



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

分子诊断与治疗杂志

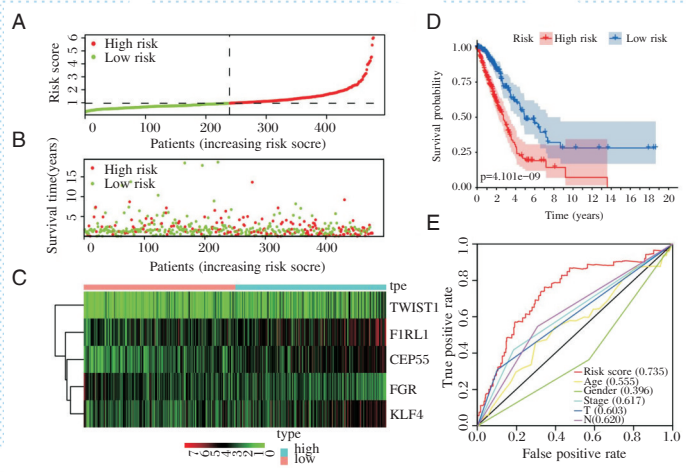
FENZI ZHENDUAN YU ZHILIAO ZAZHI

2021年9月 第13卷 第9期 总第85期

JOURNAL OF

MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Volume 13 Number 9 September 2021



注: A 为红色代表高危患者,绿色代表低危患者; B 为红色代表死亡患者,绿色代表生存患者; C 为热图显示高风险组(蓝色)和低风险组(粉色)建模基因的表达,颜色越红,表达越高; D 为高、低危组患者 K-M 分析; E 为 ROC 曲线分析比较模型与临床病理特征关联。

图(1443) 建模基因分布与模型准确性评估

Figure(1443) Modeling gene distribution and evaluation of model accuracy

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

0 9 >

李一荣



武汉大学中南医院检验科主任、武汉大学第二临床学院医学检验系副主任,免疫学博士、美国“University of Alabama at Birmingham”博士后,主任技师/副教授、博士研究生导师。兼任中国医疗保健国际交流促进会理事、湖北省医学会理事、中华检验医学杂志编委、中华医学会检验分会免疫学组委员、湖北省医学检验分会副主任委员、国家自然科学基金同行评议专家。先后主持国家重大研发计划课题、国家自然科学基金和教育部留学回国人员启动基金等项目。以第一作者或通讯作者在JAMA、Signal Transduction and Targeted Therapy、Molecular Microbiology 和 Emerging Microbes & infections 等杂志发表论文 50 余篇。先后获全国创新争先奖牌、湖北省抗击新冠肺炎疫情先进个人、湖北省科技进步二等奖和湖北省高等学校教学成果二等奖等。

分子诊断与治疗杂志

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

月刊 2021年9月 第13卷 第9期 总第85期 Monthly Volume 13 Number 9 October 2021

主管	中山大学
主办	《中国家庭医生》杂志社有限公司
承办	广州达安基因股份有限公司
总编辑	张翼鹏
顾问	申子瑜
主编	李明
编辑部主任	蒋析文
编辑部副主任	刘悦
编辑部	《分子诊断与治疗杂志》编辑部
编辑	李晓兰 李彩珍 莫源浩
出版	《中国家庭医生》杂志社有限公司
地址	广州市天河区天河北路179号祥龙大厦11楼(510620)
电话	(020) 32290789-206, 32290789-201
电子邮箱	jmdt@vip.163.com
刊号	ISSN 1674-6929 CN 44-1656/R
邮发代号	46-283
发行单位	广东省报刊发行局
发行范围	国内外公开发售
广告发布登记通知书	440100190057
印刷	天意有福科技股份有限公司
出版日期	2021年9月18日
定价	RMB 15.00元
Responsible Institution	<i>Sun Yat-sen University</i>
Sponsor	<i>China Family Doctors Magazine Publisher Co., Ltd.</i>
Organizer	<i>Daan Gene Co., Ltd.</i>
Editor in Chief	<i>ZHANG Yipeng</i>
Consultant	<i>SHEN Ziyu</i>
Editor in Chief	<i>LI Ming</i>
Managing Director	<i>JIANG Xiwen</i>
Associate Editor	<i>LIU Yue</i>
Editorial Office	<i><JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY> Editorial Office</i>
Editors	<i>LI Xiaolan LI Caizhen MO Yuanhao</i>
Editing	<i>China Family Doctors Magazine Publisher Co., Ltd.</i>
Add	<i>11 Fl., Xianglong Building, 179# Tian he bei Lu, Guangzhou, China 510620</i>
Tel	<i>(020) 32290789-206, 32290789-201</i>
E-mail	<i>jmdt@vip.163.com</i>
CSSN	<i>ISSN 1674-6929 CN 44-1656/R</i>
Printing	<i>TianYi Yofus Technology Co., Ltd.</i>
Publish Date	<i>2021.9.18</i>
Price	<i>RMB 15.00</i>



扫码订阅《分子诊断与治疗杂志》

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



中国科技核心期刊

(中国科技论文统计源期刊)

收录证书

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

分子诊断与治疗杂志

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

特颁发此证书。

中国科学技术信息研究所

Institute of Scientific and Technical Information of China

北京复兴路 15 号 100038

www.istic.ac.cn

2020年12月

证书编号: 2019-G556-0386
有效期至: 2021年12月



分子诊断与治疗杂志

月刊 2021年9月 第13卷 第9期

目次

述评

肿瘤坏死因子 α 在恶性肿瘤诊疗中的研究进展 黄奔 范维 王萍 等(1377)

论著

- 炎症性肠病患者艰难梭菌感染的流行情况及危险因素研究
..... 伍众文 刘平娟 郭鹏豪 等(1381)
- 丹参酮 II A 对 CVB3 感染的小鼠原代心肌细胞氧化损伤及凋亡的影响及其机制研究
..... 肖文涛 张静 郭素萍 等(1385)
- 血浆循环肿瘤 DNA 基因突变检测国家参考品的应用评价 孙楠 于婷 孙晶 等(1390)
- 结肠镜检查联合血清 CEA、TuM2-PK 检测对结肠癌的诊断价值 王计 吴小微 晏妮(1394)
- ChE、hs-CRP、PCT 与老年维持性透析 IPS 分值关系及联合诊断导管相关感染价值
..... 张世同 束永兵 方美双 等(1398)
- GOLPH3 在肺癌组织中的表达及其对肺癌细胞侵袭和迁移的影响
..... 王智园 杨曼 刘士岳 等(1402)
- IL-6、PCT 水平对髋关节置换术后感染的早期预测 王丽冰 左立新 刘永刚 等(1406)
- PGRN/Alb、sTREM-1、LBP 指标诊断肝硬化细菌性腹膜炎价值及对疗效影响
..... 公建庄 杜晨旭 吴慧丽(1410)
- ETUS 与曲美他嗪联用对心绞痛血流速度及 Toll 样受体 4 的影响 崔耀刚 吕小宁 庞然(1414)
- 两种检测策略在细胞库病原体污染的检出分析 曾劲峰 梅秋红 张耿 等(1419)
- CGRP、IGF-1、Bcl-2 蛋白在急性脑梗死病情评估与预后预测中的价值
..... 张家森 赵玉 李鹏涛(1423)
- Lp(a)、OPN、NLR 与冠心病患者并发狭窄性瓣膜病相关性 张航 许华山 刘超(1427)
- NT-proBNP、CRP/Alb 与高龄髋部骨折病情程度关系及对预后的影响
..... 章宇翔 程翰林 汪群力 等(1431)
- AFP、CYFRA21-1、NSE 及 CT 征象在孤立性肺结节性质中鉴别价值
..... 何桃 刘英 宋清泉 等(1435)
- 基于 5 个 PI3K 通路相关基因构建肺腺癌预后预测模型 于丽华 王宏 秦丽 等(1440)
- PA、ChE、GGT 联合诊断肺结核合并 HBV 感染患者药物性肝损伤的价值
..... 吴秋萍 吴海丰 黄远江 等(1445)
- sIL-2R、TIMP-1、IL-4 在 POAG 中的表达及与视神经损伤的相关性
..... 林相强 纪新丽 王明明 等(1449)
- 外周血 miR-183、miR-27b-3p 联合智能染色胃镜早期诊断胃癌的价值
..... 郭佳念 徐扬志 谢婷婷 等(1453)
- 三种抗体联合 C 肽检测诊断糖尿病分型与评估病情的应用价值
..... 吕磊 何亚琼 王玲玲 等(1457)

CD64、P2X7和cMPO检测在小儿细菌性肺炎诊断及预后中的研究	徐超 李超 蒋勇(1461)
超体重孕妇胎儿心脏检查方法对心脏结构、心肌、应变指标及Tei指数研究	王建春 张东芳 卢钺 等(1465)
甘草甜素通过调控COX-2/NF-κB通路治疗牙周炎的研究	张娜 侯鑫 张文 等(1469)
LMR、MCL1、DKK1与多发性骨髓瘤患者骨损伤及预后相关性	朱太岗 李月红 张飞虎 等(1473)
FSH-PI3K/AKT/NF-κB蛋白在上皮性卵巢癌组织中的表达及作用机制	路晓琳(1477)
MAIT细胞及其分泌因子表达与肺结核病情严重程度的关系	李福利 刘捷凌 冷霞 等(1482)
仰卧位手法牵引对神经根型颈椎病患者血清炎症因子的影响	马军廷 张振国 袁燕 等(1486)
肩袖损伤患者TNF-α、IL-1β及IL-10表达及与肩部疼痛的相关性	李美慧 依斯哈尔巴拉提 卢爽(1490)
口腔菌群及血炎症因子、T细胞亚群水平在复发性口腔溃疡患者病情中变化及意义	徐剑波 王丹丹 彭旭霖 等(1494)
二甲双胍联合miR-145对胃癌BGC823细胞增殖凋亡及AKT信号通路的影响	田春阳 刘晓政 范军朝(1498)
miRNA-10a、GATA6在肝细胞癌组织中的表达及意义	余袁媛 曾新桃(1503)
HbA1c、MALb联合Cys-C检测在糖尿病肾病诊断、病情评估中的应用	陈道强 吴玲 龚源(1507)
CXCR4、RGS4及RAGE在小儿肾母细胞瘤中的表达及临床意义	胡传兵 韩暖 于宝华 等(1511)
PUMA、IQGAP1在胰腺癌中的表达及与临床病理、预后生存的相关性	胡怀远 夏燕 雍翔 等(1515)
短暂性脑缺血发作患者ABCD2评分与外泌体miR-450b-5p水平的关系	钱腊燕 武晓芳 刘彦龙 等(1520)
TGR、LGR5联合RRM1检测在非小细胞肺癌疾病进展中的评估作用	李琪 王继灵 曹荣娟 等(1524)
NGAL、KIM-1、Th17细胞检测对脓毒症AKI患者预后的评估	杨火保 刘进生 郑彩霞(1529)
血清PG I、PG II水平结合EUS术前诊断胃癌分期的价值	亢晓春 陈美玲 王亚楠 等(1533)
miR-10b、LMP1和Twist1联合检测在鼻咽癌早期诊断及复发诊断中的应用	魏晓 陈鹏 张艳(1537)
不同T分期肺癌患者血清Th1/Th2平衡及MMP-9、TIMP-1水平变化分析	古晓娟 张映华 唐欢(1541)
心肌酶、电解质在小儿轮状病毒腹泻治疗及预后评估中的价值	王宗燕 韩军民 邢晗 等(1545)
NVG患者血清及房水中ET-1、MMP、TIMP-2水平变化及其临床意义	冯坤 王文 彭一(1549)

综 述

体外诊断试剂临床核查常见问题分析	金菁 徐维锋 何本霞 等(1553)
------------------------	--------------------

专家风采

李一荣	(封二)
-----------	------

实验室巡礼

武汉大学中南医院检验科	(封三)
-------------------	------

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Monthly Volume 13 Number 9 September 2021

CONTENTS

COMMENTS

- Research Progress of Tumor Necrosis Factor Alpha in Diagnosis and Treatment of Malignant Tumors
HUANG Ben, FAN Wei, WANG Ping, LIU Jiacui, DUAN Yiping, CHEN Liangyue, MA Tiantian, YU Mingxia (1377)

ORIGINAL ARTICLES

- Prevalence and risk factors of *Clostridium difficile* infection in patients with inflammatory bowel disease
WU Zhongwen, LIU Pingjuan, GUO Penghao, CHEN Yili, LIAO Kang, HUANG Bin (1381)
- Effects of Tanshinone II A on Oxidative Damage and Apoptosis of Primary Cardiomyocytes Infected by CVB3 in Mice and Its Mechanism
XIAO Wentao, ZHANG Jing, GUO Suping, HU Zhenjie, LI Jiang, GAO Chuanyu (1385)
- Evaluation of the Application of National Reference Materials for Detection of Plasma Circulating Tumor DNA Gene Mutations
SUN Nan, YU Ting, SUN Jing, JIA Zheng, QU Shoufang, HUANG Jie (1390)
- The value of colonoscopy combined with serum CEA and TuM2-PK in the diagnosis of colon cancer
WANG Ji, WU Xiaowei, YAN Ni (1394)
- The relationship between ChE, hs-CRP, PCT and the IPS score of elderly maintenance dialysis and the value of combined diagnosis of catheter-related infections
ZHANG Shitong, SHU Yongbing, FANG Meishuang, XUAN Wen (1398)
- Expression of GOLPH3 in lung cancer and its effect on the invasion and metastasis of lung cancer cells
WANG Zhiyuan, YANG Man, LIU Shiyue, SU Guomiao, LEI Zi (1402)
- The level of IL-6, IL-10 and PCT in the early prediction of infection after hip replacement
WANG Libing, ZUO Lixin, LIU Yonggang, XING Jingwei, CHEN Chao, ZHANG Sen (1406)
- The value of PGRN/Alb, sTREM-1 and LBP in the diagnosis of spontaneous bacterial peritonitis in liver cirrhosis and their influence on the therapeutic effect
GONG Jianzhuang, DU Chenxu, WU Huili (1410)
- Effects of ETUS combined with trimetazidine on blood flow velocity and Toll-like receptor 4 in angina pectoris
CUI Yaogang, LV Xiaoning, PANG Ran (1414)
- Analysis of two detection strategies in the detection of pathogen contamination in cell bank
ZENG Jinfeng, MEI Qihong, ZHANG Geng, WU Linfeng, LI Ran, XU Xiaoxuan, ZHAO Yu, XIONG Wen, LIU Mu Yun, WANG Lilin (1419)
- The value of CGRP, IGF-1 and Bcl-2 proteins in the evaluation of acute cerebral infarction and the prediction of prognosis
ZHANG Jiasen, ZHAO Yu, LI Pengtao (1423)
- Correlation of Lp(a), OPN, NLR and coronary heart disease patients with stenotic valvular disease
ZHANG Hang, XU Huashan, LIU Chao (1427)
- The relationship between NT-proBNP, CRP/Alb and the severity of hip fracture in elderly patients and their influence on prognosis
ZHANG Yuxiang, CHENG Hanlin, WANG Qunli, FANG Bing, YU Honglin, HUANG Shunshui, YE Hongwei, WANG Rihai, REN Wei (1431)
- The value of AFP, CYFRA21-1, NSE and CT signs in distinguishing the nature of solitary pulmonary nodules
HE Tao, LIU Ying, SONG Qingquan, FENG Wenhong, GUAN Ying (1435)
- Construction prognosis model for lung adenocarcinoma based on 5 PI3K pathway related genes
YU Lihua, WANG Hong, QIN Li, WANG Weina, CUI Dongyan, ZHAO Shuping (1440)
- The value of PA, Che and GGT in the diagnosis of drug-induced liver injury in patients with tuberculosis and HBV infection
WU Qiuping, WU Haifeng, HUANG Yuanjiang, ZHOU Guizhong (1445)
- The expression of sIL-2R, TIMP-1 and IL-4 in patients with POAG and their correlation with optic nerve injury
LIN Xiangqiang, JI Xinli, WANG Mingming, SUN Yafei (1449)
- The value of peripheral blood miR-183 and miR-27b-3p combined with intelligent staining gastroscopie in the early diagnosis of gastric cancer
GUO Jiannian, XU Yangzhi, XIE Tingting, JIA Lin (1453)

Diagnostic value of three antibodies combined with C peptide indiagnosis and classification of diabetes mellitus <i>LV Lei, HE Yaqiong, WANG Lingling, CHEN Qiaoyan, ZHOU Tingdong</i>	(1457)
Study on the detection of CD64, P2X7 and cMPO in the diagnosis and prognosis of bacterial pneumonia in children <i>XU Chao, LI Chao, JIANG Yong</i>	(1461)
Study on Heart Structure, Myocardium, Strain Index and Tei Index by Examination Method of Fetal Heart of Overweight Pregnant <i>WANG Jianchun, ZHANG Dongfang, LU Yue, ZHUANG Jie, ZHAO Ruifeng, GUO Lina, YANG Sufen</i>	(1465)
Glycyrrhizin plays a role in the treatment of periodontitis by regulating the COX-2/NF- κ B signaling pathway <i>ZHANG Na, HOU Xin, ZHANG Wen, SHI Bohong</i>	(1469)
Correlation of LMR, MCL1, DKK1 with bone injury and prognosis in patients with multiple myeloma <i>ZHU Taigang, LI Yuehong, ZHANG Feihu, DONG Manyu, DU Xiaolei</i>	(1473)
FSH-PI3K/AKT/NF- κ Expression and mechanism of B protein in epithelial ovarian cancer <i>LU Xiaolin</i>	(1477)
The relationship between MAIT cells, their excreted factors and the severity of tuberculosis <i>LI Fuli, LIU Jiuling, LENG Xia, SUN Xiaoke, RUAN Xiangli</i>	(1482)
Effect of supine manipulation traction on serum inflammatory cytokines in patients with cervical spondylotic radiculopathy <i>MA Junting, ZHANG Zhenguo, YUAN Yan, JI Shenghui</i>	(1486)
Expression of TNF- α , IL-1 β and IL-10 in patients with rotator cuff injury and their correlation with shoulder pain <i>LI Meihui, ISHAR Balati, LU Shuang</i>	(1490)
Changes and significance of oral flora, serum inflammatory factors, and T cell subgroup levels in patients with recurrent oral ulcers <i>XU Jianbo, WANG Dandan, PENG Xulin, SONG Feixiang, WANG Chundi</i>	(1494)
Effects of metformin combined with miR-145 on proliferation, apoptosis and AKT signaling pathway in gastric cancer BGC823 cells <i>TIAN Chunyang, LIU Xiaozheng, FAN Junchao</i>	(1498)
Expression and significance of miRNA-10a and GATA6 in hepatocellular carcinoma tissues <i>YU Yuanyuan, ZENG Xintao</i>	(1503)
Application of HbA1c and MA1b combined with Cys-C detection in the diagnosis and evaluation of diabetic kidney disease <i>CHEN Daoqiang, WU Ling, GONG Yuan</i>	(1507)
The expression and clinical significance of CXCR4, RGS4 and RAGE in patients with pediatric nephroblastoma <i>HU Chuanbing, HAN Nuan, YU Baohua, TIAN Junyan, SUN Jinsong</i>	(1511)
Expression of PUMA and IQGAP1 in pancreatic cancer and their correlation with clinicopathology and prognostic survival <i>HU Huaiyuan, XIA Yan, YONG Xiang, ZOU Ping, LIU Yan</i>	(1515)
Relationship between ABCD2 score and exosomal miR-450b-5p level in patients with transient ischemic attack <i>QIAN Layan, WU Xiaofang, LIU Yanlong, FAN Qi, MA Long</i>	(1520)
Evaluation of TGR and LGR5 combined with RRM1 detection in the progression of non-small cell lung cancer <i>LI Qi, WANG Jiling, CAO Rongjuan, LIU Xiuzhen, MENG Xiangyun</i>	(1524)
Evaluation of NGAL, KIM-1 combined with peripheral blood Th17 cell detection on the prognosis of patients with sepsis and AKI <i>YANG Huobao, LIU Jinsheng, ZHENG Caifa</i>	(1529)
The value of serum PG I and PG II levels combined with EUS in the preoperative diagnosis of gastric cancer staging <i>KANG Xiaochun, CHEN Meiling, WANG Yanan, ZHANG Dezhong</i>	(1533)
Application of combined detection of miR-10b, LMP1 and Twist1 in the early diagnosis and recurrence diagnosis of nasopharyngeal carcinom <i>WEI Xiao, CHEN Peng, ZHANG Yan</i>	(1537)
Analysis of serum Th1/Th2 balance and changes of MMP-9 and TIMP-1 levels in patients with different T stages of lung cancer <i>GU Xiaojuan, ZHANG Yinghua, TANG Huan</i>	(1541)
The value of myocardial enzymes and electrolytes in the treatment and prognostic evaluation of rotavirus diarrhea in children <i>WANG Zongyan, HAN Junmin, XING Han, XU Chunqi</i>	(1545)
Changes of ET-1, MMP and TIMP-2 levels in serum and aqueous humor of NVG patients and their clinical significance <i>FENG Kun, WANG Wen, PENG Yi</i>	(1549)

REVIEWS

The discussion of common defects in on-site verification of in-vitro diagnostic reagent (IVD) clinical trials <i>JIN Jing, XU Weifeng, HE Benxia, WANG Song, CHEN Yan, ZHANG Guangxun, LIU Yan'an, ZHANG Anping</i>	(1553)
--	--------

肿瘤坏死因子 α 在恶性肿瘤诊疗中的研究进展

黄奔¹ 范维² 王萍² 柳家翠¹ 段怡平¹ 陈梁玥¹ 马甜甜¹ 喻明霞^{1*}

[摘要] 肿瘤坏死因子 α (TNF α)广泛表达于多种恶性肿瘤组织中,并与患者的恶性临床特征相关。作为一种重要的炎性因子,TNF α 的作用与肿瘤发生发展的所有步骤有关,包括细胞转化、存活、增殖、侵袭和转移。TNF α 可作为恶性肿瘤诊疗的分子标志物。本文综述近5年来TNF α 在恶性肿瘤中的作用机制和相关信号通路的研究,并阐述其在恶性肿瘤诊疗上的应用。

[关键词] TNF α ; 肿瘤; 机制; 分子标志物

Research Progress of Tumor Necrosis Factor Alpha in Diagnosis and Treatment of Malignant Tumors

HUANG Ben¹, FAN Wei², WANG Ping², LIU Jiacyi¹, DUAN Yiping¹, CHEN Liangyue¹, MA Tiantian¹, YU Mingxia^{1*}

(1. Department of Laboratory Medicine, Zhongnan Hospital, Wuhan University, Wuhan, Hubei, China, 430071; 2. Department of Pathology, Zhongnan Hospital, Wuhan University, Wuhan, Hubei, China, 430071)

[ABSTRACT] Tumor Necrosis Factor α (TNF α) is expressed in a variety of malignant tumor tissues and is related to the malignant clinical characteristics of patients. As an important inflammatory factor, the role of TNF α is related to all steps of tumorigenesis, including cell transformation, survival, proliferation, invasion and metastasis. TNF α can be used as a molecular marker for the diagnosis and treatment of malignant tumors. This article reviews the research on the mechanism and related signal pathways of TNF α in malignant tumors in the past five years, and it's the application in the diagnosis and treatment of malignant tumors.

[KEY WORDS] TNF α ; Tumor; Mechanism; Molecular marker

1 TNF α 简介

肿瘤坏死因子(Tumor Necrosis Factor, TNF)是一种炎性细胞因子,可以协同调节其他细胞因子的产生、细胞存活和死亡来协调组织的稳态^[1]。最初,TNF因其可以在人和小鼠体内诱导肿瘤快速出血性坏死的能力而被命名。TNF α (Tumor Necrosis Factor α)由活化的巨噬细胞和其他类型的细胞如CD4⁺T细胞、中性粒细胞、肥大细胞等释

放产生,能够诱导炎症反应和细胞凋亡。TNF存在两种生物活性形式:跨膜形(tmTNF α)和分泌形(sTNF α)。sTNF α 是由tmTNF α 经过基质金属蛋白酶TACE的蛋白水解,去除氨基端76个氨基酸残基后形成。研究指出,TNF α 也可以由肿瘤相关微环境中的恶性细胞和免疫细胞产生,其作为内源性肿瘤启动子,通过产生炎症生态环境来促进恶性疾病的进展^[2]。因此,TNF α 与肿瘤的发生发展存在重要的联系。

基金项目:国家自然科学基金(81472033);湖北省医学青年后备人才(青年拔尖人才)(HB20200409);湖北省卫生和计划生育委员会联合基金项目(WJ2018H0028);湖北省卫生健康科研基金资助(WJ2019M203);武汉市应用基础研究(2017060201010171);武汉大学医学部教学研究项目(2020048);武汉大学中南医院科技创新培育基金(No.cxy2019051、cxy2018031);武汉大学大学生创新项目(MS2017045、S2018301747)

作者单位:1. 武汉大学中南医院检验科,湖北,武汉 430071

2. 武汉大学中南医院病理科,湖北,武汉 430071

*通信作者:喻明霞, E-mail: dewrosy520@163.com

2 TNF α 与恶性肿瘤

2.1 TNF α 与肺癌

TNF α 在肺癌患者血清中的表达水平显著升高,可辅助评估患者的疼痛度及预后^[3-4]。肺癌患者术后若发生肺部感染,患者血清TNF α 水平均明显上升^[5]。研究发现,TNF α 体外作用于小细胞肺癌细胞,可使得细胞集落形成能力、迁移和侵袭能力均显著升高^[6]。机制上,TNF α 通过激活核因子 κ B(nuclear factor kappa-B, NF- κ B)途径来诱发明显的炎症反应,促进细胞存活、血管生成和侵袭。许多肿瘤细胞对TNF α 治疗产生抵抗,这主要是由于NF- κ B信号途径的激活。Zhu^[7]等人的实验发现,对顺铂耐药和耐辐射的肺癌细胞系中NF- κ B和TNF α 表达上调最为显著,这两个关键分子可以作为肺癌治疗的标志物。因此,抑制TNF α 诱导的NF- κ B信号激活可以作为肺癌治疗的策略之一。陈^[8]等人发现,黄芪甙可以抑制TNF α 诱导的NF- κ B信号,使得A549细胞对TNF α 的治疗敏感而发生凋亡。另一方面,TNF α 瘤内注射联合化疗,可以提高晚期非小细胞肺癌的疗效^[9]。

2.2 TNF α 与胃癌

与健康组相比,TNF α 在胃炎组和幽门螺杆菌感染的人群中表达上调,在幽门螺杆菌感染的慢性胃炎进展至癌前病变,再到胃癌的过程中,TNF α 表达逐渐增加^[10]。在胃癌组织中,浸润的巨噬细胞可以通过释放TNF α 和IL-6,激活NF- κ B和STAT3信号调节程序性死亡受体-配体1(Programmed cell death-Ligand 1, PD-L1)的表达,帮助肿瘤细胞发生免疫逃逸^[11]。在探索胃癌的治疗方面,研究者们发现抑制TNF α 诱导的NF- κ B信号,也可以抑制肿瘤的生长和转移^[12-13]。多种与TNF α 融合的血管靶向药物已被证明可改善药物在肿瘤组织中的吸收率并增强肿瘤血管功能。在小鼠原位胃癌模型中,Lu^[14]等人评估肿瘤血管归巢肽(TCP-1)靶向递送TNF α 与5-Fu的抗癌作用,结果发现TCP-1/TNF α 联合5-Fu具有协同抑制肿瘤生长、诱导细胞凋亡和减少细胞增殖的作用,且无明显毒性。这些研究都表明了TNF α 在胃癌治疗方面有着一定的潜力。

2.3 TNF α 与乳腺癌

TNF α 表达水平与乳腺癌淋巴结转移及ER、HER2抗原表达相关^[15]。在绝经前的女性中,血清TNF α 水平可以显著增加患乳腺癌的风险^[16]。

蛋白酪氨酸磷酸酶受体A(PTPRA)是经典的蛋白酪氨酸磷酸酶之一,对于乳腺癌的发生和转移至关重要。研究指出,PTPRA可以通过TNF α 介导的NF- κ B途径促进乳腺癌细胞生长和迁移^[17]。TNF α /Arf6、TNF α -YAP / p65-HK2轴在乳腺癌细胞的转移中起到了重要的作用^[18-19]。体外给予TNF α 刺激可诱导粘蛋白4(MUC4)表达,使得HER2阳性的乳腺癌细胞系对曲妥珠单抗耐药^[20]。Yu^[21]等人的实验指出,TNF α 活化的骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSC)可显著促进肿瘤的生长与转移,机制分析表明,TNF α 活化的MSC细胞中,CCL5,CCR2和CXCR2配体表达均增加,而CCL5和CCR2配体是促进肿瘤转移必不可少的支持因素。在探究治疗方面,Wu^[22]等人的研究指出,TNF α 诱导治疗可以显著降低G0/G1期细胞比例,增加S期和G2/M期的细胞比例,使得乳腺癌细胞对化疗和放疗敏感。另外,苏林酸可以通过抑制NF- κ B信号激活,显著增强了TNF α 诱导的乳腺癌细胞凋亡^[23]。

2.4 TNF α 与结直肠癌

TNF α 在结直肠癌患者的血清中显著升高,与患者的TNM分级、淋巴结转移以及手术后发生肠梗阻相关^[24-25]。研究显示,TNF α 可促进结肠癌细胞中 β -catenin、c-myc及cyclinD1蛋白的表达,通过Wnt/ β -catenin信号通路促进结肠癌细胞的增殖^[26]。使用TNF α 处理可以增加SW620^{Le^{rs}+}结肠癌干细胞中AKT和GSK-3 β 的磷酸化水平,激活PI3K/AKT信号通路促进细胞增殖^[27]。MAPK激活蛋白激酶2(MK2)通路也是结直肠癌炎症的主要介质,MK2信号促进了炎性细胞因子IL-1 β ,IL-6和TNF α 的产生,参与了肿瘤的生长、侵袭和转移。使用MK2抑制剂治疗肿瘤,会减少产生80%的IL-1 β ,IL-6和TNF α ,可以减少肿瘤侵袭,消除小鼠肿瘤的发生发展^[28]。此外,TCP-1肽靶向传递TNF α 具有更强的抗肿瘤活性,可以诱导更多的细胞凋亡,破坏原位大肠肿瘤的新生血管,有望成为靶向治疗结直肠癌的策略^[29]。

2.5 TNF α 与肝细胞癌

TNF α 水平在原发性肝癌患者的血清中显著升高,联合AFP、AFP-L3检测可以获得较高的诊断效能^[30]。在肝癌细胞中,TNF α 和IFN- γ 可以协同诱导PD-1的表达促进肿瘤的生长,其作用机制是TNF α 通过上调IFN- γ 受体的表达从而增强了IFN- γ

信号,导致肿瘤细胞适应性免疫抵抗^[31]。而PD-L1则可将TNF α 诱导的癌细胞凋亡转换为细胞焦亡,致使肿瘤细胞发生坏死,这是由于在缺氧条件下,p-Stat3与PD-L1发生物理相互作用并促进其核易位,从而增强了Gasdermin C(GSDMC)基因的转录,经TNF α 处理后,GSDMC被caspase-8特异切割,产生了GSDMC N-末端结构域,该结构域在细胞膜上成孔引起细胞焦亡^[32]。Huang^[33]等人使用TNF α 刺激肝癌HepG2细胞后检测细胞蛋白差异表达分析发现,热休克蛋白70和TNF α 的上调与促进细胞迁移、抑制细胞凋亡有关。在探索治疗方面,TNF α 可作为索拉非尼敏感性的新预测指标,索拉非尼联合乌司他丁可改善高表达TNF α 肝癌患者的治疗效果^[34]。

2.6 TNF α 与白血病

急性白血病患者血清中TNF α 水平明显升高,与临床疗效有明显的相关性^[35]。TNF α 可以作为白血病患者化疗期间口腔念珠菌病和粘膜炎发病的标志^[36]。Zhou^[37]等人的研究发现,使用靶向tmTNF α 的抗体可以通过抗体依赖性细胞介导和补体依赖性细胞毒作用杀伤白血病细胞,同时不损伤正常造血细胞,提示TNF α 抗体在治疗白血病中有着一定的潜力。Tamai^[38]等人通过实验证明,Amleranox(氨来占诺)可以下调S100A6的表达,从而使得KMT2A/AFF1阳性急性淋巴细胞白血病对TNF α 治疗的敏感性。抑制环氧化酶-2(COX-2)能促进急性髓系白血病OCI-AML2细胞凋亡,使细胞周期阻滞于G1期,其机制可能是通过上调p53,下调TNF- α 表达实现的^[39]。因此,TNF α 可能是白血病治疗的有效靶点。

2.7 TNF α 与其他肿瘤

TNF α 在其他多种肿瘤中也发挥了重要的作用。Scheff^[40]等人在口腔癌细胞上清液和致癌小鼠舌组织中检测到了高浓度TNF α ,并发现抑制TNF α 信号破坏T细胞浸润,可消除功能性痛觉异常。TNF α 可以显著刺激胰腺癌的生长和迁移^[41]。腹膜是卵巢癌最常见的转移部位,Lau^[42]等人的研究发现,TNF α -TGF α -EGFR途径在这个过程中发挥了重要的作用。

3 小结与展望

作为一种重要的炎性因子,TNF α 高表达与患者的恶性临床特征有关,致使患者不良预后。机制上,TNF α 可以协同调节其他细胞因子,通过参与了肿瘤的发生发展。一方面,TNF α 可以诱导杀

伤肿瘤细胞。使用药物载体将TNF α 运输到肿瘤部位或者TNF α 注射到荷瘤动物模型体内发现其可以诱导肿瘤细胞凋亡;另一方面,TNF α 通过激活NF- κ B、ERK、MAPK、PI3K/AKT等信号途径增强肿瘤细胞的生存和侵袭能力,抑制TNF α 诱导的癌信号可以作为治疗肿瘤的策略之一。综上所述,TNF α 在肿瘤的发生发展中起到了重要的作用,有望成为辅助诊断、治疗和预后的分子标志物。

参考文献

- [1] Webster JD, Vucic D. The Balance of TNF Mediated Pathways Regulates Inflammatory Cell Death Signaling in Healthy and Diseased Tissues[J]. Front Cell Dev Biol, 2020, 8:365.
- [2] Atrekhany KN, Gogoleva VS, Drutskaya MS, et al. Distinct modes of TNF signaling through its two receptors in health and disease[J]. J Leukoc Biol, 2020, 107(6):893-905.
- [3] 郑玲,葛晓燕,黄少军,等.肺癌并发肺部感染PA与癌胚抗原和TNF- α 的表达及临床意义[J].中华医院感染学杂志, 2021, 31(03):360-364.
- [4] 武小岗,李娜,曹丽,等.血清肿瘤坏死因子 α 水平与肺癌患者疼痛程度的相关性研究[J].现代生物医学进展, 2019, 19(16):3172-3174+3200.
- [5] 王昌敏,陈程,庞秀慧.肺癌术后肺部感染患者血清CRP、TNF- α 、IL-2水平变化及临床意义[J].癌症进展, 2019, 17(19):2296-2298+2301.
- [6] 杨洁,郑凤龙,任喜尚.葛根素对人类炎性因子肿瘤坏死因子- α 诱导的小细胞肺癌细胞迁移和侵袭促进作用的影响及机制[J].中国老年学杂志, 2020, 40(3):616-620.
- [7] Zhu R, Xue X, Shen M, et al. NF κ B and TNF α as individual key molecules associated with the cisplatin-resistance and radioresistance of lung cancer[J]. Exp Cell Res, 2019, 374(1):181-188.
- [8] Chen M, Cai F, Zha D, et al. Astragaloside-induced cell death is caspase-dependent and enhances the susceptibility of lung cancer cells to tumor necrosis factor by inhibiting the NF- κ B, MyD88, and TRAF6 pathway[J]. Oncotarget, 2017, 8(16):26941-26958.
- [9] 仇海乐,戎冬文,贾军梅.肿瘤坏死因子- α 瘤内注射联合化疗治疗晚期非小细胞肺癌疗效观察[J].肿瘤基础与临床, 2020, 33(5):404-406.
- [10] 郑轶,刘颜敏,陈志涛,等.幽门螺杆菌感染的胃癌和癌前病变组织中肿瘤坏死因子- α 的表达及临床意义[J].临床内科杂志, 2020, 37(10):718-720.
- [11] Ju X, Zhang H, Zhou Z, et al. Tumor-associated macrophages induce PD-L1 expression in gastric cancer cells through IL-6 and TNF- α signaling[J]. Exp Cell Res, 2020, 15(2):112315.
- [12] Li J, Tong G, Huang C, et al. HOXC10 promotes cell migration, invasion, and tumor growth in gastric carcinoma cells through upregulating proinflammatory cytokines[J]. J Cell Physiol, 2020, 235(4):3579-3591.

- [13] Chen P, Guo H, Wu X, et al. Epigenetic silencing of miRNA-204 by *Helicobacter pylori* augments the NF- κ B signaling pathway in gastric cancer development and progression [J]. *Carcinogenesis*, 2020, 41(4):430-441.
- [14] Lu L, Li ZJ, Li LF, et al. A novel vascular-targeting peptide for gastric cancer delivers low-dose TNF α to normalize the blood vessels and improve the anti-cancer efficiency of 5-fluorouracil [J]. *Peptides*, 2017, 97:54-63.
- [15] Ma Y, Ren Y, Dai ZJ, et al. IL-6, IL-8 and TNF-alpha levels correlate with disease stage in breast cancer patients [J]. *Adv Clin Exp Med*, 2017, 26(3):421-426.
- [16] Agnoli C, Grioni S, Pala V, et al. Biomarkers of inflammation and breast cancer risk: a case-control study nested in the EPIC-Varese cohort [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):12708.
- [17] Lin C, Xin S, Huang X, et al. PTPRA facilitates cancer growth and migration via the TNF- α -mediated PTPRA-NF- κ B pathway in MCF-7 breast cancer cells [J]. *Oncol Lett*. 2020, 20(5):131.
- [18] 徐瑞, 邱彤璐, 梅杰, 等. 肿瘤坏死因子- α 促进乳腺癌转移的分子机制研究 [J]. *中华细胞与干细胞杂志(电子版)*, 2020, 10(1):20-25.
- [19] Gao Y, Yang Y, Yuan F, et al. TNF α -YAP/p65-HK2 axis mediates breast cancer cell migration [J]. *Oncogenesis*, 2017, 6(9):e383.
- [20] Mercogliano MF, De Martino M, Venturutti L, et al. TNF α -Induced Mucin 4 Expression Elicits Trastuzumab Resistance in HER2-Positive Breast Cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(3):636-648.
- [21] Yu PF, Huang Y, Han YY, et al. TNF α -activated mesenchymal stromal cells promote breast cancer metastasis by recruiting CXCR2 (+) neutrophils [J]. *Oncogene*, 2017, 36(4):482-490.
- [22] Wu X, Wu MY, Jiang M, et al. TNF-alpha sensitizes chemotherapy and radiotherapy against breast cancer cells [J]. *Cancer Cell Int*, 2017, 17:13.
- [23] 孙益青, 黄维娜, 邵霞, 等. 苏林酸在肿瘤坏死因子- α 诱导乳腺癌细胞凋亡中的增敏作用 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2019, 35(24):3217-3219.
- [24] 眭文妍, 范晓慧, 陈丽红, 等. TNF- α 、FoxM1 在结直肠癌组织中的表达及相关性分析 [J]. *中国医学创新*, 2019, 16(26):119-122.
- [25] 王天. 结直肠癌手术后患者血浆降钙素原、C反应蛋白、肿瘤坏死因子 α 水平的变化与术后肠梗阻的关系 [J]. *中国基层医药*, 2019(13):1570-1573.
- [26] 余钧辉, 孙学军, 郑见宝, 等. TNF- α 通过 Wnt/ β -catenin 信号通路促进结肠癌细胞的增殖 [J]. *西安交通大学学报(医学版)*, 2018, 39(04):504-508.
- [27] 戴璐, 赵晓鹏, 马璐, 等. TNF- α 通过激活 PI3K/AKT 通路促进 SW620~(Lgr5+) 结肠癌干细胞增殖 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2020, 36(1):33-41.
- [28] Ray AL, Berggren KL, Restrepo Cruz S, et al. Inhibition of MK2 suppresses IL-1 β , IL-6, and TNF-alpha-dependent colorectal cancer growth [J]. *Int J Cancer*, 2018, 142(8):1702-1711.
- [29] Shen J, Li ZJ, Li LF, et al. Vascular-targeted TNF α and IFN γ inhibits orthotopic colorectal tumor growth [J]. *J Transl Med*, 2016, 14(1):187.
- [30] 朱艳, 夏芹芹, 罗俊, 等. 甲胎蛋白、甲胎蛋白异质体与 TNF- α 因子联合检测在原发性肝癌诊断中的应用价值 [J]. *临床和实验医学杂志*, 2020, 19(4):383-386.
- [31] Li N, Wang J, Zhang N, et al. Cross-talk between TNF-alpha and IFN-gamma signaling in induction of B7-H1 expression in hepatocellular carcinoma cells [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2018, 67(2):271-283.
- [32] Hou J, Zhao R, Xia W, et al. PD-L1-mediated gasdermin C expression switches apoptosis to pyroptosis in cancer cells and facilitates tumour necrosis [J]. *Nat Cell Biol*, 2020, 22(10):1264-1275.
- [33] Huang BP, Lin CS, Wang CJ, et al. Upregulation of heat shock protein 70 and the differential protein expression induced by tumor necrosis factor-alpha enhances migration and inhibits apoptosis of hepatocellular carcinoma cell HepG2 [J]. *Int J Med Sci*, 2017, 14(3):284-293.
- [34] Tan W, Luo X, Li W, et al. TNF-alpha is a potential therapeutic target to overcome sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma [J]. *EBioMedicine*, 2019, 40:446-456.
- [35] 陆小云, 张焕新. 急性白血病血清 sICAM-1、IL-10 和 TNF- α 水平变化及临床意义 [J]. *临床血液学杂志*, 2020, 33(6):762-766.
- [36] Ramirez-Amador V, Zambrano JG, Anaya-Saavedra GZ, et al. TNF as marker of oral candidiasis, HSV infection, and mucositis onset during chemotherapy in leukemia patients [J]. *Oral Dis*, 2017, 23(7):941-948.
- [37] Zhou X, Zhou S, Li B, et al. Transmembrane TNF-alpha preferentially expressed by leukemia stem cells and blasts is a potent target for antibody therapy [J]. *Blood*, 2015, 126(12):1433-1442.
- [38] Tamai H, Yamaguchi H, Miyake K, et al. Amlexanox Downregulates S100A6 to Sensitize KMT2A/AFF1-Positive Acute Lymphoblastic Leukemia to TNF α Treatment [J]. *Cancer Res*, 2017, 77(16):4426-4433.
- [39] 陈文婷, 林丽娥, 刘丹, 等. COX-2 抑制人急性髓系白血病 OCI-AML2 细胞株内 p53、TNF- α 的表达 [J]. *热带医学杂志*, 2020, 20(7):882-886+906.
- [40] Scheff NN, Ye Y, Bhattacharya A, et al. Tumor necrosis factor alpha secreted from oral squamous cell carcinoma contributes to cancer pain and associated inflammation [J]. *Pain*, 2017, 158(12):2396-2409.
- [41] Partecke LI, Kading A, Trung DN, et al. Subdiaphragmatic vagotomy promotes tumor growth and reduces survival via TNF α in a murine pancreatic cancer model [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(14):22501-22512.
- [42] Lau TS, Chan LK, Wong EC, et al. A loop of cancer-stroma-cancer interaction promotes peritoneal metastasis of ovarian cancer via TNF α -TGF α -EGFR [J]. *Oncogene*, 2017, 36(25):3576-3587.

炎症性肠病患者艰难梭菌感染的流行情况及危险因素研究

伍众文 刘平娟 郭鹏豪 陈怡丽 廖康 黄彬*

【摘要】 目的 研究炎症性肠病(IBD)患者艰难梭菌感染的流行情况及危险因素,为临床治疗提供依据。方法 将2017年11月至2019年6月于广州中山大学附属第一医院入院的130例炎症性肠病患者纳入研究。根据患者IBD诊断,将患者分为克罗恩病组(CD)和溃疡性结肠炎组(UC),收集其入院48 h内粪便标本。采用免疫荧光法检测谷氨酸脱氢酶(GDH)、艰难梭菌A/B毒素(CDAB),实时荧光PCR法检测粪便艰难梭菌毒素B基因(*tcdB*),显色培养法检测艰难梭菌,根据艰难梭菌检测结果与患者临床情况,将患者分为阴性组、定植组和感染组,比较CD和UC两组间各项指标差异和四种检测方法的检测结果。结果 在130例炎症性肠病患者中,克罗恩病组(CD)和溃疡性结肠炎组(UC)例数分别为80(61.5%)和50(38.5%);CD组艰难梭菌定植率和感染率分别为20.0%(16/80)和8.8(7/80)%;溃疡性结肠炎定植率和感染率分别为16.0%(8/50)和26.0%(13/50);两组间一般情况、大便检测情况与炎症标志物中多项指标比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。显色培养法、免疫荧光法检测GDH、CDAB、PCR法检测*tcdB*的阳性率分别为29.2%、29.2%、3.1%和20.8%。粪便艰难梭菌毒素B基因一步法检测艰难梭菌感染与指南推荐联合法结果比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 UC患者比CD患者更容易感染艰难梭菌;需要重视IBD患者的艰难梭菌定植情况。

【关键词】 炎症性肠病;艰难梭菌;定植;感染;危险因素

Prevalence and risk factors of *Clostridium difficile* infection in patients with inflammatory bowel disease

WU Zhongwen, LIU Pingjuan, GUO Penghao, CHEN Yili, LIAO Kang, HUANG Bin*

(Department of Clinical Laboratory, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong, China, 510080)

【ABSTRACT】 Objectives To study the prevalence and risk factors of *Clostridium difficile* infection in patients with inflammatory bowel disease (IBD) to provide a basis for clinical treatment. **Method** 130 patients with inflammatory bowel disease admitted to the First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University in Guangzhou from November 2017 to June 2019 were included in the study. According to the diagnosis of IBD, the patients were divided into Crohn's disease group (CD) and ulcerative colitis group (UC), and stool samples were collected within 48 hours of admission. The Chromogenic culture, toxin A/B enzyme immunoassay (CDAB), glutamate dehydrogenase enzyme immunoassay (GDH) and real-time fluorescent quantitative PCR detection of gene for toxin B (*tcdB*) were used to detect *Clostridium difficile*. According to the test results of *Clostridium difficile* and the clinical conditions of the patients, the patients were divided into negative group, colonization group and infection group, and the differences in various indicators between the CD and UC groups and the test results of the four detection methods were compared. **Result** Among 130 patients with IBD, the numbers of Crohn's disease group (CD) and ulcerative colitis group (UC) were 80 (61.5%) and 50 (38.5%), respectively. The colonization rate and infection rate of *Clostridium difficile* in the CD group were

基金项目:广东省自然科学基金(2021A1515010423)

作者单位:中山大学附属第一医院医学检验科,广东,广州510080

*通信作者:黄彬, E-mail:hb906@163.com

20.0% (16/80) and 8.8 (7/80) %, respectively. The colonization rate and infection rate in ulcerative colitis were 16.0% (8/50) and 26.0% (13/50) respectively. There were significant differences between the two groups in general conditions, stool detection conditions and multiple indicators of inflammation markers ($P < 0.05$). The positive rates of chromogenic culture method, immunofluorescence method to detect GDH, CDAB, and qRT-PCR method to detect tcdB were 29.2%, 29.2%, 3.1% and 20.8%, respectively. There was no statistically significant difference between the results of one-step detection of *Clostridium difficile* toxin B gene in fecal *C. difficile* infection and the combined method recommended by the guidelines ($P > 0.05$). **Conclusions** UC patients are more likely to be infected with *C. difficile* than CD patients. Attention should be paid to the colonization of *C. difficile* in patients with IBD.

[KEY WORDS] Inflammatory Bowel Disease; *Clostridium difficile* asymptomatic carriage; *Clostridium difficile* infection; risk factors

炎症性肠病(Inflammatory bowel disease, IBD)可以分为克罗恩病(Crohn's disease, CD)与溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)。目前两种疾病患者艰难梭菌感染(*Clostridium difficile* infection, CDI)的流行情况和危险因素不同研究结论差异较大^[1-7]。艰难梭菌的无症状携带/定植(asymptomatic carriage/Colonization, 下文统称定植)是CDI的危险因素^[8],是艰难梭菌传播的重要途径,但目前国内IBD患者的定植情况未有文献报道。因此,需要建立完善的艰难梭菌感染、定植检测方法,调查国内IBD患者的艰难梭菌流行病学及危险因素情况,为其诊疗提供依据^[9]。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂

GeneXpert全自动医用PCR分析系统和GeneXpert *C.difficile*检测试剂盒(实时荧光PCR法)购自美国Cepheid公司。厌氧产气袋购自英国OX-OID公司。mini VIDAS全自动免疫分析仪和艰难梭菌谷氨酸脱氢酶检测试剂盒(GDH,酶联免疫荧光法)以及艰难梭菌毒素A/B检测试剂盒(CDAB,酶联免疫荧光法)、艰难梭菌显色培养基(CDIF)、基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(Vitek MS)和基质液CHCA均购自法国生物梅里埃公司。

1.2 纳入标准和排除标准

纳入标准:2017年11月至2019年6月,结合临床实验室检查、影像学检查、内镜和组织病理学,诊断为UC或克罗恩病(CD)的住院患者。排除标准:IBD分型不能确定患者;入院48h内粪便未能收集,病史不完整患者。研究经过院伦理委员会批准。研究对象为群体数据,并非具体病例无须知情同意。

1.3 艰难梭菌感染、定植和阴性诊断标准

根据《中国成人艰难梭菌感染诊断和治疗专家共识》^[10]和美国IDSA指南^[11],将GDH与CDAB同时阳性,或B毒素分子检测阳性,且腹泻次数 ≥ 3 次/天或肠梗阻患者诊断为感染;粪便检测四项其中有一项阳性但无腹泻或肠梗阻患者诊断为定植;无艰难梭菌检测结果阳性患者诊断为阴性。

1.4 实验流程

留取入院诊断为IBD患者住院48h内的大便,分为四份(每份约1mL),分别用于以下检测:免疫荧光法检测GDH、CDAB,实时荧光PCR法检测艰难梭菌B毒素、二元毒素和高产毒RT027菌株的*tcdC*基因,显色培养法培养艰难梭菌。查阅患者电子病历,登记患者各项指标。

1.5 谷氨酸脱氢酶检测方法

①200 μ L粪便加入1 000 μ L预处理液(R1);②充分震荡混匀后,3 000 r/m离心10 min;③取上清液300 μ L加入测试条上机检测,根据cut-off值(阴性:检测值 < 0.10 ;阳性:检测值 ≥ 0.10)判读结果。

1.6 艰难梭菌A/B毒素检测方法

操作同GDH,根据cut-off值(阴性: < 0.13 ng/mL;灰区:(0.13~0.37) ng/mL;阳性: > 0.37 ng/mL)判读结果。

1.7 实时荧光PCR法

①拭子挑取少量标本并插入处理液小瓶中;②震荡混匀后将全部液体转移至Gene Xpert *C.difficile* Assay检测试剂盒中,然后上机检测。检测标本中艰难梭菌的毒素B、二元毒素和缺失nt117的*tcdC*基因序列。

1.8 显色培养法

取粪便标本约300 μ L与等体积95%乙醇振荡混匀,室温静置1 h,3 000 r/m离心5 min,用无

菌棉签取上述预处理标本沉淀接种于显色培养基,置于37℃厌氧培养24~48 h。挑取边缘不规则,扁平干燥,伴有“马粪”臭味,黑色典型菌落进行鉴定。

1.9 统计学分析

采用SPSS 22.0软件进行统计学分析;计数资料以n(%)表示,采用χ²检验;计量资料符合正态分布以(x̄±s)表示,采用t检验;不符合正态分布采用M(P25, P75)表示;两项比较指标有一项或两项不符合正态分布采用秩和检验统计学方法;以P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 患者一般情况比较

克罗恩病组(CD)和溃疡性结肠炎组(UC)例数分别为80(61.5%)和50(38.5%),定植率和感染率克罗恩病患者分别为20.0%和8.8%,溃疡性结肠炎患者分别为16.0%和26.0%。IBD患者总体艰难梭菌定植率与感染率分别18.5%[(16+8)/130]和15.4%[(7+13)/130]。两组年龄、活动期重度比例、巨细胞病毒(Cytomegalovirus, CMV)、EB病毒感染率、3个月内激素、抗生素使用率比较,差异有统计学意义(P<0.05)。见表1。

表1 一般情况比较 [n(%), (x̄±s)]

项目	分组	克罗恩病组(n=80)	溃疡性结肠炎组(n=50)	t/χ ² 值	P值
性别	男	47(58.8)	28(21.5)	0.095	0.758
	女	33(41.3)	22(16.9)		
年龄		29.1±11.1	39.7±13.8	-4.817	0.000
活动期	缓解期	8(10.0)	0(0.0)	-5.772	0.000
	轻度	17(21.3)	4(8.0)		
	中度	46(57.5)	22(44.0)		
	重度	1(1.3)	22(44.0)	38.616	0.000
	(空白)	8(10.0)	2(4.0)		
分组	阴性	57(71.3)	29(58.0)	-1.950	0.051
	定植	16(20.0)	8(16.0)	0.327	0.567
	感染	7(8.8)	13(26.0)	7.033	0.008
腹泻次数	少于3次	49(61.3)	10(20.0)	-5.355	0.000
	3~4次	25(31.3)	20(40.0)		
	5~7次	6(7.5)	12(24.0)		
	多于等于8次	0(0.0)	8(16.0)		
发热		13(16.3)	10(20.0)	0.297	0.586
CMV		4(5.0)	12(24.0)	10.292	0.001
EB		7(8.8)	21(42.0)	20.129	0.000
激素		7(8.8)	18(36.0)	14.710	0.000
单抗		8(10.0)	4(8.0)	0.146	0.703
免疫抑制剂		18(22.5)	7(14.0)	1.431	0.232
抗生素		19(23.8)	20(40.0)	3.869	0.049

2.2 患者大便检测情况

两组大便血红蛋白阳性率(OB)、转铁蛋白阳性率(TF)、大便WBC比较,差异有统计学意义(P<0.05);两组四种艰难梭菌检测方法阳性率比较,差异无统计学意义(P>0.05)。见表2。

表2 大便检测比较 [n(%)]
Table 2 Stool examination differences [n(%)]

项目	分组	克罗恩病组	溃疡性结肠炎组	Z/χ ² 值	P值
OB(n=122)		40(54.1)	45(93.8)	21.712	0.000
TF(n=122)		42(56.8)	44(91.7)	17.058	0.000
大便WBC(n=122)	阴性	57(77.0)	16(33.3)	-5.034	0.000
	0~3	3(4.1)	4(8.3)		
	3~5/HP	5(6.8)	3(6.3)		
	1+	4(5.4)	9(18.8)		
	2+	2(2.7)	7(14.6)		
	3+	3(4.1)	7(14.6)		
	4+	0(0.0)	2(4.2)		
培养		20(25.0)	18(36.0)	1.800	0.180
GDH		20(25.0)	18(36.0)	1.800	0.180
tcdB		13(16.3)	14(28.0)	2.582	0.108
CDAB		3(3.8)	1(2.0)	0.316	0.576

2.3 患者炎症标志物比较

两组静脉血白细胞计数(WBC)、C反应蛋白(CRP)比较,差异有统计学意义(P<0.05)。见表3。

表3 炎症指标比较 [(x̄±s), M(P25, P75)]

项目	n	克罗恩病组	溃疡性结肠炎组	Z值	P值
ESR	126	47.5±29.5	38.5(18.75, 62)	-0.849	0.396
WBC	129	6.9(5.28, 9.37)	8.3(6.55, 10.92)	-2.789	0.005
CRP	121	28.2(12.43, 47.20)	11.5(4.20, 37.05)	-2.553	0.011

2.4 艰难梭菌不同检测方法结果

指南推荐联合方法结果与tcdB法比较,差异无统计学意义(P>0.05)。二元毒素(CDT)与O27高毒株检测均为阴性。见表4~5,图1。

表4 4种检测方法的结果

检测方法	总阳性率	定植组阳性率	定植组阳性占比	感染组阳性率	感染组阳性占比
显色培养	29.2	87.5	55.3	85.0	44.7
GDH	29.2	83.3	52.6	90.0	47.4
CDAB	3.1	8.3	50.0	10.0	50.0
tcdB	20.8	33.3	29.6	95.0	70.4
联合法	18.5	29.2	29.2	85.0	70.8

3 讨论

临床开展的检测艰难梭菌的方法有谷氨酸脱

表5 *tcdB*与联合法结果比较

指标	<i>tcdB</i>	联合法	χ^2 值	<i>P</i> 值
阳性率	20.8(27/130)	18.5(24/130)	0.220	0.639
定植组阳性率	33.3(8/24)	29.2(7/24)	0.094	0.760
感染组阳性率	95.0(19/20)	85.0(17/20)	1.083	0.298

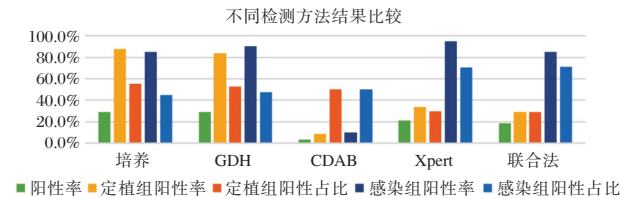


图1 艰难梭菌四种检测方法的结果

Figure 1 4 methods result

氢酶免疫学检测(GDH)、艰难梭菌 A/B 毒素免疫学检测(CDAB)、艰难梭菌基因分子检测(NAAT)、艰难梭菌培养。指南推荐以 GDH 和 CDAB 联合为基础,NAAT、产毒培养(TC)或细胞毒试验确证(CCTA)的联合法^[10]。研究发现由于 CDAB 的阳性率低下,大量标本需要再进一步检测,所以单用 *tcdB* 检测是临床检测更好的选择。

国内艰难梭菌感染率情况根据文献报道:IBD 人群整体感染率范围在 5.0~13.9%;UC 的范围在 5.56%~22.8%;CD 的范围在 4.0%~20.45%^[2-7]。研究发现患者整体的艰难梭菌感染率为 15.4%,溃疡性结肠炎(UC)感染率为 26.0%,克罗恩病(CD)感染率为 8.8%,与浙江邵逸夫医院报道感染率 13.9%、24.7%和 8.5%接近^[7]。与一些报道^[3,12-13]结果差异较大可能是检测方法差异导致的,尤其是一些单纯 CDAB 检测报道。

与症状明显的艰难梭菌感染相比,艰难梭菌的定植往往遭到临床的忽视。在中国,上海市报道健康人群艰难梭菌定植率为 0.70%^[14],台湾报道入院患者艰难梭菌定植率达 20.0%^[15]。对于 IBD 人群,国外有研究发现儿童患者,定植率可达 10.8%~17%;临床缓解期、无激素、抗生素、免疫抑制剂使用史,近期住院史患者产毒菌株定植率达 8.2%^[16]。实验发现 IBD 患者定植率为 18.5%,其中 UC 患者定植率为 16%,CD 患者为 20%(两者定植率没有统计学差异),据笔者所知是中国 IBD 人群定植情况的首次报道。

艰难梭菌定植有重要临床意义,根据患者携带菌株是否携带产毒基因,可分为产毒菌株携带和非产毒菌株携带^[17]。产毒菌株的携带不但能造成艰难梭菌的传播,而且会加大携带者自身感染

的风险^[8];与之相反,非产毒株携带通过激活机体免疫系统,能降低携带者艰难梭菌感染风险^[18]。这也凸显了 *tcdB* 的独特价值,它是一种简便且能区分产毒与非产毒菌株定植的临床检测方法。

因为客观条件的限制,本研究没有采用参考方法(产毒培养或细胞毒试验)检测,艰难梭菌感染/定植分组可能会有偏差;由于是查阅患者病历的回顾性研究,一些危险因素(如质子泵抑制剂、住院史、胃肠手术史、IBD 评分等)因采集不完整而没有纳入研究;因是单中心研究,样本数量有限,可能没有全面地揭示患者真实情况。

参考文献

- [1] Maharshak N, Barzilay I, Zinger H, et al. Clostridium difficile infection in hospitalized patients with inflammatory bowel disease: Prevalence, risk factors, and prognosis [J]. Medicine (Baltimore), 2018, 97(5):e9772.
- [2] Yue Li, Hui Xu, Tao Xu, et al. Case-Control Study of Inflammatory Bowel Disease Patients with and without Clostridium difficile Infection and Poor Outcomes in Patients Coinfected with C. difficile and Cytomegalovirus [J]. Dig Dis Sci, 2018, 63:3074-3083.
- [3] Constantin A, Ilie M, abacelia D, et al. Burden of Clostridium Difficile Infection in Inflammatory Bowel Disease [J]. Mod Med, 2016, 23(2):109-113.
- [4] 秦娟秀,马硝惟,戴颖欣,等.炎症性肠病患者中艰难梭菌感染的分子流行特征[J].中国感染与化疗杂志,2016,16(6):761-765.
- [5] Xu H, Tang H, Xu T. Retrospective analysis of Clostridium difficile infection in patients with ulcerative colitis in a tertiary hospital in China [J]. BMC Gastroenterol, 2019, 19(1):3.
- [6] Gu YB, Zhang MC, Sun J, et al. Risk factors and clinical outcome of Clostridium difficile infection in patients with IBD: A single-center retrospective study of 260 cases in China [J]. J Dig Dis, 2017, 18(4): 207-211.
- [7] Chen XL, Deng J, Chen X, et al. High incidence and morbidity of Clostridium difficile infection among hospitalized patients with inflammatory bowel disease: A prospective observational cohort study [J]. J Dig Dis, 2019, 20(9):460-466.
- [8] Clyde D, Ford, Bert K. Lopansri, Jana Coombs, et al. Clostridioides difficile colonization and infection in patients admitted for a first autologous transplantation: Incidence, risk factors, and patient outcomes [J]. Clin Transplant, 2019, 33: e13712.
- [9] 王暄,杨靖,赵建宏.艰难梭菌感染治疗方法[J].分子诊断与治疗杂志,2013,5(6):422-426.
- [10] 中国医师协会检验医师分会感染性疾病检验医学专家委员会.中国成人艰难梭菌感染诊断和治疗专家共识[J].协和医学杂志,2017,8(2-3):131-138.

(下转第 1389 页)

丹参酮 II A 对 CVB3 感染的小鼠原代心肌细胞氧化损伤及凋亡的影响及其机制研究

肖文涛¹ 张静¹ 郭素萍¹ 胡振杰¹ 李江² 高传玉^{3*}

[摘要] 目的 探讨丹参酮 II A 对病毒性心肌炎细胞损伤和凋亡的影响及潜在的作用机制。方法 以柯萨奇 B3m 病毒(CVB3)感染小鼠原代心肌细胞构建病毒性心肌炎体外模型。实验分为 5 组: 正常对照组、丹参酮 II A(Tan II A)组、模型(CVB3)组、丹参酮 II A 治疗(CVB3+Tan II A)组和利巴韦林治疗(CVB3+Rib)组。细胞计数试剂盒(CCK-8)法检测细胞活性,试剂盒检测超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性及丙二醛(MDA)含量,ELISA 法检测白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6(IL-6)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α),流式细胞术检测细胞凋亡水平,Western blot 检测细胞中剪切的含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 3(Cleaved Caspase-3)、Toll 样受体 4(TLR4)的表达和核转录因子 κ B(NF- κ B)活化水平。结果 与正常对照组相比,CVB3 组心肌细胞活性下降,SOD 和 GSH-Px 活性降低,MDA 含量增多,炎症因子 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平明显上升,凋亡率增加,Cleaved Caspase-3、TLR4 和 p-NF- κ B 的表达明显上调,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。丹参酮 II A 和利巴韦林能够提高 CVB3 诱导的细胞活性,提高 SOD 和 GSH-Px 活性,降低 MDA 含量,减少 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的分泌,抑制细胞凋亡,下调 Cleaved Caspase-3、p-TLR4 和 NF- κ B 的表达,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结论 丹参酮 II A 通过 TLR4/NF- κ B 信号通路减轻氧化应激和炎症反应,降低 CVB3 诱导心肌细胞损伤和凋亡。

[关键词] 丹参酮 II A; 病毒性心肌炎; 氧化应激; 炎症反应; TLR4/NF- κ B 信号通路

Effects of Tanshinone II A on Oxidative Damage and Apoptosis of Primary Cardiomyocytes Infected by CVB3 in Mice and Its Mechanism

XIAO Wentao¹, ZHANG Jing¹, GUO Suping¹, HU Zhenjie¹, LI Jiang², GAO Chuanyu^{3*}

(1. Coronary Care Unit, Fuwai Central China Cardiovascular Hospital/Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou, Henan, China, 451464; 2. Zhengzhou Railway Vocational and Technical College/Henan Engineering Research Center of Natural Medicine Extraction and Medical Technology Application, Zhengzhou, Henan, China, 451464; 3. Department of Coronary Heart Disease, Fuwai Central China Cardiovascular Hospital, Zhengzhou, Henan, China, 451464)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the effect of Tanshinone II A on cell damage and apoptosis of viral myocarditis and its potential mechanism. **Methods** Coxsackie B3m virus (CVB3) was used to infect primary cardiomyocytes of mice to construct an in vitro model of viral myocarditis. The experiment was divided into five groups: the normal control group, the Tanshinone II A (Tan II A) group and the model (CVB3) group, the Tanshinone II A treatment (CVB3+Tan II A) group and the ribavirin treatment (CVB3+Rib) group. Cell counting kit (CCK-8) method was used to detect cell viability. The kit detects the activity of superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) and the content of malondialdehyde (MDA). ELISA

基金项目:河南省科技厅重点研发与推广专项(212102310170,202102310088)

作者单位:1. 阜外华中心血管病医院/河南省人民医院心脏重症医学科,冠心病重症监护室,河南,郑州 451464

2. 郑州铁路职业技术学院/河南省天然药物提取和医疗技术应用工程研究中心,河南,郑州 451464

3. 阜外华中心血管病医院 冠心病病区,河南,郑州 451464

*通信作者:高传玉, E-mail: gao_chuanyu@163.com

was to detect interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α). Flow cytometry was used to detect the level of apoptosis. Western blot was used to detect the expression of cleaved cysteine-containing aspartate proteolytic enzyme 3 (Cleaved Caspase-3), Toll-like receptor 4 (TLR4) and the activation of nuclear transcription factor κ B (NF- κ B). **Results** Compared with the control group, the activity of cardiomyocytes in the CVB3 group decreased, SOD and GSH-Px activities decreased, MDA content increased, the levels of inflammatory factors IL-1 β , IL-6 and TNF- α increased significantly, and the rate of apoptosis increased. Cleaved Caspase-3, the expression of TLR4 and p-NF- κ B was significantly up-regulated, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Tanshinone IIA and ribavirin can increase CVB3-induced cell activity, increase SOD and GSH-Px activity, reduce MDA content, reduce IL-1 β , IL-6 and TNF- α secretion, inhibit cell apoptosis, and down-regulate Cleaved Caspase-3, and the expression of p-TLR4/NF- κ B, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** Tanshinone IIA reduces oxidative stress and inflammation through TLR4/NF- κ B signaling pathway and reduces CVB3 induced cardiomyocyte damage and apoptosis.

[KEY WORDS] Tanshinone IIA; Viral myocarditis; Oxidative stress; Inflammation; TLR4/NF- κ B signaling pathway

病毒性心肌炎(Viral myocarditis, VMC)是一种继发于病毒感染的心肌炎性疾病,在年轻人中多发,可引发心力衰竭、猝死等致命性伤害^[1]。据报道,肠道病毒,特别是柯萨奇病毒B3(CVB3)是导致病毒性心肌炎的最常见病毒^[2]。鉴于最常见的心肌炎诱因是病毒感染,开发有效的抗病毒药物对治疗病毒性心肌炎具有重要意义。丹参酮II A(Tanshinone II A, Tan II A)是丹参酮的主要活性成分,具有抗氧化、抗病毒、调节免疫等多种药理学功能^[3]。丹参酮II A已广泛用于心血管疾病的治疗^[4-7]。然而丹参酮II A在病毒性心肌炎中的影响及作用机制的研究相对匮乏,因此本实验以CVB3感染小鼠原代心肌细胞在体外模拟病毒性心肌炎,探究丹参酮II A对病毒性心肌炎细胞损伤和凋亡的影响及可能的机制,以期对病毒性心肌炎临床治疗提供一定的实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及主要试剂

6周龄SPF级BALB/C雄性小鼠(中国科学院实验动物中心);丹参酮II A(南京景竹医药科技有限公司);DMEM培养基(美国Thermo Fisher Scientific公司);胎牛血清(美国Life Technologies公司);CVB3病毒(美国菌种保藏中心);CCK-8试剂(日本同仁化学研究所);BCA蛋白浓度检测试剂盒(美国Sigma公司);SOD活力检测试剂盒、MDA含量检测试剂盒、GSH-Px活力测定试剂盒(南京建成生物工程研究所);IL-1 β 、IL-6和TNF- α ELISA检测试剂盒(赛默飞世尔科技有限公司);

Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒(日本TaKaRa公司);ECL化学发光试剂(上海碧云天生物技术有限公司);PVDF膜(美国密理博公司);Cleaved Caspase-3单抗、TLR4单抗、NF- κ B单抗、p-NF- κ B单抗及二抗(美国Santa Cruz公司)。

1.2 心肌细胞分离及处理分组

参照文献^[8]分离小鼠心肌细胞,即取小鼠心脏组织,剪碎,以胰酶消化,差速贴壁法获取小鼠原代心肌细胞。实验已通过本院实验动物伦理委员会审查。分离的心肌细胞培养在含10%胎牛血清的DMEM培养基中,放置在37 $^{\circ}$ C、5% CO₂、饱和湿度培养箱进行培养。在6孔板中接种 1.0×10^5 个/孔细胞,待单层贴壁生长,向细胞中加入10倍MOI的CVB3(根据预实验结果),轻轻混匀,37 $^{\circ}$ C孵育1 h,记为模型(CVB3)组,丹参酮II A治疗(CVB3+Tan II A)组以CVB3感染后使用浓度为10 μ mol/L的丹参酮II A处理,正常对照组接种同剂量的PBS,丹参酮II A(Tan II A)组使用浓度为10 μ mol/L的丹参酮II A处理,利巴韦林治疗(CVB3+Rib)组以CVB3感染后使用浓度为200 μ g/mL的丹参酮II A处理。

1.3 CCK-8法检测心肌细胞活性

心肌细胞以 3×10^3 个/孔加入到96孔板中,按照1.2方法处理和分组,每组设置3个复孔,分别在24和48 h向各孔细胞内加入CCK-8溶液10 μ L,孵育2 h,酶标仪测定450 nm处的光密度值(OD值),参比波长为600 nm,分别计算各组心肌细胞活性,细胞活性(%)=实验组OD值/对照组OD值 $\times 100\%$ 。

1.4 试剂盒测定 SOD 和 GSH-Px 活性和 MDA 含量

各组心肌细胞处理 48 h 后,收集细胞及上清培养液,分别参照 SOD、MDA 和 GSH-Px 检测试剂盒说明书对 SOD 和 GSH-Px 活性及 MDA 含量进行检测。

1.5 ELISA 检测炎症因子 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平

各组心肌细胞处理 48 h 后,收集上清培养液,使用 ELISA 检测试剂盒对 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平进行检测,具体操作步骤参考制造商说明书。

1.6 流式细胞术检测心肌细胞凋亡率

心肌细胞分组处理 48 h 后,收集 3×10^5 个细胞,采用 Annexin V-FITC/PI 试剂盒说明书处理,使用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.7 Western blot 检测心肌细胞中 Cleaved Caspase-3、TLR4、NF- κ B 和 p-NF- κ B 蛋白表达水平

抽提处理 48 h 各组心肌细胞总蛋白,BCA 法测定上清中蛋白浓度。蛋白加热变性。等量蛋白行 10% SDS-PAGE 凝胶电泳,随后电转至 PVDF 膜,于 5% 脱脂奶粉中封闭 2 h,参照一抗说明书按 1:1 000 稀释 Cleaved Caspase-3、TLR4、NF- κ B 和 p-NF- κ B,加入相应一抗,4 $^{\circ}$ C 过夜孵育,再加入 1:3 000 稀释的二抗,室温封闭 2 h,以 ECL 进行显影,使用成像系统采集图像,以 GAPDH 为内参,分别计算目的蛋白相对表达水平。

1.8 统计学分析

采用 SPSS 21.0 统计学软件对数据进行分析,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,均符合正态分布,两组间用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析,以 *P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 丹参酮 II A 对 CVB3 诱导的心肌细胞活性的影响

与对照组相比, CVB3 组心肌细胞活性显著降低 (*P* < 0.05); 与 CVB3 组相比, CVB3+Tan II A 组心肌细胞活性明显增强 (*P* < 0.05)。见表 1。

2.2 丹参酮 II A 对 CVB3 诱导的心肌细胞氧化应激的影响

与对照组相比, CVB3 组 SOD 和 GSH-Px 活性明显降低 (*P* < 0.05), MDA 含量明显增多 (*P* < 0.05); 与 CVB3 组相比, CVB3+Tan II A 组 SOD 和 GSH-Px 活性上升 (*P* < 0.05), MDA 含量下降 (*P* < 0.05)。见表 2。

表 1 各组心肌细胞活性比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of cardiomyocyte activity in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	细胞活性(%)		
	0 h	24 h	48 h
对照组	100.00 \pm 5.12	99.64 \pm 5.11	97.85 \pm 5.14
Tan II A	99.02 \pm 5.04	96.48 \pm 5.26	96.33 \pm 5.39
CVB3	98.46 \pm 4.89	76.28 \pm 4.61 ^a	52.16 \pm 3.65 ^a
CVB3+Tan II A	98.22 \pm 5.02	88.32 \pm 4.06 ^b	80.92 \pm 4.33 ^b
CVB3+Rib	99.11 \pm 5.17	90.14 \pm 4.37 ^b	84.57 \pm 4.27 ^b
<i>F</i> 值	0.056	11.047	48.006
<i>P</i> 值	0.993	0.001	0.000

注:与 Control 组比, ^a*P* < 0.05; 与 CVB3 组比, ^b*P* < 0.05。

表 2 各组心肌细胞 SOD 和 GSH-Px 活性及 MDA 含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of SOD and GSH-Px activities and MDA content of cardiomyocytes in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	SOD(U/mL)	MDA(U/mL)	GSH-Px(U/mL)
对照组	77.63 \pm 6.11	12.52 \pm 0.13	148.92 \pm 10.21
Tan II A	75.28 \pm 6.08	13.41 \pm 1.01	145.12 \pm 11.75
CVB3	58.04 \pm 5.02 ^a	28.65 \pm 3.02 ^a	91.38 \pm 8.11 ^a
CVB3+Tan II A	71.26 \pm 6.07 ^b	16.14 \pm 1.70 ^b	133.74 \pm 9.61 ^b
CVB3+Rib	73.44 \pm 6.81 ^b	14.15 \pm 1.57 ^b	139.26 \pm 12.08 ^b
<i>F</i> 值	4.847	42.919	14.851
<i>P</i> 值	0.0020	0.000	0.000

注:与对照组组比, ^a*P* < 0.05; 与 CVB3 组比, ^b*P* < 0.05。

2.3 丹参酮 II A 对 CVB3 诱导的心肌细胞炎症反应的影响

与对照组相比, CVB3 组 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平升高 (*P* < 0.05); 与 CVB3 组相比, CVB3+Tan II A 组 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平明显下降 (*P* < 0.05)。见表 3。

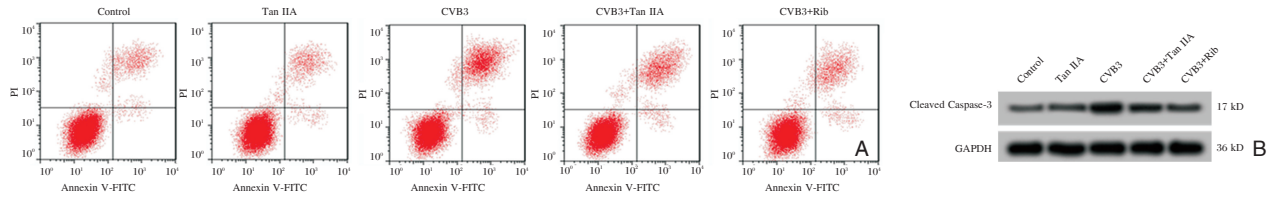
表 3 各组心肌细胞 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)
Table 3 Comparison of levels of IL-1 β , IL-6 and TNF- α in cardiomyocytes of each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	IL-1 β (pg/mL)	IL-6(pg/L)	TNF- α (pg/mL)
对照组	12.52 \pm 0.13	0.71 \pm 0.07	21.41 \pm 2.32
Tan II A	11.81 \pm 1.04	0.68 \pm 0.06	35.45 \pm 3.14
CVB3	28.65 \pm 3.02 ^a	3.55 \pm 0.37 ^a	367.95 \pm 36.84 ^a
CVB3+Tan II A	16.14 \pm 1.70 ^b	1.06 \pm 0.13 ^b	107.85 \pm 10.44 ^b
CVB3+Rib	14.24 \pm 1.38 ^b	0.91 \pm 0.09 ^b	76.52 \pm 7.63 ^b
<i>F</i> 值	47.595	131.406	195.750
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000

注:与对照组组比, ^a*P* < 0.05; 与 CVB3 组比, ^b*P* < 0.05。

2.4 丹参酮 II A 对 CVB3 诱导的心肌细胞凋亡的影响

与对照组相比, CVB3 组心肌细胞凋亡率和 Cleaved Caspase-3 的表达升高 (*P* < 0.05); 与 CVB3 组相比, CVB3+Tan II A 组细胞凋亡率和 Cleaved Caspase-3 的表达明显降低 (*P* < 0.05)。见图 1 和表 4。



注:A为流式细胞术检测各组心肌细胞凋亡率;B为Western blot检测Cleaved Caspase-3的表达。

图1 丹参酮II A对CVB3诱导的心肌细胞凋亡和Cleaved Caspase-3表达的影响

Figure 1 The effect of Tanshinone II A on CVB3-induced cardiomyocyte apoptosis and Cleaved Caspase-3 expression

表4 各组心肌细胞凋亡率比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Comparison of apoptosis rate of cardiomyocytes in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	凋亡率 (%)	Cleaved Caspase-3
对照组	2.52±0.59	0.11±0.01
Tan II A	2.88±0.62	0.12±0.01
CVB3	25.79±3.24 ^a	0.52±0.05 ^a

注:与对照组相比,^a $P < 0.05$ 。

2.5 丹参酮II A对CVB3诱导的心肌细胞中TLR4/NF-κB信号通路激活的影响

与对照组相比, CVB3组心肌细胞中TLR4和p-NF-κB的表达上调($P < 0.05$);与CVB3组相比, CVB3+Tan II A组细胞中TLR4和p-NF-κB的表达明显下调($P < 0.05$)。见图2和表5。

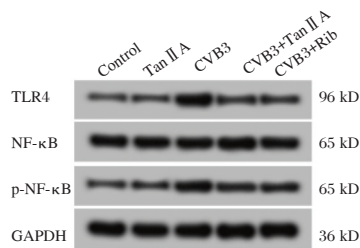


图2 Western blot检测各组心肌细胞中TLR4、NF-κB和p-NF-κB蛋白表达

Figure 2 Western blot detection of TLR4, NF-κB and p-NF-κB protein expression in cardiomyocytes of each group

表5 各组心肌细胞中TLR4、NF-κB和p-NF-κB蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Comparison of TLR4, NF-κB and p-NF-κB protein expression levels in cardiomyocytes of each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	TLR4	NF-κB	p-NF-κB
对照组	0.11±0.01	0.82±0.08	0.32±0.03
Tan II A	0.12±0.01	0.81±0.08	0.33±0.03
CVB3	0.89±0.09 ^a	0.83±0.07	0.63±0.06 ^a
CVB3+Tan II A	0.23±0.02 ^b	0.81±0.08	0.41±0.04 ^b
CVB3+Rib	0.21±0.02 ^b	0.80±0.07	0.38±0.03 ^b
F值	176.736	0.067	30.247
P值	0.000	0.991	0.000

注:与对照组比,^a $P < 0.05$;与CVB3组比,^b $P < 0.05$ 。

3 讨论

心肌炎定义为心肌损伤后心肌的炎症,也是引发小儿心力衰竭患者的主要原因之一^[9]。肠道病毒感染被认为是该疾病的一个主要原因,尤其是年轻患者中CVB3的感染。CVB3是一种重要的人类病原体,可诱导儿童和年轻人的急性和慢性病毒性心肌炎^[10]。大约50%的心肌炎及其末期扩张型心肌病可归因于CVB3感染^[11]。目前关于病毒性心肌炎的发病机制尚不完全清楚,且缺乏病毒性心肌炎治疗的特效药。因此探究病毒性心肌炎的发病机制及开发有效的药物对病毒性心肌炎的临床治疗显得尤为重要。

丹参酮II A来源于唇形科植物丹参的根及根茎,主要用于治疗冠心病、心律过速、心绞痛等心血管疾病^[12]。近期研究显示,丹参酮II A磺酸钠注射液广泛治疗病毒性心肌炎的小鼠模型及临床应用^[13]。本实验结果提示丹参酮II A对CVB3诱导的心肌细胞具有一定的保护作用。以往研究发现丹参酮II A可能通过调控氧化应激反应和炎症反应发挥其对器官损伤的保护作用^[14]。本实验中丹参酮II A能够提高CVB3诱导的心肌细胞抗氧化酶SOD和GSH-Px活性,降低MDA的含量,减轻心肌细胞的氧化应激损伤。此外,丹参酮II A可降低CVB3诱导的心肌细胞分泌的炎症因子IL-1β、IL-6和TNF-α水平,降低炎症反应,本实验结果与以上研究相符。一项研究显示,丹参酮II A可通过降低TLR4-MyD88-NF-κB信号通路,对脂多糖诱导的RAW264.7细胞发挥抗炎作用^[15]。另一项研究发现,丹参酮II A通过TLR-4介导的NF-κB信号通路降低炎症细胞因子和氧化应激水平的产生,改善缺氧缺血性脑病^[16]。本实验结果发现,丹参酮II A可下调CVB3诱导的心肌细胞中TLR4和NF-κB蛋白表达。表明丹参酮II A能够抑制TLR4/NF-κB信号通路的激活。

总之,丹参酮 II A 能够改善 CVB3 诱导心肌细胞氧化应激损伤及炎症反应,减少细胞凋亡,其潜在的机制可能与抑制 TLR4/NF- κ B 信号通路的活化有关。后续实验将对丹参酮 II A 在病毒性心肌炎小鼠心脏的影响进一步探究,以期对病毒性心肌炎的临床治疗提供实验基础。

参考文献

- [1] Frey T, Arain N. Pediatric Viral Myocarditis - A Review [J]. S D Med, 2018, 71(1):29-34.
- [2] Shen H, Liu T, Luo Y, et al. Echovirus plays major roles in the natural recombination of Coxsackievirus B3 [J]. J Med Virol, 2018, 90(2):377-382.
- [3] 张媛,毛浩萍,樊官伟.丹参酮 II A 药理作用研究进展 [J]. 天津中医药大学学报, 2019, 38(1):20-24.
- [4] 曹慧敏,吴瑾,贾连群,等.丹参酮 II A 对心血管系统药理作用的研究进展 [J]. 世界中医药, 2017, 12(7):1718-1722.
- [5] Li S, Jiao Y, Wang H, et al. Sodium tanshinone II A sulfate adjunct therapy reduces high-sensitivity C-reactive protein level in coronary artery disease patients: a randomized controlled trial [J]. Sci Rep, 2017, 7(1):17451-17461.
- [6] 李博,郭盛,方胜先,等.丹参酮 II A 通过调节 Th1/Th2 平衡改善大鼠自身免疫性心肌炎的机制研究 [J]. 中国心血管病研究, 2018, 16(6):570-574.
- [7] 李博,朱平先,许顶立.丹参酮 II A 对自身免疫性心肌炎作用机制的研究进展 [J]. 实用临床医学, 2017, 18(6):97-99.
- [8] Omatsu-Kanbe M, Yoshioka K, Fukunaga R, et al. A simple antegrade perfusion method for isolating viable single cardiomyocytes from neonatal to aged mice [J]. Physiol Rep, 2018, 6(9):e13688-e13696.
- [9] 李舟文. NT-proBNP 在小儿病毒性心肌炎诊断和心功能评估中的应用 [J]. 分子诊断与治疗杂志, 2016, 8(3):178-181.
- [10] Miteva K, Pappritz K, El-Shafeey M, et al. Mesenchymal Stromal Cells Modulate Monocytes Trafficking in Coxsackievirus B3-Induced Myocarditis [J]. Stem Cells Transl Med, 2017, 6(4):1249-1261.
- [11] Monazah A, Zeinoddini M, Saeedini AR. Evaluation of a rapid detection for Coxsackievirus B3 using one-step reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) [J]. J Virol Methods, 2017, 246:27-33.
- [12] Di T, Jia-Rui WU, Zhang XM, et al. Sodium Tanshinone II A Sulfonate Injection as Adjuvant Treatment for Unstable Angina Pectoris: A Meta-Analysis of 17 Randomized Controlled Trials [J]. Chin J Integr Med, 2018, 24(2):156-160.
- [13] 许丽琴,潘军,曹觅,等.丹参酮 II A 磺酸钠注射液联合丙种球蛋白治疗小儿急性重症病毒性心肌炎合并心力衰竭疗效观察 [J]. 现代中西医结合杂志, 2018, 27(26):2917-2920.
- [14] Zhu J, Xu Y, Ren G, et al. Tanshinone II A Sodium sulfonate regulates antioxidant system, inflammation, and endothelial dysfunction in atherosclerosis by downregulation of CLIC1 [J]. Eur J Pharmacol, 2017, 815:427-436.
- [15] Fan G, Jiang X, Wu X, et al. Anti-Inflammatory Activity of Tanshinone IIA in LPS-Stimulated RAW264.7 Macrophages via miRNAs and TLR4-NF- κ B Pathway [J]. Inflammation, 2016, 39(1):375-384.
- [16] Fang C, Xie L, Liu C, et al. Tanshinone IIA improves hypoxic ischemic encephalopathy through TLR-4-mediated NF- κ B signal pathway [J]. Mol Med Rep, 2018, 18(2):1899-1908.

(上接第 1384 页)

- [11] McDonald LC, Gerding DN, Johnson S, et al. Clinical Practice Guidelines for Clostridium difficile Infection in Adults and Children: 2017 Update by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA) [J]. Clin Infect Dis, 2018, 66(7):987-994.
- [12] Maharshak N, Barzilay I, Zinger H, et al. Clostridium difficile infection in hospitalized patients with inflammatory bowel disease: Prevalence, risk factors, and prognosis [J]. Medicine (Baltimore), 2018, 97(5):e9772.
- [13] Li Y, Xu H, Xu T, et al. Case-Control Study of Inflammatory Bowel Disease Patients with and without Clostridium difficile Infection and Poor Outcomes in Patients Coinfected with C. difficile and Cytomegalovirus [J]. Dig Dis Sci, 2018, 63(11):3074-3083.
- [14] Dong D, Ni Q, Wang C, et al. Effects of intestinal colonization by Clostridium difficile and Staphylococcus aureus on microbiota diversity in healthy individuals in China [J]. BMC Infect Dis, 2018, 18(1):207.
- [15] Hung YP, Lin HJ, Wu TC, et al. Risk factors of fecal toxigenic or non-toxigenic Clostridium difficile colonization: impact of Toll-like receptor polymorphisms and prior antibiotic exposure [J]. PLoS One, 2013, 8(7):e69577.
- [16] Parnell JM, Fazili I, Bloch SC, et al. Two-step Testing for Clostridioides Difficile is Inadequate in Differentiating Infection From Colonization in Children [J]. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2021, 72(3):378-383.
- [17] 麦光兴. 多重 PCR 检测毒力型艰难梭菌的方法学研究及应用 [J]. 分子诊断与治疗杂志, 2014, 6(3):162-165.
- [18] Jain T, Crowell C, Urdy-Cornejo V, et al. Clostridium Difficile Colonization in Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients: A Prospective Study of the Epidemiology and Outcomes Involving Toxigenic and Nontoxigenic Strains [J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2016, 22(1):157-163.

血浆循环肿瘤DNA基因突变检测国家参考品的应用评价

孙楠 于婷 孙晶 贾峥 曲守方* 黄杰*

[摘要] **目的** 评价血浆循环肿瘤DNA(ctDNA)KRAS/NRAS/EGFR/BRAF/MET基因突变检测国家参考品。**方法** 对87支国家参考品进行血浆游离DNA提取,文库构建,对文库进行高通量测序,测序后的序列比对到参考基因序列上,通过生物信息软件分析,识别携带基因突变的肿瘤DNA序列,获得相关基因突变信息。**结果** 试剂盒检测范围内的国家阳性参考品均检测出相应突变位点,国家阴性参考品和试剂盒检测范围外的阳性参考品均为野生型,可检测50 ng DNA中突变频率为0.3%~1%的检测限参考品。**结论** 该技术方法的试剂盒检测结果符合国家参考品的要求。本国家参考品为ctDNA检测的标准化提供保障。

[关键词] 测序技术;血浆循环肿瘤DNA;国家参考品;标准化

Evaluation of the Application of National Reference Materials for Detection of Plasma Circulating Tumor DNA Gene Mutations

SUN Nan, YU Ting, SUN Jing, JIA Zheng, QU Shoufang*, HUANG Jie*

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

[ABSTRACT] **Objective** To evaluate the national reference material of KRAS/NRAS/EGFR/BRAF/MET gene mutation detection of circulating tumor DNA (ctDNA). **Methods** After the library construction and specific amplification of national reference material, the amplified products were sequenced with high flux. The sequenced sequences were compared with the reference gene sequences. The original plasma DNA template was analyzed and reduced by bioinformatics software. The tumor DNA sequences carrying gene mutations were accurately identified and the relevant gene mutation information was obtained. **Results** The corresponding mutation sites were detected in the positive reference materials within the detection range. The negative reference material and the positive reference outside the detection range were wild type. The detection limit reference material with mutation frequency of 0.3%~1% in 50 ng DNA can be detected. **Conclusion** The test results of this technology meet the requirements of national standard. The national standard provides guarantee for the standardization of ctDNA detection.

[KEY WORDS] Sequencing technology; ctDNA; National Reference Material; Standardization

肺癌是全世界最常见的癌症,每年约有170万人死于该疾病^[1]。液体活检作为一种微创工具,可满足对包括肺癌在内的恶性肿瘤进行实时监测和个性化治疗的迫切需求。细胞循环肿瘤DNA(Circulating tumor DNA, ctDNA)检测是一种

较为成熟的液体活检方式,能够进行纵向监测,全面了解肿瘤的异质性。研究表明使用基于高通量测序又称二代基因测序(next generation sequencing, NGS)的ctDNA分析的灵敏度为75%~90%,检测结果与组织检测高度一致^[2-5]。2016年

基金项目:生殖健康及重大出生缺陷防控研究(2016YFC1000300)

作者单位:中国食品药品检定研究院,北京 100050

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

注:孙楠和于婷同为第一作者

中国肺癌峰会专家小组会议就液体活检达成共识并指出:检测已知的、多个平行临床可药物抑制的靶点,用于发现未知基因,探索疗效监测、预后判断和发现耐药机制等,液体活检技术推荐 NGS 方法^[6]。

本研究使用可逆末端终止测序技术对血浆循环肿瘤 DNA *KRAS/NRAS/EGFR/BRAF/MET* 基因突变检测国家参考品进行检测,用于评价基于二代测序技术平台的以血浆为检测样本的肿瘤基因突变检测试剂盒的性能。

1 材料与方法

1.1 研究对象

血浆 ctDNA *KRAS/NRAS/EGFR/BRAF/MET* 基因突变检测国家参考品,批号:360037-201901,87支/套,4.2 mL/支,血浆样本,由中国食品药品检定研究院(中检院)提供。

1.2 仪器与试剂

Qubit DNA 定量分析仪购自美国 Life technologies 公司,实时荧光定量 PCR 仪购自美国 Life technologies 公司,NextSeq CN500 基因测序分析仪购自杭州贝瑞和康基因诊断技术有限公司,微滴式数字 PCR 系统购自美国 Bio-Rad 公司,文库定量试剂(批号:2109868)购自美国 KAPA Biosystems 公司,DNA 纯化试剂盒(磁珠法)(批号:R0037)购自杭州贝瑞和康基因诊断技术有限公司,人类 *EGFR/ALK/ROS1/RET/KRAS/NRAS/PIK3CA/BRAF/HER2/MET* 基因突变联合检测试剂盒(可逆末端终止测序法)(批号:R3002191001)购自杭州贝瑞和康基因诊断技术有限公司,NextSeq CN500 高通量测序试剂盒(批号:R0300)购自杭州贝瑞和康基因诊断技术有限公司。

1.3 方法

1.3.1 提取与建库

首先提取 ctDNA *KRAS/NRAS/EGFR/BRAF/MET* 基因突变检测国家参考品的血浆游离 DNA,然后采用人类 *EGFR/ALK/ROS1/RET/KRAS/NRAS/PIK3CA/BRAF/HER2/MET* 基因突变联合检测试剂盒(可逆末端终止测序法)对提取的血浆游离 DNA 进行文库构建。在样本 DNA 片段两端添加接头,然后在连接酶的作用下将带有接头的 DNA 片段环化。通过在突变位点附近设计背靠背式引物进行反向 PCR 扩增,富集目标 DNA 片段,获得线性

化的 PCR 扩增产物。构建的文库采用 DNA 纯化试剂盒(磁珠法)试剂盒进行纯化。

1.3.2 终文库质控

终文库经过实时荧光定量 PCR 检测,样品浓度不低于 1 nM,方可进行下一步的上机测序。

1.3.3 测序

将文库进行混合,变性,复性后,加载于芯片上,准备测序用反应试剂,清洁和检查测序芯片,点击 NextSeq Control Software(NCS)图标,NCS 初始化完成后,从 NCS 的主界面点击 Sequence,测序芯片舱门打开,放入芯片,当所有运行前测试都通过,点击 Start,开始测序。

1.3.4 结果判读

通过生物信息软件分析,识别携带基因突变的肿瘤 DNA 序列,获得相关基因突变信息。

2 结果

2.1 终文库质控结果

样品文库浓度均 ≥ 1 nM。见表 1。

表 1 终文库质控结果

Table 1 Final library quality control results

国家参考品 编号	质量值	文库浓度 (nM)	国家参考品 编号	质量值	文库浓度 (nM)
CP_001_01	0.4	5.0	CP_015_01	0.4	5.9
CP_003_01	0.2	3.0	CP_016_01	0.4	5.4
CP_004_01	0.4	5.3	CP_017_01	0.4	5.1
CP_005_01	0.4	5.4	CP_018_01	0.2	3.2
CP_006_01	0.5	6.5	CP_019_01	0.5	6.4
CP_007_01	0.4	6.0	CP_020_01	0.4	5.5
CP_009_01	0.5	6.8	CP_022_01	0.5	7.7
CP_010_01	0.5	7.0	CP_023_01	0.5	6.7
CP_011_01	0.3	4.2	CP_024	0.4	6.1
CP_012_01	0.5	7.7	CP_026_01	0.4	5.3
CP_013_01	0.5	6.6	CP_027	0.4	6.3
CP_014_01	0.4	6.1	CP-000	0.3	4.8

2.2 特异性结果

对国家参考品中的阴性参考品进行检测,试剂盒声称可检测的 27 种突变检测结果的突变 reads 均为 0 条,为突变阴性;基因融合检测,融合突变 reads 数均为 0 条,为融合突变阴性。见表 2。对试剂盒范围外的国家阳性参考品进行检测,试剂盒声称可检测的 27 种突变检测结果均为突变阴性;3 种基因融合检测,为融合突变阴性。

2.3 单核苷酸变异(single nucleotide variant)和插入缺失突变(insertion-deletion)结果

对试剂盒检测范围内的国家阳性参考品进行

表2 阴性参考品检测结果

Table 2 Negative reference result

基因	氨基酸突变	突变DNA片段	总DNA片段	阴性概率值	结论
<i>BRAF</i>	V600E	0	1517	1	阴性
<i>EGFR</i>	G719A	0	2360	1	阴性
<i>EGFR</i>	G719S	0	2372	1	阴性
<i>EGFR</i>	G719C(1)	0	2372	1	阴性
<i>EGFR</i>	E746_A750del(1)	0	2261	1	阴性
<i>EGFR</i>	E746_A750del(2)	0	2269	1	阴性
<i>EGFR</i>	L747_P753>S	0	2260	1	阴性
<i>EGFR</i>	E746_S752>V	0	2213	1	阴性
<i>EGFR</i>	L747_A750>P(2)	0	2232	1	阴性
<i>EGFR</i>	L747_T751del	0	2232	1	阴性
<i>EGFR</i>	T790M	0	2106	0.9	阴性
<i>EGFR</i>	S768I	0	1968	1	阴性
<i>EGFR</i>	D770_N771insG	0	1808	1	阴性
<i>EGFR</i>	L858R(1)	0	1893	1	阴性
<i>EGFR</i>	L861Q	0	1994	1	阴性
<i>HER2</i>	A775_G776insYVMA	0	2513	1	阴性
<i>KRAS</i>	G12S	0	1236	1	阴性
<i>KRAS</i>	G12C	0	1236	1	阴性
<i>KRAS</i>	G12D	0	1239	1	阴性
<i>KRAS</i>	G12A	0	1239	1	阴性
<i>KRAS</i>	G12V	0	1239	1	阴性
<i>KRAS</i>	Q61H	0	1620	1	阴性
<i>MET</i>	L982_D1028del	0	1062	1	阴性
<i>NRAS</i>	G12D	0	1295	1	阴性
<i>NRAS</i>	Q61K	0	1578	1	阴性
<i>NRAS</i>	Q61R	0	1579	1	阴性
<i>PIK3CA</i>	H1047R	0	1781	1	阴性

检测,符合文库下机数据质量要求。对参考品的突变位点检测,突变 reads 数均大于1,均为相应位点的突变阳性。见表3。

2.4 检测限结果

对试剂盒检测范围内的1%和0.3%突变频率检测限参考品进行检测,标注的*KRAS/NRAS/EGFR/BRAF/MET*基因突变位点和其他突变位点均检出阳性。对试剂盒检测范围内的*EGFR/MET*基因拷贝数扩增阳性参考品进行检测,结果检出阳性。对试剂盒检测范围内的0.1%突变比例检测限参考品进行检测,根据试剂盒声称的检测限,标注的*KRAS/NRAS/EGFR/BRAF/MET*基因突变位点和其他突变位点检出(不高于0.1%突变频率)或未检出。见表4。

3 讨论

液体活检可用于晚期癌患者或由于其它原因不能获取肿瘤组织样本的患者^[7-8],主要应用于个性化用药指导,肿瘤发展过程监测等^[9]。液体活检最大的挑战是肿瘤患者体内 ctDNA 浓度可低至整个循环 DNA 的 0.01%^[10-11],因此对于检测技术检测下限的研究很重要。有研究表明可使用细胞系或基因编辑的细胞系作为标准化的样本,对检测限附近的检出能力进行研究验证^[12]。另外基于 NGS 的方法检测 ctDNA 时,需要使用超深测序(>10 000×原始覆盖),以达到适合检测限(≤0.1%)^[13-14]。

目前没有关于高通量测序法检测 ctDNA 的行业标准,也没有相关的国家参考品或国际参考品。据国家卫生健康委临床检验中心公布《2019年肿瘤游离 DNA(ctDNA)基因突变检测室间质量评价》结果,我国各实验室 ctDNA 基因突变检测总

表3 阳性参考品检测结果

Table 3 Positive reference result

国家参考品编号	基因	外显子	碱基突变	氨基酸突变	突变DNA片段	总DNA片段	突变丰度	结论
CP_001_01	<i>KRAS</i>	2	c.35G>A	G12D	48	1158	0.04	阳性
CP_001_01	<i>PIK3CA</i>	21	c.3140A>G	H1047R	46	1474	0.03	阳性
CP_003_01	<i>KRAS</i>	2	c.34G>T	G12C	86	1937	0.04	阳性
CP_004_01	<i>KRAS</i>	2	c.35G>C	G12A	67	1695	0.04	阳性
CP_006_01	<i>KRAS</i>	2	c.34G>A	G12S	51	1690	0.03	阳性
CP_009_01	<i>NRAS</i>	3	c.181C>A	Q61K	103	2561	0.04	阳性
CP_010_01	<i>NRAS</i>	3	c.182A>G	Q61R	65	2185	0.03	阳性
CP_011_01	<i>BRAF</i>	15	c.1799T>A	V600E	145	2495	0.06	阳性
CP_016_01	<i>PIK3CA</i>	21	c.3140A>G	H1047R	80	2312	0.03	阳性
CP_016_01	<i>EGFR</i>	19	c.2240_2257del18	L747_P753>S	3	2700	0.00	阳性
CP_018_01	<i>EGFR</i>	20	c.2369C>T	T790M	104	2633	0.04	阳性
CP_018_01	<i>EGFR</i>	21	c.2573T>G	L858R(1)	128	2544	0.05	阳性
CP_019_01	<i>EGFR</i>	18	c.2155G>A	G719S	78	3155	0.02	阳性
CP_020_01	<i>EGFR</i>	21	c.2573T>G	L858R(1)	104	1900	0.05	阳性
CP_020_01	<i>EGFR</i>	20	c.2369C>T	T790M	60	1884	0.03	阳性
CP_022_01	<i>EGFR</i>	19	c.2236_2250del15	E746_A750del(2)	140	2849	0.05	阳性
CP_023_01	<i>EGFR</i>	19	c.2239_2248>C	L747_A750>P(2)	156	2408	0.06	阳性

表4 检测限参考品结果

Table 4 Detection limit reference result

基因	外显子	氨基酸突变	碱基突变	最低检出限 (%)
EGFR	18	G719A	c.2156G>C	0.3
	18	G719S	c.2155G>A	0.3
	18	G719C	c.2155G>T	0.3
	19	E746_A750del(1)	c.2235_2249del115	0.5
	19	E746_A750del(2)	c.2236_2250del115	0.1
	19	L747_P753>S	c.2240_2257del118	0.5
	19	E746_S752>V	c.2237_2255>T	0.5
	19	L747_A750>P	c.2239_2248>C	0.1
	19	L747_T751del	c.2240_2254del115	0.5
	20	T790M	c.2369C>T	0.3
	20	S768I	c.2303G>T	0.5
	20	D770_N771insG	c.2310_2311insGGT	0.3
	21	L858R	c.2573T>G	0.3
	21	L861Q	c.2582T>A	0.3
KRAS	2	G12D	c.35G>A	0.3
	2	G12A	c.35G>C	0.1
	2	G12V	c.35G>T	0.3
	2	G12S	c.34G>A	0.1
	2	G12C	c.34G>T	0.1
	3	Q61H	c.183A>C	0.3
NRAS	2	G12D	c.35G>A	0.1
	3	Q61R	c.182A>G	0.1
PIK3CA	3	Q61K	c.181C>A	0.1
	21	H1047R	c.3140A>G	0.3
BRAF	15	V600E	c.1799T>A	0.1
HER2	20	A775_G776insYVMA	c.2324_2325ins12*	0.1
MET	14	L982_D1028del	c.2942_3082del1141	0.5

注:*代表序列 ATACGTGATGGC。

体合格率仅为 80%，其中 173 个假阳性突变结果、67 个假阴性结果。

为评价基于不同 NGS 平台的液体活检试剂盒的质量和性能，开展 ctDNA 检测标准化研究，中检院建立了血浆 ctDNA KRAS/NRAS/EGFR/BRAF/MET 基因突变检测国家参考品（批号：360037-201901）用于相关试剂盒的性能评价，包括准确性、特异性及检测限^[15]。该参考品对试剂盒检测范围内标注的基因突变位点均应检出；对试剂盒检测范围外标注的基因突变位点均不应检出；对试剂盒检测范围内的 1% 和 0.3% 突变比例检测限参考品进行检测，标注的基因突变位点均应检出。

参考品原料系提取自野生型或各种基因突变细胞系基因组 DNA，经酶切打断后，加入血浆样本中。为保证国家参考品的换批连续性，本参考品通过建立永生细胞系，获得细胞基因组 DNA 作为原料。本研究的局限性在于国家参考品不包括融合突变的基因类型，因此未对试剂盒的 ALK、ROS1、RET 三个基因的融合突变的检测能力进行评价。

本研究是基于高通量测序平台，首先利用环化单分子扩增，获得线性化的 PCR 扩增产物。然后通过对扩增产物进行高通量测序，准确识别携带基因突变的肿瘤 DNA 序列，获得相关基因突变信息。该技术能够满足血浆 ctDNA KRAS/NRAS/EGFR/BRAF/MET 基因突变检测国家参考品的要求，为 ctDNA 肿瘤基因检测提供了一种可靠的检测方法。

综上所述，血浆 ctDNA KRAS/NRAS/EGFR/BRAF/MET 基因突变检测国家参考品可以有效保障 ctDNA 检测的准确性，可以提升相关诊断试剂的质量控制水平，有利于加快循环肿瘤 DNA 检测标准化的进程。

参考文献

- [1] Freddie B, Jacques F, Isabelle S, et al. Global cancer statistics 2018: globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6):394-424.
- [2] Dagogo JI, Ritterhouse LL. The role of plasma genotyping in ALK- and ROS1-rearranged lung cancer [J]. Transl Lung Cancer Res, 2020, 9(6):2557-2570.
- [3] Aggarwal C, Thompson JC, Black TA, et al. Clinical implications of plasma-based genotyping with the delivery of personalized therapy in metastatic non-small cell lung cancer [J]. JAMA Oncol, 2019, 5(2): 173-180.
- [4] Sabari JK, Offin M, Stephens D, et al. A prospective study of circulating tumor DNA to guide matched targeted therapy in lung cancers [J]. J Natl Cancer Inst, 2019, 111(6):575-583.
- [5] 刘小云, 吴小延, 邵琼, 等. 基于分子标签二代测序技术的非小细胞肺癌驱动基因变异分析 [J]. 分子诊断与治疗杂志, 2019, 11(6):468-473.
- [6] 中国临床肿瘤学会, 中国抗癌协会肺癌专业委员会. 液体活检: 规范与精准同行 [J]. 循证医学, 2016, 16(4):193-197.
- [7] Blanc DF, Florescu M, Tehfe M, et al. Improvement of EGFR Testing over the last decade and impact of delaying TKI initiation [J]. Curr Oncol, 2021, 28(2):1045-1055.
- [8] Schwartzberg LS, Horinouchi H, Chan D, et al. Liquid biopsy mutation panel for non-small cell lung cancer: analytical validation and clinical concordance Arch [J]. NPJ Precis Oncol, 2020, 4(1):15-15.
- [9] Wan JCM, Massie C, Garcia CJ, et al. Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumour DNA [J]. Nat Rev Cancer, 2017, 17(4):223-238.
- [10] Yong E. Cancer biomarkers: Written in blood [J]. nature, 2014, 511(7511):524-526.
- [11] Jiang P, Chan CW, Chan KC, et al. Lengthening and shortening of plasma DNA in hepatocellular carcinoma patients [J]. P natl Acad Sci Usa, 2015, 112(11): E1317-1325.

(下转第 1397 页)

结肠镜检查联合血清 CEA、TuM2-PK 检测对结肠癌的诊断价值

王计 吴小微* 晏妮

[摘要] **目的** 探讨结肠镜检查联合 CEA、TuM2-PK 对结肠癌的诊断价值。**方法** 选取 2019 年 1 月至 2020 年 12 月武汉科技大学附属汉阳医院 150 例疑似结肠癌患者,根据术后病理检查结果分为结肠癌组与非结肠癌组,分析结肠镜下检视结果、血清 CEA、TuM2-PK 水平,并评价结肠镜检查、血清 CEA、TuM2-PK 水平对结肠癌的诊断价值。**结果** 150 例疑似结肠癌患者恶性比例 66.67%;结肠癌组结肠镜下检出率、血清 CEA、TuM2-PK 水平均高于非结肠癌组,且不同病理分期、分化程度及是否淋巴结转移与结肠癌患者结肠镜下检出率、血清 CEA、TuM2-PK 水平相比,差异有统计学意义($P<0.05$);结肠镜下检查结肠癌患者血清 CEA、TuM2-PK 水平均高于非结肠癌患者($P<0.05$);ROC 曲线显示,结肠镜下检查结果、血清 CEA、TuM2-PK 水平联合诊断结肠癌 AUC 最大,为 0.961。**结论** 结肠镜下检查、血清 CEA、TuM2-PK 均可用于疑似病例的结肠癌诊断及病情、病理评价,联合使用可提高结肠癌诊断价值,实现早发现早治疗。

[关键词] 结肠镜; 癌胚抗原; 肿瘤 M2 型丙酮酸激酶; 结肠癌

The value of colonoscopy combined with serum CEA and TuM2-PK in the diagnosis of colon cancer

WANG Ji, WU Xiaowei*, YAN Ni

(Department of Gastroenterology, Hanyang Hospital Affiliated to Wuhan University of Science and Technology, Wuhan, Hubei, China, 430050)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the diagnostic value of colonoscopy combined with CEA and TuM2-PK for colon cancer. **Methods** A total of 150 patients with suspected colon cancer in Hanyang Hospital Affiliated to Wuhan University of Science and Technology from January 2019 to December 2020 were selected and divided into the colon cancer group and the non-colon cancer group according to the results of post-operative pathological examination. The results of colonoscopy examination, serum CEA, TuM2-PK were analyzed to evaluate the value of colonoscopy, serum CEA and TuM2-PK levels in the diagnosis of colon cancer. **Results** The malignant ratio of 150 patients with suspected colon cancer was 66.67%. The colonic cancer group' colonoscopy detection rate, serum CEA, and TuM2-PK levels were higher than those in the non-colon cancer group, and the different pathological stages, degree of differentiation, and lymph node metastasis were compared with colon cancer patients' colonoscopy detection rate, serum CEA and TuM2-PK levels, the difference was statistically significant ($P<0.05$). The serum CEA and TuM2-PK levels of colon cancer patients under colonoscopy were higher than those of non-colon cancer Patients ($P<0.05$). The ROC curve showed that the combined diagnosis of colon cancer with colonoscopy, serum CEA, and TuM2-PK levels had the highest AUC, which was 0.961. **Conclusion** Colonoscopy, serum CEA, and TuM2-PK can be used for colon cancer diagnosis and disease condition and pathological evaluation. The combination of various indicators can improve the diagnostic value of colon cancer and realize early detection and early treatment.

[KEY WORDS] Colonoscopy; Carcinoembryonic antigen; Tumor M2 pyruvate kinase; Colon cancer

基金项目:国家卫生计生委医药卫生科技发展研究中心课题(W2015JZC30)

作者单位:武汉科技大学附属汉阳医院消化内科,湖北,武汉 430050

*通信作者:吴小微, E-mail:1030896487@qq.com

结肠癌是常见消化道恶性肿瘤,发病率居于胃肠道恶性肿瘤第三位^[1]。研究报道,早期结肠癌临床治愈率达90%左右^[2]。但结肠癌早期症状相对隐匿,发现时多已处于中晚期,错失最佳治疗时机^[3]。因此,结肠癌早期诊疗对提高患者生存率及生活质量具有重要临床意义。结肠镜下检查可直接观察消化道黏膜,并获取组织进行病理活检,可实现对结肠癌的早期诊疗,但结肠镜下检查质量受多种因素影响,临床应用存在一定局限性^[4]。血清肿瘤标志物在恶性肿瘤诊断中具有简便、高效、无创的特点。癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA)是结肠癌最常用肿瘤标志物之一^[5];肿瘤 M2 型丙酮酸激酶(Tumor M2 pyruvate kinase, TuM2-PK)是近年来发现与结肠癌有关的新标志物,其诊断价值尚未完全阐明^[6]。本研究尝试分析经结肠镜诊断联合 CEA、TuM2-PK 对结肠癌的诊断价值。报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2019 年 1 月至 2020 年 12 月武汉科技大学附属汉阳医院 150 例疑似结肠癌患者作为研究对象,根据病理检查结果分为结肠癌组与非结肠癌组。疑似结肠癌患者纳入标准:均存在肠梗阻症状,如腹胀,腹痛(绞痛或胀痛),便秘或排便困难,腹部可触及肿块;术前均未行放疗化疗治疗;患者或其家属均对本研究知情并签署同意书。排除标准:合并其他部位肿瘤;合并肺、心、胃、肝等重要脏器疾病;急慢性炎症;哺乳或妊娠期女性。男 88 例,女 62 例,年龄平均(55.94±8.63)岁。本研究经医院伦理委员会批准。

1.2 方法

①结肠镜下检查:选用 Olympus CF H260AI 电子结肠镜(日本奥林巴斯公司),检查前 3 d 需控制饮食,以少渣或无渣食物为主,检测当日禁食,上午 9:30 服用 1 包洗肠液,1 000 mL 开水冲泡,分 3 次服用,1 次/30 min,若排便仍存在残留粪渣,需再外加 1 次,直至排出物呈清水状。服用期间若出现不良反应,及时联系医护人员,必要时行灌肠清洁。随后行常规结肠镜下检查。结肠癌诊断标准^[7]:排列不规则的ⅢS、ⅢL、Ⅳ型 pit,或无结构 pit。②血清 CEA、TuM2-PK 检测:术前取空腹静脉血 5 mL,离心(3 000 r/min, 5 min,离心半径 5 cm),取血清,CEA 采用化学发光法测定,拜

耳(美国)分公司试剂盒;TuM2-PK 采用酶联免疫吸附法测定,苏州卡尔文公司试剂盒,根据 ROC 截断值进行诊断。

1.3 统计学方法

采用统计学软件 SPSS 22.0 处理数据,计数资料以 $n(\%)$ 描述,计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 描述;诊断价值采用受试者工作特征(ROC)曲线,获取 AUC,联合预测实施 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,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 术后病理检查结果

150 例疑似结肠癌患者经术后病理检查,确诊 100 例恶性,占 66.67%。见表 1。

表 1 疑似结肠癌患者术后病理检查结果

Table 1 Postoperative pathological examination results of patients with suspected colon cancer

部位	n	病理检查结果(例)		恶性比例(%)
		良性	恶性	
乙状结肠	53	19	34	64.15
降结肠	38	14	24	63.16
横结肠	23	9	14	60.87
升结肠	25	5	20	80.00
回盲部	11	3	8	72.73
合计	150	50	100	66.67

2.2 两组结肠镜下检查结果、血清 CEA、TuM2-PK 水平

结肠癌组结肠镜下检查检出率、血清 CEA、TuM2-PK 水平均高于非结肠癌组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 两组结肠镜下检查结果、血清 CEA、TuM2-PK 水平对比 [$n(\%)$, $(\bar{x} \pm s)$]

Table 2 Comparison of the results of colonoscopy, serum CEA and TuM2-PK levels between 2 groups [$n(\%)$, $(\bar{x} \pm s)$]

组别	n	结肠镜下的阳性率	CEA (ng/mL)	TuM2-PK (U/mL)
结肠癌	100	71(71.00)	65.47±12.41	21.92±5.83
非结肠癌	50	27(54.00)	5.69±1.28	11.76±3.25
χ^2 值		4.253	33.915	11.453
P值		0.039	<0.001	<0.001

2.3 不同病理特征患者结肠镜下检查结果、血清 CEA、TuM2-PK 水平

不同病理分期、分化程度及淋巴结转移与否患者结肠镜下检出率、血清 CEA、TuM2-PK 水平相比,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 3。

表3 不同病理特征患者结肠镜下检查结果、血清CEA、TuM2-PK水平 [n(%), ($\bar{x} \pm s$)]

Table 3 Colonoscopy results, serum CEA and TuM2-PK levels in patients with different pathological characteristics

病理特征	n	结肠镜下阳性率	CEA (ng/mL)	TuM2-PK (U/mL)
病理分期				
II期	57	30(52.63)	59.83±9.84	18.85±4.02
III期	33	31(93.94)	70.12±11.25	24.69±4.58
IV期	10	10(100.00)	82.27±15.87	30.28±6.03
χ^2/t 值		26.807	22.100	37.948
P值		<0.001	<0.001	<0.001
分化程度				
高分化	35	9(25.71)	57.49±7.28	18.69±3.98
中分化	32	29(90.63)	65.24±10.31	22.14±4.14
低分化	33	33(100.00)	74.16±12.96	25.13±5.28
χ^2/t 值		54.325	21.872	17.470
P值		<0.001	<0.001	<0.001
淋巴结转移				
无	75	47(62.67)	59.27±9.82	19.82±4.96
有	25	24(96.00)	84.07±11.25	28.22±5.82
χ^2/t 值		14.147	10.540	7.017
P值		<0.001	<0.001	<0.001

2.4 结肠镜下检查结果与血清CEA、TuM2-PK水平的关系

结肠镜下检查结肠癌患者血清CEA、TuM2-PK水平均高于非结肠癌患者,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表4。

表4 结肠镜下检查结果、血清CEA、TuM2-PK水平对比 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Comparison of examination results under colonoscopy, serum CEA and TuM2-PK levels ($\bar{x} \pm s$)

结肠镜下检查结果	n	CEA (ng/mL)	TuM2-PK (U/mL)
结肠癌	71	69.52±14.27	22.69±6.01
非结肠癌	27	5.41±1.19	10.52±3.17
t值		23.240	9.985
P值		<0.001	<0.001

2.5 结肠镜下检查结果、血清CEA、TuM2-PK水平对结肠癌的诊断价值

绘制ROC曲线分析结果:血清CEA、TuM2-PK水平联合诊断结肠癌AUC最大,诊断效能良好,最佳敏感度、特异度分别为86.00%、96.00%。见表5,图1。

表5 结肠镜下检查结果、血清CEA、TuM2-PK水平对结肠癌的诊断价值

Table 5 The value of colonoscopy examination results, serum CEA and TuM2-PK levels in the diagnosis of colon cancer

指标	AUC	95%CI	Z值	截断值	敏感度(%)	特异度(%)	P值
结肠镜下检查	0.585	0.502-0.665	2.011	阳性	71.00	46.00	<0.001
CEA	0.883	0.821-0.930	13.759	>32.75 ng/mL	82.00	92.00	<0.001
TuM2-PK	0.834	0.765-0.890	10.171	>19.74 U/mL	68.00	90.00	<0.001
联合诊断	0.961	0.917-0.986	32.011		86.00	96.00	<0.001

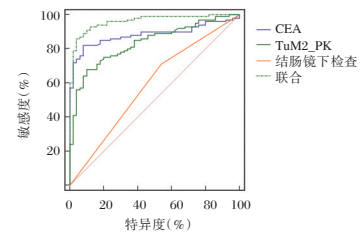


图1 ROC曲线

Figure 1 ROC curve

3 讨论

近年来,随社会高度发展,人们饮食结构、生活规律等均发生显著变化,我国结肠癌发病率呈逐年增加趋势,对人们生命质量构成严重威胁。本研究结果符合高显华等^[8]、李东言等^[9]研究报道。这是由于病理学诊断是取自患者病变组织及细胞进行鉴别。进一步表明术后病理检查是临床诊断结肠癌的金标准。目前,早诊断、早治疗已成为人们对肿瘤治疗的一种共识。目前,结肠镜下检查仍是结肠癌有效的诊断手段^[10]。本研究数据显示,结肠癌患者结肠镜下检出率均高于非结肠癌患者,且可用于结肠癌病理分期、分化程度及淋巴结转移评估。但研究报道,肠道准备质量、退镜时间、内镜技术、盲肠插管率等多种因素均可对结肠镜检查质量产生影响^[11]。本研究结果表明单一结肠镜下检查对结肠癌诊断存在一定局限性。

随分子生物学标志物发展,越来越多的血清肿瘤标志物应用于临床,检测其水平有助于结肠癌早期诊断、治疗及预后判断。同时,血清肿瘤标志物检测具有简便、创伤小、客观性强等特点。CEA是位于细胞质内的糖蛋白,在结肠癌^[12]、胃癌^[13]等多种癌组织中异常表达,为广谱肿瘤标志物。癌细胞所产生的CEA随肿瘤细胞的极性紊乱释放到血液中,导致血清CEA水平升高^[14]。同时,研究显示,CEA与宿主肿瘤发病部位的抗肿瘤免疫密切相关,为预后判定提供参考^[15]。PK是糖酵解途径的关键酶,在肿瘤细胞的代谢途径中发挥着重要作用。正常细胞中TuM2-PK以二聚体形式参与糖无氧酵解,

而肿瘤细胞中 TuM2-PK 则以四聚体形式存在,阻碍肿瘤细胞中糖酵解的终末代谢过程,导致中间代谢产物堆积,肿瘤细胞快速增殖^[16]。冯妮等^[17]研究显示,结肠癌患者血清 CEA、TuM2-PK 水平及阳性表达率均显著高于同期良性结肠病和体检健康者。本研究结果提示血清 CEA、TuM2-PK 高表达与结肠癌病情与病理状况存在一定相关性。

本研究结果提示结肠镜下检查结果与血清 CEA、TuM2-PK 水平存在一定相关性。推测结肠镜联合血清 CEA、TuM2-PK 检测对结肠癌诊断可能具有协同作用。ROC 曲线显示,各指标联合诊断 AUC 达 0.961,高于单独预测。提示临床可同时进行结肠镜下检查及血清 CEA、TuM2-PK 检测,为结肠癌诊断提供更全面、可靠的参考信息。分析认为,结肠镜下过程中可能存在肿瘤组织定位欠佳、黏膜下肿瘤导致无黏膜狭窄、生理发生弯曲无法进镜等,导致镜像假象或遗漏。

综上所述,结肠镜下检查、血清 CEA、TuM2-PK 均可用于结肠癌诊断及病情、病理状况评价,各指标联合可提高结肠癌诊断价值,实现早发现早治疗。本研究亦存在一定程度不足之处,如样本量相对较少、缺乏与同级或上级医疗机构的协同性研究,后续研究可对此进行改进,以获得更加精准的研究结论。

参考文献

[1] 孙清森,孙连生,徐建利,等. 结肠癌患者组织中 AKT2、Annexin A1 表达水平及其临床意义[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2019, 11(3): 194-197, 208.

[2] Huang MY, Huang CM, Tsai HL, et al. Comparison of adjuvant FOLFOX4 chemotherapy and oral UFUR/LV following adjuvant FOLFOX4 chemotherapy in patients with stage III colon cancer subsequent to radical resection[J]. *Oncol Lett*, 2017, 14(6): 6754-6762.

[3] 唐丹,刘勋,杨志惠. 沉默 GTPBP4 基因对结肠癌细胞生物学行为的影响及机制[J]. 山东医药, 2019, 59(1): 34-37.

[4] 李萍英,李娟,杨永耿,等. 高原地区结肠镜检查质量临床

观察及干预对策分析[J]. 中华消化内镜杂志, 2020, 37(7): 510-513.

[5] 毛海波,朱国栋,方润娅,等. 血管生成素-2、血管内皮生长因子、糖类抗原 199 及癌胚抗原对结肠癌诊断和复发转移的预测价值[J]. 实用医学杂志, 2019, 35(3): 428-432.

[6] 樊晓静,史志涛,孙昕. TuM2-PK、TK1、CEA、CA19-9 和 CA72-4 在结肠癌患者诊断中的意义[J]. 中国老年学杂志, 2019, 39(4): 814-816.

[7] 中华医学会消化内镜学分会,中国抗癌协会肿瘤内镜学专业委员会. 中国早期结直肠癌筛查及内镜诊治指南(2014, 北京)[J]. 中华医学杂志, 2015, 95(28): 2235-2252.

[8] 高显华,于冠宇,刘鹏,等. 左半结肠癌与右半结肠癌临床病理特征及预后的比较[J]. 中华胃肠外科杂志, 2017, 20(6): 647-653.

[9] 李东言,杜斌,郑燕君,等. 结肠癌经肠镜诊断及病理结果与 CEA、CA199 水平的相关性分析[J]. 中国实验诊断学, 2018, 22(10): 1744-1746.

[10] Chen S, Zhang YM, Zhang YG, et al. Potentiation of treatment efficacy against colon cancer of dopamine via elevating KLF2 expression in tumor vascular endothelial cells[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2017, 21(21): 4860-4866.

[11] 吴瑞,王骥,季文雅,等. 结肠镜检查质量的影响因素及其控制[J]. 胃肠病学, 2019, 24(12): 758-761.

[12] 孙宁宇,梁育飞,石亮. CA724、CA242 联合 CEA 预测结肠癌预后的临床价值研究[J]. 现代消化及介入诊疗, 2019, 24(4): 405-407.

[13] 王宁,付立业,隋承光,等. 胃癌患者血清中 IGF-1 与 CEA、CA125、CA199、CA724 水平的相关性分析及在胃癌诊断中的意义[J]. 中国实验诊断学, 2021, 25(2): 194-197.

[14] Laurino MY, Truitt AR, Tenney L, et al. Clinical verification of genetic results returned to research participants: findings from a colon cancer family registry[J]. *Mol Genet Genomic Med*, 2017, 5(6): 700-708.

[15] 吴胜文,周蓉. 癌胚抗原在 II A 期结肠癌中的预后意义: 一项基于严格倾向性得分匹配的大样本量回顾性研究[J]. 中国现代普通外科进展, 2020, 23(3): 173-177+181.

[16] 杨刚,唐丽娟. 血清 TuM2-PK、CEA、CA19-9 和 CA72-4 对结肠癌的筛查价值[J]. 检验医学与临床, 2017, 14(1): 35-36, 39.

[17] 冯妮,李晓琳. 血清癌胚抗原、糖类抗原 199 和肿瘤 M2 型丙酮酸激酶联合检测在结肠癌诊断中的价值[J]. 新乡医学院学报, 2018, 35(3): 182-184.

(上接第 1393 页)

[12] 吴传松,史裕英,傅继欢. 美国临床肿瘤学会(ASCO)和美国病理学家协会(CAP)关于循环肿瘤 DNA(ctDNA)检测研究进展概述[J]. 中国医疗器械信息, 2018, 23(2): 3-6.

[13] Travis AC, Jon C, Mark K, et al. Analytical Validation of a Hybrid Capture-Based Next-Generation Sequencing Clinical Assay for Genomic Profiling of Cell-Free Circulating Tumor DNA[J]. *J Mol Diagn*, 2018, 20(5): 686-702.

[14] Plagnol V, Woodhouse S, Howarth K, et al. Analytical validation of a next generation sequencing liquid biopsy assay for high sensitivity broad molecular profiling[J]. *PLoS One*, 2018, 13(3): e0193802.

[15] Xu J, Qu S, Sun N, et al. Construction of a reference material panel for detecting KRAS/NRAS/EGFR/BRAF/MET mutations in plasma ctDNA[J]. *J Clin Pathol*, 2020, Online ahead of print.

ChE、hs-CRP、PCT与老年维持性透析IPS分值关系及联合诊断导管相关感染价值

张世同* 束永兵 方美双 宣文

[摘要] **目的** 探究胆碱酯酶(ChE)、超敏C反应蛋白(hs-CRP)、降钙素原(PCT)与老年维持性透析患者感染可能性评分(IPS)分值的诊断及联合诊断导管相关感染的价值。**方法** 选取安徽省六安市中医院血液净化中心老年维持性透析患者102例,根据是否发生导管相关感染分为感染组(28例)与未感染组(74例),比较两组临床资料、IPS评分、血清ChE、hs-CRP、PCT水平,分析各血清指标与IPS评分、导管相关感染的关系,评价血清ChE、hs-CRP、PCT诊断价值。**结果** 感染组透析时间 ≥ 1 年患者比例71.43%(20/28)、贫血患者比例42.86%(12/28)、低蛋白血症患者比例50.00%(14/28)、糖尿病患者比例35.71%(10/28)、IPS分值(14.02 ± 2.79)分均高于未感染组,差异有统计学意义($P < 0.05$);感染组血清ChE低于未感染组,血清hs-CRP、PCT水平高于未感染组,差异有统计学意义($P < 0.05$);血清ChE与老年维持性透析患者IPS分值呈负相关,hs-CRP、PCT与IPS分值呈正相关,且均为导管相关感染发生的影响因素($P < 0.05$);血清ChE、hs-CRP、PCT联合诊断导管相关感染的曲线下面积(AUC)为0.923。**结论** 血清ChE、hs-CRP、PCT与老年维持性透析患者IPS分值密切相关,各指标联合在导管相关感染诊断方面具有较高诊断效能。

[关键词] 维持性透析;导管相关感染;胆碱酯酶;超敏C反应蛋白;降钙素原;感染可能性评分

The relationship between ChE, hs-CRP, PCT and the IPS score of elderly maintenance dialysis and the value of combined diagnosis of catheter-related infections

ZHANG Shitong*, SHU Yongbing, FANG Meishuang, XUAN Wen

(Blood Purification Center, Lu'an Hospital of Traditional Chinese Medicine, Lu'an, Anhui, China, 237000)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the relationship and joint diagnosis of cholinesterase (ChE), high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP), procalcitonin (PCT) and the infection probability score (IPS) of elderly maintenance dialysis patients and the value of catheter-related infections. **Methods** A total of 102 elderly maintenance dialysis patients in Blood Purification Center, Lu'an Hospital of Traditional Chinese Medicine were selected and divided into an infected group (28 cases) and an uninfected group (74 cases) according to whether they had catheter-related infections. The clinical data, IPS scores, and serum levels of ChE, hs-CRP, and CRP were compared between the two groups. The relationship between the serum indicators and IPS score, catheter-related infection was analyzed, and the diagnostic value of serum ChE, hs CRP and PCT was evaluated. **Results** In the infection group, the proportion of patients with dialysis time ≥ 1 year was 71.43% (20/28), the proportion of anemia patients was 42.86% (12/28), the proportion of hypoproteinemia patients was 50.00% (14/28), and the proportion of diabetic patients was 35.71% (10/28). The IPS score (14.02 ± 2.79) was higher than that of the uninfected group, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The serum ChE of the infected group was lower than that of the uninfected group, and the serum hs-CRP and PCT levels were higher than those of the uninfected group. In the infection group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Serum ChE was negatively correlated with the IPS scores of elderly maintenance dialy-

基金项目:国家自然科学基金委员会(1508085MH198)

作者单位:安徽省六安市中医院血液净化中心,安徽,六安 237000

*通信作者:张世同, E-mail: zhangshitong2021@126.com

sis patients, and hs-CRP, PCT and IPS scores were positively correlated, and they were all affected by the occurrence of catheter-related infections factors ($P<0.05$). The area under the curve (AUC) for the combined diagnosis of serum ChE, hs-CRP, and PCT for catheter-related infections was 0.923. **Conclusion** Serum ChE, hs-CRP, PCT are closely related to the IPS score of elderly maintenance dialysis patients, and the combination of these indicators has a high diagnostic efficiency in the diagnosis of catheter-related infections.

[KEY WORDS] Maintenance dialysis; Catheter-related infection; Cholinesterase; High-sensitivity C-reactive protein; Procalcitonin, Infection probability score

维持性透析是临床治疗终末期肾病的主要方法,报道显示,维持性透析患者治疗期间导管相关感染发生风险较高,尤其是老年患者,是导致患者死亡的主要因素^[1]。因此,维持性透析导管相关感染的规范化诊治仍然是推进腹透事业的重要环节。近年来,感染相关因子在导管相关感染的诊断中得到广泛应用,其中超敏C反应蛋白(high-sensitivity C-reactive protein, hs-CRP)较为常见,具有较高诊断敏感性^[2]。降钙素原(Procalcitonin, PCT)是一个细菌性感染指标,在临床诊断细菌性感染及评估疗效方面具有良好应用价值^[3]。此外,国内外均有研究^[4-5]证实感染可引起胆碱酯酶(Cholinesterase, ChE)水平降低,对其水平进行检测有助于反映感染病情。为进一步提高老年维持性透析患者导管相关感染的诊断效能,本研究尝试探究ChE、hs-CRP、PCT与患者感染可能性评分(Infection probability score, IPS)分数的关系及联合诊断导管相关感染的价值。报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取安徽省六安市中医院血液净化中心2018年1月至2020年3月老年维持性透析患者102例,纳入标准:①原发病发展至终末阶段,均于本院行维持性透析治疗;②年龄 ≥ 60 岁;③近期无肺部感染、泌尿系感染等其他感染性疾病;④无神经系统疾病或心理疾病,能正常沟通交流;⑤患者及家属知晓本研究,已签署同意书。排除标准:①血液系统疾病患者;②严重心脑血管疾病、肝肾功能障碍患者;③近3个月内有骨折史、手术史者;④自身免疫性疾病患者;⑤恶性肿瘤患者。其中男57例,女45例;年龄平均(68.14 \pm 3.17)岁;原发病:慢性肾小球肾炎24例,高血压肾损害56例,糖尿病肾病22例。所有患者均于入组当天参照《腹膜透析相关感染的防治指南》^[6]中相关诊断标准判断是否发生导管相关感染,将发生导管相关感染者纳入感染

组(28例),未发生导管相关感染者纳入未感染组(74例)。本实验经医院伦理委员会批准。

1.2 方法

所有患者均于入组当天采集外周静脉血5 mL,离心处理取血清,采用丁酰硫代胆碱法检测血清ChE水平,试剂盒购自上海高创化学科技有限公司,采用酶联免疫吸附试验测定血清hs-CRP、PCT水平,试剂盒购自北京百奥莱博科技有限公司。

1.3 观察指标

①两组临床资料、IPS分值,临床资料包括性别、年龄、透析时间、合并症(贫血、低蛋白血症、糖尿病、心功能不全),IPS包含心率(12分)、体温(2分)、白细胞计数(3分)、序贯性器官功能衰竭(2分)、呼吸频率(1分)、C反应蛋白(6分),分值 ≥ 13 分为重症感染, <13 分为一般感染^[7]。②两组血清ChE、hs-CRP、PCT水平,分析各血清指标与IPS分值、导管相关感染的关系,评价血清ChE、hs-CRP、PCT诊断导管相关感染的价值。

1.4 统计学方法

数据处理采用SPSS 22.0软件,计数资料以 $n(\%)$ 表示,采用 χ^2 检验,计量资料以 $(\bar{x}\pm s)$ 描述,采用独立样本 t 检验,相关性分析采用Pearson相关系数模型,通过Logistic进行多因素回归分析,诊断效能分析采用受试者工作特征(ROC)曲线,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组临床资料

两组性别、年龄、心功能不全差异无统计学意义($P>0.05$);两组透析时间、贫血、低蛋白血症、糖尿病、IPS分值比较差异有统计学意义($P<0.05$)。见表1。

2.2 两组血清ChE、hs-CRP、PCT水平

感染组血清ChE水平较未感染组低,血清hs-CRP、PCT水平较未感染组高,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表2。

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

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

资料	感染组(n=28)	未感染组(n=74)	t/χ^2 值	P值
年龄(岁)	68.45±3.30	67.83±3.06	0.894	0.374
性别(男/女)	15/13	42/32	0.084	0.773
透析时间(年)			4.761	0.029
<1	8(28.57)	39(52.70)		
≥1	20(71.43)	35(47.30)		
合并症				
心功能不全	7(25.00)	16(21.62)	0.133	0.716
贫血	12(42.86)	13(17.57)	7.022	0.008
低蛋白血症	14(50.00)	10(13.51)	15.030	<0.001
糖尿病	10(35.71)	12(16.22)	4.565	0.033
IPS分值(分)	14.02±2.79	10.35±1.46	8.649	<0.001

表2 两组血清ChE、hs-CRP、PCT水平比较 $(\bar{x} \pm s)$

Table 2 Comparison of serum ChE, hs-CRP and PCT levels between 2 groups $(\bar{x} \pm s)$

组别	n	ChE(U/L)	hs-CRP(mg/L)	PCT(μ g/L)
感染组	28	6371.53±1844.64	32.64±10.15	1.72±0.57
未感染组	74	8286.20±2159.37	21.75±6.63	1.03±0.34
t值		4.151	6.342	7.496
P值		<0.001	<0.001	<0.001

2.3 血清ChE、hs-CRP、PCT与IPS分值相关性

Pearson相关性分析,血清ChE与IPS分值间存在负相关关系($r=-0.754$),血清hs-CRP、PCT与IPS分值间存在正相关关系($r=0.822$ 、 0.805 , P 均<0.001)。

2.4 血清ChE、hs-CRP、PCT与导管相关感染的关系

以老年维持性透析患者是否发生导管相关感染作为因变量(否=0,是=1),将透析时间、贫血、低蛋白血症、糖尿病、IPS分值等其他因素调整后,血清ChE、hs-CRP、PCT作为自变量(以所有患者平均值为界:≤平均值=1,>平均值=2),Logistic回归分析结果显示,血清ChE、hs-CRP、PCT与老年维持性透析患者发生导管相关感染显著相关($P<0.05$)。见表3。

表3 血清ChE、hs-CRP、PCT与导管相关感染的关系

Table 3 The relationship between serum ChE, hs-CRP, PCT and catheter-related infections

变量	β 值	S.E.值	Wald χ^2 值	OR值	95%CI	P值
ChE	-0.818	0.328	6.221	0.441	0.241~0.808	<0.001
hs-CRP	2.247	0.702	10.241	9.455	3.792~23.576	<0.001
PCT	2.036	0.554	13.504	7.659	3.020~19.422	<0.001

表3 血清ChE、hs-CRP、PCT与导管相关感染的关系

Table 3 The relationship between serum ChE, hs-CRP, PCT and catheter-related infections

变量	β 值	S.E.值	Wald χ^2 值	OR值	95%CI	P值
ChE	-0.818	0.328	6.221	0.441	0.241~0.808	<0.001
hs-CRP	2.247	0.702	10.241	9.455	3.792~23.576	<0.001
PCT	2.036	0.554	13.504	7.659	3.020~19.422	<0.001

2.5 血清ChE、hs-CRP、PCT对导管相关感染诊断价值

以感染组为阳性样本,未感染组为阴性样本,绘制ROC曲线,结果显示,血清ChE、hs-CRP、PCT诊断导管相关感染的曲线下面积(AUC)分别为0.786、0.799、0.877,三者联合诊断导管相关感染的AUC为0.923,95%CI为0.853~0.967,敏感性为85.71%,特异性为86.49%。见图1。

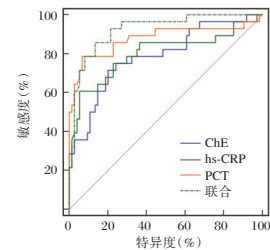


图1 血清ChE、hs-CRP、PCT对导管相关感染诊断价值

Figure 1 The diagnostic value of serum ChE, hs-CRP and PCT in catheter-related infections

3 讨论

维持性透析在维持患者生命、改善患者生活质量方面具有重要作用,长期的维持性透析可导致患者体液免疫及细胞免疫功能受损,继而增加感染发生风险,老年患者多伴有心功能不全等疾病,身体各项机能较差,感染发生风险更高^[8-9]。本研究中102例老年维持性透析患者,共有28例发生导管相关感染,发生率为27.45%,略高于国内相关文献^[10]报道的23%,提示老年维持性透析患者导管相关感染发生率较高,应给予足够重视。

目前,感染性疾病诊断的“金标准”为病原学检测,存在操作复杂、时间较长的不足,不利于疾病的早期治疗。血清学指标具有检测便捷、疾病相关性强、可动态监测等优势,可为感染性疾病的早期诊断和治疗提供重要参考。资料显示^[11],细菌性血流感染患者血清hs-CRP、PCT水平明显升高,可为细菌性血流感染的诊断提供可靠、快速的实验室依据。本研究结果提示二者与导管相关感

染的发生密切相关。hs-CRP、PCT均为临床常见炎症因子,其中hs-CRP是一种急性时相反应蛋白,其对炎症反应非常敏感,当机体出现炎症时血清水平快速升高,有助于感染性疾病的早期诊断,但存在特异性较差的不足^[12]。PCT是一种降钙素前肽物质,可特异性对细菌感染、原虫感染产生反应,病毒感染、过敏等则不会引起PCT水平发生明显变化,因此其水平变化可直接反映细菌感染引起的炎症反应剧烈程度^[13],从而对疾病进行诊断。

本研究还发现,发生导管相关感染老年维持性透析患者的血清ChE水平明显低于未发生感染者,表明ChE也参与了导管相关感染的患病过程。ChE是一种广泛分布于人体的糖蛋白,主要由肝脏细胞合成,是催化酰基胆碱水解的酶,多用于肝功能评测,近年来逐渐应用于感染性疾病的诊治。相关报道^[14]显示,感染发生时,ChE发挥抑制单核-巨噬细胞系统过多释放炎症介质的作用,从而被大量消耗,且细菌毒素对ChE具有灭活作用,加之感染引起的应激状态下患者体内蛋白类营养物质消耗过快,ChE合成量不足以弥补消耗,从而导致血清ChE水平降低。国内学者胡诗礼等^[15]研究指出,ChE水平下调提示机体抗炎作用减弱,一定程度会促使炎症反应增高,通过负反馈作用加重感染程度。均支持本研究结果。此外,IPS是评估感染患者病情的综合性指标,其分值越高提示感染病情越严重。本研究结果进一步说明血清ChE、hs-CRP、PCT水平异常变化与老年维持性透析患者导管相关感染的发生显著相关,且能辅助评估感染病情。本研究通过ROC曲线分析发现血清ChE、hs-CRP、PCT各指标联合诊断的AUC达到0.923,诊断效能较高,可为临床诊断老年维持性透析患者导管相关感染提供更准确数据参考。

综上所述,老年维持性透析患者发生导管相关感染可引起血清ChE明显降低,hs-CRP、PCT水平明显升高,各指标水平与患者IPS分值密切相关,且在导管相关感染诊断方面具有较高诊断效能。本研究存在样本量较少不足,研究结果可能存在一定误差,仍需通过大样本研究进一步验证。

参考文献

- [1] 董越,王朝驹,史清海,等.老年血液透析患者导管相关感染危险因素分析[J].中华保健医学杂志,2019,21(6):496-498.
- [2] 张雪,孔德惠,赵国林,等.尿毒症并发血液透析导管相关性感染免疫指标与PCT和CRP的诊断价值[J].中华医院感染学杂志,2020,30(11):1699-1703.
- [3] 邓星海,曹灿贤,徐晓鹏,等.HIV相关隐球菌性脑膜炎合并颅内高压患者血清及脑脊液NSE、PCT及VEGF水平对脑室-腹腔分流术后感染的预测价值[J].中华生物医学工程杂志,2019,25(5):650-655.
- [4] Perin G, Bottari NB, Silva AD, et al. Cholinesterase's activities of infected mice by *Brucella ovis* [J]. Microb Pathog, 2019, 132(1):137-140.
- [5] 卢仁辉,刘培杰,杜莎莎,等.RDW、CHE及TEG参数与重症肺炎机械通气治疗患者病情的关系[J].分子诊断与治疗杂志,2020,12(5):621-624.
- [6] 中国腹膜透析相关感染防治专家组.腹膜透析相关感染的防治指南[J].中华肾脏病杂志,2018,34(2):139-148.
- [7] 赵茜,郭慧,吕畅,等.感染可能性评分及血清胆碱酯酶和淀粉样蛋白A与危重症感染患者生存情况的关系[J].中国医药,2020,15(12):1891-1895.
- [8] Schouten RW, Haverkamp GL, Loosman WL, et al. Anxiety Symptoms, Mortality, and Hospitalization in Patients Receiving Maintenance Dialysis: A Cohort Study [J]. Am J Kidney Dis, 2019, 74(2):158-166.
- [9] 时鹏,陈巧艳,马胜银,等.维持性血液透析患者血管通路应用情况及感染危险因素分析[J].热带医学杂志,2020,20(11):1492-1495.
- [10] 丁通,鲍楠,张蓬杰,等.维持性血液透析患者血清转铁蛋白饱和度与透析导管相关性感染及预后的相关性分析[J].临床肾脏病杂志,2021,21(3):177-181.
- [11] 张莹.血培养联合血清PCT,hs-CRP水平检测在细菌性血流感染患者早期诊断中的应用价值[J].首都食品与医药,2020,27(7):104.
- [12] Zakariah NA, Bajuri MY, Hassan R, et al. Is Procalcitonin more superior to hs-CRP in the diagnosis of infection in diabetic foot ulcer [J]. Malays J Pathol, 2020, 42(1):77-84.
- [13] Schuetz P, Beishuizen A, Broyles M, et al. Procalcitonin (PCT) - guided antibiotic stewardship: an international experts consensus on optimized clinical use [J]. Clin Chem Lab Med, 2019, 57(9):1308-1318.
- [14] 陈公海,颜光寰,王光权.心衰伴肺部感染患者血清胆碱酯酶水平NT-pro BNP及PCT水平与预后的关系[J].河北医学,2019,25(12):1937-1941.
- [15] 胡诗礼,李丽华,张李,等.血清IL-17和CHE及和肽素水平与老年COPD合并肺部感染的相关性[J].中华医院感染学杂志,2020,30(21):3272-3276.

GOLPH3 在肺癌组织中的表达及其对肺癌细胞侵袭和迁移的影响

王智园¹ 杨曼² 刘士岳¹ 苏国苗¹ 雷梓^{1*}

[摘要] **目的** 研究高尔基磷酸化蛋白-3(GOLPH3)在肺癌组织中的表达,并探讨其对肺癌细胞侵袭和迁移的影响。**方法** 采用免疫组织化学法检测昆明医科大学第一附属医院收集的72例非小细胞肺癌(NSCLC)及61例远癌组织标本中GOLPH3蛋白表达情况。常规培养A549细胞,转染GOLPH3-shRNA质粒和空质粒,建立GOLPH3基因沉默的A549细胞株和对照组细胞。采用划痕实验和Transwell侵袭试验检测各组细胞迁移和侵袭能力。**结果** GOLPH3在NSCLC组织的阳性率(58.33%)明显高于远癌组织阳性率(37.70%);同时GOLPH3在TMN III+IV期组的阳性表达率(74.19%)和淋巴结转移组的阳性表达率(84.21%)明显高于TMN I+II期组(46.34%)和淋巴结未转移组(49.06%),差异有统计学意义($P<0.05$)。划痕实验结果显示GOLPH3沉默后A549细胞迁移能力减弱,侵袭实验中GOLPH3沉默组比对照组穿膜细胞数减少,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 肺癌组织中GOLPH3蛋白阳性表达率高,GOLPH3沉默可抑制肺癌细胞侵袭迁移能力。

[关键词] GOLPH3; NSCLC; 侵袭; 迁移

Expression of GOLPH3 in lung cancer and its effect on the invasion and metastasis of lung cancer cells

WANG Zhiyuan¹, YANG Man², LIU Shiyue¹, SU Guomiao¹, LEI Zi^{1*}

(1. Department of Pathology, The First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming, Yunnan, China, 650032; 2. Department of Pathology, Fuyuan people's Hospital, Fuyuan, Qujing, Yunnan, China, 655500)

[ABSTRACT] **Objective** To study the expression of GOLPH3 in lung cancer and its effect on the invasion and migration of lung cancer cells. **Methods** The expression of GOLPH3 was detected by immunohistochemistry in 72 NSCLC and 61 paracancerous tissue samples collected from the First Affiliated Hospital of Kunming Medical University. A549 cells were routinely cultured in vitro and transfected with GOLPH3 shRNA plasmid and empty plasmid to establish GOLPH3 gene silencing A549 cell lines and control cell lines. Scratch test and Transwell invasion test were used to detect cell migration and invasion ability. **Results** The positive expression rate of GOLPH3 in NSCLC tissues (58.33%) was significantly higher than that in paracancerous tissues (37.70%). Meanwhile, the positive expression rate of GOLPH3 in the TMN III+IV group (74.19%) and the lymph node metastasis group (84.21%) was significantly higher than that in the TMN I+II group (46.34%) and the lymph node non-metastasis group (49.06%) ($P<0.05$). Scratch test results showed that the migration ability of A549 cells was weakened after GOLPH3 silencing, and the number of transmembrane cells in the GOLPH3 silenced group was decreased than that in the control group, the difference was sta-

基金项目:国家自然科学基金地区基金(81660413);云南省科技厅-昆明医科大学应用基础研究联合专项资金[2019FE001(-219)];云南省教育厅科学研究基金教师类项目(2018JS201)

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. 富源县人民医院病理科,云南,曲靖 655500

*通信作者:雷梓, E-mail: wangpathology@126.com

注:杨曼为共同第一作者

tistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** The positive expression rate of GOLPH3 protein is high in lung cancer tissues. GOLPH3 silencing can inhibit the invasion and migration of lung cancer cells.

[**KEY WORDS**] GOLPH3; Lung cancer; Invasion; Migration

肺癌的发生及侵袭转移机制复杂,受到多种基因的调控^[1-3]。高尔基磷酸化蛋白-3(Golgi phosphoprotein-3, GOLPH3),也被称为 MIDAS、GPP34、GMx33,是新近发现的定位于高尔基网的具有强大转化能力的癌基因^[4-6]。研究表明 GOLPH3 在卵巢癌、乳腺癌、前列腺癌、肝癌等多种实体肿瘤组织中表达明显上调^[7-10]。GOLPH3 在肺癌的发生及侵袭转移中的作用机制尚不明确,但有体外实验研究表明,封闭 GOLPH3 基因后,肿瘤细胞被明显抑制,提示 GOLPH3 参与恶性肿瘤的发生及发展。为探究 GOLPH3 是否与肺癌的发生及侵袭转移相关,本研究分析 GOLPH3 蛋白表达与肺癌临床病理学特征之间的关系;构建沉默 GOLPH3 的肺癌 A549 细胞,以分析 GOLPH3 对肺癌细胞侵袭和迁移能力的影响,为非小细胞肺癌靶向治疗提供潜在的新靶点。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2018 年至 2020 年间于昆明医科大学第一附属医院进行手术切除的非小细胞肺癌组织 72 例,其中 61 例具有对应的远离癌的组织(远癌组织),远癌组织来源于距癌组织边缘 5 cm 以上的肺组织。病例纳入标准:①所有病例均未行术前放疗;②术前检查排除远处转移;③术后病理检查确诊非小细胞肺癌。排除标准:排除术后 1 个月内死亡者。研究经昆明医科大学第一附属医院伦理委员会批准并取得患者知情同意。

1.2 材料与试剂

肺腺癌细胞 A549 细胞购买于中国科学院昆明动物研究所, RPMI-1640 培养液、胎牛血清(#C04001-500)购于以色列 BI(Bioind)公司,针对 GOLPH3 基因特异性构建并包装的可供直接转染的慢病毒载体和阴性对照慢病毒载体购自上海吉玛制药技术有限公司。RIPA(#P0013K)细胞裂解液、BCA(#P0010)试剂盒和增强化学发光 ECL(P0018FS)试剂盒均购自上海碧云天生物技术有限公司;Transwell 小室购自美国 Millipore 公司, Matrigel(#356234)购自美国 Becton, Dickinson and Company;兔抗人 GOLPH3(#abs111104)50 μ L 多

克隆抗体购自爱必信(absin)公司,兔抗人 E-Cadherin(24E10, #3195)100 μ L 和兔抗人 Vimentin(D21H3, #5741)100 μ L 单克隆抗体均购自美国 Cell Signaling Technology 公司。

1.3 方法

1.3.1 免疫组织化学法检测组织内 GOLPH3 表达

组织标本常规制片, H-E 染色, 光镜下观察肿瘤形态学特征。免疫组化使用 SP 法染色, 一抗用 GOLPH3 多克隆抗体。免疫组化结果按照 IRS 评分法判断^[11]:以阳性细胞数评分和阳性细胞强度评分乘积为总评分,以总评分来判断阳性等级。其中阳性细胞数 $\leq 5\%$ 、6%~25%、26%~50%、51%~75%、>75%依次记为 0、1、2、3、4 分;阳性细胞强度中不着色、淡黄色、黄色、棕黄色分别记为 0、1、2、3 分。总评分 0~3 分、4~6 分、7~9 分、10~12 分依次记为阴性、弱阳性、阳性、强阳性。

1.3.2 细胞培养、转染与分组

将肺腺癌 A549 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液中,用 0.25% 的含 EDTA 的胰酶传代。置于 37 $^{\circ}$ C, 含 5% CO₂, 且饱和湿度条件下进行培养,待融合度达到 80% 时,0.25% 胰蛋白酶进行消化传代,取对数生长期细胞进行实验。稳定转染的 GOLPH3 基因沉默技术构建细胞:在 GenBank 中查找人 GOLPH3 基因 mRNA 序列,根据 shRNA 设计原则,利用 BLAST 进行同源性分析,设计出 GOLPH3-shRNA 序列。构建 GOLPH3-shRNA 质粒,建立稳定转染下调 GOLPH3 基因 A549 细胞,为 GOLPH3 沉默组,转染空质粒为对照组。继续培养 24 h 后通过筛选获得稳定转染干扰载体的细胞。

1.3.3 划痕实验检测肺癌 A549 细胞迁移能力

将细胞接种于 6 孔板,待细胞融合后,用 200 μ L 移液器枪头在 6 孔板底部划直线, PBS 洗去细胞碎片。于 0 和 24 h 分别采用 Olympus IX50 显微镜拍照记录细胞迁移的图像,以迁移率表示细胞的迁移能力。

1.3.4 Transwell 侵袭试验检测肺癌 A549 细胞侵袭能力

采用 8 μ m 孔径的 Transwell 小室进行细胞侵

袭试验,将 Matrigel 按 1:8 比例用培养基稀释后加入小室上室,在上室分别接种 10 000 个 GOLPH3 沉默和对照组的 A549 细胞,并在小室下室加入 500 μ L 含 10%胎牛血清的培养基,置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂环境中培养 24 h 后,用棉签擦拭上室内未穿膜细胞及基质胶,多聚甲醛固定,苏木素染色,显微镜下观察穿膜细胞并计数。

1.4 统计学方法

采用 Graphpad prism 8.4.2 软件对数据进行统计分析和作图;计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较行独立样本 *t* 检验;计数资料采用 *n*(%)表示,两组间计数数据用卡方检验;*P*<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GOLPH3 表达与肺癌患者临床病理因素的关系

GOLPH3 主要表达于细胞质,呈棕黄色颗粒,其中 GOLPH3 在 NSCLC 组中有 42 例阳性,显著高于远癌组织阳性病例数(23 例);GOLPH3 在 TMN III+IV 期组和淋巴结转移组的阳性率也显著高于 TMN I+II 期组和淋巴结未转移组阳性率,差异有统计学意义(*P*<0.05)。GOLPH3 的表达阳性

率在年龄和性别的分组间比较,差异无统计学意义(*P*>0.05)。见表 1 和图 1。

表 1 GOLPH3 表达与肺癌患者临床病理因素的关系[n(%)]

Table 1 The relationship between GOLPH3 expression and clinicopathological factors in patients with lung cancer[n(%)]

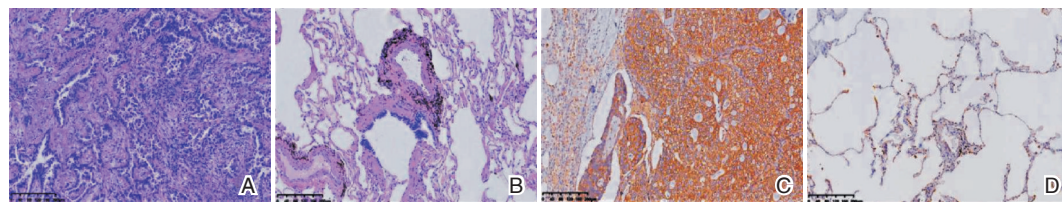
临床病理因素	GOLPH3 表达情况			χ^2 值	<i>P</i> 值	
	总计	阳性例数	阴性例数			
部位	NSCLC 组织	72	42(58.33)	30(41.67)	5.624	0.018
	远癌组织	61	23(37.70)	38(62.30)		
年龄	≥ 60	40	23(57.50)	17(42.50)	0.026	0.873
	<60	32	19(59.38)	13(40.63)		
性别	男	39	22(56.41)	17(43.59)	0.129	0.719
	女	33	20(60.61)	13(39.39)		
TNM 分期	I+II 期	41	19(46.34)	22(53.66)	5.634	0.018
	III+IV 期	31	23(74.19)	8(25.81)		
淋巴结情况	转移	19	16(84.21)	3(15.79)	7.111	0.008
	未转移	53	26(49.06)	27(50.94)		

2.2 GOLPH3 沉默对肺癌细胞迁移能力的影响

划痕实验显示,划痕 24 h 后,GOLPH3-shRNA 组中细胞迁移率明显低于 NC-shRNA 组(24.80 \pm 3.50) vs (39.17 \pm 4.74),差异有统计学意义(*P*<0.05)。见图 2。

2.3 GOLPH3 沉默对肺癌细胞侵袭能力的影响

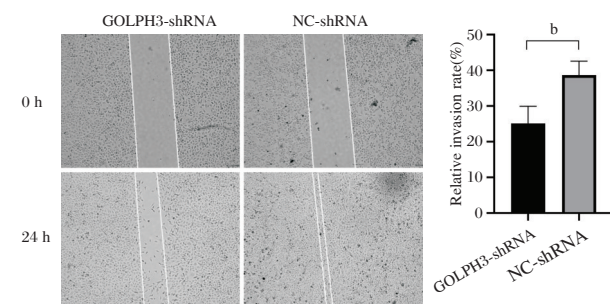
GOLPH3-shRNA 组中穿过基底膜的细胞数显著低于 NC-shRNA 组(47.40 \pm 12.20) vs (123.00 \pm 15.70),差异有统计学意义(*P*<0.05)。见图 3。



注:A 为肺腺癌组织;B 为远癌组织;C 为肺腺癌组织中 GOLPH3 呈强阳性表达;D 为癌组织中 GOLPH3 呈弱阳性表达或阴性表达。

图 1 肺癌组织及 GOLPH3 免疫组化结果(HE,×100)

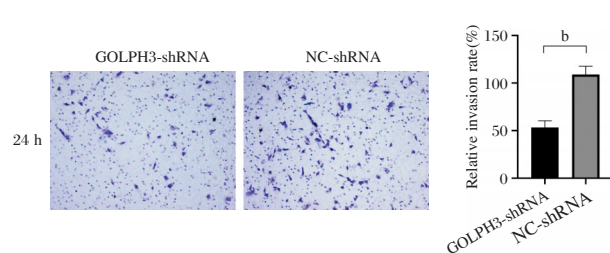
Figure 1 Immunohistochemical results of GOLPH3 in lung cancer tissue (HE,×100)



注:GOLPH3-shRNA 组与对照组比较,^b*P*<0.05。

图 2 GOLPH3 沉默对肺癌 A549 细胞迁移能力的影响

Figure 2 Effect of GOLPH3 silencing on the migration ability of lung cancer A549 cells



注:GOLPH3-shRNA 组与对照组比较,^b*P*<0.05。

图 3 GOLPH3 沉默对肺癌 A549 细胞侵袭能力的影响(苏木素,×100)

Figure 3 Effect of GOLPH3 silencing on invasion ability of lung cancer A549 cells (Hematoxylin,×100)

3 讨论

肺癌是目前全世界发病率最高的恶性肿瘤之一,积极探究肺癌发生及侵袭转移机制,在研究肺癌靶向治疗、控制癌变发展、延长肺癌患者生命具有重要意义^[12]。癌症的发生和进展是多基因多步骤的过程,Scott KL^[13]等在进行肿瘤基因组分析时发现,乳腺癌、肾癌、直肠癌等多种实体肿瘤内均存在 GOLPH3 过量表达情况,确定 GOLPH3 是一种原癌基因。GOLPH3 位于染色体 5p13,主要存在于高尔基囊泡反面膜外围,负责高尔基分选活动。GOLPH3 在特定的病理或生理条件下被激活后,将诱导各种恶性肿瘤的发生与进展^[14]。徐伟莉等^[15]研究发现,结肠癌组织内 GOLPH3 表达水平异常升高,且其表达水平与肿瘤远处转移、淋巴转移及临床分期等多个临床参数密切相关。为了了解 GOLPH3 与非小细胞肺癌的发生发展是否存在关系,本研究结果提示,NSCLC 组织内 GOLPH3 阳性表达率高于远癌组织;且在有淋巴结转移和临床分期较晚的肺癌病例组织中 GOLPH3 的阳性表达率显著高于无淋巴结转移和临床分期较早的病例,与文献研究结果一致。提示 GOLPH3 高表达与肺癌的发生、进展和转移间存在密切关系。

在上述研究结果的基础上,笔者建立了 GOLPH3 沉默的 A549 细胞,在体外水平观察 GOLPH3 基因对肺癌细胞的影响。国内王春晓^[16]等通过体外实验表明,沉默 GOLPH3 基因可逆转 HT29 结肠癌细胞对顺铂化疗的耐药性。张利科等^[17]通过重组慢性病毒方法,分别构建沉默及过表达的 GOLPH3 胰腺癌细胞株,并利用过 MTT 实验,伤痕愈合实验以及 Transwell 实验发现,沉默 GOLPH3 可有效抑制人胰腺癌细胞的增殖、侵袭及转移。国外 Cecilia Arriagada 等人^[18]敲低人多形性胶质母细胞瘤 T98G 细胞 GOLPH3 表达后发现粘着斑激酶(FAK)的自激活减少,从而促进细胞的迁移。与以上研究相似,本研究结果发现,GOLPH3 沉默组 A549 细胞迁移能力明显减弱,侵袭能力也明显低于对照组,推测 GOLPH3 可提高 A549 细胞肺癌细胞侵袭和迁移能力,结果与文献报道一致。

综上所述,GOLPH3 在肺癌组织表达高于远癌组织,且在临床分期较晚和淋巴结转移病例表达显著高于临床分期较早和淋巴结未转移的病例,在体外实验中发现 GOLPH3 沉默可减弱肺癌细胞侵袭

迁移能力,提示 GOLPH3 可促进肺癌的进展和侵袭迁移。因此,抑制 GOLPH3 过表达有望成为肺癌靶向治疗的可靠方向,但还需更进一步细致研究不同病理类型肺癌中 GOLPH3 表达情况及 GOLPH3 发挥作用的分子机制,为靶向治疗提供更多依据。

参考文献

- [1] Kerr KM, Bibeau F, Thunnissen E, et al. The evolving landscape of biomarker testing for non-small cell lung cancer in Europe[J]. Lung Cancer, 2021, 22(154): 161-175.
- [2] 睦玉霞,邓晓宇,伍铮,等.非小细胞肺癌驱动基因突变与临床病理特征的关系[J].临床与实验病理学杂志, 2020, 36(9): 1023-1028.
- [3] Wen S, Dai L, Wang L, et al. Genomic Signature of Driver Genes Identified by Target Next-Generation Sequencing in Chinese Non-Small Cell Lung Cancer[J]. Oncologist, 2019, 24(11): e1070-e1081.
- [4] Wu CC, Taylor RS, Lane DR, et al. GMx33: a novel family of trans-Golgi proteins identified by proteomics[J]. Traffic, 2000, 1(12): 963-975.
- [5] Bell AW, Ward MA, Blackstock WP, et al. Proteomics characterization of abundant Golgi membrane proteins[J]. J Biol Chem, 2001, 276(7): 5152-5165.
- [6] Snyder CM, Mardones GA, Ladinsky MS, et al. GMx33 associates with the trans-Golgi matrix in a dynamic manner and sorts within tubules exiting the Golgi[J]. Mol Biol Cell, 2006, 17(1): 511-524.
- [7] Ma Y, Wang X, Wu Y, et al. Overexpression of GOLPH3 protein is associated with worse prognosis in patients with epithelial ovarian cancer[J]. Tumour Biol, 2014, 35: 11845-11849.
- [8] Zeng Z, Lin H, Zhao X, et al. Overexpression of GOLPH3 promotes proliferation and tumorigenicity in breast cancer via suppression of the FOXO1 transcription factor[J]. Clin cancer res, 2012, 18(15): 4059-4069.
- [9] Zhang L, Guo F, Gao X, et al. Golgi phosphoprotein 3 expression predicts poor prognosis in patients with prostate cancer undergoing radical prostatectomy[J]. Mol Med Rep, 2015, 12: 1298-1304.
- [10] Dai T, Zhang D, Cai M, et al. Golgi phosphoprotein 3 (GOLPH3) promotes hepatocellular carcinoma cell aggressiveness by activating the NF- κ B pathway[J]. J Pathol, 2015, 235(3): 490-501.
- [11] Remmele W, Stegner H. E. Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue[J]. Pathologe, 1987, 8(3): 138-140.
- [12] Sung H, Ferlay J, Rebecca L, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 0: 1-41.

(下转第 1409 页)

IL-6、PCT水平对髋关节置换术后感染的早期预测

王丽冰 左立新* 刘永刚 邢晶伟 陈超 张森

[摘要] **目的** 探索白细胞介素-6(IL-6)、血清降钙素原(PCT)的水平对髋关节置换术后发生感染的早期预测价值。**方法** 分析2014年1月至2019年1月安阳市人民医院845例接受人工髋关节置换术的临床资料,发生感染的15例患者为感染组,选取同比例接受手术后未发生感染的30例患者为未感染组,并选择同时段的健康体检者30例为对照组,分析3组患者的白细胞介素-6(IL-6)、降钙素原(PCT)水平上的差异。**结果** IL-6水平上的比较结果:感染组>未感染组>对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),且两两比较差异均有统计学意义($P<0.05$);PCT水平上的比较显示:感染组>未感染组>对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),且两两比较差异均具有统计学意义($P<0.05$)。ROC分析显示:IL-6和PCT在诊断人工髋关节置换术后早期并发感染的AUC分别为0.815、0.772。最佳理论阈值分别为7.0 pg/mL、1.25 μ g/L。IL-6与PCT联合检测的敏感度、特异度均高于单一检测(P 均 <0.05)。**结论** 人工髋关节置换术后患者早期易并发感染,炎症因子IL-6、PCT对人工髋关节置换术后早期感染具有一定的诊断价值。

[关键词] 髋关节置换; IL-6; PCT

The level of IL-6 and PCT in the early prediction of infection after hip replacement

WANG Libing, ZUO Lixin*, LIU Yonggang, XING Jingwei, CHEN Chao, ZHANG Sen
(Department of Orthopedics, Anyang People's Hospital, Anyang, Henan, China, 455000)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the value of IL-6 and PCT levels in the early prediction of infection after hip replacement. **Method** The clinical data of 845 patients undergoing artificial hip replacement in Anyang People's Hospital from January 2014 to January 2019 were analyzed. 15 patients with infection were the infection group, and 30 patients who had no infection after the operation were selected as the non-infection group. 30 healthy physical examination subjects at the same time period were selected as the control group. The levels of interleukin-6 (IL-6), and procalcitonin (PCT) in the three groups were analyzed. **Results** The results of the comparison of IL-6 levels: The infected group > the uninfected group > the control group, the difference was statistically significant ($P<0.05$). The comparison of the PCT level showed that: the infected group > the uninfected group > the control group, the difference was statistically significant ($P<0.05$). ROC analysis showed that the AUC of IL-6 and PCT were 0.815 and 0.772, respectively. The optimal theoretical thresholds were 7.0 pg/mL and 1.25 g/L, respectively. The sensitivity and specificity of the combined detection of IL-6 and PCT were higher than that of the single detection ($P<0.05$). **Conclusion** Patients after artificial hip replacement are prone to complicated infections at an early stage. The inflammatory factors IL-6 and PCT have certain diagnostic value for early infections after artificial hip replacement.

[KEY WORDS] Hip replacement; IL-6; PCT

基金项目:河南省医学科技公关计划联合共建项目(LHGJ20200798)

作者单位:安阳市人民医院骨科,河南,安阳 455000

*通信作者:左立新, E-mail:594863341@qq.com

近年来,随着国内人口老龄化的演变,老年人甚至是中年人发生股骨颈骨折及股骨头坏死等疾病的发生率显著升高,威胁了很大一部分人群的健康^[1]。髋关节置换术是临床近年来治疗髋关节部位发生病变的最为显效的方法,髋关节置换术可以有效地增加患者髋关节的活动度、显著缓解患者因髋关节带来的病变并很大程度地患者疼痛^[2-3]。但由于髋关节置换术是一种大型的侵入性外科手术,部分患者在术后会呈现抵抗力、免疫力下降,有一定比例的患者会在髋关节置换术后出现术后感染的情况。术后感染不仅影响整个手术的效果、伤口愈合时间并延长患者住院时间^[4]。血清降钙素原(procalcitonin, PCT)是一种在评价机体出现全身性感染时常用的特异性标志物。在机体发生感染早期时,血清PCT水平会出现明显升高且具有早期的诊断价值^[5]。白细胞介素-6(interleukin 6, IL-6)是临床上最为常见的检查指标,当机体发生炎症反应时,血清白细胞介素会在短时间内出现显著的升高^[6-7]。本研究对全髋关节置换术后的IL-6、PCT水平进行了研究,髋关节置换术后发生感染提供早期预测价值。结果如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

分析2014年1月至2019年1月安阳市人民医院接受人工髋关节置换术845例患者资料。其中有近30例患者出现术后感染。根据前述感染组纳入标准^[8],选择纳入15例,为感染组。再从未感染患者中,依据前述未感染组纳入标准,随机抽样30例(按感染组样本量1:2设计),为未感染组。并选择同时段的健康体检者30例为对照组。3组的一般资料比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。本研究均获参试者知情同意。本实验经伦理委员会批准。

感染组纳入标准^[8]:①经过人工髋关节置换术的患者术后一个月出现感染;②年龄在25~75岁之间;③患者在进行抽取血液检查感染情况前未进行过抗感染治疗;④有齐全的检测化验资料。感染组排除标准:①患者年龄<25岁或>75岁;②患者除人工髋关节置换术外有明显体表外伤并出现感染情况;③患者免疫系统方面功能不全或障碍等;④患者心脏、肾脏等功能不全或有缺陷。

无感染组纳入标准:①2014年1月至2019年1月于本院接受髋关节置换术;②患者未出现术后

感染情况;③年龄在25~75岁之间。无感染组排除标准:①患者在2014年1月至2019年1月于本院接受髋关节置换术后出现术后感染情况;②年龄<25岁或>75岁。

1.2 诊断标准

术后早期感染诊断依据^[8]:患者在术后1个月之内,手术部位开始急性疼痛,关节置换的部位周围发生红斑或出现渗出液,术后局部皮肤出现红肿热痛的急性疼痛症状,如持续性关节疼痛、全身发热症状;患者的关节假体周围组织或关节样本中检测到病原菌,细菌若培养结果阳性者可判定为感染;实验室检查显示:C-反应蛋白、红细胞沉降率及白细胞计数均升高;根据患者临床表现、实验室检查结果及影像学检查结果进行确诊。

1.3 检查方法

比较两组患者术后3d的外周血的IL-6、PCT并检测水平,对于患者的病原菌的鉴定及测定VIKIT-2compact微生物鉴定系统对关节液、关节腔、脓液及假膜组织的病原菌进行鉴定(来自法国生物梅里埃公司);采用16srDNA基因测序法或16s核糖体蛋白打谱对无法确定的病原菌进行鉴定。电化学发光法对PCT进行测定,酶联免疫吸附法(ELISA)对IL-6进行测定。

1.4 统计学方法

使用SPSS 22.0软件进行分析。计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,两组间比较用 t 检验,多组间的比较为单因素方差分析,组内两两比较LSD- t 检验。计数资料以 $n(\%)$ 表示,行 χ^2 检验。预测诊断价值分析为ROC分析。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3组的基线资料比较

3组患者在性别、年龄比较,差异无统计学意义($P>0.05$);感染组与未感染组在原发疾病、髋关节置换的单双侧、置换材料等基线资料比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表1。

2.2 3组研究对象的IL-6和PCT水平比较

3组IL-6水平上的比较显示:感染组>未感染组>对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),且两两比较差异均有统计学意义($P<0.05$);PCT水平上的比较显示:感染组>未感染组>对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),且两两比较差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表2。

表1 3组基线资料比较 [n(%), ($\bar{x} \pm s$)]

Tab.1 Comparison of three groups of baseline data [n(%), ($\bar{x} \pm s$)]

基线资料		感染组(n=15)	未感染组(n=30)	对照组(n=30)	χ^2/F 值	P值
性别	男/女	9/6	17/13 ^a	19/11 ^{ab}	0.278	0.870
年龄(岁)		57.11±6.85	57.06±7.05 ^a	57.15±7.12 ^{ab}	(0.035)	0.966
原发疾病	股骨头股骨骨折	6(40.00)	13(43.33)		0.046	0.831
	髋关节炎	2(13.33)	3(10.00)		0.028	0.867
	股骨头缺血坏死	2(13.33)	6(20.00)		0.019	0.890
	髋关节发育不良	4(26.67)	8(26.67)		0.128	0.721
	髋关节置换	单侧	7(46.67)	17(56.67)		0.402
	双侧	8(53.33)	13(43.33)		0.178	0.673
置换材料	钛合金	6(40.00)	13(43.33)		0.046	0.831
	不锈钢	5(33.33)	11(36.67)		0.048	0.826
	陶瓷	4(26.67)	6(20.00)		0.016	0.899

注:与感染组比较,^aP值均>0.05;与未感染组,^bP值均>0.05。

表2 3组IL-6和PCT水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 The compare of IL-6 and PCT levels in 3 groups

	n	IL-6(pg/mL)	PCT(ng/mL)
感染组	15	9.85±3.23	2.10±0.63
未感染组	30	4.17±0.96 ^a	0.54±0.24 ^a
对照组	30	2.45±0.11 ^{ab}	0.48±0.11 ^a
F值		115.944	143.679
P值		0.000	0.000

注:与感染组比较,^aP值均<0.05,与未感染组,^bP值均<0.05。

2.3 IL-6和PCT水平对髋关节置换术后早期感染的预测价值

IL-6及PCT的最佳截断值分别设为7.0 pg/mL、1.25 ng/mL,两项标志物联合评价髋关节置换术后早期感染的敏感度、特异度均高于单独检测(P<0.05)。见表3、图1。

表3 IL-6、PCT及IL-6联合PCT检测对髋关节置换术后早期感染的预测价值

Table 3 The predictive value of IL-6, PCT and IL-6 combined with PCT in early infection after hip replacement

	AUC	最佳截断值	敏感度	特异度	约登指数
IL-6	0.815	7.0 pg/mL	0.781	0.810	0.591
PCT	0.772	1.25 ng/mL	0.804	0.720	0.524
IL-6联合PCT			0.867	0.833	0.700

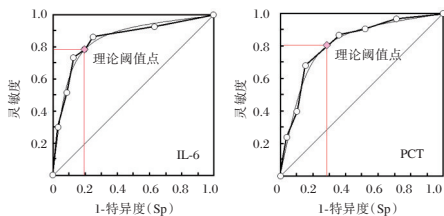


图1 IL-6、PCT及IL-6联合PCT检测对髋关节置换术后早期感染的预测价值

Figure 1 The predictive value of IL-6, PCT and IL-6 combined with PCT in early infection after hip replacement

3 讨论

随着国内开始进入老龄化的阶段,股骨颈骨折、股骨头坏死、髋关节炎等髋关节疾病的发病率在每年呈现上升的趋势^[9]。大量研究指出,人工髋关节置换术是治疗股骨头股骨骨折、髋关节炎、股骨头缺血坏死、髋关节发育不良等无法通过非手术行为复健的疾病中的最好解决方案,髋关节置换术的优点在于会避免股骨头进一步坏死或者骨不连形成等不良反应还可以很好地保留患者的运动功能并可以进一步提高患者的生活质量^[10]。但因为髋关节置换术是一种大型的创伤性手术,术中机体暴露范围广、创伤大且深等因素有可能导致患者在术后发生感染,除此之外,患者在术后抵抗力的下降,免疫功能屏障减退等个人机体原因,有可能出现手术部位感染、手术失败或者进行返修等临床常见问题^[11]。随着这些问题的出现,近年来髋关节置换术后的患者在术后发生感染的几率开始降低。但临床上的研究仍显示髋关节置换术后发生感染的概率在2%左右^[12]。对髋关节置换术患者发生感染进行早期诊断便尤为重要。本研究就髋关节置换术后法发生感染时的病原菌种类及炎症因子水平进行检测并评估其早期预测价值。

IL-6是机体内一种抗炎性细胞因子,主要是由单核巨噬细胞产生,具有诱导机体免疫耐受以及炎症抑制的作用,在机体发生感染时可明显升高,在发挥抗炎作用同时也会抑制机体免疫功能,因而导致机体感染加重,IL-6水平的检测目前广泛应用于免疫和炎症相关疾病患者的早期诊断及预后观察。有研究发现,在颅内感染时,脑脊液和血液中的IL-6水平可较正常对照组患者明显升高,在外科

术后的感染上不具备非常好的诊断效果^[13]。在PCT水平的比较上,感染组与未感染组间的差异、未感染组与对照组间的差异均有统计学意义,原因可能为:IL-6在炎症反应的调节上有着重要的调节作用,当患者术后组织受到病原菌等侵害后,巨噬细胞和单核细胞开始分泌IL-6,随着体液循环开始出现于全身的血液中,作为多种急性炎症的强检查指标还可以经垂体激素系统对体温进行调控^[14]。

有研究显示IL-6在急性炎症如:大型创伤及关节炎、败血症的诊断上有一定的临床应用价值^[15],而本研究的ROC回归曲线也证明了IL-6在诊断人工髋关节置换术后发生感染有很好的诊断价值。有研究显示PCT是由116个氨基酸组成的多肽,当患者开始出现感染症状时,外周血的PCT含量会显著升高,且稳定度较高,有研究显示,出现细菌感染时机体发生感染后的3至4小时内即检测得到PCT,且PCT的水平与炎症的严重程度有关,炎症反应控制后即降至正常水平^[16]。在本研究中,经ROC曲线显示PCT对人工髋关节置换术后发生感染的早期诊断具有较好的预测作用。且IL-6和PCT联合用于感染的预测效能,均高于两指标的单独应用。

综上所述,IL-6、PCT水平对人工髋关节置换术后发生感染的早期诊断具有重要意义,对人工髋关节置换术后并发早期感染具有一定的诊断价值。

参考文献

[1] 王鹏斌,王立松,祝建勇,等.老年髋关节置换术发生感染独立危险因素分析及预防措施[J].陕西医学杂志,2018,47(10):1309-1312.

[2] Kjaergaard N, Kjaersgaard JB, Petersen CL, et al. Thresholds for the oxford for Hip Score after total hip replacement surgery: A novel approach to post-operative evaluation [J]. J Orthop Traumatol, 2017, 18(4): 401-406.

[3] 覃勇志,周宗科.人工全髋关节置换术治疗化脓性髋关节炎后遗骨关节病的研究进展[J].中国修复重建外科杂志,2020,34(1):139-144.

[4] 严贤科,胡伟,潘泓,等.人工髋关节置换术后感染病原分布及炎症介质的早期预测诊断价值[J].中华医院感染学杂志,2018,28(23):3606-3609.

[5] 李承威,武蕾蕾,王德平,等.血清降钙素原、C-反应蛋白及白细胞介素-6联合检测在全髋关节置换术后感染诊断中的价值[J].科学技术与工程,2019,19(10):32-36.

[6] 靖旭.乌司他丁对老年髋关节置换术后认知功能及血浆IL-6 IL-10 BDNF和S100β的影响[J].河北医学,2019,25(7):1116-1119.

[7] 王雷,张浩沙强,郭瑞,等.全髋关节置换术用于股骨颈骨折患者的临床疗效评价及对血清OPG、BGP、ALP、CRP、IL-6的影响[J].现代生物医学进展,2018,18(15):2973-2976.

[8] 郭中华,杨锐,田敬海,等.快速康复外科在全髋关节置换术中应用的Meta分析[J].中国骨与关节杂志,2018,7(12):901-906.

[9] 林丽能,王辉,孙效棠,等.一期和二期髋关节翻修术后感染复发率的Meta分析[J].中华关节外科杂志(电子版),2019,13(1):73-77.

[10] 胡建彬.全髋或半髋关节置换术治疗老年股骨颈骨折效果对比[J].中国药物与临床,2020,20(10):1685-1687.

[11] 常承婷,宁宁.全髋关节置换术外科伤口感染的危险因素研究进展[J].华西医学,2019,34(9):1059-1062.

[12] 徐兵,汪华清,黄强开,等.关节液AD-1、SDF-1、sICAM-1对人工股骨头置换术后感染的诊断价值及与术后康复的关系[J].分子诊断与治疗杂志,2020,12(8):1124-1128.

[13] 王宝,孙媛,宋康,古长维.应激性高血糖对颅脑损伤患者炎症状态和外周血乳酸、MMP-9水平以及28天死亡率的影响[J].分子诊断与治疗杂志,2019,11(1):39-43.

[14] 叶云燕,王欢,王艺沙,等.血清PCT与CRP和血小板对重症感染患者病情程度的评估效果研究[J].中华医院感染学杂志,2019,29(10):1487-1490.

[15] 金永合,李武媚,姜烜星,等.降钙素原和超敏C反应蛋白对关节置换术后感染诊断价值[J].中国医学工程,2020,28(1):21-24.

[16] Meng X, Wen R, Li X. Values of serum LDL and PCT levels in evaluating the condition and prognosis of acute cerebral infarction[J]. Exp Therap Med, 2018, 16(4): 3065-3069.

(上接第1405页)

[13] Scott KL, Kabbarah O, Liang MC, et al. GOLPH3 modulates mTOR signalling and rapamycin sensitivity in cancer [J]. Nature, 2009, 459(7250): 1085-1090.

[14] Sechi S, Frappaolo A, Belloni G, et al. The multiple cellular functions of the oncoprotein Golgi phosphoprotein 3 [J]. Oncotarget, 2015, 6(6): 3493-3506.

[15] 徐伟莉,牛保华. Mcl-1与高尔基体磷酸化蛋白在结肠癌组织中的表达及与其临床病理特征的关系[J].实用癌症杂志,2017,32(9):1420-1422+1426.

[16] 王春晓,邱成志,洪钟时.沉默GOLPH3基因表达逆转人结

肠癌细胞顺铂耐药的研究[J].中国癌症杂志,2019,29(11):862-868.

[17] 张利科,侍阳. GOLPH3在胰腺癌肿瘤细胞增殖及迁移中的作用研究[J].药物生物技术,2016,23(5):385-389.

[18] Arriagada C, Luchsinger C, González A, et al. The knocking down of the oncoprotein Golgi phosphoprotein 3 in T98G cells of glioblastoma multiforme disrupts cell migration by affecting focal adhesion dynamics in a focal adhesion kinase-dependent manner [J]. PLoS One, 2019, 14(2): e0212321.

PGRN/Alb、sTREM-1、LBP 指标诊断肝硬化细菌性腹膜炎价值及对疗效影响

公建庄¹ 杜晨旭² 吴慧丽^{1*}

[摘要] **目的** 探讨颗粒蛋白前体与血清白蛋白比值(PGRN/Alb)、可溶性髓样细胞触发受体-1(sTREM-1)、脂多糖结合蛋白(LBP)指标诊断肝硬化细菌性腹膜炎(SBP)价值及对疗效影响。**方法** 选取2018年1月至2019年1月郑州市中心医院收治的142例肝硬化患者,根据是否并发SBP分为SBP组($n=46$)、无SBP组($n=96$),并选取同期46例健康体检人群作为对照组。比较3组基线资料、PGRN/Alb、sTREM-1、LBP水平,采用多因素Logistic回归方程、受试者工作特征曲线(ROC)、ROC下面积(AUC)、Spearman分析处理数据。**结果** 高脂血症发生率比较:无SBP组>对照组>SBP组,差异有统计意义($P<0.05$);糖尿病发生率、PGRN/Alb、sTREM-1、LBP比较:SBP组>无SBP组>对照组,差异有统计意义($P<0.05$)。将高脂血症、糖尿病控制后,PGRN/Alb、sTREM-1、LBP仍与SBP发生相关($P<0.05$)。ROC曲线显示PGRN/Alb+sTREM-1+LBP联合诊断SBP的AUC为0.928,优于单一诊断($P<0.05$)。不同疗效患者PGRN/Alb、sTREM-1、LBP水平比较:无效组>有效组>显效组,差异有统计学意义($P<0.05$)。Spearman进行相关性分析,结果显示,PGRN/Alb($r=-0.807, P<0.001$)、sTREM-1($r=-0.726, P<0.001$)、LBP($r=-0.706, P<0.001$)与疗效呈负相关。**结论** PGRN/Alb、sTREM-1、LBP不仅能作为诊断SBP的生物标志物,并能评估患者对抗菌治疗的反应性,为临床诊治SBP提供可靠的参考。

[关键词] PGRN/Alb; sTREM-1; LBP; 肝硬化; 细菌性腹膜炎

The value of PGRN/Alb, sTREM-1 and LBP in the diagnosis of spontaneous bacterial peritonitis in liver cirrhosis and their influence on the therapeutic effect

GONG Jianzhuang¹, DU Chenxu², WU Huili^{1*}

(1. Department of Gastroenterology, Zhengzhou Central Hospital, Zhengzhou, Henan, China, 450006;

2. Department of Clinical Laboratory, Zhengzhou Central Hospital, Zhengzhou, Henan, China, 450006)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the value of the ratio of progranulin to serum albumin (PGRN/Alb), soluble myeloid cell trigger receptor-1 (sTREM-1), lipopolysaccharide binding protein (LBP) in the diagnose of cirrhotic bacterial peritonitis (SBP) value and impact on efficacy. **Methods** A total of 142 patients with liver cirrhosis admitted to Zhengzhou Central Hospital from January 2018 to January 2019 were divided into the SBP group ($n=46$) and the non-SBP group ($n=96$) according to whether they were complicated by SBP, and 46 healthy people during the same period were selected as the control group. The baseline data, PGRN/Alb, sTREM-1, and LBP levels among the three groups were compared, and the data were analyzed and processed by multivariate Logistic regression equation, receiver operating characteristic curve (ROC), area under ROC (AUC), and Spearman. **Results** Comparison of the incidence of hyperlipidemia: the non-SBP group > the control group > the SBP group, the difference was statistically significant ($P<0.05$).

基金项目:河南省医学科技攻关计划项目(LHG20191055)

作者单位:1. 郑州市中心医院消化内科,河南,郑州 450006

2. 郑州市中心医院检验科,河南,郑州 450006

*通信作者:吴慧丽, E-mail: Wuhuili616161@126.com

Comparison of diabetes incidence, PGRN/Alb, sTREM-1, LBP: the SBP group >the non-SBP group >the control group, the difference was statistically significant ($P<0.05$). After controlling hyperlipidemia and diabetes, PGRN/Alb, sTREM-1, and LBP were still related to the occurrence of SBP ($P<0.05$). The ROC curve showed that the AUC of PGRN/Alb+sTREM-1+LBP combined diagnosis of SBP was 0.928, which was better than single diagnosis ($P<0.05$). Comparison of the levels of PGRN/Alb, sTREM-1, and LBP in patients with different curative effects: the ineffective group >the effective group >the significantly effective group, the difference was statistically significant ($P<0.05$). Spearman analysis showed that PGRN/Alb ($r=-0.807$, $P<0.001$), sTREM-1 ($r=-0.726$, $P<0.001$), LBP ($r=-0.706$, $P<0.001$) were negatively corrected with the efficacy. **Conclusion** PGRN/Alb, sTREM-1, and LBP can be used as biomarkers for the diagnosis of SBP, and evaluate the patient's response to antibacterial therapy, providing a reliable reference for the clinical diagnosis and treatment of SBP.

[KEY WORDS] PGRN/Alb; sTREM-1; LBP; Liver cirrhosis; Spontaneous bacterial peritonitis

细菌性腹膜炎(Spontaneous bacterial peritonitis, SBP)是肝硬化常见一种并发症,病情进展迅速,若未及时诊治,病死率高达30%~50%,严重危害患者生命安全^[1]。由于SBP临床表现多样化,早期症状常被自身肝病症状所掩盖,易漏诊。腹水细菌培养是诊断SBP重要策略,但用时较长,可能延误治疗,影响预后,因此研究SBP其他快速诊断方法意义重大。颗粒蛋白前体(Progranulin, PGRN)在化脓性脑膜炎、细菌性肺炎等细菌性感染疾病患者中升高^[2-3]。白蛋白(Albumin, Alb)是反映肝脏功能重要指标,在肝硬化患者中水平降低,因此PGRN/Alb可反映肝硬化患者肝功能和炎症反应情况^[4]。可溶性髓样细胞触发受体-1(Soluble triggering receptors expressed on myeloid cells-1, sTREM-1)在肺炎等感染疾病中升高,与炎症反应有关^[5]。脂多糖结合蛋白(Lipopolysaccharide-binding protein, LBP)是机体识别内毒素的关键分子,并能激活免疫反应^[6]。目前关于PGRN/Alb、sTREM-1、LBP指标诊断肝硬化SBP价值及对疗效影响的报道较少,本研究对此进行探讨,旨在为临床诊治SBP提供参考,报告如下。

1 对象和方法

1.1 研究对象

选取2018年1月至2019年1月郑州市中心医院收治的142例肝硬化患者,根据是否并发SBP分为SBP组($n=46$)、无SBP组($n=96$),并选取同期46例健康体检人群作为对照组。

纳入标准:肝硬化的诊断参考《中国肝病诊疗管理规范》白皮书^[7];SBP的诊断参考2010年欧洲肝病学会SBP临床实践指南^[8];排除标准:合并其

他感染类疾病者;入组前应用抗菌药物者;结核病患者;血液系统疾病者;肾、心功能严重不全者;长期应用糖皮质激素者。本研究经医院伦理委员会审核通过,患者及家属签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 各指标检测

病例患者均在治疗前,对照组于入院时采集肘部静脉血5 mL,采用酶联免疫吸附法检测PGRN、sTREM-1、LBP水平,并进行血常规检测,获得Alb, PGRN试剂盒购于武汉菲恩生物科技有限公司, sTREM-1试剂盒购于上海一研生物科技有限公司, LBP试剂盒购于上海赛默生物科技有限公司。

1.2.2 治疗方法及疗效评价^[7]

SBP组均给予营养支持、保肝护肝、维持水电解质平衡等基础治疗,并给予注射用头孢哌酮钠舒巴坦钠(辉瑞制药有限公司,国药准字H20020597)1.5 g,与100 mL生理盐水混合后静滴,2次/d,疗效观察期为2周。显效:腹痛、发热等临床症状体征消失,腹水细菌培养阴性;有效:临床症状体征明显缓解,腹水细菌培养未转阴;无效:临床症状体征无明显改善,腹水细菌培养阳性。

1.3 统计学方法

数据采用SPSS 22.0处理,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较以单因素方差分析,两两比较以 t 检验,计数资料用 $n(\%)$ 表示、 χ^2 检验,采用多因素Logistic回归方程分析SBP的相关影响因素,采用受试者工作特征曲线(ROC)及ROC下面积(AUC)分析各指标诊断SBP的价值,采用Spearman分析各指标与疗效的相关性。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3组基线资料、PGRN/Alb、sTREM-1、LBP比较

高脂血症发生率比较:无SBP组>对照组>SBP组,差异有统计意义($P<0.05$);糖尿病发生率、PGRN/Alb、sTREM-1、LBP比较:SBP组>无SBP组>对照组,差异有统计意义($P<0.05$)。见表1。

表1 3组基线资料、PGRN/Alb、sTREM-1、LBP比较 [$n(\%)$, ($\bar{x}\pm s$)]

Table 1 Comparison of baseline data, PGRN/Alb, sTREM-1, and LBP of 3 groups [$n(\%)$, ($\bar{x}\pm s$)]

资料	SBP组($n=46$)	无SBP组($n=96$)	对照组($n=46$)	$t/F/\chi^2$ 值	P 值	
年龄(岁)	58.62±8.72	56.92±9.34	55.79±10.25	1.058	0.349	
性别	男	26(56.52)	50(52.08)	21(45.65)	1.107	0.575
	女	20(43.48)	46(47.92)	25(54.35)		
体质量指数(kg/m^2)	23.97±1.68	24.08±1.85	24.28±2.01	0.336	0.715	
饮酒史	42(91.30)	91(94.79)	39(84.78)	4.004	0.135	
吸烟史	23(50.00)	45(46.88)	20(43.48)	0.393	0.822	
肝硬化病程(月)	56.89±11.47	54.91±12.26		0.919	0.360	
肝硬化病因	病毒性肝炎	30(65.22)	58(60.42)		0.355	0.837
	酒精性肝炎	10(21.74)	25(26.04)			
	自身免疫肝病	6(13.04)	13(13.54)			
Child-Pugh 分级	A 级	15(32.61)	36(37.50)		1.723	0.423
	B 级	22(47.83)	49(51.04)			
	C 级	9(19.57)	11(11.46)			
合并疾病	高脂血症	3(6.52)	26(27.08)	12(26.09)	8.364	0.015
	糖尿病	9(19.57)	5(5.21)	2(4.35)	9.588	0.008
	心脏病	1(2.17)	4(4.17)	0(0)	2.141	0.343
	高血压	2(4.35)	6(6.25)	1(2.17)	1.159	0.560
PGRN/Alb	1.62±0.45	0.94±0.25	0.76±0.20	109.501	<0.001	
sTREM-1(pg/mL)	170.59±32.27	130.16±29.64	42.64±9.87	276.447	<0.001	
LBP($\mu\text{g}/\text{L}$)	92.46±15.16	78.68±12.52	8.64±2.31	721.767	<0.001	

表2 SBP影响因素的多因素 Logistic 回归方程分析

Table 2 Multi-factor Logistic regression equation analysis of the influencing factors of SBP

影响因素	β 值	SE 值	$Wald \chi^2$	OR 值	95% CI	P 值
PGRN/Alb	0.289	0.096	9.091	1.336	1.078~1.655	<0.001
sTREM-1	0.923	0.239	14.910	2.516	1.625~3.897	<0.001
LBP	1.033	0.279	13.721	2.811	2.164~3.651	<0.001

注:肝硬化患者 PGRN/Alb、sTREM-1、LBP 均值依次为 1.16、143.26 pg/mL 、83.14 $\mu\text{g}/\text{L}$ 。

2.3 PGRN/Alb、sTREM-1、LBP 诊断 SBP 的 ROC

以 SBP 组为阳性样本,以无 SBP 组为阴性样本,绘制各指标诊断 SBP 的 ROC 曲线,结果显示 PGRN/Alb+sTREM-1+LBP 联合诊断 SBP 的 AUC 为 0.928,优于单一诊断($P<0.05$), $\text{logit}(p)=-0.649+0.289X_1+0.923X_2+1.033X_3$ 。见表3、图1。

2.4 不同疗效患者 PGRN/Alb、sTREM-1、LBP 比较

不同疗效患者 PGRN/Alb、sTREM-1、LBP 水平比较:无效组>有效组>显效组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表4。

2.2 多因素分析

以 SBP 发生情况为因变量(0=无,1=有),PGRN/Alb、sTREM-1、LBP 作为自变量(1=低于均值,2=高于均值),应用多因素 Logistic 回归方程分析,结果显示,将高脂血症、糖尿病控制后,PGRN/Alb、sTREM-1、LBP 仍与 SBP 发生相关($P<0.05$)。见表2。

表3 ROC 分析结果

Table 3 ROC analysis results

指标	AUC	95% CI	cut-off 值	敏感度 (%)	特异度 (%)	P 值
PGRN/Alb	0.827	0.755~0.886	>1.28	71.74	85.42	<0.001
sTREM-1	0.800	0.725~0.863	>142.31 pg/mL	80.43	68.75	<0.001
LBP	0.758	0.679~0.826	>91.73 $\mu\text{g}/\text{L}$	63.04	84.37	<0.001
联合	0.928	0.872~0.964		78.26	90.62	<0.001

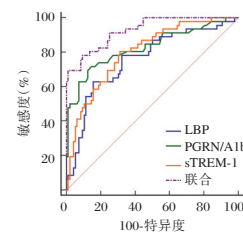


图1 PGRN/Alb、sTREM-1、LBP 诊断 SBP 的 ROC
Figure 1 ROC of PGRN/Alb, sTREM-1, LBP in the diagnosis of SBP

2.5 PGRN/Alb、sTREM-1、LBP 与疗效相关性

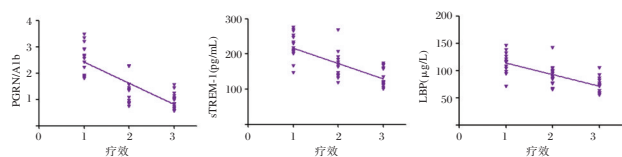
以不同疗效患者各指标作为源数据,应用 Spearman 进行相关性分析,结果显示,PGRN/Alb($r=-$

表4 不同患者PGRN/Alb、sTREM-1、LBP比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Comparison of PGRN/Alb, sTREM-1, LBP in patients with different curative effects ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	PGRN/Alb	sTREM-1(pg/mL)	LBP(μ g/L)
显效组	15	0.91 \pm 0.28	118.26 \pm 24.49	70.15 \pm 15.49
有效组	16	1.26 \pm 0.33	163.55 \pm 32.07	91.57 \pm 18.63
无效组	15	2.71 \pm 0.54	230.43 \pm 37.28	115.72 \pm 24.16
F值		86.639	47.481	20.032
P值		<0.001	<0.001	<0.001

0.807, $P < 0.001$)、sTREM-1 ($r = -0.726, P < 0.001$)、LBP ($r = -0.706, P < 0.001$)与疗效呈负相关。见图2。



注:赋值:1=显效;2=有效;3=无效。

图2 PGRN/Alb、sTREM-1、LBP与疗效相关性

Figure 2 Correlation between PGRN/Alb, sTREM-1, LBP and efficacy

3 讨论

PGRN广泛表达于上皮细胞、巨噬细胞、免疫细胞等,可调节炎症反应。Alb在血液胶体渗透压维持、营养等多方面扮演重要角色。PGRN/Alb可反映肝硬化患者免疫、营养、炎症情况。本研究表明,PGRN/Alb与肝硬化SBP发生和SBP疗效有关。一方面肝硬化患者由于肝功能损害和降低,造成Alb降低,Alb越低,患者免疫、营养状况越差,感染风险越高。另一方面,PGRN能通过促进CD4⁺T细胞向调节性T淋巴细胞的分化,调控调节性T淋巴细胞功能,影响免疫炎症反应^[9]。肝硬化并发SBP后,可刺激PGRN的合成与分泌,以调控机体免疫功能,使PGRN增加,因此肝硬化SBP患者PGRN/Alb升高。彭官清等^[10]报道,肝硬化并发SBP患者PGRN高于无SBP患者,本研究观点与之相似,佐证了PGRN的促炎作用。但现阶段关于PGRN对炎症调控作用尚存在争议,如储珍玉等^[11]研究显示,脓毒症患者PGRN降低,对机体抗炎作用减弱,参与脓毒症患者病情进展,提示PGRN还具有抗炎作用。可见PGRN在调控机体炎症反应中的机制复杂,呈现出促炎或抗炎作用,具体发挥促炎还是抗炎功能,与感染类疾病的部位、炎症微环境中炎症介质的竞争等有关,有待后续深入研究的进一步阐明与论证。

sTREM-1系髓样细胞触发受体-1从细胞膜上脱离后形成的,来源于巨噬细胞、单核细胞、中性粒细胞表面等,可对内源性、外源性感染、炎症刺激等信号产生应答^[12]。本研究结果显示,与无SBP患者相比,SBP患者sTREM-1较高,是SBP发生的相关影响因素,与李杰等^[13]报道一致。SBP发生后,在细菌感染刺激下,激活了单核细胞、中性粒细胞等免疫细胞,使髓样细胞触发受体-1释放入血,并与Toll样受体4信号通路协同,诱导炎性细胞因子的产生,增强炎症反应,从而在SBP患者中表现为升高。抗菌药物是治疗SBP的常用方法,但不同患者治疗后呈现出不同的预后,提示不同患者对抗菌药物反应性存在差异,但尚未完全阐明造成这一现象的机制。本研究结果提示治疗前sTREM-1水平较高患者对抗菌治疗反应性较差,需联合其他药物协同治疗,以增强疗效。

脂多糖是革兰阴性菌细胞壁外膜的主要成分。LBP能在脂多糖刺激下产生,是一种细菌内毒素结合蛋白,正常状态下含量微少。本研究表明,SBP患者LBP高于无SBP患者,与SBP发生相关,可用于肝硬化SBP的诊断。黎秋芬等^[14]研究显示,肝硬化SBP患者腹水LBP高于无SBP患者,可作为诊断SBP的标志物,本研究结论与之相似,但本研究检测的是外周血,与腹水相比,更易获取标本,具有临床应用优势。LBP水平升高与宿主对细菌感染的免疫反应有关,且LBP越高,感染程度越严重。显效患者治疗前LBP低于有效、无效患者,有效患者LBP低于无效患者,与疗效呈负相关,提示治疗前LBP越高,治疗难度越大,临床应重视此类患者综合管理和干预,以促进病情转归。本研究不足之处在于,受研究时间、成本预算等限制,未对患者进行长期随访,尚不明确各指标是否与患者预后有关,需后续延长随访时间进行深入的统计探讨。

综上,PGRN/Alb、sTREM-1、LBP不仅能作为诊断SBP的生物标志物,还能评估患者对抗菌治疗的反应性,为临床诊治SBP提供可靠的参考。

参考文献

[1] 王惠. PCT、凝血因子联合CRP检测在肝硬化并发SBP中的诊断及预后评估价值[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(12):1643-1647. (下转第1418页)

ETUS 与曲美他嗪联用对心绞痛血流速度及 Toll 样受体 4 的影响

崔耀刚* 吕小宁 庞然

[摘要] **目的** 探讨治疗性超声波(ETUS)与曲美他嗪联用对心绞痛(AP)血流速度及 Toll 样受体(TLR4)的影响。**方法** 选取本院 132 例 AP 患者,简单随机化分组,各 66 例。对照组给予曲美他嗪,观察组给予曲美他嗪+ETUS。比较两组临床疗效、不良反应、AP 发作次数、发作时间、硝酸甘油用量、心功能:左室射血分数(LVEF)、二尖瓣血流舒张早期最大流速/心房收缩期最大流速(E/A)、左室收缩末期内径(LVESD)、回旋支、右冠状动脉、前降支血流速度、血清饥饿激素(Chrelin)、内皮素-1(ET-1)、TLR4 水平。**结果** 观察组治疗总有效率 92.42% 高于对照组 75.76%,差异有统计学意义($P < 0.05$);治疗后观察组心绞痛发作次数、硝酸甘油用量少于对照组,心绞痛发作时间短于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$);治疗后观察组 E/A、LVEF 水平高于对照组,LVESD 小于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$);治疗后观察组回旋支、右冠状动脉、前降支血流速度小于对照组($P < 0.05$);治疗后观察组血清 Chrelin 水平高于对照组,ET-1、TLR4 水平低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$);两组不良反应发生率对比,差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** ETUS 与曲美他嗪联用治疗 AP 效果显著,能有效改善血流速度及心功能,降低血清 Chrelin、ET-1、TLR4 水平,不增加不良反应发生率。

[关键词] 治疗性超声波;曲美他嗪;心绞痛;硝酸甘油

Effects of ETUS combined with trimetazidine on blood flow velocity and Toll-like receptor 4 in angina pectoris

CUI Yaogang*, LV Xiaoning, PANG Ran

(Department of Cardiovascular Medicine, General Hospital of Yima Coal Industry Group Co., Ltd., Yima, Henan, China, 472300)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the effect of therapeutic ultrasound (ETUS) combined with trimetazidine on blood flow velocity and Toll-like receptor (TLR4) in angina pectoris (AP). **Methods** A total of 132 patients with AP in our hospital from January 2018 to September 2019 were selected and randomly divided into groups with 66 cases in each group. The control group was given trimetazidine and the observation group was given trimetazidine + ETUS. The clinical efficacy, adverse reactions, number of episodes of AP, nitroglycerin dosage, cardiac function: left ventricular ejection fraction (LVEF), maximum early mitral flow diastolic flow rate/maximum atrial systolic flow rate (E/A), left ventricular end systolic diameter (LVESD), circumflex, right coronary arteries, anterior descending blood flow velocity, serum starvation hormone (Chrelin), endothelin-1 (ET-1), TLR4 levels before and after treatment were compared between the two groups. **Results** The total effective rate of treatment in the observation group was 92.42% (61/66) higher than that in the control group 75.76% (50/66) ($P < 0.05$). After treatment, the number of angina pectoris and the amount of nitroglycerin in the observation group were less than those in the control group, and the time of angina pectoris was shorter than that in the control group ($P < 0.05$). After treatment, the levels of E/A and LVEF in the

基金项目:河南省科技厅项目(202007469x)

作者单位:义马煤业集团股份有限公司总医院心血管内科,河南,义马 472300

*通信作者:崔耀刚, E-mail: yinuo119@126.com

observation group were higher than those in the control group, and LVESD was lower than that in the control group ($P<0.05$). The blood velocity of the circumflex branch, right coronary artery, and anterior descending branch in the observation group was lower than that in the control group after treatment ($P<0.05$). After treatment, the serum Chrelin level in the observation group was higher than that in the control group, and the levels of ET-1 and TLR4 were lower than those in the control group. There was no significant difference in the incidence of adverse reactions between the two groups ($P>0.05$). **Conclusion** The combination of ETUS and trimetazidine has a significant effect in the treatment of AP, which can effectively improve blood flow speed and cardiac function, reduce serum Chrelin, ET-1, and TLR4 levels, without increasing the incidence of adverse reactions.

[KEY WORDS] Therapeutic ultrasound; trimetazidine; Angina pectoris; Nitroglycerin

心绞痛(Angina pectoris, AP)是冠状动脉斑块破裂、血栓形成致心肌血氧供给障碍而诱发的一种心血管疾病。目前AP发病机制尚未完全阐明,亦无特效治疗手段。曲美他嗪是一种心肌代谢类药物,能促进葡萄糖氧化,强化腺苷三磷酸(ATP)水平,改善心肌代谢继而提升心肌抗缺氧能力,缓解AP症状^[1-2]。近年研究显示,治疗性超声波(External therapeutic ultrasound, ETUS)对抗血栓药物、组织凝血酶原激活物具有强化效应,能促进血栓溶解、对抗血栓形成,对改善AP患者血流动力学具有积极作用^[3]。此外,冠状动脉病变能诱导多种血清因子表达,其中以内皮素-1(endothelin 1, ET-1)、饥饿激素(Chrelin)、Toll样受体(Toll-like receptors 4, TLR4)水平变化最显著^[4]。但目前有关ETUS、曲美他嗪治疗AP的报道多集中在心绞痛症状改善方面,鲜见对上述血清因子及血流速度的影响^[5]。基于此,本研究首次将ETUS与曲美他嗪联用于AP治疗,旨在从心功能、血清因子改善等方面探究此方案治疗效果,为临床完善治疗方案提供参考。

1 资料与方法

1.1 两组一般资料

选取2018年1月至2019年9月本院132例AP患者,简单随机化分组,各66例。纳入标准:符合AP诊断标准^[6];初发AP患者,入组前1个月内新发AP;冠状动脉造影示单支或多支血管病变;知情本研究并签署同意书。排除标准:急性心绞痛患者;伴严重心力衰竭患者;存在严重肝肾功能障碍者;伴出血性疾病、神经精神系统疾病者;主动脉瓣病变或明确陈旧性心肌梗死病患者。两组年龄、性别、体质量指数、心功能(NYHA)分级^[7]、合并症、吸烟史、饮食偏好等基础资料比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表1。

表1 两组一般资料比较 $[(\bar{x}\pm s), n(\%)]$

资料	对照组 (n=66)	观察组 (n=66)	χ^2/t 值	P值	
年龄(岁)	54.36±3.25	53.68±3.15	1.221	0.225	
性别	男	41(62.12)	0.131	0.717	
	女	25(37.88)			23(34.85)
体质量指数(kg/m ²)	21.43±1.11	21.61±1.01	0.974	0.332	
NYHA 分级	I 级	19(28.79)	0.350	0.554	
	II 级	47(71.21)			50(75.76)
合并症	高血脂	15(22.73)	0.364	0.647	
	高血压	9(13.64)	0.677	0.411	
	脑血管疾病	11(16.67)	0.053	0.819	
吸烟史(年)	25.61±6.11	26.31±5.97	0.666	0.507	
饮食偏好	肉食	35(53.03)	0.940	0.625	
	素食	10(15.15)			11(16.67)
	饮食均衡	21(31.82)			16(24.24)

1.2 方法

均指导休息、均衡饮食,予以抗血小板、降脂、血管舒张类药物等对症治疗。①对照组给予曲美他嗪(北京福元医药股份有限公司,国药准字H20065167),餐后口服20 mg/次,3次/d。②观察组给予曲美他嗪+ETUS:曲美他嗪用量同对照组;ETUS治疗采取日本ES-2型超声治疗仪,工作频率设定0.8 MHz,声强1.2 W/cm²,占空比100%;ETUS治疗时维持适宜环境温度(28℃左右),仰卧位,显露心前区,治疗部位包括:自右侧第三肋骨下缘自胸骨右缘平行向左至左侧锁骨中线;自胸骨左缘第三肋骨下缘到心尖区;设定超声治疗仪工作方式为脉冲式,治疗过程中超声探头紧贴辐照区,缓慢移动(1~2 cm/s),治疗20 min/次,2次/d。均连续治疗14 d观察效果。

1.3 观察指标

①临床疗效。临床疗效判定标准^[8]:显效、改善、无效。总有效率=(显效+改善)/总例数×

100%。②对比两组症状改善情况。③对比两组治疗前后心功能[左室射血分数(LVEF)、二尖瓣血流舒张早期最大流速/心房收缩期最大流速(E/A)、左室收缩末期内径(LVESD)]。心功能检测:资深影像学医师采取迈瑞多普勒超声检查仪 DC-N2S 检测 LVEF、E/A、LVESD。④对比两组治疗前后回旋支、右冠状动脉、前降支血流速度。血流速度检测:资深影像学医师采取迈瑞多普勒超声检查仪 DC-N2S 冠状动脉血流成像技术检测回旋支、右冠状动脉、前降支血流速度。⑤对比两组治疗前后血清 Chrelin、ET-1、TLR4 水平。血清 Chrelin、ET-1、TLR4 检测:以真空非抗凝管取 3 mL 晨空腹静脉血,离心 10 min(半径 8 cm,转速 3 500 r/min)取血清,用酶联免疫吸附法测 Chrelin、ET-1、TLR4 水平。试剂盒为上海西塘生物科技有限公司提供,资深专科检验医师规范完成。⑥对比两组恶心、呕吐、局部疼痛、过敏不良反应发生率。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 22.0 统计分析软件,计数资料以 n (%)表示,两组间比较采用 χ^2 检验;符合正态分布的计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,两组间比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组治疗疗效比较

观察组治疗总有效率较对照组高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 两组临床疗效比较 [n (%)]

Table 2 Comparison of clinical efficacy between the two groups [n (%)]

组别	n	显效	改善	无效	总有效率
观察组	66	23(34.85)	38(57.58)	5(7.58)	61(92.42)
对照组	66	18(27.27)	32(48.48)	16(24.24)	50(75.76)
χ^2 值					6.852
P 值					0.009

2.2 两组治疗后症状改善情况比较

治疗后观察组心绞痛发作次数、硝酸甘油用量少于对照组,心绞痛发作时间短于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 3。

2.3 两组心功能指标比较

治疗后观察组 E/A、LVEF 水平高于对照组, LVESD 小于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 4。

2.4 两组血流速度比较

治疗后观察组回旋支、右冠状动脉、前降支血流速度小于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 5。

2.5 两组治疗前后血清指标比较

治疗后观察组血清 Chrelin 水平高于对照组, ET-1、TLR4 水平低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 6。

2.6 不良反应

观察组 3 例恶心,1 例呕吐,2 例局部疼痛;对照组 2 例恶心,2 例呕吐,1 例过敏。观察组不良反应发生率 9.09% (6/66) 与对照组 7.58% (5/66) 比较,差异无统计学意义($\chi^2 = 0.099, P = 0.753$)。

表 3 两组治疗前后症状改善情况比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of symptom improvement between the 2 groups before and after treatment ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	心绞痛发作次数(次/周)		硝酸甘油用量(mg)		心绞痛发作时间(min/次)	
		治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
观察组	66	1.39±0.38	0.53±0.07 ^a	3.84±0.89	1.22±0.35 ^a	4.42±0.73	1.92±0.33 ^a
对照组	66	1.40±0.37	1.01±0.14 ^a	3.74±1.01	2.34±0.42 ^a	4.45±0.71	2.33±0.45 ^a
t 值		0.153	24.913	0.604	16.643	0.239	5.969
P 值		0.879	<0.001	0.547	<0.001	0.811	<0.001

注:与同组治疗前比较,^a $P < 0.05$ 。

表 4 两组心功能指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Comparison of cardiac function indexes between 2 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	E/A		LVEF(%)		LVESD(mm)	
		治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
观察组	66	0.78±0.16	1.33±0.15 ^a	42.20±4.74	52.22±5.51 ^a	56.81±5.34	44.33±3.28 ^a
对照组	66	0.80±0.14	1.01±0.22 ^a	43.05±3.95	48.81±5.67 ^a	57.22±4.63	52.89±3.44 ^a
t 值		0.764	9.763	1.119	3.504	0.471	14.631
P 值		0.446	<0.001	0.265	0.001	0.638	<0.001

注:与同组治疗前比较,^a $P < 0.05$ 。

表5 两组血流速度比较 ($\bar{x} \pm s$, cm/s)

Table 5 Comparison of blood flow velocity between the two groups ($\bar{x} \pm s$, cm/s)

组别	n	回旋支		右冠状动脉		前降支	
		治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
观察组	66	39.69±5.98	22.20±4.03 ^a	37.15±5.72	23.41±3.44 ^a	37.14±5.45	22.47±3.48 ^a
对照组	66	38.91±6.64	25.84±4.81 ^a	38.47±4.83	26.58±4.39 ^a	38.53±4.29	24.65±3.59 ^a
t值		0.709	4.713	1.432	4.618	1.628	3.542
P值		0.480	<0.001	0.154	<0.001	0.106	0.001

注:与同组治疗前比较,^aP<0.05。

表6 两组治疗前后各血清指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 6 Comparison of serum indexes between the two groups before and after treatment ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Chrelin(μg/L)		ET-1(ng/L)		TLR4(ng/mL)	
		治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
观察组	66	13.25±3.47	23.61±3.24 ^a	102.81±11.03	85.75±7.12 ^a	19.84±5.33	8.87±3.22
对照组	66	12.78±4.29	17.80±2.86 ^a	103.22±10.61	94.74±6.89 ^a	20.05±4.68	12.15±2.67
t值		0.692	10.922	0.218	7.371	0.241	6.370
P值		0.490	<0.001	0.828	<0.001	0.810	<0.001

注:与同组治疗前比较,^aP<0.05。

3 讨论

AP主要病理变化为不同程度的冠状动脉粥样硬化,尤其是斑块不稳定出现破溃、出血时可直接激活凝血因子刺激血小板聚集形成血栓。目前降低心肌氧耗,改善心肌血氧供给是临床治疗AP的关键。

曲美他嗪是3-酮酰辅酶A硫解酶缓聚剂类药物,具有抗心肌缺血作用,能通过提升冠状动脉血流量,缓解心肌细胞缺血缺氧状态。有研究显示,曲美他嗪可通过降低Ca²⁺超载增强心脏收缩,强化心排血量,改善微循环^[9]。国内外实验显示,ETUS可提高溶栓酶活性,促进纤维蛋白溶解^[10]。本研究首次联用ETUS与曲美他嗪治疗AP,观察组治疗总有效率92.42%高于对照组,且两组不良反应发生率均较低,分析ETUS作用机制主要是:机械振动作用,超声波机械振动能改变栓子紧密纤维蛋白结构为松散的纤维蛋白结构,充分暴露纤维蛋白溶解酶作用位点;超声波在高强度传递过程中能引起血栓震动,继而将栓子机械性破裂成小碎片^[11]。但有研究显示,电子纤维镜扫描观察ETUS作用后的残留栓子并未发现血栓表面存在破坏及纤维蛋白损害证据^[12]。推测:一定范围内ETUS单独作用无法直接溶解血栓,但能在局部形成空泡化、微流及某些物理变化增强血栓溶解作用与曲美他嗪联合能在提升心肌抗缺氧能力的基础上增加局部血氧供给,减少心绞痛发作次数。

冠状动脉血流异常是AP主要病理特征之一。有关微血管病变患者的冠状动脉血流研究

发现,微血管病变患者基础冠状动脉血流量或冠状动脉血流速度显著升高。本研究结果也显示,AP患者普遍存在回旋支、右冠状动脉、前降支血流速度升高现象,但治疗后观察组小于对照组。分析可能是因心肌缺氧缺血会刺激机体反馈调节冠状动脉局部血流量增加,ETUS与曲美他嗪联用后心肌耐受缺血缺氧能力升高,同时栓子溶解可满足心肌代谢需求,反馈机体下调冠状动脉血流速度。

此外,本研究发现治疗后观察组血清Chrelin水平高于对照组,ET-1、TLR4水平低于对照组。ET-1是血管内皮细胞合成主要介质,其在血清中表达水平能客观反映冠状动脉病变情况,相关报道表明,外周血ET-1水平与冠状动脉病变严重程度呈正相关^[13];TLR4是介导先天炎症与免疫反应的特异性受体,其在动脉粥样硬化斑块形成、破裂中具有关键作用,多种外、内源性配体与TLR4结合可激活核转录因子,促进炎症介质表达,加速动脉粥样硬化发生进展;Chrelin为生长激素释放肽的内源性配体。有研究证实,Chrelin可参与、介导心肌能量代谢过程^[14]。上述研究证实,ETUS与曲美他嗪联用能进一步调节AP患者机体Chrelin、TLR4、ET-1水平,但本研究尚未探明具体调节机制,需后期进一步探究。

综上,ETUS与曲美他嗪联用治疗AP效果显著,能有效改善血流速度及心功能,降低血清Chrelin、ET-1、TLR4水平,不增加不良反应发生率。

参考文献

- [1] Su Q, Li L1, Zhao J, et al. Effects of trimetazidine on peri-procedural microRNA-21 expression by CD4+ T lymphocytes in patients with unstable angina pectoris[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(62):104992-104999.
- [2] 李杰. 美托洛尔联合曲美他嗪治疗冠心病心力衰竭疗效分析[J]. *中国现代药物应用*, 2019, 13(24):122-124.
- [3] Martyn M, O'Shea TP, Harris E, et al. A Monte Carlo study of the effect of an ultrasound transducer on surface dose during intrafraction motion imaging for external beam radiation therapy[J]. *Med Phys*, 2017, 44(10):5020-5033.
- [4] Åström P, Juurikka K, Hadler-Olsen ES, et al. The interplay of matrix metalloproteinase-8, transforming growth factor- β 1 and vascular endothelial growth factor-C cooperatively contributes to the aggressiveness of oral tongue squamous cell carcinoma[J]. *Br J Cancer*, 2017, 117(7):1007-1016.
- [5] 戴雯莉, 吴翔宇, 李昭, 等. 曲美他嗪对不稳定型心绞痛合并糖尿病患者经皮冠状动脉介入治疗后心肌损伤及再发心绞痛的影响[J]. *中国医药*, 2016, 11(12):1753-1756.
- [6] 范维琥, 吴宗贵, 施海明. 麝香保心丸治疗冠心病心绞痛中国专家共识[J]. *中国中西医结合杂志*, 2018, 38(2):145-153.
- [7] Rui Providência, Serge Boveda, Pascal Defaye, et al. Outcome of Primary Prevention Implantable Cardioverter Defibrillator Therapy According to New York Heart Association Functional Classification [J]. *Am J Cardiol*, 2016, 118(8):1225-1232.
- [8] 杨海卿, 王科峰, 刘宇, 等. 桃红四物汤联合银杏达莫对心血瘀阻型心绞痛患者血液流变学及血清炎症因子的影响[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2019, 25(3):340-343.
- [9] Wan P, Su W, Zhang Y, et al. Trimetazidine protects retinal ganglion cells from acute glaucoma via the Nrf2/Ho-1 pathway [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2017, 131(18):2363-2375.
- [10] Strakowski JA, Chiou-Tan FY, Forrest EG, et al. Ultrasound Visualization of Torsional Anatomic Changes From External Rotation of the Anterior Shoulder [J]. *J Comput Assist Tomogr*, 2019, 43(3):519-523.
- [11] Wu P, Jia Y, Qu F, et al. Ultrasound-Responsive Polymeric Micelles for Sonoporation-Assisted Site-Specific Therapeutic Action [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2017, 9(31):25706-25716.
- [12] 王蕊, 杨莉, 陈向辉, 等. 长脉冲超声联合声学微泡治疗大鼠下肢微动脉血栓栓塞的实验研究[J]. *中国超声医学杂志*, 2017, 33(12):1127-1130.
- [13] 马云霞, 马金莲. 美托洛尔联合丹红注射液治疗稳定型心绞痛的疗效观察[J]. *宁夏:宁夏医科大学学报*, 2019, 41(04):404-407.
- [14] 蔡敏. Chrelin对急性心肌梗死大鼠心功能的影响及其机制研究[D]. 重庆:重庆医科大学, 2013.

(上接第1413页)

- [2] 金昕鑫. 化脓性脑膜炎患儿颗粒蛋白前体水平及意义[J]. *中国医师进修杂志*, 2021, 44(1):80-83.
- [3] 邹珊. 颗粒蛋白前体(PGRN)在细菌性肺炎中的保护作用及免疫学机制研究[D]. 重庆:重庆医科大学, 2018:1-60.
- [4] Paine CH, Biggins SW, Pichler RH. Albumin in Cirrhosis: More Than a Colloid [J]. *Curr Treat Options Gastroenterol*, 2019, 17(2):231-243.
- [5] 胡冰, 周栩平, 时英才, 等. 血清SAA、sTREM-1、PCT联合检测在新生儿宫内感染性肺炎中的价值[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2021, 13(3):441-444.
- [6] Agiasotelli D, Alexopoulou A, Vasilieva L, et al. High serum lipopolysaccharide binding protein is associated with increased mortality in patients with decompensated cirrhosis [J]. *Liver Int*, 2017, 37(4):576-582.
- [7] 中国医院协会. 《中国肝病诊疗管理规范》白皮书(节选) [J]. *临床肝胆病杂志*, 2014, 30(3):197-209.
- [8] European Association for the Study of the Liver. EASL clinical practice guidelines on the management of ascites, spontaneous bacterial peritonitis, and hepatorenal syndrome in cirrhosis [J]. *J Hepatol*, 2010, 53(3):397-417.
- [9] Liu C, Li J, Shi W, et al. Progranulin Regulates Inflammation and Tumor [J]. *Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem*, 2020, 19(2):88-102.
- [10] 彭官清, 凌乔, 潘沛沛, 等. 肝硬化并发自发性细菌性腹膜炎患者血清中颗粒蛋白前体水平及临床意义[J]. *中华医院感染学杂志*, 2019, 29(23):3558-3562.
- [11] 储珍玉, 侯森, 黄芳, 等. 颗粒体上皮蛋白前体在脓毒症血症中的变化及其与疾病严重程度的关系[J]. *广东医学*, 2019, 40(20):2890-2893.
- [12] Wright SW, Lovelace-Macon L, Hantrakun V, et al. sTREM-1 predicts mortality in hospitalized patients with infection in a tropical, middle-income country [J]. *BMC Med*, 2020, 18(1):159.
- [13] 李杰, 张莉. sTREM-1含量、血降钙素原和C-反应蛋白在肝硬化腹水非多形核细胞性自发性细菌性腹膜炎的诊断意义[J]. *中国中西医结合消化杂志*, 2019, 27(6):456-460.
- [14] 黎秋芬, 方祎, 王曲僵, 等. PCT、CRP、腹水乳铁蛋白及LBP联合检测在自发性细菌性腹膜炎患者诊断中的临床价值[J]. *标记免疫分析与临床*, 2019, 26(3):477-480.

两种检测策略在细胞库病原体污染的检出分析

曾劲峰¹ 梅秋红² 张耿¹ 郭林枫¹ 李然¹ 许晓绚¹ 赵钰¹ 熊文¹ 刘沐芸^{2*} 王立林^{1*}

[摘要] 目的 比较临床检测策略(CDS)与血筛检测策略(BSS)在综合细胞库供体病原体检测中的差异,进行研究分析。方法 对深圳综合细胞库2016年2月至2017年7月共计7 981例细胞供者的血浆标本进行病原体检测,病原体类型包括乙型肝炎病毒(HBV)、丙型肝炎病毒(HCV)、人类免疫缺陷病毒(HIV1/2)与梅毒螺旋体(TP)四类。实验采用CDS和BSS两种检测策略进行。分析两者在病原体总体检测结果及各单项检测结果的一致性,比较两种检测策略的差异性。同时分析BSS中血清学ELISA与核酸检测(NAT)方法对HBV、HCV、HIV检测结果的一致性,比较两者的差异性。结果 BSS与CDS两种检测策略的一致性一般($K=0.563$),差异有统计学意义($P<0.05$)。两种检测策略中,HBV的一致性一般($K=0.528$),HCV的一致性很差($K=0.105$),HIV1/2的一致性很差($K=0$);比较BSS中血清学检测方法与核酸检测方法,两种检测方法的一致性较好($K=0.651$),但两种方法差异有统计学意义($P<0.05$),其中HBV的血清学检测与核酸检测两种方法的一致性非常好($K=0.833$),而HCV与HIV血清学检测与核酸检测两种方法的一致性较差($K<0.4$)。结论 BSS在细胞供者病原体检测种类上更全面,检测灵敏度更高;在细胞库病原体污染风险防控中应同时重视两种检测方法试剂的选择,整体上降低任何单一检测方法不准确导致的病原体漏检风险,避免病原体交叉污染,保证细胞库储存样本安全。

[关键词] 血筛检测策略;临床检测策略;血清学检测;NAT;ELISA

Analysis of two detection strategies in the detection of pathogen contamination in cell bank

ZENG Jinfeng¹, MEI Qihong², ZHANG Geng¹, WU Linfeng¹, LI Ran¹, XU Xiaoxuan¹, ZHAO Yu¹, XIONG Wen¹, LIU Mu Yun^{2*}, WANG Lilin^{1*}

(1. Shenzhen Blood Center, Shenzhen, Guangdong, China, 518035; 2. Shenzhen Kono Medical Laboratory, Shenzhen, Guangdong, China, 518057)

[ABSTRACT] **Objective** To compare the difference between the clinical detection strategy (CDS) and the blood screening strategy (BSS) in the comprehensive cell bank pathogen detection. **Methods** A total of 7 981 plasma samples from cell donors in Shenzhen Comprehensive Cell Bank were tested for pathogens from February 2016 to July 2017. The types of pathogens include hepatitis B virus (HBV), hepatitis C virus (HCV), and human immunodeficiency virus (HIV1/2) and *Treponema pallidum* (TP). Two detection strategies, CDS and BSS, were used in the experiment. The consistency of the overall detection results and individual detection results of the two methods were analyzed, and the differences of the two detection strategies were compared. At the same time, the consistency of BSS serological ELISA and nucleic acid Testing (NAT) methods in BSS for HBV, HCV and HIV detection results were analyzed, and the differences between the two were compared. **Results** The consistency between BSS and CDS detection strategies was general ($K=0.563$), and the difference was statistically significant ($P<0.05$). In the two detection strategies, the consistency of HBV was general ($K=0.528$), the consistency of HCV and HIV1/2 was very poor ($K=0.105$ and 0). Comparing the serological detection method and nucleic acid detection method in BSS, the consistency of the two detec-

基金项目:广东省医学基金项目(A2020259);深圳市医学重点学科建设经费(SZ XK070);深圳市医疗卫生三名工程项目(SZSM201811092)

作者单位:1.深圳市血液中心,广东,深圳 518035

2.深圳科诺医学检验实验室,广东,深圳 518057

*通信作者:王立林, E-mail: lilywang0724@163.com; 刘沐芸, E-mail: liumuyun@nlclpct.com

tion methods is good ($K=0.651$), the difference between the two methods is statistically significant ($P<0.05$), among which the serological detection of HBV is the same as the nucleic acid detection method. The consistency of the two detection methods is very good ($K=0.833$), while the consistency of the two methods of HCV and HIV serological detection and nucleic acid detection is poor ($K<0.4$). **Conclusion** BSS is more comprehensive in the detection of cell donor pathogens, and the detection sensitivity is higher. In the prevention and control of cell bank pathogen contamination risk, attention should be paid to the choice of two detection methods and reagents, so as to reduce the missed detection of pathogens caused by inaccuracy of any single detection method, avoid pathogen cross-contamination, and ensure the safety of samples stored in the cell bank.

[KEY WORDS] Clinical detection strategy; Blood screening strategy; Serological test; NAT; ELISA

在细胞库供者样本病原体检测方面,我国还未制定专门的标准。可参照的标准为《脐带血造血干细胞库技术规范(试行)》^[1],其对于病原体检测指定参照《血站管理办法》^[2]。而在国际方面,全球先进输血和细胞治疗联盟(Advancing Transfusion and Cellular Therapies Worldwide, AABB)与细胞治疗认证机构(Foundation for the Accreditation of Cellular Therapy, FACT)均列出要检测乙型肝炎病毒(Hepatitis B virus, HBV)、丙型肝炎病毒(Hepatitis C virus, HCV)、人类免疫缺陷病毒(HIV1/2)等病毒,并且指明必须采取病毒核酸检测(Nucleic Acid Testing)方法。因此,依据目前国际行业规范,结合我国政策法规,有两种检测策略可供选择:一种为参照《血站技术操作规程(2015版)》^[3]规定采用1~2种血清学酶联免疫吸附分析(Enzyme Linked Immune Sorbent Assay, ELISA)法检测病原体抗原抗体,同时采用1种核酸检测试剂检测病毒核酸,简称血筛检测策略(Blood screen strategy, BSS);另一种为参照卫健委发布的病毒临床诊断检测标准^[4-8],采用1种临床诊断血清学试剂检测病原体抗原或抗体,简称临床检测策略(Clinical detection strategy, CDS)。本研究采用BSS与CDS检测病原体,病原体类型包括HBV、HCV、HIV与梅毒螺旋体(*Treponema pallidum*, TP),并对检测结果的差异进行综合分析,判断两种策略在检测细胞库病原体污染效果的差异,同时分析血筛检测策略中血清学检测方法 with 核酸检测方法之间的差异性,以确定核酸检测在细胞库病原体污染风险防控中的作用及效果。

1 材料与方法

1.1 标本来源

选取深圳综合细胞库2016年2月至2017年7月7 981例细胞供体的外周血标本,其中来源于孕妇的标本7 571例,均为孕产妇生产前或生产后

7天内进行采样,来源于非孕产妇的成人标本410例,为细胞样本采集前或细胞样本采集后7天内采集供者外周血标本。

1.2 检测设备及试剂

设备:FAME24/30酶免疫检测仪器(瑞士HAMILTON),TECAN RSP/200酶免疫加样器(瑞士TECAN),美国Grifols公司全自动核酸检测平台Procleix Tigris核酸检测系统;试剂:进口检测试剂有意大利Diasorin HBsAg ELISA检测试剂、美国强生ORTHO抗-HCV ELISA检测试剂、美国伯乐Genscreen ULTRA抗-HIV/Ag ELISA检测试剂、意大利Diasorin梅毒螺旋体特异性抗体检测试剂,美国Grifols Procleix Ultrio Assay试剂,国产试剂有北京万泰HBsAg ELISA检测试剂、珠海丽珠抗-HCV ELISA检测试剂、北京万泰抗-HIV ELISA检测试剂、珠海丽珠梅毒螺旋体特异性抗体检测试剂、北京万泰HTLV ELISA检测试剂。

1.3 临床检测策略

由细胞标本采集医院按照术前或产前传染病检测要求及标准对供者在细胞采集前抽血进行HBV、HCV、HIV1/2及TP的抗原/抗体检测,深圳综合细胞库收集汇总检测报告结果。

1.4 血筛检测策略

由深圳市血液中心参照血筛检测标准,采用上述进口及国产试剂对深圳市综合细胞库细胞供者抗凝血样本进行HBsAg、抗HCV、抗HIV、梅毒螺旋体抗体及HBV/HCV/HIV病毒核酸定性检测,所有检测结果均为非反应性则报为非反应性结果,否则计为反应性结果。

1.5 确诊实验

抗-HIV阳性样本送深圳市疾病预防控制中心做HIV蛋白印迹法确证试验检测,梅毒螺旋体特异性抗体阳性样本送深圳市慢性病防治中心采用日本富士(FUJIREBIO)TPPA法进行检测。

1.6 统计方法

采用 IBM SPSS Statistics 21.0 软件进行统计学分析;采用 Kappa 检验上述两种检测策略及方法的一致性;两种检测策略及方法比较采用配对卡方检验; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CDS 与 BSS 检测结果对比

两者检测结果比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 CDS 与 BSS 检测结果对比

Table 1 Comparison of detection results between CDS and BSS

BSS	n	CDS	
		+	-
+	129	51	78
-	7852	0	7852
合计	7981	51	7930
K 值		0.563	
χ^2 值		3124	
P 值		<0.001	

2.2 各检测项目两种检测策略结果对比

两种检测策略在 HBV、TP、HCV 检测结果比较,差异有统计学意义($P < 0.005$)。见表 2。

2.3 血筛策略中血清学 ELISA 检测与 NAT 检测结果分析比较

血筛检测策略中 HBV、HCV、HIV 血清学 ELISA 检测与病原体核酸检测(nucleic acid detection, NAT)两种方法检测结果一致性一般($K=0.651$);两种检测方法检测结果比较,差异有统计学意义($P < 0.001$)。见表 3。两种检测方法对 HBV 检测结果一致性非常好($K=0.833$);两种检测方法检测结果

比较,差异有统计学意义($P < 0.001$);两种方法对 HCV 与 HIV 检测结果一致性较差($K=0$)。见表 4。

表 3 BSS 中 ELISA 检测与 NAT 检测结果总体分析

Table 3 Overall analysis of ELISA and NAT detection

ELISA 检测	n	NAT 检测	
		+	-
+	102	53	49
-	7 879	7	7 872
合计	7 981	60	7 921
K 值		0.651	
χ^2 值		3622	
P 值		<0.001	

表 4 BSS 中 ELISA 检测与 NAT 检测对 HBV、HCV、HIV 结果分析

Table 4 ANALYSIS of HBV, HCV and HIV results by ELISA and NAT in BSS

HBsAg	HBV-DNA		HCVAb	HCV-RNA		HIVAb1/2		HIV-RNA	
	+	-		+	-	+	-	+	-
+	53	14	+	0	23	+	0	0	12
-	7	7907	-	0	7958	-	0	0	7969
K 值	0.833			0			0		
χ^2 值	5559								
P 值	<0.001								

NAT 结果是常量,无法计算统计量

2.4 血筛检测阳性样本中各项目占比分析

各项目阳性检出率及占比为:HBsAg 与 HBV-DNA 是占比最高的项目,分别为 30.45% 与 27.27%。见表 5。

2.5 确证试验

对 23 例抗-HCV 阳性样本进行 RIBA 确证实验发现样本均为阴性和不确定,无一例阳性;对 51 例 SYP 阳性样本进行 TPPA 检测,结果显示 20 例阳性,31 例阴性,真阳性率为 39.22%;对 12 例抗 HIV 阳性样本进行蛋白印迹法确证实验,证实其样本均为阴性。

表 2 各检测项目两种检测策略结果对比

Table 2 Comparison of results of two test strategies for each test item

BSS	n	CDS		BSS	n	CDS	
		无反应性	有反应性			无反应性	有反应性
HBV	无反应性	7 920	7 920	HIV1/2	无反应性	7 971	7 971
	有反应性	61	39		有反应性	10	10
	合计	7 981	7 959		合计	7 981	7 981
	K 值	0.528			K 值	0	
	χ^2 值	2864			χ^2 值		
P 值	<0.001		P 值	CDS 为常量,无法计算统计量			
HCV	无反应性	7 963	7 963	TP	无反应性	7 947	7 947
	有反应性	18	17		有反应性	34	5
	合计	7 981	7 980		合计	7 981	7952
	K 值	0.105			K 值	0.920	
	χ^2 值	442			χ^2 值	6 803	
P 值	0.002		P 值	<0.001			

表5 血筛检测各项目阳性占比分析统计

Table 5 Analysis and statistics of the positive proportion of each item in BSS

检测项目	阳性样本数	阳性样本占比(%)	阳性检出率(%)
HBsAg	67	30.45	0.84
HCVAb	23	10.45	0.29
HIV1/2Ab	12	5.45	0.15
SYP	51	23.18	0.64
HTLV	7	3.18	0.09
NAT	60(HBV-DNA)	27.27	0.75

3 讨论

CDS 与 BSS 两种检测策略在细胞库样本供体血液标本检测结果上存在差异,其产生的原因可能是因为 BSS 采用 ELISA 和 NAT 两种方法,共同来确定结果,从而导致与 CDS 结果出现显著差异。采用 BSS 对细胞供者进行筛查检验,ELISA 双试剂较单试剂检测具有更高的检测灵敏度,同时采用 NAT 方法对 HBV、HCV 和 HIV 进行筛查,能提高病原体感染窗口期的检出率,尤其是在 HBV 方面显示出较好效果(提高 HBV 窗口感染期检出率 11.67%),能更好的防范病原携带样本混入正常的细胞库。

从血清学检测的确认结果(HBV 除外)可以发现,本研究中样本的假阳性率高于普通献血人群,分析原因可能为研究样本多来源为孕产妇血清样本,其孕产期受激素和孕期的影响,较一般人群更易产生非特异性抗体,易产生假阳性结果。根据 Wesolowski 等的研究报道孕妇初筛试验的假阳性率约为 0.14%^[9]。国内研究者也分析了孕妇的传染病检测项目的假阳性情况,蒋春云等研究者对 7 例 ELISA HIV 反应性孕妇追踪确认检测中发现,有 3 例孕妇在追踪后抗体阳转,而其余 4 名孕妇 HIV 抗体和核酸检测持续阴性^[10]。目前血筛 HIV 检测主要采用第四代检测试剂^[11],另有研究者分析了孕妇 HIV 电化学发光的假阳性情况,16 例筛查反应性样本中,HIV 确认检测 1 例阳性,其余 15 例为阴性^[12]。对孕妇的梅毒 ELISA 研究也发现,ELISA 检测的假阳性较高,可达 8.49%^[13]。

由此可见,采用 DSS 对细胞库供体血液检测,灵敏度较高,可以有效防止细胞库的病原体污染。但针对孕妇这一特殊群体,在初筛之外,应结合确认实验或 NAT 结果,可减低假阳性率。

虽然 BSS 中应用的双试剂检测可提高检测灵敏度,但 ELISA 存在因“窗口期”、病毒变异、免疫沉默等造成的漏检,在目前使用的 ELISA 检测试

剂的条件下,HBsAg、抗-HCV 及抗-HIV 的平均“窗口期”分别约为 59 d、72 d 及 22 d^[14]。而采用 NAT,可将 HBV、HCV 及 HIV 的平均“窗口期”分别缩短至 20 d、10 d 及 7 d^[15-16],专家甚至建议有必要采用高灵敏度的核酸检测技术应用于术前筛查^[17],可见应用 NAT 可提高整体检测系统的灵敏度,降低检测后感染的残余风险。

由此可见,BSS 检测灵敏度更高,在细胞库病原体污染风险防控中应采用此策略,整体上降低任何单一检测方法不准确导致的病原体漏检风险,避免病原体交叉污染,保证细胞库储存样本安全。

参考文献

- [1] 国家卫生部医政处. 脐带血造血干细胞库技术规范(试行)[S]. 2002.
- [2] 国家卫生健康委. 血站管理办法(2018年修订)[S]. 2018.
- [3] 国家卫生健康委. 血站技术操作规程(2015版)[S]. 2015.
- [4] 中华人民共和国卫生部. 乙型病毒性肝炎诊断标准(WS299-2008)[S]. 北京:人民卫生出版社, 2009.
- [5] 中华人民共和国卫生健康委员会. 丙型肝炎诊断(WS213-2018)[S]. 北京:中国标准出版社, 2018.
- [6] 中华人民共和国卫生健康委员会. 梅毒诊断(WS273-2018)[S]. 北京:中国标准出版社, 2018.
- [7] 中华人民共和国卫生健康委员会. 艾滋病和艾滋病病毒感染诊断(WS293-2019)[S]. 北京:中国标准出版社, 2019.
- [8] 中华人民共和国卫生健康委员会. 感染性疾病免疫测定程序及结果报告(WS/T573-2018)[S]. 北京:中国标准出版社, 2018.
- [9] Wesolowski LG, Delaney KP, Lampe MA, et al. False-positive human immunodeficiency virus enzyme immunoassay results in pregnant women[J]. PLoS ONE, 2011, 6(1):e16538.
- [10] 蒋春云,尹德清,刘秀芳. 7例孕妇HIV筛查阳性跟踪检测结果分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2019, 29(13):1647-1649.
- [11] 陈尚良,郑欣,曾月婷. 第四代HIV抗原抗体检测试剂在血液筛查中的应用[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2014, 6(1):30-32.
- [12] 夏晓红,张梦莹,张晓洁. 电化学发光检测孕妇HIV假阳性情况分析[J]. 江苏医药, 2019, 45(3):313-314.
- [13] 孙雪琴. 梅毒血清学检测方法选择与产前常规筛查中的应用探讨[J]. 基层医学论坛, 2015, 19(28):3962-3963.
- [14] 陕柏峰,史宏睿,焦东丽. 太原市血液筛查后输血传播HIV残余风险度的评估[J]. 中国艾滋病性病, 2020, 5:540-542.
- [15] 吴敬林,周仲民. 核酸检测对降低输血残余风险研究现状[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2014, 35(8):1198-1199.
- [16] 王宋兴,曾劲峰. 深圳地区无偿献血HIV感染情况调查分析及输血残余风险评估[J]. 中国输血杂志, 2012, 25(7):674-675.
- [17] 李宝琪,陈培松,黄浩. 高灵敏乙型肝炎病毒核酸检测在术前筛查中的应用价值[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2019, 11(5):355-360.

CGRP、IGF-1、Bcl-2 蛋白在急性脑梗死病情评估与预后预测中的价值

张家森* 赵玉 李鹏涛

[摘要] 目的 探究降钙素基因相关肽(CGRP)、胰岛素样生长因子-1(IGF-1)、凋亡相关因子 Bcl-2 蛋白在急性脑梗死(ACI)病情评估与预后预测中的价值。方法 选取阜阳市第二人民医院 ACI 患者 117 例,根据 90 d 预后分为预后良好组(87 例)与预后不良组(30 例),比较两组、不同病情程度患者血清 CGRP、IGF-1、Bcl-2 蛋白水平,分析各指标与病情程度及预后的关系,并评价各指标对预后的预测价值。结果 预后不良组血清 CGRP、IGF-1 低于预后良好组,Bcl-2 蛋白高于预后良好组,差异有统计学意义($P<0.05$);血清 CGRP、IGF-1 与病情程度呈负相关,Bcl-2 蛋白与病情程度呈正相关($P<0.05$);多元线性回归分析,将 NIHSS 评分、梗死面积等其他因素控制后,血清 CGRP、IGF-1、Bcl-2 蛋白仍与预后显著相关($P<0.05$);ROC 曲线分析,血清 CGRP、IGF-1、Bcl-2 蛋白预测预后的 AUC 分别为 0.763、0.623、0.792,三者联合预测预后的 AUC 为 0.871,95%CI 为 0.797~0.926,诊断敏感度为 90.00%,特异度为 70.11%,明显优于各指标单独预测($P<0.05$)。结论 CGRP、IGF-1、Bcl-2 蛋白与 ACI 病情、预后显著相关,联合检测不仅能评估病情程度,还可能成为临床预测预后的重要途径。

[关键词] 急性脑梗死;降钙素基因相关肽;胰岛素样生长因子-1;凋亡相关因子 Bcl-2 蛋白

The value of CGRP, IGF-1 and Bcl-2 proteins in the evaluation of acute cerebral infarction and the prediction of prognosis

ZHANG Jiasen*, ZHAO Yu, LI Pengtao

(Department of Emergency, Fuyang Second People's Hospital, Fuyang, Anhui, China, 236000)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the value of calcitonin gene-related peptide (CGRP), insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and apoptosis-related factor Bcl-2 protein in the evaluation and prognosis of acute cerebral infarction (ACI). **Methods** A total of 117 ACI patients in Fuyang Second People's Hospital were selected and divided into a good prognosis group (87 cases) and a poor prognosis group (30 cases) according to the 90-day prognosis. The two groups were compared with the protein levels of CGRP, IGF-1, and Bcl-2 in patients with different disease levels. The relationship between various indicators and the severity of the disease and prognosis was analyzed. The predictive value of each indicator on the prognosis was evaluated. **Results** The serum CGRP and IGF-1 levels in the poor prognosis group were lower than those in the good prognosis group, and Bcl-2 was higher than that in the good prognosis group ($P<0.05$). The serum levels of CGRP and IGF-1 were negatively correlated with the severity of the disease, and Bcl-2 was positively correlated with the degree of illness ($P<0.05$). Multiple linear regression analysis, after controlling for other factors such as NIHSS score, infarct size, serum CGRP, IGF-1, and Bcl-2 were still significantly correlated with the prognosis ($P<0.05$). ROC curve analysis showed that the prognostic AUC of serum CGRP, IGF-1, and Bcl-2 were 0.763, 0.623, 0.792, respectively. The combination of the three predicted the prognosis AUC was 0.871, the 95%CI was 0.797~0.926, and the diagnostic sensitivity was 90.00%. The specificity was 70.11%, which is significantly better than the individual prediction of each indicator. **Conclusion** CGRP, IGF-1, and Bcl-2 are

基金项目:安徽省公益性研究联动计划项目(15011d04060)

作者单位:阜阳市第二人民医院急诊科,安徽,阜阳 236000

*通信作者:张家森, E-mail: zjiasen20210622@163.com

significantly related to the condition and prognosis of ACI. The combined detection can assess the severity of the condition and is an important way to predict prognosis in clinical practice.

[KEY WORDS] Acute cerebral infarction; Calcitonin gene-related peptide; Insulin-like growth factor-1; Apoptosis-related factor Bcl-2 protein

急性脑梗死(Acute cerebral infarction, ACI)是临床神经内科多发疾病,具有发病率高、致残率高、病死率高等特点,采取可靠措施及早预测预后、及时进行针对性防治对降低致残、遗留后遗症等预后不良风险至关重要^[1]。降钙素基因相关肽(Calcitonin gene related peptide, CGRP)是一种生物活性多肽,具有调节脑循环、抑制脂质过氧化反应、保护脑组织等作用^[2]。胰岛素样生长因子-1(Insulin like growth factor-1, IGF-1)具有抗动脉粥样硬化作用,可通过参与血管再生、炎症反应、平滑肌增殖迁移等途径影响动脉粥样硬化斑块稳定性,与受体结合后还能调节神经功能^[3]。Bcl-2蛋白属于凋亡相关因子,在多种原因所致脑损伤过程中具有重要作用^[4]。目前,关于上述简便生化指标用于预测ACI患者预后的研究较少,缺乏循证依据。为此,本研究尝试探究CGRP、IGF-1、Bcl-2蛋白在ACI病情评估与预后预测中的价值,旨在为临床提供数据支持。报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取阜阳市第二人民医院2018年5月至2020年12月ACI患者117例,根据90 d预后改良Rankin量表(Modified Rankin scale, mRS)评分^[5]分为预后良好组(87例, mRS评分<3分)与预后不良组(30例, mRS评分≥3分)。预后良好组男55例,女32例,平均年龄(58.21±6.38)岁,梗死部位:基底节区48例,小脑20例,脑干19例,病情程度:轻度38例,中度44例,重度5例,梗死面积:小面积32例,中面积38例,大面积17例。预后不良组男20例,女10例,平均年龄(60.17±5.91)岁,梗死部位:基底节区18例,小脑8例,脑干4例,病情程度:轻度7例,中度14例,重度9例,梗死面积:小面积4例,中面积10例,大面积16例。两组年龄、性别、梗死部位比较差异无统计学意义($P>0.05$)。本研究经本院伦理委员会审批通过。

纳入标准:①均经颅脑CT、核磁共振证实为ACI;②均符合《急性缺血性脑卒中急诊急救中国

专家共识(2018版)》ACI相关诊断标准^[6];③患者及家属均知情,签订知情承诺书。排除标准:①既往存在脑部创伤史、手术史者;②伴有血液系统疾病者;③合并其他原因所致的脑损伤者;④存在心肝肾等其他重要脏器严重功能异常者;⑤存在严重急慢性感染、代谢性疾病、自身免疫性疾病者;⑥濒临死亡者。

1.2 方法

①治疗方法:所有患者入院后均给予阿替普酶溶栓治疗,给药总剂量:0.9 mg/kg,静脉推入10%药量(1 min),采用输液泵静脉泵注其余90%药量(1 h)。②检测方法:于所有患者入院后抽取空腹静脉血3 mL,离心处理,取血清,保存于-80℃条件下。采用酶联免疫吸附法检测血清CGRP、IGF-1、Bcl-2蛋白水平,试剂盒均购自美国R&B公司,所有操作严格遵循试剂盒说明书。③病情评估方法:以美国国立卫生研究院卒中量表(National Institutes of Health Stroke Scale, NIHSS)评分^[7]为依据评估病情程度,≤4分为轻度,5~20分为中度,>20分为重度;梗死面积:<1.5 cm为小面积,1.5~5.0 cm为中面积,>5.0 cm为大面积。

1.3 统计学方法

采用统计学软件SPSS 22.0处理数据,计量资料以($\bar{x} \pm s$)描述,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两组间比较采用LSD- t 检验,两组间比较采用独立样本 t 检验;计数资料用 $n(\%)$ 表示, χ^2 检验;影响因素采用多元线性回归分析;相关性采用Pearson相关系数模型分析;预测价值采用受试者工作特征(ROC)曲线分析,获取曲线下面积,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。以 $P<0.05$ 表明差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组血清CGRP、IGF-1、Bcl-2蛋白水平

预后不良组血清CGRP、IGF-1低于预后良好组,Bcl-2蛋白高于预后良好组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表1。

表1 两组血清CGRP、IGF-1、Bcl-2蛋白水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of serum CGRP, IGF-1 and bcl-2 protein levels between the two groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	CGRP (ng/L)	IGF-1 (ng/mL)	Bcl-2 蛋白 (ng/mL)
预后不良组	30	44.72±6.68	92.77±36.49	12.85±3.04
预后良好组	87	51.28±5.03	141.14±48.05	10.32±2.26
t 值		5.641	5.031	4.818
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

2.2 不同病情程度患者血清CGRP、IGF-1、Bcl-2蛋白水平

单因素方差分析,不同病情程度患者血清CGRP、IGF-1、Bcl-2蛋白水平差异有统计学意义 ($P<0.05$);血清CGRP、IGF-1水平重度患者<中度患者<轻度患者, Bcl-2蛋白水平重度患者>中度患者>轻度患者,差异有统计学意义 ($P<0.05$)。见表2。

表2 不同病情程度患者血清CGRP、IGF-1、Bcl-2蛋白水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of serum CGRP, IGF-1 and bcl-2 protein levels in patients with different disease degrees ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	CGRP (ng/L)	IGF-1 (ng/mL)	Bcl-2 蛋白 (ng/mL)
轻度患者	31	55.43±6.35 ^b	170.33±54.19 ^b	9.41±1.50 ^b
中度患者	60	49.61±5.17 ^a	125.46±46.31 ^a	10.87±1.73 ^a
重度患者	26	42.63±4.88 ^{ab}	87.51±39.08 ^{ab}	13.06±2.29 ^{ab}
F 值		39.046	22.200	28.807
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

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

2.3 血清CGRP、IGF-1、Bcl-2蛋白与病情程度的关系

Pearson相关性分析,血清CGRP、IGF-1与病情程度呈负相关, Bcl-2蛋白与病情程度(NIHSS评分)呈正相关 ($r=-0.657$ 、 -0.703 、 0.736 , P 均 <0.05)。

2.4 血清CGRP、IGF-1、Bcl-2蛋白与预后的关系

多元线性回归分析,将NIHSS评分、梗死面积等其他因素控制后,血清CGRP、IGF-1、Bcl-2蛋白仍与预后显著相关 ($P<0.05$)。见表3。

表3 血清CGRP、IGF-1、Bcl-2蛋白与预后的关系

Table 3 Relationship between serum CGRP, IGF-1, bcl-2 protein and prognosis

自变量	偏回归系数	标准误差	偏回归系数 (标准化)	t 值	P 值
常量	4.712				
CGRP	-0.711	0.048	-0.720	-14.813	<0.001
IGF-1	-0.659	0.053	-0.673	-12.434	<0.001
Bcl-2 蛋白	0.736	0.061	0.740	12.066	<0.001

2.5 血清CGRP、IGF-1、Bcl-2蛋白对预后预测价值

以预后不良作为阳性样本,预后良好作为阴性样本,绘制ROC曲线,结果显示,血清CGRP、IGF-1、Bcl-2蛋白预测预后的AUC分别为0.763、0.623、0.792,三者联合预测预后的AUC为0.871,95%CI为0.797~0.926,Z统计=10.342, $P<0.001$,诊断敏感度为90.00%,特异度为70.11%,明显优于各指标单独预测。见图1。

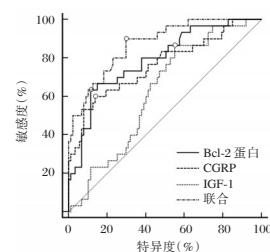


图1 血清CGRP、IGF-1、Bcl-2蛋白对预后预测价值
Figure 1 prognostic value of serum CGRP, IGF-1 and Bcl-2 proteins

3 讨论

近年来,随着人口老龄化加剧,ACI发病率呈逐年升高趋势,是致残、致死的主要疾病之一,且复发风险较高,严重影响预后^[8-9]。相关数据统计显示,ACI静脉溶栓3个月后预后不良发生率可达到42.70%,防治形势极为严峻^[10]。因此,寻找早期预测ACI预后的生化指标对制定调整治疗方案、改善预后具有重要意义。

CGRP是一种由37个氨基酸组成的生物活性多肽,主要有降钙素基因表达,广泛分布于心血管与神经系统,具有较强舒张血管、促进侧支循环开放作用,还能拮抗交感神经兴奋^[11]。结合乔文政等^[12]报道考虑为:在ACI发生发展过程中,CGRP可通过拮抗神经肽Y(NPY)、内皮素-1(ET-1)的缩血管反应控制或改善脑血管狭窄、阻塞及缺血情况,从而导致血液中的CGRP过度消耗,导致其水平明显下降。同时受损的神经细胞会不断且过量分泌缩血管物质,导致CGRP分泌功能相对减弱,导致其释放量减少,促使其在血液中的含量进一步下降,其水平越低,越无法维持机体缩血管物质与舒血管物质的相对平衡,从而导致ACI病情恶化,影响预后^[13]。提示临床可将CGRP作为评估病情、预测预后的重要指标。

IGF-1属于类似胰岛素的蛋白类物质,具有广泛生物学作用,正常情况下,主要在肝脏中表达,仅有

少部分以游离形式存在于血液循环中,可促进细胞生长、分化、成熟,还能够调节血管阻力、舒张外周血管、改善血流灌注^[14]。陶海雁等^[15]研究中显示,与健康人群相比,血清 IGF-1 水平在 ACI 患者中呈显著下降趋势。在此基础上,本研究发现,血清 IGF-1 与 ACI 病情程度具有负相关关系,是预后的重要影响因素。同时,研究表明,IGF-1 具有清除氧自由基、抵抗炎症反应、保护动脉粥样硬化血管内皮功能作用,可保护神经系统^[16]。说明临床可通过检测血清 IGF-1 水平为评估 ACI 病情提供有效依据,还可将其应用于预测预后中,有助于保障预后改善。

Bcl-2 蛋白是 Bcl-2 蛋白家族中的主要抗凋亡蛋白,主要作用是调节细胞凋亡。既往有研究发现,细胞凋亡在梗死灶周围缺血半暗带组织中发挥至关重要作用,而 Bcl-2 蛋白在脑缺血半暗带组织中表达增多^[17]。本研究发现,Bcl-2 蛋白水平在 ACI 轻度患者、中度患者、重度患者中呈逐渐升高趋势,与病情程度呈正相关。结合李山等^[18]研究推测原因:线粒体是 Bcl-2 蛋白调控内在凋亡途径的靶点,Bcl-2 蛋白可通过降低线粒体膜通透性,抑制线粒体释放促凋亡因子进入胞质内,从而阻止细胞凋亡进程,发挥抑制细胞凋亡作用,随着 ACI 病情进展、加重,神经细胞凋亡进程逐渐加快,促使 Bcl-2 蛋白呈现代偿性增多,且随病情加重不断增加。本研究结果还表明,将其他因素控制后,血清 Bcl-2 蛋白仍与 ACI 患者预后显著相关,可见 Bcl-2 蛋白能作为预测预后指标,为临床早期预测预后提供可靠信息。

此外,血清 CGRP、IGF-1、Bcl-2 蛋白虽可作为预测预后指标,单独预测价值良好,但仍有较大提升空间。为此,本研究初次尝试分析上述指标联合预测预后价值,结果发现,血清 CGRP、IGF-1、Bcl-2 蛋白联合预测预后价值显著高于各指标单独预测,为临床预测预后提供可靠的新思路。但本研究未详细探究 CGRP、IGF-1、Bcl-2 蛋白与 ACI 患者远期预后的关系,有待进一步分析研究。

综上所述,CGRP、IGF-1、Bcl-2 蛋白与 ACI 病情、预后显著相关,联合检测不仅能评估病情程度,还可能成为临床预测预后的重要途径。

参考文献

[1] Sun Z, Xu Q, Gao G, et al. Clinical observation in edaravone treatment for acute cerebral infarction [J]. *Niger J Clin Pract*, 2019, 22(10): 1324-1327.

[2] 赵艳,唐明山,张志坚.急性脑出血患者血清中 CCL17、CXCL12 及 CGRP 的动态变化[J]. *基因组学与应用生物学*, 2019, 38(8): 3877-3882.

[3] 信鹏程,张申伟,牛思泉,等.血清 IGF-1 含量对 STEMI 患者急诊介入术后 MACE 的预测价值[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2021, 13(2): 309-312.

[4] 张子英,王新华,席妹景,等.外周血 miR-25 表达与急性脑梗死患者凋亡分子含量及 90 天预后的相关性[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2020, 28(9): 773-777.

[5] Isaksson E, Wester P, Laska AC, et al. Validation of the Simplified Modified Rankin Scale Questionnaire [J]. *Eur Neurol*, 2020, 83(5): 493-499.

[6] 中国老年医学学会急诊医学分会,中华医学会急诊医学分会卒中医学组,中国卒中学会急救医学分会.急性缺血性脑卒中急诊急救中国专家共识(2018 版)[J]. *中华急诊医学杂志*, 2018, 27(7): 721-728.

[7] Kwah LK, Diong J. National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS) [J]. *J Physiother*, 2014, 60(1): 61.

[8] Liang Y, Wu J, Liu J, et al. The Clinical Implications of Thrombelastography in the Diagnosis of Acute Cerebral Infarction [J]. *Clin Lab*, 2018, 64(1): 147-152.

[9] 段圣杰,尚进林,琚小红,等.急性脑梗死患者血清内皮素、IL-10 及 hs-CRP 水平与神经功能缺损的相关性研究[J]. *中华生物医学工程杂志*, 2018, 24(2): 116-120.

[10] 吴巧玲,黄丹红,叶腾芳.急性脑梗死静脉溶栓治疗后近期预后不良的影响因素分析[J]. *中国医院统计*, 2020, 27(3): 215-217.

[11] 宋铁军,王亚斐,徐海丰,等. 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[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2021, 13(4): 535-538.

[12] 乔文政,杨艳丽.阿替普酶静脉溶栓联合高压氧对急性缺血性脑卒中患者 GCS 评分及血清 TXB2 和 CGRP 水平变化的影响[J]. *国际医药卫生导报*, 2018, 24(6): 894-897.

[13] 杨庆武,张永亮,刘水源,等.重型颅脑损伤患者血浆内皮素-1、降钙素基因相关肽变化与二次脑损伤关系探讨[J]. *福建医药杂志*, 2019, 41(1): 90-92.

[14] Lu WJ, Zeng LL, Wang Y, et al. Blood microRNA-15a Correlates with IL-6, IGF-1 and Acute Cerebral Ischemia [J]. *Curr Neurovasc Res*, 2018, 15(1): 63-71.

[15] 陶海雁,王晓平.急性缺血性脑卒中患者血清胰岛素样生长因子-1 水平变化与相关影响因素的研究[J]. *世界临床药物*, 2018, 39(6): 412-416.

[16] 闫建华,周扬,冀瑞俊.脑梗死患者血清中 IGF-1、IL-2 及 ICAM-1 水平与血管狭窄及神经功能的关系[J]. *解放军预防医学杂志*, 2019, 37(4): 69-70.

[17] 张岚,韩辉,张艳锋,等.高压氧调控 miR-153-3p/Bcl-2 轴缓解大鼠脑梗死的作用机制[J]. *中华航海医学与高气压医学杂志*, 2021, 28(2): 174-178.

[18] 李山,蒋向阳,刘顺达.低氧诱导因子-1 α 、血管内皮生长因子、Bcl-2 与急性脑梗死患者神经功能缺损度的相关研究[J]. *神经损伤与功能重建*, 2019, 14(2): 79-82.

· 论 著 ·

Lp(a)、OPN、NLR 与冠心病患者并发狭窄性瓣膜病相关性

张航* 许华山 刘超

[摘要] **目的** 探讨脂蛋白(a)[Lp(a)]、骨桥蛋白(OPN)、中性粒细胞与淋巴细胞比值(NLR)与冠心病患者并发狭窄性瓣膜病相关性。**方法** 选取2018年1月至2021年1月本院收治的300例冠心病患者,根据是否并发狭窄性瓣膜病分为狭窄组($n=72$)、无狭窄组($n=228$),比较两组基线资料、Lp(a)、OPN、NLR水平,并比较狭窄组不同严重程度患者Lp(a)、OPN、NLR水平,采用多因素Logistic回归方程分析冠心病患者并发狭窄性瓣膜病的相关影响因素,采用受试者工作特征曲线(ROC)及ROC下面积(AUC)分析各指标及联合预测冠心病患者并发狭窄性瓣膜病的价值。**结果** 狭窄组心肌梗死史、冠脉病变支数、Gensini评分、Lp(a)、OPN、NLR与无狭窄组比较,差异有统计学意义($P<0.05$);狭窄组不同严重程度患者Lp(a)、OPN、NLR:重度>中度>轻度,比较差异有统计学意义($P<0.05$);将心肌梗死史、冠脉病变支数、Gensini评分控制后,Lp(a)、OPN、NLR仍与并发狭窄性瓣膜病相关($P<0.05$);Lp(a)、OPN、NLR预测冠心病患者并发狭窄性瓣膜病的AUC为0.861、0.820、0.707,各指标联合预测冠心病患者并发狭窄性瓣膜病的AUC为0.915。**结论** Lp(a)、OPN、NLR升高与冠心病患者并发狭窄性瓣膜病风险增加有关,联合检测三者对狭窄性瓣膜病具有较高的预测效能,能为临床防治不良心血管事件的发生提供参考。

[关键词] Lp(a); OPN; NLR; 冠心病; 狭窄性瓣膜病

Correlation of Lp(a), OPN, NLR and coronary heart disease patients with stenotic valvular disease

ZHANG Hang*, XU Huashan, LIU Chao

(Department of Cardiac Surgery, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan, China, 450052)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the correlation between lipoprotein(a)[Lp(a)], osteopontin(OPN), neutrophil to lymphocyte ratio(NLR) and coronary heart disease patients with stenotic valvular disease. **Methods** A total of 300 patients with coronary heart disease admitted to our hospital from January 2018 to January 2021 were divided into stenosis group ($n=72$) and non-stenosis group ($n=228$) according to whether they were complicated by stenotic valvular disease, and the two groups were compared. Baseline data, Lp(a), OPN, NLR levels, and compare the Lp(a), OPN, NLR levels of patients with different severity in the stenosis group, and use the multivariate logistic regression equation to analyze the relevant influencing factors of coronary heart disease patients with stenotic valvular disease, Using receiver operating characteristic curve(ROC) and ROC area(AUC) to analyze the value of each index and jointly predict the value of coronary heart disease patients with stenotic valvular disease. **Results** The history of myocardial infarction, number of coronary artery lesions, Gensini score, Lp(a), OPN, NLR in the stenosis group compared with the non-stenosis group, the difference was statistically significant ($P<0.05$); Lp(a), OPN, NLR: severe > moderate > mild, the difference between pairwise comparisons was statistically significant ($P<0.05$); after the history of

基金项目:河南省医学科技攻关计划项目(201402012)

作者单位:郑州大学第一附属医院心外科,河南,郑州450052

*通信作者:张航, E-mail: xing20210506@163.com

myocardial infarction, the number of coronary artery lesions, and the Gensini score were controlled, Lp(a), OPN, and NLR were still associated with concurrent stenosis Valvular disease related ($P<0.05$); Lp(a), OPN, NLR predict the AUC of patients with coronary heart disease complicated by stenotic valvular disease as 0.861, 0.820, 0.707, and the combination of all indicators predicts the AUC of patients with coronary heart disease complicated by stenotic valv Is 0.915. **Conclusion** The increase of Lp(a), OPN and NLR is related to the increased risk of coronary heart disease complicated by stenotic valvular disease. The combined detection of the three has a high predictive power for stenotic valvular disease, and can prevent the occurrence of adverse cardiovascular events in the clinic. for reference.

[KEY WORDS] Lp(a); OPN; NLR; Coronary heart disease; Stenotic valvular disease

狭窄是心脏瓣膜病变的主要类型之一,发生原因与冠心病心肌缺血性坏死等有关,一旦发生狭窄性瓣膜病变,可影响正常的血液流动,增加心脏负担,损害心脏功能,导致心力衰竭,威胁患者生命健康,因此早期预测冠心病患者并发狭窄性瓣膜病的风险意义重大^[1]。脂蛋白(a)[Lipoprotein(a),Lp(a)]富含胆固醇,可进入、沉积在血管壁上,促进动脉粥样硬化,并能抑制纤维蛋白原水解,促进血栓形成,与冠心病、脑卒中等心脑血管疾病发生密切相关^[2]。骨桥蛋白(Osteopontin, OPN)广泛存在于细胞外基质中,OPN越高,冠心病患者冠脉病变越严重,是冠心病的相关危险因素^[3]。中性粒细胞与淋巴细胞比值(Neutrophil to lymphocyte ratio, NLR)系新型炎症标志物,在非ST段抬高急性冠脉综合征重度冠状动脉病变患者中水平高于轻中度者,且在经皮冠状动脉介入治疗术后发生心血管终点事件患者中水平高于未发生心血管终点事件者,对冠脉病变程度与心血管事件的发生具有一定的预测价值^[4]。但目前关于Lp(a)、OPN、NLR与冠心病患者并发狭窄性瓣膜病相关性的报道鲜见,本研究对此进行探讨,旨在为临床防治冠心病患者并发狭窄性瓣膜病提供参考,报告如下。

1 资料和方法

1.1 一般资料

经医院伦理委员会批准,选取2018年1月至2021年1月本院收治的300例冠心病患者,根据是否并发狭窄性瓣膜病分为狭窄组($n=72$)、无狭窄组($n=228$),其中狭窄组包括主动脉瓣膜狭窄43例,二尖瓣瓣膜狭窄29例。纳入标准:①符合冠心病诊断标准^[5];②狭窄组符合狭窄性瓣膜病诊断标准^[6];③充分知晓本研究,自愿签署知情同意书。排除标准:①急性脑梗死者;②血液系统疾病者;③合并感染类疾病者;④先天性心脏病者;⑤肺栓

塞者;⑥既往有心脏手术史者。

1.2 方法

1.2.1 资料收集

年龄、性别、体质量指数、饮酒史、吸烟史、血脂异常、糖尿病、高血压、心肌梗死史、冠脉病变支数、Gensini评分、维持性用药情况。

1.2.2 检测方法

入院时采集患者空腹静脉血5 mL,行血常规检测,获得中性粒细胞、淋巴细胞,并计算NLR;采用免疫投射比浊法检测血清Lp(a)水平,试剂盒购于深圳迈瑞生物科技有限公司;采用酶联免疫吸附法检测血清OPN水平,试剂盒购于深圳市科润生物工程有限公司。

1.2.3 狭窄性瓣膜病狭窄程度评估^[6]

轻度:瓣口面积 $>1.5\text{ cm}^2$;中度: $1.0\sim 1.5\text{ cm}^2$;重度: $<1.0\text{ cm}^2$ 。

1.3 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,多组间比较以单因素方差分析,两两比较以LSD-t检验,组间比较行独立样本 t 检验,计数资料用 $n(\%)$ 表示,行 χ^2 检验,采用多因素Logistic回归方程分析冠心病患者并发狭窄性瓣膜病的相关影响因素,采用受试者工作特征曲线(ROC)及ROC下面积(AUC)分析各指标及联合预测冠心病患者并发狭窄性瓣膜病的价值。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组基线资料、Lp(a)、OPN、NLR比较

两组年龄、性别、体质量指数、饮酒史、吸烟史、血脂异常、糖尿病、高血压、维持性用药情况比较,差异无统计学意义($P>0.05$);狭窄组心肌梗死史、冠脉病变支数、Gensini评分、Lp(a)、OPN、NLR与无狭窄组比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表1。

表1 两组基线资料、Lp(a)、OPN、NLR比较 $[(\bar{x}\pm s), n(\%)]$

Table 1 Constant variable data, Lp(a), OPN, NLR comparison $[(\bar{x}\pm s), n(\%)]$

资料	狭窄组 (n=72)	无狭窄组 (n=228)	t/ χ^2 值	P值
年龄(岁)	60.58±8.79	58.79±10.52	1.307	0.192
性别(男/女)	40/32	120/108	0.188	0.665
体质量指数(kg/m ²)	23.79±1.59	23.52±1.60	1.250	0.212
饮酒史	48(66.67)	144(63.16)	0.292	0.589
吸烟史	34(47.22)	119(52.19)	0.541	0.462
既往史				
血脂异常	31(43.06)	90(39.47)	0.292	0.589
糖尿病	19(26.39)	52(22.81)	0.389	0.533
高血压	27(37.50)	78(34.21)	0.260	0.610
心肌梗死史	39(54.17)	61(26.75)	18.503	<0.001
冠脉病变支数				
1支	6(8.33)	40(17.54)		
2支	22(30.56)	115(50.44)	19.641	0.001
3支	44(61.11)	73(32.02)		
Gensini评分(分)	54.48±14.66	38.27±11.53	98.711	<0.001
维持性用药情况				
阿司匹林	60(83.33)	201(88.16)	1.126	0.289
氯吡格雷	39(54.17)	130(57.02)	0.181	0.671
他汀类药物	16(22.22)	59(25.88)	0.390	0.532
胰岛素	8(11.11)	20(8.77)	0.354	0.552
口服降糖药	15(20.83)	40(17.54)	0.396	0.529
降压药	27(37.50)	78(34.21)	0.260	0.610
Lp(a)(mg/dL)	62.77±20.05	39.03±10.74	12.959	<0.001
OPN(μ g/L)	78.09±22.14	45.27±12.33	15.919	<0.001
NLR	4.19±1.37	3.09±0.98	7.495	<0.001

2.2 狭窄组不同严重程度患者 Lp(a)、OPN、NLR 水平比较

狭窄组不同严重程度患者 Lp(a)、OPN、NLR: 重度>中度>轻度, 两两比较差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。见表2。

表2 狭窄组不同严重程度患者 Lp(a)、OPN、NLR 水平比较 $(\bar{x}\pm s)$

Table 2 Comparison of Lp(a), OPN and NLR levels of patients with different severity in stenosis group $(\bar{x}\pm s)$

组别	n	Lp(a)(mg/dL)	OPN(μ g/L)	NLR
轻度	20	47.18±14.03	54.35±17.40	3.26±0.77
中度	34	62.35±17.69 ^a	76.27±18.11 ^a	4.17±1.05 ^a
重度	18	80.89±19.52 ^{ab}	107.91±21.32 ^{ab}	5.26±1.19 ^{ab}
F值		18.098	38.883	18.241
P值		<0.001	<0.001	<0.001

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

2.3 多因素 Logistic 回归方程分析

以是否并发狭窄性瓣膜病为因变量, 否赋值0, 是赋值1; 以两组比较差异有统计学意义的指标作为自变量, 无心肌梗死史赋值0, 有心肌梗死史赋值1, 冠脉病变支1、2、3支分别赋值1、2、3,

Gensini 评分、Lp(a)、OPN、NLR 低于两组均值赋值1, 高于两组均值赋值2(两组 Gensini 评分、Lp(a)、OPN、NLR 均值分别为 42.16 分、44.73 mg/dL、53.15 μ g/L、3.35), 应用多因素 Logistic 回归方程分析, 结果显示, 将心肌梗死史、冠脉病变支数、Gensini 评分控制后, Lp(a)、OPN、NLR 仍与并发狭窄性瓣膜病相关 ($P<0.05$)。见表3。

表3 多因素 Logistic 回归方程分析

Table 3 Multivariate logistic regression equation analysis

影响因素	β 值	SE值	Wald χ^2	OR值	95%CI	P值
Lp(a)	0.510	0.153	11.114	1.665	1.068~2.597	<0.001
OPN	0.459	0.126	13.272	1.583	1.007~2.487	<0.001
NLR	0.399	0.109	13.413	1.491	1.364~1.629	<0.001

2.4 Lp(a)、OPN、NLR 预测冠心病患者并发狭窄性瓣膜病的效能

ROC 曲线结果显示, 各指标联合预测冠心病患者并发狭窄性瓣膜病的 AUC 最大。见表4、图1。

表4 ROC 分析结果

Table 4 ROC curve

指标	AUC	95%CI	cut-off 值	敏感度 (%)	特异度 (%)	P值
Lp(a)	0.861	0.817~0.898	>49.85 mg/dL	76.39	81.14	<0.001
OPN	0.820	0.771~0.862	>65.68 μ g/L	69.44	86.84	<0.001
NLR	0.707	0.652~0.758	>3.62	66.67	64.76	<0.001
联合	0.915	0.877~0.944		88.89	79.82	<0.001

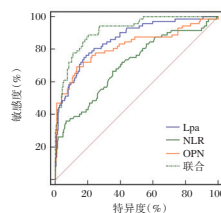


图1 Lp(a)、OPN、NLR 预测冠心病患者并发狭窄性瓣膜病的效能

Figure 1 The efficacy of Lp(a), OPN, and NLR in predicting coronary heart disease patients with stenotic valvular disease

3 讨论

Lp(a)主要在肝脏内合成, 可与纤维酶原竞争结合纤维蛋白位点, 抑制血管内血栓的溶解, 介导血栓形成, 持续升高与动脉粥样硬化性心脑血管疾病的发生有关^[7]。本研究显示, 冠心病并发狭窄性瓣膜病患者 Lp(a)高于无狭窄性瓣膜病患者, 并与狭窄程度有关, 可作为冠心病患者并发狭窄性瓣膜病的生物标志物, 与吴同薇等^[8]报道相似, 佐证了

Lp(a)在冠心病并发狭窄性瓣膜病中所扮演的负面角色。Lp(a)能通过促进磷酸盐释放、增加钙沉积等途径,介导主动脉瓣膜钙化,引起瓣膜狭窄,并能促进瓣膜纤维层脂质聚集、纤维层增厚,诱导狭窄性瓣膜的发生^[9]。可见冠心病患者Lp(a)越高,发生狭窄性瓣膜病风险越高,因此临床上应重视Lp(a)高水平患者的干预,以预防不良心血管事件的发生。因此降低Lp(a)水平可能有助于保护心脏瓣膜,从而预防狭窄性瓣膜病的发生。

OPN参与机体骨代谢、全身免疫功能调节、炎症反应等,是一种多功能蛋白质^[10]。戴亚伟等^[11]体外实验表明,采用胰高血糖素样肽-1降低OPN水平,可抑制主动脉瓣间质细胞钙化,减轻或避免主动脉瓣狭窄类病变的发生,证实OPN对狭窄性瓣膜病起到促进作用。本研究结果显示,并发狭窄性瓣膜病患者OPN高于无狭窄组,轻度、中度、重度狭窄者OPN依次升高,将心肌梗死史、冠脉病变支数等控制后,Lp(a)仍与狭窄性瓣膜病的发生相关,具有作为预测狭窄性瓣膜病的潜质。但现阶段关于OPN在心脏狭窄性瓣膜病中详细机制仍处于探究中,结合相关文献^[12],OPN一方面能通过其免疫炎症机制,介导血管内皮炎症损伤及血小板等凝血物质在损伤部位聚集,引起狭窄病变;另一方面OPN能通过其矿化作用,促进瓣膜钙化,从而参与狭窄性瓣膜病的发生。

心肌损伤时中性粒细胞可趋化至受损区域,通过分泌蛋白水解酶途径,损伤血管、激活凝血途径、介导炎症介质分泌等,与斑块破裂、血栓形成有关^[13]。淋巴细胞是一种免疫细胞,冠心病患者因生理应激、神经激素系统激活,使皮质醇释放增多,并通过细胞凋亡途径导致淋巴细胞减少^[14]。NLR能反映全身免疫炎症状况,通过血常规检测获得,具有经济性高、时效性高、可重复检测等优点而受到临床重视。王云丹等^[15]报道,维持性血液透析心脏瓣膜钙化患者NLR高于未钙化患者,是心脏瓣膜钙化发病危险因素,但在冠心病并发狭窄性瓣膜病中所起的作用尚未阐明。本研究发现检测NLR可用于评估冠心病患者并发狭窄性瓣膜病的风险及狭窄的严重程度。另值得注意的是,联合检测Lp(a)、OPN、NLR的AUC较单一指标高,故建议临床联合检测Lp(a)、OPN、NLR对狭窄性瓣膜病风险进行评估,以提高预测的可靠性,为临床提供准确参考信息。另本研究狭窄组

病例数较少,可能造成数据的偏倚,有待后续增加样本量进行进一步的探讨。

综上,Lp(a)、OPN、NLR升高与冠心病患者并发狭窄性瓣膜病风险增加有关,联合检测三者对狭窄性瓣膜病具有较高的预测效能,能为临床防治不良心血管事件的发生提供参考。

参考文献

- [1] 叶蕴青,许海燕,李喆,等.中国不同区域老年瓣膜性心脏病构成和病因分析[J].中华老年心脑血管病杂志,2019,21(7):676-682.
- [2] You XD, Jin JL, Zhang H, et al. Lipoprotein(a) as a marker for predicting coronary collateral circulation in patients with acute myocardial infarction[J]. Per Med, 2020, 17(1):67-78.
- [3] 邓静,陈昱,周梦迪,等.血清骨因子水平与冠心病患者冠状动脉病变程度相关性研究[J].中华老年心脑血管病杂志,2020,22(4):389-392.
- [4] 亢爱春,李阳,季汉华,等.NLR与NSTE-ACS冠脉病变程度及PCI术后心血管终点事件的相关性[J].河北医药,2020,42(8):1206-1209.
- [5] 葛均波,徐永健.内科学[M].第8版,北京:人民卫生出版社,2013:473-474.
- [6] Nishimura RA, Otto CM, Bonow RO, et al. 2014 AHA/ACC guideline for the management of patients with valvular heart disease: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines[J]. J Am Coll Cardiol, 2014, 63(22):e57-185.
- [7] Enas EA, Varkey B, Dharmarajan TS, et al. Lipoprotein(a): An underrecognized genetic risk factor for malignant coronary artery disease in young Indians[J]. Indian Heart J, 2019, 71(3):184-198.
- [8] 吴同薇,薛雅芝,林子祥,等.冠心病患者中脂蛋白(a)与心脏瓣膜病的相关性[J].实用医学杂志,2020,36(3):349-354.
- [9] 王俊华,崔勤涛,韩培立,等.退行性心脏瓣膜病患者血清LP(a)、OPN、IRF-4表达及其临床意义[J].分子诊断与治疗杂志,2020,12(4):483-486,506.
- [10] Lok ZSY, Lyle AN. Osteopontin in Vascular Disease[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2019, 39(4):613-622.
- [11] 戴亚伟,周景昕,韩旭,等.GLP-1抑制主动脉瓣膜间质细胞钙化[J].南京:南京医科大学学报(自然科学版),2019,39(5):664-667.
- [12] Abdelaziz Mohamed I, Gadeau AP, Hasan A, et al. Osteopontin: A Promising Therapeutic Target in Cardiac Fibrosis[J]. Cells, 2019, 8(12):1558.
- [13] 赵琦,苏畅,李天恩,等.冠状动脉旁路移植术后静脉桥血管狭窄的危险因素分析[J].中华生物医学工程杂志,2020,26(2):154-159.
- [14] 唐一鹏,陈庆良,姜楠,等.老年钙化性主动脉瓣狭窄与外周炎性细胞及血脂水平的关系[J].天津医药,2018,46(5):466-470.
- [15] 王云丹,蒋卫杰.hs-CRP、NLR、PLR与维持性血液透析患者心脏瓣膜钙化的相关性[J].临床肾脏病杂志,2020,20(2):109-113.

· 论 著 ·

NT-proBNP、CRP/Alb 与高龄髋部骨折病情程度关系及对预后的影响

章宇翔* 程翰林 汪群力 方兵 虞红林 黄顺水 叶宏伟 汪日海 任伟

[摘要] **目的** 探究氨基末端脑钠肽前体(NT-proBNP)、C反应蛋白(CRP)/白蛋白(Alb)与高龄髋部骨折病情程度关系及对预后的影响。**方法** 选取黄山首康医院2016年1月至2020年12月收治的高龄髋部骨折患者106例,均行手术治疗,根据术后6个月生存状况分为生存组与死亡组,分析NT-proBNP、CRP/Alb水平与ASA分级、APACHE II评分的相关性及其对预后的影响,并评价NT-proBNP、CRP/Alb对预后的预测价值。**结果** 死亡组入院时、出院时NT-proBNP、CRP/Alb水平高于生存组,差异有统计学意义($P<0.05$);随着ASA分级的提高,NT-proBNP、CRP/Alb水平、APACHE II评分呈逐渐升高趋势,差异有统计学意义($P<0.05$);NT-proBNP、CRP/Alb与ASA分级、APACHE II评分呈正相关($P<0.05$);NT-proBNP、CRP/Alb是预后的重要影响因素($P<0.05$);两者联合预测价值明显优于单独预测($P<0.05$)。**结论** 高龄髋部骨折患者NT-proBNP、CRP/Alb水平与病情程度密切相关,有助于评估术前风险、预测预后,临床应重视二者的临床意义并做出相应预防。

[关键词] 氨基末端脑钠肽前体; C反应蛋白/白蛋白; 高龄髋部骨折; 病情程度; 预后

The relationship between NT-proBNP, CRP/Alb and the severity of hip fracture in elderly patients and their influence on prognosis

ZHANG Yuxiang*, CHENG Hanlin, WANG Qunli, FANG Bing, YU Honglin, HUANG Shunshui, YE Hongwei, WANG Rihai, REN Wei

(Department of Orthopedics, Huangshan Shoukang Hospital, Huangshan, Anhui, China, 245000)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the relationship between N-terminal pro-brain natriuretic peptide (NT-proBNP), C-reactive protein (CRP)/albumin (Alb) and the severity of hip fractures in the elderly and their influence on the prognosis. **Methods** From January 2020 to December 2020, 106 elderly patients with hip fractures in Huangshan Shoukang Hospital were retrospectively selected, and all of them underwent surgical treatment. According to the survival status of 6 months after operation, they were divided into the survival group and the death group. The correlation of NT-proBNP and CRP/Alb levels with ASA classification, APACHE II score and their influence on prognosis were analyzed, and the predictive value of NT-proBNP and CRP/Alb on prognosis was evaluated. **Results** The levels of NT-proBNP and CRP/Alb at admission and discharge in the death group were higher than those in the survival group ($P<0.05$). With the improvement of ASA classification, NT-proBNP, CRP/Alb levels, and APACHE II score showed a gradual increase trend ($P<0.05$). NT-proBNP and CRP/Alb were positively correlated with ASA classification and APACHE II score ($P<0.05$). NT-proBNP and CRP/ALB were important prognostic factors ($P<0.05$). The combined prediction value was significantly better than that of single prediction ($P<0.05$). **Conclusion** The levels of NT-proBNP and CRP/Alb in elderly patients with hip fracture are closely related to the severity of the disease, which helps to assess the preoperative risk and predict the prognosis. The clinic should pay attention to the clinical significance

基金项目:黄山市市科技计划项目(2018KN-13)

作者单位:黄山首康医院骨科1病区,安徽,黄山245000

*通信作者:章宇翔, E-mail:zyx180621@163.com

of the two and make corresponding prevention.

[KEY WORDS] N-terminal pro-brain natriuretic peptide; C-reactive protein/albumin; Hip fracture in the elderly; Severity of illness; Prognosis

流行病学调查显示,随着我国人口老龄化进程加快,高龄髌部骨折发生率逐渐升高,增长率约为20%,且预计到2050年,全世界范围内髌部骨折患者将会高达630万,已成为人类致残致死的重要原因^[1]。目前临床首选治疗方式以手术为主,但由于高龄患者身体机能减退,且合并多系统内科疾病,术后1年内死亡率仍高达14%~36%^[2]。故此临床积极寻找预测预后的指标是降低术后死亡率的关键,也是目前骨科医生的研究重点内容。高龄患者循环容量极易受到骨折本身及围手术期所致应激反应的影响,会严重威胁心血管功能,增加心血管事件发生率,而氨基末端脑钠肽前体(N Terminal pro B type Natriuretic Peptide, NT-proBNP)是反映心功能的重要指标^[3]。而近年来炎症反应与营养状况对术后恢复的影响逐渐引起临床重视,其中C反应蛋白(C-Reactive Protein, CRP)是典型临床标志物,其异常升高与骨科创伤、感染密切相关^[4];白蛋白(Albumin, Alb)可反映营养状况,其血清含量与术后病情发展密切相关,而CRP/Alb可将炎症与营养状态结合起来,提高评估全面性^[5]。本研究创新性初次尝试分析不同时间点的NT-proBNP、CRP/Alb两者联合预测预后价值,为临床及早预测预后提供优选方案。现报告如下。

1 资料和方法

1.1 一般资料

经本院医学伦理委员会批准,选取黄山首康医院2016年1月至2020年12月收治的高龄髌部骨折患者106例作为研究对象,均符合《老年髌部骨折诊疗专家共识(2017)》中相关诊断标准^[6];多伴有髌关节疼痛,且经正侧位X线片检查确诊为髌部骨折;均为单侧新鲜髌部骨折;年龄 ≥ 65 岁;临床资料完整。排除严重肝肾功能障碍;合并急性脑血管疾病、恶性肿瘤、严重精神类疾病、甲状腺功能减退症;陈旧性髌部骨折或髌部手术史。所有患者均行手术治疗,并根据术后6个月生存状况分为生存组($n=90$)与死亡组($n=16$),其中死亡原因包括心功能衰竭4例,急性心肌梗死7例,肺栓塞2例,肺部感染1例,呼吸功能衰竭2例。两组性别、体质量指

数、骨折至手术时间、骨折部位比较,差异无统计学意义($P>0.05$);两组年龄、美国麻醉医师协会(American Society of Anesthesiologists, ASA)分级^[7]、急性生理与慢性健康评分(Acute Physiology and Chronic Health Evaluation, APACHE II 评分)比较^[8],差异有统计学意义($P<0.05$)。见表1。

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

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

资料	生存组 ($n=90$)	死亡组 ($n=16$)	t/χ^2 值	P值
年龄(岁)	75.98 \pm 4.28	83.54 \pm 5.14	6.312	<0.001
性别				
男	44(48.89)	9(56.25)	0.294	0.587
女	46(51.11)	7(43.75)		
体质量指数(kg/m ²)	23.57 \pm 2.02	23.44 \pm 1.97		
骨折至手术时间(d)	3.56 \pm 0.75	3.62 \pm 0.72		
骨折部位				
股骨颈骨折	41(45.56)	6(37.50)	0.357	0.550
转子间骨折	49(54.44)	10(62.50)		
ASA分级				
I级	15(16.67)	1(6.25)	3.006	0.003
II级	33(36.67)	3(18.75)		
III级	39(43.33)	5(31.25)		
IV级	3(3.33)	7(43.75)		
APACHE II评分(分)				
入院时	15.79 \pm 2.15	23.48 \pm 2.56	12.803	<0.001
出院时	7.59 \pm 1.12	19.52 \pm 1.57	36.784	<0.001

1.2 方法

①NT-proBNP、CRP/Alb水平测定,均于入院时、出院时采集空腹肘静脉血5 mL,静置30 min,血液凝固后,采用高速离心机以3 500 r/min的速度离心10 min,离心半径为10 cm,分离得到血清,置于2~8℃下保存待测,采用化学发光法测定NT-proBNP、CRP水平,试剂盒购自博奥赛斯(天津)生物科技有限公司;采用免疫比浊法测定Alb水平,试剂盒购自深圳市生科源技术有限公司,并计算CRP/Alb比值。②ASA分级评估^[7],器官无重要器质性病变为I级;轻度系统性疾病,属于功能代偿阶段为II级;系统性疾病显著,属于功能早期失代偿阶段为III级;严重系统性疾病、属于功能失代偿阶段为IV级。③APACHE II评分评估^[8],包括急性生理学评分、年龄评分、慢性健康状况评分评估,总分71分,分数越高病情越严重,死亡率越高。④手

术方法:股骨颈骨折采用人工全髋/股骨头置换或闭合复位空心钉内固定;转子间骨折采用骨折闭合复位股骨近端防旋髓内钉或动力髌螺钉固定;并同时术后6个月内的生存状况。

1.3 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 χ^2 检验;计量资料采用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,组间比较采用独立样本 t 检验对比,多组间比较采用单因素方差分析,多重比较采用LSD- t 检验;相关性分析采用Spearman/Pearson相关系数模型;采用Logistic进行多因素回归分析;影响因素采用COX回归分析;预测效能分析采用ROC曲线,获取曲线下面积(AUC)、联合预测实施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,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组 NT-proBNP、CRP/Alb 水平比较

死亡组入院时、出院时 NT-proBNP、CRP/Alb 水平高于生存组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表2。

2.2 不同 ASA 分级患者 NT-proBNP、CRP/Alb 水平、APACHE II 评分

不同 ASA 分级、APACHE II 评分患者入院时、出院时 NT-proBNP、CRP/Alb 水平比较,差异有统计学意义($P > 0.05$);入院时、出院时 NT-proBNP、CRP/Alb 水平、APACHE II 评分:ASA IV级>III级>II级>I级,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表3。

2.3 NT-proBNP、CRP/Alb 与 ASA 分级、APACHE II 评分相关性

入院时、出院时 NT-proBNP、CRP/Alb 与 ASA 分级、入院时、出院时 APACHE II 评分呈正相关($P < 0.05$)。见表4。

2.4 NT-proBNP、CRP/Alb 对预后的影响

COX 回归分析,将年龄、ASA 分级、APACHE II

表2 两组 NT-proBNP、CRP/Alb 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of NT-proBNP and CRP/Alb levels between 2 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	NT-proBNP (pg/mL)		CRP/Alb	
		入院时	出院时	入院时	出院时
死亡组	16	928.45±354.16	392.20±128.44	3.26±0.73	1.72±0.46
生存组	90	461.37±181.79	235.28±78.35	2.18±0.55	1.04±0.28
t 值		7.995	6.620	6.870	8.022
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

表4 NT-proBNP、CRP/Alb 与 ASA 分级、APACHE II 评分相关性

Table 4 Correlation between NT-proBNP, CRP/Alb and ASA classification, APACHE II score

项目		ASA 分级		APACHE II 评分	
		r 值	P 值	r 值	P 值
NT-proBNP	入院时	0.714	<0.001	0.742	<0.001
	出院时	0.689	<0.001	0.731	<0.001
CRP/Alb	入院时	0.736	<0.001	0.759	<0.001
	出院时	0.707	<0.001	0.740	<0.001

评分等其他因素调整后,入院时、出院时 NT-proBNP、CRP/Alb 仍是预后的重要影响因素($P < 0.05$)。见表5。

表5 NT-proBNP、CRP/Alb 对预后的影响

Table 5 The influence of NT-proBNP and CRP/Alb on prognosis

变量	β 值	S.E. 值	Wald χ^2	HR 值	95%CI	P 值
入院时						
NT-proBNP	1.564	0.503	9.668	4.778	2.781~8.209	<0.001
CRP/Alb	1.773	0.474	13.988	5.887	3.426~10.116	<0.001
出院时						
NT-proBNP	1.658	0.519	10.210	5.251	3.005~9.174	<0.001
CRP/Alb	1.977	0.602	10.785	7.221	4.261~12.238	<0.001

2.5 NT-proBNP、CRP/Alb 对预后的预测价值

ROC 曲线结果显示:两者联合预测预后值明显优于两者单独预测($P < 0.05$); Logistic 二元回归拟合后,获取两者联合预测预后值明显优于两者单独预测($P < 0.05$)。见表6、图1。

表3 不同 ASA 分级患者 NT-proBNP、CRP/Alb 水平、APACHE II 评分比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of NT-proBNP, CRP/Alb levels and APACHE II scores in patients with different ASA grades ($\bar{x} \pm s$)

ASA 分级	例数	NT-proBNP (pg/mL)		CRP/Alb		APACHE II 评分(分)	
		入院时	出院时	入院时	出院时	入院时	出院时
I 级	16	262.78±85.41 ^{bc}	202.31±25.16 ^{bc}	1.81±0.20 ^{bc}	0.83±0.12 ^{bc}	13.10±2.03 ^{bc}	7.42±1.02 ^{bc}
II 级	36	438.97±105.09 ^{ac}	238.40±36.29 ^{ac}	2.09±0.24 ^{ac}	1.02±0.14 ^{ac}	15.86±2.17 ^{ac}	8.77±1.10 ^{ac}
III 级	44	606.51±201.27 ^{ab}	272.51±40.08 ^{ab}	2.47±0.35 ^a	1.21±0.22 ^{ab}	18.14±2.49 ^{ab}	10.06±1.31 ^{ab}
IV 级	10	968.19±320.36 ^{abc}	364.10±63.35 ^{abc}	3.52±0.68 ^{abc}	1.76±0.34 ^{abc}	21.79±3.15 ^{abc}	11.80±1.46 ^{abc}
F 值		38.910	39.161	64.440	51.678	33.512	34.638
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与 I 级患者比较,^a $P < 0.05$;与 II 级患者比较,^b $P < 0.05$;与 III 级患者比较,^c $P < 0.05$ 。

表6 NT-proBNP、CRP/Alb对预后的预测价值

Table 6 The prognostic value of NT-proBNP and CRP/Alb

	指标	AUC	95%CI	Z值	截断值	敏感度(%)	特异度(%)	P值
入院时	NT-proBNP	0.865	0.784~0.923	6.814	>717.84 pg/mL	75.00	85.56	<0.001
	CRP/Alb	0.731	0.636~0.812	3.305	>2.86	62.50	75.56	0.001
	联合	0.945	0.883~0.980	17.943		87.50	90.00	<0.001
出院时	NT-proBNP	0.883	0.806~0.937	9.814	>306.41 pg/mL	81.25	84.44	<0.001
	CRP/Alb	0.811	0.723~0.880	4.723	>1.54	68.75	86.67	<0.001
	联合	0.975	0.924~0.996	34.016		93.75	95.56	<0.001

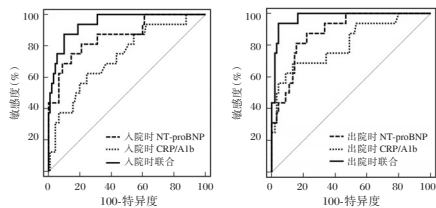


图1 NT-proBNP、CRP/Alb对预后的预测价值

Figure 1 The predictive value of NT-proBNP and CRP/Alb on prognosis

3 讨论

高龄人群由于身体机能衰退,钙吸收受阻、骨质变脆,极易发生髌部骨折,且对手术耐受性差,临床应准确评估手术风险及预后效果,从而提前规避术后死亡相关的风险因素^[9]。

既往学者多采用APACHE II评分系统对高龄髌部骨折进行评估,但具有参考指标多、操作复杂等缺点,会限制其在临床的普及^[10];而ASA分级是麻醉师对手术进行风险预测的准确依据,二者在本研究中均承担病情严重程度的评估标准,临床应寻找简单有效的实验室指标。高龄患者发生髌部骨折后,常表现为多系统功能异常,且王金强等^[11]学者研究表明,心功能不全是老年髌部骨折患者术后30d发生心脏不良事件的独立危险因素,术后病死率远高于心功能健全者。而NT-proBNP是临床评估心功能的重要指标,与心力衰竭具有明确相关性。本研究结果表明其与ASA分级、APACHE II评分均呈正相关。分析其原因为,高龄患者各项身体机能降低,组织功能异常,发生骨折后会进一步发生障碍,导致心功能损伤引发NT-proBNP表达水平升高^[12];且随着ASA分级的提高,其水平呈逐渐升高趋势,与吴刚等^[13]学者研究结果具有一致性。同时,本研究结果还显示,死亡组NT-proBNP水平较生存组高。NT-proBNP能评估心力衰竭与心血管死亡发生的关系,是心血管事件的独立影响因素,髌部骨折患者术后6个月内死亡患者心功能极可能发生

进一步退化,发展为心力衰竭,其NT-proBNP水平较高,是预后的重要影响因素。因此NT-proBNP能反映髌部骨折的病情程度,评估手术风险,对预后具有重要预测意义。

国内外多个研究表明,炎症反应、营养状态对多种疾病治疗效果、病情恢复均具有明显关联性^[14]。随着临床对骨折生理病理的深入认知,炎症因子在骨折发生及围术期的重要作用逐渐受到重视,CRP是机体创伤的敏感性标志物,是骨科用于评估术后感染的常用指标;而高龄患者由于代谢功能降低、营养摄入不足等多种因素常合并营养不良,Alb是蛋白质-能力消耗的评估指标,常被骨科医师用于评价围术期营养状态^[15]。但单一评估时临床价值较为局限,CRP/Alb可将二者结合起来,更加全面的评估髌部骨折病情与预后。CRP/Alb比值较高反映机体炎症反应较重,但全身营养状况较差,间接表明CRP/Alb可作为判断病情程度、手术风险的指标之一。本研究为进一步探讨NT-proBNP、CRP/Alb的检测价值,初次尝试分析不同时间点的NT-proBNP、CRP/Alb两者联合预测预后价值,通过绘制ROC曲线结果显示两者联合预测价值明显优于单独预测,表明联合检测能提高对预后的预测价值。

综上所述,高龄髌部骨折患者NT-proBNP、CRP/Alb水平与病情程度密切相关,有助于评估术前风险、预测预后,临床应重视二者的临床意义并做出相应预防。

参考文献

- [1] Ren Y, Hu J, Lu B, et al. Prevalence and risk factors of hip fracture in a middle-aged and older Chinese population [J]. Bone, 2019, 45(122): 143-149.
- [2] 陈超, 布特格勒其, 赵自芳, 等. 80岁以上高龄患者髌部骨折术后1年内死亡率及相关因素分析[J]. 中日友好医院学报, 2019, 33(4): 223-225.

(下转第1439页)

· 论 著 ·

AFP、CYFRA21-1、NSE 及 CT 征象在孤立性肺结节性质中鉴别价值

何桃^{1*} 刘英² 宋清泉³ 冯文红⁴ 管英⁵

【摘要】目的 探究甲胎蛋白(AFP)、细胞角蛋白19片段(CYFRA21-1)、神经元特异性烯醇化酶(NSE)及CT征象在孤立性肺结节性质中鉴别价值。**方法** 选取2019年1月至2021年1月四川省江油市人民医院呼吸科206例孤立性肺结节患者,依据结节性质分为恶性组($n=103$)与良性组($n=103$)。比较两组CT征象、AFP、CYFRA21-1、NSE水平,分析CT征象与AFP、CYFRA21-1、NSE水平相关性,绘制受试者工作(ROC)曲线,评价AFP、CYFRA21-1、NSE及CT征象在孤立性肺结节性质中鉴别价值,并分析CT征象、AFP、CYFRA21-1、NSE水平与孤立性肺结节性质的关系。**结果** 恶性组毛刺征、分叶征、胸膜凹陷征比例及血清AFP、CYFRA21-1、NSE水平均高于良性组,差异有统计学意义($P<0.05$);相关性分析可知,孤立性肺恶性结节患者CT征象与血清AFP、CYFRA21-1、NSE水平有关($P<0.05$);绘制ROC曲线,评价CT征象、血清AFP、CYFRA21-1、NSE水平对孤立性肺结节的鉴别诊断价值,发现CT征象联合血清指标鉴别诊断AUC为0.950最大,具有良好诊断效能;Logistic回归分析中,结果可见毛刺征、分叶征、胸膜凹陷征、血清AFP、CYFRA21-1、NSE水平均为孤立性肺结节性质影响因素($P<0.05$)。**结论** CT征象联合AFP、CYFRA21-1、NSE鉴别诊断孤立性肺结节性质,诊断效能较高,值得临床推广与应用。

【关键词】 孤立性肺结节; AFP; CYFRA21-1; NSE; CT征象

The value of AFP, CYFRA21-1, NSE and CT signs in distinguishing the nature of solitary pulmonary nodules

HE Tao^{1*}, LIU Ying², SONG Qingquan³, FENG Wenhong⁴, GUAN Ying⁵

(1. Department of Respiratory Medicine, Jiangyou People's Hospital of Sichuan, Jiangyou, Sichuan, China, 621700; 2. Health Management Center, Jiangyou People's Hospital, Jiangyou, Sichuan, China, 621700; 3. Emergency Department, Jiangyou People's Hospital of Sichuan, Jiangyou, China, 621700; 4. Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Jiangyou People's Hospital of Sichuan, Jiangyou, China, 621700; 5. Department of Medical Imaging, Jiangyou People's Hospital, Jiangyou, Sichuan, China, 621700)

【ABSTRACT】 Objective To explore the value of alpha-fetoprotein (AFP), cytokeratin 19 fragment (CYFRA21-1), neuron-specific enolase (NSE) and CT signs in distinguishing the nature of solitary pulmonary nodules. **Methods** A total of 206 patients with solitary pulmonary nodules in our hospital from January 2019 to January 2021 were selected and divided into malignant group ($n=103$) and benign group ($n=103$) according to the nature of the nodule. Compare the levels of CT signs, AFP, CYFRA21-1, and NSE between the two groups, analyze the correlation between CT signs and AFP, CYFRA21-1, and NSE levels, draw re-

基金项目:四川省江油市科学技术局项目(江科技[2020]24号)

作者单位:1. 四川省江油市人民医院呼吸科/健康管理中心, 四川, 江油 621700

2. 四川省江油市人民医院健康管理中心, 四川, 江油 621700

3. 四川省江油市人民医院急诊科, 四川, 江油 621700

4. 四川省江油市人民医院胸心血管外科, 四川, 江油 621700

5. 四川省江油市人民医院医学影像科, 四川, 江油 621700

*通信作者:何桃, E-mail:hetaoyx2021@163.com

ceiver operating (ROC) curves, and evaluate AFP, CYFRA21-1, NSE And the value of CT signs in distinguishing the nature of solitary pulmonary nodules, and the relationship between CT signs, AFP, CYFRA21-1, NSE levels and the nature of solitary pulmonary nodules was analyzed. **Results** The ratio of burr sign, lobular sign, pleural indention sign and serum AFP, CYFRA21-1, NSE levels in the malignant group were higher than those in the benign group ($P<0.05$); correlation analysis showed that the CT signs and serum of patients with solitary lung malignant nodules AFP, CYFRA21-1, and NSE levels are related ($P<0.05$); ROC curve was drawn to evaluate the value of CT signs, serum AFP, CYFRA21-1, and NSE levels in the differential diagnosis of solitary pulmonary nodules, The diagnostic AUC is the largest and has good diagnostic performance. In Logistic regression analysis, it can be seen that the burr sign, lobular sign, pleural indentation sign, serum AFP, CYFRA21-1, and NSE levels are all influencing factors of the nature of solitary pulmonary nodules ($P<0.05$). **Conclusion** The combination of CT signs with AFP, CYFRA21-1, and NSE in differential diagnosis of solitary pulmonary nodules has high diagnostic efficiency and is worthy of clinical promotion and application.

[KEY WORDS] Solitary pulmonary nodule; AFP; CYFRA21-1; NSE; CT signs

孤立性肺结节是肺部常见疾病,主要分为良性与恶性两大类,多数患者发病初期无典型临床症状,若为恶性结节则易错失最佳治疗时机,并于短时间内病情迅速恶化,病死率超95%^[1-2]。因此,早期及时对孤立性肺结节性质做出诊断并采取对应治疗措施,对改善患者预后具有重要意义。多层螺旋CT平扫可较为充分地展示孤立性肺结节在诊断学上的特征性表现,提高其诊断敏感性及特异度,对孤立性肺结节诊断准确性较高^[3-4]。近年来,随着生物标志物研究逐渐受到重视,肿瘤标志物检测凭借其无创、简单、经济、灵敏度及特异性高等优势,广泛应用于肿瘤筛查、诊断及预后判断等方面,并日益受到重视^[5-6]。现阶段,临床鉴别诊断孤立性肺结节多单纯采用多层螺旋CT或血清肿瘤标志物,关于二者联合应用较为鲜见。基于此,本研究尝试分析甲胎蛋白(Alpha fetoprotein, AFP)、细胞角蛋白19片段(Cytokeratin 19 fragment, CYFRA21-1)、神经元特异性烯醇化酶(Neuron specific enolase, NSE)及CT征象在孤立性肺结节性质中鉴别价值。结果如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取2019年1月至2021年1月四川省江油市人民医院呼吸科206例孤立性肺结节患者作为研究对象,其中男121例,女85例,年龄平均(48.26±13.28)岁。依据结节性质分为恶性组($n=103$)与良性组($n=103$)。纳入标准:①均经病理证实,直径<3 cm;②病史资料详细完整;排除标准:①合并其他部位结节者;②伴有自身免疫性疾病或传染病

者。所有入组人员均知情同意,本研究经本院医学伦理委员会审核批准。

1.2 方法

1.2.1 CT征象

采用美国GE公司提供128层Lightspeed VCT扫描仪进行检查,参数设置:管电压120伏特,管电流80~160 mA,扫描层厚10 mm,层距10 mm,螺距1.375:1,重建层厚1.25 mm,层距0.625 mm,视野35 cm;标准算法:肺窗宽1500 HU,窗位-700 HU,纵膈窗宽350 HU,窗位40 HU;患者取仰卧位,自胸廓入口水平、全部肺野及肋膈角层面进行扫描,发现病灶后进行0.625薄层扫描,以高分辨率重建图像,所得数据及图像传至GE ADW4.3工作站进行后处理,由本院两位10年以上工作经验的影像学医师共同判断CT征象。

1.2.2 血清指标

空腹状态下,抽取3 mL肘静脉血,3 000 r/min离心处理10 min,分离血清、血浆,置于-20℃环境下待检;以电化学发光法测定AFP、CYFRA21-1、NSE,试剂盒购自罗氏公司。操作严格遵循试剂盒说明书进行。

1.3 统计学方法

采用统计学软件SPSS 21.0处理数据,计量资料以($\bar{x}\pm s$)描述,两组间比较采用独立样本 t 检验;计数资料用 $n(\%)$ 表示、 χ^2 检验;采用Logistic多因素回归模型分析CT征象、血清AFP、CYFRA21-1、NSE水平与孤立性肺结节性质的关系;采用Spearman相关性分析CT征象与血清AFP、CYFRA21-1、NSE水平相关性;绘制受试者工作特征曲线(ROC)得到曲线下面积(AUC),检验CT征象、血

清 AFP、CYFRA21-1、NSE 水平对孤立性肺结节的鉴别诊断价值; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组 CT 征象、血清 AFP、CYFRA21-1、NSE 水平比较

恶性组毛刺征、分叶征、胸膜凹陷征比例及血清 AFP、CYFRA21-1、NSE 水平高于良性组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1, 图 1。

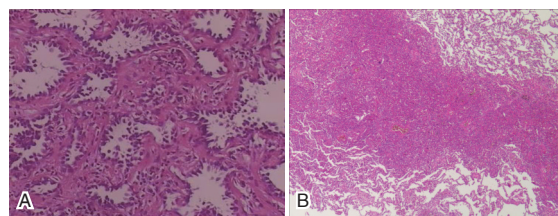
表 1 两组 CT 征象、血清 AFP、CYFRA21-1、NSE 水平比较 [$n(\%)$, ($\bar{x} \pm s$)]

Table 1 Comparison of CT signs, serum AFP, CYFRA21-1 and NSE levels between 2 groups [$n(\%)$, ($\bar{x} \pm s$)]

指标	恶性组 ($n=103$)	良性组 ($n=103$)	χ^2/t 值	P 值
CT 征象				
边缘不光滑				
无	22(21.36)	34(33.01)	3.531	0.060
有	81(78.64)	69(66.99)		
毛刺征				
无	25(24.27)	67(65.05)	34.648	<0.001
有	78(75.73)	36(34.95)		
分叶征				
无	24(23.30)	66(64.08)	34.807	<0.001
有	79(76.70)	37(35.92)		
棘突征				
无	75(72.82)	86(83.50)	3.440	0.064
有	28(27.18)	17(16.50)		
空泡征				
无	81(78.64)	87(84.47)	1.162	0.281
有	22(21.36)	16(15.53)		
空气支气管征				
无	94(91.26)	85(82.52)	3.453	0.063
有	9(8.74)	18(17.48)		
空洞				
无	100(97.09)	94(91.26)	3.186	0.074
有	3(2.91)	9(8.74)		
钙化				
无	93(90.29)	84(81.55)	3.251	0.071
有	10(9.71)	19(18.45)		
血管束束征				
无	50(48.54)	62(60.19)	2.818	0.093
有	53(51.46)	41(39.81)		
胸膜凹陷征				
无	56(54.37)	92(89.32)	31.102	<0.001
有	47(45.63)	11(10.68)		
血清指标				
AFP(ng/mL)	2.24±0.71	1.75±0.52	5.651	<0.001
CYFRA21-1(ng/mL)	4.53±1.25	2.51±0.79	14.024	<0.001
NSE(ng/mL)	17.25±5.21	12.10±3.98	7.972	<0.001

2.2 CT 征象与血清 AFP、CYFRA21-1、NSE 水平相关性

孤立性肺恶性结节患者中有毛刺征、分叶征、胸膜凹陷征者血清 AFP、CYFRA21-1、NSE 水平高



注: A 为恶性结节图; B 为良性结节图。

图 1 结节病理图 (HE 染色, ×40)

Figure 1 Pathological diagram of nodules (HE 染色, ×40)

于无毛刺征、分叶征、胸膜凹陷征者, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 相关性分析可知, 孤立性肺恶性结节患者 CT 征象与血清 AFP、CYFRA21-1、NSE 水平有关 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 CT 征象与血清 AFP、CYFRA21-1、NSE 水平相关性 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Correlation between CT signs and serum AFP, CYFRA21-1 and NSE levels ($\bar{x} \pm s$)

CT 征象	n	AFP (ng/mL)	CYFRA21-1 (ng/mL)	NSE (ng/mL)
毛刺征	无	25 1.83±0.51	3.00±0.58	14.10±2.14
	有	78 2.37±0.62 ^a	5.02±1.25 ^a	18.26±4.25 ^a
分叶征	无	24 1.88±0.57	3.05±0.98	14.32±3.06
	有	79 2.35±0.71 ^a	4.98±1.27 ^a	18.14±5.03 ^a
胸膜凹陷征	无	56 2.05±0.49	4.02±1.28	15.89±2.74
	有	47 2.47±0.73 ^a	5.14±1.54 ^a	18.87±4.06 ^a

注: 与无 CT 征象相比, ^a $P < 0.05$ 。

2.3 CT 征象、血清 AFP、CYFRA21-1、NSE 水平对孤立性肺结节的鉴别诊断价值

绘制 ROC 曲线, 评价 CT 征象、血清 AFP、CYFRA21-1、NSE 水平对孤立性肺结节的鉴别诊断价值, 发现 CT 征象联合血清指标鉴别诊断 AUC 最大, 为 0.950, 具有良好诊断效能。见表 3。

2.4 CT 征象、血清 AFP、CYFRA21-1、NSE 水平与孤立性肺结节性质的关系的 Logistic 回归分析

以孤立性肺结节性质为因变量 (良性=0, 恶性=1), 将 CT 征象、血清 AFP、CYFRA21-1、NSE 水平作为自变量, 纳入 Logistic 回归分析中, 结果可见毛刺征、分叶征、胸膜凹陷征、血清 AFP、CYFRA21-1、NSE 水平均为孤立性肺结节性质影响因素 ($P < 0.05$)。见表 4。

3 讨论

近年来, 我国肺癌标化患病率及致死率呈快速增长趋势, 尽管医疗科技飞速发展带动诊疗技术取得了巨大进步, 但该病早期发现率仍不足

表3 CT征象、血清AFP、CYFRA21-1、NSE水平对孤立性肺结节的鉴别诊断价值

Table 3 The value of CT signs, serum AFP, CYFRA21-1 and NSE levels in differential diagnosis of solitary pulmonary nodules

指标	AUC	95%CI	Z值	截断值	敏感度(%)	特异度(%)	P值
毛刺征	0.553	0.491~0.616	1.682	有	75.73	34.95	<0.001
分叶征	0.563	0.501~0.625	1.993	有	76.70	35.92	<0.001
胸膜凹陷征	0.718	0.662~0.775	7.529	有	54.37	89.32	<0.001
AFP	0.706	0.634~0.778	5.636	>2.27 ng/mL	56.31	83.50	<0.001
CYFRA21-1	0.915	0.876~0.953	21.180	>3.56 ng/mL	82.52	89.32	<0.001
NSE	0.797	0.738~0.857	9.808	>16.73 ng/mL	55.34	89.32	<0.001
联合鉴别诊断	0.950	0.923~0.976	33.346		93.20	83.50	<0.001

表4 CT征象、血清AFP、CYFRA21-1、NSE水平与孤立性肺结节关系的Logistic回归分析

Table 4 Logistic regression analysis of the relationship between CT signs, serum AFP, CYFRA21-1 and NSE levels and solitary pulmonary nodules

因素	β 值	S.E.值	Wald χ^2 值	OR值	95%CI	P值
毛刺征	1.643	0.302	29.614	5.173	3.159~8.471	<0.05
分叶征	1.635	0.359	20.738	5.129	3.294~7.985	<0.05
胸膜凹陷征	1.677	0.312	28.908	5.352	3.526~8.124	<0.05
AFP	1.446	0.311	21.616	4.246	2.984~6.041	<0.05
CYFRA21-1	1.681	0.314	28.643	5.368	3.592~8.023	<0.05
NSE	1.497	0.318	22.161	4.468	3.127~6.385	<0.05

注:赋值:毛刺征、分叶征、胸膜凹陷征:无=0,有=1;血清AFP、CYFRA21-1、NSE水平:以ROC曲线截断值为界, \leq 截断值=1,>截断值=2。

20%^[7-8]。据调查显示,早期肺癌手术切除术后5年生生存率高达90%以上^[9],故早期诊治对提高肺癌患者生存率至关重要。孤立性肺结节中良性病变占60%左右,恶性肿瘤占35%~50%^[10],鉴于孤立性肺结节恶性率较低,而手术创伤对患者机体健康影响较大,故术前准确鉴别其良恶性尤为必要。

随着多层螺旋CT的广泛应用,CT扫描已逐渐成为孤立性肺结节标准检查方法之一。CT平扫是基于CT征象的探究,对病变组织影像学细节的检查有助于临床医师描绘病灶衍变、把握病情进展^[11]。本研究中恶性组毛刺征、分叶征、胸膜凹陷征比例高于良性组,说明支持孤立性肺结节为恶性的单个征象有毛刺征、分叶征、胸膜凹陷征,毛刺征为肿瘤边缘的放射状线条影,是由于恶性肿瘤细胞沿肺间质浸润所致,分叶征形似花瓣状,因结节生长速率的差异形成,而胸膜凹陷征主要表现为结节与胸膜间喇叭口状、三角形及线样。以往研究中除上述三个征象,还存在边缘不光滑、血管束征^[12],分析原因,可能是与不同地区、不同时间及患者所处环境等有关。

肿瘤标志物是肿瘤组织或细胞产生的一项生物活性物质,在正常组织中表达较低,在肿瘤患者中表达较高,因此,肿瘤标志物检测对恶性肿瘤早期诊断及鉴别具有辅助作用。近年来,血清肿瘤标志物作为孤立性肺结节预测的风险因子广泛应用于临床预测模型中,并具有较高预测效果,故推测其在孤立性肺结节早期鉴别诊断中的具有一定作用。CYFRA21-1是一种酸性多肽,广泛存在于单层上皮细胞,如鳞状或层状上皮中,同时也是一种新的上皮源性肿瘤标志物,在恶性上皮细胞中,激活的蛋白酶可促进细胞降解,使得细胞角蛋白大量释放入血,其可溶性片段可特异性结合单克隆抗体BM19.21与KS19.1,可作为一项筛查肺癌的血清标志物^[13]。NSE作为参与糖酵解途径的烯醇化酶,在神经细胞、神经内分泌细胞及其所引发的肿瘤细胞中呈过表达状态。已有研究证实,NSE可用于肺小细胞癌诊断,并可用于监测其病情进展、治疗反应及复发预测等^[14],目前已被认为是肺小细胞癌的首选血清肿瘤标志物。AFP是畸胎瘤、卵黄囊瘤、肝细胞癌等多种肿瘤的重要肿瘤血清标志物。正常情况下,AFP主要存在于胚胎早期血清中,出生后1年血清AFP降至正常成人水平,且血清AFP诊断特异性仅次于病理检查。有学者证实,肺癌患者血清AFP水平高于肺部良性病变患者,在肺癌早期诊断中具有重要意义^[15]。本研究恶性组血清AFP、CYFRA21-1、NSE水平均高于良性组,且Logistic回归分析显示,AFP、CYFRA21-1、NSE均为孤立性肺结节性质的影响因素,故进一步研究通过ROC曲线,评价三者对孤立性肺结节性质的鉴别诊断价值,发现其联合CT征象,诊断效能较高,提示CT征象联合血清肿瘤标志物诊断,可进一步提高诊断效能。

综上所述,CT征象联合AFP、CYFRA21-1、NSE鉴别诊断孤立性肺结节性质,诊断效能较高,值得临床推广与应用。

参考文献

- [1] Weir-McCall JR, Harris S, Miles KA, et al. Impact of solitary pulmonary nodule size on qualitative and quantitative assessment using 18F-fluorodeoxyglucose PET/CT: the SPUTNIK trial [J]. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2021, 48(5): 1560-1569.
- [2] 廖明,何哲,徐恩五,等.单孔胸腔镜手术前定位技术的应用价值:基于54例孤立性肺结节的临床观察[J].*南方医科大学学报*, 2020, 40(5): 718-722.
- [3] 左翔,黄海峡,徐国厚.良恶性孤立性肺小结节患者胸部CT征象特点分析[J].*中国医师杂志*, 2020, 22(2): 286-288.
- [4] 耿睿,孙宵,李超,等.临床因素与CT影像学特征对判断孤立性肺结节良、恶性的价值[J].*宁夏医科大学学报*, 2019, 41(5): 517-521.
- [5] Xie Q, Li F, Zhao S, et al. GalNAc-T3 and MUC1, a combined predictor of prognosis and recurrence in solitary pulmonary adenocarcinoma initially diagnosed as malignant solitary pulmonary nodule ($\leq 3\text{cm}$) [J]. *Hum Cell*, 2020, 33(4): 1252-1263.
- [6] 古超. HRCT联合肿瘤标志物在诊断孤立性肺结节中的临床价值[J].*河北医科大学学报*, 2019, 40(4): 461-465.
- [7] 高枕,乔贵宾.影像组学在肺癌诊疗领域的研究及应用进展[J].*中华生物医学工程杂志*, 2021, 27(1): 107-112.
- [8] 周舒畅,王玉锦,黄璐,等.扩散峰度成像与扩散加权成像在难鉴别孤立性肺结节良恶性判定价值的比较研究[J].*中华放射学杂志*, 2019, 53(3): 200-204.
- [9] Fernandes S, Williams G, Williams E, et al. Solitary pulmonary nodule imaging approaches and the role of optical fibre-based technologies [J]. *Eur Respir J*, 2021, 57(3): 2002537.
- [10] Gorospe L, Ajuria-Illarramendi O, de la Puente-Bujidos C, et al. PET/CT Findings of Granulomatosis With Polyangiitis Presenting as a Solitary Pulmonary Nodule and Mimicking Lung Cancer [J]. *J Clin Rheumatol*, 2020, 26(5): e122-e123.
- [11] 徐志华,杨光钊,陈松宽,等.高分辨率CT图像纹理分析对孤立性肺实性结节的诊断价值研究[J].*中国临床医学影像杂志*, 2020, 31(2): 98-101.
- [12] 单文莉,柏根基,王亚婷,等. Lung-RADS分级和CT征象诊断孤立性肺结节的价值[J].*放射学实践*, 2019, 34(3): 293-297.
- [13] 周家田.血清TK1,CEA,CYFRA21-1联合胸部CT特征在肺结节诊断中的临床价值[D].成都:成都医学院, 2020.
- [14] 王仪胜,张章,秦岭,等. NSE、TTF-1及Ki-67与小细胞肺癌患者预后、化疗反应的关系[J].*分子诊断与治疗杂志*, 2021, 13(3): 461-465.
- [15] 王玲,申鸿.癌胚抗原、糖类抗原、CA125、血管生成素、细胞角蛋白19片段及甲胎蛋白检测在肺癌诊断中的临床研究[J].*陕西医学杂志*, 2019, 48(8): 1080-1084.

(上接第1434页)

- [3] 王斌,白伟,朱光谱. NT-proBNP水平判断老年髋部骨折患者病情严重程度及预后的相关性研究[J].*包头医学院学报*, 2019, 35(10): 14-16.
- [4] 鲁齐林,蔡贤华,尚冉冉,等.老年髋部骨折关节置换或内固定术前C-反应蛋白与白蛋白比值评价短期预后的可能性[J].*中国组织工程研究*, 2019, 23(28): 4435-4439.
- [5] 文新平,贾黎,韩英华,等.术前营养不良与老年人髋部骨折术后谵妄的相关性研究[J].*实用老年医学*, 2020, 34(5): 451-453+461.
- [6] 中国老年医学学会骨与关节分会创伤骨科学术工作委员会.老年髋部骨折诊疗专家共识(2017)[J].*中华创伤骨科杂志*, 2017, 19(11): 921-927.
- [7] 王晓伟,孙天胜,张建政,等.美国麻醉医师协会分级对老年髋部骨折患者预后的预测作用[J].*中华创伤杂志*, 2020, 36(1): 51-57.
- [8] 王播,潘文静,杨慧,郑茂川.急性生理和慢性健康状况评分II对重型乙型脑炎患者预后判断的价值[J].*中华传染病杂志*, 2019, 37(8): 491-492.
- [9] Huette P, Abou-Arab O, Djebara AE, et al. Risk factors and mortality of patients undergoing hip fracture surgery: a one-year follow-up study [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 9607.
- [10] 孙宝山.高龄髋部骨折患者早期转入ICU的临床价值[J].*实用手外科杂志*, 2020, 34(1): 67-69.
- [11] 王金强,骆洪涛,王晓伟,等.老年髋部骨折患者术后30d内新发心脏不良事件的危险因素分析[J].*中华创伤骨科杂志*, 2020, 22(6): 518-522.
- [12] 周林,刘毓玲,欧阳焱黎,等. NT-proBNP和cTnI联合检测对老年髋部骨折患者在围术期发生MACE的预测价值[J].*检验医学与临床*, 2019, 16(17): 2521-2523.
- [13] 吴刚,施俊峰,李宏斌.血浆NT-proBNP水平与髋部骨折严重程度与预后的相关性分析[J].*湖南师范大学学报(医学版)*, 2020, 17(4): 121-124.
- [14] 方兵,程翰林,虞红林,等.血清E2、PINP水平对绝经后骨质疏松性腰椎骨折风险的预测价值[J].*分子诊断与治疗杂志*, 2020, 12(7): 956-959, 963.
- [15] 王成龙,罗岳,李存宽. 上肢开放性骨折术后医院感染发生情况分析[J].*华南预防医学*, 2019, 45(5): 419-422+500.

基于5个PI3K通路相关基因构建肺腺癌预后预测模型

于丽华 王宏^{1*} 秦丽² 王伟娜¹ 崔东燕² 赵书平^{2*}

[摘要] **目的** 基于磷脂酰肌醇-3激酶(PI3K)通路相关基因构建肺腺癌患者预后预测模型。**方法** 癌症基因组图谱(TCGA)数据库获取了497例肺腺癌及54例正常组织表达谱数据及相匹配的临床病理资料;并通过系统检索获取了PI3K通路关键基因集合。差异表达的PI3K相关基因经由肿瘤和正常组织比较产生。基于差异表达基因,采用单因素和多因素Cox回归分析构建模型。并根据风险评分,将患者分为高死亡风险组 and 低死亡风险组;采用生存分析(K-M)和受试者工作特征(ROC)曲线分析检验预测效能。**结果** 分析共筛选出34个显著差异表达的PI3K通路相关基因用于单因素Cox回归分析。多因素Cox回归分析确定了5个与总体生存率显著相关的差异表达基因用于模型构建(*F2RL1*、*TWIST*、*FGR*、*KLF4*和*CEP55*)。K-M分析结果提示高危组患者生存百分比较低危组低,差异有统计学意义($P<0.05$)。ROC曲线结果证实该模型较临床病理特征预测效能更强。此外,多因素Cox回归分析提示该模型为肺腺癌患者预后预测的独立风险因子($P<0.05$)。**结论** 本研究构建的以PI3K通路相关基因为基础的模型可用于肺腺癌患者的预后评估。

[关键词] 肺腺癌; PI3K; TCGA; 总体生存率

Construction prognosis model for lung adenocarcinoma based on 5 PI3K pathway related genes

YU Lihua, WANG Hong, QIN Li, WANG Weina, CUI Dongyan, ZHAO Shuping*

(1. Department of Central Laboratory, Qingdao Navy Special Service Sanatorium, Qingdao, Shandong, China, 266071; 2. Department of Clinical Laboratory, Taian City Central Hospital, Taian, Shandong, China, 271000)

[ABSTRACT] **Objective** To establish a prognostic model based on phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-related genes for lung adenocarcinoma (LUAD) patients. **Methods** The expression profiles of 497 LUAD cases and 54 normal controls were derived from The Cancer Genome Atlas (TCGA) database, as well as the matched clinicopathological data. We performed a systematic retrieve to identify the PI3K-related genes. Subsequently, the differentially expressed PI3K pathway-related genes were determined by comparing the LUAD cases and normal controls. Based on these gene candidates, univariate and multivariate Cox regression analyses were used to construct a prognostic prediction model. According to the median risk score, the patients were assigned into the low-death-risk and high-death-risk subgroups. Kaplan-Meier (K-M) and Receiver Operating Characteristic (ROC) curve analyses were used to determine the predicting performance. **Results** A total of 34 differentially expressed PI3K pathway-related genes were identified for following univariate Cox regression analysis. Subsequently, multivariate Cox regression analysis identified five overall survival-related differentially expressed genes to establish the prognostic model (*F2RL1*, *TWIST*, *FGR*, *KLF4*, and *CEP55*). K-M analysis showed that patients in the high-risk group had worse outcomes than those in the low-risk group (log-rank $P<0.05$). The ROC curve results confirmed that the predictive value of the model, which was better than

基金项目:山东省自然科学基金(ZR2016HL44)

作者单位:1. 海军青岛特勤疗养中心检验科,山东,青岛 266071

2. 泰安市中心医院检验科,山东,泰安 271000

*通信作者:赵书平, E-mail:Dezhshp@126.com

注:于丽华与王宏为共同第一作者

the existing clinicopathological indicators. Besides, multivariate Cox regression analysis proved that the model was an independent risk factor for predicting the prognosis of patients with lung adenocarcinoma ($P < 0.05$).

Conclusion The five PI3K pathway-related gene-based signature is able to predict the overall survival of patients with lung adenocarcinoma.

[KEY WORDS] Lung adenocarcinoma; PI3K; TCGA; Overall survival

中国人群的肺癌发病率以及死亡率也呈逐年升高的趋势,肺腺癌(Lung adenocarcinoma, LUAD)在我国最为常见^[1]。早期LUAD患者尚有手术机会,而晚期患者,往往只能采用靶向治疗、放化疗、免疫治疗等以延长生存时间^[2]。尽管如此,远处转移和耐药问题依旧是患者不良预后的主要原因^[3]。所以,进一步寻找可用于预测LUAD患者的预后和死亡风险的肿瘤标志物,仍然是目前首要任务。磷酸肌醇3-激酶(Phosphoinositide 3-kinase, PI3K)信号下游包含多条信号通路,参与调节各类细胞生理过程。此外,众多研究发现PI3K通路在肿瘤的发生发展中也发挥着重要的作用^[4]。例如,Heavey等人发现非小细胞肺癌的侵袭和转移与PI3K/蛋白激酶B(Protein kinase B, Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(Mammalian target of rapamycin, mTOR)通路的异常激活与密切相关^[5]。虽然PI3K通路被证明与肿瘤相关,但可否采用PI3K下游基因构建预后预测模型,用于肿瘤复发预测仍是盲点。本研究通过分析公共数据库表达谱数据,利用单因素和多因素Cox回归分析构建了一项基于PI3K通路相关基因的预后预测模型。

1 材料与方法

1.1 数据来源

通过系统检索PI3K通路下游基因列表,并从The Cancer Genome Atlas(TCGA)数据库中提取相应基因的表达谱数据(数据下载于2020年10月1日),及相应患者的临床信息[主要包括总体生存率(Overall survival, OS)、生存状态(Survival status)、年龄(Age)、性别(Gender)、肿瘤分期(Tumor stage, T分期)等,共包括497例LUAD病例和54例对照。

1.2 筛选差异表达基因和基因富集

应用R统计软件中的“limma”软件包对数据进行差异分析,与PI3K通路下游基因列表取交集,以 $\log_2\text{FoldChange} \geq 2$ 或 ≤ -2 ,校正 $P\text{-value} < 0.05$ 为条件,同时对差异基因进行富集分析。

1.3 构建预后预测模型

研究首先采用单因素Cox回归分析关联差异

表达的PI3K通路基因与OS,并提取多因素Cox回归分析中各基因的系数用于预后模型的构建,公式 $= (0.189\ 042\ 561 \times F2RL1 \text{ 表达值}) + (0.159\ 601\ 144 \times TWIST \text{ 表达值}) - (0.289\ 521\ 135 \times FGR \text{ 的表达值}) - (0.223\ 936\ 656 \times KLF4 \text{ 表达值}) + (0.250\ 520\ 925 \times CEP55 \text{ 表达值})$,基于中位风险值,将患者分为高、低风险两个亚组。

1.4 统计学分析

计数资料以 $n(\%)$ 表示,行 χ^2 检验;利用Kaplan-Meier(K-M)和log-rank分析检验模型中高、低危组的生存状态差异;绘制受试者工作特征(ROC)曲线,计算曲线下面积(AUC),检验模型准确性;采用多因素Cox回归分析探究该模型预测LUAD患者预后是否受其他因素影响。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 筛选差异表达的PI3K通路相关基因

分析共纳入154个PI3K通路相关基因,分析共筛选出34个差异表达的PI3K通路基因。对获取的差异基因进行富集分析,结果显示这些基因多富集于PI3K等信号通路。见表1、图1。

2.2 基于差异表达的PI3K通路相关基因构建预测模型

将有配对临床资料的LUAD样本与差异表达基因相结合,剔除表达量较低或对结果影响较大的样本,最终纳入436例患者表达谱数据进一步行单因素Cox回归分析,结果显示有11个基因与OS相关,差异有统计学意义($P < 0.05$)。将11个基因纳入多因素Cox回归分析,筛选出5个基因用于建模($F2RL1$ 、 $TWIST$ 、 FGR 、 $KLF4$ 和 $CEP55$),差异有统计学意义($P < 0.05$)。其中, $KLF4$ 、 $CEP55$ 、 $F2RL1$ 和 $TWIST$ 为高风险基因, FGR 为保护性基因。见图2、表2。

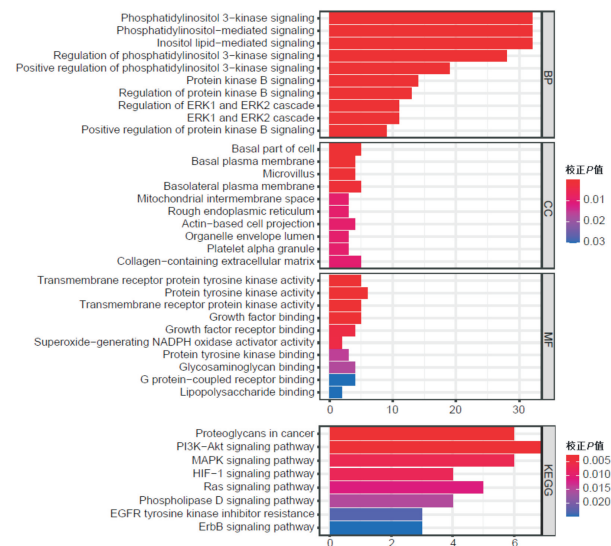
2.3 评估预测模型的有效性

患者中位风险评分为0.963 667,以此为依据将患者分为低风险(218人)和高风险组(218人)。结果显示,患者生存时间随着风险评分升高逐渐

表1 差异表达PI3K通路相关基因

Table 1 The differentially expressed PI3K pathway-related genes

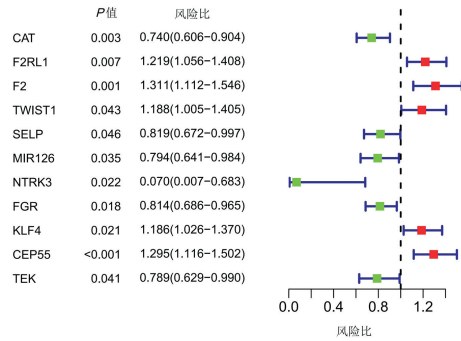
基因名称	Log ₂ 表达差值倍数	校正P值
LIME1	1.51	0.005
CEACAM1	2.13	<0.001
ERBB4	-1.35	<0.001
CAT	-1.67	<0.001
NCF1	-1.05	0.018
SERPINE2	1.58	<0.001
F2RL1	1.483	0.012
GPBR1	-2.297	<0.001
NTRK2	-1.235	0.004
F2	7.643	0.024
PEAR1	-1.859	<0.001
EDN1	-1.923	<0.001
TWIST1	2.749	<0.001
SLC9A3R1	1.113	0.019
PIP5K1B	-2.025	<0.001
CSF3	-3.676	<0.001
SELP	-2.202	<0.001
PREX2	-1.617	<0.001
MIR126	-1.039	0.036
MYOC	-2.724	<0.001
ANGPT1	-1.930	<0.001
DCN	-1.170	<0.001
NTRK3	-1.716	<0.001
ERBB2	1.083	0.002
FGR	-1.684	<0.001
KLF4	-2.167	<0.001
CEP55	3.480	<0.001
PDGFB	-1.281	<0.001



注:将筛选出的差异表达的PI3K通路相关基因进行Gene ontology [GO, 上,分别为BP, biological process; CC, cellular component; MF, molecular function]和Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG, 下)聚类分析。

图1 差异表达基因的富集分析

Figure 1 The enrichment analyses of the differentially expressed genes



注:HR>1为风险基因,HR<1为保护基因。

图2 单因素Cox回归分析结果

Figure 2 The results of univariate Cox regression analysis

表2 436例LUAD患者的临床病理特征 [n(%)]

Table 2 The clinicopathological features of the enrolled 436 LUAD cases [n(%)]

临床和病理特征	生存(n=286)	死亡(n=150)	χ ² 值	P值	
年龄	>60	185 (64.7)	44 (29.3)	49.313	<0.001
	≤60	101 (35.3)	106 (70.7)		
性别	男	126 (44.1)	72 (48.0)	0.617	0.432
	女	160 (55.9)	78 (52.0)		
临床分期	I~II	245 (85.7)	98 (65.3)	24.237	<0.001
	III~IV	41 (14.3)	52 (34.7)		
T分期	T1-2	259 (90.6)	122 (81.3)	7.598	0.006
	T3-4	27 (9.4)	28 (18.7)		
N分期	N0	219 (76.6)	70 (46.7)	39.379	<0.001
	N1-N3	67 (23.4)	80 (53.3)		

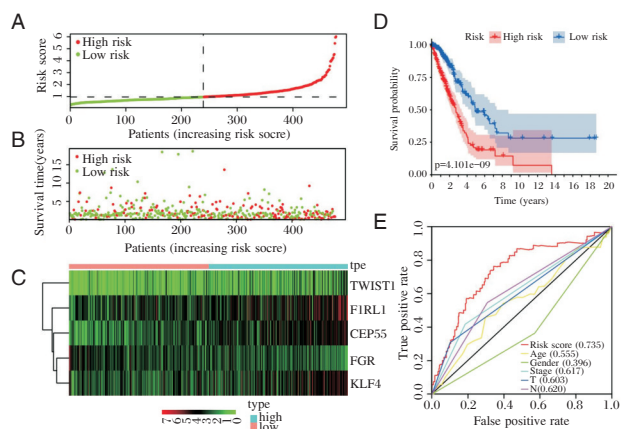
缩短(图3A),且死亡人数(图3B)则呈上升趋势;图3C可见模型中KLF4、CEP55、F2RL1和TWIST的表达在高危组患者中明显增高,FGR的表达在低危组患者中明显增高;K-M分析结果显示,风险评分与患者不良预后呈显著正相关(图3D);ROC曲线分析结果发现预测模型的预测价值最高(图3E,AUC=0.735)。见图3。

2.4 模型可作为LUAD患者独立预后因子

单因素Cox回归分析表明LUAD患者的T分期、N分期、临床分期、风险评分与OS相关(P<0.05);多因素Cox回归分析表明预测模型可作为患者OS评估的独立预测因子(P<0.05);T分期、N分期对患者预后的预测是独立的(P<0.05)。见表3、表4。

2.5 预测模型与临床病理特征的关系

使用R软件的“beeswarm”分析参与模型构建的基因与临床病理特征之间的关系,结果显示,CEP55与患者年龄(P=0.006)、生存状态(P=0.005)、性别(P=0.007)、N分期(P=4.128e-04)、stage显著相关(P=0.003),F2RL1与患者年龄(P=0.005)、生存状态(P=0.018)显著相关,FGR与患者



注:A为红色代表高危患者,绿色代表低危患者;B为红色代表死亡患者,绿色代表生存患者;C为热图显示高风险组(蓝色)和低风险组(粉色)建模基因的表达,颜色越红,表达越高;D为高、低危组患者K-M分析;E为ROC曲线分析比较模型与临床病理特征关联。

图3 建模基因分布与模型准确性评估

Figure 3 Modeling gene distribution and evaluation of model accuracy

表3 单因素Cox回归分析

Table 3 Cox regression analyses of univariate

组别	风险比	95%CI	P值
年龄	1.012	0.995~1.029	0.170
性别	0.935	0.678~1.289	0.682
临床分期	2.530	1.801~3.554	<0.001
T分期	2.413	1.589~3.663	<0.001
N分期	2.711	1.963~3.744	<0.001
风险评分	1.693	1.453~1.973	<0.001

表4 多因素Cox回归分析

Table 4 Multivariate Cox regression analysis

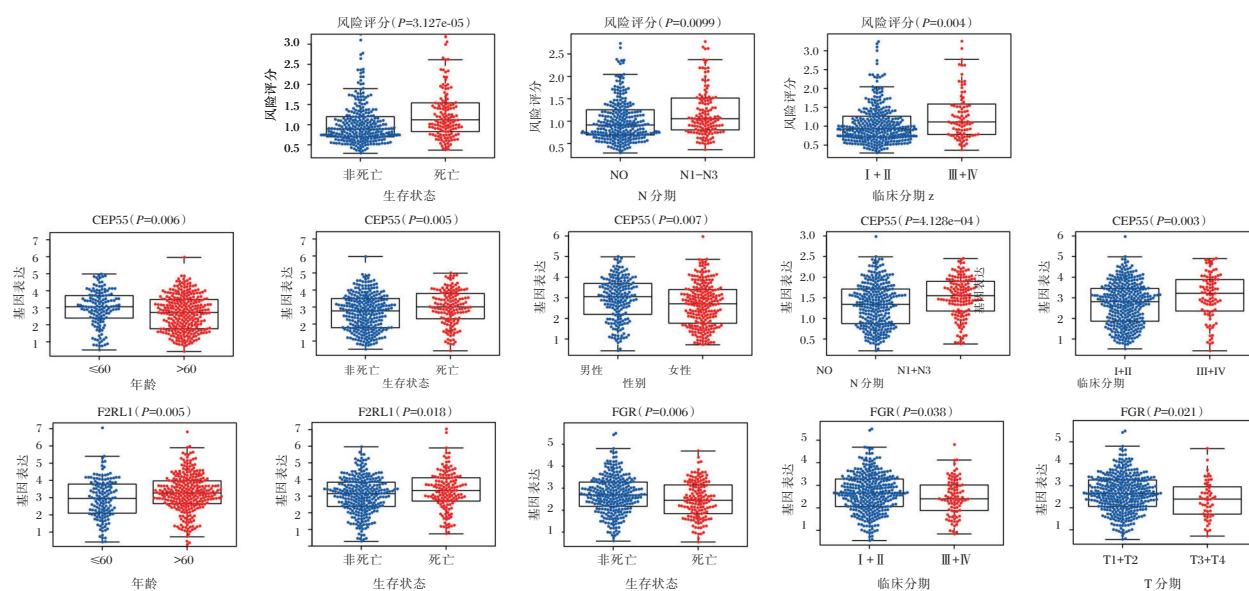
组别	风险比	95%CI	P值
年龄	1.021	1.004~1.039	0.018
性别	1.075	0.775~1.491	0.664
临床分期: III+IV	1.356	0.872~2.109	0.177
T分期: T3-T4	1.616	1.003~2.606	0.049
N分期: N1-3	2.146	1.466~3.144	<0.001
风险评分	1.707	1.455~2.002	<0.001

生存状态 ($P=0.006$)、T分期 ($P=0.021$)、stage ($P=0.038$)显著相关,见图4。

3 讨论

近年来,大量研究证实LUAD的发生和进展与PI3K信号通路密切相关,但有关该通路基因是否可作为LUAD患者预后评估标志物的研究尚处于初步阶段。本研究分析了PI3K通路基因与LUAD患者预后的关系,筛选出了能够独立预测LUAD患者预后的关键基因,并以此为依据构建了预后预测模型,系列分析证实了该预测模型的预测能力。同时,多因素Cox回归分析揭示该模型对LUAD患者的预后评估作用不受其它临床病理参数的干扰。

当前模型共纳入5个PI3K通路相关基因。*F2RL1*基因位于5号染色体上,其编码蛋白PAR2是一种G蛋白偶联受体,可以启动多种细胞内信



注:图中所示为模型中与相应临床病理特征显著相关的差异表达基因($P<0.05$)。

图4 建模基因与临床参数的关系

Figure 4 The correlation between modeling genes and clinicopathological factors

号转导。在慢性粒细胞白血病中,PAR2的高表达预示着患者预后不良。研究发现,PAR2可上调BclL12表达,而Bcl2L12可通过抑制Mdm2与p53蛋白启动子结合,抑制p53的转录活性,减少肺癌细胞凋亡进程^[6]。研究还发现,F2RL1与吉非替尼耐药密切相关。抑制PAR2表达,可以阻断ERK通路磷酸化及上皮-间质转化,上调吉非替尼治疗敏感性^[7]。TWIST最早在果蝇中被发现调节胚胎中胚层分化和肌细胞形成,现在更多关注的是其在上皮间充质转化和肿瘤侵袭中的作用。研究发现, Twist在肺癌组织中较癌旁组织显著高表达,且Twist表达与肺肿瘤的分化程度密切相关。肺腺癌细胞系高表达Twist后,上皮细胞呈梭形、纺锤体改变;此外,高表达该基因的肺腺癌细胞侵袭和迁移能力显著增强,但增殖能力相对减弱^[8]。不仅如此,过表达TWIST可抑制E-钙蛋白和 β -连环蛋白的表达,同时增强AKT2蛋白活性,促进肿瘤的侵袭和转移^[9]。KLF4基因含有KLF超家族的锌指蛋白结构,参与真核细胞转录调控作用。据报道,KLF4基因在乳腺癌中高表达可促进肿瘤增殖^[10],但在胃癌、前列腺癌等肿瘤中起到抑瘤作用^[11]。研究还发现KLF4在肺癌组织中较癌旁组织表达降低,过表达KLF4能够显著抑制肺癌细胞增殖,引起细胞G1期阻滞;机制研究发现,KLF4可通过激活p21和抑制cyclin D1表达来抑制肿瘤进展,同时其还与Sp1竞争结合cyclin D1,进而抑制cyclin D1表达,发挥肿瘤抑制作用^[12]。CEP55位于染色体10q23.33内,是一个55 kDa的中心体蛋白,在大多数肿瘤中可检测到CEP55的异常高表达。Jiang等人^[13]发现CEP55在非小细胞肺癌肿瘤组织中表达显著上调,且与患者预后不良显著相关。Liu等人^[14]也发现,沉默CEP55表达可显著抑制肺癌细胞增殖和促进肿瘤细胞凋亡;沉默CEP55可显著降低肺癌细胞中CDK4、p21和Bcl-2表达,上调凋亡前蛋白、Bad、caspase-3和PARP的表达,这提示CEP55可作为肺癌治疗的潜在作用靶点。综上,这些结果更加提示了这些预后相关基因在肺癌发生和进展过程中的关键作用。

综上,本研究通过系统分析构建了一项由5个PI3K通路基因组成的LUAD患者预后预测模型。经过分析与验证,充分说明该预后模型预测效率以及准确率较高,能够有效指导患者预后的预测,

协助制定更为精准的治疗方案。

参考文献

- [1] 黄宇筠,袁润强,陈应智,等. 伴神经内分泌分化肺腺癌血清癌胚抗原水平的分析[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2015, 7(4):261-265.
- [2] Wu L, Leng D, Cun D, et al. Advances in combination therapy of lung cancer: Rationales, delivery technologies and dosage regimens[J]. J Control Release, 2017, 260:78-91.
- [3] Yang J, Peng A, Wang B, et al. The prognostic impact of lymph node metastasis in patients with non-small cell lung cancer and distant organ metastasis[J]. Clin Exp Metastasis, 2019, 36(5):457-466.
- [4] Yang J, Nie J, Ma X, et al. Targeting PI3K in cancer: mechanisms and advances in clinical trials[J]. Mol Cancer, 2019, 18(1):26.
- [5] Heavey S, O'Byrne KJ, Gately K. Strategies for co-targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in NSCLC[J]. Cancer Treat Rev, 2014, 40(3):445-456.
- [6] Ma G, Wang C, Lv B, et al. Proteinase-activated receptor-2 enhances Bcl2-like protein-12 expression in lung cancer cells to suppress p53 expression[J]. Arch Med Sci, 2019, 15(5):1147-1153.
- [7] Jiang Y, Zhuo X, Fu X, et al. Targeting PAR2 Overcomes Gefitinib Resistance in Non-Small-Cell Lung Cancer Cells Through Inhibition of EGFR Transactivation[J]. Front Pharmacol, 2021, 12:625289.
- [8] 沈啸. 过表达Twist基因诱导肺腺癌NCI-H1299细胞EMT及其对增殖、迁移及侵袭能力的影响[D]. 上海: 复旦大学, 2013.
- [9] Fu J, Qin L, He T, et al. The TWIST/Mi2/NuRD protein complex and its essential role in cancer metastasis[J]. Cell Res, 2011, 21(2):275-289.
- [10] Cittelly DM, Finlay-Schultz J, Howe EN, et al. Progesterone suppression of miR-29 potentiates dedifferentiation of breast cancer cells via KLF4[J]. Oncogene, 2013, 32(20):2555-2564.
- [11] Jiang Z, Zhang Y, Chen X, et al. Long non-coding RNA LINC00673 silencing inhibits proliferation and drug resistance of prostate cancer cells via decreasing KLF4 promoter methylation[J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(2):1878-1892.
- [12] 胡文献. 转录因子KLF4抑制肺癌发生、发展的作用研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2008.
- [13] Jiang C, Zhang Y, Li Y, et al. High CEP55 expression is associated with poor prognosis in non-small-cell lung cancer[J]. Onco Targets Ther, 2018, 11:4979-4990.
- [14] Liu L, Mei Q, Zhao J, et al. Suppression of CEP55 reduces cell viability and induces apoptosis in human lung cancer[J]. Oncol Rep, 2016, 36(4):1939-1945.

PA、ChE、GGT联合诊断肺结核合并HBV感染患者药物性肝损伤的价值

吴秋萍 吴海丰 黄远江 周贵忠*

[摘要] **目的** 探究前白蛋白(PA)、胆碱酯酶(ChE)、 γ -谷氨酰转氨酶(GGT)联合诊断肺结核合并乙型肝炎病毒(HBV)感染患者药物性肝损伤(DILI)的价值。**方法** 选取海南医学院第二附属医院2016年1月至2019年12月155例肺结核合并HBV感染患者,根据治疗后是否发生DILI分为观察组($n=109$)、对照组($n=46$),比较两组血清PA、ChE、GGT水平、HBV-DNA载量、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST),分析血清PA、ChE、GGT因子与HBV-DNA载量、ALT、AST、DILI的关系,评价血清PA、ChE、GGT对DILI诊断及其程度的鉴别价值。**结果** 两组间及不同DILI程度间血清PA、ChE、GGT水平比较,差异有统计学意义($P<0.05$);血清PA、ChE、GGT水平与ALT、AST、HBV-DNA载量、DILI具有相关性($P<0.05$);血清PA、ChE、GGT联合检测对DILI的诊断及其程度的鉴别价值高于单一检测($P<0.05$)。**结论** 肺结核合并HBV感染患者发生DILI时PA、ChE、GGT水平明显异常变化,且与病情密切相关,联合检测对DILI早期诊断及病情评估具有较高价值。

[关键词] 前白蛋白;胆碱酯酶; γ -谷氨酰转氨酶;肺结核;乙型肝炎病毒;药物性肝损伤

The value of PA, Che and GGT in the diagnosis of drug-induced liver injury in patients with tuberculosis and HBV infection

WU Qiuping, WU Haifeng, HUANG Yuanjiang, ZHOU Guizhong*

(Department of Tuberculosis, the Second Affiliated Hospital of Hainan Medical University, Haikou, Hainan, China, 570311)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the value of prealbumin (PA), cholinesterase (Che), and gamma-glutamyltransferase (GGT) in the diagnosis of drug-induced liver injury (DILI) in patients with tuberculosis and hepatitis B virus (HBV) infection. **Methods** 155 patients with pulmonary tuberculosis complicated with HBV infection in the second Affiliated Hospital of Hainan Medical University from January 2016 to December 2019 were selected and divided into the observation group ($n=109$) and the control group ($n=46$) according to whether DILI occurred after treatment. The levels of serum PA, Che, GGT, HBV-DNA load, alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) were compared between the two groups, and the levels of serum PA, Che, GGT and HBV-DNA load, ALT, AST were analyzed. The value of PA, Che and GGT in the diagnosis and differential diagnosis of DILI was evaluated. **Results** There were significant differences in serum PA, Che and GGT levels between the two groups and different DILI degrees ($P<0.05$). Serum PA, Che and GGT levels were correlated with ALT, AST, HBV-DNA load and DILI ($P<0.05$). The value of combined detection of PA, Che and GGT in the diagnosis and differentiation of DILI was higher than that of single detection ($P<0.05$). **Conclusion** The levels of PA, Che and GGT in patients with DILI are significantly abnormal, which are closely related to the disease condition. Combined detection has high value for the early diagnosis and assessment of DILI.

基金项目:海南省卫生计生行业科研项目(18A200062)

作者单位:海南医学院第二附属医院结核科,海南,海口 570311

*通信作者:周贵忠, E-mail:zhouguizhong68@163.com

[KEY WORDS] Prealbumin; Cholinesterase; Gamma-glutamyl transferase; Tuberculosis; Hepatitis B virus; Drug-induced liver injury

流行病学调查显示,肺结核合并乙肝病毒感染(Hepatitis B Virus, HBV)发生率约为29.8%~45.3%,抗结核药物联合治疗及HBV本身的长期活动均会在一定程度上损伤肝功能,导致药物性肝损伤(Drug-Induced Liver Injury, DILI)的发生,甚至引发肝功能衰竭,严重威胁患者生命安全^[1]。血清因子是目前临床快捷方便的诊断方式,前白蛋白(Prealbumin, PA)、胆碱酯酶(Cholinesterase, ChE)均由肝脏合成,其中PA属于糖蛋白质,半衰期仅12 h,其血清水平能准确反映肝脏合成功能,是早期肝功能损伤的特异性指标^[2];而ChE以同工酶形式存在于体内,能反映肝脏炎症活动度及纤维化等多种病理损伤,二者均随着肝损伤程度加重而减少^[3]。另外,肝脏内 γ -谷氨酰转移酶(Gamma-Glutamyl Transferase, GGT)多存在于细胞膜及微粒体,参与谷胱甘肽的合成,肝脏受损时血清中GGT水平升高^[4]。基于此,本研究将探讨血清PA、ChE、GGT水平联合诊断DILI的价值。现报告如下。

1 资料和方法

1.1 一般资料

选取海南医学院第二附属医院2016年1月至2019年12月155例肺结核合并HBV感染患者作为研究对象,均符合《肺结核基层诊疗指南(2018年)》中肺结核诊断标准^[5];均经痰涂片病原学检查确诊有结核分枝杆菌感染、HBV感染;HBV表面抗原阳性,HBV-DNA $\leq 1 \times 10^5$ copies/mL;均为首次发病;既往未使用过免疫调节抑制剂、抗HBV、抗结核杆菌药物;患者均签署知情同意书。排除自身免疫实性肝病、糖尿病、严重感染;精神或意识障碍无法配合治疗或检查;恶性肿瘤;合并严重心、脾、肺等重要脏器功能障碍;近期感染甲肝或丙肝病毒。所有患者均给予抗结核治疗,根据是否发生DILI分为观察组($n=109$)与对照组($n=46$)。其中观察组男55例,女54例;平均年龄(43.98 ± 7.85)岁。对照组男25例,女21例;平均年龄(44.12 ± 7.49)岁。两组基线资料(性别、年龄)比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。本实验经医院伦理委员会批准。

1.2 方法

①治疗方法:所有患者均口服利福平(0.45 g/d)、

异烟肼(0.3 g/d)、吡嗪酰胺(1.5 g/d)、乙胺丁醇(0.75 g/d)等药物强化联合抗结核治疗,治疗期间给予复方甘草酸苷片护肝治疗。②血清生化指标检测:治疗1周后所有患者均采集5 mL空腹静脉血,以3 500 r/min的速度离心10 min,离心半径为10 cm,分离得到血清,采用全自动生化分析仪(成都恩普生医疗科技有限公司,批准文号:川械注准20172400129),PA采用免疫透射比浊法测定,ChE采用丁酰硫代胆碱法测定,试剂盒均购自深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司;GGT、ALT、AST采用速率法测定,试剂盒购自深圳市雷诺华科技实业有限公司;HBV-DNA病毒载量采用PCR-荧光探针法测定,试剂盒购自中山大学达安基因股份有限公司。③DILI程度评估:参考《药物性肝损伤诊治指南》^[6]根据血清清蛋白(TP)与白蛋白(ALB)结果计算清蛋白/球蛋白(A/G)比值,并据此评估DILI程度:其中A/G值 >1.5 为正常;A/G值1~1.5为轻度肝损伤,总胆红素(TBil) $<2.5 \mu\text{mol/L}$,国际标准化比值(INR) <1.5 ;A/G值 <1 为重度肝损伤, TBil $\geq 2.5 \mu\text{mol/L}$, INR ≥ 1.5 。

1.3 统计学方法

采用SPSS22.0对数据进行分析,计量资料采用($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用独立样本 t 检验对比;血清PA、ChE、GGT与ALT、AST、HBV-DNA病毒载量相关性采用Pearson相关系数模型;用Logistic进行多因素回归分析;采用ROC曲线,获取曲线下面积(AUC),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PA、ChE、GGT、ALT、AST、HBV-DNA病毒载量比较

观察组血清PA、ChE水平低于对照组,GGT、ALT、AST、HBV-DNA病毒载量高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表1。

2.2 血清PA、ChE、GGT与ALT、AST、HBV-DNA病毒载量相关性

Pearson相关性分析,血清PA、ChE与ALT、AST、HBV-DNA病毒载量呈负相关,GGT与ALT、

表1 两组血清PA、ChE、GGT、ALT、AST、HBV-DNA病毒载量比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of serum PA, ChE, GGT, ALT, AST, HBV-DNA viral load between 2 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	PA(mg/L)	ChE(U/L)	GGT(U/L)	ALT(U/L)	AST(U/L)	HBV-DNA($\times 10^3$ IU/mL)
观察组	109	187.56 \pm 60.58	3236.19 \pm 487.45	212.53 \pm 69.51	68.15 \pm 22.06	74.14 \pm 23.28	15.91 \pm 5.10
对照组	46	296.74 \pm 95.03	4720.76 \pm 664.31	116.29 \pm 38.36	37.62 \pm 12.39	35.05 \pm 11.57	10.32 \pm 3.21
t值		8.573	15.480	8.829	8.808	10.824	6.874
P值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

AST、HBV-DNA病毒载量呈正相关($P < 0.05$)。见表2。

表2 血清PA、ChE、GGT与ALT、AST、HBV-DNA病毒载量相关性

Table 2 Correlation between serum PA, ChE, GGT and ALT, AST, HBV-DNA viral load

项目	PA		ChE		GGT	
	r值	P值	r值	P值	r值	P值
ALT	-0.529	<0.001	-0.611	<0.001	0.745	<0.001
AST	-0.547	<0.001	-0.589	<0.001	0.732	<0.001
HBV-DNA病毒载量	-0.602	<0.001	-0.638	<0.001	0.805	<0.001

2.3 血清PA、ChE、GGT与DILI的关系

以肺结核合并HBV感染患者是否发生DILI作为因变量(否=0,是=1),将ALT、AST、HBV-DNA病毒载量等其他因素控制后,以血清PA、ChE、GGT作为自变量(以所有患者平均值为界: \leq 平均值=1, $>$ 平均值=2),Logistic回归分析显示,血清PA、ChE、GGT仍与DILI显著相关($P < 0.05$),见表3。

表3 血清PA、ChE、GGT与DILI的关系

Table 3 The relationship between serum PA, ChE, GGT and DILI

变量	β 值	S.E.	Wald χ^2	OR值	95%CI	P值
PA	-0.647	0.204	10.067	0.523	0.322~0.851	<0.001
ChE	-0.579	0.167	12.003	0.561	0.347~0.906	<0.001
GGT	1.793	0.459	15.258	6.007	3.586~10.062	<0.001

2.4 血清PA、ChE、GGT对DILI的诊断价值

ROC曲线结果显示,血清PA、ChE、GGT三者联合诊断DILI的AUC为0.955,95%CI为0.909~0.982,敏感度为94.50%,特异度为86.96%,显著优于单独诊断($P < 0.05$)。见表4、图1。

表4 血清PA、ChE、GGT对DILI的诊断价值

Table 4 The diagnostic value of serum PA, ChE, GGT for DILI

指标	AUC	95%CI	Z值	截断值	敏感度 (%)	特异度 (%)	P值
PA	0.766	0.691~0.830	5.744	≤ 282.62 mg/L	88.07	60.87	<0.001
ChE	0.828	0.760~0.884	8.442	≤ 4173.65 U/L	93.58	58.70	<0.001
GGT	0.839	0.772~0.893	10.861	> 186.36 U/L	61.47	93.48	<0.001
联合	0.955	0.909~0.982	27.132		94.50	86.96	<0.001

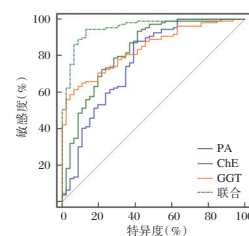


图1 血清PA、ChE、GGT对DILI的诊断价值

Figure 1 The diagnostic value of serum PA, ChE, GGT for DILI

2.5 观察组不同程度DILI患者血清PA、ChE、GGT水平

观察组重度DILI患者血清PA、ChE低于轻度DILI患者,GGT水平高于轻度DILI患者,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表5。

表5 观察组不同程度DILI患者血清PA、ChE、GGT水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Comparison of serum PA, ChE, GGT levels in the observation group with different degrees of DILI ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	PA(mg/L)	ChE(U/L)	GGT(U/L)
重度DILI患者	40	139.22 \pm 46.22	2862.47 \pm 425.10	245.63 \pm 58.41
轻度DILI患者	69	215.58 \pm 71.53	3452.84 \pm 503.77	193.34 \pm 46.39
对照组	46	296.74 \pm 95.03	4720.76 \pm 664.31	116.29 \pm 38.36
F值		48.384	137.875	81.108
P值		<0.001	<0.001	<0.001

2.6 血清PA、ChE、GGT对DILI程度的诊断价值

根据表5中不同程度DILI患者血清PA、ChE、GGT水平绘制ROC曲线,结果显示,血清PA、ChE、GGT三者联合诊断DILI的AUC为0.965,95%CI为0.912~0.991,敏感度为97.50%,特异度为84.06%,优于单独诊断($P < 0.05$)。见表6、图2。

表6 血清PA、ChE、GGT对DILI程度的诊断价值

Table 6 The diagnostic value of serum PA, ChE, GGT to the degree of DILI

指标	AUC	95%CI	Z值	截断值	敏感度 (%)	特异度 (%)	P值
PA	0.759	0.668~0.836	5.771	≤ 199.96 mg/L	92.50	57.97	<0.001
ChE	0.814	0.728~0.882	7.229	≤ 3119.62 U/L	87.50	73.91	<0.001
GGT	0.694	0.598~0.779	3.765	> 233.11 U/L	52.50	79.71	<0.001
联合	0.965	0.912~0.991	32.195		97.50	84.06	<0.001

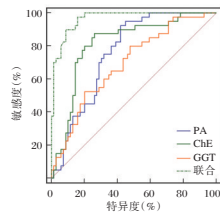


图2 血清PA、ChE、GGT对DILI程度的诊断价值
Figure 2 The diagnostic value of serum PA, ChE, GGT to the degree of DILI

3 讨论

我国是肺结核与乙肝高发地区,二者合并甚至相互交叉感染在临床也较为常见,但常用抗肺结核药物对肝脏具有一定损害作用,此时若终止治疗则会导致病情恶化,而继续治疗则会加重肝脏损伤,形成DILI^[7-8]。因此,临床应对DILI进行早期监测诊断,及时调整治疗方案,减少药物对肝脏的不可逆损伤。

传统生化指标如TP、ALB等能在一定程度上反映肝脏合成功能,但此类指标用于合并肺结核的患者检测过程中易发生误诊,诊断准确性有待进一步提升。肝脏是多种重要因子合成与转归的重要器官,任何急慢性肝损伤均会在一定程度上影响其水平,PA、ChE等因子均可在肝脏中大量合成。相关研究表明,PA含量降低是肝脏疾病预后不良的独立危险因素^[9];而刘书宏等^[10]学者指出,ChE在慢性乙型肝炎患者中与肝功能密切相关,有助于病情评估及预后判断。基于此,本研究对二者水平进行检测分析,结果显示发生DILI患者PA、ChE水平更低,且与肝功能、HBV-DNA载量密切相关。其中PA属于急性时相蛋白,参与机体功能调节,促进淋巴细胞成熟,增强机体免疫力,甚至在抗肿瘤方面具有潜在作用,能反映生理病理状态^[11];同时,肝脏是ChE合成的唯一器官,并广泛分布于神经组织,能明确反映肺结核合并HBV感染患者抗结核治疗中肝纤维化、炎症活动度等病理损伤及肝脏合成与储备功能,是肝损伤的可靠标记物^[12];有研究指出,病毒性肝炎肝硬化患者ChE水平明显降低,能在一定程度上反映Child-pugh分级情况,对疾病诊断具有一定参考价值^[13]。而乙肝病情加重及抗结核药物应用导致肝脏功能受损时,炎症反应加重、肝脏细胞变性坏死,会导致合成分泌的PA、ChE减少,另外肺结核会刺激乙酰胆碱过量分泌,并负反馈作用于ChE,

降低其活性,本研究进一步Logistic回归分析提示上述二者水平是DILI发生的独立危险因素。同时随着DILI程度加重,二者水平呈逐渐降低趋势,因此,血清PA、ChE检测能较好反映肝脏合成分泌功能,可作为早期肝损伤的敏感性指标。

GGT普遍存在于脏器组织,肝组织居于第3位,但血清中90%以上GGT来自于肝脏,是其作为肝脏病情评估指标的重要原因^[14]。临床研究发现,GGT检测在肝脏疾病诊断中具有重要价值,有助于各种肝脏疾病的临床诊治工作的开展,具有重要临床意义^[15]。本研究结果显示两组间及不同DILI程度间GGT比较均有差异,且与肝功能、乙肝病情密切相关。发生DILI患者肝脏组织炎症反应加重,会加剧细胞膜通透性,导致肝脏内GGT渗漏至血清中,其水平显著升高,可达正常水平10倍左右^[16]。因此GGT可作为临床诊断鉴别肺结核合并HBV感染患者发生DILI的敏感指标。另外,本研究为进一步探讨上述三个血清因子的检测价值,通过绘制ROC曲线,结果显示血清因子联合检测对DILI的诊断及其程度的鉴别价值高于单一检测,表明联合检测能提高对DILI早期诊断及病情评估的应用价值。

综上所述,肺结核合并HBV感染患者发生DILI时PA、ChE、GGT水平明显异常变化,且与病情密切相关,可作为DILI早期诊断的检测指标推广应用。

参考文献

- [1] 高瑜,王欣,郭珍,等. Th1、Th2、CD4+在肺结核合并慢性乙型肝炎患者血清中的表达水平[J]. 热带医学杂志, 2020,20(10):1304-1307.
- [2] Qiao W, Leng F, Liu T, et al. Prognostic Value of Prealbumin in Liver Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis[J]. Nutr Cancer, 2020, 72(6): 909-916.
- [3] 吴张君,潘莹,乐园. 血清AST、ALP、CHE、PT与乙型肝炎合并肺结核患者肝纤维化程度的相关性[J]. 中西医结合肝病杂志, 2020,30(6):509-511.
- [4] 蒙毅军,余洪立,杨石. GLDH、GGT、ALT、ALP联合检测对药物性肝损伤诊断的临床意义[J]. 检验医学与临床, 2019,16(12):1735-1737.
- [5] 中华医学会,中华医学杂志社,中华医学会全科医学分会,等. 肺结核基层诊疗指南(2018年)[J]. 中华全科医师杂志, 2019,18(8):709-717.
- [6] 中华医学会肝病学会药物性肝病学组. 药物性肝损伤诊治指南[J]. 中华肝脏病杂志, 2015,23(11):810-820.
- [7] 徐俊彦,钟凯惠,薛卫,等. 含环丝氨酸结核方案治疗耐药肺结核病患者疗效及安全性[J]. 中华生物医学工程杂志, 2019,25(1):108-111.

(下转第1452页)

sIL-2R、TIMP-1、IL-4 在 POAG 中的表达及与视神经损伤的相关性

林相强 纪新丽 王明明 孙亚飞*

[摘要] **目的** 分析可溶性白细胞介素-2受体(sIL-2R)、金属蛋白酶组织抑制因子1(TIMP-1)及白细胞介素-4(IL-4)在原发性开角型青光眼(POAG)患者中的表达及与视神经损伤的相关性。**方法** 收集青岛市城阳人民医院90例原发性开角型青光眼患者作为研究组,根据平均缺损值(MD)分为轻度损伤组、中度损伤组、重度损伤组;另选取同期在本院门诊体检的105例正常人群作为健康对照组。比较不同组别的sIL-2R、TIMP-1及IL-4水平。分析不同视神经损伤患者sIL-2R、TIMP-1及IL-4水平,采用Pearson相关性分析,绘制散点图,分析各因子与POAG病情严重程度的相关性。**结果** 研究组sIL-2R、TIMP-1及IL-4水平均显著高于健康对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。不同视神经损伤患者sIL-2R、TIMP-1及IL-4水平:重度损伤组>中度损伤组>轻度损伤组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。Pearson相关性分析结果显示:sIL-2R、TIMP-1及IL-4水平均与原发开角型青光眼患者视神经损伤病情严重程度呈正相关($P<0.05$)。**结论** sIL-2R、TIMP-1及IL-4在原发开角型青光眼患者中均呈异常表达状态,通过检测上述指标水平,可为评估患者视神经损伤严重程度提供可靠参考。

[关键词] sIL-2R; TIMP-1; IL-4; 原发性开角型青光眼; 视神经损伤

The expression of sIL-2R, TIMP-1 and IL-4 in patients with POAG and their correlation with optic nerve injury

LIN Xiangqiang, JI Xinli, WANG Mingming, SUN Yafei*

(Department of Ophthalmology, Chengyang People's Hospital of Qingdao, Qingdao, Shandong, China, 266100)

[ABSTRACT] **Objective** To analyze the expression of soluble interleukin-2 receptor (sIL-2R), tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) and interleukin-4 (Interleukin-4, IL-4) in patients with primary open-angle glaucoma (POAG) and their correlation with optic nerve injury. **Method** A total of 90 patients with POAG were collected in Chengyang People's Hospital of Qingdao as the study group. According to the average defect value (MD), they were divided into the mild injury group, the moderate injury group, and the severe injury group. In addition, 105 normal people who had physical examination in our hospital during the same period were selected as the healthy control group. The levels of sIL-2R, TIMP-1 and IL-4 in two groups were compared. The levels of sIL-2R, TIMP-1 and IL-4 in patients with different degrees of optic nerve injury were analyzed. Pearson correlation analysis is adopted, and scatter diagram was drawn to analyze the correlations between each factor and the severity of POAG. **Result** The levels of sIL-2R, TIMP-1 and IL-4 in the study group were significantly higher than those in the healthy control group, and the differences were all statistically significant ($P<0.05$). The levels of sIL-2R, TIMP-1 and IL-4 in patients with different optic nerve injuries were as follows: the severe injury group > the moderate injury group > the mild injury group, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). The Pearson correlation analysis showed that the levels of sIL-2R, TIMP-1 and IL-4 were all positively correlated with the severity of optic nerve injury in patients with

基金项目:山东省重点研发项目(2016GSF201213)

作者单位:青岛市城阳人民医院眼科,山东,青岛 266100

*通信作者:孙亚飞, E-mail:619725502@qq.com

POAG ($P<0.05$). **Conclusion** sIL-2R, TIMP-1 and IL-4 are all abnormally expressed in patients with POAG. The levels of sIL-2R, TIMP-1 and IL-4 are positively correlated with the severity of optic nerve damage in patients with POAG. The detection of the above indicators can provide a reliable reference for assessing the severity of optic nerve injury in patients.

[KEY WORDS] sIL-2R; TIMP-1; IL-4; Primary open-angle glaucoma; Optic nerve injury

原发性开角型青光眼(primary open angle glaucoma, POAG)是一种由眼压升高而致视神经损害,视野缺损,最后导致失明的眼病。POAG 主要与小梁网自身异常及产生的细胞外基质异常堆积有关^[1]。该病进展缓慢,前期无明显症状,不易发现,多数患者直至视野明显损害才就诊,严重影响患者生活质量及身体健康^[2-3]。生物学研究揭示可溶性白细胞介素-2受体(Soluble interleukin-2receptor, sIL-2R)可以低亲和力结合白细胞介素2参与免疫调节,抑制T细胞克隆扩增;还可介导免疫反应调节拮抗蛋白,使活性物质维持动态平衡^[4]。白细胞介素-4(Interleukin-4, IL-4)是免疫的应答重要因子,相关学者发现其与视神经横断伤密切相关^[5]。既往研究发现,视盘参数、血清金属蛋白酶组织抑制因子1(Tissue inhibitor of metalloproteinase-1, TIMP-1)等指标对青光眼的检测具有重要意义^[6]。本研究探讨sIL-2R、TIMP-1及IL-4在患者中的表达水平及与视神经损伤的相关性,为临床诊治提供理论指导。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集青岛市城阳人民医院2019年6月至2020年6月收治的90例POAG患者作为研究组。男18例,女72例,年龄(54.04±6.54)岁。纳入标准:①所有患者均经临床相关检查确诊:至少2次眼压≥22 mmHg,矫正视力或裸眼视力≥0.5,房角镜检查为房角开放,视野检查显示有早期青光眼性视野缺损,视盘呈青光眼性改变^[1];②临床资料完整,无缺损或丢失。排除标准:①合并角膜炎、葡萄膜炎等眼部活动性疾病者;②其他疾病引发视野损伤、视神经损伤者或严重视神经损害者;③合并痴呆、精神疾病等无法配合本研究者。另选择同期在本院门诊体检的正常人群105例作为健康对照组,男21例,女84例,年龄(55.45±6.32)岁。两组一般资料比较差异无统计学意义($P>0.05$)。本研究经医院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

对研究组患者予以BIO-1000E型一体化全自动电脑视野仪进行视野检测,由经验丰富的检测医生完成,平行检测2次。按照平均缺损值(mean defect, MD)^[7]将研究组分为3组:视神经轻度损伤:MD≤6 dB,视神经中度损伤:MD:≥7 dB~≤12 dB,视神经重度损伤:MD>12 dB。

1.3 sIL-2R、TIMP-1及IL-4水平检测

研究组患者均于入院次日清晨抽取5 mL静脉血,健康对照组于体检当天上午9点前空腹抽取5 mL静脉血。收集血液静置后,离心(4 000 r/min, 10 min),取上层血清,置于-80℃低温保存待测。sIL-2R、TIMP-1及IL-4均采用酶联免疫吸附法检测,检测仪器:瑞典雷度公司CDE68型全自动分析仪及其配套试剂盒。具体操作方法严格按照说明书进行。

1.4 统计学方法

采用SPSS 22.0软件进行统计分析,计量资料采用($\bar{x} \pm s$)表示,两两比较采用 t 检验,多组间比较采用方差检验;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sIL-2R、TIMP-1及IL-4水平比较

研究组sIL-2R、TIMP-1及IL-4水平均高于健康对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表1。

表1 两组sIL-2R、TIMP-1及IL-4水平比较($\bar{x} \pm s$)
Table 1 Comparison of sIL-2R, TIMP-1 and IL-4 levels between the two groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	sIL-2R (pg/mL)	TIMP-1 (ug/L)	IL-4 (pg/mL)
研究组	90	85.42±15.62	36.51±7.95	251.66±62.57
健康对照组	105	69.33±17.21	22.14±2.65	175.62±41.32
<i>t</i> 值		6.790	17.432	10.139
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001

2.2 不同视神经损伤患者sIL-2R、TIMP-1及IL-4水平比较

中轻度损伤38例,中度损伤27例,重度损伤25

例。不同视神经损伤患者 sIL-2R、TIMP-1 及 IL-4 水平:重度损伤组>中度损伤组>轻度损伤组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表 2。

表 2 不同视神经损伤患者 sIL-2R、TIMP-1 及 IL-4 水平比较 ($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Comparison of sIL-2R, TIMP-1 and IL-4 levels in patients with different optic nerve injuries ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	sIL-2R(pg/mL)	TIMP-1(μ g/L)	IL-4(pg/mL)
轻度损伤	38	73.54 \pm 3.74	30.52 \pm 1.96	196.52 \pm 7.43
中度损伤	27	82.62 \pm 5.12 ^a	34.36 \pm 3.62 ^a	239.52 \pm 23.51 ^a
重度损伤	25	106.52 \pm 7.19 ^{ab}	47.94 \pm 6.87 ^{ab}	348.58 \pm 25.22 ^{ab}
F 值		317.73	128.01	486.40
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

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

2.3 sIL-2R、TIMP-1 及 IL-4 水平与 POAG 患者视神经损伤病情严重程度相关性

相关性分析结果显示, sIL-2R ($r=0.972$)、TIMP-1 ($r=0.899$) 及 IL-4 ($r=0.915$) 水平均与 POAG 患者视神经损伤病情严重程度呈正相关($P<0.05$)。见图 1。

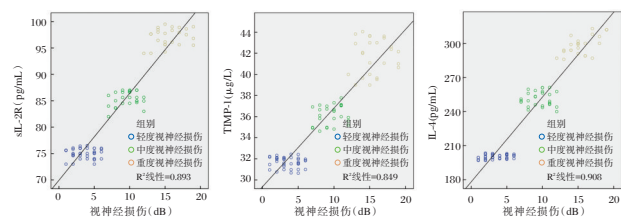


图 1 sIL-2R、TIMP-1 及 IL-4 水平与 POAG 患者视神经损伤病情严重程度相关性分析

Figure 1 Correlation analysis between levels of sIL-2R, TIMP-1 and IL-4 and severity of optic nerve injury in POAG patients

3 讨论

近年来,青光眼的发病率在全球范围内呈逐年上升趋势,防治青光眼已成为世界关注的公共卫生问题,积极评估病情、制定合理治疗对改善 POAG 患者预后具有重要意义^[8-9]。

目前,临床上对于 POAG 的发病机制尚未明确,相关研究表明与房水流出阻滞、组织病理学改变及分子遗传学研究和基因等有关^[10]。小梁网中细胞外基质的异常堆积是 POAG 的病因之一。既往研究发现导致开角型青光眼的小梁网中细胞外基质异常堆积的主要因素是基质金属蛋白酶及其组织抑制剂之间动态平衡破坏^[11]。TIMP-1 是基质金属蛋白酶抑制剂中活性最强的抑制剂,以可溶的形式分泌到细胞外基质中抑制基质金属蛋白

酶,进而影响细胞外基质的分解^[12]。一般健康生理状态下,TIMP-1 表达比例处于平衡状态,对组织重建、血管形成等具有重要作用;一旦比例失衡将影响细胞外基质,进而可引起小梁网代谢异常、房水外引流途径阻力增加^[13]。本研究显示,研究组患者 TIMP-1 水平明显高于对照组,且随着视神经损伤程度加重,TIMP-1 水平明显上升。考虑与小梁细胞合成及基质金属蛋白酶分泌减少,而 TIMP-1 合成增加,导致两者比例失调,TIMP-1 在小梁细胞间异常堆积,使房水外流阻力增加,引起房水生成与外流平衡失调,导致眼压升高有关^[14]。

研究发现,POAG 的发病与免疫因素密切相关,IL-4 是由 T 细胞分泌的因子,在免疫应答过程中具有重要作用^[15]。相关学者发现 IL-4 对视神经细胞具有损伤作用,且损伤作用呈剂量依赖性^[16]。Fang 等^[17]对腺病毒转染的 IL-4 水平研究发现,其对视神经横断伤具有保护作用,但目前仅限于动物急性视神经损伤模型,而在 POAG 患者的视网膜神经节细胞中尚未明确。本研究显示,IL-4 水平在 POAG 患者明显升高,且不同程度视神经损伤患者中比较差异有统计学意义,与 Huang 等^[18]研究结果一致。另外,由于视神经损伤与诸多因素有关,对于视神经损伤后 IL-4 水平变化与视神经损伤间的关系,后续仍需进一步的动物和临床研究。

sIL-2R 可抑制 T 细胞的增生反应,在乳腺癌、肾细胞癌、肺癌等恶性实体瘤中呈高表达状态,且转移时更明显^[19]。既往学者对青光眼患者及正常人群 sIL-2R 水平进行比较,结果发现 sIL-2R 因子水平在青光眼患者中显著升高,认为在青光眼中可通过检测 sIL-2R 受体水平来测定免疫活性,进而为青光眼患者的治疗提供有效依据^[20]。本研究对 POAG 患者 sIL-2R 水平与正常人进行比较,结果显示 sIL-2R 水平随着视神经损伤严重程度加剧而上升,进一步佐证了 sIL-2R 水平在评价 POAG 患者视神经损伤程度中的重要价值。

综上所述,sIL-2R、TIMP-1 及 IL-4 在原发性开角型青光眼患者中均呈异常表达状态,通过检测上述指标水平,可为评估患者视神经损伤严重程度提供可靠参考。

参考文献

[1] 李美玉. 原发性开角型青光眼[J]. 中华眼科杂志, 1995, 32(6):1759-1759.

- [2] 杜非凡, 王雪, 吴志鸿. 基质金属蛋白酶2, 基质金属蛋白酶抑制剂2和可溶性CD44在高度近视眼合并原发性开角型青光眼患者房水中的定量研究[J]. 中华眼科医学杂志(电子版), 2019, 9(6):335-341.
- [3] 钟莉婷, 向武, 钟燕凤, 等. Angio-OCT在眼底疾病综合诊疗过程中的应用进展[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(11):2, 9-13.
- [4] Kim YW, Lee J, Kim JS, et al. Diagnostic Accuracy of Wide-Field Map from Swept-Source Optical Coherence Tomography for Primary Open-Angle Glaucoma in Myopic Eyes [J]. *Am J Ophthalmol*, 2020, 24(12): 395-398.
- [5] Zhang J, Wang L. Association between rs4938723 polymorphism and the risk of primary open-angle glaucoma (POAG) in a Chinese population [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 28(10): 308-309.
- [6] Zhang X, Xiao H, Liu C, et al. Comparison of macular structural and vascular changes in neuromyelitis optica spectrum disorder and primary open angle glaucoma; A cross-sectional study[J]. *British J Ophthalmol*, 2020, 33(16):567-569.
- [7] Danielewska ME, Placek MM, Aleksandra KK, et al. Using the entropy of the corneal pulse signal to distinguish healthy eyes from eyes affected by primary open-angle glaucoma [J]. *Physiol Meas*, 2020, 41(5):551-554.
- [8] 莫逆, 钟华. OCTA在原发性开角型青光眼中的应用[J]. 国际眼科杂志, 2020, 20(5):791-795.
- [9] 王云, 樊宁, 刘旭阳. 原发性开角型青光眼相关基因及发病机制研究进展[J]. 中华眼视光学与视觉科学杂志, 2019, 21(10):796-800.
- [10] Hara K, Takai Y, Tanito M. Outcomes After Combined Deep Sclerectomy and Trabeculotomy to Treat Primary Open-Angle Glaucoma and Exfoliation Glaucoma [J]. *Shimane J Med Sci*, 2019, 35(16):552-554.
- [11] Ha A, Kim YW, Lee J, et al. Morphological characteristics of parapapillary atrophy and subsequent visual field progression in primary open-angle glaucoma [J]. *British J Ophthalmol*, 2020, 28(9):451-453.
- [12] Karakurt Y, Mertoglu C, Gok G, et al. Thiol-disulphide homeostasis and serum ischemia modified albumin levels in patients with primary open-angle glaucoma [J]. *Curr Eye Res*, 2019, 26(9):552-556.
- [13] Yuki K, Asaoka R, Ono T, et al. Evaluation of Fear of Falling in Patients with Primary Open-Angle Glaucoma and the Importance of Inferior Visual Field Damage [J]. *Invest Ophthalmol vis Sci*, 2020, 61(3):52.
- [14] Rubio F, Cezar A, Faria A, et al. Topical Bimatoprost Insert for Primary Open-Angle Glaucoma and Ocular Hypertension Treatment - A Phase II Controlled Study [J]. *Curr Drug Deliv*, 2021, 18(7):611-614.
- [15] Kim JS, Kim YK, Kim YW, et al. Association between esodeviation and primary open-angle glaucoma: the 2010-2011 Korea National Health and Nutrition Examination Survey [J]. *Br J Ophthalmol*, 2020, 29(6):264-267.
- [16] Vorobyeva IV. Prediction of the course of primary open-angle glaucoma in combination with diabetic retinopathy using a mathematical model [J]. *E3S Web of Conferences*, 2020, 224(9):3021.
- [17] Fang Y, Cheng J, Zhu L, et al. Evaluation of Routine Health Examination for Screening Primary Open Angle Glaucoma in Eastern China: A Hospital-Based Cross-Sectional Study [J]. *Risk Manag Healthc Policy*, 2020, 13(2):883-892.
- [18] Huang P, Qi Y, Xu YS, et al. Serum cytokine alteration is associated with optic neuropathy in human primary open angle glaucoma [J]. *J Glaucoma*, 2010, 19(5):324-30.
- [19] 张高明, 杨慧林, 王智, 等. 血清INF- γ , sIL-2R, IL-12在原发性肝癌中的表达及临床意义 [J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(21):2650-2653.
- [20] Kubota A, Nakano N, Tokunaga M, et al. Prognostic impact of soluble interleukin-2 receptor level profiling in smoldering type adult T-cell leukemia-lymphoma [J]. *Hematol Oncol*, 2019, 28(3):152-154.

(上接第1448页)

- [8] 郭红革, 陈伟, 赵文钧. 珠海市2015-2017年结核病耐药状况分析 [J]. 华南预防医学, 2018, 44(3):258-260.
- [9] 郁沙莎, 潘波, 郭王玉, 等. 血清前白蛋白(PA)含量在肝脏TACE术患者预后中的临床价值 [J]. 现代肿瘤医学, 2019, 27(2):278-280.
- [10] 刘书宏, 梁尘格, 向毅, 等. 慢性乙型肝炎患者血清白介素17A和胆碱酯酶的表达及临床意义 [J]. 现代生物医学进展, 2019, 19(20):3959-3962.
- [11] 余锐填, 关佩玲. 血清前白蛋白联合终末期肝病模型评分在失代偿期肝硬化患者临床预后评价中的意义 [J]. 中西医结合肝病杂志, 2020, 30(6):498-501.
- [12] 张光, 单前进. 乙型肝炎合并肺结核患者肝组织炎症活动度、纤维化程度与血清生化指标变化的关系 [J]. 检验医学与临床, 2019, 16(21):3127-3130.
- [13] 钱留军. 病毒性肝炎肝硬化患者血清ALB, CHE, PTA检测的临床意义 [J]. 医学检验与临床, 2020, 31(4):55-57.
- [14] 朱少美, 刘集鸿, 周潇. 丙型肝炎抗体阳性患者HCV RNA与肝功能指标联合检测的意义 [J]. 分子诊断与治疗杂志, 2019, 11(3):214-218, 223.
- [15] 崔红权. 血清ALT、AST、GGT检测在肝脏疾病诊断中应用研究 [J]. 国际检验医学杂志, 2017, 38(16):2293-2295.
- [16] Zhang LX, Lv Y, Xu AM, et al. The prognostic significance of serum gamma-glutamyltransferase levels and AST/ALT in primary hepatic carcinoma [J]. *BMC Cancer*, 2019, 19(1):841.

· 论 著 ·

外周血 miR-183、miR-27b-3p 联合智能染色胃镜早期诊断胃癌的价值

郭佳念 徐扬志* 谢婷婷 贾琳

[摘要] **目的** 探究外周血 miR-183、miR-27b-3p 联合智能染色胃镜早期诊断胃癌的价值。**方法** 选取广州医科大学附属第二医院 2018 年 1 月至 2021 年 1 月胃癌患者 78 例作为研究组,另选择胃良性疾病患者 39 例作为对照组,分析智能染色胃镜检查结果、外周血 miR-183、miR-27b-3p、PG I、PG II、PGR 水平,并评价智能染色胃镜检查、外周血 miR-183、miR-27b-3p 对胃癌的早期诊断价值。**结果** 研究组智能染色胃镜检查阳性率、外周血 miR-183 相对表达量高于对照组,miR-27b-3p 相对表达量低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);Spearman 相关性分析,研究组智能染色胃镜检查与外周血 miR-183 相对表达量呈正相关,与 miR-27b-3p 相对表达量、血清 PG I、PGR 呈负相关($P<0.05$);Pearson 相关性分析,外周血 miR-183 相对表达量与血清 PG I、PGR 呈负相关,miR-27b-3p 相对表达量与血清 PG I、PGR 呈正相关($P<0.05$);ROC 曲线显示,智能染色胃镜检查、外周血 miR-183、miR-27b-3p 联合早期诊断胃癌的 AUC 最大。**结论** 外周血 miR-183、miR-27b-3p 联合智能染色胃镜可提高早期诊断胃癌诊断价值,实现早期诊疗。

[关键词] 微小 RNA-183; 微小 RNA-27b-3p; 智能染色胃镜; 胃蛋白酶原; 胃癌; 早期诊断

The value of peripheral blood miR-183 and miR-27b-3p combined with intelligent staining gastroscopy in the early diagnosis of gastric cancer

GUO Jiannian, XU Yangzhi*, XIE Tingting, JIA Lin

(Department of Gastroendoscopy, the Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong, China, 510260)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the value of peripheral blood miR-183 and miR-27b-3p combined with intelligent staining gastroscopy in the early diagnosis of gastric cancer. **Methods** 78 patients with gastric cancer in the Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University from January 2018 to January 2021 were selected as the research group, and 39 patients with benign gastric diseases were selected as the control group. The results of intelligent staining gastroscopy, peripheral blood miR-183, miR-27b-3p, PG I, PG II, PGR levels were analyzed, and the value of smart staining gastroscopy, peripheral blood miR-183, miR-27b-3p for early diagnosis of gastric cancer was evaluated. **Results** The positive rate of intelligent staining gastroscopy and the relative expression of miR-183 in peripheral blood of the research group were higher than those of the control group, and the relative expression of miR-27b-3p was lower than that of the control group ($P<0.05$). Spearman correlation analysis showed that the intelligent staining gastroscopy of the research group was positively correlated with the relative expression of miR-183 in peripheral blood, and negatively correlated with the relative expression of miR-27b-3p, serum PG I and PGR ($P<0.05$). Pearson correlation analysis showed that the relative expression of peripheral blood miR-183 was negatively correlated with serum PG I and PGR, and the relative expression of miR-27b-3p was positively correlated with serum PG I and PGR ($P<0.05$). The ROC curve showed that the AUC of early gastric cancer diagnosed by the combination of intelligent staining gastroscopy and peripheral blood miR-183 and miR-27b-3p was the largest. **Conclusion** Pe-

基金项目:广东省基础与应用基础研究基金联合基金青年基金项(2019A1515110081)

作者单位:广州医科大学附属第二医院消化内镜室,广东,广州 510260

*通信作者:徐扬志, E-mail:gktid3660440@163.com

ripheral blood miR-183 and miR-27b-3p combined with intelligent staining gastroscop can improve the diagnostic value of early gastric cancer and realize early diagnosis and treatment.

[KEY WORDS] MicroRNA-183; MicroRNA-27b-3p; Intelligent staining gastroscop; Pepsinogen; Gastric cancer; Early diagnosis

胃癌是常见消化道恶性肿瘤,据统计,我国胃癌发病率、死亡率仅次于肺癌,居恶性肿瘤第2位^[1]。早期胃癌术后5年生存率可达90%,但由于胃癌早期表现不明显,多数患者诊断时已属肿瘤进展期^[2]。胃镜检查是公认胃癌诊断“金标准”,而智能染色胃镜的应用使胃癌早期诊断率得到显著提高^[3]。但胃镜检查属侵入性操作,大多数患者无法接受反复诊断,且对操作者要求较高,对胃癌早期诊断价值有限^[4]。因此,寻找简便、快速且具有较高敏感度与特异度的胃癌早期诊断指标,是胃癌防治相关研究的重点之一。微小RNA(microRNA, miRNA)是一类非编码小RNA,参与生物体生长、发育调节及多种疾病发生、发展。研究显示,胃癌中miR-183、miR-27b-3p显著异常表达,可能成为胃癌早期诊断生物标志物^[5-6]。基于此,本研究尝试分析外周血miR-183、miR-27b-3p联合智能染色胃镜在胃癌早期诊断中的价值。报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取广州医科大学附属第二医院2018年1月至2021年1月胃癌患者78例作为研究组,另选择胃良性疾病患者39例作为对照组。纳入标准:均经胃镜活检确诊;入组时未进行任何放化疗、内分泌治疗等;肝肾功能正常;患者及家属知情同意。排除标准:合并其他恶性肿瘤;近期使用抗生素、胃黏膜保护剂、抑酸药;哺乳或妊娠期女性;精神异常,无法配合研究。研究组女31例,男47例,年龄平均(46.85±7.94)岁,TNM分期:I期29例、II期49例。对照组女17例,男22例,年龄平均(48.02±8.35)岁。两组年龄、性别差异无统计学意义($P>0.05$),且本研究经本院伦理委员会审批通过。

1.2 方法

①智能染色胃镜检查:检查前10 min服用泡剂,在清醒状态下行智能染色胃镜检查,若检查中未发现明显病变,在胃体、胃窦、胃底部,将变焦调整为0~9档,观察胃小凹并拍照,若发现黏膜糜

烂、溃疡、色泽异常,以清水反复清洗,再通过电子染色检查获取照片,在染色的情况下进行活检,部分病灶需手动调大变焦,观察病变情况,完成活检后以清水彻底冲洗。胃镜活检组织经甲醛固定后,行石蜡包埋、切片和苏木精-伊红染色,行病理诊断。②外周血miR-183、miR-27b-3p及胃蛋白酶原检测:治疗前取空腹静脉血5 mL,离心(3 000 r/min, 5 min,离心半径5 cm),取血清,加入RNA酶混匀,裂解(酚-氯仿法),提取总RNA,逆转录为cDNA,行实时定量聚合酶链反应(qRT-PCR),反应条件:95℃ 10 min;95℃ 10 s,60℃ 1 min,40个循环,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算miR-183、miR-27b-3p水平;以酶联免疫吸附法检测胃蛋白酶原I(PGI)、胃蛋白酶原II(PGII)、PGI/PGII比值(PGR),必欧瀚生物技术公司试剂盒。

1.3 观察指标

①两组智能染色胃镜检查结果。②两组智能染色胃镜检查阳性率、外周血miR-183、miR-27b-3p、胃蛋白酶原水平。③研究组智能染色胃镜检查与外周血miR-183、miR-27b-3p、胃蛋白酶原相关性。④研究组外周血miR-183、miR-27b-3p与胃蛋白酶原相关性。⑤智能染色胃镜检查、外周血miR-183、miR-27b-3p对胃癌早期诊断价值。⑥智能染色胃镜检查、外周血miR-183、miR-27b-3p联合对胃癌早期诊断价值。

1.4 统计学方法

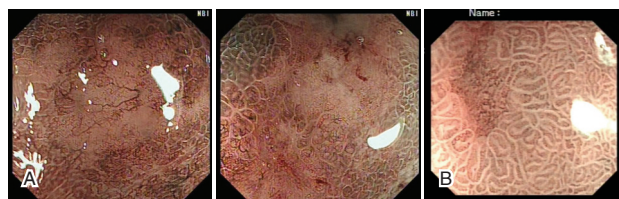
采用统计学软件SPSS 22.0处理数据,计数资料以 $n(\%)$ 描述,行 χ^2 检验;计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 描述,两组间用 t 检验;采用Spearman、Pearson分析相关性;诊断价值采用受试者工作特征(ROC)曲线,获取AUC,联合预测实施Logistic二元回归拟合,返回预测概率logit(p),将其作为独立检验变量。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组智能染色胃镜检查结果

研究组经智能染色胃镜检查显示,胃窦可见多个浅表性溃疡,周围黏膜呈明显充血水肿状态。对

照组以慢性萎缩性胃炎为例,智能染色胃镜检查显示,胃窦前壁隆起,中央凹陷。见图1。



注:A为胃癌智能染色胃镜图;B为慢性萎缩性胃炎智能胃镜图。

图1 智能染色胃镜图(×20)

Figure 1 Intelligent staining gastroscopy (×20)

表1 两组外周血 miR-183、miR-27b-3p、胃蛋白酶原水平比较($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Comparison of the positive rate of peripheral blood miR-183, miR-27b-3p, and pepsinogen levels between 2 groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	智能染色胃镜检查阳性率	miR-183 相对表达量	miR-27b-3p 相对表达量($\times 10^{-2}$)	PG I ($\mu\text{g/L}$)	PG II ($\mu\text{g/L}$)	PGR
研究组	78	50(64.10)	4.72±1.85	1.88±0.62	68.14±22.65	24.51±6.29	2.78±1.01
对照组	39	6(15.38)	0.94±0.46	5.31±2.04	135.28±43.18	23.26±5.37	5.82±1.75
χ^2/t 值		24.729	12.543	13.688	10.052	1.062	11.906
P值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.291	<0.001

miR-27b-3p 相对表达量、血清 PG I、PGR 呈负相关($P<0.05$)。见表2。

表2 研究组智能染色胃镜检查与外周血 miR-183、miR-27b-3p、胃蛋白酶原相关性

Table 2 The correlation between smart staining gastroscopy and peripheral blood miR-183, miR-27b-3p, and pepsinogen in the study group

项目	miR-183	miR-27b-3p	PG I	PGR
智能染色胃镜检查	r 值 0.674	-0.591	-0.726	-0.758
	P 值 <0.001	<0.001	<0.001	<0.001

表3 智能染色胃镜检查、外周血 miR-183、miR-27b-3p 对胃癌的早期诊断价值

Table 3 The value of intelligent staining gastroscopy, peripheral blood miR-183, miR-27b-3p in the diagnosis of early gastric cancer

指标	AUC	95%CI	Z值	截断值	敏感度(%)	特异度(%)	P值
智能染色胃镜检查	0.744	0.655~0.820	6.083	阳性	64.10	84.62	<0.001
miR-183	0.860	0.783~0.917	10.609	>2.79	75.64	94.87	<0.001
miR-27b-3p	0.845	0.766~0.905	7.968	≤3.65	88.46	74.36	<0.001

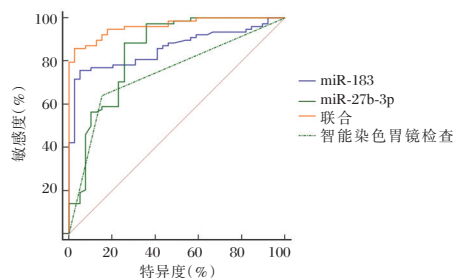


图2 ROC曲线分析结果

Figure 2 ROC curve analysis results

2.2 智能染色胃镜检查阳性率、外周血 miR-183、miR-27b-3p、胃蛋白酶原水平

研究组智能染色胃镜检查阳性率、外周血 miR-183 相对表达量高于对照组,miR-27b-3p 相对表达量、血清 PG I、PGR 低于对照组($P<0.05$),两组血清 PG II 差异无统计学意义($P>0.05$)。见表1。

2.3 研究组智能染色胃镜检查与外周血 miR-183、miR-27b-3p、胃蛋白酶原相关性

Spearman 相关性分析,研究组智能染色胃镜检查与外周血 miR-183 相对表达量呈正相关,与

2.4 智能染色胃镜检查、外周血 miR-183、miR-27b-3p 对胃癌早期诊断价值

ROC 曲线分析,智能染色胃镜检查、外周血 miR-183、miR-27b-3p 早期诊断胃癌的 AUC 分别为 0.744、0.860、0.845,联合诊断的 AUC 为 0.963,95% CI 为 0.911~0.989,诊断敏感度为 85.90%,特异度为 97.44%,显著高于单独诊断($P<0.05$)。见表3、图2。

3 讨论

早期胃癌通常指病灶局限且深度未达到粘膜

下层的胃癌,研究指出,早期胃癌患者5年生存率可达 85%~100%,而晚期胃癌患者5年生存率仅 10%~20%^[7]。因此,早期诊断、及时治疗是提高患者生存率的关键。

目前,胃镜活检仍是胃癌最主要诊断方法。研究发现,早期胃癌病灶区颜色变化与血管密度、解剖结构相关,常表现出正常血管网被新生血管取代,呈现胃小凹细小化、模糊不清、变平甚至消失,解剖结构及血管大小不整、排列紊乱^[8]。智能染色

胃镜可使用同一根胃镜观察,发现疑似病灶后切换至智能染色,可通过“色调变化”的多通道多颜色进行比较,有效显示病灶区界线,对病灶内细微血管及腺管形态进行观察,显著提高胃癌早期诊断率。本研究结果提示智能染色胃镜对胃癌诊断具有重要价值。但胃镜检查对技术要求较高,且侵入性操作给患者带来较大不适感,无法反复诊断,极易导致诊断结果偏差^[9]。

研究显示,miRNA通过发挥癌基因或抑癌基因作用,调节恶性肿瘤发生、发展^[10]。研究证实,胰腺癌、胃癌、乳腺癌等多种恶性肿瘤中均存在miRNA表达失调^[11]。miRNA谱的特异性为恶性肿瘤诊治提供了新思路。miR-183属保守进化的miRNA族,位于第7对染色体,在恶性肿瘤中多发挥原癌基因作用。孙颖等^[12]研究显示,胃癌患者血清miR-183水平上调,且与病理特征及患者预后相关,可能成为胃癌诊断及预后评估的分子标志。miR-27b-3p属miR-23b/27b/24-1簇,位于9号染色体,在口腔癌、前列腺癌、非小细胞肺癌等恶性肿瘤中发挥抑癌基因的作用^[13]。本研究结果发现胃癌患者外周血miR-183相对表达量明显升高,miR-27b-3p相对表达量明显降低,推测胃癌中miR-183可能发挥原癌基因的作用,miR-27b-3p可能发挥抑癌基因的作用,通过控制分化、凋亡基因参与胃癌发生。

大量研究证实,胃蛋白酶原在胃粘膜病变发生、发展中发挥重要作用,是胃部疾病和胃癌筛查的重要指标^[14-15]。胃蛋白酶原是胃蛋白酶的无活性前体,可分为PG I、PG II两种亚群,研究指出,检测PG I、PGR可发挥胃底腺黏膜“血清学活检”的作用,对胃癌早期诊断具有重要价值^[16]。本研究数据显示,智能染色胃镜检查、外周血miR-183、miR-27b-3p均与血清PG I、PGR相关,进一步显示了二者在胃癌早期诊断中的应用价值。此外,智能染色胃镜检查与外周血miR-183相对表达量呈正相关,与miR-27b-3p相对表达量呈负相关。本研究创新性采用智能染色胃镜检查,结果提示临床可同时进行智能染色胃镜检查及外周血miR-183、miR-27b-3p检测,为胃癌诊断提供更全面、可靠的参考信息。

综上可知,外周血miR-183、miR-27b-3p联合智能染色胃镜可提高胃癌早期诊断价值,实现早期诊疗。目前,miR-183、miR-27b-3p调控胃癌的分子机制尚不明确,相关靶基因及信号通路是后续研究重点。

参考文献

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6):394-424.
- [2] 文采,肖明娜,朴善英. PG、MG7-Ag联合G-17检测对胃癌前病变、胃癌的诊断及鉴别诊断[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2020, 12(11):1488-1492.
- [3] 张菁,钟绿,杜岗,等. 基于迁移学习的胃镜图像识别模型的构建及其在胃癌诊断中的应用[J]. *第二军医大学学报*, 2019, 40(5):483-491.
- [4] 苑素云,曹慧颖,郭冬,等. 内镜窄带成像联合醋酸及亚甲蓝染色在早期胃癌及癌前病变中的诊断价值[J]. *临床和实验医学杂志*, 2019, 18(22):2447-2449.
- [5] Bibi F, Naseer MI, Alvi SA, et al. microRNA analysis of gastric cancer patients from Saudi Arabian population [J]. *Bmc Genomics*, 2016, 17(Suppl 9):751.
- [6] 靳枫,余少康,李柱,等. 胃癌患者血清miR-183 E-selectin AMBP的变化及与临床病理的关系[J]. *河北医学*, 2019, 25(12):2094-2098.
- [7] 周宇,陈蓉,夏先根. CEA联合sHLA-G、PG、DKK-1在胃癌早期诊断及淋巴结转移预测中的临床价值[J]. *华南国防医学杂志*, 2020, 34(5):314-317.
- [8] 李建琦,程梦华,龚素琴,等. 醋酸联合靛胭脂染色的2种方式对判别早期胃癌边界的比较[J]. *临床消化病杂志*, 2018, 30(5):271-275.
- [9] 王书海,吴丽颖,贾国法,等. 淮北地区基于高危因素及不同血清学危险分层方法比较的早期胃癌筛查研究[J]. *中华消化内镜杂志*, 2020, 37(12):903-909.
- [10] 贺飞,王豪杰,梁冰,等. 微小RNA-214在食管鳞癌中的表达及其生物学功能研究[J]. *中华生物医学工程杂志*, 2018, 24(6):407-409.
- [11] Liu W, Rui M, Yuan Y. Post-transcriptional Regulation of Genes Related to Biological Behaviors of Gastric Cancer by Long Noncoding RNAs and MicroRNAs [J]. *J Cancer*, 2017, 8(19):4141-4154.
- [12] 孙颖,马瑾,胡梅洁,等. 胃癌患者外周血miR-183水平的临床意义[J]. *上海交通大学学报(医学版)*, 2017, 37(1):75-79.
- [13] 卞晨璐,徐磊霞,周锋. 血浆微RNA-27b-3p、PGR、CA15-3及CEA联合检测在胃癌早期筛查及评估中的应用[J]. *临床输血与检验*, 2020, 22(1):46-50.
- [14] Iguchi M, Kato J, Fukatsu K, et al. Serum pepsinogen levels can quantify the risk of development of metachronous gastric cancer after endoscopic resection [J]. *Int J Cancer*, 2016, 139(5):1150-1156.
- [15] 曾莎莎,肖玲巧,唐瑶,等. 幽门螺杆菌Tipα通过Wnt/β-catenin通路诱导胃癌细胞EMT[J]. *中南医学科学杂志*, 2020, 48(6):618-623.
- [16] Hamashima C, Sasazuki S, Inoue M, et al. Receiver operating characteristic analysis of prediction for gastric cancer development using serum pepsinogen and Helicobacter pylori antibody tests [J]. *Bmc Cancer*, 2017, 17(1):183.

三种抗体联合C肽检测诊断糖尿病分型与评估病情的应用价值

吕磊¹ 何亚琼^{2*} 王玲玲² 陈巧艳¹ 周廷栋³

[摘要] **目的** 探讨血清谷氨酸脱羧酶抗体(GAD-Ab)、胰岛素自身抗体(IAA)、胰岛细胞抗体(ICA)联合C肽(C-P)检测诊断糖尿病分型与评估病情的应用价值及临床意义。**方法** 选取2019年4月至2020年10月宿州市第一人民医院103例糖尿病患者作为研究组,其中30例为1型糖尿病(T1DM)组,73例为2型糖尿病(T2DM)组,另选取32例健康体检者设为对照组。比较3组IAA、ICA、GAD-Ab、C-P表达水平,分析IAA、ICA、GAD-Ab、C-P表达水平与糖尿病发病关系,绘制ROC曲线及曲线下面积(AUC),评价IAA、ICA、GAD-Ab、C-P表达水平对T2DM鉴别诊断价值。**结果** IAA、ICA、GAD-Ab表达水平比较,T1DM组>T2DM组>对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。C-P表达水平比较,T2DM组>T1DM组>对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。Logistic回归分析模型显示,IAA、ICA、GAD-Ab、C-P表达水平为糖尿病发病影响因素($P<0.05$);ROC曲线发现,IAA、ICA、GAD-Ab、C-P联合检测T2DM的AUC为0.918(95%CI:0.848-0.963),优于IAA、ICA、GAD-Ab单一检测AUC($P<0.05$);IAA、ICA、GAD-Ab联合诊断阳性患者空腹血糖(FBG)、2h血糖(2hBG)、糖化血红蛋白(HbA1c)水平高于阴性患者,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** GAD-Ab、IAA、ICA、C-P联合检测有利于正确鉴别T1DM和T2DM,评估糖尿病病情变化,为糖尿病防治提供科学指导。

[关键词] 糖尿病;分型;血清谷氨酸脱羧酶抗体;胰岛素自身抗体;胰岛细胞抗体;C肽

Diagnostic value of three antibodies combined with C peptide in diagnosis and classification of diabetes mellitus

LV Lei¹, HE Yaqiong^{2*}, WANG Lingling², CHEN Qiaoyan¹, ZHOU Tingdong³

(1. Department of Clinical Laboratory, Suzhou First People's Hospital, Suzhou, Anhui, China, 234000;

2. Scientific Research Office, North Anhui Health Vocational College, Suzhou, Anhui, China, 234000;

3. Department of Clinical Laboratory, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei, Anhui, China, 230601)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the clinical value of serum glutamic acid decarboxylase antibody (GAD-Ab), insulin autoantibody (IAA), islet cell antibody (ICA) combined with C peptide (C-P) in the diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Methods** From April 2019 to October 2020, 103 diabetic patients in Suzhou First People's Hospital were selected as the research group. Among them, 30 cases were in the type 1 diabetes (T1DM) group and 73 cases were in the type 2 diabetes (T2DM) group, and 32 healthy persons as control group. The expression levels of IAA, ICA, GAD-Ab and C-P in the 3 groups were compared. The relationship between the expression level of IAA, ICA, GAD-Ab and C-P and the incidence of diabetes mellitus was analyzed. The receiver working characteristic (ROC) curve and the area under the curve

基金项目:安徽省级教学团队计划项目(2020jxtd273)

作者单位:1.安徽省宿州市第一人民医院检验科,安徽,宿州 234000

2.皖北卫生职业学院科研办,安徽,宿州 234000

3.安徽医科大学第二附属医院检验科,安徽,合肥 230601

*通信作者:何亚琼, E-mail:hyq419@163.com

(AUC) were plotted. **Results** Comparison of the expression levels of IAA, ICA, and GAD-Ab, T1DM group>T2DM group>control group, the difference was statistically significant ($P<0.05$). Comparison of C-P expression level, T2DM group>T1DM group>control group, the difference was statistically significant ($P<0.05$); Logistic regression analysis showed that the expression levels of IAA, ICA, GAD-Ab and C-P were the risk factors for diabetes mellitus ($P<0.05$). ROC curve showed that AUC of IAA, ICA, GAD AB, C-P combined detection of T2DM was 0.918 (95% CI: 0.848-0.963), which was better than that of IAA, ICA, GAD AB single detection of AUC; The levels of FBG, 2 hBG and HbA1c in patients with positive IAA, ICA and GAD AB were higher than those in patients with negative IAA, ICA and GAD AB ($P<0.05$). **Conclusion** Combined detection of GAD-Ab, IAA, ICA and C-P is helpful to correctly identify T1DM and T2DM, evaluate the changes of diabetes mellitus, and provide scientific guidance for prevention and treatment of diabetes.

[**KEY WORDS**] Diabetes; Types; GAD-Ab; IAA; ICA; C-P

糖尿病是一组以高血糖为特征的代谢性疾病,预计2030年全国发病人数达5.52亿,严重危及患者生命安全^[1]。根据糖尿病发病机制不同,临床将其分为1型糖尿病(Type 1 diabetes mellitus, T1DM)和2型糖尿病(Type 2 diabetes mellitus, T2DM),尽管目前T1DM发病人数远低于T2DM,但其多见于儿童和青少年,极易引起酮症酸中毒、肾衰竭,甚至死亡,因此早期诊断和分型对糖尿病患者后续治疗和预后尤为重要^[2]。相关研究显示,自身免疫介导胰岛素B细胞破坏在糖尿病发生发展中起着关键作用,明确胰岛自身抗体表达情况有利于糖尿病早期诊断及分型^[3]。谷氨酸脱羧酶抗体(Glutamic acid decarboxylase antibody, GAD-Ab)为T1DM标志性抗体,其与病情程度、治疗药物选择关系已有相关报道^[4]。胰岛素自身抗体(Insulin autoantibody, IAA)、胰岛细胞抗体(Islet cell antibody, ICA)、C肽(C-Peptide, C-P)均属胰岛素B细胞自身抗体,多于糖尿病无症状期和发病后一段时间内检出。目前关于糖尿病诊断和分型最佳临床标志物组合尚不清楚,因此本研究联合检测GAD-Ab、IAA、ICA、C-P表达情况,并分析其与糖尿病分型及病情关系,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取2019年4月至2020年10月宿州市第一人民医院103例糖尿病患者作为研究组,男54例,女49例;年龄(40.03 ± 3.88)岁;病程(7.51 ± 1.05)个月;其中30例为1型糖尿病(T1DM)组,73例为2型糖尿病(T2DM)组;另选取32例健康体检者作为对照组,16例男,16例女;年龄(38.96 ± 4.42)岁。纳入标准:①符合T1DM诊断标准^[5],急性起病,症状明显,GAD-Ab

阳性,首次发病以酮症酸中毒入院;②符合T2DM诊断标准^[6],起病缓慢,症状相对较轻,GAD-Ab阴性,无酮症酸中毒病史;③空腹血糖(Fasting blood glucose, FBG) ≥ 7.0 mmol/L,餐后2 h血糖(2 hBG) ≥ 11.1 mmol/L,随机血糖(BG) ≥ 11.1 mmol/L,对照组血脂及血糖均正常。排除标准:其他自身免疫系统疾病;重要脏器器质性病变;全身急慢性感染;临床资料欠缺,且依从性差。两组性别、年龄等资料比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。研究对象知晓并签署同意书,研究经院伦理委员会审核通过。

1.2 方法

取3 mL清晨空腹外周静脉血及餐后2 h静脉血,以3 000 r/min速度离心10 min,取上清液,低温环境保存。选用深圳新产业MAGLUMI-4000全自动化学发光分析仪测定血清GAD-Ab、IAA、ICA,试剂盒购自深圳新产业生物医学工程有限公司,葡萄糖氧化酶法测定FBG、2 hBG,高效液相色谱法测定糖化血红蛋白(glycated hemoglobin A1c, HbA1c),IMMULITE分析仪测定C-P。检验过程完全参照标准操作规程操作。

1.3 统计学方法

采用SPSS 22.0进行数据处理;计量资料以($\bar{x}\pm s$)表示,行 t 检验,多组间比较用单因素方差分析,两两比较用SNK- q 检验;绘制受试者工作特征(Receiver operating characteristic, ROC)曲线及曲线下面积(Area under the ROC curve, AUC)分析鉴别诊断价值;Logistic回归方程分析影响因素;以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3组IAA、ICA、GAD-Ab、C-P表达水平比较
3组IAA、ICA、GAD-Ab、C肽表达水平比较,

差异有统计学意义($P<0.05$)。IAA、ICA、GAD-Ab表达水平比较, T1DM组>T2DM组>对照组, 差异有统计学意义($P<0.05$)。C-P表达水平比较, T2DM组>T1DM组>对照组, 差异有统计学意义($P<0.05$)。见表1。

表1 3组 IAA、ICA、GAD-Ab、C-P 表达水平比较 ($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Comparison of the expression levels of IAA, ICA, and GAD-Ab in the 2 groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	IAA (IU/mL)	ICA (IU/mL)	GAD-Ab (IU/mL)	C-P ($\mu\text{g/L}$)
T1DM组	30	9.17±3.05	13.45±4.17	28.47±7.06	0.37±0.12
T2DM组	73	5.39±1.35	10.82±3.09	13.59±4.02	0.69±0.23
对照组	32	4.10±1.27	7.25±2.14	7.85±2.19	0.18±0.09
<i>F</i> 值		64.885	29.993	171.971	94.612
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

2.2 IAA、ICA、GAD-Ab、C-P 表达水平与糖尿病关系的 Logistic 回归分析

以本研究纳入糖尿病患者为因变量(否=0, 是=1), 将 IAA、ICA、GAD-Ab、C-P 表达水平作为自变量, 纳入 Logistic 回归分析模型, 采用输入回归纳入参数, 结果显示, IAA、ICA、GAD-Ab、C 肽表达水平为糖尿病发病影响因素, 表达水平越高, 糖尿病发病风险越高($P<0.05$)。见表2。

表2 IAA、ICA、GAD-Ab、C-P 表达水平与糖尿病关系

Table 2 Relationship between the expression levels of IAA, ICA, GAD-Ab and diabetes

因素	β 值	<i>S.E.</i>	<i>Wald</i> χ^2 值	<i>OR</i> 值	95% <i>CI</i>	<i>P</i> 值
IAA	1.760	0.319	30.423	5.810	3.941~8.564	<0.05
ICA	1.803	0.327	30.401	6.068	4.025~9.147	<0.05
GAD-Ab	1.703	0.331	26.475	5.491	3.759~8.021	<0.05
C-P	1.534	0.302	25.787	4.635	3.125~6.874	<0.05

注: IAA、ICA、GAD-Ab、C-P 表达水平, 以平均数为界, <平均数=1, \geq 平均数=2。

2.3 IAA、ICA、GAD-Ab、C-P 表达水平对 T2DM 的鉴别诊断价值

IAA、ICA、GAD-Ab、C-P 联合检测 T2DM 的 AUC 为 0.918(95%*CI*:0.848~0.963), 优于 IAA、ICA、GAD-Ab 单一检测 AUC($P<0.05$)。见表3, 图1。

表3 IAA、ICA、GAD-Ab、C 肽表达水平对 T2DM 的鉴别诊断价值

Table 3 The differential diagnosis value of IAA, ICA, GAD-Ab expression levels in T2DM

指标	AUC	95% <i>CI</i>	<i>Z</i> 统计值	截断值	敏感度	特异度	<i>P</i> 值
IAA	0.736	0.640~0.818	3.809	≤ 7.18 IU/mL	0.95	0.47	<0.001
ICA	0.592	0.490~0.687	1.376	≤ 12.53 IU/mL	0.78	0.47	<0.001
GAD-Ab	0.856	0.773~0.917	8.727	≤ 19.17 IU/mL	0.82	0.80	<0.001
C 肽	0.680	0.580~0.768	3.436	> 0.45 $\mu\text{g/L}$	0.58	0.80	<0.001
联合诊断	0.918	0.848~0.963	13.382		0.90	0.83	<0.001

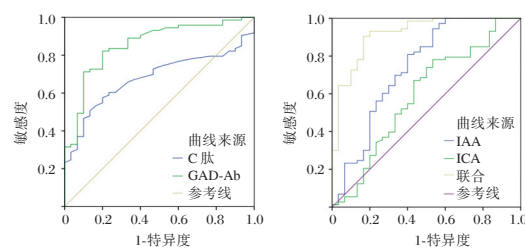


图1 ROC 曲线

Figure 1 ROC curve

2.4 IAA、ICA、GAD-Ab、C-P 联合诊断阳性与阴性患者血糖水平

IAA、ICA、GAD-Ab、C-P 联合诊断阳性患者 FBG、2 hBG、HbA1c 水平高于阴性患者, 差异有统计学意义($P<0.05$)。见表4。

表4 IAA、ICA、GAD-Ab、C-P 联合诊断阳性与阴性患者血糖水平 ($\bar{x}\pm s$)

Table 4 Blood glucose levels of patients with positive and negative combined diagnosis of IAA, ICA, and GAD-Ab ($\bar{x}\pm s$)

联合诊断	<i>n</i>	FBG (mmol/L)	2 hBG (mmol/L)	HbA1c (%)
阳性	71	7.87±1.24	13.49±2.86	10.12±2.30
阴性	32	7.15±1.09	10.54±3.01	8.06±1.47
<i>t</i> 值		2.827	4.766	4.650
<i>P</i> 值		0.006	0.000	0.000

3 讨论

糖尿病是代谢性疾病, 表现为血糖升高、糖代谢紊乱, 若未积极处理, 可导致机体各种组织尤其是心脏、眼、肾、神经等出现慢性损害及功能性障碍, 危及患者身心健康。糖尿病包含 T1DM 和 T2DM 两种类型, 以往研究指出, 不同类型糖尿病发病机制及治疗方式均不同, 早期准确鉴别糖尿病分型对确定治疗方案, 提升治疗效果具有重要价值^[7]。

谷氨酸脱羧酶 (Glutamic acid decarboxylase, GAD) 是非神经组织合成酶, 现有资料证实, 其水平在 T1DM 发病前数年甚至 10 余年即可升高, 具有敏感性高、特异性强等特点, 被认为是 T1DM 患者胰岛 B 细胞免疫破坏特异标记^[8]。GAD-Ab 是

GAD最早出现抗体,有学者发现,单一GAD-Ab阳性对胰岛素B细胞功能具有预测价值^[9]。进一步研究表明,初诊T1DM患者血清中约70%可检出GAD-Ab,明显高于T2DM患者及正常人,可能与T1DM发病后有持续少量胰岛B细胞再生或与B细胞抗原结构功能相似外源性蛋白有关^[10]。T1DM为遗传易感个体通过自身抗原介导的免疫反应所致胰岛素B细胞破坏自身免疫疾病,GAD是该免疫反应关键始动靶抗原,可抑制其所致特异性自身免疫反应,诱发免疫耐受,为临床准确区分T1DM和T2DM提供依据。Logistic回归分析模型显示,GAD-Ab表达水平为糖尿病发病影响因素,可见GAD-Ab在糖尿病发生发展中起着关键作用。

ICA为胰岛B细胞胞浆抗体,当胰岛细胞抗体和胰岛细胞表面抗原结合时,可引起免疫反应,致使胰岛细胞胞浆成分产生细胞毒效应,导致细胞溶解、死亡,最终诱发糖尿病。大量研究表明,T1DM患者中约70%存在ICA,但存在时间较短,仅出现于T1DM初期^[11-12]。目前认为ICA阳性预示胰岛B细胞自身免疫损害,当其持续阳性或高水平时,对T1DM才具有较高预测价值^[13]。有学者发现,ICA水平随糖尿病病程、发病年龄延长而降低,诊断价值随之降低^[14]。ROC曲线,说明单纯ICA检测在糖尿病分型鉴别诊断中价值有限,尚需限定糖尿病患者病程、发病年龄,寻求最佳临床标志物组合,以最大限度提高糖尿病分型诊断准确性。

IAA为胰岛素自身免疫损伤标志物,测定其在糖尿病患者和健康体检者血清中变化发现,IAA表达水平比较,T1DM组者>T2DM组>对照组,与于建平^[15]研究观点相近,可能机制与其结合胰岛素形成抗原抗体复合物,导致胰岛素失去生物活性有关。进一步研究结果说明测定其水平变化有助于区分糖尿病类型,为临床确定治疗方案提供参考。需注意的是,IAA虽为糖尿病筛查指标之一,但单一鉴别诊断特异性为46.67%,考虑原因与纳入对象年龄过大有关,同时说明单项检测可能会导致漏诊、误诊风险,联合检测更具优势。

C-P是胰岛B细胞分泌产物,其几乎不被肝脏摄取,代谢效率慢,且不受注射胰岛素影响,检测其水平可更为准确反映胰岛B细胞功能。目前,C-P在T1DM和T2DM患者中表达已有相关研究^[16-17],但对比研究较少,本研究结果提示检测C-P水平可为临床鉴别糖尿病分型提供有利信息。

糖尿病处于无症状期或发病后一段时间内可检出多种血清胰岛素抗体(IAA、ICA、GAD-Ab)及C-P,联合检测其水平变化有助于评估糖尿病进程,鉴别糖尿病分型。本研究结果提示IAA、ICA、GAD-Ab联合检测有可能为糖尿病病情评估及治疗提供新思路。但目前任何血清胰岛素抗体组合均未达到100%检出率,新抗体类型有待发现,检测方法有待完善。

综上所述,GAD-Ab、IAA、ICA、C-P联合检测有利于正确鉴别T1DM和T2DM,评估糖尿病病情变化,为糖尿病防治提供科学指导。

参考文献

- [1] 刘玉佳. 基于数据挖掘方法的长春地区40岁以上人群2型糖尿病非侵入性风险评估研究[D]. 长春: 吉林大学, 2018.
- [2] Sajjad MA, Holloway KL, de Abreu LLF, et al. Comparison of incidence, rate and length of all-cause hospital admissions between adults with normoglycaemia, impaired fasting glucose and diabetes: a retrospective cohort study in geelong, australia[J]. *BMJ Open*, 2018, 23(3): e020346.
- [3] 潘锋文. 胰岛自身抗体是1型糖尿病分期的重要依据--访中南大学附属湘雅第二医院院长周智广教授[J]. *中国医药导报*, 2020, 17(1): 1-3.
- [4] 于建平, 党小军, 郭盼, 等. IAA、ICA及GADA联合检测对糖尿病分型的诊断价值[J]. *现代生物医学进展*, 2017, 17(24): 4759-4761.
- [5] 中华医学会糖尿病学分会. 中国1型糖尿病胰岛素治疗指南[J]. *中华糖尿病杂志*, 2016, 8(10): 591-597.
- [6] 中华医学会, 中华医学会杂志社, 中华医学会全科医学分会, 等. 2型糖尿病基层诊疗指南(实践版·2019)[J]. *中华全科医师杂志*, 2019, 18(9): 810-818.
- [7] 蔡松涛, 刘慧英, 王颖, 等. ZMIZ1-AS1编码区拷贝数变异与2型糖尿病易感性关联研究[J]. *中华生物医学工程杂志*, 2020, 26(2): 160-164.
- [8] Lounici Boudiaf A, Bouziane D, Smara M, et al. Could znt8 antibodies replace ica, gad, ia2 and insulin antibodies in the diagnosis of type 1 diabetes[J]. *Curr Res Transl Med*, 2018, 66(1): 1-7.
- [9] Arif S, Gomez-Tourino I, Kamra Y, et al. Gad-alum immunotherapy in type 1 diabetes expands bifunctional th1/th2 autoreactive cd4 t cells[J]. *Diabetologia*, 2020, 63(6): 1186-1198.
- [10] 周厚清, 吴行贵. 糖尿病患者GAD-Ab, IA2-Ab和ICA联合检测的临床意义[J]. *检验医学*, 2015, 30(5): 465-467.
- [11] 刘艺文, 余洁, 马明磊, 等. 1型糖尿病患者血清胰岛自身抗体阳性率及其与临床指标的相关性[J]. *中国医刊*, 2019, 54(4): 371-375.
- [12] Andersson C, Kolmodin M, Ivarsson SA, et al. Islet cell an-

(下转第1464页)

CD64、P2X7 和 cMPO 检测在小儿细菌性肺炎诊断及预后中的研究

徐超* 李超 蒋勇

[摘要] 目的 分析 CD64、P2X7 受体联合 cMPO 检测在小儿细菌性肺炎诊断、病情评估及预后的应用价值。方法 选取 2018 年 11 月至 2019 年 11 月本科室收治的 92 例细菌性肺炎患儿作为研究组,根据小儿危重症病例评分法(PCIS)分为两个亚组:重症肺炎患儿(PCIS 评分 <80 分)设为 A 组($n=40$),将轻症肺炎患儿(PCIS 评分 ≥ 80 分)设为 B 组($n=52$);同时纳入同期本院接受健康体检结果正常者 98 例作为对照组。比较不同人群 CD64、P2X7、cMPO 水平,采用多元 Logistic 回归分析影响细菌性肺炎患儿预后生存的独立危险因素,应用 ROC 曲线分析 CD64、P2X7、cMPO 对细菌性肺炎患儿预后生存的预测价值。结果 研究组患儿 CD64、P2X7、cMPO 水平显著高于对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$);A 组患儿 CD64、P2X7、cMPO 水平显著高于 B 组,差异具有统计学意义($P<0.05$);对 92 例细菌性肺炎患儿进行预后随访显示,8 例患儿死亡,死亡率为 8.69%。通过 Logistic 回归模型分析显示:CRP ≥ 100 mg/L、WBC $\geq 12 \times 10^9$ /L、PCT ≥ 0.5 μ g/mL、CD64、P2X7、cMPO 异常升高与细菌性肺炎患儿预后生存呈正相关($P<0.05$);ROC 曲线分析显示:CD64、P2X7、cMPO 及三者联合下面积为 0.806、0.781、0.800、0.969,以联合检测下面积值最大。结论 CD64、P2X7 联合 cMPO 检测细菌性肺炎患儿诊断价值高,其水平变化与患儿预后密切相关,临床工作者应加强对其指标检测具有重要意义。

[关键词] CD64; P2X7; cMPO; 小儿细菌性肺炎

Study on the detection of CD64, P2X7 and cMPO in the diagnosis and prognosis of bacterial pneumonia in children

XU Chao*, LI Chao, JIANG Yong

(Department of Pediatrics, Shiyan Taihe Hospital, Shiyan, Hubei, China, 442000)

[ABSTRACT] **Objective** To analyze the values of CD64 and P2X7 receptor combined with cMPO in the diagnosis, disease evaluation and prognosis of bacterial pneumonia of children. **Methods** 92 children with bacterial pneumonia admitted to this hospital from November 2018 to November 2019 were selected as the study group. According to the pediatric critical illness score (PCIS), they were divided into two subgroups: children with severe pneumonia (PCIS score <80) were set as group A ($n=40$), and children with mild pneumonia (PCIS score ≥ 80 points) were set as group B ($n=52$). 98 patients with normal results of physical examination in our hospital during the same period were included as the control group. The levels of CD64, P2X7, and cMPO in different people were compared. Multivariate Logistic regression analysis was used to analyze the independent risk factors affecting the prognosis survival of children with bacterial pneumonia, and the ROC curve was used to analyze the predictive values of CD64, P2X7, cMPO for the prognostic survival of children with bacterial pneumonia. **Results** The levels of CD64, P2X7 and cMPO in the study group were significantly higher than those in the control group, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). The levels of CD64, P2X7

基金项目:湖北省自然科学基金(2018CFB513)

作者单位:十堰市太和医院儿科,湖北,十堰 442000

*通信作者:徐超, E-mail: liu965772zhao755@163.com

and cMPO in group A were significantly higher than those in group B, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Prognostic follow-up of 92 children with bacterial pneumonia showed that 8 children died and the mortality rate was 8.69%. Logistic regression model analysis showed that: $CRP \geq 100$ mg/L, $WBC \geq 12 \times 10^9/L$, $PCT \geq 0.5$ $\mu\text{g/mL}$, CD64, P2X7, cMPO abnormal increase was positively correlated with the prognostic survival of children with bacterial pneumonia ($P < 0.05$). The ROC curve analysis showed that CD64, P2X7, cMPO and the combined area of the three were 0.806, 0.781, 0.800, and 0.969, respectively. The combination of the three is the largest. **Conclusion** The detection of CD64, P2X7 and cMPO in children with bacterial pneumonia is of high diagnostic value, and changes in their levels are closely related to the prognosis of children. It is important for clinicians to strengthen the detection of their indicators.

[KEY WORDS] CD64; P2X7; cMPO; Bacterial pneumonia of children

细菌性肺炎是由肺炎球菌引起的急性肺泡炎,以起病急骤、寒战、高热、咳嗽、胸痛等临床表现为主,是儿童时期好发的呼吸系统疾病^[1]。研究表明,细菌性肺炎对儿童健康威胁性极大,不及时治疗,可进展至重症肺炎,威胁患儿生命安危^[2]。因此,如何早期及时确诊细菌性肺炎,明确疾病现状,是治疗小儿细菌性肺炎,改善预后的关键^[3]。多形核细胞胞浆髓过氧化物酶(Cytoplasmic myeloperoxidase, cMPO)是粒细胞内合成中的一种血红色蛋白酶,可灵敏反映中性粒细胞活化状态,可较早反映机体炎症损伤^[4]。研究发现,P2X7受体可通过介导相应的细胞毒性及活化诱导机体内宿主细胞凋亡与机体炎症状态紧密联系^[5]。CD64是免疫球蛋白成员之一,是临床上评价早期感染疾病的重要指标,当细菌感染时,其表达水平显著升高^[6]。本研究分析CD64、P2X7受体联合cMPO检测在小儿细菌性肺炎诊断、病情评估及预后指导中的应用价值,现报告如下。

1 对象与方法

1.1 一般资料

选取2018年11月至2019年11月本科室收治的92例细菌性肺炎患儿作为研究组,其中男57例,女35例,平均年龄(5.79±2.93)岁。根据小儿危重症病例评分法^[7](pediatric critical illness score, PCIS)分为两个亚组:将重症肺炎患儿(PCIS评分<80分)设为A组($n=40$),其中男27例,女13例,平均年龄(5.71±2.12)岁;将轻症肺炎患儿(PCIS评分≥80分)设为B组($n=52$),其中男30例,女22例,平均年龄(5.95±2.06)岁。

纳入标准:①所有患儿临床症状及实验室检查确诊,符合《中华儿科杂志》诊断标准^[7];②临床资料完整;③研究均经医学伦理委员会批准,受试者监护人签署知情同意书。排除标准:①合并先

天性肾脏、心脏等疾病者;②合并全身其他组织脏器感染性疾病者;③临床及随访资料不完整或缺乏准确性者。

同时纳入98例同期本院接受健康体检结果正常者作为对照组,其中男52例,女46例,平均年龄(5.13±2.06)岁。各组间一般资料比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

1.2 检测方法

所有研究对象均在清晨抽取空腹静脉血5 mL,使用乙二胺四乙酸抗凝处理后,使用3 000 r/min离心机离心10 min,取上清液备用。使用流式细胞仪检查cMPO,试剂盒由美国Coulter公司提供;使用化学发光免疫法检测CD64、P2X7受体,试剂盒由美国Beckman Coulter公司提供。所有操作均按试剂或仪器所配套说明书进行,由专业人员操作。根据患儿纳入研究时间起,对患者通过电话、微信等方式进行为期1个月随访,记录患儿生存时间,截止于2020年1月。

1.3 统计学方法

采用SPSS 22.0软件进行统计分析,采用多元Logistic回归分析影响细菌性肺炎患儿预后的危险因素;采用ROC曲线分析CD64、P2X7、cMPO水平对细菌性肺炎患儿预后生存的预测价值;计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,采用 t 检验;计数资料以 $n(\%)$ 表示,采用 χ^2 检验,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CD64、P2X7、cMPO水平比较
研究组患儿CD64、P2X7、cMPO水平显著高于对照组,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见表1。

2.2 A、B组CD64、P2X7、cMPO水平比较

A组患儿CD64、P2X7、cMPO水平显著高于B组,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见表2。

表1 研究组与对照组 CD64、P2X7、cMPO 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of CD64, P2X7 and CMPO levels between study group and control group ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	CD64	P2X7受体	cMPO(%)
研究组	92	42.83±4.53	66.82±7.03	18.65±2.85
对照组	98	19.62±3.09	42.16±5.27	1.76±0.71
t值		41.476	27.466	56.828
P值		<0.001	<0.001	<0.001

表2 研究组与对照组 CD64、P2X7、cMPO 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of CD64, P2X7 and CMPO levels between study group and control group ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	CD64	P2X7受体	cMPO(%)
A组	40	44.12±3.24	68.57±5.28	15.95±5.55
B组	52	35.11±3.19	52.13±7.66	13.14±2.66
t值		13.338	11.610	3.207
P值		<0.001	<0.001	0.001

2.3 92例细菌性肺炎患儿预后情况

本研究对92例细菌性肺炎患儿进行预后随访显示,8例患儿死亡,死亡率为8.69%。

2.4 影响细菌性肺炎患儿预后生存的单因素和多因素分析

CRP≥100 mg/L、WBC≥12×10⁹/L、PCT≥0.5 μg/mL、CD64、P2X7、cMPO异常升高与细菌性肺炎患儿预后生存呈正相关(P<0.05)。见表3。

2.5 CD64、P2X7、cMPO水平对细菌性肺炎患儿预后生存的预测价值

ROC曲线分析显示:CD64、P2X7、cMPO及三者联合下面积为0.806、0.781、0.800、0.969,以联合检测下面积值最大。见表4、图1。

3 讨论

细菌性肺炎是儿童常见的感染性疾病,也是导致儿童死亡的重要原因之一^[8]。细菌性肺炎早期临床症状隐匿,易贻误病情并影响患儿最终的治疗结局。寻找早期诊断细菌性肺炎的敏感指标是疾病治疗的关键^[9]。

表4 CD64、P2X7、cMPO水平对细菌性肺炎患儿预后生存的预测价值

Table 4 predictive value of CD64, P2X7 and CMPO levels on prognosis and survival of children with bacterial pneumonia

预测指标	敏感度	特异性	AUC	95%CI
CD64	0.621	0.624	0.806	0.654~0.958
P2X7	0.713	0.721	0.781	0.623~0.939
cMPO	0.746	0.752	0.800	0.645~0.955
CD64、P2X7及cMPO联合检测	0.894	0.898	0.969	0.000~1.000

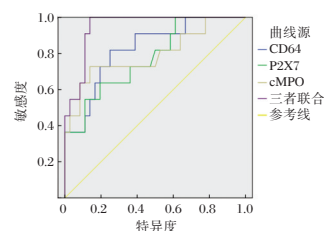


图1 ROC曲线

Figure 1 ROC curve

P2X7受体位于染色体12q24,由595个氨基酸组成,临床认为是ATP的结合位点。P2X7受体可诱导细胞产生炎症因子,激活T细胞,诱导淋巴细胞形成膜泡等多种生物功能^[10]。P2X7受体通过促使单核细胞使血管内皮生长因子释放,并依赖Ca²⁺内流及活性氧参与机体炎症反应^[11]。目前已有研究证实P2X7受体在多种真菌感染、慢性阻塞性肺病、炎症性神经痛、高血压中扮演重要角色^[12]。CD64是临床新发现的炎症指标,系免疫球蛋白超家族的成员,主要分布在巨噬细胞、单核细胞及树突状细胞表面,与体液免疫和细胞免疫密切相关^[13]。CD64在正常状态下呈低表达状态,但当细菌感染后,其水平浓度显著上升,且随着感染严重程度增加而升高^[14]。相关新生儿败血症患儿研究发现,24h后CD64指数的敏感性及其特异性明显高于败血症初期,且当患儿治疗好转后,CD64指数可明显下降,考虑CD64指数对病情判断、评估预后价值高^[15]。此外,研究发现cMPO

表3 影响细菌性肺炎患儿预后生存的单因素和多因素分析

Table 3 univariate and multivariate analysis of prognosis and survival in children with bacterial pneumonia

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 vs 女)	1.162	0.603~2.242	0.673			
年龄(<5岁 vs ≥5岁)	2.330	1.679~3.232	0.006	1.849	0.893~3.827	0.418
CRP(<100 mg/L vs ≥100 mg/L)	2.325	1.816~2.977	0.004	2.496	1.277~4.880	0.007
WBC(<12×10 ⁹ /L vs ≥12×10 ⁹ /L)	2.653	1.950~3.610	0.005	2.575	2.067~3.207	0.006
PCT(<0.5ug/ml vs ≥0.5 μg/mL)	2.643	2.105~3.137	0.007	2.489	1.678~3.691	0.005
CD64(正常 vs 异常升高)	2.537	2.029~3.172	0.002	2.565	1.859~3.537	<0.001
P2X7(正常 vs 异常升高)	2.330	1.867~2.90	0.003	2.491	1.631~3.805	<0.001
cMPO(正常 vs 异常升高)	2.372	1.702~3.272	0.003	2.496	1.670~3.731	<0.001

是过氧化物酶家族中的重要成员,其水平及活性变化代表着嗜中性多形核白细胞功能及活性状态,已被临床公认为评价炎症严重程度的一个指标^[16]。本研究结果说明 CD64、P2X7 受体及 cMPO 水平参与细菌性肺炎疾病进展。这与 Brooks 等学者^[17]对细菌性肺炎患者 CD64、P2X7 受体研究一致。提示临床需加强对细菌性肺炎患儿 CD64、P2X7 受体、cMPO 的监测,以提高临床生存率。

此外采用 ROC 曲线研究发现,CD64、P2X7 受体、cMPO 联合检测下面积最大,特异、敏感度高。进一步提示联合检测对细菌性肺炎具有重要意义,临床可通过联合检测多项指标提高对细菌性肺炎患儿的评估价值。

综上所述,CD64、P2X7 联合 cMPO 检测细菌性肺炎患儿诊断价值高,其水平变化与患儿预后密切相关,临床工作者应加强对其指标检测具有重要意义。

参考文献

[1] 王国全,王春家. 头孢替唑-头孢克肟序贯治疗小儿细菌性支气管肺炎临床疗效分析[J]. 中国药物与临床, 2020, 20(6):932-933.

[2] 陈锋,陈列强. 血清各项指标在小儿细菌性肺炎中的诊断价值[J]. 中国卫生标准管理, 2020, 11(14): 32-34.

[3] Louw AVD, Mirouse A, Peyrony O, et al. Bacterial Pneumonias in Immunocompromised Patients [J]. Semin Respir Med, 2019, 40(4):498-507.

[4] Takeuchi N, Naito S, Ohkusu M, et al. Epidemiology of hospitalised paediatric community-acquired pneumonia and bacterial pneumonia following the introduction of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine in the national immunisation programme in Japan[J]. Epidemiol Infect, 2020, 3(1):148.

[5] Lopez R, Rello J, Taccone FS, et al. Aminoglycosides in Immunocompromised Critically Ill Patients With Bacterial Pneumonia and Septic Shock: A Post-Hoc Analysis of a Prospective Multicenter Multinational Cohort[J]. Shock, 2020, 2(1):54.

[6] 刘瑞莹,李群,杨帅,等. ALB、CD64 及 BCL-2 在重症肺炎中的表达及与病情严重程度、预后的关系研究[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(12):1708-1712.

[7] 杨永弘. 小儿细菌性肺炎及其病原学诊断[J]. 中华儿科杂志, 1992, 30(4):241-242.

[8] 阿曼古丽·阿吉,李黎,木克热木·亚森,等. 重症细菌性肺炎血清甲状腺激素、炎症因子水平变化及其相关性分析[J]. 解放军医药杂志, 2017, 29(11):38-41.

[9] Nesterenko OM. Peculiarities of antimicrobial therapy of viral-bacterial pneumonia in patients with coronavirus disease [J]. 2020, 17(3):733-735.

[10] Poignant S, Boutrot M, Ehrmann S, et al. Bacterial Pneumonia in Brain-Dead Patients: Clinical Features and Impact on Lung Suitability for Donation [J]. Crit Care Med, 2020, 23(11):403-406.

[11] Sharma R, Sandrock CE, Meehan J, et al. Community-Acquired Bacterial Pneumonia- Changing Epidemiology, Resistance Patterns, and Newer Antibiotics: Spotlight on Delafloxacin[J]. Clin Drug Investig, 2020, 40(10):268-269.

[12] Wu CP, Adhi F, Highland K. Recognition and management of respiratory coinfection and secondary bacterial pneumonia in patients with COVID-19[J]. Clevel Clin J Med, 2020, 87(5):115-117.

[13] 王德莉. 儿科重症监护病房多重耐药菌感染的临床分析[J]. 保健医学研究与实践, 2017, 14(3):89-90.

[14] Lamb YN, Lyseng-Williamson KA. Omadacycline in community-acquired bacterial pneumonia and acute bacterial skin and skin structure infections: a profile of its use [J]. Drugs Ther Perspect, 2019, 35(7):305-314.

[15] Turker H, Hazar A, Ocakli B. Inflammatory markers in hospitalized patients with bacterial pneumonia: comparison of Gram-positive versus Gram-negative etiology and admission versus discharge findings [J]. Arch Med Science, 2020, 26(8):367-379.

[16] Ma X, Li Y, Liang Y, et al. Development of a DNA microarray assay for rapid detection of fifteen bacterial pathogens in pneumonia[J]. BMC Microbiol, 2020, 20(1):104-106.

[17] Brooks WA. Bacterial Pneumonia [M]// Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases, 2020, 16(3):742-746.

(上接第 1460 页)

tibodies (ICA) identify autoimmunity in children with new onset diabetes mellitus negative for other islet cell antibodies [J]. Pediatr Diabetes, 2014, 15(5):336-344.

[13] 赵彩虹. 检测 GAD-Ab、ICA 及 IAA 对糖尿病诊断的临床意义[J]. 检验医学与临床, 2018, 15(17):2641-2643.

[14] 解丽然,张慧慧. 1 型糖尿病胰岛自身抗体与自身免疫性甲状腺疾病的关系[J]. 中国实验诊断学, 2020, 24(5):823-825.

[15] 黄勇翔,吉丽盈,孟繁君,等. 联合检测血清 GAD-Ab、ICA 和 IAA 在糖尿病分型诊断中的应用价值[J]. 宁夏医科大学学报, 2019, 41(10):1028-1031.

[16] 赵俐俐,叶山东,陈超,等. 1 型糖尿病患者血脂与糖尿病肾脏疾病的关系[J]. 中国临床保健杂志, 2019, 22(2):264-266.

[17] 曹邓晗. 阿卡波糖治疗 2 型糖尿病及对血清炎症因子、抑胃肽、胰升血糖素样肽-1、空腹 C 肽的影响[J]. 安徽医药, 2019, 22(2):264-266.

超体重孕妇胎儿心脏检查方法对心脏结构、心肌、应变指标及 Tei 指数研究

王建春¹ 张东芳¹ 卢钺² 庄洁¹ 赵瑞凤³ 郭丽娜⁴ 杨粟芬^{1*}

[摘要] **目的** 探究超体重孕妇及体重正常孕妇采取侧卧位超声检查对胎儿心脏结构、心肌、应变指标及 Tei 指数的差别。**方法** 选取承德市妇幼保健院 2017 年 3 月至 2020 年 8 月做胎儿心脏超声检查的 92 例超体重孕妇的临床资料,另选取同期体重正常的 40 例孕妇为正常对照组,两组孕妇均采用侧卧位超声检查,在常规心脏超声结构观察的基础上增加对胎儿心脏功能的观察,对比两组患者胎儿心脏结构相关指标及心肌收缩功能、应变指标与 Tei 指数。**结果** 超重组右心房横径、左心室横径、右心室横径低于正常对照组,全心球形指数高于正常对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);超重组二尖瓣环 e/a 与三尖瓣 E/A 指标均高于正常对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);超重组胎儿左右心室 GLS、右心室 FWSI 均显著低于正常对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);超重组胎儿左右心室 Tei 指数均显著高于正常对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 超重组孕妇采取侧卧位超声检查能够有效评估胎儿心室功能受损状况,为早期诊断提供科学的临床依据。

[关键词] 超体重孕妇;胎儿心脏;侧卧位超声检查

Study on Heart Structure, Myocardium, Strain Index and Tei Index by Examination Method of Fetal Heart of Overweight Pregnant

WANG Jianchun¹, ZHANG Dongfang¹, LU Yue¹, ZHUANG Jie¹, ZHAO Ruifeng², GUO Lina¹, YANG Sufen^{1*}
(1. Department of Ultrasound, Chengde Maternal and Child Health Hospital, Chengde, Hebei, China, 067000; 2. Lu Yue, Department of ultrasound, Chengde Central Hospital, Chengde, Hebei, China, 067000; 3. Zhao Ruifeng, Department of ultrasound, Weichang maternal and child health hospital, Chengde, Hebei, China, 068450; 4. Guo Lina, Department of ultrasound, Weichang County Hospital, Chengde, Hebei, China, 068450)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the differences in the fetal heart structure, myocardium, strain index and Tei index between overweight pregnant women and normal-weight pregnant women with lateral ultrasound examination. **Methods** The clinical data of 92 overweight pregnant women who underwent fetal cardiac ultrasound examination in Chengde Maternal and Child Health Hospital from March 2017 to August 2020 were retrospectively analyzed. In addition, 40 pregnant women with normal weight during the same period were selected as the normal control group Both groups of pregnant women underwent lateral ultrasound examinations. On the basis of conventional echocardiographic observations, the observation of fetal heart function was added. The related indexes of fetal heart structure, myocardial contractile function, strain index and Tei index were compared between the two groups. **Result** The transverse diameter of the right atrium, the transverse diameter of the left ventricle, and the transverse diameter of the right ventricle in overweight pregnant

基金项目:承德市科技支撑计划项目(202006A009)

作者单位:1. 承德市妇幼保健院超声科,河北,承德 067000

2. 承德市中心医院超声科,河北,承德 067000

3. 承德市围场县妇幼保健院超声科,河北,承德 068450

4. 承德市围场县医院超声科,河北,承德 068450

*通信作者:杨粟芬, E-mail:15097829805@126.com

women were lower than those in the normal control group, and the global spherical index was higher than that in the normal control group ($P<0.05$). The super-recombination mitral valve annulus E/A and tricuspid valve E/A indexes in the overweight group were higher than those in the normal control group ($P<0.05$). The left and right ventricle GLS and FWSt of the right ventricle in the overweight group were significantly lower than those in the normal control group ($P<0.05$). The Tei index of the left and right ventricle in the overweight group was significantly higher than in the normal control group ($P<0.05$). **Conclusion** Ultrasound examination in lateral position for overweight pregnant women can effectively assess the fetal ventricular function impairment and provide scientific clinical basis for early diagnosis.

[KEY WORDS] Overweight pregnant women; Fetal heart; Ultrasound examination in lateral decubitus position

近年来,孕妇母体超重给超声检查带来极大困难,对于胎儿心脏相关检查更是一个挑战^[1-2],孕妇超重在影响自身身体健康的同时,对于胎儿遗传其肥胖、心血管和代谢性疾病的发生率也逐渐上升^[3]。北方人体重偏重甚至严重超重的孕妇腹壁脂肪层厚,图像远场衰减严重,导致胎儿心脏图像模糊,给胎儿心脏畸形的诊断带来巨大困难^[4]。随着产前超声医学的发展,许多胎儿心脏畸形能在孕期筛查出来,但超重孕妇胎儿存在肺静脉异位引流、室间隔缺损、房室间隔缺损、不典型法洛四联症、完全型大动脉转位、瓣膜狭窄、横纹肌瘤等胎儿心脏畸形极易发生漏诊、误诊^[5]。有研究显示超重孕妇变换体位对胎儿做超声检查,能够改善诊断结局^[6],但相关文献较少,故本文采取对超体重孕妇侧卧位行胎儿心脏超声检查分析胎儿各项心脏指标及心肌功能与损伤程度,旨在为提高该类孕妇胎儿诊断的科学性做出分析,现将研究结果报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

将承德市妇幼保健院 2017 年 3 月至 2020 年 8 月做胎儿心脏超声检查的 92 例超体重孕妇(孕前 $24 \text{ kg/m}^2 \leq \text{BMI} < 28 \text{ kg/m}^2$)作为研究对象,另取同期本院孕前体质量指数(BMI)正常的 40 例孕妇($18.5 \text{ kg/m}^2 \leq \text{BMI} < 24 \text{ kg/m}^2$)作为正常对照组。超

重组 92 例孕妇,平均年龄(29.45 ± 4.08)岁,正常对照组 40 例孕妇,平均年龄(28.37 ± 3.96)岁,所有孕妇在孕期 24 周时行侧卧位超声检查。

纳入标准:①临床资料均完整;②无意识及沟通障碍;③胎儿均无结构性心脏病;④孕妇无妊娠期高血压综合征、妊娠期糖尿病、慢性肾脏疾病、肝病、风湿性疾病、甲状腺疾病、自身免疫性疾病等;⑤无酗酒及吸烟史;⑥均为单胎妊娠;⑦孕妇及家属均知情且签署同意书;⑧研究经本院医学伦理委员会批准通过。排除标准:①退出研究者;②沟通障碍;③多胎妊娠。两组孕妇一般资料比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 1。

1.2 方法与观察指标

采用 GE Voluson E10 彩色多普勒超声诊断仪和 PHILIP7C 彩色多普勒超声诊断仪,C1-6 探头,频率 2~5 MHz,配套 Fetal HQ 分析软件(见图 1)。嘱咐孕妇采用侧卧位对胎儿做超声检查,留存二、三尖瓣血流频谱,二、三尖瓣组织多普勒频谱,二尖瓣环收缩期位移(mitral annular plane systolic excursion, MAPSE)、三尖瓣环收缩期位移(tricuspid annular plane systolic excursion, TAPSE),至少包含 5 个连续心动周期,包含整个胸腔、四腔心的胸部横切面图像。于放大四腔心切面测量左心房横径、左心室舒张末期横径、右心房横径及右心室舒张末期横径;于心尖四腔切面,二、三尖瓣瓣口处测量舒张早期血流速度 E 和舒张晚期血流速度 A,

表 1 两组一般资料比较结果($\bar{x} \pm s$)

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

组别	n	年龄(岁)	身高(cm)	空腹血糖(mmol/L)	孕周(周)	新生儿体重(g)	收缩压(mmHg)	舒张压(mmHg)
超重组	92	29.45 ± 4.08	163.55 ± 5.23	4.62 ± 0.31	24.11 ± 5.08	3218 ± 310.45	113.45 ± 14.37	75.61 ± 11.89
正常对照组	40	28.37 ± 3.96	164.20 ± 5.11	4.65 ± 0.38	24.07 ± 5.01	3207 ± 308.52	114.09 ± 14.24	76.03 ± 12.04
t 值		1.410	0.661	0.476	0.042	0.187	0.236	0.186
P 值		0.161	0.510	0.635	0.967	0.852	0.814	0.853

计算 E/A,并在侧壁瓣环处测量舒张早期瓣环运动速度 e、舒张晚期瓣环运动速度 a 及收缩期瓣环运动速度 s,计算 e/a。于包含整个胸腔、四腔心的胸部横切面图像测量心脏面积及胸廓面积,计算心胸面积比。采用软件自动追踪舒张期和收缩期的心内膜边界,自动计算出左心室射血分数(ejection fraction, EF),左、右心室面积变化率(fraction area change, FAC),全心整体球形指数(global spherical index, GSI),胎儿四腔心长径、横径,胎儿左、右心室心内膜整体纵向应变(global longitudinal strain, GLS)及胎儿右心室游离壁应变(free wall strain, FWSt),左右心室 Tei 指数。

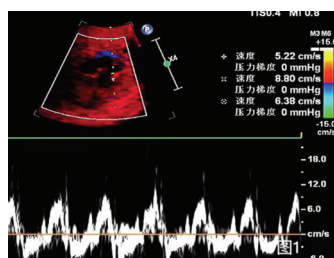


图1 组织多普勒超声

Figure 1 Tissue Doppler ultrasonography

1.3 统计学处理

采用 SPSS 22.0 统计软件进行数据分析,计量

资料用($\bar{x} \pm s$)表示,行 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组孕妇胎儿心脏结构参数比较

超重组胎儿左心房横径、右心房横径、左心室横径、右心室横径、心脏面积、四腔心横径、四腔心长径低于正常对照组,心胸面积比与全心球形指数高于正常对照组;右心房横径、左心室横径、右心室横径及全心球形指数的组间比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

2.2 两组孕妇胎儿心脏指标比较

超重组胎儿二尖瓣 E/A、二尖瓣环 e/a、三尖瓣 E/A 及三尖瓣环 s 高于正常对照组,二尖瓣环 s 与三尖瓣环 e/a 低于正常对照组;二尖瓣环 e/a 与三尖瓣 E/A 组间比较,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见表 3。

2.3 两组孕妇胎儿心肌收缩功能及应变指标比较

超重组胎儿左心室 GLS、右心室 GLS、右心室 FWSt 均显著低于正常对照组,组间差异均有统计学意义($P < 0.05$);左心室 EF、左心室 FAC、右心室 FAC 的组间差异无统计学意义($P > 0.05$),超重组胎儿 MAPSE 及 TAPSE 均高于正常对照组,组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 4。

表 2 两组胎儿心脏结构参数比较结果($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of fetal heart structure parameters between 2 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	左心房横径 (cm)	右心房横径 (cm)	左心室横径 (cm)	右心室横径 (cm)	心脏面积 (cm ²)	心胸面积比	四腔心横径 (cm)	四腔心长径 (cm)	全心球形指数
超重组	92	0.84±0.16	0.96±0.10	0.81±0.07	0.89±0.13	6.18±0.84	0.29±0.05	2.54±0.20	2.93±0.25	1.28±0.08
正常对照组	40	0.88±0.15	1.01±0.13	0.88±0.13	0.94±0.10	6.39±0.98	0.28±0.02	2.55±0.29	2.98±0.28	1.23±0.14
<i>t</i> 值		1.345	2.403	4.009	2.168	1.254	1.221	0.229	1.018	2.594
<i>P</i> 值		0.181	0.018	0.000	0.032	0.212	0.224	0.819	0.311	0.011

表 3 两组胎儿心脏指标比较结果($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of fetal heart indexes between the two groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	二尖瓣 E/A	二尖瓣环 e/a	二尖瓣环 s (cm/s)	三尖瓣 E/A	三尖瓣环 e/a	三尖瓣环 s (cm/s)
超重组	92	0.66±0.06	0.69±0.04	7.71±0.49	0.69±0.04	0.64±0.03	8.60±1.69
正常对照组	40	0.64±0.08	0.65±0.07	7.75±1.61	0.66±0.07	0.65±0.06	8.58±1.57
<i>t</i> 值		1.585	4.150	0.217	3.112	1.277	0.064
<i>P</i> 值		0.115	0.000	0.828	0.002	0.204	0.949

表 4 两组胎儿心肌收缩功能及应变指标比较结果($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Comparison of fetal myocardial contractile function and strain indexes between the two groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	左心室 GLS (%)	右心室 GLS (%)	右心室 FWSt (%)	左心室 EF (%)	左心室 FAC (%)	右心室 FAC (%)	MAPSE(mm)	TAPSE (mm)
超重组	92	20.87±3.15	20.64±2.14	14.70±3.13	59.48±4.41	44.29±5.30	36.77±5.46	4.18±0.55	5.20±0.57
正常对照组	40	22.70±2.12	22.20±1.98	16.99±2.79	59.01±5.38	42.51±4.61	34.69±6.01	4.05±0.52	5.19±0.59
<i>t</i> 值		3.355	3.935	3.988	0.526	1.842	1.95	1.268	0.092
<i>P</i> 值		0.001	0.000	0.000	0.600	0.068	0.053	0.207	0.927

2.4 两组孕妇胎儿Tei指数比较

超重组胎儿左心室 Tei 指数 (0.48 ± 0.08 vs 0.36 ± 0.05)、右心室 Tei 指数 (0.49 ± 0.12 vs 0.35 ± 0.03)均显著高于正常对照组,差异有统计学意义 ($t_1=8.761, t_2=7.266, P<0.05$)。

3 讨论

胎儿畸形发生率逐渐上升,尤其是心脏畸形,给家庭及社会带来沉重负担^[7]。随着产前超声医学的发展,许多胎儿心脏畸形能在孕期筛查出来,以往,仅筛查四腔心切面,理论上能筛查出约50%以上的严重心脏畸形。目前增加流出道切面及三血管气管切面后理论上可以筛查出约90%的心脏畸形^[8-9]。超重孕妇因自身母体肥胖对胎儿心脏畸形的诊断具有一定影响,且孕妇体重异常会导致胎儿心脏收缩及舒张功能下降、心室功能受损等^[10-11],因此,为降低超重孕妇胎儿出生缺陷的发生,寻求适合的超声方式诊断尤为重要。

赵联璧等^[12]在研究中指出,超重组左、右心室 GLS,及右心室 FWS_t 显著低于正常对照组,表明超重组孕妇胎儿左、右心室均出现纵向心肌纤维运动受累及心肌纵向应变能力降低等情况,超重孕妇妊娠对胎儿心肌功能产生了一定影响,提示妊娠期孕妇的体重管理格外重要;颜雪萍等^[13]在研究中表明,观察组胎儿左右室 Tei 指数均高于对照组,提示母体血糖高低会对胎儿心室功能造成一定影响,表明母体指标水平出现异常对胎儿影响较大,显示 Tei 指数相对于其他检测方式能够更好的进行整体心功能的评价。本研究结果表明两组孕妇胎儿左右心室 GLS 及右心室 FWS_t 指标均差异显著,这可能是因为超重孕妇母体重量异常会影响胎儿心脏收缩及舒张,母体超重后孕妇体内卵母细胞物质代谢、线粒体和染色体层面发生异常,导致胎儿心肌代谢物等方面随之改变。以往对超重孕妇采取一般平卧位超声检测,其腹壁脂肪层厚及体重问题会导致胎儿心脏图像模糊,极易发生错诊或误诊,本研究采取侧卧位超声检测,能够一定程度上降低子宫压迫感,提高子宫胎盘血流灌注量,避免平卧位时压迫下腔静脉导致的回心血量及心输出量减少的情况,克服“仰卧位低血压综合症”;另外,怀孕期间如果平卧,长大的子宫压迫下腔静脉会导致回心血量减

少,导致缺氧及体位性低血压,而侧卧位能够利于超重孕妇胎儿生长发育和防治母体妊娠期并发症,使孕妇不易发生下肢水肿、下肢静脉曲张和胎儿发育不良等病症,降低围产期孕妇和胎儿发病率及死亡率。

综上所述,超重孕妇采取侧卧位超声检查诊断效果好,能够有效观察胎儿心脏各项指标与心肌功能指数,但需注意超重孕妇妊娠会影响胎儿心肌功能改变,临床需根据该类孕妇实际情况对其进行适当的体重管理,为胎儿预后保驾护航。

参考文献

- [1] 王海琪,毛红芳,宋魏,等.超重孕妇孕期体质量管理及体质量增长适宜值的研究[J].中国妇幼保健,2020,35(1):40-42.
- [2] 迟言邦,王璘,孙静莉.育龄期女性孕前体重及孕期体重增加与新生儿出生体重关系的回顾性队列研究[J].中国计划生育和妇产科,2020,12(8):24-28+38.
- [3] 汪晓语,冯萍,李丹婷,等.妇女孕前体质量指数、孕期增重对子痫前期-子痫影响研究[J].现代预防医学,2020,47(5):844-847,912.
- [4] 魏岩,王传杰.妊娠期间体重增长规律对妊娠结局影响的相关研究[J].中国性科学,2020,29(5):78-80.
- [5] 王园园,王锐,董凤群,等.产前超声诊断胎儿心血管畸形的价值分析[J].中国临床医学影像杂志,2019,30(1):30-33.
- [6] 徐珂嘉,张俊杰,王艳,等.不同体位对肥胖产妇椎间隙定位的影响[J].现代生物医学进展,2020,20(14):74-77.
- [7] 王珊珊,徐金辉,刘峥,等.2014-2017年北京市通州区妇女孕前超重或肥胖对出生缺陷的影响[J].中国生育健康杂志,2020,31(2):55-58.
- [8] 育双,刘思平,宋兰林,等.染色体22q11.2微缺失检测在先心病产前诊断中的应用[J].分子诊断与治疗杂志,2021,13(3):418-421.
- [9] 朱小兰.超声四腔心平面头侧偏斜法在孕期胎儿心脏畸形筛查中的应用[J].宁夏医科大学学报,2018,40(3):367-369.
- [10] 王蕾琴,冷俊宏,李卫芹,等.孕早期超重肥胖和孕期血糖水平升高对巨大儿和大于胎龄儿发生风险的交互作用[J].中国公共卫生,2019,35(9):1131-1137.
- [11] 洪美铨,罗红艳,汪淑燕.孕期营养对妊娠结局的影响及降低妊娠多种疾病的效果研究[J].中国妇幼保健,2020,35(4):648-650.
- [12] 赵联璧,赵美玲,侯娜,等.二维斑点追踪技术评估超重及肥胖女性妊娠期胎儿心室收缩功能的研究[J].中华医学超声杂志(电子版),2020,17(12):1197-1202.
- [13] 颜雪萍,李雪娇,陈昌钊,等.超声心动图Tei指数在妊娠期糖尿病孕妇胎儿心脏功能评价中的应用[J].中国超声医学杂志,2020,36(2):153-156.

· 论 著 ·

甘草甜素通过调控 COX-2/NF- κ B 通路治疗牙周炎的研究

张娜 侯鑫 张文 时伯红*

[摘要] **目的** 通过检测甘草甜素对LPS刺激的人牙龈成纤维细胞(HGFs)的COX-2/NF- κ B途径的调控作用,探讨其对牙周治疗的作用。**方法** 取2017年1月至2月山东大学附属口腔医院6名需拔除埋伏阻生齿的健康志愿者术中切除的少量牙龈组织。实验分为对照组,炎症组和低、中、高3个干预组。通过脂多糖(LPS)刺激建立牙龈细胞的细胞炎症模型,同时加入甘草甜素进行干预,通过ELISA测量IL-6的水平。通过蛋白质印迹分析检测COX-2和NF- κ B的表达。**结果** 剂量为30,60,120 μ g/mL的甘草甜素对HGFs的细胞活力无明显影响,剂量为240 μ g/mL的甘草甜素明显抑制了HGFs的细胞活力。与对照组相比,LPS组IL-6和IL-8的浓度显著增高,差异有统计学意义($P<0.05$)。与LPS组相比,干预组的IL-6和IL-8表达水平随着甘草甜素的浓度的增加显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。与对照组相比,LPS组的COX-2蛋白表达明显上调,差异有统计学意义($P<0.05$);与LPS组相比,干预组的COX-2蛋白表达水平明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 甘草甜素可能通过抑制COX-2/NF- κ B通路发挥抗炎作用,为以后牙周炎治疗提供实验依据。

[关键词] 甘草甜素;牙周炎;白细胞介素-6;COX-2;NF- κ B

Glycyrrhizin plays a role in the treatment of periodontitis by regulating the COX-2/NF- κ B signaling pathway

ZHANG Na, HOU Xin, ZHANG Wen, SHI Bohong*

(Department of Stomatology, Rizhao People's Hospital, Rizhao, Shandong, China, 276826)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the effect of glycyrrhizin on periodontal treatment by detecting the regulation of glycyrrhizin on COX-2/NF- κ B signaling pathway in LPS-stimulated human gingival fibroblasts (HGFs). **Methods** A small amount of gingival tissue removed during the surgery from 6 healthy volunteers in Shandong University Affiliated Stomatological Hospital who needed to remove the impacted teeth from January to February, 2017. The experiment was divided into the control group, the inflammation group and the intervention group. The cell inflammation model of gingival cells was established by lipopolysaccharide (LPS) stimulation, while glycyrrhizin was added for intervention, and the level of IL-6 was measured by ELISA. The expression of COX-2 and NF- κ B was detected by Western blot analysis. **Results** Glycyrrhizin at doses of 30, 60, 120 μ g/mL had no significant effect on the cell viability of HGFs, and glycyrrhizin at a dose of 240 μ g/mL significantly inhibited the cell viability of HGFs. Compared with the control group, the concentration of IL-6 and IL-8 in the LPS group increased significantly, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). Compared with the LPS group, the expression levels of IL-6 and IL-8 in the intervention group decreased significantly with the increase of the concentration of glycyrrhizin, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). Compared with the control group, the COX-2 protein expression in the LPS group was significantly up-regulated, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). Compared with the LPS group, the COX-2 protein expression level in the intervention group was significantly reduced, and the difference was statistically significant Significance ($P<0.05$). **Conclusion** Glycyrrhizin exerts an anti-inflammatory

基金项目:山东省中医药科技发展计划项目(2019-0819)

作者单位:日照市人民医院口腔科,山东,日照276826

*通信作者:时伯红, E-mail:kqk2010@163.com

ry effect by inhibiting the COX-2/NF- κ B signaling pathway, providing experimental evidence for the treatment of periodontitis in the future.

[KEY WORDS] Glycyrrhizin; Periodontitis; IL-6; COX-2; NF- κ B

牙周炎是导致牙齿缺失的主要因素,其特征表现为牙周组织的炎性破坏^[1-3]。牙龈卟啉单胞菌(*Porphyromonas gingivalis*, P.g)是导致牙周炎的主要病原体^[4],其内毒素脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)是主要的毒力因子,可诱导人牙龈成纤维细胞NF- κ B活化和炎症介质释放白细胞介素6(Interleukin 6, IL-6)和白细胞介素8(Interleukin 8, IL-8)等炎性细胞因子,诱导牙周组织损伤^[5]。环氧化酶-2(Cyclooxygenase-2, COX-2)作为将花生四烯酸转化为前列腺素(Prostaglandin E2, PGE2)的关键酶,能诱导生成大量的PGs,在炎症反应中发挥重要作用^[6]。而抑制COX-2的表达可减少骨吸收^[7]表明COX-2在牙周损伤中发挥重要作用。甘草甜素是从甘草中分离出来三萜类成分,又称甘草酸,通过分解为甘草次酸及葡萄糖醛酸发挥作用,主要表现为抗炎、抗变态反应和免疫调节。其中抗炎是甘草酸类最主要的药理作用^[8-9]。本实验拟通过检测甘草甜素对LPS刺激的人牙龈成纤维细胞(HGFs)的抗炎作用及其分子机制,探讨其在牙周炎治疗中的作用。

1 资料与方法

1.1 一般资料

取于2017年1月至2月山东大学口腔医院就诊需拔除埋伏阻生齿的健康志愿者6名(16~20岁,3名男性和3名女性;平均年龄18岁),收集其中术中切除的少量牙龈组织,研究经志愿者知情同意,本实验经院伦理委员会批准同意。

1.2 试剂与仪器

甘草甜素(纯度>98%)(国家药品和生物制品控制研究所),牙龈卟啉单胞菌脂多糖(San Diego公司,美国),牙龈卟啉单胞菌脂多糖(Invitrogen公司,美国),细胞增殖试剂盒(MTT)(上海罗氏制药有限公司),IL-6 ELISA试剂盒(eBioscience公司,美国),COX-2, β -actin, p-p65等蛋白一抗抗体(Cell Signaling Technology公司,美国)。

1.3 方法

1.3.1 人牙龈成纤维细胞的分离培养及细胞活性的测定

将牙龈组织块放入预先准备好装有DMEM培

养基(含10%胎牛血清)的无菌瓶中。通过组织块法培养的人牙龈成纤维细胞,经传代、分离、纯化至第四代,得到纯度高、活性好的HGFs。将牙龈成纤维细胞与不同浓度梯度的甘草甜素剂量为30、60、120、240 μ g/mL,共培养48 h,次日镜下观察可见细胞已经贴壁。按实验分组依次添加2 \times 甘草甜素100 μ L、2 \times 牙龈卟啉单胞菌脂多糖100 μ L。轻轻摇晃96孔细胞培养板,使培养基混合均匀,放入细胞培养箱;共培养后48 h后取出,吸尽每孔内的培养基,加入MTT溶液,每孔30 μ L,再次放入细胞培养箱中解育4 h;将DMSO中溶液注入到孔板中,每孔150 μ L,放入细胞培养箱中孵育过夜;次日,取出96孔细胞培养板,肉眼观察可见紫色甲瓞晶体已完全溶解。用酶标仪测定波长570 nm处的吸亮度值。

1.3.2 酶联免疫吸附试验(ELISA)检测培养基中细胞因子IL-6和IL-8

实验分为对照组、LPS组及低中高三个干预组。对照组由400 μ L 1%胎牛血清混合培养基构成,脂多糖对照组由200 μ L 2 \times 脂多糖+200 μ L 1%胎牛血清混合培养基构成,干预组则由200 μ L不同浓度2 \times 甘草甜素+200 μ L 2 \times 脂多糖构成。细胞贴壁后,吸去孔板中的细胞培养基,用微量移液器往实验组培养孔中注入2 \times 甘草甜素,200 μ L/孔。再往空白对照组、脂多糖对照组及药物对照组中添加1%胎牛血清混合培养基,其中空白对照组400 μ L/孔,脂多糖对照组200 μ L/孔。盖上培养板的盖子,标记时间,放入细胞培养箱中培养,并开始计时;22 h后,取出细胞培养板,用微量移液器将每孔中的上清液转移至Eppendorf管,并在管身标记组别以示区分。采用ELISA检测培养基中细胞因子IL-6和IL-8的产生。

1.3.3 蛋白免疫印记实验(Westernblot)检测各组COX-2和NF- κ B蛋白水平

①裂解细胞,提取总蛋白:取出细胞培养板,胰酶消化细胞,4 $^{\circ}$ C,离心,500 r/m \times 3 min,收集细胞,每孔细胞加400 μ L的细胞裂解混合液,于冰上裂解30 min,每5 min来回摇动培养板一次。细胞裂解完毕后,移至1.5 mL的EP管中。于4 $^{\circ}$ C,12 000 rpm离心5 min。将离心后的上清液分装转移到0.5 mL的EP管中放于-20 $^{\circ}$ C保存。②提取核

蛋白:用冷 PBS 洗涤细胞两遍,转移至预冷的 1.5 mL 的 EP 管中。4℃, 500 rpm 离心 3 min。弃上清液,加入 5 倍体积的预冷的 Buffer A,最大转速涡旋剧烈振荡 30 s,放置冰上 15 min;加入上液体 1/20 体积的 Buffer B,剧烈涡旋振荡 10 s,冰浴 1 min, 4℃, 16 000 rpm,离心 5 min,沉淀即是核蛋白粗提物;在沉淀中加入预冷的 Buffer 最大转速涡旋剧烈振荡 15 s,放置冰上 40 min,每间隔 10 min 涡旋剧烈振荡 15 s;4℃, 16 000 rpm 离心 10 min,将上清液转移至新的 EP 管中,即得细胞核蛋白产物;上述提取的蛋白进行蛋白定量(BCA 法),分装并保存于-80℃。
 ③蛋白变性:将提取的细胞蛋白与蛋白上样 Buffer 按 1:1 比例充分混匀后,在 100℃ 加热 5 min 使蛋白变性。
 ④蛋白表达检测:采用 Westernblot 检测各组 COX-2 和 NF-κB 蛋白水平。

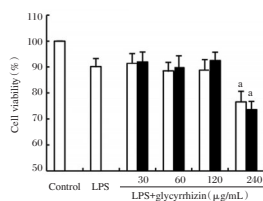
1.4 统计学方法

采用 SAS 9.4 软件进行数据处理;计数资料采用($\bar{x} \pm s$)描述,两组间采用 *t* 检验;多组间采用方差分析,对于细胞活性、IL-6 及各组蛋白的表达等均数的多重比较采用 SNK (Student - Newman - Keuls) 检验, *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度甘草酸对人牙龈成纤维细胞活性的影响

剂量为 30、60、120 μg/mL 的甘草甜素对 HGFs 的细胞活力无明显影响,差异无统计学意义(*P*>0.05)。剂量为 240 μg/mL 的甘草甜素明显抑制了 HGFs 的细胞活力,差异有统计学意义(*P*<0.05)。见图 1。



注:与 LPS 组相比, **P*<0.05。

图 1 不同浓度甘草酸对人牙龈成纤维细胞活性的影响
 Figure 1 Effects of different doses of glycyrrhizic acid on the activity of human gingival fibroblasts

2.2 甘草酸对 LPS 诱导的 IL-6 和 IL-8 产物的抑制作用

与对照组相比, LPS 组 IL-6 和 IL-8 的浓度显著增高,差异有统计学意义(*P*<0.05)。与 LPS 组相比,干预组的 IL-6 和 IL-8 表达水平随着甘草甜素的浓度的增加显著降低,差异有统计学意义(*P*<0.05)。见表 1。

表 1 甘草酸对 LPS 诱导的 IL-8 和 IL-6 的抑制作用 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Inhibitory effect of glycyrrhizic acid on IL-8 and IL-6 induced by LPS ($\bar{x} \pm s$)

组别	IL-6 (ng/mL)	IL-8 (ng/mL)
对照组	0.06 ± 0.01	0.05 ± 0.01
LPS 处理组	0.73 ± 0.11 ^a	0.69 ± 0.09 ^a
低剂量干预组	0.54 ± 0.09 ^{ab}	0.42 ± 0.07 ^{ab}
中剂量干预组	0.33 ± 0.05 ^{abc}	0.27 ± 0.05 ^{abc}
高剂量干预组	0.12 ± 0.03 ^{abcd}	0.13 ± 0.04 ^{abcd}
<i>F</i> 值	472.32	543.53
<i>P</i> 值	<0.001	<0.001

注:与对照组相比, **P*<0.05; 与 LPS 处理组相比, ^a*P*<0.05; 与低剂量干预组相比, ^b*P*<0.05; 与中剂量干预组相比, ^c*P*<0.05; 与高剂量干预组相比, ^d*P*<0.05。

2.3 甘草甜素对 COX-2/NF-κB 表达的影响

与对照组相比, LPS 组的 COX-2 蛋白表达明显上调,差异有统计学意义(*P*<0.05); 与 LPS 组相比,干预组的 COX-2 蛋白表达水平明显降低,差异有统计学意义(*P*<0.05)。见图 2。

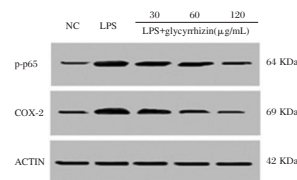


图 2 甘草甜素对 COX-2/NF-κB 表达的影响

Figure 2 The Effect of glycyrrhizin on COX-2/NF-κB expression

3 讨论

牙周炎是一类由附着于牙面的牙菌斑中的微生物所引起的牙周组织的慢性炎症,临床表现为牙周支持组织的炎症、牙周袋形成、附着丧失和牙槽骨的吸收破坏,最终导致牙齿的松动、脱落,对患者口腔功能和生活质量造成了严重的影响^[1-4]。牙龈卟啉单胞菌是其主要致病菌,其 LPS 可诱导人牙龈成纤维细胞炎症介质释放^[4]。说明牙龈卟啉单胞菌脂多糖能成功诱导人牙周膜细胞分泌 IL-6 和 IL-8 介导牙周炎症反应。这些炎症介质中白细胞介素 6(IL-6)和白细胞介素 8(IL-8)等炎性细胞因子在疾病发生发展过程中起到了重要的病理作用^[10-14],具有诱导牙周组织损伤的能力。IL-6 参与牙周炎活动期的炎症和免疫反应,通过诱导破骨细胞的生成、聚集以及破骨活性的发挥,从而加剧牙周组织的破坏。本研究结果与以往发现一致, LPS 能够显著增强人成纤维细胞 IL-6 及 IL-8 的表达。

目前临床常用的抗菌药物中以防腐剂剂和抗生素缓释剂占主导,如氯己定漱口水和派力奥(盐酸

米诺环素软膏),这些药物的长期、大量使用易诱发过敏和毒副作用的产生,国际上对抗生素的应用亦持谨慎态度,因此寻找一种安全有效、无毒副作用的治疗方式对与维护患者的机体健康和提高生活质量具有重要的临床意义^[15-16]。甘草甜素是从甘草中分离出来三萜类成分,又称甘草酸,可水解产生两分子葡萄糖醛酸和一分子(18 β 2)甘草次酸,主要作用为抗炎、抗变态反应,免疫调节。本实验采用甘草甜素治疗,发现其抗炎作用呈现剂量依赖性,随着剂量增强能显著抑制IL-6、IL-8的表达^[17]。

COX-2在牙周损伤中发挥重要作用^[6-7]。本研究发现LPS能显著增加COX-2的蛋白表达。甘草甜素治疗能显著抑制COX-2的表达,而且随甘草甜素浓度的增高,COX-2表达水平降低。LPS能诱导NF- κ B p65的磷酸化,甘草甜素的治疗显著抑制LPS诱导的NF- κ B p65磷酸化,且呈剂量依赖性。核转录因子- κ B(nuclear factor kappa B, NF- κ B)是细胞核内重要的核转录因子,在细胞刺激介导的细胞信息转录调控中起关键作用。NF- κ B在细胞中主要以p50/p65二聚体形式存在,其中p65亚基含有转录激活结构域。NF- κ B介导的信号通路参与体内多种反应过程,被认为是经典的炎症相关信号通路^[18-19]。本研究发现LPS能显著增加P65的蛋白表达。而甘草甜素治疗能显著抑制P65的表达。

目前国内尚无特异性针对牙周致病菌治疗和预防牙周病的药物,本研究以甘草甜素牙周局部给药的方式改善牙周病变部位的微环境,达到控制牙周炎症的效果。但由于口腔的微生物环境复杂,牙周病的感染往往是多种细菌的协同混合感染,并涉及局部和全身的诸多易感因素,本实验模拟了牙周主要致病菌之一牙龈卟啉单胞菌的感染情况,实验条件相对单一尚不能完全模拟人体牙周炎感染环境,且标准菌株与临床患者口腔中分离的野生菌株在致病能力上仍有一定差异,因此甘草甜素应用于牙周病患者口腔内的抗菌效果还有待进一步深入研究。

参考文献

- [1] Fischer RG, Lira Junior R, Retamal-Valdes B, et al. Periodontal disease and its impact on general health in Latin America. Section V: Treatment of periodontitis [J]. Braz Oral Res, 2020, 34(suppl 1):e026.
- [2] Yan Y, Zhan Y, Wang X, Hou J. Clinical evaluation of ultrasonic subgingival debridement versus ultrasonic subgingival scaling combined with manual root planing in the treatment of periodontitis: study protocol for a randomized controlled trial [J]. Trials, 2020, 21(1):113.
- [3] Phamduong S, Kim CS. Presentation of Localized Aggressive Periodontitis in Monozygotic Twins: Case Report [J]. Clin Adv Periodontics, 2019, 9(1):9-14.
- [4] Nagasaki A, Sakamoto S, Chea C, et al. Odontogenic infection cell activation [J]. Sci Rep, 2020, 10(1):4134.
- [5] Peeters H H, Suardita K. Efficacy of smear layer removal at the root tip by using ethylenediaminetetraacetic acid and erbium, chromium: yttrium, scandium, gallium garnet laser [J]. J Endod, 2011, 37(11):1585-1589.
- [6] Zhang ZS. Association between COX2 - 765G/C polymorphism and periodontitis in Chinese population: a meta-analysis [J]. BMC Oral Health, 2018, 18(1):32.
- [7] Morkmued S, Clauss F, Schuhbaur B, et al. Deficiency of the SMOC2 matricellular protein impairs bone healing and produces age-dependent bone loss [J]. Sci Rep, 2020, 10(1):14817.
- [8] Ahmad M, Pitt FT, Crum LA. Ultrasonic debridement of root canals: an insight into the mechanisms involved [J]. J Endod, 1987, 13(3):93-101.
- [9] 王宪英,杨吉力.复方甘草甜素的临床应用[J].河北医药, 2006, 28(8):760-761.
- [10] Shindo S, Hosokawa Y, Hosokawa I, et al. Interleukin (IL)-35 Suppresses IL-6 and IL-8 Production in IL-17A-Stimulated Human Periodontal Ligament Cells [J]. Inflammation, 2019, 42(3):835-840.
- [11] Phusuntornsakul P, Jitpukdeebooditra S, Pavasant P, et al. Vibration activates the actin/NF-kappaB axis and upregulates IL-6 and IL-8 expression in human periodontal ligament cells [J]. Cell Biol Int, 2020, 44(2):661-670.
- [12] Zhang N, Lv H, Shi BH, et al. Inhibition of IL-6 and IL-8 production in LPS-stimulated human gingival fibroblasts by glycyrrhizin via activating LXRalpha [J]. Microb Pathog, 2017, 110:135-139.
- [13] Noh MK, Jung M, Kim SH, et al. Assessment of IL-6, IL-8 and TNF-alpha levels in the gingival tissue of patients with periodontitis [J]. Exp Ther Med, 2013, 6(3):847-851.
- [14] 张启红,李春杨,营栋.舌下腺囊肿D-D、IL-6、MMP-2表达及临床意义[J].分子诊断与治疗杂志, 2021, 13(4):590-593.
- [15] 朱燕燕.派力奥口腔用药引起黑舌1例[J].甘肃医药, 2014, 33(9):719-720.
- [16] 徐晓涵. FDA 警示葡萄糖酸氯己定存在罕见严重的过敏反应[J].中国食品药品监管, 2017, (3):77.
- [17] 王晓晨,吉爱国. NF- κ B 信号通路与炎症反应[J].生理科学进展, 2014, 45(1):68-71.
- [18] 郭璇,宋瑶,阿布来提·阿不都哈尔.肺炎支原体感染合并川崎病患儿血清IL-6、IL-8及IL-10水平与冠状动脉损伤的相关性[J].分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(8):1069-1072.
- [19] Francis M, Gopinathan G, Salapatras A, et al. SETD1 and NF-kappaB Regulate Periodontal Inflammation through H3K4 Trimethylation [J]. J Dent Res, 2020, 99(13):1486-1493.

· 论 著 ·

LMR、MCL1、DKK1与多发性骨髓瘤患者骨损伤及预后相关性

朱太岗* 李月红 张飞虎 董漫玉 杜小雷

[摘要] **目的** 探讨淋巴细胞与单核细胞比值(LMR)、髓样细胞白血病蛋白1(MCL1)、Dickkopf-1(DKK1)与多发性骨髓瘤(MM)患者骨损伤、预后相关性。**方法** 选取安徽省皖北煤电集团总医院血液内科118例MM患者作为研究对象,比较不同临床病理特征患者LMR、MCL1、DKK1表达,分析上述指标与多发性骨髓瘤骨病(MBD)分级相关性,评价上述指标不同表达与预后的相关性,探讨MM患者预后不良的影响因素。**结果** MCL1、DKK1与MBD分级呈正相关,LMR与MBD分级呈负相关($P<0.05$);LMR低表达、MCL1高表达、DKK1高表达患者3年生存率低于LMR高表达、MCL1低表达、DKK1低表达患者,差异有统计学意义($P<0.05$);MBD分级、Hb、LMR、MCL1、DKK1是MM患者预后的影响因素($P<0.05$)。**结论** LMR、MCL1、DKK1与MM患者骨损伤存在一定相关性,且均为患者预后的影响因素,可为临床制定个性化治疗方案、预测预后提供新思路。

[关键词] 淋巴细胞与单核细胞比值;髓样细胞白血病蛋白1; Dickkopf-1; 多发性骨髓瘤; 骨损伤、预后

Correlation of LMR, MCL1, DKK1 with bone injury and prognosis in patients with multiple myeloma

ZHU Taigang*, LI Yuehong, ZHANG Feihu, DONG Manyu, DU Xiaolei

(Department of Hematology, General Hospital of Anhui Wanbei Coal and Power Group, Suzhou, Anhui, China, 234011)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the correlation of lymphocyte to monocyte ratio (LMR), myeloid leukemia protein 1 (MCL1), Dickkopf-1 (DKK1) with bone injury and prognosis in patients with multiple myeloma (MM). **Methods** A total of 118 patients with MM in the Department of Hematology, Wanbei Coal and Electricity Group General Hospital in Anhui Province were selected as the research objects. The expressions of LMR, MCL1 and DKK1 in patients with different clinicopathological characteristics were compared, and the correlation between the above indicators and multiple myeloma bone disease (MBD) grades was analyzed, and the correlation between the different expressions of the above indicators and prognosis was evaluated. The factors influencing the prognosis of MM patients were evaluated. **Results** MCL1 and DKK1 were positively correlated with MBD grade, and LMR was negatively correlated with MBD grade ($P<0.05$). The 3-year survival rate of patients with low LMR, high MCL1 DKK1 expression was lower than that of patients with high LMR, low MCL1, and DKK1 Low expression ($P<0.05$). MBD grade, Hb, LMR, MCL1, DKK1 are the prognostic factors of MM patients ($P<0.05$). **Conclusion** There is a certain correlation between LMR, MCL1, DKK1 and bone injury in MM patients, and they are all factors that affect the prognosis of patients. They can provide new ideas for clinical development of personalized treatment and prediction of prognosis.

[KEY WORDS] Ratio of lymphocytes to monocytes; Myeloid cell leukemia protein 1; Dickkopf-1; Multiple myeloma; Bone injury, Prognosis

基金项目:安徽省医学会急诊临床研究项目(ky2018011)

作者单位:安徽省皖北煤电集团总医院血液内科,安徽,宿州 234011

*通信作者:朱太岗, E-mail:ztgwby@163.com

多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)属血液系统恶性肿瘤常见类型之一,发病率约为10.0%^[1],相关研究显示^[2],其发生、发展与骨髓造血微环境密切相关,可上调破骨细胞活化因子、成骨细胞抑制因子表达,破坏骨细胞代谢平衡,诱发骨质疏松、溶骨性骨折等多发性骨髓瘤骨病(multiple myeloma bone disease, MBD),严重影响患者生存质量。髓样细胞白血病蛋白1(myeloid cell leukemia-1, MCL1)为骨髓瘤细胞重要生长因子,既往研究已证实^[3],其在细胞凋亡、血液系统恶性肿瘤发病过程中起着重要作用。Dickkopf-1(DKK1)是癌基因 Wnt 信号通路中抑制因子,在恶性肿瘤骨转移、骨相关病变中扮演着重要角色^[4]。淋巴细胞与单核细胞比值(lymphocyte-to-monocyte ratio, LMR)能反映机体抗肿瘤免疫功能,参与肿瘤微环境调控过程^[5]。目前,有关 LMR、MCL1、DKK1 与 MM 患者骨损伤及对预后的预测价值临床尚未完全明确。为此,本研究拟探讨 LMR、MCL1、DKK1 与 MM 患者骨损伤的相关性及与预后的关系,以期为临床评估病情程度、预测预后提供一定参考依据。详情如下。

1 资料和方法

1.1 一般资料

选取安徽省皖北煤电集团总医院血液内科2015年3月至2020年3月118例MM患者作为研究对象,其中女43例,男75例,年龄平均(56.39±4.45)岁。

纳入标准:①均符合MM诊断标准^[6],并经骨X线片、血免疫球蛋白(Immuno globulin, Ig)、骨髓象等检查确诊;②均为初诊,且预计生存期≥3个月;③所有研究对象均签署知情同意书;排除标准:①近期有放化疗、激素治疗史者;②合并严重肝肾等重要脏器器质性损害者;③合并自身免疫系统疾病或全身感染性疾病者;④严重心理障碍或精神异常者。

1.2 方法

1.2.1 临床病理特征收集

采用调查问卷方式收集所有研究对象性别、年龄、M蛋白分型、Durie-Salmon分期、国际分期系统(international staging system, ISS)分期、骨髓浆细胞比例、MBD分级^[7]、血红蛋白(hemoglobin, Hb)、乳酸脱氢酶(Lactate Dehydrogenase, LDH)、

β2-微球蛋白(β2-microglobulin, β2-MG)、肌酐等资料。其中MBD分级0级为无骨骼影像学异常,1级为严重弥漫性骨质疏松,2级为一个解剖学部位发生一个或多个溶骨性损害,3级为多个解剖学部位发生多个溶骨性损害,4级为严重溶骨性损害并发病理性骨折;Hb、LDH、β2-MG、肌酐均采用罗氏诊断产品(上海)有限公司COBAS INTEGRA 800型全自动生化分析仪检测。

1.2.2 LMR、MCL1、DKK1检测

所有研究对象均于入院第2d清晨空腹取肘静脉血5mL:①采用德国Sysmex 2100型全自动血细胞分析仪检测淋巴细胞计数与单核细胞计数,计算LMR;②静置30min后,3000r/min离心15min,离心半径10cm,取上层血清,放于-80℃低温保存,采用德国CobasE601型电化学发光免疫分析仪测定血清MCL1水平;采用卡迈舒(上海)生物科技有限公司酶联免疫吸附试验试剂盒测定血清DKK1水平。

1.2.3 治疗方法

所有研究对象均给予以化疗为主的综合治疗,化疗方案为长春新碱+蒽环类+地塞米松+沙利度胺。

1.3 统计学方法

采用统计学软件SPSS 22.0处理数据,正态计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较用 t 检验,多组间采用单因素方差分析,组内两两比较采用SNK- q 检验;计数资料用 $n(\%)$ 表示,采用 χ^2 检验;LMR、MCL1、DKK1与骨损伤相关性分析采用Spearman相关系数模型;MM患者预后不良的影响因素采用Cox多因素回归分析;不同LMR、MCL1、DKK1表达患者3年生存率采用Kaplan-Meier法绘制生存曲线,组间比较采用Log-rank检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同临床病理特征患者LMR、MCL1、DKK1表达

不同性别、年龄、M蛋白、Durie-Salmon分期、ISS分期、骨髓浆细胞比例、肌酐患者LMR、MCL1、DKK1表达比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);不同Hb、LDH、β2-MG、MBD分级患者LMR、MCL1、DKK1表达比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表1。

表1 比较不同临床病理特征患者 LMR、MCL1、DKK1 表达 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 the expressions of LMR, MCL1 and DKK1 in patients with different clinicopathological features were compared ($\bar{x} \pm s$)

临床病理特征	n	LMR	t/F 值	P 值	MCL-1 (pg/mL)	t/F 值	P 值	DKK1 (ng/mL)	t/F 值	P 值	
性别	男	75	5.04±0.59	0.424	0.672	71.39±10.49	0.865	0.389	63.74±10.81	0.754	0.452
	女	43	4.99±0.66			69.52±12.61			62.12±11.93		
年龄(岁)	≤60	83	5.06±0.81	0.759	0.450	70.02±11.45	1.055	0.294	62.97±10.45	0.296	0.768
	>60	35	4.93±0.94			72.35±9.66			63.58±9.68		
M 蛋白	IgG	65	5.09±0.72	0.988	0.376	69.84±12.13	0.508	0.603	62.45±11.39	0.301	0.741
	IgA	33	5.01±0.80			71.22±11.08			63.96±10.48		
	轻链型	20	4.81±0.93			72.70±10.64			64.08±9.53		
Durie-Salmon 分期	I~II 期	39	5.09±0.65	0.740	0.461	68.51±13.09	1.494	0.138	61.85±12.58	0.875	0.383
	III 期	79	4.99±0.71			71.80±10.24			63.79±10.66		
ISS 分期	I~II 期	60	5.03±0.82	0.138	0.890	70.45±11.36	0.241	0.810	62.47±10.73	0.728	0.468
	III 期	58	5.01±0.75			70.98±12.57			63.85±9.82		
骨髓浆细胞比例	≤30%	67	5.10±0.74	1.242	0.217	69.83±12.05	0.958	0.340	63.09±10.48	0.069	0.945
	>30%	51	4.92±0.83			71.87±10.62			63.23±11.50		
血肌酐 (mg/dl)	≤2.0	83	5.05±0.86	0.555	0.580	70.15±13.86	0.704	0.483	62.82±11.64	0.486	0.628
	>2.0	35	4.95±0.97			72.04±11.91			63.93±10.59		
Hb (g/L)	≤110	49	4.38±0.59	9.695	<0.001	75.96±10.57	4.739	<0.001	69.38±10.45	5.733	<0.001
	>110	69	5.47±0.61			66.98±9.83			58.73±9.57		
LDH (U/L)	≤245	81	5.65±0.52	20.287	<0.001	65.30±12.45	6.697	<0.001	58.24±9.22	7.866	<0.001
	>245	37	3.64±0.45			82.55±14.09			73.90±11.64		
β2-MG (mg/L)	≤5.5	72	5.74±0.69	13.573	<0.001	67.39±11.62	3.661	<0.001	59.86±8.37	4.927	<0.001
	>5.5	46	3.89±0.77			75.91±13.37			68.30±10.09		
MBD 分级	0~1 级	20	6.00±0.72	85.514	<0.001	50.39±10.24	53.189	<0.001	49.48±9.51	25.189	<0.001
	2~3 级	72	5.17±0.58			70.58±11.46			62.69±11.25		
	4 级	26	3.85±0.41			86.72±13.88			74.92±15.60		

2.2 LMR、MCL1、DKK1 与骨损伤的相关性

经 Spearman 相关性分析, MCL1 ($r=0.656$)、DKK1 ($r=0.694$) 与 MBD 分级呈正相关, LMR ($r=-0.712$) 与 MBD 分级呈负相关 (P 均 <0.05)。

2.3 LMR、MCL1、DKK1 与 MM 患者 3 年生存率的关系

随访 3 年, 脱落 9 例。以表 1 中 LMR、MCL1、DKK1 均值为界限, 将患者分为 LMR 低表达 (≤ 5.02)、高表达 (>5.02)、MCL1 低表达 (≤ 70.71 pg/mL)、高表达 (>70.71 pg/mL) 和 DKK1 低表达 (≤ 63.15 ng/mL)、高表达 (>63.15 ng/mL) 患者。采用 K-M 法进行分析显示, LMR 低表达、MCL1 高表达、DKK1 高表达患者 3 年生存率低于 LMR 高表达、MCL1 低表达、DKK1 低表达患者, 差异有统计学意义 ($\chi^2=11.917, P<0.001$; $\chi^2=11.042, P<0.001$; $\chi^2=7.716, P=0.005$)。见图 1。

2.4 MM 患者预后的影响因素

以 MM 患者预后为因变量 (生存=0, 死亡=1), 以 Durie-Salmon 分期、ISS 分期、骨髓浆细胞比例、LDH、Hb、血肌酐、MBD 分级、LMR、MCL1、DKK1 为自变量, 应用 Cox 多因素分析, 结果显示, MBD 分级、Hb、LMR、MCL1、DKK1 是 MM 患者预后的影响因素 ($P<0.05$)。见表 2。

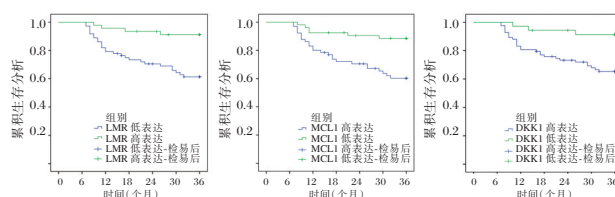


图1 LMR、MCL1、DKK1 与 MM 患者 3 年生存率的关系
Figure 1 Relationship between LMR, MCL1, DKK1 and 3-year survival rate in MM patients

表2 MM 患者预后的 Cox 多因素分析

Table 2 Cox multivariate analysis of poor prognosis in

影响因素	β 值	SE 值	Wald χ^2	HR 值	95%CI	P 值
MBD 分级	0.620	0.240	6.679	1.859	1.159 ~ 2.983	<0.001
Hb	-1.551	0.507	9.354	0.212	0.148 ~ 0.304	<0.001
LMR	-1.056	0.338	9.764	0.348	0.259 ~ 0.467	<0.001
MCL1	0.636	0.251	6.426	1.889	1.167 ~ 3.059	<0.001
DKK1	0.694	0.239	8.422	2.001	1.224 ~ 3.271	<0.001

3 讨论

淋巴细胞计数、单核细胞计数是评估机体免疫状态的指标, 二者比值通过抑制局部免疫, 促进肿瘤血管形成, 参与肿瘤微环境调控, 可诱导肿瘤细胞异常增殖, 促进肿瘤细胞转移^[8]。程盼盼等^[9]

研究已证实, LMR 与 MM 患者疾病进展及预后相关。MBD 分级是评估 MM 患者骨损伤程度的重要指标, 其分级越高说明 MM 患者病情越严重。本研究结果表明 LMR 可作为评估 MM 骨损伤的重要指标。另外, 有学者还指出, LMR 是预测恶性肿瘤患者临床预后的一个强有力生物标志物^[10]。本研究中, LMR 低表达可能降低 MM 患者 3 年生存率。杨万波等^[11]研究亦指出, 低 LMR 预示着骨质疏松临床预后较差。分析上述结果产生机制可能与炎症反应所致淋巴细胞计数减少和单核细胞产生的肿瘤相关巨噬细胞增多, 影响宿主抗肿瘤免疫应答作用, 导致肿瘤细胞生长速度加快有关。提示 LMR 对 MM 患者预后具有一定预测价值。

MCL1 是线粒体凋亡通路中重要因子, 通过抑制 bax、BH3 蛋白表达, 可参与细胞周期调节, 发挥癌基因作用。朱婕等^[12]通过 120 例 MM 患者发现, MCL1 与 MM 临床分期存在正相关, 可用于评价患者骨损伤, 支持本研究结果。提示 MCL1 有望成为评估 MM 患者骨损伤的潜在指标。近年来, 诸多研究表明 DKK1 在溶骨性或成骨性骨质破坏、骨吸收增加等病理进程中起着重要作用^[13-14]。韩东海等^[15]观点认为, DKK1 水平会随着 MM 病情加重而上升, 对 MM 病情变化具有一定的预测价值。本研究经 Spearman 相关性分析可知, DKK1 与 MM 患者 MBD 分级存在正相关关系, 这可能是由于 DKK1 水平升高可抑制骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化, 间接刺激局部破骨细胞活性, 破坏骨代谢平衡, 诱导骨质吸收, 形成恶性循环, 促进骨髓瘤细胞存活和生长, 最终加快 MM 病情进展。推测抑制 DKK1 表达可能是缓解 MM 患者骨损伤的有效靶点。本研究还表明, MCL1、DKK1 高表达患者 3 年生存率低于 MCL1、DKK1 低表达患者, 这可能归因于 MCL1、DKK1 表达过度上调可抑制骨髓瘤细胞凋亡, 促进肿瘤细胞异常增殖, 进而加重患者肿瘤细胞负荷, 促进肿瘤细胞转移, 从而引起预后不良。进一步经 Cox 多因素回归分析显示, MCL1、DKK1 高表达是 MM 患者死亡的独立危险因素。提示临床可根据 MCL1、DKK1 表达防范 MM 死亡。

综上所述, LMR、MCL1、DKK1 与 MM 患者骨损伤存在一定相关性, 且均为患者预后的影响因素, 可为临床制定个性化治疗方案、预测预后提供新思路。但本研究纳入样本量少, 缺少部分患者遗传学资料, 因此较难明确 LMR、MCL1、DKK1 水

平与遗传学异常的关系, 未来仍有待进一步扩大样本量、完善远期随访资料进行验证。

参考文献

- [1] 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.
- [2] 朱晶晶. 多发性骨髓瘤与骨髓微环境关系的研究进展[J]. 实用癌症杂志, 2021, 36(3): 516-518.
- [3] 王碧薇, 孙辉, 陈曦, 等. IL-6、IL-6R 及 MCL-1 在多发性骨髓瘤患者中的表达及临床意义[J]. 中国实验血液学杂志, 2020, 28(2): 553-557.
- [4] Reinhold S, Blankestijn WM. Wnt β -Catenin Inhibitor Dickkopf 1[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2019, 39(2): 121-123.
- [5] Shi L, Qin X, Wang H, et al. Elevated neutrophil-to-lymphocyte ratio and monocyte-to-lymphocyte ratio and decreased platelet-to-lymphocyte ratio are associated with poor prognosis in multiple myeloma[J]. Oncotarget, 2017, 8(12): 18792-18801.
- [6] Engelhardt M, Terpos E, Kleber M, et al. European Myeloma Network recommendations on the evaluation and treatment of newly diagnosed patients with multiple myeloma[J]. Haematologica, 2014, 99(2): 232-242.
- [7] 严笑, 欧阳桂芳, 徐凯红, 等. 多发性骨髓瘤患者血清 miRNA-181a 水平与病理特征的关系[J]. 中国现代医生, 2019, 57(22): 9-12.
- [8] 刘志远, 洪梅, 肖韡, 等. 中性粒细胞与淋巴细胞比值对非小细胞肺癌发生放射性肺炎的预测价值[J]. 中华生物医学工程杂志, 2020, 26(2): 137-143.
- [9] 程盼盼, 王翠玲, 张向晖, 等. 淋巴单核比、淋巴细胞亚群在多发性骨髓瘤患者外周血的表达分析及与预后的关系[J]. 中国实验诊断学, 2019, 23(9): 1499-1501.
- [10] 陈建勋, 彭健宏, 范文华, 等. 术前外周血淋巴细胞与单核细胞比值对 III 期结肠癌患者预后的评估价值[J]. 中华胃肠外科杂志, 2019, 22(1): 73-78.
- [11] 杨万波, 施俊, 何晶, 等. 术前中性粒细胞淋巴细胞、血小板淋巴细胞和淋巴细胞单核细胞比值对骨肉瘤患者预后的影响[J]. 中华实验外科杂志, 2019, 36(11): 1963-1965.
- [12] 朱婕, 张磊, 张葆康, 等. 多发性骨髓瘤患者血清 IL-6、IL-6R、MCL1 的检测分析及与预后的关系[J]. 检验医学与临床, 2018, 15(6): 792-794.
- [13] Wu Z, Zhang Y, Yang Z, et al. Elevation of miR-302b prevents multiple myeloma cell growth and bone destruction by blocking DKK1 secretion[J]. Cancer Cell Int, 2021, 21(1): 187.
- [14] 冶薇, 程虹, 封敏. 血清 DKK1、 β_2 -微球蛋白水平与多发性骨髓瘤患病程度的相关性[J]. 临床输血与检验, 2019, 21(6): 564-567.
- [15] 韩东海, 高大. 血清与骨髓 Dickkopf-1 水平检测对多发性骨髓瘤患者意义研究[J]. 临床军医杂志, 2018, 46(12): 1472, 1475.

FSH-PI3K/AKT/NF- κ B 蛋白在上皮性卵巢癌组织中的表达及作用机制

路晓琳

[摘要] **目的** 探究卵泡雌激素(FSH)-磷脂酰肌醇3激酶/蛋白激酶B(PI3K/AKT)/核转录因子 κ B(NF- κ B)蛋白对上皮性卵巢癌的影响。**方法** 选取邯郸市中心医院手术切除的上皮性卵巢癌组织(32例)、卵巢交界性肿瘤组织(32例)、卵巢良性肿瘤组织(32例)、正常卵巢组织(32例),对比不同卵巢组织中FSHR、p-AKT、NF- κ B蛋白阳性表达率,分析各蛋白之间相关性,并分析FSH对SKOV-3、3AO细胞生长、侵袭促进作用。**结果** 上皮性卵巢癌组织FSHR、p-AKT、NF- κ B蛋白阳性表达率:卵巢交界性肿瘤组织>卵巢良性肿瘤组织>正常卵巢组织,差异有统计学意义($P<0.05$);上皮性卵巢癌组织中FSHR、p-AKT、NF- κ B蛋白之间呈正相关($P<0.05$);SKOV-3细胞于FSH浓度40 mIU/ml作用48 h时细胞增殖率最大,不同浓度,比较差异有统计学意义($P<0.05$),不同时间点,差异无统计学意义($P>0.05$);3AO细胞于FSH浓度40 mIU/ml作用24 h时细胞的增殖率最大,不同浓度、不同时间点,比较差异有统计学意义($P<0.05$);SKOV-3细胞中,与对照组相比,FSH组p-AKT蛋白表达增加,LY294002组、FSH/LY294002组p-AKT蛋白表达减少($P<0.05$);FSH组NF- κ B蛋白表达高于LY294002组($P<0.05$);3AO细胞中,LY294002组、FSH/LY294002组p-AKT蛋白表达少于对照组($P<0.05$),FSH组p-AKT蛋白表达高于对照组、LY294002组、FSH/LY294002组($P<0.05$);FSH组细胞核中NF- κ B蛋白表达高于对照组、LY294002组、FSH/LY294002组($P<0.05$);4组SKOV-3、3AO细胞中AKT1/2蛋白表达无明显差异($P>0.05$);对照组、LY294002组、FSH/LY294002组两种细胞穿过小室的细胞数少于FSH组($P<0.05$)。**结论** FSH可能是经由PI3K/Akt通路上调卵巢癌细胞株SKOV-3、3AO中NF- κ B蛋白表达,促进肿瘤细胞增殖、侵袭。

[关键词] 上皮性卵巢癌;卵泡刺激素;磷脂酰肌醇3激酶/蛋白激酶B;核转录因子 κ B

FSH-PI3K/AKT/NF- κ B Expression and mechanism of B protein in epithelial ovarian cancer

LU Xiaolin

(Department of Gynecology, Handan Central Hospital, Handan, Hebei, China, 056001)

[ABSTRACT] **Objective** To explore follicular estrogen (FSH) - phosphatidylinositol 3 kinase / protein kinase B (PI3K / Akt) / nuclear transcription factor κ B (NF- κ B) Effect of protein on the occurrence and development of epithelial ovarian cancer. **Methods** The epithelial ovarian cancer tissues (32 cases), borderline ovarian tumor tissues (32 cases), benign ovarian tumor tissues (32 cases), and normal ovarian tissues (32 cases) surgically removed in our hospital were selected to compare FSHR in different ovarian tissues, P-AKT, NF- κ B protein positive expression rate, analyze the correlation between the proteins, and analyze the promotion of FSH on the growth and invasion of SKOV-3 and 3AO cells. **Results** The positive expression rates of FSHR, p-AKT and NF- κ B protein in epithelial ovarian cancer tissues were higher than those in borderline ovarian tumor tissues, benign ovarian tumor tissues, and normal ovarian tissues ($P<0.05$); FSHR and p in epithelial ovarian cancer tissues -AKT and NF- κ B protein are positively correlated ($P<0.05$);

基金项目:邯郸市科学技术研究与发展计划项目(1623208056ZC)

作者单位:邯郸市中心医院妇科 河北,邯郸 056001

通信作者:路晓琳, E-mail: sj1002@126.com

SKOV-3 cells have the highest cell proliferation rate when FSH concentration is 40 mIU/ml for 48 h, and the difference between different concentrations is statistically significant ($P < 0.05$). There was no significant difference at different time points ($P > 0.05$); the proliferation rate of 3AO cells was the largest when the FSH concentration was 40 mIU/ml for 24 h, and the difference was statistically significant at different concentrations and different time points ($P < 0.05$); In SKOV-3 cells, compared with the control group, the expression of p-AKT protein in the FSH group increased, and the expression of p-AKT protein in the LY294002 group and FSH/LY294002 group decreased ($P < 0.05$); the expression of NF- κ B protein in the FSH group was higher than that of LY294002 Group ($P < 0.05$); in 3AO cells, the expression of p-AKT protein in the LY294002 group and FSH/LY294002 group was lower than that in the control group ($P < 0.05$), and the p-AKT protein expression in the FSH group was higher than that in the control group, LY294002 group, FSH/LY294002 group ($P < 0.05$); NF- κ B protein expression in the nucleus of FSH group was higher than that of control group, LY294002 group, FSH/LY294002 group ($P < 0.05$); AKT1/2 protein expression in SKOV-3 and 3AO cells in 4 groups There was no significant difference ($P > 0.05$); the number of cells in the control group, LY294002 group, and FSH/LY294002 group that passed through the chamber was less than that of the FSH group ($P < 0.05$). **Conclusion** FSH may increase the expression of NF- κ B protein in ovarian cancer cell lines SKOV-3 and 3AO through the PI3K/Akt pathway, promote tumor cell proliferation and invasion, and accelerate the occurrence and development of epithelial ovarian cancer.

[KEY WORDS] Epithelial ovarian cancer; Follicle stimulating hormone; Phospholipid phthaloinositol 3-kinase/protein kinase B; Nuclear transcription factor kappa B

卵巢癌是女性常见恶性肿瘤,据统计,上皮性卵巢癌5年生存率仅为30%~40%,死亡率居于妇科恶性肿瘤首位^[1-2]。激素环境与卵巢癌发生发展密切相关,过量卵泡刺激素(Follicle stimulating hormone, FSH)刺激可能是卵巢癌发生的重要危险因素^[3]。有文献证实,FSH通过作用于细胞表面FSH受体(FSHR)促使细胞内相关信号通路被激活,从而在卵巢癌中发挥作用,但具体作用机制仍有待探讨^[4]。研究显示,磷脂酰肌醇3激酶/蛋白激酶B(Phosphatidylinositol 3 kinase/protein kinase B, PI3K/AKT)通路在恶性肿瘤发生发展中具有重要作用^[5]。核转录因子 κ B(Nuclear transcription factor κ B, NF- κ B)属于信号通路的中枢,与细胞增殖、凋亡联系紧密^[6]。因此,本研究尝试探究FSH-PI3K/AKT信号通路-NF- κ B蛋白对上皮性卵巢癌发生发展的影响,旨在为临床制定治疗方案提供依据。报告如下。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

选取邯郸市中心医院2015年7月至2016年10月手术切除的上皮性卵巢癌组织(32例)、卵巢交界性肿瘤组织(32例)、卵巢良性肿瘤组织(32例)、正常卵巢组织(32例)作为研究资料来源,采用搔刮法对人卵巢表面上皮细胞进行原代培养,

SKOV-3细胞株为北京大学人民医院妇科实验室提供;3AO细胞株为河北医科大学第四医院实验中心提供,均用常规RPMI-1640培养基培养;注射用重组人卵泡刺激素来自瑞士Laboratoires Serono SA公司;LY294002来自美国Promega公司。

1.2 方 法

1.2.1 免疫组化法

将4种卵巢标本组织芯片进行4 μ m切片,敷贴在处理好的载玻片,置入烤箱中加热(0.5~1 h),采用免疫组化法检测4种卵巢组织中表达FSHR、p-AKT、NF- κ B蛋白的细胞比例。判定标准^[7]:阳性细胞 $>50\%$ 为3分,21%~50%为2分,10%~20%为1分, $<10\%$ 为0分;细胞染色强度:黄褐色为3分;黄棕色为2分;浅黄色为1分,无黄色为0分。细胞染色强度与阳性细胞比例积分的乘积为最终积分, <3 分判定为阴性, ≥ 3 分判定为阳性。

1.2.2 四甲基偶氮唑蓝(Methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)法^[8]

取对数生长期SKOV-3、3AO细胞经胰酶消化后,调整细胞浓度为 1×10^5 /mL,每孔100 μ L培养于96孔培养板中,培养6~8 h,待细胞贴壁后,调整培养液,分为只加培养基不加细胞的空白对照组、不含药培养基的对照组、FSH单独处理的FSH组、LY294002单独处理的LY组及LY294002作用0.5 h后联合FSH的FSH/LY组,每组设5个复孔,重复

3次。分别培养12、24、48、72 h后,吸出含药培养基,采用MTT法检测药物对SKOV-3、3AO细胞生长促进作用及其与时间和浓度的关系。细胞生长增殖率=(A加药-A空白)/(A对照-A空白)×100%。

1.2.3 Western blot 蛋白印迹法

待上皮性卵巢癌细胞SKOV-3、3AO经40 mIU/ml FSH(FSH组)、10 μmol/L LY294002(LY组)、加入LY294002 0.5 h后联合FSH(FSH/LY组)处理,并设对照组,分别于48和24 h后倒掉培养液,制作离心上清液,置于-70℃条件下保存,进行SDS-PAGE电泳、转膜、封闭、加一抗、二抗、洗膜、化学发光、显影、定影、凝胶图像分析,观察FSH和LY294002分别及序贯联合作用于SKOV-3、3AO细胞前后FSHR、AKT1/2、p-AKT、NF-κB蛋白的表达。

1.2.4 Transwell 小室侵袭实验

调整细胞浓度为1×10⁵/mL,每孔上层小室中加200 μL细胞悬液,24孔板槽中加入500 μL含10%胎牛血清的培养基。待细胞贴壁后,用FSH 40 mIU/mL和LY294002 10 μmol/L分别及序贯联合作用于细胞,48 h后结晶紫染色,显微镜下观察上层小室底部穿过的细胞情况并计数。

1.3 统计学方法

采用统计软件SPSS 22.0进行统计学分析,计数资料采用n(%)表示,行χ²检验对比,计量资料以($\bar{x} \pm s$)描述,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两组间比较采用LSD-t检验,两组间比较采用独立样本t检验,相关性采用Spearman相关性模型分析,以P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同卵巢组织FSHR、p-AKT、NF-κB蛋白阳性表达细胞比率

上皮性卵巢癌组织FSHR、p-AKT、NF-κB蛋白阳性表达率:卵巢交界性肿瘤组织>卵巢良性肿瘤组织>正常卵巢组织(P<0.05),卵巢交界性肿瘤组织、卵巢良性组织、正常卵巢组织比较,差异无统计学意义(P>0.05)。见表1。

2.2 上皮性卵巢癌组织中FSHR、p-AKT、NF-κB蛋白表达相关性

Spearman相关性分析,上皮性卵巢癌组织中FSHR与p-AKT、NF-κB蛋白表达呈正相关(r=0.671、0.759, P均<0.001),p-AKT与NF-κB蛋白表达呈正相关(r=0.718, P<0.05)。

表1 不同卵巢组织中FSHR、p-AKT、NF-κB蛋白阳性表达率比较 [n(%)]

Table 1 FSHR, p-Akt, NF in different ovarian tissues-κ Comparison of the positive expression rate of B protein [n(%)]

组别	n	FSHR	p-AKT	NF-κB
上皮性卵巢癌组织	32	27(84.38)	18(56.25)	25(78.13)
卵巢交界性肿瘤组织	32	16(50.00)	6(18.75)	13(40.63)
卵巢良性肿瘤组织	32	13(40.63)	4(12.50)	8(25.00)
正常卵巢组织	32	15(46.88)	3(9.38)	10(31.25)
χ ² 值		15.024	24.647	22.095
P值		0.002	<0.001	<0.001

2.3 FSH对SKOV-3、3AO细胞生长促进作用及其与时间和浓度的关系

SKOV-3细胞于FSH浓度40 mIU/mL作用48 h时细胞增殖率最大。不同浓度比较差异有统计学意义(P<0.05);不同时间点比较差异无统计学意义(P>0.05);3AO细胞于FSH浓度40 mIU/mL作用24 h时细胞的增殖率最大,最大增殖率为(173.92±1.92)%。不同浓度、不同时间点比较差异有统计学意义(P<0.05)。见表2。

2.4 FSH、LY294002及联合对SKOV-3、3AO细胞FSHR、p-AKT、AKT1/2、NF-κB表达的影响

SKOV-3细胞中,与对照组相比,FSH组p-AKT蛋白表达增加,LY294002组、FSH/LY294002组p-AKT蛋白表达减少(P<0.05);FSH组NF-κB蛋白表达高于LY294002组(P<0.05);3AO细胞中,LY294002组、FSH/LY294002组p-AKT蛋白表达少于对照组(P<0.05),FSH组p-AKT蛋白表达高于对照组、LY294002组、FSH/LY294002组(P<0.05);FSH组细胞核中NF-κB蛋白表达高于对照组、LY294002组、FSH/LY294002组(P<0.05);LY294002组、FSH/LY294002组少于对照组,但无统计学差异(P>0.05);4组SKOV-3、3AO细胞AKT1/2蛋白表达无明显差异(P>0.05)。见表3。

2.5 FSH、FSH/LY、LY对SKOV-3、3AO细胞的侵袭性

对照组、FSH组、FSH/LY294002组、LY294002组SKOV-3细胞穿过基质膜平均细胞数分别为(26±6)、(118±19)、(38±7)、(18±5)个/高倍镜(×200);3AO细胞穿过基质膜平均细胞数分别为(19±4)、(134±20)、(58±11)、(12±3)个/高倍镜(×200)。对照组、LY294002组、FSH/LY294002组两种细胞穿过小室的细胞数少于FSH组(P<0.05)。见图1。

表2 FSH对SKOV-3、3AO细胞生长促进作用及其与时间和浓度的关系($\bar{x} \pm s$)

Table 2 growth promoting effect of FSH on SKOV-3 and 3AO cells and its relationship with time and concentration ($\bar{x} \pm s$)

细胞	FSH(mIU/mL)	12 h ^a	24 h ^b	48 h ^c	72 h ^d
SKOV-3 细胞	10 ^a	137.26±0.71	145.57±1.06	147.45±0.84	137.60±2.24
	20 ^b	141.02±1.25	148.18±0.69	153.17±0.95	144.58±0.75
	40 ^c	143.94±1.00	151.82±0.91	166.92±1.24	151.13±1.32
	80 ^d	139.71±0.75	143.39±1.03	163.26±0.62	137.48±0.93
	160 ^e	141.65±1.18	142.14±1.56	161.05±0.87	131.79±1.05
	F 值	193.687	407.135	2337.144	960.340
	P 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
3AO 细胞	10 ^a	106.13±4.12	114.11±2.05	109.72±2.22	109.34±6.52
	20 ^b	113.07±2.62	139.93±5.90	127.98±3.05	118.17±3.33
	40 ^c	117.45±1.04	173.92±1.92	167.91±3.24	142.04±5.36
	80 ^d	114.23±4.36	172.15±3.14	158.38±2.34	130.00±2.10
	160 ^e	113.15±1.36	154.14±2.54	140.05±1.53	122.09±3.01
	F 值	59.722	1671.452	2673.086	256.143
	P 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注: a vs b vs c vs d vs e P<0.05; A vs B vs C vs D P>0.05。

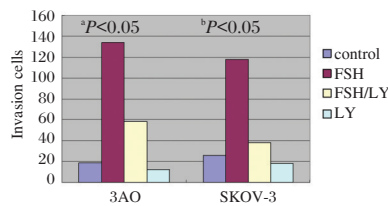
表3 FSH、LY294002及联合对SKOV-3、3AO细胞FSHR、p-AKT、AKT1/2、NF-κB表达的影响

Table 3 Effects of FSH, LY294002 and their combination on FSHR, p-Akt, AKT1 / 2 and NF in SKOV-3 and 3AO cells-κ

The influence of B expression

细胞	组别	FSHR	p-AKT	AKT1/2	NF-κB
SKOV-3 细胞	对照组	1.26±0.17 ^{bc}	1.70±0.42 ^{bcd}	1.12±0.22	0.91±0.23 ^{bcd}
	FSH 组	1.31±0.07 ^{acd}	2.64±0.32 ^{ac}	1.19±0.28	1.47±0.45 ^{ac}
	FSH/LY294002 组	1.37±0.25 ^{bd}	1.22±0.26 ^b	1.16±0.34	0.83±0.19 ^{bd}
	LY294002 组	1.27±0.31 ^c	1.22±0.41 ^b	1.15±0.26	0.35±0.57 ^{bc}
	F 值	1.658	111.481	0.344	43.747
	P 值	0.180	<0.001	0.794	<0.001
3AO 细胞	对照组	0.29±0.032 ^{bc}	0.82±0.020 ^{bcd}	1.55±0.024	0.21±0.50 ^{bc}
	FSH 组	0.32±0.041 ^{acd}	0.94±0.002 ^{acd}	1.56±0.039	1.26±0.67 ^{acd}
	FSH/LY294002 组	0.28±0.035 ^b	0.64±0.022 ^{bd}	1.55±0.027	0.57±0.29 ^{bd}
	LY294002 组	0.28±0.029 ^b	0.36±0.008 ^{bc}	1.54±0.040	0.19±0.21 ^{bc}
	F 值	9.614	8551.261	1.928	38.662
	P 值	<0.001	<0.001	0.129	<0.001

注:与同一细胞对照组相比,^aP<0.05;与同一细胞 FSH 组相比,^bP<0.05;与同一细胞 FSH/LY294002 组相比,^cP<0.05;与同一细胞 LY294002 组相比,^dP<0.05。



注:与 FSH 组 3AO 细胞穿过小室的细胞数相比,^aP<0.05;与 FSH 组 SKOV-3 细胞穿过小室的细胞数相比,^bP<0.05。

图1 FSH、FSH/LY、LY对SKOV-3、3AO细胞的侵袭性
Figure 1 Invasiveness of FSH, FSH / ly and ly on SKOV-3 and 3AO cells

3 讨论

国内卵巢癌中80%~90%为上皮性卵巢癌,普遍认为与遗传、环境、内分泌等因素有关^[9]。近年

来,随着分子生物学在恶性肿瘤发病机制中的研究不断进步,细胞因子及相关信号通路与恶性肿瘤发生发展的关系为探索肿瘤发生、增殖、侵袭提供了新思路、新途径。

FSH是腺垂体分泌的糖蛋白激素,主要作用是加速窦前卵泡、窦状卵泡颗粒细胞增殖分化,激活颗粒细胞芳香化酶促进雌二醇等物质合成、分泌,在女性内分泌和生殖功能中具有重要作用^[10]。相关研究表明,FSH与卵巢癌发生发展有关,且在卵巢癌组织表面上皮有FSHR的表达,说明FSH的确参与卵巢癌发生发展过程^[11]。本研究结果显示,SKOV-3细胞于FSH浓度40 mIU/mL作用48 h时细胞增殖率最大,具有浓度依赖性,3AO细胞于FSH浓度40 mIU/mL作用24 h时细胞的增

殖率最大,具有时间-浓度依赖性,对照组、LY294002组、FSH/LY294002组两种细胞穿过小室的细胞数少于FSH组,与闫晓楠等^[12]研究报道结果一致,说明FSH能够促进上皮性卵巢癌细胞株SKOV-3、3AO生长、增殖、侵袭的作用。本研究还显示,上皮性卵巢癌组织FSHR、p-AKT、NF-κB蛋白阳性表达率高于卵巢交界性肿瘤组织、卵巢良性肿瘤组织、正常卵巢组织,且上皮性卵巢癌组织中FSHR、p-AKT、NF-κB蛋白之间呈正相关,提示FSH在上皮性卵巢癌发生发展中的作用可能与p-AKT、NF-κB蛋白有关。PI3K/Akt信号通路是一种以促增殖、抗凋亡为主要作用的信号传导通路,其中PI3K属于磷脂酰肌醇依赖激酶家族成员,在调节细胞骨架构筑、细胞增殖、分化过程中发挥重要作用,Akt属于该通路最主要的靶酶,活化形式为p-Akt,可抑制细胞凋亡^[13]。已有报道证实,NF-κB蛋白作为PI3K/Akt信号通路的下游分子,是AKT抗凋亡信号的靶点,可导致肿瘤细胞不能及时凋亡,促使肿瘤细胞增殖,加速恶性肿瘤发生^[14]。

本研究表明,SKOV-3、3AO细胞中,与对照组相比,FSH组p-AKT蛋白、胞核中NF-κB蛋白表达增加,LY294002组、FSH/LY294002组p-AKT蛋白表达减少,胞核中NF-κB蛋白略有减少,说明FSH可能是经由PI3K/Akt通路上调卵巢癌细胞株SKOV-3、3AO中NF-κB的表达,促进肿瘤细胞增殖、侵袭,在PI3K抑制剂LY294002的特异性抑制作用下,p-AKT蛋白、胞核中NF-κB蛋白呈下调趋势。分析原因,可能是由于FSH通过结合细胞膜上的FSHR,激活PI3K,促使Akt磷酸化,从而导致PI3K/Akt信号通路异常活化,并通过降解作用促使NF-κB从复合物中解离,转位至细胞核中,引发其转录活性,进而加快细胞增殖、侵袭,经LY294002处理后FSH作用被逆转,对PI3K/Akt信号通路异常活化产生抑制作用,阻滞NF-κB核移位,最终下调卵巢癌细胞增殖、侵袭能力^[15]。因此,FSH-PI3K/AKT信号通路-NF-κB蛋白有望成为临床治疗上皮性卵巢癌的新靶点。

综上所述,FSH可能经由PI3K/Akt通路上调NF-κB的表达,促进上皮性卵巢癌肿瘤细胞增殖、侵袭。

参考文献

[1] Lheureux S, Braunstein M, Oza AM. Epithelial ovarian can-

cer: Evolution of management in the era of precision medicine [J]. *CA Cancer J Clin*, 2019, 69(4):280-304.

[2] 尼华,牛蕾蕾. 上皮性卵巢癌相关的长链非编码RNA的研究进展[J]. *国际妇产科学杂志*, 2017, 44(3):284-287.

[3] 刘静. 血清卵泡刺激素、黄体生成素、催乳素与卵巢癌临床病理特征及预后的相关性[J]. *中国卫生工程学*, 2019, 18(5):785-787.

[4] Song K, Dai L, Long X, et al. Follicle-stimulating hormone promotes the proliferation of epithelial ovarian cancer cells by activating sphingosine kinase [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1):13834.

[5] 王莉,孙云燕,李冬冬,等. GOLPH3通过PI3K/Akt信号通路调控上皮性卵巢癌细胞增殖与凋亡的研究[J]. *现代妇产科进展*, 2018, 27(9):648-651.

[6] Masoumi-Dehghi S, Babashah S, Sadeghizadeh M. microRNA-141-3p-containing small extracellular vesicles derived from epithelial ovarian cancer cells promote endothelial cell angiogenesis through activating the JAK/STAT3 and NF-κB signaling pathways[J]. *J Cell Commun Signal*, 2020, 14(2):233-244.

[7] 程国华,李雅蓉,刘兆玉,等. CENP-A通过调控PI3K/AKT/NF-κB信号通路对卵巢癌细胞侵袭、迁移的影响[J]. *中华内分泌外科杂志*, 2021, 15(3):248-253.

[8] 韩鹏黎,张晶敏,李凤梅. 靶向沉默FGF8b基因对卵巢癌SKOV-3细胞增殖和凋亡的影响[J]. *中华内分泌外科杂志*, 2018, 12(6):514-517.

[9] 徐文莉,林燕华,罗艺,等. 上皮性卵巢癌血浆中microRNA-30a-5p含量与分级及分期的关系[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2017, 9(6):381-385.

[10] 张高,周琴,季丹丹,等. 联合抗苗勒氏管激素、卵泡刺激素、雌二醇检测在诊断卵巢早衰中的应用价值分析[J]. *中国卫生检验杂志*, 2019, 29(11):1381-1383.

[11] Li S, Ji X, Wang R, et al. Follicle-stimulating hormone promoted pyruvate kinase isozyme type M2-induced glycolysis and proliferation of ovarian cancer cells [J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2019, 299(5):1443-1451.

[12] 闫晓楠,王英,展艳萍,等. 卵泡刺激素对上皮性卵巢癌细胞增殖凋亡的影响及其分子机制探讨[J]. *现代妇产科进展*, 2013, 22(9):708-712.

[13] Deng J, Bai X, Feng X, et al. Inhibition of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway alleviates ovarian cancer chemoresistance through reversing epithelial-mesenchymal transition and decreasing cancer stem cell marker expression [J]. *BMC Cancer*, 2019, 19(1):618.

[14] 徐利本,吴朝阳,王远东. PI3K/Akt信号传导通路在肿瘤发生发展及治疗中的作用[J]. *现代肿瘤医学*, 2021, 29(1):177-180.

[15] 刘亚利,王小霞,李红霞. PI3K/AKT/mTOR通路及其靶向治疗在卵巢癌中的研究进展[J]. *齐齐哈尔医学院学报*, 2020, 41(21):2710-2713.

MAIT细胞及其分泌因子表达与肺结核病情严重程度的关系

李福利 刘捷凌 冷霞 孙晓柯 阮祥林*

【摘要】 目的 探究血粘膜相关恒定T细胞(MAIT)及其分泌因子干扰素- γ (IFN- γ)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、颗粒酶B(Granzyme B)、白细胞介素17(IL-17)表达与肺结核患者病情严重程度的关系。方法 选取2017年1月至2019年3月入院的肺结核患者142例,根据患者肺结核的不同类型分组:初治组($n=68$)和复治组($n=74$),根据肺部病灶范围分组:A组(1~2个肺野)($n=62$)、B组(3~4个肺野)($n=45$)和C组(5~6个肺野)($n=35$),根据肺部是否有空洞分组:空洞组($n=59$)和无空洞组($n=83$)。并选取45例健康志愿者作为对照组,采用流式细胞仪检测各组外周血MAIT细胞及其分泌因子IFN- γ 、TNF- α 、Granzyme B及IL-17水平。结果 肺结核组患者外周血MAIT细胞比例、分泌IFN- γ 、TNF- α 及Granzyme B的MAIT细胞比例显著低于对照组,分泌IL-17的MAIT细胞比例显著高于对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。A组、B组及C组患者外周血MAIT细胞及其分泌细胞因子水平比较差异有统计学意义($P<0.05$),其中A组MAIT细胞及分泌IFN- γ 、TNF- α 及Granzyme B水平高于B组和C组,分泌IL-17水平低于B组和C组,差异均有统计学意义($P<0.05$),初治组与复治组、空洞组与无空洞组外周血MAIT细胞比例及其分泌细胞因子水平比较差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 肺结核患者外周血MAIT细胞功能存在明显缺陷,病灶范围较广的患者MAIT细胞功能缺陷更明显,临床检测MAIT细胞功能可为肺结核患者病情评估提供参考。

【关键词】 肺结核;粘膜相关恒定T细胞;分泌细胞因子;病情严重程度

The relationship between MAIT cells, their excreted factors and the severity of tuberculosis

LI Fuli, LIU Jiuling, LENG Xia, SUN Xiaoke, RUAN Xianglin*

(Department of the Third Ward of Tuberculosis, Henan Chest Hospital, Zhengzhou, Henan, China, 450003)

【ABSTRACT】 **Objective** To explore the relationship between expression of mucosal-associated invariant T (MAIT) cells, their excreted factors [interferon- γ (IFN- γ), tumor necrosis factor- α (TNF- α), granzyme B (Granzyme B), interleukin 17 (IL-17)] and the severity of tuberculosis patients. **Methods** A total of 142 tuberculosis patients who were admitted to the hospital from January 2017 to March 2019 were enrolled. According to different types of tuberculosis, they were divided into the initial treatment group ($n=68$) and the re-treatment group ($n=74$). According to the ranges of lung lesions, they were divided into group A (1-2 lung fields) ($n=62$), group B (3-4 lung fields) ($n=45$) and group C (5-6 lung fields) ($n=35$). According to presence or absence of lung cavities, they were divided into the cavity group ($n=59$) and the non-cavity group ($n=83$). Another 45 healthy volunteers were enrolled as the control group. The number of MAIT cells and their secreted factors (IFN- γ , TNF- α , Granzyme B, IL-17) in peripheral blood in each group were detected by flow cytometry. **Results** The proportions of MAIT cells in peripheral blood, and proportion of MAIT cells secreting IFN- γ , TNF- α and Granzyme B in the tuberculosis group were significantly lower than those in the control group, while the proportion of MAIT cells secreting IL-17 was significantly higher than that in the con-

基金项目:河南省卫生和计划生育委员会课题(wjlx2017056)

作者单位:河南省胸科医院结核内科三病区,河南,郑州 450003

*通信作者:阮祥林, E-mail: xkyyns@sina.com

trol group ($P < 0.05$). The differences in levels of MAIT cells and their excreted cytokines in groups A, B and C were statistically significant ($P < 0.05$). The levels of MAIT cells, IFN- γ , TNF- α and Granzyme B in group A were higher than those in groups B and C, while level of IL-17 was lower than that in groups B and C ($P < 0.05$). The differences in the proportion of MAIT cells and levels of their excreted cytokines between the initial treatment group and the re-treatment group, the cavity group and the non-cavity group were not statistically significant ($P > 0.05$). **Conclusion** There are obvious defects in the function of MAIT cells in the peripheral blood of pulmonary tuberculosis patients, and the functional defects of MAIT cells in patients with a wider range of lesions are more obvious. The clinical detection of MAIT cell function can provide a reference for the evaluation of the condition of pulmonary tuberculosis patients.

[KEY WORDS] Tuberculosis; Mucosal-associated invariant T cell; Secreted cytokine; Disease severity

肺结核是结核分枝杆菌感染肺部引起的呼吸系统疾病,属于慢性传染病^[1]。人体感染结核分枝杆菌不一定发病,90%以上的人群感染后可长期处于潜伏状态,但当机体抵抗力降低或细胞介导的变态反应增高时,会引起临床发病^[2]。因此,肺结核的发生发展不仅和结核分枝杆菌的数量和毒力有关,还与宿主自身免疫功能密切相关。现代免疫学研究也证实,复杂的细胞免疫调节系统与肺结核的病情发展有关^[3]。粘膜相关恒定T细胞(mucosal-associated invariant T cell, MAIT)是体内高度保守的天然免疫T细胞,在启动自身免疫活化,分泌效应分子对抗微生物感染中有重要的作用^[4-5]。越来越多的证据表明,MAIT细胞介导免疫反应在多种疾病的发生发展中有重要作用^[6-7]。本研究将通过检测肺结核患者外周血MAIT细胞及其分泌细胞因子水平,分析外周血MAIT细胞功能与患者病情严重程度的关系,以期进一步明确MAIT细胞与肺结核疾病进展的关系。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取2017年1月至2019年3月入院治疗的142例肺结核患者作为肺结核组。纳入标准:①肺结核的诊断标准参考《肺结核诊断的治疗指南》^[8];②年龄>18岁;③患者及家属自愿参与,且签署知情同意书。排除标准:①抗结核治疗应用免疫调节剂;②合并恶性肿瘤、自身免疫系统疾病等;③严重心、肝、肾功能不全;④孕妇和哺乳期女性;⑤存在认知障碍和沟通障碍。同时选取45例健康志愿者作为对照组。两组性别比例、年龄、体质指数比较差异无统计学意义($P > 0.05$),见表1。本研究已通过医院伦理委员会审批。

表1 两组患者基线资料比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	性别(男/女)	年龄(岁)	体质指数(kg/m ²)
肺结核组	142	82/60	47.29 \pm 7.21	23.59 \pm 2.15
对照组	45	24/21	46.83 \pm 8.16	23.82 \pm 2.26
t/ χ^2 值		0.271	0.361	0.618
P值		0.603	0.718	0.538

1.2 患者分组

肺结核患者入院后1周内完成胸片或胸部CT检查,并了解其相关病例资料。根据患者肺结核的不同类型,分为初治组($n=68$)和复治组($n=74$)。根据影像学表现分组:①肺部病灶范围分组:A组(1~2个肺野)($n=62$)、B组(3~4个肺野)($n=45$)和C组(5~6个肺野)($n=35$);②肺部是否有空洞分组:空洞组($n=59$)和无空洞组($n=83$)。

1.3 检测方法

采集受试者空腹肘部静脉血5 mL,抗凝处理后,加入淋巴细胞分离液分离单个核细胞,分别加入CD3、CD8、CD161抗体,常温下避光孵育30 min,清洗后上流式细胞仪(美国Beckman Coulter公司)进行检测,其中CD8⁺CD161⁺标记细胞即为MAIT。再分选上述MAIT细胞(密度 2×10^5 个/mL),分别加入干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、颗粒酶B(Granzyme B)及白细胞介素17(interleukin-17, IL-17)抗体,检测MAIT细胞中IFN- γ 、TNF- α 、Granzyme B及IL-17的表达,流式抗体均购自美国Santa Cruz公司。

1.4 统计学方法

采用SPSS 19.0软件进行数据分析,服从正态分布的计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,方差齐性两组比较采用t检验,多组比较采用单因素方差分析,组间两两分析采用SNK-q法;计数资料以n(%)表示,采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组外周血 MAIT 细胞及其分泌细胞因子水平比较

肺结核组患者外周血 MAIT 细胞比例、分泌 IFN- γ 、TNF- α 、Granzyme B 的 MAIT 细胞比例显著低于对照组,分泌 IL-17 的 MAIT 细胞比例显著高于对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 两组外周血 MAIT 细胞及其分泌细胞因子水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison on levels of MAIT cells and cytokines in peripheral blood between 2 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	MAIT 细胞 (%)	IFN- γ (%)	TNF- α (%)	Granzyme B (%)	IL-17 (%)
肺结核组	142	3.37 \pm 0.88	7.84 \pm 2.07	3.45 \pm 1.10	1.43 \pm 0.42	5.24 \pm 1.56
对照组	45	5.93 \pm 1.42	12.61 \pm 3.21	5.37 \pm 1.62	2.37 \pm 0.65	3.73 \pm 1.14
<i>t</i> 值		14.468	11.662	9.025	11.337	6.000
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

2.2 不同肺结核类型患者外周血 MAIT 细胞及其分泌细胞因子水平比较

初治组和复治组患者外周血 MAIT 细胞比例及其分泌细胞因子水平比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 3。

表 3 不同肺结核类型患者外周血 MAIT 细胞及其分泌细胞因子水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison on levels of MAIT cells and cytokines in peripheral blood among patients with different types of tuberculosis ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	MAIT 细胞 (%)	IFN- γ (%)	TNF- α (%)	Granzyme B (%)	IL-17 (%)
初治组	68	3.46 \pm 0.92	7.97 \pm 2.13	3.62 \pm 1.28	1.49 \pm 0.48	5.13 \pm 1.66
复治组	74	3.21 \pm 0.80	7.62 \pm 1.95	3.31 \pm 1.02	1.38 \pm 0.35	5.47 \pm 1.51
<i>t</i> 值		1.731	1.022	1.602	1.569	1.278
<i>P</i> 值		0.086	0.308	0.111	0.119	0.203

2.3 不同病灶范围患者外周血 MAIT 细胞及其分泌细胞因子水平比较

不同肺部病灶范围患者外周血 MAIT 细胞及其分泌细胞因子水平比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 5 不同空洞表现患者外周血 MAIT 细胞及其分泌细胞因子水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Comparison on levels of MAIT cells and cytokines in peripheral blood among patients with different cavity manifestations ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	MAIT 细胞 (%)	IFN- γ (%)	TNF- α (%)	Granzyme B (%)	IL-17 (%)
空洞组	59	3.27 \pm 0.79	7.71 \pm 1.84	3.31 \pm 0.95	1.41 \pm 0.48	5.53 \pm 1.43
无空洞组	83	3.52 \pm 0.92	8.05 \pm 2.26	3.62 \pm 1.18	1.45 \pm 0.40	5.11 \pm 1.72
<i>t</i> 值		1.690	0.952	1.669	0.540	1.536
<i>P</i> 值		0.093	0.342	0.097	0.590	0.127

其中 A 组 MAIT 细胞及分泌 IFN- γ 、TNF- α 及 Granzyme B 水平均高于 B 组和 C 组,分泌 IL-17 水平低于 B 组和 C 组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 4。

表 4 不同病灶范围患者外周血 MAIT 细胞及其分泌细胞因子水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Comparison on levels of MAIT cells and cytokines in peripheral blood among patients with different ranges of lesions ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	MAIT 细胞 (%)	IFN- γ (%)	TNF- α (%)	Granzyme B (%)	IL-17 (%)
A 组	62	3.81 \pm 1.02	8.43 \pm 2.51	4.37 \pm 1.35	1.73 \pm 0.52	4.65 \pm 1.42
B 组	45	3.29 \pm 0.75 ^a	7.19 \pm 1.98 ^a	3.16 \pm 1.02 ^a	1.32 \pm 0.41 ^a	5.53 \pm 1.78 ^a
C 组	35	2.63 \pm 0.70 ^{ab}	6.32 \pm 1.82 ^a	2.73 \pm 0.84 ^a	1.18 \pm 0.33 ^a	6.11 \pm 1.84 ^a
<i>F</i> 值		20.824	12.138	27.624	20.242	9.485
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与 A 组比较,^a $P < 0.05$;与 B 组比较,^b $P < 0.05$ 。

2.4 不同空洞表现患者外周血 MAIT 细胞及其分泌细胞因子水平比较

空洞组和无空洞组患者外周血 MAIT 细胞及其分泌细胞因子水平比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 5。

3 讨论

1993 年,MAIT 细胞首次在肠黏膜淋巴组织中被发现,其是一类表达半恒定 T 细胞受体的 T 淋巴细胞^[9]。不同于传统 T 淋巴细胞可表达多种 T 细胞受体识别多种抗原,MAIT 细胞仅能限制性识别主要组织相容性复合体 1b 分子,呈现出高度保守性^[10]。MAIT 细胞起源于造血干细胞,在人体血液和肝脏内数量丰富,可参与抵抗病原体、肠道免疫、维持上皮细胞稳态等过程。

近年来研究显示,MAIT 细胞在宿主防御感染性病原体的免疫反应中有重要的调控作用,可能是天然的、抗感染、抗炎因素^[11]。相关临床研究结果也显示,聚集于肠黏膜中的 MAIT 细胞在肠炎疾病中具有保护性作用^[12]。病原体入侵后,MAIT 细胞可以识别来源于细菌和酵母菌的抗原,活化后的

MAIT 细胞可聚集于感染灶,可迅速分泌细胞因子,主要是 IFN- γ 和 TNF- α ,杀伤受损的细胞,并调节树突状细胞等免疫细胞功能。MAIT 细胞是一种具有同源表型的细胞亚型,占人类外周血 T 细胞的 1%~10%^[13]。本研究结果这与既往研究报道感染性疾病患者外周血 MAIT 细胞的数量减少相符^[14]。但 MAIT 细胞在肺结核患者肺组织中的表达情况还不清楚,后期将努力收集其肺组织样本,观察 MAIT 细胞在感染部位免疫应答情况。

目前,MAIT 细胞对于铜绿假单胞菌、分支杆菌属的抗菌作用已在相关鼠类模型中明确,上述感染模型中 MAIT 细胞数量减少,而细菌负荷增加^[15],但 MAIT 细胞发挥抗菌活性的具体机制还不清楚。活化的 MAIT 细胞可迅速分泌细胞因子及细胞毒性产物,包括 IFN- γ 、TNF- α 、Granzyme B 及 IL-17 等。通过流式细胞术发现,肺结核患者外周血 MAIT 细胞分泌细胞因子功能也发生改变,分泌 IFN- γ 、TNF- α 及 Granzyme B 等细胞因子能力减弱,而分泌 IL-17 因子能力增强,这与报道指出 MAIT 细胞在不同疾病中呈现的功能不同相符^[16]。Böttcher 等^[17]研究报道,MAIT 细胞在疾病状态中分泌的细胞因子由 Th1 型转向 Th17 型,与本文结果相符。本研究分析结果进一步说明 MAIT 细胞及其功能与肺结核的进展密切相关。但本研究纳入病例数较少,后续将扩大样本量进行验证。

综上所述,肺结核患者外周血 MAIT 细胞功能存在明显缺陷,病灶范围较广的患者 MAIT 细胞功能缺陷更明显。但患者体内免疫调节网络是复杂、多面的,MAIT 细胞及其分泌因子在不同疾病状态下所起的作用也不尽相同。MAIT 细胞在肺结核中的作用机制尚未彻底明确,仍需进一步研究阐明其免疫机制。MAIT 细胞功能应用于肺结核病情判断和相关治疗将是本课题未来的研究方向。

参考文献

- [1] 王月彩,戎燕筱,王显雷,等.肺结核感染患者中 TRF、IAP 及 HMGB1 的表达及意义[J].分子诊断与治疗杂志,2021,13(4):643-646+650.
- [2] Chen B, Gu H, Wang X, et al. Prevalence and determinants of latent tuberculosis infection among frontline tuberculosis healthcare workers in southeastern China: A multilevel analysis by individuals and health facilities [J]. *Int J Infect Dis*, 2019, 79:26-33.
- [3] Yoon-Tae C, Virginia P, Jurado JO, et al. Elevated cyclic AMP inhibits mycobacterium tuberculosis -stimulated T-cell IFN- γ secretion through type I protein kinase A [J]. *J Infect Dis*, 2018, 217(11):1821-1831.
- [4] Shey MS, Balfour A, Wilkinson KA, et al. Contribution of APCs to mucosal-associated invariant T cell activation in infectious disease and cancer [J]. *Innate Immun*, 2018, 24(4):192-202.
- [5] 黄倩,王玉芝,李璐希,等. MAIT 在自身免疫性疾病中的研究进展[J].中国免疫学杂志,2019,35(1):111-115.
- [6] Cocker ATH, Greathead L, Herasimtschuk AA, et al. Therapeutic immunisation benefits mucosal-associated invariant T-cell recovery in contrast to IL-2, GM-CSF, and rhGH addition in HIV-1+ treated patients: Individual case reports from phase I trial [J]. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2019, 35(3):306-309.
- [7] 薛红,汪洋,邵建国,等.黏膜相关恒定 T 细胞在肝脏疾病发生发展中的作用研究进展[J].山东医药,2017,57(31):116-119.
- [8] 张培元.肺结核诊断和治疗指南[J].中华结核和呼吸杂志,2004,24(2):70-74.
- [9] Chen Z, Wang H, D'Souza C, et al. Mucosal-associated invariant T-cell activation and accumulation after in vivo infection depends on microbial riboflavin synthesis and co-stimulatory signals [J]. *Mucosal Immunol*, 2017, 10(1):58-68.
- [10] Bhattacharyya A, Hanafi LA, Sheih A, et al. Graft-derived reconstitution of mucosal-associated invariant T cells after allogeneic hematopoietic cell transplantation [J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2018, 24(2):242-251.
- [11] 毛玉林,陆珠凤,黄俊峰,等.黏膜相关恒定 T 细胞水平在脓毒症患者中的临床意义[J].中国感染与化疗杂志,2017,17(4):376-381.
- [12] Serriari NE, Eoche M, Lamotte L, et al. Innate mucosal-associated invariant T (MAIT) cells are activated in inflammatory bowel diseases [J]. *Clin Exp Immunol*, 2014, 176(2):266-274.
- [13] Novak J, Dobrovolny J, Brozova J, et al. Recovery of mucosal-associated invariant T cells after myeloablative chemotherapy and autologous peripheral blood stem cell transplantation [J]. *Clin Exp Med*, 2016, 16(4):529-537.
- [14] Wallington JC, Williams AP, Staples KJ, et al. IL-12 and IL-7 synergize to control mucosal-associated invariant T-cell cytotoxic responses to bacterial infection [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2018, 141(6):2182-2195.
- [15] Smith DJ, Hill GR, Bell SC, et al. Reduced mucosal associated invariant T-cells are associated with increased disease severity and *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis [J]. *Plos One*, 2014, 9(10):e109891.
- [16] 陈勇,李博,魏怡然,等.免疫球蛋白 G4 相关硬化性胆管炎中黏膜相关恒定 T 细胞的免疫生物学特性[J].国际消化病杂志,2019,39(2):96-101.
- [17] Böttcher K, Rombouts K, Saffioti F, et al. MAIT cells are chronically activated in patients with autoimmune liver disease and promote profibrogenic hepatic stellate cell activation [J]. *Hepatology*, 2018, 68(1):172-186.

仰卧位手法牵引对神经根型颈椎病患者血清炎症因子的影响

马军廷 张振国* 袁燕 姬生辉

[摘要] **目的** 观察仰卧位手法牵引治疗对神经根型颈椎病(CSR)患者血清炎症因子的影响。**方法** 随机选取本院103例CSR患者为研究对象,按照随机数字表法分为观察组($n=52$)和对照组($n=51$),对照组给予药物及颈部按摩治疗,观察组在对照组基础上加以仰卧位手法牵引治疗。比较两组治疗前后颈椎功能、血清IL-1 β 、IL-8、NF- κ B水平、症状体征改善及临床疗效。**结果** 与治疗前相比,治疗4周及随访3个月后,两组视觉模拟评分法(VAS)、颈椎功能障碍指数评分量表(NDI)评分均显著降低,颈椎病疗效评定标准(JOA)评分均显著升高,两组临床症状评分均显著降低,且治疗后组间比较差异均有统计学意义($P<0.05$)。治疗4周后,两组血清IL-1、IL-8、NF- κ B水平均显著降低,差异均有统计学意义($P<0.05$)。与治疗前相比,治疗4周及随访3个月后,两组临床症状评分均显著降低,且治疗后组间比较差异均有统计学意义($P<0.05$)。观察组愈显率、总有效率均高于对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 仰卧位手法牵引治疗可明显改善CSR患者腰椎功能和症状体征,纠正血清炎症因子水平,具有一定的效果,值得推荐。

[关键词] 神经根型颈椎病; 颈椎功能; NDI评分; 白介素-1 β ; 白介素-8

Effect of supine manipulation traction on serum inflammatory cytokines in patients with cervical spondylotic radiculopathy

MA Juntong, ZHANG Zhenguo*, YUAN Yan, JI Shenghui

(Department of Rehabilitation Medicine, Liaocheng People's Hospital, Liaocheng, Shandong, China, 252000)

[ABSTRACT] **Objective** To observe the effect of manual traction therapy in supine position on serum inflammatory factors in patients with cervical spondylotic radiculopathy (CSR). **Methods** 103 CSR patients in the hospital were randomly selected as the research subjects, and they were divided into the observation group ($n=52$) and the control group ($n=51$) according to the random number table method. The control group was given drugs and neck massage, and the observation group applied supine manipulation traction on the basis of the control group. The cervical spine function, the levels of IL-1 β , IL-8 and NF- κ B, improvement status of symptoms and signs and clinical efficacy were compared between the two groups before and after treatment. **Results** After 4 weeks of treatment and 3 months of follow-up, the scores of visual analogue scale (VAS) and neck disability index (NDI) in the two groups were significantly reduced while the score of Japanese Orthopedic Association (JOA) was significantly increased, the scores of clinical symptoms were significantly reduced compared with before treatment, and the differences between the groups after treatment were statistically significant ($P<0.05$). After 4 weeks of treatment, the levels of serum IL-1, IL-8 and NF- κ B in the two groups were significantly reduced, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). Compared with before treatment, after 4 weeks of treatment and 3 months of follow-up, the clinical symptom scores of the two groups were significantly reduced, and the differences between the groups after treatment

基金项目:山东省医药卫生科技发展计划面上项目(2018 HW032)

作者单位:聊城市人民医院康复医学科,山东,聊城 252000

*通信作者:张振国, E-mail: mjt6@163.com

were statistically significant ($P < 0.05$). The recovery rate and total effective rate of the observation group were higher than those of the control group, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion**

Supine manipulation traction can significantly improve the lumbar function, symptoms and signs of CSR patients, and correct the levels of serum inflammatory factors in CSR patients CSR. It has a certain effect and is worth recommending.

[KEY WORDS] Cervical spondylotic radiculopathy; Cervical spine function; NDI score; Interleukin-1 β ; Interleukin-8

神经根型颈椎病(cervical spondylotic radiculopathy, CSR)是颈椎疾病的一种,多由单侧或双侧脊神经根遭受压迫或刺激所致,发病原因与年龄、外伤或软组织劳损、生活习惯等因素相关,主要表现为颈部及上身组织僵硬、麻胀感、局部组织炎症等,严重者还伴随部分组织感觉及功能障碍,严重影响患者正常生活^[1]。研究发现,颈椎疾病与机体炎症因子的表达有关,其中颈椎生理疼痛可刺激机体促炎因子活化,并促进白介素-1 β (Interleukin-1 β , IL-1 β)、白细胞介素-8(Interleukin-8, IL-8)等炎症因子的表达^[2]。临床上药物治疗可在一定程度上起到缓解疼痛及肌肉痉挛的作用,但对组织功能及机体炎症的改善效果有限,且长期用药存在毒副作用,因而需采取有效的辅助治疗手段促进患者颈肩功能恢复。仰卧位手法牵引治疗是通过拉伸锻炼组织的方法松弛肌肉、神经,以增加局部组织血液流通,缓解神经压迫,进而促进组织功能恢复,临床上广泛应用于身体机能恢复锻炼中^[3]。本研究主要探究仰卧位手法牵引治疗 CSR 效果,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

随机选取 2019 年 3 月至 2020 年 1 月期间本院收治的 103 例 CSR 患者为研究对象。纳入标准:①符合《颈椎病诊治与康复指南》^[4]中相关诊断标准;②年龄 40~70 岁;③认知功能正常;④研究经医院伦理会批准,所有患者均签署知情同意书。排除标准:①严重肝肾等脏器功能障碍者;②骨质疏松等其他关节疾病、有颈椎外伤史者;③合并心脑血管疾病患者。按照随机数字表法分为观察组和对照组,两组一般资料比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

1.2 治疗方法

对照组:给予盐酸乙哌立松(卫材药业,国药准字 H20133175)、塞来昔布(G.D.Searle LLC,美

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

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

组别	n	性别		年龄(岁)	病程(年)
		男	女		
观察组	52	44(84.62)	8(15.38)	49.47 \pm 4.32	2.16 \pm 0.42
对照组	51	44(86.27)	7(13.73)	50.13 \pm 4.56	2.27 \pm 0.41
χ^2 值		0.02		0.75	1.34
P值		0.893		0.453	0.182

国,国药准字 J20140072)基础药物治疗。盐酸乙哌立松口服一日 3 次,每次 1 片,饭后服用;塞来昔布,一日 2 次,每次 1 片,与食物同服。颈部按摩:康复治疗师抚摩、推搓患者颈肩部并逐步延伸至肩臂,力度以患者感觉适中为宜,时间为 5~10 min;按摩结束后轻轻拍打患者颈肩部以松弛肌肉,时间为 3 min。每天 1 次,连续治疗 4 周。

观察组:在对照组基础上加以仰卧位手法牵引治疗,操作如下:①颈肩拉伸牵引,患者取仰卧位,康复治疗师两手分别置于患者后颈及下颌处,缓缓发力牵引,力度可根据患者感觉进行调整,持续牵引 2~3 min;②颈肩旋转牵引,康复治疗师两手分别置于患者后颈及下颌部位,缓缓转动颈部向两侧牵引,牵引力度及角度根据患者体感调整,每侧持续牵引 1~2 min。③神经放松,患者颈部枕软枕,康复治疗师轻轻按揉颈肩及头颈部以松弛肌肉、舒缓神经,持续按摩 20 min。每周治疗 2~3 次,共治疗 4 周。

1.3 疗效评估

1.3.1 颈肩功能^[5-7]

治疗前后分别采用视觉模拟评分法(visual analogue scale, VAS)、颈椎功能障碍指数评分量表(The Neck Disability Index, NDI)、日本整形外科学会(Japanese Orthopedic Association, JOA)评估两组颈肩功能。

1.3.2 血清炎症因子检测

分别于治疗前 1 天及治疗结束 1 天后,取患者清晨空腹静脉血 3~5 mL,采用酶联免疫吸附测定

法测定两组血清 IL-1 β 、IL-8 及核因子- κ B (Nuclear factor-k-gene binding, NF- κ B) 水平,试剂盒均购自武汉三鹰生物技术有限公司,检测用多功能酶标仪购自江苏英诺华医疗技术有限公司。

1.3.3 症状体征评估

参照《颈椎疾病临床评价量表的信度与效度研究》^[8]中颈椎疾病的临床症状评分标准进行评分,根据症状的严重程度依次给予 0、2、4 分,分值越高症状越严重。

1.3.4 临床疗效评估

治疗后,参照《中医病症诊断疗效标准》^[9]评估两组疗效,治愈:主要症状消失,颈肩部功能基本恢复;显效:症状基本消失,颈肩部位功能显著改善;有效:部分症状改善,颈肩部位功能部分恢复,不影响正常活动;无效:临床症状无改善,正常活动受限。愈显率=痊愈+显效,总有效率=痊愈+显效+有效。

1.4 统计学处理

采用统计软件 SPSS 19.0 处理数据,计数资料采用 $n(\%)$ 表示,采用 χ^2 检验,计量资料采用 $(\bar{x} \pm s)$

表示,采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 颈椎功能比较

与治疗前相比,治疗 4 周及随访 3 个月后,两组 VAS、NDI 评分均显著降低 ($P < 0.05$),JOA 评分均显著升高 ($P < 0.05$),且治疗后组间比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。

2.2 血清炎症因子水平比较

治疗 4 周后,两组血清 IL-1 β 、IL-8、NF- κ B 水平均显著降低 ($P < 0.05$),且治疗后组间比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 3。

2.3 症状体征比较

与治疗前相比,治疗 4 周及随访 3 个月后,两组临床症状评分均显著降低 ($P < 0.05$),且治疗后组间比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 4。

2.4 临床疗效比较

治疗后,观察组愈显率、总有效率均高于对照组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 5。

表 2 两组颈椎功能比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of cervical spine function between the two groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	VAS 评分(分)			NDI 评分(分)			JOA 评分(分)		
	治疗前	治疗 4 周后	随访 3 个月	治疗前	治疗 4 周后	随访 3 个月	治疗前	治疗 4 周后	随访 3 个月
观察组	6.78 \pm 2.12	3.86 \pm 1.03 ^a	2.14 \pm 0.57 ^{ab}	36.72 \pm 7.21	19.26 \pm 4.33 ^{ab}	12.47 \pm 3.36 ^{ab}	8.82 \pm 2.11	14.67 \pm 3.44 ^{ab}	15.58 \pm 3.67 ^{ab}
对照组	7.13 \pm 2.15	4.74 \pm 1.22 ^a	3.43 \pm 0.57 ^{ab}	37.28 \pm 6.89	26.59 \pm 4.22 ^{ab}	17.59 \pm 4.16 ^{ab}	8.34 \pm 2.05	10.22 \pm 2.51 ^{ab}	12.22 \pm 3.13 ^{ab}
t 值	0.83	3.96	11.48	0.40	8.70	6.88	1.17	7.49	4.99
P 值	0.407	<0.001	<0.001	0.688	<0.001	<0.001	0.244	<0.001	<0.001

注:与同组治疗前比较,^a $P < 0.05$;与同组治疗 4 周后比较,^b $P < 0.05$ 。

表 3 两组治疗前后血清炎症因子比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of serum inflammatory factors between the two groups before and after treatment ($\bar{x} \pm s$)

组别	IL-1 β (μ g/mL)		IL-8(μ g/L)		NF- κ B (ng/mL)	
	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
观察组	81.51 \pm 12.42	36.47 \pm 8.82 ^a	29.52 \pm 3.29	24.63 \pm 2.48 ^a	12.36 \pm 2.32	5.33 \pm 1.42 ^a
对照组	80.73 \pm 12.33	48.66 \pm 7.59 ^a	28.81 \pm 3.77	27.26 \pm 3.43 ^a	11.57 \pm 2.66	8.61 \pm 2.07 ^a
t 值	0.32	7.51	1.02	4.47	1.61	9.39
P 值	0.752	<0.001	0.311	<0.001	0.111	<0.001

注:与同组治疗前比较,^a $P < 0.05$ 。

表 4 两组症状体征比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Comparison of symptoms and signs between the two groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	颈肩背痛			上肢麻木			上肢皮肤感觉减退			肌肉压痛和紧张度		
	治疗前	治疗 4 周后	随访 3 个月	治疗前	治疗 4 周后	随访 3 个月	治疗前	治疗 4 周后	随访 3 个月	治疗前	治疗 4 周后	随访 3 个月
观察组	2.62 \pm 0.46	1.02 \pm 0.31 ^a	0.71 \pm 0.16 ^{ab}	2.87 \pm 0.49	1.84 \pm 0.51 ^a	1.47 \pm 0.35 ^{ab}	3.58 \pm 1.03	2.31 \pm 0.56 ^a	1.89 \pm 0.46 ^{ab}	3.47 \pm 0.88	2.31 \pm 0.47 ^a	1.83 \pm 0.55 ^{ab}
对照组	2.54 \pm 0.43	1.53 \pm 0.35 ^a	1.23 \pm 0.22 ^{ab}	2.73 \pm 0.51	2.21 \pm 0.62 ^a	2.03 \pm 0.36 ^{ab}	3.42 \pm 0.98	2.79 \pm 0.63 ^a	2.45 \pm 0.44 ^{ab}	3.52 \pm 0.74	2.89 \pm 0.64 ^a	2.28 \pm 0.74 ^{ab}
t 值	0.91	7.83	13.74	1.42	3.31	8.01	0.81	4.09	6.31	0.31	5.25	3.51
P 值	0.364	<0.001	<0.001	0.160	0.001	<0.001	0.420	<0.001	<0.001	0.760	<0.001	0.001

注:与同组治疗前比较,^a $P < 0.05$;与同组治疗 4 周后比较,^b $P < 0.05$ 。

表5 两组临床疗效比较 [n(%)]

Table 5 Comparison of clinical efficacy between the two groups [n(%)]

组别	n	痊愈	显效	有效	无效	愈显率	总有效
观察组	52	15(28.85)	24(46.15)	11(21.15)	2(3.85)	39(75.00)	50(96.15)
对照组	51	8(15.69)	20(39.21)	15(29.41)	8(15.69)	28(54.90)	43(84.31)
χ^2 值			2.44			6.52	8.15
P值			0.015			0.011	0.004

3 讨论

CSR属于根性痛,其发病机制一方面是由于骨质增生或椎体破坏压迫神经导致组织疼痛、麻木,另一方面与关节外软组织损伤及无菌性炎症引起的组织缺氧或神经损伤有关。研究发现,椎间盘神经部位损伤可加速炎症因子释放,促使血管通透性增强及血管内径减小,进而引发神经、血管炎症^[10]。药物治疗多侧重消除组织炎症、缓解组织疼痛,而无法改善患者身体机能障碍,因而治疗后有复发风险,故寻求有效的联合治疗方法提高治疗效果十分必要。

研究显示,仰卧位手法牵引疗法配合药物治疗CSR能有效降低药物副作用风险,具有操作简单,见效快等特点^[11]。本研究采用仰卧位手法牵引疗法对本院CSR患者实施治疗,发现治疗4周后,患者颈肩功能显著改善,证实其辅助治疗CSR的有效性。许鸿智等^[12]人采用仰卧前屈拔伸牵引治疗脊髓压迫CSR患者后,患者疼痛症状显著减轻,颈椎功能显著增强。本研究中,治疗后患者疼痛评分显著降低,颈椎功能障碍显著改善,与上述研究结果一致,说明仰卧位手法牵引疗法有助于促进颈部肌肉、组织的拉伸,改善颈部肌肉僵直、疼痛感,促进颈椎功能恢复。

研究发现,炎症因子在CSR发病过程中发挥重要作用,患者颈肩局部炎性渗出可引发组织水肿、粘连、挛缩。IL-1 β 是炎症诱导因子之一,可通过调节软骨细胞功能,促进软骨代谢,加快软骨组织退化。IL-8在椎间盘突出细胞中表达水平显著增加,研究认为其与颈肩、脊椎等骨科疾病的发生有关^[13]。NF- κ B是一种促炎因子,参与机体防御反应,可通过激活多种炎症通路,刺激炎症因子表达。本研究结果显示,治疗后患者血清IL-1 β 、IL-8、以及NF- κ B水平均显著降低,分析是仰卧位手法牵引疗法通过舒缓颈肩肌肉及关节,促使颈肩组织代谢加快,增强免疫,机体炎症得以控制。胡文杰等人^[14]采用拔伸旋转整脊手法联合颈椎牵引疗法

治疗CSR后,发现可显著缓解患者疼痛,改善临床症状,提高患者生活质量,与本研究结果相似。

在临床症状及疗效方面,本研究结果显示,治疗4周及随访3个月内,两组患者颈肩背痛、上肢麻木、上肢皮肤感觉减退、肌肉压痛和紧张度等临床症状均显著改善,提示仰卧位手法牵引疗法在改善CSR临床症状及预后效果均较好。学者侯平选^[15]研究发现与坐卧位相比,仰卧位牵引疗法治疗颈椎不稳症疗效更佳,对改善临床症状及促进血液循环等方面的效果更好,与本研究结果一致。

综上所述,仰卧位手法牵引治疗可明显改善CSR患者腰椎功能和症状体征,纠正血清炎症因子水平,具有一定的效果,值得推荐。

参考文献

- [1] 瞿强. 神经根型颈椎病的治疗研究进展[J]. 医学理论与实践, 2020, 33(3): 377-378+384.
- [2] 任晓兵, 钟勇, 陈广福, 等. 弥漫性轴索损伤患者血清MBP、IL-1 β 、IL-8及TNF- α 水平的表达及临床意义[J]. 现代生物医学进展, 2018, 18(20): 3972-3975.
- [3] Gutman G, Rosenzweig DH, Golan JD. Surgical Treatment of Cervical Radiculopathy: Meta-analysis of Randomized Controlled Trials[J]. Spine, 2018, 43(6): 365-372.
- [4] 胡松峰, 夏炳江, 胡广操, 等. 天元经络调理术治疗神经根型颈椎病35例[J]. 浙江中医杂志, 2018, 53(9): 665.
- [5] Goel A, Dharurkar P, Shah A, et al. Facetal Fixation Arthrodesis as Treatment of Cervical Radiculopathy[J]. World Neurosurg, 2019, 121: 875-881.
- [6] Chang LM, Zhen MD, Jin HM, et al. Evaluation of Anterior Decompression Surgical Outcomes of Proximal-Type Cervical Spondylotic Amyotrophy: A Retrospective Study[J]. Orthop Surg, 2020, 12(3): 734-740.
- [7] Byung W C, Sung K, Dong L, et al. Cervical radiculopathy combined with cervical myelopathy: prevalence and characteristics[J]. Eur J Orthop Surg Traumatol, 2017, 27(7): 889-893.
- [8] 郭辉, 吴致力, 支满霞. 颈椎旁注射络宁复合液配合仰卧位手法牵引治疗神经根型颈椎病临床观察[J]. 世界中西医结合杂志, 2018, 13(8): 1143-1146.

(下转第1493页)

肩袖损伤患者 TNF- α 、IL-1 β 及 IL-10 表达及与肩部疼痛的相关性

李美慧¹ 伊斯哈尔巴拉提² 卢爽^{3*}

[摘要] **目的** 分析肩袖损伤患者肩峰下滑囊(SAB)组织中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素-1 β (IL-1 β)及白细胞介素-10(IL-10)表达及与肩部疼痛的相关性。**方法** 选取2018年1月至2021年1月本院收治的因肩袖损伤或创伤性肩关节前方不稳定进行手术治疗的166例患者,其中85例肩袖损伤患者作为肩袖损伤组,81例创伤性肩关节前方不稳定患者作为肩关节不稳组。比较两组视觉模拟(VAS)评分及TNF- α 、IL-1 β 、IL-10水平变化情况,采用Pearson相关分析法,绘制散点图分析肩关节疼痛VAS评分与肩袖损伤患者TNF- α 、IL-1 β 及IL-10的相关性。**结果** 两组性别、年龄、病程及体重指数等一般资料比较差异无统计学意义($P>0.05$)。肩袖损伤组VAS评分及TNF- α 、IL-1 β 水平均显著高于肩关节不稳组,IL-10水平显著低于肩关节不稳组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。Pearson相关性分析结果显示,肩关节疼痛VAS评分与肩峰下滑囊组织中TNF- α 、IL-1 β 水平均呈正相关($P<0.05$),与IL-10水平呈显著负相关($P<0.05$)。**结论** 肩袖损伤患者SAB组织中TNF- α 、IL-1 β 及IL-10水平均发生异常改变,可能是肩袖损伤后引起肩关节疼痛的发病机制之一。

[关键词] 肩袖损伤;肩峰下滑囊组织;肿瘤坏死因子- α ;白细胞介素-1 β ;白细胞介素-10

Expression of TNF- α , IL-1 β and IL-10 in patients with rotator cuff injury and their correlation with shoulder pain

LI Meihui¹, ISHAR Balati², LU Shuang^{3*}

(1. Department of Hand & Foot Microsurgery, Children's Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi, Xinjiang, China, 830000; 2. Department of Neurosurgery, Children's Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi, Xinjiang, China, 830000; 3. Department of Hepatobiliary Surgery, People's Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi, Xinjiang, China, 830001)

[ABSTRACT] **Objective** To analyze the expression of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β) and interleukin-10 (IL-10) in the subacromial bursa (SAB) tissue of patients with rotator cuff injury and their correlation with shoulder pain. **Method** The clinical data of 166 patients who were treated with surgery for rotator cuff injury or anterior instability of traumatic shoulder joint from January 2018 to January 2021 in our hospital were collected [85 cases with rotator cuff injury (rotator cuff injury group), 81 cases with anterior instability of traumatic shoulder joint (shoulder joint instability group)]. The visual analogy score (VAS) score and the changes of TNF- α , IL-1 β , and IL-10 levels between the two groups were compared. The Pearson correlation analysis method was used, and the scatter diagram was drawn to analyze the correlation between the VAS score of shoulder joint pain and TNF- α , IL-1 β and IL-10 in patients with rotator cuff injury. **Result** The VAS score and TNF- α and IL-1 β levels in the rotator cuff injury group were significantly

基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金(2018D01C015)

作者单位:1. 新疆维吾尔自治区儿童医院手足显微外科,新疆,乌鲁木齐 830000

2. 新疆维吾尔自治区儿童医院神经外科,新疆,乌鲁木齐 830000

3. 新疆维吾尔自治区人民医院肝胆外科,新疆,乌鲁木齐 830001

*通信作者:卢爽, E-mail:41553982@qq.com

higher than those in the shoulder joint instability group, and the IL-10 level was significantly lower than that in the shoulder joint instability group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The results of Pearson correlation analysis showed that the VAS score of shoulder joint pain was positively correlated with the levels of TNF- α and IL-1 β in the subacromial bursa ($P < 0.05$), and was significantly negatively correlated with the level of IL-10 ($P < 0.05$). **Conclusion** Abnormal changes in TNF- α , IL-1 β and IL-10 levels in SAB tissues of patients with rotator cuff injury may be one of the pathogenesis of shoulder joint pain after rotator cuff injury.

[KEY WORDS] Rotator cuff injury; Subacromial bursa; Tumor necrosis factor- α ; Interleukin-1 β ; Interleukin-10

肩关节疼痛是临床常见的一种疾病,肩袖损伤是导致肩关节疼痛的主要原因之一^[1]。肩袖损伤发生率与年龄增长成正比,部分肩袖损伤患者可终身无症状。目前有关肩袖损伤引起肩关节疼痛的病因尚未十分明确^[2]。有学者认为肩峰下滑囊(Subacromial bursa, SAB)炎症反应与肩袖损伤患者肩关节疼痛密切相关^[3]。亦有研究显示,仅存在肩关节前方不稳定而无肩袖损伤患者,损伤较少累及肩峰下滑囊组织^[4]。本研究将通过对比肩袖损伤患者及仅存在肩关节前方不稳定而无肩袖损伤患者的肩部疼痛程度及SAB组织中炎性因子表达情况进行检测,以探讨肩袖损伤患者SAB组织中炎症反应与肩部疼痛的关系。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集2018年1月至2021年1月本院收治的166例因肩袖损伤或创伤性肩关节前方不稳定进行手术治疗的患者。纳入标准:①均符合肩袖损伤或创伤性肩关节前方不稳定相关诊断标准^[5],因肩袖损伤或创伤性肩关节前方不稳定进行手术治疗者;②临床资料无丢失和缺损;③具有良好的依从性。排除标准:①肩袖损伤合并创伤性肩关节前方不稳定或其他肩关节疾病者;②合并心脑血管、肝肾或造血系统等严重原发性疾病者;③合并免疫系统及全身炎症疾病者;④合并急慢性感染病史。

其中肩袖损伤85例(肩袖损伤组),创伤性肩关节前方不稳定81例(肩关节不稳组)。肩袖损伤组,男45例,女40例,平均年龄(41.18±5.58)岁。肩关节不稳组,男性41例,女性40例,平均年龄(40.57±6.19)岁。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

所有受检者均于术中取肩峰下滑囊组织,采

用PBS缓冲液反复冲洗,风干后进行称重,每100 mg滑膜组织中加入1 mL生理盐水,碾碎后制成组织匀浆。随后转速3 000 r/min,离心10 min,离心半径10 cm;抽取上清液,置于-70℃保存。肿瘤坏死因子- α (Tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-1 β (Interleukin-1 β , IL-1 β)及白细胞介素-10(Interleukin-10, IL-10)均采用酶联免疫吸附法进行检查,试剂盒购自MultiSciences公司,具体操作严格按照说明书执行。

肩部疼痛程度^[6]:术前采用视觉模拟评分法(Visual analogy score, VAS)评估两组患者肩部疼痛程度。总分10分,0分表现无疼痛,10分为疼痛剧烈,评估由同一医师操作。

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($\bar{x} \pm s$)描述,采用 t 检验;相关性采用Pearson相关分析法,并绘制散点图,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、病程及体重指数等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 the two groups

组别	n	性别 (男/女)	($\bar{x} \pm s$)		
			平均年龄 (岁)	体重指数 (kg/m ²)	病程 (年)
肩袖损伤组	85	40/45	41.18±5.58	22.64±4.24	1.26±0.55
肩关节不稳组	81	41/40	40.57±6.19	21.89±3.87	1.20±0.32
t/χ^2 值		0.210	0.667	1.198	0.854
P值		0.647	0.505	0.233	0.395

2.2 两组VAS评分及TNF- α 、IL-1 β 、IL-10水平比较

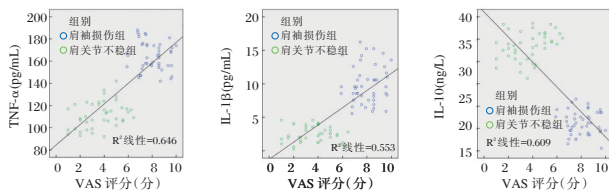
肩袖损伤组VAS评分及TNF- α 、IL-1 β 水平均显著高于肩关节不稳组,IL-10水平显著低于肩关节不稳组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表2。

表2 两组VAS评分及TNF- α 、IL-1 β 、IL-10水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	VAS评分 (分)	TNF- α (pg/mL)	IL-1 β (pg/mL)	IL-10 (ng/L)
肩袖损伤组	85	6.69 \pm 1.02	188.05 \pm 39.53	4.39 \pm 0.77	18.65 \pm 3.78
肩关节不稳组	81	4.29 \pm 0.63	114.08 \pm 16.13	2.56 \pm 0.51	29.11 \pm 5.47
t值		18.134	15.644	17.961	14.390
χ^2 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

2.3 肩关节疼痛VAS评分与肩峰下滑囊组织中各因子相关性分析

肩关节疼痛VAS评分与肩峰下滑囊组织中TNF- α 、IL-1 β 水平均呈正相关($r_1=0.841, r_2=0.834, P<0.05$),与IL-10水平呈显著负相关($r=0.758, P<0.05$)。见图1。

图1 TNF- α 、IL-1 β 及IL-10与VAS评分散点图Figure 1 Scatter chart of TNF- α , IL-1 β , IL-10 and VAS scores

3 讨论

肩袖损伤机制可分为急性损伤和慢性劳损伤,目前由于临床医生对该病认识不足,漏诊、误诊率较高。肩袖损伤易导致肩关节疼痛,患者也常因肩痛而导致肩关节功能丧失^[7]。国外研究采用超声波对成年人进行流行病学调查,结果发现50岁以上肩袖撕裂发生率明显增加,70岁时可高达80%以上,80岁可高达80%^[8-9]。但Kennedy等^[10]研究指出,大部分肩部疼痛明显的患者,其MRI上却未显示明显的肩袖损伤,而一些MRI显示肩袖完全撕裂的患者,肩部疼痛却不明显。因此,探讨肩袖损伤疼痛的原因具有重要临床价值。

目前,临床有关肩袖损伤患者疼痛的机制尚未明确,对其疼痛机制的研究主要集中在炎症性疼痛与神经源性疼痛两个方面^[11]。炎症是机体对体内外致炎因素引起的损伤所发生的防御反应^[12]。国内外研究发现,肩关节疼痛的发生、发展与SAB的炎症具有一定关系^[13]。TNF- α 、IL-1 β 及IL-10等炎症因子已被证实与疼痛有关,同时

在肩袖损伤患者的肩袖与SAB中可检测到炎症因子的存在^[14]。

Morita等^[15]通过对肩袖损伤患者SAB进行活检组织学发现,与对照组相比,肩峰撞击综合征和肩袖损伤患者的急慢性炎症因子相比较而言在组织学上更常见,而且这种细胞因子水平的高低与损伤的严重程度相关,翻修手术与全层肩袖撕裂患者中表达水平更高。Amaral等^[16]研究亦指出,肩袖损伤患者的SAB组织中存在炎症反应,且这些炎症细胞中加入地拉米松等药物治疗后,炎症因子表达会降低或升高。本研究结果显示,与肩关节不稳组相比,肩袖损伤组VAS评分及TNF- α 、IL-1 β 水平更高,IL-10水平更低;与创伤性肩关节前方不稳定相比,肩袖损伤患者的肩峰下滑囊组织炎症反应更显著,肩部疼痛亦更加显著。TNF- α 由单核-巨噬细胞系统产生及分泌,是炎症反应的起始因子,可刺激机体合成大量的促炎因子,引起炎症细胞移动,主要通过刺激滑膜细胞和软骨细胞合成前列腺素E2和胶原酶,引起疼痛^[17]。TNF- α 亦可通过刺激神经生长因子的合成与释放,引起疼痛。IL-1 β 是IL-1基因编码的亚型之一,作为IL-1的主要活化形式,是一种特异性的敏感炎症指标^[18]。IL-1 β 可由纤维母细胞、软骨细胞产生,能促进细胞浸润引起炎症和组织损伤,能增加前列腺素E2的表达,而后者具有极强的致炎作用,高浓度时可以引起疼痛^[19]。IL-10是机体内重要的抗炎因子,可有效抑制炎症细胞迁移与粘附,又可抑制炎症因子的合成与释放。Apryani等^[20]研究发现,SAB组织同骨关节炎滑膜具有相似的滑膜细胞微环境(基质细胞、成纤维细胞样滑膜细胞),相似的细胞类型和病理特征,认为IL-10可能与肩袖损伤患者SAB发生病理改变有关。本研究进一步分析肩袖损伤患者肩峰下滑囊组织中TNF- α 、IL-1 β 及IL-10水平与其肩关节疼痛程度发现,TNF- α 、IL-1 β 水平与其肩关节疼痛程度呈正相关,IL-10水平与其肩关节疼痛程度呈负相关,提示肩袖损伤导致的SAB慢性炎症反应是导致肩袖疾病患者肩痛的重要原因。

综上,肩袖损伤患者SAB组织中TNF- α 、IL-1 β 及IL-10水平均发生异常改变,可能是肩袖损伤后引起肩关节疼痛的发病机制之一。后续有待进一步明确上述炎症因子通过何种通路诱发肩关节疼痛。

参考文献

- [1] 赵丽, 黄宏艳, 金婷. 超声引导下选择性颈神经根阻滞联合全麻对肩袖损伤肩关节镜手术患者血流动力学及术后镇痛效果的影响[J]. 海南医学, 2020, 31(4):44-47.
- [2] Feng H, He Z, Twomey K, et al. Epigallocatechin-3-gallate suppresses pain-related and proinflammatory mediators in the subacromial bursa in rotator cuff tendinopathy [J]. *Discov Med*, 2019, 27(147):63-77.
- [3] 郭锐, 董云, 杨勇, 等. 炎症因子在肩袖损伤大鼠中的表达及其临床意义[J]. 暨南大学学报(自然科学与医学版), 2020, 41(5):78-83.
- [4] Fawcett R, Grainger A, Robinson P, et al. Ultrasound-guided subacromial-subdeltoid bursa corticosteroid injections: a study of short- and long-term outcomes [J]. *Clin Radiol*, 2018, 80(10):947-963.
- [5] Klontzas ME, Vassalou EE, Zibis AH, et al. The effect of injection volume on long-term outcomes of US-guided subacromial bursa injections[J]. *Eur J Radiol*, 2020, 129(4):48-49.
- [6] 胡彦彬, 王振东, 赵强, 等. FGF18与骨性关节炎患者血清炎症细胞因子、脂肪细胞因子及骨关节严重程度相关性[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(5):639-642.
- [7] Ko JY, Lian WS, Tsai TC, et al. MicroRNA-29a Mitigates Subacromial Bursa Fibrosis in Rotator Cuff Lesion with Shoulder Stiffness[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(22):5742.
- [8] Soker G, Gulek B, Soker E, et al. Sonographic assessment of subacromial bursa distension during arm abduction: establishing a threshold value in the diagnosis of subacromial impingement syndrome[J]. *J Med Ultrason*, 2018, 45(2):287-294.
- [9] Pldoja E, Rahu M, Kask K, et al. Blood supply of the subacromial bursa and rotator cuff tendons on the bursal side[J]. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 2017, 25(7):2041-2046.
- [10] Kennedy MS, Nicholson HD, Woodley SJ. Clinical anatomy of the subacromial and related shoulder bursae: A review of the literature[J]. *Clin Anatomy*, 2017, 154(6):93-94.
- [11] Rothe C, Lund J, Jenstrup MT, et al. A randomized controlled trial evaluating the impact of selective axillary nerve block after arthroscopic subacromial decompression [J]. *BMC Anesthesiol*, 2020, 20(1):48-49.
- [12] Ohya N, Yamada T, Satoh Y, et al. Relative and absolute reliability of ultrasound measurements for the thickness of the soft tissue around the shoulder joint of young normal subjects [J]. *J Phys Ther Sci*, 2017, 29(4):754-759.
- [13] Kwon SG, Roh DH, Yoon SY, et al. Involvement of peripheral P2Y1 receptors and potential interaction with IL-1 receptors in IL-1 β -induced thermal hypersensitivity in rats [J]. *Brain Res Bull*, 2017, 130(19):165-172.
- [14] Gonçalves GA, Invitti AL, Parreira RM, et al. P27kip1 overexpression regulates IL-1 β in the microenvironment of stem cells and eutopic endometriosis co-cultures [J]. *Cytokine*, 2017, 89(12):229-234.
- [15] Morita W, Snelling SJB, Wheway K, et al. ERK1/2 drives IL-1 β -induced expression of TGF- β 1 and BMP-2 in torn tendons [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1):19005.
- [16] Amaral GF, Dossa PD, Lígia Bocamino Viebig, et al. Astrocytic expression of GFAP and serum levels of IL-1 β and TNF- α in rats treated with different pain relievers [J]. *Brazil J Pharmacol Sci*, 2018, 19(1):151.
- [17] Hedderson WC, Borsa PA, Fillingim RB, et al. Plasma Concentrations of Select Inflammatory Cytokines Predicts Pain Intensity 48 Hours Post-Shoulder Muscle Injury [J]. *Clin J Pain*, 2020, 36(6):145-146.
- [18] Kim JR, Wang SI. Suprascapular nerve entrapment caused by an intraosseous ganglion of the scapula: A case report [J]. *Medicine Baltimore*, 2017, 96(24):e7167.
- [19] Squillace S, Durante M, Opejin A, et al. CD4⁺ T cells and IL-10 are required for the beneficial effects exerted by A β 3 AR agonists in neuropathic pain [J]. *J Pain*, 2018, 19(3):S81-S82.
- [20] Apryani E, Ali U, Wang ZY, et al. The spinal microglial IL-10/ β -endorphin pathway accounts for cinobufagin-induced mechanical allodynia in bone cancer pain following activation of α 7-nicotinic acetylcholine receptors [J]. *J Neuroinflammation*, 2020, 17(1):1-18.

(上接第1489页)

- [9] 陈彦均, 温涛, 许鸿智, 等. 仰卧前屈拔伸牵引对神经根型颈椎病患者有效椎管横截面积的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2020, 28(5):31-34.
- [10] 张艺, 李雪松, 孙滨, 等. 牵引态下针刺夹脊穴治疗神经根型颈椎病临床疗效观察及对炎症因子的影响[J]. 吉林中医药, 2018, 38(4):465-467.
- [11] Shakil US. Comparison between effectiveness of Mechanical and Manual Traction combined with mobilization and exercise therapy in Patients with Cervical Radiculopathy [J]. *Pakistan J Med Sci*, 2016, 32(1):31-34.
- [12] 许鸿智, 林定坤, 陈博来. 仰卧前屈拔伸牵引治疗伴退变性脊髓压迫神经根型颈椎病的效果及安全性评价[J]. 中国医药导报, 2018, 15(12):53-57.
- [13] 史传岗, 徐小青. 臭氧治疗对神经根型颈椎病患者疼痛及hs-CRP、IL-6、IL-8的影响[J]. 中国地方病防治杂志, 2017, 32(8):892-893.
- [14] 胡文杰, 李阳, 王涛, 等. 拔伸旋转整脊手法联合颈椎牵引治疗神经根型颈椎病临床观察[J]. 河北中医, 2018, 40(4):593-595, 618.
- [15] 侯平选. 坐位牵引与仰卧位牵引治疗60例颈椎不稳症的疗效对比[J]. 临床研究, 2018, 26(10):123-125.

口腔菌群及血炎症因子、T细胞亚群水平在复发性口腔溃疡患者病情中变化及意义

徐剑波* 王丹丹 彭旭霖 宋飞翔 王春笛

[摘要] **目的** 探讨口腔菌群及血炎症因子、T细胞亚群水平在复发性口腔溃疡患者病情中的变化及意义。**方法** 选择安徽医科大学附属阜阳医院口腔科2019年3月至2021年3月复发性口腔溃疡患者91例作为观察组;另选择本院同期健康体检者80例作为对照组。通过实时荧光定量聚合酶链式反应分析链球菌和韦荣氏菌的DNA浓度;采用酶联免疫吸附法测定血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-2(IL-2)和白介素-8(IL-8)水平;采用流式细胞法测定T细胞亚群水平。**结果** 观察组链球菌和韦荣氏菌DNA浓度低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。观察组血清TNF- α 、IL-2和IL-8水平高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。观察组CD3⁺、CD4⁺和CD4⁺/CD8⁺低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。急性发作期组链球菌和韦荣氏菌DNA浓度低于愈合期组,差异有统计学意义($P<0.05$)。急性发作期组血清TNF- α 、IL-2和IL-8水平高于愈合期组,差异有统计学意义($P<0.05$)。急性发作期组CD3⁺、CD4⁺和CD4⁺/CD8⁺低于愈合期组,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 复发性口腔溃疡患者存在口腔菌群紊乱,炎症反应及细胞免疫功能紊乱,且与患者病情密切相关。

[关键词] 口腔菌群;炎症因子;T细胞亚群;复发性口腔溃疡

Changes and significance of oral flora, serum inflammatory factors, and T cell subgroup levels in patients with recurrent oral ulcers

XU Jianbo*, WANG Dandan, PENG Xulin, SONG Feixiang, WANG Chundi

(Department of Stomatology, Fuyang Hospital Affiliated to Anhui Medical University, Fuyang, Anhui, China, 236000)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the changes and significance of oral flora, serum inflammatory factors, and T cell subgroup levels in patients with recurrent oral ulcers. **Methods** 91 patients with recurrent oral ulcers from March 2019 to March 2021 in the Department of Stomatology, Fuyang Hospital Affiliated to Anhui Medical University were selected as the observation group. 80 patients with healthy physical examination during the same period in this hospital were selected as the control group. The DNA concentration of Streptococcus and Veillonella was detected by real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). The enzyme-linked immunosorbent assay was used to determine serum tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-2 (IL-2) and interleukin -8 (IL-8) levels. Flow cytometry was used to determine the level of T cell subsets. **Results** The DNA concentration of Streptococcus and Veillonella in the observation group was lower than that in the control group, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). The levels of serum TNF- α , IL-2 and IL-8 in the observation group were higher than those in the control group, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). CD3⁺, CD4⁺ and CD4⁺/CD8⁺ in the observation group were lower than those in the control group, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). The DNA concentration of Streptococcus and Veillonella in the acute attack group was lower than that in the healing group, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). The levels of serum TNF- α , IL-2 and IL-8 in

基金项目:安徽医科大学基金(2019xkj170)

作者单位:安徽医科大学附属阜阳医院口腔科,安徽,阜阳236000

*通信作者:徐剑波, E-mail:jjjp@163.com

the acute attack group were higher than those in healing group, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). $CD3^+$, $CD4^+$ and $CD4^+/CD8^+$ in acute attack group were lower than those in the healing group, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** Patients with recurrent oral ulcers have oral flora disorder, inflammatory reaction and cellular immune function disorder, which are closely related to the patient's condition.

[KEY WORDS] Oral flora; Inflammatory factors; T cell subsets; Recurrent oral ulcers

复发性口腔溃疡属常见的一种口腔黏膜溃疡疾病,其具体发病机制尚未完全阐明^[1]。现代医学认为,复发性口腔溃疡的发生、发展可能与局部创伤、微生物感染、精神状态、微循环障碍、维生素缺乏、免疫、化合物和药物、遗传及不良生活习惯等有关^[2]。复发性口腔溃疡反复发作不仅造成持续性疼痛,且会造成咀嚼吞咽困难,严重影响患者食欲和进食^[3]。因此,采取及时有效的诊断和治疗复发性口腔溃疡方法尤为重要。有研究结果显示,口腔菌群、体内炎性因子水平及免疫功能状态等均与口腔疾病的发生、发展密切相关^[4-6]。本文研究探讨了口腔菌群及血炎性因子、T细胞亚群水平在复发性口腔溃疡患者病情中的变化及意义,旨在为诊断和治疗复发性口腔溃疡提供参考。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选择于2019年3月至2021年3月期间在安徽医科大学附属阜阳医院口腔科就诊的复发性口腔溃疡患者91例作为观察组。纳入标准:①符合《口腔黏膜病学》^[7]中口腔溃疡的诊断标准;②至少3次

口腔溃疡发病史;③年龄 ≥ 18 岁;④患者及家属签订知情同意书。排除标准:①合并其他口腔疾病者;②合并急慢性感染性疾病者;③重要脏器严重异常者。纳入91例中,男性53例,女性38例;年龄平均(49.83 \pm 5.45)岁;病程平均(4.19 \pm 1.25)年;体质指数平均(23.07 \pm 1.85)kg/m²;文化程度:小学及以下28例,初中~高中25例,高中以上38例;根据病情进展情况分为愈合期49例和发作期42例。另选择同期健康体检者80例作为对照组,其中男性47例,女性33例;年龄平均(49.34 \pm 7.48)岁;体质指数平均(22.76 \pm 1.89)kg/m²。2组性别、年龄、体质指数和文化程度比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

1.2 方法

1.2.1 口腔菌群检测

1.2.1.1 标本收集:受试者均于禁饮禁食2 h后,用生理盐水轻微漱口,收集1 mL唾液,用无菌移液器分装500 μ L于无菌EP管中,置4 $^{\circ}$ C冰箱保存备用。

1.2.1.2 引物设计:应用引物设计软件Primer primer 5.0设计链球菌、韦荣氏菌16s rRNA基因特异性引物(见表1),由北京奥科生物技术有限责任公司合成。

表1 链球菌、韦荣氏菌的引物序列及产物片段

Table 1 Primers and product fragments of Streptococcus and Vironella

16s rRNA 基因	上游引物	下游引物	产物片段(bp)
链球菌口腔克隆 BP2-54 基因	CACCGTATTCTGTGAGTTGC	ATTGCCGAAGATTCCCTA	297
韦荣氏菌口腔克隆 BP2-76 基因	CGAGGATAGATGAAAGGTGG	CGTCCCATTAAACAGAGC	270

1.2.1.3 标本DNA提取:500 μ L标本中加入十二烷基硫酸钠(10%)87 μ L和蛋白酶K(20 mg/mL)3 μ L,振荡混匀,65 $^{\circ}$ C孵育10 min。在混合液中加入NaCl溶液(5 mol/L)125 μ L和CTAB/NaCl溶液125 μ L,振荡混匀,65 $^{\circ}$ C孵育10 min。在混合液中加入氯仿840 μ L,12 000 r/min离心5 min。将上清液移置另一无菌EP管中,加入0.6倍体异丙醇,-20 $^{\circ}$ C下静置30 min。12 000 r/min离心30 min,弃上清液,沉淀室温下风干20 min,加入100 μ L灭活超纯水或灭菌TE重悬,20 $^{\circ}$ C保

存备用。

1.2.1.4 实时荧光定量PCR:按照TIANGEN公司荧光定量PCR试剂盒操作说明进行操作,取25 μ L反应体系,包括2.5 μ L的10 \times PCR Buffer,2 μ L的dNTP Mixture,2.5 μ L的DNA模板,上下游引物(10 μ mol/L)各0.5 μ L,0.2 μ L的Taq酶,16.8 μ L的ddH₂O。反应条件:预变性95 $^{\circ}$ C 3 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,共30个循环;72 $^{\circ}$ C 10 min结束反应。

1.2.2 血炎性因子检测

采集受试者清晨空腹外周静脉血5 mL,以10

cm 半径, 3 000 r/min, 离心 10 min, 收集血清, 采用酶联免疫吸附法 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 测定肿瘤坏死因子- α (Tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白介素-2 (Interleukin-2, IL-2) 和白介素-8 (Interleukin-8, IL-8) 水平, 人 TNF- α ELISA 试剂盒 (南京森贝伽生物科技有限公司), 人 IL-2 ELISA 试剂盒 (南京森贝伽生物科技有限公司), 人 IL-8 ELISA 试剂盒 (南京森贝伽生物科技有限公司), 严格依据试剂盒检测中说明书的内容进行操作。

1.2.3 T 细胞亚群水平检测

采集受试者清晨空腹外周静脉血 5 mL, 取每份标本 100 μ L 血分别加入异硫氰基荧光素 (Fluorescein isothiocyanate, FITC) 标记的免疫球蛋白 G1 (Immunoglobulin G1, IgG1), 藻红蛋白荧光素 (PE) 标记的 CD3, FTTC 标记的 CD4 和 FTTC 标记的 CD8 各 20 μ L, 充分混匀后, 放置于 37 $^{\circ}$ C 孵育 15 min, 制备密度为 1×10^5 个/mL 的单个核细胞悬液, 上美国 BD 公司流式细胞仪检测, 测定 T 细胞亚群水平, 采用配套软件 CyView 实时获取实验数据, 进行分析, 计算 CD4 $^+$ /CD8 $^+$ 。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 25.0 软件进行数据处理, 计数资料用 $n(\%)$ 表示, 行 χ^2 检验, 计量资料用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 两组间比较采用 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组口腔菌群比较

观察组链球菌和韦荣氏菌的 DNA 浓度低于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 两组口腔菌群比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	链球菌 DNA	韦荣氏菌 DNA
观察组	91	7.93 \pm 0.54	7.10 \pm 0.45
对照组	80	9.17 \pm 0.68	8.29 \pm 0.54
t 值		13.275	15.714
P 值		<0.05	<0.05

2.2 两组血清 TNF- α 、IL-2 和 IL-8 水平比较

观察组血清 TNF- α 、IL-2 和 IL-8 水平高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 3。

2.3 两组 T 细胞亚群比较

观察组 CD3 $^+$ 、CD4 $^+$ 和 CD4 $^+$ /CD8 $^+$ 低于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 4。

2.4 不同病情口腔菌群比较

急性发作期组链球菌和韦荣氏菌 DNA 浓度

表 3 两组血清 TNF- α 、IL-2 和 IL-8 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of serum TNF- α , IL-2 and IL-8 levels between 2 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TNF- α (pg/mL)	IL-2 (pg/mL)	IL-8 (ng/L)
观察组	91	16.74 \pm 2.38	39.74 \pm 5.43	76.83 \pm 7.65
对照组	80	9.82 \pm 1.86	21.23 \pm 3.28	52.14 \pm 5.89
t 值		20.975	26.526	23.403
P 值		<0.05	<0.05	<0.05

表 4 两组 T 细胞亚群比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Comparison of T cell subsets between 2 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	CD3 $^+$ (%)	CD4 $^+$ (%)	CD4 $^+$ /CD8 $^+$ (%)
观察组	91	65.23 \pm 3.71	34.38 \pm 3.12	1.29 \pm 0.31
对照组	80	76.72 \pm 4.65	40.92 \pm 2.97	1.82 \pm 0.27
t 值		17.953	13.987	11.844
P 值		<0.05	<0.05	<0.05

低于愈合期组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 5。

表 5 不同病情口腔菌群比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Comparison of oral flora in different conditions ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	链球菌 DNA	韦荣氏菌 DNA
急性发作期组	49	7.47 \pm 0.59	6.48 \pm 0.46
愈合期组	42	8.36 \pm 0.47	7.76 \pm 0.39
t 值		7.866	14.183
P 值		<0.05	<0.05

2.5 不同病情血炎症因子比较

急性发作期组血清 TNF- α 、IL-2 和 IL-8 水平高于愈合期组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 6。

表 6 不同病情炎症因子比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 6 Comparison of inflammatory factors in different conditions ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TNF- α (pg/mL)	IL-2 (pg/mL)	IL-8 (ng/L)
急性发作期组	49	21.02 \pm 2.89	51.27 \pm 6.95	91.28 \pm 8.98
愈合期组	42	12.07 \pm 2.03	27.38 \pm 4.26	61.07 \pm 6.20
t 值		16.820	19.367	18.364
P 值		<0.05	<0.05	<0.05

2.6 不同病情 T 细胞亚群比较

急性发作期组 CD3 $^+$ 、CD4 $^+$ 和 CD4 $^+$ /CD8 $^+$ 低于愈合期组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 7。

表 7 不同病情 T 细胞亚群比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 7 Comparison of T cell subsets in different conditions ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	CD3 $^+$ (%)	CD4 $^+$ (%)	CD4 $^+$ /CD8 $^+$ (%)
急性发作期组	49	61.42 \pm 3.26	30.96 \pm 3.14	1.02 \pm 0.35
愈合期组	42	70.82 \pm 3.98	37.89 \pm 2.97	1.59 \pm 0.23
t 值		12.384	10.760	9.014
P 值		<0.05	<0.05	<0.05

3 讨论

流行病学调查显示,复发性口腔溃疡发生率较高,且容易复发^[8-9]。口腔菌群的稳定对口腔内环境的稳定性维持尤为重要,通常口腔正常菌群与宿主间保持动态平衡,从而发挥保护宿主作用,若菌群失调,则会损伤宿主而产生相应疾病。唾液菌群(如链球菌、韦荣氏菌等)为口腔黏膜与口腔中的正常菌群^[10-11]。研究显示,口腔菌群变化参与了口腔溃疡发生、发展。当唾液菌群中链球菌、韦荣氏菌含量下降时,将不利于口腔黏膜稳定性的维护,故而可导致复发性口腔溃疡的发生^[12]。

机体免疫功能维持主要依赖于各种免疫因子、免疫细胞及免疫细胞亚群间的平衡。T细胞亚群是评价机体免疫功能重要指标,分为CD3⁺、CD4⁺和CD8⁺细胞,所有T淋巴细胞CD3⁺均阳性,按功能分为CD4⁺和CD8⁺以及调节性T细胞,而CD4⁺、CD8⁺是机体重要的免疫调控细胞,CD4⁺细胞分为Th1和Th2两个细胞亚群,分别介导细胞免疫应答和辅助体液免疫应答。而CD8⁺细胞主要功能是特异性直接杀伤靶细胞,其能够作为监测机体免疫功能的指标^[13-14]。CD4⁺是诱导性和辅助性T细胞,是调控免疫反应最重要的枢纽细胞。CD8⁺是抑制性和细胞毒性T细胞,是免疫反应中的直接杀伤性细胞。通常情况下,CD4⁺和CD8⁺细胞处于平衡状态,而其中CD4⁺细胞的辅助作用以及CD8⁺细胞的免疫抑制作用对机体正常免疫功能的维持具有重要作用。而当CD4⁺/CD8⁺比值降低时,说明机体免疫功能处于失衡状态,从而容易引起多种疾病^[15]。本研究结果说明复发性口腔溃疡患者细胞免疫功能下降,且与患者病情进展密切相关。

炎性因子与口腔溃疡发生、发展密切相关^[16]。TNF- α 主要由肥大细胞、巨噬细胞和单核细胞产生的细胞因子,其水平的过度释放是溃疡病的特异性病理因素。TNF- α 能够对中性粒细胞发挥显著的趋化作用,将其趋化至病损部位,发挥显著的免疫细胞调节作用^[17]。当TNF- α 介导的炎症反应作用于口腔黏膜上皮时,可导致组织溶解、水肿、破溃。IL-2是具有多种生物活性的一种细胞因子,主要是Th1类细胞分泌的一种促炎因子,由活化的CD4⁺T细胞分泌。IL-8作为一种抗炎因子,属炎症和损伤时的主要抗炎因子,同时也是参

与复发性口腔溃疡发病的病理过程。在早期口腔溃疡损伤处的炎症细胞、内皮细胞及角化细胞可能分泌大量的IL-8,活化炎症细胞,诱导T细胞游离到病损处,共同作用,从而形成口腔溃疡^[18]。本研究结果说明复发性口腔溃疡患者存在明显炎症反应。

综上所述,复发性口腔溃疡患者存在口腔菌群紊乱,炎症反应及细胞免疫功能紊乱,且与患者病情密切相关。

参考文献

- [1] Wong GLH, Lau LHS, Ching JYL, et al. Prevention of recurrent idiopathic gastroduodenal ulcer bleeding: a double-blind, randomised trial[J]. Gut, 2020, 69(4):652-657.
- [2] 曹婷婷,万俊,冯永梅,等.老年COPD伴严重呼吸衰竭患者血清CysC、VEGF、IL-17、ACTA水平变化[J].分子诊断与治疗杂志,2020,12(4):533-537.
- [3] Ibrahim SA, Elkot RA, Soliman HE. Lactic acid 5% mouth wash vs Kenalog in Orabase 0.1% for treatment and prophylaxis of recurrent aphthous ulcer [J]. J Cosmet Dermatol, 2020, 19(4):964-969.
- [4] 陈小艳,朱宏伟,侯瑞丽,等.复发性口腔溃疡患者肠道菌群与粪便炎症因子的相关性[J].解剖学报,2020,51(4):595-604.
- [5] Han N, Jia L, Guo L, et al. Balanced oral pathogenic bacteria and probiotics promoted wound healing via maintaining mesenchymal stem cell homeostasis [J]. Stem Cell Res Ther, 2020, 11(1):61.
- [6] 王宁,丁志锋. 肿节风分散片联合雷尼替丁治疗复发性口腔溃疡的疗效及对患者炎症因子的影响研究[J]. 中国基层医药, 2021, 28(3):349-352.
- [7] 陈谦明. 口腔黏膜病学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2012:59-60.
- [8] 尹晶,陈文涛,郁毅刚. 重症COPD患者IL-33/ST2比值与血气指标、氧化应激反应程度的相关性分析[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(3):305-308.
- [9] Sánchez-Bernal J, Conejero C, Conejero R. Recurrent Aphthous Stomatitis [J]. Actas Dermosifiliogr (Engl Ed), 2020, 111(6):471-480.
- [10] 陈杰,丁维俊. 复发性口腔溃疡微生物及免疫学机制与中医相关性探讨[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(13):202-207.
- [11] Cabras M, Carrozzo M, Gambino A, et al. Value of colchicine as treatment for recurrent oral ulcers: A systematic review [J]. J Oral Pathol Med, 2020, 49(8):731-740.
- [12] Kuang FM, Tang LL, Zhang H, et al. Recurrent pulmonary infection and oral mucosal ulcer [J]. Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi, 2017, 19(4):452-457.

(下转第1502页)

二甲双胍联合 miR-145 对胃癌 BGC823 细胞增殖凋亡及 AKT 信号通路的影响

田春阳^{1*} 刘晓政¹ 范军朝²

[摘要] 目的 探讨二甲双胍联合 miR-145 对胃癌 BGC823 细胞增殖凋亡的影响及其机制。方法 将 miR-145 mimic 及其阴性对照转染至胃癌 BGC823 细胞中并记为 miR-145 组和 NC 组,并以未转染细胞作为对照组,RT-PCR 检测细胞中 miR-145 的表达;MTT 法检测不同浓度(0、2.5、5、10、20 和 40 mmol/L)二甲双胍对 BGC823 细胞增殖的影响,并筛选出合适的作用浓度。将 BGC823 细胞随机分为未处理组(未做处理)、二甲双胍组(给予 10 mmol/L 二甲双胍处理 72 h)、miR-145 组(转染 miR-145 mimics)和二甲双胍+miR-145 组(转染 miR-145 mimics 后,给予 10 mmol/L 二甲双胍处理 72 h),采用 MTT 法和流式细胞仪分别检测各组细胞中存活率和凋亡率,Western blot 检测细胞中 CyclinD1、Bcl-2 和 p-AKT 蛋白的表达。结果 与对照组相比,miR-145 组细胞中 miR-145 的表达明显升高($P<0.05$),而 NC 组细胞中 miR-145 表达与对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$);与空白对照组(0 mmol/L)相比,二甲双胍处理组中细胞的存活率均显著降低($P<0.05$),且呈时间-剂量依赖性。与未处理组相比,二甲双胍组、miR-145 组和二甲双胍+miR-145 组细胞存活率明显降低,凋亡率明显升高($P<0.05$),细胞中 CyclinD1、Bcl-2 和 p-AKT 蛋白显著降低,且二甲双胍+miR-145 组的作用强度明显大于二甲双胍组或 miR-145 组($P<0.05$)。结论 上调 miR-145 表达可增强二甲双胍抑制胃癌 BGC823 细胞增殖促进细胞凋亡的作用,其分子机制可能与抑制 AKT 信号通路有关。

[关键词] 胃癌;二甲双胍;miR-145;细胞增殖;细胞凋亡

Effects of metformin combined with miR-145 on proliferation, apoptosis and AKT signaling pathway in gastric cancer BGC823 cells

TIAN Chunyang^{1*}, LIU Xiaozheng¹, FAN Junchao²

(1. Department of Gastroenterology, Nanyang Central Hospital, Nanyang, Henan, China, 473000; 2. Department of Anesthesiology, the First Affiliated Hospital of Henan University, Zhengzhou, Henan, China, 475000)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the effect of metformin combined with miR-145 on proliferation and apoptosis of gastric cancer BGC823 cells and its mechanism. **Methods** MiR-145 mimic and its negative control were transfected into BGC823 cells of gastric cancer and recorded as miR-145 group and NC group, and untransfected cells as control group, the expression of miR-145 in cells was detected by RT-PCR. The effect of different concentrations (0, 2.5, 5, 10, 20 and 40 mmol/L) of metformin on the proliferation of BGC823 cells was tested by MTT method and the appropriate concentration was selected. BGC823 cells were randomly divided into untreated group (untreated), metformin group (treated by 10 mmol/L metformin for 72 h), miR-145 mimics group (transfected with miR-145 mimics) and metformin+miR-145 group (after transfection of miR-145 mimics, treated by 10 mmol/L metformin for 72 h), the survival rate and apoptosis rate in

基金项目:河南省教育厅科研基金项目(16B320003)

作者单位:1. 南阳市中心医院消化内科,河南,南阳 473000

2. 河南大学第一附属医院麻醉科,河南,郑州 475000

*通信作者:田春阳, E-mail: MTtanchunyang@163.com

each group were separately measured by MTT and flow cytometry, and the expressions of CyclinD1, Bcl-2 and p-AKT proteins in the cells were checked by Western blot. **Results** Compared with the control group, the expression of miR-145 was significantly higher in the miR-145 group ($P<0.05$), but there was no significant difference between the NC group and the control group ($P>0.05$); compared with the blank control group (0 mmol/L), the survival rate of cells in the metformin group was significantly lower ($P<0.05$), and in time-dose-dependent. Compared with the untreated group, the cell survival rate of metformin group, miR-145 group and metformin+miR-145 group were decreased significantly, the apoptosis was increased significantly, and the expressions of CyclinD1, Bcl-2 and p-AKT proteins were reduced significantly, and the action intensity of metformin+miR-145 group was significantly greater than that of metformin group or miR-145 group ($P<0.05$). **Conclusion** Up regulation of miR-145 can enhance the effect of metformin on the proliferation and apoptosis of gastric cancer BGC823 cells, and its molecular mechanism may be related to inhibition of AKT signaling pathway.

[KEY WORDS] Gastric cancer; Metformin; MiR-145; Cell proliferation; Cell apoptosis

微小RNA(microRNA, miRNA)是一类非编码短序列的RNA,多数miRNAs在胃癌的组织或细胞中异常表达,参与肿瘤细胞的增殖凋亡等生物学过程,调控着胃癌的发生发展^[1-2]。近年来有研究指出,miR-145在胃癌中异常低表达,与胃癌的恶性增殖和转移关系密切^[3-4],以miR-145为治疗胃癌靶点的研究备受关注。二甲双胍是临床上常用的一种口服降糖药,其在胃癌治疗中也表现出良好的抗肿瘤作用^[5-6]。有研究指出,miR-145联合二甲双胍具有协同抑制人结肠癌细胞株HCT116增殖的作用^[7]。本研究旨在阐明miR-145联合二甲双胍抗胃癌的可行性,并探讨其可能的分子机制,以期为胃癌的治疗提供新的策略和理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

人胃癌细胞株BGC823购于中国科学院上海细胞库。RPMI1640培养基、新生牛血清、Trizol试剂和Lipofectamine 2000购于美国Invitrogen公司。miR-145 mimic、阴性对照NC和PCR引物购于上海吉玛制药技术有限公司。噻唑蓝(Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide, MTT)试剂和二甲基亚砷购于Sigma-Aldrich公司,逆转录-聚合酶链反应(Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)试剂和细胞裂解液购于北京全式金生物技术有限公司,甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体购于Bioworld公司,细胞周期素D1(Cyclin D1)抗体购于美国Cell Signaling Technology公司,磷酸化蛋白激酶B(Phosphorylated protein kinase B, p-Akt)抗体、B淋巴细胞瘤-2基因(B-cell

lymphoma-2, Bcl-2)抗体、辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠/兔IgG购于美国Santa Cruz公司,聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜和增强化学发光(enhancedchemiluminescence, ECL)试剂盒购于美国Millipore公司,逆转录试剂盒、凋亡检测试剂盒购于上海碧云天生物技术有限公司,二喹啉甲酸(Bicinchoninic acid, BCA)蛋白定量试剂盒购于美国Thermo公司。

1.2 主要仪器

HERA cell240 CO₂细胞培养箱购于德国Heracus公司,Meddel680酶标仪、Western blot转膜系统购于美国BIO-RAD公司,Moflo XDP流式细胞仪购于美国Beckmancoulter公司,Mastercycler pro梯度PCR仪购于美国Eppendorf公司。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养与转染

用含10%胎牛血清、0.1 mg/mL链霉素和100 U/mL青霉素的RPMI1640培养基在CO₂体积分数为5%、温度为37℃和湿度饱和的细胞培养箱中培养BGC823细胞。取对数生长期的BGC823细胞,以每孔10⁶个细胞种植到6孔细胞板上,于培养箱内常规培养过夜。待细胞汇合度超过70%时进行转染。实验分为对照组(未转染)、NC组(转染阴性对照NC)和miR-145组(转染miR-145 mimic),参照转染试剂Lipofectamine 2000使用说明书步骤根据上述分组进行转染。孵育6 h后,更换含血清的培养基继续培养。48 h后,采用RT-PCR检测各组细胞中miR-145的表达水平,以评价其转染效果。

1.3.2 RT-PCR检测

采用Trizol法提取对照组、NC组和miR-145组细胞的总RNA,并以紫外分光光度计对总RNA

进行浓度和纯度的定量。以RNA为模板,参照逆转录试剂盒步骤合成cDNA。再根据上海吉玛公司合成的miR-145引物(上游5'-ATTATATTGTC-CAGTTTTCCAGG-3',下游5'-AAAGGTT-GTTCTCCACTCTCTCTC-3')及内参U6引物(上游5'-ATTGGAACGATA-CAGAAGATT-3'和下游5'-GGAACGCTTCACGAATTTG-3'),以50 μL反应体系(上下游引物各1 μL、dNTP Mix 1 μL、Taq DNA聚合酶1 μL、cDNA模板2 μL和ddH₂O 44 μL)按照反应条件(94℃预变性3 min;94℃变性50 s,60℃退火50 s,72℃延伸50 s,共循环35次;最后72℃后延伸6 min)进行PCR扩增,取5 μL扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳,采用2^{-ΔΔCt}法计算各组BGC823细胞中miR-145的表达水平。

1.3.3 MTT法检测

取对数生长期BGC823细胞,以每孔5×10³个细胞种植到96孔细胞板上,置于细胞培养箱内培养24 h。设置空白对照组(0 mmol/L二甲双胍)和二甲双胍处理组(加入2.5、5、10、20和40 mmol/L二甲双胍),并设置无细胞的调零孔。根据实验分组加入二甲双胍分别作用24、48和72 h。其中,每个浓度设置3个复孔。参照文献^[8]上酶标仪检测各组细胞在570 nm波长处的光密度值(optical density, OD值),根据公式计算各组细胞的存活率。细胞存活率(%)=(二甲双胍组OD值-调零组OD值)/(空白对照组OD值-调零组OD值)×100%。每组实验重复检测3次。

1.3.4 流式细胞仪检测

取对数生长期BGC823细胞,以每孔3×10⁴个细胞种植于6孔细胞板上,孵育24 h后,将其随机分为未处理组(不做处理)、二甲双胍组(加入10 mmol/L二甲双胍)、miR-145组(转染miR-145 mimic)和二甲双胍+miR-145组(转染miR-145 mimic后加入10 mmol/L二甲双胍),根据实验分组对BGC823细胞进行转染和药物处理后,于细胞培养箱内培养72 h,参照凋亡检测试剂盒说明书步骤检测各组细胞的凋亡率。参照1.2.3中的方法检测各组细胞的存活率。每组实验重复检测3次。

1.3.5 Western blot检测

收集未处理组、二甲双胍组、miR-145组和二甲双胍+miR-145组细胞,于冰上加入细胞裂解液提取总蛋白,所提总蛋白经BCA法检测定量后,与上样缓冲液等量混合,上SDS-PAGE凝胶电泳分

离,然而采用转膜仪将其转至PVDF膜上,以封闭液(含50 g/l脱脂奶粉)处理2 h后,分别依次加入1:500倍稀释的一抗于4℃反应24 h、1:2 000倍稀释的辣根过氧化物酶标记的二抗于37℃反应1 h,抗原抗体充分反应后,以ECL化学发光剂显色,成像仪成像,以GAPDH为内参,Image J软件分析。

1.4 数据分析

采用SPSS 20.0软件进行统计学分析,计数资料($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间比较采用SNK-*q*检验,两组间比较采用独立样本*t*检验。以*P*<0.05差异有统计学意义。

2 结果

2.1 转染后胃癌BGC823细胞中miR-145的表达

NC组细胞中miR-145表达与对照组比较差异无统计学意义(*P*>0.05),但miR-145组中miR-145表达较对照组显著升高,差异有统计学意义(*P*<0.05)。见表1。

表1 转染后各组胃癌BGC823细胞中miR-145的表达($\bar{x} \pm s$)

Table 1 The relative expression of miR-145 in gastric cancer BGC823 cells after transfection ($\bar{x} \pm s$)

组别	miR-145
对照组	1.00
NC组	0.96±0.07
miR-145组	3.65±0.34*
F值	177.513
P值	0.000

注:与对照组相比,**P*<0.05。

2.2 二甲双胍对胃癌BGC823细胞增殖的影响

以不同浓度二甲双胍处理胃癌BGC823细胞24、48和72 h后,MTT法筛选出接近半数抑制浓度的二甲双胍。与空白对照组(0 mmol/L)相比,二甲双胍处理组中细胞的存活率均显著降低(*P*<0.05),且呈时间-剂量依赖性。在72 h作用时间下,10 mmol/L二甲双胍对BGC823细胞的抑制作用接近半数抑制浓度,故后期选用10 mmol/L浓度的二甲双胍作用72 h进行实验。见表2。

2.3 二甲双胍单独或联合miR-145对胃癌BGC823细胞增殖凋亡的影响

与未处理组相比,二甲双胍组、miR-145组和二甲双胍+miR-145组细胞的存活率显著降低,凋亡率显著升高,且二甲双胍+miR-145组的作用强度明显大于二甲双胍组或miR-145组(*P*<0.05)。见图1和表3。

表2 二甲双胍对胃癌BGC823细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of metformin on survival rate of gastric cancer BGC823 cells ($\bar{x} \pm s$)

浓度(mmol/L)	24 h	48 h	72 h
0	100	100	100
2.5	95.12±2.03 ^a	91.23±5.78 ^a	85.07±5.64 ^a
5	88.52±2.15 ^a	76.36±4.59 ^a	67.65±4.59 ^a
10	73.73±2.01 ^a	65.49±3.67 ^a	50.28±3.35 ^a
20	68.42±1.33 ^a	53.38±2.89 ^a	45.01±2.94 ^a
40	57.67±1.05 ^a	46.80±2.36 ^a	40.48±2.15 ^a
F值	315.332	96.595	132.707
P值	0.000	0.000	0.000

注:与0 mmol/L相比,^aP<0.05。

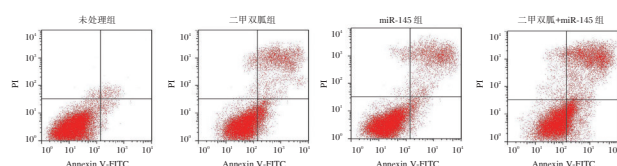


图1 流式细胞仪检测各组细胞的凋亡

Figure 1 The apoptosis of cells in each group was detected by flow cytometry

表3 各组BGC823细胞存活率和凋亡率的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of BGC823 cell survival rate and apoptosis rate in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	细胞存活率(%)	细胞凋亡率(%)
未处理组	100	3.62±0.55
二甲双胍组	50.13±5.12 ^a	22.56±2.18 ^a
miR-145组	67.85±5.36 ^a	13.64±1.12 ^a
二甲双胍+miR-145组	37.25±3.34 ^{ab}	36.74±2.25 ^{ab}
F值	402.777	625.312
P值	0.000	0.000

注:与未处理组相比,^aP<0.05;与二甲双胍组相比,^bP<0.05。

2.4 二甲双胍单独或联合 miR-145 对胃癌 BGC823 细胞中 CyclinD1、Bcl-2 和 p-AKT 蛋白表达的影响

与未处理组相比,二甲双胍组、miR-145 组和二甲双胍+miR-145 组中三种蛋白的表达水平均显著降低,且二甲双胍+miR-145 组显著低于二甲双胍组或 miR-145 组 ($P<0.05$)。见表 4。

表4 各组BGC823细胞中CyclinD1、Bcl-2和p-AKT蛋白的相对表达量

Table 4 The relative expression of CyclinD1, Bcl-2 and p-AKT proteins in BGC823 cells of each group

组别	CyclinD1	Bcl-2	p-AKT
未处理组	0.65±0.05	0.38±0.03	0.47±0.03
二甲双胍组	0.38±0.03 ^a	0.19±0.02 ^a	0.25±0.02 ^a
miR-145组	0.46±0.03 ^a	0.27±0.02 ^a	0.38±0.03 ^a
二甲双胍+miR-145组	0.31±0.02 ^{ab}	0.09±0.01 ^{ab}	0.13±0.02 ^{ab}
F值	164.936	301.833	306.808
P值	0.000	0.000	0.000

注:与未处理组相比,^aP<0.05;与二甲双胍组相比,^bP<0.05。

3 讨论

肿瘤的发生发展是一个复杂的过程,miRNA在其中发挥着原癌基因或抑癌基因的调控作用。miR-145是一种高度保守的miRNA,定位于5q32染色体上,可通过多种途径调控细胞的增殖和凋亡过程,参与肿瘤的发生与演变。miR-145在肾细胞癌组织中的表达显著下调,与肿瘤的分期、肿瘤大小等密切相关^[9];上调肝癌或宫颈癌细胞中miR-145表达可通过抑制癌细胞的增殖、侵袭和迁移并诱导细胞凋亡^[8,10]。另外,miR-145还可通过抑制MRP1表达增强乳腺癌对化疗药物阿霉素的敏感性^[11]。可见,miR-145与多种肿瘤的发生发展密切相关,其有望成为肿瘤治疗的潜在靶点。二甲双胍是常用的降糖药,同时其还对多种肿瘤表现出较好的抗肿瘤作用。例如,二甲双胍通过降低H3K27三甲基化抑制卵巢癌细胞的增殖和迁移,促进癌细胞凋亡^[12];同时,二甲双胍还可以通过调控miRNAs表达参与抑制胰腺癌细胞增殖^[13]。已有学者指出,miR-145在胃癌组织和患者外周血中低表达,参与肿瘤细胞的恶性增殖、凋亡和转移过程^[4,6];二甲双胍能够抑制胃癌的生长^[14-15]。本研究结果与王钟林^[8]等所得出的miR-145联合二甲双胍具有协同抑制结肠癌HTC116细胞增殖的结果相吻合,同时也与朱明霞等^[16]研究指出的上调miR-145表达可增强顺铂诱导胃癌细胞凋亡机制相吻合。这提示,上调miR-145表达和二甲双胍联合具有协调抑制胃癌细胞生长的作用。

CyclinD1是细胞周期G1期进入S期的正向调控因子,也是一种重要的原癌基因,其过度表达可引起细胞增殖失控,促进肿瘤的发生;Bcl-2是公认的细胞凋亡抑制因子,可通过介导多种信号通路参与细胞的凋亡过程;AKT是PI3K/AKT信号通路的关键分子,p-AKT是AKT的活化状态,活化的AKT可调控下游相关基因如CyclinD1、Bcl-2的表达抑制细胞增殖和促进细胞凋亡,参与肿瘤的发生发展;CyclinD1、Bcl-2和p-AKT均在胃癌的发生发展过程中发挥着重要作用^[17]。本研究结果发现,二甲双胍单独或与miR-145 mimics联合均能够降低胃癌BGC823细胞中CyclinD1、Bcl-2和p-AKT蛋白的表达水平,且二甲双胍联合miR-145 mimics的作用明显大于二甲双胍单独作用。已研究证实,在胶质母细胞瘤中miR-145的丢

失可导致细胞增殖分子 Cyclin D1 表达过多^[18]; 结果提示, miR-145 可通过抑制 AKT 信号通路的活化增强二甲双胍抗胃癌的作用。

总之, 二甲双胍联合 miR-145 具有更强的抗胃癌作用, 其可能通过抑制 AKT 信号通路协调抑制胃癌细胞增殖并诱导细胞凋亡。本研究仅从体外细胞水平上阐述了二甲双胍联合 miR-145 抗胃癌的作用, 后续还需从体内动物实验加以验证。

参考文献

- [1] Chen TH, Lee C, Chiu CT, et al. Circulating microRNA-196a is an early gastric cancer biomarker [J]. *Oncotarget*, 2018, 9(12):10317-10323.
- [2] Bo X, Chen Y, Sheng W, et al. The regulation and function of microRNA-377/RASSF8 signaling axis in gastric cancer [J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(3):3630-3638.
- [3] Zhu X, Yang Z, Zhang J, et al. Investigation of microRNA-145 as a serum diagnostic and prognostic biomarker for gastric cancer: A chinese cohort-based study [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2017, 10(6):9440-9447.
- [4] Qiu T, Zhou X, Wang J, et al. MiR-145, miR-133a and miR-133b inhibit proliferation, migration, invasion and cell cycle progression via targeting transcription factor Sp1 in gastric cancer [J]. *Febs Lett*, 2016, 588(7):1168-1177.
- [5] Zhou XL, Xue WH, Ding XF, et al. Association between metformin and the risk of gastric cancer in patients with type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of cohort studies [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(33):55622-55631.
- [6] Chen YZ, Liu LF, Tsai KW, et al. Metformin suppresses gastric cancer cell growth through inducing cell cycle arrest at G2/M phases [J]. *Diabetes Res Clin PR*, 2016, 120(1):S95-S96.
- [7] 王钟林, 张冬生, 王勇, 等. miRNA145 联合二甲双胍对人结肠癌细胞株 HCT116 增殖的影响 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2015, 35(12):1703-1706.
- [8] 王忠杰, 余平, 朱秀坤, 等. microRNA-145 表达对宫颈癌 Hela 细胞增殖及凋亡的影响 [J]. *现代生物医学进展*, 2018, 18(1):57-60.
- [9] Papadopoulos EI, Petraki C, Gregorakis A, et al. Clinical evaluation of microRNA-145 expression in renal cell carcinoma: a promising molecular marker for discriminating and staging the clear cell histological subtype [J]. *Biol Chem*, 2016, 397(6):529-539.
- [10] Wei D, Tan H, Chen Z, et al. MiR-145 suppresses cell proliferation and motility by inhibiting ROCK1 in hepatocellular carcinoma [J]. *Tumor Biol*, 2016, 37(5):1-6.
- [11] Gao M, Miao L, Liu M, et al. miR-145 sensitizes breast cancer to doxorubicin by targeting multidrug resistance-associated protein-1 [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(37):59714-59726.
- [12] Tang G, Guo J, Zhu Y, et al. Metformin inhibits ovarian cancer via decreasing H3K27 trimethylation [J]. *Int J Oncol*, 2018, 52(6):1899-1911.
- [13] Kato K, Iwama H, Yamashita T, et al. The anti-diabetic drug metformin inhibits pancreatic cancer cell proliferation in vitro and in vivo: Study of the microRNAs associated with the anti-tumor effect of metformin [J]. *Oncol Rep*, 2016, 35(3):1582.
- [14] 檀碧波, 李勇, 赵群, 等. miR-145 在胃癌组织和胃癌患者外周血中表达的临床意义 [J]. *中华普通外科杂志*, 2017, 32(1):73-74.
- [15] Liu Z, Yan Y, Cao S, et al. Long non-coding RNA SNHG14 contributes to gastric cancer development through targeting miR-145/SOX9 axis [J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(8):6905-6913.
- [16] 朱明霞, 周鑫, 黄泽波, 等. miR-145 通过 IGF1R 与 IRS1 逆转胃癌 SGC7901/DDP 细胞对顺铂的耐药性 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2016, 36(2):144-150.
- [17] 章硕, 夏红, 刘芳, 等. 沉默 LIMK1 抑制人胃癌 MGC803 细胞迁移与侵袭 [J]. *中南医学科学杂志*, 2020, 48(1):65-71.
- [18] Rani SB, Rathod SS, Karthik S, et al. MiR-145 functions as a tumor-suppressive RNA by targeting Sox9 and adducin 3 in human glioma cells [J]. *Neuro Oncol*, 2013, 15(10):1302-1316.

(上接第 1497 页)

- [13] Lin Q, Xie YD, Xie QQ, et al. Case-control study on risk factors of recurrent aphthous ulcer [J]. *Shanghai Kou Qiang Yi Xue*, 2019, 28(1):53-56.
- [14] 谢方英, 陈浙丽, 高月蓝. 益气养阴生肌方对复发性口腔溃疡大鼠的治疗作用及其对黏膜炎症因子和机体免疫功能的影响 [J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2019, 24(1):20-26.
- [15] Hijazi K, Morrison RW, Mukhopadhyay I, et al. Oral bacterial diversity is inversely correlated with mucosal inflammation [J]. *Oral Dis*, 2020, 26(7):1566-1575.
- [16] Farid RM, Wen MM. Promote Recurrent Aphthous Ulcer Healing with Low Dose Prednisolone Bilayer Mucoadhesive Buccal Film [J]. *Curr Drug Deliv*, 2017, 14(1):123-135.
- [17] Mehaffey E, Majid DSA. Tumor necrosis factor-alpha, kidney function, and hypertension [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2017, 313(4):F1005-F1008.
- [18] 王杨洋, 刘锐, 孟凡利, 等. 健脾解毒汤结合针刺对复发性口腔溃疡免疫功能及血清炎症因子的影响 [J]. *中华中医药学刊*, 2020, 38(4):184-187.

miRNA-10a、GATA6在肝细胞癌组织中的表达及意义

余袁媛 曾新桃*

[摘要] 目的 探讨微小RNA-10a(miRNA-10a)、核转录因子GATA6在肝细胞癌(HCC)组织中的表达及意义。方法 选取本院2017年6月至2019年6月92例经手术切除治疗的肝细胞癌(HCC)患者,术后取癌组织及癌旁组织,采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测miRNA-10a、GATA6 mRNA表达水平,比较癌组织及癌旁组织中miRNA-10a、GATA6 mRNA表达水平,分析miRNA-10a、GATA6 mRNA表达水平与HCC患者临床病理特征的相关性,采用Cox比例风险回归模型分析miRNA-10a、GATA6 mRNA表达水平与HCC患者预后的关系。结果 HCC患者癌组织miRNA-10a、GATA6 mRNA相对表达量高于癌旁组织,差异有统计学意义($P<0.05$)。HCC患者癌组织中miRNA-10a、GATA6 mRNA表达水平与TMN分期、分化程度、乙肝、肝硬化、淋巴结转移、肿瘤直径有关($P<0.05$),与年龄、性别无关($P>0.05$)。Cox比例风险回归模型分析结果显示,TMN分期增高、中高分化、乙肝、肝硬化、淋巴结转移、肿瘤直径 ≥ 5 cm、miRNA-10a、GATA6 mRNA表达水平过高是影响HCC患者预后的独立危险因素($P<0.05$)。结论 HCC患者miRNA-10a、核转录因子GATA6呈高表达状态,不同临床病理特征患者miRNA-10a、GATA6表达存在差异,两者有望成为HCC发展和预后的评估指标。

[关键词] 肝细胞癌; miRNA-10a; 核转录因子GATA6

Expression and significance of miRNA-10a and GATA6 in hepatocellular carcinoma tissues

YU Yuanyuan, ZENG Xintao*

(Department of Hepatobiliary Surgery, Mianyang Central Hospital, Mianyang, Sichuan, China, 621000)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the expression and significance of microRNA-10a (miRNA-10a) and nuclear transcription factor GATA6 in hepatocellular carcinoma (HCC) tissues. **Methods** A total of 92 HCC patients undergoing surgical resection in the hospital from June 2017 to June 2019 were enrolled. The cancer tissues and para-cancerous tissues were collected after surgery to detect the expression levels of miRNA-10a and GATA6 mRNA by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The expression levels of miRNA-10a and GATA6 mRNA in cancer tissues and para-cancerous tissues were compared. The correlation between the two indicators and clinicopathological characteristics in HCC patients was analyzed. The relationship between miRNA-10a, GATA6 mRNA and prognosis of HCC patients was analyzed by Cox proportional hazard regression model. **Results** The relative expression levels of miRNA-10a and GATA6 mRNA in cancer tissues were higher than those in para-cancerous tissues ($P<0.05$). The expression levels of miRNA-10a and GATA6 mRNA in cancer tissues of HCC patients were related to TMN staging, differentiation degree, hepatitis B, cirrhosis, lymph node metastasis and tumor diameter ($P<0.05$), but not related to age or gender ($P>0.05$). The results of Cox proportional hazard regression model analysis showed that increased TMN staging, moderately well-differentiation, hepatitis B, cirrhosis, lymph node metastasis, tumor diameter not shorter than 5cm, and excessive expression of miRNA-10a and GATA6 mRNA were independent risk factors affecting the prognosis of HCC patients ($P<0.05$). **Conclusion** The miRNA-10a and nuclear transcription factor GATA6 are highly expressed in HCC patients. There are differences in the expression of miRNA-10a and GATA6

基金项目:四川省卫生和计划生育委员会科研课题(15PJ215)

作者单位:绵阳市中心医院肝胆外科,四川,绵阳 621000

*通信作者:曾新桃, E-mail: zengxintao@163.com

in patients with different clinicopathological characteristics. The two are expected to be indicators for the development and prognosis of HCC.

[KEY WORDS] Hepatocellular carcinoma; miRNA-10a; Nuclear transcription factor GATA6

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是原发性肝癌最为常见的类型,是我国恶性肿瘤相关死亡的主要原因^[1]。HCC的发生与长期大量饮酒、丙型肝炎、非酒精性脂肪性肝病、乙型肝炎等因素相关,我国HCC发生的主要原因是乙型肝炎^[2]。现阶段临床对HCC的发病机制及诊疗取得了进展,但少数患者术后存在转移或复发,严重影响了患者的预后^[3]。因此,寻找新的肿瘤标志物对临床指导治疗、准确评估预后具有重要的价值。微小RNA(microRNA, miRNA)作为一类非编码RNA,能与mRNA结合阻断蛋白编码基因的表达^[4]。临床研究发现,微小RNA-10a(miRNA-10a, miRNA-10a)能进入线粒体调控癌基因的表达,与多种恶性肿瘤的关系密切^[5]。核转录因子GATA6(GATA-binding protein 6, GATA6)是一种转录调节因子,有研究发现,GATA6异常表达于多种肿瘤疾病中,能影响恶性肿瘤的发生和发展^[6]。本研究将探讨miRNA-10a、核转录因子GATA6在HCC组织中的表达及意义,以为临床HCC诊疗提供参考,现将结果报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取本院2017年6月至2019年6月92例经手术切除治疗的HCC患者,术后取癌组织及癌旁组织。纳入标准:①满足《原发性肝癌诊疗规范》^[7]中诊断标准,并经病理学检查确诊;②首次确诊;③术前未接受免疫治疗或化疗;④本研究经医院伦理委员会批准,患者签署知情同意书。排除标准:①继发性肝细胞癌;②合并自身免疫性疾病、感染性疾病者;③存在其他恶性肿瘤者;④肝癌复发者;⑤肾、心、肺等其他重要脏器严重损伤者;⑥临床病理资料不完整者。92例HCC患者中男性63例,女性29例;年龄平均(52.61±6.02)岁;TMN分期:I期12例,II期28例,III期52例;分化程度:低分化43例,中分化28例,高分化21例;乙肝40例,肝硬化45例;淋巴结转移44例;肿瘤直径>5 cm 30例。

1.2 方法

1.2.1 标本采集与保存

收集HCC患者癌组织及癌旁正常组织(距离

肿瘤边缘>5 cm),经快速液氮冷冻后送至标本库,于-80℃环境保存备用。

1.2.2 miRNA-10a、核转录因子GATA6 mRNA检测

取50 mg组织标本,进行冰上研磨,并按TRIzol说明书进行组织RNA提取,根据逆转录试剂盒说明合成cDNA,使用分光光度计鉴定cDNA纯度,确保A260/A280在1.8~2.0,并置于-20℃冰箱储存。TRIzol试剂、逆转录试剂盒均购自美国Invitrogen公司,采用RT-PCR法检测miRNA-10a、核转录因子GATA6 mRNA水平,取GAPDH为内参物。miRNA-10a上游引物序列:5'-ACAT-CATACCCTGTAGAACCGAA-3',下游引物序列:5'-GATTGGATGTTCTCCACAGTCTC-3';GATA6 mRNA上游引物序列:5'-CTCAGTTCCTAC-GCTTCGCAT-3',下游引物序列:5'-GTCGAGGT-CAGTGAACAGCA-3';GAPDH上游引物序列:5'-CTGCAGCATCTTCTCCTTCC-3',下游引物序列:5'-CAAAGTTGTCATGGATGACC-3'。扩增条件如下:95℃ 5 min;95℃ 15 s进行变性,60℃ 60 s进行退火,72℃ 5 min 30 s进行延伸,此为1个循环,共进行40个循环,实时定量PCR测定,以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算miRNA-10a、核转录因子GATA6 mRNA相对表达量,具体步骤严格遵循试剂盒说明书进行。

1.3 随访

对患者进行18个月随访,随访方式为电话或门诊复诊,记录随访结果(存活或死亡)。

1.4 统计学方法

采用SPSS 20.0软件进行统计分析。符合正态分布的计量数据以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,组间比较采用 t 检验;计数资料以 $n(\%)$ 表示,采用 χ^2 检验;采用Cox比例风险回归模型分析影响HCC患者预后的危险因素。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HCC患者癌组织及癌旁组织中miRNA-10a、GATA6 mRNA表达水平比较

HCC患者癌组织miRNA-10a、GATA6 mRNA相对表达量高于癌旁组织,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表1。

表1 HCC患者癌组织及癌旁组织中 miRNA-10a、GATA6 mRNA 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison on the expression levels of miRNA-10a and GATA6 mRNA in cancer tissues and para-cancerous tissues in HCC patients ($\bar{x} \pm s$)

组织类型	n	miRNA-10a	GATA6 mRNA
癌组织	92	1.97±0.35	3.53±0.71
癌旁组织	92	0.65±0.13	1.41±0.28
t值		33.911	26.643
P值		<0.001	<0.001

2.2 不同临床病理特征 HCC 患者癌组织中 miRNA-10a、GATA6 mRNA 表达水平比较

HCC 患者癌组织中 miRNA-10a、GATA6 mRNA 表达水平与 TMN 分期、分化程度、乙肝、肝硬化、淋巴结转移、肿瘤直径有关 ($P < 0.05$), 与年龄、性别无关 ($P > 0.05$)。见表 2。

2.3 影响 HCC 患者预后的相关因素分析

随访 18 个月结果显示, 92 例 HCC 患者, 失访 2 例, 存活 53 例, 死亡 37 例, 存活率为 58.89%。排除 2 例失访患者后采用 Cox 比例风险回归模型进行分析, 结果显示: TMN 分期增高、中高分化、乙肝、肝硬化、淋巴结转移、肿瘤直径 ≥ 5 cm、miRNA-10a、GATA6 mRNA 表达水平过高是影响 HCC 患者预后的独立危险因素 ($P < 0.05$)。见表 3。

3 讨论

HCC 早期缺乏典型症状, 多数患者确诊时已

表3 影响 HCC 患者预后的危险因素分析

Table 3 Risk factors affecting prognosis of HCC patients

因素	β 值	SE 值	Wald χ^2 值	P 值	OR 值	95%CI
TMN 分期	0.879	0.241	13.303	0.000	2.408	1.502~3.863
分化程度	1.143	0.315	13.167	0.000	3.136	1.691~5.815
乙肝	1.015	0.284	12.773	0.000	2.759	1.581~4.815
肝硬化	1.138	0.301	14.294	0.000	3.121	1.730~5.629
淋巴结转移	0.792	0.198	16.000	0.000	2.208	1.498~3.255
肿瘤直径	0.841	0.227	13.726	0.000	2.319	1.486~3.618
miRNA-10a	0.752	0.206	13.326	0.000	2.121	1.417~3.176
GATA6 mRNA	0.707	0.185	14.605	0.000	2.028	1.411~2.914

处于中晚期, 错过了最佳治疗时机, 导致预后较差、生存期短^[8]。因此, 临床需要寻找合理的肿瘤标志物评估 HCC 复发及转移风险, 进一步为临床 HCC 治疗提供依据。

miRNAs 能调控靶基因表达, 对细胞生长、分化及凋亡等生理过程产生影响, 近年来的研究表明 miRNAs 与肿瘤的发生及进展等过程密切相关^[9-10]。miRNA-10a 是位于 17 号染色体的 miRNA, 与恶性肿瘤的侵袭及转移密切相关^[11]。国内研究发现, 在胰腺癌患者组织中 miRNA-10a 表达水平升高, 且上调 miRNA-10a 表达可以促进胰腺癌细胞增殖及迁移^[12]。国外研究发现, miRNA-10a 在子宫颈癌组织中呈高表达, 并可以调节靶基因-神经细胞黏附分子, 促进宫颈癌浸润及淋巴细胞转移, 进而影响预后^[13-14]。有报道显示, miRNA-10a 在胃癌中呈高表达, 且可以直接靶向 MAFK8IP1, 调控肿瘤

表2 不同临床病理特征 HCC 患者癌组织中 miRNA-10a、GATA6 mRNA 表达水平比较 [n(%)]

Table 2 Comparison on the expression levels of miRNA-10a and GATA6 mRNA in cancer tissues among HCC patients with different clinicopathological characteristics [n(%)]

临床病理特征	n	miRNA-10a		χ^2 值	P 值	GATA6 mRNA		χ^2 值	P 值	
		高表达(n=36)	低表达(n=56)			高表达(n=64)	低表达(n=28)			
年龄(岁)	≥ 60	42	16(44.45)	26(46.43)	0.473	0.492	31(48.44)	11(39.29)	0.658	0.417
	< 60	50	20(55.55)	30(53.57)			33(51.56)	17(60.71)		
性别	男性	63	23(63.89)	40(71.43)	0.577	0.447	44(68.75)	19(67.86)	0.007	0.932
	女性	29	13(36.11)	16(28.57)			20(31.25)	9(32.14)		
TMN 分期	I 期、II 期	40	10(27.78)	30(53.57)	5.933	0.015	22(34.38)	18(64.29)	7.091	0.008
	III 期	52	26(72.22)	26(46.43)			42(65.52)	10(35.71)		
分化程度	低分化	43	12(33.33)	31(55.36)	4.270	0.039	23(35.94)	20(71.43)	9.856	0.002
	中高分化	49	24(66.67)	25(44.64)			41(64.06)	8(28.57)		
乙肝	有	40	23(63.89)	17(30.36)	10.026	0.002	35(54.69)	5(17.86)	10.752	0.001
	无	52	13(36.11)	39(69.64)			29(45.31)	23(82.14)		
肝硬化	有	45	25(69.44)	20(35.71)	9.977	0.002	38(59.38)	7(25.00)	9.211	0.002
	无	47	11(30.56)	36(64.29)			26(40.62)	21(75.00)		
淋巴结转移	有	44	23(63.89)	21(37.50)	6.115	0.013	36(56.25)	8(28.57)	5.980	0.014
	无	48	13(36.11)	35(62.50)			28(43.75)	20(71.43)		
肿瘤直径(cm)	> 5	30	20(55.56)	10(17.86)	14.171	< 0.001	26(48.15)	4(14.29)	9.113	0.003
	≤ 5	62	16(44.44)	46(82.14)			38(51.85)	24(85.71)		

转移^[15]。本研究结果显示,HCC患者癌组织中miRNA-10a表达水平高于癌旁组织,提示miRNA-10a可能作为癌基因参与了HCC的发生。有研究发现,miRNA-10a表达上调可能会使EphA4表达减少,进而在一定程度上促进肝癌细胞发生侵袭及转移^[16]。本研究结果表明miRNA-10a在HCC的进展过程中可能发挥着癌基因作用。本研究结果显示,随着TMN分期的增加,miRNA-10a表达上调,且存在淋巴结转移的HCC患者癌组织中miRNA-10a出现高表达的占比高于无淋巴结转移者,这进一步证明了miRNA-10a参与了HCC的侵袭和转移。

GATA6是位于18号染色体的核转录因子,可与半限制转录因子通过相互作用来调控机体细胞类型特化,与多种肿瘤的发生及发展密切相关^[17]。国外研究发现,GATA6具有保守、稳定的锌指结构,对肿瘤细胞增殖有促进作用,对肿瘤细胞凋亡有抑制作用^[18]。提示GATA6作为原癌基因在HCC患者癌组织中高度表达,与上述研究结果一致。闫江鹤等^[19]认为,癌细胞在GATA6作用下会释放大量的细胞黏附分子,细胞黏附分子含量升高会导致癌细胞与内皮细胞紧密黏附,有利于癌细胞穿透细胞外基质层,建立转移灶。进一步分析结果提示GATA6参与了HCC的局部浸润及远处转移,可作为HCC发生侵袭性生物学行为的标志物。对影响HCC患者预后的危险因素分析可见,TMN分期增高、中高分化、乙肝、肝硬化、淋巴结转移、肿瘤直径 ≥ 5 cm、miRNA-10a、GATA6 mRNA表达水平过高是影响HCC患者预后的独立危险因素,进一步提示miRNA-10a、GATA6表达与HCC患者临床预后的关系密切,临床可以通过检测miRNA-10a、GATA6表达情况,评估HCC患者的预后情况。

综上所述,miRNA-10a、核转录因子GATA6在HCC患者癌组织中呈高表达,其表达水平与TMN分期、分化程度、乙肝、肝硬化、淋巴结转移、肿瘤直径及预后有关。

参考文献

- [1] 杨波,熊婉媛,蔡小玲,等.外泌体微小RNA在肝细胞癌中的表达及临床应用[J].中华检验医学杂志,2019,42(10):894-898.
- [2] 熊香芸,李茂山,彭雁忠.肝细胞癌组织中miR-548c-3p、TRIM59的表达变化及其意义[J].山东医药,2021,26(1):11-15.
- [3] 刘子荣,张雅敏.肝癌肝移植术后复发转移的防治与评估[J].中华肝胆外科杂志,2018,24(6):424-426.
- [4] Rodríguez M, Pascasio JM, Fraga E, et al. Tenofovir vs lamivudine plus adefovir in chronic hepatitis B: TENOSIMP-B study[J]. World J Gastroenterol, 2017, 23(41):7459-7469.
- [5] Dai L, Chai CM, Shen TY, et al. LncRNA ITGB1 promotes the development of bladder cancer through regulating microRNA-10a expression[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(16):6858-6867.
- [6] 郝登荣,张宇祥.GATA6和TPM1在非小细胞肺癌中的表达及临床意义[J].中国医药生物技术,2019,14(1):52-57.
- [7] 中华人民共和国卫生和计划生育委员会医政医管局.原发性肝癌诊疗规范(2017年版)[J].中华消化外科杂志,2017,16(7):635-647.
- [8] 王京艳,刘妍,周霖,等.肝细胞癌诊断、疗效及预后相关标志物的研究进展[J].传染病信息,2020,33(3):268-272.
- [9] Worst TS, Previti C, Nitschke K, et al. miR-10a-5p and miR-29b-3p as Extracellular Vesicle-Associated Prostate Cancer Detection Markers[J]. Cancers (Basel), 2019, 12(1):43.
- [10] Wu J, Wu Y, Luo Y, et al. Circulating miRNA-199a and miRNA-122 Levels as Potential Diagnostic and Prognostic Biomarkers for Hepatocellular Carcinoma[J]. Ann Clin Lab Sci, 2020, 50(2):219-227.
- [11] Balatti V, Oghumu S, Bottoni A, et al. MicroRNA Profiling of Salivary Duct Carcinoma Versus Her2/Neu Overexpressing Breast Carcinoma Identify miR-10a as a Putative Breast Related Oncogene[J]. Head Neck Pathol, 2019, 13(3):344-354.
- [12] 谢荣臻,曾祥福,邓伟,等.miR-10a在胰腺癌侵袭转移中的作用[J].东南国防医药,2017,19(4):352-356.
- [13] Long MJ, Wu FX, Li P, et al. MicroRNA-10a targets CHL1 and promotes cell growth, migration and invasion in human cervical cancer cells[J]. Cancer Lett, 2012, 324(2):186-96.
- [14] Zhou X, Lu H, Li F, et al. LncRNA cancer susceptibility candidate (CASC7) upregulates phosphatase and tensin homolog by downregulating miR-10a to inhibit neuroblastoma cell proliferation[J]. Neuroreport, 2020, 31(5):381-386.
- [15] Lu Y, Wei G, Liu L, et al. Direct targeting of MAPK8IP1 by miR10a-5p is a major mechanism for gastric cancer metastasis[J]. Oncol Lett, 2017, 13(3):1131-1136.
- [16] Wang Y, Liu Z, Yao B, et al. Long non-coding RNA TUSC7 acts a molecular sponge for miR-10a and suppresses EMT in hepatocellular carcinoma[J]. Tumor Biol, 2016, 37(11):11429-11441.
- [17] 赵蔚,赵艳滨,张诗博,等.转录调节因子GATA6在肿瘤中的研究进展[J].现代肿瘤医学,2018,26(6):955-957.
- [18] Lai HT, Chiang CT, Tseng WK, et al. GATA6 enhances the stemness of human colon cancer cells by creating a metabolic symbiosis through upregulating LRH-1 expression[J]. Mol Oncol, 2020, 14(6):1327-1347.
- [19] 闫江鹤,李冰,朱凤池,等.GATA6和TRPC6在结肠癌组织中的表达及临床意义[J].中国临床研究,2020,33(4):442-445,451.

HbA1c、MA1b 联合 Cys-C 检测在糖尿病肾病诊断、病情评估中的应用

陈道强* 吴玲 龚源

[摘要] **目的** 分析糖化血红蛋白(HbA1c)、尿微量白蛋白(MA1b)联合胱抑素 C(Cys-C)检测在糖尿病肾病(DKD)诊断、病情评估中的应用。**方法** 将2019年6月至2020年12月本科室收治的92例糖尿病患者根据尿蛋白排泄率分为两组:40例早期肾损伤患者(300 mg/24 h>尿蛋白排泄率>30 mg/24 h)设为A组,52例中晚期肾损伤患者(尿蛋白排泄率>300 mg/24 h)设为B组。同时纳入98例同期本院接受健康体检结果正常者作为对照组。比较各组 HbA1c、MA1b 及 Cys-C 水平;采用多元 Logistic 回归分析影响糖尿病患者并发肾病的独立危险因素;绘制 ROC 曲线分析联合 HbA1c、MA1b、Cys-C 对糖尿病患者并发肾病的预测价值。**结果** HbA1c、MA1b、Cys-C 水平: B 组>A 组>对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。A 组 LDL-C、FPG、HbA1c、MA1b、Cys-C 水平显著低于 B 组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。LDL-C、FPG、HbA1c、MA1b、Cys-C 为影响糖尿病患者并发肾病的单因素($P<0.05$)。LDL-C、FPG、HbA1c、MA1b、Cys-C 水平为影响糖尿病患者并发肾病的独立危险因素($P<0.05$)。ROC 曲线显示:HbA1c、MA1b、Cys-C 及三者联合 AUC 分别为 0.956、0.972、0.985、0.956,以三者联合检测 AUC 值最大($P<0.05$)。**结论** 联合 HbA1c、MA1b、Cys-C 检测 DKD 患者诊断价值高,其水平变化与患者预后密切相关,加强患者相关指标检测具有重要意义。

[关键词] 糖化血红蛋白;尿微量白蛋白;胱抑素 C;糖尿病肾病

Application of HbA1c and MA1b combined with Cys-C detection in the diagnosis and evaluation of diabetic kidney disease

CHEN Daoqiang*, WU Ling, GONG Yuan

(Department of Endocrinology, Xuancheng Central Hospital, Xuancheng, Anhui, China, 242000)

[ABSTRACT] **Objective** To analyze the application of Hemoglobin A1c (HbA1c) and Microalbuminuria (MA1b) combined with Cystatin C (Cys-C) detection in the diagnosis and evaluation of diabetic kidney disease (DKD). **Methods** The 92 patients with diabetes admitted to this hospital from June 2019 to December 2020 were divided into two groups according to the excretion rate of urinary protein: the 40 patients with early renal injury (300 mg/24 h > urinary protein excretion rate > 30 mg/24 h) were group A, and 52 patients with advanced renal injury (urinary protein excretion rate >300 mg/24 h) as group B. 98 patients had physical examination and normal results in this hospital during the same period were included as a control group. The HbA1c, MA1b and Cys-C of each group were compared. Multivariate Logistic regression analysis was used to analyze the independent risk factors affecting diabetic nephropathy. The ROC curve was drawn to analyze the predictive value of HbA1c, MA1b and Cys-C for combined nephropathy in patients with diabetes. **Results** The levels of HbA1c, MA1b and Cys-C were as follows: group B > group A > the control group, the difference was statistically significant ($P<0.05$). The levels of LDL-C, FPG, HbA1c, MA1b and Cys-C in group A were significantly lower than those in group B, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). LDL-C,

基金项目:安徽省自然科学基金(1708085MH153)

作者单位:宣城市中心医院内分泌科,安徽,宣城 242000

*通信作者:陈道强, E-mail: piyun311371@163.com

FPG, HbA1c, MA1b, Cys-C are single factors that affect diabetic patients with nephropathy ($P<0.05$). The ROC curve analysis showed that the AUC of HbA1c, MA1b, Cys-C and the combination of the three indicators were 0.956, 0.972, 0.985, 0.956, respectively, and the AUC value of combined detection was the largest. **Conclusion** The combined detection of HbA1c, MA1b, and Cys-C in DKD patients has a high diagnostic value, and their level changes are closely related to the patient's prognosis. It is of great significance to strengthen the detection of relevant indicators of patients.

[KEY WORDS] HbA1c; MA1b; Cys-C; DKD

糖尿病肾病(Diabetic kidney disease, DKD)作为糖尿病最常见的微血管并发症之一,是糖尿病患者致死、致残的常见原因。据估计,约有40%的2型糖尿病患者患有肾病,早期DKD患者无特异表现,易被漏诊,延误治疗,重者可危及生命^[1]。近年来,相关学者发现,DKD患者疾病的发生、发展与实验室指标的变化密切相关^[2]。糖化血红蛋白(Hemoglobin A1c, HbA1c)作为评价糖尿病的重要指标,广泛应用于临床,在体内血糖异常升高时呈高表达状态^[2]。尿微量白蛋白(Microalbuminuria, MA1b)作为早期反映肾脏损害的有效指标,在国内外多种报道中均证实其水平变化与DKD病情进展关系密切^[3]。胱抑素C(Cystatin C, Cys-C)参与细胞内肽和蛋白质的代谢,影响近曲小管重吸收,与肾脏损伤有着极其密切的关系^[4]。本研究选取92例DKD患者作为研究对象,分析联合HbA1c、MA1b、Cys-C检测在DKD中的诊断、病情评估的价值,现报告如下。

1 对象与方法

1.1 一般资料

选取2019年6月至2020年12月本科室收治的92例DKD患者作为研究对象。纳入标准:①所有患者临床症状及实验室检查确诊,符合糖尿病肾病诊断^[5];②临床资料完整;③研究均经医学伦理委员会批准,受试者签署知情同意书。排除标准:①患者检测肾功能前有糖皮质激素服用史;②经实验室相关检查显示肾实质性受损或泌尿系感染导致尿常规阳性;③因甲亢等引起的肾功能代谢受损;④临床及随访资料不完整或缺乏准确性者。男48例,女44例,年龄31~72岁,平均年龄(65.79±6.93)岁。根据尿蛋白排泄率^[6]分为两组:40例早期肾损伤患者(300 mg/24 h>尿蛋白排泄率>30 mg/24 h)设为A组,其中男21例,女19例,年龄32~72岁,平均年龄(65.71±6.12)岁;52例中晚期肾损伤患者(尿蛋白排泄率>300 mg/24 h)设为B组,其中男27例,

女25例,年龄30~72岁,平均年龄(65.95±6.06)岁。同时纳入98例同期本院接受健康体检结果正常者作为对照组,男52例,女46例,年龄32~70岁,平均年龄(51.13±6.06)岁。各组间一般资料比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

1.2 检测方法

所有研究对象均在清晨抽取空腹静脉血5 mL了,使用乙二胺四乙酸抗凝处理后,使用3 000 r/min离心机离心10 min,取上清液备用。使用免疫荧光层析法检测HbA1c,试剂盒购自广州万孚生物技术有限公司;采用免疫散射比浊法检测MA1b,试剂盒由北京科美东雅生物技术有限公司提供;采用胶乳免疫比浊法检测Cys-C水平,试剂盒由北京百奥泰康生物技术有限公司提供。采用酶联免疫吸附法检查血清中总胆固醇(Total cholesterol, TC)、甘油三酯(Tri-glyceride, TG)、高密度脂蛋白胆固醇(High density liprotein cholesterol, HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(Low Density Lipoprotein, LDL-C)水平,试剂盒购自欣博盛生物科技有限公司提供;采用葡萄糖化酶检测空腹血糖(Fasting blood glucose, FPG),试剂盒由上海通蔚科技有限公司提供;所有操作均按试剂或仪器所配套说明书进行,由专业人员操作。LDL-C>3.37 mmol/L视为异常升高^[7];FPG>6.1 mmol/L视为异常升高^[7];HbA1c>6%视为异常升高^[2];MA1b>30 mg/L(24 h)视为异常升高^[3];Cys-C>1.09 mg/L视为异常升高^[4]。

1.3 统计学方法

采用SPSS 22.0软件进行统计分析,采用多元Logistic回归分析影响糖尿病患者并发肾病的危险因素;采用ROC曲线分析联合HbA1c、MA1b、Cys-C三者检测对糖尿病患者并发肾病的预测价值,计算ROC曲线下面积(Area Under Curve, AUC);计量资料以($\bar{x}\pm s$)表示,组间采用 t 检验,多组间采用 F 检验;计数资料以 $n(\%)$ 表示,采用 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 HbA1c、MA1b、Cys-C 水平比较

HbA1c、MA1b、Cys-C 水平: B 组>A 组>对照组, 差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

表 1 各组 HbA1c、MA1b、Cys-C 水平比较 ($\bar{x}\pm s$)
Table 1 Comparison of HbA1c, mAlb and Cys-C levels in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	HbA1c(%)	MA1b(mg/L)	Cys-C(mg/L)
A 组	40	6.95±1.16 ^a	81.33±21.75 ^a	7.32±1.66 ^a
B 组	52	8.72±2.64 ^{ab}	173.52±43.62 ^{ab}	18.96±2.03 ^{ab}
对照组	98	5.51±0.40	9.42±3.54	0.91±0.26
F 值		78.040	738.890	3192.50
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

注:与对照组比较,^a $P<0.05$,与 A 组比较,^b $P<0.05$ 。

2.2 分析影响糖尿病患者并发肾病的单因素

A 组 LDL-C、FPG、HbA1c、MA1b、Cys-C 水平显著低于 B 组, 差异均有统计学意义($P<0.05$)。LDL-C、FPG、HbA1c、MA1b、Cys-C 为影响糖尿病患者并发肾病的单因素($P<0.05$)。见表 2。

表 2 影响糖尿病患者并发肾病的单因素分析 [(n(%), ($\bar{x}\pm s$))]
Table 2 single factor analysis of diabetic nephropathy [(n(%), ($\bar{x}\pm s$))]

因素	n=92	A 组(n=40)	B 组(n=52)	χ^2/t 值	P 值	
年龄(岁)	<65	51	21(53.00)	30(58.00)	0.247	0.619
	≥65	41	19(48.00)	22(42.00)		
性别	男	48	21(53.00)	27(52.00)	0.003	0.956
	女	44	19(48.00)	25(48.00)		
BMI(kg/m ²)	<24	53	22(55.00)	31(60.00)	0.197	0.657
	≥24	39	18(45.00)	21(40.00)		
吸烟	有	57	23(58.00)	34(65.00)	0.596	0.440
	无	35	17(43.00)	18(35.00)		
高血压病史	有	61	24(60.00)	37(71.00)	1.259	0.262
	无	31	16(40.00)	15(29.00)		
TC(mmol/L)		5.36±1.12	5.71±1.33	1.338	0.184	
TG(mmol/L)		1.82±0.31	1.79±0.47	0.349	0.727	
HDL-C(mmol/L)		1.23±0.34	1.41±0.77	1.377	0.171	
LDL-C(mmol/L)		3.16±0.92	4.85±1.16	7.561	<0.001	
FPG(mmol/L)		10.31±1.12	11.64±1.25	5.290	<0.001	
HbA1c(%)		6.95±1.16	8.72±2.64	3.953	<0.001	
MA1b(mg/L)		81.33±21.75	173.52±43.62	12.237	<0.001	
Cys-C(mg/L)		7.32±1.66	18.96±2.03	29.461	<0.001	

表 3 影响糖尿病患者并发肾病的多因素分析

Table 3 multivariate analysis of diabetic nephropathy

影响因素	回归系数	标准误	Wald χ^2 值	P 值	OR 值	95%CI
LDL-C(mmol/L)(正常 vs 异常升高)	1.884	0.450	10.254	<0.001	6.579	2.724~15.894
FPG(mmol/L)(正常 vs 异常升高)	1.758	0.358	9.854	<0.001	5.801	3.287~10.237
HbA1c(%) (正常 vs 异常升高)	1.874	0.421	9.724	<0.001	5.641	2.632~12.091
MA1b(mg/L)(正常 vs 异常升高)	0.893	0.325	9.846	<0.001	2.44	1.29~4.62
Cys-C(mg/L)(正常 vs 异常升高)	1.325	0.532	9.651	<0.001	3.762	1.326~10.673

2.3 影响糖尿病患者并发肾病的多因素分析

LDL-C、FPG、HbA1c、MA1b、Cys-C 水平为影响糖尿病患者并发肾病的独立危险因素($P<0.05$)。见表 3。

2.4 HbA1c、MA1b、Cys-C 水平对糖尿病患者并发肾病的预测价值

ROC 曲线分析显示:HbA1c、MA1b、Cys-C 三者联合检测 AUC 值最大;检测灵敏度、特异度最高($P<0.05$)。见表 4、图 1。

表 4 HbA1c、MA1b、Cys-C 水平对糖尿病患者并发肾病的预测价值

Table 4 the predictive value of HbA1c, mAlb and Cys-C levels on diabetic nephropathy

预测因子	最佳临界值	敏感度	特异度	约登指数	AUC	95%CI
HbA1c	28.96	0.875	0.762	0.637	0.936	0.783~0.962
MA1b	30.25	0.871	0.767	0.638	0.952	0.839~0.975
Cys-C	29.65	0.881	0.793	0.674	0.965	0.877~0.973
三者联合	30.56	0.896	0.839	0.735	0.956	0.878~0.986

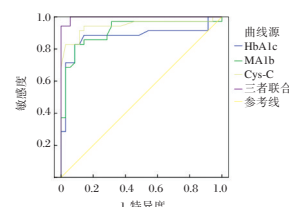


图 1 ROC 曲线

Figure 1 ROC curve

3 讨论

据相关研究显示,中国 18 岁以上人群糖尿病患病率从 2002 年的 4.2% 迅速上升至 2010 年的 11.6%, 目前中国糖尿病患者超过 1.14 亿^[6]。糖尿病患者机体代谢较差, 细胞免疫功能低下, 随着病情进展会导致生长因子、细胞因子及血流动力学生理、病理因素出现变化, 破坏肾脏正常功能, 形成肾脏损害, 及时明确诊断并进行预后改善是目前临床上的研究热点^[7]。

研究发现, HbA1c 水平越高, 氧合血红蛋白量越少, 一旦糖尿病患者 HbA1c 水平增加, 血管内皮

细胞损伤程度加重,影响微血管循环,会加速机体组织器官衰老、硬化^[8]。本研究中B组HbA1c显著高于A组,可见中晚期肾损伤患者血清HbA1c表达水平更高。Gubin等^[9]研究指出,HbA1c水平越高,DKD患者病症越严重,且HbA1c水平与血糖浓度呈正比。因此认为HbA1c可作为检测血糖水平、肾脏病变的重要指标。

本研究发现A、B两组患者MA1b、Cys-C水平显著较正常人群高,且B组患者尤甚。说明MA1b、Cys-C水平参与DKD疾病进展,与Beck等学者^[10]对糖尿病肾病患者生化指标水平研究一致。国外研究报道,MA1b水平变化与肾脏损害密切相关,在肾脏损害严重时会迅速升高,当肾脏损害控制后会明显下降,其不受机体免疫抑制状态的影响^[11]。MA1b作为一种大分子蛋白广泛存在于血浆中,可在电负同性相斥作用下选择性开启屏障,使尿蛋白分子不易通过肾小球滤过膜^[12]。相关研究指出,糖尿病患者肾损害早期血管、肾脏结构出现改变,其屏障机制受损,会导致异常蛋白从滤过膜漏出,产生MA1b;因此,MA1b与肾小球早期损伤密切相关^[13]。Cys-C是一种碱性的小分子蛋白,是目前临床公认的评估早期肾脏损伤的有效生化指标。De Bruyne等学者^[14]研究发现,Cys-C在近曲小管被重吸收,而肾小管不会分泌Cys-C,Cys-C与肾脏疾病发生关系密切,亦是DKD发生的独立危险因素。因此检测血液中Cys-C水平可评估肾小球损伤情况,了解肾小球通透性的变化。

本研究经多因素Logistic回归分析显示,HbA1c、MA1b、Cys-C水平是影响糖尿病患者并发肾病的独立危险因素。原因可能为糖尿病患者体内缺血缺氧导致血管通透性提升,并降低四周脉管血流,增加肾小球滤过压,进一步损伤肾小球所致。同时,蛋白质、脂质及葡萄糖间可出现酶促反应,产生糖基化蛋白,促使血糖水平升高,进而对肾脏功能造成损害^[15]。此外,为进一步研究HbA1c、MA1b、Cys-C水平对DKD的诊断价值,本文采用ROC曲线进行研究,结果显示联合HbA1c、MA1b、Cys-C检测下面积最大,特异、敏感度最高。进一步提示联合三者检测对诊断DKD具有重要意义,临床可通过联合检测多项指标提高对DKD的诊断价值。

综上所述,联合HbA1c、MA1b、Cys-C检测DKD患者诊断价值高,其水平变化与患者预后密切相关,加强患者相关指标检测具有重要意义。

参考文献

- [1] 师朗,宋志霞,刘阳,等.糖尿病肾病腹膜透析患者内皮衍生因子,促红细胞生成素水平变化以及死亡风险分析[J].解放军医药杂志,2020,32(3):73-78.
- [2] 何爽,黄萍,范明娟.血浆miR-192,miR-29c水平对2型糖尿病肾病诊断的临床意义[J].分子诊断与治疗杂志,2019,11(6):522-526.
- [3] 王翠晓,李盈.血清同型半胱氨酸联合hs-CRP在妊娠期糖尿病肾病中的诊断价值分析[J].湖南师范大学学报(医学版),2019,16(1):109-112.
- [4] 周敏,薛文翠,马玮龙,等.β2-MG、UACR及Cys-C对原发性老年高血压肾损伤的预测价值[J].分子诊断与治疗杂志,2021,13(1):115-118.
- [5] 中华医学会肾脏病学分会专家组.糖尿病肾脏疾病临床诊疗中国指南[J].中华肾脏病杂志,2021,37(3):255-304.
- [6] Kang Y, Fang Y, Lai X. Automatic Detection of Diabetic Retinopathy with Statistical Method and Bayesian Classifier [J]. J Med Imag Health In, 2020, 32(14):571-574.
- [7] 王华,苏鹏飞.黄芪甲苷对糖尿病肾病大鼠肾纤维化病变的作用[J].医学分子生物学杂志,2019,15(2):269-272.
- [8] Barter PJ, Brandrup-Wogensen G, Palmer MK, et al. Effect of statins on HDL-C: a complex process unrelated to changes in LDL-C: analysis of the VOYAGER Database [J]. J Lipid Res, 2018, 59(6):1546-1553.
- [9] Gubin DG, Nelaeva AA, Uzhakova AE, et al. Disrupted circadian rhythms of body temperature, heart rate and fasting blood glucose in prediabetes and type 2 diabetes mellitus [J]. Chronobiol Int, 2017, 34(23):1-5.
- [10] Beck RW, Connor CG, Mullen DM, et al. The Fallacy of Average: How Using HbA1c Alone to Assess Glycemic Control Can Be Misleading [J]. Diabet Care, 2017, 40(8):994-999.
- [11] Patil SR, Mahanwar ST, Gunjal DB, et al. Study of Interaction between Human Hemoglobin and Antitubercular Isoniazid Drug with Its Detection [J]. Macromol Symp, 2019, 387(1):699-702.
- [12] Georgianos P, Divani M, Eleftheriadis T, et al. SGLT-2 inhibitors in Diabetic Kidney Disease: What Lies Behind their Renoprotective Properties [J]. Curr Med Chem, 2019, 26(29):5564-5578.
- [13] Bonner R, Albajrami O, Hudspeth J, et al. Diabetic Kidney Disease [J]. Primary Care, 2020, 47(4):645-659.
- [14] De Bruyne S, Van DJ, Himpe J, et al. Detection and Characterization of a Biochemical Signature Associated with Diabetic Nephropathy Using Near-infrared Spectroscopy on Tissue Sections [J]. J Lab Clin Med, 2019, 8(7):406-409.
- [15] De BS, Van DJ, Himpe J, et al. Detection and Characterization of a Biochemical Signature Associated with Diabetic Nephropathy Using Near-infrared Spectroscopy on Tissue Sections [J]. J Lab Clin Med, 2019, 8(7):406-409.

· 论 著 ·

CXCR4、RGS4 及 RAGE 在小儿肾母细胞瘤中的表达及临床意义

胡传兵* 韩暖 于宝华 田俊严 孙劲松

【摘要】目的 分析选择趋化因子受体(CXCR4)、蛋白信号调节因子4(RGS4)、晚期糖基化终末产物受体(RAGE)在小儿肾母细胞瘤中的表达及临床意义。**方法** 选取2015年6月至2020年6月本院收治的98例小儿肾母细胞瘤患者,手术留取肾母细胞瘤组织纳入研究组,并选取距离肿瘤边缘>5 cm的正常肾组织纳入对照组(经病理筛查无癌细胞后最终纳入73例)。比较两组CXCR4、RGS4及RAGE表达水平,分析影响肾母细胞瘤患者预后死亡的独立危险因素。**结果** 对照组CXCR4、RAGE高表达率低于研究组,RGS4高表达率高于研究组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。临床分期Ⅲ~Ⅳ期、预后不良组织结构(UH)、有淋巴结转移者CXCR4、RAGE高表达率高于临床分期Ⅰ~Ⅱ期、预后良好组织结构(FH)及无淋巴结转移者,差异均有统计学意义($P<0.05$)。FH者RGS4高表达率高于UH者,差异有统计学意义($P<0.05$)。临床分期Ⅲ~Ⅳ期、预后不良组织结构、有淋巴结转移、CXCR4、RAGE高表达及RGS4低表达是影响肾母细胞瘤患者预后死亡的危险因素($P<0.05$)。**结论** CXCR4、RGS4及RAGE在小儿肾母细胞瘤组织中表达异常,并与肾母细胞瘤发生、发展有关,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】 CXCR4; RGS4; 小儿肾母细胞瘤; RAGE

The expression and clinical significance of CXCR4, RGS4 and RAGE in patients with pediatric nephroblastoma

HU Chuanbing*, HAN Nuan, YU Baohua, TIAN Junyan, SUN Jinsong

(Department of Pediatric Surgery, Affiliated Hospital of Jining Medical College, Jining, Shandong, China, 272000)

【ABSTRACT】 Objective To analyze the expression and clinical significance of CXCR4, RGS4 and RAGE in patients with pediatric nephroblastoma. **Methods** 98 patients with pediatric nephroblastoma who were admitted to this hospital from June 2015 to June 2020 were selected. Wilms tumor tissue collected from surgery was included in the study group, and normal kidney tissue >5 cm away from the edge of the tumor were selected as the control group (73 cases without cancer cells were finally included after pathological screening). The expression levels of CXCR4, RGS4 and RAGE in different groups were compared, and the independent risk factors affecting the prognostic death of patients with Wilms tumor were analyzed. **Results** The high expression rates of CXCR4 and RAGE in the control group were significantly lower than those in the study group, and the high expression rate of RGS4 was significantly higher than that in the study group, and the differences were all statistically significant ($P<0.05$). The high expression rates of CXCR4 and RAGE in patients with clinical stage Ⅲ to Ⅳ, poor prognosis tissue structure (UH), and lymph node metastasis were significantly higher than those in patients with clinical stage Ⅰ to Ⅱ, good prognosis tissue structure (FH) and no lymph node metastasis ($P<0.05$). The high expression rate of RGS4 in FH patients was higher than that in UH patients ($P<0.05$). The clinical stage Ⅲ~Ⅳ, UH, lymph node metastasis, high expressions of CXCR4

基金项目:山东省自然科学基金(ZR2017YL013)

作者单位:济宁医学院附属医院小儿外科,山东,济宁 272000

*通信作者:胡传兵, E-mail: xiaobing1028@163.com

and RAGE, and low expression of RGS4 were risk factors affecting the prognostic death of patients with pediatric nephroblastoma ($P<0.05$). **Conclusion** CXCR4, RGS4 and RAGE are abnormally expressed in pediatric nephroblastoma tissues, and are related to the occurrence and development of nephroblastoma. Clinically, the progress and prognosis of patients can be evaluated by detecting the expression of the three indicators.

[KEY WORDS] CXCR4; RGS4; Pediatric nephroblastoma; RAGE

肾母细胞瘤又称为威尔姆斯瘤,为婴幼儿较为常见的一种腹部恶性实体肿瘤,组成部分为肾源性上皮以及间质^[1]。由于肾母细胞瘤的生物学行为多变,加之当前对肾母细胞瘤发生、发展的分子机制并未完全明确,故寻找特异性肿瘤标志物十分重要^[2]。随着分子生物学的不断发展,研究者发现选择趋化因子受体(C-X-C motif chemokine receptor 4, CXCR4)、蛋白信号调节因子4(Recombinant Regulator Of G Protein Signaling 4, RGS4)、晚期糖基化终末产物受体(receptor for advanced glycation end products, RAGE)在神经母细胞瘤、胃癌、乳腺癌及肺癌等多种实体肿瘤中表达异常,且和肿瘤的发生、发展有关,而关于CXCR4、RGS4及RAGE在肾母细胞瘤的发生、发展过程中的作用却鲜少报道^[3-4]。基于此,本研究将通过检测小儿肾母细胞瘤患者CXCR4、RGS4及RAGE的水平,探讨上述指标水平在小儿肾母细胞瘤中的表达及临床意义,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2015年6月至2020年6月本院收治的98例小儿肾母细胞瘤患者,手术留取肾母细胞瘤组织纳入研究组。其中男59例,女39例,平均年龄为(3.82±0.74)岁。纳入标准:①经病理、影像学检查确诊^[5];②临床资料完整者;③术前未进行化疗、放疗等治疗;④患儿监护人皆自愿参与本研究,并签署知情同意书。排除标准:①存在其他系统病变或恶性肿瘤者;②存在严重心、肺、肝等器官功能不全患者;③存在精神疾病无法配合本研究或依从性差者。选取距离肿瘤边缘5 cm以外的正常肾组织纳入对照组(经病理筛查无癌细胞后最终纳入73例)。本研究经医院医学伦理委员会批准通过。

1.2 方法

所有标本组织于手术切除后立即使用10%甲醛固定,组织切片后脱蜡、水化。并采用链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶(Streptomycin avidin peroxidase, S-P)免疫组化染色法对CXCR4、RGS4及

RAGE进行检测,CXCR4兔抗人多克隆抗体浓缩型购自武汉博士德生物技术公司,RGS4及RAGE兔抗人多克隆抗体浓缩型北京博奥森生物技术有限公司提供,试剂盒、DAB显色剂由河北博海生物工程开发有限公司提供,具体方法严格按照试剂盒说明执行。每批切片染色均以磷酸盐缓冲液(Phosphate Buffered Saline, PBS)代替一抗作低表达对照,用已知高表达的组织切片作高表达对照。一抗的稀释比例皆是1/100。

根据高表达细胞百分比及染色情况判定CXCR4、RGS4及RAGE表达水平^[6]:0分:无高表达细胞;1分:高表达细胞低于10%,2分:高表达细胞在11%~15%的范围内,3分:高表达细胞>50%。染色情况判定:0分:无色,1分:淡黄色,2分:棕黄色,3分:棕褐色。总积分:上述2项评分的乘积。低表达为3分及以下,高表达为4分及以上。

1.3 观察指标

①比较对照组与研究组CXCR4、RGS4及RAGE表达情况。②分析CXCR4、RGS4及RAGE表达与肾母细胞瘤临床病理特征的关系。③对患者进行为期1年的门诊或电话随访,记录预后生存、死亡的情况,分析影响肾母细胞瘤患者预后死亡的独立危险因素。

1.4 统计学方法

采用统计软件SPSS 22.0进行统计分析。计量资料以($\bar{x}\pm s$)表示,行 t 检验;计数资料以 $n(\%)$ 表示,行 χ^2 检验;影响因素采用多元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CXCR4、RGS4及RAGE表达情况比较

对照组CXCR4、RAGE高表达率显著低于研究组,RGS4高表达率高于研究组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表1、图1。

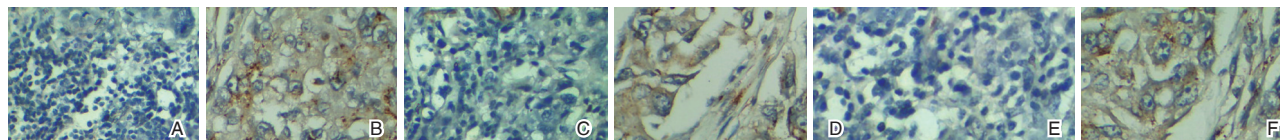
2.2 CXCR4、RGS4及RAGE表达与肾母细胞瘤临床病理特征的关系

临床分期Ⅲ~Ⅳ期、预后不良组织结构(unfa-

表1 两组 CXCR4、RGS4 及 RAGE 表达情况比较 [n(%)]

Table 1 Comparison on CXCR4, RGS4 and RAGE expression between the two groups [n(%)]

组别	n	CXCR4		RGS4		RAGE	
		高表达	低表达	高表达	低表达	高表达	低表达
研究组	98	65(66.33)	33(33.67)	37(37.76)	61(62.24)	66(67.35)	32(32.65)
对照组	73	21(28.77)	52(71.23)	58(79.45)	15(20.55)	13(17.81)	60(82.19)
χ^2 值		23.608		29.459		41.307	
P值		<0.001		<0.001		<0.001	



注: A、B 为 CXCR4 在瘤旁正常组织及肾母细胞瘤中表达; C、D 为 RGS4 在瘤旁正常组织及肾母细胞瘤中表达; E、F 为 RAGE 在瘤旁正常组织及肾母细胞瘤中表达。

图1 免疫组化染色图 (SP, ×400)

Figure 1 Immunohistochemical staining (SP, ×400)

avorable histology, UH)、有淋巴结转移者 CXCR4、RAGE 高表达率明显高于临床分期 I~II 期、预后良好组织结构 (favorable histology, FH) 及无淋巴

结转移者, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。FH 者 RGS4 高表达率高于 UH 者, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。

表2 CXCR4、RGS4 及 RAGE 表达与肾母细胞瘤临床病理特征的关系 [n(%)]

Table 2 the relationship between the expressions of CXCR4, RGS4 and RAGE and clinicopathological features of Wilms tumor [n(%)]

临床病理特征	n	CXCR4 高表达 (n=65)		χ^2 值	P值	RGS4 高表达 (n=37)		χ^2 值	P值	RAGE 高表达 (n=66)	
		n	%			n	%			n	%
年龄(岁)	≤3岁	60	38(63.33)	0.621	0.431	21(35.00)	0.500	0.480	38(63.33)	1.134	0.287
	>3岁	38	27(71.05)			16(42.11)			28(73.68)		
性别	男	59	39(66.10)	0.003	0.954	23(38.98)	1.057	0.297	41(69.49)	0.310	0.578
	女	39	26(66.67)			14(35.90)			25(64.10)		
临床分期	I~II期	58	30(51.72)	13.567	0.000	23(39.66)	0.218	0.640	34(58.62)	4.921	0.027
	III~IV期	40	35(87.50)			14(35.00)			32(80.00)		
临床分型	FU	72	43(59.72)	5.300	0.021	32(44.44)	5.167	0.023	43(59.72)	7.175	0.007
	UH	26	22(84.62)			5(19.23)			23(88.46)		
淋巴结转移	有	26	22(84.62)	4.662	0.031	16(61.54)	2.258	0.133	22(84.62)	4.799	0.028
	无	72	43(59.72)			21(29.17)			44(61.11)		

2.3 影响肾母细胞瘤患者预后死亡的单因素分析
术后1年预后死亡者8例(8.16%)。非条件单因素 logistic 回归模型分析显示:临床分期、临床分型、淋巴结转移、CXCR4、RAGE 及 RGS4 表达为影响肾母细胞瘤患者预后死亡的单因素 ($P < 0.05$)。见表 3。

2.4 影响肾母细胞瘤患者预后死亡的多因素分析
经非条件多因素 logistic 回归模型分析得,临床分期 III~IV 期、预后不良组织结构、有淋巴结转移、CXCR4、RAGE 高表达及 RGS4 低表达是影响肾母细胞瘤患者预后死亡的危险因素 ($P < 0.01$)。见表 4。

3 讨论

肾母细胞瘤是小儿肾癌中最为常见的一种类型,据不完全统计,肾母细胞瘤占小儿恶性肾肿瘤

发病率的 5% 左右^[7]。由于恶性肿瘤的发生、发展及浸润转移是由各种信号传导、趋化因子、转录因子等途径共同实现,因此,寻找识别肾母细胞瘤发生、发展相关的特异性标志物是近年来研究的热点^[8]。

Cheng 等^[9]报道显示, CXCR4 为 CXCL12 的唯一受体, CXCL12 通过和 CXCR4 的 N 端特异性结合,在肿瘤侵袭浸润转移、介导免疫反应、增强肿瘤血管新生等病理生理过程中起到关键作用。国外已有较多研究表明, CXCR4 表达异常在乳癌、前列腺癌、肾癌的发生中起到重要作用^[10]。RGS4 属于亚家族的因子,可以调控 G 蛋白信号转导效率、平衡不同 G 蛋白信号转导,参与 G 蛋白信号转导偶联功能的调节,同时 RGS4 与人体多项生理活动有关^[11]。任鹏等^[12]研究显示, RGS4 可作为许多疾

表3 肾母细胞瘤患者预后死亡的单因素 [n(%)]

Table 3 univariate analysis on prognostic death in patients with Wilms tumor [n(%)]

临床病理特征	n	死亡 (n=8)	存活 (n=90)	χ^2 值	P值
年龄(岁)	≤3岁	60	3(5.00)	2.065	0.015
	>3岁	38	5(13.16)		
性别	男	59	5(8.47)	0.019	0.890
	女	39	3(7.69)		
临床分期	I~II期	58	2(3.45)	4.214	0.040
	III~IV期	40	6(15.00)		
临床分型	FU	72	1(1.39)	16.613	<0.001
	UH	26	7(26.92)		
淋巴结转移	有	26	6(23.08)	10.499	0.001
	无	72	2(2.78)		
CXCR4	高表达	65	8(12.31)	4.433	0.035
	低表达	33	0(0.00)		
RGS4	高表达	37	0(0.00)	5.284	0.022
	低表达	61	8(13.11)		
RAGE	高表达	66	8(12.12)	4.224	0.040
	低表达	32	0(0.00)		

病的潜在治疗靶点,同时RGS4与多种肿瘤的产生、发展密切相关。Franklin等^[13]研究显示,在宫颈鳞癌组织中RAGE存在高表达情况,RAGE为宫颈鳞癌的转移、侵袭中的一个重要环节。RAGE是免疫球蛋白受体的一种,在疾病的发生、发展中有重要的作用^[14]。在正常情况下RAGE在组织细胞中处于较低的水平,仅在肺和脑组织中呈高表达状态^[15]。目前鲜有关于CXCR4、RGS4及RAGE表达与肾母细胞瘤发生发展关系的相关研究。本组研究结果发现,对照组CXCR4、RAGE高表达率显著低于研究组、RGS4高表达率高于研究组,且CXCR4、RAGE高表达率与肾母细胞瘤患者的临床分期、临床分型及淋巴结转移有关,而RGS4的高表达率仅与临床分型有关,这与相关研究结果相符^[16-17]。提示CXCR4、RGS4及RAGE表达可能在肾母细胞瘤的发生、发展及转移过程中发挥重

表4 影响肾母细胞瘤患者预后死亡的多因素分析

Table 4 Analysis of multiple factors influencing the prognostic death of patients with Wilms tumor

变量	回归系数	标准误	wald χ^2 值	OR值	95%CI	P值
临床分期:III~IV期(参照组:I~II期)	0.645	0.235	7.246	1.9006	1.202~3.021	<0.001
临床分型:UH(参照组:FU)	0.723	0.345	6.352	2.060	1.048~4.052	<0.001
淋巴结转移:有(参照组:无)	0.835	0.336	5.488	2.305	1.193~4.453	<0.001
CXCR4:高表达(参照组:低表达)	0.724	0.319	8.532	2.063	1.104~3.854	<0.001
RGS4:低表达(参照组:高表达)	0.665	0.138	5.132	1.944	1.484~2.548	<0.001
RAGE高表达(参照组:低表达)	0.410	0.105	8.698	1.507	1.227~1.851	<0.001

要作用。CXCR4作为趋化因子亚家族中的一员,可有效阻断肿瘤新生血管,从而发挥抑制肿瘤的转移与生长的作用。RAGE可通过活化MAPK、NF- κ B等信号通路,推动肿瘤细胞生长信号的进一步活化,继而促进肿瘤的转移与生长。RGS4可通过失活G蛋白对G蛋白偶联受体信号的转导通路发挥抑制作用,从而抑制肿瘤细胞转移及侵袭,故推测在肾母细胞瘤中RGS4可能为抑癌因子。本研究通过对患者预后进行分析发现,CXCR4、RAGE高表达及RGS4低表达是肾母细胞瘤患者预后死亡的危险因素,提示CXCR4、RGS4及RAGE在评估患者预后情况中具有重要的价值。然而关于CXCR4、RGS4及RAGE在小儿肾母细胞瘤组织中具体作用机制仍需要进一步的研究探索。

综上所述,CXCR4、RGS4及RAGE在小儿肾母细胞瘤组织中表达异常,并与肾母细胞瘤发生、发展有关,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] 薛满,马春利,尹春燕,等.孟鲁司特联合氨溴索对支气管哮喘患儿血清sesIt和sICAM-1水平影响的研究[J].临床和实验医学杂志,2019,25(18):236-241.
- [2] Ding Y, Guo X, Liu X, et al. Expression and clinical significance of p73 in Wilms' tumor in children [J]. Oncol Lett, 2019, 17(6): 5435-5440.
- [3] Su C, Wang T, Zhao J, et al. Meta-analysis of gene expression alterations and clinical significance of the HECT domain-containing ubiquitin ligase HUWE1 in cancer [J]. Oncol Lett, 2019, 18(3): 563-569.
- [4] 汪岭,马雪莲,王启明.小儿视网膜母细胞瘤VEGF, Cyclin D1及E-Cadherin表达及与组织病理特征的关系[J].分子诊断与治疗杂志,2020,12(11):32-36.
- [5] Yu Y, Kang YF, Li KS, et al. Expression and clinical significance of aquaporin-1 and ET-1 in urine of children with congenital hydronephrosis [J]. Eur Rev Med Pharmacol, 2017, 18(1): 4141-4146.
- [6] Carvajal-Hausdorf D, Altan M, Velcheti V, et al. Expression and clinical significance of PD-L1, B7-H3, B7-H4 and TILs in human small cell lung Cancer (SCLC) (下转第1519页)

· 论 著 ·

PUMA、IQGAP1在胰腺癌中的表达及与临床病理、预后生存的相关性

胡怀远* 夏燕 雍翔 邹萍 刘岩

[摘要] **目的** 探讨PUMA、IQGAP1蛋白在胰腺癌中的表达及与临床病理、预后生存的相关性。**方法** 选取2016年10月至2018年10月本院收治的胰腺癌患者胰腺癌组织标本、远离胰腺肿瘤3 cm的癌旁组织标本各74份,比较两组织中PUMA、IQGAP1蛋白的表达情况,并探讨其与病理特征的关系。随访2年,了解74例患者生存率,采用ROC曲线分析不同PUMA、IQGAP1表达的胰腺癌患者预后2年生存情况,采用Logistic回归模型分析影响胰腺癌患者2年预后的独立危险因素。**结果** 胰腺癌组织中的PUMA阳性率显著低于癌旁组织, IQGAP1阳性率显著高于癌旁组织,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。TNM分期为Ⅲ~Ⅵ期、有淋巴结转移、分化程度为中-低分化的胰腺癌患者PUMA阴性率、IQGAP1阳性率更高($P < 0.05$)。74例胰腺癌患者2年生存率为16.22%。PUMA阴性表达、IQGAP1阳性表达的胰腺癌患者死亡率高于PUMA阳性表达、IQGAP1阴性表达的患者,差异有统计学意义($P < 0.05$)。生存分析显示PUMA(表达阳性)、IQGAP1(表达阴性)者生存期较长,Keplan-meier生存曲线明显不同($P < 0.05$)。TNM(Ⅲ~Ⅵ期)、淋巴结转移(有)、分化程度(中-低分化)、PUMA(表达阴性)、IQGAP1(表达阳性)为影响胰腺癌患者预后生存的独立危险因素($P < 0.05$)。**结论** PUMA阴性、IQGAP1阳性为影响胰腺癌患者预后生存的危险因素,临床可通过加强监测二者表达情况,以评估胰腺癌患者病情进展情况及预后。

[关键词] PUMA蛋白; IQGAP1蛋白; 胰腺癌; 临床病理特征

Expression of PUMA and IQGAP1 in pancreatic cancer and their correlation with clinicopathology and prognostic survival

HU Huaiyuan*, XIA Yan, YONG Xiang, ZOU Ping, LIU Yan

(Department of Pathology, General Hospital of Wanbei Coal Power Group, Suzhou, Anhui, China, 234011)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the expression of PUMA and IQGAP1 in pancreatic cancer and their correlation with clinicopathology and prognostic survival. **Methods** From October 2016 to October 2018, 74 samples of pancreatic cancer tissue specimens and paracancerous tissue specimens 3 cm away from the pancreatic tumor were selected from the patients with pancreatic cancer admitted to our hospital from October 2016 to October 2018. The expressions of PUMA and IQGAP1 in two tissues were compared. Its relationship with pathological characteristics was explored, 74 patients were followed up for 2 years to understand the 2-year survival rate of patients. The ROC curve was used to analyze the 2-year prognosis of patients with different PUMA and IQGAP1 expressions, and the logistic regression model was used to analyze the independent risk factors affecting the 2-year prognosis of patients with pancreatic cancer. **Results** The positive rate of PUMA in pancreatic cancer tissue was significantly lower than that in normal tissues adjacent to cancer, and the positive rate of IQGAP1 was significantly higher than that in normal tissues adjacent to cancer. The differences were statistically significant ($P < 0.05$). In patients with TNM stage Ⅲ~Ⅵ, lymph node metastasis, and moderate-poor differentiation, the negative rate of PUMA was higher than the positive rate of PUMA, and positive

基金项目:蚌埠医学院课题(BYKY17190)

作者单位:皖北煤电集团总医院病理科,安徽,宿州 234011

*通信作者:胡怀远, E-mail: huaiyuan.hu@anweikang.cn

rate of IQGAPI was higher than the negative rate of IQGAPI, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). In the 74 patients with pancreatic cancer, the 2-year survival rate was 16.22%. The mortality of patients with pancreatic cancer and negative expression of PUMA and positive expression of IQGAPI was higher than that of patients with positive expression of PUMA and negative expression of IQGAPI, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Survival analysis showed that PUMA (positive expression) and IQGAPI (negative expression) had longer survival times, and Kaplan-meier survival curves were significantly different ($P < 0.05$). TNM (stage III~VI), lymph node metastasis (yes), degree of differentiation (medium-poor differentiation), PUMA (negative expression), IQGAPI (positive expression) are independent risk factors affecting the prognosis and survival of patients with pancreatic cancer ($P < 0.05$). **Conclusion** PUMA negative and IQGAPI positive are risk factors that affect the prognosis and survival of patients with pancreatic cancer. Clinically, the expression of both can be strengthened to evaluate the progress and prognosis of patients with pancreatic cancer.

[KEY WORDS] PUMA protein; IQGAPI protein; Pancreatic cancer; Clinicopathological features

胰腺癌是一种恶性程度极高的肿瘤,患者大多预后差。目前临床治疗胰腺癌以手术切除为首要治疗手段,但由于该病早期误诊、漏诊率高,导致生存率极低^[1]。积极寻找胰腺癌新的标志物对于胰腺癌的早期诊断及治疗具有重要的临床价值。凋亡调控基因(53 Up-regulated Modulator of Apoptosis, PUMA)为P53基因中诱导细胞凋亡的重要介质,可阻碍线粒体发挥功能,刺激凋亡线粒体蛋白释放,在肝癌、胃癌等恶性肿瘤中均有表达^[2]。IQ结构域GTP酶激活蛋白(IQ-domain GTPase-activating proteins, IQGAPs)是鸟苷三磷酸酶活化蛋白家族, IQGAPI蛋白属于其家族成员之一,具有多个结构域^[3]。有学者研究指出, IQGAPI可通过转导信号通路刺激肿瘤细胞的增殖、迁移^[4]。本文旨在探讨PUMA、IQGAPI蛋白在胰腺癌中的表达及其与临床病理、预后生存的相关性,现研究报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2016年10月至2018年10月本院收治的74例胰腺癌患者胰腺癌组织标本、远离胰腺肿瘤3 cm的癌旁组织标本各74份。其中男44例,女30例;平均年龄(55.19 ± 4.52)岁;肿瘤直径最大为8.5 cm,最小1.8 cm;肿瘤位于胰腺头颈部39例,位于体尾部35例。纳入标准:①CT检查提示胰周脂肪层消失,出现双轨征,局部出现凸起的肿物,并经术后病理检查确诊为胰腺癌^[5];②均在入院后2周内进行根治性手术切除;③术前未接受过放、化疗等辅助治疗。排除标准:①合并恶性肿瘤、阿尔兹海默症者、因精神

障碍无法配合治疗者;②病理检查结果为胰腺囊性肿瘤者;③因非胰腺癌死亡者及随访期间失访者。本研究经医院医学伦理委员会批准通过,受试者或其家属均签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 标本采集

PUMA、IQGAPI标本均经甲醛固定、石蜡包埋、切片、DAB显色剂显色、苏木精复染、乙醇脱水、二甲苯透明,中性树胶封固等步骤处理。采用免疫组化染色法检测PUMA、IQGAPI表达情况。

1.2.2 试剂

PUMA及IQGAPI兔多克隆抗体均采购自美国Epitomics公司。DAB显色剂及配套试剂盒采购自北京中杉金桥生物技术有限公司。L3回旋式切片由北京手术器械厂提供。

1.2.3 结果判定

阳性结果判定^[6]: PUMA及IQGAPI蛋白染色阳性信号呈棕黄或棕褐色,位于胞膜或胞浆。阳性细胞计分:0分:无阳性细胞,1分:阳性细胞 $< 10\%$,2分:阳性细胞 $10\% \sim 50\%$,3分:阳性细胞 $50\% \sim 75\%$,4分:阳性细胞 $> 75\%$;细胞质无染色计0分,淡黄色计1分,棕黄色计2分,棕褐色计3分。以双盲法观察切片,两项评分之和 ≤ 2 分为阴性, ≥ 3 分为阳性。阳性率=阳性例数/总例数 $\times 100\%$ 。

1.3 随访

随访从患者术后开始,直至患者死亡或本研究结束,为期2年(截止时间:2020年10月)。随访时间在1~24个月中分布,平均随访时间为(11.10 ± 2.64)个月。随访方式为门诊复查,详细记录两组患者治疗后无进展生存时间(Progression-Free-Survival, PFS)、总生存时间(Overall Survival, OS)。

1.4 统计学方法

应用SPSS 21.0软件进行统计学分析;计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,多组间采用单因素方差分析,两两比较采用LSD-t检验;计数资料以 $n(\%)$ 表示,采用 χ^2 检验;采用Kaplan-Meier生存分析预后,使用tarone法进行检验;以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

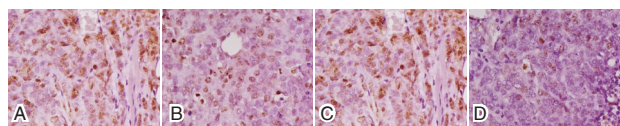
2.1 PUMA及IQGAPI在不同组织中的表达

胰腺癌组织中的PUMA阳性率显著低于癌旁组织,IQGAPI阳性率显著高于癌旁组织,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表1及图1。

表1 PUMA及IQGAPI在不同组织中的表达 [$n(\%)$]

Table 1 expression of Puma and iqgapl in different tissues [$n(\%)$]

组别	n	PUMA		IQGAPI	
		阳性	阴性	阳性	阴性
胰腺癌组织	74	23(31.08)	51(68.92)	54(72.97)	20(27.03)
癌旁组织	74	47(63.51)	27(36.49)	34(45.95)	40(54.05)
χ^2 值		15.613		11.212	
P值		<0.001		<0.001	



注:A、B为IQGAPI阴、阳性表达;C、D为PUMA阳、阴性表达

图1 胰腺癌组织免疫组化染色图(SP, x500)

Figure 1 immunohistochemical staining of pancreatic carcinoma (SP, x500)

2.2 胰腺癌组织中PUMA、IQGAPI蛋白表达与临床病理特征的关系

TNM分期为Ⅲ~Ⅵ期、有淋巴结转移、分化程度为中-低分化的胰腺癌患者PUMA阴性率、IQGAPI阳性率更高($P < 0.05$)。见表2。

2.3 胰腺癌患者不同PUMA、IQGAPI表达的预后情况

74例胰腺癌患者2年生存率为16.22%。PUMA阴性表达、IQGAPI阳性表达的胰腺癌患者死亡率高于PUMA阳性表达、IQGAPI阴性表达的患者,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表3。

表3 胰腺癌患者PUMA、IQGAPI表达的预后情况 [$n(\%)$]

Table 3 prognosis of different expression of Puma and iqgapl in patients with pancreatic cancer [$n(\%)$]

组别	n	PUMA		IQGAPI	
		阴性	阳性	阴性	阳性
生存	12	12(100.00)	0(0.00)	9(75.00)	3(25.00)
死亡	62	39(62.90)	23(37.10)	11(17.74)	51(82.26)
χ^2 值		6.459		16.713	
P值		0.011		<0.001	

2.4 生存曲线分析

PUMA表达阴性、表达阳性及IQGAPI表达阴性、表达阳性半数生存时间分别为 (9.12 ± 1.18) 月、 (16.25 ± 1.58) 月、 (17.40 ± 2.70) 月、 (10.70 ± 1.60) 月。生存分析显示PUMA(表达阳性)、IQGAPI(表达阴性)者生存期较长,Keplan-meier生存曲线明显不同($P < 0.05$)。见图2。

表2 胰腺癌组织中PUMA、IQGAPI蛋白表达与临床病理特征的关系 [$n(\%)$]

Table 2 Relationship between puma, iqgapl protein expression and clinicopathological features in pancreatic cancer [$n(\%)$]

病理参数	例数 (n=74)	PUMA		χ^2 值	P值	IQGAPI		χ^2 值	P值	
		阳性(n=23)	阴性(n=51)			阳性(n=54)	阴性(n=20)			
年龄(岁)	≥ 65	48	18(78.26)	30(58.82)	2.628	0.105	32(62.75)	16(80.00)	2.755	0.097
	< 65	26	5(21.74)	21(41.18)			22(43.14)	4(20.00)		
性别(例)	男	40	13(56.52)	27(52.94)	0.082	0.775	30(58.82)	10(50.00)	0.181	0.670
	女	34	10(43.48)	24(47.06)			24(47.06)	10(50.00)		
TNM分期	I~II期	33	18(78.26)	15(29.41)	15.309	0.001	30(58.82)	3(15.00)	9.715	0.002
	III~VI期	41	5(21.74)	36(70.59)			24(40.06)	17(85.00)		
淋巴结转移	是	45	5(21.74)	40(78.43)	21.378	0.001	39(76.47)	6(30.00)	10.918	0.001
	无	29	18(78.26)	11(21.57)			15(29.41)	14(70.00)		
分化程度	高分化	40	18(78.26)	32(62.75)	4.615	0.032	33(64.71)	7(35.00)	4.007	0.045
	中-低分化	34	5(21.74)	29(56.86)			21(41.18)	13(65.00)		
肿瘤大小(cm)	≥ 5	44	15(65.22)	29(56.86)	0.459	0.498	32(62.75)	12(60.00)	0.003	0.945
	< 5	30	8(35.78)	22(43.14)			22(43.14)	8(40.00)		
肿瘤部位	头颈部	39	15(65.22)	24(47.06)	0.276	0.599	27(52.94)	12(60.00)	0.585	0.444
	尾部	35	8(35.78)	17(33.33)			27(52.94)	8(40.00)		
神经侵犯	有	38	12(52.17)	26(50.98)	0.009	0.924	30(58.85)	8(40.00)	1.414	0.234
	无	36	11(47.83)	25(49.02)			24(47.06)	12(60.00)		

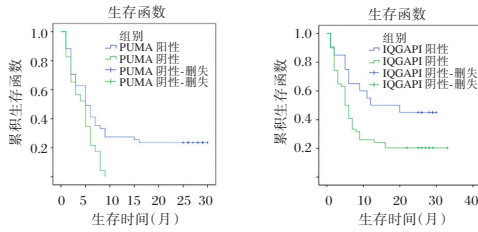


图2 不同PUMA、IQGAPI表达的患者生存曲线分析
Figure 2 analysis of survival curve of patients with different Puma and IQGAPI expression

2.5 影响胰腺癌患者预后生存的单因素和多因素分析

TNM(Ⅲ~Ⅵ期)、淋巴结转移(有)、分化程度(中-低分化)、PUMA(表达阴性)、IQGAPI(表达阳性)为影响胰腺癌患者预后生存的独立危险因素($P<0.05$)。见表4。

3 讨论

据统计,胰腺癌在全球范围内恶性肿瘤发病率中排名靠前,死亡率位居第7位,目前临床多依据腹部CT、胰腺MRI、腹部超声、超声内镜等检查结合术后病理检查确诊^[7]。但由于胰腺位置隐蔽,在患者表现出临床症状时,肿瘤多已发展到中晚期,手术根治难度大,患者仍面临术后肿瘤复发、转移的风险,且预后情况不理想。

随着医学检验技术的发展,肿瘤相关基因标志检测逐渐引起广大学者的重视,有学者研究指出,正常的胰腺细胞发展为胰腺癌的过程中有多个癌基因及抑癌基因的参与^[8]。PUMA是近年来新发现的促凋亡基因,可发挥强大的促凋亡作用^[9]。IQGAPI是一种能通过ERK-2信号通路的透明质酸,并与透明质酸受体结合促进细胞迁移及侵袭。本研结果显示

这与既往学者报道结果一致^[10]。

国外文献报道,胰腺癌患5年生存率仅在5%左右^[11]。本研究随访资料显示:胰腺癌患者术后2年生存率仅为16.22%;PUMA阴性表达、IQGAPI阳性表达的患者死亡率更高;PUMA阳性表达、IQGAPI阴性表达的患者生存期更长。这与Ghosh等学者^[12]研究结果一致,可见PUMA、IQGAPI参与了胰腺癌发生、发展的过程。IQGAPI作为血管内皮细胞生长因子受体结合蛋白,在血管内皮的迁移、增殖过程中发挥重要作用;而PUMA是一种新的具有凋亡作用的靶基因,对细胞起着恶性转化的作用,其可抑制细胞凋亡并参与肿瘤的发生、恶化的过程。有学者报道,PUMA的表达下调与肿瘤发生相关,PUMA基因丢失后,加剧了淋巴组织的转移,并促使肿瘤生长^[13]。

吴萍等学者^[14]通过小鼠实验发现,PUMA表达的改变会影响胃癌细胞的增殖能力,PUMA低表达与胃癌的发生有关。提示可在患者化疗过程中,通过增加PUMA表达量,达到促进癌细胞凋亡、抗肿瘤的目的。国内学者报道,在食管鳞状细胞癌组织中,IQGAPI表达明显上调,推测IQGAPI阳性表达可促进恶性肿瘤浸润,提高肿瘤侵袭能力^[15]。本研究结果亦证实这一观点。但由于本研究纳入样本量较少,且未对PUMA、IQGAPI在肿瘤中侵袭、转移的作用机制进行深入研究,导致研究存在不足。后续将扩大样本量并对血清标志物进行联合检测,以明确二者在胰腺癌病情进展中的作用机制,证实其对诊治胰腺癌的敏感性。

综上所述,PUMA阴性、IQGAPI阳性为影响胰腺癌患者预后生存的危险因素,临床可通过加强监测二者表达情况,以评估胰腺癌患者病情进展情况及预后。

表4 影响胰腺癌患者预后生存的单因素和多因素分析

Table 4 univariate and multivariate analysis of prognostic factors in patients with pancreatic cancer

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)	1.552	0.410~1.624	0.830			
性别(男 vs 女)	1.610	0.567~1.598	0.705			
TNM(Ⅲ~Ⅵ期 vs I~Ⅱ期)	1.714	1.517~1.94	0.028	1.258	1.467~1.339	<0.001
淋巴结转移(是 vs 否)	1.688	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)	1.557	1.527~1.857	0.011	1.325	1.254~1.884	<0.001
肿瘤大小(≥3 cm vs <3 cm)	1.587	0.485~1.685	0.254			
肿瘤部位(头颈部 vs 尾部)	1.498	0.524~1.135	0.984			
神经侵犯(有 vs 无)	1.578	0.665~1.554	0.889			
PUMA(阴性表达 vs 阳性表达)	1.221	1.235~1.456	0.019	1.354	1.372~1.698	<0.001
IQGAPI(阳性表达 vs 阴性表达)	1.122	1.342~1.568	0.001	1.647	1.247~1.654	<0.001

参考文献

- [1] 徐晓慧, 曾新颖, 王黎君, 等. 1990年与2017年中国胰腺癌疾病负担分析[J]. 中华流行病学杂志, 2019, 40(9): 1084-1088.
- [2] Yang S, Zhu Z, Zhang X, et al. Idelalisib induces PUMA-dependent apoptosis in colon cancer cells [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(4):6102-6113.
- [3] Jin X, Pan Y, Wang L, et al. Fructose-1,6-bisphosphatase inhibits ERK activation and bypasses gemcitabine resistance in pancreatic cancer by blocking IQGAP1-MAPK interaction [J]. *Cancer Res*, 2017, 77(16):3143-2016.
- [4] 陈瑜, 宋魏, 崔发财, 等. IQGAP1在食管鳞状细胞癌中的表达及其对TE-2细胞恶性生物学行为的影响[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2019, 26(1):79-84.
- [5] 沈艺南, 白雪莉, 梁廷波. 2017美国国立综合癌症网络胰腺癌诊断与治疗指南(V1版)更新解读[J]. 中华消化外科杂志, 2017, 15(16):327-329.
- [6] Carmon KS, Gong X, Yi J, et al. LGR5 receptor promotes cell-cell adhesion in stem cells and colon cancer cells via the IQGAP1-Rac1 pathway [J]. *J Biol Chem*, 2017, 292(36): 14989-15001.
- [7] 虞先潜, 刘亮, 徐华祥, 等. 胰腺癌综合诊治指南(2018版)[J]. 临床肝胆病杂志, 2018, 34(10):77-88.
- [8] 于洋, 薛莹, 仓顺东. 热休克蛋白A2, IGFBP2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.
- [9] Josep T, Volker K, Werner S, et al. nab-Paclitaxel plus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer: a subgroup analysis of the Western European cohort of the MPACT trial [J]. *Oncotargets Ther*, 2017, 10(18):591-596.
- [10] Grabowska W, Achtabowska N, Klejman A, et al. IQGAP1-dysfunction leads to induction of senescence in human vascular smooth muscle cells [J]. *Mechan Agng Developm*, 2020, 19(7):111-295.
- [11] Shuting D, Juan P, Xiangyin S, et al. Comparative study on histopathological structure and expression of p-ERK/IQGAP1 in human pterygium and pinguecula [J]. *J Pract Med*, 2019, 15(17):65-787.
- [12] Ghosh M, Lo R, Ivic I, et al. CD13 tethers the IQGAP1-ARF6-EFA6 complex to the plasma membrane to promote ARF6 activation, β 1 integrin recycling, and cell migration [J]. *Sci Signal*, 2019, 12(5):36-78.
- [13] Kosol S, Contreras-Martos S, Piai A, et al. Interaction between the scaffold proteins CBP by IQGAP1 provides an interface between gene expression and cytoskeletal activity [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1):57-53.
- [14] 吴萍, 李佳佳, 裴新茹, 等. ABT-737增强Mcl-1小分子抑制剂UMI-77诱导的胃癌细胞凋亡[J]. 中国药理学通报, 2019, 35(3):341-346.
- [15] 陈瑜, 宋魏, 崔发财, 等. IQGAP1在食管鳞状细胞癌中的表达及其对TE-2细胞恶性生物学行为的影响[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2019, 26(1):79-84.

(上接第1514页)

- [J]. *J Immuno Therap Cancer*, 2019, 7(1):98-101.
- [7] Shao X, Cheng Z, Xu M, et al. Prognosis, Significance and Positive Correlation of Rab1A and p-S6K/Gli1 Expression in Gastric Cancer [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2019, 19(11):1359-1367.
- [8] Yao CJ, Li PP, Song HS, et al. Retraction Note to: CXCL12/CXCR4 Axis Upregulates Twist to Induce EMT in Human Glioblastoma [J]. *Molecul Neurobiol*, 2017, 54(9):246-251.
- [9] Jin XH, Lu S, Wang AF. Expression and clinical significance of miR-4516 and miR-21-5p in serum of patients with colorectal cancer [J]. *BMC Cancer*, 2020, 20(1):236-238.
- [10] Cao X X, Qi M, Cai H, et al. Detection of MYD88 L265P and WHIM-like CXCR4 mutation in patients with IgM monoclonal gammopathy related disease [J]. *Ann Hematol*, 2017, 96(6):971-976.
- [11] Patricia B, Jara P, Álvaro E, et al. SOX11 promotes tumor protective microenvironment interactions through CXCR4 and FAK regulation in mantle cell lymphoma [J]. *Blood*, 2017, 130(4):1453-1462.
- [12] 任鹏, 梁春强, 张旭辉, 等. RGS4蛋白在小儿肾母细胞瘤组织中的表达及临床意义[J]. 中国药物与临床, 2019, 19(5):717-718.
- [13] Franklin TC, Wohleb ES, Yi Z, et al. Persistent Increase in Microglial RAGE Contributes to Chronic Stress-Induced Priming of Depressive-like Behavior [J]. *Biol Psychiatry*, 2018, 83(1):352-356.
- [14] Janina E, Sandra M F, Luise S, et al. Synergistic regulation of Rgs4 mRNA by HuR and miR-26/RISC in neurons [J]. *RNA Biol*, 2020, 36(28):371-377.
- [15] Nguyen AH, Detty SQ, Agrawal DK. Clinical Implications of High-mobility Group Box-1 (HMGB1) and the Receptor for Advanced Glycation End-products (RAGE) in Cutaneous Malignancy: A Systematic Review [J]. *Anticancer Res*, 2017, 37(1):1-2.
- [16] Li S, Huang Y, Huang Y, et al. The long non-coding RNA TP73-AS1 modulates HCC cell proliferation through miR-200a-dependent HMGB1/RAGE regulation [J]. *J Exp Clin Cancer Res Cr*, 2017, 36(1):51-52.
- [17] Wei C, Duan XM, Ying L, et al. Uric Acid Induces Endothelial Dysfunction by Activating the HMGB1/RAGE Signaling Pathway [J]. *BioMed Res Int*, 2017, 25(10):124-129.

短暂性脑缺血发作患者 ABCD2 评分与外泌体 miR-450b-5p 水平的关系

钱腊燕* 武晓芳 刘彦龙 凡奇 马龙

【摘要】 目的 研究短暂性脑缺血发作(TIA)患者 ABCD2 评分与外泌体 miR-450b-5p 水平的关系。方法 选取亳州市人民医院 2017 年 1 月至 2019 年 6 月诊治的 142 例 TIA 患者作为 TIA 组,另选取 133 例同期于本院体检的健康人作为对照组,检测两组外泌体 miR-450b-5p 水平,根据 ABCD2 评分将 TIA 患者分为低危组、中危组和高危组,比较各组 miR-450b-5p 水平,分析 miR-450b-5p 水平与 ABCD2 评分的相关性。比较不同预后患者 ABCD2 评分与外泌体 miR-450b-5p 水平,并通过 ROC 曲线分析两者对于预后的预测价值。结果 TIA 组外泌体 miR-450b-5p 表达水平明显低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。ABCD2 评分:高危组>中危组>低危组,外泌体 miR-450b-5p 表达水平:高危组<中危组<低危组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。外泌体 miR-450b-5p 水平与 ABCD2 评分呈负相关($r=-0.611, P<0.05$)。预后良好组患者 ABCD2 评分明显低于预后不良组,外泌体 miR-450b-5p 水平明显高于预后不良组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。外泌体 miR-450b-5p 联合 ABCD2 评分评估 TIA 预后的 AUC 为 0.819,明显大于两者单独检测($P<0.05$),两者联合预测的敏感度为 84.21%,特异度为 69.27%。结论 TIA 患者外泌体 miR-450b-5p 表达水平与 ABCD2 评分呈负相关,两者水平升高增高可提示 TIA 患者预后不良。

【关键词】 短暂性脑缺血发作; ABCD2 评分; miR-450b-5p

Relationship between ABCD2 score and exosomal miR-450b-5p level in patients with transient ischemic attack

QIAN Layan*, WU Xiaofang, LIU Yanlong, FAN Qi, MA Long

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

【ABSTRACT】 **Objective** To study the relationship between ABCD2 score and exosomal miR-450b-5p level in patients with transient ischemic attack (TIA). **Methods** 142 patients with TIA (TIA group) and 133 healthy individuals (control group) were enrolled in this study between January 2017 and June 2019. The exosomal miR-450b-5p levels in the two groups were detected. According to the ABCD2 score, patients with TIA were divided into the low-risk group, the moderate-risk group, and the high-risk group. The miR-450b-5p level was compared among the groups, and the correlation between miR-450b-5p level and ABCD2 score was analyzed. The ABCD2 scores and exosomal miR-450b-5p levels of patients with different prognosis were compared. The prognostic value of the two indicators was analyzed by the ROC curve. **Results** The expression level of exosomal miR-450b-5p in the TIA group was significantly lower than that in the control group ($P<0.05$). ABCD2 score decreased in order, while the expression level of exosomal miR-450b-5p increased in order of the high-risk group, the moderate-risk group, to the low-risk group ($P<0.05$). The miR-450b-5p level was negatively correlated with the ABCD2 score ($r=-0.611, P<0.05$). The ABCD2 score of patients in the good prognosis group was significantly lower than that in the poor prognosis group, while the exosomal miR-450b-5p level was significantly higher than that in the poor prognosis group ($P<0.05$). The AUC of exosomal

基金项目:第一批亳州市重点研发计划项目(bzzc2019016)

作者单位:亳州市人民医院神经内科,安徽,亳州 236800

*通信作者:钱腊燕, E-mail:Lizzy.qian@163.com

miR-450b-5p combined with ABCD2 score to assess the prognosis of TIA was 0.819, which was significantly greater than that of the two alone ($P < 0.05$). The sensitivity and specificity of the two combined prediction were 84.21% and 69.27%. **Conclusion** The expression level of exosomal miR-450b-5p in TIA patients is negatively correlated with the ABCD2 score. Elevated miR-450b-5p level and ABCD2 score indicate a poor prognosis in TIA patients.

[KEY WORDS] Transient ischemic attack; ABCD2 score; miR-450b-5p

短暂性脑缺血发作(transient ischemic attack, TIA)是指在一定时间内发生缺血同时又迅速缓解的症状,症状持续时间短,一般1~24 h内即可恢复正常^[1-2]。近年来,临床研究发现约有50%的TIA患者在发病后的48 h内进展为缺血性卒中(ischemic stroke, IS),具有较高的危险系数^[3]。故早期诊断和治疗TIA对于预防IS的发生具有重要意义。miRNA在血管性疾病、肿瘤等多种疾病中具有重要的调控作用^[4-5]。既往研究发现miR-450b-5p不仅与恶性肿瘤发生发展密切相关,还参与多种炎症性疾病^[6]。Huang等人^[7]研究显示miR-450b-5p通过抑制 α B-晶状体蛋白可改善肝脏缺血性损伤。Luo等人^[8]通过生物信息学分析发现miR-450b-5p可调控信号通路活性改变,影响脑组织细胞的生物活性,这为后期研究提供了思路。因此,本研究通过观察不同危险分级以及预后TIA患者外泌体miR-450b-5p表达水平,旨在初步探讨外泌体miR-450b-5p在TIA发生发展中的作用,为临床诊治TIA提供一定的依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取亳州市人民医院2017年1月至2019年6月诊治的142例TIA患者作为TIA组。纳入标准:①符合2009年美国心脏协会/脑卒中协会制定的TIA诊断标准^[9],并经影像学检查确诊;②患者临床资料完整。排除标准:①经CT或MRI检查证实为新发梗死病灶导致;②经CT或MRI检查证实为颅内出血、感染等其他神经系统疾病;③既往存在脑卒中病史;④合并严重脏器功能不全、自身免疫性疾病者;⑤近半年内存在脑部手术或外伤史。其中男109例,女33例;平均年龄(53.49 ± 8.16)岁;基础疾病:高血压24例,糖尿病29例。另选取同期来本院体检的133例健康人作为对照组,其中男104例,女29例;平均年龄(52.67 ± 7.92)岁。两组基线资料比较差异无统计学意义($P > 0.05$),具有较好的可比性。本研究经医院医学伦理委员会批准通过,受试者或家属均签署知情同意书。

1.2 方法

TIA组患者入院后次日、对照组于体检当日清晨抽取空腹静脉血3 mL,室温下以3 000 r/min的速度离心10 min,收集上层血清,然后在4℃、14 000 r/min的条件下,离心10 min,取上层清液保存于-80℃。将上清液经0.22 μ m滤膜过滤,DPBS洗两次,收集截留物,经戊二醛固定,柠檬酸铅染色,再通过透射电镜法观察提取外泌体。采用Trizol法提取外泌体中的总RNA分子,并参考miRcute血清miRNA提取分离试剂盒说明书提取外泌体中的miR-450b-5p,采用实时荧光定量PCR检测外泌体miR-450b-5p水平。反应条件按照试剂盒说明书进行:第一阶段,95℃ 30 s预变性,1个循环;第二阶段,95℃ 5 s,60℃ 30 s,40个循环。以小核RNAU6作为内参,对目标基因进行归一化处理。目标miRNA的相对表达量= $2^{-\Delta\Delta CT}$,CT值为反应体系中荧光信号达到阈值时的循环数。患者入院时或者TIA发作后进行ABCD2评估,评估标准^[10]如下:A:年龄 ≥ 60 岁,计为1分;B:血压 $\geq 140/90$ mmHg,计为1分;C:临床表现:单侧肢体无力计为2分,有言语障碍而无肢体无力,计为1分;D症状持续时间: ≥ 60 min,计为2分,10~59 min,计为1分;D糖尿病:口服降糖药或应用胰岛素治疗,计为1分。其中低危组为0~3分,中危组为4~5分,高危组为6~7分。

1.3 观察指标

比较TIA组与对照组miR-450b-5p水平,并比较不同危险分级TIA患者ABCD2评分、外泌体miR-450b-5p水平,并分析两者相关性。通过电话或者门诊形式随访,统计患者90 d内是否发生脑梗死、死亡、大动脉狭窄等不良事件,根据有无发生将患者分为预后不良组和预后良好组,比较两组患者ABCD2评分和外泌体miR-450b-5p水平,并通过ROC曲线分析两者对预后的预测价值。

1.4 统计学分析

采用SPSS 20.0统计软件进行统计处理,计量资料数据均符合正态分布,以($\bar{x} \pm s$)表示,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(F 检验)分析,进一步两两比较采用 $LSD-t$ 检验。ABCD2评分、外泌体 miR-450b-5p 水平相关性采用 Pearson 相关分析。ABCD2 评分、外泌体 miR-450b-5p 水平对 TIA 患者预后的预测价值采用受试者工作特征(ROC)曲线分析;以 ROC 曲线下面积值(AUC)反映预测效能,AUC 值的比较采用 Z 检验;以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 TIA 组与对照组外泌体 miR-450b-5p 水平比较

TIA 组外泌体 miR-450b-5p 表达水平为(0.64±0.20),明显低于对照组外泌体 miR-450b-5p 表达水平(0.98±0.34),差异有统计学意义($t=10.134, P<0.05$)。

2.2 不同危险分级患者 ABCD2 评分和外泌体 miR-450b-5p 水平比较

ABCD2 评分:高危组>中危组>低危组、外泌体 miR-450b-5p 表达水平:高危组<中危组<低危组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

表 1 不同危险分级患者 ABCD2 评分和外泌体 miR-450b-5p 水平比较 ($\bar{x}\pm s$)

分组	n	ABCD2 评分(分)	外泌体 miR-450b-5p
低危组	46	2.22±0.63	0.84±0.26
中危组	67	4.46±0.52 ^a	0.65±0.19 ^a
高危组	29	6.41±0.50 ^{ab}	0.31±0.12 ^{ab}
F 值		530.298	59.678
P 值		<0.001	<0.001

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

2.3 ABCD2 评分与外泌体 miR-450b-5p 水平相关性

外泌体 miR-450b-5p 水平与 ABCD2 评分呈负相关($r=-0.611, P<0.05$)。

2.4 不同预后患者 ABCD2 评分和外泌体 miR-450b-5p 水平

所有患者均完成随访,根据有无发生不良事件将患者分为预后不良组($n=38$)和预后良好组($n=104$)。预后良好组患者 ABCD2 评分明显低于预后不良组,外泌体 miR-450b-5p 水平明显高于预后不良组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表 2。

2.5 ABCD2 评分和外泌体 miR-450b-5p 水平对预后的预测价值

外泌体 miR-450b-5p 联合 ABCD2 评分评估 TIA 预后的 AUC 为 0.819,大于两者单独检测($P<0.05$),两者联合预测的敏感度为 84.21%,特异度为 69.27%。见表 3、图 2。

表 2 不同预后患者 ABCD2 评分和外泌体 miR-450b-5p 水平 ($\bar{x}\pm s$)

Table 2 ABCD2 scores and exosome miR-450b-5p levels in patients with different prognosis ($\bar{x}\pm s$)

分组	n	ABCD2 评分(分)	外泌体 miR-450b-5p
预后良好组	104	3.85±1.71	0.72±0.21
预后不良组	38	4.90±1.38	0.43±0.18
t 值		3.400	7.555
P 值		0.001	<0.001

表 3 ABCD2 评分和外泌体 miR-450b-5p 水平对预后的预测价值

Table 3 The prognostic value of ABCD2 score and exosome miR-450b-5p level

检验结果变量	AUC	标准误差	95%CI	P 值
ABCD2 评分	0.652	0.048	0.558~0.746	0.006
miR-450b-5p	0.779	0.041	0.698~0.860	<0.001
联合	0.819	0.037	0.747~0.890	<0.001

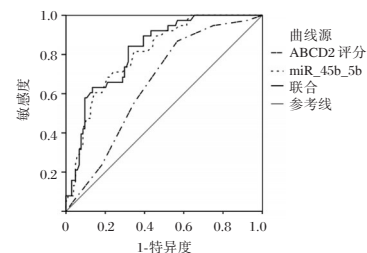


图 1 ROC 曲线

Figure 1 ROC curves

3 讨论

目前临床认为 TIA 的发病与血流动力学变化以及微栓子形成有关,是 IS 的先兆性症状,其反复发作最终可发展为不可逆的脑梗死^[11]。既往研究表明影像学检查对于 TIA 病情评估方面仍存在一定的局限性^[12]。国内外已有多项研究表明外泌体 miRNAs 可能与 TIA 的发生发展密切相关^[13-14], Luo 等人^[8]以 TIA 大鼠为对象,通过一系列试验证实 miR-450b-5p 对于 TIA 大鼠具有较高的诊断价值,可能成为大鼠 TIA 的生物学标志物及治疗靶点。但 miR-450b-5p 水平与人体 TIA 的关系尚处于初步研究阶段,国内外鲜有报道。

既往研究表明外泌体是 miRNAs 的载体和富含体,在脑缺血后的几分钟开始,脑组织将出现包括基因表达变化等各种各样的由缺血直接导致的功能损害^[15]。本研究发现 miR-450b-5p 水平在 TIA 中明显降低, Luo 等人^[8]研究也表明 TIA 大鼠中 miR-450b-5p 水平显著降低。另研究结果提示 miR-450b-5p 可能参与 TIA 的发生发展过程中,可

与 ABCD2 评分共同用于 TIA 患者病情进展的监测。TIA 与 IS 的症状相同,具有相似的病理生理机制,包括钙离子代谢异常、氧化应激、细胞凋亡、免疫反应等。而新的研究表明 miRNAs 参与了淋巴细胞的形成和分化过程,从而参与调控免疫反应环节,间接参与脑缺血的发生^[16]。在众多的 miRNAs 中,miR-450b-5p 也是一个免疫相关性 miRNA。Li 等人^[17]研究表明 miR-450b-5p 与核因子- κ B (Nuclear factor- κ B, NF- κ B) 表达增强密切相关,且 miR-450b-5p 在免疫反应的早期以及炎症反应各阶段发挥作用。而 TIA 患者因脑缺血的发生,血脑屏障被破坏,促使炎症反应发生,诱导 NF- κ B 的激活,参与 TIA 后炎症反应,进一步加重脑损伤的发生,促进 TIA 病情进展。Zhang 等人^[18]研究表明 miR-450b-5p 靶基因还与钙离子转运、基因表达调节、细胞粘附调节、转化生长因子(transforming growth factor, TGF)- β 信号通路、MAPK 信号传导等有关。如 MAPK 途径作为保护血脑屏障的关键途径,可促进脑梗死后血管生成;细胞内钙离子浓度升高、细胞凋亡以及线粒体损伤均是引起大脑中动脉阻断后缺血性再灌注损伤的重要因素;ABCD2 评分是现阶段常用的预测 TIA 进展为 IS 风险以及预后的评估工具,具有快捷、操作简单、经济等优点,但其评估指标未涉及病理生理因素、影像学检查结果,故单纯依靠 ABCD2 评分预测 TIA 预后尚存在一定的局限性。本研究以患者不同预后进行分组,结果显示外泌体 miR-450b-5p 联合 ABCD2 评分评估 TIA 预后的 AUC 明显大于两者单独诊断,两者联合预测的敏感度为 84.21%,特异度为 69.27%,提示外泌体 miR-450b-5p 可与 ABCD2 评分联合为 TIA 的预后预测提供一定的参考。

综上所述,TIA 患者外泌体 miR-450b-5p 表达水平与 ABCD2 评分呈负相关,两者水平升高增高可提示 TIA 患者预后不良。但本次研究仍存在部分局限之处,样本量较少,数据可能存在一定的偏倚,关于 miR-450b-5p 在 TIA 发生发展中扮演的角色以及其具体的作用机制仍有待于进一步研究。

参考文献

[1] 李占增,任英巧,伍淑玲,等. hs-CRP, NF- κ 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):56-60.

[2] Boulanger M, Béjot Y, Rothwell PM, et al. Long-Term Risk of Myocardial Infarction Compared to Recurrent Stroke After

Transient Ischemic Attack and Ischemic Stroke: Systematic Review and Meta-Analysis[J]. J Am Heart Assoc, 2018, 7(2):e007267.

[3] 李宏建. 亚洲和非亚洲人群短暂性脑缺血发作或轻型缺血性卒中后的 5 年预后[J]. 国际脑血管病杂志, 2021, 29(2):147-147.

[4] Backes C, Meese E, Keller A. Specific miRNA Disease Biomarkers in Blood, Serum and Plasma: Challenges and Prospects[J]. Mol Diagn Ther, 2016, 20(6):509-518.

[5] 李琳琳,喻明,崔文娟,等. 血清 miR-122-5p 水平与短暂性脑缺血发作病人预后的关系[J]. 中国临床神经外科杂志, 2020, 25(10):35-37.

[6] Ibrahim SH, El-Mehdawy KM, Seleem M, et al. Serum ROCK2, miR-300 and miR-450b-5p levels in two different clinical phenotypes of multiple sclerosis: Relation to patient disability and disease progression[J]. J Neuroimmunol, 2020, 347:577356.

[7] Huang Z, Mou T, Luo Y, et al. Inhibition of miR-450b-5p ameliorates hepatic ischemia/reperfusion injury via targeting CRYAB[J]. Cell Death Dis, 2020, 11(6):455.

[8] Luo X, Wang W, Li D, et al. Plasma Exosomal miR-450b-5p as a Possible Biomarker and Therapeutic Target for Transient Ischaemic Attacks in Rats[J]. J Mol Neurosci, 2019, 69(4):516-526.

[9] Easton JD, Saver JL, Albers GW, et al. Definition and evaluation of transient ischemic attack: a scientific statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association Stroke Council; Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia; Council on Cardiovascular Radiology and Intervention; Council on Cardiovascular Nursing; and the Interdisciplinary Council on Peripheral Vascular Disease. The American Academy of Neurology affirms the value of this statement as an educational tool for neurologists[J]. Stroke, 2009, 40(6):2276-93.

[10] Johnston SC, Rothwell PM, Nguyen HMN, et al. Validation and refinement of scores to predict very early stroke risk after transient ischemic attack [J]. Lancet, 2007, 369(9558):251-252.

[11] Pendlebury ST, Rothwell PM, Oxford Vascular Study. Incidence and prevalence of dementia associated with transient ischaemic attack and stroke: analysis of the population-based Oxford Vascular Study[J]. Lancet Neurol, 2019, 18(3):248-258.

[12] Yao Q, Zhang L, Zhou J, et al. Imaging Diagnosis of Transient Ischemic Attack in Clinic and Traditional Chinese Medicine[J]. Biomed Res Int, 2019, 2019:5094842.

[13] 樊春荔,何燕娟. 缺血性脑卒中和短暂性脑缺血发作患者血清 miR-23b-3p 水平变化的比较研究[J]. 现代检验医学杂志, 2020, 35(5):57-60, 129.

[14] Wu J, Fan CL, Ma LJ, et al. Distinctive expression signatures of serum microRNAs in ischaemic stroke and transient ischaemic attack patients [J]. Thromb Haemost, 2017, 117(5):992-1001.

TGR、LGR5联合RRM1检测在非小细胞肺癌疾病进展中的评估作用

李琪¹ 王继灵² 曹荣娟³ 刘秀珍¹ 孟祥云^{1*}

[摘要] **目的** 分析肿瘤生长速率(TGR)、富含亮氨酸的G蛋白偶联受体5(LGR5)和核苷酸还原酶M1(RRM1)在非小细胞肺癌(NSCLC)中的表达及疾病进展中的评估作用。**方法** 选取2015年1月至2018年1月于合肥市第二人民医院就诊的97例NSCLC患者,取所有患者术中新鲜肺癌组织(NSCLC组)及距离癌组织5 cm处癌旁组织(对照组),比较不同组织TGR值及LGR5、RRM1的表达情况。分析影响NSCLC患者预后生存的相关因素及TGR、LGR5、RRM1对患者预后生存的影响。**结果** NSCLC组LGR5阴性率及RRM1阳性率高于对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。中低分化、Ⅲ+Ⅳ期、有淋巴结侵犯者TGR升高率、LGR5阴性率及RRM1阳性率高于高分化、Ⅰ+Ⅱ期及无淋巴结侵犯者,差异有统计学意义($P<0.05$)。中低分化、Ⅲ+Ⅳ期、有淋巴结侵犯、TGR升高、LGR5阴性及RRM1阳性表达为影响NSCLC患者预后生存的独立危险因素($P<0.05$)。TGR、LGR5、RRM1单项及联合检测AUC分别为0.820、0.715、0.821、0.905,各指标AUC以联合检测最大($P<0.05$)。TGR降低、LGR5阳性组及RRM1阴性组平均生存时间长于TGR升高、LGR5阴性组、RRM1阳性组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。**结论** TGR、LGR5、RRM1与NSCLC疾病进展、预后均有着密切关系,可作为预测患者预后生存的分子标志物和肿瘤治疗的潜在靶点。

[关键词] TGR; LGR5; RRM1; 非小细胞肺癌

Evaluation of TGR and LGR5 combined with RRM1 detection in the progression of non-small cell lung cancer

LI Qi¹, WANG Jiling², CAO Rongjuan³, LIU Xiuzhen¹, MENG Xiangyun^{1*}

(1. Department of Pharmacy, Hefei Second People's Hospital, Hefei, Anhui, China, 230011; 2. Department of Respiration, Hefei Second People's Hospital, Hefei, Anhui, China, 230011; 3. Department of Pharmacy, Hefei People's Hospital, Hefei, Anhui, China, 230011)

[ABSTRACT] **Objective** To analyze the expression of tumor growth rate (TGR), Leucine-rich repeat-containing G protein coupled receptor 5 (LGR5) and ribonucleotide reductase subunit M1 (RRM1) in the evaluation of disease progression of non-small-cell lung cancer (NSCLC). **Method** 97 NSCLC patients treated in this hospital from January 2015 to January 2018 were selected. Fresh lung cancer tissues (NSCLC group) and adjacent tissue 5 cm from the cancerous tissues (control group) were taken from all patients during the surgery. The TGR value and the expression of LGR5 and RRM1 in different tissues were compared. The relevant factors that affected the prognostic survival of NSCLC patients and the effects of TGR, LGR5, and RRM1 on the prognostic survival of patients were analyzed. **Result** The negative rate of LGR5 and the positive rate of RRM1 in the NSCLC group were higher than those in the control group, and the differences were statistically

基金项目:安徽省卫生计生委科研计划项目(12070403012)

作者单位:1. 合肥市第二人民医院药学部,安徽,合肥 230011

2. 合肥市第二人民医院呼吸科,安徽,合肥 230011

3. 合肥市人民医院药学部,安徽,合肥 230011

*通信作者:孟祥云, E-mail: 873231876@qq.com

significant ($P<0.05$). The rate of TGR elevated, LGR5 negative rate, and RRM1 positive rate in poorly differentiated, stage III+IV, and lymph node invasion was higher than that in well-differentiated, stage I+II and no lymph node invasion, the difference was statistically significant ($P<0.05$). Poorly differentiated, stage III+IV, lymph node invasion, elevated TGR, negative LGR5 and positive expression of RRM1 were independent risk factors affecting the prognosis of NSCLC patients ($P<0.05$). The AUC of TGR, LGR5, RRM1 single detection and combined detection were 0.820, 0.715, 0.821, 0.905, respectively, and the AUC of the combined detection was the largest ($P<0.05$). The average survival time of TGR decreased, LGR5 positive group and RRM1 negative group was longer than TGR increased, LGR5 negative group, RRM1 positive group, the difference was statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** TGR, LGR5, and RRM1 are closely related to NSCLC disease progression and prognosis, and can be used as molecular markers for predicting patient survival and potential targets for tumor therapy.

[KEY WORDS] TGR; LGR5; RRM1; Non-small cell lung cancer

肿瘤生长速率(tumor growth rate, TGR)是近年兴起的一种新型指标,能动态定量观察肿瘤进展速度,适合监测靶向治疗的疗效^[1-2]。富含亮氨酸的G蛋白偶联受体5(Leucine-rich repeat-containing G protein coupled receptor5, LGR5)是结直肠癌干细胞表面标志分子,与肿瘤的生长、侵袭和不良预后相关,近年有研究发现LGR5在肺癌中也有表达^[3-4]。核苷酸还原酶M1(ribonucleotide reductase subunit M1, RRM1)作为核苷酸切除修复的限速酶,是一种抑癌基因,其异常表达与非小细胞肺癌(Non-small-cell carcinoma, NSCLC)的疾病进展、侵袭、转移等亦有紧密联系^[5-6]。本研究就既往LGR5、RRM1在NSCLC中的意义及预后评估的基础上,进一步研究TGR与其联合检测在NSCLC进展中的评估作用,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2015年1月至2018年1月于合肥市第二人民医院就诊的97例NSCLC患者。纳入标准:①均由组织病理学诊断证实为非小细胞肺癌患者^[7];②均为初次治疗的患者;③有完整的病历资料及影像学图像。排除标准:①多原发恶性肿瘤,有严重基础疾病;②合并弥漫性血管内凝血等血液系统疾病者;③妊娠期或哺乳期妇女。取所有患者术中新鲜肺癌组织及对应癌旁组织(距离癌组织5 cm处)标本,分别作为NSCLC组和对照组。本研究经医院医学伦理委员会批准通过,受试者或家属均签署知情同意书。

1.2 检测方法

1.2.1 TGR

通过以下公式计算术前TGR^[8]: $TGR=100$

$[\exp(TG)-1]$,其中 $TG=3\log(Dt/D0)/t$,D0、Dt分别为基线及第1次疗效评价时靶病灶最大直径总和,t为2次肿瘤评估间隔的时间。本文遵循实体瘤的疗效评价标准(Response Evaluation Criteria In Solid Tumors, RECIST)^[9]标准测量靶病灶,排除基线时仅存在非靶病灶(如仅有胸腔积液或骨转移)及第1次疗效评价时出现新发病灶的患者。利用受试者操作特征曲线找到TGR最佳截断点为9.74,以此为界分为TGR升高和TGR降低。

1.2.2 LGR5、RRM1

1.2.2.1 主要试剂:兔抗人LGR5多克隆抗体购自美国Epitomics公司;RRM1一抗抗体、二抗和S-P免疫组化试剂盒购自福建迈新生物技术开发有限公司。

1.2.2.2 免疫组织化学检测:将3 mm厚的石蜡组织切片经二甲苯脱蜡,梯度乙醇水化。体积分数3%过氧化氢处理阻断内源性过氧化物酶,0.01 μmol/L柠檬酸盐缓冲液(pH值6.0)高压水浴加热,抗原修复2 min,质量分数3%牛血清白蛋白封闭,阻断非特异性染色。分别以兔抗人LGR5多克隆抗体(1:150)与RRM1一抗抗体为一抗,检测LGR5、RRM1。

1.2.2.3 结果判定标准^[10]:RRM1以细胞浆呈棕黄色为阳性,LGR5阳性染色为淡黄色、棕黄色或棕褐色,定位于细胞质和细胞膜。阳性细胞百分率(A值)评分:<25%为1分,25%~50%为2分,>50%为3分;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。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。

1.3 随访方法

随访从患者术后开始,直至患者死亡或随访结束,为期3年,截止于2021年1月。随访的方式主以患者来院复查为主,随访率为100.00%。

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,行 χ^2 检验;计量数据以($\bar{x} \pm s$)表示,行t检验;采用多元Logistic回归分析影响预后生存的危​​险因素,采用ROC曲线分析不同方法的预

测价值,绘制Kaplan-Meier生存曲线研究TGR、LGR5、RRM1对患者预后生存的影响;以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组TGR、LGR5、RRM1表达情况比较

NSCLC组LGR5阴性率及RRM1阳性率高于对照组,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见表1。

表1 两组TGR、LGR5、RRM1表达情况比较 [n(%)]

Table 1 expression comparison of TGR, Lgr5 and RRM1 between the two groups [n(%)]

组别	n	TGR		LGR5		RRM1	
		升高	降低	阳性	阴性	阳性	阴性
NSCLC组	97	85(87.63)	12(12.37)	14(14.43)	83(85.57)	84(86.60)	13(13.40)
对照组	97			91(93.81)	6(6.19)	7(7.22)	90(92.78)
χ^2 值				123.085		122.717	
P值				< 0.001		< 0.001	

2.2 TGR、LGR5、RRM1表达与NSCLC患者病理参数的相关性

中低分化、III+IV期、有淋巴结侵犯者TGR升

高率、LGR5阴性率及RRM1阳性率高于高分化、I+II期及无淋巴结侵犯者,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见表2。

表2 TGR、LGR5、RRM1表达与NSCLC患者病理参数的相关性 [n(%)]

Table 2 Correlation between expression of TGR, Lgr5 and RRM1 and pathological parameters of NSCLC patients [n(%)]

病理参数	例数 (n=97)	TGR		χ^2 值	P值	LGR5		χ^2 值	P值	RRM1		χ^2 值	P值	
		高表达 (n=85)	低表达 (n=12)			阳性 (n=14)	阴性 (n=83)			阳性 (n=84)	阴性 (n=13)			
年龄(岁)	<60	42	37(88.10)	5(11.90)	0.015	0.903	6(14.29)	36(85.71)	0.001	0.971	36(85.71)	6(14.29)	0.050	0.823
	≥ 60	55	48(87.27)	7(12.73)			8(14.55)	47(85.45)			48(87.27)	7(12.73)		
性别	男	72	62(86.11)	10(13.89)	0.594	0.441	11(15.28)	61(84.72)	0.161	0.688	62(79.17)	15(20.83)	0.727	0.394
	女	25	23(92.00)	2(8.00)			3(12.00)	22(88.00)			22(88.00)	3(12.00)		
组织分化类型	高分化	52	41(78.85)	11(21.15)	7.976	0.005	13(25.00)	39(75.00)	10.13	0.001	41(78.85)	11(21.15)	5.803	0.016
	中低分化	45	44(97.78)	1(2.22)			1(2.22)	44(97.78)			5	43(95.56)		
病理类型	大细胞癌	32	27(84.38)	5(15.62)			4(12.50)	28(87.50)			28(87.50)	4(12.50)		
	腺癌	30	27(90.00)	3(10.00)	0.497	0.780	5(16.67)	25(83.33)	0.219	0.896	25(83.33)	5(17.67)	0.415	0.812
	鳞状细胞癌	35	31(88.57)	4(12.43)			5(14.29)	30(85.71)			31(88.57)	4(12.43)		
TNM分期	I+II	68	56(82.35)	12(17.65)	5.747	0.017	13(19.12)	55(80.88)	4.042	0.044	52(76.47)	12(23.53)	3.886	0.049
	III+IV	29	29(100.00)	0(0.00)			1(3.45)	28(96.55)			28(96.55)	1(3.45)		
肿瘤最大径	> 5 cm	37	33(89.19)	4(10.81)	0.134	0.714	5(13.51)	32(86.49)	0.041	0.840	31(83.78)	6(16.22)	0.408	0.523
	≤ 5 cm	60	52(86.67)	8(13.33)			9(15.00)	51(85.00)			53(88.33)	7(11.67)		
吸烟史	有	50	43(86.00)	7(14.00)	0.253	0.615	6(12.00)	44(88.00)	0.495	0.482	41(82.00)	9(18.00)	1.880	0.170
	无	47	42(89.36)	5(10.64)			8(17.02)	39(82.98)			43(91.49)	4(8.51)		
淋巴结侵犯	有	33	32(96.97)	1(3.03)	4.026	0.045	1(3.03)	32(96.97)	5.266	0.022	32(96.97)	1(3.03)	4.636	0.031
	无	64	53(51.56)	11(48.44)			13(20.31)	51(79.69)			52(81.25)	12(18.75)		

2.3 影响NSCLC患者预后生存的单多因素分析

截至随访结束,97例NSCLC患者生存59例,死亡38例,死亡率为39.18%。中低分化、III+IV期、有淋巴结侵犯、TGR升高、LGR5阴性及RRM1阳性表达为影响NSCLC患者预后生存的独立危

险因素($P < 0.05$)。见表3。

2.4 TGR、LGR5联合RRM1检测在预测NSCLC患者预后生存中的价值分析

TGR、LGR5、RRM1单项及联合检测AUC分别为0.820、0.715、0.821、0.905,各指标AUC以联合检测最大($P < 0.05$)。见表4、图1。

表3 影响NSCLC患者预后生存的单因素和多因素分析

Table 3 univariate and multivariate analysis of prognostic factors in patients with NSCLC

变量	单因素分析			多因素分析		
	OR 值	95% CI	P 值	OR 值	95% CI	P 值
吸烟史(有 vs 无)	1.675	1.028~2.729	0.038	1.279	0.927~1.764	0.194
临床分期(I + II vs III + IV)	1.306	1.018~1.675	0.046	1.679	1.088~2.648	0.031
组织分化类型(中低分化 vs 高分化)	1.799	1.309~2.471	0.035	1.751	1.213~2.526	0.009
淋巴结侵犯(有 vs >无)	1.837	1.196~2.821	0.020	1.806	1.173~2.779	0.007
TGR(升高 vs 降低)	1.943	1.218~3.097	0.013	1.916	1.237~2.966	0.001
LGR5(阴性 vs 阳性)	1.962	1.183~3.253	0.012	1.701	1.008~2.870	0.010
RRM1(阳性 vs 阴性)	1.853	1.017~3.376	0.019	1.808	1.116~2.928	0.004

表4 TGR、LGR5、RRM1 单项及联合检测水平对预测 NSCLC 患者预后生存的预测价值

Table 4 predictive value of TGR, Lgr5, RRM1 single and combined detection levels in predicting prognosis and survival of NSCLC patients

预测因子	最佳临界值	敏感度	特异度	AUC	95%CI	P 值
TGR	9.740	0.743	0.806	0.820	0.717~0.898	<0.001
LGR5	9.061	0.814	0.853	0.715	0.595~0.807	<0.001
RRM1	10.726	0.787	0.827	0.821	0.728~0.906	<0.001
TGR+LGR5+RRM1	11.872	0.928	0.863	0.905	0.846~0.969	<0.001

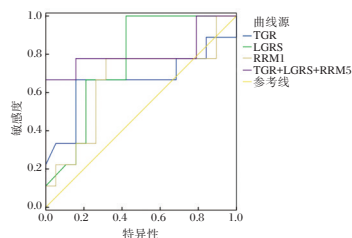


图1 ROC 曲线

Figure 1 ROC curve

2.5 TGR、LGR5、RRM1 与 NSCLC 患者预后生存的关系

TGR 高表达的平均生存时间为(29.87±2.42)个月, 低于 TGR 低表达组平均生存时间(41.09±6.42)个月, 差异有统计学意义($t=11.534, P<0.05$)。LGR5 阴性组的平均生存时间为(31.65±2.09)个月, 低于 LGR5 阳性组平均生存时间(39.35±4.47)个月, 差异有统计学意义($t=6.309, P<0.05$)。

RRM1 阴性组的平均生存时间为(38.64±3.85)个月, 高于 RRM1 阳性组平均生存时间(32.11±2.72)个月, 差异有统计学意义($t=5.880, P<0.05$)。见图2。

3 讨论

TGR 定义为 1 个月内肿瘤体积增加的百分比^[11]。目前研究发现, TGR 在肾癌、乳腺癌、结肠直肠癌等多种肿瘤中与总体生存期(Overall Surviv-

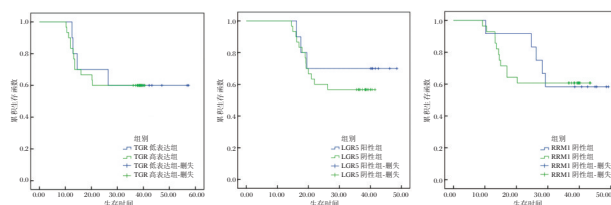


图2 不同 TGR、LGR5、RRM1 表达情况下 Kaplan-meier 生存曲线

Figure 2 Kaplan-meier survival curve under the circumstance of different expressions of TGR, LGR5 and RRM1

al, OS)显著相关,尤其在肾癌领域, TGR 已经进入临床决策层面,直接影响治疗方案的选择及预后的评估^[12-13]。因此, TGR 可能成为评价抗肿瘤治疗是否改变疾病进程的有用工具。本研究结果显示,在 NSCLC 组织中以 TGR 升高为主,且 TGR 与 NSCLC 多种病理参数关系密切,提示 TGR 升高促进 NSCLC 的侵袭与转移。Kaplan-Meier 生存曲线分析结果显示 TGR 升高人群生存期短、预后差,与既往研究^[14]趋势类似,进一步提示临床可加强对 NSCLC 患者 TGR 的检测,进而改善预后。

LGR5 是含有 18 个富含亮氨酸的重复单位和 7 个跨膜区域组成的大分子蛋白,为 G 蛋白偶联受体家族的成员之一。国外研究显示:LGR5 在人体正常组织中的表达表现出局限性,而在卵巢、胃肠道、基底细胞癌及肝脏等肿瘤组织中, LGR5 的表达均有不同程度的改变^[15]。本研究结果基本与上述研究一致,提示了 LGR5 在癌症的发生、发展中可能起到了至关重要的作用。此外,研究发现 LGR5 是 Wnt 信号通路中的靶基因,当信号通路异常激活时,引起 LGR5 的表达显著降低,可能对 NSCLC 癌组织中上皮细胞的恶性转化起到重要作用^[16]。而本组数据 Kaplan-Meier 生存曲线中显示 LGR5 阴性组生存时限低于阳性组,提示 LGR5 的表达与非小细胞肺癌患者预后生存有着密切联系。

核苷酸还原酶(ribonucleotide reductase, RR)是一种限速酶,在DNA合成通路中起作用。目前,临床上对于RRM1的研究主要集中于其表达水平与恶性肿瘤患者预后相关性。相关研究显示,RRM1表达直接影响到了NSCLC化疗耐药性^[17]。本组数据显示:NSCLC患者RRM1阳性表达率显著升高,是影响患者预后生存的独立危险因素,且进一步Kaplan-Meier生存曲线分析得RRM1阳性患者平均生存时间显著短于阴性组提示RRM1检测对NSCLC患者疾病进展及预后具有积极的预测作用。ROC曲线结果显示各指标AUC以联合检测最大,故联合检测的预测价值最佳,表明TGR、LGR5、RRM1三项联合提高了临床评估NSCLC患者预后的敏感度,值得在临床广泛推广。

综上所述,TGR、LGR5、RRM1与NSCLC疾病进展、预后均有着密切关系,可作为预测患者预后生存分子标志物和肿瘤治疗的潜在靶点。

参考文献

[1] 施联善,张辉.基于Logistic回归模型构建联合检测因子对非小细胞肺癌EGFR突变状态的预测价值[J].分子诊断与治疗杂志,2021,13(2):259-262.

[2] Paz-Ares L, Tan EH, O'Byrne K, et al. Afatinib versus gefitinib in patients with EGFR mutation-positive advanced non-small-cell lung cancer: Overall survival data from the phase II b LUX-Lung 7 trial[J]. Ann Oncol, 2017, 28(2):526-529.

[3] Soria JC, Tan DSW, Chiari R, et al. First-line ceritinib versus platinum-based chemotherapy in advanced ALK-rearranged non-small-cell lung cancer (ASCEND-4): a randomised, open-label, phase 3 study[J]. Lancet, 2017, 389(72):917-929.

[4] 李晓华,田德兴,唐微,等.lncRNA CRNDE在非小细胞肺癌组织中的表达及其临床意义[J].中国肿瘤生物治疗杂志,2017,24(8):889-894.

[5] 张昊,徐新禹,崔秀洁,等.RRM1、PDCD-5、VEGF对非小细胞肺癌放疗后近期疗效及预测价值[J].分子诊断与治

疗杂志,2021,13(2):191-194+198.

[6] Fordham SE, Blair HJ, Elstob CJ, et al. Inhibition of ATR acutely sensitizes acute myeloid leukemia cells to nucleoside analogs that target ribonucleotide reductase [J]. Blood Adv, 2018, 2(10):1157-1169.

[7] 白娟,郑玲,李茨,等.联合检测 ERCC1, BRCA1, RRM1 表达在非小细胞肺癌选择化疗方案中的意义[J].现代肿瘤医学,2016,24(21):3410-3413.

[8] Lovato A. Tumor growth rate: A new prognostic indicator of hearing preservation in vestibular schwannoma surgery: Growth Rate in Vestibular Schwannoma [J]. Laryngosc, 2019, 64(63):818-823.

[9] 顾圣佳,曹琪琪,严福华,等.双能CT在非小细胞肺癌非手术治疗疗效评估中的应用价值[J].诊断学理论与实践,2018,17(5):46-52.

[10] Martis PC, Dudley A, Laramore MA, et al. Abstract 3891: Chemoresistant cancer stem cells undergo gene changes that drive tumor recurrence [J]. Cancer Res, 2017, 77(13):3891-3891.

[11] Su Z, Dias-Santagata D, Duke MK, et al. A platform for rapid detection of multiple oncogenic mutations with relevance to targeted therapy in non-small-cell lung cancer [J]. J Mol Diagn, 2018, 7(1):74-84.

[12] 刘秋阁,刘亚楠,王刚,等.循环肿瘤细胞监测在晚期非小细胞肺癌疗效评价和预后评估中的作用[J].中国医科大学学报,2020,49(9):50-55,61.

[13] 阿衣古丽·哈热,潘广鹏,张瑾熔,等.Ⅱ、Ⅲ期直肠癌新辅助放疗与手术间隔时间对术后病理及临床疗效的影响[J].现代肿瘤医学,2016,24(10):1597-1601.

[14] 孙翠翠,张斯萌,温侗,等.晚期非小细胞肺癌肿瘤生长速率与临床病理特征及预后的相关性[J].中国医科大学学报,2019,48(8):673-677.

[15] Jo G, Cho SI, Cho Y, et al. Tumor growth rate as a prognostic factor of acral melanoma in a Korean population [J]. Medicine, 2020, 99(21):19936.

[16] 高菲,魏衍财,杨辰.干细胞标志分子LGR5研究:肿瘤治疗新靶点[J].中国组织工程研究,2015,19(6):962-968.

[17] 韩靖,江俊伟,李文辉.非小细胞肺癌RRM1、ERCC1的表达及对含铂化疗方案预后的影响[J].现代诊断与治疗,2019,30(8):1305-1307.

(上接第1523页)

[15] Li DB, Liu JL, Wang W, et al. Plasma Exosomal miRNA-122-5p and miR-300-3p as Potential Markers for Transient Ischaemic Attack in Rats [J]. Front Aging Neurosci, 2018, 10:24.

[16] Yagi Y, Ohkubo T, Kawaji H, et al. Next-generation sequencing-based small RNA profiling of cerebrospinal fluid exosomes [J]. Neuroscience Lett, 2016, 636:48-57.

[17] Li H, Shen S, Chen X, et al. miR-450b-5p loss mediated KIF26B activation promoted hepatocellular carcinoma progression by activating PI3K/AKT pathway [J]. Cancer Cell Int, 2019, 19:205.

[18] Zhang J, Furuta T, Sabit H, et al. Gelsolin inhibits malignant phenotype of glioblastoma and is regulated by miR-654-5p and miR-450b-5p [J]. Cancer Sci, 2020, 111(7):2413-2422.

NGAL、KIM-1、Th17 细胞检测对脓毒症 AKI 患者预后评估

杨火保^{1*} 刘进生² 郑彩霞¹

[摘要] **目的** 分析中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(NGAL)、尿肾损伤分子-1(KIM-1)联合外周血 Th17 细胞检测对脓毒症急性肾损伤(AKI)患者经连续性肾脏代替(CRRT)治疗预后评估价值。**方法** 选取 2019 年 1 月至 2020 年 3 月在本院行 CRRT 治疗的 69 例脓毒症 AKI 患者设为 AKI 组,另选取本院同期 68 例行 CRRT 治疗的单纯 AKI 患者作为对照组。将 AKI 组患者根据病情进行分组,以 APACHE II 评价:轻度组 28 例、中度组 19 例、重度组 22 例。比较各组 NGAL、KIM-1、Th17 水平,绘制 ROC 曲线分析 NGAL、KIM-1 联合外周血 Th17 细胞检测对脓毒症 AKI 者经 CRRT 治疗预后评估价值。**结果** AKI 组 NGAL、KIM-1、Th17 水平明显高于对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。NGAL、KIM-1、Th17 在不同病情程度脓毒症 AKI 患者中表达情况均为:重度组>中度组>轻度组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。69 例患者 30 d 后死亡 17 例,存活 52 例,死亡组脓毒症 AKI 者 NGAL、KIM-1、Th17 水平明显高于存活组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。ROC 结果显示,NGAL+KIM-1+Th17 评估脓毒症 AKI 者预后时 AUC 为 0.829,明显高于三者单独检测($P<0.05$)。**结论** NGAL、KIM-1、外周血 Th17 细胞水平变化与脓毒症 AKI 患者病情变化密切相关,三者联合检测可进一步提高对脓毒症 AKI 患者经 CRRT 治疗短期预后的预测能力。

[关键词] NGAL; KIM-1; Th17; 脓毒症急性肾损伤; CRRT

Evaluation of NGAL, KIM-1 combined with peripheral blood Th17 cell detection on the prognosis of patients with sepsis and AKI

YANG Huobao^{1*}, LIU Jinsheng², ZHENG Caifa¹

(1. Department of Critical Care, Fujian Medical University Provincial School of Clinical Medicine/Fujian Provincial Hospital, Fuzhou, Fujian, China, 350001; 2. Gastrointestinal Surgery, Fujian Medical University Provincial School of Clinical Medicine/Established Provincial Hospital, Fuzhou, Fujian, China, 350001)

[ABSTRACT] **Objective** To analyze the value of neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL), kidney injury molecule-1 (KIM-1) combined with peripheral blood Th17 cell detection in assessing the prognosis of patients with acute kidney injury (AKI) caused by sepsis after continuous renal replacement treatment (CRRT). **Methods** 69 patients with AKI caused by sepsis who were treated with CRRT in this hospital from January 2019 to March 2020 were collected and set as the observation group. In addition, 68 patients with pure AIK treated with CRRT in this hospital during the same period were selected as the control group. The patients in the AKI group were divided into groups according to the severity of the disease, and evaluated by the Acute Physiology and Chronic Health Status Score (APACHE II): 28 cases in the mild group, 19 cases in the moderate group, and 22 in the severe group. The levels of NGAL, KIM-1, and Th17 in different groups were compared, and the ROC curve was drawn to analyze the value of NGAL and KIM-1 combined with peripheral blood Th17 cell detection in assessing the prognosis of patients with AKI of sepsis af-

基金项目:福建省自然科学基金面上项目(2019J01123)

作者单位:1. 福建医科大学省立临床医学院/福建省立医院重症医学科,福建,福州 350001

2. 福建医科大学省立临床医学院/福建省立医院胃肠外科,福建,福州 350001

*通信作者:杨火保, E-mail: paulyang003@163.com

ter CRRT treatment. **Results** The levels of NGAL, KIM-1, and Th17 in the observation group were significantly higher than those in the control group, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). The expressions of NGAL, KIM-1 and Th17 in patients with AKI caused by sepsis whose severity was different were all as follows: the severe group > the moderate group > the mild group ($P<0.05$). Seventeen of 69 patients died 30 days later, and 52 survived. The levels of NGAL, KIM-1 and Th17 in septic AKI patients in the death group were significantly higher than those in the survival group, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). ROC results showed that when NGAL+KIM-1+Th17 assessed the prognosis of septic AKI patients, the AUC was 0.829, which was significantly higher than the three separate tests ($P<0.05$). **Conclusion** Changes in the levels of NGAL, KIM-1, and peripheral blood Th17 cells are closely related to changes in the condition of patients with AKI caused by sepsis. The combined detection of the three can further improve the ability to predict the short-term prognosis of patients with AKI caused by sepsis after CRRT treatment.

[KEY WORDS] NGAL; KIM-1; Th17; Acute kidney injury caused by sepsis; CRRT

脓毒症是急诊科常见的危重情况之一,据统计全世界每年有2 500万脓毒症患者,有近800万人因此失去生命,脓毒症致死率高于乳腺癌、艾滋病、前列腺癌三种疾病总和^[1]。脓毒症常会引起多器官功能障碍,其中急性肾损伤(Acute kidney injury, AKI)是导致患者死亡率上升的重要原因之一。研究显示,脓毒症患者中有近40%可并发AKI,且脓毒症所引起的AKI预后比常规AKI差,存活率低,存活患者常会伴有慢性肾脏损害,对患者预后健康与生活质量均有严重不良影响^[2]。连续性肾脏代替治疗(Continuous renal replacement therapy, CRRT)是目前治疗AKI常用手段,作为体外循环血液净化方式,CRRT是具有良好血流动力学稳定性的肾脏代替治疗模式,可有效改善多脏器功能。有研究表明,使用脓毒症AKI相关生物标记物可在一定程度上为患者预后评估提供参考,但对于多种生物标记物联合应用是否可提高对脓毒症AKI患者预后价值的研究较少^[3]。基于此,本研究将分析中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(Neutrophil gelatinase associated lipocalin, NGAL)、尿肾损伤分子-1(Kidney damage molecule-1, KIM-1)、外周血Th17细胞在脓毒症AKI患者中的表达情况,以期了解三者联合检测对脓毒症AKI患者经CRRT治疗预后的评估价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集2019年1月至2020年3月69例在本院行CRRT治疗的脓毒症AKI患者设为AKI组,其中男41例,女28例,平均年龄为(52.16±6.80)岁。纳入标准:①临床资料完整;②符合《国际严重脓毒症和脓毒性休克治疗指南》中相关诊断标准^[4];

并符合AKI诊断标准:48 h内血清肌酐水平升高 $\geq 26.5 \mu\text{mol/L}$,或增加 \geq 基线水平50%;持续6 h尿量 $<0.5 \text{ mL}/(\text{kg}\cdot\text{h})$ ^[5]。排除标准:①合并存在心、肝、肾等严重原发性疾病;②为终末期肾脏疾病者;③长期进行血液透析治疗者;④近3个月有使用免疫抑制剂治疗者。另选取68例于本院同期行CRRT治疗的单纯AKI患者作为对照组,其中男39例,女29例,平均年龄为(52.33±6.54)岁,两组患者在一般资料比较差异无统计学意义($P>0.05$)。本研究经医院医学伦理委员会批准通过,受试者或其家属均签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 CRRT治疗方法

患者均使用连续静脉血过滤模式进行治疗,在患者股静脉或颈内静脉建立血管通路,使用美国BM25机器以及德国1.3 m² AV600聚矾膜滤器进行治疗。血流量在200~250 mL/h,置换液流量为30~35 mL(kg·h)。根据患者具体情况选择抗凝以及超滤量。

1.2.2 分组

将AKI组患者根据病情严重程度进行分组,以急性生理与慢性健康状况评分(Acute physiology and chronic health score, APACHE II)评价^[6]:轻度组28例:APACHE II评分 <10 分,中度组19例:APACHE II评分:10分~20分,重度组:APACHE II评分 ≥ 22 例: >20 分。

1.2.3 预后情况

治疗后随访30 d记录患者在此期间生存情况,根据此分为存活组和死亡组。

1.2.4 NGAL、KIM-1联合外周血Th17细胞检测

在患者确诊入院后次日清晨空腹抽取静脉血

液 4 mL,并收集尿液 5 mL,使用离心机 3 000 r/min 离心后获取血清及尿液上清液,血清用于检测 NGAL、Th17 细胞,尿液用于检测 KIM-1。血清 NGAL(试剂盒为上海邦景实验有限公司提供)及 KIM-1(试剂盒为上海一研生物科技有限公司提供)使用双抗体夹心酶标免疫法进行检测;Th17 细胞水平采用流式细胞仪检测。实验步骤严格按照试剂配套说明书进行。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 22.0 统计软件进行统计分析,计量资料采用($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用 *F* 检验;计数资料采用 *n*(%)表示,采用 χ^2 检验;绘制受试者工作特征(ROC)曲线分析 NGAL、KIM-1 联合外周血 Th17 细胞检测对脓毒症 AKI 者预后评估价值,以 *P*<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 AKI 组与对照组 NGAL、KIM-1、Th17 水平比较

AKI 组 NGAL、KIM-1、Th17 水平明显高于对照组,差异均有统计学意义(*P*<0.05)。见表 1。

表 1 AKI 组与对照组 NGAL、KIM-1、Th17 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	NGAL(ng/mL)	KIM-1(μ g/mL)	Th17(%)
对照组	68	19.26 \pm 3.59	18.26 \pm 3.16	3.16 \pm 0.11
AKI 组	69	37.19 \pm 7.18	26.58 \pm 4.97	4.19 \pm 0.41
<i>t</i> 值	-	18.444	11.673	20.017
<i>P</i> 值	-	<0.001	<0.001	<0.001

2.2 不同病情程度脓毒症 AKI 者 NGAL、KIM-1、Th17 水平比较

NGAL、KIM-1、Th17 在不同病情程度脓毒症 AKI 患者中表达情况均为:重度组>中度组>轻度组,差异均有统计学意义(*P*<0.05)。见表 2。

表 2 不同病情程度脓毒症 AKI 者 NGAL、KIM-1、Th17 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	NGAL(ng/mL)	KIM-1(μ g/mL)	Th17(%)
轻度组	28	18.84 \pm 3.11	17.50 \pm 2.94	2.10 \pm 0.67
中度组	19	36.59 \pm 7.42 ^a	23.59 \pm 3.57 ^a	6.22 \pm 0.18 ^a
重度组	22	40.44 \pm 8.19 ^{ab}	29.85 \pm 5.66 ^{ab}	8.16 \pm 0.66 ^{ab}
<i>F</i> 值		96.06	54.78	862.07
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001

注:^a为与轻度组比较,*P*<0.05;^b为与中度组比较,*P*<0.05。

2.3 不同预后脓毒症 AKI 者 NGAL、KIM-1、Th17 水平比较

69 例患者 30 d 后死亡 17 例,存活 52 例,死亡组脓毒症 AKI 者 NGAL、KIM-1、Th17 水平明显高于存活组,差异均有统计学意义(*P*<0.05)。见表 3。

表 3 不同预后脓毒症 AKI 者 NGAL、KIM-1、Th17 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of NGAL, KIM-1 and Th17 levels in AKI patients with sepsis ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	NGAL(ng/mL)	KIM-1(μ g/mL)	Th17(%)
存活组	52	16.54 \pm 3.26	20.44 \pm 3.49	2.33 \pm 0.17
死亡组	17	40.15 \pm 7.66	28.46 \pm 5.79	6.98 \pm 0.77
<i>t</i> 值		17.975	6.374	41.151
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001

2.4 NGAL、KIM-1 联合外周血 Th17 细胞检测对脓毒症 AKI 者预后评估价值

ROC 结果示,ROC 结果显示,NGAL+KIM-1+Th17 评估脓毒症 AKI 者预后时 AUC 为 0.829,明显高于三者单独检测(*P*<0.05)。见表 4 及图 1。

表 4 NGAL、KIM-1 联合外周血 Th17 细胞检测对脓毒症 AKI 者预后评估价值

Table 4 prognostic value of NGAL, KIM-1 combined with Th17 cell detection in patients with septic AKI

预测因子	AUC	95%CI	敏感度	特异度	<i>P</i> 值
NGAL	0.790	0.686~0.895	0.766	0.739	<0.001
KIM-1	0.706	0.578~0.834	0.718	0.710	<0.001
Th17	0.641	0.504~0.777	0.699	0.681	<0.001
NGAL+KIM-1+Th17	0.829	0.731~0.928	0.859	0.910	<0.001

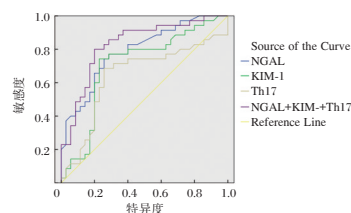


图 1 ROC 曲线

Figure 1 ROC curve

3 讨论

以往有研究发现,导致脓毒症合并 AKI 高死亡风险和此病缺乏有效的预后评估指标有关,寻找合适的评估指标可降低脓毒症合并 AKI 死亡风险^[7]。

NGAL 于 1993 年在中性粒细胞中被发现,在正常的肾脏组织中其表达水平低,但如果出现肾毒性物质或肾脏出现缺血性损伤可导致肾小管升支粗段中 NGAL 分泌迅速增高,通常在 3 h 后可在尿液或血清中检测到 NGAL,其表达升高明显早于尿 N-

乙酰 B-D 氨基葡萄糖苷酶、肌酐等因子^[8]。文献研究显示,NGAL 可作为早期诊断 AKI 的生物标志物,且敏感性、特异性均较高^[9]。王元真等人^[11]通过建立动物模型,发现 NGAL 为最早出现在肾脏上皮中的蛋白质,且稳定性好,在出现肾损伤后数小时内可在尿液和血液中被检测到。国内外均有研究显示,AKI 损伤程度、损伤持续时间与 NGAL 含量成正比,NGAL 水平增加,AKI 损伤越严重,NGAL 水平逐渐下降恢复正常,AKI 也可得到一定恢复^[10-11]。KIM-1 属于跨膜糖蛋白,由黏蛋白、免疫球蛋白组成。在正常的肾脏组织中 KIM-1 几乎不表达,但在出现 AKI 后细胞外的 KIM-1 就会脱落,可在尿液中检出^[12]。KIM-1 作为磷脂酰丝氨酸(Phosphatidylserine, PS)的受体,可有效识别脂蛋白和 PS,从而清除凋亡细胞,减缓炎症反应,达到修复组织的目的。有研究通过建立缺血性肾病大鼠模型,检测大鼠尿液中 KIM-1 含量,发现 KIM-1 在尿液中表达明显上升^[13]。刘瑞清等人^[14]研究发现,KIM-1 水平变化与肾脏管状细胞受损程度存在正相关,KIM-1 对肾损伤早期诊断价值高于传统生物标记物。邓欣雨等人^[15]研究显示,脓毒症发生发展过程中炎症反应发挥着关键的作用,淋巴细胞作为重要效应器,有着刺激炎症反应、调节免疫应答的作用,可通过分化出多种特异性 T 细胞并表达多种炎性因子参与脓毒症的发生、发展中。Th17 属于辅助性 T 细胞亚群,可分泌出 IL-17,促进中性粒细胞、单核细胞等炎性因子聚集在感染部位。在感染性或自身免疫性疾病中,患者外周血 Th17、IL-17 水平均明显升高,且和患者病情严重程度存在密切的联系。

本研究结果提示 NGAL、KIM-1、Th17 可能参与脓毒症 AKI 发展过程。进一步分析,发现随着脓毒症 AKI 患者病情进展,NGAL、KIM-1、Th17 水平为明显上升趋势。且在治疗后 30 d 随访中发现,预后生存组 NGAL、KIM-1、Th17 水平明显低于预后死亡组,与以往研究结果相符^[16]。说明三者水平变化与脓毒症 AKI 病情进展密切相关,可为患者预后情况评估提供参考依据。行 ROC 曲线分析说明 NGAL、KIM-1、Th17 可为脓毒症 AKI 患者治疗预后评估提供一定参考信息,可作为脓毒症 AKI 患者预后预测的理想生物指标。

综上所述,NGAL、KIM-1、外周血 Th17 细胞水平变化与脓毒症 AKI 患者病情变化密切相关,三者联合可进一步提高对脓毒症 AKI 患者经 CRRT

治疗短期预后的预测能力。

参考文献

- [1] Dimitriadi SN, Kit OI, Frantsiyants EM, et al. Express-diagnosing of acute kidney injury among patients with the localized kidney cancer after partial nephrectomy under warm ischemia: A role of biomarkers[J]. *J Clin Oncol*, 2019, 37(15):108-110.
- [2] 梁维, 赵静, 冯玲, 等. 脓毒症合并早期急性肾损伤患者 sTREM-1、Ang-2 及 PCT 水平变化及其与预后相关性分析[J]. *解放军医药杂志*, 2020, 32(1):60-63.
- [3] 于凡, 赵文静. 高密度脂蛋白胆固醇对脓毒症的辅助诊断价值[J]. *临床误诊误治*, 2020, 33(11):53-58.
- [4] 周荣斌, 周高速, 郭凯. 2008 年严重脓毒症和脓毒性休克治疗指南简读[J]. *中国急救医学*, 2008, 28(3):226-229.
- [5] Yoshimoto K, Komaru Y, Iwagami MM, et al. Acute Kidney Injury in Sepsis: Evidence From Asia[J]. *Semin Nephrol*, 2020, 40(5):489-497.
- [6] 韩梅, 高梦颖, 郭鹏, 等. TNF- α 及 IL-1 β 在脓毒症急性肾损伤中的价值及与 NGAL 的关系[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2021, 13(1): 34-37.
- [7] 王笑然, 张强, 张伟, 等. 联合检测尿甲状腺素、sCys-C、IL-18 对脓毒症急性肾损伤疗效评价的价值[J]. *标记免疫分析与临床*, 2019, 26(3):451-455.
- [8] 霍焱, 张坤, 胡振杰. IL-18 联合肾损伤分子-1 预测 ICU 接受 CRRT 治疗的 AKI 患者 28d 病死率[J]. *中华危重病急救医学*, 2019, 12(7):832-836.
- [9] 马鸿雁, 许颖, 刘丽. 早期连续性肾脏替代治疗脓毒症并发急性肾损伤 3 期患者的疗效分析[J]. *中华医院感染学杂志*, 2020, 30(17):92-96.
- [10] 徐冬, 余健, 陈勇, 等. 尿 MMP-9、NGAL、Kim-1、CysC 联合检测对脓毒症致急性肾损伤患者病死率的预测价值[J]. *解放军医药杂志*, 2019, 31(9):41-45.
- [11] 王元真, 孙丽春, 赵汉儒. 尿 NGAL、KIM-1 联合 APACHE II 评分预测脓毒症并发急性肾损伤患者预后的价值[J]. *临床肾脏病杂志*, 2019, 19(5):322-325.
- [12] Pisaryuk A, Povalyaev N, Sorokina M, et al. P2759 Value of biomarkers (urinary KIM-1, NGAL, albumin, serum Cys C) for predicting renal lesions and prognosis in patients with infective endocarditis[J]. *Eur Heart J*, 2019, 40(1):20-23.
- [13] 厉兆春, 张树立, 张勇. 脓毒症急性肾损伤 NGAL、KIM-1、Cys-C 联检对肾脏替代治疗预后的预测价值研究[J]. *临床和实验医学杂志*, 2019, 18(6):63-67.
- [14] 刘瑞清, 孟志云, 褚洪光, 等. 脓症患者血清 NGAL、KIM-1、Cys-C 对急性肾损伤的诊断能效[J]. *中国医药导报*, 2019, 16(29):134-137.
- [15] 邓欣雨, 赵燕, 罗成玲, 等. 脓毒症急性肺损伤患者外周血 Th22 和 Th17 细胞水平变化及临床意义[J]. *中华医院感染学杂志*, 2019, 29(4):498-502.
- [16] 路坤, 何先弟, 汪华学, 等. 脓毒症相关急性肾损伤在连续肾脏替代治疗早期降钙素原的预测价值[J]. *蚌埠医学院学报*, 2020, 45(1):60-63.

血清PG I、PG II水平结合EUS术前诊断胃癌分期的价值

亢晓春¹ 陈美玲¹ 王亚楠² 张德重^{3*}

【摘要】目的 探讨血清胃蛋白酶原I (PG I)、胃蛋白酶原II (PG II)水平结合超声内镜(EUS)术前诊断胃癌分期的价值。**方法** 选取2019年1月至2021年1月于新乡医学院第一附属医院确诊的胃癌和胃炎患者各75例,分别作为胃癌组和胃炎组,治疗前均行EUS检查和血清PG I、PG II水平检测,分析PG I、PG II水平与TNM分期的关系。**结果** EUS检查对胃癌术前T、N、M分期诊断的符合率分别为81.33%、82.67%、76.00%。胃癌组血清PG I水平低于胃炎组,PG II水平高于胃炎组,差异有统计学意义($P<0.05$)。不同TNM分期患者血清PG I、PG II水平比较差异有统计学意义($P<0.05$)。血清PG I水平与TNM分期呈负相关($r=-0.715, P<0.05$),PG II水平与TNM分期呈正相关($r=0.623, P<0.05$)。PG I、PG II诊断I+II期胃癌的敏感度、特异度为81.33%和61.33%、69.33%和56.67%,PG I、PG II诊断截断值结合EUS诊断I+II期胃癌的敏感度为90.67%,灵敏度为85.33%。**结论** EUS检查可判断胃癌TNM分期,而胃癌患者血清PG I、PG II表达均与TNM分期有关,血清PG I、PG II水平结合EUS诊断胃癌分期效能较高。

【关键词】 胃癌;胃蛋白酶原;超声内镜;TNM分期

The value of serum PG I and PG II levels combined with EUS in the preoperative diagnosis of gastric cancer staging

KANG Xiaochun¹, CHEN Meiling¹, WANG Yanan², ZHANG Dezhong^{3*}

(1. Department of Radiation Therapy, The First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Weihui, Henan, China, 453100; 2. Department of Oncology, The First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Weihui, Henan, China, 453100; 3. Department of Gastrointestinal Surgery, The First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Weihui, Henan, China, 453100)

【ABSTRACT】Objective To investigate the value of serum pepsinogen I (PG I) and pepsinogen II (PG II) levels combined with endoscopic ultrasonography (EUS) in the preoperative diagnosis of gastric cancer staging. **Methods** 75 patients with gastric cancer and 75 patients with gastritis diagnosed in the hospital between January 2019 and January 2021 were selected as the gastric cancer group and the gastritis group. EUS examination and detection of serum PG I and PG II were performed before treatment. The relationship between levels of PG I and PG II and TNM staging was analyzed. **Results** The coincidence rates of preoperative T, N and M stages of gastric cancer by EUS examination were 81.33%, 82.67% and 76.00%, respectively. The level of serum PG I in the gastric cancer group was lower than that in the gastritis group while the level of PG II was higher than that in the gastritis group ($P<0.05$). The differences in levels of serum PG I and PG II were statistically significant among patients with different TNM stages ($P<0.05$). Serum PG I level was negatively correlated with TNM staging ($r=-0.715, P<0.05$), and PG II level was positively correlated with TNM staging ($r=0.623, P<0.05$). The sensitivity and specificity of PG I and PG II in the diagnosis of stage I + II stage gastric

基金项目:河南省科技攻关项目(192102310303)

作者单位:1. 新乡医学院第一附属医院放射治疗科,河南,卫辉 453100

2. 新乡医学院第一附属医院肿瘤科,河南,卫辉 453100

3. 新乡医学院第一附属医院胃肠外科,河南,卫辉 453100

*通信作者:张德重, E-mail: flashow3@163.com

cancer were 81.33% and 61.33%, and 69.33% and 56.67%. The sensitivity and specificity of cut-off values of PG I and PG II combined with EUS were 90.67% and 85.33% in the diagnosis of stage I + II stage gastric cancer.

Conclusion EUS examination can determine the TNM staging of gastric cancer, and the expressions of serum PG I and PG II in patients with gastric cancer are related to TNM staging. The combination of serum PG I and PG II levels and EUS has a higher diagnostic efficacy in the diagnosis of gastric cancer staging.

[KEY WORDS] Gastric cancer; Pepsinogen; Endoscopic ultrasonography; TNM staging

胃癌首选治疗手段为手术切除治疗,早期胃癌术后生存率较高,而进展期患者生存率明显降低^[1]。既往研究显示,胃癌患者术前准确分期对手术治疗方案的正确选择及预后具有积极意义,有利于提高手术疗效和患者预后^[2]。影像学检查是诊断胃癌的主要方式,超声内镜(endoscopic ultrasonography, EUS)结合了内镜显示黏膜病变和超声实时扫描的特点,可更好地评估肿瘤浸润深度,获取周围组织结构的超声图像,在胃癌诊断及分期中有较好的应用价值^[3]。胃蛋白酶原(pepsinogen, PG)是反映胃黏膜泌酸功能的灵敏指标,根据生化和免疫活性分为PG I、PG II两种亚型,对胃黏膜萎缩有较好的诊断价值,因此有研究认为可将上述血清指标用于胃癌的早期筛查^[4-5]。本研究旨在探讨胃癌患者血清PG I、PG II表达情况及其与TNM分期的关系,并结合EUS图像观察其对胃癌术前分期的诊断价值,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2019年1月至2021年1月于新乡医学院第一附属医院确诊的75例胃癌患者和75例胃炎患者分别作为胃癌组核胃炎组。纳入标准:符合胃癌^[6]、胃炎诊断标准,且经病理检查确诊为单纯胃癌或单纯胃炎;年龄>18岁;均接受EUS检查;患者或家属对本研究知情且签署知情同意书。排除标准:存在内镜下黏膜下剥离术等胃部手术史;存在胃部良性肿瘤或其他疾病者;正在服用质子泵抑制剂、胃黏膜保护剂等药物;合并心、肝、肾功能严重不全者;合并自身免疫性疾病者;妊娠期或哺乳期妇女。胃癌组患者75例,男54例,女21例;平均年龄(55.37±10.27)岁;平均体质量指数(21.74±2.21)kg/m²;病理分化程度:高分化21例,中分化29例,低分化25例;浸润程度:T₁11例,T₂25例,T₃25例,T₄14例;TNM分期:I期18例,II期22例,III期20例,IV期15例;淋巴结转移36例,未转移39例。胃炎组患者75例,男56例,女19例;平均年龄(54.18±

11.05)岁;平均体质量指数(21.15±2.36)kg/m²;萎缩性胃炎41例,非萎缩性胃炎34例。两组患者性别、年龄、体质量指数比较差异无统计学意义($P>0.05$)。本研究经医学伦理委员会批准。

1.2 EUS检查方法

仪器为FUJINON system7000型超声胃镜仪。嘱咐患者检查前6h禁食,保持空腹状态左侧卧于检查床上,先行常规经腹部超声检查;使用脱气水充盈+水囊法将超声内镜送入十二指肠降段,抽空气注入300~500 mL的脱气水(含胃内注水)填充水囊,沿十二指肠降段逐段后退扫描至贲门,观察胃体情况。

1.3 血清指标检测方法

采集患者就诊第2d清晨空腹肘静脉血3 mL,常规离心分离血清待检,用双抗体夹心酶联免疫吸附法检测PG I、PG II水平,试剂盒由上海晶抗生物科技有限公司提供,严格遵照说明书进行操作。

1.4 统计学方法

采用统计学软件SPSS 21.0进行数据分析。计数数据以 $n(\%)$ 表示,组间采取 χ^2 检验;符合正态分布的计量数据以 $(\bar{x}\pm s)$ 表示,组间比较采取独立样本 t 检验,多组间比较采取单因素方差分析,进一步两两比较采取LSD- t 检验;血清PG I、PG II水平与胃癌患者TNM分期的相关性采取Pearson相关分析。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 EUS对胃癌患者术前TNM分期诊断的符合率分析

EUS术前检查结果显示,75例胃癌患者中,T、N、M分期诊断的符合率分别为81.33%、82.67%、76.00%。见表1、图1。

2.2 两组患者血清PG I、PG II水平比较

胃癌组患者血清PG I水平低于胃炎组,PG II水平高于胃炎组,差异均有统计学意义($P<0.05$),见表2。

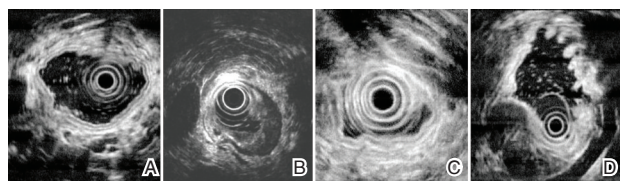
2.3 不同TNM分期患者血清PG I、PG II水平比较

不同TNM分期患者血清PG I、PG II水平比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。进一步两两比

表1 EUS对胃癌患者术前T、N、M分期的诊断 [n(%)]

Table 1 EUS in the diagnosis of preoperative T,N,M staging of patients with gastric cancer [n(%)]

分期	病理结果	EUS结果	诊断符合
T0	0	1	0(0.00)
T1	11	8	8(72.73)
T2	25	26	23(92.00)
T3	25	29	22(88.00)
T4	14	11	8(57.14)
合计	75	75	61(81.33)
N0	39	36	34(87.15)
N1	16	23	15(93.75)
N2	14	10	9(64.29)
N3	6	6	4(66.67)
合计	75	75	62(82.67)
M0	60	42	42(70.00)
M1	15	33	15(100.00)
合计	75	75	57(76.00)



注:A:T1期病变限于黏膜及黏膜下层; B:T2期病变侵及黏膜、黏膜下层及固有肌层,但浆膜层尚完整; C:T3期病变侵及胃壁各层、突破浆膜且伴邻近淋巴结转移; D:T4期病变突破浆膜层并侵及胰腺实质。

图1 EUS对胃癌T分期的诊断

Figure 1 EUS in the diagnosis of T staging of gastric cancer

表2 两组患者血清PG I、PG II水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of levels of serum PG I and PG II between the two groups of patients ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	PG I ($\mu\text{g/L}$)	PG II ($\mu\text{g/L}$)
胃癌组	75	116.66 \pm 36.15	21.01 \pm 5.56
胃炎组	75	142.62 \pm 45.03	12.16 \pm 3.82
t值		3.893	11.362
P值		<0.001	<0.001

较,PG I水平:I期>II期>III期>IV期,差异有统计学意义($P<0.05$),PG II水平:I期<II期<III期<IV期,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表3。

2.4 胃癌患者血清PG I、PG II水平与TNM分期的相关性分析

Pearson相关分析,血清PG I水平与TNM分期呈显著的负相关($r=-0.715, P<0.05$),PG II水平与TNM分期呈显著的正相关($r=0.623, P<0.05$)。

2.5 血清PG I、PG II水平结合EUS术前诊断早期胃癌的价值

ROC曲线分析显示,PG I、PG II诊断I+II期胃

表3 不同TNM分期患者血清PG I、PG II水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of levels of serum PG I and PG II among patients with different TNM stages ($\bar{x} \pm s$)

TNM分期	n	PG I	PG II
I期	18	136.57 \pm 33.49	15.36 \pm 4.58
II期	22	118.64 \pm 30.65 ^a	19.87 \pm 4.67 ^a
III期	20	108.23 \pm 32.14 ^{ab}	23.25 \pm 5.41 ^{ab}
IV期	15	101.09 \pm 31.48 ^{abc}	26.49 \pm 5.87 ^{abc}
F值		77.356	41.634
P值		<0.001	<0.001

注:与I期患者比较,^a $P<0.05$;与II期患者比较,^b $P<0.05$;与III期患者比较,^c $P<0.05$ 。

癌的曲线下面积为0.583(95CI%:0.492~0.642)、0.511(95CI%:0.382~0.551),截断值为115.81、22.53,诊断敏感度、特异度为81.33%和61.33%、69.33%和56.67%,PG I、PG II诊断截断值结合EUS诊断I+II期胃癌的敏感度为90.67%,灵敏度为85.33%。

3 讨论

病理学检查是诊断胃癌及分期的金标准,但由于其创伤大、费用高,并不适宜于作为普查手段。随着影像学技术的发展,多种影像学手段逐渐应用于胃部疾病诊断中^[7]。EUS结合了内镜和超声的双重优势,可获得胃肠道层次结构的组织学特征和周围邻近器官的超声图像,对胃癌术前分期有一定的诊断价值^[8]。本研究发现,早期胃癌在EUS图像中表现为胃部病灶的不规则隆起,且显示为低回声,局部病灶壁不规则增厚,主要浸润1、2层,第3层基本完好。EUS检查对75例胃癌患者术前T、N、M分期诊断的符合率分别为81.33%、82.67%、76.00%,与既往研究^[9]显示EUS检查对胃癌患者T、N、M分期的诊断准确性较高、符合率可达到75%~85%的结论一致。表明EUS在胃癌术前分期方面有较高的诊断价值,适宜在临床推广。但另一方面,超声检查时易受到多种外在因素影响,对腹腔内肠系膜上血管以下的后腹膜、肠系膜淋巴结等转移性病变显示不清,仍具有一定局限性^[10],因此临床上可考虑结合其他检测结果对胃癌患者分期做出综合判断,以期减少误判,提高临床诊断准确性。

血清检测相较于影像学检查具有创伤小、检测便利等特点,适宜于早期胃癌的筛查工作,因此与胃粘膜病变有关的PG成为胃癌病变的早期筛查指标之一^[11]。PG作为胃蛋白酶的无活性前体,在酸性条件下被激活,根据生化和免疫活性特征可分为两种亚型:PG I主要来源于胃底腺主细胞和胃颈黏液

细胞,生理条件下,PG在胃酸作用下活化成胃蛋白酶,当胃粘膜出现萎缩时,胃泌酸腺细胞的泌酸功能下降,PG I的合成也随之减少^[12];PG II主要来源于全胃腺和十二指肠 Brunner 腺,其表达升高与胃底腺萎缩、肠上皮化生、异型增生等病变密切相关^[13-14]。本研究结果说明PG I、PG II可用于鉴别胃炎与胃癌患者。罗锦斌等^[15]研究也显示,胃癌患者血清PG I水平低于胃炎患者而PG II水平高于胃炎患者,二者有助于胃癌的诊断。本研究结果证明胃癌患者的PG水平与TNM分期有关,二者可作为胃癌患者判断TNM分期的辅助指标,与既往研究^[16]结果一致。ROC曲线分析显示,PG I、PG II诊断I期+II期胃癌的敏感度、特异度为81.33%和61.33、69.33%和56.67%,与Hamashima^[17]等结果相近。PG I、PG II结合EUS诊断I期+II期胃癌的敏感度为90.67%,灵敏度为85.33%,提示仅采用血清PG I、PG II诊断I期+II期胃癌诊断效能偏低,而结合EUS对早期胃癌的诊断效能则有所提高。但值得注意的是不同TNM分期的胃癌患者血清PG I、PG II表达易受外界其他因素影响,如胃炎或其他胃部疾病也会影响PG分泌,因此血清指标在临床实际应用中只能作为判断TNM分期的辅助指标,还需结合EUS等影像学检查结果对胃癌患者的分期做出更为准确的诊断。

综上所述,EUS检查则可判断胃癌患者的TNM分期,胃癌患者血清PG I表达降低,PG II表达升高,两项指标与TNM分期有关,临床上结合血清PG I、PG II水平与EUS图像可对胃癌分期做出较为准确的判断。

参考文献

[1] 秦新裕. 2020年胃癌临床诊治研究进展[J]. 中华胃肠外科杂志, 2021,24(1):23-26.
 [2] Ilson DH. Advances in the treatment of gastric cancer: 2019 [J]. Curr Opin Gastroenterol, 2019, 35(6):551-554.
 [3] Yan Y, Wu Q, Li ZY, et al. Endoscopic ultrasonography for pretreatment T-staging of gastric cancer: An in vitro accuracy and discrepancy analysis[J]. Oncol Lett, 2019, 17(3):2849-

2855.
 [4] 文采,肖明娜,朴善英. PG、MG7-Ag联合G-17检测对胃癌前病变、胃癌的诊断及鉴别诊断[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020,12(11):1488-1492.
 [5] 熊海林. 血清NGAL、COX-2、PG在胃癌患者中的变化及意义[J]. 国际检验医学杂志, 2018,39(2):156-158,162.
 [6] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 胃癌规范化诊疗指南(试行)[J]. 中国医学前沿杂志(电子版), 2013,5(8):56-63.
 [7] 王智清,陶芳旭,张其林,等. 多模态磁共振成像技术对胃癌术前T分期与术后病理诊断的对比研究[J]. 中国医学装备, 2018,15(11):69-73.
 [8] 杨建波,张丽丽,张欢,等. 内镜超声对早期胃癌浸润深度及指导治疗方式选择中的价值[J]. 分子影像学杂志, 2020,43(4):713-716.
 [9] 王会丰,刘鑫,韩文,等. 超声内镜、MSCT扫描在胃癌术前诊断和分期中的应用分析[J]. 中国CT和MRI杂志, 2019,17(11):120-122.
 [10] 郭燕鑫,徐张英. 胃超声造影与超声内镜对胃癌术前分期诊断对比研究[J]. 医学影像学杂志, 2017,27(9):1832-1835.
 [11] 唐丹,曾淑. 血清DKK1、TK1、PG联合检测在胃癌诊断中的临床价值[J]. 实用癌症杂志, 2020,35(11):1765-1769.
 [12] 王颖,尤玮. CA19-9、PG I及PG II在胃癌患者血清和组织中表达及其临床意义[J]. 标记免疫分析与临床, 2019,26(3):456-459,476.
 [13] Mansour-Ghanaei F, Joukar F, Baghaee M, et al. Only serum pepsinogen I and pepsinogen I/II ratio are specific and sensitive biomarkers for screening of gastric cancer [J]. Biomol Concepts, 2019, 10(1):82-90.
 [14] 赵斌,赵欣,罗西川,等. PG-I、PG-II、PGR联合可溶性CD44v6检测对早期胃癌的诊断价值[J]. 热带医学杂志, 2020,20(4):505-507+511.
 [15] 罗锦斌,陈晓琴,龙瑞银,等. 血清胃蛋白酶原、胃泌素检测对胃癌的诊断效能[J]. 山东医药, 2018,18(15):49-51.
 [16] Zhou G, Yang J. Correlations of gastrointestinal hormones with inflammation and intestinal flora in patients with gastric cancer[J]. J BUON, 2019, 24(4):1595-1600.
 [17] Hamashima C, Sasazuki S, Inoue M, et al. Receiver operating characteristic analysis of prediction for gastric cancer development using serum pepsinogen and Helicobacter pylori antibody tests[J]. BMC Cancer, 2017, 17(1):183.

勘误声明

《分子诊断与治疗杂志》2021年8月第13卷第8期第1261页正文1.2.3中第8行:“动脉血pH值>7.00,血清HCO₃⁻>10 mmol/L”,应改为:“动脉血pH值<7.00,血清HCO₃⁻<10 mmol/L”

miR-10b、LMP1 和 Twist1 联合检测在鼻咽癌早期诊断及复发诊断中的应用

魏晓^{1*} 陈鹏² 张艳²

[摘要] 目的 探究血清 miR-10b、潜伏膜蛋白1(LMP1)和 Twist 相关蛋白1(Twist1)联合检测在鼻咽癌早期诊断及复发诊断中的应用价值。方法 选取2018年6月至2019年12月期间于郑州颐和医院行各项检查的82例疑似鼻咽癌受检者临床资料,根据后续实际诊断结果分为确诊组51例与未确诊组31例,比较两组血清 miR-10b、LMP1 mRNA、Twist1 mRNA 水平,采用受试者工作特征(ROC)曲线评估上述指标单独对鼻咽癌的早期诊断效能及联合诊断效能。将确诊组根据后续实际复发情况分为复发组23例与未复发组28例,比较两组血清 miR-10b、LMP1 mRNA、Twist1 mRNA 水平,采用 ROC 曲线评估上述指标单独对鼻咽癌复发的诊断效能及联合诊断效能。结果 确诊组血清 miR-10b、LMP1 mRNA、Twist1 mRNA 水平均显著高于未确诊组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。上述指标早期诊断鼻咽癌的 ROC 曲线 AUC 分别为0.842、0.860、0.910,三者联合诊断 AUC 为0.978($P<0.05$)。复发组血清 miR-10b、LMP1 mRNA、Twist1 mRNA 水平显著高于未复发组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。上述指标诊断鼻咽癌复发的 ROC 曲线 AUC 分别为0.804、0.818、0.733,三者联合诊断 AUC 为0.932($P<0.05$)。结论 血清 miR-10b、LMP1、Twist1 水平在鼻咽癌早期诊断及复发诊断中均具有良好效能,三者联合应用诊断效能更佳,可用于鼻咽癌患者病情监测。

[关键词] 鼻咽癌; miR-10b; 潜伏膜蛋白; Twist 相关蛋白

Application of combined detection of miR-10b, LMP1 and Twist1 in the early diagnosis and recurrence diagnosis of nasopharyngeal carcinoma

WEI Xiao^{1*}, CHEN Peng², ZHANG Yan²

(1. Department of Otorhinolaryngology, Zhengzhou Yihe Hospital, Zhengzhou, Henan, China, 450000;

2. Department of Otolaryngology, Zhengzhou Yihe Hospital, Zhengzhou, Henan, China, 450000)

Corresponding author: WEI Xiao, E-mail: weixiao1024@163.com

[ABSTRACT] **Objective** To explore the application value of combined detection of serum miR-10b, latent membrane protein 1 (LMP1) and Twist-related protein 1 (Twist1) in the early diagnosis of nasopharyngeal carcinoma and in the diagnosis of recurrence. **Methods** The clinical data of 82 patients with suspected nasopharyngeal carcinoma who underwent various examinations in this hospital between June 2018 and December 2019 were retrospectively analyzed. According to the subsequent actual diagnostic results, the patients were divided into confirmed group (51 cases) and unconfirmed group (31 cases). The levels of serum miR-10b, LMP1 mRNA and Twist1 mRNA were compared between the two groups. Receiver operating characteristic (ROC) curve was used to evaluate the individual diagnostic efficacy and combined diagnostic efficacy of the above indicators in the early diagnosis of nasopharyngeal carcinoma. The patients in the confirmed group were classified as recurrence group (23 cases) and non-recurrence group (28 cases) according to the actual subsequent recurrence, and serum levels of miR-10b, LMP1 mRNA, and Twist1 mRNA of the two groups were compared, and ROC curve was applied to evaluate the individual diagnostic efficacy and combined diagnostic

基金项目:河南省科技研发项目(182102310023)

作者单位:1. 郑州颐和医院耳鼻咽喉科,河南,郑州 450000

2. 郑州颐和医院耳鼻咽喉科,河南,郑州 450000

*通信作者:魏晓, E-mail: weixiao1024@163.com

efficacy of the above indicators on recurrence of nasopharyngeal carcinoma. **Results** The levels of serum miR-10b, *LMP1* mRNA and *Twist1* mRNA in confirmed group were significantly higher than those in unconfirmed group ($P<0.05$). The AUC values of ROC curves of the above indicators for early diagnosis of nasopharyngeal carcinoma were 0.842, 0.860 and 0.910 respectively, and the AUC of combination of the three was 0.978, and the cut-off values were 6.80, 4.05 and 3.28. Serum levels of miR-10b, *LMP1* mRNA, and *Twist1* mRNA in recurrence group were significantly higher than those in non-recurrence group ($P<0.05$). The AUC values of ROC curves of the above indicators for the diagnosis of nasopharyngeal carcinoma recurrence were 0.804, 0.818 and 0.733 respectively, with AUC of 0.932 of combined detection, and the cut-off values were 7.24, 4.85 and 4.15 respectively. **Conclusion** Serum levels of miR-10b, *LMP1* and *Twist1* have good efficacy in the early diagnosis and recurrence diagnosis of nasopharyngeal carcinoma. The combined application of the three has a better diagnostic efficacy and can be used to monitor the disease condition of patients with nasopharyngeal carcinoma.

[KEY WORDS] Nasopharyngeal carcinoma; miR-10b; Latent membrane protein; Twist-related protein

鼻咽癌是一类高发恶性肿瘤,多发生于咽隐窝、鼻咽顶壁等处,目前全球范围内每年发病人数高达八万以上,病死人数接近五万^[1-2]。研究显示,该病对放化疗表现出较高的敏感性,患者在疾病发现早期进行积极治疗后五年生存率可达到80%,但部分患者进展至中晚期后肿瘤远端转移、局部浸润程度较高,其预后生存情况并不理想^[3-4]。微小RNA(microRNA, miRNA)作为参与细胞增殖、代谢、凋亡的重要RNA分子,在机体肿瘤、炎症病变中发挥重要参与作用^[5]。其中*miR-10b*基因可在肝癌、肾癌等多种恶性肿瘤患者肿瘤侵袭、转移中出现表达异常;与潜伏膜蛋白1(Latent membrane protein 1, *LMP1*)相关的EB病毒与鼻咽癌关系紧密,*LMP1*作为此类病毒的基因产物,具有一定的癌基因功能,可参与此类疾病病情进展^[6-7];Twist相关蛋白1(Twist related protein 1, *Twist1*)则在褐色脂肪代谢、胚胎发育中作用关键,其可于多种肿瘤中有所表达^[8]。目前临床对上述指标与鼻咽癌诊断的研究较少,本次研究将探究其水平在鼻咽癌早期诊断以及复发诊断中的效能。现将所得成果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2018年6月至2019年12月期间于郑州颐和医院行各项检查的82例疑似鼻咽癌受检者临床资料,根据后续实际诊断结果分为确诊组51例与未确诊组31例,将确诊组根据后续实际复发情况分为复发组23例与未复发组28例。纳入标准:①均于本院接受各项相关检查;②复发组患者均符合中国抗癌协会鼻咽癌专业委员会制定的《复发鼻咽癌治疗专家共识》相关诊断标准^[9];③所有

人员均为初次诊治,未经相关治疗,且临床资料保存完整。排除标准:①存在严重感染状态者;②合并颌面部周围组织严重病变或其他类型恶性肿瘤者。受检者一般资料:男62例,女20例;平均年龄(46.39±12.36)岁。确诊组患者TNM分期^[10]:I期11例,II期40例;肿瘤转移情况:伴淋巴结转移33例,无淋巴结转移18例。

1.2 方法

采用实时荧光定量PCR法检测血清miR-10b、*LMP1* mRNA、*Twist1* mRNA水平,收集受检者静脉血10 mL,经3 500 r/min离心10 min后分离血清,采用Trizol reagent RNA提取试剂盒对血清中RNA进行提取检测,并以Nanodrop判断RNA浓度,随后将RNA作为模板逆转录合成cDNA,*miR-10b*上游引物序列:5'-CTCAACTGGTGTCTCGTG-GAGTCGGCAATTCAGTTGAGCACAAATT-3',下游引物序列:5'-GTGTCTGGAGTCTCGGCAATTC-3';*LMP1*上游引物序列:5'-ACACACTGCCCT-GAGGATG-3',下游引物序列:5'-TGAGCAG-GAGGGTGATCA-3';*Twist1*上游引物序列:5'-CAAGCTGCAGCTATGTGGC-3',下游引物序列:5'-TGTCCATTTCTCCTTCTCTGG-3'。miR-10b在95℃下进行30 s预变性以及5 s变性,随后60℃下进行30 s退火,并于70℃进行30 s延伸,循环共持续40个;*LMP1*、*Twist1*在95℃下进行60 s预变性以及20 s变性,随后58℃下进行25 s退火,并于70℃进行30 s延伸,循环同样持续40个。随后通过 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法对上述三个指标相对表达量进行测定。

1.3 观察指标

比较确诊组与未确诊组血清miR-10b、*LMP1* mRNA、*Twist1* mRNA水平,采用受试者工作特征(ROC)曲线评估上述指标各自对鼻咽癌的早期诊

断效能及联合诊断效能;比较复发组与未复发组血清 miR-10b、LMP1 mRNA、Twist1 mRNA 水平,采用 ROC 曲线评估上述指标各自对鼻咽癌复发的诊断效能及联合诊断效能。

1.4 统计学方法

采用统计软件 SPSS 21.0 分析数据,计量资料用($\bar{x} \pm s$)表示,采用独立样本 *t* 检验进行组间比较,诊断效能分析采用 ROC 曲线,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 确诊组与未确诊组血清 miR-10b、LMP1 mRNA、Twist1 mRNA 水平比较

确诊组血清 miR-10b、LMP1 mRNA、Twist1 mRNA 水平均显著高于未确诊组,差异均有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

表 1 确诊组与未确诊组血清 miR-10b、LMP1 mRNA、Twist1 mRNA 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of levels of serum miR-10b, LMP1 mRNA and Twist1 mRNA between confirmed group and unconfirmed group ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	miR-10b	LMP1 mRNA	Twist1 mRNA
确诊组	51	7.86±1.42	4.83±0.92	4.12±0.89
未确诊组	31	5.78±1.03	3.32±0.76	2.78±0.65
<i>t</i> 值		7.092	7.678	7.278
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001

2.2 血清 miR-10b、LMP1 mRNA、Twist1 mRNA 早期诊断鼻咽癌的效能分析

血清 miR-10b、LMP1 mRNA、Twist1 mRNA 联合早期诊断鼻咽癌的 ROC 曲线 AUC 为 0.978,优于单一诊断($P < 0.05$)。见表 2、图 1。

表 2 ROC 曲线参数

Table 2 ROC curve parameters

指标	AUC	95%CI	敏感度 (%)	特异度 (%)	截断值	<i>P</i> 值
miR-10b	0.842	0.745~0.913	87.10	74.51	6.80	<0.001
LMP1 mRNA	0.860	0.765~0.926	80.65	76.47	4.05	<0.001
Twist1 mRNA	0.910	0.826~0.962	87.10	84.31	3.28	<0.001
联合诊断	0.978	0.919~0.998	96.77	94.12		<0.001

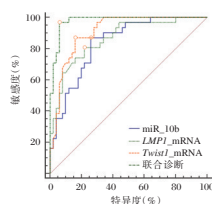


图 1 ROC 曲线

Figure 1 ROC curve

复发组 miR-10b、LMP1 mRNA、Twist1 mRNA 水平均显著高于未复发组,差异均有统计学意义($P < 0.05$),见表 3。

表 3 复发组与未复发组血清 miR-10b、LMP1 mRNA、Twist1 mRNA 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of levels of serum miR-10b, LMP1 mRNA and Twist1 mRNA between recurrence group and non-recurrence group ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	miR-10b	LMP1 mRNA	Twist1 mRNA
复发组	23	8.76±1.02	5.44±0.92	4.62±0.86
未复发组	28	7.12±1.26	4.32±0.97	3.70±0.75
<i>t</i> 值		5.030	4.198	4.080
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001

2.4 血清 miR-10b、LMP1 mRNA、Twist1 mRNA 诊断鼻咽癌复发的效能分析

miR-10b、LMP1 mRNA、Twist1 mRNA 诊断鼻咽癌复发的 ROC 曲线 AUC 分别为 0.804、0.818、0.733,三者联合诊断 AUC 为 0.932($P < 0.05$),见表 4、图 2。

表 4 ROC 曲线参数

Table 4 ROC curve parameters

指标	AUC	95%CI	敏感度 (%)	特异度 (%)	截断值	<i>P</i> 值
miR-10b	0.804	0.667~0.902	53.57	100.00	7.24	<0.001
LMP1 mRNA	0.818	0.684~0.913	71.43	81.62	4.85	<0.001
Twist1 mRNA	0.733	0.589~0.848	75.00	63.64	4.15	<0.001
联合诊断	0.932	0.823~0.984	82.14	95.45		<0.001

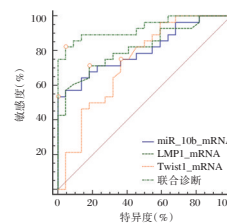


图 2 ROC 曲线

Figure 2 ROC curve

3 讨论

鼻咽癌是国内头颈部恶性肿瘤中常见的类型,早期诊断及治疗极为重要,目前放疗作为其早期主要治疗方式具备显著疗效,但不良反应较多,且面临局部复发、转移风险^[11],故临床仍需进一步探究用于其早期诊断及复发诊断的标志物。

人类 2q31 HOXD 基因簇中的 miR-10b 编码基因可通过与下游靶基因 3'-非编码区相结合达成对多种靶基因表达的调控,在机体出现心血管病变、自身免疫性疾病以及恶性肿瘤后,其表达可发生明显异常变化。孙秀英等^[12]研究发现鼻咽癌患者

癌组织 miR-10b 与 *LMP1*、*Twist1* mRNA 的表达呈正相关,与鼻咽癌肿瘤 TNM 分期亦有显著相关性。王述莲等^[13]研究发现,乳腺癌患者发病过程中可伴随 miR-10b 水平的上升,而在相关体外实验中亦发现 miR-10b 可促进肿瘤细胞侵袭过程。EB 病毒作为一类嗜淋巴细胞病毒,在人体感染后大多处于潜伏状态,而在肿瘤病情进展等条件下可进行二次复制,并通过病毒编码产生 *LMP1*,以达到促进肿瘤细胞增殖、抑制其凋亡并诱导 B 淋巴细胞分化的作用。陈俊妮等^[14]研究发现,*LMP1* 与鼻咽癌患者肿瘤分期、颈部淋巴结体积等具有显著相关性,可作为预测鼻咽癌远处转移的重要分子标志物。本研究中,上述两种指标均在确诊组患者中呈高表达水平,且肿瘤复发患者表达水平高于未复发患者。ROC 曲线分析发现,miR-10b、*LMP1* 在鼻咽癌早期诊断及复发诊断中效能显著,与上述研究结果相似。此外,miR-10b 属于致癌 miRNA,可对岩藻糖基转移酶 8 发挥一定调控作用,使蛋白激酶信号通路得以激活,从而加剧肿瘤细胞增殖及局部浸润,另一方面,其表达水平的上升可对同源性磷酸酶张力蛋白基因等抑癌基因表达产生一定抑制作用,有利于肿瘤细胞增殖。吴克复等^[15]研究指出,EB 病毒隐性感染可诱发免疫失调,引起机体免疫失控、局部淋巴增生及超炎症状态,有助于鼻咽癌等恶性肿瘤形成,此外 EB 病毒感染引发的代谢类型改变亦可支持病毒持续感染,此类改变亦可能导致肿瘤发生。在鼻咽癌发生后 EB 病毒可从潜伏状态活化,从而导致 *LMP1* mRNA 水平上升,使 *LMP1* 作为活性受体激活蛋白激酶途径、核因子 κ B 等多种胞内信号通路,使血管内皮生长因子、基质金属蛋白酶等癌基因表达上升,促进肿瘤增殖、迁移。

Twist1 基因可参与神经管闭合、神经发育以及褐色脂肪代谢等过程的调节,其属于碱性螺旋-环-螺旋蛋白家族中高度保守的转录因子,在胚胎发育过程中可调节组织重建,达到促进细胞迁移的作用,此外 *Twist1* 亦是促进多种肿瘤转移、侵袭的关键基因,在鼻咽癌转移中也可发挥重要作用^[16]。本研究中,*Twist1* 在确诊组及复发组中表达水平更高,且经 ROC 曲线分析发现,*Twist1* 在鼻咽癌早期诊断及复发诊断中效能显著,与上述研究背景相似。分析其原因,*Twist1* 作为转录因子可诱导上皮间质转化,使上皮细胞发生形态学改变向间充质细胞表型转变,并因此获得迁移能力,使上皮细胞或

组织分离、迁移至其他部位。故认为 *Twist* 诱导上皮间质转化程序为鼻咽癌转移启动的重要原因。

综上所述,血清 miR-10b、*LMP1*、*Twist1* 可应用于鼻咽癌早期诊断及复发诊断,其联合应用可表现出更佳诊断效能。

参考文献

- [1] 杜伟一,陈淑莲,李国强. *LASPI*、*GSTA3* 在鼻咽癌组织中的表达及与复发、转移的关系[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(7): 887-891.
- [2] Chen YP, Chan ATC, Le QT, et al. Nasopharyngeal carcinoma[J]. Lancet, 2019, 394(10192): 64-80.
- [3] Lee HM, Okuda KS, González FE, et al. Current Perspectives on Nasopharyngeal Carcinoma[J]. Adv Exp Med Biol, 2019, 1164: 11-34.
- [4] 李刚. CKMT1A 对人鼻咽癌 HONE1 细胞铂类化疗药物敏感性的影响及机制研究[J]. 中南医学科学杂志, 2019, 47(6): 576-580.
- [5] Wu M, Wang G, Tian W, et al. MiRNA-based Therapeutics for Lung Cancer[J]. Curr Pharm Des, 2018, 23(39): 5989-5996.
- [6] Zhang J, Jia L, Liu T, et al. mTORC2-mediated PDHE1 α nuclear translocation links EBV-LMP1 reprogrammed glucose metabolism to cancer metastasis in nasopharyngeal carcinoma[J]. Oncogene, 2019, 38(24): 4669-4684.
- [7] Wakae K, Kondo S, Pham HT, et al. EBV-LMP1 induces APOBEC3s and mitochondrial DNA hypermutation in nasopharyngeal cancer[J]. Cancer Med, 2020, 9(20): 7663-7671.
- [8] Hata T, Rajabi H, Yamamoto M, et al. Targeting MUC1-C Inhibits TWIST1 Signaling in Triple-Negative Breast Cancer[J]. Mol Cancer Ther, 2019, 18(10): 1744-1754.
- [9] 中国抗癌协会鼻咽癌专业委员会,林少俊,陈晓钟,等. 复发鼻咽癌治疗专家共识[J]. 中华放射肿瘤学杂志, 2018, 27(1): 16-22.
- [10] 潘建基. 鼻咽癌分期研究[J]. 中国癌症杂志, 2011, 12(12): 901-905.
- [11] Xiao Z, Chen Z. Deciphering nasopharyngeal carcinoma pathogenesis via proteomics[J]. Exp Rev Proteom, 2019, 16(6): 475-485.
- [12] 孙秀英,袁颖,徐彧. 鼻咽癌组织中 miR-10b、*LMP1* 和 *Twist1* 的表达变化及临床意义[J]. 山东医药, 2021, 26(1): 86-89.
- [13] 王述莲,呼建民,李绵洋,等. NLR、CRP、IL-2、BRCA1、miR-145、miR-21、miR-10b 在乳腺癌诊断及预后中的应用[J]. 医学研究杂志, 2019, 48(7): 99-102, 116.
- [14] 陈俊妮,袁波,陈集敏,等. *LMP-1* 与 *CXCR4* 在鼻咽癌组织中的表达及临床意义[J]. 实用癌症杂志, 2020, 35(9): 1423-1428.
- [15] 吴克复,郑国光,马小彤,等. EB 病毒感染的多样性及其意义[J]. 中国肿瘤临床, 2021, 48(7): 330-335.
- [16] 刘春丽,石新华,张洁,等. miR-10b 通过 *Twist* 调节鼻咽癌表达机制的研究[J]. 中国地方病防治杂志, 2018, 33(4): 437-438, 440.

· 论 著 ·

不同 T 分期肺癌患者血清 Th1/Th2 平衡及 MMP-9、TIMP-1 水平变化分析

古晓娟* 张映华 唐欢

[摘要] **目的** 分析不同 T 分期肺癌患者血清 I 型 T 辅助细胞(Th1)/II 型 T 辅助细胞(Th2)平衡及基质金属蛋白酶 9(MMP-9)、金属蛋白酶组织抑制剂-1(TIMP-1)水平变化情况。**方法** 选取本院 2013 年 1 月至 2018 年 5 月收治的肺癌患者中筛选符合纳入排除标准的 200 例设为研究对象,应用酶联免疫吸附法检测 Th1 细胞干扰素- γ (IFN- γ)、Th2 细胞白细胞介素-4(IL-4)水平,双抗体夹心酶联免疫吸附法检测血清 MMP-9、TIMP-1 水平,并计算 Th1/Th2 比值;比较不同 T 分期患者血清 Th1/Th2、MMP-9、TIMP-1 水平,*Spearman* 相关性分析法分析肺癌 T 分期与血清 Th1/Th2、MMP-9、TIMP-1 的关系。**结果** 肺癌患者血清 IFN- γ 、Th1/Th2 随着 T 分期增加而下降;血清 IL-4、MMP-9、TIMP-1 水平随 T 分期上升而上升;且不同 T 分期及任意 T 分期两两比较,患者血清 IFN- γ 、IL-4、Th1/Th2、MMP-9、TIMP-1 差异均有统计学意义($P < 0.05$);*Spearman* 相关性分析,Th1/Th2 比值与肺癌 T 分期显著负相关($r = 0.808, P < 0.01$),MMP-9、TIMP-1 与肺癌 T 分期显著正相关($r = 0.499, 0.406, P < 0.01$)。**结论** 血清 Th1/Th2、MMP-9、TIMP-1 与肺癌 T 分期密切相关,其或在肺癌患者肿瘤生长、扩散及浸润中发挥重要作用,值得临床重视。

[关键词] T 分期;肺癌;血清 I 型 T 辅助细胞/II 型 T 辅助细胞平衡;基质金属蛋白酶 9;金属蛋白酶组织抑制剂-1

Analysis of serum Th1/Th2 balance and changes of MMP-9 and TIMP-1 levels in patients with different T stages of lung cancer

GU Xiaojuan*, ZHANG Yinghua, TANG Huan

(Department of Respiratory Medicine, Second People's Hospital of Yibin City, Yibin, Sichuan, China, 644000)

[ABSTRACT] **Objective** To analyze the balance of serum T helper cell 1 (Th1)/ T helper cell 2 (Th2) and changes of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) levels in patients with different T stages of lung cancer. **Methods** From January 2013 to May 2018, 200 lung cancer patients admitted to our hospital were screened as eligible for inclusion and met the exclusion criteria. The levels of Th1 cells interferon- γ (IFN- γ) and Th2 cells interleukin-4 (IL-4), MMP9 and TIMP-1 were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The ratio of IFN- γ to IL-4 was calculated. Serum Th1/Th2, MMP-9 and TIMP-1 levels of patients with different T stages were compared. Spearman correlation analysis was performed to analyze the relationship between T stage of lung cancer and serum Th1/Th2, MMP-9 and TIMP-1. **Results** Serum IFN- γ level and Th1/Th2 ratio decreased with the increase of T stage in patients with lung cancer. The levels of serum IL-4, MMP-9 and TIMP-1 increased with the increase of T stage. There were significant differences in serum IFN- γ , IL-4, Th1/Th2, MMP-9 and TIMP-1 among different T stages and any two of the T stages ($P < 0.05$). Spearman correlation analysis showed that Th1/Th2

基金项目:四川省医学科研青年创新课题(Q15049)

作者单位:宜宾市第二人民医院呼吸内科,四川,宜宾 644000

*通信作者:古晓娟, E-mail: nzffdp@sina.com

was significantly negatively correlated with lung cancer T stage ($r=-0.808$, $P<0.01$). MMP-9 and TIMP-1 were significantly positively correlated with lung cancer T stage ($r=0.499$, 0.406 , $P<0.01$). **Conclusion** Serum Th1/Th2, MMP-9 and TIMP-1 are closely related to the T stages of lung cancer. They may involve in tumor growth, proliferation and infiltration of lung cancer patients.

[KEY WORDS] T stage; Lung cancer; Balance of serum T helper cell 1/T helper cell 2; Matrix metalloproteinase-9; Tissue inhibitor of metalloproteinase-1

肺癌是高发病率、高死亡率的恶性肿瘤疾病,因肺癌早期临床特征或体征不具特异性,多数待症状出现就诊时病情已进展至中晚期,预后不良。肺癌T分期涉及肿瘤大小、位置、浸润深度,是对肿瘤大小、扩散、浸润深度的综合界定,是肿瘤分期的重要组成部分^[1]。I型T辅助细胞(T helper cell 1, Th1)、II型T辅助细胞(T helper cell 2, Th2)细胞则是由前体细胞Th0分化而来;前者主要分泌干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ)、白细胞介素-2(interleukin-2, IL-2)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)等介导细胞免疫应答;后者则通过分泌白细胞介素-4(interleukin-4, IL-4)、白细胞介素-5(interleukin-5, IL-5)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)等介导体液免疫应答^[2]。正常情况下,两者相互作用并互相拮抗,保持平衡动态以维持正常稳定的机体免疫功能;一旦失衡,则可出现“Th1/Th2平衡漂移”,导致细胞因子体系紊乱,诱导疾病发生或进展,如肿瘤疾病、艾滋病、自身免疫性疾病等^[3]。而基质金属蛋白酶9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)生物功能丰富,是金属蛋白酶家族的重要成员,在基底膜及细胞外基质降解、生长因子激活、肿瘤细胞凋亡、血管生成因子的释放中均发挥重要作用^[4]。既往研究亦报道其在多种肿瘤疾病中呈明显高表达,其与天然组织抑制剂金属蛋白酶组织抑制剂-1(tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMP-1)平衡也直接影响肿瘤进展^[5]。但关于不同T分期肺癌患者血清Th1/Th2平衡及MMP-9、TIMP-1水平变化及其预后的关系类报道鲜见,基于此,本研究采集资料并开展如下研究,旨在为肺癌的临床诊治提供新思路,具体报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取本院自2013年1月至2018年5月收治的肺癌患者200例,其中男114例,女86例;年龄平均(55.39 ± 10.61)岁,其中<45岁64例,45~65岁65例,>65岁71例;非小细胞肺癌123例,小细胞肺癌

77例;纳入标准:符合肺癌诊断标准^[6],并有完整病理结果(电子气管镜或经皮肺穿刺活组织病理检测)佐证、临床分期明确、血清样本采集前未接受任意治疗;排除标准:合并肺癌外的其他肺部病变、合并其他肿瘤疾病、合并结缔组织组织疾病患者、合并糖尿病或冠心病史患者、合并自身免疫性疾病、合并传染性疾病患者。美国肿瘤联合会(American Joint Committee on Cancer, AJCC)/国际抗癌联盟(Union for International Cancer Control, UICC)^[7]分期I~II期38例,III期116例,IV期46例;T分期^[8]T1分期53例,T2分期53例,T3分期45例,T4分期49例;低分化65例,中分化59例,高分化76例;吸烟史42例。将其按T分期分组,不同T分期肺癌患者一般临床资料比较差异无统计学意义($P>0.05$)。见表1。

表1 研究对象一般临床资料

Table 1 general clinical data of the subjects

项目	T1 (n=51)	T2 (n=47)	T3 (n=42)	T4 (n=60)	χ^2 值	P值
性别	男	29	24	29	3.4920	.322
	女	22	23	13		
年龄	<45岁	17	15	13	0.4540	.998
	45~65岁	15	15	14		
	>65岁	19	17	15		
病理类型	非小细胞肺癌	31	28	25	0.4640	.927
	小细胞肺癌	20	19	17		
AJCC/ UICC分期	I~II	10	8	7	3.5960	.731
	III	31	29	21		
	IV	10	10	14		
分化程度	低分化	18	13	13	4.7230	.580
	中分化	13	14	10		
	高分化	20	20	19		
吸烟史	有	11	10	9	0.2130	.976
	无	40	32	33		

1.2 试剂/仪器

IFN- γ 、IL-4试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司;MMP-9、TIMP-1试剂盒购自上海森雄科技实业有限公司。

1.3 检测方法

研究对象均于未经任意治疗前采集空腹静脉血5 mL,室温放置30 min后2 000 r/min离心10

min, 分离血清置于EP管后-80℃保存;应用酶联免疫吸附法检测血清细胞因子IFN-γ、IL-4水平,并计算Th1(IFN-γ)/Th2(IL-4)比值;应用双抗体夹心酶联免疫吸附法检测血清MMP-9、TIMP-1水平,每个样本检测2次,取平均值为最终结果。

1.4 统计学分析

SPSS 19.0 软件进行分析,计量资料用($\bar{x} \pm s$)表示,重复方差分析,两两比较采用LSD-t检验;计数资料以n(%)描述,采用 χ^2 检验;Spearman相关性分析法分析肺癌T分期与血清Th1/Th2、MMP-9、TIMP-1的相关性;Sig 双侧检验;P<0.05表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同T分期患者血清Th1/Th2细胞因子水平比较

肺癌患者血清IFN-γ、Th1/Th2随着肿瘤T分期增加而下降;IL-4随肿瘤T分期上升而上升,不同T分期肺癌患者血清IFN-γ、IL-4、Th1/Th2及任意T分期血清IFN-γ、IL-4、Th1/Th2两两比较差异有统计学意义(P<0.05);见表2。

表2 不同T分期患者血清Th1/Th2细胞因子水平比较($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of serum Th1/Th2 cytokine levels in patients with different T stages ($\bar{x} \pm s$)

T分期	IFN-γ(pg/mL) (Th1 细胞因子)	IL-4(pg/mL) (Th2 细胞因子)	Th1/Th2
T1(n=51)	71.25±10.32	250.27±20.61	0.28±0.09
T2(n=47)	64.12±10.11 ^a	278.69±22.38 ^a	0.23±0.04 ^a
T3(n=42)	56.26±9.45 ^{ab}	297.09±22.71 ^{ab}	0.18±0.04 ^{ab}
T4(n=60)	49.87±6.38 ^{abc}	319.48±21.97 ^{abc}	0.16±0.01 ^{abc}
F值	56.835	97.103	54.180
P值	<0.001	<0.001	<0.001

注:与T1期比较;^aP<0.05;与T2期比较,^bP<0.05;与T3期比较,^cP<0.05。

2.2 不同T分期的肺癌患者血清MMP-9、TIMP-1水平比较

肺癌患者血清MMP-9、TIMP-1水平随T分期上升而上升,且不同T分期间血清MMP-9、TIMP-1及任意T分期间血清MMP-9、TIMP-1水平比较差异均有统计学意义(P<0.05)。见表3。

2.3 血清Th1/Th2及MMP-9、TIMP-1水平与肺癌T分期的相关性分析

经Spearman相关性分析,Th1/Th2比值与肺癌

表3 不同T分期的肺癌患者血清MMP-9、TIMP-1水平比较($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of serum MMP-9 and TIMP-1 levels in lung cancer patients with different T stages ($\bar{x} \pm s$)

T分期	MMP-9(pg/mL)	TIMP-1(pg/mL)
T1	566.80±50.81	573.87±50.12
T2	581.25±59.37 ^a	591.24±56.01 ^a
T3	612.87±53.91 ^{ab}	609.28±49.25 ^{ab}
T4	624.94±52.85 ^{abc}	619.82±56.19 ^{abc}
F值	13.127	7.699
P值	<0.001	<0.001

注:与T1期比较;^aP<0.05;与T2期比较,^bP<0.05;与T3期比较,^cP<0.05。

T分期显著负相关($r=0.808, P<0.01$),MMP-9、TIMP-1与肺癌T分期显著正相关($r=0.499、0.406, P<0.01$)。见图1。

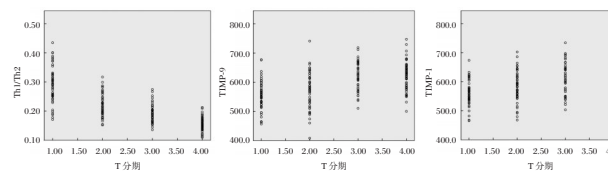


图1 肺癌T分期与血清Th1/Th2、MMP-9、TIMP-1的相关性分析图

Figure 1 Analysis diagram of correlation between T stage of lung cancer and serum Th1/Th2、MMP-9、TIMP-1

3 讨论

肿瘤T分期主要反映肿瘤组织生长、扩散、浸润程度,其与机体免疫密切相关,机体免疫由体液免疫、细胞免疫两部分组成,其中细胞免疫发挥更关键作用^[9]。而Th1细胞不仅参与细胞免疫,还参与机体迟发性超敏炎症反应,其所分泌的IFN-γ、IL-2等多种细胞因子均可发挥促进细胞毒性T细胞、巨噬细胞、NK细胞活化及增殖作用^[10]。Th2细胞则主要通过对B细胞增殖的刺激介导体液免疫,主要分泌IL-4、IL-6等细胞因子;两者相互作用并互相拮抗,维持动态平衡,发挥稳定的机体免疫功能^[11]。如殷红梅等^[12]便报道,随着肺癌分期增加,Th1/Th2呈下降趋势,但其未进一步对Th1/Th2与T分期的关系进行明确。而本研究显示,肺癌患者IFN-γ随T分期上升而下降,IL-4随T分期上升而上升,且Th1/Th2比值与肺癌T分期显著负相关。这与李晓英等^[13]、戴春等^[14]的报道结论相似,分析或因随着临床分期的增加,肿瘤患者免疫低下、免疫抑制更严重有关。当IFN-γ、IL-4表达异常,Th1/

Th2 动态平衡被打破, Th1/Th2 发生偏移, 尤其出现 Th2 优势表达则提示机体处于免疫抑制状态, 抗肿瘤免疫功能下降, 从而导致肿瘤生长、扩散、浸润。

本研究还显示, 随着肿瘤 T 分期增加, MMP-9、TIMP-1 均显著上升, 且 MMP-9、TIMP-1 与肺癌 T 分期显著正相关。这与王小军等^[15]的报道结论相似, 皆提示肺癌患者血清 MMP-9、TIMP-1 水平与肿瘤发生、发展、侵袭转移密切相关。究其原因, 细胞外基质 (extracellular matrices, ECM) 及血管基底膜 (basement membrane, BM) 所构成的屏障是阻滞肿瘤浸润转移的关键^[16]。MMP-9 作为蛋白酶家族成员之一, 被锌离子依赖, 主要参与 ECM 及 BM 降解; TIMPs 则系低分子量蛋白, 其在机体内的分布相对广泛, 其中 N-末端的大三环结构是抑制 MMP 的主要活性部位, 不仅可特异性抑制 MMP-9 活性, 亦可促进肿瘤生长, 并发挥一定抗凋亡作用^[17]。一般正常状态下, 两者在机体内保持相对平衡, 并决定 ECM 降解, 直接参与组织修复、重塑、胚胎植入、肿瘤侵袭及转移等过程^[18]。当肿瘤分泌基质金属蛋白酶类物质降解 ECM 后, 周围间质成分被破坏, 细胞间黏附关系被重整, 最终促进肿瘤新生血管形成, 且肿瘤细胞则可沿着被破坏的 ECM 逐步向脏层胸膜、胸壁、心包等周围组织浸润, 发生侵袭及转移, 从而导致 T 分期上升^[19-20]。

综上所述, 肺癌 T 分期与患者血清 Th1/Th2、MMP-9、TIMP-1 显著相关。但基于本研究样本数量相对狭窄, 且仅为一个医院的肺癌患者, 数据代表性欠缺; 虽然 Th1 和 Th2 细胞可以产 IFN 和 IL-4, 但体内 IFN 和 IL-4 的来源显然不仅限于 Th1 和 Th2 细胞, 仅以 IFN/IL-4 反映 Th1/Th2 比例, 未排除其他混杂因素对 IFN/IL-4、Th1/Th2 比例的影响, 可能存在一定偏倚。鉴于上述局限, 拟待采集更大样本量并设计更严谨的研究思路进一步对此进行深入探究。

参考文献

- [1] Ramón RP, Bolejack V, Crowley J, et al. The IASLC lung cancer staging project: proposals for the revisions of the T descriptors in the forthcoming eighth edition of the TNM classification for lung cancer [J]. *J Thorac Oncol*, 2015, 10(7):990-1003.
- [2] Haghshenas M, Khademi B, Ashraf M, et al. Helper and cytotoxic T-cell subsets (Th1, Th2, Tc1, and Tc2) in benign and malignant salivary gland tumors [J]. *Oral Dis*, 2016, 22(6):566-572.
- [3] Raffaella B, Giancarlo B, Paola PB, et al. Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s [J]. *J Exp Med*, 2016, 187(1):129-134.
- [4] Camilla B, Beilmann-Lehtonen I, Kaprio T, et al. Serum MMP-8 and TIMP-1 predict prognosis in colorectal cancer [J]. *BMC Cancer*, 2018, 18(1):679.
- [5] Ricci B, Carlo D. Evaluation of MMP2, MMP9, TIMP1, TIMP2, NGAL and MMP9/NGAL complex in urine and sera from patients with bladder cancer [J]. *Oncol Lett*, 2015, 10(4):2527.
- [6] 石远凯, 孙燕, 于金明, 等. 中国晚期原发性肺癌诊治专家共识(2016年版)[J]. *中国肺癌杂志*, 2016, 19(1):1-15.
- [7] Egner J R. *AJCC cancer staging manual* [M]. Springer, 2011:12-33.
- [8] Bülzebruck H, Bopp R, Drings P, et al. New aspects in the staging of lung cancer. Prospective validation of the International Union Against Cancer TNM classification [J]. *Cancer*, 2015, 70(5):1102-1110.
- [9] 侯敏, 王凯国. Th1/Th2 偏移与胃癌关系的研究进展[J]. *山东医药*, 2016, 56(1):96-98.
- [10] 郑凯源, 黄飞, 陆礼, 等. 激动性 CD40 抗体通过调节 Th1/Th2 平衡增强抗肿瘤作用的机制研究[J]. *中国肿瘤临床*, 2018, 45(4):163-166.
- [11] Li J, Wang Z, Mao K, et al. Clinical significance of serum T helper 1/T helper 2 cytokine shift in patients with nonsmall cell lung cancer [J]. *Oncol Lett*, 2014, 8(4):1682-1686.
- [12] 殷红梅, 王磊, 胡晓波, 等. 非小细胞肺癌患者外周血 CD4⁺T 淋巴细胞亚群的变化及临床意义 [J]. *检验医学与临床*, 2017, 14(6):759-761.
- [13] 戴春, 周永春, 黄云超, 等. 非小细胞肺癌患者血清中细胞因子 (IL-2、IL-4、IL-6、IL-10) 的含量与临床分期的关系 [J]. *现代肿瘤医学*, 2015, 23(6):779-781.
- [14] 李晓英, 谢启超. 不同分期非小细胞肺癌与 Treg 细胞、细胞因子相关研究 [J]. *安徽医科大学学报*, 2017, 52(1):113-116.
- [15] 王小军, 火云霞, 刘华, 等. 肺癌患者血清 MMP-9 和 TIMP-1 检测的临床意义 [J]. *重庆医学*, 2013, 42(10):1111-1113.
- [16] 陈卓. 周细胞在血管生成及抗肿瘤治疗中的价值 [J]. *重庆医学*, 2016, 45(29):4153-4156.
- [17] 魏莉, 徐盈. 基质金属蛋白酶 9 在老年肺癌中的表达及临床意义 [J]. *中国老年学*, 2014, 34(1):89-90.
- [18] Faraji SN, Mojtahedi Z, Ghalamfarsa G, et al. N-myc downstream regulated gene 2 overexpression reduces matrix metalloproteinase-2 and -9 activities and cell invasion of A549 lung cancer cell line in vitro [J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2015, 18(8):773-779.
- [19] 潘红, 许赞兴, 孟舒婷. 血清 HMGB-1、MIF、TIMP-1 在评估脑出血患者预后中的价值 [J]. *中南医学科学杂志*, 2020, 48(3):269-271, 283.
- [20] Young LC, Sup SH, Seokkee L, et al. Prognostic effect of matrix metalloproteinase-9 in patients with resected Non small cell lung cancer [J]. *J Cardiothorac Surg*, 2015, 10(1):1-8.

心肌酶、电解质在小儿轮状病毒腹泻治疗及预后评估中的价值

王宗燕 韩军民* 邢晗 许春奇

[摘要] **目的** 探讨心肌酶、电解质在小儿轮状病毒(RV)腹泻治疗及预后评估中的价值。**方法** 选取安徽医科大学附属宿州医院儿童感染科2018年1月至2020年1月小儿RV腹泻90例,根据治疗7 d后预后分为治愈组($n=64$)、未愈组($n=26$)。比较两组基线资料、治疗前后心肌酶[肌酸肌酶(CK)、肌酸肌酶同工酶(CKMB)]、电解质指标水平,评价小儿RV腹泻预后的影响因素,分析心肌酶与电解质相关性以及对患儿预后的评估价值。**结果** 两组脱水程度、心肌损害、继发肠道细菌感染比较,差异有统计学意义($P<0.05$);未愈组治疗1、3、7 d后CK、CKMB高于治愈组,血钠、血钾低于治愈组,差异有统计学意义($P<0.05$);治疗7 d后CK、CKMB与血钠、血钾均呈负相关性($P<0.05$);心肌损害、继发肠道细菌感染、治疗7 d后CK、CKMB、血钠、血钾是小儿RV腹泻预后的重要影响因素($P<0.05$);治疗7 d后CK、CKMB、血钠、血钾联合评估小儿RV腹泻预后的曲线下面积(AUC)最大为0.921。**结论** 心肌酶、电解质与小儿RV腹泻治疗效果相关,二者动态联合监测可为临床制定个性化治疗方案、评估预后提供循证支持。

[关键词] 肌酸肌酶;肌酸肌酶同工酶;电解质;轮状病毒腹泻

The value of myocardial enzymes and electrolytes in the treatment and prognostic evaluation of rotavirus diarrhea in children

WANG Zongyan, HAN Junmin*, XING Han, XU Chunqi

(Department of Pediatric Infection, Suzhou Hospital Affiliated to Anhui Medical University, Suzhou, Anhui, China, 2340000)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the value of myocardial enzymes and electrolytes in the treatment and prognosis evaluation of pediatric rotavirus (RV) diarrhea. **Methods** 90 children with RV diarrhea in Department of Pediatric Infection, Suzhou Hospital Affiliated to Anhui Medical University from January 2018 to January 2020 were selected and divided into cured group ($n=64$) and non cured group ($n=26$) according to the prognosis after 7 days of treatment. Compare the baseline data of the two groups, the levels of myocardial enzymes [creatinine creatine enzyme (CK), creatine creatine enzyme isoenzyme (CKMB)], and electrolyte index levels before and after treatment, evaluate the factors affecting the prognosis of children with RV diarrhea, and analyze the correlation between myocardial enzymes and electrolytes and its evaluation value for the prognosis of children. **Results** There were significant differences in the degree of dehydration, the proportion of myocardial damage and the proportion of secondary intestinal bacterial infection between the two groups ($P<0.05$); CK and CKMB of the unhealed group were higher than the cured group after 1, 3, and 7 days of treatment, and serum sodium and potassium were lower than the cured group ($P<0.05$); CK, CKMB and serum sodium, Serum potassium was negatively correlated ($P<0.05$); myocardial damage, secondary intestinal bacterial infection, CK, CKMB, serum sodium, and potassium after 7 days of treatment are important factors affecting the prognosis of children with RV diarrhea ($P<0.05$); The area under the curve (AUC) of CK, CKMB, serum sodium,

基金项目:安徽医科大学科研项目(2019xkj241)

作者单位:安徽医科大学附属宿州医院(宿州市立医院)儿童感染科,安徽,宿州 2340000

*通信作者:韩军民, E-mail:1019852379@qq.com

and serum potassium combined to evaluate the prognosis of children with RV diarrhea was the largest after 7 days of treatment, which was 0.921. **Conclusion** Myocardial enzymes and electrolytes are related to the therapeutic effect of RV diarrhea in children, and the combined dynamic monitoring of the two can provide evidence-based support for clinical development of personalized treatment plans and prognosis assessment.

[KEY WORDS] Creatine creatine enzyme; Creatine creatine enzyme isoenzyme; electrolyte; Rotavirus diarrhea

轮状病毒(Rotavirus, RV)感染是小儿腹泻的重要病因之一,具有起病急骤、病情变化迅速等特点,可引起病理性变化,甚至累及心脏、肝脏等多种脏器功能损伤,严重影响患儿生长发育^[12]。目前临床针对RV腹泻尚无特效药物,主要采用纠正脱水、饮食疗法等综合处理,但受小儿胃肠道发育不完善、机体抵抗力差等因素影响,部分患儿预后改善不甚理想。因此,探索一种有效评估小儿RV腹泻治疗及预后的指标具有重要临床价值。近年来,多项研究表明^[34],RV感染时心肌酶活性异常升高,主要表现为肌酸肌酶(creatine kinase, CK)、肌酸肌酶同工酶(creatine kinase isoenzymes, CKMB)异常升高。另有研究指出^[5],RV感染通常伴随水分流失,可影响水电解质平衡,导致血钾、血钠大量丢失。然而现阶段关于心肌酶、电解质在评估小儿RV腹泻预后中的价值临床尚缺乏循证支持。故本研究尝试探讨心肌酶、电解质在小儿RV腹泻治疗及预后评估中的价值。详情如下。

1 资料和方法

1.1 一般资料

选取2018年1月至2020年1月安徽医科大学附属宿州医院儿童感染科收治的小儿RV腹泻90例,根据治疗7d后预后分为治愈组($n=64$)、未愈组($n=26$)。纳入标准:①均符合RV腹泻诊断标准^[6];②大便RV抗原检测呈阳性,③大便外观呈稀水或蛋花样,且大便次数 ≥ 3 次/d;④所有研究对象监护人签署知情同意书;排除标准:①近3d内有止泻剂或收敛剂等药物服用史者;②合并心脑肝肾等重要脏器器质性损害者;③合并代谢性疾病、自身免疫系统疾病或神经系统疾病者;④监护人存在听力障碍、语言障碍或精神异常。本研究经医院医学伦理委员会批准。

1.2 方法

①基线资料收集:采用调查问卷收集所有研究对象性别、年龄、病程、大便次数、呕吐次数、体

温、脱水程度、发病季节、有无心肌损害、继发肠道细菌感染等内容。②心肌酶、电解质检测:分别于治疗前、治疗1、3、7d后空腹取外周静脉血5mL,采用深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司BS2000型全自动生化分析仪测定CK、CKMB、血钠、血钾水平。③治疗方法:所有研究对象均予以维持水电解质平衡、停止进食高脂肪且不易消化食物、抗病毒等综合治疗,连续治疗7d。

1.3 预后评估标准^[7]

呕吐、腹泻等症状全部消失,大便性状、颜色恢复正常且次数 ≤ 2 次/d为治愈;上述症状明显改善,大便性状、颜色恢复正常且次数为3~5次/d为显效;上述症状有所控制,大便性状、颜色有所改善为疗效不明显;未达到上述标准为无效。将治愈+显效纳入治愈组、将疗效不明显+无效纳入未愈组。

1.4 统计学方法

应用SPSS 22.0软件进行统计学分析,计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,采用 t 检验;计数资料用 $n(\%)$ 表示,采用 χ^2 检验;小儿RV腹泻预后的影响因素采用Logistic回归分析;心肌酶与电解质相关性采用Pearson相关性分析,绘制受试者工作特征(ROC)曲线得到曲线下面积(AUC),检验心肌酶、电解质对小儿RV腹泻预后的评估价值。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组基线资料

两组性别、年龄、病程、大便次数、呕吐次数、体温、发病季节比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),脱水程度、心肌损害、继发肠道细菌感染比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表1。

2.2 两组心肌酶、电解质指标水平

未愈组治疗1、3、7d后CK、CKMB高于治愈组,血钠、血钾低于治愈组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表2。

表1 两组基线资料比较 [n(%), ($\bar{x} \pm s$)]

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

基线资料	治愈组 (n=64)	未愈组 (n=26)	t/ χ^2 值	P值
性别(男/女)	38/26	14/12	0.232	0.630
年龄(岁)	1.36±0.18	1.29±0.23	1.540	0.128
病程(d)	2.25±0.51	2.31±0.64	0.469	0.640
大便次数(次/d)	4.25±1.26	4.54±1.08	1.029	0.306
呕吐次数(次/d)	1.99±0.59	2.08±0.63	0.643	0.522
体温(℃)	38.65±0.59	38.71±0.42	0.472	0.638
脱水程度				
轻度	53(82.81)	9(34.62)		
中度	11(17.19)	13(50.00)	3.787	<0.001
重度	0(0)	4(15.38)		
发病季节				
春季	11(17.19)	4(15.38)		
夏季	8(12.50)	6(23.08)	1.984	0.576
秋季	21(32.81)	9(34.62)		
冬季	24(37.50)	7(26.92)		
心肌损害				
有	2(3.13)	7(26.92)	9.141	0.003
无	62(96.87)	19(73.08)		
继发肠道细菌感染				
有	4(6.25)	8(30.77)	7.614	0.006
无	60(93.75)	18(69.23)		

2.3 心肌酶与电解质的相关性

经Pearson相关性分析,治疗7 d后CK、CKMB与血钠、血钾均呈负相关性($P<0.05$)。见表3。

表3 心肌酶与电解质的相关性

Table 3 Correlation between myocardial enzymes and electrolytes

指标	CK		CK-MB	
	r值	P值	r值	P值
血钠	-0.586	<0.001	-0.554	<0.001
血钾	-0.591	<0.001	-0.570	<0.001

2.4 小儿RV腹泻预后的影响因素

Logistic回归分析显示,心肌损害、继发肠道细菌感染、治疗7 d后CK、CKMB、血钠、血钾是小儿RV腹泻预后的重要影响因素($P<0.05$)。见表4。

2.5 心肌酶、电解质评估小儿RV腹泻预后的价值

ROC曲线显示,治疗7 d后CK、CKMB、血钠、血钾评估小儿RV腹泻预后的AUC分别为0.782、0.548、0.797、0.890,联合评估的AUC为0.921,评估价值得到显著提高($P<0.05$)。见图1。

表2 两组治疗前、治疗1、3、7 d后心肌酶、电解质指标水平 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 levels of myocardial enzymes and electrolytes before treatment, 1 D, 3 D and 7 d after treatment in the two groups ($\bar{x} \pm s$)

时间	组别	n	CK(U/L)	CK-MB(U/L)	血钠(mmol/L)	血钾(mmol/L)
治疗前	治愈组	64	141.64±33.77	53.76±6.55	104.38±5.61	3.09±0.38
	未愈组	26	142.38±35.62	55.81±4.28	102.75±7.04	2.97±0.40
	t值		0.093	1.471	1.158	1.338
	P值		0.926	0.145	0.250	0.185
治疗1 d后	治愈组	64	115.54±20.38 ^a	38.39±4.01 ^a	124.86±8.39 ^a	3.97±0.50 ^a
	未愈组	26	128.61±23.76 ^a	46.68±5.18 ^a	112.25±7.48 ^a	3.58±0.45 ^a
	t值		2.627	8.149	6.660	3.448
	P值		0.010	<0.001	<0.001	0.001
治疗3 d后	治愈组	64	101.69±18.05 ^a	31.74±3.65 ^a	130.84±10.41 ^a	4.61±0.76 ^a
	未愈组	26	116.85±20.11 ^a	39.82±4.27 ^a	119.49±9.77 ^a	3.94±0.63 ^a
	t值		3.494	9.056	4.770	3.971
	P值		0.001	<0.001	<0.001	<0.001
治疗7 d后	治愈组	64	91.65±15.67 ^a	24.45±6.85 ^a	143.76±11.46 ^a	4.97±0.68 ^a
	未愈组	26	107.38±17.88 ^a	35.63±7.51 ^a	125.25±10.84 ^a	4.36±0.59 ^a
	t值		4.142	6.825	7.051	4.000
	P值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与同组治疗前比较,^a $P<0.05$ 。

表4 小儿RV腹泻预后的多因素Logistic回归分析

Table 4 multivariate logistic regression analysis of RV diarrhea in children

影响因素	赋值	β 值	S.E值	Wald χ^2 值	OR值	95%CI	P值
心肌损害	无=0,有=1	0.880	0.238	13.685	2.412	1.157~5.028	<0.001
继发肠道细菌感染	无=0,有=1	0.691	0.245	7.954	1.996	1.072~3.715	<0.001
治疗7 d后CK	≤ 96.19 U/L=1, > 96.19 U/L=2	0.816	0.228	12.822	2.262	1.261~4.059	<0.001
治疗7 d后CK-MB	≤ 27.68 U/L=1, > 27.68 U/L=2	0.771	0.240	10.311	2.161	1.168~3.999	<0.001
治疗7 d后血钠	≤ 138.41 mmol/L=1, > 138.41 mmol/L=2	-1.221	0.367	11.075	0.295	0.183~0.475	<0.001
治疗7 d后血钾	≤ 4.79 mmol/L=1, > 4.79 mmol/L=2	-1.411	0.418	11.397	0.244	0.129~0.461	<0.001

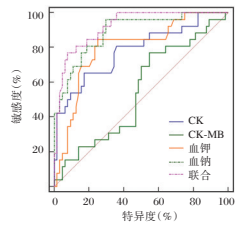


图1 ROC曲线

Figure 1 ROC curve

3 讨论

据统计^[8],每年全球死于RV感染人数约达45.34万,约占5岁以下儿童总人数的5%。因此,临床应加强对小儿RV腹泻治疗与预后的重视。

相关研究显示^[9],RV感染除诱发消化道疾病外,还可引起心肌损伤,发生率可达20%~60%,严重危及患儿生命安全。CK是一种器官特异性的肌酸激酶,CKMB是其同工酶,二者均可评估心肌损害程度^[10]。盛欢等^[11]研究已证实,监测CK、CKMB表达变化有助于准确掌握RV肠炎患儿并发心肌损害病情。本研究中,RV腹泻未愈患儿治疗1、3、7 d后CK、CKMB高于治愈患儿。说明小儿RV腹泻治疗效果与CK、CKMB存在一定关系。进一步经Logistic多因素回归分析,治疗7 d后CK>96.19 U/L、CKMB>27.68 U/L是小儿RV腹泻预后的独立危险因素。结合王荣花等^[12]研究考虑上述机制可能在于RV溶细胞作用及病毒诱导产生细胞毒T淋巴细胞可直接引起心肌损害,且RV感染侵袭导致的脱水、酸中毒等,亦可加剧心肌缺血、血氧,释放大量的氧自由基,损害心肌功能,进而导致CK、CKMB水平显著升高,进而加重病情程度,加大治疗难度,从而对治疗效果及预后产生一定影响。推测在未来可将心肌酶作为评估小儿RV腹泻治疗及预后的重要指标。另外,有学者指出^[13],RV非结构蛋白NSP4可诱导细胞内钙离子大量聚集,促使氯离子外流,降低细胞对钠离子的吸收,破坏电解质平衡,从而促进腹泻发生。阮金德等^[14]通过128例RV性肠炎患儿还发现,电解质紊乱是患儿合并心肌损害的危险因素。本研究显示,血钾、血钠低表达可能影响小儿RV腹泻治疗效果,这可能归因于RV感染一定程度会引发腹泻次数增加、钾大量丢失等症状,降低肾调节功能,减少肾血流量与血容量,削弱二氧化碳结合力,导致机体钾、钠含量不足,最终形成恶性循环,影响治疗效果与预后改善。由此可见,动态监测RV腹泻患儿机体电解质

变化趋势有助于指导临床评估治疗效果,及时调整治疗方案,促进预后改善。

本研究经Pearson相关性还发现,治疗7 d后小儿RV腹泻CK、CKMB与血钠、血钾均存在负相关性,表明小儿RV腹泻心肌损伤可能与RV感染所致电解质异常有关,二者有助于反映RV腹泻病情程度,利于指导临床及时有效治疗。ROC曲线,显示,治疗7 d后CK、CKMB、血钠、血钾联合评估小儿RV腹泻预后的AUC优于上述指标单一评估。提示联合监测心肌酶、电解质有助于提高小儿RV腹泻预后评估价值,为临床开展有效治疗方案、促进预后改善提供一定参考依据。

综上所述,心肌酶、电解质与小儿RV腹泻治疗效果相关,二者动态联合监测可为临床制定个性化治疗方案、评估预后提供循证支持。但本研究不足之处在于纳入病例数较少,导致研究结果可能存在一定偏倚,有待今后扩大样本量进一步深入分析。

参考文献

- [1] Stanifer M, Boulant S. The origin of diarrhea in rotavirus infection[J]. Science, 2020, 370(6519):909-910.
- [2] 王洪丽, 陈冠桦, 黄玲, 等. A组轮状病毒对CaCO₂和HT29细胞NKCC1表达的影响[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2021, 13(2):207-210.
- [3] 胡淑莹, 王利莹, 李明磊, 等. 小儿轮状病毒肠炎并发惊厥的影响因素分析[J]. 中国全科医学, 2021, 24(11):1344-1348.
- [4] Zuo NY, Zhang YD, Dong QW, et al. Relationship between myocardial enzyme levels, hepatic function and metabolic acidosis in children with rotavirus infection diarrhea[J]. Pak J Med Sci, 2020, 36(6):1366-1370.
- [5] 忽欣怡, 李雲, 李学尧, 等. 小儿感染性腹泻病因研究进展[J]. 临床军医杂志, 2021, 49(1):114-116.
- [6] 胡亚美, 江载芳, 申昆玲, 等. 诸福棠实用儿科学[M]. 第8版. 北京:人民卫生出版社, 2015:1194-1296.
- [7] 陆再英, 钟南山. 内科学[M]. 第7版. 北京:人民卫生出版社, 2008:424-426.
- [8] Burnett E, Parashar UD, Tate JE. Global impact of rotavirus vaccination on diarrhea hospitalizations and deaths among children <5 years old: 2006-2019[J]. J Infect Dis, 2020, 222(10):1731-1739.
- [9] Thomas SL, Walker JL, Fenty J, et al. Impact of the national rotavirus vaccination programme on acute gastroenteritis in England and associated costs averted[J]. Vaccine, 2017, 35(4):680-686.
- [10] 张红利. hsCRP联合心肌酶CKMB检测在小儿轮状病毒性肠炎诊断中的应用价值分析[J]. 中国肛肠病杂志, 2020, 40(8):40-42.

(下转第1556页)

· 论 著 ·

NVG患者血清及房水中ET-1、MMP、TIMP-2水平变化及其临床意义

冯坤 王文* 彭一

[摘要] **目的** 观察新生血管性青光眼(NVG)患者血清及房水中血清内皮素(ET-1)、基质金属蛋白酶(MMP)、基质金属蛋白酶抑制剂-2(TIMP-2)的水平变化及其临床意义。**方法** 选取2019年6月至2020年12月枣庄市中医医院收治的45例(45眼)NVG患者作为观察组,另选取同期48例(48眼)年龄相关性白内障(ARC)患者作为对照组,比较两组患者血清及房水中ET-1、MMP、TIMP-2水平变化情况,按照患者发病情况将NVG患者分为急性NVG组(24眼)与慢性NVG组(21眼),比较急慢性NVG患者血清及房水中ET-1、MMP、TIMP-2水平变化情况,并观察ET-1、MMP、TIMP-2水平与NVG的关系。**结果** 观察组患者房水ET-1、MMP、TIMP-2水平均高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。两组患者血清ET-1、MMP、TIMP-2水平比较差异无统计学意义($P>0.05$)。急性NVG患者房水中ET-1、MMP、TIMP-2水平高于慢性NVG患者,差异有统计学意义($P<0.05$)。急性NVG患者血清中ET-1、MMP、TIMP-2水平低于慢性NVG患者,但差异无统计学意义($P>0.05$)。ROC曲线分析显示,房水ET-1、MMP、TIMP-2用于评估NVG患者诊断价值的AUC分别为0.816、0.981、0.962,评估急慢性NVG的AUC分别为0.654、0.857、0.760。**结论** 房水ET-1、MMP、TIMP-2水平与NVG发生密切相关,检测房水ET-1、MMP、TIMP-2水平可为NVG发病情况提供参考。

[关键词] 新生血管性青光眼; ET-1; MMP; TIMP-2

Changes of ET-1, MMP and TIMP-2 levels in serum and aqueous humor of NVG patients and their clinical significance

FENG Kun, WANG Wen*, PENG Yi

(Department of Ophthalmology, Zaozhuang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zaozhuang, Shandong, China, 277000)

[ABSTRACT] **Objective** To observe the changes of endothelin (ET-1), matrix metalloproteinases (MMP), matrix metalloproteinase inhibitor-2 (TIMP-2) levels in serum and aqueous humor of patients with neovascular glaucoma (NVG) and their clinical significance. **Methods** 45 patients (45 eyes) with NVG treated in Zaozhuang Hospital of Traditional Chinese Medicine between June 2019 and December 2020 were selected as the observation group, and 48 patients (48 eyes) with age related cataract (ARC) during the same period were selected as the control group. The levels of ET-1, MMP and TIMP-2 in serum and aqueous humor were compared between the two groups. Patients with NVG were divided into the acute NVG group (24 eyes) and the chronic NVG group (21 eyes) according to the incidence of patients. The changes of serum and aqueous humor levels of ET-1, MMP and TIMP-2 were compared between patients with acute and chronic NVG, and the relationship between the levels of ET-1, MMP and TIMP-2 and NVG was observed. **Results** The levels of aqueous humor ET-1, MMP and TIMP-2 in the observation group were higher than those in the control group ($P<0.05$). There were no statistical differences between the two groups of patients in terms of serum ET-1,

基金项目:山东省中医药科技发展计划项目(2019-315)

作者单位:枣庄市中医医院眼科,山东,枣庄 277000

*通信作者:王文, E-mail:60347532@qq.com

MMP and TIMP-2 levels ($P>0.05$). The levels of ET-1, MMP and TIMP-2 in the aqueous humor of patients with acute NVG were higher than those of patients with chronic NVG ($P<0.05$). The levels of ET-1, MMP and TIMP-2 in serum of patients with acute NVG were lower than those of patients with chronic NVG ($P>0.05$). ROC curve analysis showed that the AUC values of aqueous humor ET-1, MMP and TIMP-2 were 0.816, 0.981 and 0.962 in assessing the diagnostic value of patients with NVG, and were 0.654, 0.857 and 0.760 in evaluating acute and chronic NVG. **Conclusion** The levels of ET-1, MMP and TIMP-2 in aqueous humor are closely related to the occurrence of NVG. The detection of levels of ET-1, MMP and TIMP-2 in aqueous humor can provide references for the occurrence of NVG.

[KEY WORDS] Neovascular glaucoma; ET-1; MMP; TIMP-2

新生血管性青光眼(Neovascular glaucoma, NVG)是一种以虹膜和房角新生血管为特征的青光眼,多继发于糖尿病视网膜病变(Diabetic retinopathy, DR)、视网膜静脉阻塞(Retinal vein occlusion, CRVO)等疾病。近年来随着DR、CRVO等发病率的上升,NVG的发病率也呈明显上升趋势^[1]。研究发现,NVG的发生与患者视网膜缺血、缺氧以及细胞外基质(Extracellular matrix, ECM)异常堆积密切相关^[2]。血清内皮素(Endothelin, ET-1)是一种具有抑制血管内皮细胞生长的特殊因子^[3]。基质金属蛋白酶(Matrix metalloproteinases, MMP)、基质金属蛋白酶抑制剂-2(Matrix metalloproteinase inhibitor-2, TIMP-2)是ECM代谢的主要调节因子,与新生血管的形成和发展过程密切相关,且二者间的动态平衡对疾病具有重要的影响^[4]。本研究探究NVG患者血清及房水中ET-1、MMP、TIMP-2的表达及临床意义,报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2019年6月至2020年12月枣庄市中医医院收治的45例(45眼)NVG患者作为观察组。纳入标准:①符合NVG诊断标准^[5-6]:眼压 ≥ 2.4 mmHg,有眼胀、疼痛等临床症状,具有视网膜视神经纤维层缺损、不同程度的青光眼性视野缺损或房角粘连等特点;其中急性NVG具有明显的眼红、眼痛,视力模糊或急剧下降等临床症状,慢性NVG各临床症状较轻。②年龄在21~65岁之间;③所有患者均行青光眼手术治疗;④本研究开始前1个月内未接受相关针对性治疗;⑤意识清晰,具有较好的沟通能力。排除标准:①存在心、肝、肾等重要脏器疾病或合并系统性免疫性疾病者;②伴有其他眼部疾病患者;③妊娠或哺乳期女性。另选取同期年龄相关性白内障(Age related

cataract, ARC)患者48例(48眼)作为对照组。本研究经院医学伦理委员会审批通过,患者或家属知情同意。

1.2 方法

1.2.1 样本采集

血清样本采集:于手术当日清晨抽取空腹静脉血5 mL,4℃下2 000 r/min离心10 min(离心半径为5.4 cm)处理,分离血清,置于-80℃冰箱保存备检。房水样本采集:患者仰卧位,完成相应消毒、冲洗以及麻醉后,使用眼睑撑开器撑开眼睑并使用注射器自角膜缘穿刺进前房,抽取房水0.3 mL,注入无菌EP管内,然后置于-80℃冰箱保存备检。

1.2.2 检测方法

采用电化学发光法检测血清及房水中ET-1、MMP、TIMP-2水平,试剂盒购自上海广锐生物科技有限公司,检验过程中严格按照试剂盒操作说明进行操作。

1.3 统计学方法

采用统计学软件SPSS 21.0进行数据分析,对于正态分布的计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,采用 t 检验;计数资料以 $n(\%)$ 表示,采用 χ^2 检验;采用logistics回归分析检验血清及房水中ET-1、MMP、TIMP-2与NVG之间的相关性,并绘制受试者工作特征曲线(ROC)曲线并计算曲线下面积评估血清及房水中ET-1、MMP、TIMP-2对NVG的预测价值,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者基线资料比较

观察组患者眼压及合并高血压比例均明显高于对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。两组患者性别、年龄、BMI、吸烟史及合并糖尿病等比较差异无统计学意义($P>0.05$)。见表1。

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

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

临床资料	观察组 (n=45)	对照组 (n=48)	χ^2/t 值	P值
性别	男	19(42.22)	2.412	0.120
	女	26(57.78)		
年龄(岁)	56.52±9.83	55.53±9.94	0.483	0.631
BMI(kg/m ²)	23.08±2.74	22.15±2.52	1.705	0.092
吸烟史	31(68.89)	27(56.25)	1.581	0.209
眼压(mmHg)	28.02±5.43	24.55±2.39	2.705	0.010
合并症	高血压	23(51.11)	18.278	<0.001
	糖尿病	22(48.89)		
		26(54.17)	0.259	0.611

2.2 两组患者血清、房水中 ET-1、MMP、TIMP-2 水平比较

两组患者血清 ET-1、MMP、TIMP-2 水平比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)；观察组患者房水 ET-1、

MMP、TIMP-2 水平均高于对照组，差异有统计学意义 ($P<0.05$)。见表 2。

2.3 不同病情严重程度 NVG 患者血清、房水中 ET-1、MMP、TIMP-2 水平比较

急性 NVG 患者房水中 ET-1、MMP、TIMP-2 水平高于慢性 NVG 患者，差异有统计学意义 ($P>0.05$)。急性 NVG 患者血清中 ET-1、MMP、TIMP-2 水平低于慢性 NVG 患者，差异无统计学意义 ($P<0.05$)。见表 3。

2.4 房水 ET-1、MMP、TIMP-2 水平对 NVG 诊断价值分析

ROC 曲线显示，房水 ET-1、MMP、TIMP-2 水平诊断 NVG 的 AUC 分别为 0.816、0.981、0.962，且 MMP、TIMP 的敏感度分别为 0.889、0.911，特异度分别为 0.979、0.917。见表 4、图 1。

表2 两组患者血清、房水 ET-1、MMP、TIMP-2 水平比较 ($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Comparison of levels of ET-1, MMP and TIMP-2 in serum and aqueous humor between the two groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	房水			血清		
		ET-1 (ng/L)	MMP (μg/L)	TIMP-2 (μg/L)	ET-1 (ng/L)	MMP (μg/L)	TIMP-2 (μg/L)
观察组	45	1.59±0.09	27.02±1.42	13.23±1.81	61.46±8.08	5.07±1.37	0.92±0.36
对照组	48	1.47±0.08	23.62±1.75	9.47±1.61	58.62±5.83	4.73±1.56	0.84±0.33
t 值		6.805	10.248	10.599	1.953	1.114	1.118
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	0.054	0.268	0.267

表3 不同病情严重程度 NVG 患者血清、房水中 ET-1、MMP、TIMP-2 水平比较 ($\bar{x}\pm s$)

Table 3 Comparison of levels of ET-1, MMP and TIMP-2 in serum and aqueous humor of patients with NVG of different severity ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	房水			血清		
		ET-1 (ng/L)	MMP (μg/L)	TIMP-2 (μg/L)	ET-1 (ng/L)	MMP (μg/L)	TIMP-2 (μg/L)
急性 NVG	24	1.62±0.09	28.33±1.86	14.12±1.89	60.63±7.92	4.92±1.32	0.91±0.35
慢性 NVG	21	1.54±0.08	25.52±1.71	12.21±1.63	62.24±8.58	5.25±1.37	0.93±0.34
t 值		3.132	5.248	3.604	0.654	0.822	0.194
P 值		0.003	<0.001	0.001	0.516	0.416	0.848

表4 房水 ET-1、MMP、TIMP-2 水平对 NVG 诊断价值分析

Table 4 Analysis of diagnostic value of ET-1, MMP and TIMP-2 in aqueous humor on NVG

指标	AUC	截断点	SE 值	95%CI	敏感性	特异性	P 值
ET-1	0.816	>1.552	0.045	0.722~0.889	0.664	0.896	<0.001
MMP	0.981	>26.534	0.045	0.928~0.998	0.889	0.979	<0.001
TIMP-2	0.962	>11.857	0.031	0.901~0.991	0.911	0.917	<0.001

2.5 房水 ET-1、MMP、TIMP-2 水平对急慢性 NVG 诊断价值分析

ROC 曲线显示，房水 ET-1、MMP、TIMP-2 水平诊断急慢性 NVG 的 AUC 分别为 0.654、0.857、0.760，且 MMP、TIMP-2 的敏感度分别为 0.833、0.708，特异度分别为 0.810、0.762，见表 5、图 2。

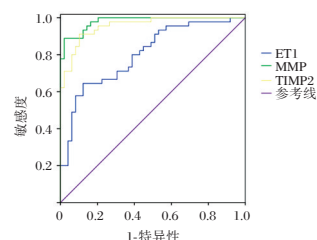


图1 房水 ET-1、MMP、TIMP-2 水平诊断 NVG 的 ROC 曲线
Figure 1 ROC curves of ET-1, MMP and TIMP-2 in aqueous humor in the diagnosis of NVG

3 讨论

NVG 是临床常见的眼科疾病，其病因复杂，具有较高的致盲率，严重危害患者身心健康^[7]。因

表5 房水 ET-1、MMP、TIMP-2 水平对急慢性 NVG 诊断价值分析

指标	AUC	截断点	SE	95%CI	敏感性	特异性	P 值
ET-1	0.654	>1.56	0.083	0.497~0.789	0.750	0.524	0.06
MMP	0.857	>26.60	0.057	0.721~0.943	0.833	0.810	<0.001
TIMP-2	0.760	>12.64	0.072	0.609~0.875	0.708	0.762	<0.001

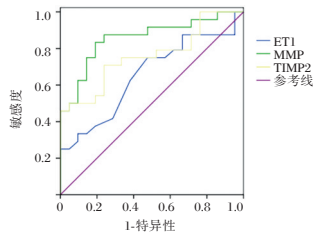


图2 房水 ET-1、MMP、TIMP-2 水平诊断急慢性 NVG 的 ROC 曲线

Figure 2 ROC curves of levels of ET-1, MMP and TIMP-2 in aqueous humor in the diagnosis of acute and chronic NVG

此,早发现、早诊断、早治疗对改善患者预后具有十分重要的意义。研究指出,NVG 主要是由于虹膜表面或者前房角生成新生血管,导致小梁网以及周边的虹膜组织发生粘连,从而引起患者的眼球内部眼压升高而发病^[8]。随着研究的深入,发现 NVG 主要是因为纤维血管膜收缩牵拉,使房角关闭,引起眼压升高而发病^[9]。

ET-1 是一种长效、强能的缩管多肽,对人体血管具有强烈的收缩作用。相关研究指出,ET-1 可导致 NVG 患者小梁网出现异常收缩并发生重建现象,继而引发眼压升高现象,而且还可导致视乳头缺血,降低视力^[10]。MMP 是细胞外基质(Extracellular matrix, ECM)代谢的主要调节因子,在 ECM 降解过程中发挥重要作用。TIMP-1 是 MMP 组织抑制剂,可通过阻止 MMP 酶原的活化来特异性地抑制相应 MMP 活性。研究发现,多种眼部疾病,如眼表疾病、葡萄膜炎、青光眼、白内障、视神经损伤、视网膜缺血、视网膜母细胞瘤、甲状腺相关眼病及眼外伤等均存在 MMP、TIMPs 表达的变化^[11]。而且,在一般健康生理状态下,TIMP-1 与 MMP 表达比例处于一种平衡状态^[12],如若比例失衡将导致 ECM 异常,进而可引起小梁网代谢异常、房水外引流途径阻力增加等^[13]。文献证明,MMP 及其组织抑制剂间动态平衡的不稳定直接导致青光眼小梁网中细胞外基质异常堆积^[14]。而且,血液中 MMP 及 TIMP-1 指标与流通通道密切相关,尤其能够影

响小梁细胞的增殖,进而影响眼压等情况^[15]。

本文研究发现,观察组房水 ET-1 水平明显高于对照组,且病情越急水平越高,提示房水中 ET-1 水平与 NVG 具有密切的联系,与张邱芳^[16]等研究结果相似。分析原因可能是房水中 ET-1 可以特异性地直接作用于血管内皮细胞,能显著抑制血管内皮细胞的增值和迁移。而血清中 ET-1 水平差异无统计学意义,可能由于 ET-1 实质上是由血管内皮细胞产生,主要作用于局部,仅有一小部分可进入血管。ROC 曲线分析显示,ET-1、MMP、TIMP-2 用于评估 NVG 患者诊断价值的 AUC 分别为 0.816、0.981、0.962, MMP、TIMP-2 的敏感度分别为 88.89%、91.11%; 特异度分别为 97.92%、91.67%。房水 ET-1、MMP、TIMP-2 水平诊断急慢性 NVG 的 AUC 分别为 0.654、0.857、0.760,且 MMP、TIMP-2 的敏感度分别为 0.833、0.708,特异度分别为 0.810、0.762,均表现出良好诊断效能。

综上所述,房水 ET-1、MMP、TIMP-2 水平与 NVG 发生密切相关,检测房水 ET-1、MMP、TIMP-2 水平可为 NVG 病情严重程度提供参考。

参考文献

- [1] Shchomak Z, Cordeiro SD, Leal I, et al. Surgical treatment of neovascular glaucoma: a systematic review and meta-analysis [J]. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2019, 257(6): 1079-1089.
- [2] Xie Z, Liu H, Du M, et al. Efficacy of Ahmed Glaucoma Valve Implantation on Neovascular Glaucoma [J]. Intern J Med Sci, 2019, 16(10): 1371-1376.
- [3] 郎哲,何志红,毕文森,等.溶栓治疗肺血栓栓塞症疗效及对凝血功能及 NF-κB,ET-1 的影响[J].分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(5): 634-638.
- [4] Wang XY, Joselyn RQ, Julie W, et al. Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 Promotes Polymorphonuclear Neutrophil (PMN) Pericellular Proteolysis by Anchoring Matrix Metalloproteinase-8 and -9 to PMN Surfaces [J]. J Immun, 2019; 202(11): 3267-3281.
- [5] Ling B, Farheen T, Yidan H, et al. Intracameral anti-VEGF injection for advanced neovascular glaucoma after vitrectomy with silicone oil tamponade [J]. Int J Ophthalmol, 2021, 14(3): 456-460.
- [6] Wang Y, Chen D, Yang W, et al. Primary Acute Angle-Closure Glaucoma: Three-Dimensional Reconstruction Imaging of Optic Nerve Head Structure in Based on Optical Coherence Tomography (OCT) [J]. Med Sci Monit, 2019, 16(25): 3647-3654.

(下转第 1556 页)

体外诊断试剂临床核查常见问题分析

金菁^{1*} 徐维锋² 何本霞¹ 王松¹ 陈燕¹ 张光勋¹ 刘彦安¹ 张安萍¹

[摘要] 临床试验过程的成功与否关键在于如何制定完整的质量体系并注重其真实性、合规性、可操作性和可溯源性,依照法律法规及相关政策,按规章制度办事,遵循科学性、合理性两大基本原则。加强体外诊断试剂(以下简称“IVD”)临床试验规范化管理,才是保证IVD临床试验质量的关键。本文介绍IVD临床试验现场核查中需要关注的常见问题,并针对现阶段体外诊断试剂的工作现状和核查中发现的常见缺陷提出解决思路,为医疗器械临床试验的实施者及管理提供者提供参考依据。

[关键词] 临床试验;体外诊断试剂;常见问题

The discussion of common defects in on-site verification of in-vitro diagnostic reagent (IVD) clinical trials

JIN Jing¹, XU Weifeng^{2*}, HE Benxia¹, WANG Song¹, CHEN Yan¹, ZHANG Guangxun¹, LIU Yan'an¹, ZHANG Anping¹

(1. Hubei Food and Drug Administration Center for Evaluation and Inspection, Wuhan, Hebei, China, 430071; 2. Hubei Food and Drug Administration, Wuhan, Hebei, China, 430075)

[ABSTRACT] The success of the clinical trial process depends on complete, compliant, authentic, operational, attributable quality system. The crucial points are accordance with the laws and related policies, according to the rules and regulations, following the two fundamental principles which are scientific nature and rationality. Strengthening the standardized management of IVD clinical trials is the key to ensuring the quality of IVD clinical trials. This article points out introduces the common problems in on-site inspection of in vitro diagnostic reagent (IVD) clinical trials. It aims to provide technical reference for executors of IVD clinical trials and government administrators.

[KEY WORDS] Clinical trial; In-vitro diagnostic reagent; Common defect

体外诊断试剂(In vitro diagnostic reagent, IVD)是指在疾病的预测、预防、诊断、治疗监测、预后观察和健康状态评价的过程中,用于人体样本体外检测的试剂、试剂盒、校准品、质控品等产品^[1]。

体外诊断试剂临床试验(包括与已上市产品进行的比较研究试验)是指在相应的临床环境中,对体外诊断试剂的临床性能进行的系统性研究^[2],是应用于临床、指导临床治疗有效性、安全性的最后一个研发环节,试验数据和结果均是药监部门

进行注册审评审批的重要依据^[3]。国家药品监督管理局先后发布《体外诊断试剂临床试验技术指导原则》^[2]、《医疗器械临床试验质量管理规范》^[4]、《医疗器械临床试验机构条件和备案管理办法》^[5]等相关要求,制定了《医疗器械临床试验现场检查程序》^[6](2016年)、《医疗器械临床试验现场检查要点(2016年)》^[6],并于2018年6月起草《医疗器械临床试验检查要点及判定原则(征求意见稿)》^[7],不断完善临床核查相关的指导性文件。自

作者单位:1.湖北省药品监督管理局技术审评核查中心,湖北,武汉430071

2.湖北省药品监督管理局,湖北,武汉430075

*通信作者:金菁, E-mail: jinjing8266@126.com

注:徐维锋为共同第一作者, E-mail: 153031690@qq.com

2015年下半年开始,国家总局每年都对在审项目实施临床试验数据监督抽查。同时,要求各省级药监局高度重视,落实国家总局医疗器械临床试验监督抽查工作要求。

本文所提及的体外诊断试剂临床试验核查常见问题,均整理自2016年以来参加湖北省药监局组织的体外诊断试剂临床试验工作,前后共计对10家临床医院开展的177个体外诊断试剂临床项目进行临床核查,分析IVD临床核查主要问题,提高申请企业临床试验质量,获得准确、真实、可靠的临床数据。

1 伦理方面

伦理委员会审查是整个临床试验中的重要环节,现场核查中发现的常见问题有:①伦理委员会批件中未见伦理批件号、伦理委员会主任委员或副主任委员签名,无伦理委员会委员参会人员签到表和委员会讨论记录;②临床试验伦理审查申请与审批表未填写日期或无伦理委员会盖章;③临床试验方案审核日期、临床试验合同签订日期、临床试验启动会时间等晚于伦理审查上会时间;④申办方与临床试验开展机构无法提供伦理审批合格的临床试验方案等。

纵观体外诊断试剂临床试验的整个伦理审查体系,相对于药物临床试验其发展尚不成熟,目前均基本以药物临床试验的方法为参照标准,伦理审批也一般都是在药物临床试验伦理委员会开展审查,忽视体外诊断试剂临床试验独有的特性。体外诊断试剂临床试验在整个临床试验领域中起步相对较晚,相关法规政策正在逐步完善,某些伦理委员因缺乏体外诊断试剂临床试验审查经验,甚至对产品特点了解甚少,减弱了临床试验伦理委员会在作为审查医疗器械临床试验最首要环节的审查能力,致使相关研究人员在试剂操作中遇到问题找不到合理依据,导致临床试验质量下降^[8-9]。

如何提高伦理委员会对体外诊断试剂临床试验的审查质量,保证其顺利进行?首先,建议各伦理委员会从参与研究的实际情况出发,借鉴国内外医院伦理委员会对体外诊断试剂临床试验审查的经验,邀请在体外诊断试剂临床试验方面有经验的相关人员作为伦理委员会成员参会,并拟定出一套适合本医院开展体外诊断试剂伦理审查的操作规程;其次,建议对伦理委员会成员及医院各

层级研究人员开展体外诊断试剂临床试验相关法律法规、政策方面知识的培训,提高其对伦理方面的认识,并在审查过程中针对不同产品的特点进行不断的持续完善和改进;最后,建议伦理委员会成员全方面了解整个临床试验的流程,加强伦理审查力度,对临床试验方案中涉及的每个关键环节进行严格把关,确保临床试验的质量。

2 机构、人员方面

随着时代的变迁,我国药物临床试验机构(以下简称“机构”)在资格认定、机构建设以及监管方面都有了质的飞越,同时也推动了我国药物临床试验不断的创新发展和整体水平的提升^[10]。机构和人员是保障一个临床试验是否合规的基础,具有完整的临床试验管理机构是保障临床试验在合规下完成整个临床试验的基础;受过培训及具有专业知识和经验的研究人员是保证临床试验能顺利完成的保障。随着《医疗器械临床试验机构条件和备案管理办法》^[5]的出台,医疗器械临床试验机构管理也逐渐规范化。在法规不断完善和更新的阶段,现场核查中依然存在很多问题,常见的主要有:①参与试验的人员分工不明确,申办方和研究者作为临床试验开展的主导人员,缺乏对开展IVD临床试验的相关流程的了解,多数申办方认为只要向试验机构提供与试验相关的资料或试验所需的仪器设备等即可,试验全程未见监查员或委派的监查员对相关试验过程进行监查;②研究者对临床试验质量管理规范不熟悉,培训机制不完善,与申报方之间缺乏交流和沟通,对IVD临床试验的操作规程不熟悉,对试验IVD产品特性不了解,忽略了试验质量,不能有效规避临床试验中存在的潜在问题;③监查及临床数据记录趋于形式化,不能客观详细的反映整个试验的质控过程,直接导致临床试验质量下降。

这些问题提示申办方及临床试验机构,在临床开展过程中应加强对相关研究人员《医疗器械临床试验质量管理规范》^[4]、《体外诊断试剂临床试验技术指导原则》^[2]及相关法律法规、政策、SOP的培训,提高各类人员对IVD临床试验方面专业水平的认识,同时应注重其对科研态度的培养,试验前做到熟悉试验方案,了解产品特性,试验中做到遵循试验方案、遵守SOP,从而保证临床试验质量。

3 临床试验实施方面

IVD 临床试验的规范实施,可有效完整的保留临床试验数据。多年核查中发现,主要存在以下问题:

3.1 临床试验的方案和总结报告形式化、简单化

在部分 IVD 临床试验中,申办者与研究者之间缺乏有效沟通,未严格按照《体外诊断试剂临床试验技术指导原则》^[2]的要求制定临床试验方案及撰写临床试验报告,自从 2007 年 5 月原国家食品药品监督管理局发布《体外诊断试剂注册管理办法》后,对于如何设计 IVD 临床试验方案、且如何设计出一份优质的临床试验方案一直是 IVD 生产企业在产品注册时最头痛的问题^[10]。常见问题:①试验方案未体现临床试验具体操作方法,未明确样本选择依据、入选标准、排除和剔除标准、样本采集量、样本处理过程等相关信息,未依据不同产品的特性及说明书内容制定明确具体的操作规程;②临床试验报告未体现本次试验筛选例数、入组例数等相关信息;③样本试验数据汇总表中发现有超出线性范围的检测数据未进行相关处理,或在试验过程中比对试剂和考核试剂结果判定之间有差异的,未见采用第三方试剂进行复测和评估等,也未在试验方案中对此作出相关规定和说明;④样本试验数据汇总表对离群样本数据直接剔除,未保留相关数据;⑤临床试验方案及报告中均未阐明所用质控品、校准品来源,未见试剂的批号、规格及有效期等相关信息,或相关信息在报告和方案中前后不一致等。

3.2 监查不到位

监查与质控贯穿于整个临床试验的过程,包括申报企业的监查、机构质控、承担科室的质控^[11]。有些申报企业将临床试验工作委托给第三方(合同研究组织, CRO),但目前国内 CRO 参差不齐,部分 CRO 都将主要的精力放在了临床试验进度上,往往忽略了临床试验的质量^[12],监查人员对整个试验流程不熟悉,监查记录不能客观、完全、真实的反映出整个临床试验的过程等各种问题。常见问题:①试验报告未对样本检测情况进行监查,或只描述“试验中存在的问题”而无“问题处理结果或反馈”;②样本复测记录表显示有多个复测样本,而监查记录中却显示无复测情况;③试验开展前未进行预实验;④临床试验中预实验的样本重复利用,预实验完成后又入组正式临床试验等。

3.3 临床试验数据的记录、保存与溯源

临床试验数据是产品安全性、有效性的评价和报告依据,也是保证临床试验数据真实、可靠的依据。常见问题:①试验机构留存记录表格无法查询试验样本采样时间、样本类型、保存条件等信息;②临床实验机构存在数据记录不完整,如无相关试剂质控品的质控信息记录、试验所用仪器设备的维护使用记录等;③院方 LIS 系统中的数据与临床试验原始资料或申报资料中的数据不一致,甚至在 LIS 系统数据不可溯源等;④原始数据产生时间与记录上的试验时间相不一致,且在数量上和分析结论上与报告记录不一致,随意选择和篡改试验数据等。

在临床试验的实施方面,首先要根据法规的要求,制定科学合理的方案,方案应具备可操作性,应包含各种情况的处理方式。其次,应做好相关记录,做到关键信息记录真实、完整、可追溯。第三,监察员应承担监察责任,提供真实有效的监察记录。最后,临床试验报告应实事求是,合理总结分析。

3.4 样本的选择及要求

IVD 临床试验的临床样本的入选受其产品的预期用途、性能指标等的影响因此,方案中应规定严格的入选标准及排除标准。而申办方往往在样本入选的过程中流于形式,导致所入选的样本评价不够充分或与方案不一致^[13]。

临床试验过程中,应注重真实性、合规性、可操作性和可溯源性^[14],保证整个临床试验全过程的完整性非常必要。高质量的临床试验是“做”出来的,而不是“查”出来的。一套完整的质量控制体系对临床试验也尤为重要,是关系整个临床试验成功与否的关键,甚至直接影响临床医生作出合理的诊断^[15]。纵观整个临床试验过程,都应依照法律法规及相关政策,按照规章制度办事,遵循科学性、合理性两大基本原则,当地监管机构协助各医疗机构加强 IVD 规范化管理,是提升我国 IVD 临床试验研究与管理水平、临床试验质量的关键。

参考文献

- [1] 国家药品监督管理局. 体外诊断试剂注册管理办法, (原国家食药监总局令第5号)[EB/OL]. (2014-07-30). <https://www.nmpa.gov.cn/ylqx/ylqxfgwj/ylqxbmgzh/0140730170001489.html>.

- [2] 国家药品监督管理局. 体外诊断试剂临床试验技术指导原则(2014年第16号)[EB/OL]. (2014-09-11)<https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/ggtg/qtggtg/20140911120001840.html>.
- [3] 国家药品监督管理局, 国家卫生健康委员会. 医疗器械临床试验质量管理规范. (第5号令)[EB/OL]. (2016-03-01). <https://www.nmpa.gov.cn/directory/web/nmpa/xxgk/fgwj/bmgzh/20160323141701747.htm>.
- [4] 国家药品监督管理局, 国家卫生健康委员会. 医疗器械临床试验机构条件和备案管理办法. [EB/OL]. (2017年第145号). <https://www.nmpa.gov.cn/ylqx/ylqxggtg/ylqxqt-gg/20171124123401301.html>.
- [5] 国家药品监督管理局. 总局关于开展医疗器械临床试验监督抽查工作的通告. [EB/OL]. (2016年第98号). <https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/ggtg/qtggtg/20160608184801181.html>.
- [6] 国家药品监督管理局, 国家药监局综合司. 关于印发医疗器械临床试验检查要点及判定原则的通知. [EB/OL]. (药监综械注[2018]45号). <https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/fg-wj/gzwwj/gzwwjylqx/20181128142501830.html>
- [7] 严华成, 邓小玲, 曾小辉, 等. 我国医疗器械临床试验运行问题及对策探讨[J]. 中华医院管理杂志, 2014, 30(5): 362-365.
- [8] 王悦, 柴怡, 沈昊, 等. 医疗器械与药物临床试验的实施差异与质控对策[J]. 中国新药与临床杂志, 2016, 35(2): 114-118.
- [9] 高荣, 李见明. 我国药物临床试验机构的发展、定位和职责探讨[J]. 中国临床药理学杂志, 2012, 28(9): 714-717.
- [10] 于泳. 浅谈体外诊断试剂临床试验方案的设计[J]. 中国医疗器械信息, 2010, 16(12): 16-17+58.
- [11] 张晓燕, 王学均, 朱丹丹, 等. 医疗器械临床试验风险管理的问题及对策. 医药卫生装备, 2018, 39(3): 87-89+93.
- [12] 张正付, 吕术超, 宁靖. 我国体外诊断试剂临床试验存在的问题及分析[J]. 中国临床药理学杂志, 2012, 36(16): 2582-2586.
- [13] 付文竹, 蔡瑶. 体外诊断试剂临床评价常见问题探讨[J]. 中国医疗器械信息, 2020, 26(15): 9+149.
- [14] 齐典. 关于提高我国临床试验质量的探讨[J]. 黑龙江医药, 2014, 26(1): 985-986
- [15] 卢芳, 陈仲林, 顾广羽, 等. 对加强药物临床试验院内质量管理的探讨[J]. 中国药房, 2011, 8(15): 24-25.

(上接第 1548 页)

- [11] 盛欢, 吕伟. 轮状病毒性肠炎患儿肝功能、心肌损伤及免疫功能的变化及临床意义[J]. 哈尔滨医科大学学报, 2019, 53(1): 87-90.
- [12] 王荣花, 李娟利, 姜红, 等. 轮状病毒性肠炎患儿心肌损伤的危险因素及益生菌干预效果研究[J]. 实用心脑血管病杂志, 2019, 27(1): 57-61.
- [13] 张雷, 冯斌. 儿童RV肠炎血液电解质和心肌酶谱水平及临床意义[J]. 实验与检验医学, 2020, 38(3): 508-511.
- [14] 阮金德, 杨立彪, 廖汉杰. 关于儿童轮状病毒性肠炎合并心肌损害的影响因素分析[J]. 中国实用医药, 2020, 15(4): 50-51.

(上接第 1552 页)

- [7] Helmy H. Micropulse diode treatment in refractory neovascular glaucoma, high-energy level combined with adjunctive Ranibizumab[J]. Egyptian Retina J, 2020, 7(2): 41.
- [8] Shelankova AV, Budzinskaya MV, Plyukhova AA, et al. Analysis of changes in serum levels of endothelin-1 in patients with retinal vein occlusion [J]. Kazanski meditsinski zhurnal, 2017, 98(3): 409-412.
- [9] Al-Karagholi AM, Ghanizada H, Nielsen C, et al. Cerebrovascular effects of glibenclamide investigated using high-resolution magnetic resonance imaging in healthy volunteers [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2020, 98(3): 409-412.
- [10] 谭蔚, 张朝军, 陈伯凡, 等. 新生血管性青光眼患者血清及房水中Klotho和Endothelin-1的表达及意义[J]. 河北医药, 2020, 42(8): 70-72+76.
- [11] Kaczorowska A, Mikus N, Stefanowicz J, et al. Selected Matrix Metalloproteinases (MMP-2, MMP-7) and Their Inhibitor (TIMP-2) in Adult and Pediatric Cancer [J]. Diagnostics, 2020, 10(8): 547.
- [12] Vira HJ, Pradhan VD, Umare VD, et al. Expression of the matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 and their inhibitors TIMP-1 and TIMP-2 in systemic lupus erythematosus patients [J]. Neth J Med, 2020, 78(5): 261-269.
- [13] Wang J, Harris A, Prendes MA, et al. Targeting Transforming Growth Factor- β Signaling in Primary Open-Angle Glaucoma [J]. J Glaucoma, 2017, 26(4): 390-395.
- [14] Weinreb RN, Robinson MR, Mohammed D, et al. Matrix Metalloproteinases and Glaucoma Treatment [J]. J Ocul Pharmacol Ther, 2020, 36(4): 208-228.
- [15] Das N, Benko C, Gill SE, et al. The Pharmacological TAILS of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors [J]. Pharmaceuticals (Basel, Switzerland), 2020, 14(1): 31.
- [16] 张郎芳, 郭蕊, 刘永丽, 等. 闭角型青光眼患者红细胞免疫功能与EPO和ET-1的相关性[J]. 国际眼科杂志, 2019, 19(3): 422-425.

武汉大学中南医院检验科

武汉大学中南医院医学检验科是集临床检测、科研和教学于一体的现代化和精准化的综合性学科,是湖北省重点学科和医院优势学科,整体实力处于国内领先水平。医学检验科拥有临床检验诊断学博士点和博士后流动站,是湖北省首家设立“艾滋病确证实验室”和“基因诊断门诊”的检验学科。近5年来,科室先后荣获“全国抗击新冠肺炎疫情先进集体”、“全国先进基层党组织”、“全国创新争先奖牌”、“湖北青年五四奖章”、“湖北省科技进步二等奖”和“武汉市青年文明号”等荣誉。

1. 打造优质团队。现有各级专业技术人员 78 人,本科以上人员占 98.2%,硕士以上占 65.8%,博士占 37.0%;中级职称以上占 68.5%,高级职称占 34.6%,海外留学回国人员近 20 人,正高职称 13 人,副高职称 14 人,临床检验诊断学博士生导师 7 人、硕士生导师 10 人。多人在国家级学会担任副主委、常委和委员,还有多人担任国内外各种专业学术期刊的副主编、编委和审稿专家。

2. 高效服务能力。医学检验科下设临床免疫室、临床化学室、临床基因扩增室、临床微生物室、临床细胞遗传室、门诊与急诊快速检测室、临床基础检验室与发热门诊实验室等,集“自动化、标准化、规范化与信息化”于一体,拥有众多国际一流的自动化检测设备,如全自动细菌培养仪和鉴定仪、全自动生化分析仪、全自动免疫分析仪、多参数五分类血细胞分析仪、流式细胞分析仪、色谱分析仪、染色体分析仪、基因测序仪等,开展了包括羊水染色体检测等 500 余个检测项目。医学检验科按照 ISO15189 质量与技术的要求,建立了健全的质量管理体系,保证检验过程的规范化与标准化,并于 2017 年顺利通过了 ISO15189 实验室认可。同时引进了先进的实验室信息管理系统,使仪器、实验室信息系统、医院信息系统以及互联网无缝对接,确保检测结果能实时准确无误地传递到医生工作站或患者本人。

3. 教书育人成效。医学检验科每年承担检验系本科生、硕士生、博士生以及住院医师、进修生的培养教育工作,同时还承担八年制临床博士以及留学生的实验诊断学教学。先后共有 10 余人次担任主编或副主编、20 余人次参编了人民卫生出版社、高等教育出版社、医药卫生出版社五年制、四年制医学检验本科规划教材《临床生物化学与检验》、《临床分子生物学与检验》、《临床免疫学与检验》、《临床血液学与检验》、《临床微生物学与检验》、《临床实验室管理》和《实验诊断学》等;负责医学部或学校大创项目 3 个,建设和维护 2 项中国大学 MOOC《临床免疫学检验技术》、《实验诊断学》。

4. 学科建设积累。医学检验科在临床检测方面不断提高,一方面保持省内领先服务水平,另一方面积极开展临床转化科学研究。近 5 年来,团队主持在研国家自然科学基金 14 项,省部级科研基金 16 项,以第一作者或通讯单位在 JAMA、Lancet Infect Dis、Signal Transduct Target Ther 等期刊发表 SCI 百余篇;获“湖北省科技奖进步二等奖”1 项;近 3 年申请专利 8 项,转化 2 项;参与 33 个临床研究,多次承办国家级学术会议以及省级学术会议或学习班。

5. 未来发展规划。科室拟以分子遗传与代谢性疾病检测、肿瘤精准实验诊断和病原微生物快速精准识别三个方面作为未来学科建设的主攻方向。医学检验科全体员工将不断加强与临床科室的沟通与交流,努力探索实验医学新的诊断模式,积极促进医学检验科与临床各专业的交叉与融合,开展新的临床研究和检测项目。秉承“科学管理、诚信服务、准确及时、持续改进”的服务宗旨,服务于临床,奉献于患者,贡献于社会。



武汉大学第二临床医学院检验医学系(检验科)博士生导师队伍

杂志简介：

《分子诊断与治疗杂志》于2009年5月创刊，是由中山大学主管，《中国家庭医生》杂志社有限公司主办，广州达安基因股份有限公司承办的面向国内外公开发行的分子医学权威性刊物，也是我国第一份以分子诊断与治疗学科为主要内容的分子医学专业学术期刊。本刊以传播分子医学理念、报道分子医学前沿、倡导分子医学创新、促进分子医学进步为办刊宗旨。主要刊登我国医学分子诊断和分子治疗相关领域中的基础理论研究、临床实践和技术方法的最新研究成果以及国内分子医学新技术、新理论和新进展等方面的文章。目前有编委及审稿专家80余人。在编委会和审稿专家及编辑部的共同努力下，于2016年被收录为“中国科技核心期刊”（中国科技论文统计源期刊）。

目前有“述评”、“论著”、“综述”、“前沿进展”、“专家笔谈”、“讲座”、“动态”和“专栏”等栏目。涵盖基因诊断、免疫诊断、核酸分子诊断、蛋白分子诊断、信号分子诊断、分子影像诊断、诊断仪器应用、基因治疗、核酸分子治疗、蛋白分子治疗等内容。

