



ISSN 1674-6929

CN 44-1656/R

邮发代号: 46-283

分子诊断与治疗杂志

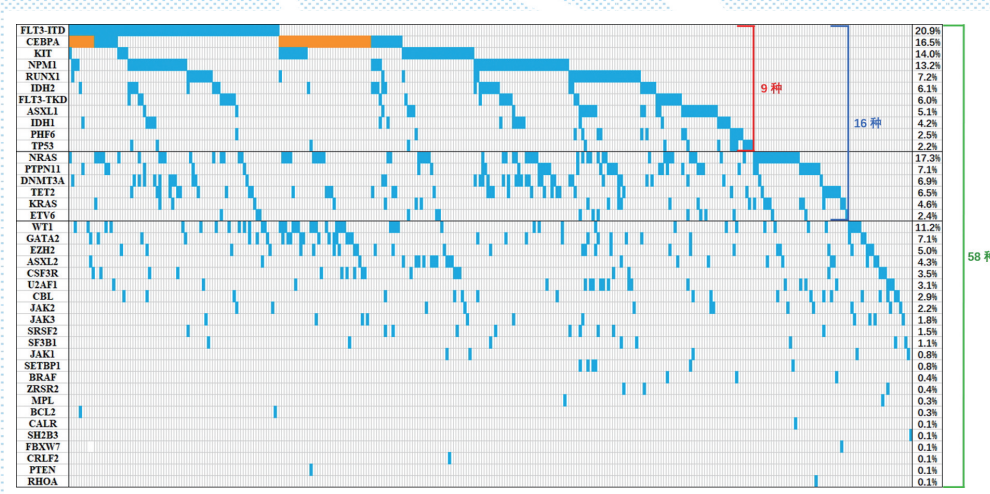
FENZI ZHENDUAN YU ZHILIAO ZAZHI

2021年2月 第13卷 第2期 总第78期

JOURNAL OF

MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Volume 13 Number 2 February 2021



图(P176) 检测9种,16种和58种突变基因患者的克隆异质性

Figure(P176) The clonal heterogeneity of patients in the testing of 9, 16, and 58 genes

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

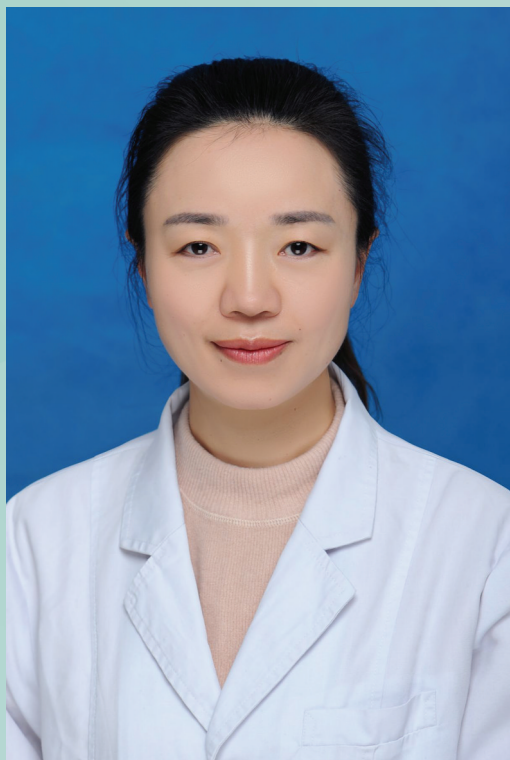


9 771674 692211

0 2>



贺静



贺静,博士,副教授,硕士生导师。现在云南省第一人民医院医学遗传科工作。是云南省技术创新人才,云南省医学学科带头人。兼任云南省医学会医学遗传学专科分会副主任委员、中华预防医学会出生缺陷预防与控制专业青年委员会委员、海医会遗传与生殖专业委员会青委会委员、中国妇幼保健协会临床诊断与实验医学分会分子诊断专业委员会委员。

主要从事遗传病发病机制的研究、遗传疾病检测、出生缺陷预防、遗传病基因诊断及产前诊断工作。近年来主要从事地中海贫血的遗传研究。对云南育龄人群的异常血红蛋白病发病率进行了调查和研究,在云南人群中除了检出云南周边省市和东南亚地区常见的异常血红蛋白类型外,还发现中国未见报道的异常血红蛋白类型,揭示出云南血红蛋白病丰富的遗传多样性与独特的地理环境相关。应用NGS技术对德宏州和西双版纳两个州傣族的进行珠蛋白基因检测,发现两个州傣族的珠蛋白基因突变类型的顺位和构成比均有显著的差异,研究首次揭示了不同地理区域的傣族人群已经出现珠蛋白基因突变谱的分化。

发表论文40多篇,其中SCI论文10多篇。参与出版论著2部、译著1部。现主持国家基金项目1项,省级研究项目3项,已经主持完成的目2项,参与的研究基金项目10多项,获得云南省科技进步一等奖、全国妇幼健康科研成果二等奖等奖项等共8项。

分子诊断与治疗杂志

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

月刊 2021 年 2 月 第 13 卷 第 2 期 总第 78 期 Bimonthly Volume 13 Number 2 February 2021

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

总编辑 张翼鹏
顾问 申子瑜
主编 李明
编辑部主任 蒋析文
编辑部副主任 刘悦
编辑部 《分子诊断与治疗杂志》编辑部
编辑 李晓兰 李彩珍 莫源浩
出版 《中国家庭医生》杂志社有限公司

地址 广州市天河区天河北路 179 号祥龙大厦 11 楼 (510620)
电话 (020) 32290789-206, 32290789-201
电子邮箱 jmdt@vip.163.com
刊号 ISSN 1674-6929
CN 44-1656/R
邮发代号 46-283
发行单位 广东省报刊发行局
发行范围 国内外公开发售
广告发布登记通知书 440100190057
印刷 天意有福科技股份有限公司
出版日期 2021 年 2 月 18 日
定价 RMB 15.00 元

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

Add 11 Fl., Xianglong Building, 179# Tian he bei Lu, Guangzhou, China 510620
Tel (020) 32290789-206, 32290789-201
E-mail jmdt@vip.163.com
CSSN ISSN 1674-6929
CN 44-1656/R
Printing TianYi Yofus Technology Co., Ltd.
Publish Date 2021.2.18
Price RMB 15.00



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



分子诊断与治疗杂志

月刊 2021年2月 第13卷 第2期

目次

述评

β -地中海贫血基因治疗的研究进展 邓玲 贺静(169)

论著

- 基因突变筛查对急性髓性白血病患者临床诊疗的获益对比分析
..... 张阳 王芳 房建成 等(174)
- 耐碳青霉烯类大肠埃希菌对替加环素异质性耐药的机制 刘宇阳 蓝锴 熊蕊 等(178)
- 胸腰椎骨质疏松性骨折患者IGFBP3、IL-17、网膜素-1与骨密度、骨代谢的关系
..... 王俊江 王红建 宋晓磊 等(183)
- 精神分裂症患者血清Cys C、TNF- α 、BDNF水平与血脂代谢的关系
..... 黄凌志 王水轮 姜振东(187)
- RRM1、PDCD-5、VEGF对非小细胞肺癌放疗后近期疗效及预测价值
..... 张昊 徐新禹 崔秀洁 等(191)
- 珠海地区353例儿童喘息性疾病病毒病原学分析 黄翩翩 邹商群 肖鸽飞 等(195)
- LPA、Hcy、MCP-1与缺血性脑卒中患者神经损伤和侧支循环的关系
..... 吴国访 张丽 张淑沛 等(199)
- BNP、Hb及FIB联合检测对孕晚期产妇产后出血的预测价值 李小芝 唐连敏 付翠芳 等(203)
- A组轮状病毒对CaCO₂和HT-29细胞NKCC1表达的影响 王洪丽 陈冠桦 黄玲 等(207)
- 荆州地区HPV-52型E7基因多态性分析和T细胞表位预测 李烁 叶梦霞 梅冰(211)
- 盐酸替罗非班联合药物洗脱支架治疗老年AMI患者的效果 蒋湘翎 项国华 李燕真(216)
- Pokemon、TIP30和HCCR-1在直肠癌组织中的表达及预后的关系研究
..... 樊丽伟 古彩喆 赵彦焕 等(220)
- 动脉粥样硬化性脑梗死血清LP-PLA₂、MMP-13与动脉狭窄程度的关系
..... 肖华 高远 李玉萍 等(225)
- LncRNA OIP5-AS1靶向miR-511-3p抑制肺癌细胞的增殖、迁移和侵袭的影响
..... 张耀森 卢国杰 钟惠铃 等(229)
- 外周血II型干扰素调节因子和T淋巴细胞与脑出血的关系研究
..... 王能强 黄桂洪 陈烨佳(234)
- TGF- β 1、TSGF及CYFRA21-1与食管癌放疗后病理缓解程度、预后的关系
..... 徐娆 唐曦 徐晓明 等(237)
- 基于生物信息学分析F2R基因在胃癌中表达与免疫浸润的临床意义
..... 陈梁玥 段怡平 柳家翠 等(242)
- Wnt-5a、Wnt-11、CaMK II在良性转归葡萄胎和恶性变葡萄胎中的表达及意义
..... 韦婵妍 黄琼华(247)

妊娠期糖尿病患者血清 FAP4、25(OH)D 水平与新生儿结局的关系	燕筠 张丽 葛郁荣(251)
慢性牙周炎龈沟液 IL-10、IL-23、MCP-1 与牙周指数的相关性分析	颜孟雄 黄婧 杨再波(255)
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	张明光 徐海军 施联善 等(259)
MMP-2、PCNA 及 Syndecan-1 与口腔黏膜鳞状细胞癌进展的关系研究	郑朝辉 刘春丽 曹瑞 等(263)
血清 FSH、IGF- I 及 BMI 对夫精人工授精助孕结局的影响	李医 孟晓楠 罗宇(267)
子痫前期孕妇血清及胎盘组织中 GRP78、P53 表达及与疾病相关性	邱光银 唐佳 张铁环 等(271)
老年骨质疏松性骨折患者血清 B-ALP、PTH、s-PINP 和 s-CTX 表达	杨帅 张红新 古雪建(276)
垂体瘤患者血清 IGF-1、IGFBP-3 水平表达及其临床意义	周相军 朱娜娜 李浩(280)
TREM-1、H2S 联合 ACE2 检测对重症急性胰腺炎预后的评估价值	董玉 闫凯 程海玲(284)
PTX3、OPG 及 Hcy 与 ACS 患者 PCI 术后支架内再次狭窄的相关性分析	雷蕾 冯杰 雷燕(288)
应激性心肌病与急性心肌梗死患者肌钙蛋白检查结果差异性	吴鹏程 王猛 张红兵 等(292)
龈沟液 SFRP1、hBD3、肿瘤坏死因子- α 在慢性牙周炎伴 Hp 感染患者中表达及临床意义	张丽媛 张鹏 马婷婷(296)
MTDH、Ets-1 及 p21WAF1 蛋白在咽喉癌组织中的表达及临床意义	张雷 贺媛 陈元星 等(300)
急性脑梗死患者外周血 miR-497 表达与炎症氧化应激的关系及对预后的预测价值	张皓春 陈忠 文泽贤 等(305)
血清 IGF-1 含量对 STEMI 患者急诊介入术后 MACE 的预测价值	信鹏程 张申伟 牛思泉 等(309)
口腔扁平苔藓患者血清 ICAM-1、VCAM-1 及 IL-17 水平与与疾病活动的相关性	陈运明(313)
PCT 与 CRP 用于经皮肾镜取石术患者术后感染诊断	赵熊 杨发武(317)
miR-20a 过表达促进 VEGF 表达及血管平滑肌细胞活性和迁移	王桂娟(320)
高频超声与 MRI 诊断儿童肘关节微小骨折的临床价值探讨	吴琴芙 黄培楷 肖梦强 等(325)
盆底 2D/4D 超声在女性前盆腔功能障碍性疾病诊断中的应用	任双丽 徐秋红 吴斯瑶 等(329)
卵巢癌中 IGF-1/IGF-1R 轴与临床病理特征及预后的相关性	朱冰 白杰 牛爱琴(333)

综 述

心理压力相关 miRNA 的研究进展	刘经健 冉凤英 罗丹 等(337)
--------------------------	-------------------

专家风采

贺静	(封二)
----------	------

实验室巡礼

云南省第一人民医院医学遗传科简介	(封三)
------------------------	------

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Monthly Volume 13 Number 2 February 2021

CONTENTS

COMMENTS

Research Progress in Gene Therapy for β -thalassemia

DENG Ling, HE Jing (169)

ORIGINAL ARTICLES

Comparative analysis of the benefit of gene mutation screening in clinical diagnosis and treatment of patients with acute myeloid leukemia

ZHANG Yang, WANG Fang, FANG Jiancheng, WANG Mingyu, LIU Hong, XU Wen, CHEN Xue, CAO Panxiang, YU Yafei, MA Xiaoli, LI Mianyang, LIU Hongxing (174)

Mechanisms of Tigecycline Heteroresistance in Carbapenem-Resistant *Escherichia coli*

LIU Yuyang, LAN Kai, XIONG Rui, LU Yang, CAI Yimei, XIANG Guoxiu, CHEN Cha, HUANG Bin (178)

Relationship between IGFBP3, IL-17, Omentin-1 and bone mineral density and bone metabolism in patients with thoracolumbar osteoporotic fractures

WANG Junjiang, WANG Hongjian, SONG Xiaolei, DING Junqing, YUAN Weijie, SANG Zhenfei, LI Yuqi, ZHANG Bin (183)

The relationship between serum Cys C, TNF- α , BDNF levels and blood lipid metabolism in patients with schizophrenia

HUANG Lingzhi, WANG Shuilun, JIANG Zhendong (187)

Short-term efficacy and predictive value of RRM1, PDCD-5 and VEGF expression in non-small cell lung cancers after radiotherapy

ZHANG Hao, XU Xinyu, CUI Xiujie, GUO Yuhua (191)

Analysis of the virus etiology of 353 children with wheezing disease in Zhuhai area

HUANG Pianpian, ZOU Shangqun, XIAO Gefei, JIA Xiaoyun, TAO Weijing, DAI Qiqiang (195)

Relationship between LPA, Hcy and MCP-1 and neurological injury and collateral circulation in patients with ischemic stroke

WU Guofang, ZHANG Li, ZHANG Shupai, DUAN Hongxia, YI Zhenghui (199)

Predictive value of the combined detection of BNP, Hb and FIB for postpartum hemorrhage of women in their third trimester

LI Xiaozhi, TANG Lianmin, FU Cuifang, XUE Yun, YAO Liyun (203)

Effects of human rotavirus A on NKCC1 expression in CaCO₂ and HT-29 cells

WANG Hongli, CHEN Guanhua, HUANG Ling, YANG Fangying, XU Wanfu (207)

Analysis of HPV-52 E7 gene polymorphism and T cell epitope prediction in Hubei Jingzhou area

LI Shuo, YE Mengxia, MEI Bing (211)

Effects of tirofiban hydrochloride combined with drug eluting stent in the treatment of elderly patients with AMI

JIANG Xiangling, XU Guohua, LI Yanzhen (216)

Expression of Pokemon, TIP30 and HCCR-1 in rectal cancer and their relationship with prognosis

FAN Liwei, GU Caizhe, ZHAO Yanhuan, LI Xun, FU Xiaoxia, ZHANG Lei, WANG Jingkun, ZHANG Dongjiao (220)

The relationship between serum LP-PLA2, MMP-13 and the degree of arterial stenosis in patients with atherosclerotic cerebral infarction

XIAO Hua, GAO Yuan, LI Yuping, GUO Yuanli (225)

LncRNA OIP5-AS1 targeting miR-511-3p inhibits the proliferation, migration and invasion of lung cancer cells

ZHANG Yaosen, LU Guojie, ZHONG Huiling, GAO Jianwei, CHEN Yayong, HU Ruijuan (229)

Study on the relationship between type II interferon regulatory factor and T lymphocytes in peripheral blood and cerebral hemorrhage

WANG Nengqiang, HUANG Guihong, CHEN Yejia (234)

Relationship between the TGF- β 1, TSGF and CYFRA21-1 levels and pathological remission and prognosis of patients with esophageal cancer after radiotherapy

XU Rao, TANG Xi, XU Xiaoming, XU Yanhua (237)

Clinical Significance of <i>F2R</i> Gene Expression and Immune Infiltration in Gastric Cancer Based on Bioinformatics Analysis	
<i>CHEN Liangyue, DUAN Yiping, LIU Jiawei, MA Tiantian, ZHU Cuiwen, ZOU Xiaofeng</i>	(242)
The expression and significance of Wnt-5a, Wnt-11 and CaMK II in hydatidiform mole of benign outcomes and malignant lesions	
<i>WEI Chanyan, HUANG Qionghua</i>	(247)
The relationship between serum FAP4 and 25 (OH) D levels with neonatal outcome in patients with gestational diabetes mellitus	
<i>YAN Jun, ZHANG Li, GE Yurong</i>	(251)
Correlation analysis of gingival crevicular fluid IL-10, IL-23 and MCP-1 and periodontal indexes in chronic periodontitis	
<i>YAN Mengxiang, HUANG Jing, YANG Zaibao</i>	(255)
Predictive value of combined detection factors based on logistic regression model for non-small cell lung cancer EGFR mutation status	
<i>ZHANG Mingguang, XU Haijun, SHI Lianshan, ZHANG Hui</i>	(259)
Study on the relationship between MMP-2, PCNA, Syndecan-1 and the progression of oral squamous cell carcinoma	
<i>ZHENG Chaohui, LIN Chunli, CAO Rui, HAO Lihui</i>	(263)
Effects of serum FSH, IGF- I and BMI on the outcome of artificial insemination of husband's sperm	
<i>LI Yi, MENG Xiaonan, LUO Yu</i>	(267)
Expression of GRP78 and P53 in Serum and Placental Tissues of Pregnant Women with Preeclampsia and the Correlation Analysis	
<i>QIU Guangyin, TANG Jia, ZHANG Tiehuan, LI Dengke, ZHENG Zhaoping</i>	(271)
The serum levels of B-ALP, PTH, s-PINP and s-CTX in elderly patients with osteoporotic fractures	
<i>YANG Shuai, ZHANG Hongxin, GU Xuejian</i>	(276)
Clinical significance of serum IGF-1 and IGFBP-3 levels in patients with pituitary tumors	
<i>ZHOU Xiangjun, ZHU Nana, LI Hao</i>	(280)
The value of TREM-1, H2S combined with ACE2 in the prognosis of severe acute pancreatitis	
<i>DONG Yu, YAN Kai, CHENG Hailing</i>	(284)
Correlation between PTX3, OPG, Hcy and in-stent re-stenosis of patients with acute coronary syndrome after percutaneous coronary intervention	
<i>LEI Lei, FENG Jie, LEI Yan</i>	(288)
Difference of troponin test results between patients with stress cardiomyopathy and acute myocardial infarction	
<i>WU Pengcheng, WANG Meng, ZHANG Hongbing, JIANG Conghui, HUANG Cheng</i>	(292)
The expression and clinical significance of gingival crevicular fluid SFRP1, hBD3 and tumor necrosis factor- α in patients with chronic periodontitis with Hp infection	
<i>ZHANG Liyuan, ZHANG Peng, MA Tingting</i>	(296)
The expression and clinical significance of MTDH, Ets-1 and p21WAF1 proteins in pharyngeal carcinoma	
<i>ZHANG Lei, HE Yuan, CHEN Yuanxing, LIU Fang, DAI Xin</i>	(300)
Relationship between mir-497 expression and inflammatory oxidative stress in patients with acute cerebral infarction and its prognostic value	
<i>ZHANG Haochun, CHEN Zhong, WEN Zexian, LIU Chunping, LIU Yuee, PU Guoming, LIU Sujun, LI Yuan</i>	(305)
Predictive value of serum IGF-1 contents on major adverse cardiovascular events after emergency intervention in STEMI patients	
<i>XIN Pengcheng, ZHANG Shenwei, NIU Siqian, XU Liang, ZHA Yujie</i>	(309)
Study on the correlation between serum ICAM-1, VCAM-1 and IL-17 levels and disease activity in patients with oral lichen planus	
<i>CHEN Yunming</i>	(313)
PCT and CRP for postoperative infection diagnosis of patients undergoing percutaneous nephrolithotomy	
<i>ZHAO Xiong, YANG Fawu</i>	(317)
Overexpression of miR-20a promotes VEGF expression and vascular smooth muscle cell activity and migration	
<i>WANG Guijuan</i>	(320)
The clinical value of high frequency ultrasound and MRI in the diagnosis of microfracture of the elbow joint in children	
<i>WU Qinfu, HUANG Peikai, XIAO Mengqiang, LI Wenjin</i>	(325)
Application of pelvic floor 2D/4D ultrasound in the diagnosis of female anterior pelvic functional disorders	
<i>REN Shuangli, XU Qiuqiong, WU Siyao, GUO Hongmei, CHEN Qiuyan, ZHU Hexiang</i>	(329)
Correlation of IGF-1/IGF-1R axis in ovarian cancer with clinicopathological features and prognosis	
<i>ZHU Bing, BAI Jie, NIU Aiqin</i>	(333)

REVIEWS

Progress on miRNA related to psychological stress	
<i>LIU Jingjian, RAN Fengying, LUO Dan, LI Chunlei, WU Lun, CHEN Qinhua</i>	(337)

• 述 评 •

β-地中海贫血基因治疗的研究进展

邓玲 贺静*

[摘要] β-地中海贫血(β-地贫)是比较常见的遗传性血液病。近年来随着基因治疗的快速发展,β-地贫的基因治疗也取得了显著进展。β-地贫的基因治疗主要集中在β-珠蛋白基因(*HBB*)和γ-珠蛋白基因(*HBG*)。一方面通过对*HBB*基因进行原位修复或导入正常外源基因来增加β-珠蛋白表达;另一方面通过基因编辑来抑制γ-珠蛋白阻遏物(如*BCL11A*)的表达,重新诱导胎儿血红蛋白(HbF)产生。本文将对β-地贫基因治疗的最新研究进展进行概述。

[关键词] β-地中海贫血;基因治疗;基因编辑

Research Progress in Gene Therapy for β-thalassemia

DENG Ling, HE Jing*

(1. Meicical School & Affiliated Hospital, Kunming University of Science and Technology, Kunming, Yunnan, China, 650032; 2. Department of Medical Genetics, the First People's Hospital of Yunnan, Kunming, Yunnan, China, 650032)

[ABSTRACT] Thalassemia is the most common inherited blood disorders globally. With the development of gene therapy techniques, gene therapy of β-thalassemia has also made remarkable progress in recent years, which mainly focuses on the β-globin (*HBB*) genes or γ-globin genes. This can be reached by increasing the expression of β-globin by in situ gene correction of *HBB* or delivery of a exogenous normal gene, or inhibiting the expression of γ-globin gene repressors by gene editing to induce the reexpression of fetal haemoglobin. In this paper, we will review the recent research progress in gene therapy of β-thalassemia.

[KEY WORDS] β-thalassemia; Gene therapy; Gene editing

β-地贫是遗传性血液病,由β-珠蛋白基因(hemoglobin subunit beta, *HBB*),发生突变引起,是全球最常见的单基因疾病。*HBB*基因编码成人血红蛋白(adult hemoglobin, HbA)的β亚基,*HBB*基因突变可消除或减少β-珠蛋白的合成,从而导致无效的红细胞生成,进而导致慢性溶血和严重贫血^[1]。β-地贫根据病情轻重,可以分为三类:轻度、中度和重度。通常情况下,轻度地贫无需特殊治疗。中度和重度地贫主要采取以下方式:除铁治疗、输血治疗、骨髓造血干细胞异体移植、脾切除

手术等^[2]。其中,异体造血干细胞移植是根治地贫的方法,但费用巨大,且配型极其困难;其他方法只能够维持地贫患者生命,同样给家庭带来极大经济负担,且需消耗大量血液资源,患者生活质量极低,不能从源头上根治该疾病。近年来,基因编辑技术已被应用于基因治疗β-地贫的多项相关研究中,它通过插入、缺失或替换的手段对基因组进行靶向编辑,能让正常基因替换突变基因,代替有缺陷的β-珠蛋白;或重新开启γ-珠蛋白基因(hemoglobin subunit gamma, *HBG*)的表达,使γ-珠蛋白

基金项目:云南省技术创新人才培养项目(2019HB071);云南省科技厅-昆明医科大学应用基础研究联合专项资金项目(2018FE001(-111));云南省临床医学中心开放项目(2019LCZXKF-XY04)

作者单位:1.昆明理工大学医学院&附属医院,云南,昆明,650032

2.云南省第一人民医院医学遗传科,云南,昆明,650032

*通信作者:贺静, E-mail: Hejing1211@163.com

增加,这样就可以结合患者红细胞中过多的 α -珠蛋白链,缓解 β -地贫患者的贫血程度。因此基因编辑技术很有可能成为缓解甚至治愈 β -地贫的治疗方法。目前,针对 β -地贫的基因治疗策略主要分为两种,慢病毒介导的基因转移和基于

基因编辑技术的策略。这两种策略都是通过递送具有正常生物学功能的 *HBB* 基因或基因编辑后的基因至患者的造血干细胞(hematopoietic stem cell, HSC),代替突变的 *HBB* 基因完成工作(图1)。

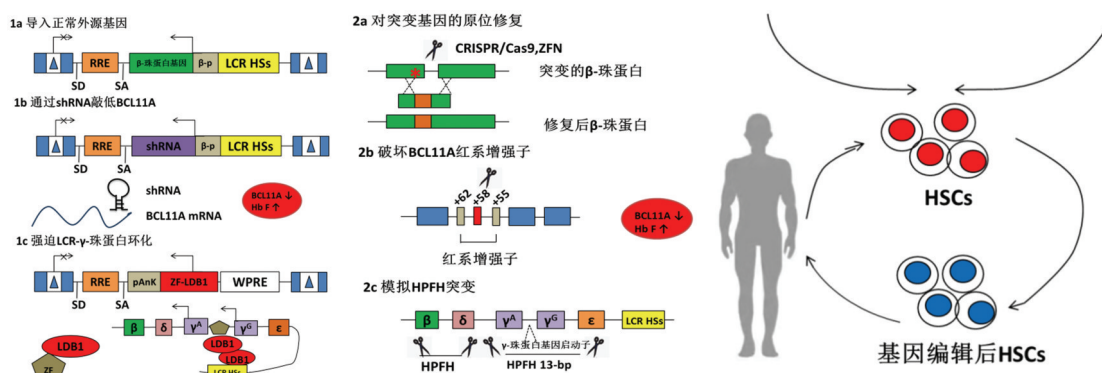


图1 β -地中海贫血基因治疗方法^[3]

Figure 1 Therapeutic Approaches for β -thalassemia^[3]

1 病毒载体介导的基因治疗

病毒载体介导的基因转移系统是目前使用最多的,常用的病毒载体包括逆转录病毒(retro virus, RV)、慢病毒(lentivirus, LV)和腺相关病毒(adenovirus associated virus, AAV)^[4]。但是逆转录病毒载体存在一定的局限性和安全隐患,而腺相关病毒载体虽然安全性有所提高但不能包装较大的DNA。慢病毒载体可以稳定携带较大的基因如 *HBB* 基因,具有将复杂的基因结构转移到静止的造血干细胞中的能力,并且制备简单、安全性较好,因此慢病毒载体是目前 β -地贫患者基因治疗最有效的基因治疗转移载体,它为 β -地贫的基因治疗提供了可行性。

1.1 通过导入正常外源基因使体内产生正常的 β -珠蛋白

通过将功能正常的 *HBB* 基因有效的导入患者的HSCs中,使患者体内产生正常的 β -珠蛋白,从而改善 β -地贫患者的临床症状。2016年, Negre等^[5]发现在 β -地贫患者中通过慢病毒转移有标记的 β -珠蛋白(β^{A-T87Q})基因进行的基因治疗可替代长期输血。2018年, Thompson等^[6]的研究中,在输血依赖型 β -地中海贫血(Transfusion-Dependent β -Thalassemia, TDT)患者身上获得了自体CD34⁺细胞,在体外应用 LentiGlobin BB305 载体编码携带T87Q这一氨基酸取代的成人血红蛋白(HbA^{T87Q})。经转导和HSCs移植,患者体内

HbA^{T87Q}在26个月后逐步增加并稳定表达,其中3例 β^0/β^0 患者已停止输血,年平均输血量减少73%。这项临床试验的结果提示细胞基因治疗可能是地中海贫血治疗领域的发展趋势。

1.2 通过 shRNA 敲低 *BCL11A* 重新激活 *HBB* 基因表达

HbF的构成为 $\alpha_2\gamma_2$,编码 γ -珠蛋白的 *HBB* 基因在胎儿出生后逐渐关闭表达^[7]。重新激活患者体内 *HBB* 基因的表达,是治疗或缓解地贫的一个重要策略^[8]。*HBB* 基因表达受多种调控元件调控,其中转录抑制因子 *BCL11A* 是影响其表达的重要因素^[9]。但 *BCL11A* 在造血干细胞和祖细胞中的普遍敲除会损害移植后的造血重建。因此对 *BCL11A* 的红细胞特异性敲除可以避免移植造血干细胞的毒性^[10]。Brendel等^[11-12]将 shRNA(short hairpin RNA)嵌入 microRNA(shRNA^{miR})中,并将其与 *HBB* 基因启动子以及仅在红细胞前体中起作用的调节元件连接在一起,最后将其插入经过改造的慢病毒载体中。该研究表明,这种使 *BCL11A* 沉默的基因疗法既可促使 *HBB* 基因的重新激活,增加HbF的表达水平,又可抑制镰状血红蛋白的表达。然而,红系谱系中 *BCL11A* 在B淋巴细胞和造血干细胞的发育中起着至关重要的作用, *BCL11A* 的完全失活会对人类红细胞的去核产生不利影响。相比之下,破坏 *BCL11A* 红系增强子中双等位基因上的 GATAA 序列不会对去核产生负

面影响^[10]。因此,目前针对 *BCL11A* 基因调控的研究,主要集中在它的红系增强子上,以提供一种安全的治疗方法。

1.3 通过改变 β -珠蛋白基因座的染色质结构重新激活 *HBG* 基因表达

β -珠蛋白基因座的主要转录增强子,称为座位调控区(locus control region, LCR),由多个红系特异性 DNase I 超敏位点组成^[2]。在红系细胞中,LCR 以发育阶段特异性方式接触类 β -珠蛋白基因以刺激转录。通过染色质环化与 *HBG* 基因相互作用,这一过程需要蛋白质 LDB1 的介导^[13]。在成人红系细胞中,通过人工锌指蛋白将 LDB1 连接到 *HBG* 基因启动子,这种方法诱使 LCR 与 *HBG* 基因启动子之间形成了一个环,最终重新激活了内源性 γ -珠蛋白的表达,同时降低了镰状血红蛋白的水平^[14]。驱动染色质环化可以控制珠蛋白基因转录的平衡,尽管此方法目前只在小鼠和成人红系细胞中进行了研究,但提供了一种新的方法进行基因治疗。目前还需进行临床前的体内研究,探讨这种策略在人体体内的安全性和特异性。

2 基因编辑技术介导的基因治疗

在过去的几十年里,基因组编辑技术的发展已经可以在体外和体内对许多不同的细胞类型进行靶向修饰,并已开发出了多种基因编辑工具,包括锌指核酸酶(zinc finger nuclease, ZFN)、转录激活样效应因子核酸酶(transcription activator-like effector nuclease, TALEN)和成簇的规律间隔的短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)/CRISPR 相关蛋白(CRISPR-associated proteins, Cas)系统^[15]。基因编辑通过人工核酸内切酶精确靶向诱导 DNA 双链断裂(DNA double-strand breaks, DSBs),激活细胞启动两种天然修复机制:同源重组修复(homology-directed repair, HDR)或非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ),对 DSBs 进行修复^[16]。

NHEJ 是一个高效的修复系统,在修复过程中能够在 DSBs 位点产生碱基随机插入或缺失,最终引起蛋白质翻译的提前终止,从而抑制基因功能,实现目的基因的敲除。而 HDR 是一种高保真的修复机制,使用同源 DNA 作为修复模板,供体中的外源目的基因会通过同源重组过程完整的整合到靶位点,实现突变基因的校正^[17-18]。虽然 NHEJ

介导的编辑效率比 HDR 介导的编辑效率高,但 HDR 修复方法可以实现精准的 DNA 编辑。

2.1 对突变基因的原位修复

与慢病毒介导的基因疗法相似,基因编辑可用于对 β -地贫患者的离体 HSC 进行体外校正,以治疗 β -地贫。理想情况下,可以通过 HDR 对 HSC 中的 *HBB* 基因进行校正,从而产生健康的红细胞。Patsali 等^[19]针对 β -地贫中剪接异常进行了修复,通过破坏异常调控元件(disruption of aberrant regulatory elements, DARE)的方式,使用 CRISPR/Cas9 和 TALEN 工具对 *HBB* 基因上的 IVS-I-110 (G>A)突变进行了修复。此外 Xu 等^[20]分别使用 CRISPR/Cas9 和 Cas12a 对 β -地贫中常见的 *HBB* IVS-I-110 (G>A)和 IVS-2-256 (C>T)突变进行基因编辑,结果显示编辑过的患者造血干细胞的红系后代显示异常剪接的逆转和 β -珠蛋白表达的恢复。

对于外显子突变需要精确修复才能恢复基因的正常功能。Liu 等^[21]修复了 β -地贫患者诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cell, iPSC)中 CD41/42 (-TCTT)突变,经编辑后的细胞有 *HBB* mRNA 的表达。而 Wattanapanitch 等^[22]利用 CRISPR/Cas9 系统靶向修复了 HbE/ β -地贫患者来源的 iPSC 中的 CD26 (G>A)突变,但是研究发现 *HBB* mRNA 和 β -珠蛋白含量无明显上升,推测可能是由 *HBB* 基因表达需要的转录因子如 *BCL11A* 水平低而引起的。因此对于修复是否成功需要考虑到修复后的基因能否转录出正常的 mRNA,并且翻译后能否产生正常的蛋白质。

针对像 β -地贫这种主要由单碱基突变引起的遗传性疾病,除了用 CRISPR/Cas9 技术进行原位修复外还可以通过单碱基编辑技术(base editors, BEs)对突变进行精确修复。Zeng 等^[23]对 *HBB* 基因上的-28 (A>G)突变进行了单碱基编辑,结果显示有 36.4%的突变实现了精确修复,虽然单碱基编辑介导的精确修复效率还需进一步提高,但是分化后的红细胞体积和形态都恢复至接近健康水平。该项研究表明单碱基编辑技术在造血干细胞的基因治疗应用中的巨大潜力,可以为 β -地贫的临床治疗提供新的解决方案。

2.2 编辑 γ -珠蛋白阻遏物激活 HbF 表达

Canver 等^[24]发现 *BCL11A* 上的红系增强子可作为 HbF 重新产生的作用靶点。Wu 等^[25]研究表明通过 CRISPR/Cas9 基因编辑技术编辑 β -地

贫和镰刀状贫血患者 HSC 中的 BCL11A 增强子的 DNase I 超敏位点+58,并进行自体 HSC 移植,可以使得体内分化产生具有高比例 HbF 及正常功能血红蛋白的红细胞,表明 CRISPR/Cas9 介导的基因编辑技术有望治愈由 β -珠蛋白突变引发的遗传疾病。

2.3 编辑 HBG 基因阻遏物结合位点模拟 HPFH 突变

遗传性胎儿血红蛋白增高症 (Hereditary persistence of fetal hemoglobin, HPFH) 是一种良性血红蛋白病,该病的发生是由于基因缺陷使 HBG 基因在成年期都持续表达的结果^[26]。Martyn 等^[27]研究发现,HPFH 是由 HBG 基因转录起始点上游约 115 bp 和 200 bp 处的点突变引起的,突变破坏了转录抑制因子 (BCL11A 和 ZBTB7A) 与启动子的结合,从而使 HBG 基因表达。Wang 等^[28]采用基因编辑技术模拟 HBG 启动子区 13 bp 缺失和 -114C>T 这 2 种 HPFH 中存在的突变,破坏了 BCL11A 结合域,从而解除对 HBG 表达的抑制,恢复 HbF 水平,以达到治疗效果。此外,研究人员利用单碱基编辑技术直接作用于 HBG 基因启动子区,使 -114 和 -115 位点的 C 突变为 T,重新激活 HbF 的表达。在 Humbert 等^[29]使用非人灵长类动物模型,利用 CRISPR-Cas9 技术将相关基因修饰引入到特定的造血干细胞和祖细胞 (hematopoietic stem and progenitor cells, HSPCs) 亚群中,编辑后的细胞有效且稳定地重新激活了 HbF,对治疗 6 个月后的骨髓样本分析发现具有分化成完整的血细胞的功能。在一年半的监测期间没有发现对成熟血细胞有不利的影响。

3 β -地贫基因治疗的临床应用

近年来随着技术的快速发展, β -地贫的基因治疗临床应用也取得了显著进展。2019 年慢病毒基因疗法 Zynteglo, 获得欧盟批准上市,这是全球首个获批用于治疗 β -地贫的基因疗法^[30]。2020 年 Zynteglo 在德国推出上市,这是该疗法的首次商用。Zynteglo 通过用 BB305 慢病毒载体转导自体 CD34⁺ 细胞,将修饰的 β -珠蛋白基因的功能性拷贝添加到患者的 HSC 中旨在纠正 TDT 患者红系细胞中 β/α -珠蛋白平衡。Zynteglo 在欧盟的批准下进行多项临床试验,在这些临床试验中,高达 75%~80% 的患者摆脱了对输血的依赖,已有患者近 6 年没有接受输血,和过去频繁的输血相比,是

一个重大进步。但 2021 年 2 月,该临床试验已暂停,原因是曾经参加此临床试验的两名患者被诊断为急性髓细胞白血病和骨髓增生异常综合征^[31]。虽然目前还不能明确这一症状与慢病毒基因疗法的关系,但是对于基因疗法的安全性问题至关重要,对临床试验必须要长期持续监测患者的安全性。

目前已经用于临床试验的 CTX001 是针对患有严重 β -地贫患者采用 CRISPR 基因编辑技术的造血干细胞疗法。CTX001 通过剪切 BCL11A 基因来促进 HbF 的产生从而实现治疗目的。该方法从患者体内分离出造血干细胞,在体外进行编辑,然后再回输到患者体内。2020 年,Frangoul 等^[32]报道的一例 β -地贫患者在接受 CTX001 治疗后,临床效果较好。在接受 CTX001 治疗后,患者的 HbF 在入组临床试验时只有 0.3 g/dL,治疗后 3 个月后就升到 8.4 g/dL,18 个月时就升到 13.1 g/dL。在 21.5 个月的随访期内,再也没有进行过输血。在该研究中,CTX001 对 β -地贫体现了出色的治疗效果,整体安全性比较好,虽然随访时间还不够长,但这已经让“一次性治愈”初现希望。

4 结语与展望

地贫是全球分布最广、累计人数最多的一种单基因遗传病,主要发生在地中海沿岸国家和东南亚各国。全世界每年约有 34 万名患有严重血红蛋白病的儿童出生,其中 90% 在发展中国家和低收入国家,给国家带来了巨大的公共卫生负担^[33]。在我国,地中海贫血基因携带者高达 3 000 万人,中重型地中海贫血病患者达 30 万人,当前 TDT 患者仍然有巨大的未被满足的医疗需求^[34]。经过多年的研究, β -地中海贫血的治疗新纪元已经开始, β -地贫是非常理想的基因治疗适应症。针对不同的基因治疗策略,必须在效率、功效和安全性方面进行比较,以便为 β -地中海贫血患者提供最佳的治疗选择。

参考文献

- [1] Shang X, Xu X. Update in the genetics of thalassemia: What clinicians need to know [J]. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2017, 39:3-15.
- [2] 徐湘民主编. 地中海贫血预防控制操作指南 [M]. 北京:人民军医出版社, 2011.
- [3] Cavazzana M, Antoniani C, Miccio A. Gene Therapy for β -Hemoglobinopathies [J]. Molecular Therapy, 2017, 25(5): 1142-1154.

- [4] 周丽娟,王京春,高宏斌,赵东平. 单基因遗传疾病的基因疗法[J]. 科技导报, 2020,38(15):89-100.
- [5] Negre O, Eggimann AV, Beuzard Y, et al. Gene Therapy of the β -Hemoglobinopathies by Lentiviral Transfer of the β (A (T87Q))-Globin Gene [J]. Hum Gene Ther, 2016, 27(2): 148-165.
- [6] Thompson AA, Walters MC, Kwiatkowski J, et al. Gene Therapy in Patients with Transfusion-Dependent beta-Thalassemia [J]. N Engl J Med, 2018, 378(16):1479-1493.
- [7] Thein SL. Molecular basis of β thalassemia and potential therapeutic targets [J]. Blood Cells Mol Dis, 2018, 70:54-65.
- [8] 鞠君毅,赵权. γ -珠蛋白基因表达调控机制与临床应用[J]. 遗传, 2018,40(6):429-444.
- [9] Bauer DE, Orkin SH. Hemoglobin switching's surprise: the versatile transcription factor BCL11A is a master repressor of fetal hemoglobin [J]. Curr Opin Genet Dev, 2015, 33:62-70.
- [10] Chang KH, Smith SE, Sullivan T, et al. Long-Term Engraftment and Fetal Globin Induction upon BCL11A Gene Editing in Bone-Marrow-Derived CD34(+) Hematopoietic Stem and Progenitor Cells [J]. Mol Ther Methods Clin Dev, 2017, 4: 137-148.
- [11] Brendel C, Guda S, Renella R, et al. Lineage - specific BCL11A knockdown circumvents toxicities and reverses sickle phenotype [J]. J Clin Invest, 2016, 126(10):3868-3878.
- [12] Brendel C, Negre O, Rothe M, et al. Preclinical Evaluation of a Novel Lentiviral Vector Driving Lineage - Specific BCL11A Knockdown for Sickle Cell Gene Therapy [J]. Mol Ther Methods Clin Dev, 2020, 17:589-600.
- [13] Deng W, Rupon JW, Krivega I, et al. Reactivation of developmentally silenced globin genes by forced chromatin looping [J]. Cell, 2014, 158(4):849-860.
- [14] Breda L, Motta I, Lourenco S, et al. Forced chromatin looping raises fetal hemoglobin in adult sickle cells to higher levels than pharmacologic inducers [J]. Blood, 2016, 128(8):1139-1143.
- [15] McNutt M. Breakthrough to genome editing [J]. Science, 2015, 350(6267):1445.
- [16] Gammon K. Gene therapy: editorial control [J]. Nature, 2014, 515(7526):S11-13.
- [17] Chang HHY, Pannunzio NR, Adachi N, et al. Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2017, 18(8): 495-506.
- [18] 杨鑫宇,王大勇,高旭. 基因编辑技术和细胞疗法在体外基因治疗中的应用 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2020, 36(11):1265-1272.
- [19] Patsali P, Mussolino C, Ladas P, et al. The Scope for Thalassemia Gene Therapy by Disruption of Aberrant Regulatory Elements [J]. J Clin Med, 2019, 8(11).
- [20] Xu S, Luk K, Yao Q, et al. Editing aberrant splice sites efficiently restores beta-globin expression in beta-thalassemia [J]. Blood, 2019, 133(21):2255-2262.
- [21] Liu Y, Yang Y, Kang X, et al. One-Step Biallelic and Scarless Correction of a beta-Thalassemia Mutation in Patient-Specific iPSCs without Drug Selection [J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2017, 6:57-67.
- [22] Wattanapanitch M, Damkham N, Potirat P, et al. One-step genetic correction of hemoglobin E/beta-thalassemia patient-derived iPSCs by the CRISPR/Cas9 system [J]. Stem Cell Res Ther, 2018, 9(1):46.
- [23] Zeng J, Wu Y, Ren C, et al. Therapeutic base editing of human hematopoietic stem cells [J]. Nat Med, 2020, 26(4):535-541.
- [24] Canver MC, Smith EC, Sher F, et al. BCL11A enhancer dissection by Cas9-mediated in situ saturating mutagenesis [J]. Nature, 2015, 527(7577):192-197.
- [25] Wu Y, Zeng J, Roscoe BP, et al. Highly efficient therapeutic gene editing of human hematopoietic stem cells [J]. Nat Med, 2019, 25(5):776-783.
- [26] Wienert B, Martyn GE, Funnell APW, et al. Wake-up Sleepy Gene: Reactivating Fetal Globin for β -Hemoglobinopathies [J]. Trends Genet, 2018, 34(12):927-940.
- [27] Martyn GE, Wienert B, Yang L, et al. Natural regulatory mutations elevate the fetal globin gene via disruption of BCL11A or ZBTB7A binding [J]. Nat Genet, 2018, 50(4):498-503.
- [28] Wang L, Li L, Ma Y, et al. Reactivation of γ -globin expression through Cas9 or base editor to treat β -hemoglobinopathies [J]. Cell Res, 2020, 30(3):276-278.
- [29] Humbert O, Radtke S, Samuelson C, et al. Therapeutically relevant engraftment of a CRISPR-Cas9-edited HSC-enriched population with HbF reactivation in nonhuman primates [J]. Sci Transl Med, 2019, 11(503).
- [30] Schuessler-Lenz M, Enzmann H, Vamvakas S. Regulators' Advice Can Make a Difference: European Medicines Agency Approval of Zynteglo for Beta Thalassemia [J]. Clin Pharmacol Ther, 2020, 107(3):492-494.
- [31] bluebird bio. bluebird bio Announces Temporary Suspension on Phase 1/2 and Phase 3 Studies of LentiGlobin Gene Therapy for Sickle Cell Disease (bb1111) [EB/OL]. <https://stockhouse.com/news/press-releases/2021/02/16/bluebird-bio-announces-temporary-suspension-on-phase-1-2-and-phase-3-studies-of-2021-2-16>.
- [32] Frangoul H, Altshuler D, Cappellini MD, et al. CRISPR-Cas9 Gene Editing for Sickle Cell Disease and beta-Thalassemia [J]. N Engl J Med, 2020.
- [33] Williams TN, Weatherall DJ. World distribution, population genetics, and health burden of the hemoglobinopathies [J]. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012, 2(9):a011692.
- [34] 北京天使妈妈慈善基金会, 中华思源工程扶贫基金会, 北京师范大学中国公益研究院编著. 中国地中海贫血蓝皮书 [M]. 北京: 中国社会科学出版社, 2016.

基因突变筛查对急性髓性白血病患者临床诊疗的获益对比分析

张阳¹ 王芳¹ 房建成¹ 王明宇¹ 刘洪¹ 徐雯¹ 陈雪¹ 曹泮翔¹ 虞亚菲²
马小丽¹ 李绵洋² 刘红星^{1,3,4*}

【摘要】目的 对比分析三种包含不同基因数目基因突变筛查在急性髓性白血病(AML)患者中的应用及帮助临床诊疗获益的情况。**方法** 采用靶向扩增子高通量测序方法,对721例初诊AML患者分别进行包括了9种、16种和58种基因的突变检测。**结果** 筛查9种、16种和58种基因的突变阳性率分别为66.2%、79.6%和86.4%;分别有23.2%、39.4%和56.3%的患者携带两种及以上基因突变;分别检出66种、186种和329种不同的突变组合。相比于只检测9种、16种基因指标,检测58种基因总体上能为62.4%、37.9%的患者提供更多的临床诊疗和预后判断方面的信息。**结论** 全面的基因突变筛查有助于更加全面的评估病情,本研究为基因突变筛查方案的选择提供了有意义的量化参考信息。

【关键词】 基因突变;急性髓性白血病;临床获益

Comparative analysis of the benefit of gene mutation screening in clinical diagnosis and treatment of patients with acute myeloid leukemia

ZHANG Yang¹, WANG Fang¹, FANG Jiancheng¹, WANG Mingyu¹, LIU Hong¹, XU Wen¹, CHEN Xue¹, CAO Panxiang¹, YU Yafei², MA Xiaoli¹, LI Mianyang², LIU Hongxing^{1,3,4*}

(1. Department of Laboratory, Hebei Yanda Lu Daopei Hospital, Langfang, Hebei, China, 065201; 2. Clinical Laboratory Department, First Medical Center, Chinese PLA General Hospital, Beijing, China, 100853; 3. Department of Laboratory, Beijing Lu Daopei Hospital, Beijing, China, 100176; 4. Beijing Lu Daopei Institute of Hematology, Beijing, China, 100176)

【ABSTRACT】Objective To compare and analyze the three types of gene mutation screening with different numbers of genes in patients with acute myeloid leukemia (AML) and the benefits of clinical diagnosis and treatment. **Methods** Using targeted amplicon high-throughput sequencing methods, 721 newly diagnosed AML patients were tested for mutations including 9, 16, and 58 genes. **Results** When 9, 16, and 58 genes were screened, the overall mutation incidence were 66.2%, 79.6% and 86.4%, respectively. Two or more mutations were detected in 23.2%, 39.4% and 56.3% of patients, respectively. A total of 66, 186 and 329 mutation combinations were detected, respectively. Compared with only 9 and 16 genes were tested, the detection of 58 genes can provide more information on clinical diagnosis, treatment and prognosis for a total of 62.4% and 37.9% of patients. **Conclusions** Comprehensive genetic mutation screening is helpful for a more comprehensive assessment of the disease. This study provides meaningful quantitative reference information for the selection of genetic mutation screening programs.

【KEY WORDS】 Gene mutation; Acute myeloid leukemia; Clinical benefit

基金名称:国家自然科学基金面上项目(61971443)

作者单位:1. 河北燕达陆道培医院检验科,河北,廊坊 065201

2. 中国人民解放军总医院第一医学中心检验科,北京 100853

3. 北京陆道培医院检验科,北京 100176

4. 北京陆道培血液病研究院,北京 100176

*通信作者:刘红星, E-mail:starliu@pku.edu.cn

近年来,基因测序技术和肿瘤分子生物学研究飞速发展,很多的分子病因被鉴定,其中对临床诊断/分类、预后分层及治疗具有重要意义的基因异常已经越来越多地被加入到血液肿瘤诊疗指南中^[1-4],分子指标所占的比重越来越大。2018版二代测序(Next generation sequencing, NGS)血液肿瘤应用中国专家共识中,AML中必要检测的突变基因有17种,建议检测的突变基因有21种^[5]。2016年版世界卫生组织(World Health Organization, WHO)造血和淋巴组织肿瘤分类标准中所涉及的血液肿瘤相关体细胞突变基因就有100多种^[1]。因此,血液肿瘤的基因突变分析已不再局限于仅检测少数几个分子指标,而是强调进行“突变组”分析。但随着检测基因数目的增加,新加入基因的突变阳性率也在减低,基因突变筛查项目中所涵盖的检测基因数目及其可提供的临床意义也存在争议。本研究拟对比分析三种包含不同基因数目基因突变筛查的应用,以评估其对急性髓性白血病(Acute myeloid leukemia, AML)患者临床诊疗获益的情况。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2015年6月至2019年5月期间就诊于本院的721例AML患者为研究对象,其中男409例,女312例,年龄1~75岁,平均(25.44±18.68)岁。纳入标准:①AML的诊断符合世界卫生组织2016年版造血和淋巴组织肿瘤分类标准^[1];②初诊未经治疗的患者。排除标准:治疗相关AML和继发AML患者。本研究经河北燕达陆道培医院伦理委员会批准,患者或家属均已签署知情同意书。

1.2 基因组DNA制备

收集患者初诊时的骨髓或骨髓涂片标本,新鲜骨髓标本裂解红细胞后进行细胞计数,取 1.0×10^7 个有核细胞提取基因组DNA。骨髓涂片细胞用移液器和纯水反复吹洗,用得到的细胞悬液提取基因组DNA。参照TGuide S32血液基因组DNA提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司,货号:No. DP601-T5C)说明书采用磁珠法提取基因组DNA。

1.3 基因突变检测和分析

采用靶向扩增子高通量基因测序方法(Ion Torrent PGM测序仪, Thermo Fisher Scientific),分别检测9种、16种和58种突变基因,分析范围包括

基因编码区全长或突变热点区域。9种筛查包括在AML中具有明确诊断、预后或治疗意义的9种基因,即I类突变^[6]:*ASXL1*、*CEBPA*、*FLT3*、*IDH1*、*IDH2*、*KIT*、*NPM1*、*RUNX1*和*TP53*。16种筛查在上述9种突变基因的基础上,增加7种突变率较低但具有临床意义的基因,包括*DNMT3A*、*ETV6*、*KRAS*、*NRAS*、*PTPN11*、*PHF6*和*TET2*。58种筛查在上述16种突变基因的基础上,增加42种突变率较低但在血液系统肿瘤中具有潜在临床意义的基因^[7]。变异过滤、识别及注释分析流程参照河北燕达陆道培医院既往的研究报道^[7]。

1.4 基因突变分类

依据WHO、美国综合癌症网络(National Comprehensive Cancer Network, NCCN)和欧洲白血病网络(European Leukemia Net, ELN)发布的AML诊疗指南、专家共识及近年来权威的研究报道^[1-3, 5],将基因突变根据临床意义进行分类:①诊断/鉴别诊断意义:*CEBPA*双突变(double-mutated *CEBPA*, *CEBPAdm*)、*NPM1*、*JAK2 V617F*、*CALR*、*MPL*、*CSF3R*、*CBL*、*SETBP1*、*SF3B1*、*SRSF2*、*U2AF1*和*ZRSR2*。②预后分层意义:*CEBPAdm*、*NPM1*、*KIT*、*RUNX1*、*FLT3-ITD*、*WT1*、*ASXL1*和*TP53*。③靶向/潜在靶向治疗意义:*FLT3-ITD/TKD*、*KIT*、*CSF3R*、*JAK1*、*JAK2*、*JAK3*、*IDH1*、*IDH2*和*BRAF*。④化疗/非靶向治疗意义:*DNMT3A*、*TET2*、*EZH2*、*KRAS*、*NRAS*和*PTPN11*。

1.5 统计学处理

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,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 基因突变阳性率

检测9种、16种和58种基因时,分别有66.2%、79.6%和86.4%的患者突变阳性(图1),23.2%、39.4%和56.3%的患者携带两种及以上基因突变。检测58种基因的突变阳性率显著高于9种($\chi^2 = 81.71, P < 0.001$)和16种($\chi^2 = 12.25, P < 0.001$),差异有统计学意义。检测9种基因时,突变率最高的三种基因为*FLT3-ITD*(20.9%)、*CEBPA*(16.5%)和*KIT*(14.0%)。检测16种和58种基因时,突变率最高的三种基因均为*FLT3-ITD*(20.9%)、*NRAS*(17.3%)和*CEBPA*(16.5%)。

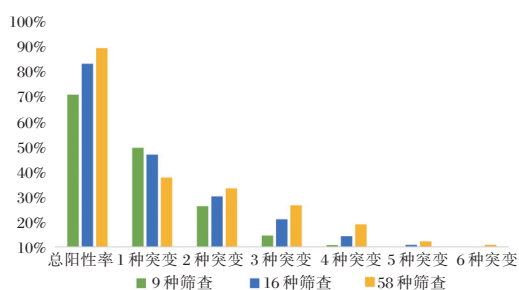
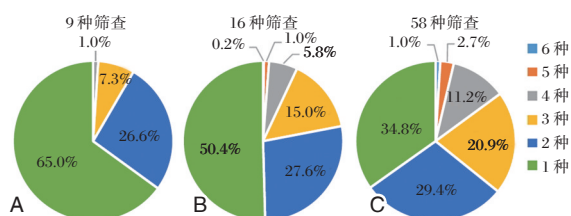


图1 9种,16种和58种基因的突变阳性率

Figure 1 The positive rates of 9, 16, and 58 mutated genes were tested

2.2 基因突变个数

检测9种基因时,最多检测到有患者同时携带4种基因突变,突变阳性的患者中携带1种和多种(≥ 2 种)基因突变患者的比例分别为65.0%和35.0%(图2A)。检测16种基因时,最多检测到有患者同时携带6种基因突变,携带1种和多种(≥ 2 种)基因突变患者的比例分别为50.4%和49.6%。(图2B)检测58种基因时,最多检测到有患者同时携带6种突变,携带1种和多种(≥ 2 种)基因突变患者的比例分别为34.8%和65.2%(图2C)。检测58种基因时,只携带1种基因突变患者的比例显著低于检测9种($\chi^2=98.46, P<0.001$)和16种基因($\chi^2=29.78, P<0.001$),差异有统计学意义。而携带多种(≥ 2 种)基因突变患者的比例显著高于检测9种($\chi^2=98.46, P<0.001$)和16种($\chi^2=29.78, P<0.001$)基因,尤其是携带3种、4种或5种基因突变的患者,差异有统计学意义。



注:(A)检测9种突变基因;(B)检测16种突变基因;(C)检测58种突变基因。

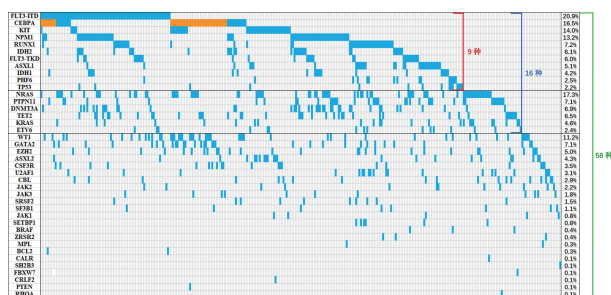
图2 携带不同突变个数患者的比例

Figure 2 The proportion of patients with a different number of mutations

2.3 基因突变组合

检测9种、16种和58种基因时,分别检出66种、186种和329种不同的突变组合,所揭示的肿瘤克隆异质性显著增加(图3)。单种基因突变中突变率最高的基因均为KIT(9种:10.1%;16种:

8.3%;58种:5.7%);最常见的2种基因突变的组合为分别为NPM1+FLT3-ITD(9种:2.9%)、CEBPA+NRAS(16种:1.7%)和CEBPA+GATA2(58种:1.4%);最常见的3种基因突变的组合均为NPM1+IDH1/IDH2+FLT3-ITD(9种:2.1%;16种:1.7%;58种:1.2%)。

图3 检测9种,16种和58种突变基因患者的克隆异质性
Figure 3 The clonal heterogeneity of patients in the testing of 9, 16, and 58 genes

2.4 基因突变的临床获益分析

检测9种、16种和58种基因,能分别为25.9%、25.9%和35.9%的患者提供辅助诊断/疾病分类相关的信息;为59.5%、60.6%和64.2%的患者提供预后分层相关的信息;为44.1%、44.7%和50.2%的患者提供靶向/潜在靶向治疗相关的信息;为0.0%、35.1%和38.1%的患者提供化疗/非靶向治疗相关的信息;为39.4%、35.5%、34.1%的患者同时提供两种临床指导信息;为12.8%、23.2%、31.3%的患者同时提供至少三种临床指导信息。

在9种基因的基础上增加检测7种基因,可为39.6%(97/244)的9种基因突变阴性的患者提供诊疗辅助信息,为36.9%(176/477)的9种基因突变阳性的患者提供更多的诊疗辅助信息。而在16种基因的基础上增加检测42种基因,可为33.3%(49/147)的16种基因突变阴性的患者提供诊疗辅助信息,为39.0%(224/574)的16种基因突变阳性的患者提供更多的诊疗辅助信息。相比于只检测9种、16种基因指标,检测58种基因总体上能为总计62.4%(450/721)、37.9%(273/721)的患者提供临床诊疗和预后信息。见图4。

3 讨论

肿瘤分子生物学的快速进展和测序技术的广泛应用,为血液肿瘤患者筛查更多突变基因提供了知识基础和技术条件。目前对单个或多个突变

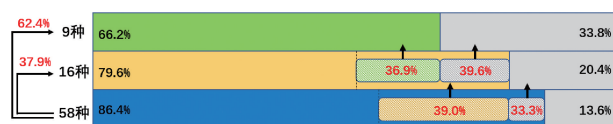


图4 检测9种、16种和58种突变基因患者的临床获益情况

Figure 4 The clinical benefits for patients in the testing of 9, 16, and 58 genes

基因临床及生物学意义探讨的研究报道有很多,但对于基因突变检测的医学经济学问题缺乏相关的数据和讨论。

本研究基于高通量基因测序技术,对比分析了分别检测9种、16种和58种基因时的突变和临床获益情况。结果表明,随着检测基因指标的増加,总的突变阳性率、平均患者携带突变的数目及组合均显著增加,仅检测58种基因就能为86.4%的患者提供有效的突变信息。Papaemmanuil E等报道,当增加到检测111种时,96%的AML患者突变阳性^[7]。因此,进行全面的基因突变筛查,有助于更加深入和全面的评估病情。但是,在转化为临床检测时,并非所有的突变基因都具有临床意义或方便检测,检测成本也是必须要考虑的因素。因此,最终分析目标基因的选择必然是综合考量的结果。

AML是一组高度克隆异质性的疾病,虽然目前根据遗传学危险度分层总体上分为预后良好、中等和差^[3],但仍是较为粗略和笼统的划分。本研究对721例患者仅检测58种基因,就有多达329种突变组合,平均每2个人的突变组合都不相同。不同患者间显著的克隆异质性,可能是临床治疗及预后存在差异的重要因素。对基因突变的全面和深入分析,才能帮助做到真正意义上的精确分层和个体化治疗。

不同的基因突变可具有单方面或多方面的临床意义,如*NPM1*同时具有诊断分型和预后判断的意义,*FLT3-ITD*突变同时具有预后判断和靶向治疗的意义。近些年,随着*FLT3*激酶抑制剂^[8]、*IDH1/2*抑制剂等靶向治疗研究的快速进展,为携带这些基因突变的患者提供了更多的治疗选择。其次,基因突变对特定化疗药物的反应也具有提示意义,如伴*RAS*突变的AML患者常会获益于缓解后大剂量阿糖胞苷治疗^[9],*DNMT3A*突变会通过影响核小体重塑而促使AML患者对蒽环类药物耐药^[10]。此外,不同的突变组合也具有一定的临床意义,如*DNMT3A*、*NPM1*和*FLT3-ITD*突变同时

伴随出现提示预后很差^[11-12]。全面了解突变组合的规律,未来能帮助更加深入的理解其致病机制及辅助临床诊疗。

基于检测成本的考虑,部分突变发生率较低(<5%)基因的检测价值常常受到质疑。事实上,在AML及很多其他恶性肿瘤中,基因突变的发生呈现长尾现象^[11-13],即一些少见基因的突变率较低,但种类多,累加起来的总体阳性率并不低。Maxson JE等和本院前期的研究,发现约4%~5%的初诊AML患者携带*CSF3R*突变^[6,14],约5%的ALL患者携带*FLT3*突变^[15]。这些结果的发现得益于全面的基因突变筛查,而不是只检测少数几种基因指标。因此,全面的筛查有助于发现这些少见突变基因的致病规律,并提供潜在的治疗靶点。

就目前来说,受限于检测成本和分析能力,进行几十种或上百种突变基因的检测是最为有效的筛查方式。但随着基因组检测成本和周期的快速下降、数据分析能力的提高,在不久的将来,全外显子组测序、全基因组测序、全转录组测序将是更加全面的筛查方式,将为医学检验带来从“目标检测”到“目标分析”的革新性进展^[16],更进一步提高我们对疾病的认知,从而更好地辅助临床诊疗。

参考文献

- [1] Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia [J]. Blood, 2016, 127 (20): 2391-2405.
- [2] Dohner H, Estey E, Grimwade D, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel [J]. Blood, 2017, 129 (4): 424-447.
- [3] Tallman MS, Wang ES, Altman JK, et al. Acute Myeloid Leukemia, Version 3.2019, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology [J]. J Natl Compr Canc Netw, 2019, 17 (6): 721-749.
- [4] 聂代静,王芳,周晓苏,等.髓系肿瘤胚系易患因素研究进展[J].分子诊断与治疗杂志,2020,12(8):987-990.
- [5] 中国抗癌协会血液肿瘤专业委员会,中华医学会血液学分会,中华医学会病理学分会.二代测序技术在血液肿瘤中的应用中国专家共识(2018年版)[J].中华血液学杂志,2018,39(11):881-886.
- [6] Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, et al. Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia [J]. N Engl J Med, 2016, 374 (23): 2209-2221.

(下转第182页)

耐碳青霉烯类大肠埃希菌对替加环素异质性耐药的机制

刘宇阳¹ 蓝锴² 熊蕊¹ 鲁洋² 蔡依玫² 向国秀¹ 陈茶² 黄彬^{1*}

【摘要】目的 研究耐碳青霉烯类大肠埃希菌(CREC)对替加环素异质性耐药的分子机制,为临床治疗和合理应用抗生素提供依据。**方法** 收集2017年1月至2019年3月间多中心分离的CREC,用改良E-test法和菌群谱型分析微量滴定法(MPAP)初筛,群体谱分析法(PAP)确认CREC对替加环素的异质性耐药情况,并用荧光定量RT-qPCR分析外排泵相关基因、外排泵调节基因和膜孔蛋白基因的表达。**结果** 改良E-test法和MPAP法筛查CREC对替加环素异质性耐药(CREC-TGC-HR)的阳性率分别为25.0%(14/56)和39.3%(22/56)。经PAP法确认,有37.5%(21/56)为阳性。改良E-test法的CREC-TGC-HR检出率低于PAP法,差异有统计学意义($P<0.05$)。3家医院CREC-TGC-HR的检出率分别是43.8%(7/16)、43.5%(10/23)和23.5%(4/17),两两比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。与CREC-TGC-HR原始菌株相比,耐药亚群外排泵基因 $acrA$ 、 $acrB$ 表达分别上调1.79倍、5.01倍;其相关调控基因 $marA$ 、 $marB$ 表达分别上调5.38和2.18倍;膜孔蛋白基因 $ompC$ 表达下调2.35倍,差异均有统计学意义($P<0.05$)。膜孔蛋白基因 $ompF$ 和 $ompX$ 的表达比较差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 首次报道CREC对替加环素异质性耐药,且异质性耐药率较高,需要采用有效的方法检测CREC-TGC-HR,为临床治疗和合理应用抗生素提供依据。

【关键词】 耐碳青霉烯类大肠埃希菌; RND外排泵; 异质性耐药; 替加环素

Mechanisms of Tigecycline Heteroresistance in Carbapenem-Resistant *Escherichia coli*

LIU Yuyang¹, LAN Kai², XIONG Rui¹, LU Yang², CAI Yimei², XIANG Guoxiu¹, CHEN Cha², HUANG Bin^{1*}

(1. Department of Laboratory Medicine, the First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong, China, 510080; 2. Department of Laboratory Medicine, the Second Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong, China, 510120)

【ABSTRACT】 Objective To study the molecular mechanism of Carbapenem-Resistant *Escherichia coli* (CREC)'s heteroresistance (HR) to tigecycline. **Methods** All strains were collected from January 2017 to March 2019. HR to tigecycline (TGC) was detected by modified E-test, Microtitration population analysis profiling (MPAP) and confirmed by population analysis profiling (PAP), and the expressions of efflux pump related genes and porin genes were analyzed by RT-qPCR. **Results** The positive rates of modified E-test and MPAP for CREC-TGC-HR were 25.0% (14/56) and 39.3% (22/56), respectively. Confirmed by PAP, A high prevalence 37.5% (21/56) of HR to tigecycline was observed in this study. The difference of positive rates between E-test and PAP was statistically significant ($P<0.05$). The detection rates of 3 Hospital were 43.8% (7/16), 43.5% (10/23) and 23.5% (4/17), respectively. There was no statistically significant difference ($P>0.05$). Mechanistic analysis revealed that efflux gene ($acrA$, $acrB$), the regulatory genes ($marA$, $marB$), porin gene ($ompC$, $ompF$) overexpression and $ompX$ down-regulation contributed to the development

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81871703,81772249)

作者单位:1. 中山大学附属第一医院检验科,广东,广州 510080

2. 广州中医药大学第二附属医院检验科,广东,广州 510120

*通信作者:黄彬, E-mail:huangb3@mail.sysu.edu.cn

of this phenomenon. **Conclusion** We firstly reported the phenotype of tigecycline HR, which has a high prevalence in CREC. It is necessary to adopt an effective method to detect CREC-TGC-HR to provide a basis for clinical treatment and rational use of antibiotics.

[KEY WORDS] Carbapenem-Resistant *Escherichia coli*; RND efflux pump; heteroresistance; tigecycline

大肠埃希菌(*Escherichia coli*, *E. coli*)是条件致病菌,常导致免疫低下人群感染^[1]。2019年耐碳青霉烯类大肠埃希菌(carbapenem-resistant *Escherichia coli*, CREC)的全国平均分离率为1.7%,比2018年上升了0.2%。随着多粘菌素耐药基因 *mcr-1* 的检出^[2],替加环素(tigecycline, TGC)被认为是治疗 CREC 的最后一道防线^[3]。不幸的是,已有大量报道显示细菌对 TGC 耐药,其主要耐药机制是 RND(resistance nodulation division, RND)外排泵系统的上调^[4]。研究表明,大肠埃希菌中 AcrAB 受全局调控因子 MarAB 的调控^[5],其外膜通透性受主要膜孔蛋白 OmpC、OmpF 和 OmpX 的调节^[6]。异质性耐药(heteroresistance, HR)意指同一克隆菌株中同时存在对某种抗生素耐药和敏感亚群的现象^[7]。HR 的难检出性常导致临床治疗失败和感染复发。目前,耐碳青霉烯类阴沟肠杆菌对 TGC 异质性耐药已有报道^[8],但尚未见 CREC-TGC-HR 的报道。本研究对检测异质性耐药的方法进行比较,分析并探讨 CREC-TGC-HR 的流行情况和耐药机制,为临床治疗和合理应用抗生素提供依据。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

收集2017年1月至2019年3月间广州(中山大学附属第一医院17株、广东省中医院23株)和宁夏(宁夏医科大学宁夏总医院18株)两个地区三个中心临床分离的 CREC,所有菌株均经 Vitek 2 全自动微生物鉴定系统鉴定。质控菌株为大肠埃希菌 ATCC 25922,由广东省中医院大学城医院检验科微生物室保存。

1.2 主要仪器与试剂

TGC 粉末购自英国 APE-BIO 公司, Mueller-Hinton (M-H)琼脂或 M-H 肉汤购自英国 Oxoid 公司, Vitek 2 全自动微生物检测系统购自法国生物梅里埃公司, RNA 提取试剂 RNAiso Plus、qPCR 试剂盒 SYBR Green qPCR Master Mi 和逆转录试剂

盒 PrimeScript RT 均购自中国大连 TaKaRa 公司。ViiA 7 Dx 荧光定量 PCR 仪购自美国 Applied Biosystems 公司, GBox 全自动凝胶成像仪购自美国 Bio-Rad 公司。PCR 引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.3 改良 E-test

参考 Andersson 等的方法^[7]:将菌液调至 2.0 麦氏浊度后,均匀涂布于 M-H 平板,贴相应的 E-test 试纸条,37℃ 孵育 48 h 后观察结果。

1.4 异质性耐药表型初筛

采用菌群谱型分析微量滴定法(microtitration population analysis profiling, MPAP)^[9],配置 2^{-4} ~ 2^4 mg/L 共 9 个倍比稀释浓度含 TGC 的 M-H 平板。细菌接种于 M-H 肉汤培养基,37℃ 过夜增菌后,用 M-H 肉汤稀释至 10^1 ~ 10^7 CFU/mL。取 10 μ L 菌液滴定于 PAP 梯度抗生素平板,每克隆重复两滴,实验重复三次。37℃ 孵育 48 h 后观察细菌生长情况。若最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)与最高不抑菌浓度(the highest noninhibitory concentration, HNIC)的比值大于 8,初筛为 TGC-HR 阳性。对照菌株为非异质性耐药的大肠埃希菌 ATCC 25922 和临床分离的泛耐药大肠埃希菌 132A5(本实验室分离的菌株)。

1.5 异质性耐药表型确认

采用菌群谱型分析法(population analysis profiling, PAP)^[7],配置 2^{-4} ~ 2^4 mg/L 共 9 个倍比稀释浓度含 TGC 的 M-H 平板。将 HR 阳性菌株接种于 M-H 肉汤培养基,37℃ 过夜增菌,梯度稀释后,取 20 μ L 菌液均匀涂布于 PAP 梯度抗生素平板,重复三次。37℃ 孵育 48 h 后菌落计数,并使用 Graph-Pad Prism 软件将菌落数量与 TGC 浓度作图,若 MIC 与 HNIC 比值大于 8,确认为 HR 阳性。对照菌株为非异质性耐药的大肠埃希菌 ATCC 25922 和临床分离的泛耐药大肠埃希菌 132A5(本实验室分离的菌株)。

1.6 基因表达分析

基于 PAP 试验,收集 CREC-TGC-HR 母菌和

异质性耐药亚群各6株,接种于M-H肉汤培养基,37℃过夜增菌。用Trizol法提取菌株的mRNA。参照逆转录试剂盒PrimeScript RT逆转录出cDNA。参照SYBR Green试剂盒进行RT-qPCR,并通过相对定量法($2^{-\Delta\Delta C_t}$)计算各基因相对表达量。qPCR反应条件:预变性95℃ 30 s;变性95℃ 5 s,退火60℃ 34 s,共40个循环;熔解曲线95℃ 15 s,60℃ 60 s,95℃ 15 s。所用的PCR引物序列见表1。

表1 大肠埃希菌RT-qPCR引物序列^[10]
Table 1 RT-qPCR primer sequence of *E. coli*^[10]

目标基因	引物	引物序列(5'-3')	产物长度(bp)
<i>marA</i>	<i>marA</i> -F	CATAGCATTTTGGACTGGAT	187
	<i>marA</i> -R	TACTTTCCTTCAGCTTTTGC	
<i>marB</i>	<i>marB</i> -F	ATAGCAGCTGCGCTTATTC	154
	<i>marB</i> -R	ACTTATCACTGCCAGTACCC	
<i>acrA</i>	<i>acrA</i> -F	CTATCACCTACGCGCTATCTTC	189
	<i>acrA</i> -R	GCGCGCACGAACATACC	
<i>acrB</i>	<i>acrB</i> -F	CGTACACAGAAAGTGCTCAA	183
	<i>acrB</i> -R	CGCTTCAACTTTGTTTTCTT	
<i>ompX</i>	<i>ompX</i> -F	ACCTGAAATACCGCTATGAA	208
	<i>ompX</i> -R	TCAGTGGTCTGGAATTTACC	
<i>ompC</i>	<i>ompC</i> -F	CTTCAAAGGTGAACTCAGG	241
	<i>ompC</i> -R	GTTGTCAGAACCGTAGGTGT	
<i>ompF</i>	<i>ompF</i> -F	GAAGTTCGCTGTTTCAGTACC	209
	<i>ompF</i> -R	CGTACTTCAGACCAGTAGCC	
<i>GAPDH</i>	<i>GAPDH</i> -F	ACTTACGAGCAGATCAAAGC	170
	<i>GAPDH</i> -R	AGTTTCACGAAGTTGTCGTT	

1.7 统计学分析

采用SPSS 23.0软件进行统计分析,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,并进行两独立样本的 t 检验。计数资料以 $n(\%)$ 表示,采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

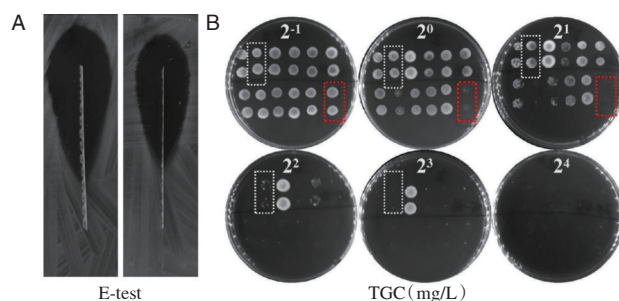
2.1 CREC临床和流行病学特征

本研究共收集到58株CREC中最常见的标本类型是痰液20.7%(17/58)和尿液13.4%(11/58),其次是血液11%(9/58)和引流液9.8%(8/58)。科室分布主要是重症监护室(24.4%,20/58)、内科(23.2%,19/58)和外科(18.8%,15/58)。根据Vitek 2全自动微生物检测系统的药敏检测结果,58株CREC中有两株菌对TGC耐药,后续实验中剔除这两株菌(中山大学附属第一医院和宁夏总医院各1株)。

2.2 HR的初筛

对56株TGC敏感菌株进行HR初筛,改良E-test

结果显示,14株CREC-TGC-HR阳性(25.0%)。MPAP结果显示,22株CREC-TGC-HR阳性(39.3%),其中31.8%(7/22)来自中山大学附属第一医院,22.7%(5/22)来自宁夏总医院,45.5%(10/22)来自广东省中医院。见图1。



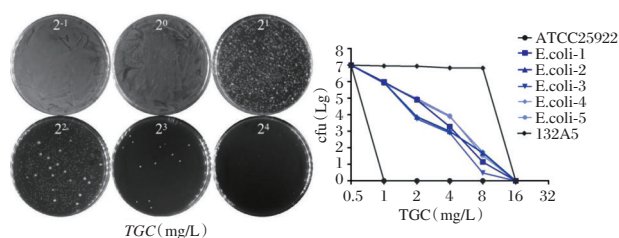
注:白色标注:HR阳性菌株;红色标注:E.coli质控菌株ATCC 25922。A为CREC-TGC-HR阳性菌株E-test结果;B为MPAP结果。

图1 CREC-TGC-HR的MPAP结果

Figure 1 The results of carbapenem-resistant *E. coli* CREC-HR to tigecycline by microtitration PAP method

2.3 HR的确认

56株TGC敏感的CREC中,有21株表现为替加环素异质性耐药(CREC-TGC-HR),检出率为37.5%(21/56)。中山大学附属第一医院、广东省中医院和宁夏总医院CREC-TGC-HR的检出率分别是43.8%(7/16)、43.5%(10/23)和23.5%(4/17),两两间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。从标本种类分布来看,阳性菌株主要来源于痰液(47.6%,10/21)和尿液(19.0%,4/21)等体液标本。从科室分布来看,阳性菌株主要来源于ICU(38.0%,8/21)、内科(28.6%,6/21)和外科(19.0%,4/21)。见图2。



注A:PAP平板图(菌液浓度107cfu/L);B:PAP曲线图。

图2 CREC-TGC-HR的PAP结果

Figure 2 Population analysis profiles (PAP) of TGC-HR in CREC

2.4 异质性耐药机制

与CREC-TGC-HR原始菌株相比,CREC-TGC-HR耐药亚群外排泵基因 $acrA$ 、 $acrB$ 表达上调1.79倍、5.01倍;其相关调控基因 $marA$ 、 $marB$ 分别表达

上调 5.38 和 2.18 倍;膜孔蛋白基因 *ompC* 下调 2.35 倍,差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。膜孔蛋白基因 *ompF* 和 *ompX* 的表达比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见表 2。

表 2 CREC-TGC-HR 原始菌株和耐药亚群各基因 mRNA 相对表达量 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Relative mRNA level of gene expression of native populations and HR-subpopulations in CREC-TGC-HR ($\bar{x} \pm s$)

基因	原始菌株	耐药亚群	P 值
<i>acrA</i>	1.094±0.104	1.955±0.158	0.001
<i>acrB</i>	0.977±0.103	4.860±0.221	0.001
<i>marA</i>	1.020±0.060	5.494±0.313	0.001
<i>marB</i>	1.283±0.248	2.789±0.378	0.004
<i>ompC</i>	1.465±0.421	0.617±0.152	0.031
<i>ompF</i>	0.913±0.118	0.621±0.203	0.097
<i>ompX</i>	1.175±0.364	0.834±0.133	0.202

3 讨论

自 1997 年首次报道甲氧西林异质性耐药金黄色葡萄球菌^[11]以来,已在一些细菌中发现异质性耐药现象,如肺炎克雷伯菌^[12]、肺炎链球菌^[13]、结核分枝杆菌^[14]、鲍曼不动杆菌^[15]、铜绿假单胞菌^[16-17]和幽门螺杆菌^[18]等临床常见致病菌。目前,国内也有少量关于 CRE 异质性耐药的报道^[19-20],但其耐药机制不够明确。这些研究大多基于纸片扩散法(Kirby-Bauer, K-B 法)和 E-test 法进行 HR 初筛。研究发现, K-B 法和 E-test 法均存在较高的假阴性率^[9],导致 HR 的漏检。本研究结果表明,改良 E-test 法与 PAP 的阳性检出率相比差异具有统计学意义 ($P<0.05$),提示 E-test 法筛查 CREC-HR 存在较高的假阴性率。MPAP 法阳性检与 PAP 相比,差异无统计学意义 ($P>0.05$),提示 MPAP 法是目前最接近 HR 检测金标准 PAP 法的检测方法。MPAP 法既比 K-B 法和 E-test 法有更高的准确度,又比 PAP 节约检测成本,操作更简便。但是由于 MPAP 采用微量滴定的方法,仍存在一定的假阳性率,仅作为 HR 的初筛方法,其实验结果需要用 PAP 确认。

有文献报道耐碳青霉烯类阴沟肠杆菌对 TGC 的异质性耐药率为 20.0% (28/140)^[21],铜绿假单胞菌对头孢吡肟的异质性耐药率为 57.3% (110/223)^[17],出现这种差异可能与抗生素种类、细菌种类以及地区差异等因素有关。虽然目前细菌对 TGC 的耐药率还处于较低水平,鉴于本研究中发现 CREC 对 TGC 较高水平的异质性耐药率,应该

高度重视关注这个问题。

据报道,大肠埃希菌 TGC 耐药机制与 RND 家族 AcrAB-TolC 有关, AcrAB 同时受外排泵调节网络中 MarAB 的调节; *marA* 位点直接或间接增加了 *micF* 的表达,导致 *ompF* 的表达减少^[22]。本研究结果提示 RND 外排泵上调与替加环素异质性耐药显著相关。

本研究中大部分 CREC 分离自 ICU,这部分患者大多数合并多种基础性疾病,且病情复杂,免疫能力相对低下,加上用药情况复杂,更容易感染 CREC。大部分 CREC 标本来自痰液和尿液,可能与呼吸道和尿道感染有关。但由于本研究存在局限性, CREC 临床标本相对较少,因此,若要进一步危险因素分析,仍需扩大样本量。

综上所述, CREC 对 TGC 有较高的异质性耐药率。CREC-TGC-HR 与 RND 外排泵系统上调有关。采用有效的方法及时检测 HR 菌株,有助于临床合理用药,避免 HR 菌株发展为耐药菌,可缩短治疗时间和减轻患者负担。

参考文献

- [1] Zeng W, Xu W, Xu Y, et al. The prevalence and mechanism of triclosan resistance in *Escherichia coli* isolated from urine samples in Wenzhou, China [J]. *Antimicrobial Res Inf control*, 2020, 9(1):161.
- [2] Flament-Simon SC, de Toro M, Mora A, et al. Whole Genome Sequencing and Characteristics of *mcr-1*-Harboring Plasmids of Porcine *Escherichia coli* Isolates Belonging to the High-Risk Clone O25b:H4-ST131 Clade B [J]. *Front micro-biol*, 2020, 11:387.
- [3] Rodríguez-Baño J, Gutiérrez-Gutiérrez B, Machuca I, et al. Treatment of Infections Caused by Extended-Spectrum-Beta-Lactamase-, AmpC-, and Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2018, 31(2): e00079-17.
- [4] Keeney D, Ruzin A, Bradford PA. RamA, a transcriptional regulator, and AcrAB, an RND-type efflux pump, are associated with decreased susceptibility to tigecycline in *Enterobacter cloacae* [J]. *Microbial Drug Res (Larchmont, NY)*, 2007, 13(1):1-6.
- [5] Keeney D, Ruzin A, McAleese F, et al. MarA-mediated overexpression of the AcrAB efflux pump results in decreased susceptibility to tigecycline in *Escherichia coli* [J]. *J Antim Chemother*, 2008, 61(1):46-53.
- [6] Cowan SW, Schirmer T, Rummel G, et al. Crystal structures explain functional properties of two *E.coli* porins [J]. *Nature*, 1992, 358(6389):727-733.
- [7] Andersson DI, Nicoloff H, Hjort K. Mechanisms and clinical relevance of bacterial heteroresistance [J]. *Nature Rev Microbiol*, 2019, 17(8):479-496.

- [8] Liu H, Jia X, Zou H, et al. Detection and characterization of tigecycline heteroresistance in *E. cloacae*: clinical and microbiological findings[J]. *Emerg Microb Inf*, 2019, 8(1):564-574.
- [9] Nicoloff H, Hjort K, Levin BR, et al. The high prevalence of antibiotic heteroresistance in pathogenic bacteria is mainly caused by gene amplification[J]. *Nature Microbiol*, 2019, 4(3):504-514.
- [10] Viveiros M, Dupont M, Rodrigues L, et al. Antibiotic stress, genetic response and altered permeability of *E. coli* [J]. *PloS one*, 2007, 2(4):e365.
- [11] Hiramatsu K, Aritaka N, Hanaki H, et al. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin[J]. *Lancet (London, England)*, 1997, 350(9092):1670-1673.
- [12] Bianco G, Boattini M, Iannaccone M, et al. Bloodstream infection by two subpopulations of *Klebsiella pneumoniae* ST1685 carrying KPC-33 or KPC-14 following ceftazidime/avibactam treatment: considerations regarding acquired heteroresistance and choice of carbapenemase detection assay [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2020, 75(10):3075-3076.
- [13] Engel H, Mika M, Denapate D, et al. A low-affinity penicillin-binding protein 2x variant is required for heteroresistance in *Streptococcus pneumoniae* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2014, 58(7):3934-3941.
- [14] Ng KCS, Supply P, Cobelens FGJ, et al. How Well Do Routine Molecular Diagnostics Detect Rifampin Heteroresistance in *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *J Clin Microbiol*, 2019, 57(11):e00717-e00719.
- [15] Thet KT, Lunha K, Srisrattakarn A, et al. Colistin heteroresistance in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from a Thai university hospital [J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2020, 36(7):102.
- [16] Ly NS, Bulitta JB, Rao GG, et al. Colistin and doripenem combinations against *Pseudomonas aeruginosa*: profiling the time course of synergistic killing and prevention of resistance [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2015, 70(5):1434-1442.
- [17] Jia X, Ma W, He J, et al. Heteroresistance to cefepime in *Pseudomonas aeruginosa* bacteraemia [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2020, 55(3):105832.
- [18] Arevalo-Jaimes BV, Rojas-Rengifo DF, Jaramillo CA, et al. Genotypic determination of resistance and heteroresistance to clarithromycin in *Helicobacter pylori* isolates from antrum and corpus of Colombian symptomatic patients [J]. *BMC Infect Dis*, 2019, 19(1):546.
- [19] 周妍君, 贾晓炯, 何建春, 等. 亚胺培南异质性耐药阴沟肠杆菌的临床特征和感染危险因素调查[J]. *中国医药导报*, 2019, 16(16):147-150.
- [20] 刘航. 耐碳青霉烯的阴沟肠杆菌中替加环素异质性耐药特征及机制研究[D]. 重庆医科大学, 2020, 1(12):78.
- [21] Linkevicius M, Sandegren L, Andersson DI. Mechanisms and fitness costs of tigecycline resistance in *Escherichia coli* [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2013, 68(12):2809-2819.
- [22] Cohen SP, McMurtry LM, Levy SB. *marA* locus causes decreased expression of OmpF porin in multiple-antibiotic-resistant (*Mar*) mutants of *Escherichia coli* [J]. *J Bacteriol*, 1988, 170(12):5416-5422.

(上接第177页)

- [7] Zhang Y, Wang F, Chen X, et al. CSF3R Mutations are frequently associated with abnormalities of RUNX1, CEBF, CEBPA, and NPM1 genes in acute myeloid leukemia [J]. *Cancer*, 2018, 124(16):3329-3338.
- [8] Stone RM, Mandrekar SJ, Sanford BL, et al. Midostaurin plus Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia with a FLT3 Mutation [J]. *N Engl J Med*, 2017, 377(5):454-464.
- [9] Neubauer A, Maharry K, Mrozek K, et al. Patients with acute myeloid leukemia and RAS mutations benefit most from postremission high-dose cytarabine: a Cancer and Leukemia Group B study [J]. *J Clin Oncol*, 2008, 26(28):4603-4609.
- [10] Guryanova OA, Shank K, Spitzer B, et al. DNMT3A mutations promote anthracycline resistance in acute myeloid leukemia via impaired nucleosome remodeling [J]. *Nat Med*, 2016, 22(12):1488-1495.
- [11] Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, et al. Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia [J]. *N Engl J Med*, 2016, 374(23):2209-2221.
- [12] Dunlap JB, Leonard J, Rosenberg M, et al. The combination of NPM1, DNMT3A, and IDH1/2 mutations leads to inferior overall survival in AML [J]. *Am J Hematol*, 2019, 94(8):913-920.
- [13] Armenia J, Wankowicz S, Liu D, et al. The long tail of oncogenic drivers in prostate cancer [J]. *Nat Genet*, 2018, 50(5):645-651.
- [14] Maxson JE, Ries RE, Wang YC, et al. CSF3R Mutations have a High Degree of Overlap with CEBPA Mutations in Pediatric AML [J]. *Blood*, 2016, 127(24):3094-3098.
- [15] Zhang Y, Zhang Y, Wang F, et al. The mutational spectrum of FLT3 gene in acute lymphoblastic leukemia is different from acute myeloid leukemia [J]. *Cancer Gene Ther*, 2020, 27(1-2):81-88.
- [16] 刘红星, 王芳, 聂代静. 血液系统疾病基因组学分析及临床应用进展[J]. *白血病·淋巴瘤*, 2018, 27(2):69-72.

· 论 著 ·

胸腰椎骨质疏松性骨折患者IGFBP3、IL-17、网膜素-1与骨密度、骨代谢的关系

王俊江^{1*} 王红建¹ 宋晓磊¹ 丁俊青² 袁伟杰¹ 桑振飞¹ 李玉其¹ 张宾¹

【摘要】目的 探究胸腰椎骨质疏松性骨折患者IGF结合蛋白3(IGFBP3)、白介素-17(IL-17)、网膜素-1(Omentin-1)与骨密度、骨代谢的关系。**方法** 选取本院2017年6月至2019年10月胸腰椎骨质疏松性骨折患者105例作为观察组,另选取同期胸腰椎骨质疏松患者102例作为对照1组,健康体检者102例作为对照2组。分析各组血清指标与胸腰椎骨质疏松性骨折发生及BMD、骨代谢相关性。**结果** 血清IGFBP3、Omentin-1:观察组<对照1组<对照2组,IL-17:观察组>对照1组>对照2组,差异有统计学意义($P<0.05$);Logistic回归分析,血清IGFBP3、IL-17、Omentin-1与胸腰椎骨质疏松性骨折发生显著相关($P<0.05$);观察组血清IGFBP3、Omentin-1高表达患者BMD、BGP高于低表达患者,P I NP、 β -CTX低于低表达患者,IL-17高表达患者BMD、BGP低于低表达患者,P I NP、 β -CTX高于低表达患者,差异均有统计学意义($P<0.05$);Pearson相关性分析,血清IGFBP3、Omentin-1与BMD、BGP呈正相关,与P I NP、 β -CTX呈负相关,IL-17与BMD、BGP呈负相关,与P I NP、 β -CTX呈正相关($P<0.05$)。**结论** IGFBP3、IL-17、Omentin-1可作为反映胸腰椎骨质疏松性骨折患者骨密度、骨代谢情况的重要因子,为临床评估病情、制定治疗方案提供更多途径。

【关键词】 胸腰椎骨质疏松性骨折; IGF结合蛋白3; 白介素-17; 网膜素-1; 骨密度; 骨代谢

Relationship between IGFBP3, IL-17, Omentin-1 and bone mineral density and bone metabolism in patients with thoracolumbar osteoporotic fractures

WANG Junjiang^{1*}, WANG Hongjian¹, SONG Xiaolei¹, DING Junqing², YUAN Weijie¹, SANG Zhenfei¹, LI Yuqi¹, ZHANG Bin¹

(1. Department of Osteology, New Mileage General Hospital, Anyang, Henan, China, 455004; 2. Clinical Laboratory Department, New Mileage Anyang Iron and Steel General Hospital, Anyang, Henan, China, 455004)

【ABSTRACT】Objective To investigate the relationship between IGF binding protein 3 (IGFBP3), interleukin-17 (IL-17), omentin-1 (Omentin-1) and bone mineral density and bone metabolism in patients with thoracolumbar osteoporotic fracture. **Methods** A total of 105 patients with thoracolumbar osteoporotic fractures from June 2017 to October 2019 were selected as the observation group. Another 102 patients with thoracolumbar osteoporosis in the same period were selected as the control group 1, and 102 healthy people were selected as the control group 2. The correlation of serum indicators with the occurrence of thoracolumbar osteoporotic fracture, BMD and bone metabolism was analyzed. **Results** Serum IGFBP3, Omentin-1: the observation group < the control group 1 < the control group 2, IL-17: the observation group > the control group 1 > the control group 2, the difference was statistically significant ($P<0.05$). Logistic regression analysis showed that serum IGFBP3, IL-17 and Omentin-1 were significantly associated with the occurrence of

基金项目:河南省卫生厅资助目(20180126985)

作者单位:1. 新里程安钢总医院骨五科,河南,安阳 455004;

2. 新里程安钢总医院检验科,河南,安阳 455004

*通信作者:王俊江, E-mail: W13526120361@163.com

thoracolumbar osteoporotic fractures ($P<0.05$). In the observation group, BMD and BGP of patients with high expression of IGFBP3 and Omentin-1 were higher than those of patients with low expression, P I NP and β -CTX were lower than those of patients with low expression, BMD and BGP of patients with high expression of IL-17 were lower than those of patients with low expression, P I NP and β -CTX were higher than those of patients with low expression, the difference was statistically significant ($P<0.05$). Pearson correlation analysis showed that serum IGFBP3 and Omentin-1 were positively correlated with BMD and BGP, negatively correlated with P I NP and β -CTX, IL-17 was negatively correlated with BMD and BGP, and positively correlated with P I NP and β -CTX ($P<0.05$). **Conclusion** IGFBP3, IL-17 and Omentin-1 can be used as important factors to reflect the bone mineral density and bone metabolism of patients with thoracolumbar osteoporotic fracture, and provide more ways for clinical evaluation and treatment.

[KEY WORDS] Osteoporotic fracture of thoracolumbar vertebrae; IGF binding protein 3; Interleukin-17; Omentin-1; Bone mineral density; Bone metabolism

胸腰椎骨质疏松性骨折是临床常见骨折类型,主要是由于骨质疏松与外力共同作用下导致骨折,具有病情严重、愈合困难、再发风险高等特点^[1]。相关研究表明,骨密度(Bone mineral density, BMD)降低、骨代谢异常是造成骨质疏松性骨折发生的重要危险因素^[2-3]。故明确相关因子改变对骨密度、骨代谢的影响至关重要。IGF结合蛋白3(IGF binding protein 3, IGFBP3)是一种调节细胞生长、分化的重要分子,在骨质疏松病程中发生相应改变^[4]。白介素-17(Interleukin-17, IL-17)属于Th17细胞因子,有文献指出其在骨质疏松中呈现过度活化状态^[5]。网膜素-1(Omentin-1)作为脂肪细胞因子之一,可调控骨代谢,维持骨生成与骨吸收动态平衡^[6]。但关于三者在胸腰椎骨质疏松性骨折中表达的临床价值仍有待验证。为此,本研究尝试探讨IGFBP3、IL-17、Omentin-1与胸腰椎骨质疏松性骨折患者BMD、骨代谢的关系。现报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取本院2017年6月至2019年10月胸腰椎骨质疏松性骨折患者105例作为观察组,其中男性39例,女性66例,平均年龄(67.17 ± 3.39)岁,体质指数(Body mass index, BMI) $19\sim 25\text{ kg/m}^2$,平均BMI(22.71 ± 1.05) kg/m^2 。另选取同期胸腰椎骨质疏松患者102例作为对照1组,其中男性37例,女性65例,平均年龄(67.51 ± 3.70)岁,平均BMI(22.46 ± 1.14) kg/m^2 。健康体检者102例作为对照2组,其中男性38例,女性64例,平均年龄(67.02 ± 3.43)岁,平均BMI(22.60 ± 1.33) kg/m^2 。3组年龄、性别、BMI等一般资料比较,差异无统计学意义

($P>0.05$),有可比性。本研究经本院伦理委员会审批通过。

纳入标准:观察组、对照1组均经双能X线骨密度仪检查确诊为胸腰椎骨质疏松;观察组经X线、MRI等影像学检查证实为胸腰椎骨质疏松性骨折;对照2组体检各项指标均显示正常,且既往无骨质疏松病史;3组均自愿签订知情承诺书。排除标准:因恶性肿瘤、甲状腺功能异常、甲状旁腺功能异常等其他疾病而致继发性骨质疏松者;参与本研究前6个月内服用维生素D、钙剂及抗骨质疏松药物者;伴有胸腰椎骨折史、椎体畸形者;因占位性病变、肿瘤、炎症所引起的病理性骨折者;属于开放性骨折、多发性骨折者。

1.2 方法

于所有受检者入院后采集空腹静脉血4 mL,离心处理,离心速率为2 500 r/min,离心半径为13.5 cm,离心时间为15 min,取上清液,保存于-20℃恒温冰箱内,待检。采用酶联免疫吸附法检测血清IGFBP3、IL-17、Omentin-1及骨代谢指标[骨钙素(Bone(Gla)protein, BGP)、I型前胶原氨基端原肽(Type I procollagen amino terminal peptide, P I NP)、 β -胶原降解产物(β -isomer of C-terminal telopeptide of type I collagen, β -CTX)]水平,试剂盒(批号:粤械注准20152400980)均购自广州菲康生物技术有限公司,所有操作步骤严格遵循试剂盒说明书。采用购自美国Hologic公司的双能X线骨密度测量仪检测胸腰椎BMD。

1.3 观察指标

①3组血清IGFBP3、IL-17、Omentin-1水平。②血清IGFBP3、IL-17、Omentin-1与胸腰椎骨质疏松性骨折发生的关系。③观察组不同血清水平患

者 BMD、BGP、P I NP、 β -CTX 水平。④血清 IGFBP3、IL-17、Omentin-1 与 BMD、骨代谢相关性。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 22.0 软件进行数据处理,计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, t 检验,计数资料以 $n(\%)$ 表示, χ^2 检验,各血清指标与胸腰椎骨质疏松性骨折发生的关系采用 Logistic 回归分析,各血清指标与 BMD、骨代谢指标的相关性采用 Pearson 分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3组血清 IGFBP3、IL-17、Omentin-1 水平比较

3组中 IGFBP3、Omentin-1 表达水平比较:对照2组>对照1组>观察组,差异有统计学意义($P < 0.05$),IL-17 表达水平比较:观察组>对照1组>对照2组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表1。

表1 3组血清 IGFBP3、IL-17、Omentin-1 水平比较 $(\bar{x} \pm s)$

Table 1 Comparison of serum IGFBP3, IL-17 and Omentin-1 levels in 3 groups $(\bar{x} \pm s)$

组别	<i>n</i>	IGFBP3 (pg/mL)	IL-17 (pg/mL)	Omentin-1 (ng/mL)
观察组	105	2.73±0.76	25.68±6.07	30.12±6.29
对照1组	102	3.95±0.81	19.47±4.92	47.03±8.35
对照2组	102	5.42±1.04	13.39±4.11	62.18±10.40
<i>F</i> 值		243.647	149.813	369.073
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001

2.2 血清 IGFBP3、IL-17、Omentin-1 与胸腰椎骨质疏松性骨折发生的关系

Logistic 回归分析,血清 IGFBP3、IL-17、Omentin-1 与胸腰椎骨质疏松性骨折发生显著相关($P < 0.05$),见表2。

表2 血清 IGFBP3、IL-17、Omentin-1 与胸腰椎骨质疏松性骨折发生的关系

Table 2 Relationship between serum IGFBP3, IL-17, Omentin-1 and occurrence of thoracolumbar osteoporotic fracture

变量	β	S.E.	Wald/ χ^2	OR 值	95%CI	<i>P</i> 值
IGFBP3	-0.846	0.235	12.956	0.429	0.211~0.873	<0.05
IL-17	1.745	0.579	9.078	5.723	3.076~10.649	<0.05
Omentin-1	-0.640	0.202	10.031	0.527	0.305~0.912	<0.05

2.3 观察组不同血清水平患者 BMD 水平比较

观察组血清 IGFBP3、Omentin-1 高表达患者 BMD 高于低表达患者,IL-17 高表达患者 BMD 低于低表达患者,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见图1。

2.4 观察组不同血清水平患者骨代谢指标

观察组血清 IGFBP3、Omentin-1 高表达患者

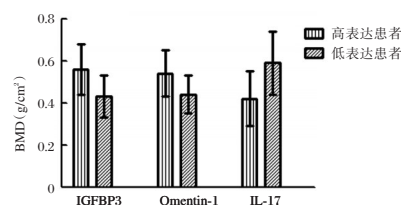


图1 观察组不同血清水平患者 BMD

Figure 1 BMD of patients with different serum levels in the observation group

BGP 高于低表达患者,P I NP、 β -CTX 低于低表达患者,差异均有统计学意义($P < 0.05$);IL-17 高表达患者 BGP 低于低表达患者,P I NP、 β -CTX 高于低表达患者,差异均有统计学意义($P < 0.05$),见表3。

表3 观察组不同血清水平患者骨代谢指标比较 $(\bar{x} \pm s)$

Table 3 Comparison of bone metabolism indexes of patients with different serum levels in the observation group $(\bar{x} \pm s)$

时间	组别	<i>n</i>	BGP	P I NP	β -CTX
IGFBP3	高表达患者	40	4.33±1.05	60.15±10.26	0.56±0.11
	低表达患者	65	2.63±0.56	73.86±14.29	0.67±0.15
	<i>t</i> 值		10.811	5.283	4.018
	<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001
Omentin-1	高表达患者	43	4.18±0.94	60.59±9.97	0.52±0.13
	低表达患者	62	2.66±0.51	74.22±13.74	0.71±0.20
	<i>t</i> 值		10.680	5.565	5.475
	<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001
IL-17	高表达患者	68	2.74±0.53	73.32±12.80	0.68±0.16
	低表达患者	37	4.27±1.02	60.04±10.05	0.54±0.12
	<i>t</i> 值		10.132	5.458	4.654
	<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001

2.5 血清 IGFBP3、IL-17、Omentin-1 与 BMD 相关性

Pearson 相关性分析,血清 IGFBP3、Omentin-1 与 BMD 呈正相关,IL-17 与 BMD 呈负相关($r = 0.602, 0.655, -0.396, P < 0.05$),见图2。

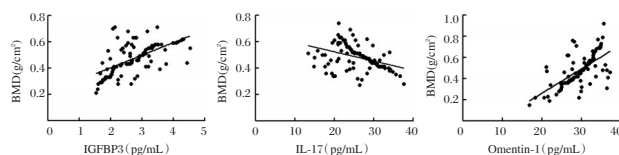
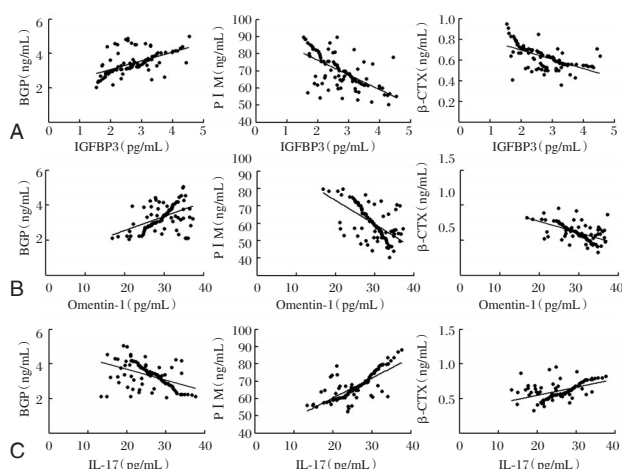


图2 血清 IGFBP3、IL-17、Omentin-1 与 BMD 相关性

Figure 2 correlation between serum IGFBP3, IL-17, Omentin-1 and BMD

2.6 血清 IGFBP3、IL-17、Omentin-1 与骨代谢相关性

Pearson 相关性分析,血清 IGFBP3($r = 0.565, -0.640, -0.600$)、Omentin-1($r = 0.490, -0.585, -0.567$)与 BGP 呈正相关,与 P I NP、 β -CTX 呈负相关,IL-17($r = -0.466, 0.764, 0.503$)与 BGP 呈负相关,与 P I NP、 β -CTX 呈正相关($P < 0.05$),见图3。



注: A 为血清 IGFBP3 与骨代谢相关性; B 为血清 Omentin-1 与骨代谢相关性; C 为血清 IL-17 与骨代谢相关性。

图3 血清 IGFBP3、IL-17、Omentin-1 与骨代谢相关性

Figure 3 correlation between serum IGFBP3, IL-17, Omentin-1 and bone metabolism

3 讨论

目前,临床普遍认为,骨基质与骨矿成分丢失、BMD 下降、骨微结构破坏是骨质疏松性骨折的病理基础,骨代谢过程中骨形成与骨吸收紊乱亦是其重要发病机制^[7]。研究表明,BGP、P I NP、β-CTX 等骨代谢标志物在骨质疏松性骨折中具有变化早、变化程度大等特点,水平改变可反映骨折风险^[8]。因此,积极探索相关因子表达改变与 BMD 及上述骨代谢标志物的关系成为临床重要研究方向。

有文献指出,IGFBP3 的生物学作用是通过结合 IGF-1,延长其半衰期,使其发挥广泛促生长、促分化效应,可直接促进骨质矿化、增强成骨细胞活性,加快骨小梁结构形成,还能间接抑制破骨细胞活性,延缓骨吸收过程,从而发挥保护 BMD 及骨代谢作用^[9]。有研究认为,IGFBP3 分泌不足与骨质疏松发生及向压缩性骨折进展密切相关^[10]。在此基础上,本研究数据显示,血清 IGFBP3 在胸腰椎骨质疏松性骨折中水平较低,与 BMD 具有正相关关系,与骨代谢指标 BGP 呈正相关,与 P I NP、β-CTX 呈负相关。可能是由于 IGFBP3 减少表达影响成骨细胞介导的骨形成及破骨细胞介导的骨吸收过程,导致 BMD 下降,骨代谢紊乱。因此,临床可通过采取相关措施上调 IGFBP3 表达,为防治胸腰椎骨质疏松性骨折提供新方向。

Omentin-1 主要来源于网膜脂肪血管基质细胞,具有舒张血管、抑制成骨分化及炎症反应等作

用,能在成骨破骨共同培养下刺激成骨护骨素生成、分泌。本研究发现,血清 Omentin-1 与胸腰椎骨质疏松性骨折发生密切相关。相关研究表明,Omentin-1 具有保护 BMD 作用,可通过低表达途径抑制骨矿密度与重塑骨强度,从而促使 BMD 降低,提高骨质疏松性骨折风险^[11]。故血清 Omentin-1 与 BMD 呈正相关关系。同时,Pearson 相关性分析,血清 Omentin-1 与骨代谢指标显著相关,可能是由于其表达水平越低,对成骨细胞保护作用越弱,最终影响骨代谢过程。且一项研究显示,Omentin-1 可通过调节 RANKL/OPG/RANK 信号通路调整破骨细胞、成骨细胞数量与活性,从而实现调节骨代谢作用^[12]。这提示上调血清 Omentin-1 水平可能是防治老年群体胸腰椎骨质疏松性骨折的重要环节。

Th17 细胞属于 CD4⁺T 细胞亚群,可大量分泌细胞因子 IL-17,与多种疾病发生与进展相关。李春亮等^[13]报道中指出,IL-17 在骨质疏松合并压缩性骨折患者中呈过多表达。本研究证实,IL-17 参与胸腰椎骨质疏松性骨折发生过程,且与 BMD 负相关。同时,IL-17 作为具有显著促炎活性的细胞因子,能激活、介导炎症级联反应,造成炎症反应过度激活,促使多种炎症细胞因子大量分泌,影响骨代谢过程^[14]。故血清 IL-17 与 BGP 呈负相关,与 P I NP、β-CTX 呈正相关,从多个方面对骨代谢产生影响,可见临床及时检测血清 IL-17 水平,采取针对性措施抑制 Th17 细胞分泌 IL-17,有利于降低胸腰椎骨质疏松性骨折风险。

综上所述,IGFBP3、IL-17、Omentin-1 可作为反映胸腰椎骨质疏松性骨折患者骨密度、骨代谢情况的重要因子,为临床评估病情、制定治疗方案提供更多途径。但本研究样本量较少,需作进一步分析与探究。

参考文献

- [1] Vaishya R, Vijay V, Agarwal AK, et al. Assessment of osteoporotic fracture risk in urban Indian population using quantitative ultrasonography & FRAX tool[J]. Indian J Med Res, 2017, 146(8):S51-S56.
- [2] 母丹丹,易东春,司福军. 类风湿关节炎骨质疏松患者骨密度变化及影响骨折风险的因素[J]. 实用医院临床杂志, 2020, 17(3):214-217.
- [3] 申力,邢丽莉,李鸿江,等. 骨代谢标志物变化情况与绝经后女性发生骨质疏松性椎体压缩骨折的相关性分析[J]. 颈腰痛杂志, 2019, 40(3):305-307. (下转第 190 页)

· 论 著 ·

精神分裂症患者血清 Cys C、TNF- α 、BDNF 水平与血脂代谢的关系

黄凌志¹ 王水轮² 姜振东^{3*}

【摘要】目的 探讨首发精神分裂症患者的血清胱抑素 C(Cys C)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、脑源性神经营养因子(BDNF)水平与血脂代谢特征的关系,为精神分裂症患者的临床诊疗提供参考。**方法** 回顾性分析本院 120 例首发精神分裂症患者和 90 例正常人的临床资料,研究二者的血清 Cys C、TNF- α 、BDNF 水平及总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、低密度脂蛋白(LDL-C)和高密度脂蛋白(HDL-C)的水平,通过多因素 Logistic 回归分析考察精神分裂症患者血清 Cys C、TNF- α 、BDNF 水平及与血脂代谢特征的相关性。**结果** 精神分裂组 TNF- α 、BDNF 和 Cys C 平均水平分别为 (33.32 ± 7.65) ng/L、 (10.56 ± 1.32) μ g/L、 (0.71 ± 0.04) mg/L, BDNF 浓度较正常人群低,其余两项均高于对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$); TC、TG、LDL-C 和 HDL-C 的平均水平分别为 (4.66 ± 0.86) mmol/L、 (2.32 ± 1.21) mmol/L、 (2.57 ± 0.45) mmol/L。异常率分别为 37.5%、47.5%、50.8%和 21.7%。精神分裂组血清 TC、TG、LDL-C 水平均较对照组高, HDL-C 水平较对照组低,其中血 TG、HDL-C、LDL-C 差异均有统计学意义($P < 0.05$);精神分裂组血脂异常发生率均高于对照组,其中高 TG、低 HDL-C 发生率差异均有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 血液 BDNF 及 TNF- α 水平与血脂异常的发生有关。

【关键词】 精神分裂症; 血脂代谢; 细胞因子; Logistic 回归分析

The relationship between serum Cys C, TNF- α , BDNF levels and blood lipid metabolism in patients with schizophrenia

HUANG Lingzhi¹, WANG Shuilun², JIANG Zhendong^{3*}

(1. Department of Psychiatry, Fifteenth Metallurgical Specialty Hospital, Huangshi, Hubei, China, 435000; 2. Department of Psychiatry, Wuhan Jimin Geriatric Hospital, Wuhan, Hubei, China, 430000; 3. Department of Psychiatry, Wuhan Wuchang Hospital, Wuhan, Hubei, China, 430000)

【ABSTRACT】Objective To explore the relationship between serum Cystatin C (Cys C), Tumor necrosis factor- α (TNF- α), Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels and the characteristics of blood lipid metabolism in patients with first-episode schizophrenia, and to provide references for clinical diagnosis and treatment of schizophrenia. **Methods** To retrospectively analyze the clinical data of 120 patients with first-onset schizophrenia and 90 normal people in our hospital, and study their serum Cys C, TNF- α , BDNF levels, total cholesterol (TC), triacylglycerol (TG), The levels of low-density lipoprotein (LDL-C) and high-density lipoprotein (HDL-C). Multivariate Logistic regression analysis was used to investigate the serum Cys C, TNF- α , BDNF levels and their correlation with the characteristics of blood lipid metabolism in patients with schizophrenia. **Results** The average levels of TNF- α , BDNF and Cys C in the schizophrenia group were (33.32 ± 7.65) ng/L, (10.56 ± 1.32) μ g/L, and (0.71 ± 0.04) mg/L, respectively. The BDNF concentration

基金项目:2016 年度武汉市公共卫生及卫生政策科研项目(WG16E06)

作者单位:1. 十五冶精神专科医院精神科,湖北,黄石 435000

2. 武汉市济民老年医院精神科,湖北,武汉 430000

3. 武汉市武昌医院精神心理科,湖北,武汉 430000

*通信作者:姜振东, E-mail: qinkao200290@163.com

was lower than that in the control population, and the other two were higher than those of the control group. The difference was statistically significant ($P<0.05$). The average levels of TC, TG, LDL-C and HDL-C in the schizophrenia group were (4.66 ± 0.86) mmol/L, (2.32 ± 1.21) mmol/L, and (2.57 ± 0.45) mmol/L, respectively. The abnormal rate was 37.5%, 47.5%, 50.8% and 21.7%, respectively, which were higher than those in the control group. The blood TC, TG, LDL-C levels of the patient group were higher than those of the control group, and the HDL-C level was lower than that of the control group. The differences in blood TG, HDLC, LDL-C were statistically significant ($P<0.05$). The incidence of dyslipidemia in the schizophrenia group was all higher than that of the control group, the difference in the incidence of high TG and low HDL-C is statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** The blood BDNF and TNF- α levels are related to the occurrence of dyslipidemia.

[KEY WORDS] Schizophrenia; Lipid metabolism; Cytokines; Logistic regression analysis

精神分裂症(Schizophrenia)在青壮年群体中发病率较高^[1],患者通常存在一定程度的感知、思维、情感、意志行为等障碍,部分患者伴有不协调的精神活动,该病的发病机制尚未明确^[2-4]。有研究报道精神分裂症患者脑组织异常、神经损伤及细胞因子水平^[5]的变化与患者疾病的进展如血脂代谢异常存在一定的联系,且对该病的进展发挥着重要的作用^[6-8]。为了解常见细胞因子如胱抑素 C(Cystatin c, Cys C)、肿瘤坏死因子- α (Tumor necrosis factor- α , TNF- α)和脑源性神经营养因子(Brain derived neurotrophic factor, BDNF)同精神分裂症的关系,本研究将临床信息进行收集和数据分析,并对该病的危险因素进行了多因素 Logistic 回归分析,为精神分裂症患者的临床诊断提供了依据。

1 材料与方法

1.1 一般资料

选取 2015 年 1 月至 2019 年 12 月间于本院确诊的 120 例精神分裂症患者及体检健康就诊者 90 例为研究对象,分为精神分裂症组 and 对照组,全部入组患者需满足以下纳入标准:①符合 CCMD-3 精神分裂症的诊断标准^[9]及中国成人血脂异常防治指南标准^[10];②首次发作;③未服用精神药物;④性别不限;临床资料完整无缺失;④本研究在由医院医学伦理委员会批准的前提下,经患者或家属同意后进行。排除标准:①合并心功能不全;②肝肾功能障碍;③近期内服用过免疫增强剂;④由脑血管疾病或脑炎引起的首发精神分裂症;⑤处于哺乳等特殊时期。

1.2 方法

收集患者的临床资料,比较性别、年龄、血清细胞因子 Cys C、TNF- α 和 BDNF 水平,比较比较总胆

固醇(Total cholesterol, TC)、三酰甘油(Triglyceride, TG)、低密度脂蛋白胆固醇(Low density lipoprotein-Cholesterol, LDL-C)和高密度脂蛋白胆固醇(High density lipoprotein-Cholesterol, HDL-C)的水平,并对患者的临床资料进行整理分析。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 22.0 进行统计分析;计量资料采用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,进行独立样本 t 检验或秩和检验;计数资料以 $n(\%)$ 表示,采用交叉表计算精神分裂症组和对照组血脂异常的发生率,采用 χ^2 检验两组血脂异常发生率差异的统计学意义;最后采用二分类多元 Logistics 回归检验血脂异常的危险性因素。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者的临床资料

两组间年龄、性别比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。除 BDNF 和 HDL-C 平均水平低于对照组外,精神分裂症组的 TNF- α 、Cys C、TC、TG 和 LDL-C 水平均高于对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

表 1 精神分裂症组和对照组临床资料比较 $(\bar{x} \pm s)$
Table 1 Comparison of clinical data between schizophrenia group and control group $(\bar{x} \pm s)$

项目	精神分裂症组 ($n=120$)	对照组 ($n=90$)	Z/χ^2 值	P 值
男/女	68/52	39/51	1.420	0.256
年龄(岁)	45.32 ± 12.87	44.45 ± 11.56	1.235	0.786
TNF- α (ng/L)	33.32 ± 7.65	20.56 ± 8.46	1.574	0.016
BDNF(μ g/L)	10.56 ± 1.32	20.45 ± 7.48	0.986	0.046
Cys C(mg/L)	0.71 ± 0.04	0.53 ± 0.02	0.564	0.032
TC(mmol/L)	4.66 ± 0.86	4.53 ± 1.03	5.430	0.053
TG(mmol/L)	2.32 ± 1.21	1.64 ± 0.97	10.675	<0.001
HDL-C(mmol/L)	0.97 ± 0.32	1.43 ± 0.29	9.643	<0.001
LDL-C(mmol/L)	2.57 ± 0.45	2.18 ± 0.32	8.432	<0.001

2.2 精神分裂症组与对照组间血脂异常发生率比较

精神分裂症组高 TC、高 TG、低 HDL-C 和高 LDL-C 血症发生率均高于对照组,精神分裂症组和对照组比较,高 TC、高 LDL-C 发生率的两组间比较,差异均无统计学意义($P>0.05$);高 TG、低 HDL-C 的发生率的两组间比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 2。

表 2 两组间血脂异常发生率对比 [$n(\%)$]
Table 2 Comparison of the incidence of dyslipidemia between the 2 groups [$n(\%)$]

项目	精神分裂症组 ($n=120$)	对照组 ($n=90$)	χ^2 值	P 值
高 TC	45(37.5)	20(22.2)	3.457	0.234
高 TG	57(47.5)	17(19.9)	21.436	<0.001
低 HDL-C	61(50.8)	13(14.4)	10.45	0.043
高 LDL-C	26(21.7)	9(10.0)	2.765	0.121

2.3 精神分裂症患者发生血脂异常的相关因素分析

对影响血脂代谢较为常见的影响因素如 TNF- α 、Cys C、BDNF 和 BMI 等因素分别与二分类变量(血脂异常)进行二分类多因素 Logistic 回归分析。分析结果显示:TNF- α (OR=8.456, 95% CI: 4.918~14.537, $P<0.001$) 及 BDNF (OR=5.460, 95% CI: 2.986~9.982, $P<0.001$) 是精神分裂症患者发生血脂异常的相关因素。见表 3。

表 3 精神分裂症患者发生血脂异常的相关因素分析
Table 3 Analysis of related factors of dyslipidemia in patients with schizophrenia

相关因素	β 值	S.E. 值	Wald χ^2 值	P 值	OR 值	95%CI
常数项	-1.364	0.373	13.343	<0.001	-	-
TNF- α	2.135	0.276	59.622	<0.001	8.456	4.918~14.537
Cys C	0.516	0.270	3.664	0.056	1.675	0.988~2.842
BDNF	1.697	0.308	30.399	<0.001	5.460	2.986~9.982
BMI	0.376	0.267	1.979	0.159	1.457	0.863~2.460

3 讨论

精神分裂症共患肥胖、糖尿病和各种心血管疾病备受关注,炎症致病学说解释了患者发病及容易罹患其他疾病与炎症有关^[2, 7, 11-12]。血脂代谢的异常可由细胞因子介导,通过患者体内细胞因子浓度高低,影响神经生化和神经内分泌的功能^[13],直接影响神经递质的释放和作用^[14-15]。炎症的发生必然导致炎症因子在血清中的浓度发生变

化^[16],如果能够监测到这一情况的发生并了解其变化,也就可以进一步提示炎症的发生促进了糖尿病等并发症的发生发展的关系。从而寻求解决办法,减轻患者痛苦,延缓疾病发生。本研究回顾性分析本院患者的临床资料,研究两组间血清 Cys C、TNF- α 、BDNF 水平,实验结果表明,除 BDNF 水平低于对照组外,精神分裂症组 TNF- α 和 Cys C 平均水平均高于对照组,均为有统计学意义的差异;多因素回归分析表明血液 BDNF 及 TNF- α 水平与血脂异常的发生有关。分析原因,可能与 BDNF 影响了中枢神经系统多巴胺能神经元的功能,使得患者出现阴性症状及静坐生活方式,增加患者的 BMI 水平,进一步引发血脂代谢异常^[17]。TNF- α 参与感染、创伤等反应,对免疫应答也有介导作用,参与维持内环境的稳定^[18], TNF- α 可以通过激活炎症反应和促进黏附分子的表达来影响血脂,还可以通过破坏血管内皮细胞结构和内皮细胞功能的完整性,促进中性粒细胞氧化代谢,加速脂质的溶解^[19]。Cys C 是重要的组织蛋白酶抑制剂,参与血管壁、细胞外基质的产生和降解的动态平衡。

针对本研究的上述结果提出以下建议:对于精神分裂症患者,临床医师不仅要注重治疗,还要注意预防代谢综合征,适当采取干预措施对其高危因素加以控制。虽然血脂异常在精神分裂症患者中很常见,但许多患者没有得到适当的治疗。所有这些都表明,正确监测精神分裂症患者的血糖和血脂水平愈发重要^[20]。

本研究发现精神分裂症患者 TNF- α 和 BDNF 血清浓度与血脂异常密切相关,且和正常人有显著性差异,这就为把 TNF- α 和 BDNF 血清浓度高低作为判定精神分裂症患者提供了一种可能。本研究对精神分裂症患者的个性化诊治提供了一定的临床依据,但分析的影响因素较为单一,仍需大样本,为研究提供强有力的证据。

参考文献

- [1] Martínez - Andrés JA, García - Carmona JA. Switching from clozapine to paliperidone palmitate-3-monthly improved obesity, hyperglycemia and dyslipidemia lowering antipsychotic dose equivalents in a treatment-resistant schizophrenia cohort [J]. Int Clin Psychopharmacol, 2020, 35(3): 163-169.
- [2] 朱明, 宋传福. 慢性精神分裂症患者血清 SOD、BDNF、PANSS 量表评分及临床意义 [J]. 中国医药导报, 2020, 17(23): 118-121.

- [3] 程波,王燕,周君亚.阿立哌唑对阴性症状为主的老年精神分裂症患者血清神经营养因子和脂质代谢指标水平的影响[J].国际精神病学杂志,2019,46(6):997-1003.
- [4] Xiong Z, Cheng M, Zhu P, et al. Association of blood cell counts with the risk of olanzapine-or clozapine-induced dyslipidemia in Chinese schizophrenia patients [J]. Hum Psychopharmacol, 2019, 34(4): e2699.
- [5] de Almeida V, Alexandrino GL, Aquino A, et al. Changes in the blood plasma lipidome associated with effective or poor response to atypical antipsychotic treatments in schizophrenia patients [J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2020, 101(2): 1043-1048.
- [6] 朱洁琳,崔力军,潘鑫,等. BDNF rs6265 基因多态性与首发精神分裂症患者血脂代谢异常的相关性 [J]. 浙江医学, 2018, 40(21): 2330-2333.
- [7] 胡佳,常宁,赵刘乐,等. 炎症因子在精神分裂症患者外周血单个核中的表达及意义 [J]. 河北医药, 2020, 42(8): 1181-1184.
- [8] Sheikh WE, Rajab A, Shalaby A, et al. Comparison between typical and atypical antipsychotics according their effects on metabolism in schizophrenia patients [J]. Meno Med J, 2019, 32(1): 234-245.
- [9] 中华医学会精神科分会. 中国精神障碍分类与诊断标准 [M]. 第三版. 济南: 山东科学技术出版社, 2001: 147-149.
- [10] 诸骏仁,高润霖,赵水平,等. 中国成人血脂异常防治指南 (2016年修订版) [J]. 中国循环杂志, 2016, 31(10): 937-953.
- [11] 颜涛,程超,王会霞,等. 血清 IL-6、TNF- α 和 IL-1 β 在首发精神分裂症患者中的检测及意义 [J]. 海南医学院学报, 2015, 21(8): 1106-1108.
- [12] 胡佳. 炎症因子是精神分裂症患者并发糖尿病的相关因素 [D]. 河北医科大学, 2015.
- [13] Kim DD, Barr AM, Fredrikson DH, et al. Association between Serum Lipids and Antipsychotic Response in Schizophrenia [J]. Curr Neuropsychopharmacol, 2019, 17(9): 852-863.
- [14] 刘婵媛,陈珺. 血清中 IL-6、IL-10 与 TNF- α 在精神分裂症患者中检测意义分析 [J]. 中国实验诊断学, 2014, 18(12): 2019-2020.
- [15] 梁悦,马会平,韩维田. Cystatin C 在临床疾病诊疗中的作用 [J]. 分子诊断与治疗杂志, 2014, 6(5): 356-360.
- [16] Lin Y, Peng Y, He S, et al. Serum IL-1ra, a novel biomarker predicting olanzapine-induced hypercholesterolemia and hyperleptinemia in schizophrenia [J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2018, 84(PtA): 71-78.
- [17] 马心慧,刘英慧,曹淑杰,等. 首发精神分裂症与离子型谷氨酸受体 6 基因多态性的关联研究 [J]. 分子诊断与治疗杂志, 2010, 2(6): 379-382.
- [18] 樊兵,胥顺. 血清脂联素、TNF- α 、CRP 联合检测在脓毒症患者中的临床应用价值 [J]. 分子诊断与治疗杂志, 2015, 7(6): 383-386.
- [19] 冯馨锐,崔雨舒,何志涛,等. 肿瘤坏死因子- α 的生物学功能研究进展 [J]. 吉林医药学院学报, 2019, 40(1): 66-68.
- [20] Sharma P, Brown H E. Management of Metabolic Syndrome in Schizophrenia [J]. Psychiat Ann, 2020, 50(8): 457-463.

(上接第 186 页)

- [4] 赵丽娟,李静,吉淑敏. 糖尿病伴骨质疏松患者血清微小 RNA-210 胰岛素样生长因子结合蛋白-3 的表达及临床价值 [J]. 安徽医学, 2019, 40(10): 1131-1134.
- [5] 黄明,胡熙耀,彭敏,等. 青藤碱对家兔骨质疏松压缩性骨折模型骨生长分化因子 2 和血清白介素-1 β 及白介素-17 的影响 [J]. 实用药物与临床, 2017, 20(11): 1253-1256.
- [6] 陈丽华,吕燕碧,邝雪辉,等. 脂肪因子 Omentin-1、脂联素与中老年女性骨密度相关性研究 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2019, 25(7): 909-912, 919.
- [7] Liu X, Xu X. MicroRNA-137 dysregulation predisposes to osteoporotic fracture by impeding ALP activity and expression via suppression of leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptor 4 expression [J]. Int J Mol Med, 2018, 42(2): 1026-1033.
- [8] 王军峰,陈军,杨嘉. 高剂量维生素 D 补充剂对骨质疏松症患者骨代谢标志物的影响 [J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2018, 32(7): 698-700.
- [9] Teumer A, Qi Q, Nethander M, et al. Genomewide meta-analysis identifies loci associated with IGF-I and IGFBP-3 levels with impact on age-related traits [J]. Aging Cell, 2016, 15(5): 811-824.
- [10] 黄晓燕,张茵,胡蓓,等. 瘦素、胰岛素样生长因子-1 和胰岛素样生长因子结合蛋白-3 在绝经后骨质疏松症患者血清中的表达及意义 [J]. 中国妇幼保健, 2018, 33(9): 2056-2058.
- [11] 柴瑛. 老年男性骨质疏松性髋部骨折患者血清网膜素-1 与骨转换的关系 [J]. 中国老年学杂志, 2018, 38(13): 3178-3180.
- [12] Wang Z, Tan J, Lei L, et al. The positive effects of secreting cytokines IL-17 and IFN- γ on the early-stage differentiation and negative effects on the calcification of primary osteoblasts in vitro [J]. Int Immunopharmacol, 2018, 18(57): 1-10.
- [13] 李春亮,罗成林,朱海勇,等. 骨质疏松合并压缩性骨折患者 Th17 细胞功能测定及其与骨代谢的相关性分析 [J]. 疑难病杂志, 2018, 17(10): 72-75.
- [14] 沈茹,李艳君,林丽佳. 系统性红斑狼疮患儿外周血 IL-6、IL-10、IL-17 水平变化及其在单个核细胞中的表达研究 [J]. 分子诊断与治疗杂志, 2017, 9(6): 371-375.

· 论 著 ·

RRM1、PDCD-5、VEGF对非小细胞肺癌放疗后近期疗效及预测价值

张昊^{1*} 徐新禹² 崔秀洁¹ 郭玉华¹

【摘要】目的 探讨核苷酸还原酶1(RRM1)、程序化死亡因子5(PDCD-5)及血管内皮生长因子(VEGF)表达对非小细胞肺癌放疗后近期疗效评价及预测价值。**方法** 纳入126例2015年5月至2017年5月本院收治的接受放疗的非小细胞肺癌患者(26例)作为研究组,同时将上述患者肺癌旁正常组织作为对照组。并根据放疗后近期疗效情况将研究组分为完全缓解组(61例),部分缓解组(36例),未缓解组(29例)。比较各组RRM1、PDCD-5及VEGF表达情况;采用多元Logistic回归分析影响NSCLC患者近期疗效的独立危险因素;采用ROC曲线分析RRM1、PDCD-5及VEGF对NSCLC患者近期疗效的预测价值。**结果** 研究组RRM1、PDCD-5、VEGF阳性表达率高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。放疗后,完全缓解组及部分缓解组RRM1、PDCD-5、VEGF阳性表达率及阴性表达率比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。但完全缓解组及部分缓解组RRM1、PDCD-5、VEGF阳性表达率较未缓解组低,差异具有统计学意义($P<0.05$)。临床分期(Ⅲ+Ⅳ)期、分化程度(低、中分化)、RRM1、PDCD-5及VEGF阳性为影响NSCLC患者放疗后近期疗效的独立危险因素($P<0.05$)。RRM1、PDCD-5及VEGF单项及联合检测曲线下面积分别为0.817、0.705、0.798、0.938,各指标曲线下面积以联合检测最高。**结论** NSCLC患者放疗后近期疗效与RRM1、PDCD-5及VEGF水平密切相关,临床应对其指标进行监测对该疾病患者具有重要意义。

【关键词】 RRM1; PDCD-5; VEGF; 非小细胞肺癌

Short-term efficacy and predictive value of RRM1, PDCD-5 and VEGF expression in non-small cell lung cancers after radiotherapy

ZHANG Hao^{1*}, XU Xinyu², CUI Xiujie¹, GUO Yuhua¹

(1. Department of Oncology, Chaoyang Central Hospital, Chaoyang, Liaoning, China, 122000; 2. West China School of Clinical Medicine, Sichuan University, Chengdu, Sichuan, China, 610207)

【ABSTRACT】Objective To explore the evaluation and predictive value of RRM1, PDCD-5 and VEGF expression in the short-term curative effect of non-small cell lung cancer after radiotherapy. **Methods** A total of 126 patients with non-small cell lung cancer who received radiotherapy in this hospital from May 2015 to May 2017 were recruited as the research group. According to the short-term efficacy after radiotherapy, the research group was further divided into: the complete remission group: 61 cases, the partial remission group: 36 cases, the non-remission group: 29 cases. At the same time, the normal tissue adjacent to the lung cancer of the above patients was collected and used as a control group. The expressions of RRM1, PDCD-5 and VEGF were measured and compared between the two groups. Multivariate Logistic regression analysis was used to analyze the independent risk factors affecting the short-term efficacy of NSCLC patients. The ROC curve was used to analyze the predictive value of RRM1, PDCD-5 and VEGF on the short-term efficacy of NSCLC patients. **Results** The positive expression rates of RRM1, PDCD-5, and VEGF in the research group

基金项目:辽宁省自然科学基金项目(20152225)

作者单位:1. 朝阳市中心医院肿瘤科,辽宁,朝阳 122000

2. 四川大学华西临床医学院,四川,成都 610207

*通信作者:张昊, E-mail: baosi285113327@163.com

were higher than those in the control group ($P<0.05$). After radiotherapy, the positive and negative expression rates of RRM1, PDCD-5, VEGF between the complete remission group and the partial remission group were compared ($P>0.05$), but the positive expression rates of RRM1, PDCD-5 and VEGF in the complete remission group and the partial remission group were lower than those of the non-remission group ($P<0.05$). The clinical stages of III and IV, the degree of differentiation (low and moderately differentiated), RRM1, PDCD-5 and VEGF positive are independent risk factors that affect the short-term efficacy of NSCLC patients after radiotherapy ($P<0.05$). The area under the curve of RRM1, PDCD-5 and VEGF and combined detection of three are 0.817, 0.705, 0.798, 0.938, respectively, and the area under the combined detection is highest.

Conclusion The short-term efficacy of NSCLC patients after radiotherapy is closely related to the levels of RRM1, PDCD-5 and VEGF. Clinical monitoring of these indicators is of great significance to NSCLC patients.

[KEY WORDS] RRM1; PDCD-5; VEGF; Non-small cell lung cancer

三维放射是目前临床治疗非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)患者的有效手段。但相关研究发现,三维放射治疗放疗后部分患者症状缓解率较低,如有生物标记作为标准帮助筛选患者进行治疗,可提高疗效,降低毒副反应,故寻求有效肿瘤标志物对NSCLC患者具有重要意义^[1]。研究显示核苷酸还原酶1(ribonucleotide reductase subunit1, RRM1)在多种恶性肿瘤中高表达,其分泌与肺癌肿瘤关系密切^[2]。程序化死亡因子5(Programmed death factor 5, PDCD-5)是临床上重要的凋亡调控分子,经临床实验证明其对肿瘤化疗具有协同增敏的作用^[3]。而血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)系肿瘤生长、侵袭及转移相关主要调控因子之一,证实其表达水平与肿瘤组织及淋巴结转移密切相关^[4]。本研究对RRM1、PDCD-5及VEGF表达对NSCLC患者放疗后近期疗效评价及预测价值系进行分析,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2015年5月至2017年5月本院收治的NSCLC患者126例,其中男85例,女41例;年龄52~78岁,平均(68.79±3.31)岁。根据放疗后近期疗效情况分为:完全缓解组:61例,部分缓解组:36例,未缓解组:29例。纳入标准:①所有患者均予以外科切除手术明确的病理,符合中华医学会肺癌临床诊疗指南(2018版)^[5]标准;②入组前均接受一个月放疗;③根据本院实际情况纳入年龄在51~78岁之间;④临床资料完整且真实。排除标准:①合并血液疾病者;②严重精神疾患或痴呆等无法配合本研究者;③存在除NSCLC以外其他原发性恶性肿瘤者;④合并风湿免疫及结缔

组织病变者。本研究经医院伦理委员会批准通过,受试者均同意研究并签署知情同意书。

1.2 放射治疗

NSCLC患者予以三维适形放疗,放疗部位包括原发灶、同侧肺门、纵隔可见淋巴结。三维放射治疗计划系统中根据放疗计划分别统计V20、V30(接受20 Gy/30 Gy照射的肺占全肺总体积的百分数)和全肺照射平均剂量。

1.3 标本采集及检测方法

RRM1多克隆抗体,购自北京博奥森生物技术有限公司;PDCD-5单克隆抗体购于北京宝赛生物技术有限公司;VEGF单克隆抗体试剂盒购于北京中山生物技术有限公司。免疫组化采用链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶连接法(streptavidin-peroxidase, SP)法,SP试剂盒购自北京中山生物科技有限公司。各步骤均严格按照试剂盒说明书进行操作^[6]。染色结果判定标准^[7]:以细胞核中出现棕黄色颗粒为RRM1、PDCD-5、VEGF阳性染色细胞。每张切片随机选取10个高倍视野,按照阳性细胞的染色数量和显色强度分级评分,取其平均值。细胞染色数量的评分按照阳性细胞计数占同类细胞的百分比,计算该病例的细胞阳性率。

1.4 近期疗效研究方法

采用世界卫生组织(World Health Organization, WHO)评价标准^[8]:分为:完全缓解、部分缓解、无变化、进展。

1.5 临床分期及分化程度判定

根据美国癌症联合委员会系统(American Joint Committee on Cancer, AJCC)^[9]建议进行TNM分期,结合有关肿瘤、附近淋巴结和远处器官转移的信息,使用I到IV期进行描述。并根据切除的病理组织切片对患者分化程度进行判断。

1.6 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;采用多元 Logistic 回归分析影响 NSCLC 患者近期疗效的独立危险因素;采用 ROC 曲线分析 RRM1、PDCD-5 及 VEGF 对 NSCLC 患者近期疗效的预测价值;以 $P < 0.05$ 为差

异有统计学意义。

2 结果

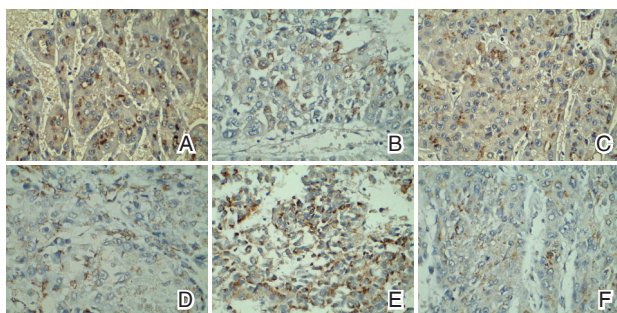
2.1 RRM1、PDCD-5 及 VEGF 水平表达

研究组 RRM1、PDCD-5、VEGF 阳性表达率高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1、图 1。

表 1 RRM1、PDCD-5 及 VEGF 水平表达 [$n(\%)$]

Table 1 Expression of RRM1, PDCD-5 and VEGF [$n(\%)$]

组别	n	RRM1		PDCP-5		VEGF	
		阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性
研究组	126	99 (78.57)	27 (21.42)	96 (76.19)	30 (23.80)	101 (80.15)	25 (19.84)
对照组	126	16 (12.69)	110 (87.30)	18 (14.28)	108 (85.71)	17 (13.49)	109 (86.50)
χ^2 值	—	110.189		97.455		112.453	
P 值	—	<0.001		<0.001		<0.001	



注: A、B 为 RRM1 阳、阴性表达; B、C 为 PDCD-5 阳、阴性表达; E、F: VEGF 阳、阴性表达。

图 1 RRM1、PDCD-5 及 VEGF 在 NSCLC 癌组织的表达 (SP, $\times 400$)

Figure 1 expression of RRM1, PDCD-5 and VEGF in NSCLC carcinoma (SP, $\times 400$)

2.2 放疗后 RRM1、PDCD-5 及 VEGF 在 NSCLC 患者水平表达

放疗后,完全缓解组及部分缓解组 RRM1、PDCD-5、VEGF 阳性表达率及阴性表达率比较差异无统计学意义($P > 0.05$);完全缓解组及部分缓解组 RRM1、PDCD-5、VEGF 阳性表达率较未缓解组低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

2.3 影响 NSCLC 患者放疗后近期疗效的因素分析

患者年龄非影响近期疗效危险因素;临床分期(Ⅲ+Ⅳ)期、分化程度(低、中分化)、RRM1、PDCD-5 及 VEGF 阳性为影响 NSCLC 患者放疗后近期疗效的独立危险因素($P < 0.05$)。见表 3。

表 2 比较放疗后 RRM1、PDCD-5 及 VEGF 在 NSCLC 患者水平表达 [$n(\%)$]

Table 2 The expression of RRM1, PDCD-5 and VEGF in NSCLC patients after radiotherapy [$n(\%)$]

组别	n	RRM1		PDCP-5		VEGF	
		阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性
完全缓解组	61	16 (26.22)	45 (73.77)	14 (22.95)	47 (77.04)	12 (19.67)	49 (80.32)
部分缓解组	36	10 (27.77)	26 (72.22)	8 (22.22)	28 (77.77)	7 (19.44)	29 (80.55)
未缓解组	29	23 (79.31)	6 (20.68)	21 (72.41)	8 (27.58)	24 (82.75)	5 (17.24)
χ^2 值	—	8.6061		3.588		15.246	
P 值	—	<0.001		0.014		<0.001	

表 3 影响 NSCLC 患者放疗后近期疗效的因素分析

Table 3 Analysis of factors affecting the short-term efficacy of radiotherapy 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
年龄(<60 vs ≥ 60)岁	1.775	0.717~4.390	0.594	—	—	—
临床分期(Ⅰ+Ⅱ vs Ⅲ+Ⅳ)	1.962	1.535~2.506	0.016	2.125	1.605~2.813	<0.001
分化程度(高分化 vs 低、中分化)	2.330	1.781~3.048	0.009	2.572	1.865~3.548	<0.001
肿瘤直径(≤ 4 vs > 4)cm	1.960	1.595~2.048	0.013	2.330	1.778~3.054	<0.001
RRM1(阴性 vs 阳性)	2.155	1.720~2.700	0.045	2.444	1.772~3.371	<0.001
PDCD-5(阴性 vs 阳性)	2.565	1.984~3.316	0.033	2.401	1.775~3.247	<0.001
VEGF(阴性 vs 阳性)	2.330	1.792~3.030	0.008	2.575	1.949~3.401	<0.001

2.4 RRM1、PDCD-5 及 VEGF 单项及联合检测对 NSCLC 患者近期疗效的预测价值

ROC 曲线显示:RRM1、PDCD-5 及 VEGF 单项及联合检测曲线下面积分别为 0.817、0.705、0.798、0.938,联合检测最大。见表 4、图 2。

表 4 RRM1、PDCD-5 及 VEGF 单项及联合检测对 NSCLC 患者近期疗效的预测价值

Table 4 The predictive value of single and combined RRM1, PDCD-5 and VEGF tests on the short-term efficacy of NSCLC patients

预测因子	最佳临界值	敏感度 (%)	特异度 (%)	AUC	95%CI
RRM1	17.54	0.729	0.446	0.817	0.696~0.938
PDCD-5	16.81	0.518	0.876	0.705	0.544~0.867
VEGF	15.87	0.623	0.723	0.798	0.673~0.923
三者联合	19.76	0.973	0.813	0.938	0.864~1.000
预测指数模型	1.86	0.623	0.912	0.873	0.546~0.843

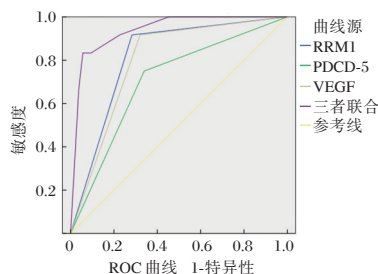


图 2 RRM1、PDCD-5 及 VEGF 单项及联合检测曲线分析

Figure 2 Analysis of single and combined detection curves of RRM1, PDCD-5 and VEGF

3 讨论

研究发现,NSCLC 五年生存率仅为 28.13%^[10]。近年来,有学者发现肿瘤转移抑制基因和宿主因素间相互作用密切相关,这为进一步探讨 NSCLC 发病机制并优化诊疗方案提供了新的思路。

RRM1 系肿瘤转移抑制基因,其在多种肿瘤组织中高表达,参与细胞增殖、凋亡、自噬等多个生物学过程。众多研究发现,DNA 修复基因的能力与肺癌的发病及耐药有关;DNA 修复基因修复力低者肺癌发生的风险较正常人明显增加,而修复力高者对放疗耐受,使放疗失败^[11]。相关动物实验研究发现,RRM1 可在影响 DNA 化学损伤修复的效率及核苷酸的代谢的同时,减少黏着斑激酶磷酸化,对肿瘤细胞的转移具有抑制作用^[12]。本文发现,研究组 RRM1 阳性表达率明显高于对照组,且完全缓解组及部分缓解组 RRM1 阳性表达率较未缓解组高,考虑其原因与癌组织存在基因损伤使 DNA 修复基因的表达增加有关。

PDCD-5 是由北京大学人类疾病基因研究中心马教授发现的一种新的凋亡调控基因,也是目前国际肿瘤研究的热点之一。研究表明 PDCD-5 与多种恶性肿瘤的发生、发展密切相关^[13]。本研究显示 PDCD-5 在 NSCLC 癌组织中表达率高,但予以放疗后缓解率升高。一方面与 PDCD-5 经真核表达载体导入或大肠杆菌表达重组蛋白导入多种细胞后,不能单独对细胞产生明显的影响,但加入诱导凋亡的因素可明显促进细胞凋亡,表明 PDCD-5 是凋亡增强剂,而非诱导剂;另一方面, PDCD-5 表达量减少,可能使其抵抗化疗药物诱导凋亡刺激信号发生的作用机制之一。

VEGF 是近年来才被被发现的一种促血管生长因子,可促进血管内皮细胞的增殖和迁移,与肿瘤浸润转移关系密切,通过癌组织增殖与淋巴结转移过程中发挥重要作用;并在胃癌、直肠癌、乳腺癌、胰腺癌等多种实体癌中均具有表达^[14]。本研究结果显示,VEGF 与 NSCLC 患者密切相关,在癌组织中阳性表达率高,这与 Woodford 等^[15]对肺癌患者 VEGF 水平研究有一定出入,考虑其原因与样本量不足,导致部分结果未显示明显差异有关,后续将加大样本量,以完善研究的可靠性。此外,本文为深入了解 NSCLC 患者放疗情况,对患者近期疗效进行研究发现,RRM1、PDCD-5 及 VEGF 水平与是患者近期疗效危险因素相关;且 ROC 曲线显示,三者水平对患者近期疗效预测价值最佳,说明检测三指标可作为预测患者近期疗效的有效手段。

综上所述,NSCLC 患者放疗后近期疗效与 RRM1、PDCD-5 及 VEGF 水平密切相关,临床应对其指标进行监测对该疾病患者具有重要意义。

参考文献

- [1] 权建华,张富利,许卫东.同步推量调强放疗联合多西他赛同期化疗治疗晚期非小细胞肺癌的临床效果及短期预后观察[J].临床误诊误治,2020,33(3):72-76.
- [2] Zhang CC, Jia Ys, Jia YN, et al. Prognostic and predictive value of plasma d-dimer levels in patients with small-cell lung cancer[J]. Int J Clin Oncol, 2018, 23(12):276-279.
- [3] Huang HC, Su WJ, Chiang CL, et al. The predictive value of the interferon- γ release assay for chemotherapy responses in patients with advanced non-small-cell lung cancer[J]. Lung Cancer Amsterdam, 2018, 11(7):341-343.
- [4] 杨秀成,于琼,巩林强,等.结肠癌血清 IGF-1 水平及肿瘤组织中 VEGF-C、VEGFR-3 表达与淋巴结转移的相关性研究[J].分子诊断与治疗杂志,2020,12(3):381-385.

(下转第 198 页)

• 论 著 •

珠海地区 353 例儿童喘息性疾病病毒病原学分析

黄翩翩¹ 邹商群^{1*} 肖鸽飞¹ 贾晓芸¹ 陶维井² 戴其强²

【摘要】目的 探讨儿童喘息性疾病的病毒病原学特征,提高临床诊治水平。**方法** 收集本院儿科2018年6月至2019年5月353例喘息患儿的咽拭子,应用多重PCR技术对病毒进行检测,并分析临床资料。**结果** 病毒检测阳性124例(35.13%),呼吸道合胞病毒(RSV)77例(21.81%)、副流感病毒(PIV)14例(3.97%)、博卡病毒(HBoV)11例(3.11%)、人偏肺病毒(HMPV)10例(2.83%)、鼻病毒(HRV)9例(2.55%)、腺病毒(ADV)4例(1.13%)、流感病毒A型(INF-A)1例(0.28%),流感病毒B型(INF-B)0例(0%)。混合病毒感染3例(0.85%),28天~3岁喘息患儿共340例,占96.32%。**结论** 喘息病例检出率高的病毒病原体为呼吸道合胞病毒,混合病毒感染少见,28天~3岁幼儿为喘息性疾病高发年龄。

【关键词】 儿童;喘息;病毒;病原学

Analysis of the virus etiology of 353 children with wheezing disease in Zhuhai area

HUANG Pianpian¹, ZOU Shangqun^{1*}, XIAO Gefei¹, JIA Xiaoyun¹, TAO Weijing², DAI Qiqiang²

(1. Department of Pediatrics, Zhuhai Maternal and Child Health Care Hospital, Zhuhai, Guangdong, China, 519000; 2. Guangzhou DaAn Clinical Laboratory Center, Guangzhou, Guangdong, China, 510665)

【ABSTRACT】 Objective To explore the viral etiological characteristics of children's wheezing diseases and improve the level of clinical diagnosis and treatment. **Methods** The throat swabs of 353 wheezing children from June 2018 to May 2019 were collected from the Pediatric Department of this Hospital, and multiple PCR technology was used to detect the virus and analyze clinical data. **Results** Eight viruses nucleic acids were detected by throat swabs in 353 cases. 124 cases (35.13%) were positive for the virus, 77 cases (21.81%) for respiratory syncytial virus (RSV), 14 cases (3.97%) for parainfluenza virus (PIV), 11 cases (3.11%) for Bocavirus (HBoV), Human metapneumovirus (HMPV) 10 cases (2.83%), rhinovirus (HRV) 9 cases (2.55%), adenovirus (ADV) 4 cases (1.13%), influenza virus type A (INF-A) 1 case (0.28%), 0 cases (0%) of influenza virus type B (INF-B). There were 3 cases of mixed virus infection (0.85%), 340 cases of wheezing children from 28 days to 3 years old, accounting for 96.32%. **Conclusion** The viral pathogen with a high detection rate of wheezing cases is respiratory syncytial virus, and mixed viral infections are rare. Children between 28 days and 3 years old are the age at which wheezing diseases occur.

【KEY WORDS】 Children; Wheezing; Virus; Pathogen

喘息是儿童常见临床症状之一,5岁及以下婴幼儿会出现反复的喘息。近年来研究认为,引起儿童喘息反复发作主要原因之一是呼吸道感染,尤其是呼吸道病毒感染^[1]。其中呼吸道合胞病毒(Respiratory syncytial virus, RSV)是最常见的病毒

病原,随着分子生物学检测技术的发展,在喘息患儿的呼吸道标本中发现一些其他病毒,如人类偏肺病毒(Human metapneumovirus, HMPV)、副流感病毒(Parainfluenza virus, PIV)、人类博卡病毒(Human bocavirus, HBoV)等。因此,确定各种病

基金项目:广东省医学科学技术研究基金项目(A2017443)

作者单位:1. 珠海市妇幼保健院,广东,珠海 519000

2. 广州达安临床检验中心,广东,广州 510665

*通信作者:邹商群, E-mail: drzsqr@163.com

毒与儿童喘息性疾病的关系显得尤为紧迫和重要。本文对珠海市妇幼保健院 353 例喘息病例进行病毒病原学特点分析,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集本院儿科 2018 年 6 月 1 日至 2019 年 5 月 30 日收治的 353 例喘息患儿的临床资料。其中男性 229 人(64.87%)、女性 124 人(35.13%)。平均年龄(1.50 ± 0.93)岁,28 天~<1 岁(婴儿期)80 例(22.67%)、1~<3 岁(幼儿期)260 例(73.65%)、3 岁以上(学龄前期及学龄期)13 例(3.68%)。

1.2 标本检测

1.2.1 标本收集

患儿入院后 24 h 内用温生理盐水漱口 2 次后,取一次性无菌咽拭子轻柔且迅速擦拭患儿咽后壁及两侧扁桃体 2~3 次,收集粘膜和上皮细胞,采样后迅速将咽拭子放入收集管中,旋紧管盖并在收集管上标记采样日期、患者姓名和编号等信息,立即放在 2~8℃冰箱保存,24 h 内待检。入选患儿均由监护人签署知情同意书,本研究已通过伦理委员会审批。

1.2.2 病原体核酸检测

将采集的呼吸道咽拭子标本送广州达安临床检验中心,采用美国 Thermo Fisher Scientific 公司的 KingFisher 全自动核酸提取仪和广州美基生物科技有限公司的磁珠法病毒总核酸提取试剂盒,按照试剂盒说明书和仪器操作手册,提取标本中病毒总核酸。提取总核酸后利用多重 PCR 和 Luminex 悬浮液芯芯片技术进行呼吸道病原体核酸检测,可同时检测呼吸道标本中的包括甲型流感病毒(Influenza A virus, FluA)、乙型流感病毒(Influenza B virus, FluB)、PIV、鼻病毒(HRV)、腺病毒(adenovirus, ADV)、RSV、HMPV、HBoV 等在

内的 8 种呼吸道主要病毒。检测仪器为美国 Luminex 公司的 Luminex MAGPIX®液相悬浮芯片系统,按检测试剂参数根据 cutoff 值进行结果判读^[2]。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计软件进行统计处理,计数资料用 $n(\%)$ 表示,采用 χ^2 检验,组间比较采用秩和检验,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 临床资料分析

353 例病例均出现喘息症状,平均病程(9.47 ± 9.63)d,平均住院天数(6.86 ± 1.86)d。118 例出现发热(33.43%),出院诊断急性支气管肺炎 326 例(92.35%)、重症肺炎 18 例(5.10%)、急性喘息性支气管炎 5 例(1.42%)、支气管哮喘、支气管炎各 4 例(1.13%)血常规提示淋巴细胞为主 220 例(62.32%)。血沉增快 123 例(34.84%);C 反应蛋白增高 149 例(42.21%);降钙素原增高 168 例(47.59%);血清过敏原阳性 281 例(79.60%)。

2.2 病原组成

病毒检测阳性 124 例(35.13%),其中 RSV 77 例(21.81%)最高、依次是 PIV、HBoV、HMPV、HRV、ADV 4 例(1.13%)、流感病毒 A 型(Influenza A virus, INF-A)、流感病毒 B 型(Influenza B virus, INF-B)。混合病毒感染 3 例(0.85%)。见表 1。

2.3 不同性别、季节、年龄患儿的病毒检出率比较

男性病毒检出率高于女性,差异无统计学意义($P > 0.05$)。不同季节:春季与夏、秋、冬检出率比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),夏天病毒检出率高。不同年龄段比较,幼儿组阳性率最高,学龄前及学龄期组最低,3 组比较差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 2。

表 1 不同病原的季节、年龄分布情况 [$n(\%)$]

Table 1 Seasonal and age distribution of different pathogens [$n(\%)$]

病原类型	<i>n</i>	季节				年龄		
		春季	夏季	秋季	冬季	<1 岁	1~3 岁	>3 岁
呼吸道合胞病毒	77	14(18.18)	36(46.75)	12(15.58)	15(19.48)	30(38.96)	46(59.74)	1(1.30)
副流感病毒	14	4(28.57)	1(7.14)	3(21.43)	6(42.86)	2(14.29)	12(85.71)	0(0)
博卡病毒	11	0(0)	7(63.64)	1(9.10)	3(27.27)	2(18.18)	8(72.73)	1(9.10)
偏肺病毒	10	5(50.00)	1(10.00)	2(20.00)	2(20.00)	0(0)	10(100.00)	0(0)
鼻病毒	9	2(22.22)	1(11.11)	6(66.67)	0(0)	1(11.11)	8(88.89)	0(0)
腺病毒	4	2(50.00)	1(25.00)	0(0)	1(25.00)	0(0)	4(100.00)	0(0)
甲型流感病毒	1	1(100.00)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1(100.00)	0(0)

表2 不同性别、季节、年龄患儿的病毒检出率比较 [n(%)]

Table 2 Comparison of virus detection rates among children of different genders, seasons and ages [n(%)]

项目	n	病毒检出率	χ^2 值	P值
性别				
男	229	79(34.50)	0.113	0.736
女	124	45(36.29)		
季节			8.645	0.034
春季(3~5月)	68	29(42.65)		
夏季(6~8月)	108	46(42.59)		
秋季(9~11月)	88	24(27.27)		
冬季(12~2月)	89	25(28.09)		
年龄(岁)			4.319	0.115
28天~<1	80	34(42.50)		
1~<3	260	88(33.85)		
3岁以上	13	2(15.38)		

2.4 病毒检出阳性与病毒检出阴性的喘息患儿临床特征比较

2组患儿临床特征比较,年龄、重症肺炎比例、氧疗时间比较,差异有统计学意义($P<0.05$),病毒性组年龄较小,重症肺炎、氧疗比例较多。病程、住院时间、发热天数、并发症(肝功能损害、呼吸衰竭、心肌损害等),差异无统计学意义($P>0.05$),见表3。

3 讨论

喘息是儿童常见的呼吸道临床症状之一,研究认为,约1/3儿童3岁前至少有过1次喘息发作^[3],本研究结果提示病毒为婴幼儿喘息疾病的主要病原。病毒检出率春夏季较秋冬季高,春夏季RSV、HBoV、HMPV、PIV检出高峰有所重叠。

有文献报道约90%的儿童2岁前曾有过RSV感染,约40%的RSV会感染下呼吸道^[4]。本研究结果提示RSV是引起婴幼儿喘息症状的重要病原,和较多学者的研究结果相一致^[5-7]。在我国,RSV在南方地区流行季节是夏秋季节,北方地区是冬春季节^[8],本研究提示RSV感染夏季多发,考虑珠海处于亚热带,天气炎热所致。PIV-3是住院儿童感染肺炎和毛细支气管炎最常见的血清型,易合并ADV和RSV感染^[9],有报道提出PIV在危重症儿童的机械辅助通气率高于RSV^[10],但本研究PIV感染

病例未发现重症,且检出率远小于RSV,考虑PIV致病性可能存在地域及流行差异。HBoV检出11例(3.11%),夏季常见(7例,1.98%),幼儿组检出率高(8例,2.27%)。hBoV在中国亚热带地区大流行时间是每年的6~9月(夏季),易感人群年龄在2岁以下^[11],与本研究结论较为一致。HMPV检出10例(2.83%),春季常见(5例,1.42%),全为幼儿组感染(10例,2.27%)。HMPV在亚热带以春夏季为主,易感人群为2岁以下婴幼儿^[12],与本研究结论较为一致。本研究HRV、ADV、INF-A检出率低,INF-B未检出,说明珠海地区喘息患儿HRV、ADV、INF-A、INF-B感染较RSV少见。

本研究结果提示混合病毒感染少见。Olofsson S等^[13]的研究表明,混合病毒感染患儿更易出现发热、低氧血症且住院时间更长。也有学者报道了双重呼吸道病毒混合感染较单一病毒感染收住儿科ICU的风险增高3倍^[14]。但也有部分研究结果显示,混合感染与疾病严重程度无相关性^[15]。本研究结果提示病毒感染是喘息患儿的危险因素。随着多重病毒病原体分子检测方法的出现及应用,呼吸道感染导致的危重症在儿童重症监护室越来越普遍,具有较高的发病率和病死率^[11]。但发热天数组别组间差异无统计学意义,考虑可能合并细菌或肺炎支原体感染,对热程有影响。

本研究不足之处在于病例数不够多,因此当进一步分成不同的组别时,例如分成四个季节进行比较时,每组中的阳性患儿具体数目较小,有可能影响比较结果的统计学意义。入组本研究的患儿大多是普通住院患儿,未行肺泡灌洗液病原学检查。

综上所述,本研究显示珠海地区儿童喘息疾病呼吸道病毒病原体主要以RSV感染为主,PIV、HBoV、HMPV、HRV、ADV等病毒亦常见,和严华杰等学者的报道较为一致^[16]。如能在喘息性疾病发病初期进行病原学的快速检测,明确病原体感染,对临床治疗具有重要的指导意义,可以避免不

表3 病毒检出阳性与病毒检出阴性的患儿临床特征比较 [n(%)]

Table 3 Comparison of clinical characteristics of children with positive and negative virus detection [n(%)]

临床特征	病毒阳性组(n=124)	病毒阴性组(n=229)	Z/ χ^2 值	P值
年龄[M(P ₂₅ ~P ₇₅)](天)	1.21(0.83, 1.75)	1.42(1, 2)	-2.536	0.011
病程[M(P ₂₅ ~P ₇₅)](天)	7(5.25, 8)	6(5, 7)	-0.290	0.772
住院天数[M(P ₂₅ ~P ₇₅)](天)	6(5, 8)	7(6, 7)	-1.674	0.094
发热天数[M(P ₂₅ ~P ₇₅)](天)	3(2, 5)	4(2, 6)	-0.566	0.475
重症肺炎	11(8.87)	6(2.62)	6.857	0.009
氧疗	25(20.16)	24(10.48)	6.307	0.012
并发症	18(14.52)	29(12.66)	0.239	0.625

必要的抗生素应用,减少患儿的药费开支及耐药菌的产生,对临床诊治儿童反复喘息发作具有重要的指导意义。

参考文献

- [1] 中华医学会儿科学分会呼吸学组. 儿童支气管哮喘诊断与防治指南(2016年版)[J]. 中华儿科杂志, 2016, 54(3):167-181.
- [2] Ma, Z, Deng, H, Hua, L, et al. Suspension microarray - based comparison of oropharyngeal swab and bronchoalveolar lavage fluid for pathogen identification in young children hospitalized with respiratory tract infection[J]. BMC Infect Dis, 2020, 168(20).
- [3] Bacharier LB, Bomer A, Carlsen KH, et al. Diagnosis and treatment of asthma in childhood: a PRACTALL consensus report[J]. Allergy, 2008, 63(1):5-34.
- [4] Ralston SL, Lieberthal AS, Meissner HC, et al. Clinical practice guideline: the diagnosis, management, and prevention of bronchiolitis[J]. Pediatrics, 2014, 134(5):e11474-e1502.
- [5] 钱胜华, 张莉, 王晓花, 等. 5岁以下儿童反复喘息发作呼吸道病原分析[J]. 临床肺科杂志, 2016, 21(12):2249-2251.
- [6] 唐铭钰, 李锦, 赵瑞柯, 等. 6岁以下儿童急性喘息性疾病病原学与临床特点分析[J]. 中国感染与化疗杂志, 2018, 18(4):365-371.
- [7] 王宇清, 季伟, 严永东, 等. 1527例喘息住院患儿病毒病原学分析[J]. 临床儿科杂志, 2012, 30(12):1144-1149.
- [8] 陶珊. 小儿重症肺炎不同病原抗原及抗体IgM抗体检测特点及流行趋势分析[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(4):492-496.
- [9] Jornist I, Muhsen K, Ram D, et al. Characterization of human parainfluenza virus-3 circulating in Israel, 2012-2015[J]. J Clin Virol, 2018, 107:19-24.
- [10] Kawaguchi A, Bates A, Lee BE, et al. Virus detection in critically ill children with acute respiratory disease: a new profile in view of new technology[J]. Acta Paediatr, 2018, 107(3):504-510.
- [11] Liu WK, Liu Q, Chen DH, et al. Epidemiology of HBoV1 infection and relationship with meteorological conditions in hospitalized pediatric with acute respiratory illness: a 7-year study in a subtropical region[J]. BMC Infect Dis, 2018, 18:329.
- [12] Qaisry LM, Meqdam MM, Alkhateeb A, et al. Human metapneumovirus in Jordan: prevalence and clinical symptoms in hospitalized pediatric patients and molecular virus characterization[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2012 74(3):288-291.
- [13] Olofsson S, Brittain-LONG R, Andersson LM, et al. PCR for detection of respiratory viruses: seasonal variations of virus infections[J]. Expert Rev Anti Infect Ther, 2011, 9(8):615-626.
- [14] Bierbaum S, Konigsfeld N, Besazza N, et al. Performance of a novel microarray multiplex PCR for the detection of 23 respiratory pathogens (SYMP-ARI study)[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2012, 31(10):2851-2861.
- [15] Poritz MA, Blaschke AJ, Byington CL, et al. FilmArray, an automated nested multiplex PCR system for multi-pathogen detection: development and application to respiratory tract infection[J]. PLoS One, 2011, 6(10):e26047.
- [16] 严华杰, 盛军, 邵洁. 呼吸道常见病毒和新型病毒感染与婴幼儿喘息性疾病的关系[J]. 临床儿科杂志, 2009, 27(9):891-892+898.

(上接第194页)

- [5] 中华医学会, 中华医学会儿科学分会, 中华医学杂志社. 中华医学会儿科学分会临床诊疗指南(2018版)[J]. 肿瘤研究与临床, 2018, 30(12):793-824.
- [6] 郭小琦, 刘宏涛, 梁英平. 小细胞肺癌组织中 MIP-3 α 和 CCR6 表达与术后复发转移及预后的关系[J]. 医学分子生物学杂志, 2019, 16(6):575-581.
- [7] 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.
- [8] Xu S, Shi L. High expression of miR-155 and miR-21 in the recurrence or metastasis of non-small cell lung cancer[J]. Oncol Lett, 2019, 18(1):758-763.
- [9] Tseng JS, Yang TY, Wu CY, et al. Characteristics and Predictive Value of PD-L1 Status in Real-World Non-Small Cell Lung Cancer Patients[J]. J Immunother, 2018, 41(6):1.
- [10] Deng J, Hou G, Fang Z, et al. Distinct expression and prognostic value of OTU domain-containing proteins in non-small cell lung cancer[J]. Oncol Lett, 2019, 18(5):5417-5427.
- [11] Zeng Z, Yang Y, Qing C, et al. Distinct expression and prognostic value of members of SMAD family in non-small cell lung cancer[J]. Medicine, 2020, 99(10):e19451.
- [12] 林珊, 孟玲楠, 珊丹, 等. EGFR 靶向抑制剂 ZD1839 联合放疗对非小细胞肺癌细胞凋亡的影响及其机制研究[J]. 解放军医药杂志, 2019, 31(3):34-38.
- [13] 吴明彬, 谢卫民, 谢金龙, 等. 洛铂和顺铂分别联合吉西他滨治疗晚期肺癌的疗效比较[J]. 保健医学研究与实践, 2018, 15(4):63-65.
- [14] Wang L, Li WY, Li FF, et al. Bioinformatics Analysis of HKDC1 Expression in Non-small Cell Lung Cancer and Its Relationship to Survival[J]. J Nutritional Oncol, 2020, 5(1):34-42.
- [15] Woodford R, Loh Y, Lee J, et al. Predictive value of PD-L1 and other clinical factors for chemioimmunotherapy in advanced non-small-cell lung cancer[J]. Future Oncol, 2019, 15(2):473-476.

• 论 著 •

LPA、Hcy、MCP-1 与缺血性脑卒中患者神经损伤和侧支循环的关系

吴国访^{1*} 张丽¹ 张淑沛¹ 段红霞¹ 易正辉²

[摘要] **目的** 探讨缺血性脑卒中患者血清溶血磷脂酸(LPA)、同型半胱氨酸(Hcy)、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)水平与神经功能缺损程度及侧支循环形成的关系。**方法** 选取2017年3月至2020年8月本医院神经内科收治的缺血性脑卒中患者108例为研究组,按照2:1比例选择同期54例健康体检者作为对照组。检测所有患者和健康者的血清LPA、Hcy、MCP-1水平,分析缺血性脑卒中患者血清LPA、Hcy、MCP-1水平与NIHSS评分的相关性,采取受试者工作曲线(ROC)分析血清LPA、Hcy、MCP-1对侧支循环良好的预测价值,记录曲线下面积(AUC值)。**结果** 研究组患者血清LPA、Hcy、MCP-1水平明显高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。各亚组间患者血清LPA、Hcy、MCP-1水平比较,轻度损伤组<中度损伤组<重度损伤组,差异有统计学意义($P<0.05$)。Pearson相关分析结果显示,血清LPA、Hcy、MCP-1水平与NIHSS评分呈显著正相关($P<0.05$)。侧支循环良好组血清LPA、Hcy、MCP-1水平明显低于侧支循环不良组,差异有统计学意义($P<0.05$)。ROC曲线分析结果显示,血清LPA、Hcy、MCP-1预测侧支循环良好的AUC值分别为0.834、0.847、0.858,敏感度分别为71.43%、80.36%、87.50%。**结论** 缺血性脑卒中患者血清LPA、Hcy、MCP-1高表达,三者均能反映神经功能缺损程度,或可作为判断侧支循环形成是否良好的生物学指标。

[关键词] 缺血性脑卒中;溶血磷脂酸;同型半胱氨酸;单核细胞趋化蛋白-1

Relationship between LPA, Hcy and MCP-1 and neurological injury and collateral circulation in patients with ischemic stroke

WU Guofang^{1*}, ZHANG Li¹, ZHANG Shupai¹, DUAN Hongxia¹, YI Zhenghui²

(1. Department of Neurology, Luohe Sixth People's Hospital, Luohe, Henan, China, 462000; 2. Mental Health Center Affiliated to Medical College of Shanghai Jiaotong University, Shanghai, China, 201100)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the relationship between levels of serum lysophosphatidic acid (LPA), homocysteine (Hcy) and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and neurological deficit degree and collateral circulation formation in patients with ischemic stroke. **Methods** 108 patients with ischemic stroke admitted to the Department of this Hospital between March 2017 and August 2020 were selected as the study group, and another 54 healthy people with physical examination during the same period were selected as the control group according to a 2:1 ratio. The levels of serum LPA, Hcy and MCP-1 were detected among all patients and healthy people. The correlation between levels of serum LPA, Hcy and MCP-1 and NIHSS score was analyzed among patients with ischemic stroke, and receiver operating characteristic curve (ROC) was used to analyze the predictive value of serum LPA, Hcy and MCP-1 on good collateral circulation, and the area under the curve (AUC value) was recorded. **Results** The levels of serum LPA, Hcy and MCP-1 in patients with ischemic stroke were significantly higher than those in healthy people ($P<0.05$). Comparison of se-

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81171272)

作者单位:1.漯河市第六人民医院神经内科,河南,漯河 462000

2.上海交通大学医学院附属精神卫生中心,上海 201100

*通信作者:吴国访, E-mail: fenmu8465703909980@163.com

rum LPA, Hcy and MCP-1 levels among patients in each subgroup showed that the mild injury group < the moderate injury group < the severe injury group ($P<0.05$). Pearson correlation analysis results show that the levels of serum LPA, Hcy and MCP-1 are significantly positively correlated with the NIHSS score ($P<0.05$). The levels of serum LPA, Hcy and MCP-1 in the good collateral circulation group were significantly lower than those in the poor collateral circulation group ($P<0.05$). ROC curve analysis results showed that the AUC values of serum LPA, Hcy and MCP-1 in predicting good collateral circulation were 0.834, 0.847 and 0.858 respectively, and the sensitivities were 71.43%, 80.36% and 87.50%. **Conclusion** Serum LPA, Hcy and MCP-1 are highly expressed in patients with ischemic stroke, all of which can reflect the degree of neurological deficits, or can be used as biological indicators to judge whether the formation of collateral circulation is good.

[KEY WORDS] Ischemic stroke; Lysophosphatidic acid; Homocysteine; Monocyte chemoattractant protein-1

缺血性脑卒中是脑血管狭窄或闭塞造成脑组织缺血缺氧性坏死而导致的一种脑血管疾病,在老年人群中发生率较高,且致死率、致残率较高,对患者生命健康构成严重威胁^[1]。缺血性脑卒中患者神经功能缺损程度与侧支循环形成密切相关,研究侧支循环形成情况对治疗有一定指导意义,有利于改善病人的生存状态^[2]。除影像学检查外,血清指标检测在临床操作简便、迅速,应用较为广泛,寻找合适的判断脑卒中病情严重程度的生化指标在临床有重要意义。溶血磷脂酸(Lysophosphatidic acid, LPA)可促进血小板聚集和血栓形成,减少脑组织血供^[3];同型半胱氨酸(Homocysteine, Hcy)与动脉粥样硬化有关,在脑卒中发生发展中起到一定作用^[4];单核细胞趋化蛋白-1(Monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)可影响血供,加重脑组织损伤^[5]。基于此,本研究将探讨缺血性脑卒中患者血清 LPA、Hcy、MCP-1 水平与神经功能缺损程度及侧支循环形成的关系,以期对疾病的治疗和预后评估提供一定参考依据,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

随机选取 2017 年 3 月至 2020 年 8 月本院神经内科收治的缺血性脑卒中患者 108 例。纳入标准:①符合缺血性脑卒中的诊断标准^[6],经 CT 或 MRI 检查确诊;②均为首次发病;③患者及家属知情同意。排除标准:①合并多脏器损伤或恶性肿瘤者;②合并甲状腺功能异常或心血管疾病者;③合并急性颅脑损伤或急性感染者;④入组前接受抗凝、抗血栓治疗者;⑤合并精神性疾病者;⑥妊娠期或哺乳期妇女。108 例患者中男 60 例,女 48 例,平均年龄(56.87 ± 11.03)岁,平均体重(62.47 ± 14.42)

kg。按照 2:1 比例选择同期 54 例健康体检者作为对照,均无心脑血管疾病,其中男 33 例,女 21 例,平均年龄(56.87 ± 11.03)岁,平均体重(62.47 ± 14.42)kg。两组患者基线资料比较差异无统计学意义($P>0.05$)。本研究经医院医学伦理委员会批准,受试者均签署知情同意书。

1.2 分组情况

患者入院当天,受过培训的护士采取美国国立卫生研究院卒中量表(National Institutes of Health Stroke Scale, NIHSS)^[7]对患者神经功能损伤程度作出评估:分为轻度损伤 37 例、中度损伤 39 例、重度损伤 32 例。

侧支循环形成情况参考《缺血性卒中脑侧支循环评估与干预中国指南(2017)》^[8]中相关标准分为:0 级、1 级、3 级、4 级。108 例患者分组情况:侧支循环良好组 56 例、侧支循环不良组 52 例。

1.3 检测方法

研究组患者入院第 2 d、对照组健康者体检时采集清晨肘静脉血 3 mL,常规分离血清待检。用酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测 LPA、Hcy、MCP-1 水平,LPA 试剂盒由上海一研生物科技有限公司提供,Hcy 试剂盒由上海信裕生物科技有限公司提供,MCP-1 试剂盒由上海将来实业股份有限公司提供。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 21.0 软件进行统计分析,计量数据以($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采取 t 检验,多组间比较采取单因素方差分析;采取 Pearson 相关分析血清 LPA、Hcy、MCP-1 水平与 NIHSS 评分的相关性;采取受试者工作曲线(ROC)分析血清 LPA、Hcy、MCP-1 对侧支循环良好的预测价值。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组血清 LPA、Hcy、MCP-1 水平比较

研究组患者血清 LPA、Hcy、MCP-1 水平明显高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

表 1 两组血清 LPA、Hcy、MCP-1 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of levels of serum LPA, Hcy and MCP-1 between 2 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	LPA ($\mu\text{mol/L}$)	Hcy ($\mu\text{mol/L}$)	MCP-1 ($\mu\text{g/L}$)
缺血性脑卒中	108	2.74 $\pm$ 0.80	24.55 $\pm$ 7.91	161.56 $\pm$ 55.43
健康者	54	0.84 $\pm$ 0.21	12.30 $\pm$ 3.43	85.64 $\pm$ 17.58
<i>t</i> 值		17.135	10.868	9.808
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001

2.2 不同程度神经功能缺损者血清 LPA、Hcy、MCP-1 水平比较

各亚组间患者血清 LPA、Hcy、MCP-1 水平比较,轻度损伤<中度损伤<重度损伤,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 2。

表 2 不同程度神经功能缺损者血清 LPA、Hcy、MCP-1 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of levels of serum LPA, Hcy and MCP-1 in patients with different degrees of neurological deficit ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	LPA ($\mu\text{mol/L}$)	Hcy ($\mu\text{mol/L}$)	MCP-1 ($\mu\text{g/L}$)
轻度损伤	37	2.08 $\pm$ 0.50	17.57 $\pm$ 3.73	114.74 $\pm$ 26.86
中度损伤	39	2.73 $\pm$ 0.50	25.48 $\pm$ 4.80	160.26 $\pm$ 36.12
重度损伤	32	3.51 $\pm$ 0.70	31.48 $\pm$ 7.93	217.27 $\pm$ 48.45
<i>F</i> 值		54.811	53.177	63.901
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001

2.3 缺血性脑卒中患者血清 LPA、Hcy、MCP-1 水平与 NIHSS 评分的相关性分析

Pearson 相关分析结果显示,血清 LPA、Hcy、MCP-1 水平与 NIHSS 评分呈正相关($r=0.496$ 、 0.452 、 0.623 , $P<0.05$)。

2.4 侧支循环良好与不良者血清 LPA、Hcy、MCP-1 水平比较

侧支循环良好者血清 LPA、Hcy、MCP-1 水平明显低于侧支循环不良者,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 3。

2.5 血清 LPA、Hcy、MCP-1 对侧支循环良好的预测

价值分析 ROC 曲线分析结果显示,血清 LPA、Hcy、MCP-1 预测侧支循环良好的 AUC 值分别为 0.834、0.847、0.858,敏感度分别为 71.43%、80.36%、87.50%。见表 4 和图 1。

表 3 侧支循环良好与不良者血清 LPA、Hcy、MCP-1 水平比较

Table 3 Comparison of levels of serum LPA, Hcy and MCP-1 between patients with good and poor collateral circulation ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	LPA ($\mu\text{mol/L}$)	Hcy ($\mu\text{mol/L}$)	MCP-1 ($\mu\text{g/L}$)
侧支循环良好	56	2.30 $\pm$ 0.59	20.04 $\pm$ 5.35	128.71 $\pm$ 33.54
侧支循环不良	52	3.21 $\pm$ 0.74	29.40 $\pm$ 7.36	196.93 $\pm$ 52.67
<i>t</i> 值		7.091	7.587	8.088
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001

表 4 血清 LPA、Hcy、MCP-1 对侧支循环良好的预测价值

Table 4 Analysis of predictive value of serum LPA, Hcy and MCP-1 on good collateral circulation

指标	截断值	AUC	敏感度 (%)	特异度 (%)	约登指数	95%CI
LPA	2.59	0.834	71.43	80.77	0.5220	0.751~0.899
Hcy	24.22	0.847	80.36	78.85	0.5920	0.765~0.909
MCP-1	166.20	0.858	87.50	75.00	0.6250	0.778~0.9918

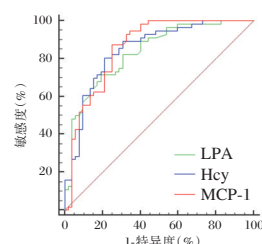


图 1 血清 LPA、Hcy、MCP-1 预测侧支循环良好的 ROC 曲线

Figure 1 ROC curves of serum LPA, Hcy and MCP-1 in predicting good collateral circulation

3 讨论

缺血性脑卒中患者由于脑血供不足而出现相应的神经功能缺损,其严重程度可根据 NIHSS 评分进行简单的评估。人体代偿机制作用下,大脑形成侧支循环,可在一定程度上缓解脑组织缺血状态,对病情严重程度有一定影响,因此研究侧支循环形成情况对患者的治疗有重要意义。

LPA 是具有广泛生物学效应的溶血磷脂家族中的一种多功能磷酸信使,既参与膜磷脂水解,也可参与三酰甘油形成。LPA 通过调节活化血小板、可溶性纤维蛋白受体促进血小板与可溶性纤维蛋白原结合,为血栓形成及血小板聚集提供基础条件,因此血清 LPA 水平升高会增加脑血管发生狭窄或闭塞的可能性,可作为脑卒中早期发生的标志物^[9]。本研究结果显示,脑卒中患者血清 LPA 高表达,其水平与 NIHSS 评分成正相关,即与脑卒中病情进展密切相关,与李在坡等学者^[10]得

到的结论类似。分析原因认为,LPA存在于动脉粥样斑块脂质中心内,是导致血栓形成的易脱落部分,其在血清中表达越高则脑卒中的风险越高,病情越严重,LPA检测有助于判断脑卒中患者的斑块情况和神经功能损伤情况。

Hcy作为一种含硫氨基酸,通过促进血管平滑肌细胞增殖导致血管痉挛和动脉硬化,且能促进趋化因子和细胞粘附分子表达,从而加速动脉硬化进展^[11]。同时,Hcy可加快血小板聚集并促进纤维蛋白原形成,导致凝血发生;此外,其可促进血栓素A₂生成损伤血管内皮细胞,加速脂质、钙在动脉管壁中的沉积,有利于脑卒中的发生和发展^[12]。本研究结果显示,缺血性脑卒中患者血清Hcy高表达,其水平与NIHSS评分成正相关,与王婷等学者^[13]的研究报道较为一致,即病情越严重则Hcy在血清中表达越高,Hcy检测有助于判断脑卒中患者的神经功能缺损情况。

MCP-1是一种参与机体炎症反应和免疫调节过程中的趋化因子,正常生理状态下在血清中表达极低。脑组织发生缺血缺氧性损伤时,机体在自由基诱导下促使神经细胞、巨噬细胞、内皮细胞分泌MCP-1,通过提高黏附分子表达影响脑组织血供,又进一步加重脑组织损伤^[14]。本研究结果显示,缺血性脑卒中患者血清MCP-1高表达,其水平与NIHSS评分成正相关,与毛从答等学者^[15]得到的结论一致,证实了病情越严重则MCP-1在血清中表达越高,该指标检测有助于脑卒中的临床诊断和治疗。

综上所述,缺血性脑卒中患者血清LPA、Hcy、MCP-1高表达,三者均能反映神经功能缺损程度,未来或可作为判断侧支循环形成是否良好的生物学指标,检测上述血清指标有助于判断患者病情严重程度,对临床治疗有一定的指导意义。

参考文献

- [1] 袁大华,杜朴,王玉凯.血清PTX-3、CTRP9、MIF水平与缺血性脑卒中患者神经功能及短期预后的关系[J].分子诊断与治疗杂志,2020,12(7):935-939.
- [2] Semerano A, Laredo C, Zhao Y, et al. Leukocytes, Collateral Circulation, and Reperfusion in Ischemic Stroke Patients Treated With Mechanical Thrombectomy [J]. Stroke, 2019, 50(12):3456-3464.
- [3] Weiss HR, Mellender SJ, Kiss GK, et al. Lysophosphatidic Acid Reduces Microregional Oxygen Supply/Consumption Balance after Cerebral Ischemia-Reperfusion [J]. J Vasc Res, 2020, 57(4):178-184.
- [4] 戴艺,刘丽,欧燕,等.冠心病心绞痛患者经冠心舒通胶囊治疗后Hcy、FIB和CRP的变化[J].分子诊断与治疗杂志,2020,12(7):948-951.
- [5] Georgakis MK, Malik R, Björkbacka H, et al. Circulating Monocyte Chemoattractant Protein-1 and Risk of Stroke: Meta-Analysis of Population-Based Studies Involving 17 180 Individuals [J]. Circ Res, 2019, 125(8):773-782.
- [6] 中华医学会神经病学分会,中华医学会神经病学分会脑血管病学组.中国急性缺血性脑卒中诊治指南2014[J].中华神经科杂志,2015,48(4):246-257.
- [7] Hwang J, Lee MJ, Chung JW, et al. NIHSS sub-item scores predict collateral flow in acute middle cerebral artery infarction [J]. Interv Neuroradiol, 2018, 24(6):678-683.
- [8] 中国卒中学会脑血流与代谢分会.缺血性卒中脑侧支循环评估与干预中国指南(2017)[J].中华内科杂志,2017,56(6):460-471.
- [9] Ueda H. Lysophosphatidic Acid Receptor Signaling Underlying Chronic Pain and Neuroprotective Mechanisms through Prothymosin α [J]. Yakugaku Zasshi, 2019, 139(11):1403-1415.
- [10] 李在坡,李娇娇,李娟,等.急性缺血性脑卒中患者血清PARK7、D-D、LPA水平变化及意义[J].山东医药,2017,57(44):58-60.
- [11] Larsson SC, Traylor M, Markus HS. Homocysteine and small vessel stroke: A mendelian randomization analysis [J]. Ann Neurol, 2019, 85(4):495-501.
- [12] Wang M, Liang X, Cheng M, et al. Homocysteine enhances neural stem cell autophagy in in vivo and in vitro model of ischemic stroke [J]. Cell Death Dis, 2019, 10(8):561.
- [13] 王婷,白琳,熊飞.老年缺血性脑卒中后疲劳病人神经功能及远期预后的相关因素分析[J].实用老年医学,2019,33(9):871-875.
- [14] 秦慧兵,张保朝,张小林,等.血清MCP-1、HMGB1、APN、oxLDL水平与老年脑梗死病情及颈动脉粥样硬化关系[J].华南预防医学,2020,46(1):79-82.
- [15] 毛从答,李玲玲,牛兆青,等.血清RBP4、MCP-1、SAA水平变化与缺血性脑卒中老年患者NIHSS评分的相关性[J].武警医学,2019,30(8):693-696.

· 论 著 ·

BNP、Hb 及 FIB 联合检测对孕晚期产妇产后出血的预测价值

李小芝^{1*} 唐连敏¹ 付翠芳¹ 薛云² 姚莉芸¹

[摘要] **目的** 探讨外周血脑钠肽(BNP)、血红蛋白(Hb)及纤维蛋白原(FIB)联合检测对孕晚期产妇产后出血的预测价值研究。**方法** 收集2017年3月至2019年3月本院收治的65例产后出血产妇的临床资料(观察组),选取同期自然分娩未发生产后出血的70例产妇设为对照组。对比两组产妇孕晚期BNP、Hb、FIB水平,分析产后严重出血及产后一般出血的产妇的BNP、Hb、FIB水平;以Logistic回归模型分析影响孕晚期产妇产后出血的危险因素,绘制ROC曲线分析BNP、Hb、FIB检测及三者联合检测对孕晚期产妇产后出血的预测价值。**结果** 观察组产妇BNP水平高于对照组,Hb、FIB水平低于对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。产后普通出血产妇BNP水平低于产后严重出血产妇,Hb、FIB水平低于对高于产后严重出血产妇,差异均统计学意义($P<0.05$)。前置胎盘、宫缩乏力、胎儿体质量、BNP、Hb、FIB为影响产妇产后出血的单因素($P<0.05$);进一步分析得出:前置胎盘、宫缩乏力、BNP、Hb、FIB为影响产妇产后出血的独立危险因素($P<0.05$)。采用ROC曲线分析BNP、Hb、FIB及三者联合检测孕晚期产妇产后出血的诊断价值,BNP、Hb、FIB及三者联合曲线下面积分别为0.879、0.902、0.831、0.988,联合下面积曲线检测最大。**结论** 孕晚期测定产妇外周血BNP、Hb、FIB水平对其产后出血的发生有较大预测价值,联合检测上述指标对保障产妇生命安全有重要意义。

[关键词] BNP; Hb; FIB; 孕晚期产妇; 产后出血

Predictive value of the combined detection of BNP, Hb and FIB for postpartum hemorrhage of women in their third trimester

LI Xiaozhi^{1*}, TANG Lianmin¹, FU Cuifang¹, XUE Yun², YAO Liyun¹

(1. Department of Obstetrics, the Third Hospital of Xingtai, Xingtai, Hebei, China, 054000; 2. Department of Laboratory Medicine, the Third Hospital of Xingtai, Xingtai, Hebei, China, 054000)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the predictive value of the combined detection of peripheral blood brain natriuretic peptide (BNP), hemoglobin (Hb) and fibrinogen (FIB) for postpartum hemorrhage of women in their third trimester. **Methods** The clinical data of 65 women with postpartum hemorrhage admitted to this hospital from March 2017 to March 2019 were selected, and 70 women who had no postpartum hemorrhage during natural delivery were selected as the controls group. The levels of BNP, Hb, and FIB of women in their third trimester between the two groups were measured and compared. Logistic regression model was used to analyze the risk factors of postpartum hemorrhage of the women in the third trimester, and the ROC curve was drawn to analyze the predictive value of BNP, Hb, FIB and the combined detection of the three for postpartum hemorrhage of the women in their third trimester. **Results** Maternal BNP levels in the observation group were higher than those in the control group, and Hb and FIB levels were lower than those in the control group and the differences were statistically significant ($P<0.05$). The level of BNP in women with

基金项目:邢台市科技支撑计划项目(2018ZC115)

作者单位:1.邢台市第三医院产科,河北,邢台 054000

2.邢台市第三医院检验科,河北,邢台 054000

*通信作者:李小芝, E-mail:rongning903917@163.com

ordinary hemorrhage after delivery was lower than that in women with severe postpartum hemorrhage and the levels of Hb and FIB were lower than those in women with severe hemorrhage after delivery, the differences were statistically significant ($P<0.05$). Placenta previa, uterine inertia, fetal body weight, BNP, Hb, FIB were the single factors that affected postpartum hemorrhage ($P<0.05$). The conditional single factors were selected, and further analysis shows that placenta previa, uterine inertia, BNP, Hb, and FIB are independent risk factors affecting postpartum hemorrhage ($P<0.05$). The ROC curve was used to analyze the diagnostic value of BNP, Hb, FIB and the three combined detection for postpartum hemorrhage of women in their third trimester. The area under the curve of BNP, Hb, FIB and the three combined curves were 0.879, 0.902, 0.831, 0.988, respectively, and the area under the combined curve was the largest. **Conclusion** The determination of the levels of BNP, Hb and FIB in the peripheral blood of the parturient during the third trimester has a greater predictive value for the occurrence of postpartum hemorrhage. The combined detection of the above indicators is of great significance to guarantee the life safety of the parturient.

[KEY WORDS] BNP; Hb; FIB; Parturient in late pregnancy; Postpartum hemorrhage

产后出血是产妇分娩过程中最为严重的并发症,相关研究指出在全球孕产妇死亡病例中,有25%的病例因产后出血所致,因此产后出血为导致全球孕产妇死亡的一大重要原因^[1]。有学者发现,有一半以上的产妇无明确诱因出现产后出血,导致临床产后出血的预防工作难以展开,如何监测并有效预防产妇产后出血成为广大临床工作者研究的热点^[2-3]。既往研究认为,产妇产后出血各种凝血指标的变化是导致产后出血的主要原因之一,纤维蛋白原、血红蛋白(Hemoglobin, Hb)等指标维持在正常水平,可为减少产后出血提供了一种生理性防御屏障^[4]。但脑钠肽(Brain Natriuretic Peptide, BNP)水平变化对影响产妇产后出血的相关研究较少。深入分析妊娠期凝血指标变化情况,有助于对多种妊娠期并发症的预防、诊断及治疗。纤维蛋白原(Fibrinogen, FIB)是临床常用的评估凝血酶活性的一个重要指标,有学者提出FIB的变化是导致产妇产后出血的原因之一^[5]。本研究将探讨Hb、BNP、FIB联合检测对孕晚期产妇产后出血的预测价值,为临床提供理论依据,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集2017年3月至2019年3月本院收治的65例产妇产后出血作为观察组。平均年龄(25.17 ± 1.12)岁;其中产后严重出血需进行输血治疗的有27例,产后普通出血38例;出血量500~1 081 mL,平均出血量(710.14 ± 112.47)mL; BMI指数平均(25.81 ± 1.52) kg/m²; 妊娠周期37~42周,平均(40.25 ± 0.58)周。

选取同期自然分娩未发生产后出血的70例产妇设为对照组,平均年龄(26.17 ± 1.12)岁, BMI指数,平均(25.87 ± 1.58) kg/m²; 妊娠周期38~43周,平均(40.32 ± 0.60)周。两组产妇的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,受试者签署知情同意书。

纳入标准:①均符合产后出血诊断标准(胎儿分娩后产妇出血量 >500 mL)^[6];②孕24周后产检记录完整,纳入研究前2个月未服用过抗凝或促凝药物;③产妇及胎儿在妊娠期经B超检查正常(无胎盘形态、位置异常)。排除标准:①合并妊娠期糖尿病、高血压、心脏病者,凝血功能障碍者;②合并血液系统疾病者;③合并心、肝、肾等重要器官严重疾病者;④流产史、既往胎盘粘连史。

1.2 方法

在产妇产32~33周期间,纳入研究的对象均在次日清晨空腹抽取静脉血3 mL, 3 000 r/min离心,持续5 min分离血清及血浆,样本置于-20℃下保存待检。采用STA Cimpact Max全自动凝血分析仪及配套试剂盒检测BNP、Hb,采用日本SYS-MEX CA7000全自动凝血分析仪及配套试剂盒检测FIB水平。使用样本均在采集2 h内完成检测,相关操作严格按照实验流程进行。

1.3 观察指标

①对比两组产妇产后BNP、Hb、FIB水平,同时比较产后严重出血及产后一般出血的产妇产后BNP、Hb、FIB水平。②以Logistic回归模型分析影响孕晚期产妇产后出血的危险因素,采用ROC曲线分析BNP、Hb、FIB检测及三者联合检测对孕晚期产妇产后出血的预测价值。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析, 计量资料采用 $(\bar{x} \pm s)$ 描述, 采用 t 检验; 通过 Logistic 回归模型分析影响孕晚期产妇产后出血的危险因素, 绘制 ROC 曲线分析 BNP、Hb、FIB 及三者联合对孕晚期产妇产后出血的预测价值以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组产妇 BNP、Hb、FIB 水平比较

观察组产妇 BNP 水平高于对照组, Hb、FIB 水平低于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 两组产妇 BNP、Hb、FIB 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	BNP (pg/mL)	Hb (g/L)	FIB (g/L)
对照组	70	122.47±20.54	117.85±29.85	4.92±0.80
观察组	65	345.57±41.25	107.54±27.55	4.43±0.73
<i>t</i> 值	—	41.829	2.081	3.708
<i>P</i> 值	—	<0.001	0.039	<0.001

2.2 产后严重出血与产后普通出血产妇 BNP、Hb、FIB 水平比较

产后普通出血产妇 BNP 水平低于产后严重出血产妇, Hb、FIB 水平高于对高于产后严重出血产妇, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 产后严重出血与普通出血产妇 BNP、Hb、FIB 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	BNP (pg/mL)	Hb (g/L)	FIB (g/L)
产后普通出血	38	288.68±34.65	120.57±8.59	4.74±0.88
产后严重出血	27	371.41±47.85	114.12±7.14	4.25±0.79
<i>t</i> 值	—	8.092	3.194	2.307
<i>P</i> 值	—	<0.001	0.002	0.024

2.3 影响产妇产后出血的危险因素分析

前置胎盘、宫缩乏力、胎儿体质量、BNP、Hb、FIB 为影响产妇产后出血的单因素 ($P < 0.05$); 进一步分析得出: 前置胎盘、宫缩乏力、BNP、Hb、FIB 为影响产妇产后出血的独立危险因素 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 影响产妇产后出血的危险因素分析

Table 3 Risk factors of postpartum hemorrhage

变量	单因素分析			多因素分析		
	OR 值	95%CI	<i>P</i> 值	OR 值	95%CI	<i>P</i> 值
年龄 (<30 岁 vs ≥30 岁)	1.139	0.713~1.513	0.569	—	—	—
产次 (1 次 vs ≥2 次)	1.065	1.912~1.341	0.727	—	—	—
前置胎盘 (是 vs 否)	1.791	1.325~1.616	0.019	1.857	1.257~1.754	0.041
宫缩乏力 (是 vs 否)	1.716	1.236~1.497	0.010	1.598	1.364~1.885	0.023
胎儿体质量 (<4 000 g vs ≥4 000 g)	1.765	1.212~1.535	0.015	1.685	1.268~1.779	0.538
BNP (异常升高 vs 正常)	1.831	1.644~1.972	0.016	1.636	1.365~1.784	0.035
Hb (异常降低 vs 正常)	1.586	1.357~1.867	0.022	1.754	1.452~1.885	0.008
FIB (异常降低 vs 正常)	1.658	1.587~1.575	0.004	1.658	1.369~1.789	0.017

2.4 BNP、Hb、FIB 及三者联合检测孕晚期产妇产后出血的诊断价值

采用 ROC 曲线分析 BNP、Hb、FIB 及三者联合曲线下面积分别为 0.879、0.902、0.831、0.988, 各指标曲线下面积以联合检测最大。见表 4、图 1。

3 讨论

严重产后出血因失血量过多, 可能会导致产妇产后出现心动过速、呼吸急促、血压降低等症状, 随着出血量的持续增多, 失血性休克、产褥感染、产后贫血及器官功能衰竭等并发症对产妇及胎儿的生命健康造成严重威胁。因导致产后出血的原因难以预测, 临床医护人员无法采取相应的预防产后出血的有效措施, 导致孕产妇及围生儿因产后大出血的病

表 4 BNP、Hb、FIB 及三者联合检测孕晚期产妇产后出血的诊断价值

Table 4 Diagnostic value of BNP, Hb, FIB and combined detection of BNP, Hb, FIB in late pregnancy women with postpartum hemorrhage

预测指标	最佳临界值	灵敏度 (%)	特异度 (%)	AUC	95%CI
BNP	25.10	0.619	0.628	0.879	0.778~0.981
Hb	26.41	0.720	0.735	0.902	0.809~0.996
FIB	25.42	0.758	0.714	0.831	0.718~0.944
三者联合检测	27.59	0.895	0.899	0.988	0.900~1.000
预测指数模型	1.586	0.587	0.760	0.7689	0.741~0.865

死亡率较高。国外研究认为, 大部分因产后出血所致的产妇死亡病例中, 是诊断延误所导致^[7]。因此, 如何及时发现导致产妇产后出血的危险因素并采取干预措施是妇产科医生亟待解决的一大难题。

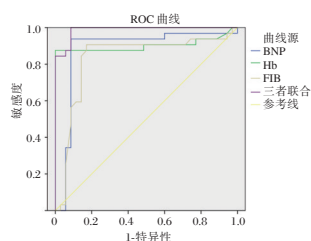


图1 BNP、Hb、FIB及三者联合检测孕晚期产妇产后出血的诊断价值

Figure 1 The diagnostic value of BNP, Hb, FIB and their combination in the detection of postpartum hemorrhage in late pregnancy

多数学者认为,重点关注孕晚期产妇凝血功能相关指标、凝血纤溶指标水平变化情况,对预测产妇产后出血有重要价值^[8-9]。有学者研究指出,孕晚期产妇血小板稀释,部分凝血纤溶指标会呈上升趋势^[10]。血浆纤维蛋白原英文缩写为FIB,又名第一因子纤维蛋白原,是血浆中的糖蛋白,由肝细胞合成,在转换成纤维蛋白后可诱导血小板活化,增加血液粘稠度,具有高效止血功能^[11]。既往学者报道,FIB浓度与产后出血发生率及严重程度密切相关^[12]。本研究结果与Naihao L等^[13]学者报道结果相似。血浆Fib水平升高,则提示血液处于高凝状态,纤维蛋白形成较多,有利于预防出血;严重出血产妇体内FIB水平下降,是由于其血液高凝状态代偿严重不足所致,易发生产后出血。

Hb是一种负责运输氧气的蛋白,其表达水平会随着氧气浓度的变化而变化,相关研究显示严重产后出血的产妇Hb水平比普通产后出血产妇低,但产后出血组与产后未出现产妇Hb水平比较差异无统计学意义^[14]。这与本研究存在一定差入,考虑为本研究中纳入样本量较少,实验结果存在偏倚所致。本研究结果显示,观察组产妇BNP水平高于对照组,产后严重出血产妇BNP水平高于产后普通出血产妇,这一研究结果与Hsieh J Y^[15]等报道结果一致。分析其原因:BNP表达增高会刺激血管扩张,降低局部循环阻力,从而提高产妇产后出血机率。

由于本研究纳入时间较短,且产妇分娩后产后出血量的计算普遍存在误差,BNP、Hb、FIB水平变化对预测低危产妇产后出血的诊断价值仍有待进一步研究,后续将进一步扩大样本量,丰富实验方法,以获得更有价值的研究结果。

综上所述,孕晚期测定产妇外周血BNP、Hb、FIB水平对其产后出血的发生有较大预测价值,提

示临床工作者对孕晚期产妇需积极检测上述指标水平,有助于及时判断产妇凝血功能情况,并做好备血工作及抢救预案,对降低产妇产后出血,保障产妇及生命安全有重要意义。

参考文献

- [1] 廖琦,李斌,赖成毅.原发性高血压合并心功能不全患者血清BNP、Hcy和炎症因子的表达及影响因素分析[J].解放军医药杂志,2019,31(8):44-48.
- [2] 路春梅,赵云刚,杨旭,等.孕晚期亚临床甲状腺功能异常对孕妇糖代谢及妊娠并发症的影响[J].分子诊断与治疗杂志,2020,12(3):323-326.
- [3] 邓飞涛,欧阳为相,朱剑文,等.早期先兆流产细胞因子的检测及临床价值分析[J].医学分子生物学杂志,2019,16(5):483-486.
- [4] 韩卫全,熊洁.妊娠期糖尿病孕妇孕晚期血糖水平监测的临床价值研究[J].保健医学研究与实践,2016,13(1):38-40.
- [5] Gillissen A, Thomas VDA, Caram-Deelder C, et al. Predictive value of a bleeding score for postpartum hemorrhage[J]. Res Pract Thrombosis Haemost, 2019, 3(2):277-284.
- [6] Mclean K, Parson J, Bernstein I. 1006 variation in late pregnancy total blood volume: implications for blood loss quantification in postpartum hemorrhage[J]. Am J Obstet Gynecol, 2019, 220(1):S647.
- [7] Oshima K, Yokoi A, Shibata S, et al. Investigation of postpartum hemorrhage related to assisted reproductive technology (ART) pregnancy managed by in-hospital midwife care system[J]. J Japan Academy Midwifery, 2018, 32(15):87.
- [8] Adeku MA, Adegbola O, Ajayi GO. The predictive value of serum cancer antigen 125 (CA125) levels on pregnancy outcome in threatened miscarriages[J]. J Perin Med, 2019, 47(7):704-709.
- [9] Xu XD, Tang YQ. Relationship between Brain Natriuretic Peptide and Recurrence of Atrial Fibrillation after Successful Electrical Cardioversion: an Updated Meta-Analysis[J]. Braz J Card joras, 2017, 32(12):530-535.
- [10] Salive ME, Cornoni-Huntley J, Guralnik JM, et al. Anemia and Hemoglobin Levels in Older Persons: Relationship with Age, Gender, and Health Status[J]. J Am Geriatr Soc, 2017, 14(18):489-496.
- [11] Altemose KE, Kumer J, Portale AA, et al. Vitamin D insufficiency, hemoglobin, and anemia in children with chronic kidney disease[J]. Pediatr Nephrol, 2018, 33(11):2131-2136.
- [12] Obón-Santacana M, Lujan-Barroso L, Freisling H, et al. Dietary and lifestyle determinants of acrylamide and glycidamide hemoglobin adducts in non-smoking postmenopausal women from the EPIC cohort[J]. Eur J Nutr, 2017, 56(3):1157-1168.
- [13] Lu NH, Sui YH, Ding Y, et al. Fibrinogen binding-dependent cytotoxicity and degradation of single-walled carbon nanotubes[J]. J Mater Sci Mater Med, 2018, 29(8):115.
- [14] Korte W, Poon MC, Iorio A, et al. Thrombosis in Inherited Fibrinogen Disorders[J]. Trans Med Hemother, 2017, 44(2):70-76.
- [15] Hsieh JY, Smith TD, Meli VS, et al. Differential regulation of macrophage inflammatory activation by fibrin and fibrinogen[J]. Acta Biomater, 2017, 47:14-24.

· 论 著 ·

A组轮状病毒对CaCO₂和HT-29细胞NKCC1表达的影响

王洪丽¹ 陈冠桦² 黄玲² 杨芳英² 许万福^{1,3*}

[摘要] **目的** 探讨A组轮状病毒对CaCO₂和HT-29细胞钠钾氯共转运蛋白1(NKCC1)表达的影响。**方法** 收集临床诊断A组轮状病毒肠炎患儿的粪便及电解质分析的结果。细胞实验分为A组轮状病毒组和PBS对照组,利用Western blotting和实时RT-QPCR分别检测两组对CaCO₂和HT-29细胞NKCC1 mRNA和蛋白水平表达的影响。**结果** A组轮状病毒肠炎患儿的血钠、血氯、血钾平均水平明显低于正常范围值($P<0.05$)。A组轮状病毒组CaCO₂和HT-29细胞中NKCC1 mRNA及蛋白水平的表达均明显低于PBS对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。A组轮状病毒组HT-29细胞中AMPK磷酸化表达水平明显高于PBS对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。A组轮状病毒组加入AMPK抑制剂Compound C后NKCC1蛋白表达明显增高($P<0.05$)。**结论** A组轮状病毒可能通过AMPK负调控CaCO₂和HT-29细胞中NKCC1的表达而引起腹泻。

[关键词] A组轮状病毒;钠钾氯共转运蛋白1;电解质紊乱;腹泻

Effects of human rotavirus A on NKCC1 expression in CaCO₂ and HT-29 cells

WANG Hongli¹, CHEN Guanhua², HUANG Ling², YANG Fangying², XU Wanfu^{1,3*}

(1. Department of Gastroenterology, Guangzhou Women and Children's Medical Center, Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong, China, 510120; 2. Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong, China, 510623; 3. Institute of Pediatrics, Guangzhou Women and Children's Medical Center, Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong, China, 510120)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the effect of human rotavirus A on NKCC1 expression in CaCO₂ and HT-29 cells. **Methods** The human rotavirus A stool samples and blood electrolyte data were collected. The experiment was divided into the human rotavirus A group and the PBS control group. Western blotting and real-time PCR were performed to detect NKCC1 expression at mRNA level and protein level in CaCO₂ and HT-29 and Caco-22 cells treated with human rotavirus A or PBS. **Results** The average levels of blood sodium, blood chloride and blood potassium of children with human rotavirus enteritis in the group were significantly lower than the normal range ($P<0.05$). The expression of NKCC1 mRNA and protein in CaCO₂ and HT-29 cells in the human rotavirus A group was significantly lower than that in the PBS control group, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). The phosphorylation level of AMPK in the HT-29 cells of the human rotavirus A group was significantly higher than that in the PBS control group, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). The expression of NKCC1 protein in A rotavirus group was significantly increased after adding AMPK inhibitor Compound C ($P<0.05$). **Conclusion** Human rotavirus A may cause diarrhea by negatively regulating the expression of NKCC1 in CaCO₂ and HT-29 cells by AMPK signaling pathway.

[KEY WORDS] Human Rotavirus A; Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter; Electrolyte disturbance; Diarrhea

基金项目:广东省医学科研基金项目(A2018395)

作者单位:1. 广州医科大学附属广州市妇女儿童医疗中心消化科, 广东, 广州 510120

2. 广州医科大学, 广东, 广州 510623

3. 广州医科大学附属广州市妇女儿童医疗中心儿研所, 广东, 广州 510120

*通信作者:许万福, E-mail: xushiw123@gmail.com

A组轮状病毒是引起儿童急性腹泻的一种常见病原体,发病急,传染性强,多表现为反复高热,剧烈呕吐及蛋花水样腹泻,导致患儿肠道丢失明显增多,易出现脱水和电解质紊乱^[1-2]。钠钾氯共转运蛋白1($\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ co-transporter 1, NKCC1)是一种帮助钠、钾、氯离子进行主动运输进出细胞的蛋白质,广泛分布在全身,它通过质膜转运1个钠离子、1个离子和2个氯离子,对利尿剂敏感^[3]。据文献显示,葡聚糖硫酸钠盐(Dextran Sulfate Sodium Salt, DSS)结肠炎模型中NKCC1的表达与离子转运功能的变化一致^[4];同时,NKCC1与上皮细胞钠通道一起调节远端结肠的离子和液体转运^[5],提示NKCC1可能是腹泻的治疗靶点^[6]。肠道电解质转运是一个离子分泌和离子吸收过程的动态平衡,这一动态平衡失调可诱导腹泻发生^[7]。近年来,由于A组轮状病毒疫苗的大力推广^[8]和口服补液盐的广泛应用^[9],临床发现因A组轮状病毒感染而导致中重度脱水及电解质紊乱的几率已明显降低,但仍是临床上导致病毒性腹泻的最常见病原。因此,本文拟探讨A组轮状病毒对 CaCO_2 和HT-29细胞NKCC1表达的影响,以期了解A组轮状病毒感染的发病机制。现报道如下。

1 材料和方法

1.1 临床标本

选取2018年6月至2020年6月期间在本院确诊为A组轮状病毒感染性肠炎,需急诊留观或住院治疗的91例患儿。其中男孩53例,女孩38例,平均年龄为 (1.53 ± 1.28) 岁。收集A组轮状病毒肠炎患儿的大便标本,并用磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)稀释并过滤,获取A组轮状病毒的上清液,储存于 -80°C 备用。并收取其在本院急诊留观或住院时留取的电解质检测结果,分析血钠、钾、氯离子水平,进行统计分析。

1.2 试剂和仪器

CaCO_2 和HT-29细胞购自美国模式培养物集存库(American type culture collection, ATCC),胎牛血清购自美国Hyclone公司, Rabbit anti NKCC1 Polyclonal Antibody (Catalog: A11675), phospho-AMPK (AP0116), β -actin 抗体 (Catalog: AC026) 购自美国波士顿 Abclonal 公司。

1.3 细胞培养和处理

CaCO_2 和HT-29细胞培养于DMEM完全培养基(10%血清、100 U/mL青霉素、100 ng/mL链霉

素)中,培养条件为 37°C , 5% CO_2 。实验设为2组,分别为PBS对照组和A组轮状病毒组。PBS对照组为100 μL 磷酸缓冲盐溶液处理 CaCO_2 和HT-29细胞,A组轮状病毒组为予100 μL 感染复数(multiplicity of infection, MOI)为1的A组轮状病毒处理 CaCO_2 和HT-29细胞24 h, CaCO_2 和HT-29细胞密度为 $1.0 \times 10^5/\text{mL}$ ^[10]。

1.4 总RNA提取、逆转录、荧光定量PCR

细胞总RNA的提取按照Trizol试剂盒进行。按照试剂盒说明书逆转录合成cDNA。按照广州复能基因有限公司荧光定量PCR试剂盒说明书进行,PCR反应:95 $^\circ\text{C}$ 预变性10 min;95 $^\circ\text{C}$ 10 s,58 $^\circ\text{C}$ 15 s,72 $^\circ\text{C}$ 20 s,40个循环;72 $^\circ\text{C}$ 延伸10 min。72 $^\circ\text{C}$ 采集荧光信号。以 β -actin作为内参照基因,并采用相对定量法进行定量。相对表达量 $=2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$, ΔCt =目的基因平均Ct值-内参照基因平均Ct值, $\Delta\Delta\text{Ct}$ =实验组 ΔCt -对照组 ΔCt 。引物由广州锐博生物科技有限公司合成,实时定量RT-PCR使用引物如下:内参基因 β -actin的引物序列: β -actin-F:5'-CCTGGCACCCAG-CACAAT-3', β -actin-R:5'-GGGCCGGACTCGT-CATAC-3'; NKCC1的引物序列: NKCC1-F:5'-ACCTTCGGCCACAACACCATGGA-3', NKCC1-R:5'-ACCACAGCATCTCTGGTTGGA-3'。

1.5 蛋白质免疫印迹

收集相应组别细胞,加入细胞裂解液于冰上裂解涡旋,置于金属浴100 $^\circ\text{C}$ 加热10 min、室温12 000 r/min离心10 min,取等量的蛋白进行SDS-PAGE电泳并转移到PVDF膜上,用化学发光法检测。

1.6 统计学处理

使用SPSS 22.0进行统计分析,计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,采用独立样本 t 检验;多样本采用one-way ANOVA检验,组间采用Tukey's multiple comparisons test分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 临床基线资料比较

A组轮状病毒感染最突出的临床表现为腹泻、呕吐与发热,少部分伴有抽搐及腹痛。A组轮状病毒性肠炎患者血钠、血钾和血氯平均水平低于正常范围,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表1、2。

2.2 两组 CaCO_2 和HT-29细胞中NKCC1 mRNA表达的比较

与PBS对照组相比,A组轮状病毒组 CaCO_2 细

胞和 HT-29 细胞中 *NKCC1* mRNA 的表达水平明显降低, 差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。见图 1。

表 1 A 组轮状病毒性肠炎患者的临床表现 [$n(\%)$]

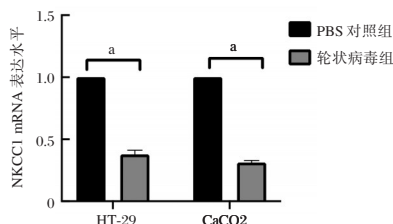
Table 1 Clinical data of patients with human rotavirus A infection [$n(\%)$]

临床表现	有	无
腹泻	85(93.40)	6(6.60)
发热	67(73.60)	24(26.40)
呕吐	73(80.20)	18(19.80)
抽搐	15(16.50)	76(83.50)
腹痛	7(7.70)	84(92.30)

表 2 离子正常参考水平及 A 组轮状病毒组离子水平比较

Table 2 Comparison of ion levels between normal reference level and human rotavirus A infection

离子	离子正常参考水平 (mmol/L)	患者离子水平 (mmol/L)	t 值	P 值
钠 Na^+	138.00~144.00	134.70 $\pm$ 3.41	15.12	<0.001
钾 K^+	3.50~5.70	3.59 $\pm$ 0.53	2.45	0.018
氯 Cl^-	98.00~107.00	101.50 $\pm$ 3.89	18.56	<0.001



注:与 PBS 组比较, $^aP<0.05$ 。

图 1 两组 CaCO_2 和 HT-29 细胞 *NKCC1* mRNA 的表达

Figure 1 *NKCC1* mRNA expression in CaCO_2 and HT-29 cells on PBS group and human rotavirus A group

2.3 两组 CaCO_2 和 HT-29 细胞中 *NKCC1* 蛋白水平的比较

与 PBS 对照组相比, A 组轮状病毒组 CaCO_2 细胞和 HT-29 细胞中 *NKCC1* 蛋白水平的表达明显降低, 差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。见图 2、表 3。

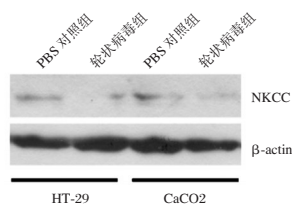


图 2 两组 CaCO_2 和 HT-29 细胞 *NKCC1* 蛋白水平的表达

Figure 2 *NKCC1* protein level in CaCO_2 and HT-29 cells in PBS group and human rotavirus A group

2.4 两组 HT-29 细胞中 AMPK 磷酸化活性的比较

蛋白质免疫印迹结果显示, 与 PBS 对照组相比, A 组轮状病毒组 HT-29 细胞 AMPK 磷酸化活性明显升高, 差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。在

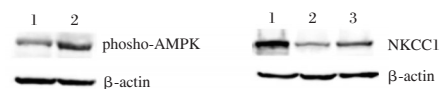
表 3 HT-29 和 CaCO_2 细胞中 2 组 *NKCC1* 表达水平比较

Table 3 Comparison of *NKCC1* expression between 2 groups in HT-29 and CaCO_2 cells

组别	n	HT-29	CaCO_2
PBS 组	30	1.07 $\pm$ 0.13	1.01 $\pm$ 0.04
A 组轮状病毒组	30 ^a	0.11 $\pm$ 0.03	0.12 $\pm$ 0.05
t 值		13.52	24.49
P 值		<0.001	<0.001

注: ^a 部分临床标本的病毒 MOI 低于 1, 不计入样品处理。

A 组轮状病毒组加入 AMPK 抑制剂 Compound C 后, HT-29 细胞中 *NKCC1* 蛋白水平明显升高 ($P<0.05$)。见图 3 和表 4、5。



注: 1. PBS 对照组; 2. 轮状病毒组; 3. 轮状病毒组+Compound C。

图 3 HT-29 细胞中不同组别 AMPK 活性及 *NKCC1* 表达水平比较

Figure 3 Comparison of AMPK activity and *NKCC1* expression in HT-29 cells

表 4 HT-29 细胞中 2 组 AMPK 活性水平比较

Table 4 Comparison of AMPK activity between 2 groups in HT-29 cells

组别	n	HT-29
PBS 组	30	1.05 $\pm$ 0.08
A 组轮状病毒组	30 ^a	2.64 $\pm$ 0.12
t 值		19.43
P 值		<0.001

注: ^a 部分临床标本的病毒 MOI 低于 1, 不计入样品处理。

表 5 HT-29 细胞中 3 组 *NKCC1* 表达水平比较

Table 5 Comparison of *NKCC1* expression among 3 groups in HT-29 cells

组别	n	HT-29
PBS 组	30	1.07 $\pm$ 0.06
A 组轮状病毒组	30 ^a	0.16 $\pm$ 0.03 ^b
A 组轮状病毒组+Compound C	30 ^a	0.72 $\pm$ 0.04 ^{bc}
F 值		353.10
P 值		<0.001

注: ^a 部分临床标本的病毒 MOI 低于 1, 不计入样品处理。与 PBS 组比较, ^b $P<0.05$; 与 A 组轮状病毒组比较, ^c $P<0.05$ 。

3 讨论

腹泻病是 5 岁以下儿童死亡的第二大原因。据统计, 全球 5 岁以下儿童中, 每年腹泻可导致 150~200 万死亡病例^[11]。轮状病毒为 5 岁以下严重胃肠炎的最主要病原^[12]。轮状病毒疫苗在预防严重轮状病毒相关胃肠炎方面作用显著, 但每年仍有超过 20 万人死于轮状病毒^[8, 12]。

众多文献显示,发展中国家儿童病毒性肠炎后可出现严重腹泻和营养不良,并可能出现脱水及电解质紊乱等并发症^[12]。对于轮状病毒感染所致的胃肠炎,目前并无特效抗病毒的药物,临床上采取对症及支持疗法,需及时给予口服补液盐治疗,继续喂养,必要时给予静脉补充电解质,以纠正水、电解质紊乱及酸碱平衡失调^[14]。目前临床上使用最广的口服补液盐是口服补液盐Ⅲ,可补充钠离子、氯离子和钾离子,相比传统口服补液盐,渗透压由311 mOsm/L降至245 mOsm/L,可使溶液迅速吸收,减少静脉输液的必要性,并且能减少粪便量,具有补液和止泻双重作用,临床效果^[15]。

钠钾氯共转运蛋白1,通过质膜转运1个钠离子、1个离子和2个氯离子的电中性转运。NKCC1在调节细胞体积,控制上皮细胞的离子吸收和分泌以及维持细胞内氯化物稳态方面具有关键作用,因此在病毒性腹泻中的作用近年来越来越受人们关注^[16-17]。本研究进一步探讨A组轮状病毒干预CaCO₂和HT-29细胞后NKCC1的表达变化情况,有助于了解A组轮状病毒感染的发病机制,为临床治疗和干预提供新的思路和策略。

通过临床数据分析结果提示A组轮状病毒可能抑制肠道上皮NKCC1的表达。结果发现,A组轮状病毒下调肠上皮细胞CaCO₂和HT-29细胞NKCC1 mRNA和蛋白水平的表达,提示A组轮状病毒诱导病毒腹泻可能依赖于NKCC1。

AMPK作为生物能量代谢调节的关键分子,除了维持细胞内能量平衡的作用外,AMPK还调节全身能量代谢,是研究糖尿病及其他代谢相关疾病的核心^[18]。King等^[6]的研究显示AMPK能够抑制NKCC1的表达。本研究结果进一步表明,A组轮状病毒能够诱导HT-29细胞AMPK活性增加,而抑制AMPK的活性则能够逆转A组轮状病毒对HT-29细胞NKCC1表达的抑制作用。但在A组轮状病毒诱导的腹泻中,A组轮状病毒如何调控AMPK的活性以及下游的关键分子有待于进一步阐明。此外,除了下调NKCC1表达以外,是否还通过调控其他基因进而促进电解质紊乱和脱水,从而诱导腹泻发生尚有待于进一步研究。

综上所述,A组轮状病毒可能通过激活AMPK磷酸化活性,进而抑制CaCO₂和HT-29细胞NKCC1的表达而导致腹泻。

参考文献

- [1] 陈峰,唐晓宇,仇保丰,等. A组轮状病毒极速实时荧光RT-PCR检测方法的建立及临床评价[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2018, 10(5): 320-326.
- [2] Hong L, Song Y Y, Tao Z X, et al. Rotavirus gastroenteritis and its vaccination[J]. Zhang Hua Yu Fang Yi Xue Za Zhi, 2020, 54(7): 787-792.
- [3] Liu R, Wang J, Liang S, et al. Role of NKCC1 and KCC2 in Epilepsy: From Expression to Function[J]. Front Neurol, 2019, 10: 1407.
- [4] Barrett K E, McColo D F. Hydrogen peroxide scavenger, catalase, alleviates ion transport dysfunction in murine colitis[J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2016, 43(11): 1097-1106.
- [5] Jiang C, Kawabe H, Rotin D. The Ubiquitin Ligase Nedd4L Regulates the Na/K/2Cl Co-transporter NKCC1/SLC12A2 in the Colon[J]. J Biol Chem, 2017, 292(8): 3137-3145.
- [6] King SJ, Bunz M, Chappell A, et al. AMPK mediates inhibition of electrolyte transport and NKCC1 activity by reactive oxygen species[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2019, 317(2): G171-G181.
- [7] Rao MC. Physiology of Electrolyte Transport in the Gut: Implications for Disease[J]. Compr Physiol, 2019, 9(3): 947-1023.
- [8] Burnett E, Parashar U, Tate J. Rotavirus Vaccines: Effectiveness, Safety, and Future Directions[J]. Paediatr Drugs, 2018, 20(3): 223-233.
- [9] Brady K. Acute gastroenteritis: evidence-based management of pediatric patients[J]. Pediatr Emerg Med Pract, 2018, 15(2): 1-25.
- [10] Frias AH, Jones RM, Fifiadara NH, et al. Rotavirus-induced IFN-beta promotes anti-viral signaling and apoptosis that modulate viral replication in intestinal epithelial cells[J]. Innate Immun, 2012, 18(2): 294-306.
- [11] Lozano-Fuentes S, Elizondo-Quiroga D, Farfan-Ale J A, et al. Use of Google Earth to strengthen public health capacity and facilitate management of vector-borne diseases in resource-poor environments[J]. Bull World Health Organ, 2008, 86(9): 718-725.
- [12] Crawford SE, Ramani S, Tate JE, et al. Rotavirus infection[J]. Nat Rev Dis Primers, 2017, 3: 17083.
- [13] Bilal A, Sadiq MA, Haider N. Frequency of hyponatraemia and hypokalaemia in malnourished children with acute diarrhoea[J]. J Pak Med Assoc, 2016, 66(9): 1077-1080.
- [14] 长三角免疫规划一体化项目组, 中华医学会感染病学分会儿童感染和肝病学组. 儿童轮状病毒胃肠炎预防诊疗专家共识(2020年版)[J]. 中华预防医学杂志, 2020, 54(4): 392-405.
- [15] 周志强, 赵小燕, 徐武军. 低渗透压ORS溶液(口服补液盐Ⅲ)治疗小儿腹泻病疗效分析[J]. 中国当代医药, 2016, 23(18): 75-77.
- [16] Chew TA, Orlando BJ, Zhang J, et al. Structure and mechanism of the cation-chloride cotransporter NKCC1[J]. Nature, 2019, 572(7770): 488-492.
- [17] Delpire E, Guo J. Cryo-EM structures of DrNKCC1 and hKCC1: a new milestone in the physiology of cation-chloride cotransporters[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2020, 318(2): C225-C237.
- [18] Carling D. AMPK signalling in health and disease[J]. Curr Opin Cell Biol, 2017, 45: 31-37.

• 论 著 •

荆州地区 HPV-52 型 E7 基因多态性分析和 T 细胞表位预测

李烁 叶梦霞 梅冰*

[摘要] **目的** 研究湖北荆州地区人乳头瘤病毒 52 型(HPV-52) E7 基因变异特征以及预测 T 细胞表位。**方法** 扩增 HPV-52 阳性样本 E7 基因,测序并与 GenBank 参考序列比对,分析序列变异性,构建 E7 基因系统发育树,估算基因选择压力以及预测 E7 蛋白 T 细胞表位。**结果** HPV-52 E7 基因突变序列中检测到 19 个单核苷酸突变,包括 10 个非同义突变和 9 个同义突变。常见的单核苷酸突变为 751C>T 和 801A>G,突变率分别为 96.51%和 98.84%。3 个非同义突变发生在编码 E7 蛋白 β 折叠区域内。系统进化分析表明荆州地区 HPV-52 E7 基因变异序列主要分布在 B 谱系。对于 HLA-A*02:01, MLLGTLQVV(84-92) 表位亲和力最强,对于 HLA-DQA1*01:01/DQB1*02:01, ATIKDYILDLQPETT(6-20) 表位亲和力最强。**结论** 湖北荆州地区 HPV-52 E7 基因序列具有多态性,单核苷酸突变的发现以及 T 细胞表位预测可为 HPV 治疗性疫苗的研究提供科学依据。

[关键词] 人乳头瘤病毒 52 型; E7 基因; 多态性; T 细胞表位

Analysis of HPV - 52 E7 gene polymorphism and T cell epitope prediction in Hubei Jingzhou area

LI Shuo, YE Mengxia, MEI Bing*

(Department of Laboratory Medicine, Second Clinical Medical College of Yangtze University, Jingzhou, Hubei, China, 434020)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the characteristics of human papillomavirus type 52 (HPV-52) E7 gene mutation and predict T cell epitopes in Jingzhou, Hubei Province. **Methods** The E7 gene of HPV-52 positive samples was amplified, sequenced, and compared with the GenBank reference sequence, and the sequence variabilities were analyzed. The E7 gene phylogenetic tree was constructed, the selection pressure was estimated, and the T cell epitopes of E7 protein were predicted. **Results** 19 single nucleotide mutations were detected in the HPV-52 E7 gene variant sequences, including 10 non-synonymous mutations and 9 synonymous mutations. The common single nucleotide mutations are 751C>T and 801A>G, and the mutation rates are 96.51% and 98.84%, respectively. Three non-synonymous mutations occurred in the β -sheet region encoding E7 protein. Phylogenetic analysis showed that the HPV-52 E7 gene variant sequences in Jingzhou area are mainly distributed in the B lineage. For HLA-A*02:01, the T cell epitope with the strongest affinity was MLLGTLQVV (84-92), and for HLA-DQA1*01:01/DQB1*02:01, the T cell epitope with the strongest affinity was ATIKDYILDLQPETT (6-20). **Conclusion** The HPV-52 E7 gene sequence in Jingzhou, Hubei is polymorphic. The discovery of single nucleotide mutations and T cell epitope prediction can provide a scientific basis for the research of HPV therapeutic vaccines.

[KEY WORDS] Human papillomavirus type 52; E7 gene; Polymorphism; T cell epitope

基金项目:2019 年湖北省中央引导地方科技发展专项(2019ZYYD066)

作者单位:长江大学第二临床医学院医学检验部,湖北,荆州 434020

*通信作者:梅冰, E-mail:meibing008@163.com

在中国宫颈癌的发病率居女性恶性肿瘤的第二位,与人乳头瘤状病毒(Human papillomavirus, HPV)持续感染密切相关^[1]。HPV是小的双链DNA病毒,目前已发现200多种HPV亚型,其中十二种高危亚型(16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58和59)具有致癌性^[2]。E7蛋白可以结合并抑制成视网膜细胞瘤蛋白pRb,释放E2F促进细胞增殖,在HPV诱导的癌变中起关键作用^[3]。因此,E7蛋白是开展疫苗免疫治疗研究的理想靶点^[4]。HPV-16和HPV-18是全球最常见的两种高危型HPV^[5]。然而HPV亚型分布有地域差异,已有研究表明湖北荆州地区HPV-52亚型检出率最高^[6]。高危型HPV E7基因突变导致氨基酸变异,可能影响宿主免疫应答和疫苗治疗效果^[7]。目前国内外研究集中在HPV-16和HPV-18亚型,而对HPV-52亚型的研究相对较少^[8-9]。疫苗研究设计时应重点关注本地区检出率较高的HPV亚型,因此本研究通过分析湖北荆州地区HPV-52 E7基因多态性、变异株谱系分布、阳性选择位点和T细胞表位预测,以期为本地区该病毒发展诊断和治疗性疫苗的研究提供重要数据。

1 资料和方法

1.1 一般资料

收集2019年9月至2020年7月在本院进行高危型HPV分型检测的女性宫颈脱落细胞样本3 910例。平均年龄(42.1±10.3)岁。宫颈脱落细胞样本由妇科医生使用专用样本采集器采集,将其置于加有专用细胞保存液的取样管中。样本采集后放置于4℃保存,24 h内完成样本检测。样本采集前获得患者知情同意并签署知情同意书,本研究获得医院伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 HPV DNA提取和分型

HPV分型试剂采用上海之江生物科技股份有限公司HPV分型试剂盒(荧光PCR法),按照试剂盒说明书进行DNA提取和分型检测。

1.2.2 PCR扩增和测序

对HPV-52阳性样本进行E7基因特异性序列扩增和测序。扩增E7基因引物如下:F:5'-GGGA AAACATTAGAAGAG-3',R:5'-TTGTTTTTCTAT-TATTGCCTCTA-3'。PCR反应总体积为25 μL,扩增试剂为TAKARA公司的PrimerSTAR扩增试

剂盒。扩增条件如下:94℃ 3 min;94℃ 45 s,53.5℃ 60 s,72℃ 60 s,共39个循环;最后72℃延伸10 min。PCR产物于2.5%琼脂糖凝胶电泳检测后送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

1.3 序列分析

使用DNASTar将获得的E7基因样本序列与HPV-52参考序列(GenBank登录号:NC_001592)比对,分析序列突变情况。MEGA-X软件翻译核苷酸序列,采用Align by ClustalW对本研究中的变异组序列与变异谱系的参考基因组序列进行比对,参数设置为默认值,参考基因组序列分别为:A1, X74481; A2, HQ537739; B1, HQ537740; B2, HQ537743; C1, HQ537744; C2, HQ537746; D, HQ537748。邻接法构建系统发育树,参数设置选择Kimura 2-parameter模型,Bootstrap值为1000,其他参数设置为默认值。PSIPRED(<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>)预测氨基酸序列二级结构。

1.4 选择压力分析

使用PAML4.9软件Codeml程序检测序列阳性选择位点。通过似然比检验检测M7/M8模型间差异是否有统计学意义。采用贝叶斯经验贝叶斯(Bayes Empirical Bayes, BEB)方法,后验概率 $P \geq 0.95$ 为阳性选择位点。

1.5 T细胞表位预测

IEDB (http://tools.immuneepitope.org/main/html/tcell_tools.html)预测E7蛋白MHC-I和MHC-II分子的抗原结合位点。选取中国人群HLA-I类基因和HLA-II类基因分布较广的等位基因(HLA-A*11:01, HLA-A*24:02, HLA-A*02:01, HLA-B*40:01, HLA-B*46:01, HLA-C*01:02, HLA-C*03:04, HLA-DQB1*02:01, HLA-DRB1*14:01, HLA-DRB1*12:02, HLA-DRB1*15:02, HLA-DQB1*05:01和HLA-DPB1*04:01)预测T细胞表位。

2 结果

2.1 HPV-52 E7基因序列分析

3 910例宫颈脱落细胞样本中共检出高危型HPV阳性样本822例,其中HPV-52单阳性样本207例。经PCR扩增和测序后成功获得172个E7基因核苷酸序列。与参考序列相比,本地区E7基因变异率为98.84%(170/172)。根据E7基因序列多态性分组,170条序列被分为10个不同变异组

(JE01-JE10), 见表1。共发现19个单核苷酸突变, 包括10个非同义突变和9个同义突变。751C>T 和 801 A>G 出现率高, 分别占96.51%

(166/172) 和 98.84% (170/172)。非同义突变 Y59D、Y59C 和 H72N 发生在编码 HPV-52 β -折叠区域内。

表1 HPV-52 E7 基因核苷酸突变及预测氨基酸变异

Table 1 HPV-52 E7 gene nucleotide mutation and predicted amino acid mutation

参数	突变数据																	n
核苷酸位点	5	5	6	6	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	8	8	8	
参比碱基	7	9	6	6	0	0	2	2	3	4	4	5	5	6	9	0	4	4
JE01	3	5	2	4	6	7	7	8	3	2	7	1	9	6	3	1	8	9
JE02	T	C	C	G	A	G	T	A	C	G	C	A	C	C	C	A	T	A
JE03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	G	-	-
JE04	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	G	-	-
JE05	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	G	-	-
JE06	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	G	-	C
JE07	A	-	T	-	G	A	G	-	T	A	-	-	-	-	-	G	G	-
JE08	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	T	G	-	-
JE09	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	G	-	-
JE10	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	T	-	-	-	G	-	-
参比氨基酸	T	L	T	D	S	S	Y	Y	H	D	S	L	L	H	L	Q	L	L
氨基酸位点	7	15	37	38	52	52	59	59	61	64	65	67	69	72	81	83	99	99
氨基酸变异	-	-	I	N	N	N	D	C	Y	N	-	-	-	N	-	-	R	-
二级结构							S	S				S	S	S	H	H		

2.2 HPV-52 E7 基因系统发育树

本实验中获得的变异组由黑色菱形标注, 结果表明荆州地区 E7 基因突变序列分布在 B 谱系, JE02 分布在 D 谱系, JE06 分布在 C 谱系, 未检测到 A 谱系。见图 1。

2.3 选择压力分析

对 E7 基因序列进行选择压力分析, 结果表明荆州地区 E7 基因变异序列中无阳性选择位点, 见表 2。

2.4 HPV-52 E7 蛋白 T 细胞表位分析

IEDB 预测 HPV-52 E7 蛋白 T 细胞表位, 限定中国人群分布频率较高的 7 个 HLA-I 类等位基因和 6 个 HLA-II 类等位基因, 可预测覆盖大部分人群的表位。对于 HLA-I 类等位基因, 根据百分等级 (Percentile Rank, PR) 小于 1.00 筛选理想的 E7 蛋白 T 细胞表位, PR 越低则亲和力越强。按亲和力大小选取排名前三的优势。对于 HLA-II 类等位基因, 根据设定标准 (PR<5.00) 筛选 T 细胞表位, 按亲和力大小选取排名前三的优势表位, 见表 3~4。

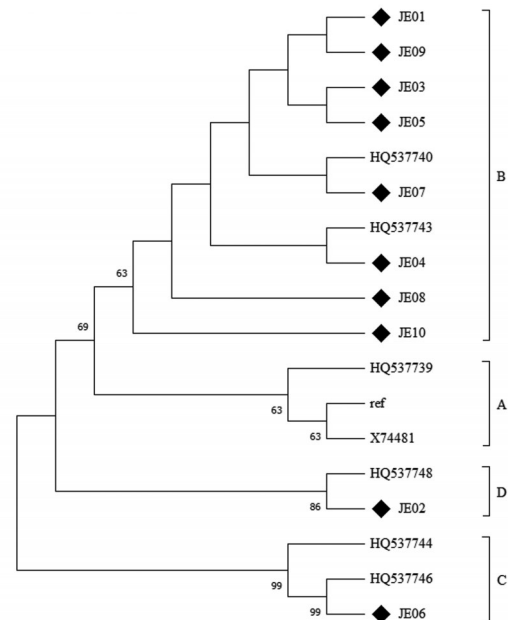


图1 HPV-52 E7 基因系统发育树

Figure 1 HPV-52 E7 gene phylogenetic tree

表2 HPV-52 E7 基因选择压力分析

Table 2 HPV-52 E7 gene selection pressure analysis

模型	对数似然差异	参数估计	2ΔlnL	概率	正选择位点
M7	-520.192791	$p=0.005\ 00$ $q=0.007\ 55$			不允许
M8	-519.853765	$p0=0.766\ 78$ $p=0.005\ 00$ $q=1.970\ 36$ $p1=0.233\ 22$ $\omega=1.972\ 19$	0.68	$P=0.712$	无

注: 2ΔlnL, 两个模型之间对数似然差的两倍。

表3 HLA-I类等位基因的预测表位结合物

Table 3 Predicted epitope binders for HLA-I alleles

等位基因	HPV-52 E7 氨基酸参考序列			HPV-52 E7 氨基酸变异序列-1			HPV-52 E7 氨基酸变异序列-2		
	位置	肽	PR	位置	肽	PR	位置	肽	PR
HLA-A*02:01	84-92	MLLGTLQVV	0.08	84-92	MLLGTLQVV	0.08	84-92	MLLGTLQVV	0.08
	83-91	QMLLGTLQV	0.17	83-91	QMLLGTLQV	0.17	83-91	QMLLGTLQV	0.17
	11-19	YILDLPET	0.50	11-19	YILDLPET	0.50	11-19	YILDLPET	0.50
HLA-A*11:01	51-59	TSNYYIVTY	0.74						
	50-59	ATSNYYIVTY	0.83						
HLA-A*24:02	58-69	TYCHSCDSTLRL	0.88	53-61	NYIYVTDCTY	0.80			
	58-67	TYCHSCDSTL	0.92						
HLA-B*40:01	47-55	AEQATSNYY	0.68	47-55	AEQATNNYY	0.71	47-55	AEQATNNYY	0.71
	47-56	AEQATSNYYI	0.94	47-56	AEQATNNYYI	1.00	47-56	AEQATNNYYI	1.00
HLA-B*46:01	51-59	TSNYYIVTY	0.08	7-15	TIKDYILD	0.72	7-15	TIKDYILD	0.72
	46-54	QAEQATSNY	0.72	73-81	STATDLRTL	0.72	73-81	STATDLRTL	0.72
	7-15	TIKDYILD	0.72						
HLA-C*01:02	73-81	STATDLRTL	0.38	73-81	STATDLRTL	0.38	73-81	STATDLRTL	0.38
	15-22	LQPETTD	0.57	15-22	LQPETTD	0.57	15-22	LQPETTD	0.57
	92-99	VCPGCRAL	0.67	61-69	YSCNSTLRL	0.87	61-69	YSCNSTLRL	0.87
HLA-C*03:04	73-81	STATDLRTL	0.18	73-81	STATDLRTL	0.18	73-81	STATDLRTL	0.18
	61-69	HSCDSTLRL	0.27	61-69	YSCNSTLRL	0.19	61-69	YSCNSTLRL	0.19
	74-81	TATDLRTL	0.32	74-81	TATDLRTL	0.32	74-81	TATDLRTL	0.32

表4 HLA-II类等位基因的预测表位结合物

Table 4 Predicted epitope binders for HLA-II alleles

等位基因	HPV-52 E7 氨基酸参考序列			HPV-52 E7 氨基酸变异序列-1			HPV-52 E7 氨基酸变异序列-2		
	位置	肽	PR	位置	肽	PR	位置	肽	PR
HLA-DQA1*01:01/DQB1*02:01	6-20	ATIKDYILDLPETT	3.10	6-20	ATIKDYILDLPETT	3.10	6-20	ATIKDYILDLPETT	3.10
	5-19	KATIKDYILDLPET	3.40	5-19	KATIKDYILDLPET	3.40	5-19	KATIKDYILDLPET	3.40
	7-21	TIKDYILDLPETTD	4.50	7-21	TIKDYILDLPETTD	4.50	7-21	TIKDYILDLPETTD	4.50
HLA-DQA1*01:01/DQB1*05:01	4-18	DKATIKDYILDLPQE	3.60	4-18	DKATIKDYILDLPQE	3.60	4-18	DKATIKDYILDLPQE	3.60
	5-19	KATIKDYILDLPET	3.70	5-19	KATIKDYILDLPET	3.70	5-19	KATIKDYILDLPET	3.70
	3-17	GDKATIKDYILDLPQ	4.80	3-17	GDKATIKDYILDLPQ	4.80	3-17	GDKATIKDYILDLPQ	4.80

3 讨论

宫颈癌是常见的妇科恶性肿瘤,由高危型 HPV 持续感染引起^[1]。E7基因在宫颈癌的发展中起重要作用,其基因突变导致氨基酸变异影响致癌能力、宿主免疫应答和疫苗治疗效果。充分了解本地区 HPV-52 E7基因变异情况是治疗性疫苗设计的基础。

研究发现杭州^[10]和台湾^[11]地区 HPV-52 E7基因分别存在 15 和 11 个单核苷酸突变,751C>T 和 801 A>G 为高频突变位点。本研究对荆州地区 HPV-52 E7基因的分析中共发现了 19 个单核苷酸突变,其中 C747T、A759G 和 C793T 单核苷酸突变位点此前未见报道,说明不同地域间 HPV-52 E7基因突变特点存在差异,在感染与遗传过程中荆州地区 E7基因突变较为活跃。此外,本研究发现各突变序列中皆存在 2 个及以上单核苷酸突变,与

江苏^[12]研究结果不同,表明荆州地区 HPV-52 E7基因突变具有一定的地域特征。本研究中 751C>T 和 801 A>G 同样均为高频突变位点,与杭州^[10]和台湾^[11]地区人群中的分布趋势一致,表明这些高频突变位点在以上地区人群中具有一定程度的普遍性,有望成为新的诊断检测靶标。3 个非同义突变发生在编码 E7 蛋白 β 折叠区域内。因此治疗性疫苗的设计应考虑到这些单核苷酸突变。

HPV-52 基因变异序列有地域差异,根据基因组序列的不同,HPV-52 亚型有 4 个变异谱系:A、B、C 和 D,亚洲以 B 谱系为主,C 和 D 谱系较少,无 A 谱系^[13]。本研究表明荆州地区 HPV-52 E7基因突变序列分布于 B、C 和 D 谱系,97.65% 的突变序列属于 B 谱系,与中国西南地区^[14]研究结果相同。台湾一项研究表明患有高度鳞状上皮内病变妇女中 HPV-52 E6、E7 和 LCR 基因序列病毒株大多属于 B 和 C 谱系^[11]。对本地区宫颈病变与 HPV-52

谱系相关性需要进一步研究。阳性选择下的变异基因对环境的适应性增强,对本地区 HPV-52 E7 基因序列进行选择压力分析,表明荆州地区 E7 基因序列中无阳性选择位点。

治疗性疫苗可刺激细胞免疫反应,清除已表达病毒蛋白的感染细胞或者恶性细胞,因此对已感染者有重要意义^[4]。E7 蛋白在宫颈肿瘤中持续性过表达,是治疗性疫苗的理想靶点^[15]。免疫信息学可用于肽疫苗研究的 T 细胞表位的预测,目前表位预测主要集中在 HPV-16 和 HPV-18 亚型^[16]。宫颈癌患者中 HPV-52 感染率高,因此 HPV-52 治疗性疫苗的表位预测和研究刻不容缓^[17]。本研究对 HPV-52 E7 蛋白 T 细胞表位预测,筛选出针对本地区 E7 蛋白的理想表位。对于 *HLA-I* 类等位基因,由于 S52N、Y59D、Y59C、H61Y、D64N 和 L99R 突变,使多个表位亲和力改变。对于 *HLA-II* 类等位基因,预测的亲和力强的表位中未包含氨基酸变异位点。由于这些非同义突变对表位亲和力有明显影响,本研究结合 *HLA-II* 类等位基因的限制表位的预测结果,进一步筛选排除含有非同义突变的 *HLA-I* 类等位基因限制性表位,发现了 2 个亲和力强的表位 YILDLPET (11-19) 和 TIKDYILD (7-15),均位于 ATIKDYILDLPETT (6-20) 氨基酸区段。对于 *HLA-I* 类等位基因,73-92 位氨基酸区域亲和力强,但对于 *HLA-II* 类等位基因,在 73-92 位氨基酸区段的表位 PR 值大于 5.00,亲和力低,因此 6-20 氨基酸区段对 E7 蛋白的免疫特性具有重要意义,将有助于研发有效的 HPV-52 治疗性疫苗。

综上所述,本研究通过分析湖北荆州地区 HPV-52 E7 基因序列变异性,发现多个核苷酸变异位点以及突变株谱系分布,进一步了解本地区 E7 基因变异特点。T 细胞表位预测发现的亲和力较高的表位为后续研究治疗性疫苗奠定了可靠基础。

参考文献

- [1] Wu Q, Jia M, Chen H, et al. The economic burden of cervical cancer from diagnosis to one year after final discharge in Henan Province, China: A retrospective case series study [J]. Plos One, 2020, 15(5): e232129.
- [2] de Sanjosé S, Brotons M, Pavón MA. The natural history of human papillomavirus infection [J]. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2018, 47: 2-13.
- [3] Gupta S, Kumar P, Das BC. HPV: Molecular pathways and targets [J]. Curr Probl Cancer, 2018, 42(2): 161-174.
- [4] Vonsky MS, Runov AL, Gordeychuk IV, et al. Therapeutic Vaccines Against Human Papilloma Viruses: Achievements and Prospects [J]. Biochemistry (Mosc), 2019, 84(7): 800-816.
- [5] 李岳军,周妙姬,邱峰. 人乳头瘤病毒 52 型 E2 和 E6/E7 在宫颈病变中的表达及其意义 [J]. 分子诊断与治疗杂志, 2015, 7(4): 241-246.
- [6] 阎璠,李滔,唐全,等. 湖北荆州地区高危型 HPV 感染状况及流行病学特征研究 [J]. 湖北大学学报(自然科学版), 2020, 42(3): 311-315.
- [7] Chen Z, Jing Y, Wen Q, et al. E6 and E7 Gene Polymorphisms in Human Papillomavirus Types-58 and 33 Identified in Southwest China [J]. Plos One, 2017, 12(1): e171140.
- [8] Ramas V, Mirazo S, Bonilla S, et al. Analysis of human papillomavirus 16 E6, E7 genes and Long Control Region in cervical samples from Uruguayan women [J]. Gene, 2018, 654: 103-109.
- [9] Xu HH, Zheng LZ, Lin AF, et al. Human papillomavirus (HPV) 18 genetic variants and cervical cancer risk in Tai-zhou area, China [J]. Gene, 2018, 647: 192-197.
- [10] Ding T, Wang X, Ye F, et al. Distribution of human papillomavirus 58 and 52 E6/E7 variants in cervical neoplasia in Chinese women [J]. Gynecol Oncol, 2010, 119(3): 436-443.
- [11] Chang YJ, Chen HC, Lee BH, et al. Unique variants of human papillomavirus genotypes 52 and 58 and risk of cervical neoplasia [J]. Int J Cancer, 2011, 129(4): 965-973.
- [12] 王本敬,刘敏娟,李文静,等. 人乳头瘤病毒 52 型 E6 和 E7 基因突变与宫颈癌及癌前病变关系的研究 [J]. 中国计划生育和妇产科, 2018, 10(6): 24-30.
- [13] Zhang C, Park JS, Grce M, et al. Geographical distribution and risk association of human papillomavirus genotype 52-variant lineages [J]. J Infect Dis, 2014, 210(10): 1600-1604.
- [14] Zhang Y, Cao M, Wang M, et al. Genetic variability in E6, E7, and L1 genes of human papillomavirus genotype 52 from Southwest China [J]. Gene, 2016, 585(1): 110-118.
- [15] Chan PK, Liu SJ, Cheung JL, et al. T-cell response to human papillomavirus type 52 L1, E6, and E7 peptides in women with transient infection, cervical intraepithelial neoplasia, and invasive cancer [J]. J Med Virol, 2011, 83(6): 1023-1030.
- [16] Jabbar B, Rafique S, Salo-Ahen O, et al. Antigenic Peptide Prediction From E6 and E7 Oncoproteins of HPV Types 16 and 18 for Therapeutic Vaccine Design Using Immunoinformatics and MD Simulation Analysis [J]. Front Immunol, 2018, 9: 3000.
- [17] Bao YP, Li N, Smith JS, et al. Human papillomavirus type distribution in women from Asia: a meta-analysis [J]. Int J Gynecol Cancer, 2008, 18(1): 71-79.

盐酸替罗非班联合药物洗脱支架治疗老年AMI患者的效果

蒋湘翎^{1*} 项国华² 李燕真³

[摘要] **目的** 探讨盐酸替罗非班联合药物洗脱支架治疗老年急性心肌梗死(AMI)患者的疗效及对血清肌钙蛋白(cTnI)、D-二聚体(D-D)、尿酸(UA)、肌酸激酶同工酶(CK-MB)的影响。**方法** 选取医院收治的107例老年AMI患者,根据简单随机分组法将其分为两组,对照组($n=53$)采用药物洗脱支架治疗,观察组($n=54$)予以盐酸替罗非班联合药物洗脱支架治疗,对比两组治疗效果、血清cTnI、D-D、UA、CK-MB水平以及心脏不良事件。**结果** 观察组临床疗效总有效率高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。观察组治疗后TIMI血流分级优于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。治疗后,观察组血清cTnI、D-D、UA、CK-MB水平均低于对照组,观察组治疗前后各指标差值均大于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。观察组主要不良心血管事件(MACE)发生率低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 盐酸替罗非班联合药物洗脱支架治疗老年AMI患者疗效显著,能够有效降低血清cTnI、D-D、UA、CK-MB水平,减少心脏不良事件发生。

[关键词] 急性心肌梗死;老年;盐酸替罗非班;药物洗脱支架

Effects of tirofiban hydrochloride combined with drug eluting stent in the treatment of elderly patients with AMI

JIANG Xiangling^{1*}, XU Guohua², LI Yanzhen³

(1. Department of Pharmacy, Sichuan Forestry Central Hospital, Chengdu, Sichuan, China, 610081; 2. Department of Cardiology, Sichuan Forestry Central Hospital, Chengdu, Sichuan, China, 610081; 3. Department of Pharmacy, the Fourth People's Hospital of Sichuan Province, Chengdu, Sichuan, China, 610016)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the curative effect of tirofiban hydrochloride combined with drug eluting stent (DES) on elderly patients with acute myocardial infarction (AMI) and its influences on serum cardiac troponin I (cTnI), D-dimer (D-D), uric acid (UA) and creatine kinase isoenzyme (CK-MB). **Methods** A total of 107 elderly AMI patients who were admitted to the hospital were enrolled and divided into the control group ($n=53$, DES) and the observation group ($n=54$, tirofiban hydrochloride combined with DES) by the simple random grouping method. Curative effect, levels of serum cTnI, D-D, UA and CK-MB, and adverse cardiac events were compared between the two groups. **Results** The total response rate of clinical curative effect in the observation group was higher than that in the control group, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). After treatment, the blood flow classification of TIMI in the observation group was better than that in the control group, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). After treatment, the levels of serum cTnI, D-D, UA and CK-MB in the observation group were lower than those in the control group, the difference value of each indicator before and after treatment in the observation group was

基金项目:四川省卫生和计划生育委员会科研基金资助项目(17PJ032)

作者单位:1.四川省林业中心医院药剂科,四川,成都 610081

2.四川省林业中心医院心血管内科,四川,成都 610081

3.四川省第四人民医院药学部,四川,成都 610016

*通信作者:蒋湘翎, E-mail:qianquanfei139@163.com

higher than that in the control group, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). The incidence of major adverse cardiovascular event (MACE) was lower than that in the control group, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** Tirofiban hydrochloride combined with a drug-eluting stent has a significant effect in the treatment of elderly patients with AMI. It can effectively reduce serum cTnI, D-D, UA, CK-MB levels and reduce the occurrence of adverse cardiac events.

[KEY WORDS] Acute myocardial infarction; Elderly; Tirofiban hydrochloride; Drug eluting stent

急性心肌梗死 (Acute myocardial infarction, AMI) 已成为危害老年人健康的重要疾病, 调查显示, 我国老年人群 AMI 发病率逐渐增高, 死亡率较高^[1]。冠状动脉粥样斑块破裂继发急性血栓形成, 造成动脉管腔堵塞是 AMI 发生的主要原因, 及早有效疏通梗死血管是 AMI 治疗要点^[2]。药物洗脱支架治疗 AMI 在临床应用较为广泛, 其可改善血管狭窄, 降低支架内再狭窄发生率^[3]。但是在治疗过程中, 微小血栓或斑块脱落容易引起远端血管栓塞而出现无复流现象, 对治疗效果造成影响^[4]。盐酸替罗非班为血小板糖蛋白 II b/III a 抑制剂, 能够较好抑制血小板聚集, 减少血栓形成^[5]。然而在临床中, 联合抗血小板治疗可能会引发血小板减少症, 增加患者出血风险。本研究, 探讨盐酸替罗非班联合药物洗脱支架治疗的效果, 以及对血清肌钙蛋白 (cardiac troponin I, cTnI)、D-二聚体 (D-dimer, D-D)、尿酸 (uric acid, UA)、肌酸激酶同工酶 (creatinase isoenzyme, CK-MB) 的影响。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2018 年 1 月至 2020 年 6 月医院收治的 107 例老年 AMI 患者, 纳入标准: ①符合《缺血性心脏病的命名及诊断标准》^[6]; ②年龄 ≥ 60 岁; ③符合药物洗脱支架治疗指征; ④AMI 发病至急诊治疗时间不超过 12 h; ⑤对本研究知情并签署知情同意书。排除标准: ①合并心房颤动、心包疾病等; ②严重心、肝、肾功能不全; ③合并恶性肿瘤; ④严重感染; ⑤合并精神性疾病; ⑥合并血液系统疾病。根

据简单随机分组法将患者分为对照组 53 例和观察组 54 例, 两组一般资料比较差异无统计学意义 ($P>0.05$), 见表 1。本研究通过医院伦理委员会批准。

1.2 方法

对照组术前常规给予阿司匹林 (拜耳医药保健有限公司, 国药准字 J20130078, 100 mg) 100 mg+硫酸氢氯吡格雷 (赛诺菲制药有限公司, 国药准字 H20056410, 75 mg) 75 mg 抗血小板聚集, 术中予以肝素静脉滴注, 80~100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 术后常规进行阿司匹林+硫酸氢氯吡格雷双抗治疗, 并皮下注射低分子肝素, 12 h/次, 1 mg/kg, 连续注射 5~7 d。观察组在对照组基础上给予盐酸替罗非班, 即术中在冠脉内注入盐酸替罗非班, 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 5 min 内注射完毕, 之后持续静脉泵入, 0.15 $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{min})$, 持续 24~36 h。

抽取两组术前和术后 1 个月清晨空腹静脉血 5 mL, 离心分离血清, 电化学发光法检测 cTnI 水平, 速率法检测 CK-MB 水平, 免疫比浊法检测 D-D 水平, 日本 Olympus AU5400 型全自动生化分析仪测定 UA 水平。试剂盒购于武汉博士德生物技术有限公司。

1.3 观察指标

①两组治疗前后血清 cTnI、D-D、UA、CK-MB 水平。②观察并记录两组主要不良心血管事件 (Major adverse cardiovascular events, MACE) 发生情况, 观察时间以患者开始治疗为第 1 d, 共两周, MACE 包括心源性死亡、心绞痛、急性/亚急性支架内血栓等。③记录两组治疗不良反应, 包括血小板减少症、出血。

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

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

组别	n	性别 (男/女)	年龄 (岁)	病程 (年)	吸烟史	高血压	糖尿病	靶血管		
								左降支	左回旋支	右冠状动脉
观察组	54	35/19	65.90 $\pm$ 2.26	17(31.48)	26(48.15)	43(79.63)	11(20.37)	27(50.00)	4(7.41)	23(42.59)
对照组	53	37/16	66.14 $\pm$ 2.31	20(37.74)	30(56.60)	40(75.47)	12(22.64)	24(45.28)	5(9.43)	24(45.28)
χ^2 值		0.304	0.543	0.463	0.767	0.266	0.082		0.300	
P 值		0.582	0.588	0.496	0.381	0.606	0.775		0.861	

1.4 疗效评估

①通过数字减影血管造影(Digital subtraction angiography, DSA)检查对冠状动脉梗死相关血管开通后血流状况进行判断^[7]分为:TIMI 0级、TIMI 1级、TIMI 2级、TIMI 3级。在疗程结束后评估两组疗效,临床疗效评估^[8]分为三种结果:显效、有效、无效。当此疗效评价出现分歧时,以胸痛症状情况为主。总有效=显效+有效。

1.5 统计学分析

数据分析用SPSS 20.0软件处理,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,采用 t 检验,计数资料以 $n(\%)$ 表示,采用 χ^2 检验和精确Fisher检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组临床疗效比较

观察组临床疗效总有效率高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表2。

表2 两组疗效比较 [$n(\%)$]

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

组别	n	显效	有效	无效	总有效
观察组	54	52(96.30)	1(1.85)	1(1.85)	53(98.15)
对照组	53	42(79.25)	3(5.66)	8(15.09)	45(84.91)
χ^2 值					4.491
P 值					0.034

表4 两组治疗前后血清cTnI、D-D、UA、CK-MB水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Comparison of serum CTNI, D-D, UA, CK-MB levels between the 2 groups before and after treatment ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	时间	cTn I (ng/mL)	D-(mg/L)	UA (μ mol/L)	CK-MB (U/L)
观察组	54	治疗前	5.72 $\pm$ 1.67	0.95 $\pm$ 0.31	426.35 $\pm$ 81.69	59.37 $\pm$ 18.63
		治疗后	0.24 $\pm$ 0.11	0.27 $\pm$ 0.12	304.47 $\pm$ 61.12	20.44 $\pm$ 5.92
		t 值	22.305	15.861	8.779	14.635
		P 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
		治疗前后差值	5.48 $\pm$ 1.45	0.68 $\pm$ 0.25	121.88 $\pm$ 35.73	38.93 $\pm$ 12.74
对照组	53	治疗前	5.50 $\pm$ 1.73	0.92 $\pm$ 0.33	430.19 $\pm$ 79.37	61.15 $\pm$ 20.07
		治疗后	0.79 $\pm$ 0.34	0.41 $\pm$ 0.16	352.68 $\pm$ 68.45	29.60 $\pm$ 9.14
		t 值	19.631	10.219	5.434	10.513
		P 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
		治疗前后差值	4.71 $\pm$ 1.38	0.51 $\pm$ 0.20	77.51 $\pm$ 18.90	31.55 $\pm$ 10.38
		t 值	2.813	3.880	8.007	3.282
		P 值	0.006	<0.001	<0.001	<0.001

表5 两组MACE发生率比较 [$n(\%)$]

Table 5 Comparison of mace incidence between 2 groups [$n(\%)$]

组别	n	心绞痛	心源性死亡	急性/亚急性支架内血栓	MACE发生率
观察组	54	1(1.85)	0(0)	0(0)	1(1.85)
对照组	53	5(9.43)	1(1.89)	2(3.77)	8(15.09)
χ^2 值					4.491
P 值					0.034

2.2 两组治疗后TIMI血流分级比较

观察组治疗后TIMI血流分级优于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表3。

表3 两组治疗后TIMI血流分级比较 [$n(\%)$]

Table 3 Comparison of TIMI blood flow classification between 2 groups after treatment [$n(\%)$]

组别	n	TIMI 1级	TIMI 2级	TIMI 3级
观察组	54	0(0.00)	1(1.85)	53(98.15)
对照组	53	1(1.89)	7(13.21)	45(84.91)
χ^2 值			6.144	
P 值			0.046	

2.3 两组治疗前后血清cTnI、D-D、UA、CK-MB水平比较

治疗前,两组血清cTnI、D-D、UA、CK-MB水平比较差异无统计学意义($P > 0.05$);治疗后,观察组血清cTnI、D-D、UA、CK-MB水平均低于对照组,观察组治疗前后各指标差值均大于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表4。

2.4 MACE发生率比较

观察组MACE发生率低于对照组,差异具有统计学意义($P < 0.05$),见表5。

2.5 两组不良反应比较

两组均未出现血小板减少症和脑出血,轻度观察组不良反应发生率与对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表6。

表6 两组不良反应比较 [$n(\%)$]

Table 6 Comparison of adverse reactions between the 2 groups [$n(\%)$]

组别	n	消化道出血	牙龈出血	总发生
观察组	54	1(1.85)	1(1.85)	2(3.70)
对照组	53	1(1.89)	0(0)	1(1.89)
χ^2 值				<0.001
P 值				0.987

3 讨论

药物洗脱支架治疗是急诊介入治疗 AMI 方式之一,在临床应用广泛。但由于 AMI 患者冠状动脉内血栓较多,行药物洗脱支架治疗时容易发生血栓脱落而造成远端微循环栓塞,出现复流慢或者无复流现象,影响治疗。因此对于行该项治疗的 AMI 患者,可通过强化血小板治疗来降低血栓栓塞发生率,以完全恢复冠状动脉血流灌注以及心肌组织灌注^[9]。

常用抗血小板药物阿司匹林、氯吡格雷均只能抑制血小板活化过程中的某一条路径,不能防止血小板经其他途径激活。而血小板糖蛋白 II b/III a 受体拮抗剂的出现打破了上述药物应用局限,其作用于血小板聚集的最后共同通路,能够竞争性抑制纤维蛋白原或血管假性血友病因子介导的血小板聚集,导致纤维蛋白原难以和糖蛋白 II b/III a 受体结合,继而抑制了血小板聚集,发挥抗血小板作用^[10]。盐酸替罗非班是目前临床使用的血小板糖蛋白 II b/III a 受体拮抗剂中作用最强、应用最广的药物,其分子量小,形成的抗原抗体反应也弱,停止使用后能够快速在血液中消失,半衰期短,可以早期获得最佳抑制血小板聚集作用^[11]。本次研究结果表明联合治疗能够提高老年 AMI 患者临床疗效,改善血管血流再灌注,促使心功能恢复。商卓等^[12]研究也显示,在 AMI 患者介入治疗中使用盐酸替罗非班,能够明显增加心肌细胞血流灌注,缩小受损心肌面积,提升临床疗效。

cTnI 是表达于心脏组织的一种蛋白,为心肌细胞特有抗原,当心肌细胞出现缺血缺氧时,cTnI 会从细胞中释放进入到血液中,使血液中 cTnI 表达增多^[13]。D-D 为特异性纤溶过程标记物,一般情况下人体血浆 D-D 水平较低,当 D-D 水平明显升高时,提示纤溶蛋白降解增多,有血凝块形成^[14]。UA 为体内嘌呤代谢的终末产物,相关研究表明,血清 UA 水平与心血管疾病存在密切关联,对比 UA 水平正常的人群,高尿酸血症患者心血管疾病的发病率和死亡率明显升高^[15]。CK-MB 属于肌酸激酶,主要分布在心肌细胞胞浆内,是临床公认的反映心肌损伤坏死的敏感性佳的重要指标^[16]。本次结果表明盐酸替罗非班联合药物洗脱支架治疗能够更好地减轻心肌受损程度,保护心肌细胞,进而改善患者心功能。

抗血小板治疗不当可引起出血,血小板减少症是抗血小板药物治疗的严重并发症,甚至可造成患者死亡。在使用抗血小板药物治疗时,患者出血是观察重点。本次结果提示盐酸替罗非班联合药物洗脱支架治疗不会明显增加患者出血发生率。

本次研究也存在以下不足之处:两组总样本量仅 107 例,样本量并不多,可能会对不良反应发生情况有一定影响;此外,本次研究随访时间较短,未对患者远期效果进行随访统计分析,这有待后续增加样本量和延长随访时间,更好地完善研究。

综上所述,对老年 AMI 患者采用盐酸替罗非班联合药物洗脱支架治疗,能够获得显著治疗效果,有效降低血清 cTnI、D-D、UA、CK-MB 水平,且可减少心脏不良事件发生。

参考文献

- [1] 张瑞环,李公信,申健,等.老年急性心肌梗死患者介入治疗的疗效及近期安全性评价[J].热带医学杂志,2012,12(04):407-410.
- [2] Spacek M, Zemanek D, Hutrya M, et al. Vulnerable atherosclerotic plaque - A review of current concepts and advanced imaging[J]. Biomed Pap Med Facy Univ Palacky, Olomouc Czech, Repub, 2018, 162(1):10-17.
- [3] Kim Y, Jeong MH, Ahn Y, et al. Results of a 10-Year Experience in Korea Using Drug-Eluting Stents During Percutaneous Coronary Intervention for Acute Myocardial Infarction (from the Korea Acute Myocardial Infarction Registry) [J]. Am J Cardiol, 2018, 122(3):365-373.
- [4] 王洪涛,孟庆阳,廖序东,等.冠状动脉内注射替罗非班对急诊介入治疗中无复流的影响[J].中华急诊医学杂志,2016,25(6):822-824.
- [5] 牛文书,刘扬,王玉斌,等.替罗非班在缺血性进展性卒中的疗效观察[J].中华疾病控制杂志,2019,23(4):489-492.
- [6] 佚名.缺血性心脏病的命名及诊断标准[J].广东医学,1982,8(9):33-34.
- [7] 李勇,吕树铮.首次急性 ST 段抬高型心肌梗死患者行直接经皮冠状动脉介入术中发生无复流合并心动过缓的危险因素[J].心肺血管病杂志,2018,37(5):384-387,392.
- [8] 李宝亮,苏华,马俊帅,等.替罗非班注射剂治疗急性心肌梗死患者的临床研究[J].中国临床药理学杂志,2020,36(17):2617-2619,2623.
- [9] 郭庆,叶鸿.单药与双联抗血小板治疗对药物洗脱支架植入术后血管内皮功能及炎症因子的影响[J].河北医学,2018,24(2):235-239.
- [10] 崔凡凡,石秋艳,李艳玲,等.阿司匹林联合血小板膜糖蛋白 II b/III a 受体拮抗剂对进展性脑卒中患者预后的影响[J].中国老年学杂志,2019,39(21):5173-5176.

(下转第 224 页)

Pokemon、TIP30 和 HCCR-1 在直肠癌组织中的表达及预后的关系研究

樊丽伟 古彩喆 赵彦煊 李洵 付晓霞 张磊 汪景坤 张东娇*

[摘要] **目的** 探讨 Pokemon、TIP30 和人宫颈癌基因-1(HCCR-1)在直肠癌组织中的表达及预后的关系。**方法** 纳入 100 例 2016 年 6 月至 2018 年 6 月本院收治的直肠癌患者,收集术中切取的 100 份直肠癌组织及癌旁组织。采用免疫组织化学方法检测 Pokemon、TIP30 及 HCCR-1 蛋白的表达水平。比较 Pokemon、TIP30 及 HCCR-1 不同表达水平患者临床资料的差异。对患者进行随访 2 年,采用多元 Logistic 回归分析影响直肠癌患者预后的危险因素,绘制 Kaplan-Meier 生存曲线,研究 Pokemon、TIP30 及 HCCR-1 蛋白表达情况对直肠癌患者预后的影响。**结果** 直肠癌组织中 Pokemon、HCCR-1 蛋白表达水平显著高于癌旁组织,而 TIP30 蛋白表达水平显著低于癌旁组织,差异有统计学意义($P < 0.05$);年龄、性别、局部浸润程度与直肠癌患者组织 Pokemon、TIP30 及 HCCR-1 蛋白表达无相关($P > 0.05$),但 Dukes 分期、淋巴结转移与 Pokemon、HCCR-1 蛋白表达呈正相关,而组织分化程度与 TIP30 蛋白表达呈负相关($P < 0.05$);100 例直肠癌患者 2 年生存率为 43.00%(43/100)。Dukes 分期、淋巴结转移、分化程度、Pokemon 高表达、TIP30 低表达及 HCCR-1 高表达为影响直肠癌患者预后的独立危险因素($P < 0.05$)。Pokemon、HCCR-1 蛋白低表达组平均生存时间显著长于高表达组,TIP30 蛋白高表达组平均生存时间显著长于低表达组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** Pokemon、HCCR-1、TIP30 与在直肠癌患者组织中密切相关,可作为预测直肠癌患者预后的分子标志物和肿瘤治疗的潜在靶点。

[关键词] Pokemon; TIP30; HCCR-1; 直肠癌

Expression of Pokemon, TIP30 and HCCR-1 in rectal cancer and their relationship with prognosis

FAN Liwei, GU Caizhe, ZHAO Yanhuan, LI Xun, FU Xiaoxia, ZHANG Lei, WANG Jingkun, ZHANG Dongjiao*

(Hospital of the 82nd Group Army of PLA, Baoding, Hebei, China, 071000)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the expression of Pokemon, TIP30 and HCCR-1 in rectal cancer and their relationship with prognosis. **Methods** 100 patients with rectal cancer who were admitted to this hospital from June 2016 to June 2018 were enrolled. 100 rectal cancer tissues and adjacent tissues were collected during the operation. Immunohistochemical methods were used to detect the expression levels of Pokemon, TIP30 and HCCR-1 proteins. The differences in the clinical data of patients with different expressions of Pokemon, TIP30 and HCCR-1 were compared. All patients were followed up for 2 years after the treatment. Multivariate Logistic regression was used to analyze the risk factors affecting the prognosis of patients with rectal cancer. Kaplan-Meier survival curve was drawn to study the effects of Pokemon, TIP30 and HCCR-1 protein expressions on the prognosis of patients with rectal cancer. **Results** The Pokemon and HCCR-1 proteins in rectal cancer tissues were significantly higher than those in precancerous tissues, and the TIP30 protein was lower than that in precancerous tissues, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). There was no significant correlation between age, gender, and the degree of local infiltration and the Pokemon, TIP30, and HC-

基金项目:保定市科技计划项目(1941ZF098)

作者单位:中国人民解放军陆军第八十二集团军医院消化内科,河北,保定 071000

*通信作者:张东娇, E-mail: yuan109853wang50@163.com

CR-1 protein in patients with rectal cancer ($P>0.05$), but Dukes staging, lymph node metastasis, Pokemon, and HCCR-1 protein expression are positively correlated. The degree of tissue differentiation and TIP30 protein expression were negatively correlated ($P<0.05$). The 2-year survival rate of 100 patients with rectal cancer was 43.00 % (43/100). Dukes staging, lymph node metastasis, degree of differentiation, high expression of Pokemon and HCCR-1, and low expression of TIP30 were independent risk factors affecting the prognosis and survival of patients with rectal cancer ($P<0.05$). The average survival time of the Pokemon and HCCR-1 protein low expression group was longer than that of the high expression group, and the average survival time of the TIP30 protein high expression group was longer than that of the low expression group, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** The level of Pokemon, HCCR-1 and TIP30 are closely related to the prognosis in the tissues of rectal cancer patients, and can be used as molecular markers for predicting the prognostic survival of patients with rectal cancer and potential targets for tumor therapy.

[KEY WORDS] Pokemon; TIP30; HCCR-1; Rectal cancer

直肠癌是消化道常见的恶性肿瘤,其发病率仅次于胃癌和食道癌,近年来该病的发病率和死亡率呈现逐年上升的趋势^[1]。尽早诊治直肠癌患者,提高其疗效及生存率是目前研究热点^[2]。Pokemon (POK erythroid myeloid ontogenetic factor) 是由 POK 家族的 ZBTB7A 基因编码的转录阻遏蛋白,广泛表达于多种肿瘤中,可通过多种机制在肝癌、前列腺癌、非小细胞肺癌等的发生、发展与分化过程中发挥重要作用^[3]。人宫颈癌基因-1 (Human Cervical Cancer Oncogene, HCCR-1) 是一个线粒体外膜蛋白,由 LETMD1 编码产生,通过负调控抑癌基因 p53 的表达,参与到多种恶性肿瘤的早期发生^[4]。TIP30 (Tat interacting protein 30) 是新发现的基因,可作为抑癌基因,使细胞凋亡,负调控肿瘤的发生、发展^[5]。然而,这三个基因在直肠癌中的研究较少,其与患者的临床病理特征及预后是否相关也有待于进一步探索。故本研究将分析 Pokemon、TIP30 及 HCCR-1 在直肠癌患者组织中的表达与临床特征、预后的关系,以期为临床治疗提供新思路。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集 2016 年 6 月至 2018 年 6 月在本院接受手术治疗的 100 例直肠癌患者的临床资料。平均年龄(56.31 ± 6.65)岁。纳入标准:①符合 2018 年美国癌症协会结直肠癌筛查指南解读标准^[6];②术前未接受化疗、放疗等辅助治疗;③患者临床资料完整。排除标准:①合并肝、肾、心脏等脏器严重疾病者;②合并严重神经功能、认知功能障碍者;③依从性差者。本研究经医院医学伦理委员会批准,患

者均签署知情同意书。

1.2 样本采集及 Pokemon、TIP30 及 HCCR-1 蛋白表达水平检测

收集术中切取的 100 份直肠癌组织及癌旁组织。Pokemon、TIP30 及 HCCR-1 蛋白水平的检测采用免疫组织化学方法进行^[7]。

1.3 临床病理特征及随访

对所有患者性别、年龄、临床分期、组织分化程度、Pokemon、TIP30 及 HCCR-1 蛋白表达情况及其预后情况进行记录和统计,比较 Pokemon、TIP30 及 HCCR-1 蛋白不同表达患者临床病理特征间的差异。采用双盲法评定 Pokemon、TIP30 及 HCCR-1 蛋白的表达情况^[8],并予以免疫反应评分判定患者表达状态,低表达状态为阴性和弱阳性(-,+),高表达状态为中等阳性和强阳性(++,+ + +)。所有患者治疗结束后通过电话、微信、到院复诊等方式进行随访 2 年,随访截止日期为 2020 年 6 月 30 日。

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, χ^2 检验;计量资料采用 $(\bar{x}\pm s)$ 描述, t 检验;采用多元 Logistic 回归分析影响直肠癌患者预后生存的危险因素;绘制 Kaplan-Meier 生存曲线研究 Pokemon、TIP30 及 HCCR-1 蛋白的表达对患者预后的影响。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

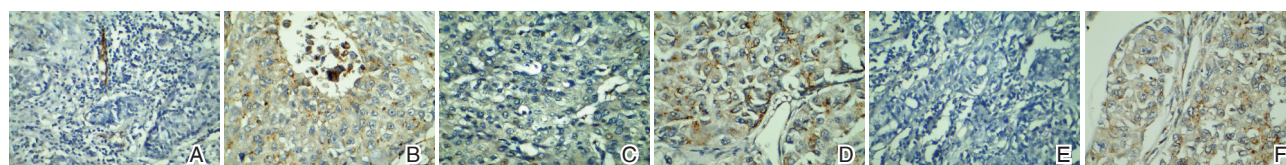
2.1 直肠癌组织和癌旁组织中 Pokemon、TIP30 及 HCCR-1 蛋白表达情况比较

癌组织 Pokemon、HCCR-1 水平显著高于癌旁组织,TIP30 水平低于癌旁组织,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 1、图 1。

表1 直肠癌组织和癌旁组织中 Pokemon、TIP30 及 HCCR-1 蛋白表达情况比较 [n(%)]

Table 1 Comparison of Pokemon, TIP30 and HCCR-1 protein expression in rectal cancer tissues and adjacent normal tissues [n(%)]

分组	n	Pokemon 蛋白					TIP30 蛋白					HCCR-1 蛋白				
		-	+	++	+++	高表达率(%)	-	+	++	+++	高表达率(%)	-	+	++	+++	高表达率(%)
癌旁组织	100	45	31	14	10	24(24.00)	10	9	39	42	81(81.00)	46	32	17	9	26(26.00)
癌组织	100	6	8	48	38	86(86.00)	33	38	17	12	29(29.00)	5	11	51	33	84(84.00)
χ^2 值	-	77.657					54.626					67.960				
P 值	-	<0.001					<0.001					<0.001				



注:A、B 分别为 Pokemon 蛋白低、高表达; C、D 分别为 TIP30 蛋白低、高表达; E、F 分别为 HCCR-1 蛋白低、高表达

图1 直肠癌组织癌组织 Pokemon、TIP30 及 HCCR-1 蛋白免疫组化染色图 (SP, × 500)

Figure 1 immunohistochemical staining of Pokemon, TIP30 and HCCR-1 in rectal cancer (SP, × 500)

2.2 不同临床病理特征与直肠癌患者癌组织中 Pokemon、TIP30 及 HCCR-1 蛋白表达水平的关系

年龄、性别、局部浸润程度与直肠癌患者组织 Pokemon、TIP30 及 HCCR-1 蛋白表达无显著

相关性 ($P>0.05$), Dukes 分期、淋巴结转移与 Pokemon、HCCR-1 蛋白表达呈正相关, 组织分化程度与 TIP30 蛋白表达呈负相关 ($P<0.05$)。见表 2。

表2 不同临床病理特征与直肠癌患者癌组织中 Pokemon、TIP30 及 HCCR-1 蛋白表达水平比较 [n(%)]

Table 2 Comparison of Pokemon, TIP30 and HCCR-1 protein expression levels in different clinicopathological features and rectal cancer tissues [n(%)]

临床特征		Pokemon 蛋白				HCCR-1 蛋白				TIP30 蛋白			
		高表达 (n=76)	低表达 (n=24)	χ^2 值	P 值	高表达 (n=74)	低表达 (n=26)	χ^2 值	P 值	高表达 (n=29)	低表达 (n=71)	χ^2 值	P 值
年龄(岁)	≥60	31(0.36)	12(0.50)	0.631	0.427	30(0.35)	13(0.50)	0.702	0.402	14(0.48)	29(0.40)	0.464	0.496
	<60	45(0.52)	12(0.50)			44(0.52)	13(0.50)			15(0.51)	42(0.59)		
性别(例)	男	37(0.43)	14(0.58)	0.680	0.410	39(0.46)	12(0.46)	0.330	0.566	18(0.62)	33(0.46)	2.003	0.157
	女	39(0.45)	10(0.41)			35(0.41)	14(0.53)			11(0.37)	38(0.53)		
Dukes 分期	A+B	49(0.56)	5(0.50)	13.985	<0.001	48(0.57)	6(0.23)	13.526	<0.001	27(0.93)	27(0.38)	25.143	<0.001
	C+D	27(0.31)	19(0.79)			26(0.30)	20(0.76)			2(0.06)	44(0.61)		
组织分化程度	低分化	39(0.45)	20(0.83)	7.730	0.005	38(0.45)	21(0.80)	6.883	0.009	6(0.20)	53(0.74)	24.7820	<0.001
	高中分化	37(0.43)	4(0.16)			36(0.42)	5(0.19)			23(0.79)	18(0.25)		
淋巴结转移	是	37(0.43)	18(0.75)	5.104	0.024	36(0.42)	19(0.73)	4.639	0.031	5(0.17)	51(0.71)	25.979	<0.001
	否	39(0.45)	6(0.25)			38(0.45)	7(0.26)			25(0.86)	20(0.28)		
局部浸润程度	T1~T2	35(0.40)	11(0.45)	0.000	0.985	32(0.38)	14(0.53)	1.079	0.299	13(0.44)	33(0.46)	0.023	0.880
	T3~T4	41(0.47)	13(0.54)			44(0.52)	12(0.46)			16(0.55)	38(0.53)		

2.3 直肠癌患者 Pokemon、TIP30 及 HCCR-1 蛋白表达的预后情况

本研究对 100 例直肠癌进行随访显示, 患者 2 年生存率为 43.00%(43/100)。

2.4 影响直肠癌患者预后生存的单因素和多因素分析

Dukes 分期、淋巴结转移、分化程度、Pokemon 高表达、TIP30 低表达及 HCCR-1 高表达为影响直肠癌患者预后生存的独立危险因素 ($P<0.05$), 见表 3。

2.5 Pokemon、TIP30 及 HCCR-1 蛋白与直肠癌患者预后生存的相关性分析

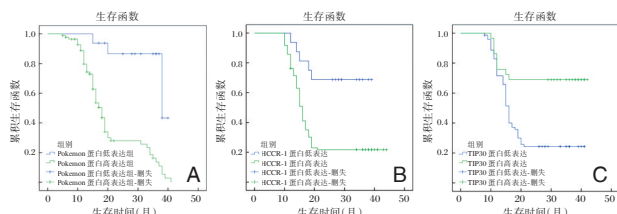
Pokemon 低表达组平均生存时间为 (36.12±1.42) 个月, 高于 Pokemon 高表达组的平均生存时间为 (20.92±1.49) 个月, 差异有统计学意义 ($t=73.848, P<0.001$)。HCCR-1 低表达组平均生存时间为 (31.68±1.67) 个月, 高于 HCCR-1 高表达组的平均生存时间为 (20.91±1.28) 个月, 差异有统计学意义 ($t=51.185, P<0.001$)。TIP30 低表达组平均生

表3 影响直肠癌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 rectal 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
局部浸润深度(T1~T2 vs T3~T4)	1.775	0.717~4.390	0.594	—	—	—
分化程度(低分化 vs 中高分化)	1.962	1.535~2.506	0.016	2.125	1.605~2.813	<0.001
Dukes 分期(A+B vs C+D)	2.330	1.781~3.048	0.009	2.572	1.865~3.548	<0.001
淋巴结转移(有 vs 无)	1.960	1.595~2.048	0.013	2.330	1.778~3.054	<0.001
Pokemon(高表达 vs 低表达)	2.155	1.720~2.700	0.045	2.444	1.772~3.371	<0.001
TIP30(高表达 vs 低表达)	2.565	1.984~3.316	0.033	2.401	1.775~3.247	<0.001
HCCR-1(高表达 vs 低表达)	2.325	1.816~2.977	0.021	2.565	1.896~3.468	<0.001

存时间为(20.81±1.91)个月,低于 TIP30 高表达组的平均生存时间为(32.75±1.33)个月,差异有统计学意义($t=51.300, P<0.001$)。见图2。



注:A: Pokemon 与直肠癌患者预后生存的相关性; B: HCCR-1 与直肠癌患者预后生存的相关性; C: TIP30 与直肠癌患者预后生存的相关性。

图2 Pokemon、HCCR-1、TIP30 与直肠癌患者预后生存的 Kaplan-meier 生存曲线

Figure 2 Kaplan Meier survival curve of Pokemon, HCCR-1, TIP30 and prognosis of rectal cancer patients

3 讨论

据统计,直肠癌的发病率及病死率逐年上升,5年生存率不足20%^[9]。分子标记物对直肠癌的诊疗、病变程度、疗效评价及预后的预测等方面有重要作用。

Pokemon 在临床上被认为是瘤的总开关,并可作为细胞异常增殖的特异性指标^[10]。Knight 等^[11]在结肠癌研究中发现,Pokemon 通过作用于 ARF 及 P53 信号通路发挥致癌作用。Braide 等^[12]通过对比肝癌组织及癌旁组织 Pokemon 表达发现,Pokemon 在癌组织中表达明显升高,且其与肝癌进展呈正相关。TIP30 定位于 11P15.1 染色体,参与人体激素调节、细胞内氧化还原反应及细胞代谢而发挥重要的生物学功能。研究表明,TIP30 一方面可特异性作用于 Tat 蛋白活化区域,进而对基因的转录进行调节,另一方面可阻断细胞从 G0、G1 进入 S 期,使细胞增殖受到抑制,从而阻断异常细胞的增殖,促进

细胞凋亡^[13]。Adli 等^[14]对 TIP30 在结直肠癌研究中显示,TIP30 蛋白在癌组织中表达明显降低,且与结直肠癌临床分期、分化程度、淋巴结转移、VEGF 和 P53 的表达相关。Qunli 等^[15]对肝癌及癌旁组织中 TIP30 蛋白的表达进行检测发现,所有癌旁组织中均可检测到 TIP30 高表达,但在癌组织中 TIP30 表达降低,提示 TIP30 的缺失可能促进肝癌的发生和进展。而国外大量研究结果表明 HCCR-1 在白血病、肾癌、淋巴瘤、结肠癌、乳腺癌、胃癌、肝癌和子宫癌中均有过度表达,且在早期肿瘤中表达更为显著,提示其与人类多种恶性肿瘤的早期发生有关^[16]。本研究发现 Pokemon、HCCR-1 在直肠癌细胞中呈高表达状态,TIP30 在直肠癌组织中呈低表达,并且与 Dukes 分期、淋巴结转移及分化程度有关,与既往 Kammar 等^[17]对结直肠腺瘤中研究一致,说明 Pokemon、TIP30、HCCR-1 在直肠癌患者中恶变程度、侵袭转移中占有重要作用。

同时,为明确影响直肠癌患者预后影响的危险因素,本文研究对食管癌患者进行为期2年随访发现,患者2年生存率为43.00%。相关研究发现,Pokemon 水平上升与结直肠癌患者三年生存率密切相关^[18]。结果与上述研究一致,有力证明了 Pokemon、TIP30、HCCR-1 与直肠癌患者关系密切,进一步提示 Pokemon、TIP30、HCCR-1 通过参与肿瘤细胞的分化、浸润和转移影响直肠癌患者临床结局。但本研究由于纳入的样本量有限,研究结果有待于通过进一步扩大样本量或多中心合作研究予以进一步证实。

综上所述,Pokemon、TIP30 及 HCCR-1 在直肠癌中呈异常表达状态,且与临床病理特征及预后生存密切相关,可作为预测直肠癌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] 白驹, 杨力芳. 结直肠癌患者血浆中可溶性血栓调节蛋白的水平及其临床意义[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2018, 10(1):38-42.
- [2] 王红, 黄慧瑶, 刘成成, 等. 我国结直肠癌筛查卫生经济学证据系统更新: 2009-2018[J]. 中华流行病学杂志, 2020, 41(3):429-435.
- [3] Li X, Xiao C, Kong Y, et al. Rectal wall dose-volume effect of pre- or post KUSHEN Ningjiao's relationship with 3D brachytherapy in cervical cancer patients [J]. Radiat Oncol, 2019, 14(1):274-278.
- [4] Liu W, Li Y, Zhu H, et al. The Relationship between Primary Gross Tumor Volume and Tumor Response of Locally Advanced Rectal Cancer: pGTV as a More Accurate Tumor Size Indicator[J]. J Invest Surg, 2019, 11(3):1-10.
- [5] Valeria T, Arianna B, Stefania B, et al. Factors affecting the number of lymph nodes retrieved after colo-rectal cancer surgery: A prospective single-centre study[J]. Surgeon, 2020, 18(1):31-36.
- [6] 张政, 张澍田, 李鹏. 2018年美国癌症协会结直肠癌筛查指南解读[J]. 中国实用内科杂志, 2018, 38(9):814-816.
- [7] Zhao L, Wang XM, LV CY, et al. Relationship between the Expression of TOP2A Gene and Chemotherapy Response in Advanced Rectal Cancer[J]. Practi J Cancer, 2019, 15(7):517-519.
- [8] Howell JN, Nelson B, Cady D, et al. Relationship of lymphopenia to overall survival and progression-free survival in rectal cancer patients receiving neoadjuvant chemoradiation [J]. J Clin Oncol, 2020, 38(4):39.
- [9] Nocera F, Markus VF, Steinemann DC. Rectal prolapse following short-course radiotherapy for rectal cancer: report of a case [J]. J Surg Case Rep, 2020, 2020(12):1-3.
- [10] Wang HF, Liu J, Wang G. Comparison of the short-term outcomes of abdominoperineal resection for rectal cancer between folding knife position and lithotomy position[J]. J Laparosc Surg, 2019, 22(5):392-395.
- [11] Knight K, Boland K, Mcmillan DC, et al. The relationship between aortoiliac calcification and long-term outcome in rectal cancer resection[J]. J Clin Oncol, 2019, 37(4):705.
- [12] Braide K, Kindblom J, Lindencrona U, et al. Salvage radiation therapy in prostate cancer: relationship between rectal dose and long-term, self-reported rectal bleeding [J]. Clin Transl Oncol, 2020, 17(3):1-8.
- [13] Thomsen CB, Andersen RF, Jensen LH, et al. The Clinical Impact of MicroRNA-21 in Low Rectal Cancer Treated with High-Dose Chemoradiotherapy in the Organ Preserving Setting[J]. Gastrointestinal Disorders, 2020, 2(4):378-384.
- [14] Adli M, Ozturk F, Degerli AD. Simultaneous Integrated Versus Sequential Boost with VMAT in Neoadjuvant Radiotherapy of Rectal Cancer: A Dosimetric Study[J]. Int J Radiat Oncol Biol Physics, 2020, 108(3):649.
- [15] Tang QL, Xiao LL, Wei QH. Study on monitoring of Streptococcus agalactiae in third trimester women and its relationship with vaginal microenvironment [J]. Int J Laborat Med, 2019, 14(3):572-576.
- [16] Wang X, Xie J, Ye W, et al. Vascular Endothelial Growth Factor-C Expression in Rectal Cancer and the Relationship with Lymphangiogenesis and Lymphatic Metastasis [J]. J Biomat Tissue Eng, 2019, 9(3):338-341.
- [17] Kammar P, Chaturvedi A, Sivasanker M, et al. Impact of delaying surgery after chemoradiation in rectal cancer: outcomes from a tertiary cancer centre in India[J]. J Gastrointest oncol, 2020, 11(1):13-22.
- [18] Roeder F, Meldolesi E, Gerum S, et al. Recent advances in (chemo-) radiation therapy for rectal cancer: a comprehensive review Introduction and current standard approach [J]. Radiat Oncol, 2020, 15(1):216-219.

(上接第219页)

- [11] 李岳. 盐酸替罗非班对急性冠状动脉综合征的临床疗效及安全性评价[J]. 中国临床药理学杂志, 2015, 31(16):1572-1574.
- [12] 商卓, 罗惟恕, 关杰, 等. 冠状动脉内盐酸替罗非班联合短时静脉泵注对行直接PCI术STEMI患者的疗效评价[J]. 中国急救医学, 2016, 36(5):430-433.
- [13] Jaimi G, Elizabeth C, Christopher VH, et al. Evaluating Rapid Rule-out of Acute Myocardial Infarction by Use of a High-Sensitivity Cardiac Troponin I Assay at Presentation [J]. Clin Chem, 2018, 64(5):820-829.
- [14] 王燕, 杨奇, 韩者艺. D-二聚体与结直肠癌预测及预后关系的研究进展[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2019, 35(4):94-98.
- [15] 李刚, 朱春凯, 郑培明. miR-499、miR-16、肌红蛋白与常规心肌损伤标志物的关系及在急性心肌梗死早期诊断中的价值[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(6):728-732.
- [16] 朱会会, 贾媛媛, 毛恩强, 等. 心肌损伤标记物对急性胰腺炎严重程度的预测效应[J]. 中华急诊医学杂志, 2018, 27(9):972-976.

· 论 著 ·

动脉粥样硬化性脑梗死血清 LP-PLA2、MMP-13 与动脉狭窄程度的关系

肖华 高远 李玉萍 郭园丽*

[摘要] **目的** 探讨动脉粥样硬化性脑梗死患者血清脂蛋白相关磷脂酶 A2(Lp-PLA2)、基质金属蛋白酶 13(MMP-13)表达及与动脉狭窄程度的相关性。**方法** 选取 2016 年 12 月至 2019 年 12 月本院收治的 92 例动脉粥样硬化性急性脑梗死患者作为观察组,选取同期在本院进行体检的 86 例健康人群设为对照组。对比两组血清 Lp-PLA2、MMP-13 水平,并采用 Logistic 回归模型分析影响动脉粥样硬化性脑梗死患者颈动脉狭窄程度的危险因素,通过 ROC 曲线分析 Lp-PLA2、MMP-13 及二者联合检测对动脉粥样硬化性脑梗死患者动脉狭窄程度的预测价值。**结果** 观察组 MMP-13、Lp-PLA2 水平显著高于对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。总胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白、吸烟、NIHSS 评分、MMP-13、Lp-PLA2 为影响动脉粥样硬化性脑梗死患者动脉狭窄程度的单因素($P<0.05$)。总胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白、吸烟、NIHSS 评分、MMP-13、Lp-PLA2 为影响动脉粥样硬化性脑梗死患者动脉狭窄程度的独立危险因素($P<0.05$)。采用 ROC 曲线分析 MMP-13、Lp-PLA2 及二者联合曲线下面积分别为 0.794、0.889、0.953,各指标曲线下面积以联合检测最大。**结论** 可通过加强监测 MMP-13、Lp-PLA2 水平,了解动脉粥样硬化性脑梗死患者病情情况,MMP-13 及 Lp-PLA2 可作为判断动脉粥样硬化性脑梗死患者动脉血管狭窄程度的重要指标。

[关键词] 动脉粥样硬化; 脑梗死; LP-PLA2; MMP-13; 动脉狭窄程度

The relationship between serum LP-PLA2, MMP-13 and the degree of arterial stenosis in patients with atherosclerotic cerebral infarction

XIAO Hua, GAO Yuan, LI Yuping, GUO Yuanli*

(Department of Neurology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan, China, 450000)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the expression of serum lipoprotein-associated phospholipase A2 (Lp-PLA2) and matrix metalloprotein-13 (MMP-13) in patients with atherosclerotic cerebral infarction and their relationship with the degree of arterial stenosis Relevance. **Methods** 92 patients with atherosclerotic acute cerebral infarction admitted to our hospital from December 2016 to December 2019 were selected as the observation group. 86 healthy people who underwent physical examination in our hospital during the same period were selected and set as the control group. The serum levels of Lp-PLA2 and MMP-13 were compared between the two groups, and the logistic regression model was used to analyze the risk factors affecting the degree of carotid artery stenosis in patients with atherosclerotic cerebral infarction. The ROC curve was used to analyze the predictive value of Lp-PLA2, MMP-13 and the combination of the two in the degree of arterial stenosis in patients with atherosclerotic cerebral infarction. **Results** The levels of MMP-13 and Lp-PLA2 in the observation group were significantly higher than those in the control group, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). Total cholesterol, triglycerides, high-density lipoprotein, low Density

基金项目:河南省医学科技攻关计划项目(201603138)

作者单位:郑州大学第一附属医院神经内科,河南,郑州 450000

*通信作者:郭园丽, E-mail: gylzd@163.com

lipoprotein, smoking, NIHSS score, MMP-13, Lp-PLA2 are the single factor that affects the degree of arterial stenosis in patients with atherosclerotic cerebral infarction ($P<0.05$). Total cholesterol, triglycerides, low-density lipoprotein, smoking, NIHSS score, MMP-13, Lp-PLA2 is an independent risk factor affecting the degree of arterial stenosis in patients with atherosclerotic cerebral infarction ($P<0.05$). The area under the curve of MMP-13, Lp-PLA2 and the combination of the two were 0.794, 0.889, 0.953, respectively, and the area under the curve of each indicator was the largest in the combined test. **Conclusion** MMP-13 and Lp-PLA2 can be used as important indicators to judge the degree of arterial vascular stenosis in patients with atherosclerotic cerebral infarction.

[KEY WORDS] Atherosclerosis; Cerebral infarction; LP-PLA2; MMP-13; Degree of arterial stenosis

随着经济水平的提高、生活方式及饮食习惯的转变,脑血管发病率逐年上升,成为危害人类生命健康的主要疾病之一。其中缺血性脑卒发病率占所有脑血管疾病中的80%左右,而大动脉粥样硬化性脑梗死为缺血性脑卒中最为常见的病理类型^[1]。有学者研究指出,动脉粥样硬化发生过程中除了传统危险因素参与之外,还存在新的危险因素参与^[2]。脂蛋白相关磷脂酶A2(lipoprotein associated phospholipase A2, Lp-PLA2)作为炎症反应标记物,与脑梗死的发生有密切联系;基质金属蛋白酶13(Matrix metalloprotein-13, MMP-13)是金属基质蛋白家族中的一种,其与动脉粥样硬化的关系在国内外有较多研究^[3]。但这两者与动脉粥样硬化性脑梗死患者颈动脉血管狭窄程度的关系鲜有报道,本文将探讨动脉粥样硬化性脑梗死患者Lp-PLA2、MMP-13表达及与动脉狭窄程度的相关性,为临床诊治动脉粥样硬化性脑梗死提供理论指导。现报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集2016年12月至2019年12月本院收治的92例动脉粥样硬化性急性脑梗死患者设为观察组。其中男52例,女40例;平均年龄(53.28 ± 3.29)岁;根据影像检查结果发现:轻-中度颈动脉狭窄45例,重度颈动脉狭窄47例;根据NIHSS评分^[4],分为:神经功能缺损轻度23例,神经功能缺损中度39例,神经功能缺损重度30例。并选取同期在本院进行体检的健康人群86例设为对照组,其中男46例,女40例;平均年龄(53.37 ± 4.35)岁。两组一般资料比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

纳入标准:①均经影像学(头颅MRI、CT、MRA或CTA)检查明确为粥样硬化性急性脑梗死且合并不同程度的颈动脉狭窄^[5];②年龄18~80岁;③采用美国国立研究院制定的卒中量表

(National institute of health stroke scale; NIHSS)评分^[6]评估神经功能受损程度,NIHSS评分在1~15分之间;④均为首次发病的患者,治疗过程中未存在再发脑梗死。排除标准:①腔隙性脑梗死、出血性卒中者;②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;③因药物、外伤、脑血管疾病等原因引起的脑梗死;④近期服用过炎症抑制药物者;⑤临床资料及影像资料有缺失者;⑥高血压、糖尿病患者。

1.2 检测方法

1.2.1 标本采集

观察组于发病后3 h内空腹抽取静脉血3 mL,对照组于纳入研究后清晨空腹状态下抽取静脉血3 mL。标本无需抗凝,4℃下放置30 min,3 000 r/min离心15 min,分离血清,-18℃保存待测,均在42 h内完成检测。应用酶联免疫吸附法检测血浆MMP-13、Lp-PLA2质量浓度,生化全套检查采用武汉贝茵莱生物科技有限公司的全自动生化仪及配套试剂盒,具体步骤严格按照说明书进行操作。MMP-13正常范围值:2.57~3.09 ng/mL^[7]; Lp-PLA2正常范围值:175~207 ng/mL^[8]。

1.2.2 头颈部CT血管成像(CT angiography, CTA)检查

应用日本东芝株式会社生产的TOSHIBA 80排螺旋CT(规格型号TSX-302A)对所有患者进行头颈部CTA检查(范围:主动脉弓下缘至)颅顶,足先进,观察双侧颈总动脉、颈内动脉、Willis环(双侧大脑前动脉始段、双侧颈内动脉末端、两侧大脑后动脉及前、后交通动脉)狭窄情况。

1.3 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;计量资料以 $(\bar{x}\pm s)$ 表示,行 t 检验;通过Logistic回归模型分析影响动脉粥样硬化性脑梗死患者颈动脉狭窄程度的危险因

素,绘制 ROC 曲线分析 MMP-13、Lp-PLA2 及二者联合对动脉粥样硬化性脑梗死患者颈动脉狭窄程度的预测价值,并计算 ROC 曲线下面积,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组 MMP-13、Lp-PLA2 水平检测结果比较

观察组 MMP-13、Lp-PLA2 水平显著高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 两组 MMP-13、Lp-PLA2 水平检测结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of detection results of MMP-13 and Lp-PLA2 between 2 groups ($\bar{x} \pm s$)			
组别	n	MMP-13 (ng/mL)	Lp-PLA2 (ng/mL)
观察组	92	5.28±0.57	232.19±88.62
对照组	86	2.80±0.31	122.10±39.45
t 值	-	35.709	10.581
P 值	-	<0.001	<0.001

2.2 影响动脉粥样硬化性脑梗死患者动脉狭窄程度的单因素

总胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白、吸烟、NIHSS 评分、MMP-13、Lp-PLA2 为影响动脉粥样硬化性脑梗死患者动脉狭窄程度的单因素($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 影响动脉粥样硬化性脑梗死患者动脉狭窄程度的单因素

Table 2 Single factors influencing the degree of arterial stenosis in patients with atherosclerotic cerebral infarction					
指标	分类	轻-中度狭窄 (n=45)	重度狭窄 (n=47)	t/χ ² 值	P 值
性别	男	22 (48.89)	30 (63.83)	2.088	0.148
	女	23 (51.11)	17 (36.17)		
年龄 (岁)	<65	24 (53.33)	28 (59.57)	0.364	0.546
	≥65	21 (46.67)	19 (40.43)		
BMI (kg/m ²)	-	23.88±2.13	24.05±2.19	0.377	0.707
总胆固醇 (mmol/L)	-	4.95±0.88	5.40±0.95	2.354	0.021
甘油三酯 (mmol/L)	-	1.77±0.49	1.52±0.42	2.631	0.010
高密度脂蛋白	-	1.20±0.33	1.22±0.35	0.282	0.779
低密度脂蛋白	-	2.64±0.58	2.95±0.64	2.431	0.017
NIHSS 评分	轻-中	29 (64.44)	16 (34.04)	8.503	0.004
	重	16 (35.56)	31 (65.96)		
饮酒	是	19 (42.22)	22 (46.81)	0.196	0.658
	否	26 (57.78)	25 (53.19)		
吸烟	是	23 (51.11)	34 (72.34)	4.396	0.036
	否	22 (48.89)	13 (27.66)		
MMP-13	-	4.75±0.41	5.39±0.49	6.779	0.001
Lp-PLA2	-	197.65±70.85	258.64±77.41	11.103	0.001

2.3 影响动脉粥样硬化性脑梗死患者动脉狭窄程度的多因素

总胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白、吸烟、NIHSS 评分、MMP-13、Lp-PLA2 为影响动脉粥样硬化性

脑梗死患者动脉狭窄程度的独立危险因素($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 影响动脉粥样硬化性脑梗死患者动脉狭窄程度的多因素

Table 3 Multiple factors influencing the degree of arterial stenosis in patients with atherosclerotic cerebral infarction						
因素	回归系数	标准误差	Wald/χ ² 值	OR 值	95%CI	P 值
总胆固醇	1.558	0.354	9.587	4.749	2.691~8.381	0.011
甘油三酯	1.785	0.595	9.145	5.959	2.691~8.381	0.028
低密度脂蛋白	1.586	0.324	10.058	4.884	2.588~9.217	0.008
吸烟	1.658	0.417	9.235	5.249	2.318~11.886	0.018
NIHSS 评分	1.724	0.458	11.254	5.607	2.177~9.895	0.001
MMP-13	1.658	0.421	11.025	5.249	3.323~8.289	0.002
Lp-PLA2	1.527	0.339	10.856	4.604	2.369~8.948	0.005

2.4 MMP-13、Lp-PLA2 及二者联合检测动脉粥样硬化性脑梗死患者动脉狭窄程度预测价值

MMP-13、Lp-PLA2 及二者联合曲线下面积分别为 0.794、0.889、0.953,各指标曲线下面积以联合检测最大,见表 4 及图 1。

表 4 MMP-13、Lp-PLA2 及二者联合检测动脉粥样硬化性脑梗死患者动脉狭窄程度预测价值

Table 4 The predictive value of MMP-13, Lp-PLA2 and their combined detection in patients with atherosclerotic cerebral infarction					
预测指标	最佳临界值	灵敏度 (%)	特异度 (%)	AUC	95%CI
MMP-13	23.45	0.669	0.774	0.794	0.648~0.941
Lp-PLA2	23.11	0.725	0.732	0.889	0.787~0.991
二者联合检测	23.58	0.785	0.801	0.953	0.000~1.000
预测指数模型	1.358	0.745	0.758	0.895	0.698~0.958

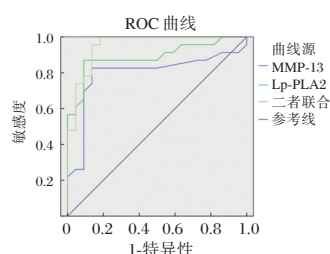


图 1 MMP-13、Lp-PLA2 及动脉粥样硬化性脑梗死患者动脉狭窄程度预测价值

Figure 1 The predictive value of MMP-13, Lp-PLA2 and arterial stenosis in patients with atherosclerotic cerebral infarction

3 讨论

脑梗死、冠心病等心血管疾病的发生都以动脉粥样硬化为病理基础,但引发动脉粥样硬化的发病机制尚未明确,国外学者率先提出动脉粥样

硬化是慢性炎症反应所引发的疾病,引发国内外学者的广泛关注^[9]。炎症反应参与了动脉粥样硬化形成及发展的过程,这一观点已被后续研究证实。Jung等^[10]学者指出,对脑血管疾病患者加强监测炎症标志物,可对该类疾病更好地做到早期诊断、治疗。

导致脑卒中发生的一个重要因素是大动脉粥样硬化性狭窄,而血管的炎症反应及氧化应激反应在动脉粥样硬化的发生及发展过程中发挥重要作用^[11]。Lp-PLA2是磷脂酶A2超家族成员之中的一个亚类,可生成溶血卵磷脂、氧化游离脂肪酸等促炎物质,提高细胞因子及粘附因子的表达,加速内皮细胞凋亡,最终形成动脉粥样硬化^[12-13]。本研究结果显示MMP-13、Lp-PLA2为影响动脉粥样硬化性脑梗死患者动脉狭窄程度的独立危险因素,与Rinaldo等^[14]学者报道结果一致。可见,对于动脉粥样硬化性脑梗死患者可通过了解患者生活习惯、既往史、加强血脂水平的监测来预测其动脉血管狭窄程度。这提示医务工作者今后在动脉粥样硬化性脑梗死发生的高危人群筛查中,可将血清MMP-13及Lp-PLA2做为有意义的生物学标志物。

动脉粥样硬化常累及肌性动脉,会促进出血及血栓形成,动脉中层的逐渐退变、钙化,逐渐阻塞动脉官腔,导致患者脑部组织爱缺血、坏死^[15-16]。有动物实验研究表明,抑制鼠MMP-13活性可减少胶原在颈动脉斑块中聚集,已形成的斑块稳定性增加,破裂能力降低^[17]。Toyama等^[18]学者报道,MMP-13参与细胞质新陈代谢、血管壁渗血、血栓形成、细胞凋亡及增殖的过程。本研究结果证实MMP-13、Lp-PLA2水平会影响动脉粥样硬化性脑梗死患者动脉狭窄程度,重度动脉狭窄的动脉粥样硬化性脑梗死患者血清MMP-13、Lp-PLA2水平更高。ROC曲线分析结果显示:MMP-13联合Lp-PLA2检测曲线下面积以联合检测最大,可见二者联合检测价值相对较高。

综上所述,可通过加强监测MMP-13、Lp-PLA2水平,了解动脉粥样硬化性脑梗死患者病情情况,血清MMP-13及Lp-PLA2可作为判断动脉粥样硬化性脑梗死患者动脉血管狭窄程度的重要指标。但本研究纳入样本较少,后续将进一步探讨MMP-13及Lp-PLA2之间的联系,以便于更好了解动脉粥样硬化性脑梗死患者病情程度。

参考文献

- [1] 张会朵,齐凡星,李慧. 动脉粥样硬化性脑梗死患者的红细胞分布宽度水平及临床意义[J]. 解放军医药杂志, 2017, 29(3):98-101.
- [2] 黄一苇,张昊,李灵真. 成年OSAHS患者血清MIF水平与病情严重程度的相关性及对并发脑梗死的预测价值[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(4):72-76.
- [3] 王华,张小广. 氯吡格雷、阿司匹林联合丁苯酞对进展性脑梗死患者神经功能及生活质量的影响[J]. 保健医学研究与实践, 2020, 16(1):24-27.
- [4] Hidenori S, Yoshinari N, Ryuta Y, et al. Dose-Dependent Inhibitory Effects of Cilostazol on Delayed Cerebral Infarction After Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage[J]. Transl Stroke Res, 2018, 12(25):87-78.
- [5] Lin J, Xian W, Lai R, et al. Bilateral cerebral infarction associated with severe arteriosclerosis in the A1 segment: a case report[J]. J Int Med Res, 2019, 17(9):36-47.
- [6] Aksoy AG, Özdemir AZ, Özkan S. Pathological Yawning in Patients with Acute Middle Cerebral Artery Infarction: Prognostic Significance and Association with the Infarct Location[J]. Balkan Med J, 2020, 37(1):877-878.
- [7] Kaur G, Peyster RG, Manganas LN. Undiagnosed Coarctation of the Aorta and Cerebral Infarction[J]. Pediatr Neurol, 2017, 66(29):11-15.
- [8] Kakudo T, Kishimoto N, Matsuyama T, et al. Functional recovery by application of human dedifferentiated fat cells on cerebral infarction mice model[J]. Cytotechnology, 2018, 18(27):97-100.
- [9] Deguchi I, Osada T, Takao M. Prescription status of oral anticoagulants in patients with acute cerebral infarction with non-valvular atrial fibrillation at the time of stroke onset[J]. J Cardiol, 2020, 75(5):544-548.
- [10] Jung BY, Se CB, Cheolkyu J, et al. Differentiation of Deep Subcortical Infarction Using High-Resolution Vessel Wall MR Imaging of Middle Cerebral Artery[J]. Korean J Radiol, 2017, 18(6):964-972.
- [11] Ping LI, Qin LI, Yue-Kang SU, et al. Comparison of Clinical Features of Cerebral Infarction in Young Adults and Middle-aged and Elderly Patients[J]. Systems Med, 2019, 19(20):87-90.
- [12] Elsawaf A, Galhom A. Decompressive craniotomy for malignant middle cerebral artery infarction: Optimal timing and literature review[J]. World Neurosurg, 2018, 18(25):18-21.
- [13] Deguchi I, Osada T, Kimura H, et al. A case of acute cerebral infarction associated with an accessory middle cerebral artery in a patient who underwent thrombectomy[J]. Acute Med Surg, 2019, 7(1):e459.
- [14] Kim JH, Kim SJ, Kim HY. Right Hand Weakness and Headache During Ascent to Mount Everest: A Case of Cerebral Venous Infarction[J]. Neurologist, 2017, 22(3):75-79.

· 论 著 ·

LncRNA OIP5-AS1 靶向 miR-511-3p 抑制肺癌细胞的增殖、迁移和侵袭的影响

张耀森* 卢国杰 钟惠铃 高建伟 陈亚勇 胡瑞娟

【摘要】 目的 研究 LncRNA OIP5-AS1 对肺癌细胞的增殖、迁移和侵袭的影响以及作用机制。方法 采用 qRT-PCR 法检测 OIP5-AS1 和 miR-511-3p 的表达量;采用 MTT 法检测细胞增殖;采用 Transwell 小室实验检测细胞迁移和侵袭;蛋白免疫印迹法检测 CyclinD1、MMP-2 蛋白表达量;双荧光素酶报告实验检测 OIP5-AS1 和 miR-511-3p 的靶向关系。结果 与正常细胞肺上皮细胞 BEAS-2B 相比,肺癌细胞 A549、NCI-H23 和 NCI-H2170 中 OIP5-AS1 表达显著增加,miR-511-3p 表达显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$);敲低 OIP5-AS1 或者过表达 miR-511-3p 显著抑制了肺癌细胞 A549 的增殖、迁移和侵袭;OIP5-AS1 可以靶向负调控 miR-511-3p 的表达,抑制 miR-511-3p 可以部分回复敲低 OIP5-AS1 对肺癌细胞 A549 的增殖、迁移和侵袭的影响($P<0.05$)。结论 LncRNA OIP5-AS1 通过靶向调控 miR-511-3p 的表达抑制肺癌细胞的增殖、迁移和侵袭。

【关键词】 OIP5-AS1; miR-511-3p; 肺癌细胞; 增殖; 迁移; 侵袭

LncRNA OIP5 - AS1 targeting miR - 511 - 3p inhibits the proliferation, migration and invasion of lung cancer cells

ZHANG Yaosen*, LU Guojie, ZHONG Huiling, GAO Jianwei, CHEN Yayong, HU Ruijuan

(District 1, Respiratory Center, Guangzhou Panyu Central Hospital, Guangzhou, Guangdong, China 511400)

【ABSTRACT】 **Objective** To study the effect of LncRNA OIP5-AS1 on the proliferation, migration and invasion of lung cancer cells, and its mechanism. **Methods** qRT-PCR method was used to detect the expression of OIP5-AS1 and miR-511-3p; MTT method was used to detect cell proliferation; Transwell assay experiment was used to detect cell migration and invasion; Western blotting method were used to detect CyclinD1 and MMP-2 protein expression; and the dual luciferase reporter experiment detects the targeting relationship between OIP5-AS1 and miR-511-3p. **Results** Compared with normal lung epithelial BEAS-2B cells, the expression of OIP5-AS1 in lung cancer cells A549, NCI-H23 and NCI-H2170 was significantly increased, and the expression of miR-511-3p was significantly decreased; knockdown OIP5-AS1 or overexpress miR-511-3p significantly inhibits the proliferation, migration (72.42 ± 7.73 and 68.52 ± 5.63) and invasion of lung cancer cell A549; OIP5-AS1 can target and negatively regulate the expression of miR-511-3p, and inhibit miR-511-3p to reverse the effects of partial knockdown OIP5-AS1 on the proliferation, migration and invasion of lung cancer cells A549 ($P<0.05$). **Conclusion** LncRNA OIP5-AS1 inhibits the proliferation, migration and invasion of lung cancer cells through targeted regulation of the expression of miR-511-3p.

【KEY WORDS】 OIP5-AS1; miR-511-3p; Lung cancer cells; Proliferation; migration; Invasion

基金项目:广东省中医药局科研项目(20181216)

作者单位:广州番禺中心医院呼吸中心一区,广东,广州 511400

*通信作者:张耀森, E-mail: zys1892223@126.com

肺癌是呼吸科常见的恶性肿瘤之一,具有高发率、高死亡率和5年预后较差等特点,其在全球癌症死亡率中位居第一^[1]。尽管在肺癌治疗方面已经取得了进展,但是肺癌患者的5年预后生存率仍然未超过20%^[2]。长链非编码RNA显示在肺癌中起到抗癌或抑癌的效果,参与肺癌细胞的增殖、迁移和侵袭等,在临床诊断和治疗中具有潜在的意义^[3]。研究发现,OIP5-AS1在肺癌组织中表达上调,其异常表达与肿瘤大小、淋巴结转移和预后不良相关;敲低OIP5-AS1能够抑制肺癌细胞的增殖,OIP5-AS1通过调控miR-378a-3p促进肺癌细胞的增殖^[4]。miR-511-3p在前列腺癌、结直肠癌等癌症中异常表达^[5-6]。研究发现,miR-511-3p在前列腺中组织和细胞中表达下调,可能与患者的总体生存期较短相关,过表达miR-511-3p可以促进前列腺癌细胞的增殖和迁移^[5],但是在肺癌中的研究机制尚不明确。因此,本研究将探讨LncRNA OIP5-AS1通过靶向调控miR-511-3p对肺癌细胞的增殖、迁移和侵袭的影响。

1 材料与结果

1.1 细胞和主要试剂

人正常肺上皮细胞 BEAS-2B 和人肺癌细胞 A549、NCI-H460、NCI-H2170 购自中国科学院上海细胞库;FBS、RPMI 1640 购自美国 Gibco 公司;Lipofectamine 2000 试剂盒、Trizol 试剂盒和逆转录试剂盒购自美国 Invitrogen 公司;青霉素、链霉素、MTT 试剂盒购自北京索莱宝公司;Transwell 小室、Matrigel 基质胶购自美国 Corning 公司;CyclinD1 抗体、MMP-2 抗体、GAPDH 抗体购自美国 Abcam 公司;双荧光素酶试剂盒美国 Promega 公司;引物由上海吉玛公司设计合成。

1.2 细胞培养与转染

人正常肺上皮细胞 BEAS-2B 和人肺癌细胞 A549、和 NCI-H460、NCI-H2170 置于 5% CO₂、37℃ 培养箱中培养,且培养基内含有 10% FBS、100 U/mL 青霉素和 100 U/mL 链霉素的 RPMI 1640 培养基。细胞生长至 85% 时,加入胰酶消化传代培养。将对数生长期的肺癌细胞 A549 在培养内稀释细胞,然后按照 Lipofectamine 2000 试剂盒说明书将 si-NC 组、si-OIP5-AS1 组、miR-NC 组、miR-511-3p 组、pcDNA 组、si-OIP5-AS1+anti-miR-NC 组和 si-OIP5-AS1+anti-miR-511-3p 组,转染至 A549 细胞

中,转染 6 h 后换新鲜培养基,继续培养 48 h。

1.3 OIP5-AS1 和 miR-511-3p 的表达

取 1.2 各组的正常肺上皮细胞 BEAS-2B 和人肺癌细胞 A549、和 NCI-H460、NCI-H2170,采用 Trizol 试剂盒说明书提取总 RNA,在分光光度计测定 RNA 纯度和浓度,采用逆转录试剂盒合成 cDNA,然后进行 qRT-PCR 扩增,其中分别以 GAPDH 和 U6 作为内部内参。

1.4 MTT 检测细胞增殖

取 1.2 各组肺癌细胞 A549,加入 0.25% 胰酶消化细胞,然后将细胞稀释后接种至 96 孔板内,细胞密度为 2×10^3 个/孔,培养时间至 48、72 h 时,每孔内加入 5 mg/mL MTT,培养 4 h,培养液内加入 DMSO,在酶标仪 A490 纳米处检测细胞吸光度值。

1.5 Transwell 检测细胞迁移和侵袭

细胞迁移实验:取 1.2 各组肺癌细胞 A549,采用不含血清的 RPMI1640 培养基将细胞密度调整为 1×10^5 个/mL。然后在 Transwell 下层小室加入 400 μ L 含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基,Transwell 上层小室加入 100 μ L 细胞,上层小室放入下层小室培养 48 h,通过棉签轻轻擦去未发生迁移的细胞,甲醇固定细胞 10 min 后,采用结晶紫染色 30 min,显微镜下随机选取 5 个视野,拍照观察,计算取平均值。

细胞侵袭实验:在不含血清的 RPMI1640 培养内按照 1:3 比例稀释 Matrigel 基质胶,在 Transwell 上层小室加入稀释好的 100 μ L 细胞,其他步骤同上述迁移实验一致。

1.6 蛋白免疫印迹法检测 CyclinD1 和 MMP-2 蛋白表达

取 1.2 各组肺癌细胞 A549 采用常规方法提取细胞总蛋白,按照二喹啉甲酸法定量蛋白。冰浴煮沸需要上样的缓冲液,在 SDS-PAGE 上样孔内加入 40 μ g 蛋白样品,转移至 PVDF 膜上,室温封闭培养 1 h,加入一抗,CyclinD1 抗体、MMP-2 抗体和 GAPDH 抗体,4℃ 过夜培养,加入二抗,室温培养 2 h,滴加 ECL 显影曝光,分析蛋白条带灰度值,计算 CyclinD1 和 MMP-2 蛋白。

1.7 双荧光素酶报告实验

取 1.2 各组肺癌细胞 A549 消化家属,将细胞稀释至 1×10^4 个/孔接种至 24 孔板中,培养 48h。将构建的 OIP5-AS1 野生型载体(wt-OIP5-AS1)和突变型(mut-OIP5-AS1)载体与 miR-NC 或 miR-511-

3p 共转染,转染成功后继续培养 48 h,采用双荧光素酶试剂盒检测荧光素酶活性。

1.8 统计学方法

采用统计学软件 SPSS 22.0 进行数据分析;计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,均符合正态分布,两组间比较通过 *t* 检验,多组间比较通过单因素方差分析;以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 OIP5-AS1 和 miR-511-3p 在肺癌细胞中的表达

与正常肺上皮细胞 BEAS-2B 相比,肺癌细胞 A549、NCI-H23 和 NCI-H2170 中 OIP5-AS1 表达量均显著增加($P < 0.05$),miR-511-3p 表达量均显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 OIP5-AS1 和 miR-511-3p 在肺癌细胞中的表达

Table 1 Expression of OIP5-AS1 and miR-511-3p in lung cancer cells		
分组	OIP5-AS1	miR-511-3p
BEAS-2B	0.98±0.07	1.06±0.07
A549	2.44±0.28	0.41±0.03
NCI-H23	1.57±0.18	0.87±0.06
NCI-H2170	1.85±0.20	0.66±0.05
<i>F</i> 值	28.388	78.723
<i>P</i> 值	0.000	0.000

2.2 敲低 OIP5-AS1 对肺癌细胞 A549 的增殖、迁移和侵袭的影响

与 si-NC 组相比,si-OIP5-AS1 组的 OIP5-AS1 表达、OD 值(48、72 h 时)、迁移、侵袭细胞数目以及 CyclinD1、MMP-2 蛋白表达均显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 1、表 2。

表 2 敲低 OIP5-AS1 对肺癌细胞 A549 的增殖、迁移和侵袭的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of knocking down OIP5-AS1 on the proliferation, migration and invasion of lung cancer cell A549 ($\bar{x} \pm s$)

分组	OIP5-AS1	OD(450)		迁移细胞数目(个)	侵袭细胞数目(个)	CyclinD1	MMP-2
		48 h	72 h				
si-NC	2.12±0.25	0.71±0.07	0.87±0.07	154.61±16.35	133.60±12.43	0.98±0.07	1.02±0.09
si-OIP5-AS1	0.85±0.08 ^a	0.46±0.05 ^a	0.58±0.04 ^a	72.42±7.73 ^a	65.65±6.58 ^a	0.44±0.05 ^a	0.51±0.04 ^a
<i>t</i> 值	14.515	8.719	10.791	13.634	14.494	18.832	15.535
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

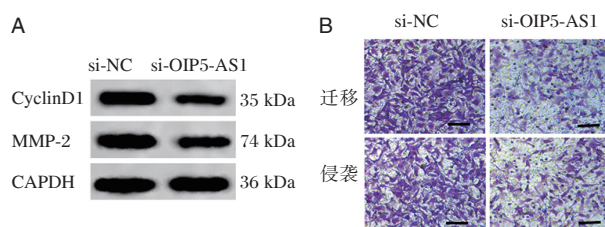
注:与 si-NC 比较,^a $P < 0.05$ 。

表 3 过表达 miR-511-3p 对肺癌细胞 A549 的增殖、迁移和侵袭的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effect of overexpression of miR-511-3p on the proliferation, migration and invasion of lung cancer cell A549 ($\bar{x} \pm s$)

分组	miR-511-3p	OD(450)		迁移细胞数目(个)	侵袭细胞数目(个)	CyclinD1	MMP-2
		48 h	72 h				
miR-NC	0.48±0.05	0.77±0.07	0.92±0.08	141.33±14.82	136.44±13.16	0.95±0.08	0.97±0.08
miR-511-3p	1.76±0.17 ^a	0.52±0.05 ^a	0.65±0.06 ^a	68.52±5.63 ^a	62.16±5.39 ^a	0.49±0.04 ^a	0.54±0.05 ^a
<i>t</i> 值	21.670	8.719	8.100	13.778	15.670	15.429	13.674
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注:与 miR-NC 比较,^a $P < 0.05$ 。



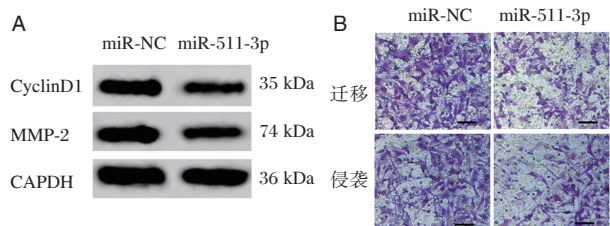
注:A 为 CyclinD1、MMP-2 蛋白表达;B 为迁移、侵袭图,主要采取结晶紫染色,放大倍数为 50 μm。

图 1 敲低 OIP5-AS1 对肺癌细胞 A549 的迁移和侵袭的影响

Figure 1 Effect of knocking down OIP5-AS1 on the migration and invasion of lung cancer cell A549

2.3 过表达 miR-511-3p 对肺癌细胞 A549 的增殖、迁移和侵袭的影响

与 miR-NC 组相比,miR-511-3p 组的 miR-511-3p 表达显著增加($P < 0.05$),而 OD 值(48 h 和 72 h 时)、迁移细胞数目、侵袭细胞数目、CyclinD1 蛋白表达、和 MMP-2 蛋白表达均显著降低差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 2、表 3。



注:A 为 CyclinD1、MMP-2 蛋白表达;B 为迁移、侵袭图,主要采取结晶紫染色,放大倍数为 50 μm。

图 2 过表达 miR-511-3p 对肺癌细胞 A549 的迁移和侵袭的影响

Figure 2 Effect of overexpression of miR-511-3p on the proliferation, migration and invasion of lung cancer cell A549

双荧光素酶实验报告结果显示,与 miR-NC 组相比,miR-511-3p 组显著降低 wt-OIP5-AS1 荧光素酶活性,差异有统计学意义($P<0.05$),对 mut-OIP5-AS1 无明显变化,与 pcDNA 组相比 OIP5-AS1 组的 miR-511-3p 表达显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$);与 si-NC 组相比,si-OIP5-AS1 组的 miR-511-3p 表达显著增加,差异有统计学意义($P<0.05$)。见图 3、表 4、5。

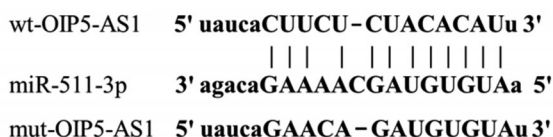


图 3 OIP5-AS1 与 miR-511-3p 结合位点

Figure 3 OIP5-AS1 and miR-511-3p binding site

表 4 双荧光素酶报告实验 ($\bar{x} \pm s$)

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

分组	wt-OIP5-AS1	mut-OIP5-AS1
miR-NC	0.98±0.07	0.99±0.08
miR-511-3p	0.43±0.05	0.95±0.07
t 值	19.181	1.129
P 值	0.000	0.276

表 5 OIP5-AS1 调控 miR-511-3p 的表达

Table 5 OIP5-AS1 regulates the expression of miR-511-3p

分组	miR-511-3p
pcDNA	0.99±0.09
OIP5-AS1	0.51±0.04
si-NC	1.09±0.10
si-OIP5-AS1	2.55±0.26
F 值	106.570
P 值	0.000

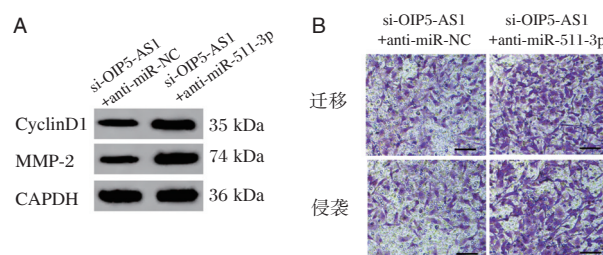
2.5 抑制 miR-511-3p 部分回复敲低 OIP5-AS1 对肺癌细胞 A549 的增殖、迁移和侵袭的影响

与 si-OIP5-AS1+anti-miR-NC 组相比,si-OIP5-AS1+anti-miR-511-3p 组的 miR-511-3p 表达显著降低($P<0.05$),而 OD 值(48、72 h 时)、迁移、侵袭细胞数目、CyclinD1 和 MMP-2 蛋白表达均显著增加($P<0.05$)。见图 4、和表 6。

表 6 抑制 miR-511-3p 可以部分回复敲低 OIP5-AS1 对肺癌细胞 A549 的增殖、迁移和侵袭的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 6 Inhibition of miR-511-3p can reverse the effect of partial knockdown of OIP5-AS1 on the proliferation, migration and invasion of lung cancer cell A549 ($\bar{x} \pm s$)

分组	miR-511-3p	OD(450)		迁移细胞数目(个)	侵袭细胞数目(个)	CyclinD1	MMP-2
		48 h	72 h				
si-OIP5-AS1+anti-miR-NC	2.33±0.21	0.43±0.04	0.52±0.05	75.62±6.96	62.48±7.32	0.41±0.04	0.47±0.05
si-OIP5-AS1+anti-miR-511-3p	1.25±0.12	0.62±0.06	0.76±0.08	132.46±12.63	115.93±9.85	0.72±0.07	0.75±0.06
t 值	13.396	7.904	7.632	11.825	13.066	11.535	10.755
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000



注:A 为 CyclinD1、MMP-2 蛋白表达;B 为迁移、侵袭图,主要采取结晶紫染色,放大倍数为 50 μ m

图 4 抑制 miR-511-3p 可以部分回复敲低 OIP5-AS1 对肺癌细胞 A549 的迁移和侵袭的影响

Figure 4 Inhibition of miR-511-3p can reverse the effect of knockdown of partial OIP5-AS1 on the migration and invasion of lung cancer cell A549

3 讨论

OIP5-AS1 是在编码 OIP5 基因沿着反义方向转录的,最早是在斑马鱼中鉴定出来,在中枢神经系统的早期发育中具有重要作用^[7]。OIP5-AS1 在肺腺癌、乳腺癌、神经胶质瘤和肝母细胞瘤中异常表达,调控肿瘤细胞的增殖和凋亡等机制^[8]。Yang 等^[9]研究发现,OIP5-AS1 在宫颈癌组织和细胞中表达上调,异常表达与晚期分期、淋巴结转移和总体生存率低显著相关;OIP5-AS1 可以通过 miR-143-3p 上调 ITGA6 促进宫颈癌细胞的增殖和侵袭。OIP5-AS1 在肺腺癌组织和细胞中表达上调,OIP5-AS1 通过 miR-448 调控肺腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭^[10]。Mei 等^[11]研究发现,OIP5-AS1 在非小细胞肺癌表达上调,与肿瘤分期和较差的不良预后有关;抑制 OIP5-AS1 抑制非小细胞肺癌细胞的血管形成和侵袭。本研究结果显示,敲低 OIP5-AS1 的表达可以抑制肺癌细胞 A549 的增殖、迁移和侵袭,说明 OIP5-AS1 可以作为肺癌潜在生物标志物。

miRNA 在肺癌细胞异常表达,通过调控细胞的增殖、迁移和侵袭等发挥着作用^[12-13],如 miR-124-3p、miR-379-5p 和 miR-3655 等^[14]。Chi 等^[15]研究结果发现,miR-203 在肺癌细胞表达下调,miR-203

通过调控 RGS17 抑制肺癌细胞的增殖、侵袭和迁移。miR-511-3p 在如乳腺癌中表达下调, LINC02163 通过调节 miR-511-3p/HMGA2 轴促进乳腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭,并抑制其细胞凋亡^[16],说明 miR-511-3p 可以作为肿瘤潜在生物标志物。OIP5-AS1 可以海绵多个下游 miRNA 参与肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭,本研究结果显示,miR-511-3p 在肺癌细胞中表达下调,过表达 miR-511-3p 可以抑制肺癌细胞 A549 的增殖、迁移和侵袭,说明 miR-511-3p 可以作为肺癌的生物标志物。进一步实验证明,OIP5-AS1 可以靶向调控 miR-511-3p,抑制 miR-511-3p 可以部分回复敲低 OIP5-AS1 对肺癌细胞 A549 的增殖、迁移和侵袭的影响,说明 OIP5-AS1 通过调控 miR-511-3p 影响 A549 细胞的增殖、迁移和侵袭。

综上所述,敲低 OIP5-AS1 的表达能够抑制肺癌细胞的增殖、迁移和侵袭,其作用机制可能与 miR-511-3p 有关,旨在为早期肺癌诊断和治疗提供新的作用靶点。

参考文献

- [1] Wood SL, Pernemalm M, Crosbie PA, et al. Molecular histology of lung cancer: From targets to treatments[J]. *Cancer Treat Rev*, 2015, 41(4): 361-375.
- [2] Hawkes N. Cancer survival data emphasise importance of early diagnosis[J]. *BMJ*, 2019, 364: 1408.
- [3] Chen ZY, Lei TY, Chen X, et al. Long non-coding RNA in lung cancer[J]. *Clin Chim Acta*, 2020, 504: 190-200.
- [4] Wang ML, Sun X, Yang YL, et al. Long non-coding RNA OIP5-AS1 promotes proliferation of lung cancer cells and leads to poor prognosis by targeting miR-378a-3p[J]. *Thorac Cancer*, 2018, 9(8): 939-949.
- [5] Zhang F, Wu ZJ. Significantly altered expression of miR-511-3p and its target AKT3 has negative prognostic value in human prostate cancer[J]. *Biochimie*, 2017, 140: 66-72.
- [6] Ma JW, Zhang LH, Shang AQ, et al. LINC02163 promotes colorectal cancer progression via miR-511-3p/AKT3 axis[J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2020, 48(1): 961-968.
- [7] Kim J, Noh JH, Lee SK, et al. LncRNA OIP5-AS1/cyranos suppresses GAK expression to control mitosis[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(30): 49409-49420.
- [8] Li YW, Han X, Feng H, et al. Long noncoding RNA OIP5-AS1 in cancer[J]. *Clin Chim Acta*, 2019, 499: 75-80.
- [9] Yang J, Jiang B, Hai J, et al. Long noncoding RNA opa-interacting protein 5 antisense transcript 1 promotes proliferation and invasion through elevating integrin $\alpha 6$ expression by sponging miR-143-3p in cervical cancer[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(1): 907-916.
- [10] Deng J, Deng H, Liu CF, et al. Long non-coding RNA OIP5-AS1 functions as an oncogene in lung adenocarcinoma through targeting miR-448/Bcl-2[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 98: 102-110.
- [11] Mei JZ, Liu GJ, Wang WH, et al. OIP5AS1 modulates epigenetic regulator HDAC7 to enhance nonsmall cell lung cancer metastasis via miR1405p[J]. *Oncol Lett*, 2020, 20(4): 7.
- [12] Yang YB, Tan H, Wang Q. MiRNA-300 suppresses proliferation, migration and invasion of non-small cell lung cancer via targeting ETS1[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(24): 10827-10834.
- [13] Fang QY, Deng QF, Luo J, et al. MiRNA-20a-5p accelerates the proliferation and invasion of non-small cell lung cancer by targeting and downregulating KLF9[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(5): 2548-2556.
- [14] He QF, Fang YR, Lu F, et al. Analysis of differential expression profile of miRNA in peripheral blood of patients with lung cancer[J]. *J Clin Lab Anal*, 2019, 33(1): e23003.
- [15] Chi YB, Jin QQ, Liu XH, et al. miR-203 inhibits cell proliferation, invasion, and migration of non-small-cell lung cancer by downregulating RGS17[J]. *Cancer Sci*, 2017, 108(12): 2366-2372.
- [16] Qin CL, Jin LF, Li J, et al. Long non-coding RNA LINC02163 accelerates malignant tumor behaviors in breast cancer by regulating the microRNA-511-3p/HMGA2 axis[J]. *Oncol Res*, 2020.

(上接第 228 页)

- [15] Yang L, Liu Y, Wang S, et al. Association between Lp-PLA2 and coronary heart disease in Chinese patients[J]. *J Int Med Res*, 2017, 45(1): 14-18.
- [16] Sundseth J, Sundseth A, Jacobsen EA, et al. Predictors of early in-hospital death after decompressive craniectomy in swollen middle cerebral artery infarction[J]. *Acta Neurochi (wien)*, 2017, 159(2): 301.
- [17] Aksoy Gündoğdu A, Özdemir AÖ, Özkan S. Pathological Yawning in Patients with Acute Middle Cerebral Artery Infarction: Prognostic Significance and Association with the Infarct Location[J]. *Balkan Med J*, 2019, 37(1): 24-28.
- [18] Toyama M, Nakayama M, Fukaya K, et al. Early cardiac surgery for infective endocarditis with acute extensive cerebral infarction[J]. *Indian J Thorac Cardiovasc Surg*, 2020, 36(4): 1-4.

外周血Ⅱ型干扰素调节因子和T淋巴细胞与脑出血的关系研究

王能强^{1*} 黄桂洪² 陈烨佳³

【摘要】目的 研究外周血Ⅱ型干扰素调节因子 γ -干扰素(IFN- γ)和T淋巴细胞(CD4、CD8)与脑出血的关系。**方法** 选取本院2019年1月至2020年6月收治的100例脑出血患者为观察组,另选取同期70名健康体检者为对照组,对比两组以及观察组内不同分期、不同病情程度患者外周血IFN- γ 、CD4、CD8表达水平,利用Spearman相关性分析法检验外周血IFN- γ 、CD4、CD8表达水平与脑出血患者分期、病情程度的相关性。**结果** 观察组外周血IFN- γ 、CD4、CD8表达水平均低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);观察组内超急性期患者外周血IFN- γ 、CD4、CD8表达水平高于急性期患者,差异有统计学意义($P<0.05$);观察组内外周血IFN- γ 、CD4、CD8表达水平随着病情程度的提升而下降,差异有统计学意义($P<0.05$);Spearman相关性分析结果提示,外周血IFN- γ 、CD4、CD8表达水平与脑出血患者分期、病情程度均呈负相关性($P<0.05$)。**结论** 外周血Ⅱ型干扰素调节因子IFN- γ 和T淋巴细胞CD4、CD8参与到了脑出血的发生、发展之中,对今后临床评估脑出血患者分期、病情严重程度具有一定的帮助价值。

【关键词】 脑出血;Ⅱ型干扰素调节因子;分期;病情程度

Study on the relationship between type II interferon regulatory factor and T lymphocytes in peripheral blood and cerebral hemorrhage

WANG Nengqiang^{1*}, HUANG Guihong², CHEN Yeji³

(1. Neurosurgery Department, Chaonan Minsheng Hospital, Shantou, Guangdong, China, 5151442; 2. Department of Neurology, Chaonan Minsheng Hospital, Shantou, Guangdong, China, 515144; 3. Medical Imaging Center, Chaonan District People's Hospital, Shantou, Guangdong, China, 510080)

【ABSTRACT】 Objective To study the relationship between γ -Interferon (IFN- γ) and T lymphocytes (CD4, CD8) and cerebral hemorrhage. **Methods** A total of 100 patients with cerebral hemorrhage admitted to our hospital from January 2019 to June 2020 were selected as the observation group, and another 70 healthy physical examination subjects during the same period were selected as the control group. The expression levels of peripheral blood IFN- γ , CD4, and CD8 were compared between the two groups and the observation group in patients with different stages and different disease levels. Spearman correlation analysis method was used to test the expression levels of peripheral blood IFN- γ , CD4, and CD8 with cerebral hemorrhage patients. **Results** The expression levels of peripheral blood IFN- γ , CD4, and CD8 in the observation group were lower than those in the control group, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). The expression levels of peripheral blood IFN- γ , CD4 and CD8 in the hyperacute phase of the observation group were higher than those of the acute phase, and the difference was statistically significant ($P<0.05$); In the observation group, the expression levels of IFN- γ , CD4, and CD8 in peripheral blood decreased with the im-

基金项目:广东省汕头市科技基金项目(180914134010169)

作者单位:1. 汕头潮南民生医院神经外科,广东,汕头 515144

2. 汕头潮南民生医院神经内科,广东,汕头 515144

3. 汕头市潮南区人民医院医学影像中心,广东,汕头 510080

*通信作者:王能强, E-mail:419025659@qq.com

provement of the disease, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). The results of Spearman correlation analysis showed that the expression levels of peripheral blood IFN- γ , CD4, and CD8 were negatively correlated with the stage and severity of cerebral hemorrhage patients ($P<0.05$). **Conclusion** Peripheral blood IFN- γ and T lymphocytes CD4 and CD8 are involved in the occurrence and development of cerebral hemorrhage, and have certain helpful value for clinical evaluation of the stage and severity of cerebral hemorrhage patients in the future.

[KEY WORDS] Cerebral hemorrhage; Type II interferon regulatory factor; Staging; Disease severity

脑出血属于心脑血管疾病中十分常见,也是极其危险的病症类型。好发于中老年人群且具有病情发展迅速、致残率及致死率高的特点^[1]。尽管围绕脑出血展开的临床研究不断增加,但内容多集中于疗效及患者预后,对其发病机制的研究稍显薄弱。II型干扰素又被医学界称之为免疫干扰素,由机体的T淋巴细胞所分泌并全程参与到免疫调节进程之中,属于人体重要的免疫调节因子^[2]。II型干扰素由调节因子以及T淋巴细胞构成^[3],典型代表为外周血II型干扰素调节因子 γ -干扰素(IFN- γ)和T淋巴细胞(CD4、CD8)且均能够诱发氧化应激损伤以及炎性损伤^[4],而脑出血的发生、发展与氧化应激损伤以及炎性损伤存在着密切的关联性^[5],将对外周血II型干扰素调节因子和T淋巴细胞与脑出血的关系展开探讨。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取本院2019年1月至2020年6月收治的100例脑出血患者为观察组,另选同期70名健康体检者为对照组。观察组中男66例、女34例;平均年龄(59.50 ± 17.50)岁;起病至接受治疗时间:0.5~20 h,平均起病至接受治疗时间(10.25 ± 9.75)h;入院时格拉斯哥昏迷评分(GCS):5~12分,平均GCS评分(8.50 ± 3.50)分;出血量:20~90 mL,平均出血量(55.00 ± 35.00)mL;分期:超急性期65例、急性期35例;病情程度(GCS评分法):轻型25例、中型45例、重型30例;出血部位:基底节区58例、丘脑22例、外囊出血15例、脑干出血5例。对照组中男43名、女27名;平均年龄(57.50 ± 17.50)岁。观察组纳入标准:①符合《中国脑出血诊治指南(2019)》^[6]诊断标准且均为原发性脑出血者;②起病时间 ≤ 24 h者;③患者家属和健康体检者签署《知情同意书》。观察组排除标准:①植物生存状态者;②继发性脑出血者;③恢复期或者是后遗症

期脑出血患者;④同时参加多项临床试验者;⑤研究开始前服用过影响IFN- γ 、CD4、CD8表达水平检测结果的药物者;⑥合并代谢性疾病和(或)感染性疾病者。两组受试者性别分布、平均年龄均衡可比,差异无统计学意义($P>0.05$)。研究经医学伦理委员会批准,实验对象均知情同意。

1.2 方法

分别于清晨采集对照组以及观察组发病24 h内空腹静脉血各3 mL静脉血,置于不同肝素抗凝试管之中。①IFN- γ 检测:向其中一支血液样本中加入人外周血淋巴细胞分离液(天津市灏洋生物制品科技有限责任公司,货号:P8900,规格:200 mL),利用高速冷冻离心机(美国热电公司,型号:Sorvall ST16R)中以3 000转/min离心15 min,获得单个核细胞之后再加入RPMI 1640培养基(美国GIBCO公司,货号:SH30809.01,规格:500 mL),其中包含有10%胎牛血清,稀释成为 1×10^6 mL后接种至培养孔,利用人IFN- γ 检测试剂盒(美国R&D公司,规格:48T)测定IFN- γ 表达水平,检测方法为酶联免疫吸附剂测定法(ELISA)。②CD4、CD8表达水平检测:首先以3 000转/min离心15 min,收集血清后置于流式细胞仪(美国BD公司,型号:FACSCanto II)对血清中游离的CD4、CD8分子表达水平进行测定。

1.3 观察指标

选取两组受试者、观察组内不同分期(超急性期、急性期)、不同病情程度(轻型、中型、重型)患者IFN- γ 、CD4、CD8表达水平为观察指标。

1.4 统计学分析

采用SPSS 22.0软件进行数据分析,符合正态分布的计量资料采用($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较以 F 检验,两两比较以LSD- t 检验;IFN- γ 、CD4、CD8表达水平与脑出血患者分期、病情程度的相关性以Spearman相关性分析法检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组受试者外周血 IFN- γ 、CD4、CD8 表达水平比较

观察组外周血 IFN- γ 、CD4、CD8 表达水平均低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

表 1 两组外周血 IFN- γ 、CD4、CD8 表达水平比较 ($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Comparison of the expression levels of IFN- γ , CD4, and CD8 in peripheral blood of 2 groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	IFN- γ ($\mu\text{g/mL}$)	CD4(%)	CD8(%)
观察组	100	8.78 $\pm$ 1.02	21.89 $\pm$ 1.07	30.88 $\pm$ 1.09
对照组	70	10.20 $\pm$ 1.05	24.33 $\pm$ 1.01	37.45 $\pm$ 1.05
<i>t</i> 值		4.334	5.211	9.859
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000

2.2 观察组内不同分期、不同病情程度患者外周血 IFN- γ 、CD4、CD8 表达水平比较

观察组内超急性期患者外周血 IFN- γ 、CD4、CD8 表达水平高于急性期患者,外周血 IFN- γ 、CD4、CD8 表达水平随着病情程度的提升而下降,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 2。

表 2 观察组内不同程度患者外周血 IFN- γ 、CD4、CD8 表达水平比较 ($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Comparison of the expression levels of peripheral blood IFN- γ , CD4, and CD8 in patients with different levels in the observation group ($\bar{x}\pm s$)

项目	<i>n</i>	IFN- γ ($\mu\text{g/mL}$)	CD4(%)	CD8(%)
分期				
超急性期	65	9.44 $\pm$ 1.01	22.91 $\pm$ 1.09	33.56 $\pm$ 1.14
急性期	35	8.12 $\pm$ 1.03	20.87 $\pm$ 1.11	28.20 $\pm$ 1.10
<i>t</i> 值	—	4.089	5.014	6.897
<i>P</i> 值	—	0.000	0.000	0.000
病情程度				
轻型	25	9.32 $\pm$ 1.02 ^{ab}	23.02 $\pm$ 1.17 ^{ab}	33.89 $\pm$ 1.11 ^{ab}
中型	45	8.75 $\pm$ 1.05 ^a	21.87 $\pm$ 1.13 ^a	30.85 $\pm$ 1.14 ^a
重型	30	8.27 $\pm$ 1.03	20.77 $\pm$ 1.15	27.90 $\pm$ 1.18
<i>F</i> 值	—	3.210	3.453	5.041
<i>P</i> 值	—	0.000	0.000	0.000

注:与重型相比较,^a $P<0.05$;与中型相比较,^b $P<0.05$ 。

2.3 外周血 IFN- γ 、CD4、CD8 表达水平与脑出血患者分期、病情程度的相关性

外周血 IFN- γ 、CD4、CD8 表达水平与脑出血患者分期($r_1=-0.51$, $r_2=-0.44$, $r_3=-0.42$, $P<0.05$)、病情程度均呈负相关性($r_1=-0.61$, $r_2=-0.53$, $r_3=-0.50$, $P<0.05$)。

3 讨论

在所有类型的脑卒中亚型中脑出血发病率仅次于缺血性脑卒中^[7]。目前脑出血的发病率为 12/

10 万人~15/10 万人且仍然处于持续上升趋势^[8]。关于脑出血的发生机制,主要包括微动脉瘤破裂、脂肪玻璃样变或纤维坏死、脑动脉粥样硬化、脑动脉外膜和中层结构薄弱^[9]。以上作用机制多从病理层面予以解释,近些年来基于分子机制的脑出血发病机制的研究日渐丰富,如凝血因子通路、脂质代谢、炎症反应、氧化应激反应、蛋白-受体系统等^[10]。Ⅱ型干扰素是人体内活化 T 淋巴细胞以及自然杀伤细胞分泌的物质,能够调节机体免疫功能,促使白细胞朝着感染灶迁移并发挥抑制炎症反应的作用^[11]。肖勇等^[12]在其研究中证实,与健康人相比,急性脑出血患者外周血 IFN- γ 表达水平更低,表明急性脑出血起病后存在外周血 IFN- γ 异常改变情形。本次研究结果表明以上指标参与到了脑出血的发生、发展之中且与分期、病情程度均呈负相关性。总结原因如下:①IFN- γ 是人体中一类能够调节细胞功能的小分子多肽,能够激活单核/巨噬细胞并源源不断地分泌出白细胞介素-12 等细胞因子^[13]。脑出血发病早期存在氧化应激损伤,诱发的急性炎症反应将会源源不断地释放炎性细胞因子,而为了抑制炎症反应,巨噬细胞系统激活过程中导致 IFN- γ 大量消耗,由此导致外周血中 IFN- γ 表达水平降低。②CD4、CD8 是 T 淋巴细胞的重要亚群,区别为表面标志和分化抗原不同。CD4 通过主要组织相容性复合体Ⅱ发生的多肽抗原反应被激活,源源不断地分泌出细胞因子以调节或者是提升免疫反应^[14]。CD8 能够直接杀死或者是裂解靶细胞,在持续杀伤数个靶细胞后自身依然不会受损,但如果需要杀死或者是裂解的靶细胞数量多,就会导致其数量降低^[15]。氧化应激损伤以及炎性损伤是诱发脑出血的主要原因,随着促炎递质、炎性细胞因子持续释放,CD4、CD8 在杀伤大量的靶细胞后外周血中表达水平随之降低。因此,IFN- γ 、CD4、CD8 表达水平的测定对脑出血的诊断具有一定价值。

综上所述,外周血Ⅱ型干扰素调节因子 IFN- γ 和 T 淋巴细胞 CD4、CD8 参与到了脑出血的发生、发展之中,对今后临床评估脑出血患者分期、病情严重程度具有一定的帮助价值。

参考文献

- [1] 王丹,王新志,陈婧,等.早期免疫营养干预对高血压脑出血患者免疫功能影响[J].华南预防医学,2019,45(6):540-543.
- [2] 陈鹏,贾丽娟,鱼丽萍,等.急性脑出血患者早期外周血干扰素- γ 、hs-CRP 水平与预后的关系(下转第 241 页)

· 论 著 ·

TGF- β 1、TSGF 及 CYFRA21-1 与食管癌放疗后病理缓解程度、预后的关系

徐 尧 唐 曦 徐 晓明 徐 炎华*

【摘 要】 目的 分析转化生长因子- β 1(TGF- β 1)、肿瘤特异性生长因子(TSGF)及血清细胞角蛋白 19 片段(CYFRA21-1)水平变化与食管癌放疗后病理缓解程度、预后的关系。方法 分析 2016 年 3 月至 2017 年 3 月本院收治的 76 例食管癌患者作为食管癌组,按放疗后病理缓解程度分为完全缓解(CR)组($n=53$)和未完全缓解(NCR)组($n=23$),根据化疗后预后生存情况分为生存组($n=56$)和死亡组($n=20$),另选取同期健康体检合格者 60 例作为对照组。比较食管癌组放疗前后与对照组、CR 组和 NCR 组 TGF- β 1、TSGF 及 CYFRA21-1 水平变化,分析肿瘤标志物变化趋势与病理缓解程度的关系。采用多元 Logistic 回归分析影响食管癌放疗患者预后生存的危险因素。结果 食管癌组放疗前 TGF- β 1、TSGF 及 CYFRA21-1 水平高于对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。CR 组 TGF- β 1、TSGF 及 CYFRA21-1 水平低于 NCR 组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。肿瘤标志物变化趋势呈下降趋势的患者治疗有效率高于呈上升趋势的患者,差异具有统计学意义($P<0.05$)。瘤部位、长度、X 线分型、总疗程 TGF- β 1、TSGF 及 CYFRA21-1 水平是影响食管癌放疗患者预后生存的单因素($P<0.05$)。总疗程、TGF- β 1、TSGF 及 CYFRA21-1 水平为影响食管癌放疗患者预后生存的独立危险因素($P<0.05$)。结论 TGF- β 1、TSGF 及 CYFRA21-1 水平变化趋势与食管癌患者放疗后病理缓解程度及预后情况密切相关,检测三者水平可作为监测放疗疗效、提示预后的有效手段。

【关键词】 TGF- β 1; TSGF; CYFRA21-1; 食管癌; 放疗病理缓解程度

Relationship between the TGF- β 1, TSGF and CYFRA21-1 levels and pathological remission and prognosis of patients with esophageal cancer after radiotherapy

XU Rao, TANG Xi, XU Xiaoming, XU Yanhua*

(Second School of Clinical Medicine, Changjiang University, Jingzhou, Hubei, China, 434000)

【ABSTRACT】 **Objective** To analyze the relationship between the changes of transforming growth factor- β (TGF- β 1), tumor specific growth factor (TSGF) and serum cytokeratin 19 fragment (CYFRA21-1) levels and pathological remission and prognosis of patients with esophageal cancer after radiotherapy. **Methods** The clinical data of 76 patients with esophageal cancer admitted to our hospital from March 2016 to March 2017 were analyzed and selected as the esophageal cancer group. According to the degree of pathological remission after radiotherapy, they were divided into the complete remission (CR) group ($n=53$) and the not completely relieved (NCR) group ($n=23$). At the same time, patients with esophageal cancer were divided into the survival group ($n=56$) and the death group ($n=20$) according to their prognostic survival after chemotherapy. In addition, 60 patients who passed the physical examination during the same period were selected as the control group. The change in TGF- β 1, TSGF and CYFRA21-1 levels in the esophageal cancer group and the control group, the CR group and the NCR group before and after radiotherapy were compared. The relationship between the change trend of tumor markers and the degree of pathological remission was analyzed.

基金项目:湖北省卫生和计划生育委员会项目(WJ2016Y15)

作者单位:长江大学第二临床医学院,湖北,荆州 434000

*通信作者:徐炎华, E-mail: xuyanhua339@126.com

The multivariate Logistic regression was used to analyze the risk factors that affect the prognostic survival of patients with esophageal cancer radiotherapy. **Results** The levels of TGF- β 1, TSGF and CYFRA21-1 before radiotherapy in the esophageal cancer group were higher than those in the control group after radiotherapy, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). The levels of TGF- β 1, TSGF and CYFRA21-1 in the CR group were lower than those in the NCR group, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). The effective rate of treatment of patients whose tumor markers showed a downward trend was higher than that of patients with an upward trend, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). There were differences in tumor location, length, X-ray type, total duration of treatment, levels of TGF- β 1, TSGF and CYFRA21-1 between the survival group and the death group ($P<0.05$). The total course of treatment, TGF- β 1, TSGF and CYFRA21-1 levels were independent risk factors affecting the prognostic survival of patients with esophageal cancer after radiotherapy ($P<0.05$). **Conclusion** The change trend of TGF- β 1, TSGF and CYFRA21-1 levels is closely related to the pathological remission and prognosis of patients with esophageal cancer after radiotherapy. The detection of the levels of the three indicators can be used as an effective means to monitor the efficacy of radiotherapy and prompt the prognosis.

[KEY WORDS] TGF- β 1; TSGF; CYFRA21-1; Esophageal cancer; Degree of pathological remission after radiotherapy

食管癌是发生在消化道的恶性肿瘤,我国是世界上食管癌高发地区之一^[1]。既往文献指出,局部晚期食管癌新辅助放疗后病理缓解与患者的总生存期(Overall Survival, OS)有关,故评价食管癌的放疗疗效具有重要临床意义^[2-3]。目前与食管癌相关的肿瘤血清学指标较多,其中,转化生长因子- β 1(transforming growth factor - β , TGF- β 1)及肿瘤特异性生长因子(tumor specific growth factor, TSGF)均可促进肿瘤及周边毛细血管增殖并释放^[4-5]。此外,血清细胞角蛋白19片段(cytokeratin 19 fragment, CYFRA21-1)也是一些癌症的肿瘤标识物,关于其与食管癌的相关性存在一些争议^[6]。本文就 TGF- β 1、TSGF 及 CYFRA21-1 水平变化与食管癌放疗后病理缓解程度、预后的关系进行研究,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

分析2016年3月至2017年3月本院收治的79例食管癌患者临床资料,纳入标准:①满足中晚期食管癌诊断标准^[7],且为初治的患者;②Kamofsky评分 ≥ 60 分^[7],预期生存期在3个月以上者;③临床资料及随访记录完整者;排除标准:①非原发性食管癌者;②合并严重心血管、血液系统或其他恶性肿瘤等影响生存时间疾病者;③肝功能严重异常者;④严重精神疾患或痴呆等无法完成所有治疗和随访者;⑤无法放疗毒副作用,中途终止治疗者。根据纳入排除标准最终选取76例作为研究对

象,作为食管癌组。其中男43例,女33例,平均年龄(49.15 ± 3.13)岁。按照放疗后病理缓解程度分为完全缓解(complete remission, CR)组($n=53$)和未完全缓解(Not completely relieve, NCR)组($n=23$)。另根据食管癌患者化疗后预后生存情况分为生存组($n=56$)和死亡组($n=20$)。选取同期健康体检合格者60例作为对照组,其中男39例,女21例,平均年龄(49.36 ± 3.16)岁。食管癌组及对照组年龄、性别一般资料比较差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。所有患者均知情同意。本实验经医院伦理委员会批准。

1.2 检测方法

1.2.1 TGF- β 1检测、CYFRA21-1检测

抽取空腹静脉血4 mL,室温放置30 min后离心($3\ 000\ \text{r/min}$, 15 min)分离血清。TGF- β 1采用ELISA法,试剂盒由深圳晶美生物工程有限公司提供,仪器为芬兰MultiskanMK3型全自动酶标仪、美国Muiti Wash洗板机。CYFRA21-1采用电化学发光方法,用德国罗氏公司电化学发光免疫分析仪Elecsys2010及罗氏公司提供的配套检验试剂盒,按说明书操作。

1.2.2 TSGF检测

将各试剂移至室温($18\sim 25^\circ\text{C}$)平衡30 min,按标准配制稀释;每孔内滴加待测样品100 μL ,放于 37°C 等待2 h;倒去孔中液体并拭干;每孔内加生物素标记抗体工作液100 μL ,放于 37°C 等待2 h,洗板3次后印干;每孔内滴加辣根过氧化物酶标记亲

和素工作液 100 μL , 放置 37 $^{\circ}\text{C}$ 等待 45 min; 倒去孔中液体并拭干, 如此重复 5 次洗板并印干; 每孔加底物溶液 90 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光并加终止溶液 50 μL 后出现变色反应, 在 10 min 内用酶标仪测 450 nm 波长的吸光度。

1.2.3 肿瘤标志物变化趋势评估标准^[8]

放疗后较放疗前下降 10% 以上判为下降趋势, 其他情况均为上升趋势; 且三项指标中任一项出现上升, 即认为上升趋势。

1.3 疗效判定^[9]

①CR: 所有目标病灶消失; ②部分缓解 (part remission, PR), 肿瘤体积缩小 $\geq 30\%$; ③稳定 (stable Disease, SD), 肿瘤体积缩小 $< 30\%$; ④进展 (progressive Disease, PD), 肿瘤体积增加 $> 20\%$ 或出现新病灶。治疗有效率 = (CR + PR) / 例数 $\times 100\%$ 。

1.4 随访方法

本研究随访从患者术后开始, 直至患者死亡或本研究的随访结束, 为期 2 年, 截止于 2020 年 3 月 31 日, 随访的方式以患者来院复查为主。在本研究中, 总生存时间 (Overall Survival, OS) 表示食管癌患者从手术至死亡的时长^[10]。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 18.0 软件进行统计分析, 计数资料以 $n(\%)$ 表示, 采用 χ^2 检验, 计量资料采用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 两组间比较行 t 检验, 多组件比较行 F 检验; 采用多元 Logistic 回归分析影响食管癌放疗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 食管癌组放疗前后与对照组 TGF- $\beta 1$ 、TSGF 及 CYFRA21-1 水平比较

食管癌组放疗前 TGF- $\beta 1$ 、TSGF 及 CYFRA21-1 水平均高于同组放疗后及对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 CR 组和 NCR 组 TGF- $\beta 1$ 、TSGF 及 CYFRA21-1 水平比较

CR 组 TGF- $\beta 1$ 、TSGF 及 CYFRA21-1 水平均低于 NCR 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。

2.3 肿瘤标志物变化趋势与治疗效果的关系

经统计, 共 21 例呈上升趋势, 55 例呈下降趋势。肿瘤标志物变化趋势呈下降趋势的患者治疗有效率高于呈上升趋势的患者, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 1 食管癌组放疗前后与对照组 TGF- $\beta 1$ 、TSGF 及 CYFRA21-1 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of TGF- $\beta 1$, TSGF and CYFRA21-1 levels between esophageal cancer group and control group before and after radiotherapy ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	TGF- $\beta 1$ (ng/mL)	TSGF ($\mu\text{g/mL}$)	CYFRA21-1 (ng/mL)
食管癌组	76			
放疗前		43.12 $\pm$ 2.56 ^b	125.43 $\pm$ 14.75 ^b	8.74 $\pm$ 1.48 ^b
放疗后		20.95 $\pm$ 2.13 ^{ab}	89.57 $\pm$ 13.85 ^{ab}	2.39 $\pm$ 0.91 ^{ab}
对照组	60			
		9.73 $\pm$ 1.28	83.11 $\pm$ 12.43	1.79 $\pm$ 0.71
<i>F</i> 值	—	4511.09	195.40	875.28
<i>P</i> 值	—	<0.001	<0.001	<0.001

注: 与放疗前比较, ^a $P < 0.05$; 与对照组比较, ^b $P < 0.05$ 。

表 2 TACE 治疗前后 TSGF、GGT、VEGF 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of TSGF, GGT and VEGF levels before and after TACE treatment ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	TGF- $\beta 1$ (ng/mL)	TSGF ($\mu\text{g/mL}$)	CYFRA21-1 (ng/mL)
CR 组	53	13.71 $\pm$ 3.31	70.19 $\pm$ 5.84	3.51 $\pm$ 0.35
NCR 组	23	21.85 $\pm$ 2.79	91.37 $\pm$ 4.69	2.07 $\pm$ 0.44
<i>t</i> 值	—	10.302	15.358	15.217
<i>P</i> 值	—	<0.001	<0.001	<0.001

表 3 肿瘤标志物变化趋势与治疗效果的关系

Table 3 Relationship between the change trend of tumor markers and therapeutic effect

变化趋势	<i>n</i>	CR	PR	SD	PD	有效率 (%)
上升趋势	21	0(0.00)	9(42.86)	6(28.57)	6(28.57)	42.86
下降趋势	55	29(52.73)	14(25.45)	12(21.82)	0(0.00)	78.18
χ^2 值	—	—	—	8.777	—	—
<i>P</i> 值	—	—	—	0.003	—	—

2.4 影响食管癌放疗患者预后的单因素分析

年龄、性别、胸痛史、病理类型与食管癌放疗患者预后生存无关, 瘤部位、长度、X 线分型、总疗程 TGF- $\beta 1$ 、TSGF 及 CYFRA21-1 水平是影响食管癌放疗患者预后的单因素 ($P < 0.05$)。见表 4。

2.5 影响食管癌放疗患者预后的多因素分析

总疗程、TGF- $\beta 1$ 、TSGF 及 CYFRA21-1 水平为影响食管癌放疗患者预后的独立危险因素 ($P < 0.05$)。见表 5。

3 讨论

由于早期食管癌症状隐匿, 多数患者确诊时已错过了最佳手术治疗时间^[11]。对于此类患者, 放、化疗成为主要治疗方式, 故寻找用于早期诊断及评估患者预后的相关指标对食管癌的防治显得尤为重要^[12]。

TGF- $\beta 1$ 是一类多功能的细胞因子, TGF- $\beta 1$ 通路在肿瘤发展早期具有抑制肿瘤细胞增殖的作

表4 影响食管癌放疗患者预后生存的单因素分析

Table 4 Analysis of biliary factors affecting prognosis and survival of patients with esophageal cancer after radiotherapy

因素	生存组 (n=56)	死亡组 (n=20)	χ^2/t 值	P值
年龄(岁)				
>55	20(35.71)	12(60.0)	3.566	0.059
≤55	36(64.29)	8(40.00)		
性别				
男	30(53.57)	13(65.00)	0.783	0.376
女	26(46.43)	7(35.00)		
部位				
颈段+胸段	26(46.43)	2(10.00)	28.123	<0.001
胸中段	23(41.07)	3(15.00)		
胸下段	7(12.50)	15(75.00)		
长度(cm)				
≤3	28(50.00)	3(15.00)	14.408	<0.001
3~5	13(23.21)	2(10.00)		
≤5	15(26.79)	15(75.00)		
X线分型				
蕈伞+腔内型	29(51.79)	2(10.00)	30.833	<0.001
髓质型	11(19.64)	2(10.00)		
溃疡型	10(17.86)	1(5.00)		
缩窄型	6(10.71)	15(75.00)		
胸痛史				
有	39(69.64)	18(90.00)	2.052	0.152
无	17(30.36)	2(10.00)		
病理类型				
低磷	21(37.50)	6(30.00)	0.397	0.820
鳞癌	19(33.93)	8(40.00)		
其它	16(28.57)	6(30.00)		
总疗程(d)				
<49	30(53.57)	1(5.00)	32.534	<0.001
50~63	19(33.93)	3(15.00)		
>64	7(12.50)	16(80.00)		
TGF-β1(ng/mL)	15.12±3.11	46.98±4.25	35.465	<0.001
TSGF(μ/mL)	80.37±9.05	136.79±15.05	19.852	<0.001
CYFRA21-1(ng/mL)	9.63±2.13	2.03±0.96	15.358	<0.001

表5 影响食管癌放疗患者预后生存的多因素分析

Table 5 Multivariate analysis of prognostic factors in patients with esophageal cancer after radiotherapy

影响因素	回归系数	标准误	Wald/ χ^2 值	OR值	95%CI值	P值
肿瘤部位(颈段+胸段 vs 胸中或胸下段)	0.953	0.971	4.061	2.593	0.387~17.395	0.161
长度(≤3 cm 或 3~5 cm vs ≤5 cm)	0.879	0.764	4.594	2.408	0.539~10.767	0.234
X线分型(蕈伞+腔内型 vs 髓质型或溃疡型或缩窄型)	0.931	0.791	4.284	2.537	0.538~11.958	0.059
总疗程(<49d vs 50-63d或64 d)	1.051	0.356	4.356	2.861	1.424~5.747	0.001
TGF-β1(偏高 vs 正常)	0.967	0.178	4.184	2.630	1.855~3.728	0.003
TSGF(偏高 vs 正常)	0.931	0.133	4.306	2.537	1.955~3.293	0.008
CYFRA21-1(偏高 vs 正常)	1.036	0.165	4.984	2.818	2.039~3.894	0.001

后可被释放进入组织液和体液,因此其成为了检测和评估非小细胞肺癌、中晚期食管癌预后的一个灵敏性较高的重要标志物^[14]。Jiang等^[15]的Meta分析显示,血清CYFRA21-1是提示非小细胞肺癌不良预后的因素之一,高水平的血清CYFRA21-1提示患者预后不良,生存时间明显低于血清CYFRA21-1水平正常或较低的患者。本研究结果显示,CYFRA21-1可作为食管癌的1个独立预后因素,血清CYFRA21-1高者生存率低于血清

用,能抑制细胞的增生,使细胞停留在G1期,并诱导细胞凋亡。肿瘤后期癌细胞失去对TGF-β1抑癌作用敏感性,同时自身合成分泌大量TGF-β1,或在细胞外TGF-β1的作用下通过上皮间质化转变的过程发生形态学改变和增强浸润性。Zhang等^[13]研究发现TGF-β1在肾癌组织中的阳性表达率较癌旁肾组织减少,且TGF-β1阳性表达率随着肾癌病理分级和临床分期的上升而显著下降,提示TGF-β1的缺失有可能促进肾癌的发生。这与本研究结果相似,表明TGF-β1参与了恶性肿瘤的发生、侵袭与转移,与食管癌患者放疗疗效及预后关系密切。

TSGF是近年来研究发现的一种与恶性肿瘤血管增殖有关的因子,由于TSGF肿瘤谱广并具有与其他肿瘤标志物无相关关系的特性,因此在肿瘤的早期即可以出现并检出,故常作为肿瘤血管生存的标志物之一。TSGF检测对各种恶性肿瘤早期及治疗后的复发具有高度敏感性,尤其适合用于肿瘤患者术后及放、化疗后对疗效的检测。本研究结果提示TSGF对肿瘤的早期诊断和病情监控及复发转移具有重要的临床意义。

CYFRA21-1是构成细胞骨架的一种中间丝状物,以寡聚物形式存在,多年来CYFRA21-1在恶性肿瘤检测中的作用一直受到重视。因CYFRA21-1广泛存在于肺癌、食管癌等单层或浮层上皮肿瘤细胞的胞质中,当癌细胞溶解或坏死

CYFRA21-1低者,具有重要的临床意义。

综上,TGF-β1、TSGF及CYFRA21-1水平变化趋势与食管癌患者放疗后病理缓解程度及预后情况密切相关,检测三者水平可作为监测放疗疗效、提示预后的有效手段。

参考文献

- [1] 彭蓉,娜吧错,益西卓呷,等.不同病理类型食管癌GRP78,GRP94表达及与预后的关系分析[J].解放军医药杂志,2020,(7):22-26.

- [2] Pastorino U, Valente M, Alloisio M, et al. Current results of esophageal cancer surgery. Time trends in Operative Mortality and Long Term Survival [J]. Tumori, 1987, 73 (2): 139-146.
- [3] 党杰, 张永刚. EZH2 蛋白表达预测食管癌术后中远期生存率的价值研究[J]. 医学分子生物学杂志, 2018, 24(1): 45-48.
- [4] 郝媛媛, 程亮亮, 于显凤. 同步放化疗联合泰欣生治疗进展期食管癌的临床疗效及安全性分析[J]. 保健医学研究与实践, 2019, 16(4): 58-62, 69.
- [5] Mei X, Zhu X, Zuo L, et al. Predictive significance of CYFRA21-1, squamous cell carcinoma antigen and carcinoembryonic antigen for lymph node metastasis in patients with esophageal squamous cancer [J]. Int J Biol Markers, 2019, 34(2): 4795-4799.
- [6] Qu T, Zhang JW, Xu N, et al. Diagnostic value analysis of combined detection of Trx, CYFRA21-1 and SCCA in lung cancer [J]. Oncol Lett, 2019, 17(5): 4293-4298.
- [7] Wang J, Wu M, Zheng D, et al. Garcinol inhibits esophageal cancer metastasis by suppressing the p300 and TGF- β 1 signaling pathways [J]. Acta Pharmacol Sin, 2020, 41(1): 82-92.
- [8] Pastorino U, Valente M, Alloisio M, et al. Current Results of Esophageal Cancer Surgery. Time Trends in Operative Mortality and Long Term Survival [J]. Tumori, 1987, 73(2): 139-146.
- [9] Verstockt B, Dreesen E, Noman M, et al. Ustekinumab Exposure-outcome Analysis in Crohn's Disease Only in Part Explains Limited Endoscopic Remission Rates [J]. J Crohn Colitis, 2019, 56(7): 3514-3516.
- [10] Basch EM, Deal AM, Dueck AC, et al. Overall survival results of a randomized trial assessing patient-reported outcomes for symptom monitoring during routine cancer treatment [J]. J Clin Oncol, 2017, 35(15): 132-134.
- [11] Murakawa K, Ono K, Yamamura Y, et al. Minimally invasive surgery for esophageal cancer after esophageal perforation [J]. Asian J Endos Surg, 2017, 33(41): 5619-5623.
- [12] Long L, Pang XX, Lei F, et al. SLC52A3 expression is activated by NF- κ B p65/Rel-B and serves as a prognostic biomarker in esophageal cancer [J]. Cell Mol Life Sci, 2018, 75(14): 2643-2661.
- [13] Zhang H, Xie C, Yue J, et al. Cancer-associated fibroblasts mediated chemoresistance by a FOXO1/TGF β 1 signaling loop in esophageal squamous cell carcinoma [J]. Mol Carcinog, 2017, 56(3): 1150-1163.
- [14] Mishra A, Singh N, Shyan H, et al. Differential expression profiling of transcripts of IDH1, CEA, Cyfra21-1, and TPA in stage IIIa non-small cell lung cancer (NSCLC) of smokers and non-smokers cases with air quality index [J]. Gene, 2021, 766: 145-151.
- [15] Jiang ZF, Wang M, Xu JL. Thymidine kinase 1 combined with CEA, CYFRA21-1 and NSE improved its diagnostic value for lung cancer [J]. Life Sci, 2018, 194: 1-6.

(上接第 236 页)

- [J]. 海南医学, 2019, 30(15): 1969-1971.
- [3] Creisher PS, Chandwani MN, Kamte YS, et al. Type II interferon signaling in the brain during a viral infection with age-dependent pathogenesis [J]. Dev Neurobiol, 2020, 80(7-8): 213-228.
- [4] 钱文亚, 成聪聪, 吴伟萍. CD4+T、CD8+T 细胞结合细胞炎症因子检测在支原体肺炎中的临床意义 [J]. 全科医学临床与教育, 2019, 17(11): 981-983.
- [5] 马世龙, 熊明. 小骨窗经外侧裂-岛叶入路微创术治疗基底节区脑出血的疗效及炎症-氧化应激状态研究 [J]. 现代医学, 2019, 47(8): 887-892.
- [6] 中华医学会神经病学分会, 中华医学会神经病学分会脑血管病学组. 中国脑出血诊治指南(2019) [J]. 中华神经科杂志, 2019, 52(12): 994-1005.
- [7] 孙文慧, 李建彬, 冯石献, 等. 2014-2017 年郑州市居民脑卒中流行病学特征分析 [J]. 广东医学, 2019, 40(11): 1584-1588.
- [8] Krämer TJ, Hack N, Brühl TJ, et al. Depletion of regulatory T cells increases T cell brain infiltration, reactive astrogliosis, and interferon- γ gene expression in acute experimental traumatic brain injury [J]. J Neuroinflammation, 2019, 16(1): 163.
- [9] 段克非, 由杨, 田步先. 血浆代谢物对脑出血发病的预测和诊断价值 [J]. 中风与神经疾病杂志, 2019, 36(9): 831-835.
- [10] Matta SK, Olias P, Huang Z, et al. Toxoplasma gondii effector TgIST blocks type I interferon signaling to promote infection [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2019, 116(35): 17480-17491.
- [11] 石烽, 王志维. γ 干扰素在主动脉夹层发病中的研究进展 [J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2019, 21(4): 431-433.
- [12] 肖勇, 夏正新, 张苏宁, 等. 急性脑出血患者早期外周血干扰素- γ 分泌水平与预后关系的研究 [J]. 重庆医学, 2018, 47(1): 57-59+62.
- [13] 李邦林, 贾汉伟, 李靖, 等. 缺血性脑卒中患者单个核细胞 TLR3、IRF-3、IFN- γ mRNA 表达及临床意义 [J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(2): 207-211.
- [14] 翟云霞, 胥萍, 赵静, 等. 结核患者外周血 25-羟基维生素 D 的表达与免疫细胞亚群相关性 [J]. 中国热带医学, 2020, 20(11): 1053-1056.
- [15] 胡北泉, 覃刚, 魏凤, 等. 高血压患者脑出血后外周血 T 淋巴细胞亚群的动态变化及临床意义 [J]. 内科, 2020, 15(2): 135-138.

基于生物信息学分析 *F2R* 基因在胃癌中表达与免疫浸润的临床意义

陈梁玥¹ 段怡平¹ 柳家翠¹ 马甜甜¹ 朱翠雯¹ 邹晓沅^{2*}

【摘要】 目的 探究凝血因子II(凝血酶)受体(*F2R*)在胃癌中的表达与免疫细胞浸润情况,探索*F2R*在胃癌中预后价值及其生物学功能。**方法** 从TCGA数据库中下载胃癌中*F2R*基因表达谱数据及患者的临床病理信息,使用R4.0.2软件提取*F2R*在胃癌组及正常对照组的表达量数据,比较两组间*F2R*的表达差异。利用Kaplan-Meier法分析*F2R*表达与患者预后的相关性,并利用GEPIA对此进行验证。使用Cox回归分析*F2R*表达与胃癌患者临床预后相关性。利用GSEA富集分析预测*F2R*在胃癌中参与的信号通路。使用TIMER2.0分析了*F2R*表达与免疫浸润之间的关系。**结果** *F2R*在胃癌样本中表达显著上调($P<0.05$);生存分析显示*F2R*高表达组的总体生存率显著高于低表达组,差异均有统计学意义($P<0.05$);*F2R*的表达也与肿瘤组织学分级、临床分期和及肿瘤状态相关,是胃癌的独立预后因素($HR=1.303, 95\%CI:1.076\sim1.578, P<0.05$)。富集分析结果显示,*F2R*基因主要富集在MTOR信号通路、MAPK信号通路和癌症通路等。免疫浸润分析结果显示*F2R*表达与CD4+T细胞、CD8+T细胞、巨噬细胞相关($Rho>0.5, P<0.05$)。**结论** *F2R*在胃癌中表达显著上调,可作为胃癌患者的独立预后因子,且与免疫浸润有关。

【关键词】 胃癌; *F2R*; 生物信息学; 表达预后; 免疫浸润; 富集分析

Clinical Significance of *F2R* Gene Expression and Immune Infiltration in Gastric Cancer Based on Bioinformatics Analysis

CHEN Liangyue¹, DUAN Yiping¹, LIU Jiacyi¹, MA Tiantian¹, ZHU Cuiwen¹, ZOU Xiaofeng^{2*}

(1. Gene Diagnosis Center, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan, Hubei, China, 430071;

2. Scientific Bureau, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan, Hubei, China, 430071)

【ABSTRACT】 Objective To explore the expression of *F2R* in gastric cancer and immune cell infiltration and the prognostic value of *F2R* in gastric cancer and its biological function. **Methods** *F2R* expression profile data and clinicopathological information of gastric cancer patients were downloaded from TCGA database. R4.0.2 software was used to extract the expression data of *F2R* in the gastric cancer group and the normal control group. The expression differences between the two groups were analyzed. Kaplan-Meier method was used to perform the survival analysis, GEPIA were used to verify the prognostic value. Cox regression models were adopted to analyze the clinicopathologic features. GSEA enrichment analysis was used to predict the signaling pathways that *F2R* participates in gastric cancer. TIMER2.0 was used to analyze the relationship between *F2R* expression and immune infiltration. **Results** The expression level of *F2R* in gastric cancer was significantly up-regulated ($P<0.05$). The overall survival rate of *F2R* in the high expression group was lower than

基金项目:国家自然科学基金(81472033,30901308);湖北省卫生健康科研基金资助(WJ2019M203);武汉市应用基础研究(2017060201010171);湖北省卫生和计划生育委员会联合基金项目(WJ2018H0028);湖北省卫生和计划生育委员会青年人才项目(WJ2015Q021);武汉大学中南医院科技创新培育基金(cxpy2018031, cxpy20160054);武汉大学大学生创新项目(MS2017045, S2018301747)

作者单位:1. 武汉大学中南医院基因诊断中心, 湖北, 武汉 430071

2. 武汉大学中南医院科研处, 湖北, 武汉 430071

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

that of the low expression group. The expression level of *F2R* was significantly related to tumor histological grade ($P<0.05$), clinical stage ($P<0.05$) and tumor status ($P<0.05$). *F2R* was an independent risk factor for the prognostic of gastric cancer ($HR=1.303$, $95\%CI: 1.076\sim1.578$, $P<0.05$). GSEA enrichment results indicated that *F2R* was enriched in the MTOR signaling pathway, MAPK signaling pathway and cancer pathway. Immune infiltration analysis showed that *F2R* expression was correlated with CD4+T cells, CD8+T cells and macrophages ($Rho>0.5$, $P<0.05$). **Conclusion** *F2R* is significantly up-regulated in gastric cancer, which can be used as an independent prognostic factor in patients with gastric cancer and is related to immune infiltration.

[KEY WORDS] Gastric cancer; *F2R*; Bioinformatics; Expression and Prognosis; Immune infiltration; Functional enrichment

据报道,2018年在世界范围内,胃癌(gastric cancer, GC)有1 033 701例新增病例,造成783 000人死亡^[1],因其死亡人数占癌症相关死亡总人数的8.2%,这使GC成为继肺癌和结直肠癌(死亡率18.4%和9.3%)后第三大与癌症相关的死亡原因^[2]。由于缺乏早期诊断标志物,大多数胃癌患者诊断时已处于晚期阶段,其五年生存率仅为30%^[3]。因此,深入认识胃癌的分子发病机制,寻求对GC更敏感的生物标志物,对改善胃癌患者的总体生存期至关重要。凝血因子II凝血酶受体(coagulation factor II receptor, *F2R*)又称蛋白酶激活受体1(protease activated receptor 1, *PAR1*)属于G蛋白偶联受体家族,该家族有四种亚型,其中*PAR1*是研究最深入的一种^[4]。目前研究认为,*F2R*可能是作为某些介导恶性肿瘤转移物质的受体而起作用,包括凝血酶、基质蛋白酶、血管内皮生长因子和整合素家族^[5-6]。另外,*F2R*可以通过参与细胞信号传导^[7],激活炎症反应,破坏内皮屏障和参与免疫逃逸等机制参与肿瘤进程^[8]。近年来,有研究表明,*F2R*在多种恶性肿瘤中高表达,且这种表达与肿瘤侵袭、转移等生物学行为密切相关,并提示预后不良^[9]。然而,*F2R*在胃癌的发生发展中扮演的角色和分子机制尚未阐明。本研究通过分析TCGA数据库获得的微阵列数据,探索*F2R*在胃癌中的表达、免疫浸润及预后价值,并预测*F2R*在胃癌发生发展中的分子作用机制。

1 材料与方法

1.1 数据采集

从TCGA数据库下载有关基因表达,免疫系统浸润和相关临床信息数据,其中包括375个肿瘤组织和32个正常组织。对基因表达数据进行归一化处理,并Log2转化后用于后续分析。排除了临床信息缺失或患者生存时间为0的样本。使用

Strawberry Perl 5.32.1软件将原始基因表达谱数据整理成基因表达矩阵文件。

1.2 *F2R*的表达与患者临床病理特征及预后的相关性分析

使用R4.0.2软件中的“limma”包、“beeswarm”包提取*F2R*在胃癌组织样本和正常组织样本的表达数据并分析比较两组的表达差异,设定 $P<0.05$, Fold change >2 为筛选标准。使用Wilcoxon秩和检验分析*F2R*在GC及癌旁正常组织样本中的表达差异;利用R 4.0.2软件“survival”包分析两组之间总体生存率(overall survival, OS)的差异;用IBM SPSS Statistics 25.0软件绘制了*F2R*表达的ROC曲线图。根据下载整理的临床病理信息,结合*F2R*表达量,研究*F2R*与年龄、性别、TNM分期等临床相关性。采用了单因素和多因素COX回归分析判断*F2R*在胃癌中的预后价值, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

1.3 基因富集分析

采用GSEA(版本4.1.0)对*F2R*进行基因富集分析,采用缺省加权富集统计的方法,随机组合次数设为1 000次,其他参数设为默认值。 $P<0.05$ 和错误发现率(false discovery rate, FDR)小于0.05的基因集作为显著富集的基因集。

1.4 免疫浸润分析

使用TIMER2.0来评估*F2R*表达与肿瘤免疫细胞浸润(tumor-infiltrating immune cells, TIIC)丰富度的相关性,包括CD4+T细胞,CD8+T细胞和巨噬细胞。另外,使用一种基于基因表达的反卷积算法,CIBERSORT(<http://cibersort.stanford.edu/>)^[10],评估样本中各组之间的基因表达的相对变化。使用CIBERSORT分析了22种TIIC的免疫应答,以评估它们与GC中*F2R*表达的关联,并揭示TIIC之间的关联性^[11]。将375个肿瘤样品以中位数为界,分为高、低表达两组来分析*F2R*对免疫系统微环境的影响。

1.5 资料验证

使用基因表达谱分析交互式分析(GEPIA) (<http://gepia.cancer-pku.cn/index.html>)在线数据库分析 *F2R* 差异表达的生存曲线,发现基因表达与 GC 患者预后的相关性。同时,绘制了以疾病状态为变量的箱式图,以计算 *F2R* 的差异表达。

2 结果

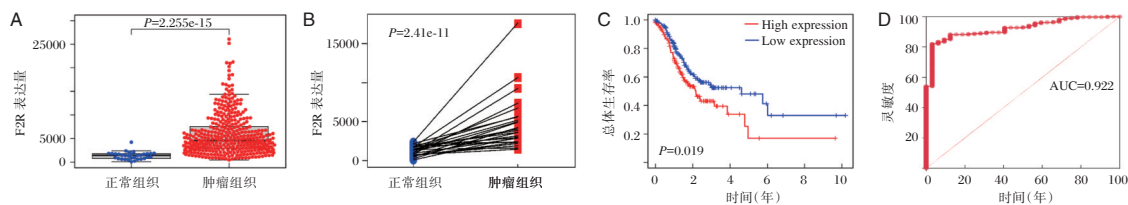
2.1 *F2R* 的表达差异和预后分析

在胃癌组织中, *F2R* 表达水平高于正常组织,差异有统计学意义 ($P<0.05$) (图 1A-B)。图

1C 中生存曲线表明肿瘤组织中 *F2R* 的高表达与 OS 密切相关 ($P<0.05$),与图 1D 的受试者工作曲线 (AUC=0.922) 共同揭示了 *F2R* 的预后价值。

2.2 *F2R* 表达与临床病理相关性和 COX 回归分析

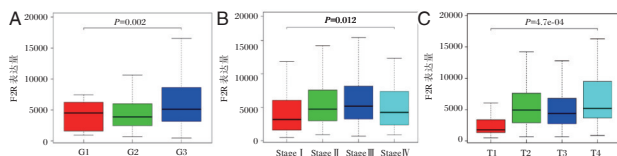
F2R 表达水平与肿瘤组织学分期 (图 2A)、临床分期 (图 2B) 以及肿瘤状态 (图 2C) 具有相关性,差异有统计学意义 ($P<0.05$)。多因素 Cox 分析结果显示 *F2R* 表达 (HR=1.303, 95% CI: 1.076~1.578, $P<0.05$) 及年龄 (HR=2.089, 95% CI: 1.425~3.057, $P<0.05$) 可以作为胃癌的独立预后因子。见表 1。



注:A为 *F2R* 在正常组织和肿瘤组织中的表达;B为 27 对配对的胃癌组织和癌旁组织中 *F2R* 的表达差异;C为高表达 *F2R* 胃癌患者和低表达 *F2R* 胃癌患者的总体生存率差异比较;D为 *F2R* 的 ROC 曲线。

图 1 *F2R* 在胃癌组织中的表达差异和预后分析

Figure 1 Analysis of the expression and prognostic of *F2R* in gastric cancer



注:A-C 依次为胃癌患者组织学分期、临床分期、T 分期与 *F2R* 表达量的相关性分析。

图 2 *F2R* 表达量与胃癌患者临床病理特征相关性

Figure 2 The correlation between the expression of *F2R* and clinicopathological characteristics of gastric cancer patients

表 1 单因素 COX 回归分析

Table 1 Univariate cox regression analysis of *F2R* in gastric cancer

因素	单因素分析	
	HR 值(95%CI)	P 值
年龄	1.669 (1.160~2.400)	0.006 ^a
性别	1.403 (0.959~2.054)	0.081
组织学分期	1.330 (0.940~1.883)	0.107
临床分期	1.549 (1.244~1.929)	<0.001 ^a
T 分期	1.255 (1.001~1.573)	0.049
M 分期	1.806 (0.971~3.358)	0.062
N 分期	1.327 (1.132~1.555)	<0.001 ^a
<i>F2R</i>	1.283 (1.082~1.521)	0.004 ^a

注:^a $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2.3 GSEA 富集分析

GSEA 揭示在高表达 *F2R* 的样本中,具有显著差异的 KEGG 富集通路 ($FDR<0.05$, $P<0.05$),

根据校正后的富集得分(NES)选择了最富集的信号通路(图 3)。其结果显示 *F2R* 基因高表达样本主要富集在 MTOR 信号通路、MAPK 信号通路、细胞因子与细胞因子受体互作通路、JAK-STAT 信号通路、肌动蛋白细胞骨架调节通路和癌症通路。见表 2。

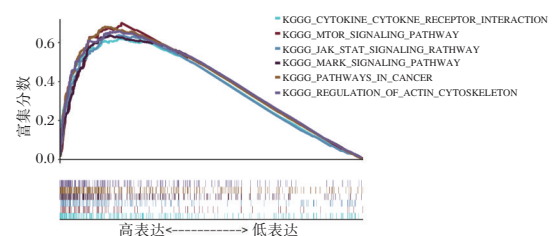


图 3 *F2R* 功能富集分析

Figure 3 Functional enrichment analysis of *F2R*

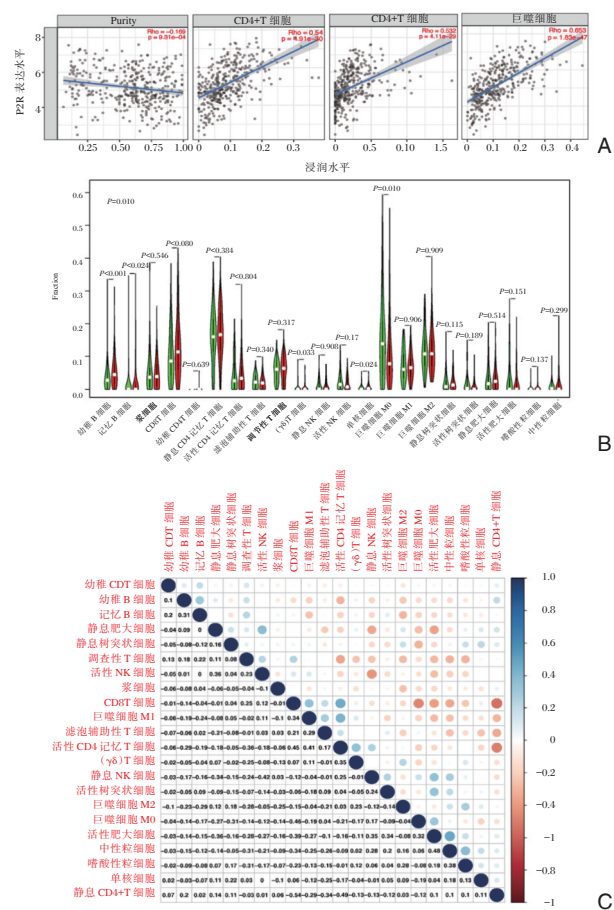
表 2 *F2R* 基因功能富集分析

Table 2 Functional enrichment analysis of *F2R*

富集通路	富集分数	标准化富集分数	P 值	FDR 值
癌症通路	0.680	2.330	<0.001	0.003
JAK-STAT 信号通路	0.640	2.300	<0.001	0.002
细胞因子与细胞因子受体互作通路	0.620	2.250	<0.001	0.002
肌动蛋白细胞骨架调节通路	0.660	2.250	<0.001	0.002
MAPK 信号通路	0.640	2.210	<0.001	0.001
MTOR 信号通路	0.730	2.160	<0.001	0.001

2.4 *F2R* 表达与免疫浸润细胞

使用TIMER2.0分析*F2R*表达与GC免疫浸润之间的相关性。*F2R*表达与CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞、巨噬细胞正相关($Rho>0.5$, $P<0.05$) (图4A)。以*F2R*表达的中位值,将375个肿瘤样品分为高低表达两组,通过CIBESORT算法评估样本的22种免疫细胞表达水平的差异(图4B)。B细胞,记忆B细胞,T细胞、巨噬细胞,M0巨噬细胞是受*F2R*表达影响的主要细胞,其中高表达组的记忆B细胞、巨噬细胞增加($P<0.05$),而B细胞和M0巨噬细胞减少($P<0.05$)。绘制了22种免疫细胞之间可能存在的相关性的热图(图4C)。



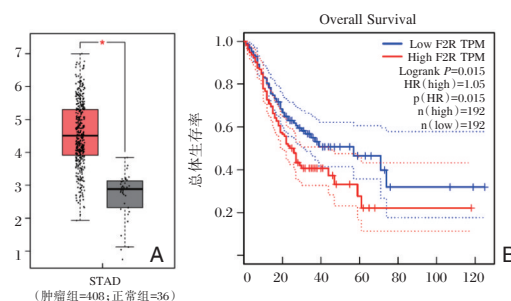
注:A. *F2R*表达与免疫浸润水平之间的相关性; B. 肿瘤样品中*F2R*高表达组和低表达组中22种免疫亚型的变化比例; C. 肿瘤样品中22种免疫浸润细胞的热图。

图4 *F2R*表达与免疫浸润

Figure 4 Expression of *F2R* and immune infiltration

2.5 资料验证

与正常组相比,GC中*F2R*的表达显著增加($P<0.05$, $|\text{Log2FC}|>1$,图5A),且高表达的*F2R*与GC的不良预后有关($P<0.05$,图5B)。



注:A.从GEPID获得的GC组织和正常样本中*F2R* mRNA的表达水平箱式图; B.基于从GEPID获得的数据绘制的生存曲线。

图5 资料验证

Figure 5 Data validation

3 讨论

众所周知,凝血级联反应与肿瘤之间有着密不可分的关系。研究表明,癌细胞不仅可以激活血液凝固,而且可以导致血管内皮损伤、血小板活性增加和纤维蛋白溶解异常,进而引起血栓形成,而血栓形成又促进了恶性肿瘤的生长和转移,且此过程与*F2R*有关^[12]。随着研究的不断深入,发现*F2R*作为凝血过程中的重要一环,其高度表达及长时间的激活会触发NF- κ B和表皮生长因子受体的激活^[13-14],进而参与多种肿瘤类型的进展、转移和侵袭^[15-16]。在大多数研究中,*F2R*被认为是癌基因,因为其在肿瘤组织中高度表达,且与恶性肿瘤临床特征显著相关。比如在乳腺癌中,过表达的*F2R*与HMGA2相互作用来调节上皮间质转化,进而将乳腺癌细胞转化为转移表型来促进癌细胞迁徙、侵袭和转移^[17]。Yang^[18]等人发现,在胰腺癌中*F2R*不仅通过一些信号通路参与肿瘤的生长和转移,还有一个重要的机制是*F2R*介导的抗肿瘤免疫抑制作用。这些结果说明,*F2R*在不同肿瘤发生发展中所扮演的角色是复杂的,需要进一步研究。

MTOR信号通路是癌症发生过程中重要的信号通路之一,参与调节氨基酸、葡萄糖、核苷酸、脂肪酸和脂质代谢^[19]。在细胞骨架调节通路中,细胞骨架由肌动蛋白、微管和中间丝构成,其中肌动蛋白细胞骨架的动态重组将会改变细胞的运动性,从而促进肿瘤细胞的侵袭和转移^[17]。JAK-STAT信号通路通过对基因表观遗传的修饰来影响基因表达和诱导上皮间质转化^[20]。MAPK信号通路则与细胞周期调节有关^[21]。由此可以推断*F2R*在体内通过这些过程和途径起作用。本研究结果有助于增进对*F2R*生物学功能的理解。

结果显示 *F2R* 的表达与 CD4+T 细胞、单核细胞、巨噬细胞和肥大细胞具有显著的相关性。另在 *F2R* 高表达组中,记忆 B 细胞、巨噬细胞水平升高,而 B 细胞和 M0 巨噬细胞水平降低。这可能揭示了 *F2R* 可能通过调节巨噬细胞来调节胃癌。巨噬细胞可以分泌多种细胞因子,例如 CXCL1, IL6, TGF- β 和 VEGF,它们可促进肿瘤的生长和转移^[18],胃癌患者的肿瘤内区域巨噬细胞密度增加^[22]。可以推断,*F2R* 的过表达有效促进了巨噬细胞的免疫反应和浸润,这些共同说明了 *F2R* 在 GC 中免疫浸润细胞的调节和募集中起着关键作用。

综上所述,*F2R* 在胃癌组织中的表达显著上调,其调节了胃癌发展过程中的免疫浸润细胞及各种途径中的蛋白质,并与胃癌患者的恶性进展相关。通过对其功能更深入的了解,*F2R* 高表达能够作为 GC 的独立预后因子,并有望成为 GC 诊断和治疗的有效工具,以及新的治疗分子靶点。

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] Thrift AP, El-Serag HB. Burden of gastric cancer [J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2020, 18(3):534-542.
- [3] Matsuoka T, Yashiro M. Biomarkers of gastric cancer: Current topics and future perspective [J]. World J Gastroenterol, 2018, 24(26):2018-2832.
- [4] Sinha RK, Wang Y, Zhao Z, et al. Par1 biased signaling is required for activated protein c in vivo benefits in sepsis and stroke [J]. Blood, 2018, 131(11):1163-1171.
- [5] Flaumenhaft R, De Ceunynck K. Targeting par1: Now what? [J]. Trends Pharmacol Sci, 2017, 38(8):701-716.
- [6] Li Z, Yin M, Zhang H, et al. Bmx represses thrombin-par1-mediated endothelial permeability and vascular leakage during early sepsis [J]. Circ Res, 2020, 126(4):471-485.
- [7] Gao G, Yang M, Wang F, et al. Coagulation factor 2 thrombin receptor promotes malignancy in glioma under sox2 regulation [J]. Aging (Albany NY), 2020, 12(11):10594-10613.
- [8] Wojtukiewicz MZ, Hempel D, Sierko E, et al. Endothelial protein c receptor (epcr), protease activated receptor-1 (par1) and their interplay in cancer growth and metastatic dissemination [J]. Cancers (Basel), 2019, 11(1):51.
- [9] McAuley JR, Bailey KM, Ekambaram P, et al. Malt1 is a critical mediator of par1-driven nf- κ b activation and metastasis in multiple tumor types [J]. Oncogene, 2019, 38(49):7384-7398.
- [10] Newman AM, Liu CL, Green MR, et al. Robust enumeration of cell subsets from tissue expression profiles [J]. Nat Methods, 2015, 12(5):453-457.
- [11] Gentles AJ, Newman AM, Liu CL, et al. The prognostic landscape of genes and infiltrating immune cells across human cancers [J]. Nat Med, 2015, 21(8):938-945.
- [12] Wojtukiewicz MZ, Hempel D, Sierko E, et al. Thrombin-unique coagulation system protein with multifaceted impacts on cancer and metastasis [J]. Cancer Metastasis Rev, 2016, 35(2):213-233.
- [13] McAuley JR, Bailey KM, Ekambaram P, et al. Malt1 is a critical mediator of par1-driven nf- κ b activation and metastasis in multiple tumor types [J]. Oncogene, 2019, 38(49):7384-7398.
- [14] Zhang Y, Wang H, Zhu G, et al. F2r negatively regulates osteoclastogenesis through inhibiting the akt and nf κ b signaling pathways [J]. Int J Biol Sci, 2020, 16(9):1629-1639.
- [15] Yang E, Cisowski J, Nguyen N, et al. Dysregulated protease activated receptor 1 (par1) promotes metastatic phenotype in breast cancer through hmga2 [J]. Oncogene, 2016, 35(12):1529-1540.
- [16] Yang Y, Stang A, Schweickert PG, et al. Thrombin signaling promotes pancreatic adenocarcinoma through par-1-dependent immune evasion [J]. Cancer Res, 2019, 79(13):3417-3430.
- [17] Fife CM, McCarroll JA, Kavallaris M. Movers and shakers: Cell cytoskeleton in cancer metastasis [J]. Br J Pharmacol, 2014, 171(24):5507-5523.
- [18] Zhou Z, Xia G, Xiang Z, et al. A c-x-c chemokine receptor type 2-dominated cross-talk between tumor cells and macrophages drives gastric cancer metastasis [J]. Clin Cancer Res, 2019, 25(11):3317-3328.
- [19] Mossmann D, Park S, Hall MN. Mtor signalling and cellular metabolism are mutual determinants in cancer [J]. Nat Rev Cancer, 2018, 18(12):744-757.
- [20] Groner B, von Manstein V. Jak stat signaling and cancer: Opportunities, benefits and side effects of targeted inhibition [J]. Mol Cell Endocrinol, 2017, 451:1-14.
- [21] Wagner EF, Nebreda AR. Signal integration by jnk and p38 mapk pathways in cancer development [J]. Nat Rev Cancer, 2009, 9(8):537-549.
- [22] Li JQ, Yu XJ, Wang YC, et al. Distinct patterns and prognostic values of tumor-infiltrating macrophages in hepatocellular carcinoma and gastric cancer [J]. J Transl Med, 2017, 15(1):37.

· 论 著 ·

Wnt-5a、Wnt-11、CaMK II 在良性转归葡萄胎和恶性变葡萄胎中的表达及意义

韦婵妍* 黄琼华

【摘要】目的 探讨无翅型 MMTV 整合位点家族成员 5a(Wnt-5a)、无翅型 MMTV 整合位点家族成员(Wnt-11)及 Ca^{2+} /钙调素依赖的蛋白激酶 II (CaMK II) 在良性转归及恶性变葡萄胎组织中的表达其临床意义。**方法** 收集 2009 年 3 月至 2020 年 3 月本院 72 例葡萄胎患者首次清宫石蜡标本,其中 28 例为随访发生恶变的葡萄胎(恶变葡萄胎组),44 例为随访未发生恶变的葡萄胎(良性转归葡萄胎组),采用免疫组织化学法(IHC)检测上述组织标本中 Wnt-5a、Wnt-11 及 CaMK II 蛋白表达情况;采用 ROC 曲线分析 Wnt-5a、Wnt-11 及 CaMK II 蛋白表达对葡萄胎恶变的预测效能。**结果** 恶变葡萄胎组和良性转归葡萄胎组的 Wnt-5a(75.00% vs 29.55%)、Wnt-11(82.14% vs 22.13%)及 CaMK II(89.29% vs 63.64%)蛋白阳性表达率比较,恶变葡萄胎组均显著高于良性转归葡萄胎组,差异有统计学意义($P<0.05$)。多因素 Logistic 回归结果提示宫腔病变径线 ≥ 6 cm($OR=2.328$, 95% CI : 1.518~3.569)、Wnt-5a 阳性($OR=3.347$, 95% CI : 1.586~7.062)、Wnt-11 阳性($OR=3.873$, 95% CI : 1.664~9.014)及 CaMK II 阳性($OR=1.355$, 95% CI : 1.057~1.738)是葡萄胎恶变的独立危险因素($P<0.05$)。Wnt-11 预测葡萄胎恶变的 AUC 分别大于宫腔病变径线、CaMK II 预测的 AUC($P<0.05$),与 Wnt-5a 预测的 AUC 比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 恶变葡萄胎首次清宫组织中 Wnt-5a、Wnt-11 及 CaMK II 蛋白表达较良性转归葡萄胎异常升高,三者对葡萄胎恶变具有较好的预测价值。

【关键词】 葡萄胎; Wnt 信号通路; Wnt-5a; Wnt-11; Ca^{2+} /钙调素依赖的蛋白激酶 II

The expression and significance of Wnt-5a, Wnt-11 and CaMK II in hydatidiform mole of benign outcomes and malignant lesions

WEI Chanyan*, HUANG Qionghua

(Department of Obstetrics and Gynecology, Chaonan Minsheng Hospital, Shantou, Guangdong, China, 515100)

【ABSTRACT】Objective To explore the expression and clinical significance of Wnt-5a, Wnt-11 and Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II (CaMK II) in hydatidiform mole of benign outcomes and malignant lesions. **Methods** The paraffin specimens from 72 patients with hydatidiform mole who underwent curettage for the first time in the hospital from March 2009 to March 2020 were collected, including 28 cases with hydatidiform mole of malignant lesions (malignant lesion hydatidiform mole group) and 44 cases without malignant lesions (benign outcome hydatidiform mole group). The expression of Wnt-5a, Wnt-11 and CaMK II protein in the above tissue samples was detected by immunohistochemistry (IHC). The predictive efficiency of Wnt-5a, Wnt-11 and CaMK II for malignant lesions of hydatidiform mole was analyzed by ROC curves. **Results** The positive expression rates of Wnt-5a (75.00% vs 29.55%), Wnt-11 (82.14% vs 22.13%) and CaMK II (89.29% vs 63.64%) were significantly higher in the malignant lesion hydatidiform mole group than those in the benign outcome hydatidiform mole group ($P<0.05$). The results of multivariate Logistic regression

基金项目:2018 年汕头市科技计划医疗卫生类别项目(170822111931024)

作者单位:汕头潮南民生医院妇产科,广东,汕头 515100

*通信作者:韦婵妍, E-mail: weimuqiang3923@163.com

analysis indicated that the diameter of uterine lesions not shorter than 6 cm ($OR=2.328$, $95\%CI$: 1.518~3.569), Wnt-5a positive ($OR=3.347$, $95\%CI$: 1.586~7.062), Wnt-11 positive ($OR=3.873$, $95\%CI$: 1.664~9.014) and CaMK II positive ($OR=1.355$, $95\%CI$: 1.057~1.738) were independent risk factors for malignant lesions of hydatidiform mole ($P<0.05$). AUC of Wnt-11 for predicting malignant lesions of hydatidiform mole was greater than that of uterine lesions diameter and CaMK II ($P<0.05$). There was no significant difference in AUC between Wnt-11 and Wnt-5a ($P>0.05$). **Conclusion** The expression of Wnt-5a, Wnt-11 and CaMK II protein in the first purging tissue of malignant hydatidiform mole is abnormally higher than that of benign prognosis. The three have better predictive value for the malignant transformation of mole.

[KEY WORDS] Hydatidiform mole; Wnt signaling pathway; Wnt-5a; Wnt-11; Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II

葡萄胎是来源于受精卵的异常受精,是一类良性的妊娠滋养细胞疾病(gestational trophoblastic disease, GTD),多数葡萄胎在吸宫后病灶自然消退,但是具有一定的恶变潜能,能发展成为侵蚀性葡萄胎和绒毛膜癌、上皮样滋养细胞肿瘤、胎盘部位滋养细胞肿瘤等^[1-3]。关于葡萄胎恶变的机制仍不明确,目前临床上主要通过检测葡萄胎清宫术后血人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotropin, hCG)水平来预测葡萄胎恶变,但葡萄胎清宫术后hCG随访不能严格执行,且hCG随访具有时间滞后性,部分葡萄胎患者确诊恶变时已出现远处转移甚至是子宫破裂^[4-5]。因此对于首次清宫术诊断葡萄胎的患者,如何判断其预后及转归是亟待解决的难题。近年来研究^[6]显示,葡萄胎恶变与Wnt信号转导通路调控有关,Wnt信号通路相关蛋白可能是预测葡萄胎转归的潜在标志物,但目前相关系统研究尚缺乏。本研究检测葡萄胎首次清宫组织中Wnt/ Ca^{2+} 通路的相关蛋白无翅型MMTV整合位点家族成员5a(wingless-type MMTV integration site family, member 5A, Wnt-5a)、无翅型MMTV整合位点家族成员(wingless-type MMTV integration site family member, Wnt-11)及 Ca^{2+} /钙调素依赖的蛋白激酶II(Ca^{2+} -calmodulin dependent protein kinase II, CaMK II)表达,并探讨其预测葡萄胎恶变的临床价值。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取2009年3月至2020年3月本院72例葡萄胎患者为研究对象,平均年龄(32.84 ± 6.42)岁。纳入标准:①符合葡萄胎的诊断标准^[7],并经病理确诊;②临床病理资料完整;③年龄18~45岁。④所有患者均知情并同意;排除标准:①清宫前接受化疗的患者;②随访时间不足6个月者。入

选的72例葡萄胎患者中,28例随访发生恶变(恶变葡萄胎组),44例为随访未发生恶变(良性转归葡萄胎组);收集所有患者首次清宫石蜡标本。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂

兔抗人Wnt-5a、Wnt-11抗体(美国Santa Cruz公司),兔抗人CaMK II抗体((英国abcam公司),Envision法免疫组织化学试剂盒(丹麦DAKO公司),DAB显色试剂盒(丹麦DAKO公司),羊抗兔IgG二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司)。

1.2.2 检测方法

免疫组化染色及判定标准石蜡包埋的组织标本4 μm 连续切片至过胶玻片上,56℃条件下烤片2 h,使用二甲苯连续脱蜡3次,梯度乙醇脱二甲苯,水洗。0.3%过氧化氢室温孵育以阻断内源性过氧化物酶的活性。采用免疫组化Envision法染色,染色步骤严格按说明书要求进行,采用DAB显色,严格控制显色时间,常规脱水、封片。使用已知阳性切片作为阳性对照,PBS替代Wnt-5a、Wnt-11及CaMK II一抗作为阴性对照。显微镜下随机选取5个切片视野($\times 200$),再从各视野中观察100个细胞,采用病理Path软件分析显微镜下细胞分布情况。Wnt-5a、Wnt-11及CaMK II均定位于细胞质,以细胞质染色强度结合阳性细胞百分比对其表达情况进行判读^[8]。

1.3 统计学方法

使用SPSS 20.0软件进行数据统计分析,计数资料用 $n(\%)$ 表示,采取 χ^2 检验;葡萄胎恶变的独立危险因素采用多因素Logistic回归模型分析;应用受试者工作特征(receiver operating characteristic, ROC)曲线及曲线下面积(area under the curve, AUC)评价各指标的诊断效能,AUC比较使用Z检验。以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组 Wnt-5a、Wnt-11 及 CaMK II 蛋白表达比较

恶变葡萄胎组 Wnt-5a、Wnt-11 及 CaMK II 蛋白阳性表达率均显著高于良性转归葡萄胎组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

表 1 两组 Wnt-5a、Wnt-11 及 CaMK II 蛋白表达比较 [$n(\%)$]

Table 1 Expression of Wnt-5a, wnt-11 and CaMK II proteins between the 2 groups [$n(\%)$]					
组别	n	Wnt-5a 阳性	Wnt-11 阳性	CaMK II 阳性	
恶变葡萄胎组	28	21(75.00)	23(82.14)	25(89.29)	
良性转归葡萄胎组	44	13(29.55)	10(22.73)	28(63.64)	
χ^2 值		12.476	24.331	5.795	
P 值		<0.001	<0.001	0.016	

2.2 恶变葡萄胎组和良性转归葡萄胎组临床特征比较

年龄、卵巢黄素化囊肿、宫腔病变径线与葡萄胎是否恶变相关($P<0.05$),孕周、滋养细胞增生程度、血 β -hCG 与葡萄胎恶变无关($P>0.05$)。见表 2。

表 2 恶变葡萄胎组和良性转归葡萄胎组临床特征比较 [$n(\%)$]

Table 2 Comparison of clinical features between malignant hydatidiform mole group and benign conversion hydatidiform mole group [$n(\%)$]

临床资料	恶变 葡萄胎组 ($n=28$)	良性转归 葡萄胎组 ($n=44$)	χ^2 值	P 值
年龄(岁)				
≥35	15(53.57)	11(25.00)	6.054	0.014
<35	13(46.43)	33(75.00)		
孕周(周)				
≥12	8(28.57)	9(20.45)	0.625	0.429
<12	20(71.43)	35(79.55)		
卵巢黄素化囊肿				
有	8(28.57)	4(9.09)	4.675	0.031
无	20(71.43)	40(90.91)		
宫腔病变径线(cm)				
≥6	19(67.86)	16(36.36)	6.794	0.009
<6	9(32.14)	28(63.64)		
滋养细胞增生程度				
轻度	20(71.43)	29(65.91)	0.240	0.624
中度/重度	8(28.57)	15(34.09)		
血 β -hCG(mIU/mL)				
≥ 1×10^5	24(85.71)	34(77.27)	0.778	0.378
< 1×10^5	4(14.29)	10(22.73)		

表 4 Wnt-5a、Wnt-11、CaMK II 及宫腔病变径线预测葡萄胎恶变的效能比较

Table 4 Comparison of the efficacy of Wnt-5a, wnt-11, CaMK II and uterine cavity lesion diameter in predicting malignant transformation of hydatidiform mole

变量	β 值	SE	Wald / χ^2	OR	95%CI	P 值
宫腔病变径线(<6 vs. ≥6 cm)	0.845	0.218	15.025	2.328	1.518~3.569	0.000
Wnt-5a(阴性 vs. 阳性)	1.208	0.381	10.053	3.347	1.586~7.062	0.002
Wnt-11(阴性 vs. 阳性)	1.354	0.431	9.869	3.873	1.664~9.014	0.002
CaMK II(阴性 vs. 阳性)	0.304	0.127	5.730	1.355	1.057~1.738	0.017

2.3 葡萄胎恶变影响因素的多因素 Logistic 回归分析

以葡萄胎是否发生恶变作为因变量(1=恶变, 0=良性转归),表 1 和表 2 中差异有统计学意义的变量作为自变量纳入多因素 Logistic 回归分析,结果显示宫腔病变径线≥6 cm、Wnt-5a 阳性、Wnt-11 阳性及 CaMK II 蛋白阳性是葡萄胎恶变的独立危险因素($P<0.05$)。见表 3。

表 3 葡萄胎恶变影响因素的多因素 Logistic 回归分析

Table 3 Multivariate Logistic regression analysis of the influencing factors of hydatidiform mole

指标	AUC	SE	95%CI
Wnt-5a	0.770	0.043	0.687~0.840
Wnt-11	0.822	0.038	0.744~0.884
CaMK II	0.726	0.047	0.640~0.801
宫腔病变径线	0.644	0.050	0.554~0.727

2.4 ROC 曲线分析 Wnt-5a、Wnt-11、CaMK II 及宫腔病变径线对葡萄胎恶变的预测价值

绘制葡萄胎患者首次清宫组织中 Wnt-5a、Wnt-11、CaMK II 蛋白及宫腔病变径线预测葡萄胎恶变的 ROC 曲线。Wnt-11 预测葡萄胎恶变的 AUC 分别大于宫腔病变径线($Z=3.481, P=0.000$)、CaMK II($Z=2.822, P=0.005$)。预测的 AUC 与 Wnt-5a 预测的 AUC 比较,差异无统计学意义($Z=1.804, P=0.071$)。见图 1、表 4。

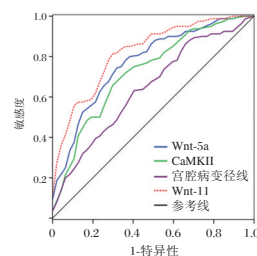


图 1 Wnt-5a、Wnt-11 及 CaMK II 蛋白预测葡萄胎恶变的 ROC 曲线

Figure 1 ROC curves of Wnt-5a, wnt-11 and CaMK II proteins in predicting malignant transformation of hydatidiform mole

3 讨论

葡萄胎发生恶变的原因尚不清楚,一般认为是同一种疾病的不同发展阶段^[9-10]。葡萄胎恶变后具有强大的破坏力,很早便可通过血行远处转移,若能早期发现葡萄胎恶变并给予预防性化疗,其预后通常更好^[11-12]。既往研究^[13]显示,葡萄胎大小与葡萄胎恶变倾向具有密切联系,病变越大,发生恶变的可能也越大。

非经典 Wnt 信号通路在胚胎早期发育中体轴的建立、中胚层的模式形成及随后的器官发生中起重要作用,该通路异常与众多器官发育畸形有关,此外在多种癌症中可发现其不同程度的过表达^[14]。在非经典 Wnt 信号通路中, Wnt-5a 是最重要的激活因子之一, Wnt-5a 在激活 Wnt/Ca²⁺ 信号通路,发挥生物学功能过程中发挥重要作用。既往报道指出敲除 Wnt-5a 基因的小鼠有严重的四肢缺陷, Wnt-5a 在雌性哺乳类动物的生殖道发育中发挥重要作用^[15]。Wnt-11 是另外一个重要的 Wnt/Ca²⁺ 信号通路激活因子,作为非经典信号通路的代表性配体, Wnt-11 可以调控细胞的增殖、分化和迁移继而决定细胞的命运^[16];另外 Wnt-11 能促使细胞泛素化,导致黏附蛋白的降解及逆转,为细胞的迁移奠定了基础。本研究结果提示葡萄胎患者首次清宫组织中 Wnt-5a、Wnt-11 过表达可能与葡萄胎恶变相关。本研究经多因素 Logistic 回归分析提示 Wnt-5a、Wnt-11 阳性表达是的葡萄胎恶变的独立危险因素, Wnt-5a、Wnt-11 可能是预测葡萄胎恶变的潜在生物标志物。为进一步评价首次清宫组织中 Wnt-5a、Wnt-11 在预测葡萄胎恶变中的价值。

在 Wnt/Ca²⁺ 信号通路中, Wnt 蛋白通过与细胞膜上相应的 Frizzled (Fz) 家族受体结合后通过一系列信号传递最终引起胞浆内质网 Ca²⁺ 的释放,使得细胞内钙离子水平瞬间升高,同时细胞内 Ca²⁺ 的增加可以进一步活化 CaMKII,活化的 CaMKI 继续激活其下游通路,来发挥生物学功能^[17]。本研究结果表明其对预测葡萄胎恶变有一定价值。

综上所述,恶变葡萄胎首次清宫组织中 Wnt-5a、Wnt-11 及 CaMK II 蛋白表达较良性转归葡萄胎异常升高,三者对葡萄胎恶变具有较好的预测价值,在葡萄胎清宫时便可提示其是否有恶变倾向。本研究不足在于纳入样本数量较小,可能影响结果的统计效能,更全面、准确的结果尚需要进行大样本研究论证。

参考文献

- [1] 焦澜舟, 尤淑艳, 王亚萍, 等. 早期葡萄胎的临床特点及诊断方法探讨[J]. 中华妇产科杂志, 2019, 54(11):756-762.
- [2] Santaballa A, García Y, Herrero A, et al. SEOM clinical guidelines in gestational trophoblastic disease (2017) [J]. Clin Transl Oncol, 2018, 20(1):38-46.
- [3] 吴龙英, 韦雯雯, 颜士杰. 155 例妊娠滋养细胞疾病临床资料分析[J]. 中华全科医学, 2017, 15(3):457-459.
- [4] 朱烨, 苏亦平, 周璘, 等. 血人绒毛膜促性腺激素对葡萄胎恶变的早期预测价值[J]. 中国临床医学, 2016, 23(4):473-476.
- [5] 刘睿, 张涛红, 胡娇娇, 等. 外周血系统性炎症标志物预测完全性葡萄胎恶变的价值研究[J]. 实用妇产科杂志, 2020, 36(1):31-36.
- [6] 张忠珏, 王亚华. Wnt11 和 BCL2A1 在完全性葡萄胎中的表达及临床意义[J]. 岭南急诊医学杂志, 2018, 23(2):145-147.
- [7] 向阳, 周琦, 吴小华, 等. 妊娠滋养细胞疾病诊断与治疗指南(第四版)[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2018, 34(9):994-1001.
- [8] Cha SW, Tadjuidje E, Tao Q, et al. Wnt5a and Wnt11 interact in a maternal Dkk1-regulated fashion to activate both canonical and non-canonical signaling in Xenopus axis formation. [J]. Development, 2008, 135(22):3719-3729.
- [9] Zhao JR, Cheng WW, Wang YX, et al. Identification of microRNA signature in the progression of gestational trophoblastic disease[J]. Cell Death Dis, 2018, 9(2):94.
- [10] 齐洁敏, 于淑莉, 白兴武, 等. 良、恶性葡萄胎组织中 P-选择素和 HPA 的表达及其临床意义[J]. 临床与实验病理学杂志, 2019, 35(3):273-277.
- [11] 焦澜舟, 王亚萍, 姜继勇, 等. 葡萄胎集中化管理临床意义的探讨[J]. 中华妇产科杂志, 2018, 53(6):390-395.
- [12] 张素素, 李红梅, 李红霞等. 转化生长因子-β1 与胎盘生长因子在葡萄胎预后中的意义[J]. 癌症进展, 2017, 15(4):443-446.
- [13] 张素素, 邵军晖, 张六连. 中性粒细胞/淋巴细胞比值、血小板/淋巴细胞比值、β 人绒毛膜促性腺激素和宫腔团块最大直径对葡萄胎预后的预测价值[J]. 广西医学, 2019, 41(22):2875-2878.
- [14] Huang L, Jin Y, Feng S, et al. Role of Wnt/βcatenin, Wnt/cJun Nterminal kinase and Wnt/Ca²⁺ pathways in cisplatin-induced chemoresistance in ovarian cancer[J]. Exp Ther Med, 2016, 12(6):3851-3858.
- [15] Kumawat K, Gosens R. WNT-5A: signaling and functions in health and disease[J]. Cell Mol Life Sci, 2016, 73(3):567-587.
- [16] 孙娟, 信艳萍, 张国梅, 等. 慢病毒介导 HMGN5 基因沉默对卵巢癌细胞增殖, 迁移, 侵袭的影响及其机制研究[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2019, 11(6):53-58.
- [17] Coullery R, Pacchioni AM, Rosso SB. Exposure to glyphosate during pregnancy induces neurobehavioral alterations and downregulation of Wnt5a-CaMKII pathway [J]. Rep Tox, 2020, 96(1):390-398.

· 论 著 ·

妊娠期糖尿病患者血清FAP4、25(OH)D水平与新生儿结局的关系

燕筠^{1*} 张丽² 葛郁荣³

【摘要】目的 探究妊娠期糖尿病(GDM)患者血清脂肪酸结合蛋白质4(FAP4)、25-羟维生素D[25(OH)D]水平与新生儿结局的关系。**方法** 选取2018年3月至2020年4月本院收治的GDM患者102例(观察组),另选取同期在本院生产的健康孕妇83例(对照组),比较两组的血脂相关指标、血糖相关指标、胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)、血清FAP4、25(OH)D水平,采用受试者工作特征(ROC)曲线分析血清FAP4、25(OH)D水平预测新生儿结局的应用价值。**结果** 观察组的总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、空腹血糖(FPG)和餐后2h血糖(2hPG)水平均高于对照组,高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)和HOMA-IR水平均低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);两组的胎儿窘迫、胎儿生长受限、新生儿窒息和低体重出生发生率比较差异无统计学意义($P>0.05$),观察组的新生儿不良结局总发生率高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);观察组的血清FAP4水平高于对照组,25(OH)D水平低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);观察组两亚组患者血清FAP4、25(OH)D水平比较,结局不良组患者的血清FAP4水平明显高于结局良好组,25(OH)D水平明显低于结局良好组,差异有统计学意义($P<0.05$);ROC曲线分析结果显示,FAP4、25(OH)D的曲线下面积(AUC)分别为0.660和0.715,对新生儿结局均有一定的预测能力($P<0.05$)。**结论** GDM患者血清FAP4、25(OH)D水平与新生儿不良结局有关,二者对GDM患者新生儿不良结局具有一定的预测价值。

【关键词】 妊娠期糖尿病;妊娠结局;新生儿;血清脂肪酸结合蛋白质4;25-羟维生素D

The relationship between serum FAP4 and 25 (OH) D levels with neonatal outcome in patients with gestational diabetes mellitus

YAN Jun^{1*}, ZHANG Li², GE Yurong³

(1. Department of Obstetrics and Gynecology, Zhongda Hospital Affiliated to Southeast University, Nanjing, Jiangsu, China, 210009; 2. Department of Obstetrics and Gynecology, Qingdao Women's and Children's Hospital, Qingdao, Shandong, China, 266000; 3. Department of Obstetrics and Gynecology, Guiyang Maternal and Child Health Hospital, Guiyang, Guizhou, China, 550003)

【ABSTRACT】 Objective To investigate the relationship between serum fatty acid binding protein 4 (FAP4) and 25-hydroxyvitamin D [25 (OH) D] levels and neonatal outcomes in patients with gestational diabetes mellitus (GDM). **Methods** From March 2018 to April 2020, 102 patients with GDM (the observation group), and 83 healthy pregnant women who delivered in the hospital (the control group) were enrolled in the study. Blood lipid indicators, blood glucose indicators, the homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR), serum FAP4 and 25 (OH) D levels were compared between the two groups. The receiver operating characteristic (ROC) curves were used to analyze the value of serum FAP4 and 25 (OH) D levels in predicting neonatal outcomes. **Results** The observation group's total cholesterol (TC), triglycerides (TG), fast-

基金项目:江苏省自然科学基金项目(BK20181215)

作者单位:1. 东南大学附属中大医院妇产科,江苏,南京 210009

2. 青岛妇女儿童医院妇产科,山东,青岛 266000

3. 贵阳市妇幼保健院妇产科,贵州,贵阳 550003

*通信作者:燕筠, E-mail: weimuqiang3923@163.com

ing blood glucose (FPG) and postprandial 2 h blood glucose (2 h PG) levels were higher than those of the control group, high density lipoprotein cholesterol (HDL-C) and HOMA-IR level was lower than the control group, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). There was no significant difference in the incidence of fetal distress, fetal growth restriction, neonatal asphyxia and low birth weight between the two groups ($P>0.05$). The total incidence of adverse neonatal outcomes in the observation group was higher than that in the control group ($P<0.05$). The serum FABP4 level of the observation group was higher than that of the control group, and the 25 (OH) D level was lower than that of the control group, the difference was statistically significant ($P<0.05$). In the observation group, the adverse outcome group had significantly higher serum FABP4 levels, and significantly lower 25 (OH) D levels than those in the good outcome group ($P<0.05$). ROC curve analysis shows that the area under the curve (AUC) values of FABP4 and 25(OH)D are 0.660 and 0.715 ($P<0.05$). **Conclusion** Serum FABP4 and 25 (OH) D levels in patients with GDM are related to adverse neonatal outcomes, and both have a certain predictive value for the adverse neonatal outcomes of GDM patients.

[KEY WORDS] Gestational diabetes mellitus; Pregnancy outcome; Neonate; Serum fatty acid binding protein 4; 25-hydroxyvitamin D

妊娠期糖尿病(gestational diabetes mellitus, GDM)是妊娠期女性常见的并发症之一,不仅会导致母婴不良结局的发生,还会增加女性产后心血管疾病的发生风险^[1-2]。当前,临床多认为胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)是导致GDM发病的最直接病因^[3]。有文献报道脂肪酸结合蛋白质4(fatty acid binding protein 4, FABP4)是一种影响机体糖脂代谢的调节蛋白,可通过调节脂肪酸代谢水平影响机体对胰岛素的敏感性^[4];另有研究指出,25-羟维生素D[25-hydroxyvitamin D, 25(OH)D]水平的变化会影响胰岛 β 细胞功能,诱导IR发生,增加GDM的发生风险^[5]。血清FABP4、25(OH)D在GDM患者血清中的表达水平及意义研究已有报道,但有关二者在GDM患者新生儿不良结局中的预测价值研究报道较少。本研究探讨了血清FABP4、25(OH)D水平在GDM患者和健康孕妇中的表达水平,并分析其对GDM患者新生儿不良结局的预测价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2018年3月至2020年4月本院收治的GDM患者102例为观察组,平均年龄(29.57 ± 4.63)岁,孕周平均(32.64 ± 1.78)周;孕前身体质量指数(body mass index, BMI)平均(23.71 ± 1.48) kg/m^2 。另选取同期在本院生产的健康孕妇83例为对照,年龄平均(28.61 ± 3.45)岁,孕周平均(33.17 ± 1.21)周;BMI平均(23.46 ± 1.52) kg/m^2 。本研究经医院伦理委员会批准。各组的临床基线资料比较差异无

统计学意义($P>0.05$),具有可比性。纳入标准:①临床检查符合GDM的诊断标准^[6];②患者年龄 ≤ 45 岁;③均为初产妇,胎龄30~35周;④患者及其家属知情同意,均签署知情同意书。排除标准:①经检查存在恶性肿瘤、免疫系统疾病患者;②存在严重器官功能障碍患者;③近期服用对本研究指标有影响的药物。

1.2 研究方法

1.2.1 实验室指标检测

取研究对象晨起空腹肘静脉血5 mL,3 000 r/min离心10 min后分离血清,低温保藏待测。应用全自动生化分析仪(AU2700型,日本奥林巴斯公司),采用免疫比浊法检测总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglycerides, TG)和高密度脂蛋白胆固醇(high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C)水平;采用酶联免疫吸附法检测血清FABP4、25(OH)D水平,试剂盒购于上海奥陆生物科技有限公司,严格按照相关操作步骤进行。采用葡萄糖氧化酶法检测空腹血糖(fasting blood glucose, FPG)、餐后2 h血糖(2h postprandial plasma glucose, 2 h PG)水平,稳态模型计算胰岛素抵抗指数(homeostasis model assessment of insulin resistance, HOMA-IR),计算公式为 $\text{HOMA-IR} = (\text{FPG} \times \text{空腹胰岛素}) / 22.5$ ^[7],其中空腹胰岛素水平采用化学发光免疫法进行检测。

1.2.2 随访及新生儿结局分析

所有研究对象均通过常规门诊产前检查进行随访,研究对象分娩结束后即停止随访。观察并记录新生儿结局,计算新生儿不良结局发生率。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析。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;受试者工作特征(ROC)曲线分析血清 FABP4、25(OH)D 水平对新生儿不良结局的预测价值; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组血脂、血糖相关指标比较

观察组的 TC、TG、FPG 和 2hPG 水平均高于对照组, HDL-C 和 HOMA-IR 水平均低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 两组患者血脂、血糖相关指标比较 $(\bar{x} \pm s)$

Table 1 Comparison of blood lipids and blood glucose associated indexes between 2 groups $(\bar{x} \pm s)$

指标	观察组 ($n=102$)	对照组 ($n=83$)	t 值	P 值
TC (mmol/L)	5.09±0.71	4.83±0.83	2.296	0.023
TG (mmol/L)	1.84±0.56	1.51±0.50	4.181	<0.001
HDL-C (mmol/L)	1.37±0.41	1.61±0.47	3.708	<0.001
FPG (mmol/L)	6.41±1.03	4.56±1.17	11.430	<0.001
2hPG (mmol/L)	11.25±1.24	6.38±1.27	26.28	<0.001
HOMA-IR	2.10±0.84	3.51±1.03	10.257	<0.001

2.2 两组新生儿结局情况比较

两组的胎儿窘迫、胎儿生长受限、新生儿窒息和低体重出生发生比较差异无统计学意义($P > 0.05$);观察组的新生儿不良结局总发生率高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 两组新生儿结局情况比较 $[n(\%)]$

Table 2 Comparison of neonatal outcomes between 2 groups $[n(\%)]$

组别	n	胎儿窘迫	胎儿生长受限	新生儿窒息	低体重出生	合计
观察组	102	7(6.86)	8(7.84)	2(1.96)	5(4.90)	22(21.57)
对照组	83	4(4.82)	2(2.41)	0(0.00)	2(2.41)	8(9.64)
χ^2 值		0.342	2.642	—	—	4.794
P 值		0.559	0.104	0.503	0.462	0.029

2.3 两组血清 FABP4、25(OH)D 水平比较

观察组的血清 FABP4 水平高于对照组, 25(OH)D 水平低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 3。两亚组的年龄、孕周和孕前 BMI 比较,差异均无统计学意义($P < 0.05$)。与结局良好组相比,结局不良组患者的血清 FABP4 水平明显高于结局良好组, 25(OH)D 水平明显低于结局良好组,差异具有统计学意义($P < 0.05$),见表 4。

表 3 两组血清 FABP4、25(OH)D 水平比较 $(\bar{x} \pm s)$

Table 3 Comparison of serum FABP4 and 25(OH)D levels between the two groups $(\bar{x} \pm s)$

指标	观察组 ($n=102$)	对照组 ($n=83$)	t 值	P 值
FABP4 ($\mu\text{g/L}$)	35.18±8.76	20.63±9.41	10.868	<0.001
25(OH)D (ng/mL)	40.17±10.53	47.38±8.74	4.993	<0.001

表 4 观察组两亚组患者血清 FABP4、25(OH)D 水平比较 $(\bar{x} \pm s)$

Table 4 Comparison of serum FABP4 and 25(OH)D levels between the two subgroups of the observation group $(\bar{x} \pm s)$

指标	结局不良组 ($n=22$)	结局良好组 ($n=80$)	t 值	P 值
FABP4 ($\mu\text{g/L}$)	37.15±8.86	32.63±7.41	2.427	0.017
25(OH)D (ng/mL)	37.71±9.25	42.96±8.22	2.582	0.011

2.4 血清 FABP4、25(OH)D 水平预测新生儿结局的 ROC 曲线分析

ROC 曲线分析结果显示, FABP4、25(OH)D 对新生儿妊娠结局均有一定的预测能力($P < 0.05$),见表 5、图 1。

表 5 血清 FABP4、25(OH)D 水平预测新生儿结局的 ROC 曲线分析

Table 5 ROC curve analysis of serum FABP4 and 25(OH)D levels for predicting neonatal outcomes

指标	AUC	P 值	最佳阈值	约登指数	敏感度 (%)	特异度 (%)
FABP4	0.660	0.031	35.41	0.3305	75.63	42.86
25(OH)D	0.715	0.006	39.83	0.4916	70.59	78.58

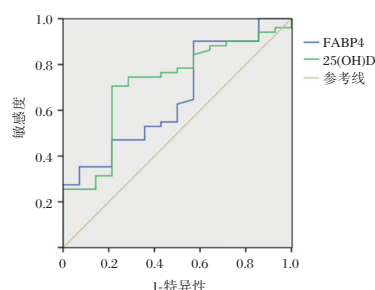


图 1 血清 FABP4、25(OH)D 水平预测新生儿结局的 ROC 曲线分析

Figure 1 ROC curve analysis of serum FABP4 and 25(OH)D levels for predicting neonatal outcomes

3 讨论

GDM 是影响妊娠期女性身体健康及新生儿不良结局的重要危险因素,早期对 GDM 进行诊断,是后续治疗 GDM 的基础。FABP4 是一种可溶性脂质结合蛋白,当机体 FABP4 水平升高后,大量短

链脂肪酸在细胞内聚集,导致蛋白激酶B磷酸化程度降低,从而影响葡萄糖氧化水平,引起IR^[8]。既往研究发现,2型糖尿病患者的血清FABP4水平与IR存在显著相关性,认为FABP4可能在机体葡萄糖稳态中起重要作用^[9]。25(OH)D是评估机体维生素D水平的常用指标,其水平缺乏与糖尿病的发生发展关系密切,通过补充维生素D可明显改善妊娠结局^[10]。本研究分析了GDM患者血清FABP4、25(OH)D水平与新生儿结局的关系,可为预防GDM患者不良新生儿结局提供参考。

研究结果显示,观察组的TC、TG、FPG和2hPG水平均高于对照组,HDL-C和HOMA-IR水平均低于对照组,且观察组的新生儿不良结局总发生率高于对照组,与既往研究结果类似^[11]。磷脂酰肌醇3激酶/蛋白激酶B(phosphatidylinositol 3 kinase/protein kinase B, PI3K/AKT)通路异常是引起IR的主要途径,妊娠会触发PI3K重新分配,使其优先与胰岛素受体结合,降低PI3K对胰岛素的反应,从而增加代偿性胰岛素的分泌,导致IR。因此,GDM患者均存在较为明显的IR和胰岛 β 细胞功能缺陷^[12]。此外,高水平的IR会降低机体TG分解能力,增加游离脂肪酸的含量,加重脂质代谢紊乱程度,形成恶性循环。而母体的血脂代谢异常会进一步影响胎儿的糖脂代谢,导致新生儿不良结局的发生^[13]。

既往研究表明,FABP4是胚胎滋养层脂质堆积的重要因素,GDM患者的胚胎滋养层脂质水平改变会增加细胞内TG水平,增加FABP4的表达^[14]。25(OH)D可调节机体钙磷代谢,其受体和依赖性钙结合蛋白存在于胰岛 β 细胞上,当25(OH)D水平异常变化时,会影响胰岛素的分泌,导致胰岛 β 细胞功能受损,加重GDM患者的IR^[15]。ROC曲线分析结果提示FABP4和25(OH)D水平与新生儿不良结局有关,对GDM患者新生儿不良结局具有一定的预测价值。因此,临床可根据GDM患者血清FABP4、25(OH)D水平的变化,及时采取针对性的治疗措施,以预防新生儿不良结局的发生。

综上所述,GDM患者血清FABP4水平较健康者显著升高,25(OH)D水平较健康者显著降低,且血清FABP4、25(OH)D水平与新生儿不良结局有关,二者对GDM患者新生儿不良结局具有一定的预测价值。由于本研究样本量较少,在选择方面可能存在偏倚,有待后续扩大样本量进行深入研究及验证。

参考文献

- [1] 杨慧丽,程玉敏. 妊娠期高血压疾病大鼠PLGF、FABP4及与胎盘脂代谢的关系 miRNA-181a[J]. 热带医学杂志, 2020, 20(12):1544-1548+1675.
- [2] 李华,殷红梅,李英. 尿酸联合糖化血红蛋白早期检测对高龄孕妇妊娠期糖尿病发病的预测[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2018, 10(6):57-62.
- [3] Shang M, Dong X, Hou L. Correlation of adipokines and markers of oxidative stress in women with gestational diabetes mellitus and their newborns[J]. J Obstet Gynaecol Res, 2018, 44(4):637-646.
- [4] Ning H, Tao H, Weng Z, et al. Plasma fatty acid-binding protein 4 (FABP4) as a novel biomarker to predict gestational diabetes mellitus[J]. Acta Diabetol, 2016, 53(6):1-8.
- [5] 尹万军,张梦笑,张英,等. 妊娠中期维生素D水平与GDM发生风险的相关性[J]. 中华妇产科杂志, 2019, 54(11):763-769.
- [6] Cosson E. Diagnostic criteria for gestational diabetes mellitus[J]. Diabetes Metab, 2010, 36(6):538-548.
- [7] Yang Y, Suh BK, Lee SS, et al. Triglycerides/glucose index is a useful surrogate marker of insulin resistance among adolescents[J]. Int J Obes (Lond), 2017, 41(5):89-792.
- [8] Li B, Yang H, Zhang W, et al. Fatty acid-binding protein 4 predicts gestational hypertension and preeclampsia in women with gestational diabetes mellitus[J]. Plos One, 2018, 13(2):e0192347.
- [9] Nakamura R, Okura T, Fujioka Y, et al. Serum fatty acid-binding protein 4 (FABP4) concentration is associated with insulin resistance in peripheral tissues, a clinical study[J]. Plos One, 2017, 12(6):e0179737.
- [10] Maddaloni E, Cavallari I, Napoli N, et al. Vitamin D and Diabetes Mellitus[J]. Front Horm Res, 2018, 50(16):161-176.
- [11] Chun SK, Shin S, Kim MY, et al. Effects of maternal genetic polymorphisms in vitamin D-binding protein and serum 25-hydroxyvitamin D concentration on infant birth weight[J]. Nutrition, 2017, 35(27):36-42.
- [12] Venditti P, Reed TT, Victor VM, et al. Insulin resistance and diabetes in hyperthyroidism: A possible role for oxygen and nitrogen reactive species[J]. Free Rad Res, 2019, 53(3):248-268.
- [13] 黄兆明,卢锦娥. 血糖水平控制正常妊娠期糖尿病孕妇的围产结局分析[J]. 中华妇产科杂志, 2018, 53(9):625-629.
- [14] Amir A, Biana S, Galia GY, et al. The association between adipocytokines and glycemic control in women with gestational diabetes mellitus[J]. J Matern Fetal Neonatal Med, 2018, 33(2):177-183.
- [15] Yoon HK. Gestational Diabetes Mellitus, Fetal Growth and Vitamin D[J]. J Bone Metabol, 2017, 24(3):155-159.

• 论 著 •

慢性牙周炎龈沟液 IL-10、IL-23、MCP-1 与牙周指数的相关性分析

颜孟雄 黄婧 杨再波*

[摘要] **目的** 分析慢性牙周炎患者龈沟液白介素-10(IL-10)、白介素-23(IL-23)、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)水平及其与牙周指数的相关性。**方法** 选取2017年5月至2020年4月本院口腔诊疗中心患者134例,依据口腔情况分为对照组($n=30$)、牙龈炎组($n=48$)、慢性牙周炎组($n=56$),记录菌斑指数(PLI)、出血指数(BI)、探诊深度(PD)、附着丧失(AL)。依据病变程度将慢性牙周炎组分为轻度病变亚组($n=30$)、中重度病变亚组($n=26$),收集龈沟液后采用酶联免疫吸附试验测定各组 IL-10、IL-23、MCP-1 水平,分析其与牙周指数相关性。**结果** 牙龈炎组、慢性牙周炎组 PLI、BI、PD、AL 均高于对照组,慢性牙周炎组 PLI、BI、PD、AL 高于牙龈炎组,差异均具有统计学意义($P<0.05$)。牙龈炎组、慢性牙周炎组龈沟液 IL-10 低于对照组,而 IL-23、MCP-1 水平高于对照组,慢性牙周炎组龈沟液 IL-10 低于牙龈炎组,而 IL-23、MCP-1 水平高于牙龈炎组,差异均具有统计学意义($P<0.05$)。慢性牙周炎患者中,轻度病变亚组患者龈沟液 IL-10 高于中重度病变亚组患者,而 PLI、BI、PD、AL、IL-23、MCP-1 水平低于中重度病变亚组患者,差异均具有统计学意义($P<0.05$)。慢性牙周炎患者龈沟液 IL-10 水平与各项牙周指数均呈负相关($P<0.05$),IL-23、MCP-1 水平与各项牙周指数呈正相关($P<0.05$)。**结论** 慢性牙周炎患者龈沟液中 IL-10 呈低表达,IL-23、MCP-1 呈高表达,且三者均与牙周指数有明显相关性。

[关键词] 慢性牙周炎; 龈沟液; IL-10; IL-23; MCP-1; 牙周指数

Correlation analysis of gingival crevicular fluid IL-10, IL-23 and MCP-1 and periodontal indexes in chronic periodontitis

YAN Mengxiong, HUANG Jing, YANG Zaibao*

(Stomatological Center of Enshi Tujia and Miao Autonomous Prefecture Central Hospital, Enshi, Hubei, China, 445000)

[ABSTRACT] **Objective** To analyze the levels of interleukin-10 (IL-10), interleukin-23 (IL-23) and monocyte chemo attractant protein-1 (MCP-1) in gingival crevicular fluid (GCF) of patients with chronic periodontitis (CP) and their correlation with periodontal indexes. **Methods** From May 2017 to April 2020, 134 patients were enrolled in the study. They were divided into the control group ($n=30$), the gingivitis group ($n=48$) and the CP group ($n=56$) according to the oral condition. The plaque index (PLI), bleeding index (BI), probing depth (PD) and attachment loss (AL) were recorded. According to the severity, patients in the CP group were divided into the mild group ($n=30$) and the moderate to severe group ($n=26$). GCF was collected to determine the levels of IL-10, IL-23 and MCP-1 by enzyme-linked immunosorbent assay. And their correlation with periodontal index was analyzed. **Results** the PLI, BI, PD and AL in the gingivitis group and the CP group were higher than those in control group, which were higher in the CP group than the gingivitis group ($P<0.05$). IL-10 in the gingivitis group and the CP group was lower than that in the control group, while levels of IL-23 and MCP-1 were higher than those in the control group. IL-10 in the CP group was lower than that in the gingivitis group, while levels of IL-23 and MCP-1 were higher than those in the gingivitis group ($P<$

基金项目:湖北省卫生计生委科研项目面上项目(WJ2017M256)

作者单位:恩施土家族苗族自治州中心医院口腔诊疗中心,湖北,恩施 445000

*通信作者:杨再波, E-mail: Yangzb73@163.com

0.05)。Among patients with CP, the mild group had higher GCF IL-10 levels but lower PLI, BI, PD, AL, IL-23 and MCP-1 levels than the moderate to severe group ($P<0.05$)。The IL-10 level was negatively correlated with periodontal indexes ($P<0.05$) , while IL-23 and MCP-1 levels were positively correlated with periodontal indexes ($P<0.05$)。 **Conclusion** The expression of IL-10 in gingival crevicular fluid of patients with chronic periodontitis is low , while IL-23 and MCP-1 are highly expressed , and the three are significantly correlated with periodontal index.

[KEY WORDS] Chronic periodontitis; Gingival crevicular fluid; IL-10; IL-23; MCP-1; Periodontal index

慢性牙周炎(chronic periodontitis, CP)为口腔科最常见的牙周类疾病,也是我国成人失牙的首要病因。慢性牙周炎不仅危害患者局部口腔健康,且致病菌经咀嚼等多种途径进入血液循环后可使机体出现炎症反应,对全身多处系统产生不良影响^[1]。牙周炎局部炎症微环境及其包含的各类炎性分子是造成牙周支持组织炎症、进行性附着丧失及骨吸收的主要原因^[2]。其中白介素-10(interleukin-10, IL-10)、白介素-23(interleukin-23, IL-23)、单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemo attractant protein-1, MCP-1)被证实与牙周炎发病有密切关系^[3]。本文主要分析慢性牙周炎患者龈沟液 IL-10、IL-23、MCP-1 水平及其与牙周指数的相关性,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 研究对象

选取2017年5月至2020年4月本院口腔诊疗中心患者134例。纳入标准:①慢性牙周炎者符合相关诊断标准^[4],牙龈炎者符合相关诊断标准^[5];②近12周内未应用抗生素、免疫治疗药物、非甾体抗炎药等;③半年内未接受过洁治、系统性牙周治疗,测定牙无龋洞。排除标准:①合并系统性炎症性疾病、肝肾损伤;②近4周内与相关感染性疾病、牙周炎病史;③近期吸烟饮酒史或正畸治疗史。依据口腔情况分为对照组($n=30$,牙周健康,无牙周治疗史或与牙周炎相关的全身性疾病、无吸烟酗酒史)、牙龈炎组($n=48$)、慢性牙周炎组($n=56$)。对照组中男14例,女16例,平均年龄(40.15 ± 4.23)岁,牙龈炎组中男25例,女23例,平均年龄(40.24 ± 4.18)岁,慢性牙周炎组中男29例,女27例,平均年龄(40.34 ± 4.16)岁,依据相关标准^[4]进行严重程度分级,本次慢性牙周炎患者分为轻度病变亚组30例,中重度病变亚组26例。3组的性别、年龄比较差异无统计学意义($P>0.05$),有可比性。本研究获得本院伦理委员会批准,入组对象均签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 牙周指数检查

对全口余留牙齿进行牙周情况检查,包括菌斑指数(plaque index, PLI)、出血指数(blood index, BI)、PD、AL,参照相关标准^[6]进行评估。

1.2.2 龈沟液标本采集

所有入选对象均选取6颗指数牙(16、11、26、36、31、46),取6颗指数牙的近中颊位点牙周指标均值代表该患者牙周情况,均无龋齿、牙髓、根尖病变或咬合创伤,不符合条件者取邻牙。佩戴无菌手套进行临床操作,小心去除待取部位的龈上菌斑、牙石,无菌干棉卷隔湿,以气枪吹干牙面10 s,将吸潮纸轻插入受试牙的近中颊位点,在遇轻微阻力时即停止,30 s后取出(如被血污染则弃除)。将取完龈沟液后的6根吸潮纸尖一同放入原EP管称重,减去原记录重量则为龈沟液重量,按1 g/mL换算成体积,记录后EP管封口置于 -80°C 冻存备用,标本采集均由同一人独立完成。

1.2.3 龈沟液 IL-10、IL-23、MCP-1 水平测定

PBS缓冲液200 μL 浸润待测龈沟液纸尖末端,离心半径10 cm,12 000 r/min速率离心5 min,取上清2 μL ,采用酶联免疫吸附试验(武汉博士德公司)检测IL-10、IL-23、MCP-1水平,将试剂盒中标准液稀释至10 $\mu\text{g/mL}$,取96孔板,每孔加入标准液0.1 mL,经 4°C 过夜,将待测样本与试剂盒一起平衡至室温;次日加入待测样品,100 μL PBS缓冲液以5 000 r/min速率离心5 min,去除滤纸条,保留上清液,在 37°C 下孵育1 h,加入双抗,经 37°C 孵育30 min,检测450 nm波长处光密度(optical density, OD)值^[7]。

1.3 观察指标

①比较对照组、牙龈炎组、慢性牙周炎组 PLI、BI、PD、AL;②比较对照组、牙龈炎组、慢性牙周炎组龈沟液中 IL-10、IL-23、MCP-1 水平;③比较不同程度慢性牙周炎患者牙周指数及龈沟液中 IL-10、IL-23、MCP-1 水平;④分析慢性牙周炎患者沟液中

IL-10、IL-23、MCP-1水平与牙周指数的相关性。

1.4 统计学方法

采用SPSS 23.0软件对数据进行统计学处理,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采取单因素方差分析,组间进一步两两比较采用LSD-*t*检验,两组间比较采用独立样本*t*检验,相关性采用Pearson相关分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3组PLI、BI、PD、AL比较

3组PLI、BI、PD、AL比较:慢性牙周炎组>牙龈炎组>对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表1。

表1 3组PLI、BI、PD、AL比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of PLI, BI, PD and AL in 3 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	PLI	BI	PD(mm)	AL(mm)
对照组	30	0.77±0.08	0.57±0.06	2.41±0.26	0
牙龈炎组	48	0.96±0.11 ^a	0.78±0.08 ^a	3.15±0.34 ^a	1.85±0.19
慢性牙周炎组	56	1.10±0.12 ^{ab}	0.98±0.12 ^{ab}	4.35±0.48 ^{ab}	3.52±0.37
<i>F</i> 值		90.921	185.132	267.529	28.229
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与牙龈炎组比较,^b $P < 0.05$ 。

2.2 3组龈沟液IL-10、IL-23、MCP-1水平比较

牙龈炎组、慢性牙周炎组龈沟液IL-10低于对照组,IL-23、MCP-1水平高于对照组,慢性牙周炎组龈沟液IL-10低于牙龈炎组,IL-23、MCP-1水平高于牙龈炎组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表2。

2.3 不同严重程度慢性牙周炎患者牙周指数及IL-10、IL-23、MCP-1水平比较

轻度病变亚组龈沟液IL-10高于中重度病变亚组,PLI、BI、PD、AL、IL-23、MCP-1水平低于中重度病变亚组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表3。

表3 不同严重程度慢性牙周炎患者牙周指数及IL-10、IL-23、MCP-1水平比较($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of periodontal index and levels of IL-10, IL-23 and MCP-1 in patients with chronic periodontitis of different severity ($\bar{x} \pm s$)

病变严重程度	<i>n</i>	PLI	BI	PD(mm)	AL(mm)	IL-10($\mu\text{g/L}$)	IL-23($\mu\text{g/L}$)	MCP-1($\text{pg}/\mu\text{L}$)
轻度病变亚组	30	0.99±0.12	0.84±0.08	3.88±0.39	2.06±0.23	645.15±65.89	10.56±1.18	58.16±5.79
中重度病变亚组	25	1.13±0.14	1.02±0.11	4.41±0.45	3.67±0.38	506.48±52.64	14.21±1.43	63.01±6.45
<i>t</i> 值		4.030	7.066	4.722	19.468	8.608	10.465	2.965
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.004

表4 慢性牙周炎患者龈沟液IL-10、IL-23、MCP-1水平与牙周指数相关性

Table 4 Correlation between the levels of IL-10, IL-23, MCP-1 in GCF and periodontal index in patients with chronic periodontitis

龈沟液指标	PLI		BI		PD(mm)		AL(mm)	
	<i>r</i> 值	<i>P</i> 值	<i>r</i> 值	<i>P</i> 值	<i>r</i> 值	<i>P</i> 值	<i>r</i> 值	<i>P</i> 值
IL-10($\mu\text{g/L}$)	-0.456	0.017	-0.653	<0.001	-0.715	<0.001	-0.668	<0.001
IL-23($\mu\text{g/L}$)	0.579	0.008	0.457	0.021	0.652	<0.001	0.812	<0.001
MCP-1($\text{pg}/\mu\text{L}$)	0.389	0.030	0.376	0.034	0.778	<0.001	0.805	<0.001

表2 3组龈沟液IL-10、IL-23、MCP-1水平比较($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of the levels of IL-10, IL-23 and MCP-1 in gingival crevicular fluid among 3 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	IL-10($\mu\text{g/L}$)	IL-23($\mu\text{g/L}$)	MCP-1($\text{pg}/\mu\text{L}$)
对照组	30	724.15±73.58	6.36±0.65	20.59±2.18
牙龈炎组	48	697.41±70.51 ^a	7.27±0.78 ^a	40.18±4.26 ^a
慢性牙周炎组	56	524.69±53.49 ^{ab}	12.44±1.35 ^{ab}	62.55±6.37 ^{ab}
<i>F</i> 值		132.054	468.221	736.530
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与牙龈炎组比较,^b $P < 0.05$ 。

2.4 慢性牙周炎患者龈沟液IL-10、IL-23、MCP-1水平与牙周指数相关性

相关分析显示,慢性牙周炎患者龈沟液IL-10水平与牙周指数各项呈负相关($P < 0.05$),IL-23、MCP-1水平均与牙周指数各项呈正相关($P < 0.05$)。见表4。

3 讨论

慢性牙周炎为常见口腔疾病^[7]。牙龈上皮细胞与免疫细胞在牙周致病菌作用下,出现炎症反应,其中IL-10、IL-23、MCP-1与慢性牙周炎发展的关系受到了关注。IL-23可起到前炎性因子作用,发挥促炎作用并影响机体免疫反应;IL-10与高加索人和亚洲人的牙周炎易感性有关^[8];MCP-1作为一种单核细胞与巨噬细胞特异性炎症趋化因子也被发现与炎症疾病相关^[9]。因此IL-10、IL-23、MCP-1可能与慢性牙周炎的发展有密切关系,明确其相关性有重要意义。

本研究发现牙龈炎组、慢性牙周炎组IL-10低于对照组,这与国外Bi等^[10]的报道结果一致,表明IL-10可在一定程度上对慢性牙周炎患者起到保护作用。IL-10可抑制黏附因子表达,使促有丝分裂

物质作用减少,降低机体内生长因子、炎性因子水平。Th17细胞可放大炎症反应,而IL-23为Th17细胞产生作用的关键因子^[11]。本次实验结果这与国外Sadeghi等^[12]的报道结果相似。当牙龈炎发生炎症时活化的中性粒细胞、单核巨噬细胞及树突状细胞可产生大量IL-23,从而发挥前炎症因子作用,加重牙周组织的炎症程度。早期Boström等^[13]报道,牙周炎患者血清及炎症牙龈结缔组织MCP-1水平高于健康牙龈组织,MCP-1与牙周炎有明显相关性,本研究结论与之一致。MCP-1过表达可趋化大量单核巨噬细胞游走于牙周组织的龈沟液中,分泌黏附分子等炎性介质,形成局部炎症微环境,导致牙周软组织炎症破坏^[14]。

相关性分析结果表明,IL-10、IL-23、MCP-1与慢性牙周炎患者牙周指数有一定关系。IL-10是最重要的炎症抑制因子,IL-10水平异常时可导致机体免疫功能紊乱及病理损伤,因此其与牙周指数有一定关联^[15]。IL-23水平和自身免疫病及炎症反应密切相关^[16],因此IL-23与牙周指数也有密切关联,可反映牙周组织损伤程度。MCP-1则可趋化大量单核巨噬细胞,其可经自分泌方式产生大量MCP-1蛋白,加重炎症微环境,此外龈沟液中MCP-1高表达也可进一步趋化碱性粒细胞至反应区域,引起牙槽骨吸收,加重牙周组织破坏,因此MCP-1与牙周指数也存在关联。本研究也有一定不足之处,所取龈沟液样本量有限,未进行重复检测,由于酶联免疫吸附试验变异系数(Coefficient of Variation, CV)较大,可能导致本次结果有局限性,此外每组样本例数较少,得出的研究结论有片面性。后期将扩大样本量,对慢性牙周炎患者龈沟液重复采集龈沟液样本进行检测,以进一步验证本次结论。

综上所述,慢性牙周炎患者龈沟液中IL-10呈低表达,而IL-23、MCP-1水平升高,且三者均与牙周指数(PLI、BI、PD、ALI)有密切关系,临床可加以监测。

参考文献

- [1] 刘园, 栾庆先. 北京石景山社区中老年人群慢性牙周炎和颈动脉内膜中层厚度的相关性[J]. 北京大学学报(医学版), 2018, 50(2):264-270.
- [2] Heidari Z, Moudi B, Mahmoudzadeh-Sagheb H. Immunomodulatory factors gene polymorphisms in chronic periodontitis: an overview[J]. BMC Oral Health, 2019, 19(1):29.
- [3] 朱靖, 刘桂荣, 吕晔, 等. 牙周炎伴糖尿病病人龈沟液中炎症因子MCP-1、TNF- α 、IL-6的水平及其临床意义[J]. 精准医学杂志, 2019, 34(1):67-70.
- [4] Holtfreter B, Albandar JM, Dietrich T, et al. Standards for reporting chronic periodontitis prevalence and severity in epidemiologic studies: Proposed standards from the Joint EU/USA Periodontal Epidemiology Working Group [J]. J Clin Periodontol, 2015, 42(5):407-412.
- [5] Syndergaard B, Al-Sabbagh M, Kryscio RJ, et al. Salivary biomarkers associated with gingivitis and response to therapy [J]. J Periodontol, 2014, 85(8):e295-303.
- [6] Bueno AC, Ferreira RC, Cota LO, et al. Comparison of different criteria for periodontitis case definition in head and neck cancer individuals [J]. Support Care Cancer, 2015, 23(9):2599-2604.
- [7] 赵华兵. 慢性牙周炎不同临床阶段龈沟液及血清中Th17和Treg的相关细胞因子的检测[D]. 河北:河北医科大学, 2016.
- [8] Wang Z, Li Y, Zhou Y, et al. Association between the IL-10 rs1800872 polymorphisms and periodontitis susceptibility: A meta-analysis [J]. Medicine (Baltimore), 2019, 98(40):e17113.
- [9] Pepelassi E, Xynogala I, Perrea D, et al. The effect of experimental periodontitis, experimental diabetes and their combination on the serum levels of adiponectin, leptin, IL-6, IL-18, MCP-1, RANTES and sICAM-1 in rats [J]. J Int Acad Periodontol, 2020, 22(1):1-10.
- [10] Bi CS, Sun LJ, Qu HL, et al. The relationship between T-helper cell polarization and the RANKL/OPG ratio in gingival tissues from chronic periodontitis patients [J]. Clin Exp Dent Res, 2019, 5(4):377-388.
- [11] Miranda TS, Heluy SL, Cruz DF, et al. The ratios of pro-inflammatory to anti-inflammatory cytokines in the serum of chronic periodontitis patients with and without type 2 diabetes and/or smoking habit [J]. Clin Oral Investig, 2019, 23(2):641-650.
- [12] Sadeghi R, Sattari M, Dehghan F, et al. Interleukin-17 and interleukin-23 levels in gingival crevicular fluid of patients with chronic and aggressive periodontitis [J]. Cent Eur J Immunol, 2018, 43(1):76-80.
- [13] Boström EA, Kindstedt E, Sulniute R, et al. Increased eotaxin and mcp-1 levels in serum from individuals with periodontitis and in human gingival fibroblasts exposed to pro-inflammatory cytokines [J]. Plos One, 2015, 10(8):e0134608.
- [14] Chang CW, Lin HH, Wu SY, et al. Association between monocyte chemoattractant protein-1 -2518 A/G gene polymorphism and the outcome of the nonsurgical periodontal treatment [J]. J Formos Med Assoc, 2018, 117(3):191-196.
- [15] Al-Hamoudi N, Alsahhaf A, Al-Deeb M, et al. Effect of scaling and root planing on the expression of anti-inflammatory cytokines (IL-4, IL-9, IL-10, and IL-13) in the gingival crevicular fluid of electronic cigarette users and non-smokers with moderate chronic periodontitis [J]. J Periodontal Implant Sci, 2020, 50(2):74-82.
- [16] 张韶斌, 陈斯亮, 符青松, 等. 25-羟维生素D3与IL-10在系统性红斑狼疮中的临床应用研究[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2018, 10(3):180-183+195.

· 论 著 ·

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

张明光¹ 徐海军^{1*} 施联善² 张辉³

[摘要] **目的** 探讨基于 Logistic 回归模型构建联合检测因子对非小细胞肺癌表皮生长因子受体(EGFR)突变状态的预测价值。**方法** 选取本院 2019 年 3 月至 2020 年 9 月收治的晚期非小细胞肺癌患者 102 例,根据 EGFR 突变状态分为野生型组($n=71$)和突变型组($n=31$)。收集两组一般临床资料,采用 Logistic 回归构建非小细胞肺癌患者 EGFR 突变状态的联合检测因子模型,并绘制受试者工作特征曲线(ROC)。**结果** 突变型组女性、无吸烟史、周围型肺癌、有原发灶毛刺、有肺内转移、有骨转移、有胸膜凹陷征、血清 CEA $\geq 8.05 \mu\text{g/L}$ 、CYFRA21-1 $< 2.72 \mu\text{g/L}$ 占比高于野生型组,差异有统计学意义($P<0.05$);经 Logistic 回归分析发现,部位($OR=1.322$, 95% CI : 1.220~11.531)、胸膜凹陷征($OR=2.162$, 95% CI : 1.906~39.608)、CYFRA21-1($OR=0.891$, 95% CI : 1.015~5.854)是影响非小细胞肺癌患者 EGFR 突变状态的独立危险因素;得出联合检测因子模型表达式为: $\text{Logit}(P) = -4.551 + 1.322X_1 + 2.162X_2 + 0.891X_3$;联合检测因子模型最佳临界值为 0.422,灵敏度为 81.25%,特异度为 92.86%,曲线下面积为 0.847 (0.689~0.999)。**结论** 基于 Logistic 回归模型构建联合检测因子能较好的预测非小细胞肺癌患者 EGFR 突变状态。

[关键词] 非小细胞肺癌;表皮生长因子受体;突变状态;Logistic 回归模型

Predictive value of combined detection factors based on logistic regression model for non-small cell lung cancer EGFR mutation status

ZHANG Mingguang¹, XU Haijun^{1*}, SHI Lianshan², ZHANG Hui³

(1. Department of Oncology, Bozhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Bozhou, Anhui, China, 236800; 2. Department of Oncology, Bozhou People's Hospital, Bozhou, Anhui, China, 236800; 3. Department of Pathology, General Hospital of Wanbei Coal power Group, Suzhou, Anhui, China, 234000)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the predictive value of combined detection factors based on logistic regression model for EGFR mutation in non-small cell lung cancer. **Methods** 102 patients with advanced non-small cell lung cancer admitted to our hospital from March 2019 to September 2020. They were divided into the wild type group ($n=71$) and the mutant group ($n=31$) according to mutation state of EGFR. General clinical data of the two groups were collected. Logistic regression was used to construct a combined detection factor model of neurological sequelae in patients with advanced non-small cell lung cancer. Draw the working characteristic curve (ROC) of subjects and judge the prediction efficiency of the model. **Results** The proportion of female in the mutation group, no smoking history, peripheral lung cancer, primary burr, intrapulmonary metastasis, bone metastasis, pleural depression, CEA $\geq 8.05 \mu\text{g/L}$, CYFRA21-1 $< 2.72 \mu\text{g/L}$ was higher than that in the wild type group, the difference was statistically significant ($P<0.05$). Logistic regression analysis showed that location ($OR=1.322$, 95% CI : 1.220~11.531), pleural indentation ($OR=2.162$, 95% CI : 1.906~39.608), CYFRA21-1 ($OR=0.891$, 95% CI : 1.015~5.854) were independent risk factors for

基金项目: 中华国际医学交流基金会(Z-2014-06-18388)

作者单位: 1. 亳州市中医院 肿瘤科, 安徽, 亳州 236800

2. 亳州市人民医院 肿瘤内科, 安徽, 亳州 236800

3. 皖北煤电集团总医院 病理科, 安徽, 宿州 234000

*通信作者: 徐海军, E-mail: xuhaijun0618@163.com

EGFR mutation in NSCLC patients. The expression of joint detection factor model was: $\text{Logit}(P) = -4.551 + 1.322X_1 + 2.162X_2 + 0.891X_3$. The best critical value of the combined detection factor model was 0.422, the sensitivity was 81.25 %, the specificity was 92.86 %, and the area under the curve was 0.847 (0.689~0.999).

Conclusion The combined detection factors based on logistic regression model can better predict the EGFR mutation in NSCLC patients.

[KEY WORDS] Non small cell lung cancer; Epidermal growth factor receptor; Mutation state; Logistic regression model

肺癌的发病率及病死率从20世纪70年代明显增加,已成为我国发病率升幅最大的恶性肿瘤之一^[1]。非小细胞肺癌是临床常见的肺癌类型。现有研究证实,表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂(Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors, EGFR-TKI)对非小细胞肺癌EGFR敏感者具有良好疗效^[2-3],但因EGFR基因突变比例较低、组织活检要求高等,使其检测率偏低,限制了EGFR-TKI的临床应用。目前,血清癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA)、细胞角蛋白19片段(CYFRA21-1)、神经特异性烯醇化酶等在非小细胞肺癌诊断及鉴别诊断中具有良好效能^[4-5],但各指标均有自身的优势和局限性,且单一指标较难兼顾灵敏度和特异度。因此,本研究以晚期非小细胞肺癌患者为研究对象,借鉴国外对Logistic回归模型的延伸,建立联合检测因子模型,并探讨该模型对非小细胞肺癌EGFR突变状态的预测价值。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取本院2019年3月至2020年9月收治的102例晚期非小细胞肺癌患者作为研究对象,其中男性68例,女性34例;年龄55~78岁,平均年龄(62.77±3.52)岁;吸烟史65例,饮酒史42例;高血压53例,糖尿病38例,高血脂31例。根据患者EGFR突变状态,将71例野生型患者作为野生型组($n=71$),31例EGFR发生19Del、21L858R等突变状态的患者作为突变型组($n=31$)。本研究通过本院伦理委员会批准,所有患者及其家属均知情同意。

纳入标准:①经本院或本院合作的合肥安为康医学检验公司病理或细胞学诊断为非小细胞肺癌;②具有完整的临床病例资料,并进行EGFR突变分析;③生存期超过3个月;④临床分期为ⅢB~Ⅳ期;⑤入组前未接受化疗及抗肿瘤药物治疗;⑥有客观性、可评价的病灶;⑦配合治疗者。排除标准:①无病理或细胞学明确诊断证据;②早期非

小细胞肺癌;③Karnofsky评分<60分;④入组前接受化疗或服用抗肿瘤药物;⑤肠道肿瘤病史;⑥无客观可评价病灶;⑦严重心脑血管疾病患者;⑧免疫缺陷;⑨治疗过程中病情加重转院者,依从性差者等。

1.2 方法

收集患者年龄、性别、吸烟史、TNM分期、部位、原发灶毛刺、肺内转移、骨转移、血清CEA、CYFRA21-1、肿瘤最大直径等情况。所有患者均于入院后空腹采血5 mL,离心得血清,采用电化学免疫发光法测定血清CEA及CYFRA21-1水平,试剂盒由德国罗氏公司提供。通过PCR法检测患者组织标本中的EGFR突变状态,组织标本不足者另取患者血浆标本5 mL请确认样本血浆量,一般需要3~5 mL患者血浆进行DNA提取,采用专用的EGFR提取试剂提取,提取后加入EGFR的18-21外显子突变区域引物及扩增试剂,扩增DNA靶片段,采用荧光检测方法检测EGFR基因第18-21外显子的突变情况,操作由本院合作的合肥安为康医学检验公司病理科技师严格按照说明书进行。

1.3 统计学方法

采用SPSS 21.0软件系统进行数据处理分析。计量资料用($\bar{x} \pm s$)表示,采用 t 检验,计数资料采用 $n(\%)$ 表示,采用 χ^2 检验,采用Logistic回归构建非小细胞肺癌EGFR突变状态的联合检测因子模型,并绘制该模型的受试者工作特征曲线(Receiver operating characteristic, ROC),计算曲线下面积; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组基本资料单因素分析

突变型组女性、无吸烟史、周围型肺癌、有原发灶毛刺、有肺内转移、有骨转移、有胸膜凹陷征、血清CEA $\geq 8.05 \mu\text{g/L}$ 、CYFRA21-1 $< 2.72 \mu\text{g/L}$ 占比高于野生型组,比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表1。

表1 两组基本资料单因素分析 [n(%)]

Table 1 Univariate analysis of 2 groups of basic data [n(%)]

项目	野生型组 (n=71)	突变型组 (n=31)	χ^2 值	P值
年龄(岁)				
≥65	32(45.07)	15(48.39)	0.096	0.757
<65	39(54.93)	16(51.61)		
性别			9.269	0.002
男	54(76.06)	14(45.16)		
女	17(23.94)	17(54.84)		
吸烟史			19.077	0.000
有	55(77.46)	10(32.26)		
无	16(22.54)	21(67.74)		
TNM分期			3.438	0.064
ⅢB	27(38.03)	6(19.35)		
Ⅳ	44(61.97)	25(80.65)		
部位			5.453	0.020
中央型	36(50.70)	8(25.81)		
周围型	35(49.30)	23(74.19)		
分叶			0.060	0.806
是	51(71.83)	23(74.19)		
否	20(28.17)	8(25.81)		
原发灶毛刺			4.356	0.037
是	54(76.06)	29(93.55)		
否	17(23.94)	2(6.45)		
肺内转移			6.782	0.009
是	26(36.62)	20(64.52)		
否	45(63.38)	11(35.48)		
骨转移			5.891	0.015
是	21(29.58)	17(54.84)		
否	50(70.42)	14(45.16)		
胸膜凹陷征			6.534	0.011
是	41(57.75)	26(83.87)		
否	30(42.25)	5(16.13)		
血清CEA(μg/L)			38.772	0.000
≥8.05	15(21.13)	27(87.10)		
<8.05	56(78.87)	4(12.90)		
CYFRA21-1(μg/L)			5.321	0.021
≥2.72	55(77.46)	17(54.84)		
<2.72	16(22.54)	14(45.16)		
肿瘤最大直径(cm)			3.438	0.064
≥5.05	27(38.03)	6(19.35)		
<5.05	44(61.97)	25(80.65)		

2.2 多因素 Logistic 回归分析及联合检测因子方程的构建

经 Logistic 回归分析发现,部位、胸膜凹陷征、CYFRA21-1 是影响非小细胞肺癌患者 EGFR 突变状态的独立危险因素。将部位、胸膜凹陷征、CYFRA21-1 分别作为协变量 X_1 、 X_2 、 X_3 , 得出联合检测因子模型表达式为: $\text{Logit}(P) = -4.551 + 1.322X_1 + 2.162X_2 + 0.891X_3$ 。见表2、表3。

2.3 联合检测因子方程 ROC 曲线

ROC 曲线得出:联合检测灵敏度(81.25%),特异度(92.86%),曲线下面积最大0.847。见表4、图1。

2.4 个体预测

对联合检测因子模型进行变形可得到个体预测概率方程,即 $P=1/[1+e^{-(-4.551+1.322X_1+2.162X_2+0.891X_3)}]$ 。随机将1名患者数据代入,该患者各协变量分别为 $X_1=1$ 、 $X_2=1$ 、 $X_3=0$,得到 $P=0.256$,小于联合检测因子

表2 多因素赋值表

Table 2 Multi factor assignment table

因素	赋值
性别	男=0,女=1
吸烟史	有=0,无=1
部位	中央型=0,周围型=1
原发灶毛刺	否=0,是=1
肺内转移	否=0,是=1
骨转移	否=0,是=1
胸膜凹陷征	否=0,是=1
血清CEA	<8.05 μg/L=0, ≥8.05 μg/L=1
CYFRA21-1	<2.72 μg/L=0, ≥2.72 μg/L=1

表3 多因素 Logistic 回归分析

Table 3 Results of multivariate logistic regression analysis

因素	β	S.E	Wald/ χ^2 值	OR值	95%CI	P值
常数项	-4.551	2.067	7.152	-	-	0.000
性别	1.065	0.622	2.932	2.901	0.857~9.817	0.087
吸烟史	0.773	0.467	2.740	2.166	0.867~5.410	0.098
部位	1.322	0.573	5.323	3.751	1.220~11.531	0.021
原发灶毛刺	0.652	0.357	3.335	1.919	0.953~3.864	0.068
肺内转移	0.572	0.331	2.986	1.772	0.926~3.390	0.084
骨转移	0.833	0.521	2.556	2.300	0.828~6.386	0.110
胸膜凹陷征	2.162	0.774	7.802	8.688	1.906~39.608	0.005
血清CEA	0.475	0.264	3.237	1.608	0.958~2.698	0.072
CYFRA21-1	0.891	0.447	3.973	2.438	1.015~5.854	0.046

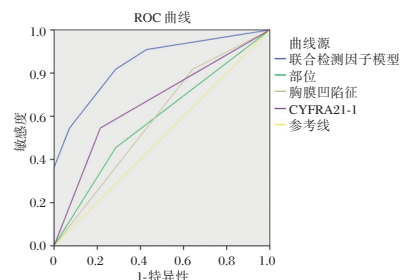


图1 联合检测因子模型的ROC曲线图

Figure 1 ROC curve of joint detection factor model

模型的最佳临界值0.422,表明该患者在联合检测因子模型准确度为89.22%的条件下,该患者不发生EGFR突变。

3 讨论

肺癌是临床常见的肺部癌症之一,由于发病临床表现轻微且不典型,大多数患者确诊往往处于肺癌晚期,导致肺癌致死率在我国恶性疾病中位居第一^[6]。EGFR属于酪氨酸激酶ErbB家族受体,大

表4 联合检测因子模型的ROC曲线

Table 4 ROC curve of joint detection factor model

项目	最佳临界值	灵敏度(%)	特异度(%)	准确率(%)	曲线下面积	95%CI	P值
联合检测因子	0.422	81.25	92.86	89.22	0.847	0.689~0.999	0.003
部位	1	49.13	76.79	59.80	0.605	0.354~0.815	0.180
胸膜凹陷征	1	52.00	78.57	67.61	0.613	0.361~0.810	0.163
CYFRA21-1	0	69.84	80.30	69.61	0.707	0.444~0.887	0.042

量分布于人类等哺乳动物的上皮细胞、成纤维细胞等表面,其发生基因突变和相关信号转导参与了肺癌的侵袭和转移过程,与患者预后密切相关^[7]。研究表明,EGFR 基因突变可优化临床治疗方案,提高 EGFR-TKI 治疗效果,但因其检测技术要求高、肺癌组织小样本假阴性高等因素导致其检测率较低^[8]。近年来,EGFR 基因突变状况引入了血清学、细胞学等相关的新指标,均具有较高的诊断价值,但单一指标难以兼顾灵敏度和特异度,且得出的结果并不一致。本研究借鉴心血管疾病、危重症疾病等联合检测方法,构建 Logistic 回归联合检测因子模型,发挥各指标优势,同时对其贡献度进行统计学量化,更为客观的反映疾病变化情况。

本研究中,突变型组的周围型、有胸膜凹陷征的患者占比高于野生型组。提示,EGFR 突变更易发生在周围型肺癌和有胸膜凹陷征的患者之中。目前,关于非小细胞肺癌 EGFR 突变状态与患者 CT 特征之间的关系尚不明确。临床上,肺腺癌多为周围型,常出现腺泡正、毛刺、分叶等影像学特征,且易发生双肺转移和骨转移,而肺鳞癌多为中央型,常伴有肺不张、阻塞性肺炎等临床表现,但是否肺腺癌患者更易发生 EGFR 突变仍需多中心、大样本进一步研究^[9-10]。本研究结果提示,血清 CYFRA21-1 表达水平较低的非小细胞肺癌患者的 EGFR 更易发生突变。相关研究表明,血清 CYFRA21-1 高表达与非小细胞肺癌患者实施 EGFR-TKI 治疗后无疾病进展生存期密切相关^[11]。另有研究表明,肺鳞癌患者 CYFRA21-1 表达水平高于肺腺癌,且其 EGFR 突变阳性实施 EGFR-TKI 治疗效果低于肺腺癌 EGFR 突变阳性患者^[12]。

本研究针对 Logistic 回归分析得出的独立危险因素,量化各因素的贡献度,最终得出联合检测灵敏度和特异度均高于各协变量单一检测结果。表明,构建的联合检测因子模型能较好的预测非小细胞肺癌患者 EGFR 突变状态。采用 Logistic 回归构建联合检测因子模型具有以下优势:①Logistic 回归模型对各协变量的混杂因素进行校正,量化各协变量的贡献度,提高该模型的预测效能。②本研究中的变量多为二分类变量,而二分类变量形成 ROC 曲线多为一条折线,工作效能较差,采用 Logistic 进行校正,拟合多个联合检测因子,可提高 ROC 曲线的光滑度^[13]。③模型 Logit(P)可通过变形公式得到个体预测概率方程,对于具体的病例,可根据患者各

协变量情况,带入个体预测概率方程得出概率 P ,与联合检测因子模型的最佳临界值进行对比,进而判断非小细胞肺癌患者发生 EGFR 突变的可能性^[14]。这种判断方法基于量化的历史临床数据,更符合循证医学思维,可弥补临床医师在诊断和评估非小细胞肺癌患者 EGFR 突变状态方法的不足。

综上所述,基于 Logistic 回归模型构建联合检测因子能较好的预测非小细胞肺癌患者 EGFR 突变状态。

参考文献

- [1] 李媛秋. 肺癌发病和死亡流行情况与人类发展指数的关系分析[J]. 中国肿瘤, 2019, 28(9):646-650.
- [2] 龙利丽, 梁艳玲, 张兴梅, 等. 非小细胞肺癌的 EGFR-TKI 治疗[J]. 国际肿瘤学杂志, 2019, 46(2):105-108.
- [3] 彭敏, 翁一鸣, 湛亮, 等. EGFR-TKI 联合化疗对比单用 EGFR-TKI 治疗 EGFR 突变的晚期非小细胞肺癌疗效与安全性 Meta 分析[J]. 中国肿瘤, 2018, 27(11):874-880.
- [4] 李玉杰, 于海莲. 血清促胃泌素释放肽、癌胚抗原、鳞状细胞癌抗原水平对于肺癌的预测价值研究[J]. 国际呼吸杂志, 2018, 38(24):1873-1877.
- [5] 吴琼, 马海洋, 王雪臣, 等. 血清肿瘤标志物在非小细胞肺癌骨转移中的诊断价值[J]. 国际肿瘤学杂志, 2018, 45(6):337-340.
- [6] 秦康. 非小细胞肺癌 EGFR 突变类型与 TKIs 疗效关系的研究进展[J]. 中国肿瘤, 2018, 27(10):779-789.
- [7] 柳菁菁, 李双, 李慧, 等. EGFR-TKI 联合化疗对比 EGFR-TKI 单药一线治疗 EGFR 敏感突变晚期非小细胞肺癌患者疗效的 Meta 分析[J]. 肿瘤, 2018, 38(4):362-370.
- [8] 张露, 刘相良, 陈晓. EGFR 突变型非小细胞肺癌脑转移的靶向治疗和免疫治疗进展[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2019, 26(9):1035-1041.
- [9] 王炜华, 孙希文, 袁明远, 等. 高端高分辨薄层 CT 在早期肺腺癌诊断筛查中的应用[J]. 检验医学与临床, 2019, 16(7):865-869, 873.
- [10] 涂文婷, 范丽, 刘士远, 等. 肺癌放射组学研究进展[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2018, 25(8):604-608.
- [11] 王群慧, 郑华, 胡范彬, 等. 伴有 EGFR 突变的非小细胞肺癌血清 CYFRA21-1 和 CEA 水平与 EGFR-TKIs 的疗效关系[J]. 中国肺癌杂志, 2016, 19(8):550-558.
- [12] 石海蓉, 张影, 陆颖, 等. 血清肿瘤标志物在肺癌骨转移诊断中的价值[J]. 中华核医学与分子影像杂志, 2018, 38(5):331-335.
- [13] 陈卫中, 潘晓平, 倪宗瓚. logistic 回归模型在 ROC 分析中的应用[J]. 中国卫生统计, 2007, 24(1):22-24.
- [14] Giovanni, Tripepi, Kitty, et al. How to deal with continuous and dichotomic outcomes in epidemiological research: linear and logistic regression analyses [J]. Nephron Clin Practice, 2011, 118(4):399-406.

· 论 著 ·

MMP-2、PCNA 及 Syndecan-1 与口腔黏膜鳞状细胞癌进展的关系研究

郑朝辉^{1*} 刘春丽¹ 曹瑞¹ 郝立辉²

【摘要】目的 探讨基质金属蛋白酶2(MMP-2)、增殖细胞核抗原(PCNA)及蛋白聚糖-1(Syndecan-1)在口腔黏膜鳞状细胞癌中的表达及其与疾病进展的关系。**方法** 收集2015年2月至2018年2月本院收治的62例口腔黏膜鳞状细胞癌患者标本设为观察组,选取上述患者癌旁正常组织设为对照组,对比MMP-2、PCNA及Syndecan-1在不同组织中的表达情况,分析三者与病理特征的关系并探讨三者不同表达对患者预后2年生存情况的预测价值。**结果** 观察组MMP-2、PCNA阳性表达率显著高于对照组,Syndecan-1阳性表达率显著低于对照组,差异均具有统计学意义($P<0.05$)。MMP-2、PCNA及Syndecan-1与淋巴结转移(有)、肿瘤直径(≥ 3 cm)、组织分化程度(低-中分化)、TNM分期(Ⅲ~Ⅳ期)有关($P<0.05$)。本研究纳入的62例口腔黏膜鳞状细胞癌患者2年生存率为40.32%(25/62),MMP-2阳性、PCNA阳性及Syndecan-1阴性的患者死亡率更高($P<0.05$)。MMP-2、PCNA、Syndecan-1及三者联合ROC曲线下面积分别为0.811、0.730、0.814、0.917,各指标曲线下面积以三者联合检测最大。**结论** MMP-2及PCNA表达阳性、Syndecan-1表达阴性的口腔黏膜鳞状细胞癌患者死亡率更高,可联合三者检测水平了解疾病进展情况,评估预后。

【关键词】 MMP-2; PCNA; Syndecan-1; 口腔黏膜鳞状细胞癌

Study on the relationship between MMP-2, PCNA, Syndecan-1 and the progression of oral squamous cell carcinoma

ZHENG Chaohui^{1*}, LIU Chunli¹, CAO Rui¹, HAO Lihui²

(1. Department of Stomatology, Second Affiliated Hospital of Xingtai Medical College, Xingtai, Hebei, China, 054000; 2. Department of Stomatology, Hebei Xingtai Medical College, Xingtai, Hebei, China, 054000)

【ABSTRACT】 Objective To investigate the expression of matrix metalloprotein-2 (MMP-2), proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and proteoglycan-1 (Syndecan-1) in oral mucosal squamous cell carcinoma and its relationship with disease progression. **Method** The clinical data of 62 patients with oral mucosal squamous cell carcinoma admitted to our hospital from February 2015 to February 2018 were selected. 62 specimens of oral mucosal squamous cell carcinoma were set as the observation group, and the normal tissues adjacent to the cancer were selected as the control group. The expressions of MMP-2, PCNA and Syndecan-1 in different tissues were measured and compared. The relationship between the them and the pathological characteristics was analyzed, and the predictive value of the three expressions for the patient's 2-year survival status was explored. **Results** ① The positive expression rate of MMP-2 and PCNA in the observation group was significantly higher than that in the control group, and the positive expression rate of Syndecan-1 was significantly lower than that in the control group, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). ② MMP-2, PCNA and Syndecan-1 are related to lymph node metastasis (yes), tumor diameter (≥ 3 cm), degree of tissue differentiation (low-medium differentiation), and TNM staging (stage Ⅲ~Ⅳ) ($P<0.05$). ③ The 2-

基金项目:邢台市科技计划项目(2020ZC166)

作者单位:1. 邢台医专第二附属医院口腔科,河北,邢台 054000

2. 河北邢台医学高等专科学校口腔系,湖北,邢台 054000

*通信作者:郑朝辉, E-mail: faxiaolian6215@163.com

year survival rate of 62 patients with oral mucosal squamous cell carcinoma included in this study was 40.32% (25/62). The mortality of patients with positive MMP-2, PCNA, and negative Syndecan-1 expression was higher ($P<0.05$). ④ The area under the ROC curve of MMP-2, PCNA, Syndecan-1 and the combined indicators were 0.811, 0.730, 0.814, 0.917, respectively. The area under the combined detection curve was the highest.

Conclusion Patients with oral mucosal squamous cell carcinoma with positive expression of MMP-2 and PCNA and negative expression of Syndecan-1 have a higher mortality rate. The detection level of the three indicators can be combined to understand the disease progression and evaluate the prognosis.

[KEY WORDS] MMP-2; PCNA; Syndecan-1; Oral mucosal squamous cell carcinoma

口腔黏膜鳞状细胞癌临床发病率较高,且呈逐年上升趋势,因该病具有转移率高、复发率高、生存率低等特点,严重威胁患者的生命健康^[1]。有学者研究指出,寻找新的生物标志物对提高口腔黏膜鳞状细胞癌的诊断率具有重要意义^[2]。基质金属蛋白酶2(Matrix metalloprotein-2, MMP-2)是一种依赖性蛋白酶,以酶素原形式合成分泌;蛋白聚糖-1(Syndecan-1)为跨膜硫酸乙酰肝素蛋白聚糖家族的成员,参与细胞增殖、迁移等过程^[3]。既往学者研究指出,二者与鳞状细胞癌的发生及发展密切相关^[4]。增殖细胞核抗原(Proliferating Cell Nuclear Antigen, PCNA)对细胞增殖起决定性作用,且关于其与肿瘤的关系国内外已有较多报道,但其与口腔黏膜鳞状细胞癌中的关系报道较少^[5]。为给临床诊治口腔黏膜鳞状细胞癌提高新思路,本研究采用免疫组化染色法检测口腔黏膜鳞状细胞癌患者中MMP-2、PCNA及Syndecan-1水平,并分析其及其疾病进展的关系。现报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

2015年2月至2018年2月本院收治的62例患者口腔黏膜鳞状细胞癌标本,为观察组。其中男38例,女24例;年龄平均(55.65 ± 3.45)岁;根据TNM分期,可分为I期11例,II期19例,III期22例,IV期10例;组织学分化程度:高分化36例,中分化22例,低分化4例。同时选取上述患者的癌旁正常组织设为对照组。本研究通过医院伦理委员会批准通过,研究对象签署知情同意书。纳入标准:①所有患者均经手术或穿刺活检结合影像学检查(显微镜下可见增生的上皮突破基膜向深层浸润形成不规则条索形癌巢),证实为鳞状细胞癌^[6];②影像资料、临床资料完整;③纳入研究前未进行过放、化疗治疗。排除标准:①合并其他恶性肿瘤及重要器官严重疾病者;②因精神障碍无法配合治疗者。

1.2 方法

1.2.1 试剂

兔抗人多克隆抗体MMP-2、鼠抗人单克隆抗体PCNA及Syndecan-1均由北京博奥森生物公司提供,DAB显色剂由北京中杉金桥生物技术公司提供,抗体免疫组织化学试剂盒由上海嵎崧达实业有限公司提供。

1.2.2 指标检测方法

免疫组化法:标本经常规石蜡切片、脱水,加入酒精、自来水冲洗、显色、复染、脱水中性树胶封固。在显微镜下观察在显微镜下观察MMP-2、PCNA、Syndecan-1。检测过程严格按照试剂盒说明进行,检测完成后由2位高年资医师采用双盲法阅片。

1.3 判断标准

MMP-2、PCNA及Syndecan-1阳性判断标准^[7]:肿瘤细胞胞质或细胞核中出现棕黄色或棕褐色颗粒。

1.4 随访

本研究为期2年,随访方式:来院复查及电话随访,从患者术后开始,直至患者死亡或本研究的随访结束(截止时间:2020年2月)。随访时间分布在3~24个月,平均随访时间(19.98 ± 2.64)个月。

1.5 统计学方法

采用SPSS 22.0软件进行统计分析,计量资料采用($\bar{x}\pm s$)描述,采用 t 检验;计数资料通过 $n(\%)$ 表示,采用 χ^2 检验;绘制ROC曲线,并计算曲线下面积以评估(MMP-2、PCNA及Syndecan-1)对口腔黏膜鳞状细胞癌患者2年生存的预测价值;以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组MMP-2、PCNA及Syndecan-1水平比较

观察组MMP-2、PCNA阳性表达率显著高于对照组,Syndecan-1阳性表达率显著低于对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表1、图1。

2.2 MMP-2、PCNA 及 Syndecan-1 与口腔黏膜鳞状细胞癌患者病理特征的关系

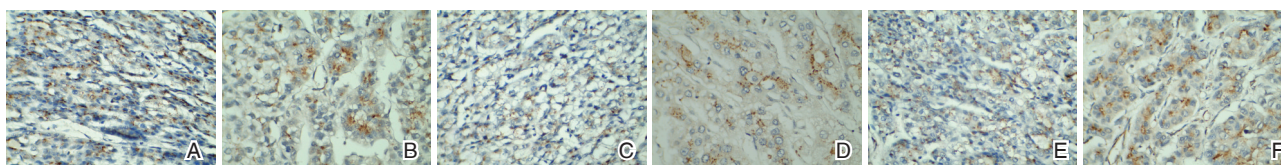
MMP-2、PCNA 及 Syndecan-1 与淋巴结转

移(有)、肿瘤直径(≥ 3 cm)、组织分化程度(低-中分化),TNM分期(Ⅲ~Ⅳ期)有关($P < 0.05$)。见表2。

表1 两组MMP-2、PCNA及Syndecan-1水平比较[n(%)]

Table 1 Comparison of MMP-2, PCNA and syndecan-1 levels between 2 groups [n(%)]

组别	n	MMP-2		PCNA		Syndecan-1	
		阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性
观察组	62	44(70.97)	18(29.03)	40(64.52)	22(35.48)	32(51.61)	30(48.39)
对照组	62	10(16.13)	52(83.87)	16(25.81)	46(74.19)	62(100.00)	0(0.00)
χ^2 值		37.922		18.756		39.574	
P值		<0.001		<0.001		<0.001	



注: A、B 为 MMP-2 阴、阳性表达; C、D 为 PCNA 阴、阳性表达; E、F 为 Syndecan-1 阴、阳性表达。

图1 免疫组化染色图(SP,×500)

Figure 1 immunohistochemical staining (SP,×500)

表2 MMP-2、PCNA 及 Syndecan-1 与口腔黏膜鳞状细胞癌患者病理特征的关系[n(%)]

Table 2 Relationship between MMP-2, PCNA, syndecan-1 and pathological characteristics of patients with oral mucosal carcinoma [n(%)]

组别	n	MMP-2		χ^2 值	P值	PCNA		χ^2 值	P值	Syndecan-1		χ^2 值	P值
		阳性 (n=44)	阴性 (n=18)			阳性 (n=40)	阴性 (n=22)			阳性 (n=32)	阴性 (n=30)		
年龄(岁)	<65	30(20(45.45))	10(55.56)	0.522	0.470	18(45.00)	12(54.55)	0.518	0.472	16(50.00)	14(46.67)	0.069	0.793
	≥ 65	32(24(54.55))	8(44.44)			22(55.00)	10(45.45)			16(50.00)	16(53.33)		
性别	男	38(26(59.09))	12(66.67)	0.309	0.578	24(60.00)	14(63.64)	0.079	0.779	20(62.50)	18(60.00)	0.041	0.840
	女	24(18(40.91))	6(33.33)			16(40.00)	8(36.36)			12(37.50)	12(40.00)		
肿瘤直径(cm)	<3	29(16(36.36))	13(72.22)	6.598	0.010	14(35.00)	15(68.18)	6.277	0.012	19(59.38)	10(33.33)	4.218	0.040
	≥ 3	33(28(63.64))	5(27.78)			26(65.00)	7(31.82)			13(40.63)	20(66.67)		
组织学分化程度	低-中分化	26(25(56.82))	1(5.56)	13.786	0.001	23(57.50)	3(13.64)	11.215	0.001	6(18.75)	20(66.67)	7.879	0.005
	高分化	36(19(43.18))	17(94.44)			17(42.50)	19(86.36)			16(50.00)	10(33.33)		
TNM分期	I~II期	30(16(36.36))	14(77.78)	8.773	0.003	15(37.50)	15(68.18)	5.350	0.021	25(78.13)	5(16.67)	23.418	0.001
	III~IV期	32(28(63.64))	4(22.22)			25(62.20)	7(31.82)			7(21.88)	25(83.33)		
淋巴结转移	有	25(22(50.00))	3(16.67)	5.898	0.015	21(52.50)	4(18.18)	6.947	0.008	3(9.38)	22(73.33)	26.322	0.001
	无	37(22(50.00))	15(83.33)			19(47.50)	18(81.83)			29(90.63)	8(26.67)		

2.3 口腔黏膜鳞状细胞癌患者不同MMP-2、PCNA及Syndecan-1表达的预后情况

本研究纳入的62例口腔黏膜鳞状细胞癌患者2年生存率为40.32%(25/62),MMP-2表达阳性、PCNA表达阳性及Syndecan-1表达阴性的患者死亡率更高($P < 0.05$)。见表3。

2.4 MMP-2、PCNA及Syndecan-1及三者联合检测对口腔黏膜鳞状细胞癌患者2年生存的预测价值

MMP-2、PCNA、Syndecan-1三者联合检测值均大于单一检测值。见表4、及图1。

3 讨论

随着医学技术的进步,临床对早期口腔黏膜

表3 口腔黏膜鳞状细胞癌患者不同MMP-2、PCNA及Syndecan-1表达的预后情况[n(%)]

Table 3 prognosis of different expressions of MMP-2, PCNA and syndecan-1 in patients with oral [n(%)]

指标	不同表达	n	生存(n=25)	死亡(n=37)	χ^2 值	P值
MMP-2	阳性	44	22(35.48)	22(42.31)	5.898	0.015
	阴性	18	3(4.84)	15(24.19)		
PCNA	阳性	40	20(32.26)	20(32.26)	4.387	0.036
	阴性	22	5(8.06)	17(27.42)		
Syndecan-1	阳性	32	7(11.29)	25(40.32)	9.353	0.002
	阴性	30	18(29.03)	12(19.35)		

鳞状细胞癌患者采取手术结合放、化疗治疗后,口腔黏膜鳞状细胞癌患者的生存率得到提高,但仍不理想。有研究资料指出,口腔肿瘤患者的五年存活率在60%以下^[8]。

表4 MMP-2、PCNA及Syndecan-1及三者联合检测
对口腔黏膜鳞状细胞癌患者2年生存的预测价值

Table 4 The predictive value of MMP-2, PCNA, syndecan-1 and their combined detection in 2-year survival of patients with oral mucosal carcinoma

预测指标	最佳 临界值	灵敏度 (%)	特异度 (%)	AUC	95%CI
MMP-2	23.458	76.82	83.97	0.811	0.631~0.992
PCNA	23.587	75.22	85.45	0.730	0.531~0.930
Syndecan-1	24.054	75.91	78.52	0.814	0.648~0.979
三者联合检测	24.558	85.48	88.95	0.917	0.805~1.000
预测指数模型	24.005	75.95	77.83	0.7689	0.774~0.958

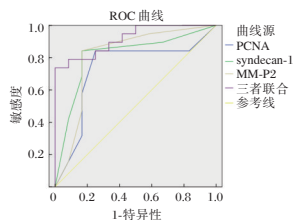


图1 MMP-2、PCNA及Syndecan-1及三者联合检测口腔
黏膜鳞状细胞癌患者2年生存的预测价值

Figure 1 The predictive value of MMP-2, PCNA, syndecan-1 and their combined detection in 2-year survival of patients with oral mucosal carcinoma

研究发现,MMP-2的表达水平与恶性肿瘤发生、发展及生物学行为有密切联系^[9],但其在口腔黏膜癌变过程中的表达及其与口腔黏膜癌病情进展的关系国内外尚未见报道。MMP-2可促进血管内皮生长因子的分泌,使基底膜和细胞外基质降解能力提高,促进微血管形成、肿瘤内微血管密度升高,从而加速肿瘤生长,淋巴结转移^[10-11]。

有学者报道,PCNA在胃癌、肺癌、乳腺癌等多种恶性肿瘤中均呈高表达状态,其为增殖细胞中合成的核内多肽,与细胞周期有密切关系^[12]。临床认为PCNA反映的是肿瘤细胞增殖动力学状况,PCNA表达过高,说明癌组织中细胞增殖活性明显增高,细胞增殖旺盛,导致多克隆细胞亚群的产生,从而使肿瘤转移的机会增多,患者预后较差^[13]。本研究中,MMP-2、PCNA及Syndecan-1与淋巴结转移(有)、肿瘤直径(≥ 3 cm)、组织分化程度(低-中分化)、TNM分期(Ⅲ~Ⅳ期)有关,这一研究结果与上述结果基本一致。

国外学者研究指出,在原发性膀胱癌中,较低分期的肿瘤中Syndecan-1多呈阳性表达,但其在低分化的肺癌组织中表达水平降低^[14]。

综上所述,不同MMP-2、PCNA及Syndecan-1表达与口腔黏膜鳞状细胞癌的发生及发展密切相

关,结果提示临床医务工作者可通过积极检测口腔黏膜鳞状细胞癌患者肿瘤组织中MMP-2、PCNA及Syndecan-1表达情况,以了解其疾病进展情况,并评估预后。

参考文献

- [1] 王伟,郭雯,董海北,等.灵芝孢子提取物对肺腺癌细胞顺铂化疗敏感性及TAZ表达的影响[J].解放军医药杂志,2020,39(6):25-29.
- [2] 黄佳欣,邵婷如,陈跃川,等.长链非编码RNA在口腔鳞状细胞癌中的研究进展[J].分子诊断与治疗杂志,2018,10(2):120-124.
- [3] 章恒,朱成斌,岳雯,等.西帕依固龈液对头颈部肿瘤放疗期间口咽部黏膜的保护作用研究[J].临床误诊误治,2018,31(10):39-42.
- [4] 董建新,张俊梅,李海城,等.miR-142-3p靶向HIF1 α 对甲状腺癌生物学行为的影响[J].医学分子生物学杂志,2019,16(1):69-75.
- [5] 李钊,吕丹.乳腺钼靶联合超声检查在早期乳腺癌筛查中的应用[J].保健医学研究与实践,2018,15(1):80-82.
- [6] Bajpai M, Chandolia B, Pardhe N, et al. Primary Intra-Osseous Basaloid Squamous Cell Carcinoma of Mandible: Report of Rare Case with Proposed Diagnostic Criteria [J]. J Coll Physicians Surg Pak, 2019, 29(12):1215-1217.
- [7] Meram AT, Jie C, Stavan P, et al. Hydrogen Sulfide Is Increased in Oral Squamous Cell Carcinoma Compared to Adjacent Benign Oral Mucosae [J]. Anticancer Res, 2018, 38(7):3843-3852.
- [8] Krishna A, Bhatt MLB, Singh V, et al. Differential Expression of c-fos Proto-Oncogene in Normal Oral Mucosa versus Squamous Cell Carcinoma [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2018, 19(3):867-874.
- [9] Zhou Y, Kolokythas A, Schwartz JL, et al. microRNA from brush biopsy to characterize oral squamous cell carcinoma epithelium [J]. Cancer Med, 2017, 6(1):67-78.
- [10] Moutasim KA, Thomas GJ, Barrett AW. Papillary and verrucous lesions of the oral mucosa [J]. Diagn Histopathol, 2017, 18(19):658-852.
- [11] Xu H, Zhong L, Deng J, et al. High expression of ACE2 receptor of 2019-nCoV on the epithelial cells of oral mucosa [J]. Int J Oral Sci, 2020, 12(1):8-10.
- [12] Constanza MM, René MF, Wilfredo GA, et al. Expresión de Podoplanina en Mucosa Oral Normal, Displasia Epitelial Oral y Carcinoma Oral de Células Escamosas [J]. Int J Odontostomatol, 2017, 11(3):311-317.
- [13] Feng L, Houck JR, Lohavanichbutr P, et al. Transcriptome analysis reveals differentially expressed lncRNAs between oral squamous cell carcinoma and healthy oral mucosa [J]. Oncotarget, 2017, 8(19):31521-31531.
- [14] Liang S, Zhang N, Chen L, et al. Effect of intensity modulated radiation therapy on oral mucosa and immune function in patients with nasopharyngeal carcinoma [J]. Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban, 2018, 43(5):505-510.

· 论 著 ·

血清 FSH、IGF- I 及 BMI 对夫精人工授精助孕结局的影响

李医* 孟晓楠 罗宇

〔摘要〕 **目的** 探究血清促卵泡激素(FSH)、胰岛素样生长因子- I (IGF- I)及身体质量指数(BMI)对夫精人工授精助孕结局的影响。**方法** 选取2018年2月至2019年11月本院收治的行AIH治疗的不孕患者104例。根据助孕结局分为妊娠组(34例)与非妊娠组(70例)。对比观察两组患者血清FSH、IGF- I及BMI差异,并通过ROC曲线分析其预测助孕结局价值,根据随访12周流产情况将妊娠患者分为流产组(11例)与未流产组(23例),对比两组患者血清FSH、IGF- I及BMI,并分析其与流产情况发生的相关性。**结果** 妊娠组患者的BMI、血清FSH水平显著低于未妊娠组,血清IGF-1水平显著高于未妊娠组,差异均有统计学意义($P<0.05$),多因素分析显示,BMI增加、血清FSH水平升高、血清IGF-1水平降低是未助孕成功的独立危险因素($P<0.05$),ROC曲线分析显示,BMI、血清FSH水平及血清IGF-1水平对助孕结局的影响的AUC为0.759、0.738、0.976,敏感性、特异性为73.5%/97.1%/97.1%、60.6%/48.6%/94.3%。三项联合预测AUC为0.999,敏感性、特异性为97.1%、100%;流产组患者BMI ≥ 25 kg/m²、血清FSH水平 ≥ 10 U/L高于未流产组,血清IGF-1水平低于未流产组,差异有统计学意义($P<0.05$),Spearman相关性显示,BMI、血清FSH水平与流产发生呈显著正相关($r=0.807$ 、 0.408 , $P<0.05$),血清IGF-1水平与流产发生呈显著负相关($r=-0.340$, $P<0.05$)。**结论** 夫精人工授精患者BMI ≥ 25 kg/m²、血清FSH水平 ≥ 10 U/L,IGF-1水平低是助孕妊娠率与活产率的危险因素,临床可根据三者水平变化进行指导干预,改善助孕结局。

〔关键词〕 夫精人工授精;血清FSH水平、IGF- I水平;BMI

Effects of serum FSH, IGF- I and BMI on the outcome of artificial insemination of husband's sperm

LI Yi*, MENG Xiaonan, LUO Yu

(Department of Reproductive Genetics, Pingdingshan Maternal and Child Health Hospital, Pingdingshan, Henan, China, 467000)

〔ABSTRACT〕 **Objective** To explore the serum FSH, IGF- I and BMI for pure artificial insemination to help the influence of the pregnancy outcome. **Methods** From February 2018 to November 2019, 104 infertile patients with AIH treatment were selected. They were divided into the pregnancy group (34 cases) and the non-pregnancy group (70 cases). To observe the difference of serum FSH, IGF- I and BMI between the two groups, and analyze its influence value by ROC curve, pregnancy patients were divided into abortion group (11 cases) and non-abortion group (23 cases) according to the 12-week follow-up of abortion. Serum FSH, IGF-I and BMI of the two groups were compared, and their correlation with the occurrence of abortion was analyzed. **Result** The level of BMI, serum FSH in the pregnant group was significantly lower than that in the non-pregnant group ($P<0.05$). Serum IGF-1 level was significantly higher than that in the non-pregnant group, difference was statistically significant ($P<0.05$). Multivariate analysis showed that increased BMI, increased serum FSH levels, and decreased serum IGF-1 levels were independent risk factors for successful preg-

基金项目:国家自然科学基金(82074268)

作者单位:平顶山市妇幼保健院生殖遗传科,河南,平顶山 467000

*通信作者:李医, E-mail: pds_pzm@126.com

nancy failure ($P<0.05$). ROC curve analysis showed that the AUC of the effects of BMI, serum FSH level and serum IGF-1 level on the outcome of assisted pregnancy were 0.759, 0.738, 0.976, and the sensitivity and specificity were 73.5%/97.1%/97.1%, 60.6%/48.6%/94.3%. The three-item combined prediction AUC is 0.999, the sensitivity and specificity are 97.1%, 100%; the BMI ≥ 25 kg/m², serum FSH level ≥ 10 U/L in the abortion group is higher than that in the non-abortion group, and the serum IGF-1 level is low. In the non-abortion group, the difference was statistically significant ($P<0.05$). Spearman correlation showed that BMI and serum FSH levels were significantly positively correlated with abortion ($r=0.807$, 0.408 , $P<0.05$), and serum IGF-1 levels were significantly negatively correlated with abortion ($r=-0.340$, $P<0.05$). **Conclusion** The BMI ≥ 25 kg/m², serum FSH ≥ 10 U/L, and low IGF-1 level are risk factors for assisted pregnancy rate and live birth rate in ivf patients. Clinical intervention can be conducted according to the changes of these three levels to improve the outcomes of assisted pregnancy.

[KEY WORDS] Artificial insemination of husband; Serum FSH level; IGF- I level; BMI

夫精人工授精 (artificial insemination with husband's sperm, AIH) 是指通过非性交手段将丈夫精液经过洗涤、优选处理后在女方排卵期人工注入女性生殖道内,使精卵自然结合达到妊娠的辅助生殖技术,是治疗不孕症的方法之一^[1]。具有操作简单、费用低廉的特点,但相关性研究表明, AIH 周期妊娠率较低,且波动较大,助孕结局受多种因素影响^[2]。女性体内脂肪囤积过渡会对生殖功能、月经周期、内分泌功能与代谢功能产生影响,身体质量指数 (Body Mass Index, BMI) 是常用国际性衡量人体胖瘦程度与健康情况的标准;促卵泡激素 (follicle-stimulating hormone, FSH) 是女性垂体前叶嗜碱性细胞分泌的激素,主要作用为促进卵泡成熟;胰岛素样生长因子- I (insulin like growth factor- I, IGF- I) 是一种多肽类物质,具有促生长作用,对卵泡生长和优势卵泡选择具有一定影响^[3-5]。三者与女性生殖条件均具一定联系,但临床关于三者对 AIH 助孕结局影响的相关研究较少,基于此,本研究旨在探索血清 FSH、IGF- I 及 BMI 对夫精人工授精助孕结局的影响,以期规范为临床提供价值性参考。现将研究成果报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2018 年 2 月至 2019 年 11 月本院收治的行 AIH 治疗的不孕患者 104 例。平均年龄 (32.79 ± 7.45) 岁;不孕年限 1~15 年,平均年限 (8.45 ± 2.41) 年;基础 FSH 为 1.26~37.60 IU/L。根据助孕结局分为成功妊娠组 (34 例) 与非妊娠组 (70 例)。

纳入标准:①不孕原因包括:排卵障碍、子宫内膜异位症、宫颈因素等;②均为治疗第一周期患

者;③子宫输卵管检查显示有一侧及以上输卵管通畅;④男方精液经 3 次检查显示精子浓度 $>5 \times 10^6$ 个/mL,正常形态精子 $>1\%$,精子活力 (A+B) $>10\%$;排除标准:①近 3 个月服用激素类药物;②近期服用避孕药。所有患者均知情同意,本实验经医院伦理委员会批准。

1.2 方法

促排卵方法:月经周期正常患者采用自然周期 AIH,卵泡发育异常、月经周期延长 ≥ 35 天及排卵障碍患者采用常规促性腺激素释放激素激动剂 (Conventional gonadotropin-releasing hormone agonists, GnRHa)/绒毛膜促性腺激素 (绒毛膜促性腺激素 (Human chorionic gonadotropin, HCG) 方案诱导排卵。对患者阴道进行 B 超监测,观察卵泡的发育情况、子宫内膜的形成厚度及类型等。当 1~2 个卵泡直径大于 16 mm 时,然后进行量为 5 000~10 000 IU 的 HCG 肌肉注射,约在注射后的 24~36 h 进行人工授精,第二天复查 B 超,未排卵患者下午进行补授。

精液收集方式:男方禁欲 3~7 天,手淫取精后采用梯度分离液 (Spermrins Grad 康德乐 (中国) 投资有限公司,国食药监械 (进) 字 2014 第 3541046 号) 离心处理精液,使用胚胎培养液清洗沉淀精子后备用 AIH 法:患者取膀胱截石位,常规擦拭外阴,授管抽取精子悬液 (0.3~0.5) mL,缓慢注入宫腔后患者平卧 30 min。黄体支持:术后常规进行黄体支持,排卵后第 2 天给与 10 mg 地屈孕酮 (Abbott Biologicals B.V. 注册证号 H20170221) 口服,2 次/日,治疗 10 天。

随访:患者于排卵 14 天后进行检查,判断助孕结局。收集患者一般资料, BMI=体重 (kg)/身高的

平方(m^2)。所有患者入院后抽取空腹静脉血 2 mL,离心 300 r/min, 10 min,取上清液待检,使用全自动免疫分析仪[(本生(天津)健康科技有限公司)]检测血清 FSH 含量。使用 ELISA 法检测血清 IGF- I 水平。试剂盒供自本生(天津)健康科技有限公司。

1.3 观察指标

妊娠诊断标准^[6]:进行 AIH 术后 14 d,若患者月经未来潮,对患者进行晨尿 HCG 检查,若检查 HCG 结果为 ≥ 10 mU/mL 或为阳性,则可确定为生化妊娠;再在 AIH 术后 28 d 对患者进行阴道 B 超检查,若宫内可见孕囊、胚芽及心管搏动,则确定为临床妊娠。

1.4 统计学处理

采用软件 SPSS 22.0 进行数据统计。计数资料用 $n(\%)$ 表示,行 χ^2 检验;计量资料用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,行独立样本 t 检验,多因素采用二元 Logistic 回归分析;预测价值评估采用 ROC 曲线分析,曲线下面积(area under curve, AUC) 0.7~0.9 则预测准确性较好, >0.9 时预测准确性高。采用 Spearman 相关分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者 BMI、血清 FSH、IGF- I 水平比较

成功妊娠组女性的 BMI、血清 FSH 水平显著低于未妊娠组,血清 IGF- I 水平显著高于未妊娠组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 有无妊娠情况患者 BMI、血清 FSH、IGF- I 水平比较
($\bar{x} \pm s$)

项目	妊娠组 ($n=34$)	未妊娠组 ($n=70$)	t 值	P 值
BMI (kg/m^2)	22.97 $\pm$ 2.21	25.20 $\pm$ 2.52	4.447	<0.001
血清 FSH 水平 (U/L)	7.40 $\pm$ 2.21	9.01 $\pm$ 2.31	7.442	<0.001
血清 IGF- I 水平 (ng/mL)	174.79 $\pm$ 8.86	149.57 $\pm$ 9.89	12.638	<0.001

表 3 BMI、血清 FSH 水平、血清 IGF- I 水平及三项联合对助孕结局的预测价值

Table 3 Value of BMI, serum FSH level, serum IGF- I level and the predictive value of the three combined effects on pregnancy outcomes

检验项目	AUC	S.D	95%CI	最佳临界值	敏感度(%)	特异度(%)	YL	P 值
BMI	0.759	0.051	0.659~0.858	24.220	73.5	60.0	0.335	0.000
血清 FSH	0.738	0.052	0.635~0.840	10.185	97.1	48.6	0.457	0.000
血清 IGF- I 水平	0.976	0.016	0.944~1.000	160.210	97.1	94.3	0.914	0.000
三项联合	0.999	0.001	0.997~1.000	-134.547	97.1	100.0	0.971	0.000

2.2 多因素 Logistic 分析

多因素分析显示,BMI 增加、血清 FSH 水平升高、血清 IGF- I 水平降低是未妊娠的独立危险因素($P < 0.05$)。见表 2。

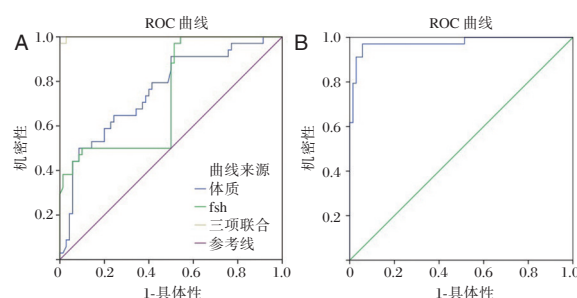
表 2 有无妊娠情况患者多因素 Logistic 分析

Table 2 Analysis of multifactorial Logistic in pregnant patients

相关因素	B	$S.E.$	Wald	自由度	Exp(B)	95%CI	P 值
BMI	0.415	0.109	14.403	1	1.515	1.222~1.878	0.000
血清 FSH 水平	0.305	0.098	9.737	1	1.357	1.120~1.644	0.002
血清 IGF- I 水平	-0.313	0.064	24.189	1	0.731	0.645~0.828	0.000

2.3 血清 FSH、IGF- I 水平及 BMI 对助孕结局的预测价值

Logistic 回归模型显示,三项联合预测 AUC 为 0.999,敏感性、特异性为 97.1%、100%,均高于单一检测值。见表 3、图 1。



注:A 为 BMI、血清 FSH 水平及三项联合影响助孕结局的 ROC 曲线 B 为血清 IGF- I 水平预测助孕结局的 ROC 曲线

图 1 BMI、血清 IGF- I、FSH 水平及三项联合预测助孕结局的 ROC 曲线

Figure 1 BMI, Serum IGF- I, FSH level and ROC curve of three combinations Prediction of pregnancy outcomes

2.4 BMI、血清 FSH 水平及血清 IGF- I 水平对于流产情况影响比较

对妊娠组进行 12 周随访,记录流产事件发生情况:截止随访结束,34 例妊娠成功女性中,11 例流产。流产组 BMI ≥ 25 kg/m^2 、血清 FSH 水平 ≥ 10

U/L 例数高于未流产组,血清 IGF- I 水平低于未流产组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 4。

表 4 BMI、血清 FSH 水平及血清 IGF- I 水平对流产情况影响比较 [$n(\%)$, ($\bar{x} \pm s$)]

Table 4 BMI、Comparison of effects of serum FSH and serum IGF- I levels on abortion [$n(\%)$, ($\bar{x} \pm s$)]

项目		流产组 ($n=11$)	未流产组 ($n=23$)	χ^2 值	P 值
BMI(kg/m^2)	<25	3(27.27)	17(73.91)	6.683	0.010
	≥ 25	8(72.73)	6(26.09)		
血清 FSH 水平 (U/L)	<10	4(36.36)	17(73.91)	4.443	0.035
	≥ 10	7(63.64)	6(26.09)		
血清 IGF- I 水平(ng/mL)		168.56 $\pm$ 9.88	190.81 $\pm$ 8.95	13.708	<0.001

2.5 BMI、血清 FSH 水平及血清 IGF- I 水平与流产情况相关性分析

Spearman 相关性显示,BMI、血清 FSH 水平与流产发生呈显著正相关($r=0.807, 0.408, P<0.05$),血清 IGF- I 水平与流产发生呈显著负相关($r=-0.340, P<0.05$)。

3 讨论

不孕症是指一年以上正常性生活且未采取避孕措施而未妊娠,近年来不孕症发生率渐高,严重影响患者的生活质量^[7-8]。AIH 是操作简便,并发症少的助孕技术,但既往研究表明:AIH 技术助孕后妊娠率仅为 8%~22%^[9]。BMI 水平较高患者肥胖程度较高,患者体内可能存在月经周期、分泌与代谢异常,促排卵药物需求较大,长时间作用损伤卵子质量,影响胚胎发育,使临床妊娠率下降。卵泡发育顺序为始基卵泡、窦前卵泡、窦状卵泡到排卵前卵泡,其发育过程由卵巢局部调控,依靠激素环境进行发育,卵泡颗粒细胞、内膜细胞协同 FSH 反应促进卵泡生长、优势卵泡形成与排卵,FSH 水平升高使卵泡发育速度减缓或加快^[10]。在卵泡发育过程中,IGF- I 可通过激活、加强卵泡发育对卵巢生理功能进行调节^[11],其影响卵泡发育主要途径为:①IGF- I 可启动卵泡发生,对优势卵泡选择具有特殊作用;②IGF- I 可通过维持酶活性刺激 E2 生成,影响卵泡发育;③IGF- I 可通过介导 GH 发挥促生长作用。同时,本研究多因素分析显示,BMI 增加、血清 FSH 水平升高、血清 IGF- I 水平降低是未成功妊娠的独立危险因素,ROC 曲线分析提示联合对助孕结局的预测价值较高;提示 BMI $>24.22 \text{ kg}/\text{m}^2$,血清 FSH 水平 >10.185

U/L,血清 IGF- I 水平 $<160.21 \text{ ng}/\text{mL}$ 是助孕失败危险因素,三者对助孕情况均具有较高预测价值,联合预测价值更高。既往研究表明:BMI $\geq 25 \text{ kg}/\text{m}^2$ 为肥胖患者,血清 FSH 水平 $\geq 10 \text{ U/L}$ 为卵巢储备功能下降,血清 IGF- I 水平降低为卵巢发育减弱,患者妊娠率降低,与本文研究具有一致性^[12-13]。

本研究通过对成功妊娠女性进行随访 3 个月记录流产发生情况,通过对比显示,BMI、血清 FSH 水平与流产发生呈显著正相关,血清 IGF- I 水平与流产发生呈显著负相关。肥胖患者卵子质量下降,子宫内膜功能下降及卵巢反应不良使妊娠活产率降低;如本文上述,血清 FSH 水平 $\geq 10 \text{ U/L}$ 为卵巢储备功能下降,对卵巢发育过程造成影响,活产率降低;IGF- I 是调节胎儿生长发育的因子,妊娠早期 IGF- I 促进胎儿器官分裂分化与生长,参与妊娠其胎儿生长发育全过程,IGF- I 水平降低,胎儿发育受阻,流产率增加^[14-15]。

综上所述,夫精人工授精患者 BMI $\geq 25 \text{ kg}/\text{m}^2$ 、血清 FSH 水平 $\geq 10 \text{ U/L}$,IGF- I 水平低是助孕妊娠率与活产率的危险因素,临床可根据三者水平变化进行指导干预,改善助孕结局。本研究不足之处样本量较少,未研究出最适宜 BMI、血清 FSH、IGF-1 水平。

参考文献

- [1] Hu QB, Chen Xq. Qualitative study on psychological experience of artificial insemination of husband and wife[J]. J Clin Nursing's Practicality, 2017, 2(8):9-10+12.
- [2] Chang ZY, Shi H, BU ZQ, et al. Effect of uterine anomalies on pregnancy rates and reproductive outcomes in women undergoing artificial insemination by husband[J]. Rep Dev Med, 2018, 2(4):201-207.
- [3] Dixon S, Harrison L, Hoeroldt B, et al. Diabetes mellitus in patients with autoimmune hepatitis (AIH): at diagnosis and following prednisolone treatment[C]. BMJ Publishing Group Ltd and British Soc Gastroenterol, 2019, 68:115.
- [4] Haroon Latif, Khan, Shahzad, et al. Tri-nucleotide consortium of androgen receptor is associated with low serum FSH and testosterone in asthenospermic men[J]. Syst Biol Reprod Med, 2018, 64(2):112-121.
- [5] Takahashi T, Ogasawara T, Kishimoto J, et al. Synergistic Effects of FGF-2 with Insulin or IGF-I on the Proliferation of Human Auricular Chondrocytes[J]. Cell Transplantat, 2017, 14(9):683-693.
- [6] 刘盼, 赵敏英, 郭丽娜, 等. 评估减重对多囊卵巢综合征患者宫腔内人工授精成功率的影响[J]. 国际生殖健康/计划生育杂志, 2018, 037(4):273-276. (下转第 275 页)

· 论 著 ·

子痫前期孕妇血清及胎盘组织中 GRP78、P53 表达及与疾病相关性

邱光银 唐佳 张铁环 李登科 郑钊平*

[摘要] 目的 分析子痫前期(PE)孕妇血清及胎盘组织中葡萄糖调节蛋白 78(GRP78)、P53 的表达及与病情、预后的相关性。**方法** 选取本院 2017 年 4 月至 2020 年 5 月收治且经临床确诊的 150 例 PE 孕妇纳入研究组,并分为早发型 78 例(早发组),晚发型 72 例(晚发组),选取同期本院健康妊娠女性 90 例作为对照组。比较两组及不同病情 PE 患者血清中 GRP78、P53 蛋白及胎盘组织中 GRP78、P53 mRNA 表达。并记录 PE 孕妇产后不良结局发生情况。**结果** 对照组血清 GRP78、P53 蛋白与胎盘组织中 GRP78、P53 mRNA 水平均显著低于研究组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。对照组血清 GRP78、P53 蛋白与胎盘组织中 GRP78、P53 mRNA 水平均显著低于早发组与晚发组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。早发组 GRP78、P53 阳性表达率分别为 76.92%、73.08%,晚发组 GRP78、P53 阳性表达率分别为 80.56%、76.39%,组间比较差异无统计学意义($P>0.05$)。但两组 GRP78、P53 阳性表达率均显著高于对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。150 例 PE 患者中预后不良 38 例(25.33%)。年龄、总胆固醇、肌酐、GRP78 及 P53 表达情况为影响 PE 患者预后不良的单因素($P<0.05$)。进一步 Logistic 回归分析显示:年龄、总胆固醇、肌酐、GRP78 及 P53 阳性表达是影响 PE 预后不良的独立危险因素($P<0.05$)。**结论** PE 孕妇血清及胎盘组织中 GRP78、P53 蛋白均呈高表达,与 PE 发病机制密切相关,检测 GRP78、P53 蛋白水平可有效评估患者预后。

[关键词] 子痫前期;葡萄糖调节蛋白 78;P53 蛋白;胎盘组织

Expression of GRP78 and P53 in Serum and Placental Tissues of Pregnant Women with Preeclampsia and the Correlation Analysis

QIU Guangyin, TANG Jia, ZHANG Tiehuan, LI Dengke, ZHENG Zhaoping*

(Department of Obstetrics, Longquan hospital of West China Hospital Of Sichuan University, Chengdu, Sichuan, China, 610100)

[ABSTRACT] **Objective** To analyze the expression of Glucose regulatory protein 78 (GRP78) and P53 protein in serum and placenta tissue of pregnant women with preeclampsia (PE) and their correlation with the condition and prognosis. **Methods** The clinical data of 150 pregnant women with PE who were admitted to our hospital from April 2017 to May 2020 and were clinically diagnosed were collected and included in the study group, including 78 cases with early attack (early attack group) and 72 cases with late attack (late attack group). During the same period, 90 healthy pregnant women in our hospital were selected as the control group. The expressions of GRP78 and P53 protein in serum and placental tissue between the two groups and PE patients with different conditions and the expression of GRP78 and P53 mRNA in placental tissue were compared. The incidence of adverse postpartum outcomes of PE pregnant women was recorded. **Results** The levels of serum GRP78 and P53 protein in the control group and the GRP78 and P53 mRNA levels in placental tissue were significantly lower than those in the study group ($P<0.05$). The levels of serum GRP78, P53 protein

基金项目:四川省卫健委课题(17ZD053)

作者单位:四川大学华西医院龙泉医院产科,四川,成都 610100

*通信作者:郑钊平, E-mail:411715104@qq.com

and *GRP78* and *P53* mRNA in placental tissues of the control group were significantly lower than those of the early-attack group and the late attack group ($P<0.05$). The positive expression rates of *GRP78* and *P53* in the early attack group were 76.92% and 73.08%, respectively, and the positive expression rates of *GRP78* and *P53* in the late attack group were 80.56% and 76.39%, respectively. The positive expression rates of *GRP78* and *P53* in the two groups were significantly higher than those in the control group ($P>0.05$). Among 150 PE patients, 38 had poor prognosis, accounting for 25.33%. Univariate analysis showed that age, total cholesterol, creatinine, *GRP78* and *P53* expression have some relationship with the poor prognosis of PE patients ($P<0.05$). Logistic regression analysis showed that age, total cholesterol, creatinine, *GRP78* and *P53* positive expression are independent risk factors affecting the poor prognosis of PE ($P<0.05$). **Conclusion** *GRP78* and *P53* proteins are highly expressed in the serum and placenta tissue of PE pregnant women, which are closely related to the pathogenesis of PE. The detection of *GRP78* and *P53* protein levels can effectively assess the prognosis of patients.

[KEY WORDS] Preeclampsia; Glucose regulatory protein 78; *P53* protein; Placental tissue

子痫前期(Preeclampsia, PE)是妊娠期特发、严重的并发症,常伴有恶心、头痛及呕吐等症状^[1]。据相关统计发现,近20年来,PE发病率上升25%,对孕产妇及胎儿生命安全造成严重影响^[2]。目前有关PE的发病机制尚未十分明确。既往研究显示,胎盘功能、胎盘滋养细胞分化及凋亡会受到内质网应激反应的影响,而PE发病期间胎盘血氧不足等因素会启动内质网应激反应^[3-4]。因此,内质网应激相关调节功能异常与PE发生密切相关。葡萄糖调节蛋白78(Glucose regulated protein 78, *GRP78*)与蛋白质折叠及组装,*P53*蛋白主要与细胞凋亡有关,上述两种蛋白分子在胎盘滋养细胞内质网应激反应及相关凋亡途径中起到一定作用^[5]。基于此,本研究,进一步探讨*GRP78*、*P53*表达与子痫前期病情、预后的关系。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集本院2017年4月至2020年5月收治且经临床确诊的150例PE孕妇为研究组,其中早发PE者78例(早发组),分娩孕周(32.11 ± 5.89)周;晚发PE者72例(晚发组),分娩孕周(35.69 ± 6.87)。选取同期本院健康妊娠女性90例作为对照组。本研究经医院医学伦理委员会批准通过。两组一般资料,比较差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。见表1。

纳入标准:①均为单胎妊娠;②临床资料无缺损或丢失;③均为剖宫产分娩;④依从性好,可完成随访;⑤患者及家属均知情,并签署知情同意书。排除标准:①合并高血压、肝炎、及自身免疫

疾病;②合并心、肝肾功能不全;③合并其他妊娠并发症者;④精神异常、无法配合本次研究者。

表1 两组一般资料比较($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Comparison of general data between two groups

($\bar{x}\pm s$)				
组别	<i>n</i>	平均年龄(岁)	体重指数(kg/m ²)	分娩孕周(周)
研究组	150	26.48±3.58	27.89±3.15	34.75±2.06
对照组	90	27.33±3.04	27.18±2.84	35.11±2.65
<i>t</i> 值		1.882	1.753	1.175
<i>P</i> 值		0.061	0.081	0.241

1.2 方法

1.2.1 血清*GRP78*、*P53*蛋白检测

采取受检者3 mL静脉外周血,4℃ 1 000 r/min离心15 min后取上清液,标本均为清澈透明、无溶血污染标本,放于-80℃冰箱以备批量待检。上述蛋白因子均采用酶联免疫吸附法检测,检测仪器为上海基因有限公司的全自动酶免疫分析仪,试剂盒由上海生工生物有限公司生产,具体操作步骤严格按照说明书执行。

1.2.2 胎盘组织*GRP78*、*P53*蛋白检测

中央带母体面至胎儿面1.0 cm×1.0 cm×1.0 cm,去除母体面约4 mm脱膜组织,常规清洗后分装2管,0.1 g/管。其中1份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,首先进行标本准备:组织切片后脱蜡、水化。然后根据S-P免疫组化染色法对*GRP78*、*P53*蛋白进行检测。主要试剂:*GRP78*一抗为兔抗人单克隆抗体,按1:100稀释;*P53*蛋白一抗为鼠抗人单克隆抗体,按1:50稀释,二抗为山羊抗兔IgG,用二氨基联苯胺呈色,光学显微镜下观察。另外一份迅速冷冻,低温保存,用半定量逆转录多聚合酶链

式反应(Reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)检测 *GRP78* 及 *P53* mRNA 表达。

1.2.3 染色结果判定^[6]

GRP78 阳性细胞滋养层细胞、绒毛间质滋养层细胞及合体滋养层细胞,呈棕黄色颗粒。根据阳性细胞百分比、染色强度判定。0分:无阳性细胞;1分:阳性细胞<10%;2分:阳性细胞10%~50%;3分:阳性细胞>50%。染色强度判定:0分无色,1分淡黄色,棕黄色2分,棕褐色3分。总积分:上述2项评分的乘积。阳性:总积分≥3分。

1.3 观察指标

①比较两组不同病情PE患者血清中 *GRP78*、*P53* 蛋白与胎盘组织中 *GRP78*、*P53* mRNA 表达情况。②记录PE孕妇产后不良结局发生情况,包括产后大出血、胎盘早剥及围产儿死亡等。

1.4 统计学方法

采用SPSS 18.0软件进行统计分析,计量资料采用($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用方差检验;计数资料以 *n*(%)表示,采用 χ^2

检验;采用非条件多因素 Logistic 回归分析影响PE患者预后不良的危险因素,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

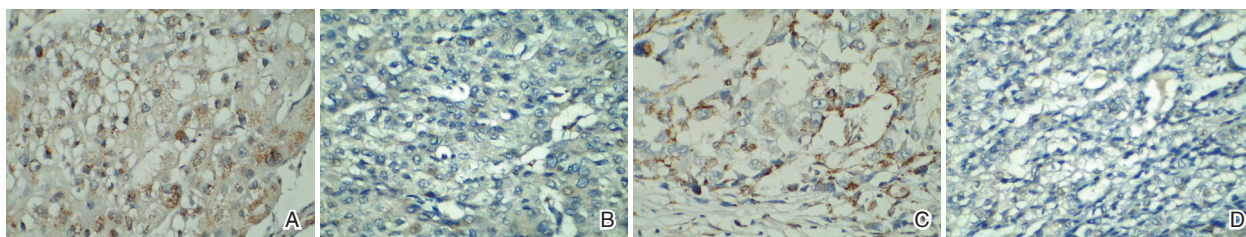
2 结果

2.1 两组血清 *GRP78*、*P53* 蛋白及胎盘组织中 *GRP78*、*P53* mRNA 表达情况

对照组血清 *GRP78*、*P53* 蛋白与胎盘组织中 *GRP78*、*P53* mRNA 水平均显著低于研究组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表2、图1。

表2 两组血清 *GRP78*、*P53* 蛋白及胎盘组织中 *GRP78*、*P53* mRNA 表达情况 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	血清		胎盘组织	
		<i>GRP78</i> ($\mu\text{g/L}$)	<i>P53</i> (U/L)	<i>GRP78</i> mRNA	<i>P53</i> mRNA
对照组	90	1.12±0.06	52.23±4.81	1.04±0.02	53.14±5.27
研究组	150	3.04±1.26	70.54±8.63	2.94±0.06	67.94±3.10
<i>t</i> 值		14.434	18.470	290.673	27.408
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001



A:子痫前期孕妇 *GRP78* 蛋白表达。B:正常孕妇 *GRP78* 蛋白表达。C:子痫前期孕妇 *P53* 蛋白表达。D:正常孕妇 *P53* 蛋白表达。

图1 *GRP78*、*P53* 蛋白在不同孕妇胎盘组织中的表达情况 (SP, ×400)

Figure 1 Expression of *GRP78* and *p53* protein in placenta of different pregnant women (SP, ×400)

2.2 PE 不同病情患者血清 *GRP78*、*P53* 蛋白及胎盘组织中 *GRP78*、*P53* mRNA 表达情况

对照组血清 *GRP78*、*P53* 蛋白与胎盘组织中 *GRP78*、*P53* mRNA 水平均显著低于早发组与晚发组,差异有统计学意义($P < 0.05$),早发组与晚发组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表3。

2.3 各组胎盘组织中 *GRP78*、*P53* 蛋白组化分析

早发组 *GRP78*、*P53* 阳性表达率低于晚发组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。两组 *GRP78*、*P53* 阳性表达率显著高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表4。

2.4 影响PE患者预后不良的单因素分析

150例PE患者中预后不良38例,占25.33%。年龄、总胆固醇、肌酐、*GRP78* 及 *P53* 表达情况为

表3 PE 不同病情患者血清 *GRP78*、*P53* 蛋白及胎盘组织中 *GRP78*、*P53* mRNA 表达情况 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	血清		胎盘组织	
		<i>GRP78</i> ($\mu\text{g/L}$)	<i>P53</i> (U/L)	<i>GRP78</i> mRNA	<i>P53</i> mRNA
对照组	90	1.12±0.06	52.23±4.81	1.64±0.02	53.14±5.27
早发组	78	3.01±1.22	68.54±8.25	2.45±0.08	67.71±3.02
晚发组	72	2.83±1.17	69.45±5.39	2.46±0.11	66.62±2.64
<i>F</i> 值		102.90	200.06	3189.73	359.91
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

影响PE患者预后不良的单因素($P < 0.05$),见表5。

2.5 PE 患者预后不良影响因素的多因素分析

经 Logistic 回归分析,患者年龄、总胆固醇、肌

表4 各组胎盘组织中 GRP78、P53 蛋白组化分析 [n(%)]

Table 4 Protein histochemical analysis of GRP78 and p53 in placenta of each group [n(%)]

组别	n	GRP78		P53	
		阳性	阴性	阳性	阴性
对照组	90	22(24.44)	68(75.56)	21(23.33)	69(76.67)
早发组	78	60(76.92)	18(23.08)	57(73.08)	21(26.92)
晚发组	72	58(80.56)	14(19.44)	55(76.39)	17(23.61)
χ^2 值		68.244		60.160	
P 值		<0.001		<0.001	

表5 影响 PE 患者预后不良的单因素分析 [n(%)]

Table 5 Univariate analysis of poor prognosis in patients with PE [n(%)]

因素	例数 (n=150)	预后不良 (n=38)	χ^2 值	P 值
年龄(岁)	≥30	50	32(84.21)	59.281 <0.001
	<30	100	6(15.79)	
体重指数(kg/m ²)	≥28	78	21(55.26)	0.217 0.641
	<28	72	17(44.74)	
总胆固醇(mmol/L)	≥5.2	86	28(73.68)	5.562 0.018
	<5.2	64	10(26.32)	
甘油三酯(mmol/L)	≥2.0	11	3(7.89)	0.024 0.878
	<2.0	139	35(92.11)	
肌酐(μmol/L)	≥106	59	21(55.26)	5.412 0.020
	<106	91	17(44.74)	
D-二聚体(μL)	≥500	17	7(18.42)	2.544 0.111
	<500	133	31(64.58)	
GRP78	阳性	118	37(97.37)	10.606 <0.001
	阴性	32	1(2.63)	
P53	阳性	112	34(89.47)	5.899 0.015
	阴性	38	4(10.53)	

酞、GRP78 及 P53 阳性表达是 PE 患者预后不良的独立因素($P<0.05$)。见表 6。

3 讨论

PE 是孕产妇、围产儿死亡的主要原因之一,轻度 PE 临床症状无特异性,但会导致患者手部、面部出现突发性肿胀;重度 PE 则可能导致孕妇出现头痛、呼吸障碍、腹痛等症状^[7-8]。近年来研究报道显示,内质网应激相关分子内皮素-1、GRP78 等在 PE 中会异常表达,并参与子宫螺旋动脉重建及滋养细胞的增殖与分化,导致 PE 发生^[9]。

GRP78 是内质网上最多的伴侣蛋白,通过多

种途径参与细胞信号转导,调控细胞的增殖与凋亡^[10]。本研究发现,GRP78 蛋白、GRP78 mRNA 在 PE 患者血清和胎盘组织中表达量均较健康孕妇高,但在早发 PE 与晚发 PE 患者中比较差异无统计学意义,说明 GRP78 可能参与了 PE 发病。分析原因可能是由于 PE 患者机体内存在氧化应激反应,导致机体组织处于低糖、缺氧的状态,诱导 GRP78 大量生成,导致其表达上升^[11-12]。Kelly 等^[13]通过研究 GRP78 蛋白在 PE 胎盘滋养细胞中的表达发现,早发型、晚发型 PE 胎盘组织中 GRP78 蛋白均呈现高表达,且组间比较差异无统计学意义。本研究发现,早发组、晚发组 PE 患者胎盘组织 GRP78 蛋白阳性表达率均显著高于对照组,与上述报道相符。

P53 蛋白是抑癌基因 P53 的表达产物,在调节细胞凋亡、抑制血管生成等方面具有重要作用^[14]。Lee 等^[15]报道证实,胎盘滋养细胞中,P53 蛋白水平存在异常,且与胎盘形成、浸润有关。Bastida 等^[16]研究发现,PE 患者血清及胎盘组织中 VEGF 与 P53 呈高度负相关,证实了 P53 通过调节 VEGF 水平引发血管内皮功能紊乱,进一步诱发 PE。本组研究结果提示 P53 参与了 PE 的发生。

此外,笔者通过进一步 Logistic 回归分析探讨上述因子与患者临床预后的相关性,结果发现 GRP78 及 P53 不同表达 PE 患者间预后不良的发生率亦存在一定差异,由此进一步提示 GRP78 和 P53 的表达与 PE 孕产妇的预后结局有着一定的联系。且通过 Logistic 回归分析发现,总胆固醇、肌酐、GRP78 及 P53 阳性表达是 PE 患者预后不良的独立因素,这可能是因为 PE 患者胎盘滋养细胞存在显著的凋亡现象,且凋亡指数显著增高,滋养细胞侵入受限,胎盘着床变浅其对子宫螺旋小动脉的侵袭不足,参与循环的血流量减少,胎盘缺血缺氧。

综上所述,PE 孕妇血清及胎盘组织中 GRP78、P53 蛋白均呈高表达,可能与 PE 发病密切相关,检测 GRP78、P53 蛋白水平有助于评估患者预后。

表6 PE 患者预后不良影响因素的多因素分析

Table 6 Multivariate analysis of adverse prognostic factors in patients with PE

因素	回归系数	标准误差	Wald/ χ^2 值	P 值	OR	95%CI 值
年龄(参照组:<30 岁)	0.374	0.135	9.402	<0.001	1.454	1.116~1.894
总胆固醇(参照组:<5.2 mmol/L)	0.532	0.210	10.541	<0.001	1.702	1.128~2.569
肌酐(参照组:<106 μmol/L)	0.468	0.187	6.758	<0.001	1.597	1.107~2.304
GRP78(参照组:阴性)	0.442	0.175	9.646	<0.001	1.556	1.104~2.192
P53(参照组:阴性)	0.511	0.218	10.221	<0.001	1.667	1.087~2.556

参考文献

- [1] 程惠, 周曙光. PLGF, IL-6 与妊娠期高血压病情程度及母婴结局的相关性[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(5): 674-677.
- [2] Miller EC, Gatollari HJ, Too G, et al. Risk Factors for Pregnancy-Associated Stroke in Women With Preeclampsia [J]. Stroke, 2017, 48(7): 1752.
- [3] Maesa JM, Toro-Crespo MD, Liro-Amenteros J, et al. Utility of S-FLT1/PLGF ratio for the diagnosis of preeclampsia: A systematic review [J]. Clin Chim Acta, 2019, 493(6): S352-353.
- [4] Bailey LJ, Alahari S, Tagliaferro A, et al. Augmented trophoblast cell death in preeclampsia can proceed via ceramide-mediated necroptosis[J]. Cell Death Dis, 2017, 8(2):e2590.
- [5] 蒋艳丽, 李晓瑛, 王巧鸽. 子痫前期孕妇胎盘组织中 MMP-9 和 ET-1 表达水平及其与预后相关性分析[J]. 解放军医药杂志, 2018, 30(10):64-68.
- [6] Tannetta D, Masliukaite I, Vatish M, et al. Update of syncytiotrophoblast derived extracellular vesicles in normal pregnancy and preeclampsia[J]. J Reprod Immunol, 2017, 119(11): 98-106.
- [7] 廖媛, 刘兴会, 谭婧, 等. 建立子痫前期不良结局风险预警模型的初步研究[J]. 四川大学学报(医学版), 2018, 49(5):797-802.
- [8] Boeldt DS, Bird IM. Vascular adaptation in pregnancy and endothelial dysfunction in preeclampsia [J]. J Endocrinol, 2017, 232(1):R27.
- [9] 张青苗, 宋婷, 欧阳为相, 等. 妊娠期糖尿病胎鼠胎盘中脂代谢相关因子的研究[J]. 医学分子生物学杂志, 2018, 15(5):332-337.
- [10] Piccoli GB, Cabiddu G, Castellino S, et al. A best practice position statement on the role of the nephrologist in the prevention and follow-up of preeclampsia: the Italian study group on kidney and pregnancy[J]. J Nephrol, 2017, 30(3):1-11.
- [11] 戚燕妮, 吴丹梅. 阴道用乳杆菌活菌胶囊治疗妊娠期细菌性阴道病的临床疗效及对妊娠结局的影响[J]. 保健医学研究与实践, 2020, 17(2):61-63+68.
- [12] McLaughlin K, Baczyk D, Potts A, et al. Low Molecular Weight Heparin Improves Endothelial Function in Pregnant Women at High Risk of Preeclampsia [J]. Hypertension, 2017, 69(1):180-188.
- [13] Kelly RS, Giorgio RT, Chawes BL, et al. Applications of metabolomics in the study and management of preeclampsia: a review of the literature[J]. Metabolomics, 2017, 13(7):79.
- [14] Kaira K, Toyoda M, Shimizu A, et al. Prognostic significance of GRP78/BiP expression in patients with Stage III/IV hypopharyngeal squamous cell carcinoma [J]. Neoplasma, 2016, 63(3):4594-4596.
- [15] Lee CL, Veerbeek JHW, Rana TK, et al. inhibition of trophoblast invasion in placenta-related complications of pregnancy[J]. Am J Pathol, 2018, 189(2):154-155.
- [16] Bastida RD, Aguilar E, Ditisheim A, et al. Endoplasmic reticulum stress responses in placentation - A true balancing act [J]. Placenta, 2017, 57(6):163.
- [7] BALOYI, Magezi, E. Gendered character of barrenness in an African context: An African pastoral study. In Skriflig (Online)[J]. In die Skriflig, 2017, 51(1):1-7.
- [8] 唐媛, 刘小娟, 刘秀丽, 等. EMT 不孕患者血清 AcrAb、Sp17Ab 水平[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(7):932-934+955.
- [9] 倪丽莉, 王菁, 刁飞扬, 等. 供精人工授精后早期妊娠丢失的影响因素分析[J]. 生殖医学杂志, 2020, 29(7):900-906.
- [10] Bycya, Bxtsa, Byfza, et al. Transcriptome analysis of sheep follicular development during prerecruitment, dominant, and mature stages after FSH superstimulation - ScienceDirect [J]. Domestic Animal Endocrinol, 2020, 74:106563.
- [11] Miho, Matsuda, Masato, et al. Phospholipase C-related but catalytically inactive proteins regulate ovarian follicle development[J]. J Biological Chem, 2017, 292(20):8369-8380.
- [12] 马龙飞, 李娟, 冯赓. 胰岛素样生长因子 1 基因多态性与多囊卵巢综合征相关性研究[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2018, 10(6):406-410.
- [13] 刘盼, 郭丽娜, 赵敏英. 多囊卵巢综合征患者内分泌状态对其宫腔内人工授精成功率的影响[J]. 河北医科大学学报, 2018, 39(10):1185-1188, 1192.
- [14] 郑波, 戴芳芳, 郭钰英, 等. 控制性促排卵中三种促性腺激素使用 4 天后血 FSH 值及助孕结局分析[J]. 生殖医学杂志, 2020, 29(1):33-37.
- [15] Catherine LS, Anne-Laure C, Nicolas T, et al. Fetal growth is associated with the CpG methylation of the P2 promoter of the IGF1 gene[J]. Clin Epigenet, 2018, 10(1):57.

(上接第 270 页)

老年骨质疏松性骨折患者血清 B-ALP、PTH、s-PINP 和 s-CTX 表达

杨帅* 张红新 古雪建

[摘要] **目的** 探讨老年骨质疏松性骨折(OPF)患者血清骨特异性碱性磷酸酶(B-ALP)、甲状旁腺激素(PTH)、I型前胶原氨基端前肽(s-PINP)和I型胶原羧基端交联肽(s-CTX)水平及临床意义。**方法** 选取2019年3月至2020年3月本院收治76例老年OPF患者作为OPF组,同期收治80例未发生骨折骨质疏松症(OP)患者作为对照组。比较两组腰椎(L₂₋₄)、股骨颈、桡骨远端骨密度(BMD)、B-ALP、PTH、s-PINP和s-CTX水平;分析B-ALP、PTH、s-PINP和s-CTX水平与BMD的相关性;利用受试者工作特征曲线(ROC)评价B-ALP、PTH、s-PINP和s-CTX水平与发生OPF的关系。**结果** OPF组腰椎(L₂₋₄)、股骨颈、桡骨远端三个部位BMD水平均低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。OPF组B-ALP、PTH、s-PINP、s-CTX水平均高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。OPF组腰椎(L₂₋₄)、股骨颈、桡骨远端三个部位BMD水平与B-ALP、PTH、s-PINP和s-CTX水平呈负相关($P<0.05$)。绘制ROC曲线,B-ALP、PTH、s-PINP、s-CTX诊断OPF发生的AUC分别为0.663、0.625、0.729、0.690,四者联合诊断OPF发生的AUC为0.856,高于四者单独诊断AUC值。**结论** OPF患者血清B-ALP、PTH、s-PINP、s-CTX与BMD密切相关,且对评估OPF发生具有较高的诊断价值。

[关键词] 老年骨质疏松; B-ALP; PTH; s-PINP; s-CTX

The serum levels of B - ALP, PTH, s - PINP and s - CTX in elderly patients with osteoporotic fractures

YANG Shuai*, ZHANG Hongxin, GU Xuejian

(Department of Orthopedics, First Central Hospital of Baoding, Baoding, Hebei, China, 071000)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the levels and clinical significance of serum bone-specific alkaline phosphatase (B-ALP), parathyroid hormone (PTH), N-terminal propeptide of type I procollagen (s-PINP) and carboxy-terminal cross-linking peptide of type I collagen (s-CTX) in elderly patients with osteoporotic fracture (OPF). **Methods** A total of 76 elderly OPF patients from March 2019 to March 2020 were enrolled as the OPF group, while another 80 osteoporotic (OP) patients without fracture admitted during the same period were enrolled as the control group. The bone mineral density (BMD) of lumbar spine (L₂₋₄), femoral neck and distal radius, B-ALP, PTH, s-PINP and s-CTX levels were compared between the two groups. The correlation between B-ALP, PTH, s-PINP, s-CTX levels and BMD was analyzed. The relationship between B-ALP, PTH, s-PINP and s-CTX levels with OPF was evaluated by receiver operating characteristic (ROC) curves. **Results** BMD levels of lumbar spine (L₂₋₄), femoral neck and distal radius in the OPF group were lower than those in the control group, the difference was statistically significant ($P<0.05$), while levels of B-ALP, PTH, s-PINP and s-CTX were higher than those in the control group, the difference was statistically significant ($P<0.05$). BMD levels of lumbar spine (L₂₋₄), femoral neck and distal radius were

基金项目:河北省卫生厅科研基金项目(20191713)

作者单位:保定市第一中心医院骨五科,河北,保定 071000

*通信作者:杨帅, E-mail:chuanguji57057@163.com

negatively correlated with levels of B-ALP, PTH, s-PINP and s-CTX in the OPF group ($P < 0.05$). According to the ROC curves, AUC values of B-ALP, PTH, s-PINP and s-CTX for diagnosis of OPF were 0.663, 0.625, 0.729 and 0.690, respectively. AUC of their combination was 0.856, higher than that of single indicator. **Conclusion** The serum B-ALP, PTH, s-PINP, and s-CTX of OPF patients are closely related to BMD, and have high diagnostic value for the evaluation of OPF.

[KEY WORDS] Elderly osteoporosis; B-ALP; PTH; s-PINP; s-CTX

骨质疏松症(Osteoporosis, OP)是全世界范围内发病率较高的代谢性骨疾病,其特征是骨量减少、骨脆性增加和骨显微组织结构破坏^[1]。OP的发生是由于骨形成和骨吸收之间的不平衡^[2],被认为是与骨折和其他严重的继发性健康问题有关的最常见的人类疾病之一。据报道,全球50岁以上的人群中,每2名女性和每4名男性中就有一位在其余生中会因OP而发生骨折^[3]。骨质疏松性骨折(Osteoporotic fracture, OPF),也称为脆性骨折,不同于由剧烈碰撞或意外造成的骨折,它指的是无创伤或小创伤发生的骨折^[4]。OP的传统诊断方法主要基于双能量X射线吸收仪(Dual energy X-ray absorptiometry, DEXA)和骨密度(Bone mineral density, BMD)评估^[5]。然而,很多患者往往不接受DEXA扫描,因此,迫切需要识别易于获得和有效的生物标志物以诊断OPF。血清骨特异性碱性磷酸酶(Bone-specific alkaline phosphatase, B-ALP)和I型前胶原氨基端前肽(N-terminal propeptide of type I procollagen, s-PINP)是骨形成的有效指标^[6-7];甲状旁腺激素(Parathyroid hormone, PTH)在骨重塑中发挥作用^[8];I型胶原羧基端交联肽(Carboxy-terminal cross-linking peptide of type I collagen, s-CTX)是骨吸收的常用指标^[9]。因此,本研究探讨老年OP患者血清B-ALP、PTH、s-PINP和s-CTX水平在诊断OPF中的价值,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2019年3月至2020年3月本院收治76例老年OPF患者作为OPF组,男21例,女55例;平均年龄(71.82 ± 6.34)岁;身体质量指数(Body Mass Index, BMI)为(24.38 ± 3.11) kg/m^2 ;OP病程8~17年,平均(13.15 ± 2.54)年。同期收治80例未发生骨折OP患者作为对照组。男27例,女53例;平均年龄(72.15 ± 5.94)岁;BMI为(23.49 ± 3.37) kg/m^2 ;OP病程8~16年,平均(12.48 ± 2.72)年。两组在一

般资料上比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。本研究获医院伦理委员会批准,按照自愿参加原则,研究对象均签署知情同意书。

纳入标准:①根据2017版《骨质疏松性骨折诊疗指南》^[10]相关标准确诊为OP,骨折患者依据影像学结果确诊;②年龄 ≥ 60 岁;③OP病程 > 7 年;④已签署知情同意书;⑤OPF组均为低能创伤导致。排除标准:①既往史严重心肺、肝肾功能不全;②患有其他影响骨代谢疾病;③使用影响骨代谢药物;④继发性OP;⑤免疫系统疾病患者;⑥神经精神疾病患者;⑦肿瘤患者;⑧近期使用激素类药物。

1.2 观测指标

①使用DEXA(上海品源博联医疗设备有限公司Dexa Pro-II)测定两组患者腰椎(L₂₋₄)、股骨颈、桡骨远端三个部位BMD;②抽取两组患者静脉血5 mL,3 000 r/min离心15 min收集血清,采用酶联免疫吸附法使用相应试剂盒(上海酶联生物科技有限公司)测量B-ALP、PTH、s-PINP和s-CTX水平。

1.3 统计学方法

使用SPSS 20.0统计学软件进行统计处理。计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,采用 t 检验;相关性分析采用Pearson相关分析;绘制受试者工作特征曲线ROC,计算曲线下面积AUC,评估B-ALP、PTH、s-PINP和s-CTX水平诊断OPF发生的效能。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者BMD水平比较

OPF组腰椎(L₂₋₄)、股骨颈、桡骨远端三个部位BMD水平均低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表1。

2.2 两组患者B-ALP、PTH、s-PINP和s-CTX水平比较

OPF组B-ALP、PTH、s-PINP、s-CTX水平均高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表2。

表1 两组患者BMD水平比较 ($\bar{x} \pm s$)Table 1 Comparison of BMD levels between 2 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	腰椎 _(L2-4)	股骨颈	桡骨远端
OPF组	76	0.79±0.18	0.64±0.13	0.42±0.09
对照组	80	0.87±0.21	0.71±0.15	0.46±0.11
t值		2.549	3.108	2.478
P值		0.012	0.002	0.014

表2 两组患者B-ALP、PTH、s-PINP和s-CTX水平比较 ($\bar{x} \pm s$)Table 2 Comparison of b-alp, PTH, s-pinp and s-ctx levels between 2 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	B-ALP (U/L)	PTH (pg/mL)	s-PINP (ng/mL)	s-CTX (ng/mL)
OPF组	76	76.31±21.65	59.81±22.13	58.27±18.34	0.62±0.13
对照组	80	68.28±18.74	52.14±20.49	47.95±15.77	0.58±0.09
t值		2.481	2.248	3.774	2.244
P值		0.014	0.026	<0.001	0.026

表3 B-ALP、PTH、s-PINP和s-CTX水平与BMD水平相关性

Table 3 Correlation between b-alp, PTH, s-pinp, s-ctx and BMD

组别		腰椎 _(L2-4) BMD		股骨颈 BMD		桡骨远端 BMD	
		r值	P值	r值	P值	r值	P值
OPF组	B-ALP	-0.327	<0.001	-0.431	<0.001	-0.297	0.001
	PTH	-0.286	0.005	-0.319	<0.001	-0.252	0.008
	s-PINP	-0.461	<0.001	-0.523	<0.001	-0.408	<0.001
	s-CTX	-0.417	<0.001	-0.498	<0.001	-0.362	<0.001
对照组	B-ALP	-0.092	0.168	-0.172	0.011	-0.115	0.264
	PTH	-0.079	0.467	-0.087	0.324	-0.062	0.513
	s-PINP	-0.104	0.082	-0.291	0.004	-0.105	0.173
	s-CTX	-0.096	0.318	-0.260	0.009	-0.810	0.421

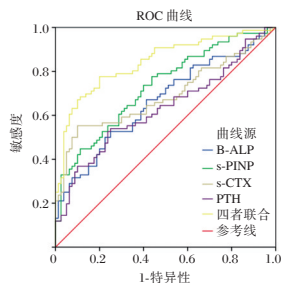


图1 B-ALP、PTH、s-PINP和s-CTX水平诊断OPF发生的ROC曲线

Figure 1 ROC curve of OPF predicted by b-alp, PTH, s-pinp and s-ctx levels

表4 B-ALP、PTH、s-PINP和s-CTX水平诊断OPF发生的ROC曲线分析各数值

Table 4 ROC curve analysis of b-alp, PTH, s-pinp and s-ctx levels predicting the occurrence of OPF

	截点值	AUC	95%CI
B-ALP(U/L)	80.48	0.663	0.583~0.737
PTH(pg/mL)	67.10	0.625	0.544~0.701
s-PINP(ng/mL)	48.21	0.729	0.652~0.797
s-CTX(ng/mL)	0.66	0.690	0.611~0.761
四者联合		0.856	0.783~0.934

2.3 B-ALP、PTH、s-PINP和s-CTX水平与BMD水平相关性

OPF组腰椎_(L2-4)、股骨颈、桡骨远端三个部位BMD水平与B-ALP、PTH、s-PINP和s-CTX水平呈显著负相关($P<0.05$);对照组患者股骨颈BMD水平与B-ALP、s-PINP和s-CTX水平呈显著负相关($P<0.05$),腰椎_(L2-4)、桡骨远端BMD水平与B-ALP、s-PINP和s-CTX水平无相关性($P>0.05$),三个部位BMD水平与PTH均无相关性($P>0.05$)。见表3。

2.4 B-ALP、PTH、s-PINP和s-CTX水平对OPF发生的诊断价值

四者联合诊断OPF发生的AUC为0.856,高于三者单独诊断AUC值。见图1、表4。

3 讨论

老年OP是一种与年龄相关的疾病,已成为全世界关注的重要健康问题^[11]。目前临床中以BMD值作为诊断和检测OP的主要有效指标,其具有较好的特异性。而随着老年OP患者疾病程度加剧,OPF发生风险逐渐提高^[12]。在本研究中,OPF组腰椎_(L2-4)、股骨颈、桡骨远端三个部位BMD水平均显著低于对照组,与崔建中等^[13]研究结果一致,提示OPF患者骨量严重减少,骨皮质和骨小梁不能达到合理承重需求,因而低能创伤即会造成骨折。但是BMD测量主要以DEXA为主,且变化非常缓慢,通常要数月甚至数年的时间才能观察到统计学上的变化,不能作为短期连续观测指标,具有一定局限性。因此,需要寻找其他易得且有效指标对老年OP患者病情进行监测,以及及时做好预防措施,降低OPF发生率。

总碱性磷酸酶(Total alkaline phosphatase, TAP)是广泛使用的生化指标,已被证明是具有正常肝功能受试者骨形成的有效指标^[14]。而与TAP相比,定量血清中的B-ALP能更好地体现骨形成

指数。B-ALP在成骨细胞的细胞表面表达,其合成与骨形成率呈正相关,在被磷脂酶裂解后释放到血液循环中^[15]。而本研究中OPF组B-ALP水平高于对照组,与王弢等^[16]研究一致。提示B-ALP能通过反映机体骨形成状态体现OP患者疾病进展,B-ALP水平越高,OP程度越严重,进而可能增加OPF发生风险。

PTH由甲状旁腺分泌,在钙稳态和骨重塑中起多种作用。甲状旁腺素的分泌受细胞外钙化水平和其他体液因子的调节,通过直接或间接调节基因表达发挥生物学效应。PTH介导蛋白激酶C和c-fos信号通路,通过胰岛素样生长因子I、II和IGF结合蛋白3等生长因子,刺激成骨细胞和破骨细胞的增殖和分化,促进骨钙素、纤连蛋白和骨胶原的合成^[17]。在本研究结果说明OPF组患者促骨形成状态更高,骨量更少,因而导致骨折发生。

s-PINP是从原胶原中裂解下来并在骨形成过程中释放到循环系统中,能反应成骨细胞的活性以及成骨速率^[18];而s-CTX是I型胶原蛋白的降解产物,在骨吸收过程中释放到循环系统中^[19],因此被认为是骨吸收的指标。在本研究结果表明OPF患者骨周转率更高,降低BMD致使骨折发生。

本研究结果显示,B-ALP、PTH、s-PINP和s-CTX联合诊断OPF发生的AUC值高于四者单独诊断,效能更高。通过对患者血清B-ALP、PTH、s-PINP和s-CTX进行检测,能较好地对OPF发生进行监测,有效进行针对性预防,避免OPF发生。

综上所述,OPF患者B-ALP、PTH、s-PINP和s-CTX水平升高,且与BMD水平呈负相关,对OPF患者进行B-ALP、PTH、s-PINP和s-CTX监测有助于评估OPF发生风险,对临床中预防OPF具有重要价值。

参考文献

- [1] Ge DW, Wang WW, Chen HT, et al. Functions of microRNAs in osteoporosis[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2017, 21(21):4784-4789.
- [2] Florencio-Silva R, Sasso GR, Sasso-Cerri E, et al. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells[J]. Biomed Res Int, 2015, 2015(1):421746.
- [3] Qadir A, Liang S, Wu Z, et al. Senile Osteoporosis: The Involvement of Differentiation and Senescence of Bone Marrow Stromal Cells[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(1):349.
- [4] Lu J, Ren Z, Liu X, et al. Osteoporotic Fracture Guidelines and Medical Education Related to the Clinical Practices: A Nationwide Survey in China[J]. Orthop Surg, 2019, 11(4):569-577.
- [5] Du JP, Liu JJ, Fan Y, et al. Surgery for Multisegment Thoracolumbar Mild Osteoporotic Fractures: Revised Assessment System of Thoracolumbar Osteoporotic Fracture[J]. World Neurosurg, 2018, 114(1): e969-e975.
- [6] Diemar SS, Møllehave LT, Quardon N, et al. Effects of age and sex on osteocalcin and bone-specific alkaline phosphatase-reference intervals and confounders for two bone formation markers[J]. Arch Osteoporos, 2020, 15(1):26.
- [7] Kim TY, Bauer DC, McNabb BL, et al. Comparison of BMD Changes and Bone Formation Marker Levels 3 Years After Bisphosphonate Discontinuation: FLEX and HORIZON-PFT Extension I Trials[J]. J Bone Miner Res, 2019, 34(5):810-816.
- [8] Zhao Y, Zhang G. A computational study of the dual effect of intermittent and continuous administration of parathyroid hormone on bone remodeling[J]. Acta Biomater, 2019, 93:200-209.
- [9] Lehrskov LL, Kjeldsen S, Lyngbæk MP, et al. Interleukin-6 May Not Affect Bone Resorption Marker CTX or Bone Formation Marker PINP in Humans[J]. J Endocr Soc, 2020, 4(9):bvaa093.
- [10] 中华医学会骨科学分会骨质疏松学组. 骨质疏松性骨折诊疗指南[J]. 中华骨科杂志, 2017, 37(1):1-10.
- [11] Wang HX, Mo S, Yang L, et al. Effectiveness associated with different therapies for senile osteoporosis: a network Meta-analysis[J]. J Tradit Chin Med, 2020, 40(1):17-27.
- [12] 田志, 杨召旭, 范静, 等. 老年骨折患者血清25OHD和PTH水平与骨质疏松程度的相关性[J]. 重庆医学, 2018, 47(6):767-769.
- [13] 崔建中, 吴九如, 陈永智, 等. 骨质疏松性骨折的临床预警监测[J]. 中国老年学杂志, 2019, 39(24):6029-6031.
- [14] Marini S, Barone G, Masini A, et al. The Effect of Physical Activity on Bone Biomarkers in People With Osteoporosis: A Systematic Review[J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2020, 11(1):585689.
- [15] Nakatoh S. The importance of assessing the rate of bone turnover and the balance between bone formation and bone resorption during daily teriparatide administration for osteoporosis: a pilot study[J]. J Bone Miner Metab, 2016, 34(2):216-224.
- [16] 王弢, 冯世庆. 老年骨质疏松性骨折患者血清生化指标检测及风险评估[J]. 中国实验诊断学, 2016, 20(4):618-619, 620.
- [17] Canalis E. MANAGEMENT OF ENDOCRINE DISEASE: Novel anabolic treatments for osteoporosis[J]. Eur J Endocrinol, 2018, 178(2): R33-R44.
- [18] Hernandez AV, Pérez-López FR, Piscoya A, et al. Comparative efficacy of bone anabolic therapies in women with postmenopausal osteoporosis: A systematic review and network meta-analysis of randomized controlled trials[J]. Maturitas, 2019, 129(1):12-22.
- [19] He JQ, Xu SB, Zhang BZ, et al. Gut microbiota and metabolite alterations associated with reduced bone mineral density or bone metabolic indexes in postmenopausal osteoporosis[J]. Aging (Albany NY), 2020, 12(9):8583-8604.

垂体瘤患者血清 IGF-1、IGFBP-3 水平表达及其临床意义

周相军^{1*} 朱娜娜² 李浩¹

[摘要] **目的** 分析垂体瘤患者血清胰岛素样生长因子-1(IGF-1)和胰岛素样生长因子结合蛋白(IGFBP-3)水平表达及其临床意义。**方法** 将本院自2014年1月至2018年7月收治的60例垂体瘤患者纳入研究范围,选取同期于本院行体检的健康志愿者60例设为对照组;放射免疫法检测垂体瘤患者及对照组血清 IGF-1、IGFBP-3 水平表达水平,并计算 IGF-1/IGFBP-3 比值,比较2组血清 IGF-1、IGFBP-3 及 IGF-1/IGFBP-3 比值水平,并将垂体瘤患者按不同临床特征分组,比较不同临床特征患者血清 IGF-1、IGFBP-3 及 IGF-1/IGFBP-3 比值。**结果** 垂体瘤 IGF-1 表达水平及 IGF-1/IGFBP-3 比值均显著高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),IGFBP-3 表达水平比较差异无统计学意义($P>0.05$);不同性别、不同肿瘤直径及病理类型的垂体瘤患者 IGF-1、IGFBP-3 表达水平及 IGF-1/IGFBP-3 比值比较差异无统计学意义($P>0.05$);侵袭性垂体瘤患者 IGF-1 表达水平及 IGF-1/IGFBP-3 比值显著高于非侵袭性垂体瘤患者差异有统计学意义($P<0.05$);进一步经 ROC 曲线分析,IGF-1 表达水平及 IGF-1/IGFBP-3 比值对垂体瘤侵袭性有优势明显预测价值(AUC=0.974, 0.936),IGF-1、IGF-1/IGFBP-3 比值预测垂体瘤侵袭性的敏感度分别 100.00%、86.20%,特异度分别为 93.50%、87.10%。**结论** IGF-1、IGF-1/IGFBP-3 比值或对垂体瘤侵袭性发挥有一定预测价值,值得临床重视。

[关键词] 垂体瘤;胰岛素样生长因子-1;胰岛素样生长因子结合蛋白-3

Clinical significance of serum IGF-1 and IGFBP-3 levels in patients with pituitary tumors

ZHOU Xiangjun^{1*}, ZHU Nana², LI Hao¹

(1. Neurosurgery Department of Xinyang Central Hospital, Xinyang, Henan, China, 464000; 2. Disinfection Supply Center of Xinyang Central Hospital, Xinyang, Henan, China, 464000)

[ABSTRACT] **Objective** To analyze the expression levels and clinical significance of serum insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and insulin-like growth factor binding protein (IGFBP-3) in patients with pituitary tumors. **Methods** 60 patients with pituitary tumors admitted to the hospital from January 2014 to July 2018 were enrolled in the study. Another 60 healthy volunteers who came to our hospital for healthy examination were selected as the control group. The radioimmunoassay was used to detect the expression levels of serum IGF-1 and IGFBP-3, and the ratio of IGF-1/IGFBP-3 was calculated. The serum IGF-1, IGFBP-3 and ratio of IGF-1/IGFBP-3 were compared between the two groups. And patients with pituitary tumors were grouped according to different clinical features, and the serum IGF-1, IGFBP-3 and ratio of IGF-1/IGFBP-3 were compared among patients with different clinical features. **Results** The expression levels of IGF-1 and the ratio of IGF-1/IGFBP-3 in pituitary tumors were significantly higher than those in the healthy control group, but there was no significant difference in the expression level of IGFBP-3 ($P>0.05$). There was no significant difference

基金项目:河南省科技计划项目(162102210403)

作者单位:1. 信阳市中心医院神经外科,河南,信阳 464000

2. 信阳市中心医院消毒供应中心,河南,信阳 464000

*通信作者:周相军, E-mail: 3619873299@qq.com

in the expression levels of IGF-1 and IGFBP-3 and the ratio of IGF-1/IGFBP-3 among patients with pituitary tumors of different genders and different tumor diameters and pathological types ($P>0.05$). The levels of IGF-1 and the ratio of IGF-1/IGFBP-3 in patients with invasive pituitary tumors were significantly higher than those in patients with non-invasive pituitary tumors ($P<0.05$). Further analysis by ROC curve shows only the level of IGF-1 and IGF-1/IGFBP-3 ratio have obvious predictive value on invasiveness of pituitary tumors (AUC = 0.974, 0.936), and the sensitivities of IGF-1 and the IGF-1/IGFBP-3 ratio in predicting the invasiveness of pituitary tumors were 100.00% and 86.20% respectively, and the specificities were 93.50 % and 87.10 % respectively. **Conclusion** The ratio of IGF-1/IGFBP-3 may have a certain predictive value on invasiveness of pituitary tumors, which deserves clinical attention.

[KEY WORDS] Pituitary tumors; Serum IGF-1; IGFBP-3

垂体瘤约占颅内肿瘤的10%~25%,具高分化特征,按其分泌的激素类型,临床可分为生长激素(growth hormone, GH)腺瘤、泌乳素(prolactin, PRL)腺瘤、促肾上腺皮质激素(adrenocorticotropin hormone, ACTH)腺瘤、无功能(nonfunctioning, NF)腺瘤等病理类型^[1]。不同肿瘤类型的临床表现特征各异,虽多数均生长缓慢,但仍有少数表现为恶性生物学行为,侵袭性生长速度快,对常规手术及放射、药物治疗等无反应^[2]。胰岛素样生长因子-1(insulin-like growth factor i, IGF-1)和胰岛素样生长因子结合蛋白(Insulin-like growth factor binding protein-3, IGFBP-3)均是胰岛素样生长因子家族(insulin-like growth factors, IGFs)成员,研究指出IGFs可通过与其对应受体结合,激活信号传导通路及通路中涉及到的各种细胞因子,促进细胞有丝分裂及分化,在多种肿瘤疾病的发生、发展进程中扮演重要角色^[3]。但关于IGF-1、IGFBP-3在垂体瘤中的表达及其临床意义类报道相对鲜见。本研究将分析垂体瘤患者血清IGF-1、IGFBP-3水平表达及其临床意义,旨在为垂体瘤的临床诊治提供依据,具体报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

研究对象为本院自2014年1月至2018年7月收治的60例垂体瘤患者,其中男21例,女39例,平均年龄(44.27 ± 10.12)岁;肿瘤直径4~18 mm,平均(12.14 ± 3.08)mm,34例肿瘤直径 <10 mm,26例 ≥ 10 mm;Knosp分级3~4级(侵袭性)29例,Knosp分级0~2级(非侵袭性)31例;PRL 15例,ACTH 17例,GH 14例,NF 14例。所纳入患者均经临床及手术病理确诊,并排除肝功能异常患者。另选同期于本院行体检的健康志愿者60例设为对照组,其中男27例,女33例,平均年龄(46.01 ± 9.87)

岁;2组性别、年龄比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。本研究经患者知情同意并签署知情同意书,研究方案获本院伦理委员会审批同意。

纳入标准:①垂体瘤患者均经组织病理确诊^[4];②对照组患者体检结果正常,无肿瘤病史、重症感染病史、移植史等严重内外科病史。排除标准:①肝肾功能异常;②合并感染性疾病患者;③垂体瘤患者合并垂体瘤以外的其他肿瘤疾病;④血清样本采集时处于感染急性期;⑤合并自身免疫性疾病史;⑥合并免疫缺陷疾病。

1.2 方法

1.2.1 试剂/仪器

IGF-1、IGFBP-3放射免疫试剂盒均购自比利时Diasource公司,放射免疫计数仪(BXS05-SN-6105)购自北京北信科仪分析仪器有限公司。

1.2.2 检测方法

采集2组研究对象晨间空腹静脉血3.5 mL,3 500 r/min条件下离心8 min,分离血清后将样本分装成2份,置于 -80°C 冰箱保存。IGF-1、IGFBP-3测定时,均预先稀释样本及质控样品(IGF-1标准品、质控样本及样本均为50 μL , IGFBP-3为10 μL),将标准品、质控样品及样品分别加入对应剂量的缓冲液(IGF-1:200 μL 、IGFBP-3:1 000 μL),旋涡混合器混匀后,25 $^{\circ}\text{C}$ 温育30 min,再分别加入 ^{125}I 标记IGF-1(1 200 μL)或 ^{125}I 标记IGFBP-3(50 μL),旋涡混合器后25 $^{\circ}\text{C}$ 温育120 min,清洗3次后, γ 放射免疫计数器测定,每管测定时间为60 s。

1.3 统计学分析

应用SPSS 19.0进行统计学分析,计量资料均用($\bar{x}\pm s$)描述,多组间采用方差分析,两两比较采用 t 检验;并绘制受试者工作特征曲线(ROC)分析IGF-1、IGFBP-3及IGF-1/IGFBP-3比值对垂体瘤侵袭性的预测价值; $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 垂体瘤患者 IGF-1、IGFBP-3 表达水平

垂体瘤 IGF-1 表达水平及 IGF-1/IGFBP-3 比值均显著高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$), IGFBP-3 表达水平比较差异无统计学意义($P>0.05$)。见表1。

表1 垂体瘤患者 IGF-1、IGFBP-3 表达水平 ($\bar{x} \pm s, n=60$)
Table 1 Expression levels of IGF-1 and IGFBP-3 in patients with pituitary tumors ($\bar{x} \pm s, n=60$)

组别	IGF-1 (ng/mL)	IGFBP-3 (ng/mL)	IGF-1/ IGFBP-3
垂体瘤组	243.84±63.18	4136.12±686.56	0.06±0.02
对照组	186.18±58.83	4098.10±825.05	0.05±0.02
<i>t</i> 值	-5.173	-0.275	-3.694
<i>P</i> 值	0.000	0.784	0.000

2.2 不同临床特征的垂体瘤患者 IGF-1、IGFBP-3 表达水平

不同性别、不同肿瘤直径及病理类型的垂体瘤患者 IGF-1、IGFBP-3 表达水平及 IGF-1/IGFBP-3 比值比较差异无统计学意义($P>0.05$);侵袭性垂体瘤患者 IGF-1 表达水平及 IGF-1/IGFBP-3 比值显著高于非侵袭性垂体瘤患者,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表2。

表2 不同临床特征的垂体瘤患者 IGF-1、IGFBP-3 表达水平
Table 2 Expression levels of IGF-1 and IGFBP-3 in patients with pituitary tumors of different clinical features

临床特征	IGF-1 (ng/mL)	IGFBP-3 (ng/mL)	IGF-1/ IGFBP-3
性别			
男	242.50±66.66	4221.18±721.34	0.06±0.02
女	244.56±62.11	4090.44±672.20	0.06±0.02
<i>t</i> 值	-0.117	0.686	-0.281
<i>P</i> 值	0.907	0.497	0.780
肿瘤直径			
<10 mm	247.92±58.11	4082.94±705.97	0.06±0.02
≥10 mm	238.50±70.09	4205.84±667.56	0.06±0.02
<i>t</i> 值	0.555	-0.689	0.743
<i>P</i> 值	0.581	0.494	0.461
侵袭性			
侵袭性	296.20±36.49	3979.42±715.71	0.08±0.02
非侵袭性	194.85±38.45	4282.84±634.78	0.05±0.01
<i>t</i> 值	10.475	-1.733	7.061
<i>P</i> 值	0.000	0.089	0.000
病理类型			
PRL	218.49±51.89	4356.98±686.03	0.05±0.02
ACTH	253.71±65.01	4148.37±656.44	0.06±0.020
GH	227.18±61.93	4165.36±441.98	0.06±0.02
NF	275.67±62.63	3855.70±874.43	0.08±0.03
<i>F</i> 值	1.979	0.279	2.222
<i>P</i> 值	0.148	0.758	0.118

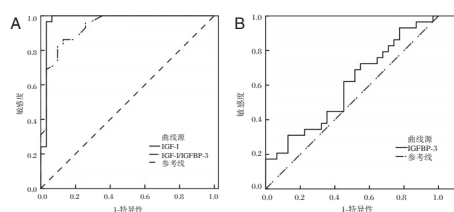
2.3 IGF-1、IGFBP-3 表达水平及 IGF-1/IGFBP-3 比值对垂体瘤侵袭性的预测价值分析

经 ROC 曲线分析,IGF-1 表达水平及 IGF-1/IGFBP-3 比值对垂体瘤侵袭性有优势明显预测价值,敏感度为 100%、特异度为 93.50%;IGFBP-3 表达水平对垂体瘤侵袭性无明显预测价值。见表3、图1。

表3 IGF-1、IGFBP-3 表达水平及 IGF-1/IGFBP-3 比值对垂体瘤侵袭性的预测价值分析

Table 3 Predictive value of expression levels of IGF-1 and IGFBP-3 and ratio of IGF-1/IGFBP-3 on invasiveness of pituitary tumors

指标	AUC	约登指数	Cut-off	敏感度(%)	特异度(%)
IGF-1	0.974(0.000-1.000)	0.935	233.411	100.00	93.50
IGFBP-3	0.596(0.452-0.740)	0.181	3718.396	30.00	87.10
IGF-1/IGFBP-3 比值	0.936(0.877-0.955)	0.733	0.0585	86.20	87.10



注:A 为 IGF-1、IGF-1/IGFBP-3; B 为 IGFBP-3。

图1 ROC 曲线分析

Figure 1 ROC curve analysis

3 讨论

垂体瘤是发生率仅次于脑胶质瘤、脑膜瘤的颅内良性肿瘤疾病,起源于腺垂体,但仍有部分垂体瘤表现处恶性生物学特征^[5-6]。此类肿瘤组织生

长迅速,可累及海绵窦、颅底骨板等组织构造,对手术、内分泌等药物、放疗等治疗无反应,有效性不佳,预后较差^[7]。探究有效的生物学指标预测垂体瘤侵袭性十分必要,或可为疾病临床诊治及预后评估提供新思路。IGFs 系统包括 2 个 IGF (IGF-1, IGF-2)、2 个 IGF 受体(IGF-receptor 1, IGF- r1; IGF-receptor 2, IGF- r2)和 6 个与 IGF 具有高亲和力的 IGF 结合蛋白(IGF-binding proteins, IGFBPs)^[8]。IGF-1 则是 IGFs 系统中与胰岛素原高度同源的多肽因子,其参与血糖调节,在细胞增殖、分化中以发挥重要价值^[9]。虽机体所有组织均可产生 IGF-1,但不会进入血液循环,主要在组织内部发挥自身分泌及旁分泌作用;而血液中的 IGF-1 主要经肝脏合

成及分泌,再经血液循环至机体各个组织器官发挥内分泌作用^[10]。研究指出,IGF-1可通过与其受体结合激活丝裂原激活蛋白酶途径(mitogen-activated protein kinase, MAPK)、磷脂酰肌醇3激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)信号传导途径发挥作用,促进细胞有丝分裂、刺激RNA、DNA合成,促进细胞周期蛋白D1表达,加速细胞从G1期进入S期^[11-12]。本研究中,垂体瘤患者血清IGF-1显著高于健康对照组,这与高志强等^[13]的报道结论相似,其亦指出,非小细胞肺癌患者血清IGF-1表达水平要显著高于健康对照组。

本研究与既往报道^[13]结论不符,分析或因研究对象个体差异所致,加之本研究样本数量小,若进一步扩大样本量是否可将差异显著化仍有待深入探究。研究指出,IGFBP-3作为分泌蛋白家族成员之一,可竞争性与IGF-1结合抑制IGF-I的作用,降低生物利用度,是IGFs系统发挥促肿瘤形成作用中不可或缺的主要调节蛋白,主要通过对IGFs生物活性的调节,对肿瘤细胞的增殖、分化及凋亡发挥促进或抑制作用^[14]。且IGFBP-3与IGF-1结合后便可阻断IGF-1激活信号通路的传导,抑制IGF-1对细胞有丝分裂、细胞增殖、分化的促进作用,恶性肿瘤疾病中IGFBP-3多呈低表达现象^[15]。综合本研究结论,分析或因IGFs与其特异性受体之间的部分相互作用虽受IGFBPs固有的结构修饰调控,但IGFBPs还具有独立于IGF的生物学效应,其发挥调节作用不单纯依靠IGF-1,组织蛋白酶、基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)等均可影响IGFBP-3表达有关。

本研究这与台湾一项针对乳腺癌患者的研究^[16]结论相似,其报道绝经期乳腺癌患者IGF-1/IGFBP-3比值显著高表达,且IGF-1/IGFBP-3比值与乳腺癌风险显著正相关,均提示肿瘤患者或存在IGF-1/IGFBP-3比值异常高表达现象。本研究进一步行ROC曲线分析,结果显示,IGF-1、IGF-1/IGFBP-3比值对垂体瘤侵袭性均有较高的预测价值。由此可见,IGF-1、IGF-1/IGFBP-3比值或可在疾病诊治及预后评估中发挥一定预测价值。

综上所述,垂体瘤患者存在明显IGF-1、IGF-1/IGFBP-3比值异常高表达情况,并可对肿瘤侵袭性发挥优势预测价值,值得临床重视。但基于本研究在样本数量上的局限性、且数据代表性尚有欠缺,加之其为回顾性分析,未能通过长时程随访进一步分析其对预后的评估价值等,IGF-1、IGFBP-3在垂体瘤患者中的

表达情况及临床意义仍有极大深入探究空间。

参考文献

- [1] Aflorei ED, Márta K. Epidemiology and etiopathogenesis of pituitary adenomas[J]. J Neuro Oncol, 2014, 117(3):379-394.
- [2] Cuevas-Ramos D, Fleseriu M. Somatostatin receptor ligands and resistance to treatment in pituitary adenomas[J]. J Molec Endocrinol, 2014, 52(3):R223-R240.
- [3] 张海峰, 申兴斌, 刘莎莎, 等. 下调胰岛素样生长因子-1表达对人胃癌细胞增殖和侵袭及迁移的影响[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2017, 24(1):16-22.
- [4] 薛贵生, 扈玉华, 吴建梁, 等. 不同级别恶性脑胶质瘤中胰岛素样生长因子结合蛋白-3的表达差异[J]. 中华实验外科杂志, 2015, 32(5):1069-1071.
- [5] 阳吉虎, 黄国栋, 李维平. 侵袭性垂体瘤的治疗策略[J]. 中华神经医学杂志, 2018, 17(3):320-325.
- [6] 陈汉文, 孙冰, 孙海玲, 等. 垂体瘤患者术后垂体功能减退危险因素分析研究[J]. 中国全科医学, 2018, 21(11):1296-1299.
- [7] Kaaks R, Johnson T, Tikk K, et al. Insulin-like growth factor I and risk of breast cancer by age and hormone receptor status - A prospective study within the EPIC cohort[J]. Int J Cancer, 2013, 134(11):2683-2690.
- [8] Holdaway IM, Mason BH, Lethaby AE, et al. Serum insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding protein-3 following chemotherapy for advanced breast cancer[J]. Anz J Surg, 2015, 73(11):905-908.
- [9] 赵鸿梅, 王燕庆, 吴小利, 等. 胰岛素样生长因子系统在肿瘤诊治中的应用[J]. 中华检验医学杂志, 2016, 39(8):575-577.
- [10] Oudega M, Xu XM, Guénard V, et al. A combination of insulin-like growth factor-I and platelet-derived growth factor enhances myelination but diminishes axonal regeneration into Schwann cell grafts in the adult rat spinal cord[J]. Glia, 1997, 19(3):247-258.
- [11] Kurek R, Tunn UW, Eckart O, et al. The significance of serum levels of insulin-like growth factor-I in patients with prostate cancer[J]. BJU Int, 2000, 85(1):125-129.
- [12] Kim WY, Jin Q, Oh SH, et al. Elevated epithelial insulin-like growth factor expression is a risk factor for lung cancer development[J]. Cancer Res, 2009, 69(18):7439-7448.
- [13] 高志强, 储天晴, 赵怡卓, 等. 胰岛素样生长因子-1、胰岛素样生长因子受体-1和胰岛素样生长因子结合蛋白-3在非小细胞肺癌患者血清中的表达及其临床意义[J]. 上海医学, 2016, 39(9):563-565.
- [14] Johnson MA, Firth SM. IGFBP-3: A cell fate pivot in cancer and disease[J]. Growth Horm IGF Res, 2014, 24(5):164-173.
- [15] Mayo JC, Hevia D, Quiros-Gonzalez I, et al. IGFBP3 and MAPK/ERK signaling mediates melatonin-induced anti-tumor activity in prostate cancer[J]. J Pineal Res, 2017, 62(1):117-123.
- [16] Ranke, Michael B. Insulin-like growth factor binding-protein-3 (IGFBP-3)[J]. Best Pract Clin Endocrinol Metabolism, 2015, 29(5):701-711.

TREM-1、H₂S 联合 ACE2 检测对重症急性胰腺炎预后的评估价值

董玉^{1*} 闫凯² 程海玲¹

[摘要] 目的 研究髓样细胞触发受体-1 (TREM-1)、硫化氢(H₂S)联合血管紧张素转化酶2 (ACE2)检测对重症急性胰腺炎预后的评估价值。方法 选取2017年6月至2019年6月本院收治的58例重症急性胰腺炎患者作为研究组,按照治疗结局分为死亡组($n=18$)和生存组($n=40$),选取45例同期于本院接受健康体检结果正常者作为对照组。比较各组间TREM-1、H₂S及ACE2表达水平差异,采用Logistic回归分析影响重症急性胰腺炎患者预后生存的危险因素,采用ROC曲线分析TREM-1、H₂S、ACE2单项及联合检测水平对重症急性胰腺炎预后的预测价值。结果 研究组TREM-1、H₂S及ACE2水平均高于对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。肺脏衰竭、心血管系统衰竭、APACHE II、TREM-1、H₂S及ACE2水平为影响重症急性胰腺炎患者预后生存的多因素($P<0.05$)。TREM-1、H₂S、ACE2评分及三者联合曲线下面积分别为0.839、0.789、0.763、0.963,各指标曲线下面积以联合检测最大。结论 TREM-1、H₂S及ACE2水平在重症急性胰腺炎患者中显著升高,联合三者检测可作为评估患者预后生存的有效手段,临床上可检测其水平并及时进行干预,进而提高生存率。

[关键词] TREM-1; H₂S; ACE2; 重症急性胰腺炎

The value of TREM-1, H₂S combined with ACE2 in the prognosis of severe acute pancreatitis

DONG Yu^{1*}, YAN Kai², CHENG Hailing¹

(1. Department of Critical Care Medicine, Nanjing Tongren Hospital, Nanjing, Jiangsu, China, 210000;

2. Hepatobiliary Pancreatic Center of Zhongda Hospital Southeast University, Nanjing, Jiangsu, China, 210009)

[ABSTRACT] **Objective** To study the value of triggering receptor expressed on myeloid cells 1 (TREM-1), hydrogen sulfide (H₂S) combined with angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in estimating the prognosis of severe acute pancreatitis. **Methods** 58 patients with severe acute pancreatitis admitted to this hospital from June 2017 to June 2019 were selected as the study group, and the patients were divided into the death group ($n=18$) and the survival group ($n=40$) according to the treatment outcome. 45 people with normal physical examination results in our hospital during the same period were selected as the control group. The differences in the expression levels of TREM-1, H₂S and ACE2 between the groups were compared. Logistic regression was used to analyze the risk factors that affect the prognosis of patients with severe acute pancreatitis. The ROC curve was used to analyze the predictive value of TREM-1, H₂S and ACE2 individual or three combined detection for the prognosis of patients with severe acute pancreatitis. **Results** The levels of TREM-1, H₂S and ACE2 in the study group were higher than those in the control group, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). Pulmonary failure, cardiovascular system failure, APACHE II, TREM-1, H₂S and ACE2 levels are multiple factors affecting the prognosis of patients with severe acute pancreatitis ($P<0.05$). The areas under the TREM-1, H₂S, ACE2 curves and the three combined curves were 0.839, 0.789, 0.763, and 0.963, re-

基金项目:江苏省自然科学基金项目(BK20171235)

作者单位:1.南京市同仁医院重症医学科,江苏,南京 210000

2.东南大学附属中大医院肝胆胰中心,江苏,南京 210009

*通信作者:董玉, E-mail: guo377437wang063@163.com

spectively. The area under the curve of the three combined detection was the largest. **Conclusion** The levels of TREM-1, H₂S, and ACE2 significantly increased in patients with severe acute pancreatitis. The combined detection of the three can be used as an effective means to assess the prognosis of patients. Clinically, their levels can be detected and timely interventions can be performed to improve the survival rate.

[KEY WORDS] TREM-1; H₂S; ACE2; Severe acute pancreatitis

急性胰腺炎是胰腺因胰蛋白酶的自身消化作用而引起的急性化学性炎症,临床以急性上腹痛、恶心呕吐、发热、血尿淀粉酶增高为特征^[1]。轻度急性胰腺炎如果能及时救治,一般可完全康复,不留后遗症,但若未早期救治可发展为重症急性胰腺炎,引起胰腺功能不全,导致胰痿、胰腺和胰周坏死组织继发感染、腹腔间隔室综合征等,威胁患者生命健康^[2]。目前重症急性胰腺炎的病情诊断及评估主要依赖于实验室、CT等检查,但其存在一定局限性,因此如何早期有效评估并干预重症急性胰腺炎患者病情对改善其预后具有重要价值。新近研究发现,髓样细胞触发受体-1(triggering receptor expressed on myeloid cells 1, TREM-1)为介导创伤、感染后炎症反应的关键介质,在胰腺炎患者病情发展过程中发挥显著作用。而硫化氢(H₂S)、血管紧张素转化酶2(angiotensin converting enzyme, ACE2)亦在胰腺炎患者中显著上升^[3]。本研究就TREM-1、H₂S联合ACE2对重症急性胰腺炎预后的评估价值进行研究,旨在为临床治疗提供思路,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2017年6月至2019年6月本院收治的58例重症急性胰腺炎患者,作为研究组。其中男性30例,女性28例,平均年龄(44.35±6.71)岁。纳入标准:①符合重症急性胰腺炎术后肠痿的诊断标准^[4];②所有患者临床资料完整且均知情且同意本研究。排除标准:①复发胰腺炎者;②合并心、肝、肾等器官和系统严重疾病或恶性肿瘤者;③合并严重精神疾病或痴呆的患者;④并发其他病毒、支原体等感染性疾病者。按照治疗结局分为死亡组($n=18$)和生存组($n=40$)。

同时选取45例同期于本院接受健康体检结果正常者作为对照组,其中男25例,女20例,平均年龄(44.41±6.78)岁。研究组与对照组一般资料比较差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。本研究已获得医院医学伦理委员会批准通过。

1.2 治疗方法

所有患者入组后均给予禁食水、胃肠减压抑酸抑酶、生长抑素、抗生素预防感染等常规治疗;严密监测生命体征变化;对症营养支持治疗,维持水、电解质及酸碱失衡;必要时行血液透析、机械通气等器官支持治疗,根据患者具体病情给予手术治疗。

1.3 检测方法

所有患者入组后采集清晨空腹静脉血5 mL,离心(3 500 r/min, 5 min)后分离血清,采用敏感硫酸电极法测定血清H₂S浓度,贝克曼DXC600全自动生化分析仪测定血清ACE2水平,试剂盒购自上海罗氏诊断产品有限公司。酶联免疫吸附法测定TREM-1浓度,试剂来自北京美康生物技术研究中心有限责任公司,根据试剂盒说明书步骤操作。

1.4 统计学方法

采用SPSS 22.0软件进行数据分析。计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 t 检验,多组间比较采用 F 检验;计数资料以 $n(\%)$ 表示,采用 χ^2 检验;采用Logistic回归分析影响重症急性胰腺炎患者预后的危险因素;采用ROC曲线分析TREM-1、H₂S、ACE2单项及联合检测水平对重症急性胰腺炎预后的预测价值。以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TREM-1、H₂S、ACE2水平比较

研究组TREM-1、H₂S、ACE2水平均高于对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。见表1。

表1 两组TREM-1、H₂S、ACE2水平比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of TREM-1, H₂S and ACE2 levels between the 2 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TREM-1 (mg/L)	H ₂ S (μ mol/L)	ACE2 (U/L)
研究组	58	74.52±1.45	46.09±3.56	69.87±13.65
对照组	45	1.98±0.47	21.95±1.26	20.39±2.58
t 值	—	322.404	43.388	23.962
P 值	—	<0.001	<0.001	<0.001

2.2 影响重症急性胰腺炎患者预后的单因素分析

性别、BMI与重症急性胰腺炎患者预后生存无关,生存组与死亡组间年龄、肺脏衰竭、心血管

系统衰竭、病因、APACHE II、TREM-1、H₂S、ACE2水平比较具有统计学意义($P<0.05$)。见表2。

表2 影响重症急性胰腺炎患者预后生存的单因素分析
[$n(\%)$, ($\bar{x} \pm s$)]

因素	生存组 ($n=40$)	死亡组 ($n=18$)	χ^2 值	P 值
性别				
男	20(50.00)	10(55.56)	0.153	0.695
女	20(50.00)	8(44.44)		
年龄(岁)				
<60	25(62.50)	3(16.67)	10.443	0.001
≥60	15(37.50)	15(83.33)		
BMI(kg/m ²)				
>24	22(55.00)	7(38.89)	1.289	0.256
≤24	18(45.00)	11(61.11)		
肺脏衰竭				
有	11(27.50)	6(33.33)	18.802	<0.001
无	29(72.50)	2(11.11)		
心血管系统衰竭				
有	10(25.00)	15(83.33)	17.224	<0.001
无	30(75.00)	3(16.47)		
病因				
胆源性	23(57.50)	4(22.22)	6.209	0.013
非胆源性	17(42.50)	14(77.78)		
APACHE II(分)	5.79±2.63	12.15±1.34	9.677	<0.001
TREM-1(mg/L)	63.51±1.23	75.79±1.21	35.349	<0.001
H ₂ S(μmol/L)	36.36±1.54	49.17±1.63	28.787	<0.001
ACE2(U/L)	52.79±6.31	66.43±7.25	7.271	<0.001

2.3 影响重症急性胰腺炎患者预后生存的多因素分析

肺脏衰竭、心血管系统衰竭、APACHE II、TREM-1、H₂S、ACE2水平为影响重症急性胰腺炎患者预后生存的多因素($P<0.05$)。见表3。

2.4 TREM-1、H₂S、ACE2单项及联合检测水平对重症急性胰腺炎预后的预测价值

采用ROC曲线分析TREM-1、H₂S、ACE2单项及联合检测水平对重症急性胰腺炎预后的预测价值,各指标曲线下面积以联合检测最大。见表4、图1。

表4 TREM-1、H₂S、ACE2单项及联合检测水平对重症急性胰腺炎预后的预测价值

Table 4 Predictive value of TREM-1, H₂S and ACE2 levels in prognosis of severe acute pancreatitis

预测因子	最佳临界值	敏感度	特异度	ROC曲线下面积	95%CI
TREM-1	2.561	0.798	0.746	0.839	0.718~0.960
H ₂ S	2.646	0.754	0.811	0.789	0.646~0.932
ACE	2.595	0.763	0.796	0.763	0.588~0.937
三者联合	2.910	0.952	0.736	0.963	0.905~1.000

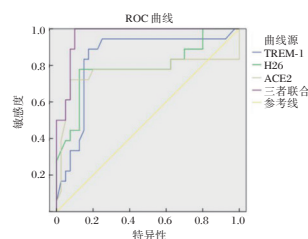


图1 TREM-1、H₂S、ACE2单项及联合检测水平对重症急性胰腺炎预后的预测价值ROC曲线图

Figure 1 ROC curve diagram of the predictive value of TREM-1, H₂S, ACE2single and combined detection levels on the prognosis of severe acute pancreatitis

3 讨论

重症急性胰腺炎与胰管阻塞、胰管内压增高、胰腺血液供应不足等有关,胰腺坏死及器官衰竭是本病的重要标志,具有起病急、发展快、病死率高等特点,是威胁人类健康的重要公共卫生问题^[5]。早期诊断和合理有效干预是降低重症急性胰腺炎患者病死率、改善预后的关键,目前超声或CT引导下细针穿刺细胞学检查仍是诊断感染的金标准,但该手段属于有创性检查,且技术难度及风险均较大,普及率较低^[6-7]。随着对本症发病机制研究的深入,近年来相关血清学诊断指标的价值引起广泛关注。

重症急性胰腺炎的发生与发展与细胞因子等炎性介质引发的瀑布样级联反应关系密切,迄今为止,

表3 影响重症急性胰腺炎患者预后生存的多因素分析

Table 3 Univariate analysis of prognosis and survival in patients with severe acute pancreatitis

影响因素	回归系数	标准误	Wald χ^2 值	P 值	OR值	95%CI
年龄(≥60岁 vs <60岁)	0.941	0.894	4.264	0.079	2.563	0.444~14.779
肺脏衰竭(有 vs 无)	0.895	0.162	4.595	<0.001	2.447	1.782~3.362
心血管系统衰竭(有 vs 无)	0.936	0.132	4.368	<0.001	2.550	1.969~3.303
病因(胆源性 vs 非胆源性)	0.979	0.798	4.161	0.292	2.662	0.557~12.719
APACHE II(升高 vs 正常)	0.912	0.264	3.494	<0.001	2.489	1.484~4.176
TREM-1(升高 vs 正常)	1.036	0.147	3.178	<0.001	2.818	2.113~3.759
H ₂ S(升高 vs 正常)	0.935	0.354	4.354	<0.001	5.550	1.274~5.103
ACE2(升高 vs 正常)	1.261	0.292	4.484	<0.001	3.529	1.991~6.255

胰腺的坏死和感染被认为是影响重症急性胰腺炎患者死亡率的重要原因^[8]。2000年Bouchon首次鉴定出TREM-1受体,TREM-1选择性表达于血液中性粒细胞和单核细胞表面,可触发并扩大细菌感染后细胞因子的级联反应,对炎症反应的加强及放大产生重要作用^[9]。研究发现,TREM-1能够诱导血液中性粒细胞和单核细胞分泌炎症细胞因子,如肿瘤坏死因子- α 、白细胞介素-8、白细胞介素-1 β 等^[10]。为明确TREM-1与急性胰腺炎的关系,本研究采用Logistic回归模型进行分析,结果显示TREM-1异常升高是影响患者预后生存的独立危险因素之一。这与Amrun等^[11]研究结果相似,提示TREM-1可作为评估重症急性胰腺炎发生发展的重要指标。

H₂S被看做体内第三种气体信号分子,具有调节炎症反应、舒张血管、抑制平滑肌细胞增殖等多种生理学功能^[12]。迄今为止,不少研究发现,H₂S可能参与胰腺炎的发生、发展,甚至有研究认为血清H₂S水平与胰腺组织损伤程度呈正相关^[13]。但关于H₂S在炎症中作用并不一致,它既可以通过上调P物质的量来发挥促炎作用,也可通过抑制淋巴细胞的生长起到抑制炎症的作用^[14]。本研究结果发现在感染和死亡患者中均存在该因子水平异常增高现象,提示其参与疾病的病理过程。

ACE2是一种金属蛋白酶,全长805个氨基酸,包括17个氨基酸组成的N端信号肽序列和一个C端膜锚定区^[15]。目前认为,ACE2是组织肾素-血管紧张素系统(renin-angiotensin system,RAS)激活后特异性的负性调节因子,可通过ACE2-Ang(1-7)-Mas受体轴,拮抗RAS经轴(ACE-AngII-AT1R轴),发挥抗炎、舒张血管、抗凝等生物学作用^[16]。本研究结果表明ACE2是一种评估重症急性胰腺炎患者预后的合适靶分子。

此外,本研究利用ROC曲线进行分析,结果表明三者联合时具有更佳的评估效能。这可能是由于在三者单独评估重症急性胰腺炎患者预后时,其评估效能易受全身炎症反应或其他系统炎症反应、组织损伤等影响,而三者联合时则可能有效发挥协同作用,提高了对重症急性胰腺炎患者预后的评估效能。

综上所述,TREM-1、H₂S及ACE2水平在重症急性胰腺炎患者中显著升高,联合三者检测可作为评估患者预后生存的有效手段,临床上应检测其水平并及时进行干预,进而提高生存率。

参考文献

- [1] Greenberger PA. Evidence Accumulates Against Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors and Beta-Adrenergic Blockers as Important Co-factors for Anaphylactic Reactions[J]. The J Allergy Clin Immunol Pract, 2020, 8(6):1906-1907.
- [2] 祝荫,吕农华.重症急性胰腺炎MDT诊治与全程管理[J].中华胰腺病杂志,2020,20(5):328-331.
- [3] Subramanian S, Pallati PK, Rai V, et al. Increased expression of triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in the population with obesity and insulin resistance[J]. Obesity, 2017, 25(3):527-529.
- [4] Wu JS, Li JM, Lo HY, et al. Anti-hypertensive and angiotensin-converting enzyme inhibitory effects of Radix Astragali and its bioactive peptide AM-1[J]. J Ethnopharmacol, 2020, 254(52):112724.
- [5] 李冠群,孙备.重症急性胰腺炎并发外科处理的焦点与难点[J].中华肝脏外科手术学电子杂志,2019,8(3):11-15.
- [6] Wilasco MIA, Uribe-Cruz C, Santetti D, et al. IL-6, TNF- α , IL-10, and nutritional status in pediatric patients with biliary atresia[J]. J Pediatr, 2017, 93(5):517-524.
- [7] 刘玉兰,王洋.重症急性胰腺炎致肝损伤的诊断和治疗[J].中华消化杂志,2019,39(5):292-294.
- [8] Liang Y, Zhao X, Meng F. Procalcitonin, C-Reactive Protein, and Neutrophil Ratio Contribute to the Diagnosis and Prognosis of Severe Acute Pancreatitis[J]. Iranian J Public Health, 2019, 48(12):2177-2186.
- [9] Lucie J, Kevin C, Marc D, et al. Targeted endothelial gene deletion of triggering receptor expressed on myeloid cells-1 protects mice during septic shock[J]. Cardiovascular Res, 2018, 114(6):907-918.
- [10] Dantas PHDS, Matos ADO, Filho EDS, et al. Triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (TREM-1) as a therapeutic target in infectious and noninfectious disease: a critical review[J]. Internat Rev Immunol, 2020, 39(4):188-202.
- [11] Amrun SN, Tan JLL, Rickett NY, et al. TREM-1 activation is a potential key regulator in driving severe pathogenesis of enterovirus A71 infection[J]. Sci Rep, 2020, 10(1):3810.
- [12] Zwain HM, Nile BK, Faris AM, et al. Modelling of hydrogen sulfide fate and emissions in extended aeration sewage treatment plant using TOXCHEM simulations[J]. Sci Rep, 2020, 10(1):565-569.
- [13] Christopher H, Hyo-Jeong K, Yan Z, et al. Hypothalamic-Pituitary Axis Regulates Hydrogen Sulfide Production[J]. Cell Metabol, 2020, 3(6):1320-1333.
- [14] Katalin ÉS, László P, Tamás S, et al. Hydrogen sulfide inhibits calcification of heart valves; implications for calcific aortic valve disease[J]. British J Pharmacol, 2020, 177(4):654-659.
- [15] Massimo V, Carlo P. The second life of the ambiguous angiotensin-converting enzyme 2 as a predictive biomarker for cardiometabolic diseases and death[J]. Eur Heart J, 2020, 30(45):45.
- [16] Gutta S, Grobe N, Kumbaji M, et al. Increased urinary angiotensin converting enzyme 2 and neprilysin in patients with type 2 diabetes[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2018, 315(2):596-599.

PTX3、OPG 及 Hcy 与 ACS 患者 PCI 术后支架内再次狭窄的相关性分析

雷蕾^{1*} 冯杰¹ 雷燕²

【摘要】目的 分析长正五聚蛋白 3 (PTX3)、骨保护素 (OPG) 及同型半胱氨酸 (Hcy) 与急性冠脉综合征 (ACS) 患者冠状动脉支架植入术 (PCI) 后支架内再次狭窄 (ISR) 的相关性。**方法** 选取 2017 年 1 月至 2019 年 1 月收治的 95 例于本院进行 PCI 术治疗的 ACS 患者作为 ACS 组。根据 PCI 术后 6~9 个月复查冠状动脉造影的结果,分为 ISR 组 ($n=49$) 和 N-ISR 组 ($n=46$)。选取 60 例同期因疑似 ACS 患者住院并经冠状动脉造影证实血管狭窄直径 $<50\%$ 、血流正常且临床资料完整者作为对照组。比较 ACS 组与对照组 PTX3、OPG 及 Hcy 的水平;记录所有 ACS 患者 PCI 术后发生 ISR 的情况,采用多元 Logistic 回归分析影响 ACS 患者 PCI 术后发生 ISR 的独立危险因素。**结果** ACS 组 PTX3、OPG 及 Hcy 水平高于对照组,差异有统计学意义 ($P<0.05$);ISR 组与无 N-ISR 组年龄、性别、BMI、高血压病史、糖尿病史、血肌酐、甘油三酯、高密度脂蛋白胆固醇、总胆固醇比较差异无统计学意义 ($P>0.05$);ISR 组低密度脂蛋白胆固醇、左心室射血分数低于 N-ISR 组, APTX3、OPG、Hcy 水平及吸烟人数高于 N-ISR 组,比较差异有统计学意义 ($P<0.05$)。低左心室射血分数及高 APTX3、OPG、Hcy 水平为影响 ACS 患者 PCI 术后发生 ISR 的独立危险因素 ($P<0.05$)。**结论** APTX3、OPG、Hcy 水平在 ACS 及术后 IRS 患者中显著升高,三者均为影响 PCI 术后发生 ISR 的独立危险因素,临床可将三者纳入指标检测体系,从而规避 ACS 患者 PCI 术后发生 ISR 的风险。

【关键词】 长正五聚蛋白 3; 骨保护素; 同型半胱氨酸; 支架内再次狭窄

Correlation between PTX3, OPG, Hcy and in-stent re-stenosis of patients with acute coronary syndrome after percutaneous coronary intervention

LEI Lei^{1*}, FENG Jie¹, LEI Yan²

(1. Department of Cardiology, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan, 637000; 2. Department of Laboratory Medicine, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan, China, 637000)

【ABSTRACT】Objective To analyze the correlation between blood pentraxin 3 (PTX3), osteoprotegerin (OPG) and homocysteine (Hcy) and in-stent re-stenosis (ISR) of patients with acute coronary syndrome (ACS) after percutaneous coronary intervention (PCI). **Methods** 95 patients with ACS who were treated by PCI in our hospital from January 2017 to January 2019 were selected as the ACS group. According to the results of reexamination of coronary angiography 6-9 months after PCI, they were divided into the ISR group ($n=49$) and the N-ISR group ($n=46$). In the same period, 60 patients who were hospitalized for suspected ACS during the same period and were confirmed by coronary angiography with vascular stenosis less than 50%, and had normal blood flow and complete clinical data were selected as the control group. The levels of PTX3, OPG and Hcy between the ACS group and the control group were compared. The occurrence of ISR in all ACS patients after PCI was recorded, and multivariate Logistic regression was used to analyze the indepen-

基金项目:四川省卫计委科研项目(16PJ133)

作者单位:1. 川北医学院附属医院心内科,四川,南充 637000

2. 川北医学院附属医院检验科,四川,南充 637000

*通信作者:雷蕾, E-mail: song167826wang97@163.com

dent risk factors that affect the occurrence of ISR in ACS patients after PCI. **Results** PTX3, OPG and Hcy levels in the ACS group were higher than those in the control group, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). There was no difference in age, gender, BMI, history of hypertension, history of diabetes, blood creatinine, triglycerides, high-density lipoprotein cholesterol, and total cholesterol between the ISR group and the non-ISR group ($P>0.05$). The low-density lipoprotein cholesterol and left ventricular ejection fraction in the ISR group were lower than those in the N-ISR group, and the levels of APTX3, OPG, Hcy and the number of smokers were higher than those in the N-ISR group. The difference between the two groups was statistically significant ($P<0.05$). Low left ventricular ejection fraction and high APTX3 and OPG levels were independent risk factors for ISR in ACS patients after PCI ($P<0.05$). **Conclusion** The levels of APTX3, OPG, and Hcy are significantly increased in ACS and postoperative IRS patients. The three are independent risk factors that affect ISR after PCI. Clinically, they can be included in the index detection system to avoid the risk of ISR in ACS patients after PCI.

[KEY WORDS] Pentraxin 3; Osteoprotegerin; Homocysteine; In-stent restenosis

急性冠脉综合征 (Acute coronary syndrome, ACS) 是一组由急性心肌缺血引起的临床综合征, 主要包括不稳定型心绞痛、急性非 ST 段抬高型心肌梗死以及急性 ST 段抬高型心肌梗死^[1]。冠状动脉支架植入术 (Percutaneous coronary intervention, PCI) 是 ACS 患者必要的治疗手段, 但受到血管内皮细胞损伤、平滑肌细胞增生等影响, 部分患者术后依然会发生血管再次狭窄 (in-stent restenosis, ISR), 导致血栓或心肌梗死等主要不良心血管事件 (major adverse cardiac event, MACE) 的发生^[2]。因此, 重视 ACS 患者 PCI 术后再次狭窄危险因素的干预有重要意义^[3]。长正五聚蛋白 3 (pentraxin 3, PTX3) 及骨保护素 (osteoprotegerin, OPG) 是近年来颇受关注的研究指标。PTX3 作为一种急性期反应蛋白, 参与各种心血管疾病发生机制中的炎症反应过程, 对该类疾病的诊断、病情评估等有指导性意义^[4]。OPG 则是分泌性糖蛋白, 可调节血管钙化, 与动脉粥样硬化有重要关联^[5]。为此, 本研究对 PTX3、OPG 及 Hcy 与 ACS 患者 PCI 术后 ISR 的相关性进行分析, 为临床治疗提供理论支持依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2017 年 1 月至 2019 年 1 月收治的 95 例于本院进行 PCI 术治疗的 ACS 患者作为 ACS 组。纳入标准: ①符合中华医学会 ACS 诊断标准^[6]; ②临床资料完整且真实者; 排除标准: ①既往有心肌梗死、PCI 或冠状动脉旁路移植术史者; ②PCI 术后行介入治疗者; ③未经控制的恶性心律失常者; ④甲状腺或肾上腺功能紊乱者; ⑤合并急性慢性感

染性疾病及恶性肿瘤患者; ⑥合并严重肝肾疾病者; ⑦合并肺栓塞、下肢静脉血栓等血栓性疾病者。其中男 51 例, 女 44 例, 平均年龄 (63.77 ± 5.71) 岁。根据 PCI 术后 6~9 个月复查冠状动脉造影的结果, 分为 ISR 组 ($n=49$) 和 N-ISR 组 ($n=46$)。

选取 60 例同期因疑似 ACS 患者住院并经冠状动脉造影术证实血管狭窄直径 $<50\%$ 、血流正常且临床资料完整^[6]者作为对照组; 其中男 38 例, 女 22 例, 平均年龄 (63.69 ± 5.75) 岁。ACS 组与对照组性别、年龄等一般资料比较差异无统计学意义 ($P>0.05$), 具有可比性。本研究已获得本院医学伦理委员会批准, 所有患者签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 Hcy 的检测

患者入院后次日清晨抽取空腹静脉血 3 mL, 置于肝素锂抗凝管中, 在低温离心机中离心 ($3\ 000\ \text{r/min}$, 15 min)。取 400 μL 血浆送检, 采用自动化的荧光偏振免疫法得出 Hcy 的含量, 操作过程严格按照说明书进行。

1.2.2 PTX3、OPG 的检测

患者入院后次日清晨抽取空腹静脉血 4 mL, 离心 ($3\ 000\ \text{r/min}$, 15 min), 提取血清。用酶联免疫吸附法检测 PTX3、OPG 水平, 试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司; 检测严格遵照说明书进行操作。

1.2.3 ISR 发生的标准

支架内、两端 (距支架边缘 $\leq 5\ \text{mm}$ 范围) 或支架体内+两端的管腔内径狭窄 $\geq 50\%$ ^[7]。

1.3 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; 计量资料采用 ($\bar{x}\pm s$) 表

示,行 t 检验;采用多元 Logistic 回归分析影响 ACS 患者 PCI 术后发生 ISR 的独立危险因素。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组 PTX3、OPG 及 Hcy 的水平比较

ACS 组 PTX3、OPG 及 Hcy 水平高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 两组 PTX3、OPG 及 Hcy 的水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of PTX3, OPG and Hcy levels

between 2 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	PTX3 (ng/mL)	OPG (g/L)	Hcy ($\mu\text{mol/L}$)
ACS 组	95	6.73 $\pm$ 1.55	9.23 $\pm$ 0.09	21.36 $\pm$ 5.36
对照组	60	4.23 $\pm$ 1.06	2.13 $\pm$ 0.07	17.98 $\pm$ 5.13
t 值	—	10.972	519.610	3.888
P 值	—	<0.001	<0.001	<0.001

2.2 ACS 经 PCI 后不同预后患者临床资料分析

ISR 组与无 N-ISR 组年龄、性别、BMI、高血压病史、糖尿病史、血肌酐、甘油三酯、高密度脂蛋白胆固醇、总胆固醇比较差异无统计学意义($P > 0.05$);ISR 组低密度脂蛋白胆固醇、左心室射血分数低于 N-ISR 组,APT3、OPG、Hcy 水平及吸烟人数高于 N-ISR 组,比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

2.3 影响 ACS 患者 PCI 术后发生 ISR 的多因素分析

低左心室射血分数及高 APT3、OPG、Hcy 水平为影响 ACS 患者 PCI 术后发生 ISR 的独立危险因素($P < 0.05$),见表 3。

3 讨论

PCI 是在经皮腔内冠状动脉成形术的基础上发展的冠状动脉介入治疗技术,可在短期内使阻塞血管再通,并能使缺血心肌细胞恢复血流供应,减少心血管事件的发生^[8]。受到患者自身多重因素的影响,加之 PCI 术介入治疗不可避免的对血管内皮的损伤,导致 PCI 术后血管存在一定的再狭窄

表 2 ACS 经 PCI 后不同预后患者临床资料分析

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

Table 2 Univariate analysis of ISR in ACS patients after PCI

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

因素	ISR 组 ($n=49$)	N-ISR 组 ($n=46$)	χ^2/t 值	P 值
性别				
男	25 (51.02)	26 (56.52)	0.289	0.591
女	24 (48.98)	20 (43.48)		
年龄 (岁)				
<60	27 (55.10)	29 (63.04)	0.618	0.432
≥ 60	22 (44.90)	17 (36.96)		
BMI (kg/m ²)				
>24	32 (65.31)	30 (65.22)	0.001	0.993
≤ 24	17 (34.69)	16 (34.78)		
高血压病史				
有	29 (59.18)	24 (52.17)	0.473	0.492
无	20 (40.82)	22 (47.83)		
糖尿病病史				
有	18 (36.73)	20 (43.48)	0.450	0.503
无	31 (63.27)	26 (56.52)		
血肌酐 (mg/dL)	1.95 $\pm$ 0.26	1.97 $\pm$ 0.22	0.403	0.688
甘油三酯 (mmol/L)	1.83 $\pm$ 0.75	1.81 $\pm$ 0.72	0.132	0.895
高密度脂蛋白胆固醇 (mmol/L)	2.86 $\pm$ 0.61	2.77 $\pm$ 0.63	0.707	0.481
低密度脂蛋白胆固醇 (mmol/L)	1.13 $\pm$ 0.59	1.87 $\pm$ 0.65	5.816	<0.001
总胆固醇 (mmol/L)	4.97 $\pm$ 1.21	4.83 $\pm$ 1.25	0.555	0.581
左心室射血分数 (%)	53.40 $\pm$ 13.81	69.87 $\pm$ 13.15	5.945	<0.001
PTX3 (ng/mL)	7.46 $\pm$ 3.21	4.31 $\pm$ 3.16	4.816	<0.001
OPG (g/L)	10.97 $\pm$ 3.67	4.71 $\pm$ 6.31	5.955	<0.001
Hcy ($\mu\text{mol/L}$)	20.92 $\pm$ 5.19	15.79 $\pm$ 4.71	5.034	<0.001
吸烟				
是	26 (53.06)	27 (58.70)	0.305	0.581
否	23 (46.94)	19 (41.3)		

率^[9]。因此,寻求能够早期预测 ISR 的分子指标成为心血管研究领域的新热点。

炎症反应是贯穿整个 ACS 病变发展的重要变化,内皮损伤、泡沫细胞形成、脂质沉积、动脉粥样硬化形成、斑块破裂及血栓形成等过程均有炎症因子的参与^[10]。在 PCI 术中,植入支架时会破坏血管内壁并导致基底膜暴露、内皮细胞损伤,而在 PCI 术后,内皮损伤可激活炎症反应,一方面直接造成血栓及 IRS,另一方面也能促进平滑细胞增殖、加重 IRS^[11]。

表 3 影响 ACS 患者 PCI 术后发生 ISR 的多因素分析

Table 3 Multivariate analysis of influencing factors of ISR in ACS patients after PCI

影响因素	回归系数	标准误	Wald/ χ^2 值	OR 值	95%CI	P 值
年龄 (≥ 60 岁 vs <60 岁)	1.095	0.971	4.591	2.389	0.446~20.049	0.061
低密度脂蛋白胆固醇 (>3.37 mmol/L vs 2.07~3.37 mmol/L)	1.031	0.932	4.562	2.804	0.451~17.421	0.341
左心室射血分数 (<50% vs 50%~70%)	0.932	0.211	4.373	2.540	1.679~3.840	<0.001
PTX3 水平 (正常 vs 异常升高)	0.781	0.139	4.096	2.184	1.662~2.867	<0.001
OPG 水平 (正常 vs 异常升高)	0.959	0.147	4.287	2.609	1.956~3.480	<0.001
Hcy 水平 (正常 vs 异常升高)	0.974	0.125	4.318	2.649	2.073~3.384	<0.001
吸烟 (是 vs 否)	0.863	0.647	4.195	2.370	0.667~8.424	0.084

PTX3是最近发现的经典长正五聚蛋白,其主要由炎症反应时的树突状细胞、巨噬细胞和内皮细胞分泌,属于炎症急性期反应蛋白^[12]。PTX-3可在炎症因子诱导下由血管内皮细胞分泌,并在动脉粥样硬化斑块上表达上调,故多数研究直接检测其水平以反映血管的炎症状态^[13]。本研究结果提示PTX3可能是PCI术后病人发生IRS较为可靠的炎症预测因子。OPG作为肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)受体家族的新成员,广泛存在于人体多种组织内,在肝、心、肺、肾、胃、小肠、皮肤、脑、脊髓及骨骼中均有较高水平的表达^[14]。近年来,OPG通过提高内皮细胞存活来防止炎症细胞因子的血管损害作用引起临床关注。Osman等^[15]研究发现,ACS患者血清OPG与冠脉无狭窄的患者相比显著升高,这与本研究结果相似,说明OPG参与了ACS的发生。

Hcy为一种含硫肌酸,是蛋氨酸的中间代谢产物。大量研究发现,在动脉粥样硬化的发病机制中Hcy是一种独立危险因素^[16]。Hcy参与心血管疾病的途径包括多个方面:①Hcy能与内皮源性一氧化氮快速结合,抑制一氧化氮合成并加速其降解,最终导致血管内皮功能紊乱;②Hcy能促进血管平滑肌细胞增殖;③Hcy能使凝血和纤溶系统失衡;④Hcy还能增强血小板聚集的状态,激活组织因子、凝血因子V、Ⅺ等使机体处于血栓前状态;⑤Hcy还能影响血脂代谢。本研究结果中,Hcy水平在ACS及术后IRS患者中显著升高,进一步证实了上述观点。

综上所述,APT3、OPG、Hcy水平在ACS及术后IRS患者中显著升高,三者均为影响PCI术后发生ISR的独立危险因素,临床可将三者纳入指标检测体系,从而规避ACS患者PCI术后发生ISR的风险。

参考文献

- [1] Shawn FF, Jamie V, Martin S, et al. Pacemaker Implantation Practice and Early Complications in New Zealand: A 3 Year Analysis from the All New Zealand Acute Coronary Syndrome- Quality Improvement Device Registry (ANZACS-QI DEVICE)[J]. Heart Lung Circulation, 2018, 27(16):30-36.
- [2] Slusher AL, Whitehurst M, Maharaj A, et al. Plasma pentraxin 3 and glucose kinetics following acute high-intensity interval exercise versus continuous moderate-intensity exercise in healthy men[J]. Appl Physiol Nutrition Metab, 2018, 43(12):1233-1238.
- [3] Christenson RH, Azzazy HME. Biochemical markers of the acute coronary syndromes[J]. Clin Chem, 2020, 43(8):8.
- [4] Samardzic J, Skoric B, Lana G, et al. Impact of Continuous P2Y12 Inhibition Tailoring in Acute Coronary Syndrome and Genetically Impaired Clopidogrel Absorption[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2020, 75(61):894-897.
- [5] Han SH. Usefulness of Plasma Pentraxin 3 Levels in Acute and Chronic Inflammatory Diseases [J]. J Korean Med, 2018, 33(23):1971-1973.
- [6] Krzanowski M, Krzanowska K, Gajda M, et al. Pentraxin3 as a new indicator of cardiovascular-related death in patients with advanced chronic kidney disease? [J]. Pol Arch Intern Med, 2017, 127(3):170-177.
- [7] Telecka-Gadek D, Marcin M, Szarpak L, et al. Acute coronary syndromes in the practice of the Emergency Medical Team [J]. Disaster Emerg Med J, 2018, 65(16):1649-1653.
- [8] Tojo M, Shintani -Ishida K, Tsuboi H, et al. Postmortem plasma pentraxin 3 is a useful marker of fatal acute coronary syndrome[J]. Sci Rep, 2019, 9(1):1644-1648.
- [9] Tunc-Ata M, Gunfer T, Mergen-Dalyanoglu M, et al. Examination of levels pentraxin-3, interleukin-6, and C-reactive protein in rat model acute and chronic exercise [J]. J Exerc Rehabil, 2017, 65(17):1741-1743.
- [10] Meher G, Bhattacharjya S, Chakraborty H. Membrane Cholesterol Modulates Oligomeric Status and Peptide-Membrane Interaction of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Fusion Peptide[J]. J Physical Chem B, 2019, 123(50):10654-10662.
- [11] Uskelas S, Kärkkäinen JM, Eränen J, et al. Percutaneous coronary intervention with drug-coated balloon-only strategy in stable coronary artery disease and in acute coronary syndromes: An all-comers registry study [J]. Catheter Cardiovasc Interv, 2018, 61(48):1481-1485.
- [12] Wang Q, Kou X, Bai F, et al. A4191 The characteristics of the serum inflammatory cytokines and homocysteine levels in hypertensive patients with acute coronary syndromes [J]. J Hypertension, 2018, 36(32):100-105.
- [13] 周鹏,王烁,任艳玲. 冠心病患者冠状动脉CT特征与血清脂蛋白(a)、脂联素、PTX3的相关性研究[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(2):244-248.
- [14] Osman S, Ahmet K, Pinar K, et al. Inflammatory mediators in the diagnosis and treatment of acute pancreatitis: pentraxin-3, procalcitonin and myeloperoxidase [J]. Arch Med Res, 2018, 14(2):288-296.
- [15] 毛梅,汪丽,秦磊,等. 不同剂量叶酸联合维生素B12治疗老年高血压合并高同型半胱氨酸血症的临床疗效分析[J]. 保健医学研究与实践, 2019, 16(3):5-9.
- [16] Abdelhamid WG, Eldin HMS, Abd -Elkarim MA, et al. Prognostic value of clinical score, pentaxin3 and C-reactive protein in toxin-related lung injury and acute respiratory distress syndrome[J]. Egyptian J Forensic Applied Toxicol, 2017, 17(2):93-115.

应激性心肌病与急性心肌梗死患者肌钙蛋白检查结果差异性

吴鹏程^{1*} 王猛² 张红兵³ 蒋崇慧⁴ 黄澄⁵

[摘要] 目的 分析应激性心肌病与急性心肌梗死患者肌钙蛋白检查结果差异性。方法 收集分析本院2018年1月至2020年6月收治的10例应激性心肌病患者(应激性心肌病组)以及100例急性心肌梗死患者(急性心肌梗死组)临床资料,对两组患者肌钙蛋白(肌钙蛋白T、肌钙蛋白I)、心肌酶谱(ALT、AST、CK、CK-MB、LDH)、心电图表现(I导联抬高、aVL导联抬高、V2-V5导联ST段抬高)进行对比,利用Spreaman相关性分析法检验以上指标与应激性心肌病的相关性,绘制受试者工作特征曲线计算应激性心肌病与急性心肌梗死肌钙蛋白的cut-off值。结果 两组患者肌钙蛋白检测结果比较,应激性心肌病组CTNT及CTNI值分别为 $(0.46\pm 0.05)\mu\text{g/L}$ 、 $(3.67\pm 0.41)\mu\text{g/L}$,高于急性心肌梗死组的 $(1.27\pm 0.11)\mu\text{g/L}$ 、 $(24.38\pm 1.42)\mu\text{g/L}$,差异有统计学意义($P<0.05$),心肌酶谱检测结果、心电图表现相比较,差异无统计学意义($P>0.05$);Spreaman相关性分析结果显示,肌钙蛋白与应激性心肌病有关,心肌酶谱、心电图表现与应激性心肌病无关;受试者工作特征曲线显示:应激性心肌病与急性心肌梗死肌钙蛋白T的cut-off值为 $0.97\mu\text{g/L}$ 、肌钙蛋白I的cut-off值为 $7.71\mu\text{g/L}$ 。结论 肌钙蛋白检查结果可以作为应激性心肌病、急性心肌梗死的初步诊断。

[关键词] 应激性心肌病;急性心肌梗死;肌钙蛋白;心肌酶谱

Difference of troponin test results between patients with stress cardiomyopathy and acute myocardial infarction

WU Pengcheng^{1*}, WANG Meng², ZHANG Hongbing³, JIANG Conghui⁴, HUANG Cheng⁵

(1. Emergency Department, Zhongshan Torch Development Zone Hospital, Zhongshan, Guangdong, China, 528437; 2. Department of Cardiology, Zhongshan Torch Development Zone Hospital, Zhongshan, Guangdong, China, 528437; 3. Emergency Department, Nanlang Branch, Zhongshan People's Hospital, Zhongshan, Guangdong, China, 528437; 4. Department of Emergency, Zhongshan People's Hospital, Zhongshan, Guangdong, China, 528437; 5. Department of Cardiology, Guangdong Provincial People's Hospital, Guangdong, Guangzhou, China, 510080)

[ABSTRACT] **Objective** To analyze the difference of troponin test results between patients with stress cardiomyopathy and acute myocardial infarction. **Methods** The clinical data of 10 patients with stress cardiomyopathy (stress cardiomyopathy group) and 100 patients with acute myocardial infarction (acute myocardial infarction group) admitted to our hospital from January 2018 to June 2020 were collected and analyzed. Group of patients with troponin (troponin T, troponin I), myocardial enzyme spectrum (ALT, AST, CK, CK-MB, LDH), electrocardiogram (lead I elevation, aVL lead elevation, V2-V5 lead ST segment eleva-

作者单位: 1. 中山火炬开发区医院急诊科, 广东, 中山 528437

2. 中山火炬开发区医院心内科, 广东, 中山 528437

3. 中山市人民医院南朗分院急诊科, 广东, 中山 528437

4. 中山市人民医院急诊科, 广东, 中山 528437

5. 广东省人民医院心内科, 广东, 广州 510080

*通信作者: 吴鹏程, E-mail: 452551481@qq.com

tion) for comparison, Spreaman correlation analysis method was used to test the correlation between the above indicators and stress cardiomyopathy, and the receiver operating characteristic curve was drawn to calculate the muscle calcium of stress cardiomyopathy and acute myocardial infarction. The cut-off value of the protein.

Results Comparing the results of troponin detection between the two groups, the values of CTNT and CTNI in the stress cardiomyopathy group were $(0.46 \pm 0.05) \mu\text{g/L}$ and $(3.67 \pm 0.41) \mu\text{g/L}$, respectively, which were higher than those in the acute myocardial infarction group $(1.27 \pm 0.11) \mu\text{g/L}$, $(24.38 \pm 1.42) \mu\text{g/L}$, the difference was statistically significant ($P < 0.05$), compared with the results of myocardial enzyme spectrum and electrocardiogram, the difference was not statistically significant ($P > 0.05$); Spreaman Correlation analysis results suggest that troponin is related to stress cardiomyopathy, and myocardial enzyme spectrum and electrocardiogram have nothing to do with stress cardiomyopathy; receiver operating characteristic curve suggests: stress cardiomyopathy and acute myocardial infarction muscle. The cut-off value of calcineurin T was $0.97 \mu\text{g/L}$, and the cut-off value of troponin I was $7.71 \mu\text{g/L}$. **Conclusion** The results of troponin examination can be used as a preliminary diagnosis of stress cardiomyopathy and acute cardiomyopathy infarction.

[KEY WORDS] Stress Cardiomyopathy; Acute Myocardial Infarction; Troponin; Myocardial Enzyme Spectrum

急性心肌梗死已经成为十分常见的心血管疾病之一^[1]。尽管溶栓治疗以及急诊支架介入手术的广泛应用使得急性心肌梗死所致的死亡率降低至4%~8%,但治疗工作面临的形势依然不容乐观^[2]。应激性心肌病为左心室局部收缩功能暂时性障碍所致^[3]。尽管其发病率较低,但却与急性心肌梗死存在着极高的相似性,如果按照溶栓治疗或者是急诊支架介入手术治疗往往不能够取得预期疗效并造成医疗资源不必要的浪费,所以准确区分二者十分重要。肌钙蛋白是急性心肌梗死患者诊疗工作的重要参照指标^[1],但与应激性心肌病的差异性却少有研究涉及,故本次研究围绕应激性心肌病与急性心肌梗死患者肌钙蛋白检查结果差异性展开分析,旨在为区分二者提供帮助,内容如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取本院2018年1月至2020年6月收治的10例应激性心肌病患者(应激性心肌病组)以及100例急性心肌梗死患者(急性心肌梗死组)为研究对象。应激性心肌病组中男7例、女3例;平均年龄 (62.50 ± 14.50) 岁;起病至接受治疗时间5.5 h~20 h,平均起病至接受治疗时间 (15.45 ± 2.35) h。急性心肌梗死组中男72例、女28例;平均年龄 (64.00 ± 14.00) 岁;起病至接受治疗时间5 h~18 h,平均起病至接受治疗时间 (15.33 ± 2.27) h。纳入标准:①均经急诊造影确诊者;②临床资料完整,无缺失

项者。排除标准:①病情危重,入院后死亡者;②未进行心肌酶谱、肌钙蛋白测定者;③合并其他心血管病变者;④既往有急性心肌梗死病史者;⑤合并慢性肾功能不全、严重感染灶者。两组患者一般资料均衡可比,差异无统计学意义($P > 0.05$)。本研究经医学伦理委员会审批,患者知情同意。

1.2 方法

两组患者收治入院后均采集血样测定肌钙蛋白以及心肌酶谱,做心电图。急性心肌梗死组接受溶栓治疗。应激性心肌病组接受 β 受体阻滞剂+血管紧张素转化酶抑制剂+利尿剂+阿司匹林治疗。

1.3 观察指标

选取肌钙蛋白检测结果、心肌酶谱检测结果、心电图表现为观察指标。肌钙蛋白检测结果包括肌钙蛋白T、肌钙蛋白I。心肌酶谱检测结果包括ALT、AST、CK、CK-MB、LDH。

1.4 仪器和试剂

采血后利用豪夫迈·罗氏生产的cobas h 232 Cardiac System分析仪测定肌钙蛋白以及心肌酶谱。心电图表现包括I导联抬高、aVL导联抬高、V2-V5导联ST段抬高,仪器为力康生物医疗科技控股有限公司生产的Prince 180B快速心电图检测仪。

1.5 统计学分析

采用SPSS 25.0统计软件对数据进行处理;符合正态分布的计量资料采用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,组间比较采用独立t检验;计数资料采用 $n(\%)$ 表示,行 χ^2 检验;肌钙蛋白、心肌酶谱、心电图表现与与应激性

心肌病的相关性以 Spreaman 相关性分析法检验, 绘制受试者工作特征曲线计算应激性心肌病与急性心肌梗死肌钙蛋白的 cut-off 值; $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者肌钙蛋白检测结果比较

应激性心肌病组肌钙蛋白检测结果低于急性心肌梗死组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 两组患者肌钙蛋白检测结果比较 [$(\bar{x} \pm s)$, $\mu\text{g/L}$]

Table 1 Comparison of troponin test results between 2 groups of patients [$(\bar{x} \pm s)$, $\mu\text{g/L}$]

组别	<i>n</i>	肌钙蛋白 T	肌钙蛋白 I
应激性心肌病组	10	0.46 $\pm$ 0.05	3.67 $\pm$ 0.41
急性心肌梗死组	100	1.27 $\pm$ 0.11	24.38 $\pm$ 1.42
<i>t</i> 值		5.211	19.897
<i>P</i> 值		0.000	0.000

2.2 两组患者心肌酶谱检测结果比较

应激性心肌病组心肌酶谱检测结果与急性心肌梗死组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 2。

表 2 两组患者心肌酶谱检测结果比较 [$(\bar{x} \pm s)$, U/L]

Table 2 Comparison of myocardial enzyme spectrum test results between the 2 groups [$(\bar{x} \pm s)$, U/L]

组别	<i>n</i>	ALT	AST	CK	CK-MB	LDH
应激性心肌病组	10	237.44 $\pm$ 15.28	180.77 $\pm$ 15.33	1487.95 $\pm$ 123.43	198.72 $\pm$ 14.38	417.64 $\pm$ 20.56
急性心肌梗死组	100	237.59 $\pm$ 15.69	188.04 $\pm$ 15.46	1488.23 $\pm$ 125.47	198.55 $\pm$ 15.10	417.48 $\pm$ 20.42
<i>t</i> 值		0.189	0.327	0.432	0.272	0.281
<i>P</i> 值		0.820	0.693	0.577	0.743	0.736

2.3 两组患者心电图表现比较

应激性心肌病组心电图表现与急性心肌梗死组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 3。

表 3 两组患者心电图表现比较 [$n(\%)$]

Table 3 Comparison of ECG performance between the two groups [$n(\%)$]

组别	<i>n</i>	I 导联 抬高	aVL 导联 抬高	V2-V5 导联 ST 段抬高
应激性心肌病组	10	9(90.00)	9(90.00)	10(100.00)
急性心肌梗死组	100	96(96.00)	97(97.00)	100(100.00)
χ^2 值		1.920	2.962	0.000
<i>P</i> 值		0.166	0.085	1.000

2.4 肌钙蛋白、心肌酶谱、心电图表现与与应激性心肌病的相关性

肌钙蛋白轻度升高与应激性心肌病有关 ($P < 0.05$), 心肌酶谱变化、心电图表现与应激性心肌病无关 ($P > 0.05$)。见表 4。

2.5 应激性心肌病与急性心肌梗死肌钙蛋白 cut-off 值

受试者工作特征曲线提示: 应激性心肌病与急性心肌梗死肌钙蛋白 T 的 cut-off 值为 0.97 $\mu\text{g/L}$ 、肌钙蛋白 I 的 cut-off 值为 7.71 $\mu\text{g/L}$ 。

3 讨论

应激性心肌病好发于既往无器质性心脏病的人群, 以胸闷、胸痛为主要症状表现^[4]。心电图检

表 4 肌钙蛋白、心肌酶谱、心电图表现与与应激性心肌病的相关性

Table 4 Correlation between troponin, myocardial enzyme spectrum, electrocardiogram and stress cardiomyopathy

指标	<i>r</i> 值	<i>P</i> 值
肌钙蛋白	肌钙蛋白 T	0.48
	肌钙蛋白 I	0.62
心肌酶谱	ALT	0.27
	AST	0.24
	CK	0.19
	CK-MB	0.17
	LDH	0.22
心电图表现	I 导联抬高	0.25
	aVL 导联抬高	0.27
	V2-V5 导联 ST 段抬高	0.23

查提示患者普遍存在异常改变情况, 心脏 B 超则提示收缩功能不同程度的下降, 心脏造影却很少发现心脏血管堵塞^[5]。应激性心肌病以左心室尖顿抑为主要病理改变, 表现为透壁型的损伤电流, 形成类似于急性心肌梗死 ST 段提高的心电图特征^[6]。急性心肌梗死则是因冠状动脉发生急性、持续性的缺血缺氧而出现的心肌坏死, 患者往往伴有强烈的、持久的胸骨后疼痛、心肌酶活性升高、进行性心电图改变^[7-8]。因急性心肌梗死与应激性心肌病具有较高的相似性, 故在临床中漏诊风险高。

肌钙蛋白由 3 个不同基因的亚基所组成, 包括肌钙蛋白 T、肌钙蛋白 I、肌钙蛋白 C, 其中肌钙蛋白 T、肌钙蛋白 I 用于心血管系统疾病诊断^[9]。肌钙蛋

白T,包括骨骼肌肌钙蛋白T以及心肌型肌钙蛋白T两种,后者仅有6%~8%呈游离状态^[10]。肌钙蛋白I同样由骨骼肌肌钙蛋白I以及心肌肌钙蛋白I组成,在人体中心肌肌钙蛋白I的氨基末端较骨骼肌肌钙蛋白I多出了31个氨基酸,心肌肌钙蛋白I对心肌改变具有较高的特异性^[11]。当心肌以外的肌肉组织发生创伤或病变时将会不同程度升高但却不会超过临界值,而当急性心肌梗死发生后将会显著升高^[12-13]。在心血管系统疾病诊断中肌钙蛋白的特异性达到了99%,欧洲心脏病协会明确指出,肌钙蛋白是急性心肌梗死诊断的必要条件^[14]。然而,急性心肌梗死、应激性心肌病患者起病后肌钙蛋白变化程度如何,二者之间是否存在差异性目前很少有临床研究涉及,故围绕此方面内容展开深入分析对于快速鉴别诊断以上两种疾病具有重要意义。

本研究结果提示,两种疾病虽然在心电图、临床表现上存在着极高的相似性,但肌钙蛋白检测结果差异性较为明显,Spreaman相关性分析结果提示肌钙蛋白轻度升高与应激性心肌病有关,分析原因在于应激性心肌病并无广泛的心肌受累,而急性心肌梗死则存在,由此导致肌钙蛋白上升幅度不一。因此,在今后临床工作中如果收入存在胸痛、心电图ST段抬高、肌钙蛋白升高的患者,可以依据肌钙蛋白升高幅度作出应激性心肌病、急性心肌梗死的初步诊断。若想获得确切诊断,则可以按照ST段抬高的心肌梗死处理原则,行急诊造影并排除严重冠脉病变后即可考虑为应激性心肌病^[15]。

然而,需要指出的是,尽管本次研究证实应激性心肌病患者肌钙蛋白仅轻-中度升高,但由于纳入研究的样本例数过少,故所得结果的可靠性仍然需要大样本临床研究的证实。

综上所述,应激性心肌病与急性心肌梗死患者心肌酶谱检测结果、心电图表现无明显差异性,但应激性心肌病患者肌钙蛋白检查结果仅轻-中度升高,而急性心肌梗死患者则升高显著,此点可以作为区分两种疾病的重要参照依据。

参考文献

- [1] 常琳,常佩云,刘娟. CK-MB、cTn I、冠脉造影及心电图联合诊断急性心肌梗死价值研究[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(8): 1018-1021.
- [2] 孟军,毛玮,黄金梅. 广西2013-2017年死因监测点主要慢性病早死概率及变化趋势[J]. 中国热带医学, 2019, 19(3): 220-224.
- [3] 孟影,汪国宏,周炳凤. 神经源性应激性心肌病一例[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2019, 21(7): 764-765.
- [4] 李澍. 应激性心肌病患者的临床诊治分析[J]. 海军医学杂志, 2019, 40(6): 555-557.
- [5] 罗晓亮,李佳,赵雪燕,等. 应激性心肌病临床特点及预后分析[J]. 中国循环杂志, 2018, 33(9): 884-888.
- [6] 侯良磊. 应激性心肌病的临床特点分析[J]. 浙江医学, 2019, 41(19): 2103-2106.
- [7] 李刚,朱春凯,郑培明. miR-499、miR-16、肌红蛋白与常规心肌损伤标志物的关系及在急性心肌梗死早期诊断中的价值[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(6): 728-732.
- [8] 朱庆,钟小碟,蒙仕珠. 海口市社区卫生服务机构慢性病管理现状分析[J]. 中国热带医学, 2019, 19(11): 1058-1062.
- [9] 胡剑威,张学红,张兆奎,等. 应激性心肌病与急性心肌梗死临床特点比较[J]. 中国老年学杂志, 2017, 37(8): 2048-2049.
- [10] Amin HZ, Amin LZ, Pradipta A. Takotsubo Cardiomyopathy: A Brief Review[J]. J Med Life, 2020, 13(1): 3-7.
- [11] 汤勇才,任惠铭,黄小媛,等. 超敏肌钙蛋白I对早期心肌梗死和脑血管意外的诊断价值[J]. 热带医学杂志, 2018, 18(6): 787-791+840.
- [12] 任美英,刘莹,郭晓杰. 高敏肌钙蛋白T与慢性心力衰竭的相关性及对急性心肌梗死的鉴别价值[J]. 中国实验诊断学, 2019, 23(7): 1142-1144.
- [13] 张国正,梁岩,蔺亚晖,等. 高敏心肌肌钙蛋白I浓度及变化诊断急性心肌梗死的中国人群临床应用研究[J]. 中国循环杂志, 2019, 34(1): 44-49.
- [14] Matthaei H, Klein A, Branchi V, et al. Acute mesenteric ischemia (AMI): absence of renal insufficiency and performance of early bowel resection may indicate improved outcomes[J]. Int J Colorectal Dis, 2019, 34(10): 1781-1790.
- [15] 郭英,罗薇,丁霁,等. 高敏肌钙蛋白T正常的胸痛患者早期排除急性心肌梗死的最佳策略[J]. 实用医学杂志, 2018, 34(1): 63-66.

龈沟液 SFRP1、hBD3、肿瘤坏死因子- α 在慢性牙周炎伴 Hp 感染患者中表达及临床意义

张丽媛¹ 张鹏² 马婷婷³

[摘要] 目的 探讨龈沟液分泌型卷曲相关蛋白1(SFRP1)、 β 防御素3(hBD3)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 在慢性牙周炎伴幽门螺杆菌(Hp)感染患者中表达及意义。方法 选取2017年7月至2019年9月本院收治的167例慢性牙周炎患者,根据是否伴有Hp感染分为对照组(无Hp感染,105例)、Hp感染组(慢性牙周炎伴Hp感染,62例),比较两组龈沟液SFRP1、hBD3、TNF- α 表达,采用Logistic、Spearman、接收者工作特征(ROC)曲线下面积(AUC)进行统计分析。结果 Hp感染组SFRP1、TNF- α 高于对照组,hBD3低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$);龈沟液SFRP1、hBD3、TNF- α 与慢性牙周炎合并Hp感染有呈正相关($P < 0.05$);龈沟液SFRP1、TNF- α 与Hp感染程度呈正相关,hBD3与Hp感染程度呈负相关($P < 0.05$);SFRP1预测疗效的AUC为0.746(95%CI: 0.619~0.848),hBD3预测疗效的AUC为0.785(95%CI: 0.663~0.880),TNF- α 预测疗效的AUC为0.697(95%CI: 0.567~0.807)。结论 慢性牙周炎伴Hp感染患者龈沟液SFRP1、TNF- α 呈高表达,hBD3呈低表达,并与Hp感染程度有关,检测三者水平可预测临床疗效,应用价值较高。

[关键词] 龈沟液; SFRP1; hBD3; 肿瘤坏死因子- α ; 慢性牙周炎伴Hp感染

The expression and clinical significance of gingival crevicular fluid SFRP1, hBD3 and tumor necrosis factor- α in patients with chronic periodontitis with Hp infection

ZHANG Liyuan^{1*}, ZHANG Peng², MA Tingting³

(1. Department of Stomatology, Chaoyang Central Hospital, Shenyang, Liaoning, China, 122000; 2. Department of Stomatology, Air Force hospital, Northern Theater, PLA, Shenyang, Liaoning, China, 110042; 3. Department of Dermatology, Air Force Hospital, Northern War Zone, PLA, Shenyang, Liaoning, China, 110042)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the expression and significance of gingival crevicular fluid secreted frizzled-related protein 1 (SFRP1), human beta-defensin-3 (hBD3), and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in patients with chronic periodontitis with helicobacter pylori (Hp) infection. **Methods** From July 2017 to September 2019, 167 patients with chronic periodontitis were selected in this hospital. According to whether they were accompanied by Hp infection, they were divided into the control group (without Hp infection, 105 cases) and the Hp infection group (chronic periodontitis with Hp infection, 62 cases). The expressions of SFRP1, hBD3 and TNF- α in gingival crevicular fluid were compared between the two groups. Logistic, Spearman, receiver operating characteristic (ROC) curve and area under ROC (AUC) were used for statistical analysis. **Results** SFRP1 and TNF- α in the Hp infection group were higher than those in the control group, and hBD3 was lower than that in the control group, the difference was statistically significant ($P <$

基金项目:辽宁省自然科学基金指导计划(20170681336)

作者单位:1. 辽宁省朝阳市中心医院口腔科,辽宁,朝阳 122000

2. 中国人民解放军北部战区空军医院口腔科,辽宁,沈阳 110042

3. 中国人民解放军北部战区空军医院皮肤科,辽宁,沈阳 110042

*通信作者:张丽媛, E-mail: zhangliyuan3326@163.com

0.05)。There was a significant correlation between gingival crevicular fluid SFRP1, hBD3, TNF- α and chronic periodontitis with Hp infection ($P<0.05$)。Gingival crevicular fluid SFRP1 and TNF- α were positively correlated with the degree of Hp infection, and hBD3 was negatively correlated with the degree of Hp infection ($P<0.05$)。The AUC of SFRP1 in predicting efficacy was 0.746 (95%CI 0.619~0.848), the AUC of hBD3 in predicting efficacy was 0.785 (95%CI 0.663~0.880), and the AUC of TNF- α in predicting efficacy was 0.697 (95%CI 0.567~0.807)。Conclusion The gingival crevicular fluid of patients with chronic periodontitis with Hp infection showed high expression of SFRP1 and TNF- α , and low expression of hBD3, which is related to the degree of Hp infection. The detection of the levels of the three can predict clinical efficacy and has high application value.

[KEY WORDS] Gingival crevicular fluid; SFRP1; hBD3; Tumor necrosis factor- α ; Chronic periodontitis with Hp infection

慢性牙周炎是引起成年人牙齿丧失的主要原因之一,合并Hp感染时可加重慢性牙周炎病情,增加临床治疗难度^[1]。分泌型卷曲相关蛋白(secreted frizzled-related protein 1, SFRP)1是SFRP家族成员,与其具有相似结构的SFRP5是牙周炎严重程度的生物标志物,提示SFRP家族可能与慢性牙周炎有关,但SFRP1在慢性牙周炎伴Hp感染中作用尚未阐明^[2]。人 β 防御素-3(human beta-defensin-3, hBD-3)是抗菌多肽成员之一,根据相关研究,抗菌多肽能通过刺激肥大细胞系参与牙周炎症疾病的发生,但是否与慢性牙周炎伴Hp感染有关仍不明确^[3]。肿瘤坏死因子- α (Tumor necrosis factor- α , TNF- α)是一种炎症因子,在牙周炎小鼠模型中呈高表达^[4]。本研究将探讨龈沟液SFRP1、hBD3、TNF- α 的表达及临床意义,报告如下。

1 对象和方法

1.1 研究对象

选取2017年7月至2019年9月本院收治的167例慢性牙周炎患者,根据是否伴有Hp感染分为对照组(无Hp感染,105例)、Hp感染组(慢性牙周炎伴Hp感染,62例)。所有患者自愿签署知情同意书。纳入标准:①慢性牙周炎患者:全口牙中附着丧失水平 >1 mm、牙周探诊深度 >5 mm、骨吸收位点 $>30\%$;②Hp感染组 ^{14}C 尿素吹气法提示阳性;③无其他系统急慢性感染;④入组前4周无质子泵抑制剂、克拉霉素等抗Hp治疗史;⑤心肝肾功能无明显异常;⑥入组前4周无抗生素应用史;⑦入组前6个月无牙周治疗史;排除标准:①哺乳期、妊娠期患者;②合并恶性肿瘤者。

1.2 方法

1.2.1 龈沟液SFRP1、hBD3、TNF- α 检测

于治疗前,从16、24、36、44四个位点采集龈沟液样本,通过酶联免疫双抗体夹心法试剂盒检测SFRP1、hBD3、TNF- α 水平,试剂盒购于德国罗氏公司。

1.2.2 Hp感染程度判断

于入院后治疗前,采用Hp检测仪(安徽养和医疗器械设备有限公司,YH04)及配套试剂盒,检查前受检者禁食4~6 h或空腹, ^{14}C 尿素胶囊($1\mu\text{Ci}$)1粒用120 mL温水送服,静坐15 min,吹气2~5 min,当吹气卡上指示窗内指示片的颜色由蓝色变为白色时停止吹气, ^{14}C -UBT ≥ 100 dpm时判定为Hp阳性,其中100~200为“+”,201~1 000为“++”, $>1 000$ 为“+++”^[5]。

1.3 治疗方法

Hp感染组均给予抗Hp三联疗法与牙周基础治疗。

1.4 疗效判断^[6]

显效:Hp阴性,牙周袋深度 ≤ 4 mm,X线片显示牙槽骨吸收不超过根长的1/3;有效:Hp阴性,牙周袋深度 ≤ 6 mm,X线片显示牙槽骨吸收超过根长的1/3,但不超过根长的1/2;无效:与显效、有效不相符者^[6]。总有效为显效与有效之和。

1.5 统计学方法

采用SPSS 22.0处理数据。计量资料以 $(\bar{x}\pm s)$ 表示,两独立组比较为 t 检验,多组比较以单因素方差分析,两两比较以LSD- t 检验。计数资料用 $n(\%)$ 表示,比较为 χ^2 检验。采用多因素Logistic回归分析龈沟液SFRP1、hBD3、TNF- α 与慢性牙周炎Hp感染的关系。采用Spearman分析龈沟液SFRP1、hBD3、TNF- α 与Hp感染程度的相关性。

采用接收者工作特征(ROC曲线下面积AUC分析)龈沟液SFRP1、hBD3、TNF- α 预测疗效的价值。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般资料比较

两组年龄、性别、体质量指数、饮酒史、吸烟史、牙周炎严重程度、合并疾病等资料比较,差异无统计学意义($P>0.05$),均衡可比。见表1。

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

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

项目	HP感染组 ($n=62$)	对照组 ($n=105$)	t/χ^2 值	P 值
年龄(岁)	49.28 $\pm$ 5.52	48.74 $\pm$ 5.80	0.592	0.555
性别(男/女)	36/26	65/40	0.241	0.624
体质量指数(kg/m ²)	22.59 $\pm$ 1.65	22.38 $\pm$ 1.62	0.804	0.423
饮酒史	38(61.29)	67(63.81)	0.106	0.715
吸烟史	32(51.61)	60(57.14)	0.482	0.488
牙周炎严重程度				
中度	32(51.61)	59(56.19)	0.329	0.566
重度	30(48.39)	46(43.81)		
合并疾病				
高脂血症	8(12.90)	15(14.29)	0.063	0.802
糖尿病	10(16.13)	19(18.10)	0.105	0.746
心脏病	3(4.84)	4(3.81)	0.006	0.937
高血压	6(9.68)	8(7.62)	0.215	0.643
HP感染(+ / ++ / +++)	22/19/21	-	-	-

2.2 两组龈沟液SFRP1、hBD3、TNF- α 表达

HP感染组SFRP1、TNF- α 高于对照组,hBD3低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表2。

表2 两组龈沟液SFRP1、hBD3、TNF- α 表达 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 The expression of SFRP1, hBD3 and TNF- α in gingival crevicular fluid of 2 groups ($\bar{x} \pm s$)

项目	HP感染组 ($n=62$)	对照组 ($n=105$)	t 值	P 值
SFRP1(pg/mL)	411.21 $\pm$ 69.89	236.89 $\pm$ 43.36	17.728	0.000
hBD3(μ g/L)	2.13 $\pm$ 0.53	4.97 $\pm$ 1.02	23.635	0.000
TNF- α (pg/mL)	2758.46 $\pm$ 222.37	1354.49 $\pm$ 187.66	43.569	0.000

2.3 龈沟液SFRP1、hBD3、TNF- α 与慢性牙周炎HP感染的关联关系

建立非条件Logistic回归模型,以本研究资料为样本,以发生慢性牙周炎HP感染为因变量,赋值1=HP感染,0=否。以前述单因素分析(表1、表2)中 $P<0.10$ 的指标/因素为自变量。初选了SFRP1、hBD3、TNF- α 为自变量,并参考两组总均值及中值进行分段(分层),转化成两分类变量。回归过程采用逐步后退法,以进行自变量的选择和剔除,设定

$\alpha_{剔除}=0.10, \alpha_{入选}=0.05$ 。3个自变量均被保留入回归方程($P<0.05$)。见表3。

表3 龈沟液SFRP1、hBD3、TNF- α 与慢性牙周炎HP感染的相关性

Table 3 Correlation between gingival crevicular fluid SFRP1, hBD3, TNF- α and Hp infection in chronic periodontitis

因素	赋值说明	β	SE	Wald	OR值	95%CI	P 值
SFRP1	1= ≥ 300 pg/mL, 0=否	0.793	0.272	8.507	2.210	1.297~3.766	0.003
hBD3	1= ≥ 3.4 μ g/L, 0=否	-0.357	0.155	5.323	0.700	0.517~0.948	0.021
TNF- α	1= ≥ 2000 pg/mL, 0=否	1.274	0.363	12.282	3.574	1.753~7.286	0.000

2.4 HP感染患者龈沟液SFRP1、hBD3、TNF- α 与HP感染程度的相关性

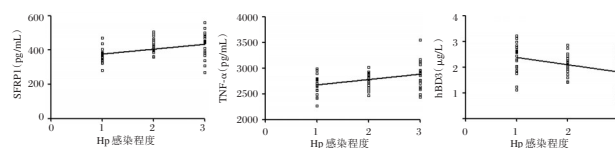
随HP感染加重,SFRP1、TNF- α 呈增加趋势,hBD3呈降低趋势,其变化趋势有统计学意义(<0.05)。采用Spearman进行相关性分析发现,龈沟液SFRP1、TNF- α 与HP感染程度呈正相关($r=0.400, 0.405, P$ 均 <0.05),hBD3与HP感染程度呈负相关($r=-0.410, P<0.05$)。见表4、图1。

表4 不同感染程度的HP感染患者龈沟液的SFRP1、hBD3、TNF- α 水平及比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Comparison of SFRP1, hBD3 and TNF- α levels in gingival crevicular fluid of patients with HP infection with different degrees of infection ($\bar{x} \pm s$)

感染程度 亚组	n	SFRP1 (pg/mL)	hBD3 (μ g/L)	TNF- α (pg/mL)
+	22	279.35 $\pm$ 50.01	3.16 $\pm$ 0.85	1683.88 $\pm$ 160.02
++	19	385.92 $\pm$ 55.84 ^a	2.14 $\pm$ 0.43 ^a	2943.81 $\pm$ 221.95 ^a
+++	21	572.23 $\pm$ 103.44 ^{ab}	1.05 $\pm$ 0.28 ^{ab}	3716.52 $\pm$ 288.07 ^{ab}
平均	62	411.21 $\pm$ 69.89	2.13 $\pm$ 0.53	2758.46 $\pm$ 222.37
F 值		85.541	72.887	418.792
P 值		0.000	0.000	0.000

注:显著性标记a、b分别为和+、++组相比 $P<0.05$ 。



注:赋值:1=HP感染“+”,2=HP感染“++”,3=HP感染“+++”。

图1 SFRP1、TNF- α 、hBD3与HP感染程度散点图

Figure 1 Scatter plot of SFRP1, TNF- α , hBD3 and Hp infection degree

2.5 龈沟液SFRP1、hBD3、TNF- α 预测疗效的ROC分析结果

总有效患者SFRP1、TNF- α 低于无效患者,

hBD3 高于无效患者差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 5~6、图 2。

表 5 不同疗效者龈沟液 SFRP1、hBD3、TNF- α 比较 ($\bar{x} \pm s$)

指标	总有效 ($n=39$)	无效 ($n=23$)	t 值	P 值
SFRP1 (pg/mL)	395.29 $\pm$ 58.96	438.20 $\pm$ 88.42	2.293	0.025
hBD3 (μ g/L)	2.56 $\pm$ 0.49	1.40 $\pm$ 0.60	9.351	<0.001
TNF- α (pg/mL)	2521.69 $\pm$ 189.56	3159.94 $\pm$ 278.00	11.846	<0.001

表 6 ROC 分析结果

Table 6 ROC analysis results

项目	AUC	95%CI	理论阈值	敏感度 (%)	特异度 (%)
SFRP1	0.746	0.619~0.848	413.21 pg/mL	0.818	0.641
hBD3	0.785	0.663~0.880	2.32 μ g/L	0.826	0.718
TNF- α	0.697	0.567~0.807	2919.30 pg/mL	0.615	0.769

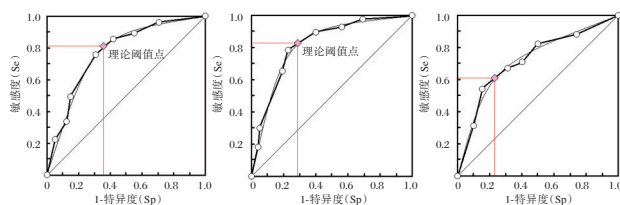


图 2 龈沟液 SFRP1、hBD3、TNF- α 预测疗效的 ROC

Figure 2 The ROC of the predictive efficacy of SFRP1, hBD3 and TNF- α in gingival crevicular fluid

3 讨论

Liu J 等^[7]研究指出, Wnt3a 与牙周炎发生密切相关。SFRP1 是 Wnt3a 信号通路重要的效应因子之一, 水平的提高可激活 Wnt3a 信号通路及下游因子, 增强 Wnt3a 对局部牙龈沟中微环境的破坏。赵芳等^[8]报道显示, 慢性牙周炎患者龈沟液 SFRP1 高于健康对照者。本研究显示, SFRP1 与慢性牙周炎合并 Hp 感染及 Hp 感染程度呈正相关, 可能参与了慢性牙周炎合并 Hp 感染的发病及 Hp 感染的加重。Chi YT 等^[9]研究指出, 慢性牙周炎患者牙龈组织 SFRP1 呈高表达, 且重度患者高于中度患者, 说明 SFRP1 与慢性牙周炎病情有关。SFRP1 高表达能通过调控 Wnt3a 信号通路, 提高下游单核细胞或巨噬细胞对牙周组织的浸润, 从而加重牙周的炎症反应与 Hp 感染, 影响患者病情程度。可见从基因水平靶向 SFRP1, 抑制 SFRP1 表达, 可能为慢性牙周炎伴 Hp 感染的防治及感染的控制提供了一个新的研究方向。但目前

关于 SFRP1 慢性牙周炎伴 Hp 感染领域的研究较少, SFRP1 是否通过其他途径或机制影响疾病的发生及严重程度仍需后续进一步的探讨。

hBD-3 具有抗真菌、抗病毒、抗细菌等活性, 参与机体的防御反应, 是获得性免疫和宿主天然免疫系统的重要组成部分, 在口腔中, 可表达于牙周组织^[10-11]。Bedran TB 等^[12]采用白介素-37 刺激三维共培养模型的齿龈上皮细胞和成纤维细胞, 发现白介素-6 等炎症因子大量表达, 而加入 hBD3 可明显减少炎症因子的分泌, 保护牙周组织。本研究显示, hBD3 的低表达与慢性牙周炎发病有关, 并能加重慢性牙周炎合并 Hp 感染的感染程度。分析原因发现, hBD-3 可通过降低趋化因子和促炎细胞因子表达, 减轻感染程度, 并能抑制基质金属蛋白酶 1、7、9 的分泌, 减少细胞外基质的破坏, 减轻牙周炎症反应^[13-14]。因此采用小 RNA、hBD-3 模拟物等技术提高 hBD-3 的表达, 可能有助于慢性牙周炎伴 Hp 感染的防治与治疗。TNF- α 是临床常用的感染类疾病炎症因子, 动物学实验发现, TNF- α 在牙周炎中呈高表达^[15]。但在慢性牙周炎伴 Hp 感染患者中的研究较少。本研究结果说明 TNF- α 参与慢性牙周炎伴 Hp 感染的发病, 并能影响感染的严重程度。可见抑制 TNF- α 的表达可能为临床防治慢性牙周炎伴 Hp 感染及改善感染程度提供了一个新靶点与思路。同时本研究还发现, TNF- α 预测疗效的 AUC 为 0.697, 提示检测 TNF- α 能为临床预测疗效提供参考。本研究不足之处在于, 入组病例数较少, 可能影响研究结果, 后续仍需扩大样本量进行完善。

参考文献

- [1] 刘涛, 李睿, 龚琳, 等. 胃幽门螺杆菌感染后 Semaphorin 5A 致胃癌可能机制的研究[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2019, 11(3): 189-193.
- [2] Schulz J, Knappe C, Graetz C, et al. Secreted frizzled-related protein 5 serum levels in human periodontitis-A nested case-control study[J]. J Clin Periodontol, 2019, 46(5): 522-528.
- [3] Gupta K, Idahosa C, Roy S, et al. Differential Regulation of Mas-Related G Protein-Coupled Receptor X2-Mediated Mast Cell Degranulation by Antimicrobial Host Defense Peptides and Porphyromonas gingivalis Lipopolysaccharide [J]. Infect Immun, 2017, 85(10): e00246-17.
- [4] Liu X, Wang Z, Song W, et al. Systematically transplanted human gingiva-derived mesenchymal stem cells regulate lipid metabolism and inflammation in hyperlipidemic mice with periodontitis[J]. Exp Ther Med, 2020, 19(1): 672-682.

(下转第 304 页)

MTDH、Ets-1 及 p21WAF1 蛋白在咽喉癌组织中的表达及临床意义

张雷¹ 贺媛² 陈元星³ 刘芳¹ 代欣^{2*}

[摘要] **目的** 分析异黏蛋白(MTDH)、转录调节因子-1(Ets-1)及细胞周期调控蛋白(p21WAF1)在咽喉癌组织中的表达及临床意义。**方法** 收集66例咽喉癌患者的临床资料,手术留取咽喉癌细胞癌组织66例(研究组)及42例癌旁黏膜组织(对照组)。比较两组MTDH、Ets-1及p21WAF1蛋白表达情况,分析上述蛋白与咽喉癌临床病理特征的关系。采用多元Logistic回归分析影响咽喉癌患者预后死亡的独立危险因素。**结果** 研究组MTDH、Ets-1及p21WAF1阳性表达率分别为63.64%、72.73%、42.42%,对照组分别为16.67%、23.81%、78.57%,对照组MTDH、Ets-1阳性表达率显著低于研究组,p21WAF1阳性表达率显著高于研究组,差异有统计学意义($P<0.05$)。临床分期Ⅲ~Ⅳ期、中低分化、有淋巴结转移者MTDH、Ets-1阳性表达率明显高于临床分期Ⅰ~Ⅱ期、高分化及无淋巴结转移者,差异有统计学意义($P<0.05$)。中低分化者p21WAF1阳性表达率明显高于高分化者,差异具有统计学意义($P<0.05$)。术后对患者进行1年随访,预后死亡12例(18.18%)。经非条件多因素logistic回归模型分析得,临床分期Ⅲ~Ⅳ期、中低分化、有淋巴结转移、MTDH、Ets-1阳性表达及p21WAF1阴性表达是影响咽喉癌患者预后死亡的独立危险因素($P<0.01$)。**结论** MTDH、Ets-1及p21WAF1蛋白在咽喉癌组织中表达异常,并可能参与咽喉癌发生、病情进展。

[关键词] 异黏蛋白;转录调节因子-1;细胞周期调控蛋白;咽喉癌

The expression and clinical significance of MTDH, Ets-1 and p21WAF1 proteins in pharyngeal carcinoma

ZHANG Lei¹, HE Yuan², CHEN Yuanxing³, LIU Fang¹, DAI Xin^{2*}

(1. Head and Neck Rehabilitation Center, Beijing Rehabilitation Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing, China, 100144; 2. Neurospeech Rehabilitation Center, Beijing Rehabilitation Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing, China, 100144; 3. Department of Otolaryngology, Head and Neck Surgery, Beijing Rehabilitation Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing, China, 100144)

[ABSTRACT] **Objective** To analyze the expression and clinical significance of metadherin (MTDH), E26 transform ation-spe-cific-1 (Ets-1) and cell cycle regulatory protein (p21WAF1) in pharyngeal carcinoma tissues. **Methods** The clinical data of 66 patients with throat cancer were selected. During the operation, the cancerous tissues of throat cancer cells of 66 cases (study group) and adjacent mucosa tissues (control group) in 42 cases were collected. The protein expressions of MTDH, Ets-1 and p21WAF1 were compared between the two groups, and the relationship between these proteins and the clinicopathological characteristics of throat cancer was analyzed. Multivariate Logistic regression was used to analyze the independent risk factors that affect the prognostic death of patients with throat cancer. **Results** The positive expression

基金项目:北京市自然科学基金资助项目(L182015)

作者单位:1.首都医科大学附属北京康复医院头颈康复中心,北京 100144

2.首都医科大学附属北京康复医院神经言语康复中心,北京 100144

3.首都医科大学附属北京康复医院耳鼻喉头颈外科,北京 100144

*通信作者:代欣, E-mail:daixin1977@163.com

rates of MTDH, Ets-1 and p21WAF1 in the study group were 63.64%, 72.73%, and 42.42%, respectively, and in the control group were 16.67%, 23.81%, and 78.57%, respectively. The positive expression rate of MTDH and Ets-1 in the control group was significantly lower than that in the study group, and the positive expression rate of p21WAF1 was significantly higher than that in the study group, the differences were statistically significant ($P<0.05$). The positive expression rates of MTDH and Ets-1 in patients with the clinical stages III to IV, medium and low differentiation, and lymph node metastases were significantly higher than those in patients with the clinical stages I to II, high differentiated and without lymph node metastasis, the differences were statistically significant ($P<0.05$). The positive expression rate of p21WAF1 in patients with low to moderate differentiation was significantly higher than that in patients with high differentiation, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). The patients were followed up for 1 year after the operation, and the prognosis death was 12 cases (18.18%). According to the analysis of unconditional multivariate logistic regression model, clinical stage III ~ IV, medium and low differentiation, lymph node metastasis, positive expression of MTDH, Ets-1 and negative expression of p21WAF1 are independent risk factors affecting the prognosis and death of patients with throat cancer ($P<0.01$). **Conclusion** MTDH, Ets-1 and p21WAF1 proteins are abnormally expressed in throat cancer tissues, and may be involved in the occurrence and progression of throat cancer.

[KEY WORDS] Metadherin; Transcription regulator-1; Cell cycle regulatory protein; Throat cancer

近年来,我国咽喉癌的发病率呈逐渐上升趋势,有关其发病机制尚未十分明确,但认为与肿瘤侵袭转移有关^[1]。异黏蛋白(metadherin, MTDH)是近年来发现的一个癌基因,在多种肿瘤中呈高表达,且被认为与肿瘤转移、预后不良有关^[2]。转录调节因子-1(E26 transformation-specific-1, Ets-1)是目前研究较多的一个信号依赖转录因子,该因子可通过不同途径在肿瘤发生、发展和转移等方面起着重要作用^[3]。而细胞周期调控蛋白P21(wide-type P21 activated factor1, p21WAF1)是目前已知的具有最广泛激酶抑制活性的细胞周期抑制蛋白,可抑制Rb蛋白磷酸化,从而使细胞周期停滞^[4]。目前,MTDH、Ets-1及p21WAF1蛋白在咽喉癌组织中的研究鲜有报道。因此,本组研究采用免疫组织化学法检测上述蛋白在咽喉癌组织中的表达情况,并探讨其在咽喉癌发生、发展中的临床意义,为更好治疗咽喉癌提供可靠的指导意见。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集本院2017年5月至2019年5月收治的咽喉癌患者的临床资料。纳入指标:①均经病理穿刺活检确诊为咽喉癌^[5];②免疫、血液系统功能正常;③临床各方面资料无丢失或缺损;④术前未进行化疗、放疗等治疗。排除标准:①合并慢性呼吸道疾病者;②所有患者均自愿参与本次研究,且签署知情同意书;③合并肾炎、全身变态反

应性病史;④近期或反复发生上呼吸道感染史。

最终共纳入66例咽喉癌患者,男57例,女9例;平均年龄(60.58 ± 13.25)岁;分化程度:高分化40例,中低分化26例;颈部淋巴结转移27例;肿瘤分期:I~II期41例,III~IV期25例。手术留取咽喉癌细胞癌组织纳入研究组;并选取其相应癌旁黏膜组织(距癌组织 >0.5 cm,病理证实无癌细胞)42例纳入对照组。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂

MTDH兔抗人多克隆抗体、鼠抗人Ets-1单克隆抗体、鼠抗人p21WAF1单克隆抗体均购自北京中杉金桥生物工程有限公司;SP免疫组织化学系列工作液试剂盒、DAB显色剂购自河北博海生物有限公司。

1.2.2 染色方法

所有标本手术切除后立即用10%甲醛固定,组织切片后脱蜡、水化。然后根据链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶(Streptomycin avidin peroxidase, S-P)免疫组化染色对MTDH、Ets-1及p21WAF1蛋白进行检测,具体方法严格按照试剂盒说明执行。每批切片染色均以PB S代替一抗作阴性对照,MTDH、Ets-1及p21WAF1用已知阳性表达的组织切片作阳性对照。一抗稀释比例均为1:100。

1.2.3 结果判断^[6]

根据阳性细胞百分比、染色强度判定。0分:无阳性细胞,1分:阳性细胞 $<10\%$,2分:阳性细胞

10%~50%, 3分:阳性细胞>50%。染色强度判定:0分无色,1分淡黄色,棕黄色2分,棕褐色3分。总分:上述2项评分的乘积。阳性:总分≥3分。

1.3 观察指标

①比较对照组与研究组 MTDH、Ets-1 及 p21WAF1 蛋白表达情况。②分析 MTDH、Ets-1 及 p21WAF1 表达与咽喉癌临床病理特征的关系。③对患者进行1年电话随访,分析其预后生存与死亡情况,并影响咽喉癌患者预后死亡的独立危险因素。

1.4 统计学方法

采用 SPSS22.0 软件进行统计分析。计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,行 t 检验;计数资料采用 $n(\%)$ 描述,行 χ^2 检验;影响因素采用多元 Logistic 回归分析,以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 两组 MTDH、Ets-1 及 p21WAF1 蛋白表达情况

研究组 MTDH、Ets-1 阳性表达率分别高于对照组,差异有统计意义($P < 0.05$),p21WAF1 阳性表达率显著低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表1、图1。

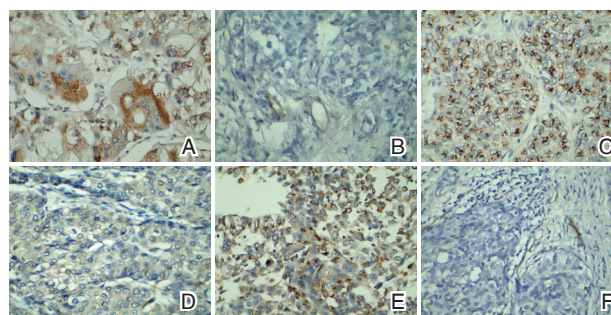
2.2 咽喉癌患者 MTDH、Ets-1 及 p21WAF1 表达与其临床病理特征的关系

临床分期Ⅲ~Ⅳ期、中低分化、有淋巴结转移者 MTDH、Ets-1 阳性表达率明显高于临床分期Ⅰ~Ⅱ期、高分化及无淋巴结转移者,差异有统计学意义($P < 0.05$)。而中低分化者 p21WAF1 阳性表达率明显高于高分化者,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见表2。

表1 两组 MTDH、Ets-1 及 p21WAF1 蛋白表达情况
[$n(\%)$]

Table 1 Expression of mtdh, Ets-1 and p21WAF1 in the two groups [$n(\%)$]

组别	<i>n</i>	MTDH 阳性	Ets-1 阳性	p21WAF1 阳性
对照组	42	7(16.67)	10(23.81)	33(78.57)
研究组	66	42(63.64)	48(72.73)	28(42.42)
χ^2 值	—	22.846	24.703	13.644
<i>P</i> 值	—	<0.001	<0.001	<0.001



注:A、C、E. 咽喉癌患者 MTDH、Ets-1、p21WAF1 蛋白表达。B、D、F 为正常人群 MTDH、Ets-1、p21WAF1 蛋白表达。

图1 MTDH、Ets-1 及 p21WAF1 蛋白在不同人群中的表达情况(SP,×400)

Figure 1 expression of mtdh, Ets-1 and p21WAF1 proteins in different populations (SP,×400)

2.3 影响咽喉癌患者预后死亡的单因素分析

术后对患者进行1年随访,预后死亡12例(18.18%)。临床分期、分化程度、淋巴结转移、MTDH、Ets-1 阳性表达率及 p21WAF1 阴性表达率与咽喉癌患者死亡有显著相关性($P < 0.05$)。见表3。

2.4 影响咽喉癌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、中低分化、有淋巴结转移、MTDH、Ets-1 阳性表达及 p21WAF1 阴性表达是影响咽喉

表2 咽喉癌患者 MTDH、Ets-1 及 p21WAF1 表达与其临床病理特征的关系 [$n(\%)$]

Table 2 Expression of mtdh, Ets-1 and p21WAF1 in patients with laryngeal carcinoma and their clinicopathological features

临床病理特征		<i>n</i>	MTDH 阳性	χ^2 值	<i>P</i> 值	Ets-1 阳性	χ^2 值	<i>P</i> 值	p21WAF1 阳性	χ^2 值	<i>P</i> 值
年龄(岁)	≤45	34	20(58.52)	0.702	0.402	24(70.59)	0.162	0.688	12(35.29)	1.460	0.227
	>45	32	22(68.75)			24(75.00)			16(50.00)		
性别	男	57	37(64.91)	0.294	0.588	42(73.68)	0.193	0.660	23(40.35)	0.736	0.391
	女	9	5(55.56)			6(66.67)			5(55.56)		
肿瘤直径(cm)	≤3	35	19(54.29)	2.816	0.093	23(65.71)	1.848	0.174	14(40.00)	0.179	0.672
	>3	31	23(74.19)			25(80.65)			14(45.16)		
临床分期	Ⅰ~Ⅱ期	41	22(53.66)	4.657	0.031	24(58.54)	10.989	0.001	18(43.90)	0.097	0.756
	Ⅲ~Ⅳ期	25	20(80.00)			24(96.00)			10(40.00)		
分化程度	高分化	40	21(52.50)	5.442	0.020	23(57.50)	11.870	0.001	8(20.00)	20.903	0.001
	中低分化	26	21(80.77)			25(96.15)			20(76.92)		
肿瘤部位	声门上型	21	15(71.43)	0.808	0.369	15(71.43)	0.026	0.871	11(52.38)	1.250	0.264
	声门型	45	27(60.00)			33(73.33)			17(37.78)		
淋巴结转移	有	27	23(85.19)	7.051	0.008	25(92.59)	9.091	0.003	10(37.04)	0.543	0.461
	无	39	21(53.85)			23(58.97)			18(46.15)		

表3 影响咽喉癌患者预后死亡的单因素分析 [n(%)]

Table 3 Univariate analysis of prognostic mortality in patients with laryngeal cancer [n(%)]

临床病理特征	n	死亡(n=12)	χ^2 值	P值
年龄(岁)	≤45	34	6(17.65)	0.013 0.908
	>45	32	6(18.75)	
性别	男	57	10(17.54)	0.114 0.735
	女	9	2(22.22)	
肿瘤直径(cm)	≤3	35	5(14.29)	0.760 0.383
	>3	31	7(22.58)	
临床分期	I~II期	41	2(4.88)	12.878 0.001
	III~IV期	25	10(40.00)	
分化程度	高分化	40	1(2.50)	16.786 0.001
	中低分化	26	11(42.31)	
肿瘤部位	声门上型	21	3(14.29)	0.314 0.575
	声门型	45	9(20.00)	
淋巴结转移	有	27	11(40.74)	15.631 0.001
	无	39	1(2.56)	
MTDH	阳性	42	12(28.57)	7.948 0.005
	阴性	24	0(0.00)	
Ets-1	阳性	48	12(25.00)	5.500 0.019
	阴性	18	0(0.00)	
p21WAF1	阳性	28	1(3.57)	6.978 0.008
	阴性	38	11(28.95)	

癌患者预后死亡的独立危险因素($P<0.01$)。见表4。

3 讨论

恶性肿瘤细胞失控性增殖与高代谢状态导致肿瘤组织内缺氧、常存在坏死区域和血管增生区域,使得肿瘤侵袭性更强、更易发生远处转移,这主要是因为缺氧状态可诱发部分蛋白与基因的合成及表达增加,MTDH在这过程中具有重要作用^[7]。MTDH位于人体染色体8q22上,是基因扩增及肿瘤基因位点改变的热点区域。Dilsa等^[8]研究证实,MTDH在乳腺癌、肺癌、食管鳞状细胞癌等多种恶性肿瘤组织中呈高表达,在肿瘤细胞生成、转移、增殖等方面均具有重要作用。现已有研究证实,MTDH通过上调缺氧诱导因子-1,促进肿瘤血管生成,为肿瘤生长提供能源与生长环境^[9-10]。本组研究通过SP方法对咽喉癌及癌旁正

表4 影响咽喉癌患者预后死亡的多因素分析

Table 4 Analysis of multiple factors influencing the prognosis and death of patients with laryngeal cancer

变量	回归系数	标准误	wald/ χ^2 值	P值	OR值	95%CI
临床分期: III~IV期(参照组: I~II期)	0.578	0.202	8.134	<0.001	1.782	1.200~2.648
分化程度: 中低分化(参照组: 高分化)	0.772	0.234	11.0.51	<0.001	2.164	1.368~3.423
淋巴结转移: 有(参照组: 无)	0.663	0.252	10.113	<0.001	1.941	1.184~3.180
MTDH: 阳性(参照组: 阴性)	0.704	0.236	8.617	<0.001	2.022	1.273~3.211
Ets-1: 阳性(参照组: 阴性)	0.613	0.228	9.515	<0.001	1.846	1.181~2.886
p21WAF1 阴性(参照组: 阳性)	0.654	0.204	9.547	<0.001	1.923	1.289~2.869

常组织中MTDH的表达情况进行检测,结果发现,与癌旁正常组织相比,咽喉癌组织中MTDH阳性表达率更高,且其阳性表达率与肿瘤临床分期、分化程度及淋巴结转移密切相关,提示MTDH可能在咽喉癌的发生、发展和转移过程中起重要作用。Ets-1是目前研究较多的一个信号依赖转录因子。国外大量研究显示,Ets-1在侵袭性肿瘤的间质纤维母细胞及内皮细胞中均有表达,且其高表达可能是恶性肿瘤发生、发展过程中的一个重要环节^[11-12]。Nazir等^[13]研究显示,子宫内膜癌、鼻咽癌、食管癌等癌组织中,Ets-1阳性表达率显著高于癌旁及息肉组织。但Ets-1与咽喉癌的关系报道较少见。本组研究发现,咽喉癌组织中Ets-1阳性表达率显著高于癌旁正常组织,分析其原因可能是由于该蛋白本身就是一种原癌基因,过量表达导致细胞恶性转化加快。因此,推测Ets-1在咽喉癌发生、发展中具有重要作用,通过测量其表达情况可作为咽喉癌病变程度及评估预后的分子指

标之一。

p21WAF1是目前研究较多的抑癌基因,属于单拷贝基因。p21WAF1可通过抑制Cyclin-CDK复合物及抑制增殖细胞核抗原(Proliferating cell nuclear antigen, PCNA),使细胞周期在G1期停滞,进而抑制细胞的无限增殖^[14]。多数学者认为,p21WAF1基因的多态性使其阳性表达与肿瘤的关系因不同类型肿瘤而异^[15]。Zohny等^[16]研究发现,在肺癌、乳腺癌、结肠癌中,肿瘤恶性程度越高,p21WAF1表达越高。此外,MTDH、Ets-1阳性表达及p21WAF1阴性亦是咽喉癌患者预后死亡的独立危险因素,提示MTDH、Ets-1及p21WAF1在评估患者预后情况中具有重要的价值。

综上所述,MTDH、Ets-1及p21WAF1蛋白在咽喉癌组织中表达异常,并与咽喉癌发生、发展有关,或可作为判断咽喉癌恶性程度及评估其预后的参考指标。

参考文献

- [1] 张庆颜,董小玉,臧乃亮,等. CRISPR/Cas9 系统在人类疾病中的研究应用进展[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2018, 10(3):206-211.
- [2] Eguchi K, Suzuki M, Ida S, et al. Successful treatment of radiation-induced mucositis with proton pump inhibitor administration; A report of two laryngeal cancer cases[J]. *Auris Nasus Larynx*, 2016, 112(3):520-523.
- [3] 郝媛媛,程亮亮,于显凤. 同步放化疗联合泰欣生治疗进展期食管癌的临床疗效及安全性分析[J]. 保健医学研究与实践, 2019, 16(4):1564-1566.
- [4] Arens C, Schwemmle C, Voigt-Zimmermann S. Chirurgische Rekonstruktionen beim Larynxkarzinom Surgical reconstruction in laryngeal carcinoma[J]. *HNO*, 2020, 68(10):456-457.
- [5] 刘喜亮. 不同手术治疗后喉癌患者气管感染、肺功能损伤发生情况及其对肿瘤复发的影响[J]. 解放军医药杂志, 2018, 30(1):42-45.
- [6] Sakanaka K, Ishida Y, Fujii K, et al. Long-term outcome of definitive radiotherapy for cervical esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Rad Oncol*, 2018, 13(1):7.
- [7] 何克剑,侯晓强,尹龙. 小RNA 干扰技术靶向沉默 CDK6 对喉癌细胞生物学特性的影响[J]. 医学分子生物学杂志, 2019, 16(6):582-586.
- [8] Dilsa MK, Xiaochuan D, Graciela M, et al. Post-trimodality expression levels of metadherin (MTDH) as a prognostic biomarker for esophageal adenocarcinoma patients[J]. *Med oncol*, 2017, 34(8):1-7.
- [9] Neeli PK, Gollavilli PN, Mallappa S, et al. A novel metadherin Δ 7 splice variant enhances triple negative breast cancer aggressiveness by modulating mitochondrial function via NFB-SIRT3 axis[J]. *Oncogene*, 2019, 39(10):4654.
- [10] Shin SS, Ko MC, Park YJ, et al. Hydrangenol inhibits the proliferation, migration, and invasion of EJ bladder cancer cells via p21WAF1-mediated G1-phase cell cycle arrest, p38 MAPK activation, and reduction in Sp-1-induced MMP-9 expression[J]. *Excli J*, 2018, 17(4):531-543.
- [11] Ranjan A, Iyer SV, Ward C, et al. MTBP inhibits the Erk1/2-Elk-1 signaling in hepatocellular carcinoma[J]. *Oncotarget*, 2018, 9(30):21429-21443.
- [12] Park KJ, Lee JL, Yoon SK, et al. Radiomics-based prediction model for outcomes of PD-1/PD-L1 immunotherapy in metastatic urothelial carcinoma[J]. *Eur Rad*, 2020, 30(10):5392-5403.
- [13] Nazir SU, Kumar R, Singh A, et al. Corrigendum to "Breast cancer invasion and progression by MMP-9 through Ets-1 transcription factor" [Gene 711 (2019) 143952][J]. *Gene*, 2019, 716(6):144013.
- [14] Kim DH, Yoon CJ, Kim JS, et al. Abstract 470: Epstein-Barr virus-encoded miR-BART5 modulates PIAS3-pSTAT3 and p21waf1 in gastric carcinoma cells [J]. *Cancer Res*, 2017, 77(13 Supplement):470.
- [15] Williams M, Liu X, Zhang Y, et al. NCOA5 deficiency promotes a unique liver protumorigenic microenvironment through p21WAF1/CIP1 overexpression, which is reversed by metformin[J]. *Oncogene*, 2020, 39(19):165.
- [16] Zohny SF, Al-Malki AL, Zamzami MA, et al. p21 Waf1/Cip1 : its paradoxical effect in the regulation of breast cancer [J]. *Breast Cancer*, 2019, 26(2):131-137.

(上接第 299 页)

- [5] 赵志忠,吴卫兰,武丽娟,等. 晋城矿区 1885 例消化门诊患者 14C 尿素呼气试验幽门螺杆菌感染监测结果分析[J]. 中国医师杂志, 2012, 14(2):245-246.
- [6] 李晋,王秉新,赵双,等. 牙周病病人正畸治疗时机选择及效果分析[J]. 内蒙古医科大学学报, 2019, 41(4):415-417.
- [7] Liu J, Ren X, Zhang M, et al. Roles of Wnt3a and Dkk1 in experimental periodontitis[J]. *J Dent Sci*, 2017, 12(3):220-225.
- [8] 赵芳,黄婷,李娟. Wnt3a、SFRP1、NLRP3 及 IL-1 β 联合检测对慢性牙周炎感染的诊断价值分析[J]. 实验与检验医学, 2019, 37(2):118-120.
- [9] Chi YT, Xu CJ, Sun XJ, et al. Expression and significance of secreted frizzled-related protein 1 and β -catenin in gingival tissue of patients with chronic periodontitis[J]. *West Chin J Stomatol*, 2018, 36(3):257-261.
- [10] Yoo YJ, Perinpanayagam H, Lee JY, et al. Synthetic Human β Defensin -3 - C15 Peptide in Endodontics: Potential Therapeutic Agent in Streptococcus gordonii Lipoprotein - Stimulated Human Dental Pulp-Derived Cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 21(1):E71.
- [11] Chen L, Lv Z, Gao Z, et al. Human β -defensin-3 reduces excessive autophagy in intestinal epithelial cells and in experimental necrotizing enterocolitis [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1):19890.
- [12] Bedran TB, Mayer MP, Spolidorio DP, et al. Synergistic anti-inflammatory activity of the antimicrobial peptides human beta-defensin-3 (hBD-3) and cathelicidin (LL-37) in a three-dimensional co-culture model of gingival epithelial cells and fibroblasts[J]. *PLoS One*, 2014, 9(9):e106766.
- [13] Lee JK, Chang SW, Perinpanayagam H, et al. Antibacterial efficacy of a human β -defensin-3 peptide on multispecies biofilms[J]. *J Endod*, 2013, 39(12):1625-1629.
- [14] Raina M, Bates AM, Fischer CL, et al. Human beta defensin 3 alters matrix metalloproteinase production in human dendritic cells exposed to Porphyromonas gingivalis hemagglutinin B[J]. *J Periodontol*, 2018, 89(3):361-369.
- [15] 刘永召,郑瑞,韩淑伶. 盐酸米诺环素对牙周炎大鼠的治疗效果及对大鼠 IL-8、hs-CRP、TNF- α 的影响[J]. 川北医学院学报, 2019, 34(3):349-353.

· 论 著 ·

急性脑梗死患者外周血 miR-497 表达与炎症氧化应激的关系及对预后的预测价值

张皓春^{1*} 陈忠¹ 文泽贤¹ 刘春平² 刘月娥² 蒲国明² 刘素君² 李源²

【摘要】目的 急性脑梗死(ACI)患者外周血 miR-497 表达与炎症氧化应激的关系及对预后的预测价值。**方法** 选择2017年5月至2019年9月期间在本院接受静脉溶栓治疗的80例ACI患者作为ACI组,同期体检的60例健康体检者作为对照组,检测并比较两组外周血 miR-497 的表达水平,血清中炎症因子肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-6(IL-6)、白介素-17(IL-17)的含量及氧化应激指标丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的含量。根据90 d时的改良 Rankin 量表(mRS)评分评估预后。**结果** ACI组患者外周血中 miR-497 的表达水平高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);ACI组中 miR-497 表达 $\geq$ 中位数患者的血清 TNF- α 、IL-6、IL-17、MDA 含量高于 miR-497 表达 $<$ 中位数患者,SOD、GSH-Px 含量低于 miR-497 表达 $<$ 中位数患者;ACI组中预后不良患者外周血中 miR-497 的表达水平高于预后良好患者,差异均有统计学意义($P<0.05$);ROC 曲线下面积为 0.841 1(95%CI: 0.750 9~0.931 3, $P<0.05$),外周血 miR-497 表达水平对 ACI 患者的预后具有预测价值。**结论** ACI 患者外周血 miR-497 表达增加与炎症氧化应激过度激活及预后不良有关。

【关键词】 急性脑梗死; miR-497; 炎症反应; 氧化应激反应; 预后

Relationship between mir - 497 expression and inflammatory oxidative stress in patients with acute cerebral infarction and its prognostic value

ZHANG Haochun^{1*}, CHEN Zhong¹, WEN Zexian¹, LIU Chunping², LIU Yuee², PU Guoming², LIU Sujun², LI Yuan²

(1. Department of Cerebrovascular Disease, Dazhou Central Hospital, Dazhou, Sichuan, China, 635000;

2. Department of Neurology, Dazhou Central Hospital, Dazhou, Sichuan, China, 635000)

【ABSTRACT】 Objective To investigate the relationship between the expression of miR-497 in peripheral blood and inflammatory oxidative stress, prognosis in patients with acute cerebral infarction (ACI). **Method** 80 patients with ACI who received intravenous thrombolytic therapy in our hospital from May 2017 to September 2019 were selected as the ACI group, and 60 healthy subjects in the same period were selected as the control group. The expression level of miR-497 in peripheral blood, the contents of inflammatory factors such as tumor necrosis factor - α (TNF - α), interleukin-6 (IL-6), interleukin-17 (IL-17) and oxidative stress index malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) were determined and compared. The prognosis was evaluated according to the modified Rankin Scale (mRS) score at 90 days. mRS score 0-2 points was good prognosis, and 3-6 points was poor prognosis. **Result** The expression level of miR-497 in peripheral blood of the ACI group was higher than that of the control group ($P<0.05$). The levels of TNF- α , IL-6, IL-17 and MDA in serum of patients with miR-497 expression $\geq$ median in the ACI group were higher than those of patients with miR-497 expression $<$ median, SOD and GSH-Px levels

基金项目:达州市科学技术局(2020013-1)

作者单位:1. 达州市中心医院脑血管病科,四川,达州 635000

2. 达州市中心医院神经内科,四川,达州 635000

*通信作者:张皓春, E-mail: yangliuyi24@163.com

were lower than those of patients with miR-497 expression < median, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The expression level of miR-497 in peripheral blood of patients with poor prognosis was higher than that of patients with good prognosis in the ACI group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The area under the ROC curve was 0.8411 (95% CI: 0.7509~0.9313, $P < 0.05$). The expression level of miR-497 in peripheral blood has predictive value for the prognosis of ACI patients. **Conclusion** The increased expression of miR-497 in peripheral blood of ACI patients is related to excessive activation of inflammatory oxidative stress and poor prognosis.

[KEY WORDS] Acute cerebral infarction; miR-497; inflammatory response; Oxidative stress response; Prognosis

急性脑梗死 (acute cerebral infarction, ACI) 是颅内动脉血栓栓塞或血栓形成引起的脑组织缺血缺氧损害, 发病率呈逐年上升趋势、发病人群呈年轻化趋势, 致残率较高、严重影响患者的生活质量^[1]。ACI 患者神经功能损害的机制复杂, 多项研究报道了炎症反应及氧化应激反应的过度激活与脑组织缺血缺氧损害密切相关^[2]。微小 RNA (microRNA, miR) 是一类在神经系统中发挥重要作用的非编码小分子 RNA, 多种 miRs 在缺血缺氧脑组织、糖氧剥夺神经元中存在异常表达^[3-4]。国内闫海清^[5]的细胞研究发现, 糖氧剥夺神经元中 miR-497 表达增加且对炎症反应、氧化应激反应的激活具有促进作用。但 miR-497 在 ACI 发病过程中表达的变化及意义尚不清楚。因此, 本研究将研究外周血 miR-497 表达与炎症氧化应激的关系及对预后的预测价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选择 2017 年 5 月至 2019 年 9 月期间在本院接受静脉溶栓治疗的 80 例 ACI 患者作为 ACI 组, 其中男性 51 例、女性 29 例, 年龄 (52.93 ± 10.92) 岁。纳入标准: ①发病时间 < 4.5 h, 符合静脉溶栓指征; ②符合 ACI 诊断标准^[6]; ③临床资料及随访资料完整; ④入院后留取外周静脉血 3~5 mL 用于 miR-497 表达的检测。排除标准: ①存在静脉溶栓禁忌症; ②既往有脑卒中、脑外伤病史; ③合并自身免疫性疾病、恶性肿瘤、血液系统疾病。另取同期在我院体检的 60 例健康体检者作为对照组。对照组中男性 38 例、女性 22 例, 年龄 (49.57 ± 11.24) 岁。两组间一般资料的比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。本研究取得患者知情同意及医院伦理委员会批准。

1.2 外周血 miR-497 表达的检测

取 ACI 组患者入院后即刻的外周血样本及对

照组志愿者体检时的外周血样本, 采用北京天根公司的试剂盒进行 miR-497 表达的检测。首先采用全血 RNA 提取试剂盒提取 RNA, 而后采用 miR 反转录试剂盒将 RNA 中的 miR 反转录合成 cDNA, 最后采用 miR 荧光定量 PCR 检测试剂盒进行 PCR 检测, 反应体系为 cDNA 1 μ L、试剂盒内反应混合液 10 μ L、10 μ mol/L 的上游引物 0.4 μ L、试剂盒内的通用下游引物 0.4 μ L, 去离子水补足至 20 μ L 并在荧光定量 PCR 仪上进行反应, 反应程序为 94 s W2 预变性 3 min, 94 $^{\circ}$ C 15 s、60 $^{\circ}$ C 40 s 重复 40 个循环。根据反应的循环曲线计算 miR-497 的表达水平。

1.3 血清炎症因子及氧化应激指标的检测

取 ACI 组患者入院后即刻的血清样本及对照组志愿者体检时的血清样本, 采用酶联免疫试剂盒 (上海西唐公司) 检测肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-6 (IL-6)、白介素-17 (IL-17) 的含量, 采用硫代巴比妥酸试剂盒 (南京建成公司) 检测丙二醛 (MDA) 的含量, 采用黄嘌呤氧化法试剂盒 (南京建成公司) 检测超氧化物歧化酶 (SOD) 的含量, 采用分光光度法试剂盒 (南京建成公司) 检测谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 的含量。

1.4 病情严重程度的评价

根据入院时美国国立卫生研究院卒中量表^[6] (the National Institutes of Health Stroke Scale, NIHSS) 评分评价病情严重程度, < 5 分为轻度、5~15 分为中度、 ≥ 16 分为重度。

1.5 预后的评价

静脉溶栓后 90 d, 采用改良 Rankin 量表^[6] (Modified Rankin Scale, mRS) 评价预后, mRS 评分 0~2 分为预后良好、3~6 分为预后不良。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件进行统计学处理, 计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间比较采用 t 检验、多组间比

较采用单因素方差分析,miR-497 预测预后的价值采用ROC 曲线分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组外周血 miR-497 表达水平的比较

ACI 组患者外周血中 miR-497 的表达水平明显高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

表 1 两组外周血 miR-497 表达水平的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of miR-497 expression in peripheral blood between 2 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	miR-497
ACI 组	80	1.00±0.27
对照组	60	0.74±0.20
<i>t</i> 值		6.276
<i>P</i> 值		0.000

2.2 ACI 组中 miR-497 不同表达患者血清炎症因子的比较

在 ACI 组中,miR-497 表达<中位数患者血清 TNF- α 、IL-6、IL-17miR-497 表达≥中位数患者含量明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 2。

表 2 ACI 组中 miR-497 不同表达患者血清炎症因子的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of serum inflammatory factors between patients with different expression of miR-497 in ACI group ($\bar{x} \pm s$)

项目	<i>n</i>	TNF- α (ng/mL)	IL-6 (pg/mL)	IL-17 (ng/mL)
miR-497 表达 ≥中位数	40	23.19±4.59	5.96±0.94	14.04±2.93
<中位数	40	17.58±3.14	4.22±0.77	10.28±2.25
<i>t</i> 值		6.380	9.057	6.437
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000

2.3 ACI 组中 miR-497 不同表达患者血清氧化应激指标的比较

与 ACI 组中 miR-497 表达<中位数患者比较,ACI 组中 miR-497 表达≥中位数患者的血清 MDA 含量明显升高,SOD、GSH-Px 含量明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 3。

2.4 ACI 组中不同病情严重程度患者外周血 miR-497 表达水平的比较

ACI 组中不同病情严重程度患者外周血 miR-497 表达水平比较结果:重度>中度>轻度,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 4。

2.5 ACI 组中不同预后患者外周血 miR-497 表达水平的比较

ACI 组中外周血 miR497 的表达水平比较,33

表 3 ACI 组中 miR-497 不同表达患者血清氧化应激指标的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of serum oxidative stress indexes between patients with different expression of miR-497 in ACI group ($\bar{x} \pm s$)

项目	<i>n</i>	MDA (mmol/L)	SOD (U/L)	GSH-Px (U/L)
miR-497 表达 ≥中位数	40	17.49±3.82	93.29±16.58	44.52±10.14
<中位数	40	12.57±2.41	127.44±24.59	58.67±15.58
<i>t</i> 值		6.889	7.283	4.814
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000

表 4 ACI 组中不同病情严重程度患者外周血 miR-497 表达水平的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Comparison of miR-497 expression in peripheral blood of patients with different severity in ACI group ($\bar{x} \pm s$)

严重程度	<i>n</i>	miR-497
轻度	27	0.83±0.22
中度	34	1.01±0.27
重度	19	1.27±0.35
<i>F</i> 值		54.938
<i>P</i> 值		<0.05

例预后不良患者高于 47 例预后良好患者($t=6.364$, $P=0.000$),差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.6 外周血 miR-497 表达水平预测 ACI 组患者预后的 ROC 曲线分析

外周血 miR-497 表达水平预测 ACI 组患者预后的 ROC 曲线下面积为 0.8411 (95%CI: 0.7509 ~ 0.9313, $P<0.05$)。根据约登指数最大值确定最佳截断值为 1.035,该截断值预测 ACI 组患者预后的灵敏度为 85.11%、特异性为 72.73%。见图 1。

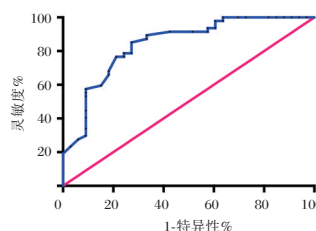


图 1 外周血 miR-497 表达水平预测 ACI 组患者预后的 ROC 曲线

Figure 1 ROC curve of miR-497 expression in peripheral blood predicting prognosis of patients with ACI

3 讨论

miR 是近些年心脑血管疾病发病机制研究的热门分子,在心肌梗死、脑梗死的发病过程中,缺血缺氧的病理刺激能够引起多种 miR 表达改变。miR-497 是一种具有加剧损伤作用的 miR,多项动

物实验发现,抑制 miR-497 的表达能够减轻脑梗死大鼠的神经损伤及心肌梗死大鼠的心肌损伤^[7-8]。闫海清^[5]的细胞研究发现,糖氧剥夺的神经元中 miR-497 的表达水平明显增加;Wang J^[9]的临床研究发现,急性心肌梗死外周血中 miR-497 的表达水平明显增加。本研究结果与 miR-497 在糖氧剥夺神经元中表达增加的趋势及在心肌梗死患者外周血中表达增加的趋势一致。

根据闫海清^[5]的细胞研究结果,在糖氧剥夺的同时敲低 miR-497 的表达能够明显抑制神经元内炎症反应及氧化应激反应的激活,表明 miR-497 在糖氧剥夺引起神经元损伤的过程中参与炎症反应及氧化应激反应的调控。目前多项 ACI 相关的研究已经证实,炎症及氧化应激反应的过度激活与神经功能的损害密切相关,ACI 患者血清中炎症因子 TNF- α 、IL-6、IL-17 及氧化应激产物 MDA 的含量增加,而抗氧化酶 SOD、GSH-Px 的含量降低^[10-12]。为了阐明 miR-497 在 ACI 发病过程中对炎症及氧化应激的调控作用,本研究进一步分析了不同 miR-497 表达水平的 ACI 患者血清炎症因子及氧化应激指标的差异,结果表明 ACI 发病过程中 miR-497 表达增加可能与炎症反应及氧化应激反应的过度激活有关。

ACI 患者遗留神经功能损害会对日常生活造成不利影响。目前多项研究采用 mRS 评分 ACI 患者的短期神经功能及预后,根据闫薪如^[13]的研究结果,ACI 患者 90d 预后不良的发生率分别为 36.48%、51.43%、41.41%。本研究对 90 d 预后进行了随访,共 33 例患者发生了预后不良、发生率 42.5%,与国内几项研究关于 ACI 预后不良发生率的报道基本一致。在此基础上分析 miR-497 与预后不良的关系可知:预后不良的 ACI 患者外周血 miR-497 的表达水平高于预后良好的 ACI 患者且 miR-497 的表达水平对 ACI 患者的预后具有预测价值。这一结果表明 ACI 患者 miR-497 表达增加与预后不良有关,ACI 发病后检测 miR-497 的表达有助于发现可能发生预后不良的患者,进而可以尽早进行高压氧^[14]、电刺激^[15]等治疗以促进神经功能重建、改善预后。

综上所述,本研究的临床数据表明 ACI 患者外周血 miR-497 表达增加与炎症氧化应激过度激活及预后不良有关,今后 miR-497 有望成为研究 ACI 发病机制的新靶点,也有望成为评估 ACI 病

情及预后新的标志物。

参考文献

- [1] Moussaddy A, Demchuk AM, Hill MD. Thrombolytic therapies for ischemic stroke: Triumphs and future challenges [J]. *Neuropharmacology*, 2018, 134(Pt B):272-279.
- [2] Sarkar S, Chakraborty D, Bhowmik A, et al. Cerebral ischemic stroke: cellular fate and therapeutic opportunities [J]. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2019, 1(24): 435-450.
- [3] Sabet Sarvestani F, Azarpira N. microRNAs Alterations of Myocardium and Brain Ischemia-Reperfusion Injury: Insight to Improve Infarction [J]. *Immunol Invest*, 2020, 7: 1-22.
- [4] Cao W, Zhang T, Wang L, et al. Diagnostic performance of circulating MicroRNAs in acute ischemic stroke: A protocol for systematic review and meta-analysis [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2020, 99(40):e22353.
- [5] 闫海清,岳学静,贵永堃,等. miR-497-5p 靶向 AKT3 对缺血/再灌注损伤诱导的神经细胞氧化应激和炎症反应的影响 [J]. *免疫学杂志*, 2019, 35(11): 927-933.
- [6] 中华医学会神经病学分会,中华医学会神经病学分会脑血管病学组. 中国急性缺血性脑卒中诊治指南 2014 [J]. *中华神经科杂志*, 2015, 48(4): 246-257.
- [7] Chen X, Lin S, Gu L, et al. Inhibition of miR-497 improves functional outcome after ischemic stroke by enhancing neuronal autophagy in young and aged rats [J]. *Neurochem Int*, 2019, 127:64-72.
- [8] Li Z, Lv J, Pan Y, et al. Inhibiting MicroRNA - 497 Improves the Effects of Exercise Training on Myocardial Infarction [J]. *Int J Sports Med*, 2020, 41(7):475-483.
- [9] Wang J, Lin M, Ren H, et al. Expression and Clinical Significance of Serum miR-497 in Patients with Acute Cerebral Infarction [J]. *Clin Lab*, 2019, 65(4).
- [10] Lin SP, Tu C, Huang W, et al. Acute-phase serum superoxide dismutase level as a predictive biomarker for stroke-associated infection [J]. *Int J Neurosci*, 2020, 130(2): 186-192.
- [11] 秦慧兵,张保朝,张小林,等. 血清 MCP-1、HMGB1、APN、oxLDL 水平与老年脑梗死病情及颈动脉粥样硬化关系 [J]. *华南预防医学*, 2020, 46(1): 72-75.
- [12] 刘磊,董海,何仲春,等. 大面积脑梗死患者外周血 Th1、Th2、Th17、Treg 细胞水平变化及意义 [J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2020, 12(11): 1527-1530.
- [13] 闫薪如,冯娟. 血清血管生成素 1 水平与急性脑梗死发病、病情严重程度及 90d 预后的关系 [J]. *临床神经病学杂志*, 2016, 29(2): 113-116.
- [14] 王天栋,任占军. 高压氧治疗脑梗死患者介入时机的选择及对中远期预后的影响 [J]. *中华航海医学与高气压医学杂志*, 2020, 27(2): 180-183,204.
- [15] 佟建霞,陈滢,刘虹,等. 经颅直流电刺激联合认知功能训练对脑梗死患者认知及日常生活活动能力的影响 [J]. *按摩与康复医学*, 2019, 10(12): 17-19.

• 论 著 •

血清 IGF-1 含量对 STEMI 患者急诊介入术后 MACE 的预测价值

信鹏程 张申伟 牛思泉 胥良 赵育洁*

【摘要】目的 研究血清胰岛素样生长因子-1(IGF-1)含量对 ST 段抬高型心肌梗死(STEMI)患者急诊介入术后主要不良心血管事件(MACE)的预测价值。**方法** 选择2017年6月至2020年6月期间在本院接受急诊介入手术的 STEMI 患者作为 STEMI 组、同期体检的健康志愿者作为对照组,检测血清 IGF-1 的含量。随访 STEMI 患者介入术后 6 个月内发生 MACE 的情况,采用 ROC 曲线分析 IGF-1 对 MACE 的预测价值、采用 Logistic 回归分析 MACE 的影响因素。**结果** 与对照组比较,STEMI 组患者血清中 IGF-1 的含量明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$);ROC 曲线分析显示,IGF-1 预测 MACE 的曲线下面积为、最佳截断值为 87.64 ng/mL;STEMI 组中 MACE 患者的血清 IGF-1 含量明显低于非 MACE 患者,MACE 患者的 hs-CRP 含量、cTnI 峰值、Gensini 评分、多支病变比例明显高于非 MACE 患者,差异有统计学意义($P<0.05$);logistics 回归分析显示,IGF-1 含量、cTnI 峰值、Gensini 评分是 STEMI 患者发生 MACE 的影响因素。**结论** STEMI 患者血清 IGF-1 含量明显降低,IGF-1 含量对介入术后 6 个月内发生 MACE 具有预测价值。

【关键词】 ST 段抬高型心肌梗死;胰岛素样生长因子-1;主要不良心血管事件

Predictive value of serum IGF-1 contents on major adverse cardiovascular events after emergency intervention in STEMI patients

XIN Pengcheng, ZHANG Shenwei, NIU Siqian, XU Liang, ZHAO Yujie*

(The Seventh People's Hospital of Zhengzhou, Zhengzhou Cardiovascular Hospital, and the Second Department of Cardiology, Henan Cardiovascular Hospital, Southern Medical University, Zhengzhou, Henan, China, 450016)

【ABSTRACT】 Objective To study the predictive value of serum insulin-like growth factor-1 (IGF-1) on major adverse cardiovascular events (MACE) of patients with ST segment elevation myocardial infarction (STEMI) after emergency intervention. **Methods** STEMI patients who underwent emergency intervention in our hospital from June 2018 to June 2019 were selected as the STEMI group and healthy volunteers who had physical examination at the same time as the control group, then serum IGF-1 level was detected. The MACE of STEMI patients within 6 months after intervention was followed up. ROC curve was used to analyze the predictive value of IGF-1 on MACE, and logistic regression was used to analyze the influencing factors of MACE. **Result** Compared with the control group, the serum IGF-1 level in the STEMI group was significantly lower, the difference was statistically significant ($P<0.05$); ROC curve analysis showed that the area under curve of IGF-1 in predicting MACE was, and the best cutoff value was 87.64 ng/mL. The serum IGF-1 level of MACE patients in the STEMI group was significantly lower than that of non MACE patients, and the hs-CRP content, cTnI peak value, Gensini score and the proportion of multi vessel lesions of MACE patients were sig-

基金项目:河南省科技厅基金资助项目(192102310062)

作者单位:郑州市第七人民医院/郑州市心血管病医院/南方医科大学附属河南心血管病医院心内二科,河南,郑州 450016

*通信作者:赵育洁, E-mail: ianlang896540@163.com

nificantly higher than those of non MACE patient, the difference was statistically significant ($P<0.05$). Logistic regression analysis showed that IGF-1, cTnI peak value and Gensini score were the influencing factors of MACE in STEMI patients. **Conclusion** The level of serum IGF-1 in patients with STEMI is significantly reduced, and the level of IGF-1 has predictive value for MACE within 6 months after intervention.

[KEY WORDS] ST segment elevation myocardial infarction; Insulin-like growth factor-1; Major adverse cardiovascular events

急性ST段抬高型心肌梗死(ST-segment elevation myocardial infarction, STEMI)是临床上常见的心血管疾病,具有急性发作、病情重、预后差的特点。皮冠状动脉介入治疗(percutaneous coronary intervention, PCI)是临床治疗 STEMI 的主要手段,能够有效再通冠脉、恢复心肌血流灌注。但是,部分 STEMI 患者在 PCI 术后仍会发生心肌梗死、支架再狭窄等心血管事件,对预后产生不利影响。近些年,越来越多研究关注了 STEMI 患者 PCI 术后的主要心血管不良事件(major adverse cardiovascular events, MACE)并分析了 MACE 的相关影响因素及预测手段^[1-2]。胰岛素样生长因子-1(insulin-like growth factor-1, IGF-1)是具有广泛促增殖作用的细胞因子,多项心血管的相关研究表明 STEMI 患者及心力衰竭患者的血清 IGF-1 含量降低^[3-4],但 IGF-1 在 STEMI 患者 PCI 术后心血管事件发生中的作用尚不清楚。因此,本研究将具体分析血清 IGF-1 对术后 MACE 的预测价值。

1 对象与方法

1.1 研究对象

选择 2017 年 6 月至 2020 年 6 月期间在本院接受急诊介入手术的 STEMI 患者作为 STEMI 组,纳入标准:①符合《急性 ST 段抬高型心肌梗死诊断和治疗指南》^[5]中 STEMI 中的诊断标准;②首次发病且发病至入院时间 <12 h;③病历资料及随访资料完整。排除标准:①既往有 PCI 手术史或溶栓治疗史;②既往有心肌梗死、脑卒中病史;③合并恶性肿瘤、急慢性感染、自身免疫性疾病。共纳入 102 例患者,包括男性 58 例、女性 44 例,平均年龄(57.48 ± 11.82)岁。另取同期体检的健康志愿者作为对照组,共 58 例,包括男性 31 例、女性 27 例,平均年龄(55.73 ± 12.18)岁。两组间一般资料比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。本研究取得医院伦理委员会批准及患者知情同意。

1.2 方法

1.2.1 血清 IGF-1 含量的检测

入院时采集 STEMI 组患者的外周静脉血 3 mL,体检时采集对照组志愿者的外周静脉血 3 mL,离心分离血清后采用酶联免疫吸附法试剂盒(上海酶联公司,规格:96T)检测 IGF-1 含量,按照试剂盒说明书进行操作。

1.2.2 临床资料的收集

根据 STEMI 患者的病历收集以下临床资料:性别、年龄、吸烟史、高血压史、糖尿病史、随机血糖、总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、超敏 C 反应蛋白(hs-CRP)、肌钙蛋白 I(cTnI)峰值、Gensini 评分、是否多支病变。随机血糖、TC、TG、LDL-C、HDL-C 采用全自动生化分析仪(贝克曼库尔特,型号:AU5800)检测。Gensini 评分参照指南^[5]并按照如下标准进行评价:管腔狭窄 1%~25%为 1 分、26%~50%为 2 分、51%~75%为 4 分、76%~90%为 8 分、91%~99%为 16 分、100%(即闭塞)为 32 分,左主干狭窄 $\times 5$ 、左前降支近段或左回旋支近段 $\times 2.5$ 、左前降支中段 $\times 1.5$ 、左前降支远段及左回旋支中远段及右冠状动脉近、中、远段后降支 $\times 1$ 、其他小分支 $\times 0.5$ 。多支病变情况根据 PCI 术中冠脉造影情况进行判断。

1.2.3 介入术后 MACE 的随访

从 PCI 术后第 1 天开始进行随访,出院后每月随访 1 次,随访截止术后 6 个月,随访方式包括门诊复查、电话或网络软件回访等,随访内容为 MACE 发生情况。MACE 包括心肌梗死、脑卒中、急性心衰、支架内血栓形成或再狭窄、死亡。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 21.0 软件进行数据分析;计量资料以($\bar{x}\pm s$)差表示,两组间比较采用 t 检验;计数资料采用 $n(\%)$ 表示,两组间比较采用 χ^2 检验;IGF-1 预测介入术后 MACE 采用 ROC 曲线分析, MACE 的影响因素采用 Logistic 回归分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 STEMI组与对照组血清 IGF-1 含量的比较

与对照组比较, STEMI 组患者血清中 IGF-1 的含量降低, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。见表 1。

表 1 STEMI 组与对照组血清 IGF-1 含量的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of serum IGF-1 content between STEMI group and control group ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	IGF-1(ng/mL)
STEMI 组	102	107.09±24.59
对照组	58	174.75±36.47
<i>t</i> 值		19.779
<i>P</i> 值		0.000

2.2 STEMI 组中 MACE 患者与非 MACE 患者血清 IGF-1 含量的比较

与 STEMI 组中非 MACE 患者比较, MACE 患者血清中 IGF-1 的含量明显降低, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。见表 2。

表 2 STEMI 组中 MACE 患者与非 MACE 患者血清 IGF-1 含量的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of serum IGF-1 levels between MACE patients and non-MACE patients in the STEMI group ($\bar{x} \pm s$)

STEMI 患者	<i>n</i>	IGF-1
MACE	21	91.18±19.42
非 MACE	81	111.81±24.05
<i>t</i> 值		4.403
<i>P</i> 值		0.000

2.3 IGF-1 含量的预测 STEMI 患者 MACE 的 ROC 曲线分析

IGF-1 含量预测 STEMI 患者 MACE 的 ROC 曲线下面积为 0.7587 (95%CI: 0.644~0.873, $P<0.05$)。根据约登指数最大值确定 IGF-1 预测 STEMI 患者 MACE 的截断值为 87.64 ng/mL, 预测的灵敏度为 86.42%、特异性为 62.50%。见图 1。

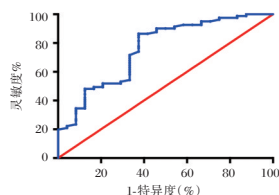


图 1 IGF-1 含量的预测 STEMI 患者 MACE 的 ROC 曲线

Figure 1 The ROC curve of MACE in STEMI patients predicted by IGF-1 content

2.4 STEMI 组中 MACE 患者与非 MACE 患者临床特征的比较

STEMI 组中 MACE 患者与非 MACE 患者的性

别、年龄、吸烟史、高血压史、糖尿病史、随机血糖、TC、TG、LDL-C、HDL-C 比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$); MACE 患者的 hs-CRP 含量、cTnI 峰值、Gensini 评分、多支病变比例明显增加差异有统计学意义 ($P<0.05$)。见表 3。

表 3 STEMI 组中 MACE 患者与非 MACE 患者临床特征比较 [$n(\%)$, ($\bar{x} \pm s$)]

Table 3 Comparison of clinical characteristics between MACE patients and non-MACE patients in the STEMI group [$n(\%)$, ($\bar{x} \pm s$)]

因素	MACE 患者 (<i>n</i> =21)	非 MACE 患者 (<i>n</i> =81)	<i>t</i> / χ^2 值	<i>P</i> 值
男性	10(47.62)	48(59.26)	0.921	0.337
年龄(岁)	58.32±12.04	57.11±10.95	0.875	0.382
吸烟史	12(57.14)	37(45.68)	0.878	0.349
高血压史	13(61.90)	40(49.38)	1.048	0.306
糖尿病史	8(38.10)	32(39.51)	0.014	0.906
随机血糖(mmol/L)	8.29±1.74	7.92±1.75	1.711	0.088
TC(mmole/L)	5.35±0.89	5.14±0.94	1.825	0.069
TG(mmole/L)	2.32±0.62	2.23±0.54	1.306	0.192
LDL-C(mmole/L)	3.49±1.13	3.24±1.16	1.751	0.081
HDL-C(mmole/L)	1.14±0.40	1.23±0.48	1.565	0.118
hs-CRP(mg/L)	8.39±1.58	6.04±1.07	15.959	0.000
cTnI 峰值(ng/mL)	53.38±9.29	32.77±6.57	23.138	0.000
多支病变	14(66.67)	33(40.74)	4.511	0.034
Gensini 积分	81.93±13.74	68.37±10.44	9.802	0.000

2.5 STEMI 患者 MACE 影响因素的 Logistic 回归分析

以 STEMI 患者是否发生 MACE 作为因变量, 以两组间比较有统计学差异的因素 IGF-1、hs-CRP 含量、cTnI 峰值、Gensini 评分、多支病变为自变量, 进行 logistics 多因素回归分析可知: IGF-1 含量、cTnI 峰值、Gensini 评分是发生 MACE 的影响因素。见表 4。

表 4 STEMI 患者 MACE 影响因素的 Logistic 回归分析

Table 4 Logistic regression analysis of factors affecting MACE in STEMI patients

因素	β 值	OR 值	95%CI	Wald/ χ^2 值	<i>P</i> 值
IGF-1	-0.378	0.793	0.558~0.937	6.182	0.005
hs-CRP	0.197	1.221	0.839~2.382	1.372	0.208
cTnI 峰值	0.285	1.309	1.028~2.747	5.032	0.017
Gensini 积分	0.441	1.374	1.103~4.372	7.474	0.000
多支病变	0.348	1.274	0.938~3.589	1.858	0.117

3 讨论

PCI 是治疗 STEMI 的有效手段, 再通冠脉的效果确切, 极大的降低了疾病的致残率及死亡率。但是, 有研究报道约 15-30% 的 STEMI 患者在 PCI 术后 6-12 个月内会发生心血管事件, 影响疾病

的近期预后并增加死亡率^[6-7]。在临床实践中,需要对可能发生PCI术后心血管事件的高危患者进行早期筛查及干预,以期降低心血管事件发生率、改善疾病预后。已有研究报道,中药方剂、高压氧等是预防PCI术后MACE的有效手段^[8-10]。

近些年,国内越来越多的学者开始关注PCI术后心血管事件的危害,多项研究报道了MIF、HMGB1、VEGF等细胞因子对PCI术后MACE的发生具有预测价值^[11-13],不同细胞因子的增多或减少可能通过加重心肌损害、影响心肌修复的方式来造成MACE的发生。IGF-1是新近发现的在心血管系统中发挥重要作用的细胞因子。最早关于IGF-1的研究认为其在促进生长发育、调节营养代谢中起重要作用。新近的几项基础研究表明,IGF-1在缺血心肌中表达降低,外源性给予IGF-1能够减轻心肌缺血损害^[14-15],表明IGF-1具有心肌保护作用,缺血刺激能够使IGF-1表达减少并削弱其心肌保护作用,进而可能加重心肌损害、影响心肌修复。

STEMI患者介入术后MACE的发生受到多种因素的影响,国内相关的研究发现,STEMI病情的严重程度与术后MACE的发生有关,cTnI峰值、Gensini评分是介入术后发生MACE的影响因素^[16]。cTnI是心肌损伤的标志物,其峰值反映了心肌缺血损害的严重程度;Gensini评分是评价冠脉闭塞程度的指标,其评分越高、冠脉病变越重。本研究对STEMI患者介入术后MACE影响因素的分析显示:IGF-1含量、cTnI峰值、Gensini评分是发生MACE的影响因素。其中IGF-1含量与MACE相关的分析结果与IGF-1对MACE具有预测价值的分析结果一致,而cTnI峰值、Gensini评分与MACE相关的分析结果与既往其他学者的研究结果一致。以上相关因素的分析结果进一步验证了IGF-1减少与介入术后MACE发病的关系。

综上所述,STEMI患者血清IGF-1含量明显降低且IGF-1含量与介入术后6个月内发生MACE有关,检测IGF-1对MACE具有预测价值。

参考文献

- [1] Guo L, Zhong L, Chen K, et al. Long-term clinical outcomes of optimal medical therapy vs. successful percutaneous coronary intervention for patients with coronary chronic total occlusions[J]. *Hellenic J Cardiol*, 2018, 59(5): 281-287.
- [2] Tscharre M, Vogel B, Tentzeris I, et al. Prognostic Impact of Soluble P-Selectin on Long-Term Adverse Cardiovascular Outcomes in Patients Undergoing Percutaneous Coronary Intervention[J]. *Thromb Haemost*, 2019, 119(2): 340-347.
- [3] 王娟, 陈丹, 谭利国, 等. 急性冠脉综合征患者血清miR-26b、IGF-1表达水平与冠脉病变程度的相关性分析[J]. *热带医学杂志*, 2019, 19(6): 762-766.
- [4] Piccioli L, Arcopinto M, Salzano A, et al. The impairment of the Growth Hormone/Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) axis in heart failure: A possible target for future therapy[J]. *Monaldi Arch Chest Dis*, 2018, 88(3): 975.
- [5] 中华医学会心血管病学分会 中华心血管病杂志编辑委员会. 急性ST段抬高型心肌梗死诊断和治疗指南[J]. *中华心血管病杂志*, 2015, 43(5): 380-393.
- [6] Gershlick AH, Banning AS, Parker E, et al. Long-Term Follow-Up of Complete Versus Lesion-Only Revascularization in STEMI and Multivessel Disease: The CvLPRIT Trial[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2019, 74(25): 3083-3094.
- [7] Kim YH, Her AY, Jeong MH, et al. Impact of stent generation on 2-year clinical outcomes in ST-segment elevation myocardial infarction patients with multivessel disease who underwent culprit-only or multivessel percutaneous coronary intervention[J]. *Catheter Cardiovasc Interv*, 2020, 95(2): E40-E55.
- [8] 马征, 龙佳, 贾文浩, 等. 益气凉血生肌方预防冠心病PCI术后气虚血瘀、痰热互结证患者主要不良心血管事件的随机对照试验[J]. *中医杂志*, 2019, 60(21): 1837-1842.
- [9] 陈诚军, 虞冬, 宋芝萍. 自拟益气通梗饮治疗急性心肌梗死行PCI术患者疗效观察[J]. *中国中医急症*, 2019, 28(6): 1064-1066.
- [10] 李朝晖, 周元锋, 田峰, 等. 高压氧联合阿司匹林治疗急性心肌梗死的临床疗效及对血清炎症因子水平的影响[J]. *中华航海医学与高气压医学杂志*, 2019, 26(3): 248-251.
- [11] Deng XN, Wang XY, Yu HY, et al. Admission macrophage migration inhibitory factor predicts long-term prognosis in patients with ST-elevation myocardial infarction[J]. *Eur Heart J Qual Care Clin Outcomes*, 2018, 4(3): 208-219.
- [12] 闫小菊, 李勇, 郭丽娟, 等. 血清高迁移率族蛋白B1和氨基末端脑钠肽前体水平联合CAMI-STEMI评分对急诊经皮冠状动脉介入术后生存状况预测价值[J]. *中国心血管病研究*, 2020, 18(2): 105-109.
- [13] 艾民, 颜昌福, 夏福纯, 等. 血清hs-CRP及VEGF水平对急性心肌梗死经皮冠状动脉介入治疗术后心血管事件的影响[J]. *山东医药*, 2018, 58(1): 16-18.
- [14] Liao Y, Li H, Pi Y, et al. Cardioprotective effect of IGF-1 against myocardial ischemia/reperfusion injury through activation of PI3K/Akt pathway in rats in vivo[J]. *J Int Med Res*, 2019, 47(8): 3886-3897.
- [15] 于俊民, 张小波, 李大鹤, 等. IGF-1/IGF-1R在大鼠梗死心肌组织中的表达与干预[J]. *中国循证心血管医学杂志*, 2019, 11(10): 1201-1204.
- [16] 屠袁园, 赵菊伟. 急性ST段抬高型心肌梗死患者冠脉介入治疗后近期预后的相关影响因素分析[J]. *中国卫生统计*, 2019, 36(3): 392-394.

• 论 著 •

口腔扁平苔藓患者血清 ICAM-1、VCAM-1 及 IL-17 水平与与疾病活动的相关性

陈运明

[摘要] **目的** 探究口腔扁平苔藓(OLP)患者血清细胞间黏附分子-1(ICAM-1)、血管细胞粘附分子-1(VCAM-1)及白介素-17(IL-17)水平与疾病活动的相关性。**方法** 选取本院2019年1月至2020年12月收治的102例各型OLP患者,另选择同期健康志愿者100例作为对照组,酶联免疫吸附法(ELISA)检测并对比所有受试者血清ICAM-1、VCAM-1及IL-17水平;统计OLP患者临床特征(充血面积、疼痛程度、糜烂面积)并评估临床体征评分、病损(RAE)评分及疾病活动评分,Spearman检验分析血清ICAM-1、VCAM-1及IL-17水平与临床特征及各评分的相关性。**结果** OLP患者血清ICAM-1、VCAM-1及IL-17水平明显高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),OLP患者中血清ICAM-1、VCAM-1及IL-17水平糜烂型>充血型>网纹型,差异具有统计学意义($P<0.05$)。以充血面积、疼痛程度、糜烂面积均值为分界点,对比不同充血面积、疼痛程度、糜烂面积OLP患者血清ICAM-1、VCAM-1及IL-17水平比较差异有统计学意义($P<0.05$)。Spearman相关性分析结果显示,ICAM-1、VCAM-1及IL-17分别与充血面积、疼痛程度、糜烂面积存在正相关性($P<0.05$)。糜烂型OLP患者临床体征评分、病损RAE评分及疾病活动评分>充血型患者并>网纹型患者,差异有统计学意义($P<0.05$);ICAM-1、VCAM-1及IL-17分别与临床体征评分、病损RAE评分及疾病活动评分存在正相关性($P<0.05$)。**结论** OLP患者存在血清ICAM-1、VCAM-1及IL-17异常升高,其升高程度与患者临床特征及疾病活动进展程度呈正相关性。

[关键词] 口腔扁平苔藓;细胞间黏附分子-1;血管细胞粘附分子-1;白介素-17;疾病活动评分

Study on the correlation between serum ICAM-1, VCAM-1 and IL-17 levels and disease activity in patients with oral lichen planus

CHEN Yunming

(Department of Stomatology, People's Hospital of Yingcheng City, Hubei Province, Yingcheng, Hubei, China, 432400)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the serum intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) and interleukin-17 (IL-17) levels and disease activity in patients with oral lichen planus (OLP) Relevance. **Methods** A total of 102 OLP patients of various types who were admitted to our hospital from January 2019 to December 2020 were selected, and 100 healthy volunteers during the same period were selected as the control group. The sera of all subjects were tested and compared by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). ICAM-1, VCAM-1 and IL-17 levels. Calculate the clinical characteristics of OLP patients (congestion area, pain degree, erosion area) and evaluate the clinical sign score, disease damage (RAE) score and disease activity score. Spearman test analyzes serum ICAM-1, VCAM-1 and IL-17 levels and clinical characteristics and the correlation of each score. **Results** The levels of serum ICAM-1, VCAM-1 and IL-17 in OLP patients were significantly higher than those in the control group ($P<0.05$). The levels of serum ICAM-1, VCAM-1 and IL-17 in OLP patients were erosive > hyperemia > net The pattern of patterns, the difference was statistically significant ($P<0.05$). Taking the average of hyperemia area, pain

基金项目:国家卫生计生委医药卫生科技研究发展项目(2018YFC1002103)

作者单位:湖北省应城市人民医院口腔科,湖北,应城432400

通信作者:陈运明, E-mail: hbyccym3245188@126.com

degree and erosion area as the cut-off point, the differences in serum ICAM-1, VCAM-1 and IL-17 levels of OLP patients with different hyperemia area, pain degree and erosion area were statistically significant ($P < 0.05$). Spearman correlation analysis showed that ICAM-1, VCAM-1 and IL-17 were positively correlated with hyperemia area, pain degree, and erosion area ($P < 0.05$). The clinical sign scores, lesion RAE scores and disease activity scores of patients with erosive OLP > congestive patients and >reticulated patients, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). ICAM-1, VCAM-1 and IL-17 were positively correlated with clinical sign score, lesion RAE score, and disease activity score, respectively ($P < 0.05$). **Conclusion** There is abnormal increase of serum ICAM-1, VCAM-1 and IL-17 levels in OLP patients, and the increase is positively correlated with the patient's clinical characteristics and disease activity progression.

[KEY WORDS] Oral lichen planus; Intercellular adhesion molecule-1; Vascular cell adhesion molecule-1; Interleukin-17; Disease activity score

口腔扁平苔藓(oral lichen planus, OLP)是临床十分常见的口腔黏膜疾病,临床主要表现为小丘疹连成的树枝状、线状、网状白色条纹,并可伴有充血、溃疡、水泡、萎缩及糜烂。研究者认为,OLP的发生受多种因素的影响,导致病情迁延难愈,反复发作,而长期糜烂区域不仅影响患者张口,还可导致局部纤维增生,甚至引发恶变,严重影响了患者的日常生活和工作^[1]。细胞间黏附分子-1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)、血管细胞黏附分子-1(vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)具有促血管生成作用,其在炎症组织内发挥促进炎症细胞迁移渗透的作用,从而导致炎症状态迁延不愈^[2]。淋巴细胞固介导的细胞免疫反应与OLP的发病机制密切相关,辅助淋巴细胞(Th)17细胞亚群为T淋巴细胞的主要类型之一,其可大量表达白介素-17(interleukin-17, IL-17),IL-17具有多种生物学功能,最主要的就是促进炎症发展,并在肺炎、类风湿关节炎等多种炎症性疾病中具有作用^[3-4]。因此,本研究对口腔扁平苔藓患者血清ICAM-1、VCAM-1及IL-17水平与疾病活动的相关性进行探究,以了解OLP的发病机制,并为OLP的临床诊疗提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取本院2019年1月至2020年12月收治的102例各型OLP患者,其中,男33例,女69例,年龄平均(48.3 ± 3.9)岁,发病部位:颊部81例,唇部21例;OLP分型:网纹型41例、充血型33例、糜烂型28例,病程平均(0.8 ± 0.3)年。另选择同期健康志愿者100例作为对照组,均经过检查口腔黏膜正常,其中男34例,女66例,年龄平均(48.9 ± 4.3)岁。

所有受试者性别、年龄等临床资料比较差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。本研究获得医学伦理委员会批准通过。

纳入标准:①符合《口腔黏膜病学》第4版^[5]中OLP诊断及分型标准;②经病理及临床症状检查确诊;③均自愿签署知情同意书;④能够配合完成研究。排除标准:①近期服用抗生素、糖皮质激素、免疫制剂等相关药物者;②合并糖尿病、心血管疾病、精神病等全身系统性疾病、免疫性疾病者;③肝肾等脏器功能障碍者;④合并其他口腔疾病者。

1.2 方法

1.2.1 临床症状

采用视觉模拟评分法(visual analogue scale, VAS)评估所有OLP患者疼痛程度,评分0~10分,分数越高,疼痛越严重。并计算充血型和糜烂型OLP患者充血和糜烂面积。

1.2.2 临床体征评分、病损(reticular, atrophic and erosive lesion, RAE)评分及疾病活动评分

临床体征评分依照文献^[6]进行评估;采用病损RAE评分^[7]评估患者病损情况,OLP患者病损分布在舌、颊、牙龈、口底、唇等位置;疾病活动性评分采用OLP网纹-糜烂-溃疡疾病活动积分(Reticulum-Erosion-Ulcer, REU)^[8]进行判断。事先向所有OLP患者讲解各评分量表内容,使患者充分了解并正确填写。

1.2.3 血清ICAM-1、VCAM-1及IL-17检测

所有受试者均抽取5 mL空腹外周静脉血,3 000 r/min离心15 min收集上清, -20°C 保存待测。采用酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)及680型酶标仪(美国BIO-RAD公司)检测ICAM-1、VCAM-1及IL-17水平,试剂盒购自美国R&D公司,严格按试剂盒说明书进行各项操作。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 20.0 统计学软件进行数据分析, 计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 组间两两比较采用 t 检验, 多组间采用单因素方差分析; Spearman 检验分析各指标相关性。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同分型 OLP 患者与对照组血清 ICAM-1、VCAM-1 及 IL-17 水平比较

OLP 患者中血清 ICAM-1、VCAM-1 及 IL-17 水平比较结果: 糜烂型 > 充血型 > 网纹型, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 不同分型 OLP 患者与对照组血清 ICAM-1、VCAM-1 及 IL-17 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of serum ICAM-1, VCAM-1 and IL-17 levels between OLP patients of different types and the control group ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	ICAM-1 (ng/L)	VCAM-1 (ng/L)	IL-17 (ng/L)
对照组	100	225.1±37.5	568.5±68.2	171.8±21.4
网纹型	41	267.0±30.1	724.8±72.5	196.2±25.6
充血型	33	282.5±36.9	753.9±63.3	229.7±36.7
糜烂型	28	311.2±44.1	799.2±73.8	267.4±28.6
<i>F</i> 值		8.750	15.909	10.557
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000

2.2 不同临床特征患者血清 ICAM-1、VCAM-1 及 IL-17 水平比较

所有 OLP 患者的平均疼痛视觉模拟评分 (VAS) 为 (5.2 ± 1.1) 分, 平均糜烂面积为 $(8.2 \pm 1.4) \text{ mm}^2$, 平均充血面积为 $(11.3 \pm 1.8) \text{ mm}^2$, 以充血面积、疼痛程度、糜烂面积均值为分界点, 对比不同充血面积、疼痛程度、糜烂面积 OLP 患者血清 ICAM-1、VCAM-1 及 IL-17 水平比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。

2.3 血清 ICAM-1、VCAM-1 及 IL-17 水平与临床特征的相关性分析

Spearman 相关性分析结果显示, ICAM-1、VCAM-1 及 IL-17 分别与充血面积、疼痛程度、糜烂面积存在正相关性 ($P < 0.05$)。见表 3。

2.4 不同分型 OLP 患者临床体征评分、病损 RAE 评分及疾病活动评分比较

不同分型 OLP 患者临床体征评分、病损 RAE 评分及疾病活动评分比较结果: 糜烂型 > 充血型 > 网纹型, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 4。

2.5 血清 ICAM-1、VCAM-1 及 IL-17 水平与各评分的相关性

Spearman 相关性分析结果显示, ICAM-1、

表 2 不同临床特征患者血清 ICAM-1、VCAM-1 及 IL-17 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of serum ICAM-1, VCAM-1 and IL-17 levels in patients with different clinical characteristics ($\bar{x} \pm s$)

临床特征	<i>n</i>	ICAM-1 (ng/L)	VCAM-1 (ng/L)	IL-17 (ng/L)
VAS 评分 ≥ 5.2 分	47	295.1±33.9	776.2±64.9	260.4±29.0
VAS 评分 < 5.2 分	55	279.4±28.1	729.8±57.1	218.5±22.5
<i>t</i> 值		2.558	3.841	8.209
<i>P</i> 值		0.012	0.000	0.000
糜烂面积 $\geq 8.2 \text{ mm}^2$	10	334.5±37.2	803.6±55.3	288.5±29.6
糜烂面积 $< 8.2 \text{ mm}^2$	18	288.5±36.0	746.2±69.1	214.6±27.5
<i>t</i> 值		3.202	2.251	6.634
<i>P</i> 值		0.004	0.033	0.000
充血面积 $\geq 11.3 \text{ mm}^2$	14	330.5±39.4	810.4±71.3	284.2±26.7
充血面积 $< 11.3 \text{ mm}^2$	19	296.7±34.5	749.2±68.2	255.2±32.2
<i>t</i> 值		2.363	2.239	2.418
<i>P</i> 值		0.026	0.034	0.023

表 3 血清 ICAM-1、VCAM-1 及 IL-17 水平与临床特征的相关性分析

Table 3 Correlation analysis between serum ICAM-1, VCAM-1 and IL-17 levels and clinical characteristics

项目	ICAM-1		VCAM-1		IL-17	
	<i>r</i> 值	<i>P</i> 值	<i>r</i> 值	<i>P</i> 值	<i>r</i> 值	<i>P</i> 值
充血面积	0.391	0.012	0.414	0.006	0.427	0.003
疼痛程度	0.403	0.004	0.352	0.015	0.395	0.011
糜烂面积	0.448	0.000	0.430	0.002	0.336	0.017

表 4 不同分型 OLP 患者临床体征评分、病损 RAE 评分及疾病活动评分比较 (分)

Table 4 Comparison of clinical sign scores, lesion RAE scores and disease activity scores of different types of OLP patients (points)

疾病分型	<i>n</i>	临床体征评分	病损 RAE 评分	疾病活动评分
网纹型	41	1.1±0.3	11.1±1.2	10.3±1.5
充血型	33	2.8±0.6	12.5±0.9	18.8±1.9
糜烂型	28	4.9±0.6	14.5±0.9	27.5±2.2
<i>F</i> 值		42.001	14.522	45.865
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000

VCAM-1 及 IL-17 分别与临床体征评分、病损 RAE 评分及疾病活动评分存在正相关性 ($P < 0.05$)。见表 5。

表 5 血清 ICAM-1、VCAM-1 及 IL-17 水平与各评分的相关性

Table 5 Correlation between serum ICAM-1, VCAM-1 and IL-17 levels and each score

项目	ICAM-1		VCAM-1		IL-17	
	<i>r</i> 值	<i>P</i> 值	<i>r</i> 值	<i>P</i> 值	<i>r</i> 值	<i>P</i> 值
临床体征评分	0.404	0.004	0.429	0.002	0.389	0.012
病损 RAE 评分	0.418	0.003	0.349	0.016	0.451	0.000
疾病活动评分	0.392	0.009	0.437	0.002	0.358	0.017

3 讨论

OLP为常见的口腔黏膜非感染性慢性炎症疾病,以女性患者为主,其主要损害为黏膜表面白色网状斑块或花纹,部分患者损害区发生糜烂,临床根据病损区年末情况分为网纹型、充血型和糜烂型。近年来对于OLP的研究显示^[9-10],在OLP病损组织中存在微血管密度相较于正常口腔黏膜组织明显升高的情况,并且在糜烂型OLP患者中更加明显。另有研究显示^[11],血管异常增生及内皮细胞功能失调与OLP患者慢性炎症息息相关。ICAM-1为免疫球蛋白家族成员,其可同淋巴细胞相关抗原-1(lymphocyte associated antigen-1,FA1)、整合素-2 β 等结合,从而促进淋巴细胞向炎症区域迁移。一项研究指出^[12],ICAM-1与OLP患者病损区域微血管密度增加密切相关。VCAM-1同样属于免疫球蛋白结合家族,其可与细胞粘附分子缓慢抗原-4、整合素1- β 等在记忆性T细胞表面结合介导免疫性炎症反应的发生发展。ICAM-1、VCAM-1常作为新生血管形成的重要生理指标^[13]。本研究中,在OLP患者中,血清ICAM-1、VCAM-1水平明显升高,且在充血型及糜烂型OLP患者中升高更加显著,充血型及糜烂型OLP患者意味着疾病发展进一步加重。

研究证实^[14],CD4+T淋巴细胞中辅助性T细胞及其分泌的细胞因子平衡失调在OLP的发病机制中具有重要作用。Th17细胞为CD4+T细胞在转化生长因子- β 的诱导下产生的,Th17细胞具有特异性的转录因子ROR γ t,可发挥极强的促炎症效应,参与多种自身免疫性疾病和过敏性疾病的病理过程^[15]。IL-17为Th17细胞分泌的一种促炎症反应细胞因子,可诱导肿瘤坏死因子- α 、IL-6等炎症细胞因子和趋化因子等的表达,介导炎症细胞到局部组织的浸润和组织损伤。

本研究相关性分析结果提示,血清ICAM-1、VCAM-1及IL-17水平与OLP患者疾病活动、病情严重程度等存在密切相关性,检测血清ICAM-1、VCAM-1及IL-17水平有助于了解OLP患者病情发展。ICAM-1、VCAM-1二者高水平促进了OLP患者血管和淋巴细胞增加,并激活扁平苔藓内皮细胞活性及炎症因子释放,从而在OLP患者疾病免疫炎症反应发展过程中发挥重要调节作用。OLP患者尤其是糜烂型患者局部表皮破损,导致感染性炎症的产生和发展,而IL-17的促炎症作用在

其组织破坏及炎症反应中发挥关键作用。

综上所述,OLP患者存在血清ICAM-1、VCAM-1及IL-17异常升高,其升高程度与患者临床特征及疾病活动进展程度呈正相关性。

参考文献

- [1] 李佳薇. 口腔扁平苔藓治疗的研究进展[J]. 吉林医药学院学报, 2020, 41(6): 455-457.
- [2] Rasmussen R, Bache S, Stavngaard T, et al. Plasma Levels of IL-6, IL-8, IL-10, ICAM-1, VCAM-1, IFN γ , and TNF α are not Associated with Delayed Cerebral Ischemia, Cerebral Vasospasm, or Clinical Outcome in Patients with Subarachnoid Hemorrhage [J]. World Neurosurg, 2019, 128(1): 1131-1136.
- [3] 沈茹, 李艳君, 林丽佳. Th17细胞在儿童肺炎中的研究进展[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2017, 9(3): 211-214.
- [4] 蔡婷婷, 许浦生. 慢性阻塞性肺疾病患者痰中IL-17、TGF- β 1、IL-10水平与肺功能、生活质量的关系[J]. 热带医学杂志, 2014, 14(8): 1017-1020+1024.
- [5] 陈谦明. 口腔黏膜病学[M]. 第4版. 北京: 人民卫生出版社, 2012: 103-110.
- [6] Seoane J, Romero MA, Varela-Centelles P, et al. Oral lichen planus: a clinical and morphometric study of oral lesions in relation to clinical presentation [J]. Brazilian Dental J, 2004, 15(1): 9-12.
- [7] Kaliakatsou F, Hodgson TA, Lewsey JD, et al. Management of recalcitrant ulcerative oral lichen planus with topical tacrolimus [J]. J Am Acad Dermatol, 2002, 46(1): 35-41.
- [8] Piboonniyom SO, Treister N, Pitiphat W, et al. Scoring system for monitoring oral lichenoid lesions: A preliminary study [J]. Oral Surg, 2005, 99(6): 696-703.
- [9] 傅志华, 武照, 李乾鹏, 等. 血管生成与口腔扁平苔藓关系的研究进展[J]. 口腔医学, 2019, 39(8): 757-761.
- [10] 孟文霞, 冯璐, 刘曙光, 等. 口腔扁平苔藓活化成纤维细胞对血管内皮细胞迁移及成管特性的影响[J]. 口腔医学研究, 2019, 35(8): 806-809.
- [11] Azzaa HH, El-Wakeel NM, Attia EA, et al. ALK 1 expression in oral lichen planus: a possible relation to microvessel density [J]. J Oral Pathol Med, 2016, 45(5): 373-380.
- [12] Mahmoud MM, Afifi MM. Anti-angiogenic therapy (bevacizumab) in the management of oral lichen planus [J]. Eur J Oral Sci, 2016, 124(2): 119-126.
- [13] Al-Hassiny A, Friedlander LT, Parachuru VPB, et al. Upregulation of angiogenesis in oral lichen planus [J]. J Oral Pathol Med, 2018, 47(2): 173-178.
- [14] 贾沛茹, 刘芳, 柳汀, 等. 口腔扁平苔藓病损中Th17/Treg平衡及意义[J]. 实用口腔医学杂志, 2018, 34(5): 614-618.
- [15] 石志坚. Th细胞相关细胞因子水平与老年湿疹患者病理特征的系统分析[J]. 中南医学科学杂志, 2016, 44(3): 335-337.

• 论 著 •

PCT与CRP用于经皮肾镜取石术患者术后感染诊断

赵熊* 杨发武

【摘要】目的 探究降钙素原(PCT)与C-反应蛋白(CRP)用于经皮肾镜取石术(PCNL)患者术后感染诊断价值。**方法** 选取2017年1月至2019年12月来本院泌尿外科行PCNL治疗的患者102例,按照是否发生术后感染分为感染组31例和非感染组71例,检测入组对象的PCT、CRP水平,并运用受试者工作曲线(ROC)进行PCNL术后感染诊断效能的分析,确定最佳诊断临界值。**结果** 感染组患者的PCT、CRP水平均显著性高于非感染组患者差异有统计学意义($P<0.05$);ROC曲线显示,PCT的诊断最佳临界值为 $0.56\text{ }\mu\text{g/L}$,灵敏度及特异度分别为77.4%和93.00%,约登指数为0.704,AUC为0.821;CRP的诊断最佳临界值为 6.35 mg/L ,灵敏度及特异度分别为93.5%和97.2%,约登指数为0.907,AUC为0.987;PCT、CRP两者联合检测灵敏度及特异度分别为96.80%和100.00%,约登指数为0.968,AUC为0.998。**结论** 行PCNL治疗发生术后感染的患者的PCT、CRP水平升高,二者联合检测对PCNL术后感染具有较高的诊断价值。

【关键词】 经皮肾镜取石术; 术后; 感染; 血清降钙素原; C-反应蛋白

PCT and CRP for postoperative infection diagnosis of patients undergoing percutaneous nephrolithotomy

ZHAO Xiong*, YANG Fawu

(Urology Department of Anhui Suixi County Hospital, Huaibei, Anhui, China, 235100)

[ABSTRACT] Objective To explore the diagnostic value of procalcitonin (PCT) and C-reactive protein (CRP) in the diagnosis of postoperative infection in patients with percutaneous nephrolithotomy (PCNL). **Methods** A total of 102 patients who came to our Urology Department for PCNL treatment from January 2017 to December 2019 were selected and divided into the infection group (31 cases) and the non-infection group (71 cases) according to whether postoperative infection occurred. The PCT and CRP levels of the enrolled subjects were detected, and the receiver operating curve (ROC) was used to analyze the diagnostic efficacy of infection after PCNL to determine the best diagnostic cut-off value. **Results** The levels of PCT and CRP in the infected group were significantly higher than those in the non-infected group ($P<0.05$). The ROC curve shows that the optimal cutoff value for PCT diagnosis is $0.56\text{ }\mu\text{g/L}$, the sensitivity and specificity are 77.4% and 93.00%, respectively, the Youden index is 0.704, and the AUC is 0.821. The best critical value for CRP diagnosis is 6.35 mg/L , the sensitivity and specificity are 93.5% and 97.2%, respectively, the Youden index is 0.907, and the AUC is 0.987. The sensitivity and specificity of combined detection of PCT and CRP were 96.80% and 100.00%, respectively, the Youden index was 0.968, and the AUC was 0.998. **Conclusion** The levels of PCT and CRP in patients undergoing PCNL treatment for postoperative infection are elevated, and the combined detection of the two has a high diagnostic value for postoperative infection of PCNL.

[KEY WORDS] Percutaneous nephrolithotomy; Postoperative; infection; Serum procalcitonin; C-reactive protein

基金项目:淮北市科技计划项目(rj201805)

作者单位:安徽省濉溪县医院泌尿外科,安徽,淮北 235100

*通信作者:赵熊, E-mail:zhaoxiong0615@126.com

经皮肾镜取石术(Percutaneous nephrolithotomy, PCNL)适用于治疗大的、复杂肾结石,在20世纪70年代被确立为一种微创治疗肾结石的选择,并在随后的几年中得到进一步发展^[1]。PCNL适用于所有需要接受开放手术治疗的肾结石患者,肾结石的类型主要包括完全性鹿角形结石、不完全性鹿角形结石、结石直径 ≥ 2 cm肾结石及特殊类型的肾结石等,是治疗大容量肾结石疾病的首选方法^[2]。PCNL手术的优点包括切口小、恢复快、住院时间短、并发症少。PCNL通常是一种安全的治疗选择,与低但特异性的并发症发生率相关^[3]。许多并发症是由结肠、脾脏、肝脏、胸膜、肺等周围器官损伤引起的,主要并发症包括术后出血和感染^[4-5]。目前,预测PCNL术后发生感染的临床参数是白细胞计数、降钙素原(PCT)与C-反应蛋白(CRP),然而,PCT与CRP在我们的临床实践中没有进行常规检测,尤其是在术前检测^[6]。本研究分析各项标志物单项检测及联合检测在预测PCNL术后感染方面的诊断价值,为临床诊断PCNL术后感染提供客观的实验室数据,现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2017年1月至2019年12月来本院泌尿外科行PCNL治疗的患者102例,按照是否发生术后感染分为感染组31例和非感染组71例。其中,非感染组患者男37例,女34例;平均年龄(48.13 ± 2.08)岁;感染组患者男19例,女12例平均年龄(48.01 ± 2.22)岁;两组患者的一般资料比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。所有患者及家属均知情同意。纳入标准:①入组对象符合PCNL手术适应证者;②入组对象术前均未伴有感染者;③临床病例资料完整者。排除标准:①合并血液系统疾病、自身免疫性疾病、内分泌及代谢病、恶性肿瘤者;②伴有严重的心脏、肝脏、肾脏功能损害者;③全身功能不能耐受手术者;④妊娠期及哺乳期者。

1.2 方法

1.2.1 手术方法

PCNL手术由经验丰富的泌尿外科医生进行,排泄性尿路造影(IVP)及CT了解肾盂肾盏结构和结石部位,选择最适合穿刺肾盏。皮肤穿刺点一般选在脊柱旁开10~12 cm,腋后线偏后12肋下或11肋间,在超声引导下确定穿刺点位,采用穿刺针进

入肾被膜后,随着患者的呼吸进入肾盏,将导丝经穿刺针送入肾盏、肾盂、输尿管,然后用扩张器沿导丝逐级扩张至病灶管径,采用钬激光进行碎石,手术结束后经瘘道顺行放置D-J管,留置肾造瘘管。患者术后接受1 d的静脉用抗生素治疗,术后1个月拔出D-J管并行腹部平片检查残余结石情况,如出现直径 > 4 mm的结石残余,则行腹部平扫CT进一步检查并决定治疗方案。患者的术后并发症根据改良型Clavien手术并发症分级系统进行分级^[7]。

1.2.2 血清PCT检测

用无菌管收集两组患者的中段晨尿液8~10 mL,2 000~3 000转/min,离心20 min,采用免疫发光分析法检测PCT,具体操作步骤严格按照降钙素原测定试剂盒(化学发光免疫分析法)(南京诺尔曼生物技术有限公司)使用说明书进行。

1.2.3 CRP测定

于清晨空腹抽取两组患者静脉血5~7 mL,1 000~2 000转/min,离心15 min,采用免疫比浊法检测CRP,具体操作步骤严格按照C-反应蛋白检测试剂盒(免疫比浊法)使用说明书进行。

1.3 统计学方法

采用SPSS 20.0软件进行统计分析。计数资料以 $n(\%)$ 表示,采用 χ^2 检验;计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,采用 t 检验;采用受试者工作曲线(ROC)评价诊断效能,计算ROC曲线下面积(AUC)。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组PCT、CRP水平比较

与非感染组相比较,感染组患者的PCT、CRP水平升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表1。

表1 两组患者的PCT、CRP比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	PCT($\mu\text{g/L}$)	CRP(mg/L)
非感染组	71	0.37 ± 0.06	3.74 ± 1.04
感染组	31	0.72 ± 0.33	9.23 ± 2.15
<i>t</i> 值		5.863	13.542
<i>P</i> 值		0.000	0.000

2.2 PCT、CRP单项检测及联合检测分别对PCNL术后感染的诊断效能

ROC曲线分析显示:PCT、CRP两者联合检测灵敏度及特异度,约登指数,AUC值,均比单项检测值高($P < 0.05$)。见表2、图1。

表2 PCT、CRP 单项检测及联合检测分别对 PCNL 术后感染的诊断效能

Table 2 The diagnostic efficacy of PCT and CRP single test and combined test respectively on PCNL postoperative infection

检测指标	AUC	标准误差	95%CI	最佳临界值	敏感度	1-特异度	约登指数	P 值
PCT($\mu\text{g/L}$)	0.821	0.064	0.695~0.948	0.56	0.774	0.070	0.704	0.000
CRP(mg/L)	0.987	0.009	0.969~1.000	6.35	0.935	0.028	0.907	0.000
PCT+CRP 联合	0.998	0.002	0.994~1.000	—	0.968	0.000	0.968	0.000

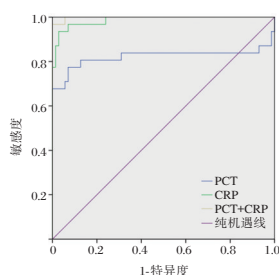


图1 PCT、CRP 单项检测及联合检测分别对 PCNL 术后感染的诊断效能

Figure 1 The diagnostic efficacy of PCT, CRP single test and combined test respectively for postoperative infection of PCNL

3 讨论

PCNL 是腔内泌尿外科手术的一个重要部分,在治疗上尿路结石方面,与输尿管镜技术及体外冲击波碎石共同成为现代主要的治疗方法,已彻底改变了传统开放手术的外科治疗方式,被用作治疗上尿路结石 $>2\text{ cm}^3$ 的金标准,具有微创切口小、结石清除迅速和结石清除率高等特点^[8]。PCNL 是一种常见的取石方法,尽管经皮肾手术比开放手术创伤小,但仍可能出现并发症。感染是一种主要的并发症,根据严重程度分为发热、全身炎症反应综合征和脓毒症。一般情况下,发热是由于潜在的尿路感染导致的。PCNL 期间发生感染并发症的主要机制为在肾结石细菌定植和碎石过程中内毒素释放而诱发^[9]。导致 PCNL 术后感染的另一个因素是使用高压冲洗液,这可能导致真菌、细菌和内毒素从收集系统进入体循环而诱发^[10]。

CRP 属于一类急性时相蛋白,是机体应激状态下,由肝脏合成,可在炎症因子作用下迅速做出反应,含量明显高于正常水平,已经被广泛应用于临床评估炎症程度,可以作为诊断细菌性感染、病毒性感染及急性排异反应等生物学指标,因此 CRP 对细菌性感染的诊断特异性不高^[11-12]。当 PCNL 术后并发感染,机体发生炎症反应,炎症因子水平升高诱导 CRP 在肝脏细胞内大量合成,循环入血,血浆

中 CRP 含量升高。高水平的 CRP 促使补体系统激活,特异性结合 T 淋巴细胞,吞噬细胞活性被激发,CRP 含量水平越高,感染程度越重。

PCT 是降钙素的前体蛋白,包含 116 个氨基酸,主要由甲状腺 C 细胞、外周单核细胞分泌^[13],无激素活性^[14],在正常人群体内含量较少,在受到细菌性感染的机体内的含量在 6~12 h 内急剧上升,但纠正炎症反应后,又迅速下降^[15]。PCT 与炎症反应关系密切,作为细菌细胞壁成分之一的脂多糖或机体释放的炎症因子介质间接诱导全身组织、细胞降钙素-I 基因表达,导致 PCT 持续释放^[16]。PCT 对于细菌性感染较为敏感,可准确判断感染细菌的类型及感染部位,当机体受到的创伤导致肝脏巨噬细胞分泌水平呈非特异性上调,可准确预测 PCNL 术后患者是否并发感染^[17-18]。

本研究结果表明 PCT、CRP 两者联合检测可以明显提高诊断敏感度和特异度,避免漏诊和误诊,提高了临床确诊率,对于临床预测行 PCNL 治疗发生术后感染具有重要的诊断价值,本研究还确定了 PCT、CRP 二者的最佳诊断阈值,为临床预测行 PCNL 治疗发生术后感染提供客观数据,但由于本研究纳入对象病例数较少,研究范围相对狭小,因此研究结果可能存在一定的偏差,下一步将会进行更深入的大样本研究。

综上所述,行 PCNL 治疗发生术后感染的患者的 PCT、CRP 水平升高,二者联合检测对 PCNL 术后感染具有较高的诊断价值,为临床更好地选择合适的抗生素并及时治疗感染提供客观依据。

参考文献

- [1] 高健,胡立宝,陈尘,等. 经皮肾镜去石术后出血的介入治疗[J]. 北京大学学报(医学版), 2020, 52(4):667-671.
- [2] Draga ROP, Kok ET, Sorel MR, et al. Percutaneous nephrolithotomy: factors associated with fever after the first postoperative day and systemic inflammatory response syndrome. [J]. J Endourol, 2009, 23(6):921.
- [3] 夏生俊,施勇,浦金贤,等. 经皮肾镜取石术患者术前中段尿培养、肾盂尿培养和肾结石培养结果一致性分析及其与术后感染的关系[J]. 中国医师进修杂志, 2019, 42(3):225-229.

(下转第 324 页)

miR-20a 过表达促进 VEGF 表达及血管平滑肌细胞活性和迁移

王桂娟

【摘要】目的 探讨 miR-20a 过表达对血管内皮生长因子(VEGF)表达及血管平滑肌细胞(VSMC)活性和迁移的影响,并初步探索其可能的机制。**方法** 将 miR-20a mimics 转染至 VSMC, VSMC 分为 3 组:空白对照(Con)组、阴性对照(miR-NC)组和转染(miR-20a)组。Real-time PCR 检测 miR-20a 的表达变化, Real-time PCR 和 Western blot 检测各组 VSMC 中 VEGF 的表达,细胞计数试剂盒(CCK-8)法检测各组 VSMC 活性变化,Transwell 实验检测各组 VSMC 迁移能力,生物信息学和荧光素酶报告基因实验分析 miR-20a 对 CNN1 的靶向关系。**结果** 与 miR-NC 组比较,转染 miR-20a mimics 后 miR-NC 组 VSMC 中 miR-20a 的表达明显升高,VEGF mRNA 和蛋白表达明显上调,VSMC 活性升高,VSMC 迁移能力增强,差异均具有统计学意义($P<0.05$)。与 miR-NC 组比较,Con 组以上各指标差异均无统计学意义($P>0.05$)。荧光素酶报告基因实验结果显示,miR-20a 可显著抑制野生型钙调蛋白 1(CNN1)相对荧光素酶活性($P<0.05$),但对突变型 CNN1 相对荧光素酶活性无明显抑制作用($P>0.05$)。**结论** 过表达 miR-20a 能够促进 VSMC 活性和迁移以及 VEGF 的表达,其作用机制可能与靶向调控 CNN1 的表达有关。

【关键词】 miR-20a; 血管平滑肌细胞; VEGF; 细胞迁移

Overexpression of miR-20a promotes VEGF expression and vascular smooth muscle cell activity and migration

WANG Guijuan

(Department of Transfusion Tai'an Hospital of Traditional Chinese Medicine, Tai'an, Shandong, China, 271000)

【ABSTRACT】 Objective To investigate the effects of miR-20a overexpression on the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and the activity and migration of vascular smooth muscle cells (VSMC), and to explore its possible mechanism. **Methods** miR-20a mimics was transfected into VSMC. VSMCs were divided into 3 groups: blank control (Con) group, negative control (miR-NC) group and transfection (miR-20a) group. The expression of miR-20a was detected by Real-time PCR. The expression of VEGF was detected by Real-time PCR and Western blot. The activity of VSMC was detected by cell counting kit (CCK-8). Transwell assay was used to detect each group. VSMC migration ability, bioinformatics and luciferase reporter gene assays were used to analyze the targeting relationship of miR-20a to CNN1. **Results** Compared with the miR-NC group, the expression of miR-20a in VSMC of the miR-NC group was significantly increased after transfection of miR-20a mimics, the expression of VEGF mRNA and protein was up-regulated, the activity of VSMC was increased, and the migration ability of VSMC was enhanced ($P<0.05$). Compared with the miR-NC group, there was no significant difference in the above indicators between the Con group ($P>0.05$). The results of luciferase reporter gene assay showed that miR-20a significantly inhibits the relative luciferase activity of wild-type calmodulin 1 (CNN1) ($P<0.05$), but has no significant inhibitory effect on the relative luciferase activity of mutant CNN1 ($P>0.05$). **Conclusion** Overexpression of miR-20a

作者单位:泰安市中医医院检验科,山东省,泰安市 271000

通信作者:王桂娟, E-mail: WGJ18553855098@163.com

can promote the activity and migration of VSMC and the expression of VEGF, and its mechanism may be related to the targeted regulation of CNN1 expression.

[KEY WORDS] miR-20a; HUMAN vascular smooth muscle cells; VEGF; cell migration

动脉粥样硬化(Atherosclerosis, AS)是一种常见的破坏性和危及生命的疾病,其特征在大动脉中纤维元素和脂质的积累^[1]。血管平滑肌细胞(Vascular smooth muscle cell, VSMC)是构成动脉血管壁的主要细胞成分,调控增殖、迁移和凋亡等异常细胞功能促进AS的形成和发展^[2]。然而,VSMC对AS影响的详细分子机制仍不清楚。研究表明,血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)通过调控血管生成影响AS斑块的形成和发展^[3]。微小RNA(microRNA, miRNA)是长度为18~24个核苷酸的非编码RNA分子,通过与靶基因的3'非翻译区(3'untranslated regions, 3'UTR)结合来抑制翻译或诱导mRNA切割。最近,许多研究表明miRNA通过调控VSMC的增殖、迁移、表型转换和体内血管重塑等参与AS的进展^[4]。miR-20a属于miR-17-92簇,在多种恶性肿瘤中发挥作用,包括结肠癌、前列腺癌、胃癌和肺癌等^[5]。然而,迄今为止,miR-20a在VSMC中的生物学功能尚未明确阐明。本研究探究miR-20a对VSMC活性和迁移及VEGF表达的影响以及可能的机制,以期AS的治疗提供新的方向。

1 材料与方法

1.1 细胞系和主要试剂

人主动脉血管平滑肌细胞系T/G HAVSMC(美国ATCC);SmGM-2培养基(瑞士龙沙集团有限公司);胎牛血清、胰蛋白酶(赛默飞世尔科技公司);RNA提取试剂盒、反转录试剂盒(大连宝生物工程有限公司);除抗体外Western blot检测所需试剂(上海碧云天生物技术研究所);miR-20a mimics及mimics NC(上海吉玛制药有限公司);脂质体2000转染试剂(美国Invitrogen公司);Real-time PCR Kit检测试剂盒(上海研卉生物科技有限公司);CCK-8试剂盒(日本同仁化学研究所);Transwell下室(美国BD公司);VEGF、CNN1抗体(美国NEB公司);辣根过氧化物酶标记的二抗(美国CST公司);荧光素酶报告基因检测试剂盒(美国Promega公司)。

1.2 细胞培养

人血管平滑肌细胞培养在含5%灭活胎牛血

清的SmGM-2培养液中,置于体积分数5%CO₂、37℃、饱和湿度的细胞培养箱中培养,细胞生长融合度达90%以上时以胰蛋白酶消化传代,指数生长长期的细胞用于后续实验。

1.3 细胞分组和转染

将对数生长期的VSMC分为空白对照(Con)组、阴性对照(miR-NC)组和转染(miR-20a)组共3组。VSMC接种到24孔板中,于37℃培养箱过夜培养,待细胞生长汇合度达50%时,将脂质体2000与miR-20a mimics或mimics NC以2.5:1的比例混合,并加入到24孔板的细胞中,转染miR-20a mimics的VSMC记为miR-20a组,转染mimics NC的VSMC记为miR-NC组,未做转染处理的VSMC记为Con组。各组细胞在37℃培养箱孵育6h后更换为5%胎牛血清的SmGM-2培养液。

1.4 Real-time 检测

收集转染48h后3组VSMC,RNA提取试剂盒分别提取总RNA,并将RNA反转录成cDNA,使用Real-time PCR Kit检测试剂盒进行Real-time PCR。miR-20a正向引物5'-CACCTCGAGCCTGC-TATTTCTTCAA-3',反向引物5'-GAG AATTCAGTAACAGGACAGTTTG-3'。VEGF正向引物5'-ATCTTCAAGCCGTCCTGTGTGC-3',反向引物5'-CAAGGCTCACAGTGAACGCT-3'。CNN1正向引物5'-AAGGGCGGAACATCATT-GGGCT-3',反向引物5'-CTCGAAGATCTGCC-GCTTGGT-3'。反应结束后读取Ct值,采用相对定量2^{-ΔΔCt}法计算目的基因相对表达量。

1.5 Western blot 检测细胞中PCNA和Ki-67蛋白表达水平

使用RIPA裂解缓冲液分别从3组VSMC中提取蛋白质,并通过12%十二烷基硫酸钠聚-丙烯酰胺凝胶电泳分离,然后转移至聚偏二氟乙烯膜(polyvinylidene fluoride membranes, PVDF)上。在37℃下用5%脱脂牛奶封闭2小时,将膜与一抗孵育过夜:VEGF(1:1 000稀释),CNN1(1:800稀释)。随后将膜与1:2 000稀释的相应二抗室温孵育2h。以GAPDH的蛋白质水平作上样对照,使用ECL试剂盒显影,获取各蛋白条带,采用Image J软件分析

各组 VSMC 中 VEGF 和 CNN1 蛋白相对表达量。

1.6 CCK-8 法检测

对数期的 VSMC 以 8×10^3 个/孔接种到 96 孔板中,按照上述 1.3 法转染和分组,分别在转染 0、24、48、72 h 时向每孔细胞加入 10 μ L CCK-8 溶液,37℃ 孵育 2 h,使用酶标仪测定 490 nm 波长处吸光度值(OD 值)。

1.7 Transwell 实验

三组 VSMC 以胰酶消化,制成单细胞悬液,取 100 μ L 细胞悬液接种到 Transwell 小室的上室,在下室中添加含 10% 胎牛血清的 SmGM-2 培养液,放置在 37℃ 培养箱常规培养 48 h。采用多聚甲醛固定,结晶紫染色,在显微镜下观察穿膜细胞,随机选取 5 个视野技术穿膜细胞数。

1.8 荧光素酶报告基因实验

通过生物信息学在线软件 TargetScan 等预测结果显示 miR-20a 与 CNN1 mRNA 3'-UTR 存在靶向结合位点。根据预测结果将 CNN1 3'-UTR 及突变结合位点分别插入到 psiCHECK-2 荧光素酶载体上(该部分由上海生工生物工程有限公司完成),分别记为 CNN1-Wt 和 CNN1-Mut 荧光素酶重组载体。将 miR-20a mimics 或 mimics NC 与重组载体质粒共转染至 VSMC,48 h 后使用荧光素酶报告基因检测试剂盒测定萤火虫和海肾荧光素酶活性,以萤火虫荧光素酶活性作为内部对照计算细胞相对荧光素酶活性。

1.9 统计学分析

采用 SPSS 21.0 统计学软件分析数据,计量资料均以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,多组间差异比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 VSMC 中 miR-20a 的表达量比较

与 miR-NC 组 (0.96 ± 0.09) 相比,miR-20a 组 (3.16 ± 0.32) VSMC 中 miR-20a 的相对表达量明显升高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),而 Con 组 (1.00 ± 0.10) 中 miR-20a 的相对表达量无明显变化,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.2 各组 VSMC 中 VEGF 表达量比较

Western blot 检测结果:与 miR-NC 组相比,miR-20a 组 VSMC 中 VEGF mRNA 和蛋白相对表达量均明显上调,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),而

Con 组中 VEGF 的表达无明显变化,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 1,表 1。

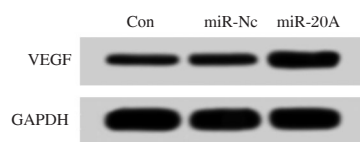


图 1 Western blot 检测 3 组 VSMC 中 VEGF 蛋白表达
Figure 1 Western blot detection of VEGF protein expression in 3 groups of VSMC

表 1 3 组 VSMC 中 VEGF mRNA 和蛋白相对表达量比较
($\bar{x} \pm s$)

组别	VEGF mRNA	VEGF 蛋白
Con	1.00 ± 0.11	0.26 ± 0.03
miR-NC	0.98 ± 0.10	0.25 ± 0.03
miR-20a	2.64 ± 0.25	0.67 ± 0.07
F 值	289.660	231.448
P 值	0.000	0.000

2.3 各组 VSMC 活性比较

与 miR-NC 组相比,miR-20a 组 VSMC 活性在转染 24、48、72 h 时均明显上调,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),而 Con 组中 VSMC 活性无明显改变,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 2。

表 2 3 组 VSMC 在不同时间点 OD 值($\lambda=490$ nm)比较
($\bar{x} \pm s$)

组别	0 h	24 h	48 h	72 h
Con	0.20 ± 0.02	0.44 ± 0.04	0.61 ± 0.06	0.79 ± 0.08
miR-NC	0.18 ± 0.02	0.42 ± 0.04	0.59 ± 0.06	0.78 ± 0.08
miR-20	0.20 ± 0.02	0.52 ± 0.05	0.74 ± 0.07	0.96 ± 0.09
F 值	3.000	13.263	14.802	13.220
P 值	0.069	0.000	0.000	0.000

2.4 各组 VSMC 迁移能力比较

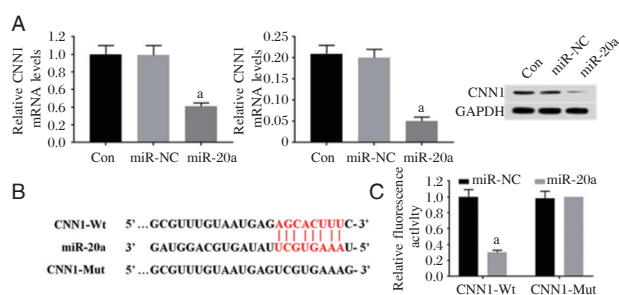
与 miR-NC 组相比,miR-20a 组 VSMC 穿膜细胞数明显增多 ($P < 0.05$),而 Con 组中 VSMC 穿膜细胞数无明显改变 ($P > 0.05$)。见表 3。

表 3 3 组 VSMC 穿膜细胞数比较 ($\bar{x} \pm s$)
Table 3 Comparison of the number of VSMC penetrating cells in the 3 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	迁移细胞数
Con	62.04 ± 6.10
miR-NC	59.25 ± 6.24
miR-20a	113.36 ± 10.58
F 值	133.251
P 值	0.000

2.5 miR-20a对CNN1的靶向关系验证

Western blot 检测结果发现(图2A),与 miR-NC 组相比,miR-20a 组 VSMC 中 CNN1 mRNA 和蛋白表达明显下调($P<0.05$),而 Con 组中 CNN1 的表达无明显变化($P>0.05$)。生物信息学软件分析结果显示(图2B),CNN1 的 3'UTR 与 miR-20a 存在互补结合碱基位点。荧光素酶报告基因实验结果显示(图2C),miR-20a mimics 能够显著抑制 CNN1-Wt 细胞的相对荧光素酶活性($P<0.05$),而对 CNN1-Mut 细胞的相对荧光素酶活性无明显抑制作用($P>0.05$)。



注:A为 CNN1 mRNA 和蛋白表达;B为 miR-20a 与 CNN1 的 3'UTR 的靶向结合位点;C为 miR-20a 和 CNN1 的靶向关系。与 miR-NC 组比,* $P<0.05$ 。

图2 miR-20a 靶向调控 CNN1

Figure 2 miR-20a targets and regulates CNN1

3 讨论

AS 是由于脂肪、血栓、碳酸钙和结缔组织在血管沉积导致的一种慢性动脉疾病,也是全世界死亡率和发病率的主要原因。目前关于 AS 治疗策略包括药物治疗、外科手术和综合治疗,但未能取得良好的治疗效果^[6]。因此迫切需要探究 AS 的发病机制,对开发新的有效的 AS 治疗手段具有十分重要的意义。AS 的发病机制极其复杂,近年来随着研究的深入,发现 VSMC 的增殖和迁移涉及 AS 进展的所有阶段^[7]。VEGF 是一类特殊的细胞因子,广泛存在于心、脑、肝等组织和细胞中,在维持 VSMC 结构和功能上均具有重要作用^[8]。VEGF 可通过调控血管生成,导致 VSMC 异常增生,最终诱发 AS 的形成和发展。近年来已经描述了 miRNA 在控制 VSMC 增殖和迁移中的调节作用^[9]。此外,越来越多的证据表明 miRNA 与 VSMC 的功能密切相关^[10-11]。据报道,异常的 miRNA 表达与动脉粥样硬化的发展有关^[12]。miRNA 在调节 VSMC 中的作用有助于了解动脉粥样硬化的分子

机制,为 AS 的诊断和治疗策略提供新的作用靶点。

miR-20a 位于 chr13orf25 内含子的染色体 13q31 上,miR-20a 的表达失调参与多种癌症的发展。Fan 等人通过微阵列数据分析表明在增殖的 VSMC 中 miR-20a 异常高表达,推测 miR-20a 可能与 VSMC 活性有关^[13]。一项研究显示,miR-20a 在调节卵巢癌 OVCAR3 细胞的顺铂耐药和通过激活 EMT 促进细胞迁移中具有重要作用^[14]。miR-20a 在肝癌组织和细胞系中均低表达,恢复其表达可抑制肝癌 HepG2 细胞的增殖、迁移和侵袭^[15]。以上这些数据提示 miR-20a 可调控细胞的迁移能力。本实验与以上研究类似。Deng 等人研究发现,VEGF 可通过激活 Akt 和 Erk 信号通过刺激人脐静脉内皮细胞中 miR-31 和 miR-20a 的表达^[16]。在本实验结果发现过表达 miR-20a 的 VSMC 中 VEGF mRNA 和蛋白表达均明显升高。以上实验数据提示过表达 miR-20a 可能通过上调 VEGF 的表达及 VSMC 的活性和迁移能力参与 AS 的发展。CNN1 在多种恶性肿瘤中呈低表达,是一种广谱肿瘤诊断标记物。本实验通过生物信息学软件预测发现,CNN1 可能是 miR-20a 一个直接靶基因,荧光素酶报告基因测定证实 miR-20a 直接结合 VEGF-A mRNA 的 3'-UTR。且 Real-time PCR 和 Western blot 检测结果表明过表达 miR-20a 可显著抑制 CNN1 的表达。本实验结果提示 miR-20a 可能通过靶向调控 CNN1 影响 VSMC 活性和迁移以及 VEGF 的表达。

总之,本实验结果显示过表达 miR-20a 可促进 VEGF 的表达及 VSMC 活性和迁移,其作用机制可能与 miR-20a 靶向负调控 CNN1 的表达有关。本研究提供了对 AS 发展中 miR-20a 功能的进一步理解,为开发新的 AS 治疗手段提供一定的实验基础。

参考文献

- [1] Khyzha N, Alizada A, Wilson M D, et al. Epigenetics of Atherosclerosis: Emerging Mechanisms and Methods [J]. Trends Mol Med, 2017, 23(4):332-347.
- [2] Grootaert M O J, Moulis M, Roth L, et al. Vascular smooth muscle cell death, autophagy and senescence in atherosclerosis [J]. Cardiovas Res, 2018, 114(4):622-634.
- [3] Camaré C, Pucelle M, Nègresalvayre A, et al. Angiogenesis in the atherosclerotic plaque [J]. Red Biol, 2017, 12:18-34.
- [4] Yu X, Li Z. MicroRNAs regulate vascular smooth muscle cell functions in atherosclerosis (review) [J]. Int J Mol Med, 2014, 34(4):923-33.

- [5] Huang D, Peng Y, Ma K, et al. MiR-20a, a novel promising biomarker to predict prognosis in human cancer: a meta-analysis[J]. BMC Cancer, 2018, 18(1):1189-1202.
- [6] Berghuan SC, Bodde MC, Jukema JW. Pathophysiology and treatment of atherosclerosis: Current view and future perspective on lipoprotein modification treatment[J]. Neth Heart J, 2017, 25(4):231-242.
- [7] Osonoi Y, Mita T, Azuma K, et al. Defective autophagy in vascular smooth muscle cells enhances cell death and atherosclerosis[J]. Autophagy, 2018, 14(11):1991-2006.
- [8] Liao XH, Xiang Y, Li H, et al. VEGF-A Stimulates STAT3 Activity via Nitrosylation of Myocardin to Regulate the Expression of Vascular Smooth Muscle Cell Differentiation Markers[J]. Sci Rep, 2017, 7(1):2660-2670.
- [9] Choe N, Kwon D, Shin S, et al. The microRNA miR-124 inhibits vascular smooth muscle cell proliferation by targeting S100 calcium-binding protein A4 (S100A4)[J]. FEBS LETT, 2017, 591(7):1041-1052.
- [10] 张伟峰, 雷素扬, 赵俊涛. miR-93-5p 对心脏成纤维细胞纤维化的影响[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(5):656-660.
- [11] Yang F, Chen Q, He S, et al. miRNA-22 is a Novel Mediator of Vascular Smooth Muscle Cell Phenotypic Modulation and Neointima Formation[J]. Circulation, 2018, 137(17):1824-1841.
- [12] Di Gregoli K, Mohamad Anuar NN, Bianco R, et al. MicroRNA - 181b Controls Atherosclerosis and Aneurysms Through Regulation of TIMP-3 and Elastin[J]. Cir Res, 2017, 120(1):49-65.
- [13] Fan P, Chen Z, Tian P, et al. miRNA Biogenesis Enzyme Drosha Is Required for Vascular Smooth Muscle Cell Survival[J]. Plos One, 2013, 8(4):e60888-e60898.
- [14] Liu Y, Han S, Li Y, et al. MicroRNA-20a contributes to cisplatin-resistance and migration of OVCAR3 ovarian cancer cell line[J]. Oncol Lett, 2017, 14(2):1780-1786.
- [15] Chen GS, Zhou N, Li JQ, et al. Restoration of miR-20a expression suppresses cell proliferation, migration, and invasion in HepG2 cells[J]. Onco Target Ther, 2016, 9(1):3067-3076.
- [16] Deng H, Liu H, Zhai B, et al. Vascular endothelial growth factor suppresses TNFSF15 production in endothelial cells by stimulating miR-31 and miR-20a expression via activation of Akt and Erk signals[J]. FEBS Open Bio, 2017, 7(1):108-117.

(上接第319页)

- [4] Ganpule AP, Vijayakumar M, Malpani A, et al. Percutaneous nephrolithotomy (PCNL) a critical review [J]. Int J Surg, 2016, 36:660-664.
- [5] Bhat S, Lal J, Paul F. A randomized controlled study comparing the standard, tubeless, and totally tubeless percutaneous nephrolithotomy procedures for renal stones from a tertiary care hospital[J]. Indian J Urol, 2017, 33(4):310-314.
- [6] Deshmukh S, Sternberg K, Hernandez N, et al. Compliance with American Urological Association Guidelines for Post-Percutaneous Nephrolithotomy Antibiotics Does Not Appear to Increase Rates of Infection[J]. J Urol, 2015, 194(4):992-996.
- [7] 费夏俊, 林毅. 血清降钙素原水平对经皮肾镜手术患者尿培养结果及术后感染性发热的预测作用[J]. 天津医科大学学报, 2018, 24(6):524-528+535.
- [8] Tang K, Liu H, Jiang K, et al. Predictive value of preoperative inflammatory response biomarkers for metabolic syndrome and post-PCNL systemic inflammatory response syndrome in patients with nephrolithiasis[J]. Oncotarget, 2017, 8(49):85612-85627.
- [9] 王卫生, 桂俊卿, 徐跃文, 等. 一期和分期经皮肾镜碎石术治疗复杂感染性上尿路结石对比研究[J]. 国际泌尿系统杂志, 2019, 39(2):252-255.
- [10] Jiang E, Guo H, Yang B, et al. Predicting and comparing postoperative infections in different stratification following PCNL based on nomograms[J]. Sci Rep, 2020, 10(1):1527-1631.
- [11] 秦国东, 于文春, 邱明, 等. 经皮肾镜术前及术后监测降钙素原对感染的早期诊断及尿源性脓毒症预防的临床意义[J]. 国际泌尿系统杂志, 2020, 40(3):419-422.
- [12] 刘琪, 常文婧, 孙祖俊, 等. PCT、SAA、hs-CRP、Neu% 和 WBC 检测对感染性疾病的临床诊断价值分析[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(15):1835-1838, 1843.
- [13] 赖香茂, 刘晓萍, 汤英贤, 等. 经皮肾镜取石术后感染患者血清中降钙素原检测的临床意义[J]. 黑龙江医学, 2015, 39(3):276-277.
- [14] 甄品, 张昆鹏, 左长增, 等. 重症急性胰腺炎继发肺部感染患者血清炎症细胞因子水平的变化及临床价值[J]. 中华医院感染学杂志, 2020, 30(8):1240-1243.
- [15] 郭连峰, 牟娜, 刘兆玮, 等. 血清 HNL、CD64 和 PCT 检测对细菌感染性疾病的临床诊疗[J]. 中国老年学杂志, 2020, 40(13):2807-2809.
- [16] 李贵忠, 满立波, 王海, 等. 比较降钙素原、C 反应蛋白和白细胞计数在经皮肾镜取石术后脓毒症诊断中的价值[J]. 中华泌尿外科杂志, 2017, 38(1):42-46.
- [17] 时东彦, 赵建宏. 降钙素原检测及临床应用评价[J]. 临床荟萃, 2017, 32(4):284-286+290.
- [18] 廖荣叶, 孙守萍, 曹志. PCT、sICAM-1、sVCAM-1 在慢性肾小球肾炎合并细菌感染中的应用价值[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(5):629-633.

· 论 著 ·

高频超声与MRI诊断儿童肘关节微小骨折的临床价值探讨

吴琴芳¹ 黄培楷^{2*} 肖梦强² 李文金¹

[摘要] **目的** 探讨高频超声(HFUS)与核磁共振成像(MRI)在儿童肘关节微小骨折中的应用价值。**方法** 选取2019年5月至2020年11月本院收治的57例疑似肘关节微小骨折患儿,均行HFUS与MRI检查,根据MRI诊断结果将患儿分为骨折组($n=26$)、无骨折组($n=31$),比较两组一般资料、超声征象和参数,分析超声征象和参数与儿童肘关节微小骨折关系,探究超声征象和参数诊断儿童肘关节微小骨折的价值。**结果** HFUS与MRI诊断儿童肘关节微小骨折的一致性为96.49%,Kappa值为0.942,95%CI:0.765~1.118($P<0.05$);骨折组、无骨折组肌肉损伤或水肿、脂肪垫征阳性、关节积液、骨皮质连续性中断分布及肘前脂肪垫厚度比较,差异有统计学意义($P<0.05$);肌肉损伤或水肿、脂肪垫征阳性、关节积液、骨皮质连续性中断分布及肘前脂肪垫厚度均与儿童肘关节微小骨折相关($P<0.05$);脂肪垫征阳性诊断儿童肘关节微小骨折的敏感度、特异度均为100%;肌肉损伤或水肿、关节积液、骨皮质连续性中断、肘前脂肪垫厚度诊断儿童肘关节微小骨折的AUC分别为0.766、0.699、0.673、0.835。**结论** HFUS诊断儿童肘关节微小骨折与MRI结果具有一致性,可直观显示脂肪垫阳性征、肌肉损伤征,为临床诊治儿童肘关节微小骨折提供有效影像学技术支持。

[关键词] 肘关节微小骨折;高频超声;核磁共振成像;脂肪垫阳性征

The clinical value of high frequency ultrasound and MRI in the diagnosis of microfracture of the elbow joint in children

WU Qinfu¹, HUANG Peikai^{2*}, XIAO Mengqiang², LI Wenjin¹

(Department of Ultrasound, Zhuhai Hospital, Guangdong Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhuhai, Guangdong, China, 519015)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the application value of high frequency ultrasound (HFUS) and magnetic resonance imaging (MRI) in children with microfractures of the elbow joint. **Methods** From May 2019 to November 2020, 57 children with suspected elbow joint microfractures in our hospital were selected for HFUS and MRI. According to the results of MRI diagnosis, children were divided into the fracture group ($n=26$) and the non-fracture group ($n=31$). The general data, ultrasound signs and parameters of the two groups were compared, and the relationship between the ultrasound signs and parameters and the microfractures of the elbow joint in children was analyzed. **Results** The consistency of HFUS and MRI in the diagnosis of microfractures of the elbow joint in children was 96.49%, the Kappa value was 0.942, and the 95% CI was 0.765~1.118 ($P<0.05$). The comparison of muscle injury or hematoma, positive fat pad sign, joint effusion, cortical bone continuity, and fat pad thickness in front of the elbow between the fracture group and the non-fracture group was statistically significant ($P<0.05$). Muscle injury or hematoma, positive fat pad sign, joint effusion, continuity distribution of cortical bone, and thickness of elbow fat pad were all related to microfractures of the elbow joint in children ($P<0.05$). The sensitivity and specificity of the positive fat pad sign in the

基金项目:广东省珠海市医学科研项目(20191207A010024)

作者单位:广东省中医院珠海医院超声科,广东,珠海519015

*通信作者:黄培楷, E-mail:6251758@163.com

diagnosis of microfractures of the elbow joint in children were 100 %. The AUC of muscle injury or hematoma, joint effusion, continuity of cortical bone, and thickness of elbow fat pad for the diagnosis of microfractures of the elbow joint in children were 0.766, 0.699, 0.673, and 0.835, respectively. **Conclusion** The HFUS diagnosis of microfractures of elbow joints in children is consistent with the MRI results. It can directly display positive signs of fat pads and muscle damage signs, and provide effective imaging technical support for the clinical diagnosis and treatment of microfractures of elbow joints in children.

[KEY WORDS] Microfractures of the elbow joint; High-frequency ultrasound; Magnetic resonance imaging; Positive fat pad sign

小儿骨骺未融合,会发生骨骺撕脱分离,尤其学龄期儿童较为多见。肘关节是由三个关节组成的复合关节,结构复杂,受其肘部解剖组织特殊性影响,易受损伤^[1-2]。文献报道指出^[3],对于微小骨折及隐匿性骨折临床多采取核磁共振成像(Magnetic resonance imaging, MRI)确诊,但MRI检查存在检查时间过长、噪音等问题,不宜于儿童。大量临床实践证实^[4-5],高频超声(High-frequency ultrasound, HFUS)是诊断骨、骨关节及软组织疾病有效方法之一,除可显示骨折线外,还对骨折周围软组织肿胀程度、神经及肌腱损伤、关节积液或血肿等情况评估具有较高应用价值。目前国内利用超声诊断儿童肘关节微小骨折的报道较少见,鉴于此,本文首次探讨HFUS与MRI诊断儿童肘关节微小骨折的一致性及与脂肪垫阳性征、肌肉损伤征的关系。具体分析如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2019年5月至2020年11月本院收治的57例疑似肘关节微小骨折患儿,均行HFUS与MRI检查,根据MRI诊断结果将患儿分为骨折组($n=26$)、无骨折组($n=31$)。组间年龄、性别、受伤至检查时间、受伤侧、临床症状比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表1。纳入标准:①首次X线检查未发现明确骨折或可疑骨折;②均有受伤史,且外伤病史 ≤ 3 d;③年龄 <13 岁,且年龄 >5 岁;④有肘关节损伤症状体征;⑤知情本研究并签署同意书。排除标准:①四肢恶性肿瘤病史;②临床外伤病史 >3 d;③四肢感染病史;④肘关节疾病病史;⑤存在MRI检查禁忌者。研究经本院伦理委员会审核通过。

1.2 方法

1.2.1 MRI检查

MRI检查设备为GE 3.0T HDXI,线圈采用关

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

Table 1 Comparison of general data between 2 groups

		[$n(\%)$, ($\bar{x} \pm s$)]			
资料		骨折组 ($n=26$)	无骨折组 ($n=31$)	t/χ^2 值	P 值
年龄(岁)		6.04 $\pm$ 2.33	6.45 $\pm$ 2.60	0.621	0.537
性别	男	22(84.62)	26(83.87)	0.083	0.872
	女	4(15.38)	5(16.13)		
	<1 d	6(23.08)	8(25.81)		
受伤至 检查时间	1~2 d	14(53.85)	14(45.16)	0.162	0.872
	3 d	6(23.08)	9(29.03)		
受伤侧	左侧	14(53.85)	17(54.84)	0.006	0.940
	右侧	12(46.15)	14(45.16)		
临床症状	肘关节周围红肿	23(88.46)	24(77.42)	0.551	0.458
	活动受限	4(15.38)	0(0.00)	3.042	0.081
	压痛	9(34.62)	6(19.35)	1.698	0.193

节表面线圈,检查序列包括快速自旋回波序列(TSET1WI),T1快速反转恢复序列(T1-TIRM),脂肪抑制质子密度加权像(FS-PDWI),三维双重回波稳态序列(3D-DESS)。

1.2.2 HFUS检查

应用GE LOGIQ E9超声诊断仪,设置探头频率为(6.0~15.0)MHz,协助患儿躺在检查床上,分别从肘关节前、后、内侧、外侧区纵切面、横切面连续扫查,重点观察干骺端内外上髁连续性是否中断、光滑、低回声,以及关节腔有无积血,关节囊外软组织有无肿胀积液。

1.2.3 影像学分析

所有影像检查结果由两名放射科影像学医师根据双盲法独立做出诊断,并对HFUS检查肌肉损伤或血肿、脂肪垫征阳性、关节积液、骨皮质连续性中断显示效果进行评判,若两名放射科影像学医师诊断结果不一致,需商讨后统一诊断结果。

1.3 观察指标

①分析HFUS与MRI诊断儿童肘关节微小骨折的一致性。②根据MRI诊断结果将患儿分为骨折组、无骨折组,比较两组超声征象和参数。③分析超

声征象和参数与儿童肘关节微小骨折关系。④超声征象和参数对儿童肘关节微小骨折的诊断价值。

1.4 统计学分析

采用统计学软件 SPSS 19.0 进行数据处理;计数资料以 $n(\%)$ 描述, χ^2 检验;计量资料服从正态分布,以 $(\bar{x} \pm s)$ 描述,两组间比较采用独立样本 t 检验;一致性采用 Kappa 分析;预测效能分析采用受试者工作特征(ROC)曲线,获取曲线下面积比较采用 DeLong 检验,联合诊断实施 Logistic 二元回

归拟合,返回预测概率 $\logit(p)$,将其作为独立检验变量。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HFUS 与 MRI 诊断儿童肘关节微小骨折的一致性

HFUS 与 MRI 诊断儿童肘关节微小骨折的一致性为 96.49%, Kappa 值为 0.942 (95% CI: 0.765~1.118),差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 HFUS 与 MRI 诊断儿童肘关节微小骨折的一致性

Table 2 The consistency of HFUS and MRI in diagnosing minor fractures of the elbow joint in children

HFUS	MRI				一致性(%)	Kappa 值	95%CI	χ^2 值	P 值
	肱骨远端	桡骨近端	尺骨近端	无骨折					
肱骨远端	15	0	0	0	96.49	0.942	0.765~1.118	147.473	<0.001
桡骨近端	0	5	0	0					
尺骨近端	0	0	4	0					
无骨折	0	1	1	31					

2.2 两组超声征象和参数比较

骨折组、无骨折组肌肉损伤或血肿、脂肪垫征阳性、关节积液、骨皮质连续性中断分布及肘关节侧位片时肘前脂肪垫厚度比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 3、图 1。

2.4 超声征象和参数与儿童肘关节微小骨折关系的 Logistic 回归方程分析

肌肉损伤或血肿、脂肪垫征阳性、关节积液、骨皮质连续性中断分布及肘前脂肪垫厚度均与儿童肘关节微小骨折相关($P < 0.05$)。见表 4。

2.5 超声征象和参数诊断儿童肘关节微小骨折的 ROC 分析

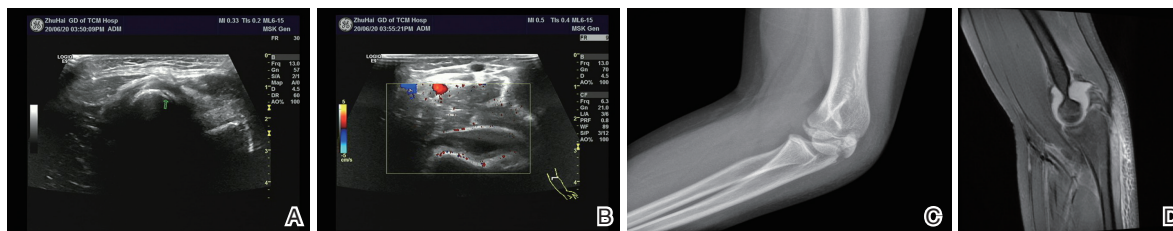
脂肪垫征阳性诊断儿童肘关节微小骨折的敏感度、特异度均为 100%;肌肉损伤或血肿诊断儿童肘关节微小骨折的 AUC 为 0.766,关节积液诊断儿童肘关节微小骨折的 AUC 为 0.699,骨皮质连续性中断诊断儿童肘关节微小骨折的 AUC 为 0.673,

表 3 两组超声征象和参数比较 [$n(\%)$]

Table 3 Comparison of ultrasound signs and parameters between the 2 groups [$n(\%)$]

资料		骨折组 ($n=26$)	无骨折组 ($n=31$)	t/χ^2 值	P 值
超声 征象	肌肉损伤或血肿	是 18(69.23)	5(16.13)	16.566	<0.001
		否 8(30.77)	26(83.87)		
	脂肪垫征	阳性 26(100.00)	0(0.00)	57.000	<0.001
		阴性 0(0.00)	31(100.00)		
超声 参数	关节积液	是 12(46.15)	2(6.45)	12.029	0.001
		否 14(53.85)	29(93.55)		
	骨皮质连续性中断	是 9(34.62)	0(0.00)	10.272	0.001
		否 17(65.38)	31(100.00)		
肘前脂肪垫厚度(mm)		4.94±0.63	3.44±0.75	8.081	<0.001

肘前脂肪垫厚度诊断儿童肘关节微小骨折的 AUC 为 0.835,各征象和参数对应的 cut-off 值、敏感度、特异度见图 2、表 5。



注:a图箭头所指为高频超声下探及尺骨鹰嘴连续性中断;b图为高频超声下探及肘关节腔积液;c图为DR片显示前脂肪垫征阳性,尺骨鹰嘴可疑骨折;d图为MRI压脂序列显示肘关节腔积液,尺骨鹰嘴骨皮质不连续。

图 1 儿童肘关节超声影像结果

Figure 1 Results of ultrasound images of children's elbow joints

表4 超声征象和参数与儿童肘关节微小骨折关系的 Logistic 回归方程分析

Table 4 Logistic regression equation analysis of the relationship between ultrasound signs and parameters and children's elbow joint microfractures

影响因素	β 值	S.E. 值	Wald / χ^2 值	P 值	OR 值	95%CI
肌肉损伤或血肿	0.896	0.301	8.868	<0.001	2.451	1.254~4.789
脂肪垫征阳性	1.308	0.403	10.540	<0.001	3.700	2.364~5.791
关节积液	0.553	0.203	7.430	<0.001	1.739	1.134~2.667
骨皮质连续性中断	1.276	0.266	23.022	<0.001	3.583	1.668~7.698
肘前脂肪垫厚度	0.987	0.251	15.369	<0.001	2.675	2.008~3.564

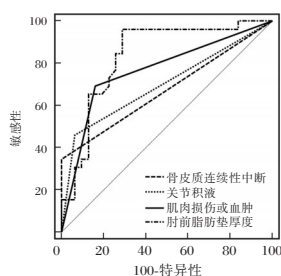


图2 超声征象和参数诊断儿童肘关节微小骨折的 ROC
Figure 2 The ROC of ultrasound signs and parameters in the diagnosis of small elbow fractures in children

表5 ROC 分析结果
Table 5 ROC analysis results

指标	AUC	95%CI	cut-off 值	敏感度(%)	特异度(%)	P 值
肌肉损伤或血肿	0.766	0.654~0.877	1 ^a	69.23	83.87	<0.001
关节积液	0.699	0.591~0.806	1 ^a	46.15	93.55	<0.001
骨皮质连续性中断	0.673	0.580~0.766	1 ^a	34.62	100.00	<0.001
肘前脂肪垫厚度	0.835	0.725~0.945	>4.12 mm	96.15	70.97	<0.001

注:肌肉损伤或血肿、关节积液、骨皮质连续性中断为非连续性变量,诊断时有“是”和“否”,^a表示“是”。

HFUS 对正常骨骼因能量限制无法得到骨骼完整图像,不能良好显示内部骨髓结构,但在骨骼病理情况下,骨质受到破坏,骨皮质变薄断裂或完全溶解消失,声束衰减减小,有助于声束穿过骨骼,加之儿童骨皮质骨化尚不十分完全,故可在声像图上较完全显示骨病变^[10]。由本研究结果可知,骨折组、无骨折组肌肉损伤或血肿、脂肪垫征阳性、关节积液、骨皮质连续性中断分布及时前脂肪垫厚度比较存在显著差异,说明临床可借助上述 HFUS 诊断指标判断儿童肘关节微小骨折发生情况。关节内骨折后,因关节内渗出或出血造成肘前或肘后脂肪垫的翘起,于肘关节侧位片上呈“八”字征。既往研究认为^[11],肘关节外伤患者中 X 线平片无法显示的细微骨折唯一征象可能是肘部脂肪垫翘起(脂肪垫征阳性)。骨骼对高频声能的传播是一种天然屏障,因声阻抗不同,在骨骼与软组织交界处形成强回声界面,声能在

3 讨论

MRI 能够检查到软骨内部三层结构信号改变,直接经矢状面、冠状面及横断面成像,从不同角度观察肘关节损伤情况,且对骨皮质、关节软骨、骨小梁等组织分辨率高^[6]。但对于无法控制的非自主运动者、体内装有心脏起搏器、胰岛素泵等电子植入物及高热或散热功能障碍者均无法进行检查^[7-8]。此外,高场强 MRI 检查具有一定磁场,会产生发热效应,检查时间较长,噪声也大,可能引起儿童不适。近年来,随着超声技术不断发展,HFUS 的出现使超声对骨结构及软组织显像更加清晰,同时具有无辐射、检查便捷等优势,在儿童肘部骨折中逐渐得到应用^[9]。但 HFUS 与 MRI 诊断儿童肘关节微小骨折的一致性仍需进一步探究。本研究在受伤≤3 d 内行 HFUS 检查,发现 HFUS 与 MRI 检查在诊断儿童肘关节微小骨折方面具有一致性。因此,对于疑似肘关节微小骨折患儿,建议行 HFUS 检查,利于准确判断微小骨折发生情况,改善患儿预后。

骨界面几乎全部反射,故利用此特性 HFUS 可明确骨组织脂肪垫征阳性、骨皮质连续性中断。本研究借助 HFUS 探头的细微分辨率,可明确肌肉损伤情况,以及各个时期损伤血肿的不同声像,可为临床诊断儿童肘关节微小骨折提供参考数据。本研究亦存在不足之处,因选例较少,所得数据可能发生偏倚,还需扩大样本量进行进一步深入探究。

综上所述,HFUS 诊断儿童肘关节微小骨折与 MRI 结果具有一致性,可直观显示脂肪垫阳性征、肌肉损伤征,在儿童肘关节微小骨折中具有较高诊断价值。

参考文献

- [1] 吴剑平,丁晓飞,廖世杰,等. 儿童肘部骨折的特征分析[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2018, 33(11): 820-823.

(下转第 332 页)

• 论 著 •

盆底2D/4D超声在女性前盆腔功能障碍性疾病诊断中的应用

任双丽 徐秋红 吴斯瑶 郭红梅* 陈秋妍 朱荷香

【摘要】目的 探究盆底2D/4D超声在女性前盆腔功能障碍性疾病诊断中的应用价值。**方法** 选取2018年10月至2020年7月期间于本院彩超室行盆底超声诊断的女性患者226例,作为盆底超声诊断对象,对照组(113例)采用2D盆底超声诊断,研究组采用4D盆底超声诊断(113例)。分析比对两组静息状态下与Valsalva动作下盆底超声参数,超声检查指标及两组诊断方式的准确性、灵敏性与特异性。**结果** 静息状态下及Valsalva动作下研究组与对照组患者肛提肌盆底超声参数比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。研究组Ar、As、 θ 、Br、Bs、Mu数值稍高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。经盆底超声诊断研究组灵敏度(94.8%)、特异性(98.9%)及诊断符合率(96.9%)均高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 女性前盆腔功能障碍性疾病的诊断采用4D盆底超声的诊断效果优于2D盆底超声,可在超声动态图像下直观观察女性患者前盆腔的相关情况,具有较高的诊断效能,值得推广使用。

【关键词】 盆底超声;前盆腔功能障碍;诊断符合率

Application of pelvic floor 2D/4D ultrasound in the diagnosis of female anterior pelvic functional disorders

REN Shuangli, XU QiuHong, WU Siyao, GUO Hongmei*, CHEN Qiuyan, ZHU Hexiang

(Ultrasonography Department, Dongguan Maternal and Child Health Hospital, Dongguan, Guangdong, China, 523000)

【Abstract】 Objective To explore the application value of pelvic floor 2D/4D ultrasound in the diagnosis of female anterior pelvic functional disorders. **Methods** 226 female patients who received pelvic floor ultrasound diagnosis in the color ultrasound room of our hospital from October 2018 to July 2020 were selected as the subjects of pelvic floor ultrasound diagnosis. 2D pelvic floor ultrasound diagnosis was used in the control group(113 female patients), and 4D pelvic floor ultrasound diagnosis was used in the study group(113 female patients). The accuracy, sensitivity and specificity of ultrasound examination indicators and diagnostic methods of the two groups were analyzed and compared under resting state and Valsalva action. **Results** there was no statistically significant difference in the pelvic floor ultrasound parameters of the levator ANI muscle between the study group and the control group under resting state and Valsalva action ($P>0.05$). The values of Ar, as, Br, Bs and Mu in the study group were slightly higher than those in the control group, with statistically significant differences ($P<0.05$). The sensitivity(94.8%), specificity and(98.9%) diagnostic(96.9%) coincidence rate of the study group were all higher than those of the control group, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** 4D pelvic floor ultrasound is better than 2D pelvic floor ultrasound in the diagnosis of functional disorders of the female anterior pelvic cavity. The relevant situation of female patients' anterior pelvic cavity can be observed directly under the dynamic ultrasound image, which has higher diagnostic efficacy and is worthy of popularization.

【KEY WORDS】 Pelvic floor ultrasound; Anterior pelvic dysfunction; Diagnostic compliance rate

基金项目:东莞市社会科技发展(一般)项目(2018507150071493)

作者单位:广东省东莞市妇幼保健院超声科,广东,东莞 523000

*通信作者:郭红梅, E-mail: 79101865@163.com

妇产临床中盆底功能障碍(Pelvic floor dysfunction, PFD)属常见影响女性健康的病症,PFD诱因为女性盆底组织结构伴有缺陷或者退化,创伤、发育不良、组织病变等,从而导致生殖器官的支持功能减低,出现脏器异位或移位。人体解剖学据垂直向划分女性盆腔,依次为前腔、中腔、后腔,其中前盆腔的组成包含膀胱、阴道前壁及尿道等,且主要常见疾病为阴道前壁膨出、压力性尿失禁及前盆腔器官脱垂^[1]。伴随医学诊断技术的不断创新与发展,超声诊断技术也随之发生日新月异的改变,在女性PFD疾病诊断中应用最为广泛的为盆底超声,其优势在于探查扫描安全性高,便捷、相对廉价,且能动态显像,具有高分辨率^[2]。当前临床中常用彩超检查为二维(2D)彩超,而四维(4D)彩超是基于2D彩超连续采集与处理图像,将检查目标的3D图像动态的呈现在超声显示器上,使前盆腔呈现“类解剖”的图像状态^[3]。因此本研究探究盆底2D/4D超声在女性前盆腔功能障碍性疾病诊断中的应用价值,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2018年10月至2020年7月期间于本院彩超室行盆底超声诊断的女性患者226例,作为盆底超声诊断对象,按照随机数字表法分为两组,其中对照组采用2D盆底超声诊断(113例),研究组采用4D盆底超声诊断(113例)。纳入标准:①女性患者均主诉为前盆腔功能障碍相关症状或临床表现。②均接受盆底超声诊断;③患者均自愿参与研究,且于知情书上署名。排除标准:①伴精神异常或意识障碍。②近3个月内有盆底手术史或盆腔巨大包块史;③泌尿生殖系统急性炎症。④临床基础资料缺失,不配合研究。女性患者平均年龄(49.5 ± 5.2)岁,孕次1~6次,平均(2.3 ± 0.2)次,产次1~4次,平均(2.2 ± 0.3)次,BMI指数($19.1 \sim 34.5$) kg/m^2 ,平均(26.8 ± 2.3) kg/m^2 。本研究经院伦理委员会审核后许可。

1.2 方法

盆底超声诊断:运用彩色多普勒超声诊断仪(型号GE Voluson E10),并采用RAB4-8L容积探头,彩超频率设置为4~8 MHz,其中二维扫查时发射角度设置为70°,四维探查时摆动角度为85°,腔内容积探头频率6~12 MHz,最大扫描角度195°。

检测前需预先告知检测者准备事项,即检测前叮嘱患者尽量排空膀胱及直肠,符合检测要求后调整体位,取截石位,并调整髋关节,使其处于外展及屈曲状态^[4]。对照组采用2D盆底超声诊断,研究组采用4D盆底超声诊断。

在仪器容积探头上涂抹一定量的无菌耦合剂,后戴上安全套,将其放置于大阴唇间,同时将探头与大阴唇相贴合,行盆腔脏器等检查。且行二维图像检查,并在正中矢状面获得清晰图像显现,对参照点作出合理调整,并转移至耻骨联合的后下缘部位,后详加确定,再自前向后依次将进行盆腔脏器检查,如检测膀胱后壁及直肠等部位,图像显现后详加观察。后采集两组检测者于静息及最大Valsalva动作下显现的图像,记录患者两种动作下肛提肌的相关数据。对上述两种状态下获得超声图像进行详细查看,并对膀胱移动度、膀胱后角、及尿道旋转角详加测量,其中膀胱后角为膀胱三角区域后壁、近段尿道两者之间形成的夹角;膀胱颈移动度指的是检测者膀胱颈位置于最大Valsalva动作下的值与静息状态的值之间的有效差;尿道旋转度是指最大Valsalva动作下尿道倾斜角与静息下尿道倾斜角之间的有效差值。

1.3 观察指标

①比对两组静息状态下肛提肌盆底超声参数。即比对肛提肌裂孔横径、纵径、面积以及肛提肌夹角。②比对两组Valsalva动作下肛提肌盆底超声参数。③比对两组尿道膀胱后角(Ar、As)、膀胱颈旋转角度(θ)、膀胱颈至耻骨联合中点间的距离值(Br、Bs)及膀胱颈移动长度(Mu)。④比对两组盆底超声诊断方式的灵敏性与特异性及诊断符合率。上述指标计算公式为:灵敏度=真阳性/(真阳性+假阴性) $\times 100\%$;特异性=真阴性/(真阴性+假阳性) $\times 100\%$;阳性预测值=真阳性/(真阳性+假阳性) $\times 100\%$;阴性预测值=真阴性/(假阴性+真阴性) $\times 100\%$;诊断符合率=(真阳性+真阴性)/(真阳性+假阳性+假阴性+真阴性) $\times 100\%$ ^[5]。

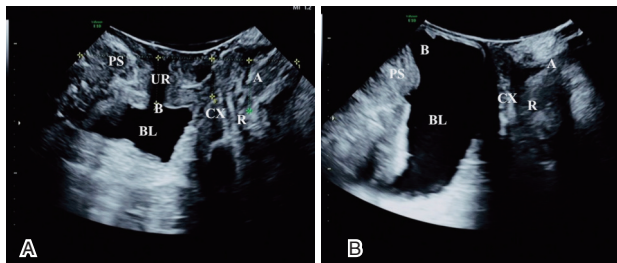
1.4 统计学方法

采用SPSS 22.0统计学软件数据处理,符合正态分布的计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,行 t 值检验,计数资料以 $n(\%)$ 表示,行 χ^2 检验;当 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 女性盆底静息及Valsalva动作时矢状切面B超结果

女性盆底静息及Valsalva动作时矢状切面B超结果。见图1。



注:PS:耻骨联合;UR:尿道;BL:膀胱;B:膀胱颈;CX:宫颈;A:肛管;R:直肠壶腹部。

图1 女性盆底静息状态及Valsalva矢状切面结构

Figure 1 Resting state of female pelvic floor and sagittal section of Valsalva

2.2 静息状态下肛提肌盆底超声参数比较

静息状态下两组患者肛提肌盆底超声参数比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表1。

表1 静息状态下肛提肌盆底超声参数比对($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Comparison of ultrasonic parameters of pelvic floor of levator ANI under resting state ($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	裂孔横径(mm)	裂孔纵径(mm)	裂孔面积(mm ²)	肛提肌夹角(°)
对照组	226	38.5±5.8	52.9±6.5	1325.6±322.1	56.2±9.3
研究组	226	38.6±6.1	53.4±7.1	1331.4±316.2	56.3±9.2
<i>t</i> 值	—	1.641	1.659	1.715	1.235
<i>P</i> 值	—	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05

2.3 Valsalva动作下肛提肌盆底超声参数比较

Valsalva动作下两组患者肛提肌盆底超声参数比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表2。

2.4 两组盆底超声检查指标比较

研究组Ar、As、θ、Br、Bs、Mu数值稍高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),见表3。

2.5 两组盆底超声灵敏度与特异性及诊断符合率比较

本研究中77例女性患有前盆腔功能障碍性疾

表2 Valsalva动作下肛提肌盆底超声参数比对($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Comparison of ultrasonic parameters of pelvic floor of levator ANI muscle under Valsalva action ($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	裂孔横径(mm)	裂孔纵径(mm)	裂孔面积(mm ²)	肛提肌夹角(°)
对照组	226	38.5±4.9	51.3±8.6	1429.3±235.6	62.3±9.0
研究组	226	38.7±5.1	51.6±9.1	1431.6±233.7	63.2±10.3
<i>t</i> 值	—	1.524	1.541	1.554	1.896
<i>P</i> 值	—	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05

病。经盆底超声诊断研究组灵敏度、特异性及诊断符合率均高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表4。

表4 两组盆底超声灵敏度与特异性及诊断符合率比较

Table 4 Comparison of ultrasound sensitivity, specificity and diagnostic coincidence rate between the two groups

组别	<i>n</i>	阳性率	阴性预测值	阳性预测值	灵敏度(%)	特异性(%)	符合率(%)
对照组	226	24.3	86.4	85.9	71.4	94.0	86.3
研究组	226	32.3	97.3	96.0	94.8	98.0	96.9
χ^2 值	—	5.351	6.052	6.067	6.921	5.102	5.983
<i>P</i> 值	—	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

3 讨论

PFD为妇产科常见病症,尤其在女性分娩后发病率最高,女性前PFD指的是盆底组织结构及功能出现异常性改变的病症,因女性盆腔组织结果相对复杂,部分疾病患病的早期并无明显临床体征或症状,因此疾病早期诊治具有一定困难性^[6]。现阶段诊断PFD主要采用的是X线检查、超声检查及MRI检查,X线检查通过膀胱与排便造影可连续且动态的观察膀胱颈变化,但有研究发现,在诊断脱肛、膀胱脱垂及子宫脱垂患者时存在不足;MRI检查软组织分辨率良好,但价格较为昂贵,在基层医院开展有一定限制,并且大部分患者接受度不高;超声检查包括传统2D检查、3D检查及4D检查,随着医学技术发展也不断发展与改进,通过联合诊断可靠性较高^[7-8]。本研究主要针对女性前PFD行2D、4D盆底超声诊断,探究其在疾病诊断中的应用效果。

本研究结果提示两种诊断方式均能准确的测量女性患者肛提肌相关参数,但4D盆底超声对

表3 比对两组盆底超声检查指标($\bar{x}\pm s$)

Table 3 Comparison of indicators of pelvic floor ultrasound examination between the two groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	Ar(°)	As(°)	θ(°)	Br(mm)	Bs(mm)	Mu(mm)
对照组	226	111.3±6.2	130.8±12.5	30.6±4.6	34.2±4.1	41.2±6.1	17.2±2.1
研究组	226	116.2±6.8	136.9±13.6	35.9±5.7	39.6±5.6	48.7±7.3	21.3±2.6
<i>t</i> 值	—	9.458	9.225	9.525	9.325	9.236	9.685
<i>P</i> 值	—	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

于女性前盆腔膀胱、尿道的相关参数能准确测量, 原因为4D盆底彩超相较于2D盆底彩超, 诊断显像时增加冠状切面, 特点为动态直观、显像、立体定位及旋转, 通过实时动态的探查患者目标部位的活动情况, 且最为重要的是可直观显像病灶不同组织层次的立体及毗邻间关系, 为女性盆腔复杂结构病灶的诊断提升精确度及可行性, 因此4D盆底彩超在探查组织结构复杂的女性盆腔时存在显著优势^[9]。本研究结果提示诊断女性前盆腔PFD采用4D盆底彩超的灵敏度、特异性及诊断符合率更高。4D盆底彩超属于新型临床诊断方式, 其基于2D与3D超声, 能实时显示动态图像, 在人体软组织诊断中具较高分辨率, 且相较于其他诊断方式(X射线诊断、MRI)具有无创、经济实惠、可重复诊断、无放射性、无需造影等优势, 4D盆底彩超在诊断女性前盆腔PFD时, 通过实时动态立题图像, 直观扫描探查女性盆底肌肉及软组织, 弥补了2D盆底彩超无法动态显像、图像清晰度相对低上的不足, 使得诊断结果更直观、更准确^[10]。本研究在得出结论的同时, 发现存在一定的研究局限性, 因样本量小, 且为单中心研究, 加之女性盆腔结构的复杂性、女性妊娠及分娩对盆腔结构造成的损伤, 因此在后续研究中需加大样本量, 多中心对女性盆腔结构进一步深层次分析。

综上所述, 女性前盆腔功能障碍性疾病的诊断采用4D盆底超声的诊断效果优于2D盆底超声, 可在超声动态图像下直观观察女性患者前盆

腔的相关情况, 值得推广使用。

参考文献

- [1] 张芳, 张周龙. 经会阴盆底三维超声联合直肠超声在盆底功能障碍性疾病诊断中的应用[J]. 中国超声医学杂志 2019, 35(12): 1115-1119.
 - [2] 钟春燕, 林芸, 魏俊, 等. 盆底超声在评价女性盆底功能障碍性疾病中的应用进展[J]. 医学综述, 2019, 25(1): 104-108.
 - [3] 王莹, 鲁虹霞, 冯桂婷. 四维盆底超声在初产妇盆底功能障碍性疾病中的运用[J]. 重庆医学, 2020, 49(10): 1669-1671, 1676.
 - [4] 黄弋庭, 周莹, 尤沛, 等. 经会阴四维超声成像结合图像降噪技术评估产后盆底功能障碍的价值探讨[J]. 临床超声医学杂志, 2019, 21(9): 664-667.
 - [5] 武莉. 盆底二维及三维超声在女性盆腔脏器脱垂及直肠肛门病变中的应用价值[J]. 山西医药杂志, 2019, 48(24): 27-28.
 - [6] 李思慧, 高建松, 王军华, 等. 二维超声测量肛提肌裂孔前后径和面积与盆腔器官脱垂病情的相关性[J]. 中国性科学, 2020, 29(4): 97-101.
 - [7] 顾小宁, 杨敏, 刘芳, 等. 经会阴盆底超声督导盆底肌肉训练在绝经后女性盆腔器官脱垂中的作用[J]. 中国超声医学杂志, 2018, 34(11): 1024-1027.
 - [8] 余颖莹, 陶肖樱, 金贝, 等. 四维盆底超声评估针灸治疗产后女性盆底功能障碍疗效的价值[J]. 中华全科医学, 2020, 18(1): 108-110+139.
 - [9] 王芳. 盆底器官脱垂女性盆底器官运动与角量参数变化的超声研究及其临床意义分析[J]. 山西医药杂志, 2019, 48(18): 2218-2221.
 - [10] 王爽, 王静. 经会阴二维与三维超声评价女性产后盆底功能损伤的研究[J]. 中国数字医学, 2018, 13(2): 95-97.
-
- (上接第328页)
- [2] Gierer P, Rocher S, Wichelhaus A, et al. Typical fractures and dislocations of the elbow joint and their treatment[J]. Radiologie, 2018, 58(11): 976-984.
 - [3] 李晓娜, 彭志刚, 张雪松, 等. MRI在儿童肘关节损伤中的应用[J]. 河北医药, 2020, 42(9): 1344-1347.
 - [4] 李雄涛, 沈先涛, 伍兴, 等. 超声检查在移位较小或没有移位的儿童肱骨外髁骨折中的应用[J]. 中华小儿外科杂志, 2017, 38(12): 927-931.
 - [5] Bohner L, Habor D, Gremse F, et al. Accuracy of High-Frequency Ultrasound Scanner in Detecting Peri-implant Bone Defects[J]. Ultrasound Med Biol, 2019, 45(3): 650-659.
 - [6] 李樑, 孙丽萍, 沈朝忠. 磁共振不同序列检查在儿童肘关节外伤诊断中的应用价值[J]. 中国基层医药, 2020, 27(17): 2058-2062.
 - [7] 王庆雷. MRI在儿童肘关节骨骺损伤诊断中的应用价值[J]. 安徽医学, 2017, 38(3): 365-366.
 - [8] 孟兆伟, 王洪涛, 管唯唯. MRI在肝癌合并肝硬化经皮穿刺射频消融效果及术后复发中的预测价值[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(6): 786-789+798.
 - [9] 徐文斌, 戴蓉丹, 刘悦, 等. 超声检查在儿童肘部骨折诊治中的应用进展[J]. 浙江医学, 2020, 42(5): 521-524+528.
 - [10] Lempeš V, Rosengren BE, Landin L, et al. Hand fracture epidemiology and etiology in children-time trends in Malmö, Sweden, during six decades[J]. J Orthop Surg Res, 2019, 14(1): 213.
 - [11] 李晓梅, 王新强. 高频超声在小儿肘关节外伤(DR示脂肪垫阳性征骨折示阴性)中的价值研究[J]. 现代医用影像学, 2017, 26(1): 45-48.

• 论 著 •

卵巢癌中 IGF-1/IGF-1R 轴与临床病理特征及预后的相关性

朱冰* 白杰 牛爱琴

【摘要】目的 研究卵巢癌中胰岛素样生长因子-1(IGF-1)/IGF-1受体(IGF-1R)轴与临床病理特征、手术预后的相关性。**方法** 选择2015年3月至2017年12月期间在本院妇产科手术切除的卵巢癌组织、卵巢良性肿瘤组织、正常卵巢癌组织,采用免疫组化检测 IGF-1、IGF-1R 的阳性率,采用荧光定量PCR检测 IGF-1、IGF-1R 的 mRNA 表达水平。随访卵巢癌患者手术后的总生存期,采用 Kalpan-Meier 生存曲线分析总生存期的差异。**结果** 卵巢癌组织中 IGF-1、IGF-1R 的阳性率、mRNA 表达水平均高于卵巢良性肿瘤组织、正常卵巢癌组织,差异有统计学意义($P<0.05$);FIGO III~IV期、组织学分级 G2-G3 卵巢癌组织中 IGF-1、IGF-1R 的阳性率高于 I~II期、组织学分级 G1 卵巢癌组织,差异有统计学意义($P<0.05$);卵巢癌中 IGF-1、IGF-1R 阳性表达的患者总生存期较 IGF-1、IGF-1R 阴性表达患者缩短,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 卵巢癌中 IGF-1 及 IGF-1R 高表达与病理特征恶化、手术后总生存期缩短有关,IGF-1/IGF-1R 轴参与卵巢癌的发病。

【关键词】 卵巢癌;胰岛素样生长因子-1;胰岛素样生长因子-1受体

Correlation of IGF-1/IGF-1R axis in ovarian cancer with clinicopathological features and prognosis

ZHU Bing*, BAI Jie, NIU Aiqin

(Department of Gynecology, First People's Hospital of Shangqiu City, Shangqiu, Henan, China, 476000)

【ABSTRACT】Objective To study the insulin-like growth factor-1 (IGF-1)/IGF-1 receptor(IGF-1R) axis in ovarian cancer with clinicopathological features and prognosis. **Methods** Ovarian cancer tissue, benign ovarian tumor tissue and normal ovarian cancer tissue were selected from the Department of gynecology and obstetrics of this Hospital from March 2015 to December 2017. The positive rates of IGF-1 and IGF-1R were detected by immunohistochemistry, and the mRNA expression levels of IGF-1 and IGF-1R were detected by fluorescence quantitative PCR. The overall survival time of patients with ovarian cancer after operation was followed up. The difference of overall survival was analyzed by Kalpan Meier survival curve. **Results** the positive rates of IGF-1 and IGF-1R, the mRNA expression levels of IGF-1 and IGF-1R in ovarian cancer tissues, which were higher than those in benign ovarian tumor tissues and normal ovarian cancer tissues, the difference was statistically significant ($P<0.05$). The positive rates of IGF-1 and IGF-1R in ovarian cancer tissues with FIGO stage III~IV and histological grade G2-G3 were higher than those in ovarian cancer tissues with stage I~II and histological grade G1, the difference was statistically significant($P<0.05$); the overall survival time of patients with positive expression of IGF-1 and IGF-1R was shorter than that of patients with negative expression of IGF-1 and IGF-1R, the difference was statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** the high expression of IGF-1 and IGF-1R in ovarian cancer is related to the deterioration of pathological features and the shortening of postoperative overall survival. The IGF-1/IGF-1R axis is involved in the progression of ovarian cancer.

【KEY WORDS】 Ovarian cancer; Insulin-like growth factor-1; Insulin-like growth factor-1 receptor

基金项目:2019年河南省医学科技攻关计划联合共建项目(LHGJ20191494)

作者单位:商丘市第一人民医院妇科,河南,商丘476000

*通信作者:朱冰, E-mail:duwusiren1986@163.com

卵巢癌是临床常见的女性生殖系统恶性肿瘤,发病率不断升高,但因为早期缺乏典型的临床症状及体征,疾病的早期诊断率较低^[1]。在临床实践中,多数卵巢癌患者确诊时已为中晚期,错过了根治性手术的时机。卵巢癌的治疗主要采用细胞减灭术联合辅助化疗,但复发率和转移率高,整体预后较差。近些年,越来越多的学者开始关注卵巢癌的发病机制,发现在卵巢癌发病中其关键作用的分子有助于发现新的治疗靶点。胰岛素样生长因子(insulin like growth factor-1, IGF-1)是具有广泛促生长作用的细胞因子,与受体 IGF-1R 结合后促进细胞的增殖、迁移、侵袭。卵巢癌相关的基础研究证实,IGF-1 对卵巢癌的增殖、迁移及侵袭具有显著促进作用^[2]; IGF-1R 抑制剂对卵巢癌细胞的增殖具有抑制作用,对细胞凋亡有促进作用^[3]。为了阐明 IGF-1 及 IGF-1R 在卵巢癌发病中的作用,本研究将探究 IGF-1 及 IGF-1R 与临床病理特征、手术预后的相关性。

1 材料与方法

1.1 一般资料

选择 2015 年 3 月至 2017 年 12 月期间本院妇科手术切除的卵巢癌组织(70 例)、卵巢良性肿瘤组织 35 例,包括浆液性囊腺瘤 22 例、粘液性囊腺瘤 13 例,均经术后病理明确诊断、正常卵巢组织(55 例)作为本研究的临床样本取自接受全子宫+卵巢切除术的子宫肌瘤患者。纳入标准:①经均经术后病理明确诊断;②临床病理资料完整;③组织样本充足。排除标准:①术前接受过放化疗;②既往有其他恶性肿瘤病史。本研究经医院伦理委员会批准,取得患者知情同意。

1.2 试剂

SP 二步法免疫组化试剂盒(SP-9001)为北京中杉金桥公司,IGF-1、IGF-1R 及 β -actin 一抗为 Abcam 公司,石蜡包埋组织 RNA 提取试剂盒(AB209)为北京艾比根公司,cDNA 第一链合成试剂盒、荧光定量检测试剂盒为北京天根公司,IGF-1、IGF-1R 及 β -actin 特异性引物为上海生工公司。

1.3 IGF-1、IGF-1R 表达的免疫组化检测

取石蜡包埋的卵巢癌组织、卵巢良性肿瘤组织、正常卵巢组织,制作病理切片,采用试剂盒进行免疫组化染色,分别使用 IGF-1、IGF-1R 的一抗,染色完成后在显微镜随机观察 5 个视野,参照文

献^[4]对染色强度进行评估、对阳性染色细胞进行计数。无染色、淡黄色、棕黄色、棕褐色依次记为 0 分、1 分、2 分、3 分;阳性染色细胞比例 0%~10%、10%~25%、25%~50%、50%~75%、>75%依次记为 0、1、2、3、4 分。染色强度评分与阳性染色细胞比例评分相加,0~3 分为阴性表达、4~7 分为阳性表达。

1.4 IGF-1、IGF-1R 表达水平检测

取石蜡包埋的卵巢癌组织、卵巢良性肿瘤组织、正常卵巢组织,采用试剂盒提取组织中的 RNA,采用 cDNA 第一链合成试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA,采用荧光定量检测试剂盒进行荧光定量 PCR 反应,分别使用 IGF-1、IGF-1R 及 β -actin 特异性引物,得到相应的反应曲线及循环阈值(Ct),以 β -actin 为内参,代入公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算 IGF-1 及 IGF-1R 的 mRNA 表达水平。

1.5 卵巢癌患者手术预后的随访

采用门诊复诊、电话回访等方式进行术后随访,随访截止日期 2020 年 6 月 30 日,病理确诊日期至死亡日期或随访截止日期为总生存期。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 21.0 软件进行数据统计分析;计数资料以 $n(\%)$ 表示、组间比较采用 χ^2 检验;计量资料经正态性检验、符合正态分布后以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用方差分析、两两比较采用 LSD- t 检验;总生存期采用 Kaplan-Meier 生存曲线描述并进行 Log rank 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 正常卵巢组织、卵巢良性肿瘤组织、卵巢癌组织中 IGF-1 和 IGF-1R 表达水平的比较

卵巢癌组织中 IGF-1、IGF-1R 的阳性表达率及 mRNA 表达水平均明显高于卵巢良性肿瘤组织、正常卵巢组织,差异有统计学意义($P < 0.05$);卵巢良性肿瘤组织与正常卵巢组织中 IGF-1、IGF-1R 阳性表达率及 mRNA 表达水平的比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图 1、图 2、表 1。

2.3 不同临床病理特征卵巢癌组织中 IGF-1、IGF-1R 表达水平的比较

不同年龄、月经状态、病理类型卵巢癌组织中 IGF-1、IGF-1R 阳性率的比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);FIGO III~IV 期卵巢癌组织中 IGF-1、IGF-1R 的阳性率高于 I~II 期卵巢癌组织,组织学分级 G2-G3

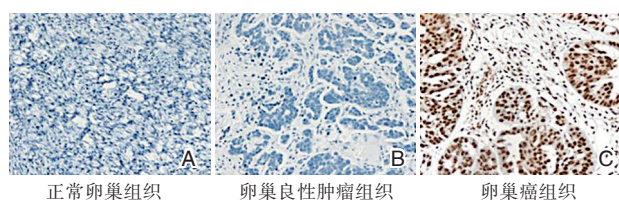


图1 各组组织 IGF-1 的免疫组化染色 (SP, ×400)

Figure 1 Immunohistochemical staining of IGF-1 between of different groups (SP, ×400)

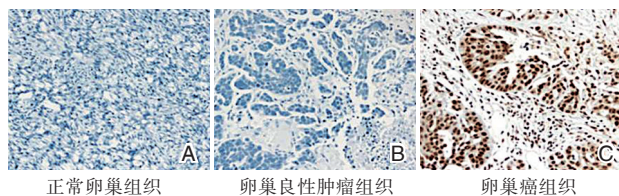


图2 两组组织中 IGF-1R 的免疫组化染色 (SP, ×400)

Figure 2 Immunohistochemical staining of IGF-1R between of 2 groups (SP, ×400)

表1 各组织中 IGF-1、IGF-1R 表达水平的比较 [n(%), ($\bar{x} \pm s$)]Table 1 Comparison of IGF-1 and IGF-1R expression levels between of different groupss [n(%), ($\bar{x} \pm s$)]

组织来源	n	IGF-1 阳性率	IGF-1R 阳性率	IGF-1 mRNA 表达水平	IGF-1R mRNA 表达水平
卵巢癌	70	55 (78.57)	52 (74.29)	2.01±0.32 ^{ab}	2.32±0.46 ^{ab}
良性卵巢肿瘤	35	14 (40.00)	12 (34.29)	1.09±0.19	1.10±0.28
正常卵巢	55	19 (34.55)	17 (30.91)	1.00±0.23	1.00±0.29
χ^2/F 值		15.408	24.209	29.598	34.572
P 值		0.000	0.000	0.000	0.000

注:与正常卵巢组织比较,^a $P<0.05$;与良性卵巢肿瘤组织比较,^b $P<0.05$

表2 不同临床病理特征卵巢癌组织中 IGF-1、IGF-1R 表达水平的比较 [n(%)]

Table 2 Comparison of IGF-1 and IGF-1R expression levels in ovarian cancer tissues with different clinicopathological characteristics [n(%)]

临床病理特征	临床病理特征	n	IGF-1 阳性率	χ^2 值	P 值	IGF-1R 阳性率	χ^2 值	P 值
年龄(岁)	<50	37	27 (72.97)	1.461	0.227	27 (72.97)	0.071	0.790
	≥50	33	28 (84.85)			25 (75.76)		
月经状态	未绝经	42	36 (85.71)	3.182	0.074	34 (80.95)	2.443	0.118
	已绝经	28	19 (67.86)			18 (64.29)		
病理类型	浆液性	45	35 (77.78)	0.047	0.828	34 (75.56)	0.106	0.744
	其他	25	20 (80.00)			18 (72.00)		
FIGO 分期	I~II	26	16 (61.54)	7.128	0.008	15 (57.69)	5.962	0.015
	III~IV	44	39 (88.64)			37 (84.09)		
组织学分级	G1	24	14 (58.33)	8.884	0.003	12 (50.00)	11.276	0.001
	G2~G3	46	41 (89.13)			40 (86.96)		

3 讨论

IGF-1 是具有广泛生物学作用的细胞因子,与其受体 IGF-1R 结合后促进细胞内 PI3K/AKT、MAPK 等信号通路激活,进而在多种恶性肿瘤的发病中起促癌作用。已有研究发现,肝癌、胰腺癌、鼻咽癌中 IGF-1 及 IGF-1R 的表达均明显增加^[5-7]。国内薛景戈的研究采用免疫组化检测了卵巢癌中 IGF-1 的表达并发现 IGF-1 的阳性率明显

卵巢癌组织中 IGF-1、IGF-1R 的阳性率高于 G1 卵巢癌组织,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表2。

2.4 IGF-1 阳性表达与阴性表达卵巢癌患者手术预后的比较

与卵巢癌中 IGF-1、IGF-1R 阴性表达的患者比较,IGF-1、IGF-1R 阳性表达患者的总生存期明显缩短,差异有统计学意义($P<0.05$)。见图3。

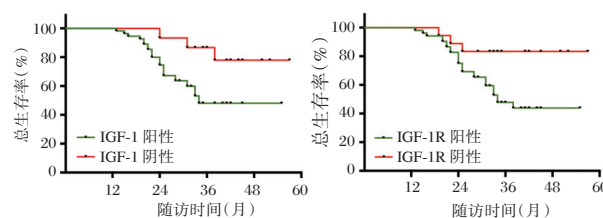


图3 不同 IGF-1、IGF-1R 表达的卵巢癌患者手术预后的比较

Figure 3 Comparison of surgical prognosis of ovarian cancer patients with different IGF-1, IGF-1R expression

升高^[4];国外 Puvanenthiran S 的研究采用免疫组化检测了卵巢癌中 IGF-1R 的表达并发现 IGF-1R 的阳性率明显升高^[8]。本研究采用免疫组化及荧光定量 PCR 两种实验方法检测了卵巢癌组织中 IGF-1 及 IGF-1R 表达的变化,与卵巢良性组织及正常卵巢组织比较,卵巢癌中 IGF-1 及 IGF-1R 的阳性率及 mRNA 表达水平均明显增加,与国内外已经报道卵巢癌中 IGF-1 及 IGF-1R 表达增加的结果一致,表明 IGF-1/IGF-1R 轴的高表达参与卵巢癌的发病。

多项恶性肿瘤中 IGF-1 及 IGF-1R 相关的基础研究发现, IGF-1 对卵巢癌^[7]、口腔癌^[9]、胰腺癌^[10]等肿瘤细胞的增殖具有促进作用、对细胞凋亡有抑制作用, IGF-1R 抑制剂或敲低 IGF-1R 对卵巢癌^[3]、乳腺癌^[11]、结肠癌^[12]等肿瘤细胞的增殖及迁移具有抑制作用。癌细胞异常的增殖、迁移、侵袭在卵巢癌的病理进程中发挥关键作用。本研究在发现卵巢癌中 IGF-1、IGF-1R 表达增加后, 进一步分析了 IGF-1/IGF-1R 与卵巢癌病理特征的关系, 结果显示: 随着 FIGO 分期及组织学分级增加, 卵巢癌中 IGF-1、IGF-1R 的阳性率均呈升高趋势, 表明 IGF-1、IGF-1R 的高表达与卵巢癌分期及组织学分级的增加有关, 与之相关的分子机制可能是高表达的 IGF-1/IGF-1R 促进了卵巢癌细胞的增殖、迁移及侵袭, 进而促进了卵巢癌的病理进程。

目前, 卵巢癌患者的整体预后并不理想, 复发和转移是影响卵巢癌预后的重要原因。国内多项关于卵巢癌预后因素的临床研究认为, FIGO 分期、淋巴结转移两项病理特征是预后的影响因素^[13-16]。本研究已经发现卵巢癌中 IGF-1、IGF-1R 表达增加且与 FIGO 分期、组织学分级两项病理特征相关, 在此基础上进一步分析 IGF-1、IGF-1R 与预后的关系。Ben Elhadj M^[6]和 Zhang Z^[4]的研究分别在喉癌和肝癌中观察到 IGF-1、IGF-1R 高表达与患者预后不良有关。本研究在手术后对卵巢癌患者的总生存期进行随访及分析, 结果表明 IGF-1 及 IGF-1R 表达增加会造成卵巢癌患者的总生存期缩短。这一结果与 IGF-1、IGF-1R 阳性表达与病理特征恶化的结果吻合, 也与 IGF-1、IGF-1R 在其他恶性肿瘤中影响预后的结果一致。

综上所述, 卵巢癌中 IGF-1 及 IGF-1R 高表达与病理特征恶化、手术后总生存期缩短有关, 今后 IGF-1/IGF-1R 轴有望成为研究卵巢癌发病机制、发现卵巢癌新治疗手段的靶点, 但 IGF-1/IGF-1R 在卵巢癌发病中的作用及机制仍有待更多的临床和基础研究来证实。

参考文献

- [1] 尤娟. 卵巢癌患者血清 miR-21 及糖类抗原 125 水平变化及意义[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2019, 11(6): 513-516+538.
- [2] LIU L, Wang X, Li X, et al. Upregulation of IGF1 by tumor-associated macrophages promotes the proliferation and migration of epithelial ovarian cancer cells[J]. Oncol Rep, 2018, 39(2): 818-826.
- [3] 周楠, 回丽敏, 刘振兴, 等. IGF-1R 抑制剂 NVP-AEW541 对卵巢癌移植瘤中休眠细胞的作用[J]. 肿瘤, 2018, 38(10): 942-950.
- [4] Zhang Z, Lei B, Chai W, et al. Increased expression of insulin-like growth factor-1 receptor predicts poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma [J]. Medicine (Baltimore), 2019, 98(44): e17680.
- [5] Amin HM, Morani AC, Daw NC, et al. IGF-1R/mTOR Targeted Therapy for Ewing Sarcoma: A Meta-Analysis of Five IGF-1R-Related Trials Matched to Proteomic and Radiologic Predictive Biomarkers[J]. Cancers (Basel), 2020, 12(7): 1768.
- [6] Ben Elhadj M, Goucha A, Fourati A, et al. The Prognostic Significance of IGF-1R and the Predictive Risk Value of Circulating IGF-1 in Tunisian Patients with Laryngeal Carcinoma [J]. Cancer Invest, 2020, 38(5): 289-299.
- [7] 薛景戈, 任琛琛, 杨立, 等. 卵巢上皮性癌组织中 IGF-1、E-cad 蛋白的表达以及 IGF-1 对卵巢癌 SKOV3 细胞 E-cad 表达和侵袭力的影响[J]. 郑州大学学报(医学版), 2016, 51(3): 396-401.
- [8] Puvanenthiran S, Essapen S, Haagsma B, et al. Co-expression and prognostic significance of the HER family members, EGFRvIII, c-MET, CD44 in patients with ovarian cancer [J]. Oncotarget, 2018, 9(28): 19662-19674.
- [9] Ferreira Mendes JM, de Faro Valverde L, Torres Andion Vidal M, et al. Effects of IGF-1 on Proliferation, Angiogenesis, Tumor Stem Cell Populations and Activation of AKT and Hedgehog Pathways in Oral Squamous Cell Carcinoma [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(18): 6487.
- [10] Kopantzev EP, Kopantseva MR, Grankina EV, et al. Activation of IGF/IGF-1R signaling pathway fails to induce epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells [J]. Pancreatology, 2019, 19(2): 390-396.
- [11] HuGF, Wang C, Hu GX, et al. AZD3463, an IGF-1R inhibitor, suppresses breast cancer metastasis to bone via modulation of the PI3K-Akt pathway[J]. Ann Transl Med, 2020, 8(6): 336.
- [12] Wang SQ, Yang XY, Yu XF, et al. Knockdown of IGF-1R Triggers Viral RNA Sensor MDA5- and RIG-I-Mediated Mitochondrial Apoptosis in Colonic Cancer Cells [J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2019, 7(16): 105-117.
- [13] 傅志勤, 鲁超, 殷珂欣, 等. HE4 及 CA125 评估卵巢癌生物学行为及预后的临床研究[J]. 肿瘤学杂志, 2019, 25(3): 239-242.
- [14] 柳金凤, 周厚菊. 卵巢癌患者血清 MMP12、MMP13 水平与临床病理参数和预后的关系[J]. 中国妇幼保健, 2019, 34(19): 4411-4415.
- [15] 张娟娟, 张春莲, 张志军, 等. 基于 CD133 及上皮间质转化相关因子的列线图模型对上皮性卵巢癌预后的预测价值[J]. 安徽医药, 2019, 23(8): 1600-1603.
- [16] 张璐芳, 蔡晶, 王泽华, 等. VEGF 及基质金属蛋白酶与卵巢癌临床分期的相关性分析[J]. 中南医学科学杂志, 2019, 47(1): 30-32.

• 综 述 •

心理压力相关 miRNA 的研究进展

刘经健^{1,2} 冉凤英¹ 罗丹^{1,2} 李春雷¹ 武伦¹ 陈琴华^{1,3*}

[摘 要] MicroRNA (miRNA) 是一类短小的内源性非编码 RNA, 在人体中发挥着重要的作用。由心理压力导致的机体心理应激是多种疾病产生和发展的重要因素, 一些 miRNA 被发现参与机体急、慢性心理应激的调控。MiRNA 存在于所有体液中, 加上其稳定的性质, 使其成为一种具有广阔应用前景的生物标记物。本文综述了与心理压力相关的试验, 并试图探讨从唾液中寻找压力相关的 miRNA, 作为衡量心理压力的生物标记物。

[关键词] 心理压力; miRNA; 生物标记物; 唾液

Progress on miRNA related to psychological stress

LIU Jingjian^{1,2}, RAN Fengying¹, LUO Dan^{1,2}, LI Chunlei¹, WU Lun¹, CHEN Qinhu^{1,3*}

(1. Affiliated Dongfeng Hospital, Hubei University of Medicine, Shiyan, Hubei, China, 442000; 2. College of pharmacy, Hubei University of Medicine, Shiyan, Hubei, China, 442000; 3. Shenzhen Baoan Authentic TCM Therapy Hospital, Shenzhen, Guangdong, China, 518101)

[ABSTRACT] MicroRNA (miRNA) is a type of short, endogenous, non-coding RNA that plays an important role in the human body. Psychological stress is an important factor in the development of many diseases. Some miRNAs have been found to participate in the regulation of acute and chronic psychological stress. MiRNAs exist in all body fluids and their stability make them a promising biomarker. This paper reviews the experiments related to psychological stress and attempts to explore how to find stress-related miRNAs in saliva as a biomarker to measure psychological stress.

[KEY WORDS] Psychological stress; MiRNA; Biomarker; Saliva

随着社会的发展, 心理问题越来越得到人们的重视。根据国务院印发并实施的《“健康中国2030”规划纲要》, “共建共享、全民健康”是建设健康中国的战略主题, 其中, 加强心理健康服务体系建设和规范化管理, 到2030年常见心理问题识别干预水平显著提高是该规划的重要目标之一。过度的心理压力是导致心理问题和多种疾病的重要原因, 而对心理压力的评估缺乏客观的指标, miRNA作为一种新兴的生物标志物, 将其应用

于心理压力的评估具有广阔的前景。

1 压力概述

1.1 压力

过度的心理压力是严重影响我国居民生活质量的心理问题, 其与快速发展的现代化工业社会密不可分。据世界卫生组织预计, 到2020年, 精神疾病和与心理压力有关的疾病, 将成为全球第二大致残因素, 过度的心理压力已成为亟需解决的

基金项目: 国家自然科学基金(81872509); 深圳市宝安中医药发展基金会(2020KJCX-KTYJ-200); 深圳市宝安纯中医治疗医院内科科研项目(BCZY2021003)

作者单位: 1. 湖北医药学院附属东风医院实验中心, 湖北, 十堰 442000

2. 湖北医药学院药学院, 湖北, 十堰 442000

3. 深圳市宝安纯中医治疗医院, 广东, 深圳 518102

通信作者: 陈琴华, E-mail: cqh77@163.com

公共心理卫生问题。压力被定义为一个过程^[1],在这个过程中,环境需求会使机体的适应能力受到影响,从而导致心理需求和生物变化,甚至有可能导致疾病。引起心理压力的因素称为压力源^[2],由于压力源作用的持续时间不同,心理压力导致的机体应激反应可分为急性应激反应和慢性应激反应,并以多种形式出现。

1.2 压力生理

当心理压力源作用于人体时,压力反应通常由大脑皮层高级中枢开始,发出神经冲动,这些冲动会经过大脑边缘系统,到达下丘脑^[3]。接收到压力刺激产生的冲动后,下丘脑会产生两个连续过程的神经-内分泌反应。首先,应激反应诱发机体“警报”反应,导致自主神经系统(ANS)激活,交感-肾上腺髓质系统激活,促进肾上腺髓质中的肾上腺素和去甲肾上腺素的释放^[1],以及中枢和外周神经系统中的5-羟色胺和肾上腺素的释放^[3]。这种反应也称为交感肾上腺髓质(SAM)轴,在SAM轴中,唾液 α -淀粉酶水平可作为应激反应强度的度量标准^[4]。

在细胞水平上,由于HPA轴和皮质醇的激活,炎症反应被激活,并引起细胞应激。细胞应激是细胞处于不利环境和遇到有害刺激时所产生的防御或适应性反应,由外部或内部刺激如氧化应激引起。这种分子损伤诱导不同途径的细胞应激反应,主要包括氧化应激反应、热应激反应、未折叠蛋白应答(UPR)和DNA损伤应答等。每一种应激反应的目的是通过诱导修复机制来重建细胞内稳态,如果损伤超过了细胞应激反应所能应对的能力,则会诱导细胞凋亡,以防止机体受到高度的系统性损伤。

1.3 压力与疾病

心理压力除了影响人的情绪、睡眠以外,还与很多疾病有关。压力和疾病之间的关系十分复杂,目前尚不明确,而且压力易感性因人而异。通常,影响压力易感性的因素包括遗传、压力应对方式、人格类型和社会支持等等。然而,并非所有的压力都有负面影响。当身体能忍受压力并利用它来提高表现时,压力是积极健康的。当压力超过我们的应对能力,使机体系统处于疲劳状态,并引起行为或健康问题时,压力便是消极有危害的^[2]。过度的心理压力会诱发有害的生理病理效应,同时,心理压力是神经症、抑郁症或精神分裂症等精神类疾病的重要因素,也是哮喘^[5]、冠心病^[6]等急

慢性疾病发生和维持的重要因素。

1.4 压力与 miRNA

传统心理压力评估方法多以各种形式的评估量表加以衡量,诊断手段存在较强的主观性,仍有很大的诊治障碍,最近有研究表明压力与miRNA密切相关^[7]。MiRNA是一类短小的内源性非编码RNA(non-coding RNA, ncRNA),其长度通常只有19-24nt,其主要通过与特定的mRNA靶点结合来促进其降解或抑制其翻译来调节基因表达,影响细胞的生长、增殖、分化、凋亡等过程^[8-10]。迄今为止,人类已发现48 860个成熟miRNA序列^[11],并且每一个miRNA都被预测可以调控多个靶基因^[12]。

在生理性应激水平上,机体在压力下先后发生两种反应,首先激活ANS和SAM,随后皮质醇介导的HPA轴激活。某些miRNA通过调节5-羟色胺转运体影响细胞对5-羟色胺的摄取^[13],作为ANS对心理应激反应的机制之一。MiRNA在皮质醇的产生中发挥调节作用以此调节HPA轴,miR-24被发现显著降低肾上腺皮质细胞中醛固酮和皮质醇的产生^[14]。

MiRNA在功能上参与多种不同细胞应激反应途径的上调或下调,氧化应激反应可激活多种抗氧化蛋白或酶,如谷胱甘肽或超氧化物歧化酶,它们都由不同的miRNA直接调节以调控氧化应激代谢产物的表达。热应激反应和未折叠蛋白应答都是处理错误折叠蛋白积累的途径,研究发现,多种miRNA参与该信号级联过程^[15,16]。DNA损伤应答是通过p53诱导细胞周期停滞或细胞凋亡,当DNA受氧化应激影响时,miR-34家族作为p53系统中的一个关键分子已经被证实参与细胞凋亡^[17],这些都表明miRNA在调节细胞对心理应激反应过程中具有重要意义。

2 与 miRNA 相关的压力试验

2012年,Katsuura等人^[18]招募了十名参学术提升考试的健康四年级医学生,通过对受试者血清中四种与心理压力相关的细胞因子(IL-1 β 、IL-6、TNF- α 和IFN- γ)^[19-20]和唾液中的皮质醇进行测量,并对受试者进行斯皮尔伯格焦虑量表(STAI)评分,作为受试者心理应激状态的评估手段。随后,利用miRNA微阵列筛选出11个目标miRNA(miR-144、-144*、-16、-15a、-19a、-19b、-26b、-30b、-106b、126和-142-3p),又选择了6个miRNA(miR-144/

144*、-16、-26b、-19a 和 19b) 进行 qPCR 验证。结果表明, 考试结束后受试者血清中的 miR-144/144* 和 miR-16 水平显著升高, 而且部分 miRNA 水平与 TNF- α 、IFN- γ 水平成正相关, 与唾液皮质醇水平也存在一定的相关性, 但 miRNA 水平与焦虑状态评分没有显著的相关性, 推测 miR-144/144* 和 miR-16 可能是健康年轻人暴露于自然应激源后, 机体产生炎症细胞因子反应的负调节因子之一。

基于此实验, Honda 等人^[21]检测了 25 名即将参加全国执业医师考试的男性医学生外周血 miRNA 的变化。采集受试者的血液样本进行 miRNA 分析, 并采集受试者的唾液样本进行唾液皮质醇的测量, 同时对受试者进行 STAI 评分。结果表明, 在考试前两天, 7 个 miRNA (miR-16、-20b、-26b、-29a、-126、-144 和 -144*) 水平显著升高, 这些结果提示, 长期的应激状态可能会增加外周血中这些特异性 miRNA 的表达水平。由此看出, miR-16 反应可能与焦虑有关, 而非皮质醇应答。

Gidron 等人^[22]研究了短暂性(学业考试)压力与肿瘤相关 miRNA (let-7b 和 miR-21) 之间的关系, 并探讨健康行为是否调节应激对这些 miRNA 表达的影响。在癌症发展过程中, let-7b 被证实具有肿瘤抑制性, 而 miR-21 似乎增强了癌变过程。同时, 人们发现健康的生活方式(如体育锻炼和饮食)可以减少各种危险因素对疾病风险的影响^[23]。研究表明, 高压状态下, let-7b 和 miR-21 的表达水平显著下降, 而且, miR-21 的表达与健康生活方式及其时间有关, 在健康行为良好(高于中位数)的学生中, miR-21 表达水平随时间无显著变化, 然而, 在健康行为较差的学生中, miR-21 在高压期间明显下降。因此, 可推测短暂的学业压力可以改变两个与癌症相关的 miRNA 分子的表达, 且健康行为可以缓和 miR-21 的表达改变。

Wiegand 等人^[24]以 24 名 20~35 岁健康人为研究对象, 采用 Trier 社会压力测验(TSST)对 24 名 20~35 岁健康受试者进行急性心理应激诱导, 研究人类唾液外泌体中 11 种压力相关 miRNA 作为非侵入性来源在急性心理应激实验条件下的反应。他们对 24 名受试者使用改良版的 TSST^[25], 以唾液皮质醇作为 HPA 轴的指示剂, 以及唾液 α -淀粉酶、心率(HR)和心率变异性参数(HRV)作为应激期间交感神经激活的指标, 其中 6 个 miRNA (miR-16; -20b; -21; -26b; -29a 和 -134) 可以被可靠地检测到。

研究结果表明 miR-21 和 miR-26b 可能与交感神经的激活有关。

3 MiRNA 作为潜在的压力生物标记物

首先, miRNA 广泛存在于人体多种体液中, 如人全血^[18]、尿液^[26]、唾液^[27]; 其次, miRNA 以特定的分泌模式在体液中稳定存在, 易于取样分析, 即使在变化的环境条件下, 如在温度(4~37℃)发生显著变化时, 它们也能稳定存在; 最后, miRNA 与多种疾病密切相关, 在疾病的不同阶段中稳定存在^[28], 并与疾病进展呈相关性, 因此 miRNA 被认为是生物体各种过程的潜在生物标记物。MiRNA 因其在多种癌症如肺癌^[29]、心脑血管^[30]等疾病中的特异、灵敏、稳定表达, 而被广泛研究, 具有作为多种疾病的生物标记物的潜力。

到目前为止, 唾液 miRNA 的研究主要集中在癌症的检测和评估^[31], 特别是口腔癌(鳞状细胞癌)^[32]、结直肠癌^[33]。在唾液中寻找心理压力相关的 miRNA, 比起采集血液来源 miRNA 具有无创、简便快捷、成本低等优势, 是目前更为可行的一种手段。唾液中压力相关 miRNA 可以作为新的研究方向, 并因其可接受性和无创性, 为相关的研究提供更大的便利。

4 结语与展望

随着人们对心理问题的逐步重视, 一种能够客观反映人们心理压力大小的指标迫切的需要被研究出来。MiRNA 作为一种具有广阔应用前景的新兴生物标记物, 在衡量人的心理压力方面具有巨大的潜力, 特别是唾液中 miRNA 因为其无创性和人们的可接受性, 值得我们去深入探索。因为人们个体的差异和心理问题情况的复杂性, 找到具有高特异性、高代表性的压力相关 miRNA 可能具有较大的挑战, 但通过对相关 miRNA 的研究, 心理压力问题的机制也会被进一步阐释, 进而推动对心理问题在分子水平的研究。

参考文献

- [1] Lucassen PJ, Pruessner J, Sousa N, et al. Neuropathology of stress[J]. Acta Neuropathol, 2014, 127(1): 109-135.
- [2] Salleh MR. Life event, stress and illness [J]. Malays J Med Sci, 2008, 15(4): 9-18.
- [3] Gu HF, Tang CK, Yang YZ. Psychological stress, immune response, and atherosclerosis [J]. Atherosclerosis, 2012, 223

- (1):69-77.
- [4] Crnković D, Peco M, Gelo J. Correlation between salivary biochemical stress indicators and psychological indicators[J]. *Acta Clin Croat*, 2018, 57(2):316-326.
 - [5] Rosa MJ, Lee AG, Wright RJ. Evidence establishing a link between prenatal and early-life stress and asthma development[J]. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2018, 18(2):148-158.
 - [6] Shen BJ, Fan Y, Lim KSC, et al. Depression, anxiety, perceived stress, and their changes predict greater decline in physical health functioning over 12 months among patients with coronary heart disease[J]. *Int J Behav Med*, 2019, 26(4):352-364.
 - [7] Juruena MF, Agustini B, Cleare AJ, et al. A translational approach to clinical practice via stress-responsive glucocorticoid receptor signaling[J]. *Stem Cell Investig*, 2017, 4:13.
 - [8] Rios-Colon L, Deep G, Kumar D. Emerging role of microRNA 628-5p as a novel biomarker for cancer and other diseases[J]. *Tumour Biol*, 2019, 41(10):1010428319881344.
 - [9] Zhang Y, Ren S, Yuan F, et al. MiR-135 promotes proliferation and stemness of oesophageal squamous cell carcinoma by targeting RERG[J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2018, 46(Sup 2):1210-1219.
 - [10] Zhou T, Chen S, Mao X. MiR-145-5p affects the differentiation of gastric cancer by targeting KLF5 directly[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(5):7634-7644.
 - [11] Kozomara A, Birgaoanu M, Griffiths-Jones S. MiRBase: from microRNA sequences to function[J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(D1):D155-D162.
 - [12] Swingle TE, Niu L, Smith P, et al. The function of microRNAs in cartilage and osteoarthritis[J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2019, 37(5):40-47.
 - [13] Issler O, Haramati S, Paul ED, et al. MicroRNA 135 is essential for chronic stress resiliency, antidepressant efficacy, and intact serotonergic activity[J]. *Neuron*, 2014, 83(2):344-360.
 - [14] Robertson S, MacKenzie SM, Alvarez-Madrazo S, et al. MicroRNA-24 is a novel regulator of aldosterone and cortisol production in the human adrenal cortex[J]. *Hypertension*, 2013, 62(3):572-578.
 - [15] Chitnis N, Pytel D, Diehl JA. UPR-inducible miRNAs contribute to stressful situations[J]. *Trends Biochem Sci*, 2013, 38(9):447-452.
 - [16] Roufayel R, Johnston DS, Mosser DD. The elimination of miR-23a in heat-stressed cells promotes NOXA-induced cell death and is prevented by HSP70[J]. *Cell Death Dis*, 2014, 5(11):e1546.
 - [17] Leung AK, Sharp PA. MicroRNAs: a safeguard against turmoil?[J]. *Cell*, 2007, 130(4):581-585.
 - [18] Katsuura S, Kuwano Y, Yamagishi N, et al. MicroRNAs miR-144/144* and miR-16 in peripheral blood are potential biomarkers for naturalistic stress in healthy Japanese medical students[J]. *Neurosci Lett*, 2012, 516(1):79-84.
 - [19] Lucas VS, McCain N, Elswick RK, et al. Perceived stress and surgical wound cytokine patterns[J]. *Plast Surg Nurs*, 2018, 38(2):55-72.
 - [20] Maydych V, Claus M, Watzl C, et al. Attention to emotional information is associated with cytokine responses to psychological stress[J]. *Front Neurosci*, 2018, 12:687.
 - [21] Honda M, Kuwano Y, Katsuura-Kamano S, et al. Chronic academic stress increases a group of microRNAs in peripheral blood[J]. *PLoS One*, 2013, 8(10):e75960.
 - [22] Gidron Y, De Zwaan M, Quint K, et al. Influence of stress and health-behaviour on miRNA expression[J]. *Mol Med Rep*, 2010, 3(3):455-457.
 - [23] Pop TL, Namazova-Baranova L, Mestrovic J, et al. The role of healthy lifestyle promotion, counseling, and follow-up in noncommunicable diseases prevention[J]. *J Pediatr*, 2020, 217:221-223.
 - [24] Wiegand C, Heusser P, Klinger C, et al. Stress-associated changes in salivary microRNAs can be detected in response to the Trier Social Stress Test: An exploratory study[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1):7112.
 - [25] Birkett MA. The Trier Social Stress Test protocol for inducing psychological stress[J]. *J Vis Exp*, 2011, (56):3238.
 - [26] Ritter A, Hirschfeld M, Berner K, et al. Discovery of potential serum and urine-based microRNA as minimally-invasive biomarkers for breast and gynecological cancer[J]. *Cancer Biomark*, 2020, 27(2):225-242.
 - [27] Cressatti M, Juwara L, Galindez JM, et al. Salivary microRNA-153 and microRNA-223 levels as potential diagnostic biomarkers of idiopathic parkinson's disease[J]. *Mov Disord*, 2020, 35(3):468-477.
 - [28] Ghizoni JS, Nichele R, de Oliveira MT, et al. The utilization of saliva as an early diagnostic tool for oral cancer: MicroRNA as a biomarker[J]. *Clin Transl Oncol*, 2019, 10.1007/s12094-019-02210-y.
 - [29] Zhou Y, Shen S. MiR-520f acts as a biomarker for the diagnosis of lung cancer[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2019, 98(30):e16546.
 - [30] Fung EC, Butt AN, Eastwood J, et al. Circulating microRNA in cardiovascular disease[J]. *Adv Clin Chem*, 2019, 91:99-122.
 - [31] Setti G, Pezzi ME, Viani MV, et al. Salivary microRNA for diagnosis of cancer and systemic diseases: A systematic review[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(3):907.
 - [32] He L, Ping F, Fan Z, et al. Salivary exosomal miR-24-3p serves as a potential detective biomarker for oral squamous cell carcinoma screening[J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 121:109553.
 - [33] Rapado-González Ó, Majem B, Álvarez-Castro A, et al. A novel saliva-based miRNA signature for colorectal cancer diagnosis[J]. *J Clin Med*, 2019, 8(12):2029.

云南省第一人民医院医学遗传科简介

云南省第一人民医院医学遗传科于2003年创建。经过十多年发展,全科现有61名职工,其中8名博士,正高级职称1人,副高级职称13人,中级职称17人。由国家卫生健康委全国产前诊断专家组成员、中国优生科学协会副会长、中华医学会医学遗传学委员会委员、云南省云岭学者、云岭产业技术领军人才、中国医师协会医学遗传学委员会常委、云南省医学会医学遗传学分会主任委员、云南省医师协会医学遗传学医师分会主任委员、博士生导师朱宝生教授担任科主任。科室现还有多名青年骨干入选云南省中青年学术与技术带头人后备人才、云南省技术创新人才培养对象等人才计划。

医学遗传科设有遗传咨询门诊、B超(胎儿医学)室、护理室、细胞遗传室、分子遗传室、生化筛查室、基因组技术室等7个专业组。科室服务云南和周边省市群众的生殖健康和出生缺陷防治、疑难复杂病例诊治,承担着全国产前诊断人才和出生缺陷防治人才培养以及专项技术质量控制的任务,每年招收医学遗传学专业的博士后、博士生、硕士研究生和住院医师规范化培训学员,还招收妇产科学、儿科学和分子生物学与生物化学专业的硕士研究生。

目前开展的临床服务有:遗传咨询、孕前优生检查、早孕、中孕期产前筛查、产前诊断、新生儿遗传代谢病筛查与治疗、基因组学检测诊断、反复自然流产诊断与治疗、反复不良生育史诊断与治疗等特色服务项目。科室是曾溢滔院士工作站、云南省产前诊断中心、云南省新生儿筛查中心、云南省出生缺陷与遗传病重点实验室、云南省遗传与生殖健康创新团队、云南省中英联合生殖统计研究中心、云南省临床遗传学研究所、杨焕明院士工作站、云南省出生缺陷与罕见病临床医学研究中心、云南省地中海贫血防治工程研究中心、国家卫生健康委批准的全国产前诊断技术培训基地、国家卫生健康委西部优生重点实验室、国家卫生健康委全国出生缺陷防治人才培养基地、中国出生缺陷干预救助基金会出生缺陷救助示范基地。2012年获得“云南省青年文明号”,2017年获得“云南省卫生计生系统先进集体”,2019年获得“云南省工人先锋号”荣誉称号。

医学遗传科成立17年来,先后荣获云南省科技进步一等奖2项、二等奖2项、全国妇幼健康科技奖二等奖1项、华夏医学科技奖三等奖1项、云南省科技进步三等奖12项;获得国家级、省级资助科研项目共30项,共获国家和省科研基金3000余万元;主持起草国家卫健委《地中海贫血筛查实验室、基因检测实

验室与产前诊断中心设置和管理指南(试行)》1部;主持编写《TORCH感染筛查、诊断与干预原则和工作流程专家共识》、《巨细胞病毒宫内感染诊断与干预诊疗指南》各1部;主编或参编《重大出生缺陷与精准预防》、《医学遗传学》(研究生教材)、《结构性胎儿发育异常》、《医学遗传学(本科双语教材)》、《产前遗传病诊断(第二版)》等8部专著。发表科研论文100多篇,SCI论文30多篇。



杂志简介：

《分子诊断与治疗杂志》于 2009 年 5 月创刊，是由中山大学主管，《中国家庭医生》杂志社有限公司主办，中山大学达安基因股份有限公司承办的面向国内外公开发行的分子医学权威性刊物，也是我国第一份以分子诊断与治疗学科为主要内容的分子医学专业学术期刊。本刊以传播分子医学理念、报道分子医学前沿、倡导分子医学创新、促进分子医学进步为办刊宗旨。主要刊登我国医学分子诊断和分子治疗相关领域中的基础理论研究、临床实践和技术方法的最新研究成果以及国内分子医学新技术、新理论和新进展等方面的文章。目前有编委及审稿专家 80 余人。在编委会和审稿专家及编辑部的共同努力下，于 2016 年被收录为“中国科技核心期刊”（中国科技论文统计源期刊）。

目前有“述评”、“论著”、“综述”、“前沿进展”、“专家笔谈”、“讲座”、“动态”和“专栏”等栏目。涵盖基因诊断、免疫诊断、核酸分子诊断、蛋白分子诊断、信号分子诊断、分子影像诊断、诊断仪器应用、基因治疗、核酸分子治疗、蛋白分子治疗等内容。

