显著增加了面部皮肤的斑点、皱纹、皮肤纹理及紫外线色斑情况, 加速了面部皮肤的老化。

#### 参考文献

- [1] Tan SS, Ng ZY, Zhan W, et al. Role of Adipose-derived stem cells in fat grafting and reconstructive surgery [J]. *J Cutan Aesthet Surg*, 2016, 9(3):152-156.
- [2] Frese L, Dijkman PE, Hoerstrup SP. Adipose tissue-derived stem cells in regenerative medicine [J]. *Transfus Med Hemother*, 2016, 43(4): 268-274.
- [3] 高倩倩, 姜南, 张建平. 脂肪源性干细胞联合透明质酸在皮肤年轻化中的疗效观察[J]. *中国美容医学*, 2019, 28(3):31-34.
- [4] 王小燕, 刘子菁, 马仁燕, 等. 皮肤光老化研究新进展[J]. *中国麻风皮肤病杂志*, 2019, 22(5):308-309.
- [5] 刘文杰, 姜敏, 项蕾红. 细胞老化介导皮肤衰老的研究进展[J]. *中华皮肤科杂志*, 2019, 52(3):211-214.
- [6] 刘玲, 焦谊, 梁小弟, 等. LncRNA ROR 对 Ad36 诱导人脂肪源性干细胞棕色化的作用 %Role of LncRNA ROR in Ad36-induced browning of human adipose-derived stem cells [J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2018, 34(4):318-324.
- [7] 刘慧. VISIA 对痤疮患者面部皮损评价的研究及痤疮患者认知度调查[D]. 广州:南方医科大学, 2019.
- [8] 樊雪. 北京地区汉族女性面部皮肤老化参数及其与皮肤类型的相关性研究[D]. 北京:北京协和医学院, 2017.
- [9] 王曦, 舒晓红, 李朝霞, 等. 皮肤微针联合医用胶原蛋白海绵改善女性面部皮肤老化的疗效观察[J]. *中国美容医学*, 2018, 25(3):56-59.
- [10] 赵娟, 黎丹, 杨娥, 等. SPRY1 基因与角质形成细胞衰老的相关性研究[J]. *重庆医科大学学报*, 2019, 44(6):62-64.
- [11] 姚尧. 脂肪源性干细胞对皮肤慢性紫外线照射损伤的治疗研究[D]. 大连:大连医科大学, 2014.
- [12] 黄佳欣, 邵婷如, 陈跃川, 等. 长链非编码 RNA 在口腔鳞状细胞癌中的研究进展[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2018, 10(2):120-124.
- [13] 李沛霖, 崔磊. 真皮内脂肪组织调控皮肤生理病理过程与机制的研究进展[J]. *首都医科大学学报*, 2020, 41(6):896-900.
- [14] Petrus P, Mejhert N, Corrales P, et al. Transforming Growth Factor-beta3 Regulates Adipocyte Number in Subcutaneous White Adipose Tissue [J]. *Cell Rep*, 2018, 25(3):551-560.
- [15] 岳文峻. 长非编码 RNA 在人脂肪干细胞脂向分化中的差异表达分析[D]. 湛江:广东医学院, 2015.
- [16] 栗颖利, 邢新, 杨超, 等. 脂肪干细胞与放射后成纤维细胞共培养模型的建立和 LncRNA 高通量测序[J]. *现代生物医学进展*, 2017, 17(6):1006-1011.

(上接第 618 页)

- [6] Gao M, Gao W, Wang Z, et al. The reduced PDCD5 protein is correlated with the degree of tumor differentiation in endometrioid endometrial carcinoma [J]. *Springerplus*, 2016, 5(1):988-997.
- [7] Garg H, Suri P, Gupta JC, et al. Survivin: a unique target for tumor therapy [J]. *Cancer Cell Int*, 2016, 16(1):1-14.
- [8] 王翠翠, 郑金峰, 周露婷, 等. 胃癌 CyclinD1、PTEN 表达及与化疗药物耐药性关系的研究[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2014, 6(7):233-238.
- [9] Zhu X, Tian X, Yu C, et al. A long non-coding RNA signature to improve prognosis prediction of gastric cancer [J]. *Mol Cancer*, 2016, 15(1):60-75.
- [10] 吕旭, 姜叶娟, 王香, 等. p53 与 Ki-67 在胃癌组织中表达与淋巴转移的关系[J]. *中华疾病控制杂志*, 2015, 19(4):407-410.
- [11] 闫美凤, 张永胜. p53 与 Gadd45a 蛋白在胃癌组织中的表达及临床病理学意义[J]. *医学研究生学报*, 2014, 27(3):282-285.
- [12] Li P, Fei H, Wang L, et al. PDCD5 regulates cell proliferation, cell cycle progression and apoptosis [J]. *Oncol Letters*, 2018, 15(1):1177-1183.
- [13] Wang D, Wang W, Song CL, et al. The roles of serum PDCD5 in circulating CD133 positive cells of the patients with gastric cancer [J]. *Tumor Biol*, 2016, 37(9):11799-11804.
- [14] 田景中, 李光云, 许建国, 等. 奥沙利铂对胃癌凋亡相关蛋白 PDCD5 和 XIAP 表达影响研究[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2018, 25(6):384-388.
- [15] Xun C, Ning D, Caiguo Z, et al. Survivin and tumorigenesis: molecular mechanisms and therapeutic strategies [J]. *J Cancer*, 2016, 7(3):314-323.
- [16] Kato J, Kuwabara Y, Mitani M, et al. Expression of survivin in esophageal cancer: correlation with the prognosis and response to chemotherapy [J]. *Int J Cancer*, 2015, 95(2):92-95.

# 不同剂量布地奈德对 AECOPD 患者肺功能和 PCT、MMP-9 及 TIMP-1 水平的影响

张冬芹<sup>1</sup> 田祥<sup>2</sup> 刘素芬<sup>3</sup> 王丽显<sup>4</sup> 付晓丽<sup>1\*</sup>

**[摘要]** 目的 分析肺功能和血清降钙素原(PCT)、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)及金属蛋白酶-1组织抑制因子(TIMP-1)水平在慢性阻塞性肺疾病急性加重期(AECOPD)患者治疗中的变化。方法 选取2017年12月至2019年12月本院收治的AECOPD患者120例,根据不同治疗剂量分为低剂量组(1 mg/次布地奈德)及高剂量组(2 mg/次布地奈德)各60例。比较两组患者临床疗效、肺功能、动脉血气指标、PCT、MMP-9及TIMP-1水平及不良反应发生情况。结果 高剂量组患者总有效率明显高于低剂量组(96.67% vs 75.00%),差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。治疗前,两组患者FEV1、FVC、FEV1/FVC、SaO<sub>2</sub>、PaCO<sub>2</sub>、PaO<sub>2</sub>、PCT、MMP-9及TIMP-1水平比较差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。治疗后,两组患者FEV1、FVC、FEV1/FVC、SaO<sub>2</sub>、PaCO<sub>2</sub>、PaO<sub>2</sub>水平均较治疗前上升,PCT、MMP-9及TIMP-1水平较治疗前降低,以高剂量组尤甚,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。高剂量组与低剂量组不良反应比较差异无统计学意义( $\chi^2 = 2.143, P = 0.143$ )。结论 予以2 mg/次布地奈德治疗AECOPD患者临床疗效显著,可有效改善肺功能及血气指标,降低PCT、MMP-9及TIMP-1水平。

**[关键词]** 不同剂量;布地奈德;AECOPD;PCT;MMP-9;TIMP-1

## Effect of different doses of budesonide on lung function and levels of PCT, MMP-9 and TIMP-1 in patients with AECOPD

ZHANG Dongqin<sup>1</sup>, TIAN Xiang<sup>2</sup>, LIU Sufen<sup>3</sup>, WANG Lixian<sup>4</sup>, FU Xiaoli<sup>1\*</sup>

(1. Department of Geriatrics, the First Central Hospital of Baoding, Baoding, Hebei, China, 071000; 2. The Second Department of Cardiology, the First Central Hospital of Baoding, Baoding, Hebei, China, 071000; 3. Department of Nursing, the First Central Hospital of Baoding, Baoding, Hebei, China, 071000; 4. The First Department of General Medicine, the First Central Hospital of Baoding, Baoding, Hebei, China, 071000)

**[ABSTRACT]** **Objective** To analyze the changes of lung function and serum procalcitonin (PCT), matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) levels during the treatment of patients with acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease (AECOPD). **Method** 120 AECOPD patients admitted to our hospital from December 2017 to December 2019 were selected and divided into low-dose group (1 mg/time budesonide) and high-dose group (2 mg/time budesonide) according to different treatment, 60 cases in each group. The clinical efficacy, pulmonary function, arterial blood gas indexes, PCT, MMP-9 and TIMP-1 levels and the occurrence of adverse reactions were compared between the two groups. **Results** The total effective rate in the high-dose group was significantly higher than that in the low-dose group (96.67% vs 75.00%), the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). Before treatment,

基金项目:保定市科技计划项目(2041ZF258)

作者单位:1. 保定市第一中心医院老年病科,河北,保定 071000

2. 保定市第一中心医院心血管内二科,河北,保定 071000

3. 保定市第一中心医院护理部,河北,保定 071000

4. 保定市第一中心医院全科医疗一科,河北,保定 071000

\*通信作者:付晓丽, E-mail: 13483766216@163.com

there was no significant difference in the levels of FEV1, FVC, FEV1/FVC, SaO<sub>2</sub>, PaCO<sub>2</sub>, PaO<sub>2</sub>, PCT, MMP-9 and TIMP-1 between the two groups ( $P>0.05$ ). After treatment, the levels of FEV1, FVC, FEV1/FVC, SaO<sub>2</sub>, PaCO<sub>2</sub>, and PaO<sub>2</sub> of the patients in the two groups increased compared with before treatment, while the levels of PCT, MMP-9 and TIMP-1 decreased compared with before treatment, especially in the high-dose group, the difference was statistically significant ( $P<0.05$ ). There was no significant difference in adverse reactions between the high-dose group and the low-dose group ( $\chi^2=2.143$ ,  $P=0.143$ ). **Conclusion** 2 mg/time budesonide has a significant clinical effect in the treatment of AECOPD patients, which can effectively improve lung function and blood gas indicators, reduce PCT, MMP-9 and TIMP-1 levels.

**[KEY WORDS]** Different doses; Budesonide; AECOPD; PCT; MMP-9; TIMP-1

慢性阻塞性肺疾病急性加重期(Acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease, AECOPD)不及时治疗可引发患者心衰及呼衰,威胁患者生命安危<sup>[1]</sup>。目前,临床上对于AECOPD患者的治疗主要以扩张支气管,抗炎等对症支持治疗为主。布地奈德作为一种高效糖皮质激素,具有良好的抗炎效果,在临床中广范应用。但关于布地奈德剂量的使用问题临床一直存在一定争议,是临床研究的重点<sup>[2]</sup>。相关研究表明,肺部感染与病原菌微生物及金属蛋白酶密切相关<sup>[3]</sup>。血清降钙素原(procalcitonin, PCT)作为临床常见的炎性因子,对判断炎性感染程度特异性高<sup>[4]</sup>。基质金属蛋白酶-9(Matrix metalloproteinase 9, MMP-9)及金属蛋白酶-1组织抑制因子(Tissue inhibitor of metalloproteinase-1, TIMP-1)可在炎性因子刺激、转换下产生一系列炎症反应<sup>[5]</sup>。但关于PCT、MMP-9、TIMP-1与AECOPD临床过程的关系所知甚少。鉴于此,本研究就PCT、MMP-9、TIMP-1在AECOPD患者治疗中的变化进行分析,现报道如下。

## 1 对象与方法

### 1.1 研究对象

选取本院2017年12月至2019年12月收治的120例AECOPD患者作为研究对象。按照不同布地奈德治疗剂量随机分为低剂量组和高剂量组各60例。低剂量组男44例,女16例,平均(66.54±7.15)岁;高剂量组男46例,女14例,平均年龄(66.86±7.43)岁。纳入标准:①符合(慢性阻塞性肺疾病急性加重诊治中国专家共识(2017年更新版)<sup>[6]</sup>;②近三个月无糖皮质激素及其他药物治疗;③临床资料完整且未中途退出研究者。排除标准:①药物治疗不耐受者;②严重精神疾患等无法配合研究者。两组患者一般资料比较无统计学意义( $P>0.05$ )。本研究经医院医学伦理委员会批准,患者均签署知情同意书。

### 1.2 治疗方法

两组患者均予以吸氧、化痰、抗感染等对症支持治疗,布地奈德均选取阿斯利康制药有限公司,国药准字H20140475。低剂量组布地奈德(1 mg/次),高剂量组布地奈德(2 mg/次),联合灭菌注射用水稀释,直接用管道氧开大流量驱动给予雾化吸入,两组均每隔8 h进行一次雾化吸入治疗,连续治疗两周。

### 1.3 判定标准及检测方法

#### 1.3.1 临床疗效判定<sup>[7]</sup>

临床疗效分为:显效、有效、无效。总有效率=(显效+有效)/总人数×100%。

#### 1.3.2 肺功能

肺功能检测均由相关专业人员在肺功能检测仪(厂家:合肥健桥医疗电子有限责任公司,型号:FGY-200肺功能检测仪)的说明书指导下进行,主要对患者的第一秒用力呼气容积(forced expiratory volume in first second, FEV1)、第一秒用力呼气容积占用力肺活量的比率(The first second forced expiratory volum, FEV1%)及第一秒用力呼气量/用力肺活量(FEV1/FVC)进行检测。

#### 1.3.3 动脉血气指标

采用血气分析仪(厂家:上海聚慕医疗器械有限公司,型号:雷度米特ABL90血气分析仪)检测患者动脉血氧饱和度(Arterial oxygen saturation, SaO<sub>2</sub>)、动脉血二氧化碳分压(Arterial Partial Pressure of Carbon Dioxide, PaCO<sub>2</sub>)、血氧分压(Arterial blood partial pressure of oxygen, PaO<sub>2</sub>)。

#### 1.3.4 PCT、MMP-9及TIMP-1水平

抽取所有受检者治疗前后5 mL清晨空腹静脉血。予以离心处理5 min后(转速:3 500 r/min),留取上层血清,放置于-80℃恒温箱中冷藏待检。PCT、MMP-9及TIMP-1水平含量均通过使用深圳晶美生物工程有效有限公司生产的试剂盒,采用

超敏酶联免疫吸附法进行测定。

### 1.3.5 不良反应

不良反应包括皮肤瘙痒、咽喉不适、声嘶等。

### 1.4 统计学分析

采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析。计量资料使用  $(\bar{x} \pm s)$  表示,行  $t$  检验;计数资料使用  $n(\%)$  表示,行  $\chi^2$  检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 两组临床疗效比较

高剂量组总有效率显著高于低剂量组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表1。

### 2.2 两组肺功能指标比较

治疗前,两组患者 FEV1、FVC、FEV1/FVC 水平比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。治疗后,两组患者 FEV1、FVC、FEV1/FVC 水平均较治疗前上升,且高剂量组均高于低剂量组,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表2。

### 2.3 血气分析指标

治疗前两组 SaO<sub>2</sub>、PaCO<sub>2</sub>、PaO<sub>2</sub> 比较差异无统

表1 临床疗效比较 [ $n(\%)$ ]

组别	$n$	显效	有效	无效	总有效率
高剂量组	60	34(56.67)	24(40.00)	2(3.33)	58(96.67)
低剂量组	60	25(41.67)	20(33.33)	15(25.00)	45(75.00)
$\chi^2$ 值					11.582
$P$ 值					0.001

计学意义( $P > 0.05$ )。治疗后,两组 SaO<sub>2</sub>、PaCO<sub>2</sub>、PaO<sub>2</sub> 均显著改善,其中高剂量组 SaO<sub>2</sub>、PaO<sub>2</sub> 水平较低剂量组明显升高,PaCO<sub>2</sub> 较低剂量组明显降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表3。

### 2.4 PCT、MMP-9 及 TIMP-1 水平

治疗前两组 PCT、MMP-9 及 TIMP-1 比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。治疗后,两组 PCT、MMP-9 及 TIMP-1 水平较前降低,以高剂量组尤甚,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表4。

### 2.5 不良反应

高剂量组出现咽喉不适1例,皮肤瘙痒1例;低剂量组出现瘙痒2例,咽喉不适3例,声嘶1例。两组患者不良反应比较差异无统计学意义( $\chi^2 = 2.143, P = 0.143$ )。

表2 肺功能指标比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Comparison of lung function indexes ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	$n$	FEV1(L)		FEV1/FVC(%)		FEV1(%)	
		治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
高剂量组	60	1.49±0.25	1.81±0.26 <sup>a</sup>	52.02±4.37	66.51±7.54 <sup>a</sup>	50.24±5.22	63.51±6.92 <sup>a</sup>
低剂量组	60	1.51±0.23	1.62±0.34 <sup>a</sup>	52.68±4.03	58.01±6.21 <sup>a</sup>	50.82±5.12	56.31±6.03 <sup>a</sup>
$t$ 值	-	0.456	3.438	0.860	6.740	0.296	6.076
$P$ 值	-	0.649	<0.001	0.391	<0.001	0.767	<0.001

注:与同组治疗前比较<sup>a</sup> $P < 0.05$ 。

表3 血气分析指标比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 3 Comparison of blood gas analysis indexes ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	$n$	SaO <sub>2</sub> (%)		PaCO <sub>2</sub> (mmHg)		PaO <sub>2</sub> (mmHg)	
		治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
高剂量组	60	71.09±5.16	86.49±7.09 <sup>a</sup>	61.31±13.59	41.95±11.59 <sup>a</sup>	51.76±2.53	78.56±2.89 <sup>a</sup>
低剂量组	60	71.06±5.57	79.31±5.08 <sup>a</sup>	61.79±13.51	47.59±12.57 <sup>a</sup>	51.64±2.48	70.46±1.49 <sup>a</sup>
$t$ 值	-	0.030	6.376	0.194	2.555	0.262	19.296
$P$ 值	-	0.975	<0.001	0.846	0.011	0.793	<0.001

注:与同组治疗前比较<sup>a</sup> $P < 0.05$ 。

表4 PCT、MMP-9 及 TIMP-1 水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 4 Comparison of PCT, MMP-9 and TIMP-1 levels ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	$n$	PCT(ng/mL)		MMP-9( $\mu$ g/mL)		TIMP-1(%)	
		治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
高剂量组	60	0.49±0.16	0.13±0.08 <sup>a</sup>	534.33±11.06	150.33±9.12 <sup>a</sup>	323.51±10.02	106.42±5.06 <sup>a</sup>
低剂量组	60	0.51±0.14	0.29±0.13 <sup>a</sup>	531.26±12.64	184.28±10.62 <sup>a</sup>	321.54±10.28	151.23±9.12 <sup>a</sup>
$t$ 值	-	0.728	8.119	1.415	18.785	1.062	33.279
$P$ 值	-	0.467	<0.001	0.159	<0.001	0.290	<0.001

注:与同组治疗前比较<sup>a</sup> $P < 0.05$ 。

### 3 讨论

AECOPD是一种急性起病的过程,具有病情重、发作快、影响大等特点,可严重威胁患者生命<sup>[8]</sup>。目前,临床上对于AECOPD的治疗除呼吸支持、化痰等治疗以外,抗生素也发挥着不可或缺的作用。

布地奈德是临床上常用的吸入性糖皮质激素,通过吸入性给药穿过细胞,与细胞质内糖皮质激素受体结合,形成活性激素受体复合物,穿透细胞核膜,与糖皮质激素应答因子共同作用于基因转录,抑制炎症,活化炎症因子,逆转气道高反应<sup>[9]</sup>。目前,临床上对于布地奈德的剂量存在一定争议,相关研究表明,采用大剂量布地奈德治疗对肺功能改善具有显著作用<sup>[10]</sup>。而相关研究认为,大剂量布地奈德存在较高不良反应的风险<sup>[11]</sup>。本研究结果说明高剂量布地奈德治疗AECOPD临床疗效显著。Shanzhou等<sup>[12]</sup>研究发现,AECOPD患者由于气道的炎症浸润,分泌物增多,不易咳出,易造成肺部过度充气、呼吸困难,表现为PCO<sub>2</sub>上升、PO<sub>2</sub>下降。而本研究结果说明高剂量布地奈德可提升细胞膜理化作用,通过去甲肾上腺素能的神经传导机制在数分钟内降低气道供血,发挥抗炎作用,改善患者机体缺氧状态。

既往临床文献表示,肺部感染与病原菌微生物紧密联系,当病原菌微生物感染后,可导致机体分泌大量炎症因子,进而加剧患者临床症状及病情程度<sup>[13]</sup>。PCT是常见的炎症因子,当机体发生炎症反应时,其含量会大量增加,具有较高的特异性<sup>[15]</sup>。MMP-9是一种糖蛋白,在正常生理情况下,表达量低,而在炎症因子、激素、生长因子刺激下和细胞转化过程中其表达量上升<sup>[14]</sup>。相关对COPD肺血管重塑机制研究显示,TIMP-1可抑制血管形成,其表达生上调可使细胞基质紊乱,加剧炎症反应,促使肺血管重塑<sup>[15]</sup>。本研究结果说明高剂量布地奈德在降低PCT、MMP-9及TIMP-1水平上较低剂量组显著。而对比两组患者不良反应比较差异无统计学意义,考虑原因与本研究治疗时间有限,用药周期较短有关。因此对于高剂量布地奈德的近期及远期副作用可能存在一定风险,后期将进一步深入研究。

综上所述,高剂量布地奈德AECOPD患者临床疗效显著,可有效改善肺功能及血气指标,降低PCT、MMP-9及TIMP-1水平,值得临床推广应用。

### 参考文献

- [1] Sun J, Zhao G. Clinical effects of lentinan combined with budesonide inhalation in treating acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease under mechanical ventilation [J]. *Exp Ther Med*, 2019, 17(5):1503-1508.
- [2] MA Deying. Clinical effects of Ambroxol hydrochloride combined with Salbutamol and Budesonide in treatment of chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Med J Chin People's Health*, 2019, 21(7):179-182.
- [3] Zhang R, Zhu J, Liu Y, et al. Optimization of Nebulized Budesonide in the Treatment of Acute Exacerbation of Chronic Obstructive Pulmonary Disease [J]. *Int J Copd*, 2020, 16(2):409-415.
- [4] Gu Y, Pang J, Sun Z, et al. Comparative efficacies of nebulized budesonide and systemic corticosteroids in the treatment of exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease: A systematic review and meta-analysis [J]. *J Clin Pharm Therap*, 2020, 45(3):372-376.
- [5] Zheng JP, Zhang J, Li JM, et al. Clinical outcomes of using nebulized budesonide as the initial treatment for acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease: a post-hoc analysis [J]. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2019, 157(32):2725-2731.
- [6] 慢性阻塞性肺疾病急性加重(AECOPD)诊治专家组.慢性阻塞性肺疾病急性加重(AECOPD)诊治中国专家共识(2017年更新版)[J]. *国际呼吸杂志*, 2017, 37(14):1041-1057.
- [7] 朱元璐,黄琴,余忠红.复方异丙托溴铵联合不同剂量布地奈德混悬液雾化吸入治疗儿童变异性哮喘的临床研究[J]. *解放军医药杂志*, 2019, 31(1):65-68+84.
- [8] Naya I, Tombs L, Lipson DA, et al. Impact of prior and concurrent medication on exacerbation risk with long-acting bronchodilators in chronic obstructive pulmonary disease: a post hoc analysis [J]. *Respir Res*, 2019, 20(1):301-304.
- [9] 李跃飞,徐靖华,杨永,等.呼吸训练联合布地奈德福莫特罗治疗慢性阻塞性肺疾病稳定期的临床效果[J]. *保健医学研究与实践*, 2020, 16(5):246-248.
- [10] Janson C, Benhaddi H, Michael T, et al. Real-world evidence effect of budesonide + formoterol Spiromax on patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease in Sweden [J]. *Eur Clin Respir J*, 2019, 6(1):512-516.
- [11] Wei B, Tian T, Liu YG. IL-10 Combined with NGAL Has Diagnostic Value for AECOPD Combined with AKI [J]. *Int J Copd*, 2020, 15(2):637-644.
- [13] Shanzhou H. Analysis on Curative Effect of Different Doses of Budesonide Atomization Inhalation in the Treatment of Children with Acute Attack of Asthma [J]. *Clin Med En*, 2019, 16(7):472-475.
- [14] Trpkovic S, Pavlovic A, Videnovic N, et al. Principles of oxygen administration and ventilatory support in patients with acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Praxis Medica*, 2019, 34(15):672-674.
- [15] LI CM. Therapeutic Effect of Budesonide Combined with Terbutaline in the Treatment of Acute Exacerbation of Chronic Bronchitis [J]. *Systems Med*, 2019, 26(8):246-249.

## EOS、25(OH)D3及SS水平变化与哮喘患儿病情关系

徐孟霞 刘霞 王静静 江忠\*

**[摘要]** **目的** 研究嗜酸性粒细胞计数(EOS)、25-羟维生素 D3(25(OH)D3)及生长抑素(SS)水平变化与哮喘患儿病情的关系。**方法** 选取2019年8月至2020年8月本院接收198例哮喘患儿临床资料作为研究组,根据2016年中华医学会儿科分会呼吸学组制定的《儿童支气管疾病诊断与防治指南》中哮喘的诊断标准,将患儿发病时的病情分为轻度组( $n=76$ )、中度组( $n=62$ )、重度组( $n=60$ )。另选取93例同期健康体检的正常儿童作为对照组。收集临床资料,比较不同人群EOS、25(OH)D3及SS水平,采用多元Logistic回归分析影响患儿哮喘控制结果的影响因素。**结果** 研究组患儿EOS及SS水平明显高于对照组,且25(OH)D3较对照组低,差异均具有统计学意义( $P<0.05$ )。EOS、SS水平显示:轻度组<中度组<重度组,而25(OH)D3水平显示:轻度组>中度组>重度组,差异均具有统计学意义( $P<0.05$ )。复查结果显示:127(64.14%)例控制良好(A组),71(35.85%)例控制欠佳(B组)。经多元Logistic回归显示,患儿过敏性鼻炎史、家族史、医嘱治疗史、EOS、25(OH)D3及SS水平为患儿哮喘控制不佳的独立危险因素( $P<0.05$ )。**结论** EOS、25(OH)D3及SS水平在哮喘患儿中呈异常表达状态,其表达水平与患儿病情密切相关,临床工作者可通过加强监测这三项指标,以了解哮喘疾病进展情况,评估患儿预后。

**[关键词]** 嗜酸性粒细胞计数;羟维生素 D3;生长抑素

### Correlation between the changes of EOS, 25(OH)D3 and SS levels and the severity of asthma in children

XU Mengxia, LIU Xia, WANG Jingjing, JIANG Zhong\*

Department of Pediatrics, Qingdao Central Hospital, Shandong, Qingdao, 266042

**[ABSTRACT]** **Objective** To study the correlation between the changes of eosinophil count (EOS), 25-hydroxyvitamin D3 (25(OH)D3) and somatostatin (SS) levels and the severity of asthma in children. **Methods** The clinical data of 198 children with asthma treated in our hospital from August 2019 to August 2020 were selected as the study group. According to the diagnostic criteria for asthma in the "Guidelines for the Diagnosis and Prevention of Children's Bronchial Diseases" formulated by the Respiratory Group of the Pediatric Branch of the Chinese Medical Association in 2016, patients were divided into the mild group ( $n=76$ ) and the moderate group ( $n=67$ ), the severe group ( $n=60$ ). Another 93 normal children who had a physical examination during the same period were selected as the control group. The clinical data was collected to compare the levels of EOS, 25(OH)D3 and SS in different population, and multivariate Logistic regression was used to analyze the factors that affect children's asthma. **Result** The levels of EOS and SS in the study group were significantly higher than those in the control group, and 25(OH)D3 was lower than that in the control group, the differences were statistically significant ( $P<0.05$ ). EOS and SS levels were as follows: mild group < moderate group < severe group, and 25(OH)D3 levels were as follows: mild group > moderate group > severe group ( $P<0.05$ ). Re-examination results showed that 127 (64.14%) cases were well controlled (group A), 71 (35.85%) cases were poorly controlled (group B). Multivariate logistic regression showed that children's history of allergic rhinitis, family history, treatment history of medical advice, EOS, 25(OH)D3 and SS levels

基金项目:山东省医药卫生科技计划项目(2019WS0076)

作者单位:青岛市中心医院儿科,山东,青岛 266042

\*通信作者:江忠, E-mail:843920078@qq.com

were independent risk factors for poor control of asthma in children (group B) ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The levels of EOS, 25(OH)D3 and SS are abnormally expressed in children with asthma, and their expression levels are closely related to the severity of the disease. Clinicians can strengthen monitoring of these three indicators to understand the progress of asthma and assess the prognosis of the child.

**[KEY WORDS]** EOS; 25(OH)D3; SS; Asthma

支气管哮喘(Bronchial asthma,简称哮喘)是儿童常见的呼吸道疾病,由嗜酸性粒细胞、T淋巴细胞、肥大细胞、呼吸道上皮细胞及中性粒细胞等多种细胞组成的气道慢性炎症性疾病<sup>[1]</sup>。该类疾病与气道高反应性相关,可出现广泛多变的可逆性气流受限,并引起反复发作性的喘息、气急、胸闷或咳嗽等症状,不及时治疗,可随病程延长产生不可逆性缩窄和气道重塑,对患儿身体健康及生活质量造成严重影响<sup>[2]</sup>。目前,关于哮喘患儿的发病原因尚未明确。25-羟维生素D3(25 hydroxyvitamin D3,25(OH)D3)作为维生素D主要的活性成分,其与哮喘之间的关系越来越引起研究者重视<sup>[3]</sup>。Montalbano等<sup>[4]</sup>对哮喘患者研究显示,生长抑素(Somatostatin,SS)参与支气管哮喘的发生、发展病理生理过程,在缺氧条件下拮抗组胺及氧自由基所引起的非特异性损伤,起到一定的保护作用。此外,嗜酸性粒细胞计数(Eosinophil count,EOS)是免疫和过敏反应过程中极为重要的细胞,其水平变化与哮喘病情密切相关<sup>[5]</sup>。本文就EOS、25(OH)D3及SS水平变化在哮喘患儿中表达及与病情进展的关系进行研究,旨在为临床治疗提供思路,现报道如下。

## 1 一般资料

### 1.1 资料与方法

选取2019年8月至2020年8月本院接收198例哮喘患儿临床资料作为研究组。其中,男109例,女89例,平均年龄( $7.41 \pm 2.71$ )岁。纳入标准:①所有患儿临床表现及实验室检查确诊,符合《儿童支气管疾病诊断与防治指南》的诊断标准<sup>[6]</sup>;②临床资料完整;排除标准:①近一个月内服用维生素D制剂者;②自身免疫疾病者;③合并肝肾功能严重不全及恶性肿瘤疾病者;④合并痴呆等精神疾患无法配合本研究开展者。根据2016年中华医学会儿科分会呼吸学组制定的《儿童支气管疾病诊断与防治指南》中哮喘的诊断标准<sup>[6]</sup>,将患者发病时病情分为:轻度组( $n=76$ )、中度组( $n=62$ )、重度组( $n=60$ )。另选取93例同期健康体检的正常儿童作为对照组,其中男51例,女42例,平均年龄

( $7.69 \pm 2.75$ )岁。两组性别、年龄等一般资料比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。本研究经医院伦理委员会批准,受试患儿家属均签署知情同意书。

### 1.2 研究方法

收集所有患儿临床资料,比较EOS、25(OH)D3及SS水平在哮喘患儿的变化情况。记录所有患儿在随访时间内哮喘控制情况,采用多元Logistic回归分析影响患儿哮喘控制不佳的危险因素。

### 1.3 观察指标

取所有患儿清晨空腹静脉全血5 mL,采用未加抗凝剂的标准采样管进行采集,离心( $3\ 000\ r/min$ ,10 min)取血清后分别存放在聚丙烯EP管中,在 $-80^\circ\text{C}$ 超低温冰箱中保存待检。采用酶联免疫吸附法检测25(OH)D3,试剂盒选用武汉华美生物有限公司。血常规检测EOS,按常规法计EOS绝对数。放射免疫法检测SS水平,试剂盒购自北京北方生物技术研究所。所有操作均按试剂盒操作说明进行。

### 1.4 哮喘控制情况判定标准

所有哮喘患儿均给予糖皮质激素、 $\beta_2$ 受体激动剂等对症支持治疗。在治疗后一个月采用儿童哮喘控制测试(Childhood asthma control test,C-ACT)<sup>[7]</sup>问卷对患者哮喘情况进行评分,以家长或医务人员对患儿进行帮助填写,满分27分,当得分 $< 19$ 分者表示控制不佳,其余情况均视为控制尚可。

### 1.5 统计学方法

采用SPSS 22.0软件进行统计分析,计数资料以 $n(\%)$ 表示,采用 $\chi^2$ 检验,计量资料采用 $(\bar{x} \pm s)$ 描述,组间比较采用 $t$ 检验;多组间比较采用 $F$ 检验;采用多元Logistic回归分析影响患儿哮喘控制不佳的危险因素,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 对比研究组与对照组儿童EOS、25(OH)D3及SS水平

研究组患儿EOS及SS水平明显高于对照组,且25(OH)D3较对照组低,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表1。

表1 两组儿童EOS、25(OH)D3及SS水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Comparison of EOS, 25(OH)D3 and SS levels between 2 group ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	EOS( $\times 10^9/L$ )	25(OH)D3(ng/mL)	SS(pg/mL)
对照组	93	0.15 $\pm$ 0.07	43.11 $\pm$ 3.15	312.15 $\pm$ 82.52
研究组	198	0.47 $\pm$ 0.12	15.42 $\pm$ 3.31	701.42 $\pm$ 72.33
t值		23.866	67.568	40.893
P值		<0.001	<0.001	<0.001

## 2.2 对比轻、中、重三组患儿EOS、25(OH)D3及SS水平

EOS、SS水平显示:轻度组<中度组<重度组, 25(OH)D3水平显示:轻度组>中度组>重度组,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。见表2。

表2 轻、中、重3组患儿EOS、25(OH)D3及SS水平 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 EOS, 25(OH)D3 and SS levels in mild, moderate and severe groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	EOS( $\times 10^9/L$ )	25(OH)D3(ng/mL)	SS(pg/mL)
轻度组	76	0.21 $\pm$ 0.09	38.41 $\pm$ 2.15	426.21 $\pm$ 61.33
中度组	62	0.34 $\pm$ 0.10	24.71 $\pm$ 3.42	533.51 $\pm$ 67.21
重度组	60	0.42 $\pm$ 0.17	17.12 $\pm$ 1.61	694.56 $\pm$ 79.19
F值		51.31	1284.98	254.33
P值		<0.001	<0.001	<0.001

## 2.3 哮喘患儿控制情况

198例患儿经治疗后复查显示,127(64.14%)例控制良好,71(35.85%)例控制欠佳,根据患儿哮喘控制情况进行分组,将哮喘控制良好的患儿设为A组,控制欠佳的患儿设为B组。

## 2.4 影响患儿哮喘控制不佳的单因素分析

单因素分析结果显示,A组与B组性别、天气变化等占比比较,差异均无统计学意义( $P>0.05$ ),A组与B组过敏性鼻炎史、家族史、家属吸烟史、粉尘有害气体接触史、医嘱治疗史、EOS、25(OH)D3及SS水平等占比比较,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。见表3。

表3 影响患儿哮喘控制不佳的单因素分析 [ $n(\%)$ , ( $\bar{x} \pm s$ )]

Table 3 single factor analysis of poor asthma control in children [ $n(\%)$ , ( $\bar{x} \pm s$ )]

因素	A组 (n=127)	B组 (n=71)	$\chi^2/t$ 值	P值
性别	男 64(0.50) 女 63(0.49)	45(0.63) 26(0.37)	3.104	0.078
过敏性鼻炎史	有 74(0.58) 无 53(0.41)	15(0.21) 56(0.79)	25.387	<0.001
家族史	有 84(0.66) 无 43(0.33)	25(0.35) 46(0.65)	17.607	<0.001
家属吸烟史	有 81(0.63) 无 46(0.36)	22(0.31) 49(0.69)	19.622	<0.001
天气变化	有 62(0.48) 无 65(0.51)	42(0.59) 29(0.41)	1.951	0.162
是否接触粉尘有害气体	有 92(0.72) 无 35(0.27)	23(0.32) 48(0.68)	29.997	<0.001
是否遵医嘱治疗	有 31(0.24) 无 96(0.75)	49(0.69) 22(0.31)	37.628	<0.001
EOS( $\times 10^9/L$ )	0.18 $\pm$ 0.05	0.42 $\pm$ 0.16	15.620	<0.001
25(OH)D3(ng/mL)	40.11 $\pm$ 5.02	13.52 $\pm$ 5.21	35.262	<0.001
SS(pg/mL)	308.13 $\pm$ 85.51	682.46 $\pm$ 79.11	30.332	<0.001

## 2.5 影响患儿哮喘控制不佳的多因素分析

患儿过敏性鼻炎史(有)、家族史(有)、医嘱治疗史(无)、EOS(异常)、25(OH)D3(异常)及SS(异常)水平为患儿哮喘控制不佳的独立危险因素( $P<0.05$ )。见表4。

## 3 讨论

据流行病学统计,全球哮喘的患病人数达1.6亿,其中儿童患病率高达28%,哮喘已成为危害社会的公共卫生问题<sup>[8]</sup>。如何有效治疗哮喘对患者具有重要意义。

EOS是一种胞浆内具有嗜酸性颗粒的粒细胞系白细胞,由造血干细胞经多能造血干细胞-髓系祖细胞分化而来,主要存在于组织中,能够促进和抑制急性炎症反应,EOS参与对蠕虫感染、过敏和某些肿瘤的介导或应答反应<sup>[9]</sup>。相关研究发现,

表4 影响患儿哮喘控制不佳的多因素分析

Table 4 Analysis of multiple factors influencing poor control of asthma in children

影响因素	回归系数	标准误	Wald $\chi^2$ 值	OR	95%CI	P值
家属吸烟史(有 vs 无)	0.794	0.895	4.596	2.21	0.38~12.78	0.292
家族史(有 vs 无)	0.869	0.161	4.596	2.38	1.74~3.26	<0.001
过敏性鼻炎史(有 vs 无)	0.893	0.325	4.523	2.44	1.29~4.62	<0.001
粉尘有害气体接触史(有 vs 无)	0.506	0.316	4.694	1.658	0.89~3.08	0.382
是否医嘱治疗(有 vs 无)	0.928	0.815	0.205	2.49	1.67~3.73	<0.001
EOS(异常 vs 正常)	0.712	0.314	4.489	2.03	1.10~3.77	<0.001
25(OH)D3(异常 vs 正常)	0.912	0.274	4.671	2.48	1.45~4.25	<0.001
SS(异常 vs 正常)	0.876	0.157	4.526	2.40	1.76~3.26	<0.001

EOS不仅是造血终端炎症效应细胞,还是多功能免疫调控细胞,可直接作用于HSC,破坏造血稳态,正反馈调控气道炎症<sup>[10]</sup>。Zhang等<sup>[11]</sup>研究表明,EOS是哮喘患者的特异性生物标志物,对患者具有深重意义。本研究结果说明EOS与哮喘病情密切联系。当EOS聚集浓度升高时,可作为预测患儿病情进展的有效指标。

随着生物学进展研究发现,维生素D在骨骼代谢、炎症、感染、免疫等方面发挥着重要作用;同时,维生素D被认为是促进过敏性疾病发展的因素之一,在哮喘的免疫应答及慢性气道炎症方面均发挥着复杂的调控作用<sup>[12]</sup>。Williams等<sup>[13]</sup>研究发现,25(OH)D3能通过结合卵蛋白改善气道高反应性状态、降低IgE水平、减少支气管肺泡中的嗜酸粒细胞、促进白细胞介素-10(Interleukin-10, IL-10)转化生长因子的生成,减轻哮喘患者的临床症状。本研究显示,25(OH)D3在哮喘患儿中水平较低,且为影响患儿哮喘控制不佳的危险因素,与上述研究一致。考虑原因与25(OH)D3诱导抗原提呈细胞耐受性,可在不影响T细胞分化、活性的情况下,促进T细胞生长,增加特异性表型基因表达,促进免疫因子分泌有关。

SS由中枢神经系统、神经纤维、消化道等组织D细胞分泌,属抑制激素,除抑制生长激素的分泌外,还可拮抗胃泌素、胃动素的作用,从而减少胃酸、胃蛋白酶的分泌及胃肠道的蠕动<sup>[14]</sup>。相关学者对哮喘急性发作患者研究显示,在该类患者发作时,SS水平升高,与血氧分压及哮喘控制呈正相关,提示SS可作为判断哮喘患者疾病程度与预后的生物学标志<sup>[15]</sup>。本研究结果与上述研究一致,有力证明了SS水平与哮喘患儿关系密切,但关于其以何种作用机制调节哮喘疾病的进展仍未明确,后续仍将继续深入研究。

综上所述,EOS、25(OH)D3、SS水平在哮喘患儿中呈异常表达状态,其表达水平与患儿病情密切相关,临床工作者可通过加强监测这三项指标,以了解哮喘患儿疾病进展情况,评估患儿预后。

## 参考文献

- [1] 刘帆,韩秀珍,孙妍. Nod样受体蛋白3炎性小体及细胞焦亡在支气管哮喘中的作用[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2020, 35(12):955-957.
- [2] Hakamifard A, Fatemi MR, Maghami-Mehr A. Relationship between Severity of Asthma Attacks and Vitamin D Levels in Children[J]. J Med Sci, 2020, 40(1):17-23.
- [3] Fischl A, Eckrich J, Passlack V, et al. Comparison of bronchial and nasal allergen provocation in children and adolescents with bronchial asthma and house dust mite sensitization [J]. Pediatr Allergy Immunol, 2020, 31(160):381-385.
- [4] Montalbano L, Ferrante G, Montella S, et al. Relationship between quality of life and behavioural disorders in children with persistent asthma: a Multiple Indicators Multiple Causes (MIMIC) model[J]. Sci Rep, 2020, 10(1):312-315.
- [5] Juan X, Hua W, Huan L, et al. Relationship between severity of disease and serum levels of fat-soluble vitamins in children with atopic dermatitis [J]. J Clin Pediatr, 2019, 19(3):162-167.
- [6] 中华医学会儿科学分会呼吸学组,《中华儿科杂志》编辑委员会. 儿童支气管哮喘诊断与防治指南(2016年版)[J]. 中华儿科杂志, 2016, 54(3):167-181.
- [7] Vakili M, Aliyali M, Mortezaee V, et al. Relationship between spirometry results and colonisation of Aspergillus species in allergic asthma[J]. Clin Res J, 2020, 27(14):457-459.
- [8] Lo DK, Beardsmore CS, Roland D, et al. Lung function and asthma control in school-age children managed in UK primary care: a cohort study[J]. Thorax, 2019, 75(2):513-515.
- [9] Refaat MM, Sayed EE, El-Fattah WA, et al. Relationship between sputum periostin level and inflammatory asthma phenotypes in Egyptian patients [J]. J Asthma, 2020, 11(2):352-357.
- [10] 买智涛,姜明明,万善志. FeNO联合血清ECP,IgE检测对支气管哮喘的临床诊断价值[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(5):87-90, 95.
- [11] Zhang R, Gong J, Wang S, et al. Relationship Between Serum B7-H3 Levels and Prognosis of Congenital Heart Disease in Children[J]. Ped Cardiol, 2019, 40(1):177-181.
- [12] Groth EE, Weber M, Bahmer T, et al. Exploration of the sputum methylome and omics deconvolution by quadratic programming in molecular profiling of asthma and COPD: the road to sputum omics 2.0[J]. Respir Res, 2020, 21(1):437-439.
- [13] Williams TC, Jackson DJ, Maltby S, et al. Rhinovirus-induced CCL17 and CCL22 in Asthma Exacerbations and Differential Regulation by STAT6 [J]. Am J Res Cell Mol Biol, 2020, 13(4):552-554.
- [14] Kizilirmak D, Bülent B, Karamanli H. Relationship between ghrelin and obestatin levels and ghrelin/obestatin ratio in patients with asthma[J]. Tuberk Toraks, 2020, 68(1):9-16.
- [15] Qiong T, Juan L, Min L, et al. Relationship Between Changes of Serum Levels of IL-4, IFN- $\gamma$  and TGF- $\beta$ 1 and the Lung Function in Children Patients with Acute Attack of Asthma [J]. Labe Immun Clin Med, 2019, 24(8):446-449.

# 妊娠期糖尿病患者血清和胎盘氧化应激相关蛋白表达水平与妊娠结局的关系

谈炯新 李蕊 郭绮棱 刘怀昌 肖磊\*

**[摘要]** **目的** 探讨妊娠期糖尿病患者血清和胎盘氧化应激相关蛋白表达水平与妊娠结局的关系。**方法** 选取2017年8月至2019年6月于本院产科门诊接受孕期检查诊断为GDM的孕妇共108例(GDM组),选择90例正常孕妇作为对照组,记录两组的妊娠结局,采用ELISA测定所有孕妇的血清GSH、MDA和SOD1水平,以及采用免疫组化检测胎盘组织的SOD1、HO-1、NQO1和Nrf2表达水平,分析胎盘组织氧化应激相关蛋白表达水平与妊娠结局的关系。**结果** GDM组孕妇的GSH和MDA指标显著低于对照组( $P<0.05$ ),且GDM组孕妇的SOD1指标显著高于对照组( $P<0.05$ )。GDM组孕妇的胎盘SOD1与血清GSH、SOD呈显著的正相关( $P<0.05$ ),与血清MDA呈显著的负相关( $P<0.05$ )。而胎盘HO-1、NQO1和Nrf2的表达水平均与血清GSH、SOD1呈显著的负相关,而与血清MDA呈显著的正相关( $P<0.05$ ),剖宫产孕妇的胎盘组织中SOD1表达水平显著低于非剖宫产孕妇( $P<0.05$ ),而HO-1、NQO1和Nrf2表达水平显著高于非剖宫产孕妇( $P<0.05$ )。**结论** 妊娠期糖尿病患者的血清和胎盘组织存在显著的氧化应激状态,胎盘组织的氧化应激指标与剖宫产及早产的发生密切相关。

**[关键词]** 氧化应激;妊娠期糖尿病;妊娠结局;SOD1;HO-1

## Relationship between the expression of oxidative stress-related proteins in serum and placenta of pregnant women with gestational diabetes mellitus and pregnancy outcomes

TAN Jiongxin, LI Rui, GUO Qiling, LIU Huaichang, XIAO Lei\*

(Department of Internal Medicine, Foshan Maternity and Child Health Hospital, Foshan, Guangdong, China, 528000)

**[ABSTRACT]** **Objective** To investigate the relationship between serum and placental oxidative stress-related protein expression and pregnancy outcome in patients with gestational diabetes mellitus. **Methods** A total of 108 pregnant women who were diagnosed with GDM during pregnancy during the period from August 2017 to June 2019 in our hospital were selected. 90 normal pregnant women were selected as the control group. The pregnancy outcomes of 2 groups were recorded. Serum GSH, MDA and SOD1 levels were measured by ELISA in all pregnant women, and the expression levels of SOD1, HO-1, NQO1 and Nrf2 in placenta were detected by immunohistochemistry. The relationship between oxidative stress-related protein levels in placenta and pregnancy outcomes were analyzed. **Results** The GSH and MDA indicators of the GDM group were significantly lower than those of the control group ( $P<0.05$ ), and the SOD1 level of the GDM group was significantly higher than that of the control group ( $P<0.05$ ). There was a significant positive correlation between placental SOD1 and serum GSH and SOD1 ( $P<0.05$ ), and a significant negative correlation with serum MDA ( $P<0.05$ ) in pregnant women with GDM. The expression levels of HO-1, NQO1 and Nrf2 in placenta were significantly negatively correlated with serum GSH and SOD1, but positively correlated with serum MDA ( $P<0.05$ ). The expression level of SOD1 in placental tissues of cesarean section pregnant women was significantly lower than that in non-cesarean section pregnant women ( $P<0.05$ ), and HO-1, NQO1 and Nrf2 expression levels were signifi-

基金项目:广东省医学科学技术研究基金项目(A2019214);佛山市卫生和计生局医学科研(20180131)

作者单位:佛山市妇幼保健院内科,广东,佛山528000

\*通信作者:肖磊, E-mail: greenhot@163.com

cantly higher than non-caesarean section pregnant women ( $P<0.05$ ). **Conclusion** The serum and placental tissues of patients with gestational diabetes have significant oxidative stress. The oxidative stress indicators of placental tissue are closely related to the occurrence of cesarean section and premature delivery.

**[KEY WORDS]** Oxidative stress; Gestational diabetes; Pregnancy outcome; SOD1; HO-1

妊娠期糖尿病(Gestational diabetes mellitus, GDM)的发病率每年逐渐上升<sup>[1]</sup>。GDM和分娩并发症的发生密切相关<sup>[2-3]</sup>。预防和及早干预GDM是目前临床的重要方向,但GDM其具体的发生机制仍未明确。研究表明,氧化应激在GDM的发生中起着重要作用<sup>[4]</sup>。国外研究表明,患有GDM的孕妇表现出高血糖诱导的循环氧化应激增加和抗氧化酶的减少<sup>[5]</sup>。胎盘是胎儿与母体之间物质交换的重要器官,孕妇处于糖尿病或高葡萄糖状态下时,胎盘中的氧化应激反应会有所增强,有研究指出胎盘应对母体发生氧化应激时具有保护作用。进一步研究<sup>[6]</sup>发现,NOS2启动子中功能性多态性rs2779249位点的变异基因型是反复妊娠流产的潜在风险,因此,胎盘氧化应激机制与妊娠结局密切相关。但目前对于GDM患者中胎盘的氧化应激指标与妊娠结局的关系仍未明确少见报道。因此,本研究旨在探讨GDM患者胎盘和血清中氧化应激标志物的变化,并评估这些标志物与GDM患者妊娠结局之间的关系。

## 1 资料与方法

### 1.1 病例资料

选取2017年8月至2019年6月于本院产科门诊接受孕期检查诊断为GDM的孕妇共108例作为GDM组,选取同期的健康孕妇90例作为对照组;本研究获得医院伦理委员会审核通过。记录所有孕妇的一般资料,包括年龄、体重指数、孕周、妊娠结局,包括剖腹产、巨大儿、胎膜早破、早产的比例。

纳入标准:①符合妊娠期糖尿病的诊断标准<sup>[7]</sup>;根据妊娠24~28周口服葡萄糖耐量试验(OGTT)的结果诊断为GDM。②年龄为18~40岁;③经患者知情同意并签署同意书。④所有孕妇获得随访;排除妊娠期高血压、先兆子痫、甲状腺机能减退和前置胎盘的孕妇。

### 1.2 标本收集

在孕妇32周和分娩前血糖稳定后,收集静脉血,经离心后取血清在 $-80^{\circ}\text{C}$ 下冰箱中保存,直至进

一步处理。然后跟踪所有患者的妊娠结局。然后通过收集所有孕妇产后的胎盘组织,用于通过免疫组织化学测定观察胎盘中氧化应激表达的标志物。

### 1.3 血清指标检测

氧化应激指标检测:还原型谷胱甘肽(Glutathione, GSH)、超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)1、丙二醛(Malondialdehyde, MDA)均采用ELISA法进行测定。其中一抗GSH(GD-G8141)、SOD1(YB-E11086)和MDA(YS05455B)ELISA检测试剂盒均购自上海钰博生物科技有限公司。具体检测方法严格按照说明书上进行,具体操作由本院检验科医生完成。

### 1.4 免疫组化检测

孕妇分娩后15 min内,从胎盘组织中取大小约 $1\times 1\times 1\text{ cm}$ 的全厚胎盘组织固定在10%福尔马林中。收集样本时避免出现边缘、钙化、出血和坏死的区域。将组织进行石蜡包埋,切成 $5\text{ }\mu\text{m}$ 进行制片作免疫组织化学染色。免疫组化计算方法<sup>[6]</sup>:染色强度分级为0至3级,0为未染色,1为棕黄色,2为黄色,3为棕色。染色程度评分如下:0分、1分、2分、3分<sup>[7]</sup>。将染色强度和程度相乘得到总分以确定表达强度:0表示无表达,1~3分表示弱表达,4~6分为中等表达;7~9为强表达。

### 1.5 统计方法

采用SPSS 24.0软件统计数据,计量资料采用 $(\bar{x}\pm s)$ 表示,比较采用 $t$ 检验,计数资料采用 $n(\%)$ 表示,比较采用卡方检验。使用Spearman相关分析不同指标的相关性, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 两组孕妇的一般情况对比

两组患者的平均年龄、体重、BMI和孕周对比差异均无统计学意义( $P>0.05$ ),见表1。

### 2.2 两组孕妇的妊娠结局对比

GDM组孕妇妊娠结局发生剖宫产和早产的比例显著高于对照组,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),两组发生巨大儿和胎膜早破的比例差异无统计学意义( $P>0.05$ )。见表2~3。

表1 两组孕妇的一般指标比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

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

组别	n	SOD1	HO-1	NQO1	Nrf2
GDM组	108	5.4±0.9	7.3±1.2	6.4±1.3	5.3±0.9
对照组	90	6.7±0.7	4.9±2.1	4.6±1.1	3.5±1.0
t值		11.172	10.070	10.395	13.321
P值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

表2 两组孕妇的妊娠结局比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Comparison of pregnancy outcomes between 2 groups of pregnant women ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	年龄(岁)	体重(kg)	BMI(kg/m <sup>2</sup> )	孕周(周)
GDM组	108	30.6±2.1	56.5±1.7	23.3±1.7	37.3±0.5
对照组	90	30.4±2.8	56.8±1.9	23.1±1.5	37.4±0.4
t值		0.574	1.172	0.852	1.532
P值		0.567	0.243	0.395	0.127

表3 两组孕妇的血清氧化应激指标比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 3 Comparison of serum oxidative stress indicators between 2 groups of pregnant women ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	剖宫产	巨大儿	胎膜早破	早产
GDM组	108	53	13	16	12
对照组	90	29	6	9	3
$\chi^2$ 值		5.746	1.632	1.032	4.241
P值		0.017	0.201	0.310	0.039

2.3 两组孕妇胎盘组织的氧化应激指标表达情况  
分娩前和32周的GSH、SOD1和MDA水平对比差异均无统计学意义( $P>0.05$ ),分娩前和32周的GDM组孕妇的GSH和MDA指标低于对照组,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),GDM组孕妇的SOD1指标高于对照组( $t=9.721, P<0.05$ )。见表4、图1。

表4 两组孕妇胎盘组织的氧化应激指标表达情况 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 4 The expression of oxidative stress indicators in the placenta tissue of 2 groups of pregnant women ( $\bar{x} \pm s$ )

时间	组别	n	GSH ( $\mu\text{mol/mL}$ )	SOD1 (U/mL)	MDA (nmol/L)
32周	GDM组	108	2.13±0.21	12.4±1.9	1.82±0.29
	对照组	90	2.41±0.23	14.8±1.5	1.64±0.15
	t值		8.945	9.721	5.323
	P值		<0.001	<0.001	<0.001
分娩前	GDM组	108	2.21±0.33	12.8±2.6	1.85±0.26
	对照组	90	2.45±0.35	15.3±2.9	1.70±0.29
	t值		4.957	6.392	3.835
	P值		<0.001	<0.001	<0.001

2.4 血清和胎盘氧化应激指标的关系

GDM组孕妇的胎盘SOD1与血清GSH、SOD呈正相关( $P<0.05$ ),血清MDA呈负相关( $P<0.05$ )。胎盘HO-1、NQO1和Nrf2的表达水平与血清GSH、SOD呈负相关,与血清MDA呈正相关( $P<0.05$ )。见表5。

表5 血清和胎盘氧化应激指标的相关性分析

Table 5 Correlation analysis of serum and placental oxidative stress indicators

指标	SOD1		HO-1		NQO1		Nrf2	
	r值	P值	r值	P值	r值	P值	r值	P值
GSH	0.432	<0.05	-0.417	<0.05	-0.521	<0.05	-0.461	<0.05
SOD	0.857	<0.05	-0.367	<0.05	-0.561	<0.05	-0.426	<0.05
MDA	-0.358	<0.05	0.551	<0.05	0.387	<0.05	0.451	<0.05

2.5 胎盘氧化应激指标与妊娠结局的关系

剖宫产孕妇的胎盘组织中SOD1表达水平低于非剖宫产孕妇( $P<0.05$ ),HO-1、NQO1和Nrf2表达水平高于非剖宫产孕妇( $P<0.05$ )。出现早产的孕妇其胎盘组织SOD1表达水平低于非早产孕妇,HO-1高于早产孕妇,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。见表6。

表6 GDM孕妇不同妊娠结局的胎盘氧化应激指标比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 6 Comparison of placental oxidative stress indexes of different pregnancy outcomes in GDM pregnant women ( $\bar{x} \pm s$ )

妊娠结局	n	SOD1	HO-1	NQO1	Nrf2	
剖宫产	是	53	4.9±0.8	7.7±1.5	6.9±1.6	5.6±1.1
	否	55	5.8±1.2	6.9±1.4	5.9±1.5	5.0±1.2
	t值		4.568	2.867	3.352	2.706
	P值		<0.001	0.005	0.001	0.008
巨大儿	是	13	5.6±1.9	7.8±1.9	6.8±2.1	5.2±2.1
	否	95	5.4±1.0	7.2±1.3	6.3±1.4	5.3±1.0
	t值		0.594	1.469	1.130	0.287
	P值		0.554	0.145	0.261	0.774
胎膜早破	是	16	5.2±1.6	7.1±1.6	6.0±2.0	5.0±1.8
	否	92	5.4±1.1	7.3±1.4	6.5±1.3	5.4±1.2
	t值		0.624	0.516	1.300	1.134
	P值		0.534	0.607	0.196	0.259
早产	是	12	3.8±1.7	7.9±0.8	7.1±2.2	5.9±2.2
	否	96	5.6±1.2	7.2±1.1	6.3±1.5	5.2±1.1
	t值		4.661	2.131	1.645	1.815
	P值		<0.001	0.035	0.103	0.072

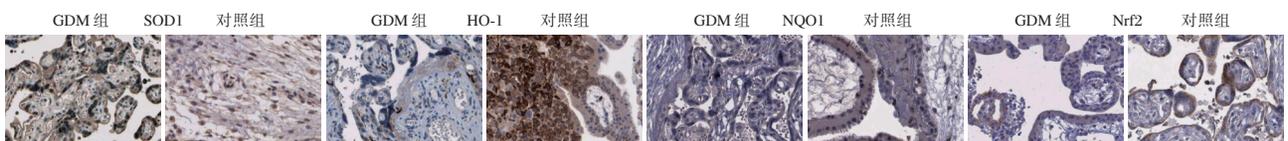


图1 免疫组化图 (IHC, ×200)

Figure 1 Immunohistochemical diagram (IHC, ×200)

### 3 讨论

氧化应激由 ROS 与抗氧化防御共同调节,其调节失衡是导致组织损伤的重要因素。目前对于 GDM 的发病确切机制尚未清楚,既往研究表明氧化应激在 GDM 的病情进展中具有重要作用<sup>[8]</sup>。既往研究<sup>[9]</sup>主要集中在对 GDM 孕妇血清学指标进行监测,但胎盘是胎儿与孕妇之间物质交换的重要器官,GDM 孕妇机体存在氧化应激的状态,其可能直接影响胎盘组织的抗氧化应激变化<sup>[10]</sup>。因此,本研究重点探讨 GDM 孕妇中胎盘组织中氧化应激相关指标的表达情况以及其与妊娠结局的关系。

SOD 和 GSH 是人体中普遍存在的抗氧化剂,可以保持氧化还原反应的平衡<sup>[10]</sup>,但它们在 GDM 胎盘组织中的表达尚未明确。本结果表明了 GDM 孕妇机体中胎盘组织的抗氧化能力显著下降。血红素氧合酶-1(heme oxygenase, HO-1)是一种可诱导的应激蛋白,HO-1 被广泛认为是一种高度敏感和可靠的氧化应激标记物<sup>[11]</sup>。既往有研究<sup>[11]</sup>在胎盘的绒毛滋养细胞中观察到 HO-1 的表达。同时,NQO1 是 Nrf2-ARE 途径的下游调节因子,Nrf2 的过表达显著增加了 GDM 细胞中 Nrf2 和 NQO1 的表达<sup>[12]</sup>。Nrf2 抗氧化防御途径可能为改善与糖尿病相关的氧化应激提供潜在治疗靶点<sup>[12]</sup>。这些数据表明氧化应激及其相关分子在 GDM 中起重要作用,也表明了胎盘组织的相关抗氧化因子表达可能是保护胎儿的重要途径。

目前胎盘氧化应激相关因子的表达变化是否会影响孕妇的临床结果仍未明确。研究<sup>[13]</sup>表明,GDM 患者的围产期不良结局风险增加,包括巨大儿、宫内胎儿死亡、新生儿死亡、难产和先兆子痫。本研究中,SOD、HO-1、NQO1 和 Nrf2 水平均与孕妇剖宫产的发生率密切相关。既往研究<sup>[14]</sup>显示 GDM 和巨大儿与 SOD 活动受损有关,GDM 母亲及其巨大婴儿的总血清抗氧化防御状态减少。但本研究中是否产巨大婴儿的孕妇胎盘组织相关因子表达水平没有显著差异,这可能是本研究纳入的样本量仍比较少。因此,GDM 孕妇的胎盘组织中存在明显的氧化应激状态。SOD、HO-1、Nrf2 和 NQO1 可被认为是评估 GDM 孕妇胎盘和胎儿氧化应激的有用标志物。

由于本研究的样本量比较少,仍需要进一步加大样本量和随访时间进行评价。综合上述,妊娠期糖尿病患者的血清和胎盘组织存在显著的氧

化应激状态,胎盘组织的氧化应激指标与剖宫产及早产的发生密切相关。

### 参考文献

- [1] 邱淑芬,姜云. 妊娠期糖尿病流行病学特征及危险因素和预防措施分析[J]. 中国预防医学杂志, 2019,20(5):451-454.
- [2] 温洁,刘萍,郭蕊. 血清中 OPG、TNF- $\alpha$  和脂联素对妊娠期糖尿病的诊断分析[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(4):450-453+468.
- [3] Cosson E, Cussac-p C, Benbara A, et al. Pregnancy adverse outcomes related to pregravid body mass index and gestational weight gain, according to the presence or not of gestational diabetes mellitus: a retrospective observational study[J]. Diabetes Metab, 2016,42: 38-46.
- [4] Sultan S, Alzahrani N, Al-sakkaf K. The postpartum effect of maternal diabetes on the circulating levels of sirtuins and superoxide dismutase[J]. FEBS Open Bio, 2018,8:256-263.
- [5] Yazlik MO, Colakoglu HE, Pekcan M, et al. The evaluation of superoxide dismutase activity, neutrophil function, and metabolic profile in cows with retained placenta [J]. Theriogenology, 2019(128):40-46.
- [6] Fortis MF, Fraga LR, Boquett JA, et al. Angiogenesis and oxidative stress-related gene variants in recurrent pregnancy loss[J]. Rep Fertl Dev, 2018, 30(3):498-506.
- [7] 王昊,漆洪波. 美国妇产科医师学会“妊娠期糖尿病指南(2017)要点解读[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2018, 34(1):62-66.
- [8] Santacroce A, Bernardo GD, Negro S, et al. Diabetes or obesity in pregnancy and oxidative stress in the offspring[J]. Pediatr Biochem, 2016, 6: 92-95.
- [9] 李茂香,李玉,吕媛媛,等. 血清 Chemerin、25(OH)D3、visfatin 水平检测对妊娠期糖尿病的诊断价值及与患者胰岛素抵抗的关联性[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2019,11(06):503-507.
- [10] Saleha A, Fatima MT, Sadia FS. Post-partum follow-up of women with gestational diabetes mellitus: effectiveness, determinants, and barriers [J]. J Matern Fetal Neonatal Med, 2018, 31: 1607-1612.
- [11] Luo Z, Xu X, Sho T, et al. Effects of n-acetyl-cysteine supplementation in late gestational diet on maternal-placental redox status, placental NLRP3 inflammasome, and fecal microbiota in sows1[J]. J Anim Sci, 2019, 97(4):1757-1771.
- [12] Yan X, Fu X, Jia Y, et al. Nrf2/Keap1/ARE Signaling Mediated an Antioxidative Protection of Human Placental Mesenchymal Stem Cells of Fetal Origin in Alveolar Epithelial Cells [J]. Oxid Med Cell Longev, 2019(2019):2654910.
- [13] Zhang C, Yang Y, Chen R, et al. Aberrant expression of oxidative stress related proteins affects the pregnancy outcome of gestational diabetes mellitus patients [J]. Am J Transl Res, 2019, 15(1):269-279.
- [14] Cui X, Li L, Yan G, et al. High expression of NQO1 is associated with poor prognosis in serous ovarian carcinoma [J]. BMC Cancer, 2015, 15: 244.

# PTA患者关节液中IL-1、TGF- $\beta$ 及TNF- $\alpha$ 的表达及临床意义

冯文涛 李松伦 何玉祥\*

**[摘要]** **目的** 分析创伤性关节炎(PTA)患者关节液中白细胞介素-1(IL-1)、转化生长因子- $\beta$ (TGF- $\beta$ )及肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )的表达及临床意义。**方法** 选取2017年8月至2020年8月本院收治的192例PTA患者作为研究对象,根据膝骨性关节炎严重性指数(index of severity for knee joint osteoarthritis, ISOA)分为中度组( $n=45$ )、严重组( $n=46$ )、非常严重组( $n=50$ )、极严重组( $n=51$ )。同时纳入155例健康志愿者作为对照组。比较各组间IL-1、TGF- $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 水平差异,采用Pearson法分析PTA患者IL-1、TGF- $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 水平与ISOA的相关性。**结果** 研究组IL-1、TGF- $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 水平均高于对照组,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。不同严重程度者IL-1、TGF- $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 水平比较:中度组<严重组<非常严重组<极严重组,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。PTA患者IL-1、TGF- $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 水平与ISOA呈正相关关系( $P<0.05$ )。**结论** IL-1、TGF- $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 水平在PTA患者异常升高,三者与患者病情严重程度呈显著正相关性,其表达情况可作为评估病情程度的依据。

**[关键词]** 创伤性关节炎;白细胞介素1;转化生长因子 $\beta$ ;肿瘤坏死因子- $\alpha$

## Expressions and clinical significance of IL-1, TGF- $\beta$ and TNF- $\alpha$ in the joint fluid of patients with post-traumatic arthritis

FENG Wentao, LI Songlun, HE Yuxiang\*

(Department of Orthopedics, Youyang Hospital, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, China, 409800)

**[ABSTRACT]** **Objective** To analyze the expressions of interleukin-1 (IL-1), transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in the joint fluid of patients with post-traumatic arthritis (PTA) and analyze the clinical significance. **Methods** A total of 192 patients with PTA admitted to our hospital from August 2017 to August 2020 were selected as the research subjects. According to the index of severity for knee joint osteoarthritis (ISOA), they were divided into a moderate group ( $n=45$ ), severe group ( $n=46$ ), very severe group ( $n=50$ ), extremely severe group ( $n=51$ ). At the same time, 155 healthy volunteers were included as a control group. The differences in the levels of IL-1, TGF- $\beta$ , and TNF- $\alpha$  between the groups were compared. The Pearson method was used to analyze the correlation between the levels of IL-1, TGF- $\beta$ , and TNF- $\alpha$  in PTA patients with ISOA. **Results** The levels of IL-1, TGF- $\beta$  and TNF- $\alpha$  in the study group were higher than those in the control group, and the differences were statistically significant ( $P<0.05$ ). **Comparison** of levels of IL-1, TGF- $\beta$ , and TNF- $\alpha$  in patients with different severity levels: moderate group <severe group <very severe group <extremely severe group, the differences were statistically significant ( $P<0.05$ ). The levels of IL-1, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$  in PTA patients were positively correlated with ISOA ( $P<0.05$ ). **Conclusion** The levels of IL-1, TGF- $\beta$ , and TNF- $\alpha$  are abnormally elevated in PTA patients, and the three are significantly positively correlated with the severity of the patient's condition, and their expression can be used as a basis for assessing the severity of the condition.

**[KEY WORDS]** Traumatic arthritis; Interleukin-1; Transforming growth factor  $\beta$ ; Tumor necrosis factor- $\alpha$

基金项目:重庆市卫生计生委医学科研项目(2017ZDXM015)

作者单位:重庆医科大学附属第一医院酉阳医院骨科,重庆 409800

\*通信作者:何玉祥, E-mail:yyheyuxiang@163.com

创伤性关节炎(Post-traumatic arthritis, PTA)是关节创伤引起的以关节软骨的退化变性和继发的软骨增生、骨化为主要病理变化,以关节疼痛、活动功能障碍为主要临床表现的一种疾病<sup>[1]</sup>。近年来,PTA的发病率呈现不断上升趋势。由于目前对PTA的早期诊断十分困难,且缺乏特异性的干预措施以减少发病率以及减缓病程的进展,故加强对PTA发生与发展过程的研究意义重大。大量研究表明炎症细胞因子在骨关节炎发病过程中发挥重要的作用,其中白细胞介素-1(interleukin-1, IL-1)、转化生长因子- $\beta$ (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )及肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )是参与软骨退变及降解并引起PTA症状的最重要的细胞因子<sup>[2-3]</sup>。本研究就IL-1、TGF- $\beta$ 及TNF- $\alpha$ 在PTA患者中的表达及临床意义进行研究。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选取2015年8月至2020年8月本院收治的192例PTA患者作为研究对象,其中男101例,女91例,平均年龄(46.51±2.02)岁。

纳入标准:①满足PTA诊断标准<sup>[4]</sup>;②关节未注射过药物者;③临床资料完整。

排除标准:①风湿性疾病、感染性关节炎、代谢性关节病、关节内肿瘤以及其他特异性关节疾病;②合并全身营养不良;③合并肝、肾、心、肺等重要器官功能不全者;④患侧肢体神经、血管损伤者;⑤合并血液系统、免疫功能疾病者。根据采用膝骨性关节炎严重性指数(index of severity for knee joint osteoarthritis, ISOA)<sup>[5]</sup>进行分组,分为中度组(5~7分,  $n=45$ )、严重组(8~10分,  $n=46$ )、非常严重组(11~13分,  $n=50$ )、极严重组(14分,  $n=51$ )。同时纳入155例健康志愿者作为对照组,其中男85例,女70例,平均年龄(46.68±2.17)岁。间一般资料比较差异无统计学意义

( $P>0.05$ ),具有可比性。本研究已获得本院医学伦理委员会批准,所有受试者均签署知情同意书。

### 1.2 检测方法<sup>[6]</sup>

所有受试者平卧位屈膝90°,取内、外侧膝眼处为穿刺点,局部浸润麻醉后,以7号注射针向内侧穿刺进入关节腔内,抽取关节液1 mL(在关节液量不足1 mL的患者可先注入无菌生理盐水10 mL后再抽吸)。抽取的关节液注入EP管,在4℃的环境中,离心(3 000 r/min, 10 min)取上清液,保存于-20℃冰箱中待检。采用酶联免疫吸附法检测IL-1、TGF- $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 水平,试剂盒均购自武汉博士德生物工程有限公司,严格按照使用说明书进行操作。

### 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;相关性采用Pearson相关分析;以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 研究组与对照组IL-1、TGF- $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 水平比较

研究组IL-1、TGF- $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 水平均高于对照组,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。见表1。

表1 研究组与对照组IL-1、TGF- $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 水平比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	$n$	IL-1 (pg/mL)	TGF- $\beta$ (ng/mL)	TNF- $\alpha$ (pg/mL)
研究组	192	26.85±10.41	8.98±3.31	35.81±11.49
对照组	155	4.03±1.52	4.05±1.22	4.85±1.01
$t$ 值		27.053	17.599	33.433
$P$ 值		<0.001	<0.001	<0.001

### 2.2 不同严重程度者IL-1、TGF- $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 水平比较

不同严重程度者IL-1、TGF- $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 水平比较:中度组<严重组<非常严重组<极严重组,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。见表2。

表2 不同严重程度者IL-1、TGF- $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 水平比较( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Comparison of IL-1, TGF- $\beta$  and TNF- $\alpha$  levels in patients with different severity ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	$n$	IL-1 (pg/mL)	TGF- $\beta$ (ng/mL)	TNF- $\alpha$ (pg/mL)	ISOA (分)
中度组	45	21.05±5.74	5.74±1.26	30.71±5.88	6.01±0.82
严重组	46	25.78±6.35 <sup>a</sup>	7.39±1.73 <sup>a</sup>	36.74±6.12 <sup>a</sup>	9.18±0.86
非常严重组	50	29.11±6.87 <sup>ab</sup>	8.66±2.90 <sup>ab</sup>	39.98±6.33 <sup>ab</sup>	12.74±0.26
极严重组	51	34.09±3.15 <sup>abc</sup>	10.89±1.05 <sup>abc</sup>	43.08±3.74 <sup>abc</sup>	14.01±0.13
$F$ 值		44.79	63.56	42.71	
$P$ 值		<0.001	<0.001	<0.001	

注:<sup>a</sup>与中度组比较, $P<0.05$ ; <sup>b</sup>与严重组比较, $P<0.05$ ; <sup>c</sup>与非常严重组比较, $P<0.05$ 。

### 2.3 PTA患者IL-1、TGF- $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 水平与ISOA的相关性

PTA患者IL-1( $r=0.980$ )、TGF- $\beta$ ( $r=0.840$ )、TNF- $\alpha$ ( $r=0.978$ )水平与ISOA呈正相关关系( $P<0.05$ )。见图1。

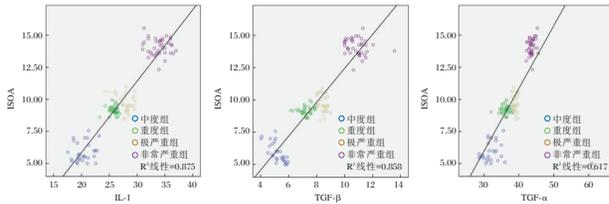


图1 IL-1、TGF- $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 水平与ISOA的相关性分析散点图

Figure 1 Scatter diagram of correlation analysis between IL-1, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$  levels and ISOA

### 3 讨论

随着操作技术的不断进步以及内固定物材料的不断改进,关节内骨折的外科治疗多能达到解剖复位关节面的要求,但PTA的发病率依然较高<sup>[7]</sup>。因此,寻求有效的临床指标以提高早期诊断率及临床干预有效率,对改善患者生活质量有重要意义。

研究显示,PTA是一个由多细胞因子参与、多病理途径、多机制相互作用的复杂病理过程<sup>[8]</sup>。关节在受到机械力的损伤后,关节滑膜出现巨噬细胞、纤维母细胞增殖、T细胞浸润等病理变化,这些细胞能够分泌产生大量IL-1、TGF- $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 等多种细胞因子。因此,国内外学者<sup>[9]</sup>提出可定量检测滑液中细胞因子的表达浓度,通过观察相关因子浓度的改变动态反映关节构造的病理变化程度。

既往文献显示,IL-1和TNF- $\alpha$ 是能够促使关节软骨基质降解以及关节软骨网架结构破坏的两种最重要的炎性细胞因子<sup>[10]</sup>。其中IL-1是最经典的炎症调节剂,由多种细胞产生,如巨噬细胞、软骨细胞、滑膜细胞等。IL-1作为调节软骨细胞的功能活动因子,能促使软骨细胞分解其周围的基质<sup>[11]</sup>。TNF- $\alpha$ 则是一种具有多种功能的炎性细胞因子,由单核/巨噬细胞产生。研究显示,TNF- $\alpha$ 能选择性地抑制软骨胶原产生,抑制蛋白聚糖合成,同时促进蛋白聚糖降解,与PTA软骨破坏及炎症反应有一定关系<sup>[12]</sup>。TGF- $\beta$ 作为一种多效性细胞因子,具有促进活动性炎症反应向炎症消退及修复转变等作用<sup>[13]</sup>。TGF- $\beta$ 信号分子可刺激软骨形

成,维持软骨机制更新,抑制软骨细胞的终末分化,阻断软骨基质钙化、血管入侵、成骨细胞的分化及骨化。因此,当正常关节腔内过多的TGF- $\beta$ 信号分子时,可诱发滑膜炎、纤维化的产生<sup>[14]</sup>。

ISOA评分可以反映PTA的自然病程,对病情的不同阶段提供了可测量的指数,能更确切地反映疾病所处的具体阶段和病变严重程度。本研究结果进一步佐证IL-1、TGF- $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 与PTA病情发展关系密切。分析其原因在于:在关节炎性环境下,炎性细胞因子自身可刺激关节滑膜细胞和关节软骨细胞分泌并释放大量的炎性细胞因子,伴随着炎性细胞因子浓度的进一步升高,大量的关节软骨细胞发生变性、坏死,同时软骨基质不断地降解,创伤关节损伤的程度便随之加重<sup>[15]</sup>。由于关节滑液来源于病变局部,相对于血清检测,更能客观而直接地反映其病变程度;同时,对关节液进行检测还可以避免或减少其他疾病及干扰因素对结果造成的影响<sup>[16]</sup>。因此,检测分析关节滑液中IL-1、TGF- $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 水平在PTA患者中的表达水平较血清检测具有更大的临床意义。

综上所述,IL-1、TGF- $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 水平在PTA患者异常升高,三者与患者病情严重程度呈显著相关性,其表达情况可作为评估病情严重程度的有效依据。

### 参考文献

- [1] 尹万乐, 马利阁, 尤笑迎, 等. 膝骨性关节炎患者关节滑液白细胞介素-1 $\beta$ 和肿瘤坏死因子- $\alpha$ 的表达及意义[J]. 中华实验外科杂志, 2017, 34(9):1593-1595.
- [2] 陈长凯, 叶宝飞, 张志伟, 等. 老年膝骨性关节炎患者血清脂联素和白细胞介素-17及转化生长因子- $\beta$ 1水平变化及临床意义[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2019, 33(6):67-69.
- [3] Karpenko MN, Vasilishina AA, Gromova EA, et al. Interleukin-1 $\beta$ , interleukin-1 receptor antagonist, interleukin-6, interleukin-10, and tumor necrosis factor- $\alpha$  levels in CSF and serum in relation to the clinical diversity of Parkinson's disease[J]. Cellul Immunol, 2018, 42(35):713-716.
- [4] Han PL, Cui QB, Yang SL, et al. Tumor necrosis factor- $\alpha$  and transforming growth factor- $\beta$ 1 facilitate differentiation and proliferation of tendon-derived stem cells in vitro[J]. Biotechnol Letters, 2017, 45(31):987-989.
- [5] Akoglu G, Tan C, Ayvaz DC, et al. Tumor necrosis factor  $\alpha$  G/A and interleukin 1  $\beta$  C/T gene polymorphisms in patients with scarring acne[J]. J Cosmetic Dermatol, 2018, 18(1):1-9.

(下转第642页)

## E-cadherin、COX-2 及 TRACP5b 与原发性骨巨细胞瘤患者复发的关系

向勇<sup>1</sup> 周伟<sup>1</sup> 罗亮<sup>1</sup> 阳运康<sup>2\*</sup>

**[摘要]** **目的** 分析上皮型钙黏蛋白(E-cadherin)、环氧化酶-2(COX-2)及抗酒石酸酸性磷酸酶5b(TRACP5b)与原发性骨巨细胞瘤患者复发的关系。**方法** 选取2018年1月至2018年12月本院病理科65例原发性骨巨细胞瘤患者的肿瘤组织及肿瘤旁正常骨组织分别作为癌组织组、癌旁正常组织组,另选取同期在本院体检的73例健康者设为对照组。比较各组E-cadherin、COX-2及TRACP5b的表达,分析E-cadherin、COX-2及TRACP5b与原发性骨巨细胞瘤患者各病理参数的相关性,采用多元Logistic回归分析影响原发性骨巨细胞瘤患者复发的危险因素。**结果** E-cadherin及COX-2在癌组织中阳性表达率显著高于癌旁正常组织,原发性骨巨细胞瘤患者TRACP5b水平明显高于对照组,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。肿瘤越大、临床分期及Jaffe分级越高的原发性骨巨细胞瘤患者其TRACP5b、E-cadherin及COX-2蛋白的阳性表达率均越高( $P<0.05$ )。患者复发率为32.30%(21/65)。肿瘤 $\geq 5$  cm、JaffeⅢ级、手术方式:单纯刮除、E-cadherin蛋白阳性、COX-2蛋白阳性、TRACP5b水平异常升高者复发率高( $P<0.05$ )。Jaffe分级为Ⅲ级、手术方式为单纯刮除、E-cadherin蛋白阳性、COX-2蛋白阳性、TRACP5b水平异常升高为影响原发性骨巨细胞瘤患者复发的危险因素( $P<0.05$ )。**结论** E-cadherin、COX-2蛋白及TRACP5b水平在原发性骨巨细胞瘤患者中呈高表达状态,且其水平变化与患者复发密切相关,临床上检测其水平对监测患者复发具有重要意义。

**[关键词]** 上皮型钙黏蛋白; 环氧化酶-2; 抗酒石酸酸性磷酸酶5b; 原发性骨巨细胞瘤

### Relationship between the levels of E-cadherin, COX-2 and TRACP5b and the recurrence of patients with primary giant cell tumor of bone

XIANG Yong<sup>1</sup>, ZHOU Wei<sup>1</sup>, LUO Liang<sup>1</sup>, YANG Yunkang<sup>2\*</sup>

(1. Department of Orthopedics, Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan, China, 646000; 2. Department of Bone and Joint Surgery, the Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan, China, 646000)

**[ABSTRACT]** **Objective** To analyze the relationship between the levels of E-cadherin, COX-2 and TRACP5b and the recurrence of patients with primary giant cell tumor of bone. **Methods** The tumor tissue and normal bone tissue adjacent to the tumor of 65 patients with primary giant cell tumor of bone from January 2018 to December 2018 in the pathology department of this hospital were selected as the cancer tissue group and the normal tissue group adjacent to the cancer. In addition, 73 healthy people who were examined in this hospital during the same period were selected as the control group. The expressions of E-cadherin, COX-2 and TRACP5b in three groups were compared. The correlation between the levels of E-cadherin, COX-2 and TRACP5b and the pathological parameters of patients with primary giant cell tumor of bone was analyzed. Multivariate logistic regression analysis was used to analyze the risk factors affecting the recurrence of patients

基金项目:四川省科技厅项目(2018TSX-0153)

作者单位:1.西南医科大学骨科,四川,泸州 646000

2.西南医科大学附属医院骨与关节外科,四川,泸州 646000

\*通信作者:阳运康, E-mail:droyyk@163.com

with primary giant cell tumor of bone. **Results** The positive expression rates of E-cadherin and COX-2 in cancer tissues were significantly higher than those in normal tissues adjacent to cancer, and the TRACP5b level of patients with primary giant cell tumor of bone was significantly higher than that in the control group, the differences were statistically significant ( $P<0.05$ ). The larger the tumor, the higher the clinical stage and the higher the Jaffe grade, the higher the positive expression rates of TRACP5b, E-cadherin and COX-2 protein in patients with primary giant cell tumor of bone ( $P<0.05$ ). The recurrence rate of patients was 32.30% (21/65). Tumors  $\geq 5$  cm, Jaffe III grade, surgical methods: curettage alone, E-cadherin protein positive, COX-2 protein positive, and abnormally elevated TRACP5b levels have a high recurrence rate ( $P<0.05$ ). Jaffe grade III, simple curettage, positive E-cadherin protein, positive COX-2 protein, and abnormal increasing of TRACP5b were risk factors affecting the recurrence of patients with primary giant cell tumor of bone ( $P<0.05$ ). **Conclusion** The levels of E-cadherin, COX-2 protein and TRACP5b are highly expressed in patients with primary giant cell tumor of bone, and their changes are closely related to patient recurrence. Clinical detection of their levels is of great significance for monitoring patient recurrence.

[KEY WORDS] E-cadherin; COX-2; TRACP5b; Primary giant cell tumor of bone

骨巨细胞瘤具有较强的局部侵袭性,可使部分患者局部反复治疗后出现恶变或肺转移,寻找有效的分子标记物用来评价原发性骨巨细胞瘤患者复发情况具有重要意义<sup>[1]</sup>。上皮型钙黏蛋白(Epithelial cadherin, E-cadherin)主要介导细胞间的黏附功能,环氧化酶-2(Cyclooxygenase, COX-2)系花生四烯酸转化为前列腺素和血栓烷的关键酶,两者在多种恶性肿瘤中表达上调,参与肿瘤的发生、发展<sup>[2-3]</sup>。抗酒石酸酸性磷酸酶 5b(Tartrate-resistant acid phosphatase 5b, TRACP5b)可降解骨基质中钙磷矿化底物的酶活性,在转移性骨肿瘤、骨质疏松症等疾病中呈高表达状态<sup>[4]</sup>。本研究就 E-cadherin、COX-2 及 TRACP5b 在原发性骨巨细胞瘤中的表达及其与病理参数的关系进行研究,现报道如下。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

收集本院病理科于 2018 年 1 月至 2018 年 12 月 65 例原发性骨巨细胞瘤的患者。纳入标准:①所有患者具有明确的病理学诊断依据,符合 2017 年实用骨科骨巨细胞瘤标准<sup>[5]</sup>;②近半年未服用任何影响骨代谢药物及手术治疗者;排除标准:①近半年曾有运动系统外伤;②患者患有糖尿病、库欣综合征等影响骨代谢疾病;③合并其他原发性恶性肿瘤。男 19 例,女 46 例,平均年龄( $35.71\pm 5.82$ )岁。收集肿瘤组织及肿瘤旁 5 cm 的正常骨组织,分别作为癌组织组、癌旁正常组织组,各 65 例。

选取同期在本院体检的 73 例健康者设为对照组,男 26 例,女 47 例,平均年龄( $35.90\pm 5.62$ )岁。各组基线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通过,所有受试者均签署知情同意书。

### 1.2 检测方式

#### 1.2.1 TRACP5b 检测方式

对照组于体检当日、原发性骨巨细胞瘤患者于入院 24 h 内采用生物素双抗体夹心酶联免疫吸附法检测 TRACP5b 水平,试剂盒选取深圳晶美生物工程有效有限公司,所有操作均按照说明书进行。

#### 1.2.2 E-cadherin、COX-2 检测方式

E-cadherin、COX-2 水平的检测采用免疫组织化学方法<sup>[6]</sup>进行结果判定<sup>[7]</sup>:E-cadherin、COX-2 阳性存在于细胞核或细胞浆内,以棕黄色颗粒为主。按阳性细胞百分率(A 值)评分:<25%为 1 分,25%~50%为 2 分,>50%为 3 分;按染色强度(B 值)评分:不着色为 0 分,浅棕黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分。综合染色阳性细胞数与染色强度判断结果:阴性(-):0 分,弱阳性(+):1~2 分,中度阳性(++):3~4 分,强阳性(+++):5~6 分;两种计分的乘积为每例的加权分数,加权分数为 0 为阴性,其余均为阳性。对患者随访 2 年,截止 2020 年 12 月。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件分析,计数资料以  $n(\%)$  表示, $\chi^2$  检验,计量资料采用  $(\bar{x}\pm s)$  表示, $t$  检验;采用多元 Logistic 回归分析影响原发性骨巨细胞瘤患者复发的危险因素,以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

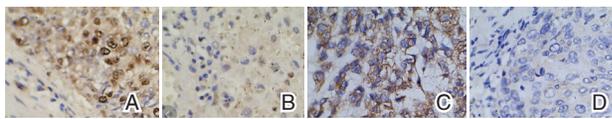
### 2.1 E-cadherin、COX-2 及 TRACP5b 水平表达

E-cadherin 及 COX-2 在癌组织中阳性表达率

表1 E-cadherin、COX-2 及 TRACP5b 水平表达情况比较 [n(%), ( $\bar{x} \pm s$ )]

Table 1 Comparison of expression of E-cadherin、COX-2 and TRACP5b [n(%), ( $\bar{x} \pm s$ )]

组别	n	E-cadherin 蛋白		COX-2 蛋白		TRACP5b(U/L)
		阳性	阴性	阳性	阴性	
癌组织组	65	51(81.53)	14(21.53)	54(83.07)	11(16.92)	5.97±2.94
癌旁正常组织组	65	11(16.92)	54(83.07)	13(20.00)	52(80.00)	
对照组	73	-	-	-	-	3.16±1.23
t/χ <sup>2</sup> 值		49.336		51.772		7.467
P 值		<0.001		<0.001		<0.001



注:A、B 为 E-cadherin 阴阳性表达; C、D 为 COX-2 阴阳性表达。

图1 E-cadherin、COX-2 蛋白组化免疫染色图 (SP, ×500)

Figure 1 immunohistochemical staining of E-cadherin and COX-2 protein (SP, ×500)

### 2.2 E-cadherin、COX-2 及 TRACP5b 与原发骨巨细胞瘤患者临床病理参数的关系

肿瘤越大、临床分期及 Jaffe 分级越高的原发性骨巨细胞瘤患者其 TRACP5b、E-cadherin 及 COX-2 蛋白的阳性表达率均越高 ( $P < 0.05$ )。见表 2。

### 2.3 术后复发情况

经两年随访显示,患者复发 21 例,复发率为 32.30%。

### 2.4 分析影响原发性骨巨细胞瘤患者复发的单因素

肿瘤  $\geq 5$  cm、Jaffe III 级、手术方式:单纯刮除、E-cadherin 蛋白阳性、COX-2 蛋白阳性、TRACP5b

显著高于癌旁正常组织 ( $P < 0.05$ ),且原发性骨巨细胞瘤患者 TRACP5b 水平明显高于对照组,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 1,图 1。

水平异常升高者复发率高 ( $P < 0.05$ ),见表 3。

### 2.5 分析影响原发性骨巨细胞瘤患者复发的多因素

Jaffe 分级为 III 级、手术方式为单纯刮除、E-cadherin 蛋白阳性、COX-2 蛋白阳性、TRACP5b 水平异常升高为影响原发性骨巨细胞瘤患者复发的危险因素 ( $P < 0.05$ )。见表 4。

## 3 讨论

相关研究发现,原发性骨巨细胞瘤患者术后复发率高,不仅影响患肢功能,还会致残,甚至出现肺部转移,导致死亡<sup>[8]</sup>。因此,明确原发性骨巨细胞瘤患者早期诊断,提高复发检测干预对患者具有重要意义。

E-cadherin 是细胞表面黏附复合物的的重要组成部分,可介导细胞与细胞间、细胞与基质间黏附,并维持细胞的极性及完整性,促进肿瘤细胞的转移及侵袭,还可参与细胞信号传导。相关研究发现,E-cadherin 表达异常会使细胞粘附性减弱,

表2 E-cadherin、COX-2 及 TRACP5b 与原发骨巨细胞瘤患者不同病理参数的关系 [n(%), ( $\bar{x} \pm s$ )]

Table 2 Relationship between E-cadherin, COX-2, TRACP5b and different pathological parameters in patients with primary giant cell tumor of bone [n(%), ( $\bar{x} \pm s$ )]

病理参数	例数 (n=65)	E-cadherin 蛋白		χ <sup>2</sup> 值	P 值	COX-2 蛋白		χ <sup>2</sup> 值	P 值	TRACP5b (U/L)	t 值	P 值	
		阳性(n=51)	阴性(n=14)			阳性(n=54)	阴性(n=11)						
性别	男	19	14(27.45)	5(35.71)	0.363	0.547	15(27.78)	4(36.36)	0.326	0.568	5.13±2.87	0.136	0.891
	女	46	37(72.55)	9(64.28)			39(72.22)	7(63.64)			5.06±2.99		
年龄(岁)	<35	34	26(50.98)	8(57.14)	0.167	0.683	30(55.56)	4(36.36)	1.349	0.245	4.38±3.06	1.312	0.191
	≥35	31	25(49.02)	6(42.86)			24(44.44)	7(63.64)			5.01±2.37		
发病部位	上肢骨	33	24(47.06)	9(64.29)	1.304	0.253	27(50.00)	6(54.55)	0.076	0.783	4.97±3.18	1.386	0.168
	下肢骨	32	27(52.94)	5(35.71)			27(50.00)	5(45.45)			4.09±4.01		
肿瘤大小 (cm)	<5	39	27(52.94)	12(85.71)	4.916	0.027	29(53.70)	10(90.91)	5.271	0.022	3.34±1.56	9.800	<0.001
	≥5	26	24(47.06)	2(14.29)			25(46.30)	1(9.09)			6.84±2.42		
Jaffe 分级	I、II	31	18(35.29)	13(92.86)	14.590	<0.001	22(40.74)	9(81.82)	6.181	0.013	4.02±1.03	6.451	<0.001
	III	34	33(64.71)	1(7.14)			32(59.26)	2(18.18)			6.31±2.67		
临床分期	皮质完整	29	18(35.29)	11(78.57)	8.326	0.004	21(38.89)	8(72.73)	4.235	0.040	3.09±1.84	14.288	<0.001
	皮质不完整	36	33(64.71)	3(51.43)			33(61.11)	3(27.27)			7.22±1.43		

表3 影响原发性骨巨细胞瘤患者复发的单因素分析  
[n(%), ( $\bar{x} \pm s$ )]

Table 3 single factor analysis of recurrence of primary giant cell tumor of bone [n(%), ( $\bar{x} \pm s$ )]

变量	复发者 (n=21)	未复发者 (n=44)	$\chi^2$ 值	P值
性别			0.007	0.936
男	6(28.57)	13(29.55)		
女	15(71.43)	31(70.45)		
年龄(岁)			1.111	0.292
<35	9(42.86)	25(56.82)		
≥35	12(57.14)	19(43.18)		
发病部位			0.504	0.478
上肢骨	12(57.14)	21(47.73)		
下肢骨	9(42.86)	23(52.27)		
肿瘤大小			39.441	<0.001
<5 cm	1(4.76)	38(86.36)		
≥5 cm	20(95.24)	6(13.64)		
Jaffe 分级			18.117	<0.001
I、II	2(9.52)	29(65.91)		
III	19(90.48)	15(34.09)		
手术方式			12.287	0.006
单纯刮除	16(76.19)	7(15.91)		
扩大刮除	2(9.52)	11(25.00)		
肿瘤切除术	2(9.52)	12(27.27)		
截肢术	1(4.76)	14(31.82)		
E-cadherin 蛋白			24.545	<0.001
阴性	1(4.76)	31(70.45)		
阳性	20(95.24)	13(29.55)		
COX-2 蛋白			13.878	<0.001
阴性	3(14.29)	28(63.64)		
阳性	18(85.71)	16(36.36)		
TRACP5b(U/L)	5.72±2.81	3.02±1.04	5.651	<0.001

破坏细胞正常组织结构,促进肿瘤转移<sup>[9]</sup>。Adel等<sup>[10]</sup>在食管鳞状细胞癌研究中发现,E-cadherin表达异常增高,且E-cadherin高表达者生存时间短。类似的,Jin等<sup>[11]</sup>研究证实骨巨细胞瘤组织中E-cadherin的表达存在异常,与肿瘤的复发、转移有关。COX-2是环氧化酶中同工酶之一,主要存在于单核-巨噬细胞、滑膜细胞及内皮细胞。正常生理状态下,COX-2仅微量表达,当细胞受到细菌内毒素、致炎因子的活化作用时,其才开始大量表达。研究发现,COX-2过度表达一方面

可刺激肿瘤新生血管形成;另一方面,COX-2还可合成血管内皮生长因子,与微血管呈密切相关性<sup>[12]</sup>。目前临床已证实COX-2在肺癌、肝癌、食管癌、胃癌、直肠癌等多种肿瘤组织的原发灶和转移灶中过表达,通过多种机理参与肿瘤的发生、发展和转移<sup>[13]</sup>。TRACP5b是一种结构高度保守的含铁糖蛋白,分子量约30~40 kD,存在于巨嗜、破骨、红细胞、脾脏毛状及单核吞噬细胞中,可降解骨基质中钙磷矿化底物的酶活性,可作为人体内骨吸收和破骨细胞活性的标志物<sup>[14]</sup>。相关学者在前列腺癌、乳腺癌、肺癌等肿瘤骨转移研究发现,TRACP5b较没有发生骨转移瘤患者水平明显升高<sup>[15]</sup>。本研究发现E-cadherin蛋白、COX-2蛋白及TRACP5b水平明显高于正常人群及癌旁正常组织组,说明E-cadherin蛋白、COX-2蛋白及TRACP5b水平与原发性骨巨细胞瘤患者密切相关。

本研究随访2年显示,随着Jaffe分级增高,E-cadherin蛋白、COX-2蛋白及TRACP5b水平表达率也显著上升。分析与原发性骨巨细胞瘤患者在多种致癌因素作用下促使E-cadherin蛋白、COX-2蛋白异常激活,促进其活化,对肿瘤基因快速转录及表达具有促进作用,加剧肿瘤细胞生长有关。另通过多元Logistic回归分析显示,E-cadherin蛋白、COX-2蛋白及TRACP5b水平为影响原发性骨巨细胞瘤患者复发的危险因素,进一步提示E-cadherin、COX-2及TRACP5b与原发性骨巨细胞瘤患者复发关系密切。但本研究由于纳入的样本量有限,研究结果有待于通过进一步扩大样本量或多中心合作研究予以进一步证实。

综上所述,E-cadherin、COX-2蛋白及TRACP5b水平在原发性骨巨细胞瘤患者中呈高表达状态,且其水平变化与患者复发密切相关,临床上检测其水平对监测患者复发具有重要意义。

表4 影响原发性骨巨细胞瘤患者复发的Logistic多因素回归分析

Table 4 logistic regression analysis of factors influencing recurrence of primary giant cell tumor of bone

影响因素	$\beta$ 值	SE值	Wald $\chi^2$ 值	OR	95%CI	P值
肿瘤大小: ≥5 cm	0.506	0.316	7.138	1.658	0.892~3.081	0.284
Jaffe 分级: III	1.593	0.417	12.286	4.918	2.172~11.137	<0.001
手术方式:扩大刮除+肿瘤切除术+截肢术	0.502	0.125	19.534	1.652	1.293~2.110	<0.001
E-cadherin 蛋白: 阳性	0.418	0.122	14.726	1.518	1.195~1.929	<0.001
COX-2 蛋白: 阳性	0.712	0.314	21.546	2.038	1.101~3.771	<0.001
TRACP5b: 异常升高	0.725	0.145	19.415	2.064	1.553~2.743	<0.001

## 参考文献

- [1] 王璇, 吴楠, 章如松, 等. H3.3 G34W 突变抗体在骨巨细胞瘤中的表达及诊断价值[J]. 中华病理学杂志, 2020, 49(2):116-121.
- [2] 张睿婷, 方霁, 周雅莹, 等. 外周血与骨髓组织髓系来源抑制细胞在多发性骨髓瘤患者诊断中的价值比较[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(7):874-877+896.
- [3] Musalam A, Andarawi M, Osman M, et al. Alterations of COX-2, HER-2/neu and E-Cadherin protein expression in the prostatic adenocarcinoma: preliminary findings [J]. Am J Transl Res, 2019, 11(3):182-187.
- [4] Ghosh U, Ghosh S, Roy AK. Expression of E-Cadherin and Its Implication in Laryngeal Squamous Cell Carcinoma [J]. J Evol Med Dent Sci, 2019, 8(50):3790-3795.
- [5] 陈皓, 吕智, 李立志, 等. 骨巨细胞瘤的治疗进展[J]. 实用骨科杂志, 2017, 23(6):522-525.
- [6] Kumar P, Sebastian A, Verma K, et al. mRNA Expression Analysis of E-Cadherin, VEGF, and MMPs in Gastric Cancer: a Pilot Study[J]. Ind J Surg Oncol, 2020, 21(5):341-344.
- [7] Zaky AH, Elser D, Bakry R, et al. Prognostic Value of Accumulative Expression of COX-2 and p53 in Small and Diffuse Large B Cell Lymphoma [J]. Pathol Oncol Res, 2019, 26(2):269-271.
- [8] 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 Rep, 2019, 19(8):492-495.
- [9] 赵振群, 梁晨亮, 王玉鑫, 等. 微小RNA-217 靶向调控骨巨细胞瘤自噬的研究[J]. 中华实验外科杂志, 2020, 37(11):2050-2054.
- [10] Adel M, Mohamed A, Mohamed O, et al. Alterations of COX-2, HER-2/neu and E-Cadherin protein expression in the prostatic adenocarcinoma: preliminary findings [J]. Am J Transl Res, 2019, 13(3):287-290.
- [11] Jin Y, Zhang J, Zhu H, et al. Expression profiles of miRNAs in giant cell tumor of bone showed miR-187-5p and miR-1323 can regulate biological functions through inhibiting FRS2 [J]. Cancer Med, 2020, 10(1):173-176.
- [12] Cheng LL, Tao XY, Qin YZ, et al. Aberrant expression of MYH9 and E-cadherin in esophageal squamous cell carcinoma and their relationship to vasculogenic mimicry [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2019, 12(6):2205-2214.
- [13] Harb OA, Kaf RM, Taha HF, et al. Clinical, pathological and prognostic implications of USP22, SIRT1 and E-cadherin expression in papillary thyroid cancer (PTC) and adjacent non-neoplastic tissue [J]. Surg Exp Pathol, 2019, 2(1):423-425.
- [14] Lee MH, Kim YJ, Msc KA Y, et al. Prognostic significance of CD200 protein expression and its correlation with COX-2 in cutaneous melanoma - ScienceDirect [J]. J Am Acad Dermatol, 2020, 82(6):1526-1528.
- [15] Liu W, Chan CM, Gong L, et al. Malignancy in giant cell tumor of bone in the extremities [J]. J Bone Oncol, 2021, 26:265-269.
- [6] Kin JW, Park MA, Kim JT. Impact of tumor necrosis factor- $\alpha$ /interleukin -  $\beta$  levels and polymorphisms on long - term stroke outcomes [J]. Psychoneuroendocrinology, 2017, 83(15):34-36.
- [7] 范峥睿, 马剑雄, 王颖, 等. 踝关节创伤性关节炎的治疗现状及其相关进展[J]. 中华创伤骨科杂志, 2020, 22(4):360-364.
- [8] Gurbani NG, Gurbani AN. Arthroscopic Management of Post-Traumatic Arthritis of Ankle and Subtalar Joints [J]. J Am Coll Surg, 2018, 227(4):591-598.
- [9] Kim JW, Choi DH, Kim JM. Impact of tumor necrosis factor- $\alpha$ /interleukin -  $\beta$  levels and polymorphisms on long - term stroke outcomes[J]. Psychoneuroendocrinology, 2017, 83(52):36-39.
- [10] 王浩, 曹飞, 斯海波, 等. 雷帕霉素调控自噬在骨关节炎软骨细胞退变中的机制研究[J]. 中华骨与关节外科杂志, 2017, 10(3):248-253.
- [11] 蔡辉, 张群燕, 郭郡浩, 等. 类风湿关节炎患者外周血浆中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  及 IL-10 的表达及临床意义[J]. 中华中医药学刊, 2017, 35(3):9-11.
- [12] 林槩, 王晨斌, 王亚, 等. 痛风康宁方对急性痛风性关节炎大鼠血清炎症因子及氧化应激的影响[J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(6):392-395.
- [13] Purcell S, Claus M, Hosgood G, et al. Interleukin-8, interleukin -  $\beta$  and tumour necrosis factor -  $\alpha$  in sequential units of packed red blood cells collected from retired racing Greyhounds[J]. Austr Veter J, 2017, 95(1):26-30.
- [14] Abolfazl K, Soleiman K, Peyman O, et al. Association between Interleukin-10-1082 G/A and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  308 G/A Gene Polymorphisms and Respiratory Distress Syndrome in Iranian Preterm Infants [J]. Mediators Inflamm, 2017, 29(30):1-8.
- [15] Khan Z, Haq RU, Jha PK, et al. Tumor necrosis factor- $\alpha$  - 308 polymorphism in North Indian rheumatoid arthritis patients and association with mRNA and serum TNF- $\alpha$  [J]. Clin Rheumatol, 2017, 36(10):8125-8129.
- [16] Caruana RJ, Lobel SA, Leffell MS, et al. Tumor Necrosis Factor, Interleukin - 1 and Beta 2 - Microglobulin Levels in Chronic Hemodialysis Patients [J]. Intern J Artificial Organs, 2018, 56(15):987-989.

(上接第 637 页)

## 肺结核感染患者中TRF、IAP及HMGB1的表达及意义

王月彩<sup>1</sup> 戎燕筱<sup>2</sup> 王显雷<sup>3</sup> 张敬美<sup>2</sup> 孙扬<sup>4</sup> 苏圆圆<sup>4\*</sup>

**[摘要]** 目的 分析肺结核感染患者中血清转铁蛋白(TRF)、免疫抑制酸性蛋白(IAP)及细胞外高迁移率族蛋白B1(HMGB1)的表达及意义。方法 选取2017年6月至2019年6月本院收治的142例肺结核患者作为观察组,其中肺结核病灶进展期46例、吸收好转期53例、稳定期43例,选取同期于本院体检的100例健康者作为对照组。对比不同对象TRF、IAP及HMGB1水平,采用Logistic回归分析影响肺结核患者临床转归的相关因素。结果 观察组TRF、IAP及HMGB1水平均高于对照组,差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。进展期患者TRF、IAP及HMGB1水平均高于吸收好转期及稳定期患者,吸收好转期患者TRF、IAP及HMGB1水平高于稳定期患者,差异均具有统计学意义( $P<0.05$ )。142例肺结核患者治疗无效者41例,有效者101例,治疗有效率为71.13%。机械通气、复发、APACHE II评分、TRF、IAP、HMGB1水平与肺结核患者预后呈正相关( $P<0.05$ ),规范化治疗与肺结核患者预后呈负相关( $P<0.05$ )。复发(有)、规范化治疗(否)、APACHE II评分( $\geq 25$ 分)、TRF(异常)、IAP(异常)及HMGB1(异常)水平是影响肺结核患者预后的独立危险因素( $P<0.05$ )。结论 TRF、IAP及HMGB1水平在肺结核患者中显著升高,三者与患者预后转归关系密切,可作为病情监测及预后评估的有效指标。

**[关键词]** 肺结核;血清转铁蛋白;IAP;HMGB1

### Expression and significance of TRF, IAP and HMGB1 in patients with pulmonary tuberculosis infection

WANG Yuecai<sup>1</sup>, RONG Yanxiao<sup>2</sup>, WANG Xianlei<sup>3</sup>, ZHANG Jingmei<sup>2</sup>, SUN Yang<sup>4</sup>, SU Yuanyuan<sup>4\*</sup>

(1. The Third Department of Tuberculosis, the Fifth Hospital of Shijiazhuang City, Shijiazhuang, Hebei, China, 050021; 2. The Second Department of Tuberculosis, the Fifth Hospital of Shijiazhuang City, Shijiazhuang, Hebei, China, 050021; 3. The Third Department of Tuberculosis, Hebei Chest Hospital, Shijiazhuang, Hebei, China, 050041; 4. The First Department of Tuberculosis, the Fifth Hospital of Shijiazhuang City, Shijiazhuang, Hebei, China, 050021)

**[ABSTRACT]** **Objective** To analyze the expression and significance of serum transferrin (TRF), immunosuppressive acidic protein (IAP) and extracellular high mobility group box-1 (HMGB1) in patients with pulmonary tuberculosis infection. **Method** The total of 142 patients with tuberculosis admitted to our hospital from June 2017 to June 2019 were selected as the observation group, including 46 cases with pulmonary tuberculosis whose lesions were in progressive stage, 53 cases in absorption and improvement stage, and 43 cases in stable stage. During the same period, 100 healthy people who were examined in this hospital were selected as the control group. The levels of TRF, IL-6 and HMGB1 in different subjects were compared. Logistic regression was used to analyze the related factors that affect the clinical outcome of patients with pulmonary tuberculosis. **Result** The levels of TRF, IAP and HMGB1 in the observation group were higher than those in

基金项目:2017年石家庄市科学技术研究与发展计划项目(171461473)

作者单位:1. 石家庄市第五医院结核三科,河北,石家庄 050021

2. 石家庄市第五医院结核二科,河北,石家庄 050021

3. 河北省胸科医院结核三科,河北,石家庄 050041

4. 石家庄市第五医院结核一科,河北,石家庄 050021

\*通信作者:苏圆圆, E-mail: suyuanyuan2011@163.com

the control group, the difference was statistically significant ( $P<0.05$ ). The levels of TRF, IAP and HMGB1 in patients with progressive stage were higher than those in the absorption and improvement stage and the stable stage, and the levels of TRF, IAP and HMGB1 in the absorption and improvement stage were higher than those in the stable stage, the difference was statistically significant ( $P<0.05$ ). 41 cases of 142 pulmonary tuberculosis patients were ineffective in treatment, 101 cases were effective, and the effective rate of treatment was 71.13%. Mechanical ventilation, recurrence, APACHE II score, TRF, IAP, HGMB1 levels were positively correlated with the prognosis of patients with tuberculosis, and standardized treatment was negatively correlated with the prognosis of patients with tuberculosis ( $P<0.05$ ). Recurrence (yes), standardized treatment (no), APACHE II score ( $\geq 25$  points), TRF (abnormal), IAP (abnormal) and HMGB1 (abnormal) levels are independent risk factors affecting the prognosis of patients with pulmonary tuberculosis ( $P<0.05$ ). **Conclusion** The levels of TRF, IAP and HMGB1 are significantly increased in patients with pulmonary tuberculosis. The three are closely related to the prognosis outcome of the patients and can be used as effective indicators for disease monitoring and prognosis evaluation.

**[KEY WORDS]** Pulmonary tuberculosis; Serum transferrin; IAP; HMGB1

结核病是由结核分枝杆菌引起的慢性传染疾病,以肺部感染最为常见。尽管运用SBAR(Situation, Background, Assessment, Recommendation)沟通模式可以提高抗结核药不良反应的早期识别率,然而仍有部分患者病情控制不理想,因此寻求新的治疗靶点成为临床关注焦点<sup>[1]</sup>。血清转铁蛋白(transferrin, TRF)是结合杆菌与宿主相互作用机制研究中的重要指标,而免疫抑制酸性蛋白(Immunosuppressive Acidic Protein, IAP)是一种对细胞、体液免疫均具有强烈抑制作用的蛋白,两者在肺部疾病中的应用价值一直是研究的热点<sup>[2]</sup>。细胞外高迁移率族蛋白B1(high mobility group box-1, HMGB1)作为重要的炎性介质和炎性因子,可介导肺部炎症反应<sup>[3]</sup>。目前有关HMGB1与结核病关系的报道较少,本研究就TRF、IAP及HMGB1在肺结核感染患者中的表达及意义进行分析,旨在为临床监测疗效提供参考。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选取2017年6月至2019年6月本院收治的142例肺结核患者,作为观察组。其中男89例,女53例,平均年龄( $46.95\pm 7.53$ )岁。纳入标准:①均符合中华医学会结核病学分会制定的《肺结核诊断和治疗指南》<sup>[4]</sup>中的诊断标准。②临床资料完整无缺失。排除标准:①入组前有激素使用史者;②合并其他非结核性肺部疾患;③合并免疫系统、血液系统等疾病者;④移植术后以及自身免疫病等。其中肺结核病灶进展期46例、吸收好转期53例、稳定期43例。分期标准<sup>[5]</sup>:活动进展期:凡具

备下列1项者属活动进展期:新发现活动性结核病灶;新出现空洞;空洞增大;病灶较前恶化;痰结核分支杆菌阳性。吸收好转期:凡具备下列1项者属好转期:结核病灶较前吸收好转;空洞闭合或缩小;痰结核分支杆菌阴转。稳定期:凡具备下列1项者属稳定期:病变无活动性;空洞闭合;痰结核分支杆菌连续阴性(每个月至少查痰3次)达6个月以上,如有空洞存在,则痰结核分支杆菌须连续阴性1年以上。选取同期于本院体检且临床资料完整的100例健康者作为对照组,其中男66例,女34例,平均年龄( $46.81\pm 7.49$ )岁。两组性别、年龄比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。本研究已获得医院伦理委员会批准,所有受试者均签署知情同意书。

### 1.2 研究方法

收集所有研究对象临床资料,包括年龄、性别、机械通气、肝损害、复发情况、治疗情况、基础疾病、吸烟史、急性生理及慢性健康状况II(acute physiology and chronic health evaluation scoring system, APACHE II)<sup>[6]</sup>(评分范围0~30分,分数越高表示病情越危急)等,采用非条件Logistic回归模型分析影响肺结核患者预后的独立危险因素。

### 1.3 观察指标

收集所有研究对象空腹静脉血,离心( $3\ 500\ r/min$ ,  $5\ min$ , 离心半径8 cm)后取分离血清。分离出血清后采用免疫透射比浊法检测TRF水平,试剂盒购自罗氏公司,检测仪器为美国Arry-360特定蛋白分析仪,按照使用说明书操作,TRF试剂盒正常值范围:2.20~4.0 g/L。IAP检测采用琼脂扩散法,试剂盒购自上海雄科实业有限公司,IAP试剂

盒正常值范围:250 μg/mL~500 μg/mL。HMGB1水平采用超敏酶联免疫吸附法进行测定,试剂盒购自深圳晶美生物工程有限公司, HMGB1试剂盒正常值范围 2.5~80.0 ng/mL。疗效分为无效、有效<sup>[6]</sup>。

#### 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( $\bar{x} \pm s$ )描述,组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用 *F* 检验;计数资料通过 *n*(%)表示,采用  $\chi^2$  检验;影响肺结核患者预后的相关因素采用非条件单因素和多因素 Logistic 回归分析;以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 两组 TRF、IAP 及 HMGB1 水平比较

观察组 TRF、IAP 及 HMGB1 水平均高于对照组,差异有统计学意义(*P*<0.05)。见表 1。

表 1 两组 TRF、IAP 及 HMGB1 水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Comparison of TRF, IAP and HMGB1 levels between 2 groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	<i>n</i>	TRF(g/L)	IAP(μg/mL)	HMGB1(ng/mL)
观察组	142	12.52±5.43	841.26±152.30	99.55±7.32
对照组	100	1.09±0.74	302.69±90.12	4.02±1.60
<i>t</i> 值		13.400	31.662	20.856
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001

### 2.2 不同肺结核病灶进展情况患者 TRF、IAP 及 HMGB1 水平比较

进展期患者 TRF、IAP 及 HMGB1 水平均高于吸收好转期及稳定期患者,吸收好转期患者 TRF、IAP 及 HMGB1 水平高于稳定期患者,差异均有统计学意义(*P*<0.05)。见表 2。

表 2 不同肺结核病灶进展情况患者 TRF、IAP 及 HMGB1 水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Comparison of TRF, IAP and HMGB1 levels in patients with different pulmonary tuberculosis lesion progression ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	<i>n</i>	TRF(μmol/L)	IAP(μg/mL)	HMGB1(ng/mL)
进展期	46	14.63±2.82	915.60±100.87	125.67±2.75
吸收好转期	53	11.33±1.79	836.94±149.52	108.95±4.66
稳定期	43	6.41±1.07	763.80±140.92	92.08±5.65
<i>F</i> 值		184.100	10.510	620.340
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001

### 2.3 142 例肺结核患者预后转归情况

截止治疗结束,142 例肺结核患者治疗无效者 41 例,有效者 101 例,治疗有效率为 71.13%。

### 2.4 影响肺结核患者预后的单因素分析

机械通气、复发、APACHE II 评分、TRF、IAP、HMGB1 水平与肺结核患者预后呈正相关(*P*<0.05),规范化治疗与肺结核患者预后呈负相关(*P*<0.05)。见表 3。

表 3 影响肺结核患者预后的单因素分析 [*n*(%), ( $\bar{x} \pm s$ )]

Table 3 single factor analysis of prognosis of patients with pulmonary tuberculosis [*n*(%), ( $\bar{x} \pm s$ )]

临床特征	例数( <i>n</i> =142)	预后		$\chi^2$ 值	<i>P</i> 值	
		有效组( <i>n</i> =101)	无效组( <i>n</i> =41)			
年龄(岁)	20~35	49	34(33.66)	15(36.58)	0.312	0.856
	36~60	50	37(36.63)	13(31.71)		
	> 60	43	30(29.71)	13(31.71)		
性别	男	89	66(65.35)	23(56.10)	1.066	0.302
	女	53	15(34.65)	18(43.90)		
复发	有	50	15(14.85)	35(85.37)	63.561	<0.001
	无	92	86(85.15)	6(14.63)		
规范化治疗	是	84	80(79.21)	4(9.76)	58.218	<0.001
	否	58	21(20.79)	37(90.24)		
合并基础疾病	有	52	37(36.63)	15(36.59)	0.006	0.940
	无	90	64(63.37)	26(63.41)		
吸烟史	有	80	51(50.50)	29(70.73)	2.554	0.110
	无	62	50(49.50)	12(29.27)		
机械通气	有	48	9(8.91)	39(95.12)	96.861	<0.001
	无	94	92(91.09)	2(4.88)		
肝损害	有	51	33(32.67)	18(43.90)	1.598	0.206
	无	91	68(67.33)	23(56.10)		
APACHE II 评分(分)			18.05±2.63	26.18±2.71	16.548	<0.001
TRF(μmol/L)			63.17±14.56	75.84±14.61	4.695	<0.001
IAP(μg/mL)			471.26±85.98	786.09±142.03	16.178	<0.001
HMGB1(ng/mL)			56.57±1.59	106.08±5.49	82.837	<0.001

## 2.5 影响肺结核患者预后的多因素分析

复发(有)、规范化治疗(否)、APACHE II评分( $\geq$

25分)、TRF异常、IAP异常及HMGB1异常水平是影响肺结核患者预后的独立危险因素( $P < 0.05$ )。见表4。

表4 影响肺结核患者预后的多因素分析

Table 4 multivariate analysis of prognosis of patients with pulmonary tuberculosis

影响因素	回归系数	标准误	Wald $\chi^2$ 值	OR	95%CI	P值
机械通气	0.969	0.889	4.098	2.635	0.461~15.051	0.519
复发(无 vs 是)	0.982	0.131	4.879	2.670	2.065~3.451	<0.001
规范化治疗(是 vs 无)	0.835	0.188	4.638	2.305	1.594~3.33	<0.001
APACHE II评分(<25分 vs $\geq$ 25分)	0.874	0.135	4.284	2.396	1.839~3.122	<0.001
TRF(异常 vs 正常)	0.851	0.195	4.993	2.342	1.598~3.432	<0.001
IAP(异常 vs 正常)	0.945	0.121	4.098	2.573	2.030~3.261	<0.001
HMGB1(异常 vs 正常)	0.987	0.298	4.465	2.683	1.496~4.812	<0.001

## 3 讨论

近年因合并艾滋病感染、结核多耐药菌株的产生,肺结核的发病率、死亡率直线上升,肺结核患者中结核分枝杆菌的感染机制及引起的免疫反应成为国内外学者共同探讨的问题<sup>[7]</sup>。

结核杆菌是胞内感染菌,其免疫主要是以T细胞为主的细胞免疫<sup>[8-9]</sup>。TRF作为结核杆菌新陈代谢中的主要参与因子,不仅可促进中性粒细胞或小吞噬细胞的吞噬、中性粒细胞的增殖作用,还作为血浆中主要含铁蛋白质穿梭于细胞外液体和内体之间,避开溶酶体快速传递细胞生长所需的铁<sup>[10-11]</sup>。同样的,IAP主要来源于巨噬、单核、粒细胞和肝脏,实验证明IAP能抑制植物血凝素诱导淋巴细胞,导致辅助T细胞和抑制性T细胞间比例失调,抑制免疫应答<sup>[12]</sup>。近年来国内外学者在肿瘤疾病的研究中发现恶性肿瘤患者体内IAP水平明显升高<sup>[13]</sup>。本研究数据提示肺结核病患者血清TRF、IAP异常升高可能是导致肺结核发生、发展的原因之一,并且与病情及预后存在明显相关性。

HMGB1因其在凝胶电泳中有很高的迁移率而得名,是广泛存在于真核细胞核中重要的非组蛋白核蛋白,具有多种核外生物学功能。研究显示,HGMB1可刺激炎症细胞活化并向炎症部位聚集,促进炎症因子分泌造成细胞损伤,故其在炎性呼吸道疾病中与气道高反应性及气道重构密切相关<sup>[14]</sup>。目前有关HMGB1与结核病关系的报道较少。据相关文献报道,HGMB1可能为组织感染或细胞损伤的信号,以及机体免疫反应增强的标志<sup>[15]</sup>。本研究采用非条件多因素Logistic回归分析发现HGMB1水平在肺结核患者中显著升高,且该因子水平的异常是影响肺结核患者预后的独立危险因素,提示HGMB1对机体免疫应答机制的作

用可能加速肺结核病情的发展,对肺结核患者病情评估、预后评价等方面有重要的临床应用价值。

此外,本组研究发现复发(有)、规范化治疗(否)、APACHE II评分( $\geq$ 25分)为影响肺结核预后的独立危险因素,其原因可能在于复发、未规范化治疗易引发结核多耐药菌株的产生,影响治疗疗效。而APACHE II评分作为判断患者预后情况及死亡率的重要工具,其评分越高,患者预后效果越差,死亡风险越大。在临床工作中,运用SBAR沟通模式可以早期识别抗结核药物的不良反应,同时需加强对合并危险因素患者的干预,以改善其预后。

综上所述,TRF、IAP及HMGB1水平在肺结核患者中显著升高,三者与患者预后转归关系密切,可作为病情监测及预后评估的有效指标。

## 参考文献

- [1] 赵景平,陈志鹏,徐宝凤,等.部队人群肺结核感染危险因素Meta分析[J].解放军医药杂志,2020,32(4):115-120.
- [2] 罗宣萍,程永素,黄冰,等.肺结核患者呼吸道感染病原菌分布及耐药性研究[J].中华医院感染学杂志,2018,28(6):859-862.
- [3] Anderson NA, Cryan J, Ahmed A, et al. Selective CDK6 degradation mediated by cereblon, VHL, and novel IAP-recruiting PROTACs[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2020, 30(9):127106.
- [4] Marianne WR. Crossing the Iron Gate: Why and How Transferrin Receptors Mediate Viral Entry [J]. Annu Rev Nutr, 2018, 38(1):2117-2119.
- [5] Söderberg-Nauclér C, Fish KN, Nelson JA. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha specifically induce formation of cytomegalovirus-permissive monocyte-derived macrophages that are refractory to the antiviral activity of these cytokines[J]. J Clin Invest, 2018, 21(12):3154-3163.
- [6] Kyu HH, Maddison ER, Henry NJ, et al. The global burden of tuberculosis: results from the Global Burden of Disease Study 2015[J]. Lancet Infet Dis, 2018, 56(3):859-861.

## 子痫前期外周血 GLUT-1 表达水平与代谢指标的相关性

罗沛芬\* 陈小兰 黄文

**[摘要]** **目的** 探讨子痫前期外周血葡萄糖转运蛋白-1 (GLUT-1) 的表达水平及其与代谢指标的相关性。**方法** 选取2017年3月至2019年4月本院收治的100例子痫前期患者设为子痫前期组,另选取同期于本院健康体检的人群100例,设为对照组,测定所有受试者 GLUT-1 表达水平及代谢相关指标,比较两组受试者 GLUT-1 表达水平及代谢指标水平;采用 Pearson 线性方程分析 GLUT-1 表达水平与子痫前期代谢指标间的相关性。**结果** 子痫前期组 GLUT-1 mRNA 及蛋白表达水平高于对照组,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ );代谢指标乳酸水平、丙酮酸水平子痫前期组高于对照组,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。Pearson 相关分析提示 GLUT-1 mRNA 及蛋白与子痫前期代谢指标乳酸水平、丙酮酸水平呈正相关 ( $P < 0.05$ )。**结论** GLUT-1 mRNA 及蛋白表达水平在子痫前期患者外周血中含量高于健康人群,与子痫前期代谢指标乳酸水平、丙酮酸水平呈正相关,推测 GLUT-1 参与了妊高症的发生发展。

**[关键词]** 妊高症;子痫前期;葡萄糖转运蛋白-1;代谢指标

### Correlation between the expression level of GLUT-1 in peripheral blood and metabolic indexes in preeclampsia

LUO Peifen\*, CHEN Xiaolan, HUANG Wen

(Department of Obstetrics and Gynecology, Dongguan People's Hospital, Dongguan, Guangdong, China, 52300)

**[ABSTRACT]** **Objective** To investigate the expression level of glucose transporter-1 (GLUT-1) in peripheral blood of pregnancy preeclampsia and its correlation with metabolic indexes. **Methods** Selected 100 cases of pre-eclampsia patients admitted to this hospital from March 2017 to April 2019 were included as the preeclampsia group, and 100 cases of the population who underwent a physical examination in this hospital during the same period were selected as the control group, and all subjects were measured. The expression level of GLUT-1 and metabolic indicators were compared between 2 groups of subjects. The expression level of GLUT-1 and the levels of metabolic indicators were compared; the Pearson linear equation was used to analyze the correlation between the expression level of GLUT-1 and the metabolic indicators of preeclampsia. **Results** The expression levels of GLUT-1 mRNA and protein in the preeclampsia group were higher than those in the control group, the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ); the levels of metabolic indexes, lactic acid, pyruvate levels in the preeclampsia group were higher than those in the control group, the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). Pearson correlation analysis showed that the expression level of GLUT-1 mRNA and protein were positively correlated with the levels of lactic acid, pyruvate, triglycerides, and low-density lipoprotein, which are metabolic indicators of preeclampsia ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The level of GLUT-1 mRNA and protein in the peripheral blood of patients with preeclampsia is higher than that of healthy people, and it is positively correlated with the levels of lactic acid, pyruvate, which are metabolic indicators of preeclampsia. It is speculated that GLUT-1 is involved in the occurrence and development of pregnancy-induced hypertension.

**[KEY WORDS]** Pregnancy-induced hypertension; Preeclampsia; Glucose transporter-1; Metabolic index

作者单位:东莞市人民医院妇产科,广东,东莞 523000

\*通信作者:罗沛芬, E-mail: pk63526@163.com

妊娠高血压综合征,是一种由多种原因引起患者妊娠20周后出现血压升高及伴随症状的疾病,随着疾病的发展可进展为子痫前期,并可出现蛋白尿、头痛、眼花、恶心、呕吐、上腹不适等症状。Cao<sup>[1]</sup>等人研究发现在高血压患者中葡萄糖有氧酵解过程产生的ATP少于正常细胞每摩尔葡萄糖经酵解产生36 mol ATP,同时乳酸、丙酮酸等糖酵解产物水平升高,表明高血压机体存在葡萄糖酵解异常。葡萄糖摄取和转运主要依靠葡萄糖转运体介导<sup>[2]</sup>。转运蛋白-1(Glucose transporter-1, GLUT-1)是机体主要的葡萄糖转运蛋白。Hien<sup>[3]</sup>等人在动物实验中证实血管平滑肌细胞中葡萄糖摄取降低可导致葡萄糖转运蛋白GLUT-1升高。这表明,机体处高血压状态时在胰岛素抵抗或葡萄糖稳态改变的情况下,可能发生葡萄糖转运蛋白GLUT-1表达的改变。本研究纳入妊高症及子痫前期患者探究GLUT-1表达水平差异及其与代谢指标的相关性。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选取2017年3月至2019年4月本院收治的100例子痫前期患者设为子痫前期组,纳入标准:①所有患者均符合中华医学会妇产科学分会2015年版《妊娠期高血压疾病诊治指南》<sup>[4]</sup>中“子痫前期”的诊断标准;②年龄在25~30岁;③单胎妊娠;④白蛋白 $\geq 40$  g/L;⑤血钙(2.25~2.75)mmol/L。排除标准:①合并心、脑等严重的器质性病变者;②原发性高血压者;③合并其他自身免疫性疾病或严重感染者;④凝血功能障碍者。另选取同期于本院健康体检的人群100例,设为对照组。纳入标准:①年龄在25~30岁;②单胎妊娠。排除标准:①合并糖尿病、高血压、高脂血症等;②合并代谢性疾病;③既往子痫前期病史;④具有心、肝、肾等功能障碍。研究对象均签署知情同意书,研究经本院医学伦理委员会审批通过。

### 1.2 代谢指标

#### 1.2.1 GLUT-1 mRNA表达水平测定

收集所有受试者外周静脉血样本2 mL;在4℃, 1 000 r/min的条件下离心10 min,使用TRIzol从全血中分离总RNA。使用美国BioTek Synergy™HI杂交解读器测定RNA纯度。使用日本Takara Biotechnology公司生产的PrimeScript RT试剂盒将RNA样本逆转录;反应条件:42℃ 20

min, 99℃ 5 min, 72℃ 10 min, 获得cDNA模板。使用美国Thermo Fisher Scientific生产的SYBR Green PCR Master Mix试剂盒和ABI 7500 Real-Time PCR系统检测GLUT-1 mRNA相对于GAPDH的水平;定量测量使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方式;反应条件:94℃预变性60 s, 98℃变性10 s, 58℃退火2 s, 74℃延伸30 s, 扩增30个循环, 74℃最终延伸7 min。引物序列为:GLUT-1上游引物为5'-CAAACAAAGGAC-CAAGAAATT-3', 下游引物为5'-UUUCUUGGUC-CUUUGUUUGT-3'; GAPDH前进, 5'-TCCCAC-CACCATCTTCCAG-3'和反向, 5'-GGTATCCATC-GCCATGCTC-3'。

#### 1.2.2 免疫单边印迹法检测GLUT-1蛋白表达

将样品悬浮在十二烷基硫酸钠(SDS)-聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)缓冲液(125 mmol/L Tris-HCl, pH 6.8, 4% SDS, 20%甘油, 100 mmol/L PMSF, 10 mg/mL抑肽酶, 1 mg/mL亮肽素, 1 mg/mL胃抑素A)中;加入FLAG抗体(1:1 000稀释)和内参B-actin抗体(1:4 000稀释)4℃孵育过夜;后用武汉艾美捷科技有限公司GLUT-1抗血清(纯化的山羊抗二抗抗体1:10 000稀释)进行免疫印迹。采集图像后,用凝胶成像仪对免疫印迹条带灰度值进行分析。

#### 1.2.3 代谢指标检测

采用全自动生化分析仪(美国,贝克曼库尔特, AU5800)测量患者24 h尿蛋白、尿酸、谷丙转氨酶、谷草转氨酶、血清肌酐、乳酸、丙酮酸水平。

### 1.3 观察指标

①两组患者临床资料比较。②GLUT-1 mRNA表达水平与子痫前期代谢指标乳酸水平、丙酮酸水平的相关性。③GLUT-1蛋白表达水平与子痫前期代谢指标乳酸水平、丙酮酸水平的相关性。

### 1.4 亚分组

以妊高症严重程度分组,分析GLUT-1表达水平与妊高症严重程度及代谢指标的相关性。

### 1.5 统计学方法

使用SPSS 22.0进行数据处理;计量资料用( $\bar{x} \pm s$ )表示,使用t检验进行比较;两变量间进行Pearson相关分析; $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 子痫前期组与对照组患者临床资料比较  
子痫前期组GLUT-1表达水平高于对照组,差

异有统计学意义( $P<0.05$ );代谢指标乳酸水平、丙酮酸水平子痫前期组高于对照组,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),其余指标比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。见表1。

表1 两组患者临床资料比较( $\bar{x}\pm s$ )

Table 1 Characteristics of the two groups of patients ( $\bar{x}\pm s$ )

临床资料	子痫前期组 (n=100)	对照组 (n=100)	t值	P值
年龄(岁)	27.56±1.14	27.84±1.63	0.939	0.353
身高(cm)	156.27±4.62	157.01±5.13	0.753	0.455
体重(kg)	63.75±4.27	62.87±5.41	0.872	0.387
BMI(kg/m <sup>2</sup> )	27.21±3.26	26.84±3.84	0.509	0.613
收缩压(mmHg)	149.16±5.11	124.87±14.39	9.773	<0.001
舒张压(mmHg)	98.63±4.92	84.18±6.80	11.557	<0.001
丙酮酸(mmol/L)	0.12±0.02	0.07±0.02	11.346	<0.001
乳酸(mmol/L)	1.09±0.06	0.94±0.05	14.472	<0.001
谷丙转氨酶(mg/L)	38.74±4.32	36.17±2.23	4.483	<0.001
尿酸(μmol/L)	226.89±74.40	219.45±56.87	0.612	0.542
谷草转氨酶(mmol/L)	33.21±2.44	31.47±2.14	3.988	<0.001
血清肌酐(μmol/L)	115.47±12.82	62.94±19.71	14.715	<0.001
尿蛋白(g/24 h)	0.67±0.21	0.25±0.02	19.746	<0.001
肾小球滤过率 [mL/(min <sup>-1</sup> ·(73m <sup>2</sup> ) <sup>-1</sup> ]	131.54±9.30	134.51±8.27	1.769	0.082
GLUT-1 mRNA 表达水平	1.00±0.08	0.81±0.09	11.054	<0.001
GLUT-1 蛋白表达	0.70±0.15	0.64±0.13	3.023	0.003

## 2.2 GLUT-1 mRNA 表达水平与子痫前期代谢指标乳酸水平、丙酮酸水平的相关性

GLUT-1 mRNA 表达水平与子痫前期代谢指标乳酸水平、丙酮酸水平呈正相关( $P<0.05$ )。见图1。

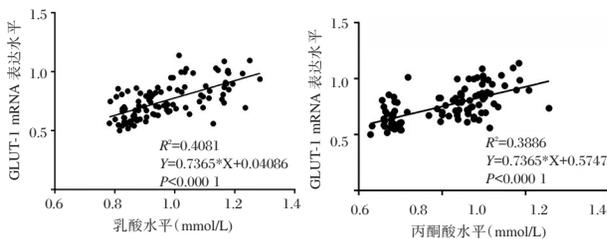


图1 GLUT-1 mRNA 与乳酸及丙酮酸水平相关性

Figure 1 GLUT-1 mRNA is associated with lactate and pyruvate levels

## 2.3 GLUT-1 蛋白表达水平与子痫前期代谢指标乳酸水平、丙酮酸水平的相关性

GLUT-1 蛋白表达水平与子痫前期代谢指标乳酸水平、丙酮酸水平呈正相关( $P<0.05$ ),见图2。

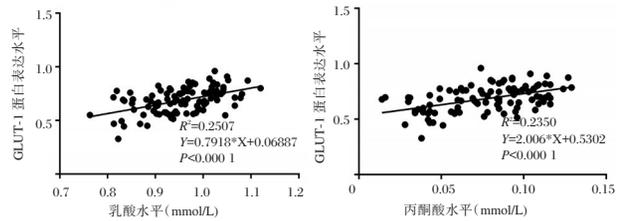


图2 GLUT-1 蛋白与乳酸及丙酮酸水平相关性

Figure 2 Glut-1 protein is associated with lactate and pyruvate levels

期高血压、子痫前期等,严重影响母婴健康,是孕产妇和围生儿发病和死亡的主要原因之一<sup>[5-6]</sup>。Park<sup>[7]</sup>等人证明在中度高血压的动物模型中血管平滑肌细胞所产生的胰岛素刺激的葡萄糖摄取改变,这表明在高血压状态下葡萄糖转运蛋白表达及血管葡萄糖摄取发生了改变。Kevin<sup>[8]</sup>等人在高血压大鼠动脉样本中发现葡萄糖转运蛋白表达和葡萄糖摄取发生了实质性变化,证实高血压中葡萄糖转运蛋白表达变化独立于胰岛素信号传导,依赖于高血压状态。因此,推测在妊高症及子痫前期中 GLUT-1 的表达水平也依赖于血压变化。

本研究结果显示对比健康人群与子痫前期患者 GLUT-1 表达水平、代谢指标乳酸水平、丙酮酸水平发现妊高症患者均高于健康受试者。分析认为:在 Palaniappan<sup>[9]</sup>等人的研究中指出在妊娠期高血压疾病患者中存在糖代谢异常、胰岛素抵抗等。1 mol 葡萄糖有氧酵解过程产生的 ATP 少于正常人体,机体为维持 ATP 平衡状态,可适应性加快该葡萄糖酵解过程<sup>[10-11]</sup>。葡萄糖与氧气在短时间内大量消耗,可引起患者不同程度的低氧和低血糖状态。机体低氧状态可促发机体无氧酵解,产生乳酸、丙酮酸等。而低血糖状态可引起 GLUT-1 mRNA 和蛋白上调,加速葡萄糖转运。因此,在子痫前期患者中 GLUT-1 表达水平、代谢指标乳酸、丙酮酸水平高于对照组人群。

Prasannarong<sup>[12]</sup>等人的研究中表明在高血压患者中存在葡萄糖酵解异常。异常状态的糖酵解过程消耗过多的氧气及葡萄糖导致机体处缺氧状态,缺氧状态可导致葡萄糖摄取和葡萄糖磷酸化(己糖激酶)和乳酸脱氢酶活性的增加,导致葡萄糖酵解过程中产生更多的乳酸及丙酮酸<sup>[13]</sup>。在 Polak<sup>[14]</sup>等人的研究中指出低氧、低血糖状态虽可刺激 GLUT-1 mRNA 和蛋白增加,增强细胞葡萄糖转运,但两个糖酵解步骤的活性没有显著变化。证实当考虑到糖酵解途径,尤其是乳酸脱氢酶途

## 3 讨论

妊娠期高血压疾病是妊娠期特有的疾病,以全身小血管痉挛为病理特性,疾病类型包括妊娠

径时, *GLUT-1 mRNA* 和蛋白表达的上调是促进葡萄糖几乎完全转化为乳酸、丙酮酸的必要条件。

综上所述, *GLUT-1* 表达水平在子痫前期外周血中含量高于健康人群, 并与子痫前期患者代谢指标乳酸水平、丙酮酸水平呈正相关, 推测 *GLUT-1* 参与了子痫前期患者代谢过程中。葡萄糖摄取和糖酵解也是炎症性疾病的特征, 在子痫前期患者中存在核转录因子  $\kappa B$  等炎症因子的改变, 但本研究未将其纳入探讨, 另外由于样本量较少且来源较单一, 研究结果可能存在偏倚, 因此后期需将纳入炎症因子进行大样本、多中心的研究。

### 参考文献

- [1] Cao Y, Zhang X, Wang L, et al. PFKFB3-mediated endothelial glycolysis promotes pulmonary hypertension [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2019, 116(27): 13394-13403.
- [2] 丁坤琼, 杨靖. *GLUT-1* 在妊娠期高血压以及子痫前期发病机制中的作用研究[J]. 中国煤炭工业医学杂志, 2019, 22(3): 280-284.
- [3] Hien TT, Garcia-Vaz E, Stenkula KG, et al. MicroRNA-dependent regulation of *KLF4* by glucose in vascular smooth muscle[J]. J Cell Physiol, 2018, 233(9): 7195-7205.
- [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, 19(3): 161-169.
- [5] 周隽, 唐佳, 郑利平, 等. *PI, RI* 联合 *sFh-1/PLCF* 检测对妊娠中晚期孕妇子痫前期的预测价值[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2021, 13(1): 107-110.
- [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] Park JL, Loberg RD, Duquaine D, et al. *GLUT4* facilitative glucose transporter specifically and differentially contributes to agonist-induced vascular reactivity in mouse aorta[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005, 25(8): 1596-1602.
- [8] Atkins KB, Johns D, Watts S, et al. Decreased vascular glucose transporter expression and glucose uptake in DOCA-salt hypertension[J]. J Hypertens, 2001, 19(9): 1581-1587.
- [9] Palaniappan B, Arthur S, Sundaram VL, et al. Inhibition of intestinal villus cell *Na/K-ATPase* mediates altered glucose and *NaCl* absorption in obesity-associated diabetes and hypertension[J]. FASEB J, 2019, 33(8): 9323-9333.
- [10] Yanai H, Yoshida H. Beneficial Effects of Adiponectin on Glucose and Lipid Metabolism and Atherosclerotic Progression: Mechanisms and Perspectives[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(5): 1190.
- [11] Heresi GA, Malin SK, Barnes JW, et al. Abnormal Glucose Metabolism and High-Energy Expenditure in Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension [J]. Ann Am Thorac Soc, 2017, 14(2): 190-199.
- [12] Prasannarong M, Saengsirisuwan V, Surapongchai J, et al. Rosmarinic acid improves hypertension and skeletal muscle glucose transport in angiotensin II-treated rats[J]. BMC Complement Altern Med, 2019, 19(1): 165.
- [13] Reckzeh ES, Waldmann H. Small-Molecule Inhibition of Glucose Transporters *GLUT-1-4*[J]. ChemBiochem, 2020, 21(1-2): 45-52.
- [14] Polak A, Harasim-Symbor E, Malinowska B, et al. The Endocannabinoid System Affects Myocardial Glucose Metabolism in the DOCA-Salt Model of Hypertension[J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 46(2): 727-739.

(上接第 646 页)

- [7] 朱艳艳, 张旭, 柳澄, 等. 成人初治继发性活动性肺结核的计算机断层成像特征分析[J]. 中华传染病杂志, 2020, 38(6): 359-363.
- [8] 李晓琴, 肖彤洋, 李马超, 等. 结核分枝杆菌 *DnaK* 和 *MPT83* 蛋白的抗原性评价[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2019, 39(2): 106-113.
- [9] 金鹏锋, 陈琳, 胡耀仁. T 细胞耗竭在结核分枝杆菌感染中的作用[J]. 中华医院感染学杂志, 2019, 29(12): 1917-1920.
- [10] Cicconi A, Rai R, Xiong X, et al. Microcephalin 1/*BRIT1-TRF2* interaction promotes telomere replication and repair, linking telomere dysfunction to primary microcephaly [J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 5861.
- [11] Wians FH, Jacobson JM, Dev J, et al. Thyrotroph function assessed by sensitive measurement of thyrotropin with three immunoradiometric assay kits: analytical evaluation and comparison with the thyroliberin stimulation test [J]. Clin Chem, 2019, 56(3): 563-567.
- [12] Mohamed MF, Sroor FM, Ibrahim NS, et al. Novel [1,2,4] triazolo[3,4-a]isoquinoline chalcones as new chemotherapeutic agents: Block IAP tyrosine kinase domain and induce both intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis [J]. Invest New Drugs, 2021, 39(1): 98-100.
- [13] Cong H, Xu L, Wu Y, et al. Inhibitor of Apoptosis Protein (IAP) Antagonists in Anticancer Agent Discovery: Current Status and Perspectives [J]. J Med Chem, 2019, 62(12): 5124-5125.
- [14] Bilon K, Nazmul H, Xiaoyun C, et al. *HMGB1* promotes ductular reaction and tumorigenesis in autophagy-deficient livers[J]. J Clin Invest, 2019, 50(45): 814-816.
- [15] Run L, Wang L, Nong X, et al. Involvement of *HMGB1* in vemurafenib resistance in thyroid cancer cells harboring *BRAF (V600E)* mutation by regulating excessive autophagy [J]. Endocrine, 2020, 30(13): 59-65.

## 血清 ApoA-I、CD40L、VCAM-1 水平与老年 SP 患者 SHG 及预后相关性

沈晶晶\* 刘建华 曹亮

**[摘要]** 目的 研究血清载脂蛋白 A-I(ApoA-I)、肿瘤坏死因子相关激活蛋白(CD40L)、血管细胞黏附因子-1(VCAM-1)水平与老年重症肺炎(SP)患者应激性高血糖(SHG)及预后相关性。方法 选取本院2018年1月至2020年9月收治的97例SP患者(重症组)和102例普通肺炎患者(普通组)进行研究,另选取同期来本院体检的104例健康人作为对照组。根据是否合并SHG将SP患者分为合并组( $n=55$ )与未合并组( $n=42$ )。根据SP患者28d生存情况将预后分为存活组( $n=67$ )和死亡组( $n=30$ )。检测各组患者血清ApoA-I、CD40L、VCAM-1水平,并采用Logistic回归模型分析老年SP患者预后影响因素。结果 重症组患者血清CD40L、VCAM-1水平明显高于普通组和对照组,血清ApoA-I水平明显低于对照组,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。合并组患者血清ApoA-I显著低于未合并组,血清CD40L、VCAM-1水平和APACHE II评分显著高于未合并组,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。血清ApoA-I水平与APACHE II评分呈负相关( $P<0.05$ ),血清CD40L、VCAM-1水平与APACHE II评分呈正相关( $P<0.05$ )。存活组和死亡组患者年龄、性别比较差异无统计学意义( $P>0.05$ ),但存活组患者APACHE II评分、血清CD40L、VCAM-1水平均显著高于死亡组,血清ApoA-I显著低于死亡组,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。APACHE II评分、血清ApoA-I、CD40L、VCAM-1均是影响SP患者预后的独立影响因素( $P<0.05$ )。结论 血清ApoA-I、CD40L和VCAM-1在SP患者体内表达异常,且与患者疾病严重程度、SHG的发生密切相关,可作为临床评估SP患者预后的重要指标。

**[关键词]** ApoA-I; CD40L; VCAM-1; 应激性高血糖

### Correlation between the serum ApoA-I, CD40L and VCAM-1 levels and stress hyperglycemia in elderly patients with severe pneumonia and prognosis

SHEN Jingjing\*, LIU Jianhua, CAO Liang

(Department of Respiratory and Critical Care Unit, the First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou, Hebei, China, 075000)

**[ABSTRACT]** **Objective** To study the correlation of serum apolipoprotein AI (ApoA-I), tumor necrosis factor-related activator protein (CD40L) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) levels with stress hyperglycemia (SHG) and prognosis in elderly patients with severe pneumonia (SP). **Methods** The clinical data of 97 patients with SP and 102 patients with common pneumonia who were admitted to the hospital from January 2018 to September 2020 were analyzed retrospectively. Meanwhile, 104 healthy individuals were selected as a control group. According to the presence or absence of SHG, patients with SP were divided into the combination group (55 cases) and the non-combination group (42 cases). The levels of serum ApoA-I, CD40L and VCAM-1 in each group were detected. The influencing factors of prognosis in elderly patients with SP were analyzed by Logistic regression model. **Results** The levels of serum CD40L and VCAM-1 in the severe group were significantly higher than those in the common group and the control group, while the level of

基金项目:河北省医学科学研究课题计划(20180915)

作者单位:河北北方学院附属第一医院呼吸与危重症监护病房,河北,张家口 075000

\*通信作者:沈晶晶, E-mail: zhong75804wang34@163.com

serum ApoA-I was significantly lower than that in the control group. The differences were statistically significant ( $P < 0.05$ ). The level of serum ApoA-I in the combination group was significantly lower than that in the non-combination group, while the levels of serum CD40L and VCAM-1, and APACHE II score were significantly higher than those in the non-combination group ( $P < 0.05$ ). The level of serum ApoA-I was negatively correlated with the APACHE II score ( $P < 0.05$ ), and the levels of serum CD40L and VCAM-1 were positively correlated with the APACHE II score ( $P < 0.05$ ). There was no statistically significant difference in age or gender between the survival group and the death group ( $P > 0.05$ ), but the APACHE II score, serum CD40L and VCAM-1 levels in the survival group were significantly higher than those in the death group, and the level of serum ApoA-I was significantly lower than that in the death group, the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). The APACHE II score, serum ApoA-I, CD40L and VCAM-1 are all independent factors affecting the prognosis of SP patients ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Serum ApoA-I, CD40L and VCAM-1 are abnormally expressed in patients with SP, and are closely related to the severity of the disease and the occurrence of SHG. They can be applied as important indicators for clinical evaluation of the prognosis of SP patients.

**[KEY WORDS]** ApoA-I; CD40L; VCAM-1; Stress hyperglycemia

据统计我国每年大约有 250 万肺炎患者,其中约 13% 左右的患者因发展为呼吸衰竭、脓毒症等进入重症监护室<sup>[1]</sup>。寻找重症肺炎(Severe pneumonia, SP)的病因以及预后影响因素,对于治疗方案的制定以及预后改善至关重要。有学者认为老年 SP 患者可能因细胞内环境变化、胰岛素抵抗、医源性因素等多种因素的共同作用,其血糖波动更为明显<sup>[2]</sup>。而应激反应引起的高血糖与危重症患者的不良预后密切相关<sup>[3]</sup>,但现阶段临床尚缺乏对于 SP 患者应激性高血糖(Stress hyperglycemia, SHG)和预后的预测指标。载脂蛋白 A-I(Apolipoprotein A-I, ApoA-I)是高密度脂蛋白的主要组成成分,可反映机体的炎症水平<sup>[4]</sup>。而肿瘤坏死因子相关激活蛋白(CD40 ligand, CD40L)和血管细胞黏附因子-1(Vascular cell adhesion factor-1, VCAM-1)是与细菌性肺炎相关的炎症反应标志物<sup>[5]</sup>。但关于上述三种因子在 SP 患者中的表达情况,与患者 SHG 以及预后的关系如何,则未见有完整的研究。故本研究将探讨血清 ApoA-I、CD40L、VCAM-1 水平与老年 SP 患者 SHG 及预后相关性。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选取本院 2018 年 1 月至 2020 年 9 月收治的 97 例 SP 患者(重症组)和 102 例普通肺炎患者(普通组)进行研究。纳入标准:①年龄 $>50$ 岁;②均符合肺炎诊断标准,若患者需要呼吸支持、循环支持和加强监护治疗等则可认为已达到 SP<sup>[6]</sup>;③患者临床资料完整;④均在本院接受治疗。排除标准:①合并恶性肿瘤、糖尿病以及肝肾功能异常者;②免疫功能

异常者;③非细菌性感染肺炎者;④近 1 个月内存在抗感染或者激素治疗者。重症组男 61 例,女 36 例;年龄平均( $71.42 \pm 7.94$ )岁。普通组男 67 例,女 35 例;年龄平均( $70.14 \pm 8.31$ )岁。另选择同期来本院体检的健康人 104 例(对照组)。其中对照组男 70 例,女 34 例;年龄平均( $70.53 \pm 8.71$ )岁。三组患者一般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

收集患者年龄、性别等一般资料,重症组和普通组患者于入院后次日抽取清晨空腹静脉血 3 mL,采用免疫比浊法检测血清 ApoA-I 水平,酶联免疫吸附法检测血清 CD40L、VCAM-1 水平。试剂盒均由上海中乔新舟生物科技有限公司提供,检测过程均严格按照试剂盒说明书进行。重症组患者在入院当天均采用急性生理和慢性健康评分 II(Acute physiology and chronic health evaluation-II, APACHE II)<sup>[7]</sup>评估患者病情严重程度,其内容由急性生理学评分、年龄评分和慢性健康评分三个部分组成,分值越高表示患者病情越为严重。另采用血糖仪检测重症患者血糖情况,其指标包括空腹血糖(Fasting blood glucose, FPG)或随机血糖水平,根据 SP 患者是否合并 SHG 分为合并组( $n=55$ )与未合并组( $n=42$ )。SHG 诊断标准<sup>[8]</sup>:FPG $\geq 7.0$  mmol/L 或随机血糖 $\geq 11.1$  mmol/L,对于 FPG $\geq 10.0$  mmol/L 的患者进行相应的血糖控制治疗,治疗方案参考美国糖尿病医师协会推荐的 The NICE-SUGAR Study 方案。根据 SP 患者 28 d 生存情况将预后分为存活组( $n=67$ )和死亡组( $n=30$ )。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS 20.0 统计软件进行统计分析。计数资料以  $n(\%)$  表示,行  $\chi^2$  检验;计量资料以  $(\bar{x} \pm s)$  表示,组间比较行  $t$  检验,多组间比较采用单因素-方差检验;血清 ApoA-I、CD40L、VCAM-1 水平与 APACHE II 评分相关性分析采用 Spearman 分析;预后影响因素采用 Logistics 回归分析;以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 3组血清 ApoA-I、CD40L、VCAM-1 水平比较

重症组血清 CD40L、VCAM-1 水平明显高于普通组和对照组,血清 ApoA-I 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 3组血清 ApoA-I、CD40L、VCAM-1 水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Comparison of serum apoA-I, CD40L and VCAM-1 levels among 3 groups ( $\bar{x} \pm s$ )

分组	n	ApoA-I(g/L)	CD40L(ng/mL)	VCAM-1(ng/mL)
重症组	97	0.93±0.31	2.78±0.67	613.25±153.54
普通组	102	1.15±0.34	2.31±0.72	523.59±132.47
对照组	104	1.32±0.38	2.06±0.74	465.76±108.83
F 值		32.102	26.335	30.632
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

### 2.2 合并组与未合并组血清 ApoA-I、CD40L、VCAM-1 水平和 APACHE II 评分比较

合并组血清 ApoA-I 显著低于未合并组,血清 CD40L、VCAM-1 水平和 APACHE II 评分显著高于未合并组,差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 2。

表 2 合并组与未合并组血清 ApoA-I、CD40L、VCAM-1 水平和 APACHE II 评分比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Comparison of serum levels of apoA-I, CD40L and VCAM-1 and APACHE II scores of the combination group and the non-combination group ( $\bar{x} \pm s$ )

分组	n	ApoA-I (g/L)	CD40L (ng/mL)	VCAM-1 (ng/mL)	APACHE II 评分(分)
合并组	55	0.83±0.29	3.02±0.68	659.67±163.75	28.23±4.81
未合并组	42	1.06±0.34	2.46±0.65	552.49±151.73	24.28±4.45
t 值		3.591	4.096	3.296	4.138
P 值		0.001	<0.001	0.001	<0.001

### 2.3 血清 ApoA-I、CD40L、VCAM-1 水平与 APACHE II 评分相关性

血清 ApoA-I 水平 ( $r=0.218$ ) 与 APACHE II 评分呈负相关,血清 CD40L ( $r=0.259$ )、VCAM-1 ( $r=0.324$ ) 水平与 APACHE II 评分呈正相关 ( $P < 0.05$ )。见图 1。

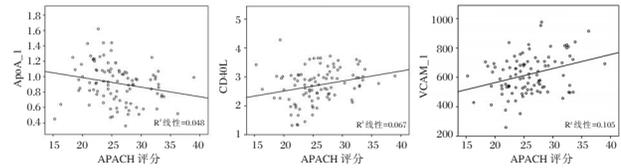


图 1 血清 ApoA-I、CD40L、VCAM-1 水平与 APACHE II 评分相关性

Figure 1 Correlation between serum levels of apoA-I, CD40L, VCAM-1 and APACHE II score

### 2.4 不同预后 SP 患者一般资料比较

存活组和死亡组年龄、性别比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。存活组 APACHE II 评分、血清 CD40L、VCAM-1 水平均显著高于死亡组,血清 ApoA-I 显著低于死亡组,差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 4。

### 2.5 SP 患者预后影响因素分析

以患者预后为自变量,不同预后患者一般资料中比较有显著差异的因素作为因变量,进行 Logistics 回归分析,结果显示 APACHE II 评分、血清 ApoA-I、CD40L、VCAM-1 均是影响 SP 患者预后的独立影响因素 ( $P < 0.05$ )。见表 5。

表 5 SP 患者预后影响因素

Table 5 Prognostic factors of patients with SP

指标	$\beta$ 值	SE	wald $\chi^2$	OR 值	95%CI	P 值
APACHE II 评分	0.431	0.137	1.539	1.176	1.176~2.013	0.002
ApoA-I	0.472	0.124	14.489	1.603	1.257~2.044	<0.001
CD40L	0.204	0.092	4.917	1.226	1.024~1.469	0.027
VCAM-1	0.312	0.145	4.630	1.366	1.028~1.815	0.032

## 3 讨论

目前临床对于 SP 发生发展的具体机制尚未

表 4 不同预后 SP 患者一般资料比较 [ $n(\%)$ , ( $\bar{x} \pm s$ )]

Table 4 Comparison of general data of SP patients with different prognosis [ $n(\%)$ , ( $\bar{x} \pm s$ )]

分组	n	性别(例)		年龄(岁)	APACHE II 评分(分)	ApoA-I(g/L)	CD40L(ng/mL)	VCAM-1(ng/mL)
		男	女					
存活组	67	39(58.21)	28(41.79)	69.70±7.82	25.21±4.39	1.10±0.34	2.66±0.62	590.61±153.89
死亡组	30	22(73.33)	8(26.67)	72.26±8.21	29.46±5.25	0.81±0.25	3.04±0.78	663.81±168.93
t/ $\chi^2$ 值			2.031	1.467	4.143	4.187	2.571	2.101
P 值			0.154	0.146	<0.001	<0.001	0.012	0.038

完全明确,部分学者认为炎症反应在其中扮演着重要角色<sup>[9]</sup>。ApoA-I是高密度蛋白的主要载脂蛋白,近年来国外部分研究证实了ApoA-I具有抑制细菌脂多糖(Lipopolysaccharides, LPS)、脂磷壁酸(Lipoteichoic acid, LTA)诱导的急性肺损伤和内毒素血症的作用,同时还可抑制LPS诱导的系统性炎症和多器官功能损伤<sup>[10]</sup>。孔路科等人<sup>[11]</sup>研究表明ApoA-I与肺部炎症反应的发生密切相关,可用于评估肺炎炎症反应严重程度。本研究结果也表明血清ApoA-I可能参与SP的发生。

SHG的发生会影响肺炎患者机体代谢、免疫功能,进而发展为多器官功能障碍综合征,严重影响患者预后<sup>[12]</sup>。随着血清生物标志物的深入研究,有学者提出检测部分生物标志物可在反映重症患者疾病严重程度的同时,应用于应激性血糖事件以及预后判断中。如张细江等人<sup>[13]</sup>研究显示coceptin与SP患者SHG以及APACHE II呈正相关,对于患者疾病进展以及预后均具有较好的评估价值。本研究结果显示血清ApoA-I、CD40L和VCAM-1不仅可反映SP患者疾病严重程度,也与SHG的发生密切相关。张净等人<sup>[14]</sup>通过临床实验也表明血清ApoA-I对于SP患者的疾病严重程度和应激性糖代谢紊乱具有一定的预测价值,与本研究结果相一致。既往研究表明重症患者SHG的发生可能与内源性糖异生增加、胰岛素抵抗有关<sup>[15]</sup>。CD40L与CD40的交联作用是为炎症介质、细胞黏附因子以及细胞因子的产生提供信号,可促进机体TNF- $\alpha$ 的分泌<sup>[16]</sup>。而TNF- $\alpha$ 作为炎症反应的始动因子,其作用于血管内皮细胞会导致VCAM-1水平上升,故而对SHG具有一定的预测价值<sup>[17]</sup>。此外,本研究结果证明血清ApoA-I、CD40L和VCAM-1水平与SP关系密切,可为患者的预后评估提供一定的参考,推测其原因可能与血清ApoA-I、CD40L和VCAM-1的异常变化可促进炎症反应、SHG事件的发生有关。

综上所述,血清ApoA-I、CD40L和VCAM-1在SP患者体内表达异常,且与患者疾病严重程度、SHG的发生密切相关,有望作为临床评估SP患者预后的重要指标。

## 参考文献

- [1] Cilloniz C, Martin-Loeches I, Garcia-Vidal C, et al. Microbial Etiology of Pneumonia: Epidemiology, Diagnosis and Resistance Patterns[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(12):2120.
- [2] 尹春彪,姚明明,舒适. sRAGE与重症肺炎患者病情程度,应激性高血糖的关系[J]. *中国现代医学杂志*, 2020, 30(12):51-56.
- [3] 王宝,孙媛,宋康,等. 应激性高血糖对颅脑损伤患者炎症状态和外周血乳酸, MMP-9水平以及28天死亡率的影响[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2019, 11(1):45-49.
- [4] 孙磊,刘奉琴,赵鹏鹏. 血清CD40L, VCAM-1表达与儿童细菌性肺炎严重程度的相关性[J]. *广东医学*, 2019, 40(17):2495-2498.
- [5] Georgila K, Vyrla D, Drakos E. Apolipoprotein A-I (ApoA-I), Immunity, Inflammation and Cancer [J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11(8):1097.
- [6] 中华医学会呼吸病学分会感染学组. 成人肺炎支原体肺炎诊治专家共识[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2010, 33(9):643-645.
- [7] Katsaragakis S, Papadimitropoulos K, Antonakis P, et al. Comparison of Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II (APACHE II) and Simplified Acute Physiology Score II (SAPS II) scoring systems in a single Greek intensive care unit[J]. *Crit Care Med*, 2000, 28(2):426.
- [8] MacIntyre EJ, Majumdar SR, Gamble JM, et al. Stress hyperglycemia and newly diagnosed diabetes in 2124 patients hospitalized with pneumonia[J]. *Am J Med*, 2012, 125(10):e17-23.
- [9] Liu GB, Cui XQ, Wang ZB, et al. Detection of serum procalcitonin and hypersensitive C-reactive protein in patients with pneumonia and sepsis[J]. *J Biol Regul Homeost Agents*, 2018, 32(5):1165-1169.
- [10] de Bont N, Netea MG, Demacker PN, et al. Apolipoprotein E-deficient mice have an impaired immune response to *Klebsiella pneumoniae* [J]. *Eur J Clin Invest*, 2015, 30(9):818-822.
- [11] 孔路科,刘婷婷,赵书青,等. 肺炎支原体肺炎患儿血清HDL-C、ApoA I水平变化及其临床意义[J]. *山东医药*, 2019, 59(19):27-30.
- [12] Magee MJ, Salindri AD, Kyaw NTT, et al. Stress Hyperglycemia in Patients with Tuberculosis Disease: Epidemiology and Clinical Implications[J]. *Curr Diab Rep*, 2018, 18(9):71.
- [13] 张细江,曹同瓦,赵锋. 重症肺炎患者coceptin与病情严重性、预后及应激性高血糖的关系[J]. *中华急诊医学杂志*, 2016, 25(3):338-342.
- [14] 张净,陈颖,王珊,等. 血清载脂蛋白A-I水平与重症肺炎患者病情严重程度、应激性高血糖及预后相关性研究[J]. *临床军医杂志*, 2020, 48(8):956-957, 959.
- [15] Mifsud S, Schembri EL, Gruppeta M. Stress-induced hyperglycaemia[J]. *Br J Hosp Med (Lond)*, 2018, 79(11):634-639.
- [16] Han L, Dai L, Zhao YF, et al. CD40L promotes development of acute aortic dissection via induction of inflammation and impairment of endothelial cell function[J]. *Aging (Albany NY)*, 2018, 10(3):371-385.
- [17] Wu N, Shen H, Liu H, et al. Acute blood glucose fluctuation enhances rat aorta endothelial cell apoptosis, oxidative stress and pro-inflammatory cytokine expression in vivo[J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2016, 15(1):109.

## 定量降低主食GL对GDM并发高脂血症患者的影响

韩晔<sup>1</sup> 张前<sup>1\*</sup> 任阳<sup>2</sup> 李丹<sup>3</sup> 王亚娟<sup>4</sup> 蒋漫红<sup>1</sup> 刘丽花<sup>5</sup>

**[摘要]** **目的** 探究定量降低主食血糖负荷(GL)疗法对妊娠期糖尿病(GDM)并发高脂血症患者的影响。**方法** 选取2019年2月至2020年7月于本院接受饮食指导的GDM合并高脂血症患者424例作为研究对象。根据自愿原则分为研究组( $n=245$ )及对照组( $n=179$ ),对照组采取常规GDM饮食指导,研究组在对照组基础上给予定量降低主食血糖负荷疗法,比较两组干预前后空腹血糖(FPG)、餐后2h血糖(2hPG)、糖化血红蛋白(HbA1c)、甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白(LDL-C)、空腹胰岛素(FINS)、胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)、胰岛素敏感指数(ISI)指标变化;对两组干预期间体重变化及新生儿出生体重进行比较;对2组不良妊娠结局进行比较。**结果** 研究组干预8周后FPG、2hPG、HbA1c、TG、TC、LDL-C水平明显低于对照组,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。研究组干预8周后FINS、HOMA-IR水平明显低于对照组,ISI水平明显高于对照组,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。研究组干预后体重增速及新生儿出生体重明显低于对照组,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。研究组不良妊娠结局总发生率为18.78%,明显低于对照组的27.93%,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。**结论** 定量降低主食血糖负荷疗法对GDM并发高脂血症患者干预可明显改善患者血糖及血脂水平,降低不良妊娠结局发生率,具有良好的临床应用价值。

**[关键词]** 妊娠期糖尿病;高脂血症;血糖负荷;代谢指标

### Effects of quantitatively reducing staple food GL on patients with GDM complicated by hyperlipidemia

HAN Ye<sup>1</sup>, ZHANG Qian<sup>1\*</sup>, REN Yang<sup>2</sup>, LI Dan<sup>3</sup>, WANG Yajuan<sup>4</sup>, JIANG Manhong<sup>1</sup>, LIU Lihua<sup>5</sup>

(1. Department of Nutrition, Hebei Petro China Central Hospital, Langfang, Hebei, China, 065000; 2. Department of Occupational Hygiene, Langfang Center for Disease Control and Prevention, Langfang, Hebei, China, 065000; 3. Department of Traditional Chinese Medicine, Hebei PetroChina Central Hospital, Langfang, Hebei, China, 065000; 4. Department of Obstetrics and Gynecology, Hebei Petro China Central Hospital, Langfang, Hebei, China, 065000; 5. Hebei Petro China Central Hospital Health Center, Langfang, Hebei, China, 065000)

**[ABSTRACT]** **Objective** To explore the effects of quantitatively reducing staple food glycemic load (GL) on patients with gestational diabetes mellitus (GDM) complicated by hyperlipidemia. **Methods** A total of 424 patients with GDM and hyperlipidemia given diet guidance in the hospital from February 2019 to July 2020 were enrolled as the research objects. According to voluntary principle, they were divided into the study group ( $n=245$ ) and the control group ( $n=179$ ). The control group was given routine GDM diet guidance, while the study group was given the therapy of quantitatively reducing staple food GL on basis of the control group. The changes in fasting blood glucose (FPG), 2h postprandial blood glucose (2hPG), triglyceride (TG), total cholesterol (TC), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), fasting insulin (FINS), insulin

基金项目:河北省廊坊市科技支撑计划项目(2018013161)

作者单位:1. 河北中石油中心医院营养科,河北,廊坊 065000

2. 廊坊市疾病预防控制中心职业卫生科,河北,廊坊 065000

3. 河北中石油中心医院中医科,河北,廊坊 065000

4. 河北中石油中心医院妇产科,河北,廊坊 065000

5. 河北中石油中心医院保健中心,河北,廊坊 065000

\*通信作者:张前, E-mail: hanye2087@163.com

resistance index (HOMA-IR) and insulin sensitivity index (ISI) before and after intervention, changes of weight during intervention, birth weight of neonates, and adverse pregnancy outcomes were compared between the two groups. **Results** After 8 weeks of intervention, the levels of FPG, 2hPG, HbA1c, TG, TC and LDL-C in the study group were significantly lower than those in the control group ( $P<0.05$ ). The levels of FINS and HOMA-IR were significantly lower than those in the control group, and the ISI level was significantly higher than that in the control group ( $P<0.05$ ). After intervention, weight gain and birth weight of neonates in the study group were significantly lower than those in the control group ( $P<0.05$ ), and total incidence of adverse pregnancy outcomes was significantly lower than that in the control group (18.78% vs 27.93%) ( $P<0.05$ ). **Conclusion** The therapy of quantitatively reducing staple food GL can significantly improve the levels of blood glucose and blood lipid in patients with GDM complicated by hyperlipidemia, and reduce the incidence of adverse pregnancy outcomes.

[KEY WORDS] Gestational diabetes mellitus; Hyperlipidemia; Glycemic load; Metabolic index

妊娠期糖尿病(gestational diabetes mellitus, GDM)为妊娠期常见合并症之一,其发病率高,危害性大,已经成为威胁母婴健康的重要因素<sup>[1]</sup>。为满足胎儿生长营养需求,妊娠期女性常伴有糖脂代谢紊乱等症状,因此,血糖及血脂的控制对于GDM患者的治疗尤为重要<sup>[2]</sup>。超30%的GDM患者存在血脂异常状态,GDM合并高脂血症可加重患者糖代谢异常,增加心脑血管疾病及不良妊娠结局产生的风险<sup>[3]</sup>。引发体内脂质异常的根本原因为饮食结构不合理,而饮食疗法可改善患者血脂指标且,对血脂的控制效果较好,可预防妊娠期高血压的产生,降低巨大儿发生率。有研究发现高血糖负荷(glycemic load, GL)为GDM发病重要因素,降低GL对于糖尿病患者的治疗有一定的效果<sup>[4]</sup>。但临床缺乏具体针对GDM合并高脂血症患者的个体化营养治疗方案。故本研究拟对该病患者进行个体化饮食指导干预,探究其治疗效果,为GDM患者孕期保健及临床工作提供一定的理论支持。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选取2019年2月至2020年7月于本院接受饮食指导的GDM合并高脂血症患者424例作为研究对象。纳入标准:①符合2010年国际妊娠并糖尿病

研究协会(International Association of Diabetes and Pregnancy Study Group, IADPSG)<sup>[5]</sup>中相关GDM诊断标准;②符合《中国成人血脂异常防治指南》<sup>[6]</sup>中相关妊娠期高脂血症诊断标准;③单胎妊娠;④妊娠前无糖尿病病史;⑤孕周24~27周。排除标准:①妊娠合并高血压患者;②严重心、肝、肾等脏器损伤者;③传染性疾病及血液系统疾病患者;④依从性较差者;⑤营养治疗期间使用胰岛素或降糖类药物者。所有研究对象按自愿原则分为对照组( $n=179$ )及研究组( $n=245$ ),两组一般资料比较差异无统计学意义( $P>0.05$ ),见表1。本研究经本院医学伦理委员会批准,受试者均签署知情同意书。

### 1.2 方法

对照组根据《孕产期营养》<sup>[7]</sup>控制不同妊娠期所需营养。控制饮食热量至200 kcal/d。其中三大营养物质按碳水化合物:蛋白质:脂肪 $\approx 5:2:3$ 比例分配,总热量分为三顿及四顿加餐,早餐15%~20%,上午加餐5%~10%;午餐20%~25%,下午加餐5%~10%;晚餐25%~30%,夜间加餐5%~10%;睡前加餐0.04%~0.08%。研究组在对照组基础上给予定量降低主食GL法,选择几种低GL的主食如通心粉、荞麦、黑米等,以主食GL<70/1 000 kcal标准计算出低GL主食及普通主食比例,并分配至各餐中。两组均连续干预至妊娠结束。

表1 两组一般资料比较( $\bar{x}\pm s$ )

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

组别	<i>n</i>	年龄(岁)	孕周(周)	BMI(kg/m <sup>2</sup> )	孕次(次)	SBP(mmHg)	DBP(mmHg)
研究组	245	28.41±3.25	25.21±1.32	22.41±3.10	1.21±0.15	116.56±7.41	74.32±7.65
对照组	179	28.95±3.30	25.39±1.17	22.64±3.17	1.24±0.18	115.21±7.35	73.41±7.51
<i>t</i> 值		1.679	1.454	0.747	1.868	1.859	1.219
<i>P</i> 值		0.094	0.147	0.455	0.062	0.064	0.224

注:SBP:收缩压(Systolic blood pressure);DBP:舒张压(diastolic blood pressure);BMI:身体质量指数(Body Mass Index)。

### 1.3 观察指标

①血糖指标:于干预前及干预8周后对患者空腹血糖(fasting plasma glucose, FPG)及餐后2 h血糖(2 hour postprandial blood glucose, 2hPG)、糖化血红蛋白(glycated hemoglobin, HbA1c)水平进行测定;②血脂指标:于干预前及干预8周后对患者甘油三酯(Triglyceride, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、低密度脂蛋白(low-density lipoprotein, LDL-C)水平使用Hitach7170S全自动生化分析仪(日立公司产)进行测定;③利用QuickPlex SQ120电化学免疫分析仪(MESO公司产)对患者干预前后空腹胰岛素(Fasting insulin, FINS)进行检测,同时计算胰岛素抵抗指数(Homeostasis model assessment, HOMA-IR)、胰岛素敏感指数(Insulin Resistance, ISI);④比较两组干预前后体重及体重增长速度、胎儿出生体重;⑤比较两组不良妊娠结局,包括羊水过多、早产、剖宫产、胎膜早破、产后出血、孕期感染。

### 1.4 统计学方法

采用SPSS 20.0软件进行统计处理,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 $\chi^2$ 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 两组干预前后血糖情况比较

两组干预8周后FPG、2hPG、HbA1c水平显著低于干预前,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );研究组干预8周后FPG、2hPG、HbA1c水平显著低于对照组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表2。

### 2.2 两组干预前后血脂情况比较

两组干预8周后TG、TC、LDL-C水平显著低于干预前,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );研究组干预8周后TG、TC、LDL-C水平显著低于对照组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表3。

### 2.3 两组干预前后胰岛 $\beta$ 细胞相关指标比较

两组干预8周后FINS、HOMA-IR水平显著低于对照组,ISI水平显著高于对照组,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ );研究组干预8周后FINS、HOMA-IR水平显著低于对照组,ISI水平显著高于对照组,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表4。

### 2.4 两组体重变化及新生儿出生体重比较

研究组干预后体重增速及新生儿出生体重显著低于对照组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表5。

表2 两组干预前后血糖情况比较( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Comparison of blood glucose between 2 groups before and after intervention ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	FPG (mmol/L)		2hPG (mmol/L)		HbA1c (%)	
		干预前	干预8周后	干预前	干预8周后	干预前	干预8周后
研究组	245	6.72±1.69	5.53±1.24	10.20±2.03	7.66±1.42	9.35±1.64	6.51±1.03
对照组	179	6.45±1.44	5.79±1.35	9.87±1.95	7.99±1.50	9.49±1.68	6.74±1.25
t值		1.728	2.054	1.681	2.308	0.859	2.071
P值		0.085	0.041	0.094	0.022	0.391	0.039

表3 两组干预前后血脂情况比较( $\bar{x} \pm s$ )

Table 3 Comparison of blood lipids between the two groups before and after intervention ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	TG (mmol/L)		TC (mmol/L)		LDL-C (mmol/L)	
		干预前	干预8周后	干预前	干预8周后	干预前	干预8周后
研究组	245	2.94±0.65	2.15±0.40	6.84±1.21	4.62±0.77	4.59±0.70	3.14±0.31
对照组	179	2.82±0.61	2.32±0.45	6.67±1.16	4.81±0.82	4.71±0.73	3.27±0.26
t值		1.927	4.099	1.454	2.441	1.712	4.560
P值		0.055	<0.001	0.147	0.015	0.088	<0.001

表4 两组干预前后胰岛 $\beta$ 细胞相关指标比较( $\bar{x} \pm s$ )

Table 4 Comparison of related indexes of insulin beta cells between the two groups before and after intervention ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	FINS ( $\mu$ IU/mL)		HOMA-IR		ISI	
		干预前	干预8周后	干预前	干预8周后	干预前	干预8周后
研究组	245	9.44±1.46	5.33±1.12	2.82±0.52	1.30±0.42	0.35±0.12	0.77±0.24
对照组	179	9.64±1.51	5.57±1.20	2.76±0.48	1.43±0.36	0.36±0.14	0.70±0.21
t值		1.373	2.114	1.212	3.855	0.790	4.018
P值		0.170	0.035	0.226	0.001	0.430	<0.001

表5 两组体重变化情况及新生儿出生体重比较 ( $\bar{x} \pm s$ )Table 5 Comparison of weight change and neonatal birth weight between the two groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	干预前体重 (kg)	干预后体重增速 (kg/月)	新生儿出生体重 (kg)
研究组	245	56.32±7.35	1.82±0.34	3.47±0.67
对照组	179	57.17±7.21	1.97±0.40	3.89±0.73
t值		1.186	4.162	6.138
P值		0.236	<0.001	<0.001

表6 两组不良妊娠结局发生情况比较 [(%)]

Table 6 Comparison of adverse pregnancy outcomes between the two groups [(%)]

组别	n	羊水过多	早产	胎膜早破	剖宫产	产后出血	孕期感染	总发生率
研究组	245	5(2.04)	12(4.90)	3(1.22)	20(8.16)	2(0.82)	4(1.63)	46(18.78)
对照组	179	7(3.91)	12(6.70)	2(1.11)	22(12.29)	4(2.23)	3(1.68)	50(27.93)
$\chi^2$ 值								4.952
P值								0.026

安全带来较大威胁。越来越多的研究发现,合理的饮食控制在血糖控制中发挥重要作用<sup>[8]</sup>。GI与GL为糖尿病营养治疗的重要指标,其中GI反映碳水化合物的质,而GL则为GI与该食物量的乘积,对食物糖代谢情况反映能力较好<sup>[9]</sup>。以往研究证实,我国中年女性中GL 90%以上来自谷物,膳食结构不合理为GDM产生的重要原因<sup>[10]</sup>。低GL饮食对于血糖的控制具有积极意义,可明显减少GDM患者不良妊娠发生率<sup>[11]</sup>。

董洪利等<sup>[4]</sup>研究表明,高GL饮食可增加GDM产生的风险。贺笑茜等<sup>[12]</sup>研究发现,对GDM患者给予饮食控制可改善患者血糖水平。本研究结果提示降低主食GL疗法对患者血糖改善效果良好。这与该方法中患者糖分摄入量较低,明显减轻了胰岛负荷,改善了胰岛功能有关。

大多数学者认为胰岛素抵抗及胰岛 $\beta$ 细胞功能异常是GDM发病产生的重要因素<sup>[13]</sup>。高脂血症与胰岛素抵抗及多种疾病相关。GDM患者由于慢性胰岛素抵抗的存在,胰岛素敏感性更低,减弱胰岛素分泌能力,更加重了GDM的严重性<sup>[14]</sup>。孕妇日常饮食中长期摄入高糖类食物可增加胰岛分泌量,加重胰岛素抵抗,因此饮食干预可一定程度缓解胰岛素抵抗,对GDM有一定治疗效果<sup>[15]</sup>。本研究中研究组干预后胰岛 $\beta$ 细胞相关指标较对照组改善效果更好,提示降低主食GL可改善GDM合并高脂血症患者胰岛功能。分析原因可能为本研究中研究组选择低GL食物以相应配比混入主食中,相比单一食物GL更低,同时还可明显增强饱腹感,以改善血糖水

## 2.5 两组不良妊娠结局发生情况比较

研究组不良妊娠结局总发生率,显著低于对照组,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。见表6。

## 3 讨论

近年来,我国GDM患者数量明显升高,且较多患者伴有明显的血脂水平异常状态,而高脂血症为临床不良妊娠结局产生的高危因素,对母婴

平使之相对平稳,进而有效地改善了胰岛功能。

GDM患者饮食上主要存在偏向问题,营养摄入不均衡或营养过剩,导致胎儿生长受限等情况产生。妊娠期增重过快可导致患者肥胖引起内分泌失调,代谢功能紊乱,且肥胖可明显增强胰岛素抵抗,脂肪组织明显增加,可分泌多种脂肪因子,对胰岛功能有较大影响。研究发现,孕妇妊娠期体重增加可导致新生儿体重增加,因此,合理控制体重可减少巨大儿出生几率。本研结果显示研究组体重增加速度及新生儿体重较对照组明显降低,表明利用降低主食GL的方式可维持正常体重增长速度,提高良好妊娠结局发生率。

综上所述,定量降低主食GL疗法可明显改善GDM合并高脂血症患者糖脂代谢指标,降低不良妊娠结局的发生率,值得临床推广。

## 参考文献

- [1] Law KP, Zhang H. The pathogenesis and pathophysiology of gestational diabetes mellitus: Deductions from a three-part longitudinal metabolomics study in China [J]. Clin Chim Acta, 2017, 468(12): 60-70.
- [2] Shin D, Lee KW, Song WO. Dietary Patterns during Pregnancy Are Associated with Risk of Gestational Diabetes Mellitus [J]. Nutrients, 2015, 7(11): 9369-9382.
- [3] Ryckman KK, Spracklen CN, Smith CJ, et al. Maternal lipid levels during pregnancy and gestational diabetes: a systematic review and meta-analysis [J]. BJOG, 2015, 122(5): 643-651.
- [4] 董洪利, 蔡聪捷, 白丹, 等. 孕早期膳食血糖负荷与妊娠期糖尿病关系的前瞻性研究 [J]. 中华流行病学杂志, 2020, 41(8): 1352-1358.

(下转第666页)

· 论 著 ·

# PA、TGF- $\beta$ 1及ACTH在创伤性骨折中的表达及临床意义

何峰<sup>1,2</sup> 张文菊<sup>3</sup> 唐毓金<sup>4</sup> 刘佳<sup>4\*</sup>

**[摘要]** 目的 探讨血清前白蛋白(PA)、转化生长因子(TGF- $\beta$ 1)及应激激素促肾上腺皮质激素(ACTH)在创伤性骨折中的表达及临床意义。方法 选取2017年5月至2019年5月在本院进行治疗的114例创伤性骨折患者设为观察组(其中轻度组60例,重度组54例),选取本院同期118例健康体检者设为对照组,对比不同人群血清PA、TGF- $\beta$ 1、ACTH水平。随访6个月,计算观察组下肢深静脉血栓发生率,logistic分析影响患者发生下肢深静脉血栓相关危险因素。结果 观察组患者PA显著低于对照组,TGF- $\beta$ 1、ACTH水平均显著高于对照组,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。重度组患者PA水平明显低于轻度组,TGF- $\beta$ 1、ACTH水平均显著高于轻度组,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。有16.67%(19/114)的患者发生下肢深静脉血栓,PA(低表达)、TGF- $\beta$ 1(高表达)、ACTH(高表达)的创伤性骨折患者发生下肢深静脉血栓率更高( $P<0.05$ )。合并高血压、糖尿病、高血脂疾病、受伤原因(高能量)、骨折严重程度(重度)、PA(低表达)、TGF- $\beta$ 1(高表达)、ACTH(高表达)为影响创伤性骨折患者发生下肢深静脉血栓的独立危险因素( $P<0.05$ )。结论 PA、TGF- $\beta$ 1、ACTH三者可作为检测创伤性骨折患者发生下肢深静脉血栓的敏感性指标。

**[关键词]** PA; TGF- $\beta$ 1; ACTH; 创伤性骨折

## Expression and clinical significance of PA, TGF- $\beta$ 1 and ACTH in traumatic fractures

HE Feng<sup>1,2</sup>, ZHANG Wenju<sup>3</sup>, TANG Yujin<sup>4</sup>, LIU Jia<sup>4\*</sup>

(1. Department of Orthopedics, Mingguang People's Hospital, Mingguang, Anhui, China, 239400; 2. Graduate School of Youjiang Medical College for Nationalities, Baise, Guangxi, China, 533000; 3. Department of Cardiology, Mingguang Peoples Hospital, Mingguang, Anhui, China, 239400; 4. Department of Orthopedics, the Affiliated Hospital of Youjiang Medical College for Nationalities, Baise, Guangxi, China, 533000)

**[ABSTRACT]** **Objective** To explore the expression and clinical significance of serum prealbumin (PA), transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) and stress hormone adrenocorticotrophic hormone (ACTH) in traumatic fractures. **Methods** 114 patients with traumatic fractures treated in this hospital from May 2017 to May 2019 were selected as the observation group (including 60 cases in the mild group and 54 cases in severe group), and 118 people with healthy physical examination in the hospital during the same period were selected as a control group. The levels of serum PA, TGF- $\beta$ 1, and ACTH in different groups were compared. All patients were followed up for 6 months to calculate the incidence of deep venous thrombosis of the lower extremities of patients in the observation group. Logistic analysis was used to analyze the risk factors that affect deep vein thrombosis of the lower extremities of patients. Results The PA level of patients in the observation group was significantly lower than that in the control group, and the levels of TGF- $\beta$ 1 and ACTH were significantly higher than those in the control group, and the differences were statistically significant ( $P<0.05$ ). The

基金项目:广西科技计划项目(2018JJA140251)

作者单位:1.安徽省明光市人民医院骨科,安徽,明光 239400

2.右江民族医学院研究生学院,广西,百色 533000

3.安徽省明光市人民医院心内科,安徽,明光 239400

4.右江民族医学院附属医院骨科,广西,百色 533000

\*通信作者:刘佳, E-mail:476220537@qq.com

PA level of patients in the severe group was significantly lower than that in the mild group, and the levels of TGF- $\beta$ 1 and ACTH were significantly higher than those in the mild group, and the differences were statistically significant ( $P<0.05$ ). 16.67% (19/114) patients with a lower extremity deep venous thrombosis and patients with traumatic fractures and PA (low expression), TGF- $\beta$ 1 (high expression) and ACTH (high expression) had a higher rate of deep venous embolism ( $P<0.05$ ). Combined with hypertension, diabetes, hyperlipidemia, cause of injury (high energy), fracture severity (severe), PA (low expression), TGF- $\beta$ 1 (high expression), ACTH (high expression) are independent risk factors for deep vein thrombosis in patients with traumatic fractures ( $P<0.05$ ). **Conclusion** PA, TGF- $\beta$ 1 and ACTH are can be used as sensitive indicators to detect deep vein thrombosis in patients with traumatic fractures.

[KEY WORDS] PA; TGF- $\beta$ 1; ACTH; Traumatic fracture

创伤性骨折是外科疾病中发病率较高的一种疾病,经过影像学检查(数字X线摄影、电子计算机断层扫描)确诊<sup>[1-2]</sup>。发生创伤性骨折时,患者机体内会发生一些急性期反应,会导致实验室相关指标水平变化<sup>[3-4]</sup>。血清前白蛋白(Prealbumin, PA)是一种由肝细胞合成的糖蛋白,可在外周血中快速检测出。Marcussen等学者<sup>[5]</sup>报道,当机体受创后,PA表达水平会出现明显变化。近年来,转化生长因子(Transforming growth factor- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 1)受到广大学者的关注,研究报道,TGF- $\beta$ 1广泛参与机体病理生理的过程,与炎症、创伤、器官纤维化等多种疾病的发生关系密切<sup>[6]</sup>。应激激素促肾上腺皮质激素(Adrenocorticotrophic hormone, ACTH)是垂体分泌的激素,有学者报道其在颅脑损伤中呈高表达状态<sup>[7]</sup>,但ACTH在创伤性骨折患者中的表达水平鲜有报道。本文分析PA、TGF- $\beta$ 1、ACTH在创伤性骨折中的表达及临床意义,以期为临床评估创伤性骨折患者预后提供参考依据。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选取2017年5月至2019年5月在本院进行治疗的114例作为观察组。纳入标准:①均经X线检查,确诊为创伤性骨折,并符合骨科相关诊断标准<sup>[8]</sup>;②所有患者受伤至就诊时间 $<24$  h;③年龄在80岁以下。排除标准:①凝血功能障碍者、合并

心、肝、肾等重要器官严重疾病者;②纳入研究前服用过影响PA、TGF- $\beta$ 1及ACTH水平的药物者;③合并其他器官严重创伤者、全身感染性疾病者。根据骨折严重程度分组:单一骨折、合并较轻的软组织损伤等为轻度组( $n=60$ );多发性骨折及复合伤等为重度组( $n=54$ )。选取同期本院的118例健康体检者设为对照组。两组一般资料比较差异无统计学意义( $P>0.05$ ),见表1。本研究经医院伦理委员会批准通过,受试者均签署知情同意书。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 PA、TGF- $\beta$ 1检测方法

观察组于入院后第二日、对照组于体检当日,均于清晨8:00空腹抽取静脉血3 mL, 3 500 r/min离心10 min,分离血清及血浆,样本置于 $-20^{\circ}\text{C}$ 下保存待检。采用酶联免疫吸附法检测PA、TGF- $\beta$ 1水平。检测仪器为日立全自动生化分析仪检测,相关试剂盒采购于北京中杉金桥生物技术有限公司。PA参考范围值: $<208.0$  mg/L视为异常降低<sup>[9]</sup>;TGF- $\beta$ 1参考范围值: $>10.0$   $\mu\text{g/L}$ 视为异常升高<sup>[10]</sup>。

#### 1.2.2 ACTH检测方法

血清ACTH水平的测定采用化学发光法,测定血清ACTH水平过程当中所用的试剂均由美国DPC公司(Los Angeles, USA)提供,检测仪器为罗氏电化学发光分析仪。ACTH参考范围值: $>80.0$   $\mu\text{g/L}$ 视为异常升高<sup>[11]</sup>。

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

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

组别	n	性别		平均年龄 (岁)	既往骨折史		受伤原因			
		男	女		有	无	高处坠落 (高能量)	车祸 (高能量)	机器挤压伤 (高能量)	轻微碰撞 (低能量)
观察组	114	59(51.75)	55(48.25)	55.41 $\pm$ 5.31	8(7.02)	106(92.98)	20(17.54)	23(20.18)	8(7.02)	63(55.26)
对照组	118	62(52.54)	56(47.46)	55.48 $\pm$ 5.39	5(4.24)	113(95.76)	-	-	-	-
t/ $\chi^2$ 值		0.014		0.0997	0.847		-	-	-	-
P值		0.904		0.921	0.357		-	-	-	-

### 1.3 观察指标

①整理研究对象的临床资料,对比观察组及对照组血清PA、TGF-β1、ACTH水平,对比不同程度的创伤性骨折患者的血清PA、TGF-β1、ACTH水平。②对纳入研究的患者进行为期6个月的随访(随访方式:电话随访或门诊复查,随访截止时间;2019年11月),了解不同PA、TGF-β1、ACTH表达的患者预后(发生下肢深静脉栓塞)情况。③通过采用多元Logistic回归分析影响患者发生下肢深静脉栓塞的独立危险因素。

### 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 $\chi^2$ 检验;采用多元Logistic回归分析影响患者发生下肢深静脉栓塞的独立危险因素;以*P*<0.05为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 两组PA、TGF-β1、ACTH水平比较

观察组患者PA显著低于对照组,TGF-β1、ACTH水平均显著高于对照组,差异均具有统计学意义(*P*<0.05)。见表2。

表2 2组PA、TGF-β1、ACTH水平比较( $\bar{x} \pm s$ )  
Table 2 Comparison of PA, TGF-β1 and ACTH levels between the two groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	<i>n</i>	PA(mg/L)	TGF-β1(μg/L)	ACTH(μg/L)
观察组	114	184.21±18.65	32.65±7.54	98.21±19.32
对照组	118	312.21±22.15	7.32±2.14	45.21±14.65
<i>t</i> 值		47.533	35.063	23.595
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001

### 2.2 不同程度的创伤性骨折患者的血清PA、TGF-β1、ACTH水平表达情况

重度组患者PA水平低于轻度组,TGF-β1、ACTH水平均高于轻度组,差异均有统计学意义(*P*<0.05)。见表3。

表3 不同程度的创伤性骨折患者的血清PA、TGF-β1、ACTH水平表达情况( $\bar{x} \pm s$ )

Table 3 expression of PA, TGF-β1 and ACTH in patients with traumatic fracture ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	<i>n</i>	PA(mg/L)	TGF-β1(μg/L)	ACTH(μg/L)
轻度组	60	199.58±17.65	25.54±6.14	82.65±17.56
重度组	54	165.65±15.45	38.65±8.20	103.32±22.87
<i>t</i> 值		10.867	9.722	5.443
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001

### 2.3 随访结果

PA(低表达)、TGF-β1(高表达)、ACTH(高表达)的创伤性骨折患者发生下肢深静脉栓塞率明显高于PA(高表达)、TGF-β1(低表达)、ACTH(低表达)的患者,差异有统计学意义(*P*<0.05)。见表4。

### 2.4 影响创伤性骨折患者发生下肢深静脉栓塞的相关因素分析

合并高血压、糖尿病、高血脂疾病、受伤原因(高能量)、骨折严重程度(重度)、PA(低表达)、TGF-β1(高表达)、ACTH(高表达)为影响创伤性骨折患者发生下肢深静脉栓塞的独立危险因素(*P*<0.05)。见表5。

## 3 讨论

相关研究指出,机体在骨折愈合过程中涉及多种不同细胞的增殖与分化,但这一调节机制至今尚未明确<sup>[12]</sup>。PA是一种炎症标志物,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。既往学者研究指出,当机体发生创伤的同时,肝细胞受损,血清PA会显著降低<sup>[13]</sup>。本研究结果这一研究结果与Aleshire等学者<sup>[14]</sup>报道结果一致。分析PA水平下降的原因:机体发生创伤时,会产生应激反应,肝脏等器官受损,导致肝细胞耗能增加,肝脏合成及分泌PA的能力下降,因此创伤性骨折患者血液中PA浓度会明显降低。

表4 观察组(不同PA、TGF-β1、ACTH表达)患者发生下肢深静脉栓塞情况 [*n*(%)]

Table 4 observation group (different expressions of PA, TGF-β1 and ACTH) patients with lower extremity deep venous thrombosis [*n*(%)]

下肢深静脉栓塞情况	<i>n</i>	PA		TGF-β1		ACTH	
		低表达( <i>n</i> =58)	高表达( <i>n</i> =56)	低表达( <i>n</i> =61)	高表达( <i>n</i> =53)	低表达( <i>n</i> =55)	高表达( <i>n</i> =59)
发生下肢深静脉栓塞	19	18(31.05)	1(1.79)	17(27.87)	2(3.77)	15(27.27)	4(6.78)
未发生下肢深静脉栓塞	95	40(68.97)	55(98.21)	44(72.13)	51(96.23)	40(72.73)	55(93.22)
$\chi^2$ 值		17.549		11.855		8.380	
<i>P</i> 值		<0.001		<0.001		0.004	

表5 影响创伤性骨折患者发生下肢深静脉栓塞的相关因素分析

Table 5 Analysis of related factors influencing deep venous thrombosis of lower limbs in patients with traumatic fracture

变量	单因素分析			多因素分析		
	OR 值	95%CI	P 值	OR 值	95%CI	P 值
年龄 (≥65 岁 vs < 65)	1.656	0.410~1.624	0.830	-	-	-
性别 (男 vs 女)	1.568	0.567~1.598	0.705	-	-	-
合并高血压、糖尿病、高脂血症 (是 vs 否)	1.798	1.517~1.943	0.028	1.558	1.467~1.939	0.028
受伤原因 (高能量 vs 低能量)	1.628	1.385~1.756	0.001	1.368	1.231~1.992	<0.001
骨折严重程度 (重度 vs 轻度)	1.627	1.527~1.857	0.011	1.586	1.324~1.885	0.025
PA (低表达 vs 高表达)	1.268	1.235~1.656	0.019	1.454	1.372~1.698	<0.001
TGF-β1 (高表达 vs 低表达)	1.358	1.342~1.768	0.001	1.547	1.247~1.654	0.034
ACTH (高表达 vs 低表达)	1.525	1.458~1.687	0.023	1.321	1.247~1.657	<0.001

TGF-β1 是上皮细胞繁殖的主要免疫调节因子和凋亡因子,具有促进纤维生成的作用。Marsen 等学者<sup>[15]</sup>研究报道,TGF-β1 可通过细胞表面受体刺激 *GoL11A2* 胶原基因的转录,增加胶原的合成,促进非胶原蛋白合成,如纤维连接蛋白、胶状蛋白与内皮素,调节整合素,促进细胞外基质蛋白合成,促进骨折愈合。本研究中创伤性骨折患者入院时血清 TGF-β1 水平显著高于健康人群,进一步证实这一研究结果。ACTH 是由垂体前叶分泌的一种激素,可通过下丘脑-垂体-肾上腺调节轴促进皮质醇释放,当机体受到创伤性刺激时,会出现交感神经内分泌反应,ACTH 水平显著升高<sup>[16]</sup>。本研究发现,ACTH 在创伤性骨折患者中呈异常高表达状态,ACTH 水平越高,创伤性骨折患者骨折严重程度越严重。分析导致创伤性骨折患者 ACTH 水平升高的原因:患者机体处于应激或非安静状态,激发了应激免疫反应,刺激多种促炎细胞因子分泌,血清 ACTH 会明显升高。本研究还发现,过高的 ACTH 会增加下肢深静脉栓塞发生的风险,导致患者预后不良。这提示临床可加强检测血清 ACTH 水平,以了解患者应激反应程度。

创伤性骨折是外界暴力状态下导致骨皮质发生完整性或连续性破坏,创伤之后凝血功能发生改变,若得不到及时救治,可诱发深静脉血栓等严重并发症发生<sup>[17]</sup>。本研究结果,提示临床工作中需加强血清 PA、TGF-β1、ACTH 监测,评估创伤性骨折患者发生下肢深静脉栓塞的概率,以尽早对患者实施针对性干预措施,降低下肢深静脉栓塞发生率,促进患者康复。

综上所述,创伤性骨折患者血清 PA、TGF-β1、ACTH 水平与健康人群比较差异具有统计学意义,PA(低表达)、TGF-β1(高表达)、ACTH(高表达)的创伤性骨折患者发生下肢深静脉栓塞的机率更

高,三者可作为检测创伤性骨折患者发生下肢深静脉栓塞的敏感性指标。

### 参考文献

- [1] 姚李春, 应敏娟, 汪小红. 围术期心理干预对创伤性骨折患者术后心理应激、生理应激的影响[J]. 中国医刊, 2017, 52(7):98-101.
- [2] 张培, 刘泉, 吴敏, 等. TGF-β1, bFGF 对自体腓绳肌腱重建前交叉韧带-骨愈合的影响[J]. 中华全科医学, 2020, 18(1):36-39.
- [3] Marcussen B, Negaard M, Hosey RG, et al. A Case Series and Literature Review: Isolated Traumatic First Rib Fracture in Athletes[J]. Clin J Sport Med, 2020, 30(23):64-69.
- [4] 钟海波, 郭祥, 罗涛. 骨伤复原汤对骨折愈合过程中 FGF-2、TGF-β1 表达及炎症、微循环影响的研究[J]. 临床和实验医学杂志, 2019, 17(18):46-51.
- [5] Fischer V, Haffner-Luntzer M, Prystaz K, et al. Calcium and vitamin-D deficiency marginally impairs fracture healing but aggravates posttraumatic bone loss in osteoporotic mice [J]. Sci Rep, 2017, 7(1):7223-7228.
- [6] 范小波, 陈雪果, 陈晓鹏, 等. 胸腰椎骨折合并脊髓损伤患者血清 TGF-β1 表达变化情况及对骨折愈合的影响[J]. 颈腰痛杂志, 2019, 40(5):650-652.
- [7] 林晴晴, 谭弄哈, 吴永芳, 等. 脐血 TGF-β1, Treg 细胞数量水平对早产儿支气管肺发育不良的预测价值[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(8):74-77.
- [8] Denney L, Branchett W, Gregory LG, et al. Epithelial-derived TGF-β1 acts as a pro-viral factor in the lung during influenza A infection[J]. Mucosal Immunol, 2017, 17(20):34-39.
- [9] Ledue TB, Rifai N, Irish GR, et al. Immunoturbidimetry of transthyretin (prealbumin) in human serum [J]. Clin Chem, 2020, 16(7):7-10.
- [10] Principe DR, Mangan RJ, Grippo PJ. Transforming Growth Factor β [J]. Springer New York, 2017, 12(22):25-28.
- [11] Nakanishi S, Teranishi Y, Noda M, et al. The protein-coding sequence of the bovine ACTH-beta-LPH precursor gene is split near the signal peptide region [J]. Nature, 2019, 39(57):752-755.

# 子痫前期患者孕早期PAPP-A、PIGF及25(OH)D3水平与疾病相关性研究

杨隽 蔡贞玉\* 盛威 杨娜

**[摘要]** 目的 研究妊娠相关血浆蛋白 A(PAPP-A)、胎盘生长因子(PIGF)及 25-羟维生素 D3 [25-(OH)D3]对子痫前期(PE)的预测价值。方法 分析 2018 年 3 月至 2020 年 3 月在本院分娩的 1 200 例单胎妊娠孕妇的临床资料。其中正常者 1 122 例(正常组),PE 者 78 例(PE 组,重度 PE 者 29 例,轻度 PE 者 49 例),比较两组及不同病情 PE 患者 PAPP-A、PIGF 及 25(OH)D3 水平,分析上述因子与 PE 病情相关性。结果 PE 组 PAPP-A、PIGF、25(OH)D3 均显著低于正常组,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。随着 PE 患者病情进展,PAPP-A、PIGF 及 25(OH)D3 水平逐渐降低( $P<0.05$ )。相关性分析结果显示,血清 PAPP-A、PIGF 及 25(OH)D3 与 PE 病情严重程度均呈负相关( $P<0.05$ )。结论 妊娠早期孕妇 PAPP-A、PIGF 及 25(OH)D3 水平下降可能与 PE 发生、发展有关,通过检测上述因子可有效评估 PE 病情。

**[关键词]** 血浆蛋白 A; 胎盘生长因子; 25-羟维生素 D3; 子痫前期

## Study on the correlation between PAPP-A, PIGF and 25(OH)D3 levels and disease in early pregnancy of patients with preeclampsia

YANG Jun, CAI Zhenyu\*, SHENG Wei, YANG Na

(Department of Obstetrics, Aviation General Hospital, Beijing, China, 100012)

**[ABSTRACT]** **Objective** To study the predictive values of pregnancy-associated plasma protein A (PAPP-A), placental growth factor (PIGF) and 25-hydroxyvitamin D3 [25-(OH)D3] for preeclampsia (PE). **Method** The clinical data of 1,200 women with singleton pregnancy who gave birth in our hospital from March 2018 to March 2020 were retrospectively analyzed. Among them, 1,122 cases were normal (normal group), 78 cases were PE (PE group: 29 cases were severe PE, 49 cases were mild PE). The levels of PAPP-A, PIGF and 25(OH)D3 in the two groups and PE patients with different conditions were compared, and the correlation between the above factors and PE conditions was analyzed. **Results** PAPP-A, PIGF and 25(OH)D3 in the PE group were significantly lower than those in the normal group, and the difference was statistically significant ( $P<0.05$ ). And with the development of PE patients, the levels of PAPP-A, PIGF and 25(OH)D3 gradually decreased ( $P<0.05$ ). The results of correlation analysis showed that serum PAPP-A, PIGF and 25(OH)D3 were negatively correlated with the severity of PE. **Conclusion** The decreased levels of PAPP-A, PIGF and 25(OH)D3 in pregnant women in early pregnancy may be related to the occurrence and development of PE. The detection of these factors can effectively assess the condition of PE.

**[KEY WORDS]** Pregnancy-associated plasma protein; Placental growth factor; 25-hydroxyvitamin D3; Preeclampsia

子痫前期(Preeclampsia, PE)是妊娠期特发、严重的并发症,伴有恶心、头痛及呕吐等症状,常导致胎儿生长受限、早产等<sup>[1]</sup>。据相关统计发现,近 20

年来,PE 发病率上升 25%,对孕产妇及胎儿生命安全造成严重影响<sup>[2]</sup>。然而,由于临床目前缺乏有效的预测指标,通常是在孕产妇出现临床征象后才进

基金项目:吴阶平医学基金会、临床科研专项资助基金(320.6750.17096)

作者单位:航空总医院产科,北京 100012

\*通信作者:蔡贞玉, E-mail:czy220@sina.com

行对症治疗,但此时已进展为重度子痫,导致产妇及围产儿预后差,死亡风险上升<sup>[3]</sup>。既往研究发现,PE与母体促炎状态密切相关,外周循环中相关因子异常表达,在全身性炎症反应及内皮功能障碍中具有重要作用<sup>[4]</sup>。故寻找生物标志物预测子痫前期,指导靶向治疗,具有重要临床意义。本组研究对孕早期孕妇血清中妊娠相关血浆蛋白A (pregnancy-associated plasma protein A, PAPP-A)、胎盘生长因子(Placental growth factor, PIGF)及25-羟维生素D3[25-hydroxyvitamin D3, 25-(OH)D3]的水平进行检测,探讨孕早期联合检查上述因子对PE的预测价值,以期为临床预测PE提供参考。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选取2018年3月至2020年3月在本院分娩的单胎妊娠孕妇的临床资料。纳入标准:①均为单胎妊娠;②均符合《妇产科学》第九版中PE诊断标准<sup>[5]</sup>;③检测孕周为11~13<sup>+</sup>周孕妇;④无输血及免疫治疗史。排除标准:①合并高血压、肝炎、及自身免疫疾病;②合并心、肝肾功能不全;③合并其他妊娠并发症者;④精神异常、无法配合本次研究者。最终共纳入1 200例,其中正常者1 122例(正常组),PE者78例(PE组,重度PE者29例,轻度PE者49例)。两组一般资料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	<i>n</i>	平均年龄 (岁)	体重指数 (kg/m <sup>2</sup> )	孕周 (周)	妊娠次数 (次)
PE组	78	29.48±6.58	27.89±3.15	11.67±3.15	1.76±0.51
正常组	1 122	30.33±7.04	27.68±2.84	11.59±2.84	1.82±0.62
<i>t</i> 值		1.035	0.627	0.239	0.835
<i>P</i> 值		0.301	0.531	0.811	0.404

### 1.2 方法

空腹抽取所有孕妇4 mL静脉血,常规静置离心,-20℃低温保存。PAPP-A、PIGF检测仪器:使用PerkinElmer AutoDELFIA®全自动高通量板式时间分辨免疫荧光仪检测,配合使用PerkinElmer芬兰Wallac公司生产的PIGF和PAPP-A的时间分辨免疫荧光试剂盒和质控品。25(OH)D3采用电化学发光免疫分析法检测,试剂盒由美国IDS有限公司提供,检测仪器为罗氏全自动电化学发

光免疫分析仪。具体操作严格按照说明书执行。

### 1.3 观察指标

①比较两组PAPP-A、PIGF及25(OH)D3水平。②比较不同病情PE患者PAPP-A、PIGF及25(OH)D3水平。PE病情分级<sup>[6]</sup>:轻度为妊娠20周后高血压(BP)≥140/90 mmHg,尿蛋白(+)或≥0.3 g/24 h;重度为BP≥160/110 mmHg,尿蛋白(++)或≥2 g/24 h,尿素氮(BUN)↑,凝血酶原时间(PT)↓,谷丙转氨酶(ALT)↑,谷草转氨酶(AST)↑。③分析PE患者PAPP-A、PIGF及25(OH)D3水平与疾病病情相关性。

### 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( $\bar{x}\pm s$ )描述,两组间比较采用*t*检验,多组比较采用方差检验。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 两组PAPP-A、PIGF及25(OH)D3水平比较

PE组PAPP-A、PIGF、25(OH)D3均显著低于正常组,差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。见表2。

表2 两组PAPP-A、PIGF及25(OH)D3水平比较( $\bar{x}\pm s$ )

Table 2 Comparison of PAPP-A, PIGF and 25(OH)D3 levels between 2 groups ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	<i>n</i>	PAPP-A (mU/L)	PIGF (pg/mL)	25(OH)D3 (ng/mL)
PE组	78	4028.90±2875.50	38.75±8.75	12.55±1.16
正常组	1 122	4780.49±2718.37	56.78±15.62	18.24±2.51
<i>t</i> 值		2.352	10.082	19.868
<i>P</i> 值		0.019	<0.001	<0.001

### 2.2 正常组与不同病情PE患者PAPP-A、PIGF及25(OH)D3水平比较

正常组PAPP-A、PIGF及25(OH)D3水平显著高于轻度、重度PE组,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。随着PE患者病情进展,PAPP-A、PIGF及25(OH)D3水平逐渐降低,组间两两比较差异有统计学意义( $P<0.05$ )。见表3。

### 2.3 PAPP-A、PIGF及25(OH)D3与PE病情严重程度相关性

相关性分析结果显示,血清PAPP-A、PIGF及25(OH)D3与PE病情严重程度均呈负相关( $P<0.05$ ),见图1。

表3 正常组与不同病情PE患者PAPP-A、PIGF及25(OH)D3水平比较( $\bar{x} \pm s$ )

Table 3 Comparison of PAPP-A, PIGF and 25(OH)D3 levels between normal group and PE patients with different diseases ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	PAPP-A (mU/L)	PIGF (pg/mL)	25(OH)D3 (ng/mL)
正常组	1 122	4780.49±2718.37	56.78±15.62	18.24±2.51
轻度PE组	49	3936.98±2589.84 <sup>a</sup>	42.45±8.36 <sup>a</sup>	12.09±1.16 <sup>a</sup>
重度PE组	29	2587.56±1746.36 <sup>ab</sup>	29.06±9.71 <sup>ab</sup>	7.67±0.54 <sup>ab</sup>
F值		11.37	65.21	401.40
P值		<0.001	<0.001	<0.001

注:<sup>a</sup>与正常组比较,<sup>b</sup>与轻度组比较, $P < 0.05$ 。

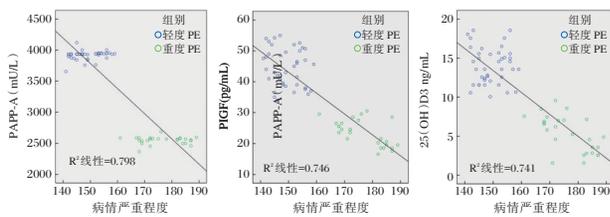


图1 PAPP-A、PIGF、25(OH)D3与PE病情严重程度相关性散点图

Figure 1 Scatter plot of correlation between PAPP-A, PIGF, 25(OH)D3 and severity of PE

### 3 讨论

PE是孕产妇、围产儿死亡的主要原因之一,轻度PE临床症状无特异性,但会导致患者手部、面部出现突发性肿胀;重度PE则可导致孕妇出现头痛、呼吸障碍、腹痛等症状<sup>[7]</sup>。目前,有关PE的发病机理主要倾向于血管内皮细胞激活和损害学说<sup>[8]</sup>。PAPP-A是与妊娠有关的一种大分子蛋白,由高糖基化蛋白复合体滋养层和蜕膜产生。Zafman等<sup>[9]</sup>等研究发现,在胎儿确诊为唐氏综合症的孕妇中,孕早期PAPP-A水平显著低于正常孕妇。国外已有研究证实,PAPP-A与各种妊娠相关疾病,如妊娠期糖尿病、高血压病、流产等密切相关<sup>[10]</sup>。本组研究结果提示PAPP-A与PE关系密切,可一定程度上反映病情的轻重。PE患者血清PAPP-A水平比正常孕妇低可能与PAPP-A的纤溶抑制作用及其对胰岛素样生长因子系统的影响有关<sup>[11]</sup>。

PIGF属于血管内皮生长因子家族,其主要在胎盘组织中表达,具有调节胎盘滋养细胞和内皮细胞生长的作用<sup>[12]</sup>。本组研究发现,与正常组比较,PE组PIGF水平显著降低,且重度PE患者的PIGF水平较轻度PE患者低,呈负相关关系。分析其原因可能是由于滋养细胞本身合成PIGF的能

力减弱,导致胎盘组织缺血、缺氧,而胎盘缺血缺氧会影响PIGF的分泌,加重胎盘组织缺血、缺氧程度,导致血管痉挛,最终诱发PE<sup>[13]</sup>。因此,可认为,PIGF水平对预测PE与判断PE患者病情严重程度具有重要的参考价值。

PE发病的病理生理学过程可分为两个阶段,第一阶段始于胎盘形成的异常,滋养细胞生长发生障碍,对子宫内层浸润不足,导致子宫螺旋动脉无法重塑,造成胎盘绒毛着床浅,胎盘灌注量下降,导致胎盘缺氧、缺血;第二阶段,由于胎盘功能异常与缺血、缺氧,导致胎盘因子进入母体血液循环后引起广泛的血管内皮细胞损伤<sup>[14]</sup>。维生素D是一种常见的细胞因子,具有调节免疫,抑制变应原诱导的作用。25(OH)D3是维生素D的体内主要存在形式,可有效控制机体钙磷水平和骨骼钙化,且对心血管系统、免疫系统、神经系统、糖代谢及细胞增殖分化等方面,都具有重要作用<sup>[15]</sup>。同时25(OH)D3活化后还可抑制血管内皮生长因子,保护血管内皮细胞,而25(OH)D3水平降低后,对血管的保护作用降低,导致血管顺应性降低,促进动脉粥样硬化,引起血压升高。本研究相关性结果亦显示,该因子水平与PE病情严重程度呈负相关。

综上所述,妊娠早期孕妇PAPP-A、PIGF及25(OH)D3水平下降可能与PE发生、发展有关,通过检测PAPP-A、PIGF及25(OH)D3可有效评估PE病情。

### 参考文献

- [1] 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.
- [2] Miller EC, Gatollari HJ, Too G, et al. Risk Factors for Pregnancy-Associated Stroke in Women With Preeclampsia [J]. Stroke, 2017, 48(7):1752.
- [3] Bailey LJ, Alahari S, Tagliaferro A, et al. Augmented trophoblast cell death in preeclampsia can proceed via ceramide-mediated necroptosis[J]. Cell Death Dis, 2017, 8(2):e2590.
- [4] Wikström S, Lindh CH, Shu H, et al. Early pregnancy serum levels of perfluoroalkyl substances and risk of preeclampsia in Swedish women[J]. Sci Rep, 2019, 9(1):484-486.
- [5] Boeldt DS, Bird IM. Vascular adaptation in pregnancy and endothelial dysfunction in preeclampsia [J]. J Endocrinol, 2017, 232(1):R27.
- [6] Premru-Srsen T, Kocic Z, Vodusek VF, et al. Total gestational weight gain and the risk of preeclampsia by pre-pregnancy body mass index categories: a population-based cohort study from 2013 to 2017[J]. J Perin Med, 2019, 47(6):585-591.

- [7] Piccoli GB, Cabiddu G, Castellino S, et al. A best practice position statement on the role of the nephrologist in the prevention and follow-up of preeclampsia: the Italian study group on kidney and pregnancy[J]. *J Nephrol*, 2017, 30(3):1-11.
- [8] 戚燕妮, 吴丹梅. 阴道用乳杆菌活菌胶囊治疗妊娠期细菌性阴道病的临床疗效及对妊娠结局的影响[J]. *保健医学研究与实践*, 2020, 17(2):61-63, 68
- [9] Zafman KB, Getrajman CS, Arnold MK, et al. Are Women with a History of Low PAPP-A at Risk for Adverse Perinatal Outcomes in a Subsequent Pregnancy? [J]. *Am J Perinatol*, 2019, 36(6):647-652.
- [10] Benachi A, Baptiste A, Taieb J, et al. Relationship between vitamin D status in pregnancy and the risk for preeclampsia: A nested case-control study[J]. *Clin Nutr*, 2019, 39(2):56-58.
- [11] Visan V, Scripcariu IS, Socolov D, et al. Better prediction for FGR (fetal growth restriction) with the sFlt-1/PIGF ratio: A case-control study[J]. *Medicine*, 2019, 98(26):e16069.
- [12] Mihalceanu E, Scripcariu IS, Lazar IT, et al. Expression of PIGF and sFLT-1 Biomarkers in Pregnancy Toxaemia[J]. *Revista de Chim*, 2020, 71(1):450-455.
- [13] Erez O, Romero R, Maymon E, et al. The prediction of late-onset preeclampsia: Results from a longitudinal proteomics study[J]. *Plos One*, 2017, 12(7):e0181468.
- [14] Dias-Junior CA, Chen J, Cui N, et al. Angiogenic Imbalance and Diminished Matrix Metalloproteinase -2 and -9 Underlie Regional Decreases in Uteroplacental Vascularization and Feto-placental Growth in Hypertensive Pregnancy [J]. *Biochem Pharmacol*, 2017, 146:101-116.
- [15] Tamblyn JA, Susarla R, Jenkinson C, et al. Dysregulation of maternal and placental vitamin D metabolism in preeclampsia [J]. *Placenta*, 2017, 50:70-77.

(上接第 658 页)

- [5] Metzger BE, Gabbe SG, Persson B, et al. International association of diabetes and pregnancy study groups recommendations on the diagnosis and classification of hyperglycemia in pregnancy[J]. *Diabetes care*, 2010, 33(3):676-682.
- [6] 中国成人血脂异常防治指南制订联合委员会. 中国成人血脂异常防治指南[J]. *中华心血管病杂志*, 2007, 19(5):4-14.
- [7] 杨慧霞. 孕产期营养[M]. 北京:人民卫生出版社, 2014:46-67.
- [8] 曾婷, 林楚慧, 叶小芳, 等. 30%低碳水化合物饮食治疗 2 型糖尿病的效果研究[J]. *中国全科医学*, 2020, 23(16):2030-2033.
- [9] Hasbullah FY, Mohd Yusof BN, Shariff ZM, et al. Factors associated with dietary glycemic index and glycemic load in pregnant women and risk for gestational diabetes mellitus [J]. *Int Food Sci Nutr*, 2020, 71(4):516-524.
- [10] 卢培玲, 辛崇敏, 薄翠华. PCPA 模式的饮食干预对妊娠期糖尿病患者糖、脂代谢及妊娠结局的影响[J]. *中国妇幼保健*, 2016, 31(16):3266-3268.
- [11] 贺笑茜, 马秀华, 高万里. 饮食及运动联合干预对妊娠期糖尿病的影响[J]. *河北医药*, 2020, 42(11):1702-1704+1708.
- [12] Mastrogiannis DS, Spiliopoulos M, Mulla W, et al. Insulin resistance: the possible link between gestational diabetes mellitus and hypertensive disorders of pregnancy [J]. *Curr Diab Rep*, 2009, 9(4):296-302.
- [13] 劳丹青, 赵华, 何芸萍, 等. 营养膳食联合经皮下注射胰岛素对妊娠期糖尿病合并高脂血症患者血糖、血脂及妊娠结局的影响 [J]. *中国妇幼保健*, 2017, 32(12):2561-2564.
- [14] 张成. 运动联合饮食干预治疗妊娠期糖尿病患者的效果及胰岛素抵抗和妊娠结局的影响[J]. *中国医药科学*, 2019, 9(13):59-61, 217.
- [15] 王欣, 刘德春, 亢林萍. 不同孕期增重与发生妊娠期糖尿病关系探讨[J]. *中国计划生育学杂志*, 2020, 28(2):213-216.

(上接第 662 页)

- [12] Zhu ZL, Mannambeth RV, Mcgiffin DC, et al. Traumatic fracture dislocation of the thoracic spine sparing both the spinal cord and aorta: Images for surgeons[J]. *ANZ J Surg*, 89(5):E212-E213.
- [13] Poorman GW, Segreto FA, Beaubrun BM, et al. Traumatic Fracture of the Pediatric Cervical Spine: Etiology, Epidemiology, Concurrent Injuries, and an Analysis of Perioperative Outcomes Using the Kids' Inpatient Database [J]. *Int J Spine Surg*, 2019, 13(1):6009-6015.
- [14] Mohan A, Arora S, Uniyal A, et al. Evaluation of plasma leptin, tumor necrosis factor- $\alpha$ , and prealbumin as prognostic biomarkers during clinical recovery from acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Lung India*, 2017, 34(1):3-8.
- [15] Aleshire SL, Bradley CA, Richardson LD, et al. Localization of human prealbumin in choroid plexus epithelium [J]. *J Histochem Cytochem*, 1983, 31(5):608-612.
- [16] 王碰起, 高进喜, 陈锦华, 等. 创伤性颅脑损伤早期患者 ACTH 轴和 TSH 轴激素水平及相关指标的变化 [J]. *中华神经医学杂志*, 2020, 19(6):566-575.
- [17] Kendall-Taylor P, Lambert A, Mitchell R, et al. Antibody that blocks stimulation of cortisol secretion by adrenocorticotrophic hormone in Addison's disease [J]. *Brit J Clin Pharmacol*, 2019, 31(66):1489-1491.

· 论 著 ·

# 血清铜蓝蛋白、胰岛素抵抗指数与肝硬化患者 Child-Pugh 分级的关系

郑能<sup>1\*</sup> 陈炎<sup>1</sup> 于力<sup>2</sup>

**【摘要】**目的 探究血清铜蓝蛋白、胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)与肝硬化患者 Child-Pugh 分级的关系。方法 选取2015年7月至2018年12月本院收治的185例肝硬化患者纳入研究组,按照 Child-Pugh 分级标准划分为 Child-Pugh A 级组(58例)、Child-Pugh B 级组(77例)、Child-Pugh C 级组(50例),另择同期查体的100例健康志愿者作为对照组。测定各组受试者铜蓝蛋白、空腹血浆胰岛素(FINS)、空腹血浆葡萄糖(FPG)水平及 HOMA-IR 水平,分析血清铜蓝蛋白、HOMA-IR 与 Child-Pugh 分级的相关性,绘制 ROC 曲线分析各指标诊断不同程度肝硬化患者的诊断价值。结果 研究组 FINS、HOMA-IR 明显高于对照组,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。FINS、HOMA-IR: Child-Pugh C 级>B 级>A 级,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。研究组血清铜蓝蛋白水平明显低于对照组,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。铜蓝蛋白: Child-Pugh C 级<B 级<A 级,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。各组受试者 FPG 比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。Spearman 相关性分析示,研究组 Child-Pugh 分级与血清铜蓝蛋白呈负相关( $r=-0.415, P<0.05$ ),与 HOMA-IR 呈正相关( $r=0.510, P<0.05$ )。ROC 曲线示,血清铜蓝蛋白、HOMA-IR 诊断肝硬化 Child-Pugh 分级 B 级+C 级患者的曲线下面积分别为 0.644、0.805,截点值分别为 302.10 mg/L 及 2.80;血清铜蓝蛋白、HOMA-IR 诊断肝硬化 Child-Pugh 分级 C 级患者的曲线下面积分别为 0.719、0.874,截点值分别为 320.20 mg/L 及 3.08。结论 血清铜蓝蛋白、胰岛素抵抗指数与肝硬化患者 Child-Pugh 分级存在一定程度相关,可作为快速评估肝硬化肝功能的参考指标。

**【关键词】** 铜蓝蛋白; 胰岛素抵抗; 肝硬化; Child-Pugh 分级

## Relationship between serum ceruloplasmin, insulin resistance index and Child-Pugh classification in patients with liver cirrhosis

ZHENG Neng<sup>1\*</sup>, CHEN Yan<sup>1</sup>, YU Lili<sup>2</sup>

(1. Department of Gastroenterology, the Second People's Hospital of Yibin, Yibin, Sichuan, China, 644000; 2. Yibin Center for Disease Control and Prevention, Yibin, Sichuan, China, 644000)

**【ABSTRACT】 Objective** To investigate the relationship between serum ceruloplasmin, insulin resistance index (HOMA-IR) and Child-Pugh classification in patients with liver cirrhosis. **Methods** 185 patients with liver cirrhosis admitted to the hospital from July 2015 to December 2018 were selected as the study group. According to Child-Pugh classification criteria, they were divided into A-class group (58 cases), B-class group (77 cases) and C-class group (50 cases). Meanwhile, 100 healthy volunteers were selected as the control group. The levels of ceruloplasmin, fasting plasma insulin (FINS), fasting plasma glucose (FPG) and insulin resistance index (HOMA-IR) in the two groups were measured. The correlation of serum ceruloplasmin and homeostasis model assessment of HOMA-IR with Child-Pugh classification was analyzed. ROC curve was used to analyze the diagnostic value of each indicator for patients with different degrees of liver cirrhosis.

基金项目:四川省卫生和计划生育委员会科研基金资助项目(18PJ109)

作者单位:1. 宜宾市第二人民医院消化内科,四川,宜宾 644000

2. 宜宾市疾病预防控制中心,四川,宜宾 644000

\*通信作者:郑能, E-mail: mylove186831@163.com

**Results** There was no statistically significant difference in FPG among the subject groups ( $P>0.05$ ). FINS and HOMA-IR in the study group were significantly higher than those in the control group ( $P<0.05$ ). FINS and HOMA-IR were significantly higher in Child-Pugh C-class group than those in B-class group and A-class group, and significantly higher in B-class group than in A-class group ( $P<0.05$ ). Serum ceruloplasmin level in the study group was significantly lower than that in the control group ( $P<0.05$ ). The level of serum ceruloplasmin: Child-Pugh C-class<B-class<A-class group, the difference is statistically significant ( $P<0.05$ ). Spearman correlation analysis showed that in the study group, Child-Pugh classification was negatively correlated with the serum ceruloplasmin ( $r=-0.415$ ,  $P<0.05$ ), but positively correlated with HOMA-IR ( $r=0.510$ ,  $P<0.05$ ). ROC curve showed that areas under curve of serum ceruloplasmin and HOMA-IR in the diagnosis of Child-Pugh classification B-class and C-class were 0.644 and 0.805, respectively. The cut-off values were 302.10 mg/L and 2.80, respectively. The areas under curve for diagnosing Child-Pugh classification C-class of liver cirrhosis were 0.719 and 0.874, respectively. The cut-off values were 320.20 mg/L and 3.08, respectively. **Conclusion** Serum ceruloplasmin and insulin resistance index are related to Child-Pugh classification of patients with liver cirrhosis to a certain extent and can be used as reference indicators for rapid assessment of liver function in patients with liver cirrhosis.

**[KEY WORDS]** Ceruloplasmin; Insulin resistance; Liver cirrhosis; Child-Pugh classification

肝硬化是各种病因引起的肝病终末阶段,具有较高的发病率及死亡率,肝硬化严重程度的评估对明确治疗方案及评估预后具有重要临床意义。肝脏作为机体重要代谢器官,其损伤可影响多种生理功能,分析这些生理功能的变化可为肝功能评价提供一定参考<sup>[1]</sup>。血清铜蓝蛋白是一种铜及氧化酶结合的蛋白复合物,具有铜离子运输、血液凝固、抗氧化等多种生物学活性。铜蓝蛋白也是一种急性期反应蛋白,当肝脏损伤时其水平可发生明显变化,因此也被用于肝硬化、肝癌等疾病的协助诊断中<sup>[2]</sup>。肝脏是葡萄糖代谢重要器官,肝损伤可造成糖代谢紊乱及胰岛素抵抗现象<sup>[3]</sup>。为探究铜蓝蛋白、胰岛素抵抗指数(Homeo stas mode assessment-insulin resistance index, HOMA-IR)等指标在肝硬化病情评估中的临床价值,本研究将分析铜蓝蛋白、血糖指标及 Child-Pugh 分级的相关性,旨在为肝硬化患者病情及预后评估提供参考。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选择2015年7月至2018年12月于本院消化内科就诊的185例肝硬化患者纳入研究组,纳入标准:①符合《肝硬化中西医结合诊断方案》<sup>[4]</sup>中相关确诊标准。②临床资料完整。排除标准:①高脂血症、严重心肝肺肾功能不全、甲状腺功能亢进、全身性感染疾病者。②近期使用利尿剂、糖皮质激素、降压药等可引起糖代谢紊乱的药物者。另择同期

于本院查体的100例健康志愿者作为对照组。所有受试者均对本研究知情并签署同意书,本研究经医院伦理委员会批准。将185例肝硬化患者按照 Child-Pugh 肝功能分级标准<sup>[5]</sup>划分为 Child-Pugh A级( $n=58$ )、Child-Pugh B级( $n=77$ )、Child-Pugh C级( $n=50$ )。各组受试者性别组成、年龄、体质量指数等资料比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。见表1。

表1 入组受试者一般资料比较 [ $n(\%)$ , ( $\bar{x}\pm s$ )]  
Table 1 Comparison of general data [ $n(\%)$ , ( $\bar{x}\pm s$ )]

组别	n	性别		年龄(岁)	体质量指数(kg/m <sup>2</sup> )
		男	女		
Child-Pugh A级	58	38(65.52)	20(34.48)	49.52±8.57	20.45±1.66
Child-Pugh B级	77	44(57.14)	33(42.86)	48.59±9.27	20.96±2.41
Child-Pugh C级	50	30(60.00)	20(40.00)	49.30±9.74	20.78±1.59
对照组	100	62(62.00)	38(38.00)	48.45±6.63	20.74±1.60
$\chi^2$ 值/F值			1.042	0.272	0.832
P值			0.791	0.845	0.477

### 1.2 方法

肝硬化组患者入院后第二天采集晨起空腹静脉血3 mL;对照组受试者体检当日采集空腹静脉血,促凝后2 h内离心分离血清,测定血清铜蓝蛋白水平及血糖相关指标。

①血清铜蓝蛋白:采用美国 Beckman 公司 Array360 特定蛋白分析系统进行血清铜蓝蛋白水平测定,测定采用全自动速率散射比浊法。

②血糖相关指标测定:分别采用放射免疫法及葡萄糖氧化酶法测定空腹血浆胰岛素(insulin, FINS)及空腹血浆葡萄糖(fasting plasma glucose,

FPG)水平,采用稳态模型评价法计算 HOMA-IR;  $HOMA-IR = FPG \times FINS / 22.5$ 。

### 1.3 统计学分析

采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析,计数资料以  $n(\%)$  表示,行  $\chi^2$  检验;符合正态分布的计量资料以  $(\bar{x} \pm s)$  表示,组间比较行  $t$  检验,多组间比较行单因素方差分析;采用 Spearman 等级相关进行相关性分析;绘制受试者工作(ROC)曲线评价各血清学指标对肝功能分级的诊断价值,以  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组受试者铜蓝蛋白、血糖相关指标比较

研究组 FINS、HOMA-IR 明显高于对照组,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。Child-Pugh C 级患者 FINS、HOMA-IR 显著高于 B 级、A 级, B 级 FINS、HOMA-IR 显著高于 A 级,差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。研究组血清铜蓝蛋白水平明显低于对照组,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。Child-Pugh C 级患者铜蓝蛋白显著低于 B 级、A 级, B 级铜蓝蛋白显著低于 A 级,差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。各组受试者 FPG 比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见表 2。

表 2 各组受试者铜蓝蛋白、血糖相关指标比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Ceruloplasmin and blood glucose related indexes in each group ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	<i>n</i>	铜蓝蛋白 (mg/L)	FINS (mU/L)	FPG (mmol/L)	HOMA-IR
Child-Pugh A 级	58	358.96±65.28 <sup>a</sup>	8.96±2.11 <sup>a</sup>	6.22±0.39	2.45±0.33 <sup>a</sup>
Child-Pugh B 级	77	374.15±88.52 <sup>ab</sup>	11.27±2.56 <sup>ab</sup>	5.88±0.63	2.96±0.70 <sup>ab</sup>
Child-Pugh C 级	50	274.15±68.59 <sup>abc</sup>	11.96±3.10 <sup>abc</sup>	5.96±0.77	3.46±0.69 <sup>abc</sup>
对照组	100	389.63±101.27	5.96±1.27	5.82±0.45	1.38±0.42
<i>F</i> 值		21.188	119.126	6.693	205.125
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	0.086	<0.001

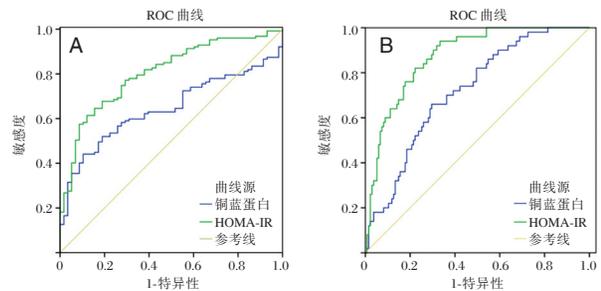
注:与对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 Child-Pugh A 级组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与 Child-Pugh B 级组比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$ 。

### 2.2 血清铜蓝蛋白、HOMA-IR 与肝硬化患者 Child-Pugh 分级的相关性分析

Spearman 相关性分析示,研究组 Child-Pugh 分级与血清铜蓝蛋白呈负相关 ( $r = -0.415, P < 0.05$ ), Child-Pugh 分级与 HOMA-IR 呈正相关 ( $r = 0.510, P < 0.05$ )。

### 2.3 血清铜蓝蛋白、HOMA-IR 对肝硬化患者肝功能的诊断价值

ROC 曲线示血清铜蓝蛋白、HOMA-IR 对肝硬化患者肝功能的诊断 ROC 曲线及诊断效能见图 1、表 3。



注:A 为指标诊断肝硬化 Child-Pugh 分级 B+C 级患者的 ROC 曲线; B 为指标诊断肝硬化 Child-Pugh 分级 C 级患者的 ROC 曲线。

图 1 血清铜蓝蛋白、HOMA-IR 诊断肝硬化 Child-Pugh 分级的 ROC 曲线

Figure 1 ROC curves of serum ceruloplasmin and HOMA-IR in Child-Pugh classification diagnosis of liver cirrhosis

## 3 讨论

铜蓝蛋白是一种存在于血清内、由肝脏合成的携铜糖蛋白,通过胆道排出,可通过对铜的结合、释放作用调节铜在机体内的分布,其浓度与氧化酶活性及血清内铜含量关系密切<sup>[6]</sup>。肝硬化患者肝实质受损,大量肝细胞坏死,肝细胞数量的减少可引起肝脏合成蛋白的能力降低,铜蓝蛋白的释放量减少<sup>[7]</sup>。本研究结果提示肝硬化病情越重,铜蓝蛋白水平降低越明显。既往关于铜蓝蛋白与肝实质损害程度及 Child-Pugh 分级的相关性报道不多,且存在一定争议。朱远航等人<sup>[8]</sup>分析了慢性肝炎、重症肝炎及肝硬化患者血清铜蓝蛋白水平,

表 3 血清铜蓝蛋白、HOMA-IR 对肝硬化患者肝功能的诊断价值

Table 3 Diagnostic value of serum ceruloplasmin and HOMA-IR in liver function of patients with liver cirrhosis

指标	分级	AUC	截点值	灵敏度(%)	特异度(%)	95%CI	<i>P</i> 值
铜蓝蛋白	Child-PughB+C 级	0.644	302.10	89.70	50.20	0.566~0.722	0.002
	Child-PughC 级	0.719	320.20	70.40	66.00	0.641~0.796	<0.001
HOMA-IR	Child-PughB+C 级	0.805	2.80	84.50	64.00	0.740~0.870	<0.001
	Child-PughC 级	0.874	3.08	66.70	94.00	0.823~0.925	<0.001

结果显示重型肝炎患者铜蓝蛋白明显低于其他肝病及正常对照组,而肝硬化、慢性肝炎及正常对照组间铜蓝蛋白水平比较差异无统计学意义。郑永平等<sup>[9]</sup>开展的一项肝硬化研究证实肝硬化患者血清铜蓝蛋白水平随 Child-Pugh 分级的升高而降低,但 Child-Pugh A 级患者较对照组血清铜蓝蛋白水平更高,其原因可能血清铜蓝蛋白水平与肝损伤程度相关,在肝损伤较轻时,其水平可出现升高,而当严重肝损伤时,则呈现下降趋势。曾达武等人<sup>[10]</sup>分析慢性乙肝患者血清铜蓝蛋白水平及纤维化分期的关系,结果显示血清铜蓝蛋白水平随纤维化分期的升高而降低,呈现中等程度的负相关关系。本研究与曾达武等人<sup>[10]</sup>研究结果类似,与其他研究结果存在一定差异,原因可能与研究对象及病情活动度差异相关。尽管如此,本研究结果仍提示血清铜蓝蛋白可能可作为一种间接反映肝硬化病情严重程度的指标。经 ROC 曲线分析,血清铜蓝蛋白对肝硬化 Child-Pugh 分级 B+C 级患者及 Child-Pugh 分级 C 级患者诊断的曲线下面积分别为 0.773、0.708,提示其对肝硬化肝功能诊断具有一定参考价值。

肝脏作为葡萄糖代谢的主要器官,肝功能的损伤可引起糖代谢紊乱<sup>[11]</sup>。本研究结果提示肝硬化患者存在高胰岛素血症及胰岛素抵抗,且这种现象随肝硬化患者 Child-Pugh 分级的升高而升高。魏新亮等人<sup>[12]</sup>研究证实,慢性乙型肝炎患者 HOMA-IR 值随病情严重程度及 Child-Pugh 分级增加而升高。郭雅丽等人<sup>[13]</sup>也证实肝硬化患者 Child-Pugh 分级与 HOMA-IR 值呈正相关。本研究与上述研究结果类似。目前研究认为肝源性糖代谢紊乱的机制可能为肝细胞数量的减少,导致肝内胰岛素受体数量减少、亲和力降低及受体后缺陷等变化,进而出现胰岛素抵抗;另外肝脏受损导致肝糖原合成障碍,进一步刺激胰岛素的分泌,造成血清胰岛素水平升高<sup>[14-15]</sup>。绘制 HOMA-IR 诊断不同肝功能分级患者的价值,结果提示 HOMA-IR 可能可作为肝硬化病情评估的参考依据。

综上所述,血清铜蓝蛋白、胰岛素抵抗指数与肝硬化患者 Child-Pugh 分级存在一定程度相关,可能可作为简单评价肝硬化肝功能的参考指标。本研究存在一定局限性,肝硬化 Child-Pugh 分级法尚不能完全反应肝硬化的严重程度,且本研究样本量存在一定限制,因此,寻找更为全面的体系

明确患者肝硬化病情,同时进一步扩大样本量是下一步研究的目标。

## 参考文献

- [1] 曾西,陈明镨,吴楠楠,等.无创性诊断方法评估肝硬化严重程度的进展[J].胃肠病学和肝病学杂志,2017,26(1):1-4.
- [2] Zeng DW, Liu YR, Zhang JM, et al. Serum ceruloplasmin levels correlate negatively with liver fibrosis in males with chronic hepatitis B: a new noninvasive model for predicting liver fibrosis in HBV-related liver disease [J]. Plos One, 2013, 8(10):e77942.
- [3] 傅熙玲,田玉岭,臧志栋,等.2型糖尿病或糖耐量异常与乙型肝炎肝硬化发生肝癌的相关性研究[J].癌症进展,2017,15(5):540-543.
- [4] 危北海,张万岱,陈治水,等.肝硬化中西医结合诊治方案(草案)[J].中国中西医结合杂志,2004,24(10):869-871.
- [5] Zou H, Tao Y, Wang ZM. Integration of Child-Pugh score with future liver remnant yields improved prediction of liver dysfunction risk for HBV-related hepatocellular carcinoma following hepatic resection[J]. Oncol Lett, 2017, 13(5):3631-3637.
- [6] Shah PH, Venkatesh R, More CB. Determination of role of ceruloplasmin in oral potentially malignant disorders and oral malignancy-A cross sectional study[J]. Oral Dis, 2017, 23(8):15-17.
- [7] Pasha MK, Aysha Q, Narasu ML, et al. Study of magnesium, copper, zinc, iron and ceruloplasmin in liver cirrhosis and ovarian cancer ascitic patients [J]. Brit J Med Med Res, 2014, 4(21):3902-3911.
- [8] 朱远航,陈忠城,潘顺文,等.血清甲状腺素、铜蓝蛋白、丙氨酸氨基转移酶和凝血酶原时间与病毒性肝炎肝损害的相关性及其临床意义[J].中国卫生检验杂志,2014,5(18):2678-2680.
- [9] 郑永平,杨宏生,杨壁辉,等.肝硬化患者急性时相蛋白水平与 Child-Pugh 分级的相关性研究——附 58 例检测分析[J].新医学,2003,34(3):152-155.
- [10] 曾达武,董菁,朱月永,等.血清铜蓝蛋白水平与慢性乙型肝炎患者临床病理关系的初步研究[J].中华传染病杂志,2012,30(12):731-735.
- [11] 邹文兰,顾学芳.2型糖尿病和糖代谢异常/糖耐量异常与非酒精性脂肪肝的相关性研究[J].中西医结合肝病杂志,2017,27(6):334-335.
- [12] 魏新亮,魏思忱,田树英,等.乙型病毒性肝炎肝硬化患者血清网膜素和脂联素水平测定的临床意义[J].疑难病杂志,2017,12(2):15-19.
- [13] 郭雅丽,卢书明,李春艳,等.肝硬化并糖尿病患者胰岛素抵抗及与肝功能关系探讨[J].大连医科大学学报,2017,39(4):22-27.
- [14] 郭雅丽,卢书明,李春艳,等.肝硬化并存糖尿病老年患者胰岛素抵抗研究[J].中华老年医学杂志,2017,36(11):1202.
- [15] 马晓英,陈玲.2型糖尿病合并非酒精性脂肪性肝病者胰岛功能异常与空腹血糖的关系[J].临床内科杂志,2017,34(5):343-344.

# APN、TNF- $\alpha$ 及 Fibroscan 受控衰减参数在非酒精性脂肪肝中的变化

高美丽<sup>1\*</sup> 何文艳<sup>1</sup> 安红杰<sup>1</sup> 田雪梅<sup>2</sup> 徐金凤<sup>1</sup> 任艳平<sup>3</sup>

**【摘要】目的** 分析布拉氏酵母菌治疗对非酒精性脂肪肝患者脂联素(APN)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )及Fibroscan(FS)受控衰减参数的影响。**方法** 选取2019年12月至2020年12月本院100例非酒精性脂肪肝患者作为研究对象,根据干预方案的差异分为研究组(生活及行为方式的干预+布拉氏酵母菌,  $n=53$ )和对照组(仅进行生活及行为方式的干预,  $n=47$ )。比较两组治疗前后肝功能、APN、炎症因子、可控衰减参数(CAP)、血脂及体质指数(BMI)水平差异。**结果** 治疗后,两组的肝功能和APN均有所改善,研究组的TBIL和DBIL水平较对照组低,APN、ALB、PTA水平较对照组高,差异均具有统计学意义( $P<0.05$ )。治疗后研究组TNF- $\alpha$ 、IL-6均低于对照组,IL-10高于对照组,差异均具有统计学意义( $P<0.05$ )。治疗后研究组TG、HDL-C、LDL-C水较治疗前及对照组低,差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。治疗后两组CAP、BMI均降低,且研究组低于对照组,差异均具有统计学意义( $P<0.05$ )。**结论** 布拉氏酵母菌可改善非酒精性脂肪肝患者肝功能,降低炎症因子含量,调节其血脂、BMI和CAP水平,值得推广。

**【关键词】** 布拉氏酵母菌; APN; TNF- $\alpha$ ; Fibroscan 受控衰减参数

## Changes of APN, TNF- $\alpha$ and fibroscan controlled attenuation parameters in patients with non-alcoholic fatty liver disease

GAO Meili<sup>1\*</sup>, HE Wenyan<sup>1</sup>, AN Hongjie<sup>1</sup>, TIAN Xuemei<sup>2</sup>, XU Jinfeng<sup>1</sup>, REN Yanping<sup>3</sup>

(1. Department of Nosocomial Infection, Hebei PetroChina Central Hospital, Langfang, Hebei, China, 065000; 2. Department of Laboratory, Hebei PetroChina Central Hospital, Langfang, Hebei, China, 065000; 3. Department of Laboratory, Clinical pharmacy of Hebei PetroChina Central Hospital, Langfang, Hebei, China, 065000)

**【ABSTRACT】 Objective** To analyze the effect of *Saccharomyces boulardii* treatment on adiponectin (APN), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and fibroscan (FS) controlled attenuation parameters (CAP) in patients with non-alcoholic fatty liver disease. **Method** 100 patients with non-alcoholic fatty liver disease from December 2019 to December 2020 were selected and divided into the study group (intervention of life and behavior style + *Saccharomyces boulardii*,  $n=53$ ) and the control group (only intervention of life and behavior style,  $n=47$ ) according to the difference of intervention plan. The differences in liver functions, APN, inflammatory factors, controllable attenuation parameters (CAP), blood lipids and body mass index (BMI) before and after treatment were compared between 2 groups. **Result** After treatment, the liver function and APN between 2 groups improved ( $P<0.05$ ). The levels of TBIL and DBIL in the study group were lower than those in the control group, and the levels of APN, ALB, and PTA were higher than those in the control group, the differences are statistically significant ( $P<0.05$ ). After treatment, TNF- $\alpha$  and IL-6 in the study group were lower than those in the control group, and IL-10 was higher than that in the control group, the differences are statistically significant ( $P<0.05$ ). After treatment, the levels of TG, CHOL and LDL-C in the study group were lower than those before treatment and lower than those in the control group, the differences are statistically significant ( $P<0.05$ ). CAP and BMI of 2 groups decreased after treatment, and the level of the study group was lower than that

基金项目:廊坊市科学技术项目(2019013132)

作者单位:1.河北中石油中心医院感染科,河北,廊坊 065000

2.河北中石油中心医院检验科,河北,廊坊 065000

3.河北中石油中心医院检验科临床药学,河北,廊坊 065000

\*通信作者:高美丽, E-mail: zhou594380song28@163.com

of the control group, the differences were statistically significant ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** *Saccharomyces boulardii* can improve the liver function of patients with non-alcoholic fatty liver, reduce the levels of inflammatory factors, and regulate their blood lipids, BMI, and CAP levels. It is worthy of promotion.

**[KEY WORDS]** *Saccharomyces boulardii*; APN; TNF- $\alpha$ ; Fibroscan controlled attenuation parameter

非酒精性脂肪肝是遗传-环境-代谢应激相关性疾病,是指除外酒精和其他明确肝脏损伤因素所致的,以弥漫性肝细胞大泡性脂肪变性为病理特征的,与肥胖、高胰岛素血症、2型糖尿病密切相关的临床病理综合征<sup>[1]</sup>。脂联素(adiponectin, APN)在增强胰岛素敏感性、改善肝细胞脂肪变和减轻炎症反应等方面发挥着重要作用,与非酒精性脂肪肝联系密切<sup>[2]</sup>。肝脏瞬时弹性硬度检查(Fibroscan, FS)即肝硬度检测,可利用脂肪影响超声波的传播,通过可控衰减参数(Controlled Attenuation Parameter, CAP)检测和定量脂肪变,可有效地检出5%以上的肝脂肪变,同时区分轻度脂肪变与中-重度脂肪变和评价脂肪变性和纤维化<sup>[3]</sup>。调节肠道菌群是治疗非酒精性脂肪肝的重要举措,布拉氏酵母菌主要用于抗肠道中毒素。目前关于布拉氏酵母菌治疗非酒精性脂肪肝的研究较少,本研究将通过探讨布拉氏酵母菌对非酒精性脂肪肝患者APN、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (Tumor necrosis factor $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )及Fibroscan受控衰减参数的影响来反映微生态制剂在非酒精性脂肪肝患者治疗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2019年12月至2020年12月于本院肝病门诊及体检中心确诊的非酒精性脂肪肝患者,纳入标准:①年龄18~70岁,性别不限;②符合《2018年非酒精性脂肪肝诊疗指南》中诊断标准<sup>[4]</sup>;③肝脏彩超诊断明确脂肪肝者;④60<谷丙转氨酶 $\leq$ 250 U/L<sup>[5]</sup>。排除标准:①有饮酒史(男性饮酒量>140 g/周,女性>70 g/周)的脂肪肝患者;②自身免疫性肝病及其他可致肝脂肪变的疾病;③肝功能

严重衰竭,胆道疾病、感染及恶性肿瘤;④近3个月服用减肥药、调脂降糖药、保肝药或其他可能致肝脏酶学改变的中、西药物;⑤1个月内使用益生菌制剂、免疫抑制剂、抗生素等影响肠道菌群的药物或食物。最终纳入100例患者,根据医嘱制定的干预方案的差异分为研究组( $n=53$ )和对照组( $n=47$ ),两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。本研究已获得院伦理委员会批准通过,所有受试者均签署知情同意书。

### 1.2 方法

对照组仅进行生活及行为方式的干预,主要为饮食控制及运动,修正不良行为。饮食要求粗、细粮搭配、定时进餐、避免进食过饱;以易于长期坚持、低强度、能耐受的动态运动即有氧运动为主,如慢跑、中快速步行(115~125步/分)、游泳等运动项目,每天30 min,同时做8~10组阻抗训练,每周2次。研究组患者在对照组的基础上,给予布拉氏酵母菌(法国百科达制药厂,批准文号:S20150051,规格:0.25 g $\times$ 6袋),用法:0.5 g每日2次共服12周。

### 1.3 观察指标

#### 1.3.1 肝功能和APN

全自动生化分析仪检测两组治疗前后血清APN、谷丙转氨酶(Alanine transaminase, ALT)、谷草转氨酶(aspartate transaminase, AST)、 $\gamma$ -谷氨酰转肽酶( $\gamma$ -glutamyltransferase, GGT)、血清总胆红素(The total bilirubin, TBIL)。

#### 1.3.2 炎症因子

肿瘤坏死因子- $\alpha$ (Tumor necrosis factor $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-6((interleukin, IL-6)及白细胞介素-10((interleukin, IL-10)水平,治疗前、治疗后12周后抽取所有患者清晨空腹静脉血3 mL,离心(3 500 r/min, 5 min, 离心半径8 cm)后取分离血清。

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

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

组别	$n$	性别		年龄(岁)	病程(年)	病情		
		男	女			轻度	中度	重度
研究组	53	30(56.60)	23(43.40)	62.54 $\pm$ 4.31	5.74 $\pm$ 1.29	14(26.42)	23(43.40)	16(30.18)
对照组	47	28(59.57)	19(40.43)	62.41 $\pm$ 4.35	5.78 $\pm$ 1.32	12(25.53)	20(42.55)	15(31.92)
$\chi^2/t$ 值		0.090		0.150	0.153	0.036		
$P$ 值		0.764		0.881	0.879	0.982		

通过酶联免疫吸附法测定两组的 TNF-α、IL-6、IL-10 浓度,由北京美康生物技术研究中心有限责任公司提供检测所用的试剂,根据试剂盒说明书步骤操作。

### 1.3.3 Fibroscan 受控衰减参数测定脂肪肝

使用 Fibroscan-502 机型(法国 Echosens 公司) M 探头进行肝脏脂肪定量检测,以 CAP 表示,单位为 dB/m,每例对象成功检测 10 次,以所有有效检测结果的中位数为最终结果,所有测量值的四分位间距与中位数的比值(IQR/med)<30%,且成功率(成功检测次数/总检测次数)>60%为有效测量<sup>[6]</sup>。

### 1.3.4 血脂

甘油三酯(Triglyceride, TG)、高密度脂蛋白胆固醇(High density lipoprotein cholesterol, HDL-C)及低密度脂蛋白胆固醇(Low density lipoprotein cholesterin, LDL-C),于治疗前、治疗 12 周后凌晨抽取所有研究对象空腹静脉血,实验室静置 30 min 后离心去上清液,然后使用东芝 TBA 120 型全自动生化分析仪进行测算。

### 1.3.5 体质指数(Body Mass Index, BMI)

治疗前、治疗 12 周后测量两组患者身高、体重,计算 BMI=体重(kg)÷身高(m)<sup>2</sup><sup>[7]</sup>。

## 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( $\bar{x} \pm s$ )描述,行 *t* 检验;计数资料以 *n*(%)表示,行  $\chi^2$  检验。以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 两组肝功能和 APN 比较

两组 TBIL、DBIL、ALB、PTA、APN 的水平在治疗前比较差异无统计学意义(*P*>0.05);治疗后,研究组的 TBIL 和 DBIL 水平较对照组低,APN、ALB、PTA 水平较对照组高,差异有统计学意义(*P*<0.05)。见表 2。

### 2.2 两组炎症因子比较

治疗前两组炎症指标浓度比较差异无统计学意义(*P*>0.05),治疗后研究组 TNF-α、IL-6 均低于对照组,IL-10 高于对照组,差异有统计学意义(*P*<0.05)。见表 3。

### 2.3 两组 TG、HDL-L, LDL-C, CAP 及 BMI 比较

两组治疗前 TG、HDL-C、LDL-C、CAP 及 BMI 水平比较差异无统计学意义(*P*>0.05),治疗后研究组 TG、CHOL、HDL-C、CAP 及 BMI 水较治疗前及对照组低,差异有统计学意义(*P*<0.05)。见表 4。

表 2 两组治疗前后 TBIL、DBIL、ALB、PTA 的水平( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 the levels of TBIL, DBIL, ALB and PTA in the two groups before and after treatment ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	<i>n</i>	TBIL(μmol/L)		DBIL(μmol/L)		ALB(g/L)		PTA(%)		APN(g/L)	
		治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
研究组	53	321.59±114.76	96.39±36.74	257.96±96.37	68.63±19.60	21.79±9.34	48.63±11.85	35.98±12.47	68.09±13.71	4.06±1.25	7.96±1.39
对照组	47	326.40±114.58	185.63±87.63	256.87±95.78	103.65±37.26	21.85±9.39	36.75±10.23	35.81±12.45	50.97±13.06	4.13±1.26	5.98±1.21
<i>t</i> 值		0.209	6.776	0.057	9.382	0.032	5.333	0.068	6.372	0.278	7.552
<i>P</i> 值		0.835	<0.001	0.955	<0.001	0.975	<0.001	0.946	<0.001	0.781	<0.001

表 3 两组治疗前后 TNF-α、IL-6 及 IL-10 比较( $\bar{x} \pm s$ , pg/mL)

Table 3 Comparison of TNF-α, IL-6 and IL-10 before and after treatment between the two groups ( $\bar{x} \pm s$ , pg/mL)

组别	<i>n</i>	TNF-α		IL-6		IL-10	
		治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
研究组	53	36.59±5.38	10.79±4.22	39.81±11.57	14.47±4.39	13.08±5.31	26.78±6.85
对照组	47	36.57±5.45	18.53±4.71	39.56±11.55	20.88±5.71	13.12±5.39	20.33±6.71
<i>t</i> 值		0.018	8.668	0.108	6.332	0.037	4.745
<i>P</i> 值		0.985	<0.001	0.914	<0.001	0.970	<0.001

表 4 两组入院时 TG、HDL-C, CAP 和 BMI 比较( $\bar{x} \pm s$ )

Table 4 Comparison of TG, HDL-C, CAP 和 BMI between the 2 groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	<i>n</i>	TG(mmol/L)		HDL-C(mmol/L)		LDL-C(mmol/L)		CAP(g/L)		BMI(kg/m <sup>2</sup> )	
		治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
研究组	53	5.26±0.63	2.07±0.42	2.63±0.86	0.76±0.31	5.63±0.85	2.03±0.52	278.63±12.85	235.41±10.13	31.63±1.15	26.96±1.03
对照组	47	5.21±0.51	3.88±0.56	2.68±0.85	1.88±0.42	5.69±0.88	2.94±0.61	278.79±12.89	249.80±11.65	31.65±1.19	28.52±1.15
<i>t</i> 值		0.433	18.409	0.292	15.282	0.347	8.052	0.062	6.607	0.085	7.156
<i>P</i> 值		0.666	<0.001	0.771	<0.001	0.730	<0.001	0.951	<0.001	0.932	<0.001

### 3 讨论

非酒精性脂肪肝是当前临床及生活中最常见的慢性肝脏疾病,迄今尚无特效治疗药物。最近一系列研究显示,肠道细菌对宿主起着免疫保护、营养物质的消化吸收、黏膜屏障、抗癌等多种作用<sup>[8]</sup>。当肠道菌群失调时,革兰阴性菌过度生长、死亡,产生大量的内毒素,内毒素通过直接损伤肝脏及激活炎症反应,促使肝脏炎性损伤及脂肪变性,加速非酒精性脂肪肝发生<sup>[9]</sup>。恢复肠道微生态平衡则可能防治非酒精性脂肪肝,因此微生态制剂在非酒精性脂肪肝的治疗中的作用越来越受到关注。微生态制剂包括益生菌、益生元和合生元三种,其中以益生菌应用最多<sup>[10]</sup>。布拉氏酵母菌是益生菌的一种,可通过调节肠道菌群减少菌群失调的发生,并改善肠道防御屏障功能,减轻氧化应激和炎症损伤,改善肝功能和胰岛素抵抗<sup>[11]</sup>。此外,布拉氏酵母菌在体内代谢过程中产生的多种有机酸可下调肠道 pH 值并改善肠道蠕动,促进肠道内产生的毒素排除,减轻内毒素血症<sup>[12]</sup>。

脂联素是一种新发现的由脂肪细胞分泌的激素,具有降血脂、降血糖、改善胰岛素敏感性以及拮抗动脉粥样硬化的作用,与肥胖、2型糖尿病和胰岛素抵抗密切相关<sup>[13]</sup>。因此,临床上常利用血清脂联素水平反映非酒精性脂肪肝病情进展程度。本研究结果表明布拉氏酵母菌对防治非酒精性脂肪肝并阻止其发展有重要价值。此外,益生菌可减轻肝脏氧化应激和炎症损伤。国外研究提示,口服亚油酸和双歧杆菌患者肝脏及脂肪组织中不饱和脂肪酸含量明显增多,炎症细胞因子 TNF- $\alpha$  及干扰素  $\gamma$  含量下降<sup>[14]</sup>。这与本研究结果基本一致,说明益生菌不仅能改变宿主脂肪酸的合成,还能降低炎症因子的含量。

FS 利用脂肪影响超声波的传播,通过 CAP 来检测和定量脂肪变,可有效地检出 5% 以上的肝脂肪变,是诊断和随访脂肪肝较好的手段<sup>[15]</sup>。本研究结果表明布拉氏酵母菌对阻止非酒精性脂肪肝病情发展有重大临床意义,有望成为该症防治的新亮点。此外值得注意的是,为避免严重不良反应的发生、提高临床疗效,在服用布拉氏酵母菌时需避免与抗真菌药物服用,并做好生活及行为方式的干预<sup>[16]</sup>。

综上所述,经布拉氏酵母菌治疗的非酒精性脂肪肝患者 APN、炎症因子、血脂水平得到改善,且肝功能明显好转。

### 参考文献

- [1] 朱敬生, 吴卫东, 常波, 等. 有氧运动对非酒精性脂肪肝大鼠肝组织雷帕霉素靶蛋白、核糖体蛋白 S6 激酶 1 和固醇调节元件结合蛋白 1c 表达的影响[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2020, 42(12):1057-1062.
- [2] 黄天生, 郭召平, 尚莹莹, 等. 化痰助运方治疗非酒精性脂肪肝(痰湿型)的临床观察及对脂联素的影响[J]. 辽宁中医杂志, 2017, 44(2):306-311.
- [3] Massart J, Begriche K, Moreau C, et al. Role of nonalcoholic fatty liver disease as risk factor for drug-induced hepatotoxicity[J]. J Clin Transl Res, 2017, 3(1):212-232.
- [4] Chan WK, Mustapha NRN, Wong LH, et al. Controlled attenuation parameter using the FibroScan XL probe for quantification of hepatic steatosis for non-alcoholic fatty liver disease in an Asian population[J]. United Eur Gastr J, 2017, 5(1):76-79.
- [5] Fangfang H, Shasha Z, Fangmiaoy Y, et al. Protective Effects and Mechanism of Meretrix meretrix Oligopeptides against Nonalcoholic Fatty Liver Disease [J]. Marine Drugs, 2017, 15(2):456-459.
- [6] Li Q, Huang C, Xu W, et al. Accuracy of FibroScan in analysis of liver fibrosis in patients with concomitant chronic Hepatitis B and nonalcoholic fatty liver disease [J]. Medicine, 2020, 99(23):
- [7] Lee S, Kim S, Hwang S, et al. Dysregulated expression of proteins associated with ER stress, autophagy and apoptosis in tissues from nonalcoholic fatty liver disease [J]. Oncotarget, 2017, 8(38):63370-63381.
- [8] Salvatore P, Vincent WSW, Calogero C, et al. Improved noninvasive prediction of liver fibrosis by liver stiffness measurement in patients with nonalcoholic fatty liver disease accounting for controlled attenuation parameter values [J]. Hepatology, 2017, 56(31):5981-5983.
- [9] 中华医学会肝病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组, 中国医师协会脂肪性肝病专家委员会. 非酒精性脂肪性肝病防治指南(2018 更新版)[J]. 中华肝脏病杂志, 2018, 34(5):641-649.
- [10] Samuel VT, Shulman GI. Nonalcoholic Fatty Liver Disease as a Nexus of Metabolic and Hepatic Diseases [J]. Cell Metabolism, 2017, 27(1):678-680.
- [11] Gundersen C. Expand SNAP to Reduce Nonalcoholic Fatty Liver Disease in the United States [J]. J Nutrit, 2019, 150(1):634-637.
- [12] 陈默, 王满才, 倪睿, 等. 益生菌在非酒精性脂肪肝治疗中的作用[J]. 中华肝脏病杂志, 2017, 25(1):77-80.
- [13] Moreno-Fernandez ME, Giles DA, Stankiewicz TE, et al. Peroxisomal  $\beta$ -oxidation regulates whole body metabolism, inflammatory vigor, and pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease[J]. Sci Insight, 2018, 3(6):574-577.
- [14] Lee SR, Lee HJ, Choi EK, et al. Direct Oral Anticoagulants in Patients With Atrial Fibrillation and Liver Disease [J]. J Am Coll Cardiol, 2019, 73(25):3295-3308.
- [15] Delgado, Susana. The Bifidobacteria and Related Organisms II Evidence of the In Vitro and In Vivo Immunological Relevance of Bifidobacteria [J]. 2018, 40(3):295-305.

# 中耳胆脂瘤的发病机制研究进展

周赫<sup>1</sup> 赵苗森<sup>2</sup> 马继伟<sup>1</sup> 奚悦<sup>1</sup> 赵苗青<sup>1\*</sup>

**[摘要]** 胆脂瘤是一种进行性发展的非肿瘤性病变,角化上皮异常增殖进入中耳,并可以对骨质造成破坏,引起多种并发症。迄今为止胆脂瘤发生和发展的完整分子机制还没有被研究透彻,就近年来胆脂瘤有相关的炎症介质、微生物感染、氧化应激、相关基因研究等将在下文中总结讨论。

**[关键词]** 胆脂瘤;发病机制;分子生物学;基因表达;炎症介质

## Research of progress on the pathogenesis of middle ear cholesteatoma

ZHOU He<sup>1</sup>, ZHAO Miaomiao<sup>2</sup>, MA Jiwei<sup>1</sup>, XI Yue<sup>1</sup>, ZHAO Miaoqing<sup>1\*</sup>

(1. Department of Pathology, Shandong Provincial Hospital Affiliated to Shandong First Medical University, Jinan, Shandong, China, 250021; 2. Library and Information Center, Shandong Taishan Vocational College of Nursing, Taian, Shandong, China, 271000)

**[ABSTRACT]** Cholesteatoma is a progressive non-neoplastic disease. The abnormal proliferation of keratinized epithelium enters the middle ear and can cause damage to bone and cause various complications. So far, the complete molecular mechanism of the occurrence and development of cholesteatoma has not been thoroughly studied. This review summarized the recent progress of cholesteatoma on inflammatory mediators, microbial infection, oxidative stress, and related gene research.

**[KEY WORDS]** Cholesteatoma; Pathogenesis; Molecular biology; Gene expression; Inflammatory mediators

## 1 概述

胆脂瘤是进行性发展的良性疾病,来源于颞骨内的角化复层鳞状上皮异常增生、堆叠后经过一系列复杂的生理生化反应而成的炎性包裹囊样肿物,它可以对中耳、内耳的组织 and 周围骨质进行渐进性的破坏,从而可以导致颅内外的各种相关并发症。

胆脂瘤在病理学上分为内容物、基质和基质周围组织三层。囊性内容物为鳞状上皮角化碎屑、脂性分泌物及坏死物质;基质由复层扁平上皮组成;周围的基质是由包含了胶原纤维,纤维细胞和炎细胞的结缔组织组成。

中耳胆脂瘤分为在儿童患者常见的先天性胆脂瘤和可发生于儿童或成人的后天性胆脂瘤,其中先天性约占2%,后天性约占98%,本文将主要对后天性胆脂瘤的机制研究进行综述。

## 2 后天性胆脂瘤

后天性胆脂瘤基于鼓膜有无穿孔和上皮细胞通过穿孔向鼓室的迁移分成原发性和继发性两种。后天原发性胆脂瘤多发生在鼓膜松弛部位,是由于完整鼓膜内陷袋后脱落角质上皮的堆积所致。后天继发性胆脂瘤常有中耳炎病史,上皮可能因为鼓膜的穿孔、内陷、感染等损伤经破损的鼓膜迁移到中耳。

基金项目:国家自然科学基金(81672093);国家自然科学基金(81770979)

作者单位:1. 山东第一医科大学附属省立医院,病理科,山东,济南 250021

2. 山东泰山护理职业学院,图书信息中心,山东,泰安 271000

\*通信作者:赵苗青, E-mail: zhaomqsd@163.com

后天性胆脂瘤发生的病理生理机制目前尚未了解透彻,推测是在多种因素的互相作用下发生的。其发病机制主要有四种学说:①囊袋内陷学说;②上皮迁移学说;③基底细胞增殖学说;④鳞状上皮化生学说;慢性炎症在后天性胆脂瘤的多种病因机制里起着基础作用<sup>[1]</sup>。后天性胆脂瘤最为广泛接受的发病机理是因为中耳负压而加深的囊袋阻塞时,角质难以被清除,从而导致胆脂瘤。

目前现有的假说还无法完整解释胆脂瘤的所有临床特征比如:迁移、侵袭性、异常增殖分化和反复发作等。近年来许多学者从分子生物学方向入手在炎症介质、基因异常、酶活性、微生物感染等多方面探究胆脂瘤的发生、发展机制。

### 2.1 炎症介质

炎症反应介质是免疫系统通过炎症这种级联反应对损伤或刺激作出反应过程中其主要作用的因子,由上皮细胞,内皮细胞和浸润性炎细胞合成。后天性胆脂瘤普遍伴有中耳的感染与炎症,中耳炎被认为是由细菌的细胞壁成分—内毒素所导致,内毒素刺激巨噬细胞和角质形成细胞产生肿瘤坏死因子 $\alpha$ (Tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )和白介素 $1\beta$ (Interleukin  $1\beta$ , IL- $1\beta$ )从而对损伤作出反应,继而形成含有活化角质形成细胞的炎性肉芽组织,具有迁移和增殖的活性。

多种炎性介质在胆脂瘤的发病里都有参与,起主要作用的则是 TNF- $\alpha$ ,与正常皮肤相比其在胆脂瘤的组织中的表达均有提高,TNF- $\alpha$ 的表达水平与炎细胞浸润、骨质破坏及感染的严重程度均有关系。活化的巨噬细胞、角质细胞以及肥大细胞均可以产生 TNF- $\alpha$ ,进而使破骨细胞介导的骨吸收增强。

近些年新发现的促炎因子高迁移率族蛋白 B1 (High mobility group protein B1, HMGB1)可以促进炎症反应、肿瘤的转移以及转录的调节。在胆脂瘤上皮细胞凋亡实验中,用紫外线诱导的细胞外基质释放 HMGB1, HMGB1-DNA 复合物可诱导角质细胞产生 TNF- $\alpha$  和 IL- $1\beta$ ,从而影响骨质吸收及炎症进展,据此猜测 HMGB1-DNA 复合物有参与胆脂瘤发生、发展的可能性<sup>[2]</sup>。

### 2.2 生长因子

来源于角质细胞的细胞因子可以诱导基质周围的成纤维细胞分泌角细胞生长因子(KGF)、表皮生长因子(Epidermal growth factor, EGF)、血小

板源生长因子(PDGF)等,这些细胞因子则可以影响胶质细胞的增殖、分化与迁移。部分学者对胆脂瘤做免疫组织化学染色发现胆脂瘤的生长因子配体与受体表达量出现异常,可能是因为表皮生长因子受体调节缺陷和干扰素- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )受体、血小板衍生生长因子(PDGF)、转化生长因子- $\alpha$ (TGF- $\alpha$ )、白介素-1(IL-1)和粒细胞集落刺激因子(GM-CSF)表达增强所致。有研究认为胆脂瘤基质中大量表达 TGF- $\alpha$ [表皮生长因子受体(Epidermal growth factor receptor, EGFR)的配体],而相比于正常的外耳角质上皮 EGFR10%的表达比例,胆脂瘤角质上皮对 EGFR 有 75%的表达,EGF 和 TGF- $\alpha$  均可与 EGFR 结合从而影响胆脂瘤的生长<sup>[3]</sup>。

### 2.3 微生物感染

细菌生物膜是菌群与上皮细胞黏附并分泌基质,使细菌相互黏连而形成的一种相对封闭稳固的静态膜状复合物,为细菌屏蔽机体攻击和占据性保护作用。慢性化脓性中耳炎和胆脂瘤的细菌生物膜形成率都很高。现已研究证实,它可能产生脂多糖(LPS)和其他刺激破骨作用的细菌产物。Rayner等学者在20年前发现提取自铜绿假单胞菌的脂多糖在体外可以诱导破骨细胞的发育,并通过 toll 样受体-4-依赖性机制有效刺激体内的骨吸收<sup>[4]</sup>。有研究证实铜绿假单胞菌脂多糖能够激活 NF- $\kappa$ B 依赖性的细胞周期蛋白 D1 介导的角质形成细胞增生。NF- $\kappa$ B 通过与细胞周期蛋白 D1 启动子特异序列结合,诱导细胞周期蛋白 D1 的表达和细胞增殖。

### 2.4 酶的活性

有多种酶在胆脂瘤中起重要作用,现已发现基质金属蛋白酶(Matrix metalloproteinases, MMPs)及其特异性抑制剂—组织金属蛋白酶抑制剂(Tissue inhibitor of matrix metalloproteinases, TIMPs)参与了这种疾病的发生、骨侵蚀的发展及上皮基质的生理转换。MMP 是一种锌钙依赖的肽链内切酶,是由蛋白水解激活的角质形成细胞、巨噬细胞、内皮细胞、成纤维细胞等合成的。MMPs 的蛋白水解活性在激活过程中受其前体控制,并被内源性抑制剂 $\alpha$ 巨球蛋白和 TIMPs 抑制。在正常时,机体严格调控着 MMP 的表达,不受控制的结果就是导致细胞外基质的变性和上皮的侵袭性增强。有研究发现, MMP 在胆脂瘤中表达上调,其抑制剂减少,致使细胞外基质减少,调

控出现失衡状态。另外有研究发现特异性胆脂瘤金属蛋白酶的同工酶 MMP1、MMP2、MMP9 等在胆脂瘤中的表达水平升高,运用免疫标记技术发现 MMP1、2、3 和 9 主要出现在上皮的基层及基底上层。MMP9 主要见于炎症细胞浸润区域。Olszewska 等研究表明 MMP9 与胆脂瘤的炎症程度呈正相关<sup>[5]</sup>。

## 2.5 氧化应激

有氧生物在正常生理代谢过程中会产生一些对细胞和组织有害的活性氧(ROS),大量的活性氧会导致氧化应激反应,造成严重的代谢障碍和对生物大分子的损害。目前氧化应激反应在慢性中耳炎和胆脂瘤发病中的作用尚未得到充分探讨。有研究证实了氧自由基与胆脂瘤的感染发病及组织损伤有关,他们对胆脂瘤性和非胆脂瘤性慢性中耳炎患者和健康受试者的氧化应激标志物和抗氧化酶进行了测定,发现胆脂瘤患者血清中总氧化状态(TOS)和氧化状态指数(OSI)更高一些,而其抗氧化状态(TAS)、对氧磷酶和芳基酯酶活性则相对较低,进而说明伴发胆脂瘤的慢性中耳炎患者氧化应激反应和抗氧化酶失衡程度更高。后续研究通过对胆脂瘤性和非胆脂瘤性慢性中耳炎患者超氧化物歧化酶、丙二醛及谷胱甘肽过氧化物酶、过氧化氢酶表达水平的测定,也证明了氧化应激和抗氧化酶失衡的情况<sup>[6]</sup>。

## 2.6 增殖标志

胆脂瘤是过度增生的疾病,但它没有表现出转移和遗传不稳定等典型的肿瘤特征。胆脂瘤上皮增殖活性较高,细胞角蛋白(如 CK5/6 和 CK13/16)这种被视为角质形成细胞增殖标志的标记物相比正常上皮有更高的表达,另有 CK1、CK19、Ki-67、EGFR、TGF- $\alpha$ 、增殖细胞核抗原、中性粒细胞明胶酶相关脂钙蛋白(NGAL)、血栓调节蛋白等被发现表达增强<sup>[7]</sup>。CK16 被研究发现在胆脂瘤基质的基底上层表达,认为其是上皮过度增殖的特征,耳道结扎后诱发的胆脂瘤的周围区域 CK13 和 CK16 的表达加重了咽鼓管阻塞继而引起胆脂瘤的发生<sup>[8]</sup>。

## 2.7 相关基因

近期的研究发现胆脂瘤发病也可能与基因的改变有关。研究人员使用微阵列分析技术在胆脂瘤中发现了 EGFR 和 TGF- $\alpha$  与多种肿瘤中 EGFR 及其配体和 TGF- $\alpha$  相似的过度表达和激活,提示

EGFR 基因调控可能与胆脂瘤的增殖有关。

在胆脂瘤中角质细胞的增殖、分化被发现与原癌基因 c-myc 和 c-jun 有莫大的关系<sup>[9]</sup>。还有 SPRRB2、CEACA6、MMPs 及其抑制剂 RECK 等在肿瘤中表达上调的基因也在胆脂瘤中表达增强,此外研究人员也发现部分肿瘤抑制基因如 p27、p53、ID4、PAX3、CDH18、CDH 19、LAMC2 和 TRAF2B 等表达下调<sup>[10]</sup>。

目前有研究发现 p53 在胆脂瘤中相比正常皮肤呈现出高表达,而 p53 基因突变则会产生在多种癌组织中高表达的突变型 p53 蛋白,但研究人员认为 p53 高表达的原因也可能是野生型 p53 增多,从而降低胆脂瘤向恶性肿瘤转化的风险。另有学者研究得出在胆脂瘤上皮中 p53 仅微量表达或不表达的结论,认为其没有影响胆脂瘤上皮的增殖<sup>[11]</sup>。

Klenke 等人发现缝隙连接蛋白  $\beta$ -2(Gap junction protein  $\beta$ -2, GJB2)基因在胆脂瘤组织中的表达水平高于正常的外耳道和耳后皮肤<sup>[7]</sup>。但 James 等人的研究发现仅有 14% 的小儿胆脂瘤患儿出现了 GJB2 基因的变异,认为 GJB2 基因变异与胆脂瘤的严重程度之间没有确切的相关性<sup>[12]</sup>。现有的研究结果对于 GJB2 基因与胆脂瘤发病机制的关系尚存争议。

另外还有研究发现因为具有相对较高的细胞核抗原(PCNA)和 MIB1 表达,小儿胆脂瘤通常比成人胆脂瘤更有侵袭性。相比于正常外耳道皮肤,与炎症密切相关的 SPP1、KRT6B 和 S100A7A 基因在胆脂瘤中有更高度的表达<sup>[7]</sup>。有的研究在胆脂瘤中也发现了 MAPK 信号通路、STAT3 信号通路、PI3K-Akt/PKB 信号通路等一些在部分肿瘤组织中同样异常表达的抗凋亡信号通路,提示调控这些通路的基因可能与胆脂瘤的发病机制相关<sup>[13]</sup>。另有很多研究发现胆脂瘤中 Fas(CD95 受体)蛋白、半胱天冬酶(caspase)、Bcl-2 蛋白等促凋亡蛋白高表达,也有 X 连锁凋亡抑制蛋白(XIAP)、survivin、Livin 等抗凋亡蛋白的高表达,说明凋亡对胆脂瘤的影响是非常复杂的,各种凋亡调控因子的综合作用,使胆脂瘤上皮增生区别于恶性肿瘤的无限增殖<sup>[14]</sup>。

## 2.8 遗传调控

MicroRNA(miRNA)存在于许多生物的基因组中,它可以参与 mRNA 的降解和翻译,进而调控

基因的表达。Friedland 等人于 2009 年首次报道了 miRNA 在成人胆脂瘤增殖和侵袭过程中的潜在作用,他们发现在胆脂瘤中 miRNA-21 的表达水平高于其在正常皮肤中的水平,而且位于其下游的磷酸酶及 PTEN、PDCD4 抑癌基因表达水平降低,据此认为 miRNA-21 增多可能抑制 PTEN 和 PDCD4 的表达,从而对胆脂瘤中角质细胞增殖和迁移起到正向调控的作用<sup>[15]</sup>。Yune 等人使用免疫组化染色及蛋白印迹方法检测胆脂瘤组织及正常皮肤,发现相比正常皮肤而言,胆脂瘤组织中 PTEN 表达水平明显较低,从而验证了 PTEN 可能参与胆脂瘤增殖调控机制的猜想<sup>[13]</sup>。Chen 等学者研究证实,胆脂瘤中 miRNA-21 与 PTEN、PDCD4 的表达呈负相关,在小儿胆脂瘤患者中对比更为突出,提示小儿胆脂瘤的角质细胞增殖更活跃,符合其有更高侵袭性的特点<sup>[16]</sup>。

另外有研究发现 miRNA-802 表达增强抑制了 PTEN 的表达并促进角质细胞增殖<sup>[17]</sup>。角质形成细胞衍生的外泌体中的 miRNA-17 被下调,则可以提高成纤维细胞中核因子  $\kappa$ B 受体活化因子配体 (RANKL) 的表达水平,进而促进破骨细胞的分化影响胆脂瘤的侵袭性<sup>[18]</sup>。

### 3 结论与未来展望

综上所述,胆脂瘤是一种细胞的生长障碍,它由多因素共同参与的复杂病理生理反应所导致,然而其确切的病因、发病机制还没有被研究透彻,可能涉及基因调控、炎症反应、细菌感染等。随着未来分子生物学的发展,有望深入了解并完善现有的机制研究,为胆脂瘤的预防、早期诊断及非手术治疗指明方向。

#### 参考文献

- [1] Kuo, Chin-Lung. Etiopathogenesis of acquired cholesteatoma: prominent theories and recent advances in biomolecular research[J]. *Laryngoscope*, 2015, 125(1):234-240.
- [2] Imai R, Sato T, Iwamoto Y, et al. Osteoclasts Modulate Bone Erosion in Cholesteatoma via RANKL Signaling[J]. *J Assoc Res Otolaryngol*, 2019, 20(5):449-459.
- [3] Rezende CE, Souto RP, Rapoport PB, Campos Ld, Generato MB. Cholesteatoma gene expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors by RT-PCR[J]. *Braz J Otorhinolaryngol*, 2012, 78(3):116-121.
- [4] Korona-Glowniak I, Wisniewska A, Juda M, et al. Malm A. Bacterial aetiology of chronic otitis media with effusion in children - risk factors[J]. *J Otolaryngol Head Neck Surg*, 2020, 49(1):24.
- [5] Laeeq S, Faust R. Modeling the cholesteatoma microenvironment: coculture of HaCaT keratinocytes with WS1 fibroblasts induces MMP-2 activation, invasive phenotype, and proteolysis of the extracellular matrix[J]. *Laryngoscope*, 2007, 117(2):313-318.
- [6] Garça MF, Turan M, Aşar B, et al. The evaluation of oxidative stress in the serum and tissue specimens of patients with chronic otitis media[J]. *Clin Exp Otorhinolaryngol*, 2015, 8(2):97-101.
- [7] Palkó E, Póliska S, Sziklai I, Penyige A. Analysis of KRT1, KRT10, KRT19, TP53 and MMP9 expression in pediatric and adult cholesteatoma[J]. *PLoS ONE*, 2018, 13(7):e0200840.
- [8] Caliman e Gurgel JD, Pereira SB, Alves AL, Ribeiro FQ. Hyperproliferation markers in ear canal epidermis[J]. *Braz J Otorhinolaryngol*, 2010, 76(5):667-671.
- [9] Zang J, Hui L, Yang N, et al. Downregulation of MiR-203a Disinhibits Bmi1 and Promotes Growth and Proliferation of Keratinocytes in Cholesteatoma[J]. *Int J Med Sci*, 2018, 15(5):447-455.
- [10] Maniu A, Harabagiu O, Schrepler MP, et al. Molecular biology of cholesteatoma[J]. *Rom J Morphol Embryol*, 2014, 55(1):7-13.
- [11] Huisman MA, De Heer E, Grote JJ. Cholesteatoma epithelium is characterized by increased expression of Ki-67, p53 and p21, with minimal apoptosis. [J]. *Acta Oto-Laryngologica*, 2003, 123(3):377-382.
- [12] Lin J, Ye Q, Wang Y, et al. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling regulates pathogenesis of human middle ear cholesteatoma[J]. *Intern J Clin Exp Pathol*, 2019, 12(4):1154-1162.
- [13] Gao J, Tang Q, Zhu X, et al. Long noncoding RNAs show differential expression profiles and display ceRNA potential in cholesteatoma pathogenesis[J]. *Oncol Rep*, 2018, 39(5):2091-2100.
- [14] 宋少鹏,李文文,李进兴,等. Bak、Bim 和 Mcl-1 在中耳胆脂瘤中的表达及意义[J]. *听力学及言语疾病杂志*, 2019, 27(3):292-296.
- [15] Sunwoo W, Lee SY, Seong J, et al. Clinical Characteristics of Patients with Cochlear Fistulas Caused by Chronic Otitis Media with Cholesteatoma[J]. *J Int Adv Otol*, 2020, 16(1):40-46.
- [16] Gao J, Tang Q, Xue R, et al. Comprehensive circular RNA expression profiling with associated ceRNA network reveals their therapeutic potential in cholesteatoma[J]. *Oncol Rep*, 2020, 43(4):1234-1244.
- [17] Xie S, Liu X, Pan Z, et al. Microarray Analysis of Differentially-expressed MicroRNAs in Acquired Middle Ear Cholesteatoma[J]. *Int J Med Sci*, 2018, 15(13):1547-1554.
- [18] Gong N, Zhu W, Xu R, et al. Keratinocytes-derived exosomal miRNA regulates osteoclast differentiation in middle ear cholesteatoma[J]. *Biochem biophys Res Commun*, 2020, 525(2):341-347.

## 南方医科大学第七附属医院医学检验科

南方医科大学第七附属医院(南方医科大学南海医院)医学检验科位于广东省佛山市南海区里水镇里官路28号。为“佛山市医学重点专科”、“南海区医学重点专科”及“佛山市健康监测及风险预警工程技术研究中心”。

医学检验科现有场地面积近2200 m<sup>2</sup>(含里水、和顺两个实验室),开展检验项目近500项。实验室配置了先进的全自动生化免疫流水线、全自动血液、凝血、体液分析仪、过敏原检测分析系统、全自动核酸提取仪和实时荧光定量PCR扩增仪等先进设备,近年来新开展多项分子诊断和基因检测项目,实现检验水平智能化和精准化。自2020年6月开展新冠核酸检测,日均检测量近1000例。近三年工作量逐年增长率均大于15%,检验质量不断提升,参加全国卫健委室间质评项目通过率达98.89%;参加佛山市临床检验结果互认技术平台,认证项目数在全市排名前列。科室三~五年建设目标为:完成病理及分子病理诊断、基因遗传诊断、个性化用药诊断、职业病及环境毒物检测、毒品检测等六个特色专科的实验室建设。科室长期规划定位是建设成为集医疗服务、公共卫生与健康管理和、职业病检测三位一体的、省内有特色、国内有影响力的综合性区域检验中心。

科室于2018年引进南方医科大学首席专家王慧君教授担任科主任和学科带头人,引进广东省中医院朝阳人才邱峰博士担任科室副主任。王慧君教授为二级教授,博士生导师,本科毕业于同济医科大学临床医学专业,博士毕业于德国埃森(ESSEN)大学法医学专业。原南方医科大学法医学院院长、南方医科大学司法鉴定中心主任。兼任广东省司法鉴定协会会长,公安部法医病理重点实验室特聘专家,司法部司法鉴定能力验证专家,《法医学杂志》编辑部编委,《Forensic Sciences Research》编委,《Journal of Forensic Science and Medicine》编委等。在病理学、法医学、司法鉴定(毒理及毒化检验、病理检验、DNA分子诊断等)等方面有深厚造诣,在学科建设方面也富有创新精神和管理经验。共主持科研基金24余项,其中国家自然科学基金7项,含重点项目一项。编译著作7部,国内外核心期刊和著名杂志发表科研论著百余篇,SCI论文26篇,包括在国际著名的新英格兰医学杂志发表我国首批高影响因子(IF=34.833)论文。

医学检验科现有专业技术人员35人,含博导1人,硕导1人,博士2人,硕士6人,高级职称10人。科



室医疗、公卫、教学、科研全面发展,近三年主持承担10余项科研项目,发表科研论文30余篇,其中SCI收录8篇;主编专著三部;获国家实用新型发明专利1项;2017年获得佛山市南海区科技进步二等奖。科室多次被评为医院“学科先进科室”、“业务先进科室”、“质量先进科室”和“先进党支部”。

### 杂志简介：

《分子诊断与治疗杂志》于2009年5月创刊，是由中山大学主管，《中国家庭医生》杂志社有限公司主办，中山大学达安基因股份有限公司承办的面向国内外公开发行的分子医学权威性刊物，也是我国第一份以分子诊断与治疗学科为主要内容的分子医学专业学术期刊。本刊以传播分子医学理念、报道分子医学前沿、倡导分子医学创新、促进分子医学进步为办刊宗旨。主要刊登我国医学分子诊断和分子治疗相关领域中的基础理论研究、临床实践和技术方法的最新研究成果以及国内分子医学新技术、新理论和新进展等方面的文章。目前有编委及审稿专家80余人。在编委会和审稿专家及编辑部的共同努力下，于2016年被收录为“中国科技核心期刊”（中国科技论文统计源期刊）。

目前有“述评”、“论著”、“综述”、“前沿进展”、“专家笔谈”、“讲座”、“动态”和“专栏”等栏目。涵盖基因诊断、免疫诊断、核酸分子诊断、蛋白分子诊断、信号分子诊断、分子影像诊断、诊断仪器应用、基因治疗、核酸分子治疗、蛋白分子治疗等内容。

