



ISSN 1674-6929

CN 44-1656/R

邮发代号: 46-283

# 分子诊断与治疗杂志

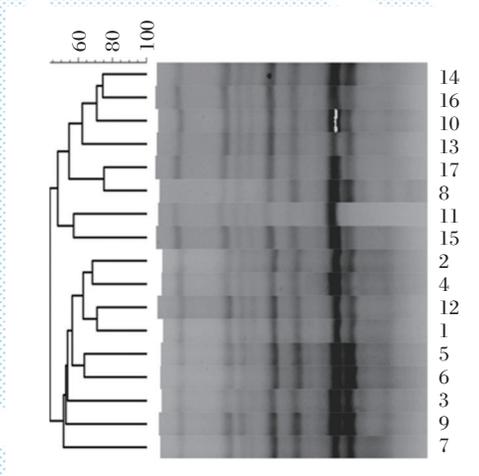
FENZI ZHENDUAN YU ZHILIAO ZAZHI

2021年5月 第13卷 第5期 总第81期

JOURNAL OF

MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Volume 13 Number 5 May 2021



图(P686) CRKP的同源性分析

Figure(P686) Romology analysis of CRKP

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

05>



分子诊断与治疗杂志

二〇二一年五月

第十三卷 第五期

中山大学

## 卢志明



卢志明,《分子诊断与治疗杂志》第五届编辑委员会编委。

1965年2月出生。2008年毕业于山东大学,医学博士学位。

主任技师,教授,博士生导师。现任山东省临床检验中心主任,山东省立医院临床医学检验部负责人。山东省有突出贡献的中青年专家。兼任山东省医学会临床检验分会主任委员,山东省临床检验

专家委员会主任委员,山东省免疫学会临床免疫专业委员会主任委员,中国医院协会检验管理专业委员会常务委员,中国中西医学临床检验专委会常务委员,山东省医师协会、山东省医院协会、山东省健康管理协会、山东省中西医结合学会的检验专业副主任委员等。同时担任《医学检验与临床》杂志副主编,《中华临床实验室管理电子杂志》编委,《临床检验杂志》、《山东大学学报》(医学版)、《山东医药》编委。卢志明教授主要从事临床免疫学和阿尔茨海默病相关基因研究。先后承担或参加了国家级课题3项,省部级课题4项。获2010年山东省科技进步二等奖(首位),2008年山东医学科技奖三等奖(首位),2011年山东医学科技奖三等奖(首位),2009年山东省自然科学三等奖(第三位)。2013年山东省医学科技奖二等奖(首位)。第一作者或通讯作者发表SCI论文十几篇,国内核心期刊三十几篇。培养和招收博士及硕士研究生20余名,1人获国家自然科学基金青年基金。

# 分子诊断与治疗杂志

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

月刊 2021 年 5 月 第 13 卷 第 5 期 总第 81 期 Bimonthly Volume 13 Number 5 May 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 5 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** 2021.5.18  
**Price** RMB 15.00



扫码订阅《分子诊断与治疗杂志》



# 中国科技核心期刊

(中国科技论文统计源期刊)

## 收录证书

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

### 分子诊断与治疗杂志

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

特颁发此证书。

中国科学技术信息研究所

Institute of Scientific and Technical Information of China

北京复兴路 15 号 100038 [www.istic.ac.cn](http://www.istic.ac.cn)

2020年12月

证书编号: 2019-G556-0386  
有效期至: 2021年12月



# 分子诊断与治疗杂志

月刊 2021年5月 第13卷 第5期

## 目次

### 述评

美国FDA批准的伴随诊断试剂临床试验证据的分析与思考 ..... 方丽 徐超 李冉 等(679)

### 论著

耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌的耐药基因及同源性分析 ..... 陈晨 周俊英 李一荣 等(683)

近红外诱导PLGA纳米粒子用于US/MR成像和乳腺癌治疗 ..... 左凤梅 卢佳慧 刘雅文 等(687)

PCT、乳酸清除率及CRP与食管癌术后肺炎并ARDS预后关系

..... 黄英明 邹龙涛 袁小锦 等(691)

海口地区恙虫病患者免疫损伤及临床特征分析 ..... 王强 张丽媛 俞亚转 等(695)

老年吉兰-巴雷综合征患者外周血IL-27水平变化及其临床意义分析

..... 张惠芳 赵红英 杨国涛 等(699)

TIF1- $\gamma$ 重组蛋白的表达及其在抗TIF1- $\gamma$ 抗体ELISA检测方法中的初步应用

..... 韩冠华 林晓涛 孟庆勇 等(703)

荧光PCR检测高血压用药相关基因多态性方法的建立 ..... 刘秀卿 李延武 黄磊(707)

惠州地区EV71疫苗接种水平与手足口病病原学分析 ..... 杨坤祥 黄彬(712)

深圳141例HIV抗体不确定检测结果分析 ..... 甘永霞 杨峥嵘 李浩 等(715)

血清uMICK、AHSG及NGAL与胃癌患者病理参数及临床预后的关系 ..... 陈瑶(720)

老年非小细胞肺癌患者放疗前后Treg及Foxp3 mRNA的变化

..... 侯盼飞 祝丽晶 濮娟 等(724)

小儿病毒性脑炎动态脑电图改变与血清NSE水平相关性 ..... 冯卉 马进 蔡金标(728)

梅尼埃病者补体、免疫球蛋白与听觉前庭功能关系及诊断价值

..... 林红艳 潘利平 李晓(732)

腹腔镜下复位治疗对小儿肠套叠T淋巴细胞亚群、NO及MDA水平的影响

..... 魏红 王贵波 武娜(736)

乳腺癌化疗患者Q-T间期离散度的变化及意义 ..... 安晓飞 李智慧 韩凤娟(740)

SPAG9 mRNA、Livin mRNA、Caspase-9 mRNA在曼月乐环疗程中动态变化及意义

..... 王学博 李松 任红娟 等(744)

LINC01088对胶质瘤U251细胞的增殖、迁移以及血管拟态的影响

..... 王薇 马庆海 张小玲 等(748)

D-二聚体、CA125、PD-L1在卵巢癌患者中的表达及诊断价值

..... 李仁河 李苗 梁裕萍 等(753)

miR-200b靶向MAP2对缺氧缺糖诱导的大鼠皮质神经细胞损伤的影响

..... 王宏宇 董俊兴 陈阵仁 等(757)

急性冠脉综合征患者血浆 miR-122、miR-29b、miR-30d 水平变化及诊断价值  
 ..... 郝春霞 张小光 李伟 等(762)

高危型 HPV 感染者宫颈免疫状况及与宫颈癌的关系 ..... 程文俊 申庆文(766)

急性缺血性脑卒中患者血清 ApoE、IMA 及 Hcy 与脑侧支循环分级的相关性  
 ..... 邓伟胜 王弘 徐昆明(770)

动态监测 LH、FSH、E2、子宫内膜厚度在排卵障碍性不孕治疗前后变化的临床意义  
 ..... 李宾玲 张丽 赵贝 等(774)

MIF、S100 $\beta$  蛋白及 SF 检测在急性脑出血中的表达及预后研究  
 ..... 王益 刘万平 何兴林 等(778)

TNF- $\alpha$ 、CA724 及 CEA 联合肠镜检查在结直肠癌诊断中的价值  
 ..... 袁焕君 姚兰杰 陈攀丽(782)

s-ChE、PCT、CRP 在肺结核合并肺部感染诊断及预后中的应用  
 ..... 党璋 吴琼 王娟 等(786)

脑梗死溶栓后血管再闭塞高危因素及与 hs-CRP、APN、TLR4 的关系  
 ..... 王杰斌 刘汉臣 张琦(790)

MGMT、h MLH1 基因在人脑胶质瘤中的表达及对常见药物化疗敏感性的影响研究  
 ..... 王传奎 梅洁 闫兆月 等(794)

支气管哮喘急性发作期患儿治疗后 IFN- $\gamma$ 、IL-1 $\beta$  及 IgE 变化研究  
 ..... 陈文欣 张秋月 王道 等(799)

NSCLC 组织中 Ape1/Ref-1 及 microRNA-21 表达与预后关系 ..... 张海燕 冯平 张洪艳 等(803)

TGF- $\beta$ 1、GM-CSF 及 TNF- $\alpha$  对急性髓系白血病患者病情转归的评估  
 ..... 仲华 林志强 薄德映 等(807)

T 细胞亚群、IL-6 及 IL-10 在支气管哮喘患儿治疗中的变化 ..... 黄国玲 陈红兵 谭忠友(811)

CP、Hcy 及 25(OH)D3 在糖尿病周围神经病变中的变化及意义  
 ..... 汤步阳 黄莹芝 胡恒贵 等(816)

重症呼吸衰竭患者心肌损害与 ET-1、IL-18、NO 水平的关系  
 ..... 吴畏 郭晓鹤 杨飞云 等(820)

前列腺癌中 CD147、MMP-2 mRNA 表达与临床分期、病理学分级的关系  
 ..... 吴狄 邓海媚 姚睿智 等(824)

非小细胞肺癌患者血清 HDAC1 和 DNMT1 浓度变化及临床意义 ..... 陈艳红 马丽 李峰(828)

PV 患者外周血 T 细胞亚群、IL-17A 和 IL-23 表达及临床意义 ..... 张小静 陈绍斐 李硕 等(832)

老年慢性肾功能衰竭患者经治疗后 BUN、Scr 及 ALb 的变化 ..... 刘博 屠恩玲 赵娜 等(836)

## 综 述

$\beta$ -地中海贫血修饰基因研究进展 ..... 龙岚 贺静(840)

高通量基因测序在血液肿瘤临床应用的质量管理现状及展望 ..... 吴祁生 王芳 聂代静 等(845)

## 专家风采

卢志明 ..... (封二)

## 实验室巡礼

山东省立医院临床医学检验部 ..... (封三)

# JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Monthly Volume 13 Number 5 May 2021

---

## CONTENTS

### ORIGINAL ARTICLES

- Alternative genes and homology analysis of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae  
*CHEN Chen, ZHOU Junying, LI Yirong, YANG Jingdong* ..... (683)
- Near-infrared triggered PLGA nanoparticles for US/MR imaging and breast cancer therapy  
*ZUO Fengmei, LU Jiahui, LIU Yawen, NI Chen, SHI Meilin, HU Junfeng* ..... (687)
- Relationship between PCT, lactate clearance, CRP and prognosis of postoperative pneumonia of esophageal cancer and ARDS  
*HUANG Yingming, ZOU Longtao, YUAN Xiaojin, JIANG Wenyan, LI Jianxiang, HE Yili, XIE Xianlong* ..... (691)
- Analysis of immune damage and clinical characteristics of tsutsugamushi disease in Haikou, Hainan Province  
*WANG Qiang, ZHANG Liyuan, YU Yazhuan, DU Yongguo* ..... (695)
- Changes of IL-27 level in peripheral blood of elderly patients with Guillain-Barré syndrome and its clinical significance  
*ZHANG Huifang, ZHAO Hongying, YANG Guotao, LI Ying, LIU Yunfeng* ..... (699)
- Expression of transcriptional intermediary factor 1-gamma recombinant protein and its application in anti-TIF1- $\gamma$  antibody ELISA detection  
*HAN Guanhua, LIN Xiaotao, MENG Qingyong, HE Lin, QIAN Chungeng, CHENG Bangning, XU Junfa* ..... (703)
- Establishment of real-time PCR assay for detection of hypertension drug-related gene polymorphism  
*LIU Xiuqing, LI Yanwu, HUANG Lei* ..... (707)
- Inoculation of enterovirus 71 vaccine and pathogen analysis of hand-foot-mouth disease in Huizhou  
*YANG Kunxiang, HUANG Bin* ..... (712)
- Analysis of uncertainty test results of 141 cases of HIV antibody in Shenzhen  
*GAN Yongxia, YANG Zhengrong, LI Hao, LI Guilian, SHI Xiangdong, LIU Shaochu, WANG Xiaohui, ZHAO Jin* ..... (715)
- Relationship between serum uMtCK, AHSG and NGAL levels with pathological parameters and clinical prognosis of patients with gastric cancer  
*CHEN Yao* ..... (720)
- Changes of Treg and *Foxp3* mRNA in elderly patients with non-small cell lung cancer before and after radiotherapy  
*HOU Panfei, ZHU Lijing, PU Juan, PAN Yan* ..... (724)
- Correlation between changes of ambulatory electroencephalogram and serum NSE level in children with viral encephalitis  
*FENG Hui, MA Jin, CAI Jinbiao* ..... (728)
- Relationship between complement, immunoglobulin and auditory vestibular function in patients with Meniere's disease and its diagnostic value  
*LIN Hongyan, PAN Liping, LI Xiao* ..... (732)
- The effect of laparoscopic reduction therapy on the levels of T lymphocyte subsets, NO and MDA in children with intussusception  
*WEI Hong, WANG Guibo, WU Na* ..... (736)
- Change and significance of Q-T interval dispersion in breast cancer patients undergoing chemotherapy  
*AN Xiaofei, LI Zhihui, HAN Fengjuan* ..... (740)
- The dynamic changes and significance of *SPAG9* mRNA, *Livin* mRNA and *Caspase-9* mRNA in the course of treatment of Mirena  
*WANG Xuebo, LI Song, REN Hongjuan, YANG Ran, SUN Li, XUE Guoyong, Qu Xiaoling* ..... (744)
- Effects of *LINC01088* on proliferation, migration, and angiogenesis of glioma U251 cells  
*WANG Wei, MA Qin Hai, ZHANG Xiaoling, SU Wuyun, CHANG Lijuan, WANG Xiaolan, LI Yao, YAN Haicheng* ..... (748)
- The expression and diagnostic value of D-dimer, CA125, PD-L1 in patients with ovarian cancer  
*LI Renhe, LI Miao, LIANG Yuping, SHEN Xiaomiao* ..... (753)

Effects of miR-200b targeting MAP2 on the damage of rat cortical nerve cells induced by hypoxia and hypoglycemia <i>WANG Hongyu, DONG Junxing, CHEN Zhenren, REN Haonan</i> .....	(757)
Changes of plasma miR-122, miR-29b, miR-30d levels in patients with acute coronary syndrome and their diagnostic value <i>HAO Chunxia, ZHANG Xiaoguang, LI Wei, ZHANG Ying</i> .....	(762)
Cervical immune status of patients with high-risk HPV infection and its relationship with cervical cancer <i>CHENG Wenjun, SHEN Qingwen</i> .....	(766)
Correlation Between Serum ApoE, IMA, Hcy and Cerebral Collateral Circulation Grading in Patients with Acute Ischemic Stroke <i>DENG Weisheng, WANG Hong, XU Kunming</i> .....	(770)
The clinical significance of dynamic monitoring of LH, FSH, E2, endometrial thickness before and after treatment of ovulatory disorder infertility <i>LI Binling, ZHANG Li, ZHAO Bei, YAN Huili</i> .....	(774)
Study on the expression and prognosis of MIF, S100 $\beta$ protein and SF in acute cerebral hemorrhage <i>WANG Yi, LIU Wanping, HE Xinglin, GUAN Nian, YANG Xiaofang, YUAN Siyi, PENG Chuan, CHEN Qian</i> .....	(778)
Value of TNF- $\alpha$ , CA724 and CEA combined with colonoscopy in the diagnosis of colorectal cancer <i>YUAN Huanjun, YAO Lanjie, CHEN Panli</i> .....	(782)
Application of S-ChE and PCT combined with CRP detection in the diagnosis and prognosis evaluation of pulmonary tuberculosis complicated with pulmonary infection <i>DANG Zhang, WU Qiong, WANG Juan, WANG Ying</i> .....	(786)
High risk factors of vascular re-occlusion after cerebral infarction thrombolysis and its relationship with hs-CRP, APN and TLR4 <i>WANG Jiebin, LIU Hanchen, ZHANG Qi</i> .....	(790)
Expression of MGMT and h MLH1 in glioma and its influence on chemosensitivity to common drugs <i>WANG Chuanxi, MEI Jie, YAN Zhaoyue, ZHANG Fengping, DUAN Ran, Ding Genxiao</i> .....	(794)
Study on the changes of IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ and IgE in children with acute exacerbation of bronchial asthma after treatment <i>CHEN Wenxin, ZHANG Qiuyue, WANG Daofang, MENG Guizhi</i> .....	(799)
Relationship between the expressions of Ape1/Ref-1 and microRNA-21 in NSCLC tissues and prognosis <i>ZHANG Haiyan, FENG Ping, ZHANG Hongyan, YANG Yating, LU Yuntao</i> .....	(803)
Evaluation of TGF- $\beta$ 1, GM-CSF and TNF- $\alpha$ on the outcome of patients with acute myelogenous leukemia <i>ZHONG Hua, LIN Zhiqiang, BO Deying, WANG Yanan, WU Yanwei, ZHAI Zhijia, JIAO Luyang</i> .....	(807)
Study on the changes of T cell subsets, IL-6 and IL-10 in the treatment of children with bronchial asthma <i>HUANG Guoling, CHEN Hongbing, TAN Zhongyou</i> .....	(811)
Changes and significance of CP, Hcy and 25(OH)D3 in diabetic peripheral neuropathy <i>TANG Buyang, HUANG Yingzhi, HU Henggui, LIU Zhen</i> .....	(816)
Relationship between myocardial damage and the levels of serum ET-1, IL-18 and NO in patients with severe respiratory failure <i>WU Wei, GUO Xiaohe, YANG Feiyun, KONG Lingyu, NIU Lidan, SHI Jinhe</i> .....	(820)
Relationship between the expression of CD147, MMP-2 mRNA and clinical stage and pathological grade in prostate cancer <i>WU Di, DENG Haimei, YAO Ruizhi, CHEN Ming</i> .....	(824)
Changes of serum HDAC1 and DNMT1 levels in patients with non-small cell lung cancer and their clinical significance <i>CHEN Yanhong, MA Li, LI Feng</i> .....	(828)
Clinical significance of peripheral blood T cell subsets and expression of IL-17A and IL-23 in patients with psoriasis vulgaris <i>ZHANG Xiaojing, CHEN Shaofei, LI Shuo, ZHANG Bing</i> .....	(832)
Changes of BUN, Scr and ALb in elderly patients with chronic renal failure after treatment <i>LIU Bo, TU Enling, ZHAO Na, GUO Jing</i> .....	(836)

## REVIEWS

Research progress in $\beta$ -thalassemia modified gene <i>LONG Lan, HE Jing</i> .....	(840)
Status and prospects of quality management elements of high-throughput sequencing in clinical application of hematological malignancies <i>WU Qisheng, WANG Fang, NIE Daijing, ZHOU Xiaosu, CHEN Jiaqi, LIU Hongxing</i> .....	(845)

# 美国FDA批准的伴随诊断试剂临床试验证据的分析与思考

方丽 徐超 李冉 刘容枝 吕允凤\*

近年来,随着生物技术的发展,人们对于疾病的发生机理的认识得到了很大的提高,精准医学的理念应运而生。肿瘤学是精准医学理念最重要的应用领域,主要体现在靶向抗肿瘤药物与相关伴随诊断的临床应用。伴随诊断试剂通过对患者生物样本中的生物标志物来为肿瘤治疗药物的安全和有效使用提供重要信息。同时,在抗肿瘤药物的开发过程中,伴随诊断试剂发挥了巨大的作用,抗肿瘤药物最终是否能够获得成功,极大地依赖于伴随诊断试剂的性能<sup>[1-3]</sup>。长期以来,基于我国与美国医药行业发展的情况,在伴随诊断试剂上市前审评审批方面存在一定差异。笔者通过本文分析伴随诊断试剂目前在美国的审批现状以及所提交的临床证据,以期为我国伴随诊断试剂临床试验证据的提交提供参考。

## 1 美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)关于伴随诊断产品的监管情况

美国是最早提出伴随诊断概念并进行监管的国家。2014年FDA发布了关于伴随诊断产品的指南,其中正式提出伴随诊断的定义<sup>[4]</sup>,明确了伴随诊断产品是能够为相应的治疗性产品安全有效的应用提供关键性信息的体外诊断产品。2016年发布了伴随诊断产品与治疗性产品共同开发的指南草案,针对伴随诊断产品如何与治疗性产品共同开发进行了相应的规定<sup>[5]</sup>。在该草案中指出作为伴随诊断试剂,最好在药物临床试验开展前,试剂的分析性能基本已确定并能够满足药物的要

求。在药物临床试验中伴随诊断试剂为入组人群提供关键性信息,最终药物和试剂同时获得上市批准。2020年4月正式发布了对于同类治疗性产品的伴随诊断试剂说明书更新的指南,对同时伴随同一类治疗性产品的伴随诊断试剂说明书的更新进行了规范<sup>[6]</sup>。伴随诊断产品在美国按照医疗器械管理,基于产品的风险等级,实行510(k)或PMA监管。目前美国FDA所批准的伴随诊断产品中,有2个通过510(k)上市,2个通过人道主义器械豁免(HDE)上市,绝大多数产品通过最为严格的PMA而获批上市<sup>[7]</sup>。

## 2 FDA批准的伴随诊断试剂的概况

1998年,FDA批准了第一个伴随诊断试剂,Dako公司开发的HER2检测试剂。该试剂采用免疫组织化学(IHC)的方法,所伴随的药物为Genentech公司的Herceptin,该药物为针对乳腺癌及胃癌预后判断因子(HER2)检测阳性的乳腺癌患者的靶向药。截至目前,FDA共批准用于伴随诊断的产品44个,其中属于伴随诊断试剂为43个<sup>[7]</sup>。以下从所批准的伴随诊断试剂的检测靶点、方法学、样本类型等方面进行简要分析。

### 2.1 检测靶点

按照检测靶点的类别,可分为基因检测和蛋白检测两大类。基因检测类产品共34个,超过所批准的伴随诊断试剂的四分之三。所检测的基因变异的形式多种多样,包括点突变、缺失、插入、融合等多种形式。蛋白检测类产品共9个,约占所批准伴随诊断试剂的四分之一。所检测的蛋白仅包

作者单位:国家药品监督管理局医疗器械技术审评中心,北京 100081

\*通信作者:吕允凤, E-mail: lvyf@cmde.org.cn

括五个靶蛋白,从最早的HER2、原癌基因 *c-erbB* 的表达产物(EGFR)蛋白,到后来的c-KIT蛋白、间变性大细胞激酶(ALK)、以及近年来的细胞程序死亡配体1(PD-L1)<sup>[7-8]</sup>。其中HER2、EGFR以及ALK既可以在基因水平上的检测,也可以实现在蛋白水平上的检测。

## 2.2 方法学

对于蛋白水平的检测,仅有IHC的方法学进行检测。而对于基因水平的检测,则方法学多种多样,包括荧光原位杂交技术(FISH)、荧光聚合酶链式反应(PCR)、高通量测序(NGS)等。

随着分子生物学技术的快速发展,近年来逐渐批准了几个基于NGS方法学的伴随诊断试剂。2017年11月30日批准的FoundationOne CDx<sup>[9]</sup>、2019年10月23日批准的Myriad myChoice<sup>®</sup> CDx<sup>[10]</sup>、2020年8月7日批准的Guardant360<sup>®</sup> CDx<sup>[11]</sup>以及2020年8月26日批准的FoundationOne<sup>®</sup> Liquid CDx<sup>[12]</sup>均为基于NGS方法学的伴随诊断试剂。上述NGS产品均为多基因检测产品,而不再局限于传统的单靶标的伴随诊断产品,NGS方法基于高通量的优势,可以同时检测多基因的变异,相应的,基于该方法所开发的伴随诊断试剂所声称伴随的靶向药也可能是多个的。

## 2.3 样本类型

43个伴随诊断试剂中,34个产品为检测实体瘤适应症的体细胞突变,其中31个产品的样本类型为石蜡包埋组织(FFPE),2个产品的样本类型同时包括FFPE和血浆,2个产品仅有血浆的样本类型。

2018年8月22日,FDA批准了罗氏的cobas<sup>®</sup> EGFR Mutation Test增加血浆(cfDNA)样本类型的PMA申请。自2019年以来,FDA又批准了三款样本类型为血浆的伴随诊断试剂,分别为2019年5月24日批准的therascreen PIK3CA RGQ PCR Kit、2020年8月7日批准的Guardant360<sup>®</sup> CDx、2020年8月26日批准的FoundationOne<sup>®</sup> Liquid CDx。其中therascreen PIK3CA RGQ PCR Kit同时适用于FFPE和血浆两种样本类型<sup>[7]</sup>。

## 3 FDA批准的伴随诊断试剂所提交的临床试验证据

目前FDA所批准的伴随诊断试剂既有与抗肿瘤

药物共同开发的伴随诊断试剂,也包括抗肿瘤药物上市后开发的伴随诊断试剂。与抗肿瘤药物共同开发的伴随诊断试剂,其临床试验主要为药物临床试验;在抗肿瘤药物上市后开发的伴随诊断试剂,其临床试验可采取桥接试验、一致性研究等多个方法。通过对FDA历年来批准的伴随诊断试剂在申报时所提交的临床证据进行研究,约30%以上采用了药物相关临床试验作为产品临床研究证据,38%的试剂采用了桥接试验的临床试验数据,仅有20%的产品采用了与已批准的伴随诊断试剂进行一致性比对的方式取得了上市许可。以下就三种临床证据的方式作一简介。

### 3.1 药物临床试验

此临床试验证据是伴随诊断试剂所伴随的靶向药的药物临床试验数据,也是伴随诊断试剂证明其指导靶向药的使用最直接的临床证据。

伴随诊断试剂在药物临床试验中的参与主要有两种方式,一种是在药物临床试验开展时并不直接参与适用人群的选择,而是在后期药物疗效的分析中,通过该试剂将人群分为不同的亚组进行药物疗效的分析;另一种方式是在药物临床试验中直接参与适用人群的筛选。具体选择哪一种药物临床试验设计方式则根据所检测靶标的特性以及药物作用机理等因素综合考虑。在FDA批准的伴随诊断试剂中,共13个试剂直接采用药物临床试验的临床证据获批上市,而且试剂与相伴随的靶向药大多同时上市。

### 3.2 桥接试验

桥接试验适用于药物上市后,试剂厂家后续开发的伴随诊断试剂的情形,或药物虽未上市,但伴随诊断试剂在药物临床试验完成后进行申报的。

桥接试验为直接采用药物临床试验中的剩余样本,采用申报试剂与药物临床试验中所采用的实验室方法或已上市伴随诊断试剂分别进行检测,针对两者的检测准确性以及两者所筛选出的适用人群的药物疗效的分析,达到将申报试剂的性能与药物临床试验中所采用的实验室方法或已上市伴随诊断试剂的性能进行桥接的目的<sup>[13-14]</sup>。

在FDA批准的伴随诊断试剂中,共17个试剂采用桥接试验的临床证据获批上市。该临床试验

方式是对于此种情形下最为直接有力的临床证据,但也存在一些弊端,如药物临床试验中的样本由于各种客观原因并不能全部获得等。

### 3.3 一致性比对

相对于以上两种临床试验方式,一致性比对的方式最为简单,但伴随诊断的临床证据力度亦不如以上两种方式。一致性比对是采用申报试剂与已上市伴随诊断试剂进行比较研究的方式。一致性对比仅能评价与已上市伴随诊断试剂检测性能的一致性,无法评价申报试剂在药效评价方面的性能。通过对FDA所批准的伴随诊断试剂的分析,采用一致性比对的方法获得上市的伴随诊断试剂共8个,其中7个为针对成熟靶点HER2的检测试剂,1个为KRAS检测试剂。

此外,2017年批准的FoundationOne CDx,该试剂是采用Meijuan.Li于2016年提出一种针对后续开发的伴随诊断试剂的非劣效检验的试验设计和统计学模型的临床证据而获批上市<sup>[15-17]</sup>。该试剂通过该评价方式所获批的伴随诊断位点亦为相对成熟且临床应用多年的靶点,如EGFR、KRAS、BRAF V600E、HER2、ALK等。

## 4 我国伴随诊断试剂的批准概况

目前我国已有较多针对以上伴随诊断靶点的产品上市,但大多仅验证了其检测某靶标的准确性,并未验证其伴随诊断的用途。近年来逐步批准了以下靶点的伴随诊断试剂,并在产品说明书中明确了伴随诊断的预期用途,主要为针对EGFR的19外显子缺失、L858R、G719X、T790M的产品,针对乳腺癌易感基因(BRCA)批准了一个产品。以上已批准的伴随诊断试剂大多基于NGS方法学,其临床证据主要是为与已上市试剂的比较研究以及回顾性药效观察性研究。

2018年批准了一款人类EGFR突变基因检测试剂盒(多重荧光PCR法),其样本类型为外周血,该产品针对EGFR的T790M提交了药物临床试验证据而获批上市,其余两个位点所提交的临床证据也是回顾性药效观察性研究<sup>[18]</sup>。

## 5 对我国伴随诊断试剂现状的思考

通过上述对美国FDA历年来所批准的伴随诊

断试剂的分析发现,美国FDA批准的伴随诊断试剂除了HER2和EGFR等非常经典的靶点有后续开发的多个产品,其他靶点则以原研的伴随诊断试剂为主,多为试剂与药物共同上市,后续开发的伴随诊断试剂较少,而我国基本均为后续开发的伴随诊断试剂。随着我国生物医药行业的快速发展,后续会逐渐出现越来越多的与药物共同开发的伴随诊断试剂<sup>[19-20]</sup>。对于伴随诊断试剂与药品共同开发共同申报的情况,如何实现医疗器械技术审评与药品技术审评的联合同步审批,是目前急需解决的审评模式上的突破。

从获批的伴随诊断试剂所提交的临床试验证据来看,FDA获批的试剂所提交的临床试验证据大多为药物临床试验或桥接试验,而我国目前基本是与已上市试剂的比较研究以及回顾性药物疗效分析的临床证据。出现该现象的主要原因可能是所伴随的靶向药物目前多为进口药,国内生产的原研靶向药较少,因此对于伴随诊断试剂的企业来说,很难与国外的药企合作来完成药物临床试验或桥接试验。基于目前的国内现状,以及对伴随诊断试剂认识的逐步深入,找到一种适合国内现状的又能充分评价伴随诊断试剂的伴随用途的临床评价路径是目前急需解决的问题。

对于近年来所批准的伴随诊断试剂,无论是我国还是FDA,基于NGS方法学的多基因产品越来越多。对于此类产品中所包含的多级基因突变位点,其临床试验证据应如何要求也是目前审评中所面临的难题。对于有明确的伴随诊断临床意义的基因,申请人应按照伴随诊断试剂的要求提供相应的临床证据。

液体活检技术近年来也越来越多地应用到伴随诊断试剂领域。而液体活检相较于传统的FFPE样本,灵敏度较低,但对于无法进行手术切除的患者又有着显著优势<sup>[21-23]</sup>。但对于KRAS等负性选择的生物标志物,基因野生型的患者可以用药,而检测血液中cfDNA的该基因突变可能会造成一部分突变型患者的漏检,从而导致用药人群的扩大,而该部分人群的药效并没有得到验证。因此对于此类产品的临床试验证据如何要求,以及此类产品的伴随诊断的正确定位,亦是目前行业内所困惑的问题。

针对以上问题,医疗器械监管部门结合我国伴随诊断试剂的发展现状,已制定了《已上市抗肿瘤药物的伴随诊断试剂临床试验指导原则》,并于去年8月份已对外征求意见,将于今年正式发布,该指导原则将针对已有抗肿瘤药物上市而后续开发的伴随诊断试剂注册申报应如何提交临床试验证据进行了指导。同时针对与抗肿瘤药物共同开发的伴随诊断试剂后续亦会出台相应的指导原则,对实现医疗器械技术审评与药品技术审评的联合同步审批的审评模式进行探索。

### 参考文献

- [1] Jorgensen JT. Clinical application of companion diagnostics [J]. Trends Mol Med, 2015,21(7): 405-407.
- [2] Vennapusa B, Manriquez G, Lynch M, et al. The Value of Companion Diagnostics[J]. J Appl Lab Med, 2021,6(2):570-576.
- [3] 马超超,邱玲. 伴随诊断的临床应用:现况与未来[J]. 中华检验医学杂志, 2018,41(10): 784-789.
- [4] U.S. FDA. Guidance for Industry and Food and Drug Administration Staff. In Vitro Companion Diagnostic Devices [EB/OL]. 2014:1-13[2021.4].
- [5] U.S.FDA. Principles for Codevelopment of an In Vitro Companion Diagnostic Device with a Therapeutic Product, Draft Guidance for Industry and Food and Drug Administration Staff [EB/OL]. 2016:1-48[2021.4].
- [6] U.S.FDA. Developing and Labeling In vitro Companion Diagnostic Devices for a Specific Group of Oncology Therapeutic Products, Guidance for Industry [EB/OL]. 2020: 1 - 12 [2021.4].
- [7] U.S.FDA. List of Cleared or Approved Companion Diagnostic Devices (In Vitro and Imaging Tools) [EB/OL], updated to 02/04/2021[2021.4]
- [8] Twomey JD, Zhang B. Cancer Immunotherapy Update: FDA-Approved Checkpoint Inhibitors and Companion Diagnostics [J]. AAPS J, 2021,23(2):39.
- [9] U.S.FDA, Summary of Safety and Effectiveness Data [EB/OL]. 2017:37-54[2021.4].
- [10] U.S.FDA, Summary of Safety and Effectiveness Data [EB/OL]. 2019:27-41[2021.4].
- [11] U.S.FDA, Summary of Safety and Effectiveness Data [EB/OL]. 2020:49-71[2021.4].
- [12] U.S. FDA, Summary of Safety and Effectiveness Data [EB/OL]. 2020:42-53[2021.4].
- [13] Li MJ. Statistical Consideration and Challenges in Bridging Study of Personalized Medicine [J]. J Biopharm Statistics, 2015,25(3): 397-407.
- [14] Bu YQ, Zhou XH. Statistical evaluation of drug efficacy for bridging study in companion diagnostic test trials [J]. J Biopharm Statistics, 2016,17(7): 1-7.
- [15] Li Mj. Statistical Methods for Clinical Validation of Follow-on Companion Diagnostic Devices via an External Concordance Study[J]. Statistics in Biopharm Res, 2016,8(3):355-363.
- [16] 高宇,刘容枝,吕允凤. Follow-on 伴随诊断试剂临床评价方法解析[J]. 中国卫生统计, 2020,37(5):772-775.
- [17] 高宇,吕允凤. 基于高通量测序的伴随诊断试剂临床评价方法及运用[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(7): 982-986.
- [18] 国家药品监督管理局医疗器械技术审评中心,人类 EGFR 突变基因检测试剂盒(多重荧光 PCR 法) [EB/OL]. 2018:13-18[2021.4].
- [19] 刘东来,王佑春,张春涛. 伴随诊断试剂的监管浅析[J]. 中国药事, 2018,32(4): 432-437.
- [20] 张俊琦,周斌. 伴随诊断相关抗肿瘤药物的发展现状[J]. 中国现代应用药学, 2018,35(3): 454-459.
- [21] 邵向阳,徐伟文. 下一代测序(NGS)技术的发展及在肿瘤研究的应用[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2016,8(5):289-296.
- [22] 巢昱清,朱小立,陈桂芳. 肿瘤的液体活检研究进展[J]. 自然杂志, 2020,42(2):108-115.
- [23] 祝小荐,万绍贵. 循环肿瘤 DNA 在肿瘤液体活检中的应用及临床意义[J]. 赣南医学院学报, 2019,39(11):1103-1108.

## 耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌的耐药基因及同源性分析

陈晨 周俊英\* 李一荣 杨京冬

**[摘要]** **目的** 对耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌(CRE)进行耐药基因和同源性分析,了解其流行病学特征,为临床合理使用抗菌药物提供科学依据。**方法** 对本院临床分离的60株CRE进行改良Hodge试验的表型鉴定,并对KPC、IMP、VIM、NDM与OXA-48五种常见的碳青霉烯酶基因进行检测;对17株产KPC酶的肺炎克雷伯菌(CRKP)进行肠杆菌基因间重复序列(ERIC)PCR分析。**结果** 60株CRE菌株中,以肺炎克雷伯菌为主要致病菌,占88.33%(53/60)。产耐碳青霉烯酶基因有58株,其中KPC有50株(86.21%),NDM有9株(15.52%),IMP有2株(3.45%)。扩增出KPC和IMP的菌株有2株(3.45%),扩增出KPC和NDM的菌株有1株(1.72%),未扩增出OXA-48与VIM耐药基因。对ERIC-PCR结果进行聚类分析,结果可聚为三类,其中菌株8和17亲缘关系最近,相关系数最高达到了0.76,菌株14和16相关系数也达到了0.75,这两对菌株表现出较高的同源性。**结论** CRKP整体同源性不强,但某些菌株相关系数较高,CRE的多重耐药将给临床用药带来更大的挑战,应引起医院感染部门的高度重视。

**[关键词]** 耐碳青霉烯酶基因;耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌;耐药性;同源性分析

### Alternative genes and homology analysis of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae

CHEN Chen, ZHOU Junying\*, LI Yirong, YANG Jingdong

(Department of Clinical Laboratory, Zhongnan Hospital, Wuhan, Hubei, China, 430071)

**[ABSTRACT]** **Objective** To investigate the resistance genes and homology of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae to understand their epidemiological characteristics and provide scientific basis for rational clinical use of antibiotics. **Methods** The phenotype identification of the modified Hodge test was carried out on 60 CRE strains isolated from our hospital, and the five common carbapenemase genes *KPC*, *IMP*, *VIM*, *NDM* and *OXA-48* were tested. 17 strains producing KPC enzyme *Klebsiella pneumoniae* (CRKP) was subjected to PCR analysis of Enterobacter intergenic repeat sequence (ERIC). Cluster analysis was applied to analyze their homology. **Results** Among the 60 CRE strains, *Klebsiella pneumoniae* was the main pathogen, accounting for 88.33% (53/60). There are 58 carbapenemase-resistant genes, of which 50 are *KPC* (86.21%), 9 are *NDM* (15.52%), and 2 are *IMP* (3.45%). Two strains (3.45%) of *KPC* and *IMP* were amplified, and one strain (1.72%) of *KPC* and *NDM* were amplified. No *OXA-48* and *VIM* resistance genes were amplified. The cluster analysis of ERIC-PCR results can be grouped into three categories. Among them, strain 8 and 17 have the closest genetic relationship, with the highest correlation coefficient reaching 0.76, and the correlation coefficient of strain 14 and 16 also reaching 0.75. Those two pairs of strains show high homology. **Conclusion** The overall homology of CRKP is not strong, but some strains have high correlation coefficients. The multi-drug resistance of CRE will bring greater challenges to clinical medication, which should attract the attention of hospital infection departments.

**[KEY WORDS]** Carbapenemase gene; Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*; Drug resistance; Homology analysis

基金项目:武汉大学中南医院科技创新培育基金资助项目(WJ2017H0021)

作者单位:武汉大学中南医院检验科,湖北,武汉 430071

\*通信作者:周俊英, E-mail: 1348548858@qq.com

近年来由于抗菌药物的不合理使用,使得临床分离的细菌对抗菌药物的敏感性逐渐降低,给临床抗感染治疗带来困难。目前临床上最受重视的是产超广谱 $\beta$ -内酰胺酶的革兰阴性杆菌,其中以肺炎克雷伯菌、大肠埃希菌等多重耐药的肠杆菌科细菌与人们的生活紧密相关<sup>[1-2]</sup>,碳青霉烯类药物不合理使用导致出现了耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌(Carbapenem resistant Enterobacteriaceae, CRE)<sup>[3-4]</sup>。肠杆菌基因间重复序列(enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence, ERIC)广泛存在于肠道细菌中,长约124~127 bp<sup>[5]</sup>,其中存在高度保守长约40 bp的核心序列,两个重复序列在肠道细菌基因组中存在着属、种、株水平上的分布和拷贝数量的差异,这些重复序列本身在进化过程中具有较强的保守性,ERIC-PCR具有快速、简单、分辨率高和使用设备简单等优点<sup>[6]</sup>,使得它在细菌分类、分子微生物生态学研究中有广阔的应用前景。本研究采取微生物鉴定药敏系统进行CRE的判定,挑选对亚胺培南不敏感的肠杆菌科细菌,改良Hodge实验进行表型筛选,PCR检测CRE菌株的五种常见耐药基因(*KPC*、*VIM*、*IMP*、*NDM*和*OXA*)。选取17株分离自ICU的基因型均为*KPC*的耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌(Carbapenem resistant Enterobacteriaceae *Klebsiella pneumoniae*, CRKP)进行ERIC-PCR和同源性分析,判断重症医学科室内的CRKP菌株是否为同一亚型或同一克隆株,从而了解细菌的流行病学特征。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株来源

通过法国梅里埃 VITEK 2 COMPACT 对本院 2017 年 2 月至 2017 年 11 月间 60 株耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌(CRE)进行鉴定,药敏结果参照 CLSIM100(2017),且改良 Hodge 实验<sup>[7]</sup>初筛结果为阳性;细菌经鉴定后置-40℃恒温冰箱中保存,改良 Hodge 实验以大肠埃希菌 ATCC25922 为质控菌株。

#### 1.1.2 试剂和仪器

美罗培南、亚胺培南、厄他培南由英国 OXOID 公司提供,细菌基因组 DNA 提取试剂盒(离心柱型)DP302, Taq 酶、dNTPs、MgCl<sub>2</sub>、10x buffer (Mg+2 plus/free) DNA 100 bp/DS5000 Marker, 由天根生

化科技(北京)有限公司提供,PCR 引物序列由北京擎科新业生物技术有限公司合成。Bio-Rad 普通 PCR 仪(Bio-Rad 公司/美国), NanoDrop 2000 (Thermo Scientific/美国),电泳仪(PAC3000)和紫外凝胶成像及分析系统仪(Bio-Rad 公司/美国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细菌的选取

选取 60 株 Hodge 实验为阳性的 CRE 菌株,标本的分离培养与鉴定操作依据《全国临床检验操作流程》(第四版)<sup>[8]</sup>进行。

#### 1.2.2 改良 Hodge 实验

以厄他培南为底物纸片进行改良 Hodge 实验,阴性结果再用美罗培南与亚胺培南纸片。以大肠埃希菌 ATCC25922 为阴性对照,若任一药敏纸片被测菌株与大肠埃希菌 ATCC25922 抑菌圈交汇处出现大肠埃希菌生长增强的现象,即可记录为改良 Hodge 实验结果阳性。

#### 1.2.3 细菌 DNA 提取

按照天根细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书进行,实验方法可见天根生化科技(北京)有限公司生产的细菌基因组 DNA 提取试剂盒(离心柱型),DP302 型号说明书。

将 DNA 收集到离心管中,按照 NanoDrop 2000 微量紫外分光光度计中文操作手册检测 DNA 浓度、纯度并记录。并将提取 DNA 作为后续 PCR 反应模板于-40℃冰箱中保存备用。

#### 1.2.4 PCR 引物合成序列

*KPC*、*IMP*、*OXA-48*、*VIM*、*NDM* 5 种 PCR 引物序列见表 1。

表 1 碳青霉烯酶基因所用的 PCR 引物序列

基因	Sequence, 5' → 3'	bp
<i>KPC</i>	F: CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG	798
	R: CTTGTCATCCTTGTTAGGCG	
<i>IMP</i>	F: GGAATAGAGTGGCTTAAAYTCTCC	232
	R: GGTTTAAYAAAACAACCACC	
<i>OXA-48</i>	F: GCGTGGTTAAGGATGAACAC	438
	R: CATCAAGTTCAACCAACCG	
<i>VIM</i>	F: GATGGTGTGTTGGTTCGCATA	390
	R: CGAATGCGCAGCACCAG	
<i>NDM</i>	F: GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC	621
	R: CGGAATGGCTCATCACGATC	

#### 1.2.5 耐药基因扩增

扩增体系: Buffer 2.5  $\mu$ L, Mg<sup>2+</sup> 2.5  $\mu$ L, dNTPs 1  $\mu$ L, 引物 F 和 R 各 1  $\mu$ L, Taq (5 U/ $\mu$ L) 1.5  $\mu$ L,

DNA 2  $\mu\text{L}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  14.5  $\mu\text{L}$ 。IMP 的反应条件为: 94 $^\circ\text{C}$ 变性 10 min; 94 $^\circ\text{C}$  30 s, 55 $^\circ\text{C}$  40 s, 72 $^\circ\text{C}$  50 s, 36 个循环; 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 5 min; KPC 的反应条件为: 94 $^\circ\text{C}$ 变性 10 min; 94 $^\circ\text{C}$  30 s, 56 $^\circ\text{C}$  40 s, 72 $^\circ\text{C}$  50 s, 36 个循环; 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 5 min; OXA、VIM 及 NDM 的反应条件为: 94 $^\circ\text{C}$ 变性 10 min; 94 $^\circ\text{C}$  30 s, 58 $^\circ\text{C}$  40 s, 72 $^\circ\text{C}$  50 s, 36 个循环; 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 5 min。电泳参数为 90 V, 20 min。

1.2.6 肠杆菌基因间重复序列 PCR 与同源性分析  
采用肠杆菌基因间重复一致序列 PCR (Enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR, ERIC-PCR) 进行基因扩增, ERIC-2 单引物序列为 AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG (5'-3')<sup>[9]</sup>。

反应体系: Buffer 2  $\mu\text{L}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  1.25  $\mu\text{L}$ , dNTPs 1.6  $\mu\text{L}$ , 引物 1  $\mu\text{L}$ , Taq (5 U/ $\mu\text{L}$ ) 0.6  $\mu\text{L}$ , DNA 1  $\mu\text{L}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  12.55  $\mu\text{L}$ ; 反应条件为: 94 $^\circ\text{C}$ 变性 5 min; 94 $^\circ\text{C}$  30 s, 44.5 $^\circ\text{C}$  45 s, 72 $^\circ\text{C}$  2 min, 35 个循环; 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 10 min。选取 17 株基因型为 KPC 的耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌 (CRKP) 进行同源性分析, 采用生物信息分析软件 (Bionumerics) 图像分析软件对其进行聚类分析, 判断标准: 按照 Tenover<sup>[10]</sup> 的判断标准, ①图谱完全相同为一个型; ②相差一个带为同一型的不同亚型; ③相差 2~3 个带为紧密相关; ④相差 4~6 个带为可能相关; ⑤相差 7 个以上条带为无亲缘关系。

## 2 结果

### 2.1 细菌的种类与临床分布

60 株 CRE 中包括肺炎克雷伯菌 53 株 (88.33%), 大肠埃希菌 3 株 (5%), 阴沟肠杆菌 3 株 (5%), 弗氏柠檬酸杆菌 1 株 (1.67%); 标本以痰和纤支镜灌洗液为主, 痰和灌洗液分离出 28 株, 构成比为 46.67%, 其次是尿液为 16 株, 构成比为 26.67%, 伤口分泌物和血液为 4 株, 构成比为 6.67%、导管尖端和引流液, 为 3 株, 构成比为 5.00%; 科室分布主要是重症医学科, 为 21 株, 其次新生儿科检出 7 株, 呼吸及危重症医学科检出 8 株, 血液科检出 5 株, 泌尿外科检出 3 株, 其他科室检出 16 株。

### 2.2 不同底物的改良 Hodge 实验结果

以厄他培南 (10  $\mu\text{g}$ /片) 纸片为底物对 60 株 CRE 菌株做改良 Hodge 实验, 检出 57 株厄他培南改良 Hodge 实验阳性株。改良 Hodge 试验结果。见图 1。

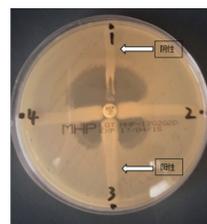


图 1 改良 Hodge 试验结果

Figure 1 Modified Hodge test results

再对剩余 3 株未检测出厄他培南底物纸片改良 Hodge 实验阳性菌株, 分别同时进行亚胺培南与美罗培南改良 Hodge 实验检测, 结果见表 2。

表 2 3 株改良 Hodge 实验阴性的菌株结果

Table 2 Results of 3 strains of modified Hodge negative

细菌类型	科室	hodge 结果	耐药基因型
阴沟亚种	泌尿外科	E(-)I(+)M(+)	NDM
大肠埃希菌	泌尿外科	E(-)I(+)M(-)	NDM
肺炎克雷伯菌	呼吸与危重症 医学科重症病区	E(-)I(+)M(-)	NDM

综合 3 种底物纸片结果, 厄他培南改良 Hodge 实验对产 KPC 型 A 类碳青霉烯酶的菌株阳性率为 100% (50 株/50 株), 33.3% (3 株/9 株) 的产 NDM 型 B 类金属  $\beta$ -内酰胺酶的菌株在厄他培南改良 Hodge 实验中结果为阴性, 但补充亚胺培南与美罗培南改良 Hodge 实验后仍可鉴定为阳性株。

### 2.3 耐药基因扩增结果

60 株 CRE 中有 58 株扩增出相关耐药基因。KPC 有 50 株占 86.21%, NDM 有 9 株占 15.52%, IMP 有 2 株占 3.45%。同时扩增出 KPC 和 IMP 的有 2 株占 3.45%, 同时扩增出 KPC 和 NDM 的有 1 株占 1.72%, 其中 60 株均未扩增出 OXA-48、VIM。见图 2。



注: 1-9 为菌株号。

图 2 五种耐药基因扩增结果

Figure 2 PCR results of five drug-resistant genes

### 2.4 ERIC-PCR 同源性分析

应用 bionumerics 软件进行聚类分析, 结果如图 3 所示。以相关系数 ( $\pm 0.50 \sim \pm 0.80$ ) 为显著相关, 相关系数 ( $\pm 0.80 \sim \pm 1.00$ ) 为高度相关。17 株 CRKP 的扩增结果可聚为 3 类。菌株 14、16、10、

13、17、8可聚为一大类:其中菌株8和17亲缘关系最近,相关系数最高达到了0.76,菌株14和16相关系数达到了0.75,菌株10和16相关系数达到了0.71,这3对菌株表现出较高的同源性;菌株11、15聚为一类:相关系数为0.57,显著相关;菌株2、4、12、1、5、6、3、9、7另聚为一大类:其中菌株1和12相关系数达到0.72,表现出较高的同源性。见图3。

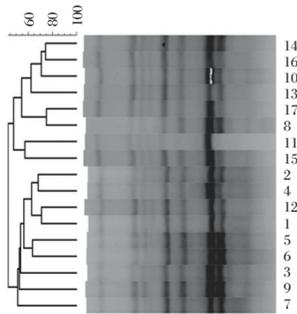


图3 CRKP的同源性分析

Figure 3 Romology analysis of CRKP

### 3 结论

60株CRE菌株中,以肺炎克雷伯菌为主占88.33%;标本类型主要为呼吸道标本(痰及支气管灌洗液)占46.67%,尿液、血液等样本均有分离,这提示可能存在多部位感染;科室以重症监护室为主占35%,广谱抗菌素的使用及支气管镜等侵入性操作是感染CRE的主要高危因素<sup>[11]</sup>,医院应加强院内感染管理工作,通过隔离感染者、对细菌耐药进行网报监管、手卫生、以及加强病区环境与器材的消毒等措施控制院内感染的发生。

CRE的耐药基因型以KPC(86.21%)和NDM(15.52%)为主,这与陆<sup>[12]</sup>等的以KPC和IMP结论有所不同,推测可能与地域有关。本研究发现CRE菌株存在一定的多重耐药基因情况,58株CRE菌株中,有3株同时存在2种耐药基因占5.17%,CRE菌株的多重耐药将给临床用药治疗带来更大困难与风险,临床医生在治疗时应慎重使用抗菌药物。另有两株菌株未检出KPC、NDM、IMP、VIM与OXA这五种基因型中的任何一种,可能属于少见的耐药基因型,有待进一步研究。

自ICU分离的17株CRKP表现出较高的同源性,相关系数最高的2菌株达到0.76,但未见同一克隆株的暴发流行,这提示医院仍要继续加强院内感染的监测与防护,加强医护人员的培训管理,一旦发现患者有耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌感染

或定植,应将患者进行隔离,规范抗菌药物的合理使用,同时对CRKP的流行趋势进行长期监控从而避免多重耐药菌株所产生的“无药可用”的严重后果。

### 参考文献

- [1] Davido B, de Truchis P, Lawrence C, et al. Extended-Spectrum Beta-Lactamase (ESBL)-Producing Escherichia coli versus Klebsiella pneumoniae: Does type of germ really matter? [J]. Infect Control Hosp Epidemiol, 2018, 39(9): 1-2.
- [2] 赵晓杰, 康海全, 姜飞, 等. KPC-2基因和外膜蛋白介导的肺炎克雷伯菌对碳青霉烯类药物耐药机制分析[J]. 中国病原生物学杂志, 2015, 10(3): 211-214+219.
- [3] Gheitani L, Fazeli H, Moghim S, et al. Frequency Determination of Carbapenem - Resistant Klebsiella Pneumoniae (CRKP) Isolated from hospitals in Isfahan of Iran and Evaluation of Synergistic Effect of Colistin and Meropenem on them [J]. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2018, 64(1): 70-74.
- [4] Castanheira M, Davis AP, Mendes RE, et al. In Vitro Activity of Plazomicin against Gram-Negative and Gram-Positive Isolates Collected from U.S. Hospitals and Comparative Activities of Aminoglycosides against Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae and Isolates Carrying Carbapenemase Genes [J]. Ant Agents Chemother, 2018, 62(8): e00313-318.
- [5] Bakhshi B, Afshari N, Fallah F. Enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)-PCR analysis as a reliable evidence for suspected Shigella spp. outbreaks [J]. Braz J Microbiol, 2018, 49(3): 529-533.
- [6] 黄秀梅, 张倩, 盖文燕, 等. 山东地区屠宰场猪肉污染沙门氏菌菌株毒力基因筛查与ERIC-PCR分型[J]. 中国人畜共患病学报, 2018, 34(8): 697-702.
- [7] Ansari M, Munir T, Saad N. Phenotypic Identification, Frequency Distribution and Antibiogram of Carbapenemase Producing Enterobacteriaceae in Clinical Isolates [J]. J Coll Physicians Surg Pak, 2018, 28(4): 274-278.
- [8] 尚红, 王毓三, 申子瑜. 《全国临床检验操作流程》(第四版)[M]. 北京, 人民卫生出版社, 2015.
- [9] 李睿, 辛力华, 张青, 等. 碳青霉烯类耐药肺炎克雷伯菌ERIC-PCR指纹图谱分型的研究[J]. 解放军医药杂志, 2018, 30(11): 102-105.
- [10] Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing [J]. J Clin Microbiol, 1995, 33(9): 2233-2239.
- [11] 周静芳, 凌勇, 刘伟江, 等. 耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌的感染特征和危险因素分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2017, 1(1): 16-19.
- [12] 陆红云, 毛巧霞, 张连生, 等. 耐碳青霉烯类肠杆菌的耐药机制及基因分型分析[J]. 江苏医药, 2018, 44(2): 210-212.

# 近红外诱导 PLGA 纳米粒子用于 US/MR 成像和乳腺癌治疗

左凤梅 卢佳慧 刘雅文 倪晨 时梅林 胡俊峰\*

**[摘要]** **目的** 报告近红外激光诱导的超声/磁共振成像协同光热治疗乳腺癌的纳米微球 PFP/MnCl<sub>2</sub>/ICG@PLGA NPs (PMINPs)。**方法** 采用双乳包埋法将氯化锰(MnCl<sub>2</sub>)、全氟戊烷(PFP)、吲哚菁绿(ICG)包埋在聚乳酸-羟基乙酸(PLGA)壳膜中。**结果** PMINPs 具有明显的核/壳结构,粒径均匀,分散性好。粒径大小为(211.10±2.66) nm,电位为(-17.50±0.65) mV。通过紫外-可见-近红外分光光度计测得 ICG 包封率为(76.38±0.32)%。当被近红外激光照射时,ICG 可以将光转化为热,产生的热量通过 PTT 效应对肿瘤产生良好的杀伤效果。这一过程还可以进一步触发 PMINPs 中磁共振造影剂 MnCl<sub>2</sub> 的释放和超声造影剂 PFP 的液气相变。**结论** 近红外激光诱导的多功能纳米粒子 PMINPs 在超声/磁共振成像和乳腺癌治疗方面具有巨大的潜力。

**[关键词]** 超声/磁共振成像; 近红外激光; 相变纳米粒子; 光热治疗

## Near-infrared triggered PLGA nanoparticles for US/MR imaging and breast cancer therapy

ZUO Fengmei, LU Jiahui, LIU Yawen, NI Chen, SHI Meilin, HU Junfeng\*

(School of Medical Imaging, Xuzhou Medical University, Xuzhou, Jiangsu, China, 221006)

**[ABSTRACT]** **Objective** At present, cancer diagnosis or treatment based on nano-medicine has problems such as fast circulation clearance and limited efficacy. Here, we report a near-infrared laser-induced ultrasound/magnetic resonance imaging combined with photothermal treatment of breast cancer nanospheres PFP/MnCl<sub>2</sub>/ICG@PLGA NPs (PMINPs). **Methods** Manganese (II) chloride (MnCl<sub>2</sub>), Perfluoropentane (PFP) and Indocyanine green (ICG) were embedded in the poly(lactic-co-glycolic) acid (PLGA) shell membrane via a double emulsion approach. **Results** The obtained PMINPs have an obvious core/shell structure, uniform particle size, and good dispersibility. The particle size is (211.10±2.66) nm, and the potential is (-17.50±0.65) mV. The ICG encapsulation rate measured by ultraviolet-visible-near-infrared spectrophotometer is (76.38±0.32)%. When irradiated by a near-infrared laser, ICG can convert light into heat. The heat generated has a good killing effect on tumors through the PTT effect. This process can further trigger the release of the magnetic resonance contrast agent MnCl<sub>2</sub> in the PMINPs and the liquid-to-gas phase change of the ultrasound contrast agent PFP. **Conclusion** Near-infrared laser-induced multifunctional nanoparticles PMINPs have great potential in ultrasound/magnetic resonance imaging and breast cancer treatment.

**[KEY WORDS]** US/MR imaging; Near infrared laser; Phase-shifted nanoparticles; Photothermal therapy

基金项目:国家自然科学基金青年项目(81602533);江苏省高校自然科学研究计划项目(16KJB310019);徐州市科技创新专项项目(KC16SY153);江苏省研究生科研与实践创新计划项目(KYCX18\_2194);江苏省研究生科研与实践创新计划项目(KYCX19\_2222)

作者单位:徐州医科大学医学影像学院,江苏,徐州 221004

\*通信作者:胡俊峰, E-mail: hujf098@yahoo.com.cn

近年来,以多功能纳米颗粒为基础,将诊断与治疗整合为一个系统,可以提高临床疗效,减少治疗的副作用,为癌症的精确诊疗提供了新的思路<sup>[1-3]</sup>。目前,乳腺癌的治疗包括手术切除、化疗、放疗等<sup>[4-6]</sup>。然而,这些方法也会对健康组织造成严重损害。因此,一种新型的肿瘤治疗方法-光热疗法(Photothermal therapy, PTT)被提出<sup>[7]</sup>。PTT疗法是利用光敏剂将光转化为热,在激发光照射下,肿瘤部分迅速升温杀伤肿瘤细胞<sup>[8]</sup>。本研究使用吲哚菁绿(Indocyanine green, ICG)作为光敏剂,ICG是一种近红外荧光染料,在激光照射后具有良好的光热转换效率和较高的生物安全性,但游离情况下稳定性差,血液循环寿命短。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要仪器与试剂

透射电子显微镜(Tecnai G2 F20,美国),马尔文粒径分析仪(Nano ZS90,英国),紫外分光光度计(Uvmini-1240,日本),808激光仪(MDL-N-808-8W,中国),多功能酶标仪(Biotek,美国),超声波破碎仪(JY92-IIDN,中国),超声成像仪(Philip,荷兰),荧光倒置显微镜(DMI3000B,美国),3.0T磁共振成像设备(GE Discovery 750w,美国);聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA,分子量10 000,聚合比50:50,Evonik,德国),氯化锰(Manganese (II) chloride, MnCl<sub>2</sub>,北陆药业,中国),全氟戊烷(Perfluoropentane, PFP,阿拉丁,中国),吲哚菁绿(ICG,麦克林,中国),聚乙烯醇(PVA, Sigma,美国);MDA-MB-231, NIH-3T3细胞株(中科院上海细胞库,中国),细胞计数试剂盒(CCK-8,美仑,中国)。

### 1.2 PMINPs 的制备

将100 mg的PLGA加入4 mL的二氯甲烷,待充分溶解后加入200  $\mu$ L的PFP,2 mg ICG,200  $\mu$ L MnCl<sub>2</sub>冰浴下超声破碎2 min分钟(100 W),得到的初乳液缓慢滴入20 mL 2%PVA溶液,超声破碎5 min(50 W)制成复乳,冰浴下搅拌8 h挥发二氯甲烷,转速10 000 r/min洗涤离心,重复三次后冻干备用,制备全程避光低温。

### 1.3 PMINPs 一般性质检测

使用透射电子显微镜观察材料的形貌和结构;使用马尔文粒径仪分析PMINPs的粒径大小、PDI及电位。采用紫外分光光度法计算ICG的标准曲线,根据标准曲线来计算PMINPs中ICG的包封率。

### 1.4 细胞毒性检测和 PMINPs 的摄入

MDA-MB-231和NIH-3T3细胞在96孔板中孵育,37 $^{\circ}$ C条件下,每孔培养 $1 \times 10^4$ 个细胞,孵育12 h。实验组每孔加入100  $\mu$ L含有不同浓度PMINPs的培养基。孵育6 h,采用细胞计数试剂盒(CCK-8)检测PMINPs的细胞毒性。将荧光标记物香豆素-6装入PMINPs中,细胞孵育1、2、3 h后,采用DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole)对细胞核进行染色,制片后使用倒置荧光显微镜进行观察。

### 1.5 光热性能检测

给予808 nm激光辐照(1.5 w/cm<sup>2</sup>, 5 min),用红外热成像仪记录各组温度变化。随后游离的ICG和PMINPs根据ICG浓度配制成25  $\mu$ g/mL的溶液,取100  $\mu$ L置于96孔板中,由808 nm激光开关循环辐照重复4次(开1 min,关2 min),用红外热成像仪记录各组温度变化。

取对数生长期的MDA-MB-231细胞与材料孵育6 h后分组处理,用CCK-8评价各组的细胞毒性。材料与细胞孵育6 h后处理四个分组,激光照射后分别用钙黄绿素-AM(Calcein-AM)和碘化丙啶(PI)处理细胞,采用活死细胞染色法定性考察光热效果。

### 1.6 超声/磁共振双模成像

#### 1.6.1 超声(Ultrasound, US)

显微镜下观察激光照射(1.5 w/cm<sup>2</sup>)下PMINPs的变化。将软管浸入水中,采用808激光照射(1.5 w/cm<sup>2</sup>),使用超声成像仪观察是否成像。

#### 1.6.2 磁共振(Magnetic Resonance, MR)

在3.0 T Discovery 750 W MR系统上对PMINPs进行T1加权成像研究。用自旋回波序列对稀释后的样品进行MRI扫描。此外,利用MDA-MB-231细胞的体外MR成像试验评价其对乳腺癌细胞的磁共振成像能力。MDA-MB-231细胞与不同浓度PMINPs孵育6 h。将细胞消化离心收集并用PBS洗涤,使用前面描述的磁共振成像系统进行磁共振成像。磁共振扫描参数:重复时间=16 ms,回波时间=3.2 ms,视野=8 cm $\times$ 8 cm,层厚=0.4 mm,层间距=0.5 mm,矩阵=320 $\times$ 288。

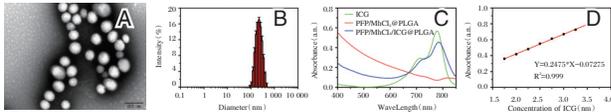
### 1.7 统计学分析

采用IBM SPSS Statistics 24软件处理分析数据,计量资料以( $\bar{x} \pm s$ )形式表示,采用t检验和单因素方差分析,以P<0.05表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 PMINPs 一般性质

所制备的纳米粒子具有明显的核/壳结构,粒径均匀,分散性强(图1A)。如图1B所示,PMINPs的尺寸为 $(211.10 \pm 2.66)$  nm, PDI为0.12。Zeta电位为 $(-17.50 \pm 0.65)$  mV。图1C中可以看出, PFP/MnCl<sub>2</sub>@PLGA NPs的吸收光谱没有明显的吸收峰,而自由ICG的吸收光谱在770~790 nm左右达到峰值。PMINPs的吸收光谱在790~810 nm处出现峰值通过紫外吸收光谱确定ICG标准曲线为 $y=0.2475x-0.0725$  ( $r=0.999$ ) (图1D)。在此基础上计算ICG的平均包封率为 $(76.38 \pm 0.32)\%$ ,平均载药量为 $(6.99 \pm 3.98)\%$ 。



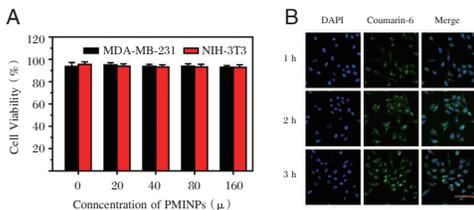
注:A为PMINPs透射电子显微镜下表现;B为PMINPs粒径分布;C为PMINPs紫外/可见光/近红外吸收光谱;D为ICG标准曲线。

图1 PMINPs 的表征

Figure 1 Characterizations of PMINPs

### 2.2 细胞毒性检测和摄入

CCK-8试验结果显示当浓度到达160 μg/mL时,PMINPs对MDA-MB-231和NIH-3T3细胞均无明显细胞毒性,不同浓度吸光度值差异无统计学意义,且细胞活力都在90%以上(图2A)。从图2B中可以看出,随着时间的推移,MDA-MB-231细胞中出现代表PMINPs的绿色荧光且随着时间的增加而变量。



注:A为不同细胞与不同浓度PMINPs孵育后进行细胞毒性测试( $n=6$ );B为MDA-MB-231细胞对PMINPs的摄入( $\times 20$ )。

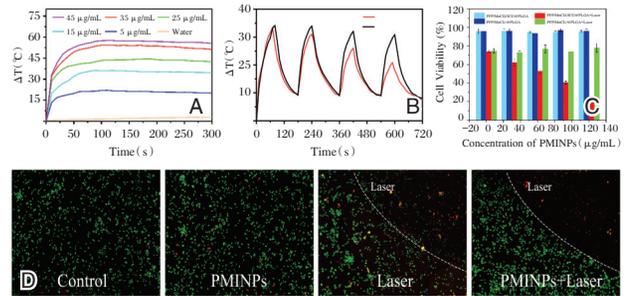
图2 PMINPs 的体外细胞毒性和细胞摄取

Figure 2 In vitro cytotoxicity and cellular uptake of PMINPs

### 2.3 光热性能检测

经过808 nm激光辐照后,PMINPs升温显著,与ICG的浓度呈正相关(图3A)。经过4个激光开-关循环后,PMINPs仍可以较稳定的产热,升温峰值只降低了3.3℃,而游离ICG产热能力则明显下降(图3B)。

如图3C所示,不同浓度的PMINPs在没有激光照射的情况下细胞活性没有明显下降。在近红外激光照射下,随着PMINPs浓度的增加,癌细胞的消融作用增强。对于PFP/MnCl<sub>2</sub>@PLGA NPs,由于光敏剂ICG的缺乏,激光照射后的加热效果不明显,对肿瘤细胞的损伤也很难观察到。如图3D所示,仅激光照射,PMINPs处理对细胞无明显杀伤作用。



注:A为PMINPs的光热加热曲线;B为游离ICG与PMINPs稳定性(1.5 w/cm<sup>2</sup>);C为PTT治疗肿瘤;D为PMINPs介导的PTT治疗肿瘤图。

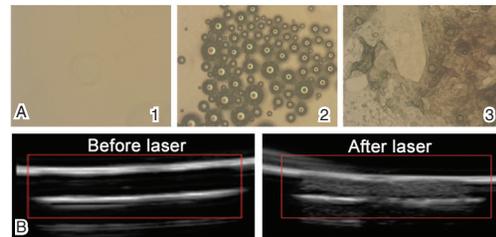
图3 PMINPs 光热性能检测

Figure 3 PMINPs photothermal performance test

### 2.4 超声/磁共振双模成像

#### 2.4.1 超声

随着辐照时间的延长,微泡膨胀到一定体积后开始破裂(图4A)。相应的,在808 nm近红外激光照射前,透明塑胶软管中PMINPs的超声成像效果没有增强。当激光照射后,PFP气化,产生气泡,并发生明显的超声成像增强(图4B)。



注:A为显微镜下激光照射前后PMINPs的变化(1.5w/cm<sup>2</sup>);图中1表示照射前,2表示照射中,3表示照射后。B为塑胶软管内激光照射前后PMINPs的超声成像效果(1.5w/cm<sup>2</sup>)

图4 超声成像

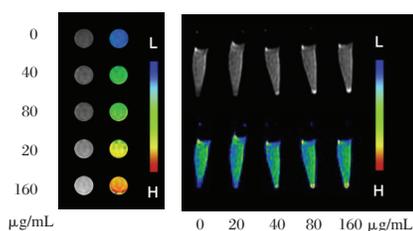
Figure 4 US imaging

#### 2.4.2 磁共振

PMINPs的磁共振信号强度随着Mn浓度的增加而增强,见图5A。PMINPs在细胞中具有很好的磁共振成像能力,并且是浓度依赖性的,见图5B。

## 3 讨论

根据已有研究可知,锰离子可以增强T1信



注: A 为不同 Mn 浓度 PMINPs 的磁共振成像及伪彩图; B 为 MDA-MB-231 细胞孵育不同 Mn 浓度 PMINPs 后的磁共振成像及伪彩图。

图5 磁共振成像

Figure 5 MR imaging

号,能显著提高病灶与周围良性组织的对比度。本研究中选用  $MnCl_2$  作为磁共振造影剂。制备的纳米粒子将  $MnCl_2$  包裹在内,由于  $MnCl_2$  将会随着纳米载体在机体血液及组织内流通循环,会大大提高其在机体内的循环时间,从而给磁共振成像诊断提供充足的时间。磁共振成像是一种具有精细软组织对比和多平面成像能力的无创成像工具,但通常需要较长的采集时间,不能提供实时图像<sup>[9]</sup>。相比之下,超声可以提供实时图像,但在组织识别方面能力与磁共振相比略差<sup>[10]</sup>。在许多临床应用中,超声和磁共振是互补的,以区别可能的病理改变组织<sup>[11]</sup>。已有许多前人开发了相应造影剂,可以达到超声/磁共振共同成像的目的<sup>[12-13]</sup>。在这项工作中,笔者用了第三代造影剂全氟戊烷,在室温下以液体形式存在,而在注射进入人体以后,当达到相变温度,发生液气相变变为气态,达到超声显影增强目的<sup>[14]</sup>。

所研制的纳米粒子具有粒径适宜、稳定性高的特点。粒径在 200 nm 左右的 PMINPs 可通过实体瘤的高通透性和滞留效应在肿瘤部位富集。因此,在近红外激光照射下,富集在肿瘤部位的光敏剂 ICG 迅速升温杀伤肿瘤而对正常组织的杀伤作用较小。重要的是,由于温度迅速上升,PF6 转变为气泡增强超声成像。同时,纳米颗粒释放出  $MnCl_2$ , 其体积小,可以更好地穿透肿瘤,获得更均匀的磁共振成像结果。通过一系列的表征,证实 PMINPs 具有良好的肿瘤吸收能力,可用于乳腺癌超声/磁共振双模成像及治疗。在以后的研究工作中,还有以下几个方面的工作需要完善:可尝试在纳米微球表面修饰靶向物如适配体,叶酸等,增加其靶向性;进一步研究纳米微球在动物体内的成像与治疗效果等,为临床应用奠定试验基础。

## 参考文献

- [1] Li LL, Xing H, Zhang JJ, et al. Functional DNA molecules enable selective and stimuli-responsive nanoparticles for biomedical applications [J]. *Acc. Chem. Res.*, 2019, 52(9): 2415-2426.
- [2] Wu B, Lu ST, Yu H, et al. Gadolinium-chelate functionalized bismuth nanotheranostic agent for in vivo MRI/CT/PAI imaging-guided photothermal cancer therapy [J]. *Biomaterials*, 2018, 159:37-47.
- [3] Chen Q, Chen JW, Yang ZJ, et al. Nanoparticle-enhanced radiotherapy to trigger robust cancer immunotherapy. *Advanced materials*[J]. 2019, 31(10):1802228.
- [4] Crawford LJ, Walker B, Irvine AE. Proteasome inhibitors in cancer therapy[J]. *J cell commun Signal*, 5(2):101-110.
- [5] Liu X, Xie Z, Shi W, et al. Polynorepinephrine nanoparticles: a novel photothermal nanoagent for chemo-photothermal cancer therapy[J]. *ACS Appl Mater Interf*, 2019, 11(22).
- [6] Wang C, Chen SQ, Wang YX, et al. Lipase-triggered water-responsive "Pandora's box" for cancer therapy: toward induced neighboring effect and enhanced drug penetration [J]. *Advanced Mater*, 2018, 30(14):1706407.
- [7] Liu J, Zheng JX, Nie HF, et al. Molybdenum disulfide-based hyaluronic acid-guided multifunctional theranostic nanoplateform for magnetic resonance imaging and synergetic chemo-photothermal therapy [J]. *Colloid Interf Sci*, 2019, 548:131-144.
- [8] Cao Y, Meng XD, Wang DD, et al. Intelligent  $MnO_2/Cu_2-xS$  for multimode imaging diagnostic and advanced single-laser irradiated photothermal/photodynamic therapy [J]. *ACS Applied Mater Interf*, 2018, 10(21):17732-17741.
- [9] Al-Hattali S, Vinnicombe SJ, Gowdh NM et al. Breast MRI and tumour biology predict axillary lymph node response to neoadjuvant chemotherapy for breast cancer [J]. *Cancer Imaging*, 2019, 19(1):91.
- [10] Chen SN, Liu YJ, Zhu SY et al. Dual-mode imaging and therapeutic effects of drug-loaded phase-transition nanoparticles combined with near-infrared laser and low-intensity ultrasound on ovarian cancer [J]. *Drug delivery*, 2018, 25(1): 1683-1693.
- [11] Kim YJ, Huh JS, Park KK: Effectiveness of bi-Parametric MR/US fusion b for detecting clinically significant prostate cancer in prostate biopsy naive men [J]. *Yonsei Med, J* 2019, 60(4):346-351.
- [12] Dong Q, Yang H, Wan C, et al. Her2-functionalized gold-nanoshelled magnetic hybrid nanoparticles: a theranostic agent for dual-modal imaging and photothermal therapy of breast cancer [J]. *Nanoscale Res Lett*, 2019, 14(1):235.
- [13] Sun JZ, Sun YC, Sun L. Synthesis of surface modified  $Fe_3O_4$  super paramagnetic nanoparticles for ultra sound examination and magnetic resonance imaging for cancer treatment [J]. *J Photochem Photobiol B. Biology*, 2019, 197:111547.
- [14] Gao M, Liang C, Song XJ, et al. Erythrocyte-membrane-enveloped perfluorocarbon as nanoscale artificial red blood cells to relieve tumor hypoxia and enhance cancer radiotherapy [J]. *Adv Mater*, 2017, 29(35):1701429.

# PCT、乳酸清除率及CRP与食管癌术后肺炎并ARDS预后关系

黄英明 邹龙涛 袁小锦 江雯妍 黎坚向 何伊里 谢显龙\*

**[摘要]** 目的 分析降钙素原(PCT)、乳酸清除率及C反应蛋白(CRP)与食管癌术后肺炎合并急性呼吸窘迫综合征(ARDS)患者预后的相关性。方法 选取2015年1月至2019年8月本院接收的689例食管癌术后患者,其中发生肺炎者200例(A组),未发生肺炎者489例(B组)。A组中合并ARDS者86例(A1组),未合并ARDS者114例(A2组)。根据病历资料中的生存死亡情况,将A1组分为死亡组( $n=34$ )和生存组( $n=52$ ),选取同时期680例接受健康体检结果正常者为C组。比较各间PCT、乳酸清除率及CRP水平差异,采用Logistic分析影响患者预后的独立危险因素。结果 A、B、C三组PCT、CRP水平比较:A组>B组>C组,24 h乳酸清除率比较:A组<B组<C组,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。A1组PCT及CRP水平高于A2组,24 h乳酸清除率低于A2组,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。生存组呼吸 $\geq 30$ 次/min、心率 $\geq 100$ 次/min、氧合指数 $< 150$  mmHg、呼吸困难病程 $\geq 12$  h、合并多器官功能障碍综合征者及开放式手术者较死亡组少,PCT、CRP较死亡组低,24 h乳酸清除率较死亡组高,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。氧合指数、呼吸困难病程、合并多器官功能障碍综合征、手术方式、PCT、CRP及24 h乳酸清除率为影响食管癌术后肺炎合并ARDS患者预后的独立危险因素( $P<0.05$ )。结论 PCT、CRP、24 h乳酸清除率三者异常表达是食管癌术后肺炎合并ARDS患者预后生存的独立危险因素,对患者的生存评估具有一定的临床价值。

**[关键词]** PCT; 乳酸清除率; CRP; 食管癌; ARDS

## Relationship between PCT, lactate clearance, CRP and prognosis of postoperative pneumonia of esophageal cancer and ARDS

HUANG Yingming, ZOU Longtao, YUAN Xiaojin, JIANG Wenyan, LI Jianxiang, HE Yili, XIE Xianlong\*  
(Department of Critical Care Medicine, Guangxi Medical University Cancer Hospital, Nanning, Guangxi, China, 530021)

**[ABSTRACT]** **Objective** To analyze the correlation between the levels of procalcitonin (PCT), lactate clearance rate and C-reactive protein (CRP) and the prognosis of patients with postoperative pneumonia combined with acute respiratory distress syndrome (ARDS) after surgery for esophageal cancer. **Method** 689 postoperative patients with esophageal cancer treated in this hospital from January 2015 to August 2019 were selected, including 200 cases with pneumonia (group A) and 489 cases without pneumonia (group B). In group A, 86 cases had ARDS (group A1), and 114 cases had no ARDS (group A2). According to the survival and death of patients in the medical records, the A1 group was divided into the death group ( $n=34$ ) and the survival group ( $n=52$ ). 680 people who had normal result of physical examination in the same period were regarded as the group C. The differences in PCT, lactate clearance and CRP levels were compared, and the independent risk factors affecting the prognosis of patients were analyzed by Logistic. **Result** The levels of PCT and CRP in group A, B and C were as follows: group A>group B>group C, the 24h lactic acid

基金项目:广西卫计委自筹经费科研课题(Z2015582)

作者单位:广西医科大学附属肿瘤医院重症医学科,广西,南宁 530021

\*通信作者:谢显龙, E-mail: xianlong-gxmu@163.com

clearance rate is as follows: group A < group B < group C, and the differences were statistically significant ( $P < 0.05$ ). The PCT and CRP levels in the A1 group was higher than that in the A2 group, and the 24 h lactate clearance rate was lower than that in the A2 group, and the differences were statistically significant ( $P < 0.05$ ). The survival group had fewer patients with breathings  $\geq 30$  breaths/min, heart rate  $\geq 100$  beats/min, oxygenation index  $< 150$  mmHg, dyspnea course  $\geq 12$  h, multiple organ dysfunction syndrome and open surgery than in the death group. PCT and CRP were lower than those in the death group, and the 24 h lactate clearance rate was higher than that in the death group, and the differences were statistically significant ( $P < 0.05$ ). Oxygenation index, duration of dyspnea, multiple organ dysfunction syndrome, surgical methods, PCT, CRP, and 24 h lactate clearance were independent risk factors that affect the prognosis of patients with postoperative pneumonia combined with ARDS after surgery for esophageal cancer ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** PCT, lactate clearance, and CRP of the three is an independent risk factor for the prognosis of patients with postoperative pneumonia and ARDS after esophageal cancer. It has certain clinical value for the patient's survival assessment.

**[KEY WORDS]** PCT; Lactic acid clearance rate; CRP; Esophageal cancer; ARDS

手术后肺炎是指术后肺通气不足,膈肌活动差,咳嗽反射受损或抑制,支气管痉挛和脱水,引起支气管分泌物滞留而导致的肺段不张<sup>[1]</sup>。食管癌术后肺炎严重者可并发急性呼吸窘迫综合征(Acute Respiratory Distress Syndrome, ARDS),严重威胁其生命安全<sup>[2]</sup>。及时评估食管癌术后肺炎合并 ARDS 患者病情发展情况,对改善患者预后具有重要意义。降钙素原(Procalcitonin, PCT)在危重感染病情评估具有重要意义,已成为公认的诊断感染性休克的有效生物学标志物<sup>[3]</sup>。乳酸是细胞发生无氧代谢时的产物,被作为判断危重症患者无氧代谢和组织灌注的敏感指标<sup>[4]</sup>。本研究就 PCT、乳酸清除率及 C 反应蛋白(C-reactive protein, CRP)对食管癌术后肺炎合并 ARDS 患者预后的预测进行研究,现报道如下。

## 1 一般资料

### 1.1 资料与方法

选取 2015 年 1 月至 2019 年 8 月本院接收的 694 例食管癌术后患者临床资料,纳入标准:①满足食管癌诊断标准<sup>[5]</sup>,年龄在 18 岁以上;②临床资料完整者;排除标准:①入组前 3 月内有抗生素、糖皮质激素、免疫抑制剂等药物使用史者;②合并慢性阻塞性肺疾病、肺结核等肺部疾病者;③合并除食管癌以外的恶性肿瘤疾病者。根据纳入排除标准,最终纳入 689 例,男 457 例,女 232 例;平均年龄( $52.36 \pm 4.97$ )岁。根据肺炎诊断标准<sup>[6]</sup>分为 A 组(发生肺炎者  $n=200$ )和 B 组(未发生肺炎者,  $n=489$ )。A 组中合并 ARDS 者 86 例(A1 组),未合并 ARDS 者 114 例(A2 组)。根据病历资料中的生存及死亡情况,将 A1 组

分为死亡组( $n=34$ )和生存组( $n=52$ )。选取 680 例同期于本院接受健康体检结果正常者且临床资料完整者作为 C 组,其中男 360 例,女 320 例;平均年龄( $53.41 \pm 5.01$ )岁。A、B 及 C 组间一般资料比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),具有可比性。

### 1.2 检测方法

#### 1.2.1 PCT、CRP 检测

收集所有研究对象入组后清晨空腹血 5 mL,离心( $3\ 500$  r/min, 5 min,  $r=8$  cm)后取分离血清,置于罗氏 E411 全自动电化学发光分析仪中检测 PCT 水平。通过酶联免疫吸附法(Enzyme Linked Immune Sorbent Assay, ELISA)法测定各组 CRP 浓度,由北京美康生物技术研究中心有限责任公司提供检测所用的试剂,根据 ELISA 试剂盒说明书步骤操作。正常值范围:PCT  $\leq 0.05$  ng/mL, CRP:  $0.068 \sim 8.2$  mg/L<sup>[7]</sup>。

#### 1.2.2 早期乳酸清除率检测

所有受试者分别于入组时及入组 24 h 时,采用 GEM Premier 3000 仪器检测动脉血乳酸水平,并计算 24 h 乳酸清除率,24 h 乳酸清除率=(初始血乳酸值-24 h 后血乳酸值)/初始血乳酸值  $\times 100\%$ <sup>[8]</sup>。以 24 h 乳酸清除率为 10% 为界限,清除率  $\geq 10\%$  为高清除率,清除率  $< 10\%$  为低清除率<sup>[9]</sup>。

### 1.3 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  $\chi^2$  检验,计量资料以  $(\bar{x} \pm s)$  表示,组间比较行  $t$  检验,多组间比较行  $F$  检验;采用多元 Logistic 回归分析影响分析影响食管癌术后肺炎合并 ARDS 患者预后的独立危险因素,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 A、B及C组间PCT、乳酸清除率及CRP水平比较

三组PCT、CRP水平比较:A组>B组>C组,24h乳酸清除率比较:A组<B组<C组,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。见表1。

表1 A、B、C组间PCT、乳酸清除率及CRP水平比较( $\bar{x}\pm s$ )  
Table 1 comparison of PCT, lactate clearance rate and CRP levels among A, B, C group ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	PCT(ng/mL)	CRP(mg/L)	24h乳酸清除率(%)
A组	190	9.35±1.67	45.69±4.28	1.33±0.65
B组	489	7.81±1.52	33.21±3.52	4.87±2.31
C组	680	1.52±0.43	5.87±1.33	6.12±2.15
F值	-	5968.77	21795.61	398.28
P值	-	<0.001	<0.001	<0.001

### 2.2 A1、A2组PCT、乳酸清除率及CRP水平比较

A1组PCT及CRP水平比高于A2组,24h乳酸清除率低于A2组,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。见表2。

### 2.3 影响分析影响食管癌术后肺炎合并ARDS患者预后的单因素分析

生存组呼吸 $\geq 30$ 次/min、心率 $\geq 100$ 次/min、氧合指数 $<150$  mmHg、呼吸困难病程 $\geq 12$  h、合并多器官功能障碍综合征者及开放式手术者较死亡组少,PCT、CRP较死亡组低,24h乳酸清除率较死亡

表2 A1、A2组PCT、乳酸清除率及CRP水平比较( $\bar{x}\pm s$ )

Table 2 Comparison of PCT, lactate clearance rate and CRP levels between A1, A2 group ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	PCT(ng/mL)	CRP(mg/L)	24h乳酸清除率(%)
A1组	86	9.86±1.33	47.31±4.52	7.31±1.59
A2组	114	8.92±1.25	43.15±4.36	6.20±1.47
t值	-	5.122	6.576	5.104
P值	-	0.001	<0.001	0.001

组高,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。见表3。

### 2.4 影响分析影响食管癌术后肺炎合并ARDS患者预后的多因素分析

氧合指数( $<150$ )、呼吸困难病程( $\geq 12$  h)、合并多器官功能障碍综合征、手术方式(开放式手术)、PCT(异常)、CRP(异常)及24h乳酸清除率(低)为影响食管癌术后肺炎合并ARDS患者预后的独立危险因素( $P<0.05$ )。见表4。

## 3 讨论

研究显示,食管癌术后肺炎合并ARDS患者的预后相对较差,且此种情况具有较高的致死率<sup>[10]</sup>,因此对此类患者进行预后状态及其高危因素的研究是改善预后的必要基础与前提。

既往文献提出,患者一般状况、手术创伤、围术期管理及术后并发症等均可诱发食管癌术后肺炎合并ARDS的发生,并影响患者预后<sup>[11]</sup>。本研究结果显示:PCT(异常)、CRP(异常)及24h乳酸清

表3 影响分析影响食管癌术后肺炎合并ARDS患者预后的单因素分析

Table 3 single factor analysis of influencing factors on prognosis of patients with pneumonia and ARDS after esophageal cancer surgery

因素		例数(n=86)	生存组(n=52)	死亡组(n=34)	$\chi^2/t$ 值	P值
年龄(岁)	>60	34	21(40.38)	13(38.24)	0.040	0.842
	$\leq 60$	52	31(59.62)	21(61.76)		
性别	男	50	34(65.38)	16(47.06)	2.837	0.092
	女	36	18(34.62)	18(52.94)		
呼吸(次/min)	$\geq 30$	41	11(21.15)	30(82.24)	37.084	<0.001
	<30	45	41(78.85)	4(11.76)		
心率(次/min)	$\geq 100$	40	9(17.31)	31(91.18)	45.090	<0.001
	<100	46	43(82.69)	3(8.82)		
氧合指数(mmHg)	$\geq 150$	32	4(7.69)	28(82.35)	49.048	<0.001
	<150	54	48(92.31)	6(17.65)		
呼吸困难病程(h)	$\geq 12$	36	4(7.69)	32(94.12)	63.094	<0.001
	<12	50	48(92.31)	2(5.88)		
合并多器官功能障碍综合征	是	22	2(3.85)	20(58.82)	32.640	0.001
	否	64	50(96.15)	14(41.18)		
手术方式	胸腔镜手术	51	42(80.77)	9(26.47)	25.114	<0.001
	开放式手术	35	10(19.23)	25(73.53)		
PCT(ng/mL)		-	8.87±1.52	10.03±1.18	3.767	<0.001
CRP(mg/L)		-	47.80±2.45	49.51±2.61	3.084	0.003
24h乳酸清除率(%)		-	8.21±1.37	7.45±1.24	2.610	0.011

表4 影响分析影响食管癌术后肺炎合并 ARDS 患者预后的多因素分析

Table 4 multivariate analysis of prognostic factors in patients with pneumonia and ARDS after esophageal cancer surgery

影响因素	回归系数	标准误	Wald $\chi^2$ 值	OR 值	95%CI	P 值
呼吸( $\geq 30$ 次/min vs $< 30$ 次/min)	0.861	0.765	4.591	2.366	0.528~10.595	0.591
心率( $\geq 100$ 次/min vs $< 100$ 次/min)	0.894	0.759	4.835	2.445	0.552~10.823	0.543
氧合指数( $< 150$ mmHg vs $\geq 150$ mmHg)	0.833	0.191	4.107	2.300	1.582~3.345	$< 0.001$
呼吸困难病程( $\geq 12$ h vs $< 12$ h)	0.997	0.192	4.320	2.71	1.860~3.948	$< 0.001$
合并多器官功能障碍综合征(是 vs 否)	0.825	0.247	4.985	2.282	1.406~3.703	0.006
手术方式(胸腔镜手术 vs 开放式手术)	0.889	0.181	4.875	2.433	1.706~3.469	$< 0.001$
PCT(异常 vs 正常)	0.933	0.298	4.188	2.542	1.418~4.559	$< 0.001$
CRP(异常 vs 正常)	0.981	0.334	4.028	2.667	1.386~5.133	$< 0.001$
24 h 乳酸清除率(低清除率 vs 高清除率)	0.922	0.141	4.364	2.697	2.045~3.555	$< 0.001$

除率(低)、氧合指数( $< 150$ )、呼吸困难病程( $\geq 12$  h)、合并多器官功能障碍综合征、手术方式(开放式手术)是影响食管癌术后肺炎合并 ARDS 患者预后生存的独立危险因素。

促炎因子和抑炎因子的失衡在 ARDS 发生、发展过程中至关重要,在 ARDS 发生、发展过程中可合并 CRP、白细胞介素-6、白细胞介素-8、肿瘤坏死因子- $\alpha$  等细胞因子浓度急剧升高,进而放大炎症反应,引发瀑布式级联反应,加重病情进展。PCT 主要是由甲状腺 C 细胞产生的无激素活性的降钙素前肽物质,是由 116 个氨基酸残基组成的分子量为 13 KD 的糖蛋白。由于 ARDS 患者常合并有脓毒症,细菌细胞壁的脂多糖可刺激外周血单核细胞产生 PCT,机体可释放的肿瘤坏死因子- $\alpha$ 、白细胞介素-6 等大量炎症因子可促进 PCT mRNA 的大量表达,因此可表现为血浆 PCT 水平异常升高<sup>[12]</sup>。CRP 是白细胞介素-6 诱导肝脏合成的一种急性时相非特异性蛋白,是急性炎症反应的重要标记物<sup>[13]</sup>。在感染和组织损伤时血浆浓度急剧升高,并可在 24 h~72 h 内达到峰值。研究显示,CRP 可激活补体,产生大量炎症介质并释放氧自由基,加剧炎症反应;一旦感染被有效控制,CRP 可在 48 h 内迅速下降,故临床将其作为判断感染及创伤损害危重程度和预后的评价指标<sup>[14]</sup>。本研究发现,在 A1 组及死亡组中可见 PCT、CRP 水平显著升高,进一步佐证两者均与食管癌术后肺炎合并 ARDS 患者病情发展密切。

ARDS 的病理基础为炎症细胞介导肺炎反应致肺毛细血管膜损伤,临床以微血管通透性增高而导致的肺泡含蛋白质肺水肿等为主要病理特征<sup>[15]</sup>。ARDS 发生时,患者出现呼吸窘迫和难以纠正的低氧血症,组织氧供应严重不足,机体内环境和代谢发生紊乱,导致产生大量的乳酸<sup>[16]</sup>。因此,近年来血乳酸含量在评估 ARDS 患者病情演变中的临床应用价值

日益增高。本研究结果提示检测 24 h 乳酸清除率可有效反映机体的循环功能和组织灌注情况。

综上所述,PCT、CRP、24 h 乳酸清除率食管癌术后肺炎合并 ARDS 患者中呈异常表达,三者异常表达是食管癌术后肺炎合并 ARDS 患者预后生存的独立危险因素,对患者的生存评估具有一定的临床价值。

#### 参考文献

- [1] Beale R, Grover ER, Smithies M, et al. Acute respiratory distress syndrome ("ARDS"): no more than a severe acute lung injury?[J]. BMJ, 1993, 26(6915):1335-1339.
- [2] 黄云峰,周帆,徐晓林.血清降钙素原联合血管外肺水指数在重症社区获得性肺炎致急性呼吸窘迫综合征患者预后评估中的价值[J]. 保健医学研究与实践, 2020, 17(4):32-35.
- [3] Legriel S, Grigoiresco B, Martel P, et al. Diagnostic Accuracy of Procalcitonin for Early Aspiration Pneumonia in Critically Ill Patients with Coma: A Prospective Study[J]. Neurocritical Care, 2018, 30(32):8971-8973.
- [4] 黄杨,张磊,郭伟. CRP、PCT 联合肺部感染评分在 ICU 肺部感染诊断及预后中的应用价值[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(8):86-90.
- [5] 李印,秦建军. 中国临床肿瘤学会(CSCO)食管癌诊治指南 2020 版外科领域更新要点解读[J]. 中国胸心血管外科临床杂志, 2020, 26(8):857-859.
- [6] Dinglas VD, Aronson FL, Colantuoni E, et al. Muscle Weakness and 5-Year Survival in Acute Respiratory Distress Syndrome Survivors[J]. Crit Care Med, 2017, 45(3):1-2.
- [7] Gluck E, Nguyen HB, Yalamanchili K, et al. Real-world use of procalcitonin and other biomarkers among sepsis hospitalizations in the United States: A retrospective, observational study[J]. PLoS One, 2018, 13(10):5941-5943.
- [8] Chenggong H, Yongfang Z, Chang L, et al. Pentraxin-3, procalcitonin and lactate as prognostic markers in patients with sepsis and septic shock[J]. Oncotarget, 2018, 9(4):5125-5136.

## 海口地区恙虫病患者免疫损伤及临床特征分析

王强 张丽媛 俞亚转 杜永国\*

**[摘要]** **目的** 分析海南海口地区恙虫病患者免疫损伤及临床特征。**方法** 选取海南海口地区2015年1月至2020年1月诊断恙虫病的患者297例,纳入患者组;并选取同期100名健康体检者,纳入对照组。对比患者组、对照组外周血淋巴细胞、自然杀伤(NK)细胞、炎性因子水平差异,并分析患者组临床特征。**结果** 患者组CD3<sup>+</sup>T淋巴细胞、CD4<sup>+</sup>T淋巴细胞、CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞水平高于对照组,患者组NK细胞、CD19<sup>+</sup>B淋巴细胞水平低于对照组,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。患者组IL-6、IL-8、IL-18、IL-15、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 水平均高于对照组,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。患者临床表现以发热、焦痂或溃疡、畏寒为主,分别占100.00%、90.91%、70.03%。患者OT基因型以Karp型为主,占62.63%,其次为Gilliam型,占17.85%。同源性分析结果显示,297例恙虫病患者恙虫病东方体(OT)代表株与台湾KM08、KM05同源性较高。**结论** 海南海口地区恙虫病患者存在明显免疫损伤,并以体液免疫增强、细胞免疫减弱及促炎因子大量释放为主,患者临床表现特异性有限,其OT基因型呈现多样性但以Karp型为主,来源亦较为复杂。

**[关键词]** 恙虫病;免疫损伤;临床特点

### Analysis of immune damage and clinical characteristics of tsutsugamushi disease in Haikou, Hainan Province

WANG Qiang, ZHANG Liyuan, YU Yazhuan, DU Yongguo\*

(Department of Tropical Diseases, Second Affiliated Hospital of Hainan Medical College, Haikou, Hainan, China, 570311)

**[ABSTRACT]** **Objective** To analyze the immune damage and clinical characteristics in patients with tsutsugamushi disease in Haikou, Hainan Province. **Methods** 297 patients diagnosed with tsutsugamushi disease from January 2015 to January 2020 in Haikou District of Hainan Province were selected and included in the patient group, and 100 healthy persons in the same period were selected as the control group. The levels of peripheral blood lymphocytes, natural killer (NK) cells and inflammatory factors were measured and compared between the two groups, and the clinical characteristics and molecular epidemiological characteristics of the patient group were analyzed. **Results** The number of CD3<sup>+</sup> T lymphocytes, CD4<sup>+</sup> T lymphocytes and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes in the patient group were higher than those in the control group, and the number of NK cells and CD19<sup>+</sup> B lymphocytes in the patient group were lower than those in the control group ( $P<0.05$ ). The levels of IL-6, IL-8, IL-18, IL-15, TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  in the patient group were significantly higher than those in the control group ( $P<0.05$ ). The main clinical manifestations were fever, eschar or ulcer, and chills, accounting for 100.00%, 90.91% and 70.03% respectively. Karp genotype was the main genotype, accounting for 62.63%, followed by Gilliam genotype, accounting for 17.85%. The results of homology analysis showed that the representative strains of *Orientia tsutsugamushi* (OT) from 297 patients with Tsutsugamushi had high homology with Taiwan km08 and km05 strains. **Conclusion** Patients with tsutsugamushi disease in Haikou area of Hainan have obvious immune damage, and they are mainly characterized by enhanced humoral immunity, weakened cellular immunity and large release of pro-inflammatory factors. The specificity of the clinical manifestations of patients is limited. Their OT genotypes are diverse but mainly Karp type. The source is also more complicated.

**[KEY WORDS]** Tsutsugamushi disease; Immune damage; Clinical characteristics

基金项目:海南省自然科学基金资助项目(819QN360)

作者单位:海南医学院第二附属医院热带病科,海口,海南570311

\*通信作者:杜永国, E-mail: duyongguo@163.com

恙虫病又称丛林斑疹伤寒,是由恙虫病东方体(*Orientia tsutsugamushi*, OT)引发的自然疫源性疾病,以鼠类为主要传染源,经恙螨幼虫叮咬传播<sup>[1]</sup>。恙虫病患者以发热、焦痂或溃疡、淋巴肿大、皮疹为主要临床特征,严重时可并发呼吸窘迫综合征、弥散性血管内凝血、胃肠道出血甚至死亡<sup>[2]</sup>。鉴于恙虫病早期临床症状特异性有限,极易误诊为伤寒、上呼吸道感染、肝炎或血液病,贻误治疗时机。同时,OT基因型众多,不同基因型的毒力和致病力也存在明显差异<sup>[3]</sup>。因此,了解恙虫病患者免疫损伤特点,并掌握其临床特点,对于恙虫病的早期鉴别诊断及治疗有着重要意义。为此,本研究选取海南海口地区诊断恙虫病的患者进行研究。报告如下。

## 1 对象与方法

### 1.1 研究对象

选取海南海口地区2015年1月至2020年1月诊断恙虫病的患者297例,纳入患者组。患者入组标准:①参照中国疾病预防控制中心制定的恙虫病诊断标准<sup>[4]</sup>明确诊断;②入院前未接受抗生素治疗,急性期全血、焦痂标本保存完好。排除标准:①合并其他传染性疾病;②合并免疫功能不全;③合并心、肝、肾等脏器严重病变。选择同期100名健康体检者,在征得其知情同意后,纳入对照组。患者组男132例,女165例,年龄平均(56.24±11.87)岁;对照组男43名,女57名,年龄平均(55.91±12.04)岁。两组受试者性别、年龄,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。且经医学伦理委员会批准,患者均知情同意。

### 1.2 研究方法

#### 1.2.1 免疫损伤检测

分别于两组受试者入组时,取其外周血标本,检测其外周血淋巴细胞、自然杀伤(Natural killer cell, NK)细胞、炎性因子水平,外周血淋巴细胞检测使用流式细胞仪检测,检测指标包括CD3<sup>+</sup>T淋巴细胞、CD4<sup>+</sup>T淋巴细胞、CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞及CD19<sup>+</sup>B淋巴细胞;NK细胞检测亦使用流式细胞

仪。炎性因子指标包括白细胞介素-6(IL-6)、IL-8、IL-10、IL-15及肿瘤坏死因子- $\alpha$ (Tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、干扰素- $\gamma$ (Interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ )。

#### 1.2.2 临床特征分析

整理患者组临床表现特征,包括畏寒、寒战、发热、焦痂或溃疡、头晕或头痛等,计算其各项临床表现占比。

#### 1.2.3 分子流行特点分析

取患者组全血标本,提取总DNA,行OT目标基因扩增,而后行巢式聚合酶链反应(PCR),将PCR第2轮反应产物使用QIAxcel Advanced全自动实时毛细管电泳系统分析,选500 bp条带阳性的样品送测序。核苷酸序列经拼接后,使用MegAlign软件行分析处理,其他用于参比的标准株序列下载自GenBank,结合本研究获得的序列,使用BLAST行同源性检索,Clustal X进行序列排队,对代表株序列进行同源性分析比较。

### 1.3 统计学分析

使用SPSS 22.0统计学软件进行数据分析;计数资料以 $n(\%)$ 表示,并采用 $\chi^2$ 检验;计量资料均符合正态分布,以 $(\bar{x}\pm s)$ 表示,采用双侧 $t$ 检验;当 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 免疫损伤特点

患者组CD3<sup>+</sup>T、CD4<sup>+</sup>T、CD8<sup>+</sup>T、IL-6、IL-8、IL-18、IL-15、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 淋巴细胞水平高于对照组,患者组NK细胞、CD19<sup>+</sup>B淋巴细胞水平低于对照组,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。见表1~2。

### 2.2 临床特征

患者临床表现以发热、焦痂或溃疡、畏寒为主,分别占100.00%、90.91%、70.03%,见表3。

### 2.3 基因型分布

297例恙虫病患者中以OT基因型以Karp型为主,占186(62.63%),其次为Gilliam型,占53(17.85%),依次是Kato,占39(13.13%)、TA763,占18(6.06%),其中有1例是未确定的。

表1 两组受试者外周血淋巴细胞及NK细胞水平比较( $\bar{x}\pm s$ )

Table 1 Comparison of peripheral blood lymphocytes and NK cells between the two groups ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	例数	CD3 <sup>+</sup> T淋巴细胞(%)	CD4 <sup>+</sup> T淋巴细胞( $\times 10^6/L$ )	CD8 <sup>+</sup> T淋巴细胞( $\times 10^6/L$ )	NK细胞(%)	CD19 <sup>+</sup> B淋巴细胞(%)
患者组	297	74.31±1.82	574.49±40.81	597.92±94.11	15.52±0.69	9.12±0.99
对照组	100	56.12±2.43	215.33±17.95	208.87±60.51	23.26±2.16	19.51±1.03
$t$ 值		79.040	85.220	38.715	54.191	89.851
$P$ 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

表2 两组受试者炎症因子水平比较 (ng/L,  $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Comparison of inflammatory factors between the two groups (ng/L,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	IL-6	IL-8	IL-10	IL-15	TNF- $\alpha$	IFN- $\gamma$
患者组	297	39.15 $\pm$ 7.21	14.13 $\pm$ 1.29	33.15 $\pm$ 2.96	7.13 $\pm$ 0.88	37.19 $\pm$ 5.24	45.43 $\pm$ 3.99
对照组	100	2.91 $\pm$ 0.48	2.68 $\pm$ 0.55	2.74 $\pm$ 0.39	1.01 $\pm$ 0.12	10.81 $\pm$ 0.69	4.11 $\pm$ 0.78
t值		50.184	86.106	102.354	69.272	50.156	102.817
P值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

表3 297例恙虫病临床特征分析

Table 3 Clinical characteristics of 297 cases of tsutsugamushi disease

临床表现	例数(n)	占比(%)
畏寒	208	70.03
寒战	142	47.81
发热	297	100.00
焦痂或溃疡	270	90.91
头晕或头痛	168	56.57
斑丘疹	155	52.19
外周淋巴结肿大	138	46.46
全身肌肉酸痛	71	23.91
乏力纳差	67	22.56
咳嗽咳痰	44	14.81
恶心呕吐或腹痛	18	6.06

### 2.4 基因序列同源性分析

同源性分析结果显示,297例恙病患者OT代表株与台湾KM08、KM05同源性较高,见表4。

## 3 讨论

恙虫病广泛流行于亚太地区的热带及亚热带区域<sup>[5]</sup>,海南海口地区具有独特的热带、亚热带气候特征,是恙虫病的高发地区。据报道,2006~2017年,海南恙虫病发病率居全国前4位<sup>[6]</sup>,且以6~9月为发病高峰。其原因一方面为6~9月气候湿热、降雨量高,为鼠类、恙螨生长繁殖创造了有利条件。另一方面,6~9月是海南海口地区农作物收获时节,增加了恙螨侵袭机会<sup>[7-8]</sup>。

外斐反应是实验室诊断恙虫病的常规手段,但其灵敏性、特异性均处于较低水平,难以及时达到诊断目的<sup>[9]</sup>。加之恙虫病临床表现复杂、临床重视程度不高,均使其漏诊率、误诊率处于较高水平<sup>[10-11]</sup>。漏诊、误诊不仅会加剧病情进展、贻误治疗时机,也使患者经济负担加重,甚至因病情加剧、多系统并发症发生而影响生存质量<sup>[12]</sup>。因此,明确恙虫病的临床特征并开展早期诊治,是控制疾病进展、改善患者预后的关键环节。

免疫损伤是急性传染病的重要致病机制<sup>[13]</sup>,全面掌握恙虫病患者的免疫损伤特点,对于指导临床诊断及疗效评估有着重要意义。NK细胞是固有免疫应答的关键细胞,可直接诱导被病毒感染的细胞死亡,与机体抗病毒免疫密切相关<sup>[14]</sup>,恙病患者NK细胞的下降意味着由NK细胞导致的免疫攻击有所下降,机体固有免疫难以发挥有效的杀灭病原体作用;CD19<sup>+</sup>是B细胞增殖、分化、活化及抗体产生有关的重要膜抗原,其水平下降意味着机体免疫功能下降,也是恙虫病常见临床病理改变。同时,恙病患者亦存在IL-6、IL-8、IL-18、IL-15、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 显著升高的表现,说明恙病患者处于明显免疫失调状态,这一状态常导致器官损伤加剧。因此,关注并调控恙病患者免疫损伤,对于指导病情评估、改善患者预后有着重要意义。

表4 297例恙病患者OT代表株与参考株56 kDa蛋白基因序列同源性(%)

Table 4 Homology of 56 kDa protein gene between OT representative and reference strain in 297 of tsutsugamushi disease (%)

编号	Hualien-1 (台湾)	Hualien-3 (台湾)	Taitun-7 (台湾)	OI07 (台湾)	KM05 (台湾)	KM08 (台湾)	KM21-2 (台湾)	Gilliam (缅甸)	CDC Kato (日本)	Kawasaki (日本)	CDC Karp (新几内亚)
2017HN0529	73.5	74.1	94.5	93.6	95.8	77.6	77.1	76.1	74.3	73.5	94.6
2017HN0117	73.5	74.1	94.5	93.6	95.8	77.6	77.1	76.1	74.3	73.5	94.6
2016HN0109	75.8	77.6	78.4	78.4	77.6	100.0	77.1	75.8	74.1	74.1	77.6
2015HN1129	74.1	75.5	98.5	99.2	94.1	79.5	77.1	85.7	75.5	73.1	98.4
2016HN1104	97.5	77.8	73.2	74.2	74.5	74.7	75.6	94.7	77.2	91.6	74.9
2017HN1205	73.3	74.3	94.9	94.7	100.0	78.4	77.3	77.6	74.9	73.4	95.5
2019HN1019	73.4	74.2	94.7	93.5	95.6	77.1	77.3	76.5	74.5	74.5	94.3
2016HN0508	75.2	85.7	79.6	80.6	79.7	75.2	76.5	79.7	85.4	78.2	79.2
2017HK0622	75.9	99.9	75.5	75.6	74.1	74.2	75.9	77.6	99.3	77.3	74.2
2019LC0705	72.8	73.5	76.1	76.8	76.3	97.5	88.8	76.4	73.2	74.7	76.1
2019HN0425	72.6	74.1	92.4	91.7	91.3	78.4	79.4	76.3	74.5	72.1	92.0

在临床特征的分析中,可以发现,患者临床表现以发热、焦痂或溃疡、畏寒为主,与过往报道一致,提示临床在发现同时存在发热、焦痂或溃疡、畏寒的患者时,应高度怀疑恙虫病并开展相应实验室检查。另外,患者OT基因型以Karp型为主,占62.63%,与我国广州、台湾等地区OT优势基因型一致<sup>[15]</sup>,且患者OT代表株与台湾KM08、KM05同源性较高,说明海南海口地区OT基因型呈现多样化趋势,其来源也较为复杂。加强分子流行病学监测,普及恙虫病健康教育,提高临床对恙虫病的认知,均为遏制恙虫病在海南海口持续流行高发的重要措施。

综上所述,海南海口地区恙虫病患者存在明显免疫损伤,并以体液免疫增强、细胞免疫减弱及促炎因子大量释放为主,患者临床表现特异性有限,其OT基因型呈现多样性但以Karp型为主,来源亦较为复杂,应予以高度重视。

## 参考文献

- [1] 梁成员, 黄永志, 陆小艳. 某地区恙虫病的临床与流行病学分析[J]. 检验医学与临床, 2015, 12(12): 1686-1688.
- [2] Park JW, Yu DS, Lee GS, et al. Epidemiological Characteristics of Rodents and Chiggers with *Orientia tsutsugamushi* in the Republic of Korea[J]. Korean J Parasitol, 2020, 58(5): 559-564.
- [3] Park JW, Kim SH, Park DW, et al. Molecular epidemiology of an *Orientia tsutsugamushi* gene encoding a 56-kDa type-specific antigen in chiggers, small mammals, and patients from the Southwest Region of Korea[J]. Am J Trop Med Hyg, 2018, 98(2): 616-624.
- [4] 毛学辉, 黄建梅, 张少敏, 等. 42例恙虫病流行及临床特征分析[J]. 大理大学学报, 2019, 4(10): 60-62.
- [5] 热衣汗·玉素甫, 贾万忠, 等. 新疆北疆部分地区牛羊包虫病流行病学调查与cox1和nad1基因分析[J]. 塔里木大学学报, 2020, 32(2): 17-24.
- [6] Kim SY, Gill B, Song BG, et al. Annual Fluctuation in Chigger Mite Populations and *Orientia tsutsugamushi* Infections in Scrub Typhus Endemic Regions of South Korea[J]. Osong Public Health Res Perspect, 2019, 10(6): 351.
- [7] Narang R. Biology of *Orientia tsutsugamushi* [M]//Rickettsiales. Springer, Cham, 2016: 385-396.
- [8] 曲久, 丹增, 布次仁. 西藏西北部分地区山羊无浆体病的流行病学调查[J]. 畜牧与饲料科学, 2016, 37(6): 132-132.
- [9] Jun H, Jegal S, Kim-Jeon MD, et al. Three-year surveillance (2016 - 2018) of chigger mites vector for tsutsugamushi disease in the Hwaseong-Si area of Gyeonggi-Do, Republic of Korea[J]. Entomol Res, 2020, 50(2): 63-73.
- [10] Boucher A, Herrmann JL, Morand P, et al. Epidemiology of infectious encephalitis causes in 2016 [J]. Med Maladies Infect, 2017, 47(3): 221-235.
- [11] 周海燕, 何凤屏, 罗君, 等. 粤北山区恙虫病自然疫源地的研究[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2011, 3(6): 398-401.
- [12] 孙丽华. 恙虫病与血液系统的损伤[J]. 中外医疗, 2013, 32(13): 189-190.
- [13] Bhate R, Pansare N, Chaudhari SP, et al. Prevalence and phylogenetic analysis of *Orientia tsutsugamushi* in rodents and mites from central India[J]. Vector-Borne Zoonot, 2017, 17(11): 749-754.
- [14] 张丽, 宋闽宁, 黄文琪. 恙虫病58例临床分析[J]. 人民军医, 2011, 54(2): 151-151.
- [15] Lee HJ, Park C. Distribution of Chigger Mites as *Tsutsugamushi* Vectors Sampled in Seogwipo [J]. Korean J Clin Lab Sci, 2019, 51(3): 344-350.
- [9] Lars L, Anna-Karin P, Gunnar J, et al. Diagnostic accuracy of procalcitonin, neutrophil-lymphocyte count ratio, C-reactive protein, and lactate in patients with suspected bacterial sepsis[J]. PLoS One, 2017, 12(7): e0181704-1081706.
- [10] Spoto S, Cella E, De Cesaris M, et al. Procalcitonin and MR-Proadrenomedullin Combination with SOFA and qSOFA Scores for Sepsis Diagnosis and Prognosis: A Diagnostic Algorithm[J]. Shock, 2017, 32(74): 1-3.
- [11] Arora R, Campbell JP, Simon G, et al. Does serum procalcitonin aid in the diagnosis of bloodstream infection regardless of whether patients exhibit the systemic inflammatory response syndrome?[J]. Infection, 2017, 45(3): 291-298.
- [12] Li F, Zhang W, Hu H, et al. Diagnostic value of procalcitonin, C-reactive protein and lactate dehydrogenase in paediatric malignant solid tumour concurrent with infection and tumour progression[J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 1245-1248.
- [13] Vogel H, Wieggers U. Procalcitonin as Predictor of Bacterial Infection in Meconium Aspiration Syndrome[J]. Am J Perinatol, 2017, 35(8): 769-773.
- [14] Craig GM, Evans SJ, Brayshaw BJ. An inverse relationship between serum zinc and C-reactive protein levels in acutely ill elderly hospital patients[J]. Postgrad Med J, 2018, 28(782): 1025-1028.
- [15] Ferguson ND, Frutos-Vivar F, Esteban A, et al. Acute Respiratory Distress Syndrome Due To Tuberculosis in a Respiratory ICU Over a 16-Year Period [J]. Critic Care Med, 2019, 33(10): 1-5.
- [16] 李成承, 吴利辉, 胡亮. 血浆可溶性血栓调节蛋白对急性呼吸窘迫综合征儿童预后的预测[J]. 中国临床研究, 2020, 33(5): 68-71.

(上接第694页)

· 论 著 ·

# 老年吉兰-巴雷综合征患者外周血 IL-27 水平变化及其临床意义分析

张惠芳<sup>1\*</sup> 赵红英<sup>1</sup> 杨国涛<sup>2</sup> 李英<sup>1</sup> 刘云峰<sup>1</sup>

**[摘要]** **目的** 探究老年吉兰-巴雷综合征(GBS)患者外周血白细胞介素-27(IL-27)水平变化情况并分析其临床意义。**方法** 选取本院老年 GBS 患者 44 例作为 GBS 组,选取同期健康体检者 44 例作为对照组,比较两组外周血 IL-27、IL-17、IL-10 水平,根据 GBS 组发病高峰期病情程度分为重型患者与轻型患者,对比 GBS 组不同病情患者临床资料、外周血 IL-27、IL-17、IL-10 水平,分析各指标水平变化的临床意义。**结果** GBS 组外周血 IL-27、IL-17 水平高于对照组,IL-10 水平低于对照组,差异均有统计学意义( $P<0.05$ );重型患者腹泻、自主神经功能障碍、延髓功能障碍、轴索损伤发生率均高于轻型患者,差异均有统计学意义( $P<0.05$ );重型患者外周血 IL-27、IL-17 高于轻型患者,IL-10 低于轻型患者( $P<0.05$ );发病高峰期临床症状评分与外周血 IL-27、IL-17 呈正相关,与 IL-10 呈负相关( $r=0.554$ 、 $0.594$ 、 $-0.650$ , $P<0.05$ );外周血 IL-27、IL-17、IL-10 预测老年 GBS 疾病严重程度的曲线下面积(AUC)均 $>0.7$ ,各指标联合预测的 AUC 最大,为 0.898。**结论** 老年 GBS 患者外周血 IL-27、IL-17 水平明显升高,IL-10 水平降低,各指标异常变化可能具有促进病情加重的作用,且在预测患者疾病严重程度方面具有较高应用价值。

**[关键词]** 吉兰-巴雷综合征;白细胞介素-27;白细胞介素-17;白细胞介素-10

## Changes of IL - 27 level in peripheral blood of elderly patients with Guillain - Barré syndrome and its clinical significance

ZHANG Huifang<sup>1\*</sup>, ZHAO Hongying<sup>1</sup>, YANG Guotao<sup>2</sup>, LI Ying<sup>1</sup>, LIU Yunfeng<sup>1</sup>

(1. Department of Geriatrics, Cangzhou Central Hospital, Cangzhou, Hebei, China, 061001; 2. Department of Neurology, Cangzhou Central Hospital, Cangzhou, Hebei, China, 061001)

**[ABSTRACT]** **Objective** To explore the changes in peripheral blood interleukin-27 (IL-27) levels in elderly patients with Guillain - Barré syndrome (GBS) and analyze its clinical significance. **Methods** We selected 44 elderly GBS patients in our hospital as the GBS group, and 44 healthy patients during the same period as the control group. The levels of IL-27, IL-17, and IL-10 in the peripheral blood of the two groups were compared. According to the severity of the disease at the peak of the onset of the GBS group, the patients were divided into severe patients and mild patients. The clinical data, peripheral blood IL-27, IL-17, and IL-10 levels of patients with different conditions in the GBS group were compared, and the clinical significance of changes in the levels of each indicator were analyzed. **Results** The levels of IL-27 and IL-17 in the peripheral blood of the GBS group were higher than those of the control group, and the level of IL-10 was lower than that of the control group ( $P<0.05$ ). The incidence of severe diarrhea, autonomic dysfunction, bulbar dysfunction, and axonal injury are higher than those of mild patients ( $P<0.05$ ). IL-27 and IL-17 in peripheral blood in severe patients are higher than those in mild patients, IL-10 was lower than that in mild patients ( $P<0.05$ ). The clinical

基金项目:沧州市科学技术研究与发展指导计划(162302165)

作者单位:1. 沧州市中心医院老年内科,河北,沧州 061001

2. 沧州市中心医院神经内三科,河北,沧州 061001

\*通信作者:张惠芳, E-mail: zhang0huifang@163.com

symptom score at the peak of the disease was positively correlated with peripheral blood IL-27 and IL-17, and negatively correlated with IL-10 ( $r=0.554, 0.594, -0.650, P<0.05$ ). The area under the curve (AUC) of peripheral blood IL-27, IL-17, and IL-10 predicting the severity of GBS disease in the elderly are all greater than 0.7, and the combined prediction of each indicator is the largest with 0.898. **Conclusion** The levels of IL-27 and IL-17 in the peripheral blood of elderly GBS patients are significantly increased, and the level of IL-10 is decreased. Abnormal changes in various indicators may have a role in accelerating the severity of the disease, and have a high application value in predicting the severity of the disease.

**[KEY WORDS]** Guillain-Barre Syndrome; Interleukin-27; Interleukin-17; Interleukin-10

吉兰-巴雷综合征(Guillain-Barre Syndrome, GBS)是一种人体自身免疫系统攻击其周围神经的病症,其主要病理特征为周围神经的髓鞘脱失和炎性细胞浸润,目前尚不清楚确切发病机制<sup>[1-2]</sup>。GBS呈急性发病,症状与体征多于2周达高峰,临床表现轻重不一,多数患者起病时病情较轻,随后病情逐渐加重,甚至可能发展至不能独立行走或需要机械辅助通气<sup>[3]</sup>。因此于发病早期预测疾病发展趋势,对指导临床开展有效的干预和治疗、改善患者预后具有重要意义。研究发现细胞因子介导的炎症反应在自身免疫性疾病的发病过程中发挥非常重要作用<sup>[4-5]</sup>。白细胞介素-27(Interleukin-27, IL-27)是近年新发现的一种细胞因子,报道指出IL-27对Th1、Th2、Th17细胞均具有广泛的免疫抑制作用<sup>[6-7]</sup>。IL-27在老年GBS中的作用如何,目前国内外文献未见报道。本研究尝试探究老年GBS患者外周血IL-27水平变化情况,并分析其作用机制。报告如下。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选取2016年1月至2020年7月本院老年GBS患者44例作为GBS组,男27例,女17例;平均年龄( $82.24\pm 2.93$ )岁;体质量指数(Body mass index, BMI)平均( $22.36\pm 1.42$ ) $\text{kg}/\text{m}^2$ 。依据1:1配对原则,另选取同期健康体检者44例作为对照组,男22例,女22例;平均年龄( $81.71\pm 2.14$ )岁;平均( $21.95\pm 1.52$ ) $\text{kg}/\text{m}^2$ 。对比两组性别、年龄、BMI,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

GBS组纳入标准:①明确诊断为GBS<sup>[8]</sup>;②年龄 $\geq 75$ 岁;③心肺等重要脏器功能良好;④发病前3个月内未使用糖皮质激素或免疫抑制剂;⑤患者及家属知晓本研究,已签署同意书。对照组纳入标准:①全身体检结果均正常,无自身免疫性疾病及家族史;②自主行为能力良好,无沟通交流障

碍;③近3个月内未使用糖皮质激素或免疫抑制剂;④研究对象本人及家属知晓本研究,已签署同意书。排除标准:①血液系统疾病患者;②慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经病患者;③脊髓灰质炎患者;④就诊时GBS病情已明显缓解者;⑤恶性肿瘤患者;⑥由重金属、农药中毒引起的多发性神经炎;⑦近3个月内有骨折史、严重创伤或手术史者;⑧合并明确颅内病变的神经炎患者;

### 1.2 方法

指标检测方法:所有研究对象均于入院当天(治疗前)采集空腹静脉血3 mL,置于有肝素的抗凝管中,由专业检测人员采用酶联免疫吸附试验检测外周血IL-27、IL-17、IL-10水平,试剂盒购自北京百奥莱博科技有限公司,检测操作严格按照试剂盒说明书完成。

GBS疾病严重程度评定方法:所有患者均给予经免疫球蛋白、激素、对症等治疗,根据发病高峰期(一般于患病2周左右达到高峰)临床症状评分(Hughes评分标准<sup>[9]</sup>)评估,分值范围0~6分,评分 $\leq 2$ 分判定为轻型,评分 $\geq 3$ 分判定为重型。

### 1.3 观察指标

①两组外周血IL-27、IL-17、IL-10水平。②GBS组不同病情患者临床资料、外周血IL-27、IL-17、IL-10水平,临床资料包括年龄、性别、BMI、上呼吸道感染、双侧面瘫、腹泻、自主神经功能障碍、延髓功能障碍、轴索损伤。③分析外周血IL-27、IL-17、IL-10与发病高峰期临床症状评分的关系。④分析老年GBS疾病严重程度的影响因素。⑤分析外周血IL-27、IL-17、IL-10水平对老年GBS患者疾病严重程度的预测价值。

### 1.4 统计学方法

数据处理采用SPSS 22.0软件,计数资料以 $n(\%)$ 表示,采用 $\chi^2$ 检验,计量资料以( $\bar{x}\pm s$ )描述,两组间比较采用独立样本 $t$ 检验,相关性分析采用

Pearson 相关系数模型,通过多元线性回归分析评估关联性,预测效能分析采用受试者工作特征(ROC)曲线,获取曲线下面积(AUC),不同预测方案间曲线下面积比较采用DeLong 检验,联合预测实施 Logistic 二元回归拟合,返回预测概率 logit(p)。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 两组外周血 IL-27、IL-17、IL-10 水平

GBS 组外周血 IL-27、IL-17 水平较对照组高 ( $P < 0.05$ ),IL-10 水平较对照组低,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 1。

表 1 两组外周血 IL-27、IL-17、IL-10 水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	IL-27(pg/mL)	IL-17(pg/mL)	IL-10(pg/mL)
GBS 组	44	185.69±35.46	24.78±5.22	40.25±10.06
对照组	44	115.24±23.58	13.36±4.05	55.18±12.37
t 值		10.974	11.466	6.211
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

### 2.2 GBS 组不同疾病严重程度患者临床资料

不同疾病严重程度患者年龄、性别、BMI、上呼吸道感染、双侧面瘫比较,差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ );GBS 组不同疾病严重程度患者腹泻、自主神经功能障碍、延髓功能障碍、轴索损伤比较,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 2。

表 2 GBS 组不同疾病严重程度患者临床资料 [ $(\bar{x} \pm s), n(\%)$ ]

资料	重型患者 (n=24)	轻型患者 (n=20)	t/χ <sup>2</sup> 值	P 值
年龄(岁)	82.43±3.15	82.05±2.79	0.419	0.677
性别	男 14(58.33) 女 10(41.67)	13(65.00) 7(35.00)	0.205	0.651
BMI(kg/m <sup>2</sup> )	22.54±1.53	22.19±1.20	0.831	0.411
上呼吸道感染	有 10(41.67) 无 14(58.33)	8(40.00) 12(60.00)	0.013	0.911
双侧面瘫	是 4(16.67) 否 20(83.33)	2(10.00) 18(90.00)	0.412	0.521
腹泻	有 11(45.83) 无 13(54.17)	3(15.00) 17(85.00)	4.781	0.029
自主神经功能障碍	有 9(37.50) 无 15(62.50)	1(5.00) 19(95.00)	4.841	0.028
延髓功能障碍	有 10(41.67) 无 14(58.33)	2(10.00) 18(90.00)	5.515	0.019
轴索损伤	有 11(45.83) 无 13(54.17)	3(15.00) 17(85.00)	4.781	0.029

### 2.3 GBS 组不同疾病严重程度患者外周血 IL-27、IL-17、IL-10 水平

GBS 组重型患者外周血 IL-27、IL-17 较轻型患者高 ( $P < 0.05$ ),IL-10 较轻型患者低,差异有统计学意义 ( $t=3.638, 4.238, 4.132, P < 0.05$ )。见图 1。

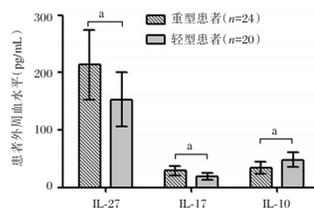


图 1 GBS 组不同疾病严重程度患者外周血 IL-27、IL-17、IL-10 水平

Figure 1 GBS levels of peripheral blood IL-27, IL-17, IL-10 in patients with different disease severity

### 2.4 外周血 IL-27、IL-17、IL-10 与发病高峰期临床症状评分的关系

Pearson 相关性分析,外周血 IL-27、IL-17 与发病高峰期临床症状评分呈正相关,IL-10 与发病高峰期临床症状评分呈负相关 ( $r=0.554, 0.594, -0.650, P < 0.05$ )。

### 2.5 多元线性回归分析

多元线性回归分析,将双侧面瘫、腹泻、自主神经功能障碍、延髓功能障碍、轴索损伤等其他因素控制后,外周血 IL-27、IL-17、IL-10 仍与疾病严重程度(发病高峰期临床症状评分)显著相关 ( $P < 0.05$ )。见表 3。

表 3 多元线性回归分析

自变量	偏回归系数	标准误差	偏回归系数 (标准化)	t 值	P 值
常量	-1.796				
IL-27	0.698	0.061	0.710	11.443	<0.001
IL-17	0.523	0.052	0.551	10.058	<0.001
IL-10	-0.556	0.048	-0.573	-11.583	<0.001

### 2.6 外周血 IL-27、IL-17、IL-10 对老年 GBS 疾病严重程度的预测价值

ROC 曲线结果显示,各指标联合预测老年 GBS 疾病严重程度的 AUC 最大,为 0.898,最佳预测敏感度、特异度分别为 83.33%、90.00%。见表 4、图 2。

## 3 讨论

GBS 是一种细胞免疫、体液免疫共同参与的自身免疫性疾病,最近研究发现 IL-27 对 Th1、Th2、

表4 外周血 IL-27、IL-17、IL-10 对老年 GBS 疾病严重程度的预测价值

Table 4 Predictive value of peripheral blood IL-27, IL-17, IL-10 on the severity of GBS diseases in the elderly

指标	AUC	95% CI	Z 值	截断值	敏感度 (%)	特异度 (%)	P 值
IL-27	0.785	0.636~0.895	3.941	>210.82 pg/mL	75.00	85.00	<0.001
IL-17	0.765	0.613~0.879	3.710	>27.57 pg/mL	54.17	95.00	<0.001
IL-10	0.810	0.664~0.913	4.826	≤46.06 pg/mL	87.50	60.00	<0.001
联合	0.898	0.769~0.969	8.437		83.33	90.00	<0.001

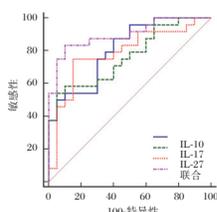


图2 外周血 IL-27、IL-17、IL-10 预测老年 GBS 疾病严重程度的 ROC 曲线

Figure 2 ROC curve of peripheral blood IL-27, IL-17, IL-10 in predicting the severity of GBS disease in the elderly

Th17 细胞均具有广泛的免疫抑制作用,可抑制其产生促炎性细胞因子,并可用于多种实验性自身免疫性疾病<sup>[10]</sup>。但 IL-27 在 GBS 发生发展中的作用机制尚无临床研究报道。本研究对此进行探讨,发现老年 GBS 患者外周血 IL-27 水平明显高于健康体检者,进一步经相关性分析发现外周血 IL-27 水平与老年 GBS 患者发病高峰期临床症状评分呈正相关,据此笔者推测 IL-27 可能与 GBS 的发生有关。IL-27 是一种具有多种生物学功能的因子,最近研究<sup>[11]</sup>证实 IL-27 可以抑制 Th1 型免疫反应以调控免疫反应的适度,是 T 细胞介导炎症的一个关键拮抗剂。IL-27 还对 Th2 和 Th17 细胞具有抑制作用,正常情况下, Th2 效应细胞在机体抵抗蠕虫感染方面具有至关重要作用,但 Th2 型免疫反应失调可以导致多种疾病的发生,如哮喘和过敏等<sup>[12]</sup>。IL-27 还可抑制 Th2 型免疫反应,如国内司马宇彤等<sup>[13]</sup>报道指出可抑制 Th2 细胞和 Th17 细胞分化,同时上调调节性 T 细胞水平。

本研究还发现,老年 GBS 患者外周血 IL-17 水平明显升高, IL-10 水平明显降低。IL-17 是 Th17 细胞分泌的关键性因子之一, Th17 细胞参与了诸多炎症性疾病的发生如类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、哮喘,在上述疾病中表达水平明显增高<sup>[14]</sup>。IL-10 是一种多细胞源、多功能的细胞因子,可调节细胞的生长与分化,参与炎症反应和免疫反应,被认为是最主要的炎症与免疫抑制细胞

因子之一。人体内单核巨噬细胞和淋巴细胞均可通过分泌 IL-10 发挥抑制免疫反应的作用。且本研究发现外周血 IL-17、IL-10 均与老年 GBS 患者发病高峰期临床症状评分存在密切相关性,且与老年 GBS 疾病严重程度显著相关。进一步证实外周血 IL-27、IL-17、IL-10 可作为评估老年 GBS 疾病严重程度的生物学指标。且 GBS 目前无特效治疗方法,其主要包括血浆置换和免疫球蛋白,但仅对约 1/3 的患者有效,并可能引起过敏反应等多种副作用,甚至引发严重并发症,皮质类固醇则认为对 GBS 无效,并有不良反应,而 IL-27 已被用于多种实验性自身免疫性疾病的治疗,且未发现明显的副作用,因此笔者认为 IL-27 可能是治疗包括 GBS 在内的自身免疫性疾病的很好的细胞因子, IL-27 必将成为治疗免疫性疾病的新靶点,为疾病病程和病情的评估提供可能有效的方法。

综上所述,老年 GBS 患者外周血 IL-27、IL-17、IL-10 水平与发病高峰期临床症状评分密切相关,早期检测各指标水平有助于预测患者疾病严重程度,具有较高临床应用价值。但本研究为单中心研究,存在样本量较少的不足,仍需通过多中心研究进一步验证。

## 参考文献

- [1] 中华医学会神经病学分会,中华医学会神经病学分会周围神经病协作组,中华医学会神经病学分会心电图与临床神经电生理学组,等. 中国吉兰-巴雷综合征诊治指南 2019 [J]. 中华神经科杂志, 2019, 52(11): 877-882.
- [2] Malek E, Salameh J. Guillain-Barre Syndrome [J]. Semin Neurol, 2019, 39(5): 589-595.
- [3] Liu S, Dong C, Ubogu EE. Immunotherapy of Guillain-Barré syndrome [J]. Hum Vaccin Immunother, 2018, 14(11): 2568-2579.
- [4] 艾国, 雒真龙, 张志成, 等. 炎症相关细胞因子及趋化因子在小鼠自身免疫性肝损伤不同时期的表达及作用 [J]. 医学研究杂志, 2020, 49(2): 20-24.
- [5] 杨继涛, 王建亭, 谭利萍, 等. 白细胞介素 21 在自身免疫及炎症性疾病中的作用 [J]. 国际耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2019, 43(5): 295-299.

(下转第 706 页)

## TIF1- $\gamma$ 重组蛋白的表达及其在抗 TIF1- $\gamma$ 抗体 ELISA 检测方法中的初步应用

韩冠华<sup>1,2</sup> 林晓涛<sup>2</sup> 孟庆勇<sup>1</sup> 何林<sup>2</sup> 钱纯亘<sup>2</sup> 程邦宁<sup>2\*</sup> 徐军发<sup>1\*</sup>

**[摘要]** **目的** 通过基因工程技术制备转录中介因子 1- $\gamma$ (TIF1- $\gamma$ )重组蛋白并探讨其用于研制抗 TIF1- $\gamma$  抗体检测试剂的应用价值。**方法** 采用昆虫杆状病毒表达系统表达目的蛋白,并将重组目的蛋白作为包被抗原初步建立抗 TIF1- $\gamma$  IgG 抗体 ELISA 检测方法。**结果** 成功表达并纯化 TIF1- $\gamma$  重组蛋白。自建抗 TIF1- $\gamma$  IgG 抗体-ELISA 检测 21 例抗 TIF1- $\gamma$  IgG 抗体阳性样本,检出率为 100%;检测 44 例健康对照组和 25 例疾病对照组样本,特异性为 97.1%。**结论** 制备的 TIF1- $\gamma$  重组蛋白在研制体外诊断试剂方面有较好的应用前景,基于此重组蛋白初步建立的抗 TIF1- $\gamma$  IgG 抗体-ELISA 是一种特异和灵敏的血清学检测方法,对临床诊断和治疗皮炎患者有一定的应用价值。

**[关键词]** 转录中介因子 1- $\gamma$ ; 重组蛋白; 皮炎

### Expression of transcriptional intermediary factor 1-gamma recombinant protein and its application in ELISA for detection of anti-TIF1- $\gamma$ antibody

HAN Guanhua<sup>1,2</sup>, LIN Xiaotao<sup>2</sup>, MENG Qingyong<sup>1</sup>, HE Lin<sup>2</sup>, QIAN Chungen<sup>2</sup>, CHENG Bangning<sup>2\*</sup>, XU Junfa<sup>1\*</sup>  
(1. Institute of Laboratory Medicine, Guangdong Medical University, Dongguan, Guangdong, China, 523808;  
2. Shenzhen YHLO Biotech Co., Ltd, Shenzhen, Guangdong, China, 518000)

**[ABSTRACT]** **Objective** To prepare transcriptional intermediary factor 1-gamma (TIF1- $\gamma$ ) recombinant protein by genetic engineering technology and explore its application value in the development of anti-TIF1- $\gamma$  antibody detection reagent. **Methods** Insect baculovirus expression vector system was used to express the recombinant protein and the purified recombinant protein was used as the coated antigen in ELISA to detect anti-TIF1- $\gamma$  antibody. **Results** The TIF1- $\gamma$  recombinant protein was successfully expressed and purified. Anti-TIF1- $\gamma$  antibody-ELISA was used to detect 21 positive samples of anti-TIF1- $\gamma$  antibody, and the positive rate was 100%. The specificity in the healthy control group and disease control group was 97.1%. **Conclusion** The TIF1- $\gamma$  recombinant protein has a good application prospect in the development of in vitro diagnostic reagents. The anti-TIF1- $\gamma$  antibody-ELISA is a specific and sensitive serological detection method. It has certain application value for clinical diagnosis and treatment of patients with dermatomyositis.

**[KEY WORDS]** Transcriptional intermediary factor 1-gamma; ELISA; Dermatomyositis

特发性炎性肌病(idiopathic inflammatory myopathy, IIM)是一组以对称性四肢近端肌无力为特征表现的系统性自身免疫性结缔组织病,基于临床症状及免疫病理特征,可将其分为不同的亚型,临床上常见的亚型是皮炎(dermatomyositis,

DM)。随着研究的深入,陆续有学者发现 IIM 患者血清中存在特异性的自身抗体,且此类抗体与 IIM 患者的临床表现和预后相关,有助于指导临床医生为患者制定个体化的治疗方案<sup>[1-2]</sup>。其中抗转录中介因子 1- $\gamma$ (Transcriptional Intermediary Factor

基金项目:国家自然科学基金面上项目(81870016,81570009)

作者单位:1. 广东医科大学检验医学研究所,广东,东莞 523808

2. 深圳市亚辉龙生物科技股份有限公司,广东,深圳 518000

\*通信作者,徐军发, E-mail: xujunfa@gdmu.edu.cn; 程邦宁, E-mail: chengbangning@szyhlo.com

1-gamma, TIF1- $\gamma$ )抗体是TARGOFF等<sup>[3]</sup>于2006年通过免疫沉淀法(immunoprecipitation, IP)首次在肌炎患者血清中发现的一种自身抗体,后续的多项研究指出抗TIF1- $\gamma$ 抗体可作为监测DM患者继发性恶性肿瘤的生物标志物<sup>[4]</sup>。检测抗TIF1- $\gamma$ 抗体的金标准是IP,但由于该方法涉及培养及使用细胞,步骤繁琐,且需要使用放射性标记物,并不适用于临床检测。目前临床上检测抗TIF1- $\gamma$ 抗体最常用的是抗肌炎抗体谱IgG检测试剂盒(欧蒙印迹法),但基于不同方法学之间特异性和敏感度会存在一定差异,应结合临床症状和其它检测方法(如ELISA、化学发光法等)对检测结果进行综合分析<sup>[5-6]</sup>。基于上述背景,本研究将分析TIF1- $\gamma$ 重组蛋白作为诊断抗原的临床应用价值,为开发抗TIF1- $\gamma$  IgG抗体检测方法提供核心原料。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 仪器与试剂

DH10Bac感受态细胞、SF9细胞由本实验室保存;质粒提取试剂盒、脂质体转染试剂盒购自Thermo公司;Flag层析填料购自MBL公司;抗Flag标签鼠单克隆抗体购自康为世纪生物科技有限公司;封闭液、偶联物稳定剂、TMB底物购自湖州英创生物科技有限公司;鼠抗人IgG-HRP购自菲鹏生物股份有限公司;PCR仪、酶标仪为BioRad公司产品。

#### 1.1.2 标本来源

抗TIF1- $\gamma$  IgG抗体阳性血清21例,抗Jo-1 IgG抗体、抗Scl-70IgG抗体、抗双链DNA(dsDNA)抗体、类风湿因子(RF)和抗核抗体(ANA)各5例,共25例(疾病对照组)以及健康体检者血清44例(健康对照组),由本实验室收集并保存,均已分离血清并保存在-80℃冰箱。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 表达质粒pFastBac1-TIF1- $\gamma$ 的构建

从Uniprot数据库检索得到人TIF1- $\gamma$ 氨基酸序列(ID:Q9UPN9),按照昆虫杆状病毒表达系统偏好对TIF1- $\gamma$ 序列进行密码子优化,在C-端同时引入3×Flag序列,委托通用生物系统(安徽)有限公司合成。合成的TIF1- $\gamma$ 基因为3462 bp,其中5'端含BamHI酶切位点,3'端含XhoI酶切位点,经BamHI和XhoI双酶切后插入到pFastBac1载体,表达质粒经测序及双酶切鉴定确认构建的正确性。

#### 1.2.2 TIF1- $\gamma$ 重组蛋白的表达与纯化

将pFastBac1-TIF1- $\gamma$ 转化DH10Bac感受态细胞,使用LB琼脂平板(含50  $\mu$ g/mL卡那霉素、10  $\mu$ g/mL四环素、7  $\mu$ g/mL庆大霉素、100  $\mu$ g/mL X-gal和40  $\mu$ g/mL IPTG)进行蓝白斑筛选,分别挑取蓝斑和白斑扩大培养,培养物用于提取重组杆粒,具体操作参考质粒提取试剂盒说明书。使用M13 Forward/M13 Reverse引物对重组杆粒进行PCR鉴定。将鉴定正确的Bacmid-TIF1- $\gamma$ 转染至SF9细胞,27℃培养72 h,500 g离心15 min收集上清即为第一代重组病毒(P1);P1用于感染正常SF9细胞,扩增病毒得到P2;通过相同的方法得到P3,将P3加入到悬浮培养的SF9细胞,27℃,110 rpm培养72 h,收获细胞并进行离心和超声处理,收集细胞裂解液,通过Flag亲和层析柱进行纯化,收集表达产物进行SDS-PAGE和Western-Blot分析。

#### 1.2.3 抗TIF1- $\gamma$ IgG抗体-ELISA的建立

TIF1- $\gamma$ 重组蛋白包被96孔板(400 ng/孔),商品化封闭液封闭;血清按1:100稀释,每孔100  $\mu$ L,37℃孵育1 h;PBS-T洗板3次后加入1:10 000稀释的HRP标记的鼠抗人IgG,100  $\mu$ L每孔,37℃孵育30 min;再次清洗后,加入TMB底物,37℃孵育10 min;最后加入终止液,酶标仪读取OD值。

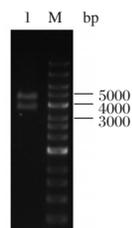
#### 1.2.4 统计学处理

使用SPSS 26.0统计分析软件对数据进行处理,通过绘制受试者工作特征曲线(receiver operation characteristic, ROC),确定自建抗TIF1- $\gamma$  IgG抗体-ELISA检测临界(cut-off)值。

## 2 结果

### 2.1 表达质粒pFastBac1-TIF1- $\gamma$ 的构建及鉴定

电泳结果显示出现两条特异性条带,其中一条位置约在3400 bp处为TIF1- $\gamma$ 基因,另一条位置约在4700 bp处为载体pFastBac1。见图1。



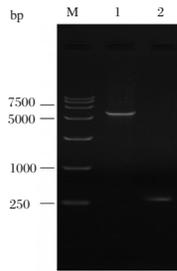
注:1为pFastBac1-TIF1- $\gamma$ 经BamHI/XhoI双酶切;M为DNA Marker。

图1 pFastBac1-TIF1- $\gamma$ 双酶切鉴定结果

Figure 1 Restriction enzyme identification of pFastBac1-TIF1- $\gamma$

### 2.2 重组杆粒 Bacmid-TIF1- $\gamma$ 的鉴定

已发生转座的 Bacmid-TIF1- $\gamma$  条带位置约在 5 700 bp 处,未发生转座的 Bacmid 条带位置约在 300 bp 处。见图 2。



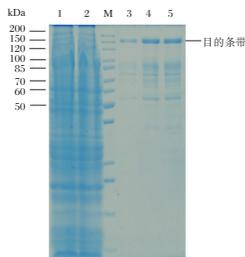
注:M为DNA Marker;1为Bacmid-TIF1- $\gamma$ ;2为阴性对照。

图2 Bacmid-TIF1- $\gamma$  扩增结果

Figure 2 PCR result of the Bacmid-TIF1- $\gamma$

### 2.3 TIF1- $\gamma$ 重组蛋白表达和纯化

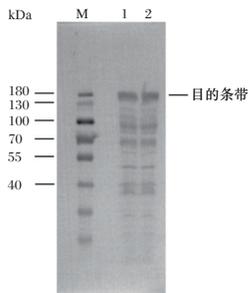
表达产物经 SDS-PAGE 分析,目的蛋白条带位置约在 150 kD 处。Western-Blot 结果显示,该目的条带能与抗 Flag 标签抗体特异性结合。见图 3~4。



注:1为未纯化样本;2为纯化穿透;M为蛋白分子量Marker;3-5为纯化样本。

图3 表达产物的 SDS-PAGE 分析

Figure 3 SDS-PAGE analysis of expression protein products



注:M为蛋白分子量Marker;1-2为纯化样本。

图4 TIF1- $\gamma$  重组蛋白 Western-Blot 检测

Figure 4 The detection of TIF1- $\gamma$  recombinant protein by Western Blot

### 2.4 抗 TIF1- $\gamma$ IgG 抗体-ELISA 检测结果

结果显示,OD 值=0.273 时约登指数最大,因此把 cut-off 值选定为 0.273,此时敏感度为 100%,特异性为 97.1%。见图 5。

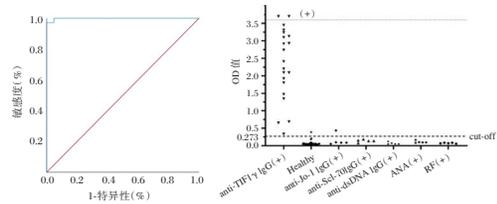


图5 抗 TIF1- $\gamma$  IgG 抗体-ELISA ROC 曲线

Figure 5 ROC curve of anti-TIF1- $\gamma$  antibody-ELISA

## 3 讨论

TIF1- $\gamma$  蛋白属于 TRIMs (Tripartite motif-containing) 家族蛋白,具有一个 RING 结构域,可作为泛素连接酶 E3 发挥作用,在肿瘤发生过程中扮演着重要的角色,如参与凋亡相关蛋白 P53 的调控、抑制 TGF- $\beta$  信号通路的活性等,推测这些蛋白的自身抗体可能是肿瘤发生过程中产生的,从而促进癌症的发生<sup>[7-8]</sup>。抗 TIF1- $\gamma$  抗体可作为监测 IIM 患者继发性恶性肿瘤的生物标志物。临床上对于抗 TIF1- $\gamma$  抗体阳性的 IIM 患者,应注意密切随访,及时进行相关的肿瘤检测。IP 被视为检测该类自身抗体的金标准,但它并不适用于常规的临床检测,面对不断增长的患者数量,建立有效、可靠、快速和简便的抗 TIF1- $\gamma$  抗体检测方法非常有必要。为了验证现有试剂的性能以及开发出更符合临床需求的抗 TIF1- $\gamma$  抗体检测试剂,Aggarwal 等<sup>[9]</sup>以 OriGene 公司的纯化全长 TIF1- $\gamma$  重组蛋白作为包被抗原建立了基于 ELISA 的抗 TIF1- $\gamma$  抗体的检测方法与 IP 进行比较,总体符合率为 93.9%,有高度的一致性( $\kappa=0.87$ )。Mahler 等<sup>[10]</sup>用欧蒙印迹法与 IP 共同测试一批 DM 患者血清,其中抗 TIF1- $\gamma$  抗体项目总体符合率为 94.9%, $\kappa=0.71$  ( $P < 0.05$ ),一致性较好。上述研究表明,以欧蒙抗肌炎抗体谱 IgG 检测试剂盒为代表的 IB 检测方法与金标准 IP 有较好的一致性,同样的,以 ELISA 为原理所建立的检测方法也有望替代 IP。

本研究测试过程中发现 2 例与欧蒙印迹法测试结果不符的样本,推测出现不符的原因有以下几点,一是包被抗原的纯度。本研究得到的重组蛋白经纯化后通过 SDS-PAGE 分析,存在较明显的非目的条带,猜测是目的蛋白降解产物,是否因此而产生了非特异性结合还有待验证。二是固相载体材料的不同。ELISA 和 IB 的固相材料分别为聚苯乙烯和硝酸纤维素膜,因此包被工艺可能会存在差异。如将蛋白包被在硝酸纤维素膜后,一般需要进行一定时间的烘干,此过程对蛋白的活性可能会造成一定的

影响,而蛋白质与酶标板的结合则是通过物理吸附作用,包被条件相对温和。三是反应体系的不同。封闭液和缓冲液的选择,如盐离子的浓度、表面活性剂的种类及用量、是否需要添加额外的蛋白成分或阻断剂等都有可能对测试结果产生影响。四是不同方法学之间特异性和敏感度会存在一定差异,且抗 TIF1- $\gamma$  IgG 抗体的检测目前没有可溯源的国际标准品,对于测试结果有存在争议的样本,应参考不同技术平台的检测结果并结合患者临床表现进行综合分析<sup>[11-12]</sup>。综合上述四个方面,后续需通过金标准或第三方 ELISA 试剂验证两例假阳性样本是否为“真阴性”。另外有文献报道,两种自身抗体各自对应的靶抗原(Mi-2 $\beta$  和 TIF1- $\gamma$ )有相似的氨基酸序列,抗 Mi-2 $\beta$  抗体会和 TIF1- $\gamma$  蛋白结合,出现交叉反应<sup>[13]</sup>。后续仍需收集并测试更多疾病对照组样本,探讨是否存在能与本研究制备的 TIF1- $\gamma$  重组蛋白结合的自身抗体,进一步评估自建 ELISA 的特异性。

综上所述,本研究得到的 TIF1- $\gamma$  重组蛋白在体外诊断试剂研发方面具有较好的应用前景,为开发抗 TIF1- $\gamma$  IgG 抗体检测方法提供了核心原料。基于此重组蛋白初步建立的抗 TIF1- $\gamma$  IgG 抗体-ELISA 是一种特异和灵敏的血清学检测方法,对临床诊断和治疗皮炎患者有一定的应用价值,可作为现有免疫印迹法试剂的良好补充。

## 参考文献

- [1] Betteridge Z, Mchugh N. Myositis-specific autoantibodies: an important tool to support diagnosis of myositis [J]. *J Int Med*, 2016, 280(1): 8-23.
- [2] 李珊珊,葛永鹏,杨阔波,等. 皮炎患者 427 例肌炎特异
- [3] Targoff IN, Mamirova G, Trieu EP, et al. A novel autoantibody to a 155-kd protein is associated with dermatomyositis [J]. *Arthritis rheumatism*, 2006, 54(11): 3682-3689.
- [4] Shimizu K, Kobayashi T, Kano M, et al. Anti-transcriptional intermediary factor 1- $\gamma$  antibody as a biomarker in patients with dermatomyositis [J]. *J Dermatol*, 2020, 47(1): 64-68.
- [5] Tansley SL, Snowball J, Pauling JD, et al. The promise, perceptions, and pitfalls of immunoassays for autoantibody testing in myositis [J]. *Arthr Res Ther*, 2020, 22(1): 117.
- [6] 李柳冰,刘晨曦,张艳芳,等. ELISA 法与免疫膜条法检测抗 MDA5 抗体、抗 TIF1 $\gamma$  抗体的比对分析 [J]. *国际检验医学杂志*, 2019, 40(9): 1028-1031.
- [7] Fujimoto M, Hamaguchi Y, Kaji K, et al. Myositis-specific anti-155/140 autoantibodies target transcription intermediary factor 1 family proteins [J]. *Arthr rheumat*, 2012, 64(2): 513-522.
- [8] 何志鑫,朱进,朱旭辉. TRIMs 家族蛋白在肝细胞癌中的研究进展 [J]. *临床肿瘤学杂志*, 2019, 24(10): 938-942.
- [9] Aggarwal R, Oddis CV, Goudeau D, et al. Anti-transcription intermediary factor 1-gamma autoantibody ELISA development and validation [J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2014, 53(3): 433-437.
- [10] Mahler M, Betteridge Z, Bentow C, et al. Comparison of Three Immunoassays for the Detection of Myositis Specific Antibodies [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 848.
- [11] 武永康,张乃丹,翟建昭. 自身抗体检测现状及展望 [J]. *国际检验医学杂志*, 2019, 40(11): 1368-1373.
- [12] Damoiseaux J, Vulsteke JB, Tseng CW, et al. Autoantibodies in idiopathic inflammatory myopathies: Clinical associations and laboratory evaluation by mono- and multispecific immunoassays [J]. *Autoimm Rev*, 2019, 18(3): 293-305.
- [13] Fujimoto M, Murakami A, Kurei S, et al. Enzyme-linked immunosorbent assays for detection of anti-transcriptional intermediary factor-1 gamma and anti-Mi-2 autoantibodies in dermatomyositis [J]. *J Dermatol Sci*, 2016, 84(3): 272-281.
- [6] Chen X, Deng R, Chi W, et al. IL-27 signaling deficiency develops Th17-enhanced Th2-dominant inflammation in murine allergic conjunctivitis model [J]. *Allergy*, 2019, 74(5): 910-921.
- [7] 单敏敏. 基于 STAT1 信号通路探讨哮喘宁颗粒对哮喘大鼠 Th1/Th2 免疫平衡的调节作用 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2019.
- [8] Willison HJ, Jacobs BC, van Doorn PA. Guillain-Barré syndrome [J]. *Lancet*, 2016, 388(10045): 717-727.
- [9] 景红萍,周玉. 不同 Hughes 评分格林巴利综合征患者电生理特点变化及预后价值分析 [J]. *医药论坛杂志*, 2020, 41(7): 120-123.
- [10] 王亚茹. IL-37 对变应性鼻炎患者相关细胞因子免疫调控研究 [J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2021, 13(1): 99-102+106.
- [11] Montes de Oca M, de Labastida Rivera F, Winterford C, et al. IL-27 signalling regulates glycolysis in Th1 cells to limit immunopathology during infection [J]. *PLoS Pathog*, 2020, 16(10): e1008994.
- [12] Zhang L, Zhang J, Su S, et al. Changes in interleukin-27 levels in patients with acute coronary syndrome and their clinical significance [J]. *PeerJ*, 2019, 7(1): e5652.
- [13] 司马宇彤,杜崑,王向东,等. 白细胞介素-19 和白细胞介素-27 在慢性鼻-鼻窦炎发病机制中的研究进展 [J]. *国际耳鼻喉头颈外科杂志*, 2020, 44(6): 359-363.
- [14] 陈亚琴,曹拥军. Th17 细胞及 IL-17 与类风湿关节炎关系研究进展 [J]. *现代中西医结合杂志*, 2019, 28(16): 1814-1818.

(上接第 702 页)

## 荧光PCR检测高血压用药相关基因多态性方法的建立

刘秀卿 李延武\* 黄磊

**[摘要]** **目的** 建立联合检测高血压用药相关基因多态性的荧光PCR检测方法。**方法** 针对 *CYP2D6\*10*、*CYP2C9\*3*、*ADRB1 (1165G>C)*、*AGTR1 (1166A>C)*、*ACE (I/D)* 突变位点分别设计特异性引物和探针,优化建立荧光PCR反应体系。验证该方法的敏感性、特异性、准确度、检出限、抗干扰能力。收集收集2017年6月至2019年1月本院EDTA-K<sub>2</sub>抗凝全血样本362例临床样本,分别用荧光PCR法、基因芯片法、测序法进行检测,以基因芯片法为对比方法,测序法为金标准,评价荧光PCR法的特异性和准确性。**结果** 建立的荧光PCR法对五个位点的检测CV值均小于5%,检出限分别为5、10、20、5、20 ng/μL。362例临床样本的检测方法与测序法的一致性为100%,敏感性、特异性、准确性均高于基因芯片法。**结论** 建立的联合检测高血压用药基因多态性的荧光PCR法具有很好的准确性、特异性、灵敏度和重复性,且操作简单、结果判读容易,可为高血压药物的临床使用提供参考。

**[关键词]** 高血压; 基因多态性; *CYP2D6*; *CYP2C9*; *ADRB1*; *AGTR1*; *ACE*

### Establishment of real-time PCR assay for detection of hypertension drug-related gene polymorphism

LIU Xiuqing, LI Yanwu\*, HUANG Lei

(Department of Laboratory Medicine, The Second People's Hospital of ShenZhen, ShenZhen, GuangDong, China, 518035)

**[ABSTRACT]** **Objective** To establish a real-time PCR assay for detecting drug-related genes polymorphism in hypertension. **Methods** A set of allele-specific PCR primers and probes were designed for *CYP2D6\*10*, *CYP2C9\*3*, *ADRB1 (1165G>C)*, *AGTR1 (1166A>C)*, *ACE (I/D)*. A real-time PCR reaction system was established and optimized. The accuracy, susceptibility, specificity and repeatability of the assay was evaluated. A total of 362 clinical samples of EDTA-K<sub>2</sub> anticoagulant whole blood samples from Shenzhen Second People's Hospital from June 2017 to January 2019 were collected, and tested with fluorescence PCR, gene chip method, and sequencing method respectively. The gene chip method was used as the comparison method, and the sequencing method was used as the gold standard to evaluate the specificity and accuracy of the fluorescent PCR method. **Results** The established fluorescence PCR method has detected CV values of less than 5% for the five loci, and the detection limits are 5, 10, 20, 5, 20 ng/μL. The consistency of the test results of 362 clinical samples with the sequencing method was 100%, and the sensitivity, specificity, and accuracy were higher than those of the gene chip method. **Conclusion** The established fluorescent PCR method for detecting gene polymorphisms of hypertension drugs has good accuracy, specificity, sensitivity and reproducibility, simple operation and easy interpretation of results, which can provide reference for the clinical use of hypertension drugs.

**[KEY WORDS]** Hypertension; polymorphism; *CYP2D6*; *CYP2C9*; *ADRB1*; *AGTR1*; *ACE*

药物代谢的遗传差异和药物作用靶点如受体的遗传多态性是影响个体对药物反应的主要因素。已明确与高血压药物治疗显著相关的基因主

要包括 *CYP2D6*、*CYP2C9*、*ADRB1*、*AGTR1*、*ACE* 等药物代谢酶及其受体<sup>[1-4]</sup>。其中在中国人群中有多态性意义的基因突变,包括 *CYP2D6\*10*、

作者单位:深圳市第二人民医院检验科,广东,深圳 518035

\*通信作者:李延武, E-mail: 13554769888@163.com

*CYP2C9\*3*、*ADRB1* (1165G>C)、*AGTR1* (1166A>C)、*ACE* (I/D) 等<sup>[5-7]</sup>。目前高血压用药基因检测主要有四种方法:测序、PCR-RFLP、基因芯片和PCR-熔解曲线。前三者操作繁琐,费时费力,难以满足临床常规检测需求,而PCR-熔解曲线的特异性及结果判断的简易程度不及荧光PCR。荧光PCR具有高灵敏度、高特异性、操作简便、结果判断简单等特点,便于临床常规检测。本研究旨在建立一种简单、准确的荧光PCR法,检测*CYP2D6\*10*、*CYP2C9\*3*、*ADRB1* (1165G>C)、*AGTR1* (1166A>C)、*ACE* (I/D) 位点的多态性,为高血压药物临床使用提供参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 标本来源

收集2017年6月至2019年1月本院EDTA-K<sub>2</sub>抗凝全血样本362份(含高血压93例)。纳入标准:已完成高血压基因芯片检测的住院患者。排除标准:①既往有精神病、血液病、肿瘤病史患者;②无法完成检测的样本;③所有患者彼此无亲缘关系。经深圳市第二人民医院伦理委员会批准,使用已完成检测的剩余样本,故豁免知情同意。

#### 1.1.2 试剂和主要仪器

深圳菲鹏10×Taq buffer(Mg<sup>2+</sup> plus)、25 mmol/L dNTP(含dUTP)、HS-Taq Ex(5 U/μL)、UNG酶、江苏康为世纪核酸提取试剂(50326)、湖南宏灏高血压基因芯片检测试剂(201811001);深圳亚能YN-16杂交仪、美国美谷Genepix 4100A生物芯片扫描仪、杭州博日FQD-96A荧光PCR仪、德国Implen P-330-31超微量分光光度计。

### 1.2 方法

提取标本DNA置-70℃冰箱保存待用。引物探针设计用Primer Premier 5.0及Primer Express 3.0软件设计引物和探针组。见表1。

PCR扩增产物送至赛默飞世尔科技广州测序中心进行双向序列测定。基因芯片检测操作参照仪器和试剂说明书。

荧光PCR反应:分5管进行。反应体系20 μL,包括Taq Buffer 2 μL, HS-Taq Ex 0.2 μL, UNG酶0.05 μL, dNTP 2 μL, 10 μmol/L引物对及探针各0.2 μL; DNA 1.5 μL, ddH<sub>2</sub>O 13.45 μL。循环参数:37℃ 10 min; 95℃ 5 min; 95℃ 15 s, 60℃ 30 s, 共40个循环,在延伸阶段60℃收集荧光信号。见表2。

表1 引物和探针

Table 1 Primers and probes

位点编号	引物	引物、探针序列(5'→3')
<i>CYP2C9*3</i> <i>rs1057910</i>	测序组	TCATATACCCCTGAATTGCTACA CCAGAAATTCCAGCCCAA
	荧光组	GCCACATGCCCTACACAGATG GCAGTGTAGGAGAAACAACTTACCTT
	WP	FAM-TCCAGAGATACCTTGAC-MGB
	MP	VIC-TCCAGAGATACATTGAC-MGB
<i>ADRB1</i> <i>rs1801253</i>	测序组	CGACCGCCTCTTCGTCT CTTTTCTCTTTGCCTCGGAT
	荧光组	CCTTCAACCCCATCATCTACTGC CCGGGCCAGACAGCC
	MP	FAM-CCTTCCAGCGATGC-MGB
	WP	VIC-CCTTCCAGGGACTGC-MGB
<i>AGTR1</i> <i>rs5186</i>	测序组	GTATTGATTCAACTAGGCATCATAACG GTACAAAATGTGCAGTACCAGGTG
	荧光组	CCTCTGCAGCACTTCACTACCA ATGCATTTTCTCCTTCAATTCTGA
	WP	FAM-AATGAGCCTTAGCTACTT-MGB
	MP	VIC-AATGAGCATTAGCTACTTT-MGB
<i>CYP2D6*10</i> <i>rs1065852</i>	测序组	ACTGGCAGCACAGTCAACACA GAAAATCCAGTCCTTACGCA
	荧光组	TGCTCCTGGTGGACCTGATG TCCACATGCAGCAGGTTGC
	WP	FAM-CTGCACGCTACTCA-MGB
	MP	VIC-CTGCACGCTACCCA-MGB
<i>ACE</i> <i>rs4340</i>	测序组	CATGCCTGTAGTCCTAGCTGC GGATCTACCTTTTCTAGGCTTG CTTAGCTCACCTCTGCTTGAAGG ATCTCCTGACCTCGTGATCCG
	荧光组	ACTCCCATCCTTCTCCCATTT IP VIC-GTGTGGGATTACAGGCGTGA DP TACAGTCA -BHQ1 FAM-GCCTATACAGTCACTTTTA TGTGGTTTCGCC-BHQ1
	IP	VIC-GTGTGGGATTACAGGCGTGA
	DP	TACAGTCA -BHQ1

注:FAM为羧基荧光素、VIC为六氯荧光素、MGB为Minor Groove Binder、BHQ1为黑洞淬灭基团1。

表2 荧光PCR结果判读

Table 2 Results interpretation of fluorescence PCR

基因种类	基因型	FAM通道 (Ct值)	VIC通道 (Ct值)
<i>CYP2C9</i> 、 <i>AGTR1</i> 、 <i>CYP2D6</i>	野生型(W)	≤34	≥38或无
	杂合型(H)	≤34	≤34
	突变型(M)	≥38或无	≤34
<i>ADRB1</i> 、 <i>ACE</i>	野生型(W)/插入型(I)	≥38或无	≤34
	杂合型(H)	≤34	≤34
	突变型(M)/缺失型(D)	≤34	≥38或无

性能评价:检出限:将各位点H型、W型、M型的核酸用TE缓冲液分别稀释至50、30、20、10和5 ng/μL,用荧光PCR检测3次,型别正确即符合。重复性:稀释至20 ng/μL分3批检测,每批检测8次,计算FAM和VIC通道Ct平均值、标准差和变异系数,CV<5%为合格。抗干扰能力:分别加入3 200 mg/dL甘油三酯、200 g/dL血红蛋白、150 mg/dL胆

红素、2倍治疗浓度的高血压常用药物,共90个样本。提取后检测。临床样本检测及准确度:用三种方法分别检测362例样本。

### 1.3 统计学方法

采用SPSS 19.0数据分析;采用四格表分析,与基因芯片法相比,评价荧光PCR法的符合率、特异性并进行配对卡方检验;与测序法相比,评价荧光PCR法的符合率、准确性并进行配对卡方检验;以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 检出限

结果显示20 ng/ $\mu$ L的样本3次检测均型别正确。*CYP2C9*\*3 5 ng/ $\mu$ L和*ADRB1* (1165G>C) 10 ng/ $\mu$ L H型样本FAM通道均只有2次有扩增;*ACE* (I/D) 10 ng/ $\mu$ L H型样本FAM和VIC通道都只有2次有扩增。见图1。

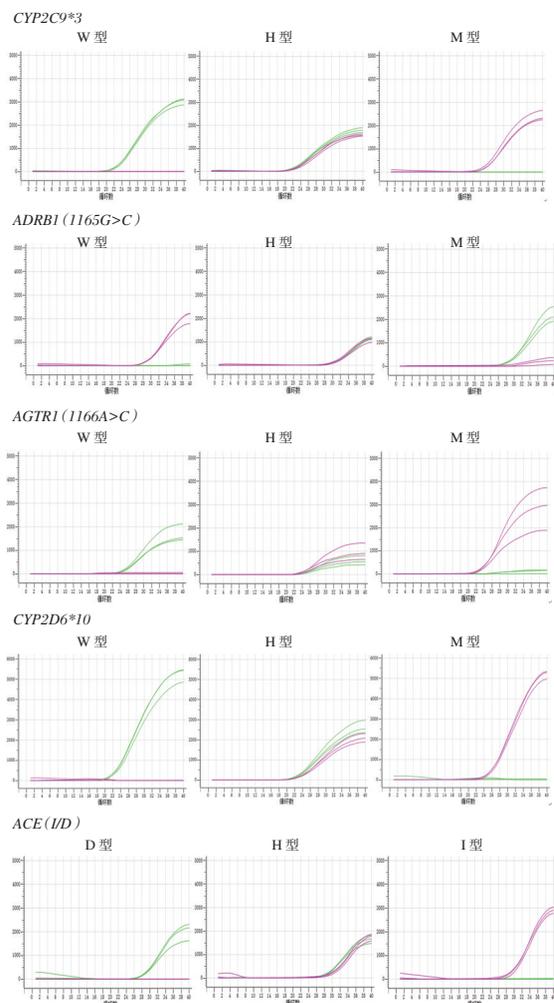


图1 荧光PCR检测结果

Figure 1 The results real-time PCR

### 2.2 重复性

H型、W型、M型批内差及批间差均小于5%。见表3。

表3 重复性检测结果(%)

Table 3 Repeatability test results (%)

基因型		批次1 CV	批次2 CV	批次3 CV	批间差 CV
<i>CYP2C9</i>	W FAM	0.79	1.78	3.87	2.47
	H FAM	1.23	2.04	3.38	2.33
	VIC	1.47	1.98	3.76	2.54
<i>ADRB1</i>	M VIC	1.23	3.88	0.37	2.40
	W VIC	1.68	0.78	1.25	2.79
	H FAM	0.64	0.64	0.95	2.42
<i>AGTR1</i>	VIC	0.72	0.76	0.95	2.54
	M FAM	0.71	0.77	0.90	1.19
	W FAM	1.43	1.27	1.23	1.43
<i>CYP2D6</i>	H FAM	1.25	2.66	1.82	1.25
	VIC	0.92	2.84	1.52	0.92
	M VIC	2.10	0.94	0.89	2.10
<i>ACE</i>	W FAM	1.75	1.39	1.05	1.37
	H FAM	0.54	1.19	4.11	3.08
	VIC	0.74	1.01	4.16	3.20
<i>ADRB1</i>	M VIC	0.83	0.68	0.61	0.69
	D FAM	0.73	0.98	1.51	1.49
	H FAM	0.78	0.54	1.25	2.57
<i>ACE</i>	VIC	0.99	2.30	1.62	3.06
	I VIC	0.29	1.01	1.26	2.38

### 2.3 抗干扰能力

所有加入干扰物质的样本检测CT值与原始样本CT值的差值均在1个CT值以内。见表4。

### 2.4 临床样本验证与准确性

其中有5例*CYP2D6*\*10荧光PCR为W型而基因芯片为H型,另各1例荧光PCR为H型和M型而基因芯片为M型和H型;还有3例*ACE*(I/D)荧光PCR为W型而基因芯片为H型;荧光PCR基因分型与测序结果完全一致,符合率100%,见表5。各位点测序图见图2。362例样本分高血压和非高血压组,基因型分布。见表6。

## 3 讨论

*CYP2D6*\*10多态性可影响美托洛尔、卡维地洛等药物在体内的代谢过程<sup>[8]</sup>;*CYP2C9*\*3能降低依贝沙坦、甲苯磺丁脲等药物的体内清除率<sup>[1]</sup>;*ADRB1*是 $\beta_1$ 肾上腺素受体类药物的作用靶点,会影响药物疗效;*AGTR1* (1166A>C)能影响肾素-血管紧张素-醛固酮系统抑制剂类药物的疗效<sup>[9]</sup>;*ACE* (I/D)能影响ACE抑制剂和 $\beta$ 受体拮抗剂类药物的效应<sup>[10-11]</sup>。基因检测能让医生了解患者对不同降压药物的疗效反应及毒性,更好地进行个性化治疗。因此临床急需建立一种快速简便可以

表4 抗干扰能力检测结果

Table 4 Test results of anti-interference ability

样本类型		甘油三酯	血红蛋白	胆红素	厄贝沙坦	阿替洛尔	依那普利片
CYP2C9	W	FAM 0.12	-0.18	0.04	0.18	0	0.37
	H	FAM -0.17	-0.24	0.05	0.58	-0.43	-0.37
		VIC 0.6	-0.19	0.15	0.95	-0.12	0.49
ADRB1	M	VIC 0.58	1	0.64	0.03	0.53	-0.13
	W	VIC -0.02	-0.03	0	0.07	-0.86	0.25
	H	FAM -0.55	-0.58	-0.6	-0.07	0.11	0.32
VIC 0.26		-0.42	-0.17	-0.32	0.03	0.26	
AGTR1	M	FAM 0.1	0.13	0.12	-0.17	0.07	0.14
	W	FAM 0.29	0.24	0.66	-0.19	0.4	0.81
	H	FAM 0.01	0.16	0.67	0.47	0.75	0.15
VIC 0.68		0.29	0.7	0.33	0.35	-0.05	
CYP2D6	M	VIC 0.1	0.19	0.12	0.51	0.39	0.54
	W	FAM 0.59	0.42	-0.75	-0.89	0.83	-0.94
	H	FAM 0.74	0.77	0.48	0.27	-0.03	0.53
VIC -0.73		-0.18	0.45	-0.37	-0.61	-0.36	
ACE	M	VIC 0.6	-0.04	0.1	0.44	0.13	-0.57
	I	VIC 0.08	-0.01	0.02	0	0.1	-0.13
	H	FAM 0.31	0.26	0.68	-0.17	0.42	0.83
VIC 0.16		0.25	0.18	0.57	0.6	0.06	
D	FAM 0.23	-0.5	0.27	-0.61	-0.55	-0.91	

表5 3种检测方法检测结果对比分析

Table 5 Comparative Analysis of the results of three detection methods

基因	荧光PCR法A	基因芯片法B	测序法C	AvsB			AvsC			
				符合率(%)	$\chi^2$ 值	P值	符合率(%)	$\chi^2$ 值	P值	
CYP2C9*3	W	324	324	324	100	0.00	1.00	100	0.00	1.00
	H	37	37	37	100	0.00	1.00	100	0.00	1.00
	M	1	1	1	100	0.00	1.00	100	0.00	1.00
ADRB1	W	23	23	23	100	0.00	1.00	100	0.00	1.00
	H	124	124	124	100	0.00	1.00	100	0.00	1.00
	M	215	215	215	100	0.00	1.00	100	0.00	1.00
AGTR1	W	334	334	334	100	0.00	1.00	100	0.00	1.00
	H	26	26	26	100	0.00	1.00	100	0.00	1.00
	M	2	2	2	100	0.00	1.00	100	0.00	1.00
CYP2D6*10	W	96	91	96	98.62	3.20	0.063	100	0.00	1.00
	H	152	157	152	98.07	2.29	0.125	100	0.00	1.00
	M	114	114	114	99.45	0.50	1.00	100	0.00	1.00
ACE	I	169	166	169	99.17	1.33	0.250	100	0.00	1.00
	H	148	151	148	99.17	1.33	0.250	100	0.00	1.00
	D	45	45	45	100	0.00	1.00	100	0.00	1.00

表6 高血压组和非高血压组各基因分布

Table 6 Distribution of genes in hypertension group and non hypertension group

基因	高血压组(n=93)			非高血压组(n=269)		
	W	H	M	W	H	M
CYP2C9*3	86	7	0	238	30	1
ADRB1	5	21	67	18	103	148
AGTR1	86	6	1	248	20	1
CYP2D6*10	22	43	28	74	109	86
ACE	40	40	13	129	108	32

联合检测高血压用药相关基因的方法。

荧光PCR法对362例临床样本进行检测,总体CYP2C9\*3、ADRB1(1165G>C)、AGTR1(1166A>C)的基因型分布与张欣然等人的文献报

道一致<sup>[12]</sup>;而CYP2D6\*10和ACE(I/D)的基因型分布与赵杰娉等人的报道不太一致<sup>[13]</sup>,这与选取特定样本的分组有关。本实验结果与李俊萍<sup>[14]</sup>等对石家庄汉族人群的ADRB1基因多态性研究结果相一致,这提示ADRB1基因中C等位基因有可能是高血压的易感基因。

荧光PCR检测CYP2C9\*3、ADRB1和AGTR1与基因芯片100%符合,CYP2D6\*10、ACE的基因型符合率分别是98.07%、99.17%,检测结果无统计学差异。以Sanger测序为金标准,荧光PCR法的准确性、特异性、敏感性均为100%,证实了荧光PCR法的准确性高于基因芯片法。准确荧光定

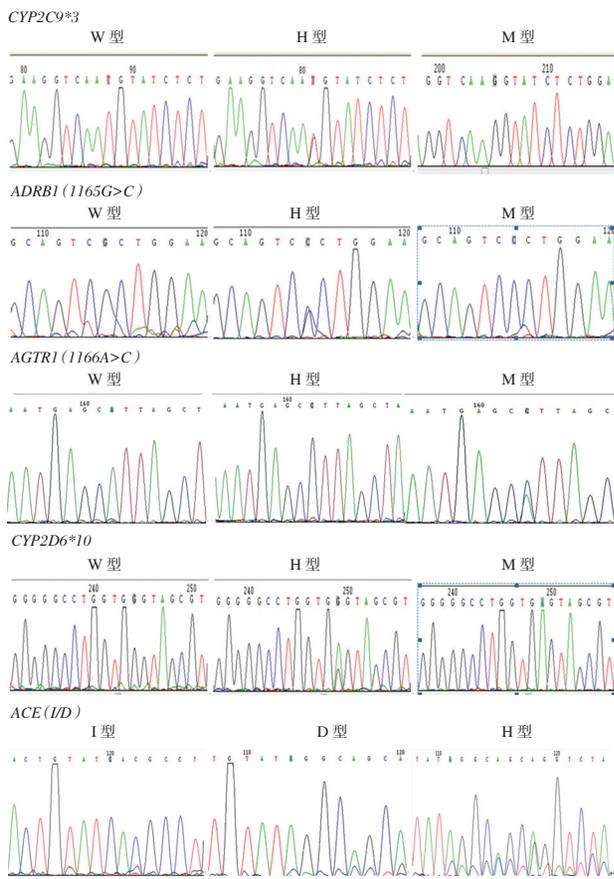


图2 测序结果

Figure 2 Sequencing results

定参数,均会影响基因芯片结果判定。此外,ACE 3例插入型基因芯片为杂合型,可能由于插入型和缺失型有一段高度相似的序列导致;CYP2D6\*10有7例基因芯片与测序不一致,也可能CYP2D6\*1/\*10存在小概率突变<sup>[15]</sup>。荧光PCR亦证实CYP2D6杂合子分型中C:T存在1:1、1:2、1:3的现象,但VIC信号值不会低于FAM 1/2。无论是Sanger测序、基因芯片还是荧光PCR,前期处理大致相同,前二者需后处理费时费力,而荧光PCR操作简单、准确率高、特异性强、重复性好、省时快速且结果判读容易,能更好的服务病人与临床。当然荧光PCR也有局限性,只可检测已知的SNP位点而不能发现未知的SNP位点<sup>[16]</sup>。

综上所述,荧光PCR法能够快速准确对患者高血压相关的功能意义明确且发生频率较高的基因突变进行分型,如果能够扩大样本量并且进行多中心临床验证,它将具有广阔的应用前景。

### 参考文献

[1] 代留玲,茶春丽,李靖娟,等. CYP2D6基因多态性对慢性

肾脏疾病合并高血压患者使用美托洛尔疗效的影响[J]. 临床医学, 2017, 30(6): 48-50.

[2] Chang Ik Choi, Mi Jeong Kim, Eun Kyung Chung, et al. CYP2C9\*3 and \*13 alleles significantly affect the pharmacokinetics of irbesartan in healthy Korean subjects [J]. Eur J Clin Pharmacol, 2012, 68(2): 149-154.

[3] Sun YX, Liao YH, Yuan Y, et al. Influence of autoantibodies against AT1 receptor and AGTR1 polymorphisms on candesartan - based antihypertensive regimen Results from the Study of Optimal Treatment in Hypertensive Patients with Anti-AT1-Receptor Autoantibodies trial [J]. J Am Soc Hypertens, 2014, 8(1): 21-27.

[4] Stavroulakis GA, Makris TK, Krespi PG, et al. Predicting Response to Chronic Antihypertensive Treatment with Fosinopril: The Role of Angiotensin-Converting Enzyme Gene Polymorphism[J]. Cardiovasc Drugs Ther, 2000, 14(4): 427-432.

[5] 张峰,杨军,李莉.  $\beta$ 1受体基因和药物代谢酶CYP2D6\*10与高血压病基因导向治疗的相关性研究[J]. 心血管康复医学杂志, 2013, 22(6): 629-631.

[6] Hong XM, Zhang SC, Mao GY, et al. CYP2C9\*3 allelic variant is associated with metabolism of irbesartan in Chinese population[J]. Eur J Clin Pharmacol, 2005, 61(9): 627-634.

[7] 陈文,朱旭明. 血管紧张素转化酶插入/缺失基因多态性与抗高血压药疗效关系的meta分析[J]. 现代检验医学杂志, 2017, 32(2): 67-74.

[8] 杨军,王爽,董天崴,等. CYP2D6\*10基因多态性与美托洛尔治疗高血压疗效的关系[J]. 心血管康复医学杂志, 2014, 23(2): 155-159.

[9] 张玲,曾定尹. 高血压患者AT1R基因多态性与药物降压关系[J]. 中国公共卫生, 2007, 23(12): 1514-1515.

[10] 黄红,陈波,李燕,等. 云南汉族原发性高血压ACE基因多态性与厄贝沙坦降压疗效相关性[J]. 昆明医科大学学报, 2016, 37(7): 40-43.

[11] 谷兰平,徐新娟,张荣秀. 新疆维吾尔族、哈萨克族高血压患者血管紧张素转换酶基因I/D多态性与血管紧张素转化酶抑制剂降压疗效的关系[J]. 中华诊断学电子杂志, 2017, 5(4): 225-229.

[12] 张欣然,杨军,荆洪英,等. 血管紧张素II-1受体基因多态性在佳木斯地区高血压患者中的分布[J]. 黑龙江医药科学, 2017, 40(4): 65-67.

[13] 赵杰娉,崔天祥,方慧玲. 高血压子代人群中血管紧张素转换酶等位基因分布研究[J]. 中国实用神经疾病杂志, 2014, 17(16): 79-80.

[14] 李俊萍,郭晓华,郑玉云,等.  $\beta$ 1肾上腺素能受体Gly389Arg多态性与原发性高血压的关系[J]. 国际心血管病杂志, 2006, 33(4): 275-277.

[15] Hosono N, Kato M, Kiyotani K, et al. CYP2D6 Genotyping for Functional-Gene Dosage Analysis by Allele Copy Number Detection[J]. Clin Chem, 2009, 55(8): 1546-1554.

[16] 戎国栋,沈丹婷,陈丹,等. 基于荧光定量PCR技术的人类CYP2C9和VKORC1基因多态性检测方法学评价[J]. 临床与病理杂志, 2017, 37(11): 2357-2362.

## 惠州地区EV71疫苗接种水平与手足口病病原学分析

杨坤祥<sup>1</sup> 黄彬<sup>2\*</sup>

**[摘要]** **目的** 了解惠州市肠道病毒EV71型(EV71)灭活疫苗接种水平及接种前后手足口病的病原学情况。**方法** 以2014年1月至2018年12月五年间本院收治的4 692例手足口病住院病例为研究对象,采集每位患儿肛拭子标本,采用实时荧光定量PCR方法检测肠道病毒核酸。**结果** 2014至2018年惠州市手足口病每年发病率分别为636/10万、601/10万、555/10万、607/10万和478.52/10万。2017至2018年惠州市EV71疫苗估算接种率分别为8.82%和14.52%,有显著提升。疫苗接种前轻症组肠道病毒71型(EV71)构成比为6.97%;重症组构成比为27.73%。疫苗接种后未接种疫苗轻症组EV71构成比为21.95%;未接种疫苗重症组的构成比为14.83%;已接种疫苗轻症组的构成比为0.00%;已接种疫苗重症组的构成比为0.00%。**结论** 2014至2018年惠州市手足口病发病率居高不下,EV71疫苗接种率有待提高。EV71型灭活疫苗的接种能有效降低儿童EV71感染手足口病的发病率。

**[关键词]** 手足口病;EV71疫苗;病原学

### Inoculation of enterovirus 71 vaccine and pathogen analysis of hand-foot-mouth disease in Huizhou

YANG Kunxiang<sup>1</sup>, HUANG Bin<sup>2\*</sup>

(1. Huizhou First Women and Children's Hospital, Huizhou, Guangdong, China, 516003; 2. Department of Laboratory Medicine, The first affiliated hospital of Sun Yat-sen university, Guangzhou, Guangdong, China, 510080)

**[ABSTRACT]** **Objective** To analyze the inoculation of enterovirus 71 (EV71) inactivated vaccine and pathogen characteristics of hand-foot-mouth disease (HFMD) in Huizhou. **Methods** A total of 4692 patients with severe HFMD admitted to in Huizhou children's hospital from January 2014 to December 2018 were selected as study subjects. The anal swabs of the children were collected, and the enterovirus RNA was extracted. The enterovirus nucleic acid was detected by real-time fluorescence quantitative PCR. **Results** From 2014 to 2018, the annual incidence of HFMD in Huizhou was 636/100 000, 600/100 000, 555/100 000, 606/100 000 and 478/100 000, respectively. The estimated EV71 vaccination rate in Huizhou from 2017 to 2018 was 8.82% and 14.52%, with a significant increase. Before vaccination, the proportion of EV71 was 6.97% and 27.73%, respectively in the mild group and severe group. After vaccination, the proportion of EV71 of the unvaccinated was 21.95% and 14.83%, the proportion of EV71 of the vaccinated was 0.00% and 0.00%, respectively in the mild group and the severe group. **Conclusion** From 2014 to 2018, the incidence of HFMD in Huizhou remained high, and the EV71 vaccination rate needs to be improved. The vaccination of the inactivated EV71 vaccine can effectively reduce the incidence of EV71 infection in children with HFMD.

**[KEY WORDS]** Hand-foot-mouth disease; Enterovirus 71 vaccine; Pathogen

基金项目:广东省医学科研基金立项项目(A2018231)

作者单位:1. 惠州市第一妇幼保健院,广东,惠州 516003

2. 中山大学附属第一医院检验科,广东,广州 510080

\*通信作者:黄彬, E-mail:hb906@163.com

手足口病(hand-foot-mouth disease, HFMD)是由肠道病毒(Enterovirus, EV)感染引起的一种儿童传染病<sup>[1]</sup>。2008年5月,卫生部将手足口病纳入法定报告的丙类传染病<sup>[1]</sup>。引起手足口病的主要肠道病毒类型有肠道病毒71型(Enterovirus71, EV71)、柯萨奇病毒A组6型、10型和16型(CoxsackievirusA, CA6, CA10, CA16)等,而EV71是近年来引起婴幼儿手足口病重症和死亡的主要病原体<sup>[2]</sup>。目前对EV71感染尚缺乏有效抗病毒药物,预防性疫苗接种是控制EV71感染引起手足口病最有效的方法<sup>[3]</sup>。2016年底惠州市正式启动EV71灭活疫苗接种。本研究通过分析惠州市近五年的手足口病发病率和EV71疫苗接种率,结合本院EV71疫苗接种前后时间段的手足口病病例的病原学特征,初步了解EV71疫苗接种对手足口病流行的影响,为制定疫苗接种策略提供依据。

## 1 资料与方法

### 1.1 病例来源

①手足口病发病资料:惠州市各级医疗机构通过“中国疾病监测报告信息系统”报告的2014~2018年全市手足口病病例资料;②EV71灭活疫苗接种资料从“中国免疫规划信息管理系统”中提取2017年1月至2018年12月广东省惠州市每月报告的EV71灭活疫苗接种情况报表资料;③2014年1月至2018年12月五年间本院手足口病专科收治的4692例手足口病住院患儿,根据广东省医疗机构病案统计管理系统的住院病案首页的诊断,病例分型为“危重”的划分为“重症组”;病例分型为“一般”的划分为“轻症组”;根据接种时间段分为疫苗接种前(2014年至2016年)和疫苗接种后(2017年至2018年)。

### 1.2 EV71疫苗接种率估算方法

根据疫苗接种报表资料中的EV71疫苗接种剂次数,假设平均接种剂次为两剂,将报告接种剂次数(n)除以2,得到报告接种数(a);然后用报告接种数除以6月龄~5岁儿童应接种人数(b),得到估算接种率(f)。估算公式为: $a=n/2$ ,  $f=a/b$ 。

### 1.3 标本采集

肠道病毒核酸检测标本为入院24h内采集的患儿肛拭子标本。常规消毒后采用无菌聚酯纤维塑料柄拭子插入患儿肛门2~3cm,自肛门周围皱襞处拭取,或在肛门内轻轻旋转涂擦,然后将拭

子装入加有1mL生理盐水的无菌拭子采集管中。

### 1.4 仪器和方法

仪器为ABI 7500型实时荧光定量PCR基因扩增仪(ABI,美国);肠道病毒核酸检测系列试剂盒(EV71型、CA16型、通用肠道病毒型)由中山大学达安基因股份有限公司提供。

### 1.5 病毒核酸提取和荧光定量PCR检测

样本核酸提取采用中山大学达安基因股份有限公司生产的核酸提取试剂盒(离心柱法),具体操作步骤和完全按照试剂盒说明书指引进行。扩增反应体系和结果判读按照肠道病毒EV71/CA16/EVs核酸检测系列试剂盒说明书操作和设置,每次试验均检测空白对照、阴性质控品和阳性质控品,满足质量控制要求时才进行检测结果的判定。

### 1.6 统计学分析

应用SPSS 20.0软件进行分析,计数资料用 $n(\%)$ 表示,不同肠道病毒和不同年份间的比较采用 $\chi^2$ 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 手足口病发病率

2014至2018年惠州市手足口病每年报告发病人数分别为29590、28160、26397、28961和22859例,发病率分别为636/10万、601/10万、556/10万、607/10万和479/10万。见图1。



图1 2014~2018年惠州市手足口病发病率情况

Figure 1 The incidence of HFMD from 2014 to 2018 in Huizhou

### 2.2 EV71疫苗估算接种率

2017年1至12月,惠州市共报告EV71疫苗接种剂次数为78896人次,每百名儿童(6月龄~5岁)接种剂次数为17.64人次,估算接种率为8.82%。2018年1至12月,惠州市共报告EV71疫苗接种剂次数为130675人次,每百名儿童(6月龄~5岁)接种剂次数为29.04人次,估算接种率为14.52%。

### 2.3 EV71疫苗接种前后肠道病毒的构成比较

EV71疫苗接种前后肠道病毒构成情况和统计学结果见表1~2。

表1 EV71疫苗接种前后肠道病毒构成情况 [n(%)]

Table 1 Enterovirus composition before and after EV71 vaccination [n(%)]

组别	是否接种	HFMD 例数(EV 阳性数)	阳性率(%)	病原例数		
				EV71	CA16	EVs
轻症组	2014~2016 接种前	1 218(760)	62.40	53(6.97)	141(18.56)	566(74.47)
	2017~2018 未接种	579(328)	56.65	72(21.95)	58(17.68)	198(60.37)
	2017~2018 已接种	133(90)	67.67	0(0.00)	12(13.33)	78(86.67)
重症组	2014~2016 接种前	1 419(1 190)	83.86	330(27.73)	147(12.35)	713(59.92)
	2017~2018 未接种	1 173(1 005)	85.68	149(14.83)	65(6.47)	791(78.71)
	2017~2018 已接种	170(130)	76.47	0(0.00)	17(13.08)	113(86.92)

表2 EV71疫苗接种前后肠道病毒构成情况统计学比较

Table 2 Statistical comparison of Enterovirus composition before and after EV71 vaccination

组别比较	轻症组		重症组	
	$\chi^2$ 值	P值	$\chi^2$ 值	P值
接种前EV71与未接种EV71	50.54	<0.01	53.16	<0.01
接种前EV71与已接种EV71	6.69	<0.01	48.07	<0.01
接种前CA16与未接种CA16	0.12	>0.05	21.63	<0.01
接种前CA16与已接种CA16	1.49	>0.05	0.06	>0.05
接种前EVs与未接种EVs	2.53	>0.05	1.23	>0.05
接种前EVs与已接种EVs	1.89	>0.05	2.28	>0.05
未接种EV71与已接种EV71	23.87	<0.01	22.19	<0.01
未接种CA16与已接种CA16	0.96	>0.05	7.50	<0.01
未接种EVs与已接种EVs	4.67	<0.05	0.10	>0.05

### 3 讨论

EV71灭活疫苗作为我国自主研发的疫苗,且生产企业有好几家<sup>[4-5]</sup>,疫苗上市后的使用情况及对传染病的防控效果值得我们高度关注。本研究显示。惠州市2014至2017年的手足口病发病率每年均在500/10万以上。2018年发病率则降低一些,为479/10万,高于全国2008至2017年年平均发病率(135/10万)<sup>[6]</sup>,也高于榆林地区2014至2018年手足口病的年平均发病率(167/10万)<sup>[7]</sup>,比广东省2016至2017年的年发病水平也高(356/10万)<sup>[8]</sup>。说明惠州地区是手足口病的高发区,对肠道病毒的监测和EV71疫苗的接种非常有必要。惠州市自2016年底启动EV71疫苗接种以来,2017年手足口病发病率并没有下降,反而小幅度升高。原因可能跟2017年惠州市CA6型肠道病毒大流行有关<sup>[9-10]</sup>。

本研究显示,惠州市2017年的EV71疫苗估算接种率仅为8.82%,低于广东省2017年的平均接种率(10.07%)<sup>[11]</sup>,比深圳市(19.76%)<sup>[11]</sup>和中山市(14.49%)<sup>[11]</sup>等省内城市都低,而汕头市接种率仅为1.39%<sup>[11]</sup>,提示社会经济发展水平和育儿观念对第二类疫苗使用量有较大的影响<sup>[12]</sup>。到了2018年,惠州市的EV71疫苗估算接种率上升到

14.52%,较之前有较大程度的提升,说明家长们通过朋友或亲戚同事有同龄小孩的交流发现,接种EV71疫苗确实减少发病,从而对EV71疫苗接受程度逐渐增加<sup>[13]</sup>。增加对EV71疫苗接种实例的宣传,或者鼓励接种过EV71疫苗的儿童家长向有需要的人群推荐可以提高EV71疫苗的接种率。

本研究结果说明接种EV71型灭活疫苗,有助于适龄儿童产生抗体而得到有效的保护,从而减少感染EV71型肠道病毒引起的手足口病的发生。即使感染上EV71型肠道病毒,也会因为接种过疫苗产生抗体而使病情减轻,从而达到有效的防治。国内的研究显示<sup>[14-15]</sup>,接种两次EV71型灭活疫苗接种后28d,检测血清抗体阳转率为88.1%~91.7%,对EV71感染相关手足口病的保护效力达90%以上。所以EV71型灭活疫苗的接种有效降低儿童EV71感染手足口病的发病率,尤其在减少手足口病的重症及死亡病例方面具有非常重要的意义。由于肠道病毒各型别之间没有交叉保护作用<sup>[16]</sup>,所以接种EV71疫苗不能预防所有类型的手足口病,只对EV71型手足口病有效,但能降低发病率和重症率,是目前最经济、最有效的预防手段。

综上所述,2014至2018年惠州市手足口病发病率居高不下,EV71疫苗接种率有待提高,EV71型灭活疫苗的接种能有效降低儿童EV71感染手足口病的发病率。

### 参考文献

- [1] 安志杰,刘艳,廖巧红,等. 肠道病毒71型灭活疫苗使用技术指南[J]. 中国疫苗和免疫, 2016, 22(4): 458-464.
- [2] 王燕. 手足口病病原及流行病学研究进展[J]. 中华医学杂志, 2009, 89(24): 1724-1725.
- [3] 钱素云,李兴旺. 我国手足口病流行及诊治进展十年回首[J]. 中华儿科杂志, 2018, 56(5): 321-323.
- [4] 赵志梅,王雷,邓燕,等. 肠道病毒71型灭活疫苗上市后预防接种不良反应主动监测研究[J]. 中国疫苗和免疫, 2019, 25(5): 557-561. (下转第719页)

## 深圳141例HIV抗体不确定检测结果分析

甘永霞 杨峥嵘\* 李浩 黎桂连 石向东 刘少础 王晓辉 赵锦

**[摘要]** 目的 对141例HIV抗体不确定样本的结果进行分析,为开展HIV确证检测提供准确有效的判定依据。方法 采用WB法对2017至2019年深圳辖区内各筛查实验室送检的HIV抗体筛查有反应的样本进行确证试验,141例被确证为不确定结果的样本结合CD4<sup>+</sup>T淋巴细胞检测结果进行综合分析。结果 141例不确定样本中,p24条带出现的占比最高,为77.3%,其次是gp160条带,为32.6%。总随访率为22.7%,在失访的109例受检者中,血站占37.6%(41例),医疗机构占45.0%(49例)。在随访到的32例受检者中有11例阳转,11例阳转前后的CD4<sup>+</sup>T淋巴细胞绝对数和CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>细胞比值比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。21例条带未进展受检者前后的CD4<sup>+</sup>T淋巴细胞绝对数比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ ),其CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>细胞比值比较,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。11例转阳者与21例条带未进展者的第一带型和第一带型,第二带型和第二带型的CD4<sup>+</sup>T淋巴细胞绝对数及其CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>细胞比值分别比较,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。结论 深圳应重视加强医疗机构和血站的HIV首次不确定受检者的后续随访跟踪工作,紧密结合实验室的相关检测结果尽早做出判断,避免延迟HIV感染的诊断而引起二代传播的风险。

**[关键词]** HIV; 抗体不确定; 阳转; WB带型; CD4<sup>+</sup>T淋巴细胞

### Analysis of uncertainty test results of 141 cases of HIV antibody in Shenzhen

GAN Yongxia, YANG Zhengrong\*, LI Hao, LI Guilian, SHI Xiangdong, LIU Shaochu, WANG Xiaohui, ZHAO Jin

(Shenzhen Center for Disease Control and Prevention, Shenzhen, Guangdong, China, 518055)

**[ABSTRACT]** **Objective** To analyze the results of 141 cases of HIV antibody from indeterminate samples and provide an accurate and effective basis for the implementation of HIV confirmation testing. **Methods** Western blot analysis was used to confirm the HIV antibody screening response samples submitted by various screening laboratories in Shenzhen from 2017 to 2019. 141 samples confirmed as uncertain results were comprehensively analyzed combined with CD4<sup>+</sup>T lymphocyte test results. **Results** Among the 141 uncertain samples, the p24 band appeared in the highest proportion at 77.3%, followed by the gp160 band at 32.6%. The total follow-up rate was 22.7%, among the 109 cases lost to follow-up, blood stations accounted for 37.6% (41 cases) and medical institutions accounted for 45.0% (49 cases). Among the 32 cases, there were 11 cases of positive conversion. The absolute number of CD4<sup>+</sup>T lymphocytes and the ratio of CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> cells in 11 cases before and after positive conversion showed no significant difference ( $P>0.05$ ). There was no significant difference in the absolute number of CD4<sup>+</sup>T lymphocytes before and after the test in 21 cases of unprogressive bands ( $P>0.05$ ), and the difference in the ratio of CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> cells was statistically significant ( $P<0.05$ ). The absolute number of CD4<sup>+</sup>T lymphocytes and the ratio of CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> cells in the first band type, the first band type, the second band type and the second band type were significantly different between 11 positive cases and 21 unprogressive cases ( $P<0.05$ ). **Conclusion** Shenzhen should pay attention to strengthening the follow-up follow-up work of medical institutions and blood stations for HIV-indeterminate subjects for the first time, and

基金项目:广东省医学科学技术研究基金项目(A2019474);深圳市科技计划项目(JCYJ20140410171018515, JCYJ20150402102135492);深圳市引进高层次医学团队项目“三名工程”(SZSM201811071);深圳市卫生系统科研项目(SZGW2018003)

作者单位:深圳市疾病预防控制中心,广东,深圳 518055

\*通信作者:杨峥嵘, E-mail: yangzr@szcdc.net

make judgments as soon as possible in close conjunction with the relevant laboratory test results to avoid the risk of delaying the diagnosis of HIV infection and causing the risk of second-generation transmission.

[KEY WORDS] HIV; Antibody uncertainty; Positive conversion; WB band type; CD4<sup>+</sup> T lymphocyte

实验室检测是艾滋病 (Human Immunodeficiency Virus, HIV) 防治的基础, 尽早并最大限度地及时诊断发现艾滋病感染者是有效阻断艾滋病传播的重要环节<sup>[1-2]</sup>。《全国艾滋病检测技术规范》(2015年修订版) 新增了核酸检测作为 HIV-1 感染诊断的补充试验, 但对受检者检测前的近期内有明确流行病学史的个体, 核酸检测结果阴性或低于最低检测限也不能排除 HIV-1 感染<sup>[3]</sup>。目前国内使用最为广泛的方法仍是蛋白印迹试验 (Western blotting, WB), 该方法特异性很高, 出现不确定结果很多<sup>[4]</sup>。为更清晰认识不确定带型和 HIV 感染之间的关系, 提高 HIV 感染的诊断率, 现将 2017 至 2019 年深圳报告的 141 例 HIV 抗体不确定结果的具体分析如下。

## 1 对象与方法

### 1.1 样本来源

选取 2017 至 2019 年深圳市疾病预防控制中心艾滋病确证实验室接收的 HIV 抗体筛查有反应的待确证样本, 包括自愿咨询检测点 (VCT)、医疗机构、血站和羁押监管场所等。对所有 WB 法为“不确定”结果的样本纳入进一步的研究和分析。141 例受检者中, 男性 82 例, 女性 59 例, 年龄最大 83 岁, 最小 16 岁, 平均年龄 (34.99±14.23) 岁。此项研究不会对受检者造成额外伤害, 研究经深圳市疾病预防控制中心伦理委员会批准。

### 1.2 方法与试剂

采用由 MP 生物医学亚太私人有限公司生产的全自动免疫蛋白印迹仪及人类免疫缺陷病毒 (HIV 1+2 型) 抗体检测试剂盒进行蛋白印迹试验。CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞计数采用贝克曼公司生产的 Cytomics FC 500MPL 仪器及其配套的四色试剂 CD45/CD4/CD8/CD3 检测试剂盒 (Syto-STATtetra CHROME CD45-FITC/CD4-RD1/CD8-ECD/CD3-PC5)。所有检测流程及结果判定严格按照《全国艾滋病检测技术规范》的要求执行。

### 1.3 统计学分析

使用 SAS9.4 软件进行数据统计分析; 计量资料以 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 用 *t* 检验分别比较转阳者与条带未进展者的 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞绝对数和 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 细胞比

值的差异; 以  $P < 0.05$  为差异表示有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 带型分布

141 例不确定样本中, 出现条带 p24 的占比为 77.3%, 条带 gp160 为 32.6%, 其它条带为: gp120 为 3 (2.1%), gp41 为 5 (3.5%), p55 为 2 (1.4%), p17 为 10 (7.1%), p66 为 4 (2.8%), p51 为 1 (0.7%), p31 为 1 (0.7%)。

### 2.2 不同 WB 带型的失访情况

109 例失访者中, 医疗机构占 45.0% (49 例), 其中出现单一的 p24 带型失访数为 60 例, 血站占 50.0% (30/60)。见表 1。

表 1 109 例不确定样本不同 WB 带型的失访情况

Table 1 Not follow-up in 109 uncertain samples with different

WB band type

第一带型	带型例数	失访数	血站	医疗机构	VCT	羁押人群
gp160、p24、p17	2	0	0	0	0	0
gp160、p24	27	17	2	10	3	2
gp160、gp120	3	3	0	3	0	0
p24	73	60	30	22	7	1
gp41、p17	2	1	1	0	0	0
gp160、p17	1	1	1	0	0	0
p24、p17	5	4	1	1	1	1
p66、p24	1	1	0	1	0	0
p51、p24	1	1	0	1	0	0
p55	2	2	0	2	0	0
p31	1	1	1	0	0	0
gp160	13	10	3	5	1	1
gp41	3	2	0	2	0	0
p66	3	3	0	2	0	1
p17	4	3	2	0	1	0
合计	141	109	41	49	13	6

### 2.3 随访阳转情况

32 例被随访的受检者中, 其中 11 (34.4%) 例转为阳性, 21 例条带无进展。2 例第一带型为 (gp160、p24、p17) 的阳转为 1 (50%) 例, 10 例第一带型为 (gp160、p24) 的阳转为 8 (80%) 例, 13 例第一带型为 (p24) 的阳转为 1 (7.7%) 例, 3 例第一带型为 (gp160) 的阳转为 1 (33.3%) 例。见表 2。

2.4 11 例阳转的被随访受检者免疫功能检测分析  
被随访的 32 例受检者有 11 例发生了阳转。

表2 32例不确定样本的WB带型的阳转情况

Table 2 Positive conversion of WB band type in 32 uncertain samples

第一带型	例数	随访人数		被随访者的阳转情况	
		例数	百分比(%)	例数	阳转率(%)
gp160、p24、p17	2	2	100.0	1	50.0
gp160、p24	27	10	37.0	8	80.0
gp160、gp120	3	0	0.0	0	0.0
p24	73	13	17.8	1	7.7
gp41、p17	2	1	50.0	0	0.0
gp160、p17	1	0	0.0	0	0.0
p24、p17	5	1	20.0	0	0.0
p66、p24	1	0	0.0	0	0.0
p51、p24	1	0	0.0	0	0.0
p55	2	0	0.0	0	0.0
p31	1	0	0.0	0	0.0
gp160	13	3	23.0	1	33.3
gp41	3	1	33.3	0	0.0
p66	3	0	0.0	0	0.0
p17	4	1	25.0	0	0.0
合计	141	32	22.7	11	34.4

受检者阳转前后的CD4<sup>+</sup>T淋巴细胞绝对数和CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>细胞比值分别比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。见表3。

### 2.5 21例条带未进展者的免疫功能检测分析

32例被随访的受检者中有21例出现条带未进展。条带未进展受检者前后的CD4<sup>+</sup>T淋巴细胞绝对数的比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。条带未进展受检者前后的CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>细胞比值的比较,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。见表4。

### 2.6 11例阳转者与21例条带未进展者免疫功能的比较分析

11例阳转者与21例条带未进展者的(第一条带比较,第二条带作比较)CD4<sup>+</sup>T淋巴细胞绝对数CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>细胞比值分别比较,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。

表3 11例被随访受检者阳转前后的免疫功能指标分析( $\bar{x}\pm s$ )

Table 3 Analysis of immune function indexes of 11 cases were followed up before and after positive rotation ( $\bar{x}\pm s$ )

样本序号	第一带型/ 第二带型	时间 (天)	CD4 <sup>+</sup> T 淋巴细胞 绝对数 (个/ $\mu$ L)	第一带型 CD4 <sup>+</sup> 绝对数	第二带型 CD4 <sup>+</sup> 绝对数	t值	P值	CD4 <sup>+</sup> / CD8 <sup>+</sup> 细胞比值	第一 带型 比值	第二 带型 比值	t值	P值
1a	gp160、gp120、p66、p51、 gp41、p31、p24、p17	69	405					0.39				
2	gp160、p24		395					1.08				
2a	gp160、gp120、p66、p51、 gp41、p31、p24	116	549					1.19				
3	gp160、p24		229					0.28				
3a	gp160、gp120、gp41、p24、 p17	34	249					0.62				
4	gp160、p24		265					0.42				
4a	gp160、gp120、p24、p17	26	304					0.36				
5	gp160、p24		278					0.57				
5a	gp160、gp120、gp41、p24、 p17	34	356					0.59				
6	gp160、p24		553					0.36				
6a	gp160、gp120、p66、p51、 gp41、p31、p24	92	393					0.32				
7	gp160、p24		523					0.42				
7a	gp160、gp120、p66、gp41、 p24	32	396					0.45				
8	gp160、p24		553					0.48				
8a	gp160、gp120、gp41、p24	14	432					0.52				
9	gp160、p24		229					0.28				
9a	gp160、gp120、gp41、p24	14	249					0.62				
10	p24		384					0.55				
10a	gp160、gp120、gp41、p24、 p17	32	525					0.84				
11	gp160		856					0.32				
11a	gp160、gp120、p66、p51、 gp41、p31、p24	90	357					0.25				

注:前表示为第一带型,后表示为第二带型,后同。

表4 21例条带未进展者前后的免疫功能指标分析 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 4 Analysis of the immune function indexes of 21 cases with no progress of banding ( $\bar{x} \pm s$ )

样本序号	第一带型/ 第二带型	时间 (天)	CD4 <sup>+</sup> T淋巴 细胞绝对数 (个/ $\mu$ L)	第一带型 CD4 <sup>+</sup> 绝对数	第二带型 CD4 <sup>+</sup> 绝对数	t值	P值	CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> 细胞比值	第一带型 比值	第二带型 比值	t值	P值
1	gp160、p24	78	557	568.86±190.53	583.90±219.82	-0.442	0.663	1.29	1.31±0.44	1.45±0.45	-2.835	0.01
1a	gp160		602					1.40				
2	p24	31	322					0.90				
2a	—		411					0.94				
3	p24	35	724					1.22				
3a	—		804					1.19				
4	p24	55	758					1.31				
4a	p24		587					1.54				
5	p24	81	855					2.01				
5a	—		663					2.17				
6	p24	32	725					1.19				
6a	p24		656					1.08				
7	p24	75	552					1.63				
7a	p24		586					1.86				
8	p24	65	325					0.92				
8a	—		361					1.39				
9	p24	31	456					1.67				
9a	p24		769					1.76				
10	p24	46	438					1.13				
10a	p24		432					1.08				
11	p24	37	459					0.90				
11a	p24		603					0.94				
12	p24	41	570					1.15				
12a	p24		644					1.30				
13	p24、p17	92	216					0.65				
13a	p24		188					0.54				
14	p24	32	537					1.10				
14a	—		697					1.41				
15	gp41、p17	48	574					0.66				
15a	p17		504					1.34				
16	p24、p17	32	443					1.30				
16a	p17		363					1.47				
17	p66、p24	48	540					1.14				
17a	—		665					1.21				
18	gp160	62	754					1.56				
18a	gp160		508					1.66				
19	gp41	95	903					1.45				
19a	—		770					1.73				
20	p66	47	847					1.99				
20a	p66		1201					2.43				
21	p55、p17	61	391					2.40				
21a	—		248					2.04				

注:无特异条带出现用“-”表示。

### 3 讨论

本文不确定结果带型的比例构成与既往的文献研究报道相似<sup>[5-6]</sup>,按试剂盒的判定标准,出现一条env带和一条gag带可判定为HIV抗体阳性,但实际工作中发现,WB反应会出现不典型的阳性反应条带,这种假阳性结果可能会对受检者带来很大的影响<sup>[7]</sup>。本文发现2例首次带型为3个条带的受检者,其中1例经过69天后的随访复查,条带有明显的进展被确证为阳性,而另1例受检者失访。另外有2个条带的共40例,其中随访到的10

例中有8(80%)例最终确证为阳性。因此,不确定条带越多阳转的可能性越大<sup>[8]</sup>。

141例不确定的受检者中,随访率为22.7%(32/141),比其他文献报道都低<sup>[9-10]</sup>,109例失访者出现单一的p24(+)为60例,而p24(+)失访人群主要来自于血站和医疗机构。分析其原因:①可能由于血站和医疗机构大部分都使用了高敏感性的第四代检测试剂,导致筛查的假阳性率偏高;②p24(+)的出现可能与注射药物、自身免疫性疾病、急性病毒感染、肿瘤、妊娠等因素有关;③p24(+)的阴转率最高<sup>[11]</sup>,该部分失访人群对其出现单一条带的不确定结果重视度不

够,更不会主动要求复查而造成高比例的失访。据以往研究报道<sup>[12-14]</sup>,出现单一的条带大多数只是一些杂带最终被排除 HIV 感染。但本文发现,有 2 例首次带型为单一条带(p24 和 gp160)的受检者,分别经过 32 天,90 天后复查,条带明显增加被判定为阳性。因此对出现单一带型的不确定结果需要谨慎对待,有条件的要加强定期的跟踪随访。

人类自身的免疫功能系统极其复杂,感染 HIV 后机体的免疫功能受到损害,CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞绝对数和 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>细胞比值都发生了明显变化,本文结果跟以往的文獻报道一致<sup>[15-16]</sup>。不确定结果中各 WB 反应条带出现存在个体差异,必要时借助 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞检测、病毒载量检测等实验室辅助检测,尤其是结合个体的流行病学调查,增加定期的追踪随访频率等手段提高 HIV 的诊断发现率。

#### 参考文献

- [1] 朱思远,李冬冬,王婷婷,等. 中国西南地区 2008-2013 年 HIV 抗体检测结果与分析[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2015, 29(4): 335-337.
- [2] 杨蓉蓉,桂希恩,熊勇,等. 综合医院施行的三种 HIV 检测模式特点比较[J]. 国际流行病学传染病学杂志, 2019, 46(1): 29-33.
- [3] 蒋岩,汪宁,李敬云,等. 全国艾滋病检测技术规范.(2020 年修订版)[S]. 北京: 中国疾病预防控制中心, 2020: 16.
- [4] 蔡英,李世福,董文斌,等. 108 例 HIV 抗体不确定者失访和阳转情况分析[J]. 皮肤病与性病, 2019, 41(4): 483-486.
- [5] 张佳峰,郭志宏,姚亚萍,等. 1155 例的 HIV-1 抗体阳性者免疫印迹带型分析及规律总结[J]. 中国卫生检验杂志, 2010, 20(9): 2247-2249.
- [6] 朱荣华,向信春. 37 例 HIV 不确定结果随访观察及 WB 带型分析[J]. 皮肤病与性病, 2014, 36(1): 46-47+50.
- [7] 朱立国,庄远,王海宝,等. 北京某地区 HIV 抗体筛查阳性情况和确证结果分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2013, 23(15): 3101-3103.
- [8] 肖青,邢文革,薛喜梅,等. HIV 感染者 WB 条带分布情况[J]. 中国艾滋病性病, 2012, 18(3): 195-196.
- [9] 刘娜,董雪,刘建敏,等. 2014-2018 年沈阳市 HIV 感染待确定样本检测结果分析[J]. 职业与健康, 2020, 36(2): 238-240.
- [10] 晏嘉璐,童晶,杜阳光,等. HIV 抗体不确定检测结果的条带特征及随访情况[J]. 中国艾滋病性病, 2020, 26(4): 434-435+438.
- [11] 鄂爽,郭慧君,马宁,等. 辽宁省 2007-2011 年 HIV 抗体不确定结果分析[J]. 中国公共卫生, 2013, 29(8): 1130-1132.
- [12] 梁彩云,徐慧芳,李燕,等. 免疫印迹试验带型与 HIV-1 感染关系的探讨[J]. 中国预防医学杂志, 2010, 11(4): 339-342.
- [13] Migali E, Mariotti D, Lovari A, et al. HIV-1: absence of infection in subjects with indeterminate western blot [J]. Allergol Immunopathol (Madr), 1993, 21(1): 61-65.
- [14] Tebourski F, Slim A, Elgaaied A. The significance of combining World Health Organization and Center for Disease Control criteria to resolve indeterminate human immunodeficiency virus type-1 Western blot results [J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2004, 48(1): 59-61.
- [15] 丘凤兰,蔡月仙,罗伟强,等. 新诊断 HIV-1 抗体阳性者的 WB 带型及首次 CD4<sup>+</sup>T 细胞检测分析[J]. 中国热带医学, 2019, 19(12): 1155-1158.
- [16] 练维,张宏萍,陆娟,等. 2015 年-2017 年南通市新发现 HIV 感染者首次 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞检测结果分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2019, 29(9): 1089-1091.

(上接第 714 页)

- [5] 谢中勇,宋足琼,杨坤祥,等. EV71 疫苗预防接种对惠州市手足口病的流行病学特征及病原学的影响[J]. 中国预防医学杂志, 2019, 20(8): 667-670.
- [6] 张静. 2008-2017 年中国手足口病流行趋势和病原变化动态数列分析[J]. 中华流行病学杂志, 2019, 40(2): 147-154.
- [7] 亢相逢,高涛. 2014-2018 年陕西榆林地区手足口病流行病学特征及病原学分析[J]. 陕西医学杂志, 2019, 48(10): 1397-1401.
- [8] 曾四清,孙立梅,钟豪杰,等. 2008-2017 年广东省手足口病流行趋势变化特征的 Joinpoint 回归模型分析[J]. 疾病监测, 2019, 34(2): 141-146.
- [9] 杨坤祥,陈剑虹,贺海林,等. 2014~2016 年惠州市手足口病住院患儿流行病学研究[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2018, 10(1): 25-29+66.
- [10] 杨坤祥,黄彬. 2015~2017 年惠州市重症手足口病病原学分析[J]. 热带医学杂志, 2019, 19(8): 967-970.
- [11] 杨芬,梁文佳,孙立梅,等. 广东省 EV71 疫苗接种水平与手足口病流行分析[J/OL]. 中国公共卫生, 2018: 1-3.
- [12] 王爱秋,刘海云. EV71 型手足口病疫苗的效果评价[J]. 中国现代医生, 2019, 57(16): 143-147.
- [13] 许家艳. 儿童接种手足口疫苗(EV71 型)对手足口病的预防作用及安全性探讨[J]. 全科口腔医学电子杂志, 2019, 6(9): 64, 76.
- [14] Mao Q, Wang Y, Shao J, et al. The compatibility of inactivated - Enterovirus 71 vaccination with Coxsackievirus A16 and Poliovirus immunizations in humans and animals [J]. Hum Vaccin Immunother, 2015, 11(11): 2723-2733.
- [15] Chen M, Zuo X, Tan Y, et al. Six amino acids of VP1 switch along with pandemic of CA6 - associated HFMD in Guangxi, southern China, 2010-2017 [J]. J Infect, 2019, 78(4): 323-337.
- [16] 唐金芳. 肠道病毒 71 型及其疫苗研究应用概况[J]. 内科, 2019, 14(2): 184-187.

## 血清 uMtCK、AHSG 及 NGAL 与胃癌患者病理参数及临床预后的关系

陈瑶

**【摘要】目的** 探究血清广泛型线粒体肌酸激酶(uMtCK)、胎球蛋白 A(AHSG)及中性粒细胞相关载脂蛋白(NGAL)水平与胃癌患者临床病理参数及临床预后的关系。**方法** 选取本院消化内科2017年1月至2019年1月收治的85例胃癌患者作为研究组,另选择同期于本院门诊健康体检的志愿者85例作为对照组,酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清 uMtCK、AHSG 及 NGAL 水平,分析 uMtCK、AHSG 及 NGAL 与胃癌患者临床病理参数的关系;患者随访2~3年,统计研究期间胃癌患者死亡情况,并分为生存组( $n=62$ )和死亡组( $n=23$ );Cox 多因素分析 uMtCK、AHSG 及 NGAL 水平异常是否为影响胃癌患者预后的危险因素。**结果** 研究组血清 uMtCK、AHSG 及 NGAL 水平均高于对照组,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。不同年龄、性别、组织类型、Lauren's 分型胃癌患者血清 uMtCK、AHSG 及 NGAL 水平比较均差异无统计学意义( $P>0.05$ );不同肿瘤分化程度、TNM 分期、浸润深度、淋巴结转移、远处转移、血管侵犯胃癌患者血清 uMtCK、AHSG 及 NGAL 水平比较均差异有统计学意义( $P<0.05$ )。存活组胃癌患者血清 uMtCK、AHSG 及 NGAL 水平均低于死亡组,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。Cox 多因素回归分析结果显示, uMtCK、AHSG 及 NGAL 升高为影响胃癌患者预后的独立危险因素。**结论** 胃癌患者血清 uMtCK、AHSG 及 NGAL 存在异常升高的情况,且与胃癌进展、转移及不良预后存在密切相关性,检测相关指标水平有助于胃癌患者的诊断和预后评估。

**【关键词】** 广泛型线粒体肌酸激酶;胎球蛋白 A;中性粒细胞相关载脂蛋白

### Relationship between serum uMtCK, AHSG and NGAL levels with pathological parameters and clinical prognosis of patients with gastric cancer

CHEN Yao

(Department of Gastroenterology, West China Branch Hospital of Ganzi Tibetan Autonomous Prefecture, Kangding, Sichuan, China, 626000)

**【ABSTRACT】 Objective** To explore the relationship between the serum levels of extensive mitochondrial creatine kinase (uMtCK), fetuin A (AHSG) and neutrophil-associated apolipoprotein (NGAL) with clinicopathological parameters and clinical prognosis of patients with gastric cancer. **Methods** Eighty-five patients with gastric cancer admitted to the Department of Gastroenterology, Ganzi Prefecture People's Hospital, Sichuan Province from January 2017 to January 2019 were selected as the research group, and 85 volunteers who received physical examination in the outpatient clinic of this hospital during the same period were selected as the control group. ELISA was used to detect the serum levels of uMtCK, AHSG, and NGAL, and analyze the relationship between uMtCK, AHSG, and NGAL and clinicopathological parameters of gastric cancer patients; patients were followed up for 2 to 3 years, and the deaths of gastric cancer patients during the study were counted and divided into the survival groups ( $n=62$ ) and the death group ( $n=23$ ). Cox multivariate analysis of whether abnormal levels of uMtCK, AHSG and NGAL are the risk factors affecting the prognosis of gas-

基金项目:四川省医学科研课题计划项目(20181163)

作者单位:四川甘孜藏族自治州华西分院消化内科,四川,康定市 626000

通信作者:陈瑶, E-mail:hangban20085@163.com

tric cancer patients. **Results** The serum levels of uMtCK, AHSG and NGAL in the study group were significantly higher than those in the control group, and the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). There was no significant difference in serum uMtCK, AHSG and NGAL levels in patients with gastric cancer of different ages, genders, tissue types and Lauren's classification ( $P > 0.05$ ). There were statistically significant differences in serum levels of uMtCK, AHSG and NGAL in patients with different tumor differentiation, TNM stages, depth of invasion, lymph node metastasis, distant metastasis, and vascular invasion of gastric cancer ( $P < 0.05$ ). The serum levels of uMtCK, AHSG and NGAL in the survival group were lower than those in the death group, and the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). Cox multivariate regression analysis showed that the increase of uMtCK, AHSG and NGAL were independent risk factors affecting the prognosis of gastric cancer patients. **Conclusion** The serum uMtCK, AHSG, and NGAL levels in patients with gastric cancer are abnormally elevated, and they are closely related to the progression, metastasis and poor prognosis of gastric cancer. The detection of relevant indicator levels is helpful for the diagnosis and prognosis evaluation of gastric cancer patients.

[KEY WORDS] Extensive mitochondrial creatine kinase; Fetuin A; Neutrophil-associated apolipoprotein

胃癌是我国常见的消化道恶性肿瘤疾病之一,且多数患者胃癌早期症状隐匿,确诊时多处于胃癌进展期或晚期,患者生存预后较差。因此,对于探索胃癌相关的肿瘤标志物和血清学指标,反映胃癌的生物学特点,提高胃癌的诊断率和患者生存率一直是临床研究的热点内容。近年来,关于血清中线粒体肌酸激酶(mitochondrial creatine kinase, MtCK)在肿瘤中的异常表达及作用引起了临床学者的关注,其包括广泛型线粒体肌酸激酶(uMtCK)和肌节线粒体肌酸激酶(sMtCK)2种,其中uMtCK被认为在前列腺癌、肝癌等恶性肿瘤中存在过表达<sup>[1]</sup>。胎球蛋白A(alpha2-Heremans-Schmid glycoprotein, AHSG)为肝细胞合成和分泌的一类糖蛋白,其可通过基质胶促进肿瘤细胞的侵袭转移,AHSG在多种恶性肿瘤中均存在异常表达<sup>[2]</sup>。中性粒细胞明胶酶相关载脂蛋白(neutrophil gelatinase-associated lipocalin, NGAL)为lipocalin家族的一员,研究证明NGAL与炎症、细胞分化与凋亡、免疫反应、组织重构及多种肿瘤的发生发展密切相关;且其表达与肿瘤浸润、转移和预后关系密切<sup>[3-4]</sup>。因此,本研究对血清uMtCK、AHSG及NGAL与胃癌患者病理参数及临床预后的关系进行了探究,以探讨三者作为胃癌有效诊断和预后指标的可行性。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选取本院消化内科2017年1月至2019年1月收治的85例胃癌患者作为研究组,纳入标准:①均符合中华医学会消化内镜学分会及中国抗癌协会

肿瘤内镜专业委员会制定的《中国早期胃癌筛查及内镜诊治共识意见(2014年)》<sup>[5]</sup>关于胃癌的诊断标准;②均对本研究知情自愿签署知情同意书;③此前未接受放化疗、手术及其他抗肿瘤药物治疗;④临床资料完整。排除标准:①合并肝肾等器质性病变者;②合并其他恶性肿瘤者;③复发性胃癌患者及其他胃肠道疾病者;④感染、免疫系统疾病、造血系统疾病者;⑤无法配合完成研究者。其中,男44例,女41例,年龄平均(61.5±3.8)岁,患者组织类型、Lauren's分型、肿瘤分化程度、TNM分期、浸润深度、淋巴结转移、远处转移、血管侵犯患者分布见表2。另选择同期于本院门诊健康体检的志愿者85例作为对照组,其中男46例,女39例,年龄平均(61.1±3.5)岁,均自愿参与本研究,能够配合完成各项检查。本研究获得医院伦理委员会批准通过。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 病理参数统计

统计所有胃癌患者性别、年龄(≤60岁, >60岁)、组织类型(未分化腺癌、管状腺癌、粘液腺癌、印戒细胞癌)、Lauren's分型(肠型胃癌、弥漫性胃癌、混合型胃癌)、肿瘤分化程度(低分化、中分化、高分化)、TNM分期(I期、II期、III期、IV期)、浸润深度(T1、T2、T3、T4)、淋巴结转移(N0、N1、N2、N3)、远处转移(M0、M1)、血管侵犯(有或无)等临床病理参数。

#### 1.2.2 血清指标检测

所有研究对象均收集5 mL空腹静脉血,3 000 r/min离心10 min,收集血清。采用酶联免疫吸附试验检测血清uMtCK、AHSG及NGAL水平,

uMtCK 试剂盒购自上海圻明生物科技有限公司, AHSg 试剂盒购自美国 Epitope Diagnostics, Inc 公司, NGAL 试剂盒购自上海依科赛生物制品有限公司。均按照试剂盒说明书所述进行步骤操作, 读取吸光度值, 绘制标准曲线, 并计算血清 uMtCK、AHSg 及 NGAL 浓度。

### 1.2.3 随访

所有胃癌患者随访 2~3 年, 统计期间患者任何原因导致的死亡情况, 并分为生存组和死亡组, 对比 2 组胃癌患者血清 uMtCK、AHSg 及 NGAL 水平差异情况。

### 1.3 统计学分析

采用 SPSS 20.0 统计学软件进行数据分析, 计量资料以 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 两两比较用 *t* 检验, 多组间采用单因素方差分析; Cox 多因素回归分析影响胃癌患者预后的独立因素。P<0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 研究组和对照组血清 uMtCK、AHSg 及 NGAL 水平比较

研究组血清 uMtCK、AHSg 及 NGAL 水平均高于对照组, 差异有统计学意义 (P<0.05)。见表 1。

表 1 研究组和对照组血清 uMtCK、AHSg 及 NGAL 比较

Table 1 Comparison of serum uMtCK, AHSg and NGAL levels between the study group and the control group

组别	n	uMtCK(μ/L)	AHSg(μg/mL)	NGAL(ng/mL)
对照组	85	3.3±0.8	192.3±16.7	3.4±0.3
研究组	85	24.3±2.9	322.5±41.6	16.9±1.7
<i>t</i> 值		64.358	514.866	72.100
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000

### 2.2 胃癌患者血清 uMtCK、AHSg 及 NGAL 水平与临床病理参数的相关性分析

不同年龄、性别、组织类型、Lauren's 分型胃癌患者血清 uMtCK、AHSg 及 NGAL 水平比较均差异无统计学意义 (P>0.05)。不同肿瘤分化程度、TNM 分期、浸润深度、淋巴结转移、远处转移、血管侵犯胃癌患者血清 uMtCK、AHSg 及 NGAL 水平比较, 差异有统计学意义 (P<0.05)。见表 2。

### 2.3 存活组与死亡组血清 uMtCK、AHSg 及 NGAL 水平比较

直至本研究随访结束, 85 例胃癌患者中存活 62 例, 死亡 23 例。存活组胃癌患者血清 uMtCK、AHSg 及 NGAL 水平均低于死亡组, 差异具有统计学意义 (P<0.05)。见表 3。

表 2 胃癌患者血清 uMtCK、AHSg 及 NGAL 水平与临床病理参数的相关性分析 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Correlation analysis of serum uMtCK, AHSg and NGAL levels and clinicopathological parameters in patients with gastric cancer ( $\bar{x} \pm s$ )

参数	n	uMtCK(μ/L)	AHSg(μg/mL)	NGAL(ng/mL)
性别				
男	44	24.2±3.1	325.7±44.6	16.9±1.9
女	41	24.5±3.6	322.2±41.2	16.8±1.5
<i>t</i> 值		0.413	0.375	0.268
<i>P</i> 值		0.681	0.709	0.789
年龄(岁)				
≤60	39	24.0±2.8	318.7±44.2	16.6±2.0
>60	46	24.4±2.4	324.3±40.9	17.0±1.6
<i>t</i> 值		0.705	0.605	1.013
<i>P</i> 值		0.483	0.547	0.314
肿瘤大小(cm)				
≤4	37	20.1±2.2	295.7±39.9	14.4±1.9
>4	48	26.1±2.9	332.1±55.1	17.8±1.3
<i>t</i> 值		10.792	3.467	9.684
<i>P</i> 值		0.000	0.001	0.000
Lauren's 分型				
肠型胃癌	44	24.2±3.2	320.2±43.4	16.7±1.9
弥漫性胃癌	34	24.1±2.9	323.8±44.1	16.8±1.5
混合型胃癌	7	24.4±3.1	326.5±47.1	17.1±1.8
<i>F</i> 值		0.307	0.671	1.047
<i>P</i> 值		0.759	0.504	0.298
组织类型				
未分化腺癌	3	24.0±3.0	323.6±44.5	16.6±1.7
管状腺癌	54	24.3±3.1	327.9±49.1	17.0±2.2
粘液腺癌	16	24.5±3.6	321.1±41.8	17.1±2.3
印戒细胞癌	12	24.1±3.4	322.7±40.6	16.8±1.8
<i>F</i> 值		0.146	0.101	0.560
<i>P</i> 值		0.885	0.922	0.571
肿瘤分化程度				
低分化	36	17.5±2.2	265.1±33.5	15.0±1.2
中-高分化	46	27.4±2.9	341.9±56.9	17.4±1.9
<i>t</i> 值		17.001	7.621	6.973
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000
TNM 分期				
I+II	38	19.2±2.5	275.2±36.6	15.1±1.1
III+IV	47	26.1±3.2	336.7±41.5	17.3±1.6
<i>t</i> 值		10.873	7.157	7.488
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000
浸润深度				
T1/T2	33	17.0±2.0	301.3±39.2	15.5±1.5
T3/T4	52	27.2±2.8	329.7±45.1	17.8±2.3
<i>t</i> 值		19.558	2.973	5.580
<i>P</i> 值		0.000	0.004	0.000
淋巴结转移				
N0	31	17.1±2.6	296.3±46.5	12.5±1.2
N1+N2+N3	54	27.8±2.5	360.4±55.1	18.5±2.9
<i>t</i> 值		18.720	5.454	13.343
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000
远处转移				
M0	63	17.5±2.4	299.2±36.7	15.1±1.5
M1	22	26.8±2.3	331.6±42.5	17.6±1.9
<i>t</i> 值		15.812	3.420	6.268
<i>P</i> 值		0.000	0.001	0.000
血管侵犯				
有	69	27.1±3.0	360.8±43.8	18.2±1.9
无	16	18.5±1.9	244.8±3.1	13.1±1.5
<i>t</i> 值		10.940	21.765	10.021
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000

表3 存活组与死亡组血清 uMtCK、AHSG 及 NGAL 比较  
Table 3 Comparison of serum uMtCK, AHSG and NGAL levels between the survival group and the death group

组别	n	uMtCK( $\mu$ L)	AHSG( $\mu$ g/mL)	NGAL(ng/mL)
存活组	62	19.4 $\pm$ 2.4	241.6 $\pm$ 33.7	12.2 $\pm$ 1.6
死亡组	23	27.0 $\pm$ 3.6	361.9 $\pm$ 50.9	18.7 $\pm$ 2.2
t 值		9.381	10.512	14.967
P 值		0.000	0.000	0.000

## 2.4 Cox 多因素回归分析

Cox 多因素回归分析结果显示, uMtCK、AHSG 及 NGAL 升高为影响胃癌患者预后的独立危险因素。见表4。

表4 Cox 多因素回归分析结果

因素	$\beta$	标准化 $\beta$	$\chi^2$ 值	Walr	RR 值	P 值
uMtCK	0.365	0.238	4.211	8.060	1.429	0.030
AHSG	0.349	0.274	6.328	8.592	1.417	0.010
NGAL	0.402	0.166	6.675	7.303	1.492	0.011

## 3 讨论

近年来,恶性肿瘤的发病率在全球范围内呈逐渐上升的趋势,严重威胁了人类的身体健康和生存质量。胃癌等恶性肿瘤的早发现与其预后关系密切,因此对于临床寻求敏感性和特异性高、无创、易操作的理想肿瘤标志物具有重要意义。

MtCK 为肌酸激酶(creatine kinase, CK)的同工酶之一,可催化肌酸和三磷酸腺苷之间的磷酸键可逆转移并促进三磷酸腺苷的生成。MtCK 又可分为 uMtCK 与 sMtCK, uMtCK 为低聚的线粒体 CK,是巨分子酶的一种, uMtCK 在肾脏、脑和平滑肌等组织或器官中表达,近年来多项研究报道 uMtCK 在肿瘤患者病理组织或(和)血清中存在过表达, uMtCK 常伴随各种肿瘤出现,提示其可能为一种有效的潜在肿瘤标志物<sup>[6-7]</sup>。AHSG 是肝细胞合成的一种磷酸化糖蛋白,为半胱氨酸蛋白酶抑制因子超家族成员。AHSG 参与了人体胰岛素抵抗、骨骼代谢调节、恶性肿瘤迁移和侵袭过程<sup>[8-9]</sup>。研究显示<sup>[10]</sup>, AHSG 可介导肿瘤细胞黏附作用,其可激活肿瘤细胞 MAP 和 P13K/AKT 激酶信号,还可介导肿瘤外泌体形成,促进肿瘤细胞生长、运动和侵袭。NGAL 在多种肿瘤发生发展发挥重要作用,但在不同肿瘤中的作用有所差异。研究认为<sup>[11]</sup>, NGAL 可抑制机体基质金属蛋白酶降解,参与食管癌、乳腺癌等肿瘤细胞的分化、侵袭和转移,并具有加速肿瘤进程的作用。本研究结果显示,在胃癌患者中血清 uMtCK、

AHSG 及 NGAL 水平相较于健康人群血清水平明显升高,在研究中, NGAL 可作为潜在的新型新型综合治疗靶标<sup>[12]</sup>; Shi 等<sup>[13]</sup>研究认为, AHSG 与胃癌的发生发展关系密切,可作为为鉴定为胃癌的诊断生物标志物;而等研究对于 uMtCK 的生物学特性阐述中指出,其与肿瘤的发生发展及预后的关系密切。

本研究结果提示,血清 uMtCK、AHSG 及 NGAL 与胃癌临床病理特征指标存在密切相关性。uMtCK 可提高肿瘤细胞对能量需求的适应性,保护肿瘤细胞抵抗凋亡,并参与线粒体凋亡途径和肿瘤细胞适应性代谢过程。有研究指出<sup>[14]</sup>, AHSG 可作为血清化学引诱剂,通过基质胶促进肿瘤细胞的侵袭。研究认为<sup>[15]</sup>, NGAL 还可促进皮-间质转化,从而改变肿瘤微环境,进而在肿瘤的侵袭和转移中发挥作用。本研究中结果提示,血清 uMtCK、AHSG 及 NGAL 高水平患者往往在近期随访期间面临着更高的死亡风险。Cox 多因素回归分析结果提示, uMtCK、AHSG 及 NGAL 升高不仅与胃癌恶性程度及病情严重程度存在相关性,也预示着胃癌患者预后不良,可作为胃癌患者评估病情严重程度和预后的潜在指标。

综上所述,胃癌患者血清 uMtCK、AHSG 及 NGAL 存在异常升高的情况,且与胃癌进展、转移及不良预后存在密切相关性,检测相关指标水平有助于胃癌患者的诊断和预后评估。

## 参考文献

- [1] 罗喜俊,何嘉琳,梁俊杰,等. 实时荧光定量 PCR 检测结肠腺癌患者组织中广泛型线粒体肌酸激酶基因的表达[J]. 广州医科大学学报, 2019, 47(3): 10-12.
- [2] Ochieng J, Nangami G, Sakwe A, et al. Impact of Fetuin-A (AHSG) on Tumor Progression and Type 2 Diabetes[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(8): 2211.
- [3] 杨鑫,刘小静,陈云茹,等. 基于血清 NAG、NGAL、LFABP 的风险评分模型对老年重度乙肝患者肝肾综合症的预测价值[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(10): 1397-1400.
- [4] Musolino V, Palus S, Latouche C, et al. Cardiac expression of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in a model of cancer cachexia-induced cardiomyopathy[J]. ESC Heart Fail, 2019, 6(1): 89-97.
- [5] 中华医学会消化内镜学分会,中国抗癌协会肿瘤内镜专业委员会. 中国早期胃癌筛查及内镜诊治共识意见(2014年·长沙)[J]. 中华消化内镜杂志, 2014, 31(7): 361-377.
- [6] Zhang Y, Sun M, Chen YS, et al. MiR-519b-3p Inhibits the Proliferation and Invasion in Colorectal Cancer via Modulating the uMtCK/Wnt Signaling Pathway[J]. Front Pharmacol, 2019, 10(1): 741.

(下转第 727 页)

# 老年非小细胞肺癌患者放疗前后 Treg 及 *Foxp3* mRNA 的变化

侯盼飞<sup>1</sup> 祝丽晶<sup>1</sup> 濮娟<sup>2</sup> 潘艳<sup>1\*</sup>

**[摘要]** 目的 探讨老年非小细胞肺癌(NSCLC)患者放疗前后调节性T细胞(Treg)及叉头状螺旋转录因子(*Foxp3*) mRNA的变化。方法 选取本院2019年1月至2019年12月收治的40例NSCLC患者作为肺癌组,选取同期50例健康体检者作为对照组,采集肺癌组放疗前、放疗期间(每隔6次放疗)及对照组外周静脉血,运用流式细胞术(FCM)测定Treg占CD4<sup>+</sup>T淋巴细胞百分比,运用实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)技术测定Treg的重要转录因子*Foxp3* mRNA的相对表达水平。结果 肺癌组外周血中Treg占CD4<sup>+</sup>T淋巴细胞百分比以及*Foxp3* mRNA相对表达量显著高于对照组,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。肺癌组中,Treg百分比和*Foxp3* mRNA相对表达量自放疗后开始上升,Treg至第18次升至最高值,*Foxp3* mRNA至第12次升至最高值,均显著高于放疗前,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),然后逐渐下降,至第30次与放疗前比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。结论 放疗可加剧NSCLC患者Treg的变化,严重影响抗肿瘤免疫功能。

**[关键词]** 肺癌; T淋巴细胞; 放疗; 调节性T细胞

## Changes of Treg and *Foxp3* mRNA in elderly patients with non - small cell lung cancer before and after radiotherapy

HOU Panfei<sup>1</sup>, ZHU Lijing<sup>1</sup>, PU Juan<sup>2</sup>, PAN Yan<sup>1\*</sup>

(1. Department of Clinical Laboratory, 2 Department of Radiation Oncology, Lianshui People's Hospital Affiliated Kangda College of Nanjing Medical University, Lianshui, 223400, China)

**[ABSTRACT]** **Objective** To investigate changes of regulatory T cells and Forkhead helix family transcription factor 3 (*Foxp3*) mRNA in elderly patients with non - small cell lung cancer before and after radiotherapy. **Methods** A total of 40 patients with non-small cell lung cancer admitted during January 2019 and December 2019 were chosen as the carcinoma group, and 50 healthy examinees at the same period were chosen as the control group. Peripheral venous blood was collected from the lung cancer group (before and during radiotherapy, every 6 times of radiotherapy) and the control group. Serum Treg accounting for CD4<sup>+</sup> T cell proportions was monitored by flow cytometry. The expression of *Foxp3* mRNA was monitored by reverse-transcription PCR. **Results** Compared with those in the control group, Treg accounting for CD4<sup>+</sup> T cell proportions and relative expression of *Foxp3* mRNA were significantly increased in the carcinoma group ( $P<0.05$ ). After radiotherapy, Treg number for CD4<sup>+</sup> T cell proportions and relative expression of *Foxp3* mRNA were gradually increased, which were significantly different from those before radiotherapy ( $P<0.05$ ). The highest peaks of Treg and *Foxp3* mRNA were 18th and 12th, respectively. Then they gradually decreased until the 30th time, which had no significant difference compared to those before radiotherapy ( $P>0.05$ ). **Conclusion** Radiotherapy can exacerbate the changes of Treg in NSCLC and affect the anti-tumor immune

基金项目:淮南市自然科学研究计划项目(HAB201847)

作者单位:1. 南京医科大学康达学院附属涟水人民医院检验科,江苏,涟水 223400

2. 南京医科大学康达学院附属涟水人民医院放疗科,江苏,涟水 223400

\*通信作者:潘艳, E-mail:470538393@qq.com

function of the body, which provide theoretical basis for radiotherapy combined with immunotherapy in lung cancer.

[KEY WORDS] Lung cancer; T-Lymphocytes; Radiotherapy; Regulatory T cells

肺癌发病率居恶性肿瘤第1位,70%以上患者确诊时已是中晚期,放疗在肺癌的治疗中占有非常重要的地位<sup>[1]</sup>。但是放疗在激活机体抗肿瘤免疫的同时,也能引起机体的免疫抑制,出现肿瘤对射线的抵抗<sup>[2]</sup>。因此,如果放疗过程中能够解除机体的免疫抑制,即放疗联合免疫治疗,可以更有效地增强机体的抗肿瘤效应,改善患者的预后。调节性T细胞(regulatory T cells, Treg)在机体内发挥重要的免疫抑制作用,且与放疗密切相关<sup>[3]</sup>。本研究通过流式细胞术(Flow Cytometry, FCM)及实时荧光定量逆转录聚合酶链反应技术(reverse-transcription PCR, RT-PCR)测定非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)放疗过程中Treg 以及其叉头状螺旋转录因子3(Forkhead helix family transcription factor 3, Foxp3)mRNA 在放疗过程中的变化,试图为患者放疗联合免疫治疗提供干预的靶点以提高放疗疗效。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选取本院2019年1月-2019年12月收治的40例NSCLC作为肺癌组,其中男23例,女17例;年龄平均(68.55±7.82)岁。纳入标准:①年龄≥60岁;②病理确诊为NSCLC<sup>[4]</sup>;③患者未接受其他治疗,且开始采集标本后1月内不行手术及化疗,只接受单纯放疗的患者。排除标准:①慢性阻塞性肺疾病、哮喘急性发作期;②合并自身免疫系统疾病;③合并感染;④近一月使用过糖皮质激素或免疫抑制剂。选取同期在本院查体的50例健康体检者作为对照组,其中男27例,女23例;年龄平均(67.38±7.99)岁。两组性别、年龄比较差异无统计学意义( $P>0.05$ ),具有可比性。该项目经本院伦理委员会批准且所有参与者均签署知情同意书。

### 1.2 主要仪器和试剂

Varian 23-Ex 直线加速器购自美国 Varian 公司,Navios 流式细胞仪购自美国 Beckman Coulter 公司,ABI7500PCR 扩增仪购自美国 ABI 公司,人 Treg 检测试剂盒购自美国 BD 公司,RT-PCR 试剂盒、RNA 提取试剂及各种生化试剂购自上海生工

生物工程股份有限公司。Foxp3 基因引物 P1:5'-CTGGGCTCCTCGCCTGAC-3', P2:5'-CTCTCTGCCCTCAGCCTTGC-3',由上海生工生物工程股份有限公司合成。

### 1.3 放疗方法

采用 Varian 23-Ex 直线加速器,肺癌组患者均采用 6 MV X 线 IMRT 外照射,常规分割 2.0 Gy/f,总剂量 DT 60 Gy/30f。

### 1.4 血样采集

对照组清晨空腹采集静脉血 5 mL,采用肝素抗凝。肺癌组分别于放疗前、放疗期间(每隔 6 次放疗)采集标本,方法同对照组。

### 1.5 Treg 检测

取静脉血 100  $\mu$ L 加入已标记好的流式管,分别加入 FITC Mouse Anti-Human CD4、PE Mouse Anti-Human CD25、Alexa Fluor647 Mouse anti-Human CD127 各 20  $\mu$ L,室温避光孵育 15 min;加入裂解液,震荡混匀室温避光 15 min,1 200 r/min 离心 5 min,弃上清后加入 2 mL PBS,1 200 r/min 离心 5 min;弃上清后加入 500  $\mu$ L PBS 震荡后,流式细胞仪检测 Treg 占 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞百分比。

### 1.6 Foxp3 mRNA 检测

Trizol 法提取血浆总 RNA,用随机引物逆转录成 cDNA,以 cDNA 作为模板,按照试剂说明书配制反应体系,采用 ABI7500 PCR 仪检测 Foxp3 mRNA 的相对表达水平。

### 1.7 统计学分析

采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析,计量资料以( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间比较采用  $t$  检验,多组间比较采用方差分析,以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 对照组与肺癌组放疗前外周血检测指标的比较

肺癌组放疗前外周血 Treg 占 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞百分比以及 Foxp3 mRNA 相对表达量均高于对照组,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。见表 1、图 1。

### 2.2 肺癌组放疗期间外周血的检测指标变化

肺癌组放疗期间各阶段外周血 Treg 占 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞百分比自放疗后开始上升,至第 18 次升

表1 两组外周血 Treg 百分比、*Foxp3* mRNA 相对表达量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Comparison of Treg percentage and *Foxp3* mRNA relative expression between 2 groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	Treg	<i>Foxp3</i> mRNA
对照组	5.36±2.85	1.38±0.71
肺癌组	7.71±2.83	2.59±0.86
<i>t</i> 值	7.385	22.367
<i>P</i> 值	0.013	< 0.001

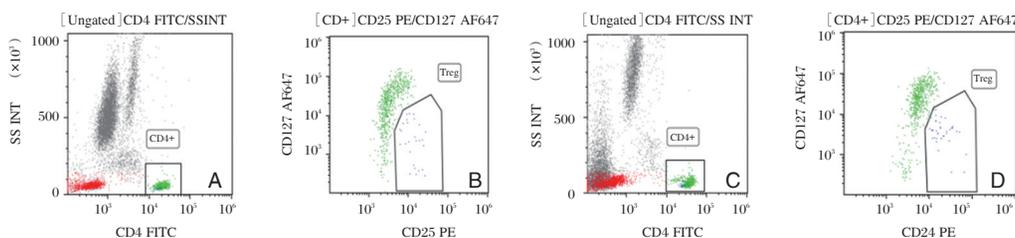


图1 外周血 Treg 检测流式细胞图

Figure 1 Flow cytometry of Treg detection in peripheral blood

表2 肺癌放疗各阶段 Treg、*Foxp3* mRNA 的变化 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Changes of Treg and *Foxp3* mRNA in different stages of lung cancer radiotherapy ( $\bar{x} \pm s$ )

分组	Treg	<i>Foxp3</i> mRNA
放疗前	7.71±2.83	2.59±0.84
放疗第6次	8.23±2.65	3.07±0.89
放疗第12次	8.28±2.15	3.25±1.00 <sup>a</sup>
放疗第18次	9.31±2.28 <sup>a</sup>	3.19±0.96 <sup>a</sup>
放疗第24次	9.18±3.06 <sup>a</sup>	3.10±0.92 <sup>a</sup>
放疗第30次	8.09±3.19	2.45±0.71
<i>F</i> 值	8.581	21.786
<i>P</i> 值	<0.001	<0.001

注:<sup>a</sup>与放疗前相比,*P*<0.05。

### 3 讨论

我国肺癌的发病率和病死率均位居恶性肿瘤之首,并以 NSCLC 最为多见<sup>[5]</sup>。由于肺癌早期诊断较为困难,确诊时只有 15% 的患者能够手术治疗<sup>[5]</sup>。对于无法手术的患者,放疗是主要的治疗措施。放疗可直接杀死肿瘤细胞,并通过刺激局部免疫反应形成长期抗肿瘤效果<sup>[6]</sup>。然而,放疗在激活抗肿瘤免疫的同时,也能引起机体的免疫抑制,造成肿瘤对射线的抵抗,这种现象与免疫抑制性 Treg 的调控密切相关<sup>[2-3,7]</sup>。

本研究的结果表明,肺癌组放疗前外周血 Treg 占 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞百分比及 *Foxp3* mRNA 的相对表达水平均明显升高,这种现象在其它的恶性肿瘤中也得到证实<sup>[8-9]</sup>,但 Treg 占 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞百分

至最高,与放疗前比较差异有统计学意义(*P*<0.05),然后逐渐下降,至第 30 次与放疗前比较差异无统计学意义(*P*>0.05)。肺癌组放疗期间各阶段外周血 *Foxp3* mRNA 相对表达量自放疗后开始上升,至第 12 次升至最高,与放疗前比较差异有统计学意义(*P*<0.05),然后逐渐下降,至第 30 次与放疗前比较差异无统计学意义(*P*>0.05)。见表 2。

比以及 *Foxp3* mRNA 相对表达水平增多的机制并未具体阐明。有研究表明肿瘤细胞高表达环氧合酶 2(Cyclooxygenase-2, COX-2),COX-2 可产生过量的诺前列酮,从而诱导 Treg 的产生,同时还可促进 *Foxp3* mRNA 表达的上调<sup>[10]</sup>。另外,肿瘤微环境中增多的白细胞介素-10(interleukin-10,IL-10)、转化生长因子-β(transforming growth factor-β, TGF-β)以及未成熟抗原递呈细胞表达,可诱导 Treg 的增殖<sup>[11]</sup>。Treg 可以通过细胞-细胞间的接触抑制、细胞因子途径两种途径抑制效应细胞的免疫反应,抑制机体的抗肿瘤免疫应答。因此,肿瘤机体内 Treg 增多导致免疫耐受增强,加速肿瘤的进展<sup>[12]</sup>。

本研究结果显示,肺癌放疗过程中 Treg 占 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞百分比以及 *Foxp3* mRNA 的相对表达量自放疗后开始逐渐上升,这与 Zhang 等<sup>[3,13]</sup>的研究结论是一致的。放疗过程中 Treg 升高的具体分子机制可能与放疗能够诱导和活化免疫抑制因子 TGF-β、增加蛋白激酶 B 的表达,进而促进 Treg 生成、抑制 Treg 凋亡有关<sup>[14]</sup>。Treg 和 *Foxp3* mRNA 升高至一定程度后又逐渐下降,这与 Napolitano 等<sup>[15]</sup>在大肠癌中的研究一致,这种变化机制可能与 microR-545 的表达有关。放疗期间 Treg 及 *Foxp3* mRNA 变化,提示放疗进一步影响了机体的免疫耐受。

本研究探讨了机体内 Treg 及 *Foxp3* mRNA 伴随放疗发生变化的现象及可能的机制。本研究亦存

在一定的局限性:由于受严格的纳入和排除标准限制,首诊且仅行放疗的患者较少,致入组的样本量少,未按照肿瘤分期进行分组统计;另外,免疫系统的个体差异因素可能导致一定的偏倚。针对上述问题,本课题组下一步的研究计划将纳入更多的患者,并对他们进行更长放疗时间的追踪,更精准地提炼出放疗过程中 Treg 以及 *Foxp3* mRNA 的变化规律,并对内部分子机制进行更深入的研究。

放疗协同免疫治疗,应用前景广阔,研究肺癌放疗过程中 Treg 及其 *Foxp3* mRNA 的普遍变化规律具有重要意义。如能在放疗过程中选择适宜的时机干扰 Treg 或 *Foxp3* mRNA 的表达,将充分发挥抗肿瘤免疫效应细胞的功能,杀灭肿瘤细胞,提高肺癌放疗的疗效,改善患者的预后。

#### 参考文献

- [1] 肖佳龙,郑莹. 全球肺癌的流行及预防进展[J]. 中国癌症杂志, 2020,30(10): 721-725.
- [2] Tian Y M, Tian Y H, Zeng L, et al. Prognostic model for survival of local recurrent nasopharyngeal carcinoma with intensity-modulated radiotherapy [J]. *Brit J Cancer*, 2014, 110(2): 297-303.
- [3] 付晶,尚春迎,刘丽. Th17/Treg 联合 PCT 值对乳腺癌患者术后化疗医院感染的预测价值分析[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020,12(12):1704-1707.
- [4] 王丽. 中国原发性肺癌诊疗规范(2015年版)[J]. 中华肿瘤杂志, 2016, 37(7): 433-436.
- [5] Chen W, Zheng R, Baade P D, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. *CA: A Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115-132.
- [6] Deloch L, Derer A, Hartmann J, et al. Modern Radiotherapy Concepts and the Impact of Radiation on Immune Activation [J]. *Front Oncol*, 2016, 6: 141.
- [7] Muroyama Y, Nirschl T R, Kochel CM, et al. Stereotactic radiotherapy increases functionally suppressive regulatory T cells in the tumor microenvironment[J]. *Cancer Immunol Res*, 2017, 5(11): 992-1004.
- [8] Liu C, Tong Z, Tan J, et al. Analysis of Treg/Th17 cells in patients with tongue squamous cell carcinoma [J]. *Exp Ther Med*, 2019,18(3): 2187-2193.
- [9] 梅琳琳,王雅莉,田晓娜,等. 宫颈病变与 Treg 转录因子表达及细胞因子水平的关系[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(11): 1484-1492.
- [10] Tuna B, Yorukoglu K, Gurel D, et al. Significance of COX-2 expression in human renal cell carcinoma[J]. *Urology*, 2004, 64(6): 1116-1120.
- [11] Hou PF, Zhu LJ, Chen XY, et al. Age-related changes in CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells and their relationship with lung cancer [J]. *Plos One*, 2017, 12(3): e0173048.
- [12] Marshall EA, Ng KW, Kung SHY, et al. Emerging roles of T helper 17 and regulatory T cells in lung cancer progression and metastasis[J]. *Mol Cancer*, 2016, 15(1):67.
- [13] Wang SJ, Haffty B. Radiotherapy as a new player in immunoncology [J]. *Cancers (Basel)*, 2018, 10(12): 515.
- [14] Wang M, Gou X, Wang L. Protein Kinase B Promotes Radiation-Induced Regulatory T Cell Survival in Bladder Carcinoma [J]. *Scandin J Immunol*, 2012, 76(1):70-74.
- [15] Wang XM, Pan SM, Du RC, et al. Changes and clinical significance of Th17/Treg related cytokines in patients with oropharyngeal carcinoma before and after radiotherapy [J]. *Clin Misdiagn Misther*, 2017, 30(3): 78-80.

(上接第 723 页)

- [7] 蓝瑞隆,黄菲,陈瑞庆,等. 线粒体肌酸激酶 1 对人鼻咽癌细胞株 CNE-1 顺铂敏感性的作用研究[J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2018,53(7):524-529.
- [8] 蒋彪,宋文丽,蒋晓春,等. 胃癌相关基因的研究新进展[J]. 医学综述, 2020,26(6):1119-1125.
- [9] 刘永文,王冬梅,李志斌,等. 肥胖成年人血清胎球蛋白 B 水平与代谢综合征关系研究[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2018,34(3):217-222.
- [10] Ochieng J, Nangami G, Sakwe A, et al. Impact of Fetuin-A (AHSG) on Tumor Progression and Type 2 Diabetes [J]. *Int J Mol Sci*, 2018,19(8):2211.
- [11] 归倩,张立会. 抑制宫颈癌中 NGAL 基因的表达对癌细胞增殖及凋亡的影响和机制研究[J]. 中国妇产科临床杂志, 2018,19(1):20-22.
- [12] Rahimi S, Roushbandeh AM, Ahmadzadeh E, et al. Implication and role of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in cancer: lipocalin-2 as a potential novel emerging comprehensive therapeutic target for a variety of cancer types [J]. *Mol Biol Rep*, 2020,47(49):2327-2346.
- [13] Shi F, Wu H, Qu K, et al. Identification of serum proteins AHSG, FGA and APOA-I as diagnostic biomarkers for gastric cancer [J]. *Clin Proteomics*, 2018, 15(6): 18.
- [14] Schlattner U, Kay L, Tokarska-Schlattner M. Mitochondrial Proteolipid Complexes of Creatine Kinase [J]. *Subcell Biochem*, 2018,87(1):365-408.
- [15] 兰纲. 老年食管癌患者血清 MMP-9、VEGF、NGAL 和 TGF- $\beta$ 1 的水平变化及意义[J]. 中国老年学杂志, 2018,38(7): 1595-1597.

# 小儿病毒性脑炎动态脑电图改变与血清NSE水平相关性

冯卉\* 马进 蔡金标

**[摘要]** 目的 分析小儿病毒性脑炎(VE)动态脑电图(AEEG)改变与血清神经元特异性烯醇化酶(NSE)水平相关性。方法 选取本院2017年8月至2020年8月108例疑似VE患儿,行AEEG检查(异常101例),以临床诊断为标准,分析AEEG检查诊断价值及与临床诊断病情程度一致性。根据AEEG检查异常程度分为重度异常组(12例)、中度异常组(25例)、轻度异常组(64例),比较3组血清NSE水平、3个月预后情况,分析AEEG检查异常程度与血清NSE相关性及其与预后的关系。结果 108例疑似VE患儿,临床确诊103例。AEEG检查诊断VE敏感度为98.06%,特异度为100%,准确度为98.15%。AEEG检查异常程度与临床诊断病情程度一致性较高( $P<0.05$ )。随VE患儿AEEG异常程度加重,血清NSE水平明显升高,差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。AEEG检查异常程度与血清NSE水平存在正相关性( $P<0.05$ )。重度异常组预后不良率高于中度异常组、轻度异常组,差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。AEEG检查异常程度与预后呈正相关( $P<0.05$ )。AEEG检查重度异常患儿预后不良相对风险HR值最大,为6.207。结论 AEEG检查有望成为小儿VE早期诊断与预后评估的一项有效辅助手段。

**[关键词]** 动态脑电图;病毒性脑炎;神经元特异性烯醇化酶;预后

## Correlation between changes of ambulatory electroencephalogram and serum NSE level in children with viral encephalitis

FENG Hui\*, MA Jin, CAI Jinbiao

(Department of Pediatrics, General Hospital of Anhui Wanbei Coal and Power Group, Suzhou, Anhui, China, 234000)

**[ABSTRACT]** **Objective** To analyze the correlation between ambulatory electroencephalogram (AEEG) changes and serum neuron-specific enolase (NSE) level in children with viral encephalitis (VE). **Methods** A total of 108 children with suspected VE from August 2017 to August 2020 in our hospital were selected for AEEG examination. The clinical diagnosis was adopted as the standard, and the diagnostic value of AEEG examination and its consistency with clinical diagnosis were analyzed. According to the degree of abnormality in AEEG examination, they are divided into the severe abnormality group, the moderate abnormality group, and the mild abnormality group. Serum NSE level and prognosis at 3 months were compared among the 3 groups, and the correlation between abnormal degree of AEEG and serum NSE and prognosis was analyzed. **Results** Among 108 children with suspected VE, 103 cases were clinically confirmed. The sensitivity of AEEG diagnosis of VE was 98.06%, the specificity was 100%, and the accuracy was 98.15%. The degree of abnormality in AEEG examination was consistent with the degree of clinical diagnosis ( $P<0.05$ ). With the aggravation of the abnormal degree of AEEG in children with VE, the serum NSE level increased significantly, and the difference was statistically significant ( $P<0.05$ ). The degree of abnormality of AEEG examination was positively correlated with serum NSE level ( $P<0.05$ ). The poor prognosis rate of the severe abnormality

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

作者单位:安徽皖北煤电集团总医院儿科,安徽,宿州 234000

\*通信作者:冯卉, E-mail: fh101101@163.com

group was higher than that of the moderate abnormality group and the mild abnormality group, and the difference was statistically significant ( $P<0.05$ ). The degree of abnormality in AEEG examination was positively correlated with the prognosis ( $P<0.05$ ). The relative risk of poor prognosis in children with severe abnormalities in AEEG examination was the highest, which was 6.207. **Conclusion** AEEG examination is expected to be an effective aid for early diagnosis and prognostic evaluation of VE in children.

**[KEY WORDS]** Ambulatory electroencephalogram; Viral encephalitis; NSE; Prognosis

小儿病毒性脑炎(viral encephalitis, VE)是由肠道病毒、流感病毒等病毒直接侵犯脑实质所致原发性脑炎,病变主要累及脑干、小脑、脑叶等<sup>[1-2]</sup>。相关研究认为,颅脑弥漫性水肿,致使神经元变性坏死、炎性细胞浸润脑膜及脑实质等部位是小儿VE主要病理改变<sup>[3]</sup>,若未予以及时有效治疗,严重危及患儿生命安全。因此,及时诊断小儿VE对促进预后改善至关重要。近年来,随影像技术不断更新发展,动态脑电图(ambulatory Electroencephalogram, AEEG)通过记录大脑神经元生物电功能检查,已逐渐成为检测脑部功能异常的有效方法<sup>[4]</sup>,但关于其检查异常程度与血清神经元特异性烯醇化酶(NSE)水平相关性及早诊断对预后的评估价值有待进一步证实。基于此,本研究尝试探讨AEEG改变对小儿VE早期诊断价值与预后评估的价值,旨在为临床诊治、改善预后提供循证数据支持。具体分析如下。

## 1 资料和方法

### 1.1 一般资料

选取本院2017年8月至2020年8月108例疑似VE患儿作为研究对象,其中女45例,男63例,年龄,平均(5.74±1.59)岁。可有发热、嗜睡、呕吐、头痛、抽搐、意识改变等临床表现;均符合AEEG检查适应症;监护人均签署知情同意书;排除以下情况:真菌、细菌或其他病原体感染所致脑膜炎者;存在脑肿瘤、颅脑损伤者;患有多发性硬化症者;凝血机制紊乱或活动性出血者;合并自身免疫系统疾病者;监护人存在认知功能障碍、意识不清或精神行为紊乱。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 AEEG检查

应用日本光电工业株式会社提供的脑电图仪进行检查,根据国际10~20定位系统安放头皮记录电极,运用16导联方式描记,检查时间24 h,包括自然清醒及自然睡眠。

#### 1.2.2 血清NSE水平

治疗前空腹抽取静脉血2 mL,采用深圳市新产

业生物医学工程股份有限公司提供的化学发光法仪器及配套试剂盒检测血清NSE,按照说明书操作。

#### 1.2.3 治疗方案

所有患儿均予以足够热量与营养支持,必要时予以静脉补液、退热、抗惊厥、抗病毒等对症处理。

#### 1.3 AEEG检查异常程度判定标准<sup>[5]</sup>

将AEEG检查异常程度分为轻度异常组、中度异常组、重度异常组,其中AEEG改变主要表现为 $\theta$ 波增多,波幅增高为轻度异常;AEEG改变主要表现为广泛不规则弥散性高波幅 $\theta$ 波、 $\delta$ 波,部分夹杂少量局灶性尖波、棘慢综合波或棘波为中度异常;AEEG改变主要表现为背景活动为全导联广泛弥散性高波幅 $\delta$ 波,部分出现局灶性尖波、棘慢综合波或棘波,重者或出现暴发抑制为重度异常。

#### 1.4 观察指标

①统计临床诊断与AEEG检查结果。②分析AEEG检查异常程度与临床诊断病情程度一致性。③比较3组血清NSE水平。④分析AEEG检查异常程度与血清NSE水平相关性。⑤对3组3个月预后情况进行判定,将继发性癫痫、运动认知功能减退、语言异常及听力障碍均纳入预后不良。⑥分析AEEG检查异常程度与预后的关系。

#### 1.5 统计学方法

采用统计学软件SPSS 22.0处理数据,计量资料以( $\bar{x} \pm s$ )描述,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两组间比较采用SNK-q检验,两组间比较采用独立样本 $t$ 检验;一致性采用Kappa分析;计数资料用 $n(\%)$ 表示、 $\chi^2$ 检验;影响因素采用COX回归模型分析;相关性分析采用Spearman相关系数模型;诊断效能采用受试者工作特征(Receiver operating characteristic curve, ROC)曲线。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 临床诊断与AEEG检查结果

108例疑似VE患儿,临床确诊103例,AEEG检查出101例异常(阳性),7例正常(阴性),其中漏

诊2例,诊断敏感度为98.06%(101/103),特异度为100%(5/5),准确度为98.15%(106/108)。见图1。

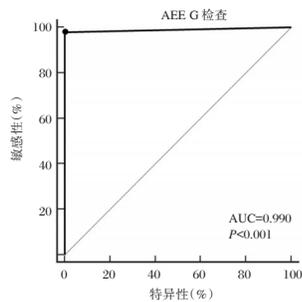
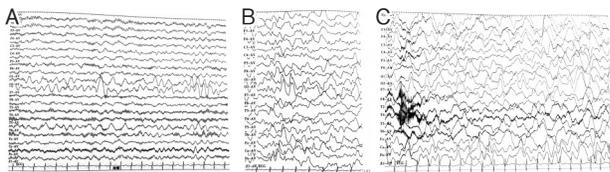


图1 AEEG检查诊断VE的ROC曲线

Figure 1 ROC curve of AEEG in diagnosis of VE

### 2.2 AEEG检查异常程度与临床诊断病情程度一致性

临床确诊103例VE患儿中,根据临床表现分度,其中轻度(发热、头痛、呕吐、精神差等)63例,中度(<3次的抽搐,但无意识改变)27例,重度(反复抽搐3次以上,有意识改变)13例。AEEG检查阳性101例中,轻度异常64例,中度异常25例,重度异常12例,见图2。一致性分析,AEEG检查异常程度与临床诊断病情程度一致性较高( $P<0.05$ )。见表1。



注:A为AEEG轻度异常;B为中度异常AEEG;C为重度异常AEEG。

图2 AEEG不同异常程度患儿改变情况

Figure 2 changes in children with different degrees of AEEG abnormalities

表1 AEEG检查异常程度与临床诊断病情程度一致性

Table 1 consistency of abnormal degree of AEEG and clinical diagnosis

检查方式 类型	临床诊断结果				Kappa	95%CI	P值
	阴性	轻度	中度	重度			
AEEG检查							
阴性	4	2	1	0	0.856	0.727~0.986	<0.001
轻度异常	1	60	3	0			
中度异常	0	1	23	1			
重度异常	0	0	0	12			

### 2.3 3组AEEG异常组血清NSE水平比较

3组AEEG异常组血清NSE水平比较:重度异常组>中度异常组>轻度异常组,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。见表2。

表2 3组血清NSE水平比较( $\bar{x}\pm s$ )

Table 2 Comparison of serum NSE levels among three groups ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	例数	NSE (ng/mL)
重度异常组	12	24.34±3.61 <sup>bc</sup>
中度异常组	25	20.79±2.57 <sup>ac</sup>
轻度异常组	64	18.36±1.21 <sup>ab</sup>
F值		50.093
P值		<0.001

注:与重度异常组比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ ;与中度异常组比较,<sup>b</sup> $P<0.05$ ;与轻度异常组比较,<sup>c</sup> $P<0.05$ 。

2.4 AEEG检查异常程度与血清NSE水平相关性  
相关性分析,AEEG检查异常程度与血清NSE水平呈正相关( $r=0.834, P<0.001$ )。

### 2.5 3组预后情况比较

3组AEEG异常组预后不良率比较:重度组>中度异常组>轻度异常组,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。见表3。

表3 3组预后情况比较[n(%)]

Table 3 Comparison of prognosis among 3 groups [n(%)]

组别	n	继发性 癫痫	运动认知 功能减退	语言异常及 听力障碍	预后不良 发生率
重度异常组	12	7(58.33)	3(25.00)	1(8.33)	11(91.67)
中度异常组	25	10(40.00)	3(12.00)	2(8.00)	15(60.00)
轻度异常组	64	9(14.06)	4(6.25)	2(3.13)	15(23.44)
$\chi^2$ 值					24.696
P值					<0.001

### 2.6 AEEG检查异常程度与预后的关系

相关性分析,AEEG检查异常程度与预后呈正相关( $r=0.728, P<0.001$ );COX回归分析,AEEG检查轻度异常患儿预后不良相对风险HR值<AEEG检查中度异常患儿<AEEG检查重度异常患儿。见表4。

表4 COX回归分析

Table 4 Cox regression analysis

变量	$\beta$	S.E.	Wald $\chi^2$	HR	95%CI	P值
AEEG检查轻度异常	1.0360.371	7.802	2.819	1.745~4.553	<0.001	
AEEG检查中度异常	1.4680.463	10.058	4.342	2.736~6.891	<0.001	
AEEG检查重度异常	1.8260.502	13.228	6.207	3.106~12.406	<0.001	

## 3 讨论

流行病学调查统计<sup>[6]</sup>,我国VE发病率为1.5%~10.5%,其中小儿VE发病率约为37.5%~94.2%,且部分患儿病情凶险,致残率高达20.0%,易遗留运动认知功能减退、继发性癫痫等后遗症,不利于预后改善。同时,相关研究报道<sup>[7]</sup>,VE患儿脑组织会逐渐出现出血、水肿、甚至坏死等一系列病理变化,进

而加重脑组织功能障碍,引起脑神经传导异常,脑电图主要表现为脑组织异常放电频率增加。AEEG作为一种无创监测手段,具有操作快捷、安全性高、可重复性强等优势,通过描记脑神经细胞电生理活动,可实时动态监测脑细胞节律性、自发性电活动,直接判断脑细胞功能改变情况、中枢病变范围及脑功能损伤程度<sup>[8-9]</sup>。本研究结果结合王维等<sup>[10]</sup>研究考虑这可能归因于随小儿VE病程进展,脑细胞损伤加重,神经细胞新陈代谢速度、强度及神经传导速度明显延缓,丘脑上行激活系统机能失衡,从而导致脑电活动改变,AEEG异常。提示AEEG可为临床小儿VE早期诊断提供一种有效辅助手段。但受VE异常脑电波信号传导具有阵发性、非持续性及短暂爆发性特点影响,郭育英等<sup>[11]</sup>研究认为,脑电图监测VE异常率仅为50.0%,与本研究结果不一致,可能与样本量不同、本研究实施AEEG检查有关。进一步绘制ROC曲线可知,AEEG诊断小儿VE的AUC值>0.9,再次佐证了AEEG在小儿VE诊断中的应用价值。

同时,国外学者指出<sup>[12]</sup>,脑炎急性期脑电图存在程度不一的异常,主要表现为多位弥漫性高波幅慢波,节律或非节律性 $\delta$ 波,且当累及脑白质时,弥漫性慢波活动更为突出,易产生高波幅且无节律、多形性 $\delta$ 波。另有文献表明<sup>[13]</sup>,脑电图异常情况与VE患儿临床症状基本平行,且脑电图异常越重,提示脑损伤越严重。本研究结果充分说明AEEG检查有助于指导临床评估小儿VE病情程度,实施个性化治疗。NSE作为糖酵解途径中重要酶,可特异性结合神经元,参与神经元成熟、分化<sup>[14]</sup>。本研究指出,血清NSE水平随VE患儿AEEG检查异常程度呈升高趋势,结合白春峰等<sup>[15]</sup>研究这可能归因于随脑部感染加重,脑实质神经元、胶质细胞及髓鞘细胞损害加剧,进而破坏血脑屏障完整性,从而导致血清NSE水平显著增加。进一步经Spearman相关性分析得出,AEEG检查异常程度与血清NSE水平存在正相关性,故建议临床采用AEEG、血清NSE水平联合检查,以对小儿VE病情进展作出更加准确评估。此外,胡文静等<sup>[16]</sup>经多因素非条件Logistic回归分析显示,脑电图重度异常(OR=13.468)是重症VE患儿预后不良的独立危险因素,支持本研究观点,可能与小儿VE神经元持续性损伤,改变生理特性与突触功能,加重大脑功能紊乱存在一定关联性,由此可见,AEEG检查有望成为评估小儿VE预后的一项重要依据。

综上所述,AEEG检查有助于指导小儿VE早期诊断,并为预后评估提供一种有效辅助手段。

## 参考文献

- [1] 靳瑞娟,黄锦钊,孙多成,等. 儿童病毒性脑炎的MRI表现与病原学检测对照分析[J]. 中国中西医结合影像学杂志, 2020, 18(6): 628-631.
- [2] Wu Y, Chen M, Cui Y, et al. Viral encephalitis in quantitative EEG[J]. J Integr Neurosci, 2018, 17(3-4): 493-501.
- [3] 聂亚丹,房敬林. 联合检测血清学指标与脑脊液指标判断小儿病毒性脑炎病情及预后的临床意义[J]. 航空航天医学杂志, 2020, 31(7): 780-781.
- [4] 魏钰,但炜,陶园,等. 动态脑电图对开颅术后预防性抗癫痫药物减停的临床研究[J]. 第三军医大学学报, 2019, 41(5): 461-466.
- [5] 中国抗癫痫协会脑电图和神经电生理分会. 临床脑电图培训教程[M]. 北京:人民卫生出版社, 2011: 78-80, 197-199.
- [6] 蒋绍清,潘宣任,庞宗钦,等. 小儿危重病例评分联合格拉斯哥昏迷量表评分及视频脑电图对小儿重症病毒性脑炎预后的评估价值研究[J]. 中国全科医学, 2020, 23(27): 3402-3407+3415.
- [7] 谢秋桂,周旭. 脑电图联合血清NSE、MBP对病毒性脑炎的诊断及病情评估价值[J]. 标记免疫分析与临床, 2018, 25(9): 1297-1300.
- [8] Lin Y, Zhang G, Wang Y, et al. Prognostic evaluation of child patients with infectious encephalitis through AEEG and REEG[J]. Exp Ther Med, 2018, 16(6): 5243-5247.
- [9] 靳梅,耿文锦,岳玲,等. 重症脑炎患儿振幅整合脑电图对脑功能预后的早期评价[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2019, 41(9): 692-695.
- [10] 王维,李佳,王立利,等. 动态脑电图联合头颅磁共振成像在儿童病毒性脑炎急性期病情及预后评估中应用价值分析[J]. 临床军医杂志, 2019, 47(6): 603-605.
- [11] 郭育英,廖海燕,谢彩云,等. 脑电图监测在病毒性脑炎诊断及预后中的应用价值[J]. 海南医学, 2018, 29(9): 1303-1304.
- [12] Milshtein NY, Paret G, Reif S, et al. Acute Childhood Encephalitis at 2 Tertiary Care Children's Hospitals in Israel: Etiology and Clinical Characteristics[J]. Pediatr Emerg Care, 2016, 32(2): 82-86.
- [13] 范新风,李艳玲,孙晓宝,等. 小儿重症病毒性脑炎的预后因素分析[J]. 中国现代医学杂志, 2020, 30(9): 94-98.
- [14] 王宇琛,章春芝,王大伟,等. 血清CYfra21-1、LDH、NSE水平检测在肺癌患者辅助诊断中的应用[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(9): 1226-1229+1233.
- [15] 白春峰,管敏仓,吕静,等. 病毒性脑炎患者神经功能指标和sICAM-1分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2019, 29(19): 2943-2947.
- [16] 胡文静,杨理明,廖红梅,等. 小儿重症病毒性脑炎临床特点、预后及其相关因素分析[J]. 中国感染控制杂志, 2018, 17(3): 241-246.

# 梅尼埃病者补体、免疫球蛋白与听觉前庭功能关系及诊断价值

林红艳<sup>1\*</sup> 潘利平<sup>1</sup> 李晓<sup>2</sup>

**[摘要]** **目的** 探讨梅尼埃病(MD)患者补体、免疫球蛋白(Ig)与听觉前庭功能关系及诊断价值。**方法** 选取2017年9月至2020年9月本院收治的102例MD患者为MD组,另选取同期39例健康人群为对照组,比较两组基线资料、听觉前庭功能[前庭功能减数值、语音频率、听觉脑干诱发电位(ABR) I~V波间歇期]、C3、C4、IgA、IgG、IgM,分析MD的相关影响因素,评价补体、免疫球蛋白与听觉前庭功能的关系及对MD的诊断价值。**结果** 前庭功能减数值、语音频率、ABR I~V波间歇期、C3、C4、IgA、IgG、IgM比较,MD组>对照组,差异有统计学意义( $P<0.05$ );C3、C4、IgA、IgG、IgM与MD患者前庭功能减数值、语音频率、ABR I~V波间歇期呈正相关( $P<0.05$ );C3、C4、IgA、IgG、IgM是MD发生的重要影响因素( $P<0.05$ );C3、C4、IgA、IgG、IgM联合诊断MD的曲线下面积(AUC)最大,为0.945。**结论** 补体、Ig与MD患者听觉前庭功能存在良好线性关系,二者联合检测可为临床MD诊断、听觉前庭功能评估提供有效辅助手段。

**[关键词]** 梅尼埃病;补体;免疫球蛋白;前庭功能;诊断

## Relationship between complement, immunoglobulin and auditory vestibular function in patients with Meniere's disease and its diagnostic value

LIN Hongyan<sup>1\*</sup>, PAN Liping<sup>1</sup>, LI Xiao<sup>2</sup>

(1. Department of Otolaryngology, Anyang Sixth People's Hospital, Anyang, Henan, China, 455000;  
2. Department of Otolaryngology, the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Xinxiang, Henan, China, 453000)

**[ABSTRACT]** **Objective** To investigate the relationship between complement, immunoglobulin (Ig) and auditory vestibular function in patients with Meniere's disease (MD) and its diagnostic value. **Methods** A total of 102 MD patients (the MD group) and 39 healthy people (the control group) admitted to our hospital from September 2017 to September 2020 were selected. The baseline data, auditory vestibular function [minus vestibular function, speech frequency, interval period of I~V wave of auditory brainstem response (ABR)], C3, C4, IgA, IgG, IgM were compared between the two groups. The related influencing factors of MD were analyzed, and the relationship between complement, immunoglobulin and auditory vestibular function and the diagnostic value of MD were evaluated. **Results** The vestibular function reduction value, speech frequency, ABR I~V wave interval, C3, C4, IgA, IgG, IgM, in the MD group were greater than those in the control group, the difference was statistically significant ( $P<0.05$ ). C3, C4, IgA, IgG, IgM were positively correlated with the vestibular function reduction value, speech frequency, ABR I~V wave interval in MD patients ( $P<0.05$ ). C3, C4, IgA, IgG, IgM are important factors influencing the occurrence of MD ( $P<0.05$ ). The area under the curve (AUC) of C3, C4, IgA, IgG, IgM combination for the diagnosis of MD is 0.945, which is the largest. **Conclusion** There is a good linear relationship between complement, Ig and auditory vestibular

基金项目:河南省科技厅项目(20190527x)

作者单位:1.安阳市第六人民医院耳鼻喉科,河南,安阳 455000

2.新乡医学院第一附属医院耳鼻喉科,河南,新乡 453000

\*通信作者:林红艳, E-mail: Linyan710227@163.com

function in patients with MD. The combined detection of the two can provide an effective auxiliary means for clinical MD diagnosis and auditory vestibular function assessment.

**[KEY WORDS]** Meniere's disease; Complement; Immunoglobulin; Vestibular function; Diagnosis

梅尼埃病(Meniere's Disease, MD)是一种以膜迷路积水为主要病理特征的内耳病,好发于40~60岁女性,发病率约为(16~513)/10万,随病情进展易造成患者耳蜗与前庭毛细胞不可逆损伤,严重影响生活质量<sup>[1-2]</sup>。目前MD病因尚未完全明确,相关研究认为<sup>[3-4]</sup>,其与内淋巴管机械阻塞与内淋巴吸收障碍学说、免疫反应学说等密切相关。补体、免疫球蛋白(Immunoglobulin, Ig)均为临床常用免疫指标,可反映机体免疫状态,但其与MD患者听觉前庭功能的相关性临床缺乏循证支持,有待进一步深入研究。本研究探讨补体、Ig与MD患者听觉前庭功能关系及诊断价值,旨在为临床诊治提供科学指导。

## 1 资料和方法

### 1.1 一般资料

选取2017年9月至2020年9月本院收治的102例MD患者为MD组,另选取同期39例健康人群为对照组。本院伦理委员会经审核评议同意。

纳入标准:①MD组均符合《梅尼埃病诊断和治疗指南(2017)》<sup>[5]</sup>中MD诊断标准,伴有发作性眩晕、波动性听力下降、耳鸣和(或)耳闷胀感等临床表现;②对照组听觉前庭功能检查无异常,且未出现上述MD临床表现;③所有研究对象均知情同意,并自愿接受听觉前庭功能检查。排除标准:①合并前庭性偏头痛、突发性耳聋、前庭神经炎等疾病者;②近3个月内有激素类药物应用史者;③合并肝肾等重要脏器器质性损害者;④青光眼、脑出血发作期者;⑤精神行为异常,近期有自杀或自残倾向者。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 两组基线资料收集

采用调查问卷收集年龄、性别、体质量指数、饮酒史、吸烟史、合并疾病等内容,其中体质量指数 $<18.5 \text{ kg/m}^2$ 为偏瘦; $18.5 \text{ kg/m}^2 \leq$ 体质量指数 $\leq 22.9 \text{ kg/m}^2$ 为正常; $23.0 \text{ kg/m}^2 <$ 体质量指数 $<26.9 \text{ kg/m}^2$ 为超重; $>26.9 \text{ kg/m}^2$ 为肥胖。

#### 1.2.2 两组听觉前庭功能检查

①前庭功能减数值:室温 $\leq 24^\circ\text{C}$ 条件下采用法

国Synapsys公司VNG视频眼震图仪及ATMOS冷热气刺激仪进行双温试验,并利用红外眼震观察眼震情况。采用最大慢相角速度计算双温试验结果<sup>[6]</sup>,单侧减数值 $\geq 20.0\%$ 提示一侧水平半规管功能低下。②语音频率:采用丹麦麦迪生公司TIERA II型听力测试仪进行纯音听阈测试,0.5、1.0、2.0、4.0 kHz的平均听阈是受检者纯音听阈结果。③听觉脑干诱发电位(auditory brainstem response, ABR) I~V波间歇期<sup>[7]</sup>:采用美国智听公司smart EP听觉诱发电位仪进行ABR检测,强度均设置为100 dB,分别测量低刺激速率(11.0 Hz)、高刺激速率(51.1 Hz)下ABR I波与V波潜伏期,并以各自V波潜伏期减去I波潜伏期获得I~V波间歇期。上述指标均取左侧和右侧平均值。

#### 1.2.3 两组补体、免疫球蛋白检测

两组均于清晨空腹取5 mL外周静脉血,常规离心处理[1 200×g离心8 min(离心半径10 cm)],取上清液, $-20^\circ\text{C}$ 冰箱低温保存。免疫比浊法测定IgA、IgG、IgM、C3、C4,严格按照罗氏诊断产品(上海)有限公司提供的试剂盒说明书操作。

### 1.3 统计学方法

采用统计学软件SPSS 22.0处理数据,计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 描述、两组间比较用 $t$ 检验;计数资料用 $n(\%)$ 表示、 $\chi^2$ 检验;采用Logistic多因素回归分析MD的相关影响因素;采用Pearson相关系数模型分析补体、免疫球蛋白与听觉前庭功能关系;绘制受试者工作特征曲线(Receiver operating characteristic curve, ROC)得到曲线下面积(areas under the curve, AUC),检验补体、免疫球蛋白对MD的诊断价值, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 两组基线资料、听觉前庭功能比较

两组年龄、性别、体质量指数、饮酒史、吸烟史、糖尿病、血脂异常、冠心病、高血压分布情况比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ );MD组前庭功能减数值、语音频率、ABR I~V波间歇期高于对照组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表1。

表1 两组基线资料、听觉前庭功能比较 [n(%), ( $\bar{x} \pm s$ )]  
Table 1 Comparison of baseline data and auditory vestibular function between 2 groups [n(%), ( $\bar{x} \pm s$ )]

资料	MD组 (n=102)	对照组 (n=39)	t/ $\chi^2$ 值	P值
年龄(岁)	52.64±14.06	50.94±15.82	0.620	0.536
性别				
男	33(32.35)	15(38.46)	0.469	0.494
女	69(67.65)	24(61.54)		
体质量指数(kg/m <sup>2</sup> )				
偏瘦	5(4.90)	1(2.56)	0.571	0.568
正常	54(52.94)	25(64.10)		
超重	29(28.43)	8(20.51)		
肥胖	14(13.73)	5(12.82)		
饮酒史	96(94.12)	32(82.05)	3.572	0.059
吸烟史	30(29.41)	11(28.21)	0.020	0.888
合并疾病				
糖尿病	6(5.88)	0(0)	1.170	0.279
血脂异常	19(18.63)	11(28.21)	1.545	0.214
冠心病	3(2.94)	0(0)	0.185	0.667
高血压	7(6.86)	1(2.56)	0.337	0.562
听觉前庭功能指标				
前庭功能减数值	25.69±7.35	14.97±3.52	8.720	<0.001
语音频率(dB)	31.69±9.59	20.05±5.76	7.097	<0.001
ABR I~V波 间歇期(ms)	0.22±0.07	0.18±0.05	3.261	0.001

2.2 两组补体、免疫球蛋白比较

MD组C3、C4、IgA、IgG、IgM高于对照组,差异有统计学意义(P<0.05)。见表2。

表2 两组补体、免疫球蛋白比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Comparison of complement and immunoglobulin between 2 groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	C3 (g/L)	C4 (g/L)	IgA (mg/L)	IgG (g/L)	IgM (mg/L)
MD组	102	1.47±0.45	0.62±0.18	2.29±0.65	12.64±3.56	1.73±0.51
对照组	39	0.92±0.26	0.31±0.10	1.72±0.55	9.21±2.34	1.18±0.32
t值		7.178	10.158	4.850	5.568	6.271
P值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

2.3 补体、免疫球蛋白与听觉前庭功能关系

以MD组作为源数据,采用Pearson进行相关性分析,结果显示,C3、C4、IgA、IgG、IgM与前庭功能减数值、语音频率、ABR I~V波间歇期呈正相关(P<0.05)。见表3。

2.4 MD影响因素的Logistic回归方程分析

以MD发生情况作为因变量,无赋值为0,有赋值为1;纳入C3、C4、IgA、IgG、IgM作为自变量,应用Logistic回归方程分析,结果显示,将前庭功能减数值、语音频率、ABR I~V波间歇期控制后,C3、C4、IgA、IgG、IgM仍与MD发病有关(P<0.05)。见表4。

表3 补体、免疫球蛋白与听觉前庭功能关系

Table 3 the relationship between complement, immunoglobulin and auditory vestibular function

指标	前庭功能减数值		语音频率		ABR I~V波间歇期	
	r值	P值	r值	P值	r值	P值
C3	0.418	<0.001	0.466	<0.001	0.396	<0.001
C4	0.526	<0.001	0.593	<0.001	0.407	<0.001
IgA	0.539	<0.001	0.574	<0.001	0.534	<0.001
IgG	0.505	<0.001	0.630	<0.001	0.461	<0.001
IgM	0.497	<0.001	0.512	<0.001	0.495	<0.001

表4 MD影响因素的Logistic回归方程分析

Table 4 logistic regression analysis of influencing factors of MD

影响因素	$\beta$ 值	SE值	Wald $\chi^2$ 值	OR值	95%CI	P值
C3	0.319	0.102	9.761	1.375	1.065~1.776	<0.001
C4	1.071	0.302	12.577	2.918	2.334~3.649	<0.001
IgA	0.680	0.203	11.223	1.974	1.497~2.603	<0.001
IgG	0.420	0.114	13.593	1.522	1.365~1.698	<0.001
IgM	0.454	0.114	15.876	1.575	1.298~1.911	<0.001

2.5 补体、免疫球蛋白对MD的诊断价值

应用Logistic二元回归拟合,结果显示,C3、C4、IgA、IgG、IgM联合诊断梅尼埃病的AUC为0.945,优于单一诊断。见表5、图1。

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
C3	0.791	0.714~0.855	>1.09g/L	73.53	82.05	<0.001
C4	0.840	0.768~0.896	>0.49g/L	61.76	94.87	<0.001
IgA	0.783	0.706~0.848	>2.27mg/L	54.90	89.74	<0.001
IgG	0.809	0.734~0.870	>12.01g/L	65.69	89.74	<0.001
IgM	0.798	0.722~0.860	>1.23mg/L	78.43	69.23	<0.001
联合	0.945	0.893~0.976		84.31	97.44	<0.001

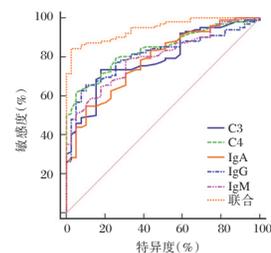


图1 补体、免疫球蛋白对MD的诊断价值

Figure 1 diagnostic value of complement and immunoglobulin in MD

3 讨论

研究已证实<sup>[8-9]</sup>,内耳具有免疫应答能力,内淋巴囊通过结合抗原刺激,可产生免疫应答。另有研究指出<sup>[10]</sup>,Ⅲ型变态反应可提高前庭膜通透性,释放大量血管纹,进而加重膜迷路积水。补体可

结合抗原抗体,促进靶细胞溶解,参与Ⅲ型变态反应发生<sup>[11]</sup>。Ig可与抗原结合,激活补体,调控细胞吞噬作用,促进信号传导<sup>[12-13]</sup>。本研究通过免疫比浊法检测表明,C3、C4、IgA、IgG、IgM在MD患者中高表达,结合赵赫等<sup>[14]</sup>研究考虑机制可能在于可溶性抗原刺激机体后,促使IgA、IgG、IgM等抗体产生,而抗体通过结合抗原可诱导大量免疫复合物产生,并在局部或全身毛细血管基底膜蓄积,进而引起抗原抗体反应,刺激补体表达,激活炎症反应,加重血管通透性,增加水肿、局部缺血、组织损伤发生风险,从而增加膜迷路积水,诱发MD。推测抑制补体、免疫球蛋白表达可能是阻断MD病理进程的重要机制之一。

另外,相关研究表明<sup>[15]</sup>,膜迷路积水可累及耳蜗、前庭和半规管,从而引起听觉与前庭功能损害。学者Cho YS等<sup>[16]</sup>观点还指出,MD患者患侧耳蜗和前庭内淋巴积水比率增加,并与平均纯音阈值显著相关。而前庭功能减数值、语音频率、ABR I~V波间歇期是临床评估听觉前庭功能常用指标,其表达升高有助于客观判断MD患者耳蜗与前庭功能损伤程度。本研究结果显示,与健康体检者比较,MD患者前庭功能减数值、语音频率、ABR I~V波间歇期显著升高,与杨婉观点相似,提示MD患者可能伴有听觉前庭功能障碍。进一步经Pearson相关性可知,C3、C4、IgA、IgG、IgM与MD患者前庭功能减数值、语音频率、ABR I~V波间歇期均存在正相关性,这可能归因于补体、Ig水平升高可引起内耳微循环障碍,抑制局部淋巴回流及血液循环,增加膜迷路积水,从而加重膜迷路积水对耳蜗与前庭等器官的刺激,影响听觉前庭功能,进而在某种程度上参与MD的发生、发展。最后,经Logistic多因素回归分析可知,C3、C4、IgA、IgG、IgM升高是MD发生的危险因素,再次佐证了补体、Ig可能在MD发生、发展中扮演着重要角色。然而补体、Ig单一诊断MD存在一定局限性,敏感度均较低,故本研究绘制ROC曲线,应用Logistic二元回归拟合,发现C3、C4、IgA、IgG、IgM联合诊断MD的AUC值大于上述指标单一诊断,且敏感度达到84.31%,特异度为97.44%。由此可见,补体、Ig联合检测对MD早期诊断具有一定应用价值。

综上所述,补体、Ig与MD患者听觉前庭功能存在良好线性关系,二者联合检测可为临床MD诊断、听觉前庭功能评估提供有效辅助手段。但

本研究纳入样本量小,且免疫反应是一个复杂过程,有待扩大样本量,进一步进行多中心研究。

## 参考文献

- [1] Liu YW, Kao SL, Wu HT, et al. Transient-evoked otoacoustic emission signals predicting outcomes of acute sensorineural hearing loss in patients with Ménière's disease [J]. *Acta Otolaryngol*, 2020, 140(3):230-235.
- [2] Wang Y, Diao T, Zhao Y, et al. The clinical characteristics and audiogram in 103 Meniere's disease patients with and without vestibular migraine [J]. *Clin Otolaryngol*, 2018, 43(1):343-347.
- [3] 郭苏影,张祎.梅尼埃病与过敏反应的关系[J].*临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2019, 33(5):470-473.
- [4] 庞博,胡俊蛟,何郡,等.内耳钆造影评估内淋巴管夹闭术治疗梅尼埃病前后膜迷路积水变化[J].*中华耳科学杂志*, 2020, 18(2):319-324.
- [5] 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志编辑委员会,中华医学会耳鼻咽喉头颈外科学分会.梅尼埃病诊断和治疗指南(2017) [J].*中华耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2017, 52(3):167-172.
- [6] 杨婉.绝经后新发梅尼埃病患者听觉前庭功能与雌激素水平的相关性分析[J].*中华实用诊断与治疗杂志*, 2019, 33(8):813-815.
- [7] 丁巍巍,林伟.听性脑干反应、畸变产物耳声发射用于婴幼儿分泌性中耳炎的诊断价值[J].*中国基层医药*, 2020, 27(2):159-162.
- [8] Kim SH, Nam GS, Choi JY. Pathophysiologic Findings in the Human Endolymphatic Sac in Endolymphatic Hydrops: Functional and Molecular Evidence [J]. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 2019, 128(6\_suppl):76S-83S.
- [9] 王汝嫵,郭明丽,屈永涛.梅尼埃病与I型变态反应关系的研究进展[J].*听力学及言语疾病杂志*, 2020, 28(2):221-225.
- [10] 王萌萌,孙麦青.益肾健脾化湿方对气虚湿停耳窍型梅尼埃病的疗效及对患者血清IgG、IgM水平的影响[J].*实用医学杂志*, 2020, 36(24):3440-3444.
- [11] 罗寰,阮海玲,陈苗苗,等.AGR、补体C3、C4在SLE合并脑血管病中检测价值[J].*分子诊断与治疗杂志*, 2020, 12(5):683-687.
- [12] 王贞,辛丽红.沙丁胺醇、布地奈德辅助雾化吸入治疗小儿哮喘合并呼吸道感染病毒的疗效[J].*中华生物医学工程杂志*, 2020, 26(4):360-364.
- [13] 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.
- [14] 赵赫,杨艳平,蔡青,等.梅尼埃病内淋巴积水机理研究进展[J].*中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 2019, 25(5):567-572.
- [15] Jian H, Yu G, Chen G, et al. Correlation between auditory-vestibular functions and estrogen levels in postmenopausal patients with Meniere's disease [J]. *J Clin Lab Anal*, 2019, 33(1):e22626.
- [16] Cho YS, Ahn JM, Choi JE, et al. Usefulness of Intravenous Gadolinium Inner Ear MR Imaging in Diagnosis of Ménière's Disease [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1):17562.

## 腹腔镜下复位治疗对小儿肠套叠 T 淋巴细胞亚群、NO 及 MDA 水平的影响

魏红\* 王贵波 武娜

**【摘要】**目的 分析腹腔镜下复位治疗对小儿肠套叠 T 淋巴细胞亚群、一氧化氮(NO)及丙二醛(MDA)水平的影响。方法 选取 2019 年 6 月至 2020 年 6 月本院收治的 105 例肠套叠患儿,据手术方式的差异分为腹腔镜组( $n=56$ ,行腹腔镜下复位手术)和传统组( $n=49$ ,行传统开腹手术)。比较两组手术情况、并发症发生率及复发率,比较手术前、术后 24 h 后 T 淋巴细胞亚群、NO 及 MDA 水平。结果 两组复位成功率比较差异无统计学意义( $P>0.05$ ),腹腔镜组恢复饮食时间、住院时间较传统组短,手术时间较传统组长,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。两组术前 T 细胞亚群各指标水平比较差异无统计学意义( $P>0.05$ ),两组术后 CD4+、CD8+ 水平降低,CD4+/CD8+ 水平升高,而术后 24 h 腹腔镜组 CD4+、CD8+ 水平较传统组高,CD4+/CD8+ 水平较传统组低,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。两组术前 NO、MDA 水平比较差异无统计学意义( $P>0.05$ ),两组治疗后 NO 降低,MDA 水平均升高,术后 24h 腹腔镜组 NO 低于传统组,MDA 水平低于传统组,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。腹腔镜组并发症发生率(5.36%)较传统组并发症发生率(18.37%)低,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。腹腔镜组与传统组复发率(3.57% vs 6.12%)比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。结论 腹腔镜复位手术治疗小儿肠套叠疗效确切,可减轻肠缺血再灌注损伤,有效保护肠道黏膜屏障,减轻术后应激,值得推广。

**【关键词】** 腹腔镜下复位治疗;小儿肠套叠;T 淋巴细胞亚群;NO;MDA

### The effect of laparoscopic reduction therapy on the levels of T lymphocyte subsets, NO and MDA in children with intussusception

WEI Hong\*, WANG Guibo, WU Na

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

**【ABSTRACT】** **Objective** To analyze the effect of laparoscopic reduction therapy on the levels of T lymphocyte subsets, nitric oxide (NO) and malondialdehyde (MDA) in children with intussusception. **Method** The clinical data of 105 children with intussusception admitted to our hospital from June 2019 to June 2020 were retrospectively analyzed. According to the differences in surgical methods, they were divided into the laparoscopic group and the traditional group. 56 cases in the laparoscopic group underwent laparoscopic reduction surgery, and 49 cases in the traditional group underwent traditional laparotomy. The operation conditions, incidence of complication, and recurrence rate between the two groups were compared, and the levels of T lymphocyte subsets, NO and MDA were compared before operation and 24 hours after the operation. **Result** There was no difference in the success rate of reduction between the two groups ( $P>0.05$ ). The time of eating recovery and hospital stay in the laparoscopic group were shorter than those in the traditional group, and the operation time was longer than that in the traditional group. The differences were statistically significant ( $P<0.05$ ). Comparison between groups: There were no differences in the levels of T cell subgroups between the two

基金项目:河北省卫生健康委员会科研课题(20190815)

作者单位:河北北方学院附属第一医院儿外科,河北,张家口 075000

\*通信作者:魏红, E-mail: xie05874jiang458@163.com

groups before operation ( $P>0.05$ ). The levels of CD4+ and CD8+ decreased, and the level of CD4+/CD8+ increased in the two groups after operation. 24 hours after operation, the CD4+ and CD8+ levels of the laparoscopic group were higher than those of the traditional group, and the CD4+/CD8+ level was lower than that of the traditional group. The differences were statistically significant ( $P<0.05$ ). There were no differences in the levels of NO and MDA between the two groups before operation ( $P>0.05$ ). After treatment, NO decreased and MDA level increased in the two groups. Comparison between groups: The NO of the laparoscopic group was lower than that of the traditional group 24 hours after operation, and the level of MDA was lower than that of the traditional group. The differences were statistically significant ( $P<0.05$ ). The incidence of complications in the laparoscopic group (5.36%) was lower than that in the traditional group (18.37%), and the difference was statistically significant ( $P<0.05$ ). There was no difference in the recurrence rate between the laparoscopic group and the traditional group (3.57% vs 6.12%) ( $P>0.05$ ). **Conclusion** Laparoscopic reduction surgery has a definite effect on the treatment of intussusception in children. It can reduce intestinal ischemia-reperfusion injury, effectively protect the intestinal mucosal barrier, and reduce postoperative stress. It is worthy of promotion.

[KEY WORDS] Laparoscopic reduction therapy; Pediatric intussusception; T lymphocyte subsets; NO; MDA

肠套叠是导致小儿肠梗阻的重要原因,近年来临床上对肠套叠患儿主要是采用腹腔镜下肠套叠复位术对其进行治疗<sup>[1]</sup>。研究证明,氧化应激在肠套叠患儿病程发展过程中扮演重要角色,其中丙二醛(Malondialdehyde,MDA)是反映机体抗氧化能力的重要参数<sup>[2]</sup>。一氧化氮(nitric oxide,NO)是舒张胃肠道平滑肌和括约肌的重要因子,过量NO对胃肠道有抑制作用,因此检测该指标水平对评估肠套叠患儿病情发展及治疗疗效具有一定价值<sup>[3-4]</sup>。此外,T淋巴细胞亚群对感染性疾病的辅助诊断、疗效评估及预后监测亦有重要意义。本研究就腹腔镜下复位治疗对小儿肠套叠T淋巴细胞亚群、NO及MDA水平的影响进行分析,现报道如下。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选取2019年6月至2020年6月本院收治的105例肠套叠患儿。纳入标准:①满足肠套叠诊断标准<sup>[5]</sup>;②发病时间在48h内;③年龄 $\leq 2$ 岁;④患儿家属均已签署知情同意书,本研究已获得本院

医学伦理委员会批准。排除标准:①合并肠绞窄、肠坏死;②合并凝血功能障碍、肝肾功能障碍;③合并急慢性感染性疾病者。根据患儿病情、家属意愿等指征选取手术方式,据手术方式的差异分为腹腔镜组( $n=56$ )和传统组( $n=49$ )。两组基线资料比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。见表1。

### 1.2 方法

传统组:全身麻醉后于右侧完成剖腹处理,于上腹部作切口,逐层切开进入腹腔,找到肠套叠头端并拖出,复位套入肠管。若无异常则将回肠末端5cm左右肠壁浆肌层采用间断缝合的方式缝到盲肠壁浆肌层处。

腹腔镜组:行腹腔镜下复位手术。全身麻醉后患儿取平卧位,建立人工气腹,压力为8mmHg。脐下缘切开1cm,直视下置入5mm Trocar作为观察孔,并于左侧腹直肌外缘上和左侧腹直肌外缘下各作一个切口,并置入5mm Trocar作为操作孔。腹腔镜下寻找到套叠头部远端,使用抓钳交替挤压牵拉套叠近端小肠,然后牵拉升结肠与套入的回肠亦或系膜,对其进行复位。复位成

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

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

组别	n	性别		年龄(月)	发病时间(h)	类型		
		男	女			回盲-结肠	回盲-直肠	结肠-直肠
腹腔镜组	56	40(71.43)	16(28.57)	9.63 $\pm$ 2.96	16.05 $\pm$ 4.82	20(35.71)	24(42.86)	12(19.64)
传统组	49	32(65.31)	17(34.69)	9.68 $\pm$ 2.91	16.12 $\pm$ 4.85	16(32.65)	22(44.90)	11(22.45)
$t/\chi^2$ 值	-	0.455		0.087	0.074	0.109		
P值	-	0.500		0.931	0.941	0.947		

功后观察肠套叠邻近肠管,若无异常将回肠末端5 cm左右肠壁浆肌层采用间断缝合的方式缝到盲肠壁浆肌层处。

### 1.3 观察指标

#### 1.3.1 两组手术情况

包括复位情况、手术时间、恢复饮食时间、住院时间。其中术后复位成功标准为:术后患儿腹肌软,腹部B超显示包块消失,患儿无哭闹,肛门有排气、排便<sup>[6]</sup>。

#### 1.3.2 T淋巴细胞亚群

包括CD4+、CD8+、CD4+/CD8+,抽取所有患儿手术前及手术后24 h清晨空腹静脉血3 mL,EDTA-K<sub>2</sub>进行抗凝。由专业技术人员严格按照BD公司FACSCalibur型号的流式细胞仪进行检测:予以加入100 μL已经混匀的全血并漩涡混匀放置于避光处15 min,将BD溶血素1.5 mL溶入流式管并于避光处孵育10 min直至完全溶透亮,再加入PBS予以洗涤一次并进行离心,将上清液摒弃后再次加入PBS洗涤2次,洗涤完成后加入600 μL的1%固定液,上机待检。

#### 1.3.3 NO及MDA水平

抽取所有患儿手术前及手术后24 h清晨空腹静脉血3 mL,离心(3 000 r/min, 10 min)取上清液,然后于-30℃冰箱保存待检,采用酶联免疫吸附试验法检测血清NO、MDA水平,试剂盒购自美国BD公司,严格按照实际说明操作。

#### 1.3.4 并发症

术后随访6个月,以回院复查为主,比较两组术后1个月、术后2个月、术后3个月及术后6个月复发情况,复发标准参考肠套叠诊断标准<sup>[7]</sup>。

### 1.4 统计学方法

采用SPSS 22.0软件进行统计分析,计数资料以n(%)表示,采用χ<sup>2</sup>检验,计量资料以(̄x±s)表示,行t检验;以P<0.05为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 两组手术情况比较

两组复位成功率比较差异无统计学意义(P>0.05),腹腔镜组恢复饮食时间、住院时间较传统组短,手术时间较传统组长,差异有统计学意义(P<0.05)。见表2。

表2 两组患者手术情况比较 [(n(%)), (̄x±s)]

Table 2 Comparison of operation conditions between the two groups [(n(%)), (̄x±s)]

组别	n	手术时间 (min)	住院时间 (d)	恢复饮食时间 (d)	复位成功
腹腔镜组	56	50.32±9.65	5.11±1.63	4.03±1.29	55(98.21)
传统组	49	41.39±8.42	6.23±1.74	5.26±1.38	49(100.00)
t/χ <sup>2</sup> 值	-	5.018	3.404	4.718	0.883
P值	-	<0.001	<0.001	<0.001	0.347

### 2.2 两组T细胞亚群、NO和MDA水平比较

两组术前T细胞亚群、NO和MDA各指标水平比较差异无统计学意义(P>0.05),两组术后CD4+、CD8+、NO水平降低,CD4+/CD8+、MDA水平升高,术后24 h腹腔镜组CD4+、CD8+、MDA水平较传统组高,CD4+/CD8+、NO水平较传统组低,差异均有统计学意义(P<0.05)。见表3。

### 2.3 两组并发症情况比较

腹腔镜组并发症发生率较传统组并发症发生率低,差异有统计学意义(P<0.05)。见表4。

表4 两组并发症发生情况比较 [n(%)]

Table 4 Comparison of complications between 2 groups [n(%)]

组别	n	切口感染	皮下气肿	小肠穿孔	肠梗阻	浆膜撕裂	升结肠破裂
腹腔镜组	56	1(1.79)	1(1.79)	0(0.00)	0(0.00)	1(1.79)	0(0.00)
传统组	49	3(6.12)	0(0.00)	1(2.04)	1(2.04)	2(4.08)	1(2.04)
χ <sup>2</sup> 值	-	-	-	-	4.370	-	-
P值	-	-	-	-	0.037	-	-

### 2.4 两组复发情况比较

腹腔镜组与传统组复发率比较差异无统计学意义(P>0.05)。见表5。

表3 两组手术前后及T细胞亚群、NO、MDA水平比较 (̄x±s)

Table 3 Comparison of T cell subpopulation levels levels, NO and MDA between 2 groups before and after operation (̄x±s)

组别	n	CD4+(×10 <sup>9</sup> /L)		CD8+(×10 <sup>9</sup> /L)		CD4+/CD8+(%)		NO(μmol/L)		MDA(mmol/mg)	
		术前	术后24 h	术前	术后24 h	术前	术后24 h	术前	术后24 h	术前	术后24 h
腹腔镜组	56	1.89±0.33	1.07±0.26 <sup>a</sup>	17.56±4.85	4.96±1.71 <sup>a</sup>	10.76±2.80	21.57±3.89	62.47±19.52	33.60±21.43 <sup>a</sup>	5.39±1.48	6.81±1.53 <sup>a</sup>
传统组	49	1.85±0.46	0.63±0.15 <sup>a</sup>	17.71±4.87	7.66±2.20 <sup>a</sup>	10.45±2.53	35.57±3.61	62.06±19.57	47.49±22.47 <sup>a</sup>	5.38±1.52	7.49±1.59 <sup>a</sup>
t值	-	0.516	10.422	0.158	7.065	0.592	19.024	0.107	3.239	0.034	2.231
P值	-	0.607	<0.001	0.875	<0.001	0.555	<0.001	0.915	0.002	0.973	0.028

注:与同组术前比较,<sup>a</sup>P<0.05。

表5 两组复发情况比较 [n(%)]

Table 5 Comparison of recurrence between the two groups [n(%)]

组别	n	[n(%)]				总复发率
		术后1个月	术后2个月	术后3个月	术后6个月	
腹腔镜组	56	0(0.00)	0(0.00)	1(1.79)	1(1.79)	2(3.57)
传统组	49	1(2.04)	0(0.00)	2(4.08)	0(0.00)	3(6.12)
$\chi^2$ 值	-	0.375				
P值	-	0.540				

### 3 讨论

肠套叠指的是部分肠管及肠系膜套入相连肠腔内的一种急腹症,肠套叠发生后,套叠肠管压迫时间超过24 h可引起肠管血液循环障碍,导致肠坏死,因此小儿肠套叠需及时复。腹腔镜技术是医疗科学技术水平高度发展的体现,随着临床使用范围的扩大,腹腔镜在腹部疾病治疗中的优势不断显现。目前认为腹腔镜手术具有以下优点:①在创伤性较小的前提下明确诊断病变的具体位置,减少了由于开放手术而引发的体液蒸发、肠管表面损伤等问题,保护了患儿全身的生理代谢,可促进胃肠功能恢复<sup>[8]</sup>。②腹腔镜头可以深入到腹腔中,视野广泛,可帮助医生在最短的时间内明确肠套叠的具体类型,同时探查其他病变,以便及早发现肿瘤、肠息肉、梅克尔憩室等病变,及早给予对症治疗<sup>[9]</sup>。但如果探查其他病变,需要适当的将切口延长,即便是切口延长,也比传统开腹手术的短。③腹腔镜手术避免腹腔脏器长期性暴露,可有效预防切口感染等并发症<sup>[10]</sup>。本研究结果显示腹腔镜组恢复饮食时间、住院时间较传统组佳,术后并发症发生率较传统组低,且两组复发率比较差异无统计学意义。提示优先选择在腹腔镜下行复位手术,有利于肠套叠患儿的康复<sup>[11]</sup>。

应激反应是机体受到外界环境刺激后产生的非特异性生理反应,手术创伤属于一种外界刺激,其引起的应激反应主要表现之一为T淋巴细胞表达紊乱<sup>[12]</sup>。本研究结果显示腹腔镜组术后T淋巴细胞水平变化程度无传统组显著,进一步佐证腹腔镜手术可降低手术创伤。NO是一种新型的生物信息递质,大量研究证实血清中NO含量的升高可对胃肠道功能造成损害,诱发肠动力异常,从而导致胃肠功能紊乱;而随着胃肠功能紊乱的进一步发展,NO又继发性升高,如此反复,形成恶性循环,最终诱发肠套叠的发生<sup>[13-14]</sup>。本研究结果进一步证实腹腔镜腹围手术的临床疗效。MDA作为

细胞膜脂质过氧化反应中的一种重要中间代谢产物,其水平的升高与脂质过氧化反应呈正相关<sup>[15]</sup>。研究认为,通过观察肠套叠患儿MDA水平可评估手术创伤程度。本研究结果提示腹腔镜手术在减轻术中氧化应激,促进患儿术后恢复方面的优势较传统开腹术更为显著。

综上所述,腹腔镜复位手术治疗小儿肠套叠疗效确切,可减轻肠缺血再灌注损伤,有效保护肠道黏膜屏障,减轻术后应激,值得推广。

### 参考文献

- [1] Fotso Kamdem A, Vidal C, Pazart L, et al. Incidence of acute intussusception among infants in eastern France: results of the EPIstudy trial[J]. *Europ J Pediatr*, 2017, 176(3):1-9.
- [2] 向东洲,王康太,涂昊,等.以肠套叠为首表现的小儿肠道疾病临床分析[J]. *中华小儿外科杂志*, 2019, 40(4):332-336.
- [3] McIlhone KA, Best EJ, Harris HP, et al. Impact of rotavirus vaccine on paediatric rotavirus hospitalisation and intussusception in New Zealand: A retrospective cohort study[J]. *Vaccine*, 2020, 38(7):1730-1739.
- [4] Camkurt MA, Findikli E, Bakacak M, et al. Evaluation of Malondialdehyde, Superoxide Dismutase and Catalase Activity in Fetal Cord Blood of Depressed Mothers[J]. *Clin Psychopharmacol Neurosc*, 2017, 15(1):35-39.
- [5] 张洁,艾芬.柴胡皂苷D对急性心肌梗死大鼠血流动力学和心肌氧化应激损伤的保护作用[J]. *医学分子生物学杂志*, 2019, 16(1):81-86.
- [6] Tarabishi AS, Aljarad Z, Shebli B, et al. A rare case of bowel intussusception due to adenocarcinomatous polyp in a 14 year-old child: case report[J]. *BMC Surg*, 2020, 20(1):5621-5627.
- [7] Arslan E, Caglayan K, Sipahi M, et al. Intussusception of the bowel in adults: two different cases[J]. *Turk J Surg*, 2017, 33(3):565-569.
- [8] Tarabishi AS, Aljarad Z, Shebli B, et al. A rare case of bowel intussusception due to adenocarcinomatous polyp in a 14 year-old child: case report[J]. *BMC Surg*, 2020, 20(1):4781-4786.
- [9] Socea B, Nica AA, Bratu OG, et al. Incidental finding of a sigmoid intussusception associated with rectal prolapse - A case report[J]. *Archiv Balkan Med Union*, 2018, 53(1):143-146.
- [10] Forasté-Enríquez CF, Mata-Hernández R, Hernández-Villaseor A, et al. Intestinal obstruction in adults due to ileal intussusception secondary to inflammatory fibroid polyp: A case report[J]. *Rev Gastroenterol Méx*, 2017, 82(3):413-418.
- [11] Arslan E, Caglayan K, Sipahi M, et al. Intussusception of the bowel in adults: two different cases[J]. *Turk J Surg*, 2017, 33(3):4649-4654.

(下转第743页)

## 乳腺癌化疗患者 Q-T 间期离散度的变化及意义

安晓飞<sup>1\*</sup> 李智慧<sup>1</sup> 韩凤娟<sup>2</sup>

**[摘要]** 目的 研究 Q-T 间期离散度与乳腺癌化疗患者心肌损伤及 miR-19b/caspase-3 凋亡途径的关系。方法 选择 2016 年 9 月 2019 年 12 月期间在本院接受术后化疗的 80 例乳腺癌患者作为乳腺癌组,另取同期在本院体检的 60 例健康知情者作为对照组。检测乳腺癌组患者化疗前及化疗两个周期后、对照组体检时的 Q-T 间期离散度、心肌损伤标志物[肌钙蛋白 I(cTnI)、磷酸肌酸激酶同工酶(CK-MB)]及 miR-19b、caspase-3。结果 乳腺癌组患者化疗后的 Q-T 间期离散度(42.83±9.93)ms、血清 cTnI(0.124±0.024)ng/mL、CK-MB(16.61±3.58)U/L、caspase-3(44.57±8.49)ng/mL 高于化疗前及对照组,外周血 miR-19b 的表达水平(0.73±0.17)低于化疗前及对照组,差异均有统计学意义( $P<0.05$ );乳腺癌组患者化疗后的 Q-T 间期离散度与血清 cTnI、CK-MB、caspase-3 含量呈正相关( $P<0.05$ ),与外周血 miR-19b 的表达水平呈负相关( $P<0.05$ )。结论 乳腺癌化疗患者化疗后 Q-T 间期离散度增加与心肌损伤加重、miR-19b/caspase-3 凋亡途径激活有关。

**[关键词]** 乳腺癌;心肌损伤;Q-T 间期离散度;miR-19b;caspase-3

### Change and significance of Q-T interval dispersion in breast cancer patients undergoing chemotherapy

AN Xiaofei<sup>1\*</sup>, LI Zhihui<sup>1</sup>, HAN Fengjuan<sup>2</sup>

(1. Department of Function, the Third People's Hospital of Henan Province, Zhengzhou, Henan, China, 450000; 2. Department of Laboratory Medicine, the Third People's Hospital of Henan Province, Zhengzhou, Henan, China, 450000)

**[ABSTRACT]** **Objective** To investigate the relationship between Q-T interval dispersion and myocardial injury, microRNA (miR)-19b/caspase-3 apoptosis pathway of breast cancer patients undergoing chemotherapy. **Methods** 80 cases of breast cancer patients who received postoperative chemotherapy in our hospital from September 2016 to December 2019 were selected as the breast cancer group, and 60 cases of health subjects in our hospital during the same period were selected as the control group. The Q-T interval dispersion, cardiac troponin I (cTnI), creatine kinase isoenzyme (CK-MB), miR-19b and caspase-3 were measured before and after chemotherapy in the breast cancer group, and at physical examination in the control group. **Results** the Q-T interval dispersion (42.83±9.93) ms, serum cTnI (0.124±0.024) ng/mL, CK-MB (16.61±3.58) U/L, caspase-3 (44.57±8.49) ng/mL of breast cancer patients after chemotherapy were higher than those before chemotherapy and the control group, and the expression level of miR-19b in peripheral blood (0.73±0.17) was lower than that before chemotherapy and the control group, the difference was statistically significant ( $P<0.05$ ). Q-T interval dispersion of breast cancer patients after chemotherapy was positively correlated with serum cTnI, CK-MB, Caspase-3, and negatively correlated with miR-19b. **Conclusion** The increase of Q-T interval dispersion in breast cancer patients after chemotherapy is associated with aggravation of myocardial damage and activation of miR-19b/caspase-3 transmission.

**[KEY WORDS]** Breast cancer; Myocardial injury; Q-T dispersion; miR-19b; Caspase-3

基金项目:河南省医学科技攻关计划(联合共建)项目(LHGJ20190855)

作者单位:1. 河南省直第三人民医院功能科,河南,郑州 450000

2. 河南省直第三人民医院检验科,河南,郑州 450000

\*通信作者:安晓飞, E-mail: sikong3263@163.com

乳腺癌是发病率居首位的女性恶性肿瘤,主要治疗手段是手术切除联合术后辅助放化疗、内分泌治疗等。蒽环类药物是常用的乳腺癌辅助化疗药物,抗肿瘤作用确切。但是,蒽环类药物具有心脏毒性,可引起心肌损伤,表现为心力衰竭、心律失常、心脏扩大等,严重者危及生命安全<sup>[1]</sup>。蒽环类药物心肌毒性相关的细胞实验发现,蒽环类药物通过下调 miR-19b 的途径增加含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-3(cysteiny l aspartate specific proteinase-3, caspase-3)的表达,进而诱导心肌细胞发生凋亡<sup>[2]</sup>。当心肌细胞发生凋亡时,细胞的电位稳定性及复极同步性均会发生改变,通过心电图检测 Q-T 间期离散度能够评价心肌细胞的电位稳定性及复极同步性。有研究报道,Q-T 间期离散度对蒽环类药物引起的心肌损伤具有预测价值<sup>[3-4]</sup>,但 Q-T 间期离散度是否与心肌损伤程度及心肌细胞凋亡有关并不清楚。为了深入阐明 Q-T 间期离散度在蒽环类药物引起心肌损伤中的评估价值及可能机制,本研究探究了 Q-T 间期离散度与心肌损伤程度及 miR-19b/caspase-3 凋亡途径的关系。

## 1 资料与方法

### 1.1 资料

选择 2016 年 9 月 2019 年 12 月期间在本院接受术后化疗的 80 例乳腺癌患者作为乳腺癌组,纳入标准:①经术后病理诊断为乳腺癌<sup>[5]</sup>;②接受含蒽环类药物的化疗方案,化疗周期 $\geq 2$ ;③化疗前后接受心电图检查;④签署知情同意书。排除标准:①化疗前存在心肌损伤;②同期接受放疗;③合并肝肾功能异常。另取同期在本院体检的 60 例健康知情者作为对照组。乳腺癌组年龄 41~60 岁、平均(55.85 $\pm$ 9.93)岁,BMI(22.38 $\pm$ 5.82)kg/m<sup>2</sup>;对照组年龄 40~58 岁、平均(54.344 $\pm$ 9.77)岁,BMI(22.92 $\pm$ 7.14)kg/m<sup>2</sup>。两组间一般资料比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。本研究经医院伦理委员会批准。

### 1.2 Q-T 间期离散度的检测

乳腺癌组化疗前及化疗 2 个周期后进行心电图检查,对照组入组时进行心电图检查,每个导联测量 3 个 Q-T 间期,Q-T 间期的起点为 QRS 波起点,终点判断如下:①等电位线与 T 波交界处;②等电位线与 T 波降支切迹交界处;③T 波与 U 波之间的切迹。所测得 Q-T 间期最大值与最小值的差值即为 Q-T 间期离散度。

### 1.3 血清心肌损伤标志物的检测

取乳腺癌组化疗前及化疗 2 个周期后的血清,对照组体检时的血清,采用电化学发光法及配套试剂盒检测肌钙蛋白 I(cTnI)、磷酸肌酸激酶同工酶(CK-MB)的含量。按照试剂盒说明书进行实验操作。

### 1.4 外周血 miR-19b 的检测

取乳腺癌组化疗前及化疗 2 个周期后的外周抗凝血,对照组体检时的外周抗凝血。首先采用全血 RNA 提取试剂盒(北京天根公司)提取外周抗凝血中 RNA,而后采用 miR cDNA 第一链合成试剂盒(北京天根公司)进行反转录实验,以 miR 为模板、合成 cDNA;最后,采用 miR 荧光定量 PCR 检测试剂盒检测 miR-19b 的表达水平,按照试剂盒说明书配置反应体系后在荧光定量 PCR 仪上进行反应,反应程序为 94 $^{\circ}$ C 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-19b 的表达水平。

### 1.5 血清 Caspase-3 的检测

取乳腺癌组化疗前及化疗 2 个周期后的血清,对照组体检时的血清,采用酶联免疫吸附法试剂盒检测 Caspase-3 的含量。按照试剂盒说明书进行实验操作。

### 1.6 统计学方法

采用 SPSS 21.0 软件进行数据分析;计量资料以( $\bar{x}\pm s$ )表示,两组间比较采用两独立样本  $t$  检验,组内化疗前后比较采用两配对样本  $t$  检验;相关性分析采用 Pearson 检验, $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 两组 Q-T 间期离散度的比较

乳腺癌组患者化疗前的 Q-T 间期离散度与对照组比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ ),化疗后的 Q-T 间期离散明显高于对照组,差异有统计学意义( $P<0.05$ );乳腺癌组患者化疗后的 Q-T 间期离散度高于化疗前,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。见表 1。

表 1 两组 Q-T 间期离散度的比较 ( $\bar{x}\pm s$ )

Table 1 Comparison of Q-T interval dispersion between 2 groups ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	$n$	时间	Q-T 间期离散度(ms)
乳腺癌组	80	化疗前	42.83 $\pm$ 9.93
		化疗后	51.88 $\pm$ 12.18 <sup>a</sup>
对照组	60	入组时	40.49 $\pm$ 11.45
$t/P$ 值			1.292/0.199
$t/P$ 值			5.617/0.000

注:与对照组比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ ;与乳腺癌组化疗前比较,<sup>b</sup> $P<0.05$

## 2.2 两组血清CK-MB、cTnI比较

乳腺癌组患者化疗前的血清CK-MB、cTnI含量与对照组比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ ),化疗后的血清CK-MB、cTnI含量明显高于对照组,差异有统计学意义( $P<0.05$ );乳腺癌组患者化疗后的血清CK-MB、cTnI含量高于化疗前,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。见表2。

表2 两组血清CK-MB、cTnI比较( $\bar{x}\pm s$ )

Table 2 Comparison of CK-MB, cTnI between 2 groups ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	时间	CK-MB(U/L)	cTnI(ng/mL)
乳腺癌组	80	化疗前	7.38±2.21	0.072±0.017
		化疗后	16.61±3.58 <sup>ab</sup>	0.124±0.024 <sup>ab</sup>
对照组	60	入组时	6.72±2.09	0.069±0.020
t/P值			1.790/0.076	0.958/0.340
t/P值			19.088/0.000	14.392/0.000

注:与对照组比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ ;与乳腺癌组化疗前比较,<sup>b</sup> $P<0.05$ 。

## 2.3 两外周血miR-19b、血清Caspase-3的比较

乳腺癌组患者化疗前的外周血miR-19b表达水平、血清Caspase-3含量与对照组比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ );化疗后的外周血miR-19b表达水平明显降低,血清Caspase-3含量明显增加,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。见表3。

表3 两组miR-19b、Caspase-3的比较( $\bar{x}\pm s$ )

Table 3 Comparison of miR-19b, Caspase-3 between 2 groups ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	时间	miR-19b	Caspase-3(ng/mL)
乳腺癌组	80	化疗前	1.04±0.21	28.49±9.91
		化疗后	0.73±0.17 <sup>ab</sup>	44.57±8.49 <sup>ab</sup>
对照组	60	入组时	1.00±0.24	31.29±7.63
t/P值			1.049/0.296	1.820/0.071
t/P值			7.792/0.000	9.560/0.000

注:与对照组比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ ;与乳腺癌组化疗前比较,<sup>b</sup> $P<0.05$ 。

## 2.4 乳腺癌组Q-T间期离散度与心肌损伤标志物、miR-19b、Caspase-3的相关性

化疗前,乳腺癌组Q-T间期离散度与CK-MB、cTnI、miR-19b、Caspase-3无明显相关性( $P>0.05$ );化疗后,乳腺癌组Q-T间期离散度与CK-MB、cTnI、Caspase-3呈正相关,与miR-19b呈负相关。见表4。

## 3 讨论

蒽环类药物是乳腺癌患者术后辅助化疗常用的药物,虽然杀伤癌细胞的效果确切,但是也具有显著的心脏毒性,患者在接受蒽环类药物化疗期间会发生心肌损伤并增加多种并发症的发生率,

表4 乳腺癌组Q-T间期离散度与心肌损伤标志物、miR-19b、Caspase-3的相关性

Table 4 Correlation between Q-T interval dispersion and myocardial injury markers, miR-19b, caspase-3 in breast cancer group

指标	化疗前		化疗后	
	r值	P值	r值	P值
CK-MB	0.114	0.231	0.374	0.006
cTnI	0.074	0.372	0.412	0.002
miR-19b	0.094	0.241	-0.317	0.015
Caspase-3	-0.107	0.194	0.342	0.011

严重者可危及生命。因此,准确评估蒽环类药物化疗期间是否发生心肌损伤、深入探究蒽环类药物引起心肌损伤的分子机制有助于早期预防心肌损伤的发生、发现心肌损伤新的防治靶点。

心肌酶是临床上用于评估心肌损伤的常用指标,但部分乳腺癌患者接受蒽环类药物化疗期间心肌酶的升高为假阳性,另有部分患者心肌酶正常为假阴性,这给病情评估造成了一定困扰,不利于准确评估蒽环类药物化疗期间的心肌损伤<sup>[6-7]</sup>。当心肌细胞发生损伤时,细胞的电位稳定性及复极同步性均会发生改变,且这一改变的出现可能早于心肌细胞的破裂、心肌酶的释放,因此对心肌细胞的电位稳定性及复极同步性进行评估有助于早期识别心肌损伤<sup>[8-9]</sup>。Q-T间期离散度是通过心电图评价心肌细胞电位及复极情况的无创指标,多项心肌梗死、心肌炎的临床研究证实,Q-T间期离散度的增加与心肌损伤的程度有关<sup>[10-12]</sup>。

近些年,国内有研究采用Q-T间期离散度来预测及评估蒽环类药物引起的心肌损伤<sup>[3-4]</sup>,本研究也将该指标用于乳腺癌患者蒽环类药物化疗后心肌损伤的评价。化疗2个周期后,乳腺癌患者的Q-T间期离散度较化疗前及健康志愿者均明显增加,表明蒽环类药物化疗影响了乳腺癌患者心肌细胞的电位稳定性及复极同步性。在此基础上分析Q-T间期离散度对心肌损伤的评估价值,通过CK-MB、cTnI两项指标反映心肌损伤的程度,结果发现:乳腺癌患者化疗2个周期后的血清CK-MB、cTnI含量均较化疗前及健康志愿者均明显增加,表明乳腺癌患者在蒽环类药物化疗后出现了心肌损伤;并且乳腺癌患者化疗后的Q-T间期离散度与血清CK-MB、cTnI含量具有正相关关系,表明Q-T间期离散度的增加与乳腺癌患者蒽环类药物化疗后心肌损伤程度的加重有关。

葱环类药物心脏毒性的分子机制复杂且未完全阐明,多项研究认为细胞凋亡是与葱环类药物引起心肌细胞损伤密切相关的生物学环节<sup>[13-15]</sup>。国内周琦<sup>[2]</sup>的细胞实验发现,葱环类药物通过抑制 miR-19b 表达的途径引起心肌细胞中 caspase-3 表达增加,进而促进细胞发生凋亡。本研究对 miR-19b 及 caspase-3 的检测发现:乳腺癌患者化疗 2 个周期后的外周血 miR-19b 表达水平较化疗前及健康志愿者均明显降低,血清 caspase-3 含量较化疗前及健康志愿者均明显增加,与周琦的细胞结果<sup>[2]</sup>吻合,表明调控 miR-19b/caspase-3 凋亡途径是葱环类药物引起心肌损伤的分子机制之一。在心肌损伤的过程中,部分心肌细胞发生凋亡会影响细胞电位及复极,本研究通过相关性分析发现:乳腺癌患者化疗后的 Q-T 间期离散度与 miR-19b 呈负相关,与 caspase-3 呈正相关,表明 Q-T 间期离散度的增加与乳腺癌患者葱环类药物化疗后 miR-19b/caspase-3 凋亡途径的改变有关。

综上所述,乳腺癌化疗患者化疗后 Q-T 间期离散度增加与心肌损伤加重、miR-19b/caspase-3 凋亡途径激活有关,未来检测 Q-T 间期离散度有望成为早期评估及预测乳腺癌患者化疗后心肌损伤的无创指标,miR-19b/caspase-3 凋亡途径也有望成为研究葱环类药物心脏毒性分子机制及防治手段的新靶点。

## 参考文献

- [1] O'Brien P, Matheson K, Jeyakumar A, et al. The clinical utility of baseline cardiac assessments prior to adjuvant anthracycline chemotherapy in breast cancer: a systematic review and meta-analysis [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2019, 174(2):357-363.
- [2] 周琦,刘敏,骆春艳,等. miR-19b 过表达抑制阿霉素诱导的 H9c2 心肌细胞凋亡[J]. *中国免疫学杂志*, 2020, 36(17):2077-2081.
- [3] 宋金花,蔡小东. Q-T 间期离散度和肌酸激酶在葱环类药物

物早期心肌损伤中的预测价值[J]. *医疗装备*, 2020, 33(18):106-107.

- [4] 纪彦文,曾燕妮,舒刘莉,等. 心脏超声和 Q-T 间期离散度对葱环类药物早期心肌损伤的预测价值[J]. *临床和实验医学杂志*, 2019, 18(15):1670-1673.
- [5] 中国抗癌协会乳腺癌专业委员会. 中国抗癌协会乳腺癌诊治指南与规范(2013版)[J]. *中国癌症杂志*, 2015, 25(9):641-703.
- [6] Henry ML, Niu J, Zhang N, et al. Cardiotoxicity and Cardiac Monitoring Among Chemotherapy-Treated Breast Cancer Patients[J]. *JACC Cardiovasc Imaging*, 2018, 11(8):1084-1093.
- [7] Michel L, Rassaf T, Totzeck M. Biomarkers for the detection of apparent and subclinical cancer therapy-related cardiotoxicity[J]. *J Thorac Dis*, 2018, 10(Suppl 35):S4282-S4295.
- [8] Song L, Zhang ZF, Hu LK, et al. Curcumin, a Multi-Ion Channel Blocker That Preferentially Blocks Late Na<sup>+</sup> Current and Prevents I/R-Induced Arrhythmias [J]. *Front Physiol*, 2020, 11:978.
- [9] Bernikova OG, Sedova KA, Artyeva NV, et al. Repolarization in perfused myocardium predicts reperfusion ventricular tachyarrhythmias[J]. *J Electrocardiol*, 2018, 51(3):542-548.
- [10] Rodríguez-Jiménez AE, Cruz-Inerarity H, Negrín-Valdés T, et al. Corrected QT-Interval Dispersion: An Electrocardiographic Tool to Predict Recurrence of Myocardial Infarction [J]. *MEDICC Rev*, 2019, 21(2-3):22-25.
- [11] Eshraghi A, Hoseinjani E, Jalalyazdi M, et al. QT interval and P wave dispersion in slow coronary flow phenomenon [J]. *ARYA Atheroscler*, 2018, 14(5):212-217.
- [12] Ucar FM, Ozturk C, Yilmaztepe MA. Evaluation of Tp-e interval, Tp-e/QT ratio and Tp-e/QTc ratio in patients with acute myocarditis[J]. *BMC Cardiovasc Disord*, 2019, 19(1):232.
- [13] Dadson K, Calvillo-Argüelles O, Thavendiranathan P, et al. Anthracycline-induced cardiomyopathy: cellular and molecular mechanisms[J]. *Clin Sci (Lond)*, 2020, 134(13):1859-1885.
- [14] Sala V, Della Sala A, Hirsch E, et al. Signaling Pathways Underlying Anthracycline Cardiotoxicity [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2020, 32(15):1098-1114.
- [15] Prathumsap N, Shinlapawittayatorn K, Chattipakorn SC, et al. Effects of doxorubicin on the heart: From molecular mechanisms to intervention strategies [J]. *Eur J Pharmacol*, 2020, 5(866):172818.

(上接第 739 页)

- [12] Horiike M, Ohno K. Investigation of Recurrence Factors for Idiopathic Intussusception in Children: Focusing on Ultrasonic Findings at Terminal Ileum [J]. *J Japan Society Pediatr Surg*, 2017, 53(45):691-697.
- [13] Haba Y, Maeda T, Kyuno T, et al. A Case of Intussusception Caused by Cancer of the Sigmoid Colon in an Adult [J]. *Gan to Kagaku Ryoho*, 2020, 47(13):1866-1868.
- [14] Rajendharan KA, Balakrishnan G, Sundaramurthi S, et al. Il-

leal intussusception due to primary intestinal melanoma with generalized lymph node metastases- a rare cause of small bowel obstruction [J]. *Intern Surg J*, 2021, 8(2):739-743.

- [15] Pham LV, Ta QV, Nguyen DT, et al. Intussusception characteristics and ultrasound guided pneumatic reduction A clinical experience in children less than 24 months old in Vietnam [J]. *Curr Pediatr Res*, 2020, 24(6):243-236.

## SPAG9 mRNA、Livin mRNA、Caspase-9 mRNA 在曼月乐环疗程中动态变化及意义

王学博\* 李松 任红娟 杨然 孙丽 薛国勇 瞿小玲

**[摘要]** 目的 探讨精子相关抗原9(SPAG9)mRNA、凋亡蛋白抑制因子(Livin)mRNA、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-9(Caspase-9)mRNA 在子宫内膜增生类病变患者曼月乐环疗程中动态变化及意义。方法 选取2017年6月至2020年5月本院收治的126例子宫内膜增生类病变患者,根据治疗后6个月病理结果分为缓解组( $n=101$ )、非缓解组( $n=25$ ),比较两组 SPAG9、Livin、Caspase-9 mRNA 表达水平、月经失血图(PBAC)评分、子宫内膜厚度,并对数据进行统计分析。结果 缓解组治疗后3、6个月 SPAG9、Livin mRNA、PBAC 评分、子宫内膜厚度低于非缓解组, Caspase-9 mRNA 高于非缓解组,差异有统计学意义( $P<0.05$ );治疗后3、6个月 SPAG9、Livin mRNA 与 PBAC 评分、子宫内膜厚度呈正相关( $P<0.05$ ), Caspase-9 mRNA 与 PBAC 评分、子宫内膜厚度呈负相关( $P<0.05$ );治疗后6个月 SPAG9、Livin mRNA、Caspase-9 mRNA 预测缓解的 AUC 依次为 0.843、0.831、0.772,各指标联合预测缓解的 AUC 为 0.902( $P<0.05$ )。结论 EAH 和 EEC 曼月乐环疗程中子宫内膜组织 SPAG9、Livin mRNA 降低及 Caspase-9 mRNA 升高是治疗有效的一种反映,可预测患者受益情况,有助于及时指导调整治疗方案。

**[关键词]** SPAG9 mRNA; Livin mRNA; Caspase-9 mRNA; EAH; EEC; 曼月乐环

### The dynamic changes and significance of SPAG9 mRNA, Livin mRNA and Caspase-9 mRNA in the course of treatment of Mirena

WANG Xuebo\*, LI Song, REN Hongjuan, YANG Ran, SUN Li, XUE Guoyong, Qu Xiaoling

(Department of Gynecology, Nanyang Central Hospital, Nanyang, Henan, China, 473000)

**[ABSTRACT]** **Objective** To investigate the dynamic changes and significance of sperm-associated antigen 9 (SPAG9) mRNA, livin mRNA, and the caspase-9 mRNA in the course of treatment of Mirena of endometrial atypical hyperplasia (EAH) and early endometrioid adenocarcinoma (EEC). **Methods** A total of 126 endometrial hyperplasia patients admitted to our hospital from June 2017 to May 2020 were selected and divided into the remission group ( $n=101$ ) and the non-remission group ( $n=25$ ) based on the pathological results 6 months after treatment. The 2 groups of SPAG9 mRNA, livin mRNA, caspase-9 mRNA expression levels, menstrual blood loss chart (PBAC) score, endometrial thickness were compared and analyzed. **Results** The SPAG9 mRNA, livin mRNA, PBAC score and endometrial thickness in the remission group were lower than those in the non-remission group at 3 and 6 months after treatment, and caspase-9 mRNA was higher than that in the non-remission group, the difference was statistically significant ( $P<0.05$ ). SPAG9 mRNA and livin mRNA were positively correlated with PBAC score and endometrial thickness at 3 and 6 months after treatment, and caspase-9 mRNA was negatively correlated with PBAC score and endometrial thickness ( $P<0.05$ ); SPAG9 mRNA at 6 months after treatment, the AUC predicted by livin mRNA and caspase-9 mRNA for remission were 0.843, 0.831, and 0.772, respectively, and the combination of each indicator predicted remission AUC of 0.902 ( $P<0.05$ ). **Conclusion** The decrease of SPAG9 mRNA, livin mRNA and the increase of

基金项目:河南省科技厅项目(201905025)

作者单位:南阳市中心医院妇二科,河南,南阳 473000

\*通信作者:王学博, E-mail:hyzewyxx1996\_01\_01@126.com

caspase-9 mRNA in endometrial tissue during the treatment course of Mirena of EAH and EEC is a reflection of the effectiveness of treatment, which can predict the benefit of patients and help to guide the adjustment of treatment plan in time.

[KEY WORDS] SPAG9 mRNA; *Livin* mRNA; *Caspase-9* mRNA; EAH; EEC; Mirena

近年来曼月乐环成为子宫内膜非典型增生(endometrial atypical hyperplasia, EAH)及早期子宫内膜癌(early endometrioid adenocarcinoma, EEC)的重要保守治疗方法,可保留患者生育功能,但不同个体治疗反应性差异较大,早期预测曼月乐环的疗效,对指导临床选取合适疗法意义重大<sup>[1]</sup>。精子相关抗原9(Sperm associated antigen 9, SPAG9)是c-Jun氨基末端激酶相互作用家族的一个新成员,靶向SPAG9,抑制SPAG9信号通路,可阻断子宫内膜腺癌细胞中17 $\beta$ 雌二醇诱导的细胞增殖、迁移、侵袭和上皮间质转化,抑制子宫内膜癌细胞的恶性行为<sup>[2,3]</sup>。凋亡蛋白抑制因子(Livin)在子宫内膜癌组织中表达显著升高,并与肌层浸润深度有关<sup>[4]</sup>。半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-9(Caspase-9)是执行细胞凋亡的主要酶类,可促进癌细胞的凋亡<sup>[5,6]</sup>。本研究探讨SPAG9、*Livin*、*Caspase-9* mRNA在曼月乐环疗程中动态变化及意义,旨在为临床决策提供参考,报告如下。

## 1 对象和方法

### 1.1 研究对象

选取2017年6月至2020年5月本院收治的126例子宫内膜增生类病变患者患者,其中EAH 13例,EEC 113例。根据治疗后6个月病理结果分为缓解组( $n=101$ )、非缓解组( $n=25$ )。①纳入标准:符合EAH、EEC诊断标准<sup>[7]</sup>;均有保留生育功能诉求或拒绝手术要求先保守治疗者;入组前未接受过相关治疗。②排除标准:已知或怀疑妊娠,未确诊的阴道出血;子宫肌瘤者;子宫息肉者;血液系统疾病者;急性感染类疾病者;有节育环过敏史者;宫腔深度>10 cm者。本研究获医院伦理委员会审核通过,患者及家属充分知情,自愿签署知情同意书。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 治疗方法与疗效评定

患者均在宫内放置左炔诺孕酮宫内节育系统(含左炔诺孕酮52 mg/个(20微克/24小时), Bayer Yakuhin, Ltd,批准文号H20140237),于治疗前、治疗后3、6个月行妇科超声检查测量子宫内膜厚度,

并按照月经失血图(Pictorial Blood Loss Assessment Chart, PBAC)评分评估患者月经量, PBAC>100分为月经过多,分值越高,月经量越多<sup>[8]</sup>。同时于治疗后6个月行子宫内膜组织活检,缓解:病变完全消失,无EAH、EEC的组织病理学证据;非缓解:与缓解标准不相符者<sup>[9]</sup>。

#### 1.2.2 SPAG9、*Livin*、*Caspase-9* mRNA检测

治疗前、治疗后3、6个月,采用实时荧光定量PCR法检测子宫内膜组织SPAG9、*Livin*、*Caspase-9* mRNA表达,检测基因相对表达量= $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。

### 1.3 观察指标

①比较两组基线资料。②比较两组治疗前、治疗后3个月、治疗后6个月SPAG9、*Livin*、*Caspase-9* mRNA动态变化。③比较两组治疗前、治疗后3个月、治疗后6个月PBAC评分、子宫内膜厚度。④分析SPAG9、*Livin*、*Caspase-9* mRNA与PBAC评分、子宫内膜厚度相关性。⑤分析曼月乐环疗效的相关影响因素。⑥分析治疗后3个月、治疗后6个月SPAG9、*Livin*、*Caspase-9* mRNA预测缓解的价值。

### 1.4 统计学方法

采用SPSS 22.0软件进行处理数据,计量资料以( $\bar{x} \pm s$ )表示,两组间比较行独立样本 $t$ 检验,组内比较行配对 $t$ 检验,计数资料用 $n(\%)$ 表示,用 $\chi^2$ 检验,采用Pearson进行相关性分析, Logistic回归方程行多因素分析,采用受试者工作特征曲线(Receiver operating characteristic, ROC)及ROC下面积(Area under the curve, AUC)分析各指标预测缓解的价值。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 基线资料

两组年龄、疾病类型、体质量指数、疾病类型、婚姻状态、生育史、既往史比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。见表1。

### 2.2 两组SPAG9、*Livin*、*Caspase-9* mRNA动态变化

缓解组治疗后3、6个月SPAG9、*Livin* mRNA低于非缓解组, *Caspase-9* mRNA高于非缓解组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表2。

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

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

资料	缓解组 (n=101)	非缓解组 (n=25)	t/ $\chi^2$ 值	P值
年龄(岁)	31.97±6.85	33.58±8.02	1.016	0.312
疾病类型				
EAH	12(11.88)	1(4.00)	0.628	0.428
EEC	89(88.12)	24(96.00)		
体质量指数(kg/m <sup>2</sup> )				
偏瘦	20(19.80)	2(8.00)	3.703	0.295
正常	42(41.58)	14(56.00)		
超重	25(24.75)	4(16.00)		
肥胖	14(13.86)	5(20.00)		
疾病类型				
EAH	62(61.39)	10(40.00)	3.743	0.053
EEC	39(38.61)	15(60.00)		
婚姻状态				
已婚	47(46.53)	8(32.00)	1.721	0.190
未婚	54(53.47)	17(68.00)		
生育史				
无	69(68.32)	20(80.00)	1.319	0.251
有	32(31.68)	5(20.00)		
既往史				
总胆固醇异常	18(17.82)	7(28.00)	0.744	0.388
低密度脂蛋白异常	13(12.87)	1(4.00)	0.825	0.364
高密度脂蛋白异常	9(8.91)	5(20.00)	1.499	0.221
三酰甘油异常	14(13.86)	6(24.00)	0.877	0.349
糖尿病	8(7.92)	4(16.00)	0.725	0.394
冠心病	2(1.98)	0(0)	0.034	0.854
高血压	1(0.99)	2(8.00)	1.758	0.185

### 2.3 两组PBAC评分、子宫内膜厚度比较

缓解组治疗后3、6个月PBAC评分、子宫内膜厚度较非缓解组显著降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表3。

### 2.4 SPAG9、Livin、Caspase-9 mRNA与PBAC评分、子宫内膜厚度关系

治疗后3、6个月SPAG9 mRNA ( $r=0.369$ 、 $0.385$ ,  $P$ 均 $<0.001$ )、Livin mRNA ( $r=0.497$ 、 $0.566$ ,  $P$ 均 $<0.001$ )与PBAC评分呈正相关,治疗后3、6个月SPAG9 mRNA ( $r=0.401$ 、 $0.427$ ,  $P$ 均 $<0.001$ )、Livin mRNA ( $r=0.428$ 、 $0.519$ ,  $P$ 均 $<0.001$ )与子宫内膜厚度呈正相关;治疗后3、6个月Caspase-9 mRNA与PBAC评分呈负相关( $r=-0.514$ 、 $-0.633$ ,  $P$ 均 $<0.001$ );治疗后3、6个月Caspase-9 mRNA与子宫内膜厚度呈负相关( $r=-0.486$ 、 $-0.597$ ,  $P$ 均 $<0.001$ )。

### 2.5 SPAG9、Livin、Caspase-9 mRNA预测缓解的效能

治疗后3、6个月SPAG9、Livin、Caspase-9 mRNA均是疗效的相关影响因素( $P < 0.05$ )。见表4。

治疗后6个月对疗效影响的OR值大于治疗后3个月,故以治疗后6个月个指标作为源数据进行ROC曲线分析,结果显示,治疗后6个月SPAG9 mRNA预测的AUC为0.843(95%CI: 0.768~0.902),截断值 $\leq 0.24$ ,敏感度为74.26%,特异度为88.00%,Livin mRNA预测的AUC为0.831(95%CI: 0.754~0.892),截断值 $\leq 7.1$ ,敏感度为75.25%,特异度为84.00%,Caspase-9 mRNA预测的AUC为0.772(95%CI: 0.688~0.842),截断值 $> 0.62$ ,敏感度为51.49%,特异度为92.00%;各指标联合预测缓解的AUC为0.902(95%CI: 0.836~0.947),敏感度为73.27%,特异度为96.00% ( $P < 0.05$ ),见图1。

表2 两组SPAG9、Livin、Caspase-9 mRNA动态变化 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 The dynamic changes of SPAG9, Livin and Caspase-9 mRNA between 2 groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	SPAG9 mRNA			Livin mRNA			Caspase-9 mRNA		
		治疗前	治疗后3个月	治疗后6个月	治疗前	治疗后3个月	治疗后6个月	治疗前	治疗后3个月	治疗后6个月
缓解组	101	0.39±0.16	0.21±0.10 <sup>a</sup>	0.15±0.05 <sup>a</sup>	8.15±2.65	6.04±1.97 <sup>a</sup>	5.14±1.69 <sup>a</sup>	0.38±0.13	0.56±0.15 <sup>a</sup>	0.69±0.21 <sup>a</sup>
非缓解组	25	0.42±0.18	0.40±0.14	0.43±0.13	7.96±2.31	8.11±2.59	8.20±2.67	0.41±0.15	0.42±0.14	0.40±0.13
t值		0.819	7.811	17.238	0.357	4.404	7.138	1.001	4.231	6.588
P值		0.415	<0.001	<0.001	0.722	<0.001	<0.001	0.319	<0.001	<0.001

注:与本组治疗前比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ 。

表3 两组PBAC评分、子宫内膜厚度比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 3 Comparison of PBAC score and endometrial thickness between 2 groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	PBAC评分(分)			子宫内膜厚度(mm)		
		治疗前	治疗后3个月	治疗后6个月	治疗前	治疗后3个月	治疗后6个月
缓解组	101	192.56±30.14	81.66±15.08	34.48±7.29	12.51±2.09	5.59±0.92	4.08±0.74
非缓解组	25	189.67±34.28	105.45±20.63	91.59±30.05	11.87±2.25	8.26±2.34	7.55±2.18
t值		0.418	6.533	17.330	1.350	9.055	13.313
P值		0.677	<0.001	<0.001	0.179	<0.001	<0.001

表4 Logistic 回归方程分析

影响因素	$\beta$ 值	SE值	Wald $\chi^2$	OR值	95%CI	P值
治疗后3个月						
SPAG9 mRNA	0.184	0.062	8.845	1.202	1.064~1.359	<0.001
Livin mRNA	0.343	0.097	12.536	1.410	1.236~1.608	<0.001
Caspase-9 mRNA	-1.241	0.355	12.230	0.289	0.168~0.497	<0.001
治疗后6个月						
SPAG9 mRNA	0.244	0.079	9.546	1.276	1.158~1.407	<0.001
Livin mRNA	0.577	0.154	14.035	1.781	1.598~1.984	<0.001
Caspase-9 mRNA	-1.020	0.255	16.007	0.361	0.205~0.634	<0.001

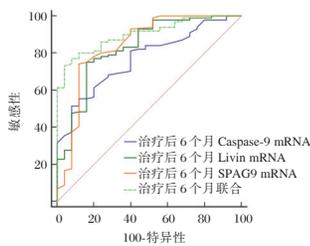


图1 预测 ROC

Figure 1 ROC for prediction

### 3 讨论

SPAG9 mRNA 定位于人类染色体 17q21, 是 c-Jun 氨基末端激酶信号通路上的支架蛋白, 在调控细胞增殖、凋亡中发挥重要作用。本研究显示, SPAG9 mRNA 在曼月乐环治疗后获得病理缓解患者中呈降低趋势, 非缓解患者 SPAG9 mRNA 在疗程中无明显变化, 可评估患者病情程度。Travaglino A 等<sup>[10]</sup>报道纳入了 27 项针对 1 360 名女性的研究, 采用免疫组化检测 SPAG9 蛋白在治疗前及随访期间的变化, 发现 SPAG9 蛋白降低可预示保守治疗的有效性, 本研究观点与之相似。曼月乐环在宫内可缓慢释放孕酮, 引起子宫内膜暂时性萎缩和间质脱膜化, 降低黏膜上皮层活性, 并控制月经出血量, 逆转子宫内膜增生, 抑制具有促进细胞生长、增殖作用 SPAG9 mRNA 的表达。可见当 SPAG9 mRNA 在疗程中呈降低趋势时, 表明曼月乐环治疗具有可行性, 否则可能意味着需终止保守治疗, 以防止病变的进一步进展, 从而指导临床选取合适的治疗方式。

凋亡蛋白抑制因子是一类具有抗细胞凋亡的因子, 在调节细胞周期和凋亡蛋白酶活性中起到重要作用。Livin 是目前发现的凋亡蛋白抑制因子家族中活性最强的抗凋亡因子, 在多种恶性肿瘤中表达显著升高<sup>[11]</sup>。细胞培养实验表明, 采用脂质体法瞬时转染 Livin-siRNA 干扰序列, 可沉默 Livin

mRNA 表达, 抑制子宫内膜癌细胞的增殖, 减弱细胞的侵袭及迁移能力, 提示 Livin mRNA 与恶性生物学行为有关<sup>[12]</sup>。但关于 Livin mRNA 在 EAH 和 EEC 曼月乐环疗程中变化的报道鲜见。本研究创新性探讨发现, 曼月乐环治疗后获病理缓解患者 Livin mRNA 呈降低趋势, 并低于非缓解患者, 而非缓解患者随着疗程推进, Livin mRNA 水平相似, 提示 Livin mRNA 可作为预测曼月乐环保守治疗反应性的分子标志物。遗憾的是, 由于本研究观点的新颖性, 缺乏更多报道的进一步论证, 尚不明确曼月乐环降低 Livin mRNA 表达的详细机制, 有待后续的深入研究。

细胞正常凋亡途径受阻是异常增殖细胞生存期延长、发生恶性增殖的必经环节。含半胱氨酸的天冬氨酸特异性蛋白酶是细胞凋亡的主要执行者, 其中 Caspase-9 作为线粒体介导通路的始动因子, 可触发凋亡级联反应, 诱导细胞的凋亡<sup>[13-14]</sup>。本研究发现, 获病理缓解的 EAH 和 EEC 患者, 在曼月乐环疗程中, Caspase-9 mRNA 呈上升趋势, 非缓解患者 Caspase-9 mRNA 无明显变化, 呈现出疗效预测的潜质。治疗后 Caspase-9 mRNA 水平升高, 可介导 EAH 异常增生细胞及 EEC 癌细胞的凋亡, 抑制细胞异常增殖行为, 从而促进病情缓解。若疗程中 Caspase-9 mRNA 降低或处于稳定状态, 则预示疗效不佳, 应调整治疗手段, 从而预防病情进一步演变, 改善患者预后。另 SPAG9、Livin、Caspase-9 mRNA 联合预测缓解的 AUC 最大, 提示联合检测三者能进一步提高预测价值。本研究不足之处在于, 因 EAH 病例数较少, 故将 EAH 和 EEC 放在一起进行数据的统计分析, 而 EEC 患者数量较多, 可能造成数据的偏倚, 有待后续的进一步探讨。

### 参考文献

- [1] Raffone A, Travaglino A, Saccone G, et al. Should progesterone and estrogen receptors be assessed for predicting the response to conservative treatment of endometrial hyperplasia and cancer? A systematic review and meta-analysis [J]. Acta Obstet Gynecol Scand, 2019, 98(8):976-987.
- [2] Xiao C, Li M, Huang Q, et al. SPAG9 promotes prostate cancer proliferation and metastasis via MAPK signaling pathway [J]. Am J Transl Res, 2019, 11(8):5249-5260.
- [3] 何鹏娟. 辛伐他汀通过 SPAG9/JNK 等信号通路对卵巢癌及子宫内膜癌上皮间质转化作用研究 [D]. 济南: 山东大学, 2018: 1-59.

(下转第 752 页)

## LINC01088对胶质瘤U251细胞的增殖、迁移以及血管拟态的影响

王薇<sup>1</sup> 马庆海<sup>2</sup> 张小玲<sup>3</sup> 苏乌云<sup>1</sup> 常丽娟<sup>1</sup> 王小兰<sup>1</sup> 李瑶<sup>1</sup> 闫海成<sup>2\*</sup>

**[摘要]** 目的 探讨 LINC01088 对胶质瘤 U251 细胞的增殖、迁移、侵袭以及血管形成的影响。方法 利用 GEPIA 网站分析 LINC01088 在胶质瘤组织中的表达。构建 LINC01088 沉默细胞稳定细胞株, MTT、Transwell、血管形成实验检测沉默 LINC01088 表达对 U251 细胞增殖、迁移和侵袭、血管生成影响。Western blot 检测 PI3K、p-AKT 和 AKT 蛋白表达的影响。结果 GEPIA 分析结果显示, 与正常组织相比, 胶质瘤组织中的 LINC01088 相对表达水平显著上调 ( $P < 0.05$ )。转染 sh-LINC01088 稳定下调 U251 细胞中 LINC01088 的表达 ( $P < 0.05$ ), 并获得稳定低表达 LINC01088 的 U251 细胞株。与对照组相比, LINC01088 沉默组细胞增殖、迁移和侵袭细胞、血管生成数量以及 PI3K 和 p-AKT 蛋白表达显著下降 ( $P < 0.05$ )。结论 沉默 LINC01088 表达抑制 U251 细胞的增殖、迁移、侵袭和血管生成, 其作用机制可能与抑制 PI3K/AKT 信号通路有关。

**[关键词]** 胶质瘤; LINC01088; PI3K 信号通路

### Effects of LINC01088 on proliferation, migration, and angiogenesis of glioma U251 cells

WANG Wei<sup>1</sup>, MA Qin Hai<sup>2</sup>, ZHANG Xiaoling<sup>3</sup>, SU Wuyun<sup>1</sup>, CHANG Lijuan<sup>1</sup>, WANG Xiaolan<sup>1</sup>, LI Yao<sup>1</sup>, YAN Haicheng<sup>2\*</sup>

(1. Department of Medical Oncology, Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot, China 010050; 2. Department of Neurosurgery, Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot, China 010050; 3. Outpatient department, Hohhot International Travel Healthcare Center, Hohhot, China, 010020)

**[ABSTRACT]** **Objective** To investigate the effects of LINC01088 on proliferation, migration, invasion and angiogenesis of glioma U251 cells. **Methods** The expression of LINC01088 in glioma was analyzed by GEPIA. The shRNA-LINC01088 (sh-LINC01088) was used to infect U251 cells to establish the stable cell line. The effect of silencing LINC01088 on the proliferation, migration and invasion, angiogenesis of U251 cells were detected by MTT, Transwell, tube formation, respectively. The expression of PI3K, p-AKT and AKT in U251 cells was measured by Western blot. **Results** GEPIA analysis showed that the relative expression level of LINC01088 in glioma tissues was significantly higher than that in normal tissues ( $P < 0.05$ ). Transfection of sh-LINC01088 could down-regulate the expression of LINC01088 in U251 cells ( $P < 0.05$ ), and U251 cell lines with stable and low expression of LINC01088 was obtained. Compared with the control group, the proliferation, the cell number of migration and invasion, the numbers of tube, and the expression of PI3K and p-AKT in the sh-LINC01088 group were significantly decreased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Silencing

基金项目:国家自然科学基金(81660469);内蒙古医科大学附属医院(NYFY YB 007);内蒙古卫生计生科研计划项目(201703101)

作者单位:1. 内蒙古医科大学附属医院肿瘤内科, 内蒙古, 呼和浩特 010050

2. 内蒙古医科大学附属医院神经外科, 内蒙古, 呼和浩特 010050

3. 呼和浩特国际旅行卫生保健中心门诊部, 内蒙古, 呼和浩特 010020

\*通讯作者: 闫海成, E-mail: nmgykdxfyhc@163.com

*LINC01088* inhibits proliferation, migration, invasion and angiogenesis of U251 cells, and its mechanism might be related to the inhibition of PI3K/AKT signaling pathway.

[KEY WORDS] Glioma; *LINC01088*; PI3K signaling pathway

胶质瘤是临床上脑内最常见的原发性肿瘤, 占有脑恶性肿瘤的 80%<sup>[1]</sup>。胶质瘤治疗后容易复发, 临床上对胶质瘤的治疗仍有一定的困难<sup>[2]</sup>。因此, 迫切需要对胶质瘤发展的机制进行研究, 寻找诊断和治疗的新方法。长链非编码 RNA (long non-coding RNA, *LncRNA*) 在肿瘤的发生、发展过程中发挥着重要作用<sup>[3]</sup>。长基因间非编码 RNA 1088 (long intergenic non-coding RNA 1088, *LINC01088*) 是长链非编码 RNA 中的一种, 其在卵巢癌发展过程中发挥了重要作用<sup>[4-5]</sup>, 但在胶质瘤细胞中的作用尚不清楚。本研究通过干扰 *LINC01088* 的表达分析 *LINC01088* 对胶质瘤 U251 细胞增殖、迁移和侵袭以及血管生成的影响, 探讨 *LINC01088* 在胶质瘤中的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要实验试剂和仪器

MTT 细胞增殖检测试剂盒 (Cat.No.C0009) 和极超敏 ECL 化学发光试剂盒 (Cat.No.P0018FM): 碧云天公司; U251 细胞购于中国科学院上海生命科学研究所细胞资源中心; siRNA 序列购于广州市锐博; TRIzol Reagent (Cat.No.15596026)、Lipofectamine 2000 (Cat.No.11668019)、SuperScript II Reverse Transcriptase (Cat.No.18064014) 和 EXPRESS One - Step Superscript qRT - PCR Kit (Cat.No.11781200): 美国 Invitrogen 公司; Transwell 小室 (Cat.No.353097) 和 Matrigel 凝胶 (Cat.No.356234): 美国 BD 公司; PI3K 抗体 (Cat.No.365290)、AKT 抗体 (Cat.No.5298)、p - AKT 抗体 (Cat.No.377556)、GAPDH 抗体 (Cat.No.47724) 和 m-IgGκ BP-HRP 抗体 (Cat.No.516102): 美国 Santa cruz 公司; ABI Prism® 快速 7500 型荧光定量 PCR 仪: 美国 Applied Biosystems 公司; 倒置光学显微镜 (OLYMPUS CKX41, U-CTR30-2): 日本 OLYMPUS 公司。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 生物信息学分析 *LINC01088* 在胶质瘤组织中的表达

利用生物信息学在线工具 GEPIA (<http://gepia.cancer-pku.cn/detail.php>) 分析 *LINC01088* 在胶

质瘤组织和正常组织中的表达 (标本数据来源于 TCGA 和 GTEx 数据库)。

#### 1.2.2 细胞培养及稳定细胞株筛选

用含有 10% 胎牛血清、1% 青霉素/链霉素的 DMEM 培养液培养 U251 胶质瘤细胞株。小干扰 RNA (siRNA) 转染胶质瘤 U251 细胞, 操作按照 Lipofectamine 2000 转染试剂说明书进行。在转染中设置对照 (*si-NC*) 组, *si-LINC01088-1* 组、*si-LINC01088-2* 组、*si-LINC01088-3* 组。然后将筛选出的 *si-LINC01088* 用于稳定细胞株构建, 感染实验分为 *LINC01088* 沉默组和对照组。

#### 1.2.3 qRT-PCR

收集 U251 细胞, Trizol 试剂提取总 RNA, 将 RNA 逆转录成 cDNA, 定量 PCR 检测 *LINC01088* 表达。以 U6 作为内参, 用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法表示 *LINC01088* 相对表达。

#### 1.2.4 MTT

将感染后的胶质瘤 U251 细胞接种至 96 孔板中, 随后按照 MTT 检测试剂盒检测 0、24、48、72 h 在 570 nm 波长下的吸光度。

#### 1.2.5 Transwell

迁移实验: 将 Transwell 小室放置于 24 孔板内, 将感染后的胶质瘤 U251 细胞接种于上室。培养 24 h, 4% 多聚甲醛溶液对小室膜下面的细胞进行固定, 然后用 0.1% 结晶紫染色, 显微镜下拍照并计数。侵袭实验: 将 Matrigel 基质胶按照说明书对 Transwell 小室底部膜的上室进行包被, 其余同迁移实验。

#### 1.2.6 血管拟态

按照王帆等<sup>[6]</sup>血管拟态实验准备 Matrigel 胶和培养板, 将准备好的各组细胞每孔按  $1 \times 10^5$  个加入 24 孔板中。培养 24 h, 利用共聚焦显微镜拍摄记录结果, 计数各组胶质瘤细胞血管生成的形成水平。

#### 1.2.7 Western blot

RIPA 裂解液提取细胞总蛋白, 取各组变性 30  $\mu$ g 蛋白进行 SDS-PAGE 凝胶电泳并电转至 PVDF 膜上。膜封闭后加入一抗 (PI3K 按 1:500 稀释, AKT 按 1:1 000 稀释, p-AKT 按 1:500 稀释, GAPDH 按 1:2 000 稀释)。随后加入 HRP 标记二抗。最后用化学发光试剂盒进行蛋白印迹条带成像。

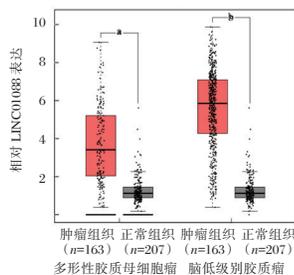
### 1.3 统计学处理

采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析,数据以  $(\bar{x} \pm s)$  表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间多重比较采用 SNK-q 分析。两组间比较采用 *t* 检验。 $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 生物信息学分析 *LINC01088* 在胶质瘤组织中的表达

GEPIA 分析结果显示,与正常组织相比,胶质瘤组织中的 *LINC01088* 表达显著上调,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见图 1。



注:<sup>a</sup> $P < 0.05$  和 <sup>b</sup> $P < 0.05$  表示与正常组织比较。

图 1 *LINC01088* 在胶质瘤组织和正常组织中的表达水平

Figure 1 The relative expression level of *LINC01088* in glioma tissues and normal tissues was analyzed

### 2.2 转染 *si-LINC01088* 对胶质瘤细胞 *LINC01088* 表达的影响

转染 24 h 后,与 *si-NC* 组相比,*si-LINC01088* 组细胞中 *LINC01088* 表达显著降低,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),*si-LINC01088-1* 干扰效率最高。见表 1。

### 2.3 慢病毒载体滴定与细胞感染效率

与对照相比,*LINC01088* 沉默组 *LINC01088* 的表达量显著降低,差异具有统计学意义 ( $t = 45.346$ ,  $P < 0.001$ )。见图 2。

### 2.4 沉默 *LINC01088* 对 U251 细胞增殖、迁移、侵袭和血管拟态能力的影响

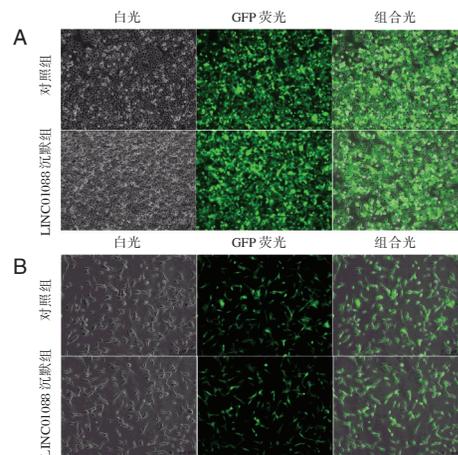
与对照相比,*LINC01088* 沉默组细胞在 24、48

表 1 转染 *si-LINC01088* 对胶质瘤 U251 细胞中 *LINC01088* 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Effect of transfected with *si-LINC01088* on the expression of *LINC01088* in glioma U251 cells ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	相对 <i>LINC01088</i> 表达		
	20 nM	50 nM	100 nM
si-NC	1.01±0.02	1.01±0.02	1.02±0.02
si-LINC01088-1	0.55±0.03 <sup>a</sup>	0.26±0.02 <sup>b</sup>	0.25±0.02 <sup>c</sup>
si-LINC01088-2	0.63±0.02 <sup>a</sup>	0.53±0.02 <sup>b</sup>	0.42±0.02 <sup>c</sup>
si-LINC01088-3	0.58±0.03 <sup>a</sup>	0.42±0.02 <sup>b</sup>	0.38±0.02 <sup>c</sup>
<i>F</i> 值	10.342	15.326	18.543
<i>P</i> 值	0.008	<0.001	<0.001

注:与 20 nM 对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 50 nM 对照组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与 100 nM 对照组比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$ 。



注:A.慢病毒感染 293T 细胞后对照组和 *LINC01088* 沉默组在白光、GFP 荧光和组合光下的细胞图。B.慢病毒感染胶质瘤 U251 细胞对照组和 *LINC01088* 沉默组在白光、GFP 荧光和组合光下的细胞图。

图 2 *sh-LINC01088* 慢病毒重组载体感染 293T 细胞和 U251 细胞图 (GFP 荧光, ×200)

Figure 2 *Sh-LINC01088* lentivirus recombinant vector infected 293T cells and U251 cells. (GFP fluorescence, ×200)

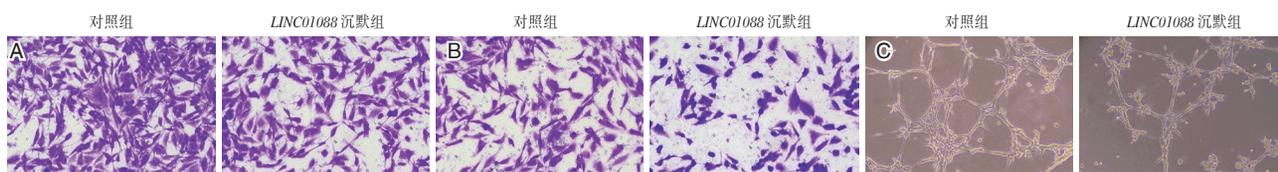
和 72 h 的增殖显著降低 ( $P < 0.05$ )。与对照相比,*LINC01088* 沉默组迁移细胞显著减少,差异具有统计学意义 ( $P < 0.001$ ),侵袭细胞显著减少 ( $P < 0.001$ ),管状数量也显著减少 ( $P < 0.001$ )。见表 3、图 3。

表 3 沉默 *LINC01088* 对 U251 细胞增殖、迁移、侵袭以及血管形成的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 3 Effect of silencing *LINC01088* on proliferation and migration of U251 cells ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	细胞活性 (OD <sub>570nm</sub> )				迁移细胞数 (个)	侵袭细胞数 (个)	微管状数目前 (个)
	0 h	24 h	48 h	72 h			
对照组	0.33±0.02	0.51±0.02	0.76±0.02	0.98±0.03	287.67±5.35	254.67±7.66	34.67±3.50
<i>LINC01088</i> 沉默组	0.35±0.01	0.41±0.01 <sup>a</sup>	0.57±0.02 <sup>b</sup>	0.63±0.02 <sup>c</sup>	190.5±8.80 <sup>a</sup>	113.67±3.14 <sup>a</sup>	13.00±5.40 <sup>a</sup>
<i>t</i> 值	1.625	13.39	14.36	26.74	23.10	41.72	8.242
<i>P</i> 值	0.180	<0.001	0.006	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与 24 h 对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 48 h 对照组比较,<sup>b</sup> $P < 0.01$ ;与 72 h 对照组比较,<sup>c</sup> $P < 0.001$ 。



注:A为细胞迁移图;B为细胞侵袭图;C为细胞血管生成图。

图3 细胞迁移实验图、侵袭及血管生成实验图(结晶紫染色,×200)

Figure 3 Cell migration in control group and *LINC01088* silencing group. (Crystal violet staining, ×200)

### 2.6 沉默 *LINC01088* 对 U251 细胞中 PI3K、p-AKT 和 AKT 蛋白表达的影响

与对照组相比,*LINC01088* 沉默组 U251 细胞中 PI3K 和 p-AKT 蛋白表达水平显著下降。见图 4。

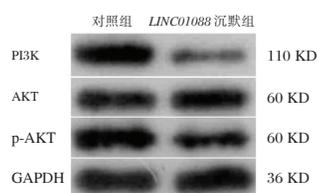


图4 细胞血管生成实验图(×200)

Figure 4 Cell angiogenesis of control (×200)

## 3 讨论

胶质瘤的发展和转移是一个复杂的多基因参与调控的过程,大量研究证实 LncRNA 在其发展中起着至关重要的作用<sup>[7]</sup>。越来越多的研究表明,异常表达的 LncRNA 经常在包括胶质瘤在内的多种癌症发现,有些表现出促进癌症的发展作用<sup>[8]</sup>,也有些表现出抑制癌症的发展作用,还有些在不同的癌症中所表现的功能也不尽相同<sup>[9]</sup>。如 LncRNA SNHG1 能促进胶质瘤的葡萄糖摄取、增殖、迁移、侵袭和血管生成<sup>[10]</sup>。LncRNA MT1JP 通过激活 PTEN/AKT 信号通路抑制胶质瘤细胞增殖、侵袭和迁移,促进胶质瘤细胞凋亡<sup>[11]</sup>。LncRNA XIST 在结直肠癌、膀胱癌和胃癌中以致癌的方式存在,而在乳腺癌和前列腺癌中也被证明发挥抑制肿瘤的作用<sup>[12-16]</sup>。因此,研究 LncRNA 在不同类型肿瘤中作用同样具有重要的意义。

*LINC01088* 是一个较新发现的 LncRNA,目前对它研究还很少,其在胶质瘤中的作用尚未见报道。最近 Zhang 等<sup>[4]</sup>研究发现,与正常卵巢组织相比,卵巢良性肿瘤组织中 *LINC01088* 的表达明显降低,*LINC01088* 对裸鼠卵巢癌移植瘤的生长有抑制作用,发挥抑癌作用。Ai 等<sup>[5]</sup>研究发现 *LINC01088* 低表达与上皮性卵巢癌临床病理特征

相关与上皮性卵巢癌 FIGO 分期、分级和远处转移有关,而且 *LINC01088* 表达水平越低总体生存率较差。以上研究表明 *LINC01088* 在卵巢癌中可以作为预后标志物,发挥抑癌作用。本研究发现胶质瘤组织中的 *LINC01088* 相对表达水平明显高于正常组织,沉默 *LINC01088* 能显著抑制 U251 细胞的增殖,同时还能抑制细胞迁移和侵袭。这些结果与 Zhang 等和 Ai 等研究 *LINC01088* 在上皮性卵巢癌组织中的表达和作用相反,这可能与 *LINC01088* 在不同类型肿瘤中发挥不同的作用有关。本研究发现沉默 *LINC01088* 能显著抑制胶质瘤 U251 细胞的血管生成能力。

PI3K/AKT 信号通路促进肿瘤的发生发展,对细胞的生存、增殖和代谢等关键功能起着重要的调控作用<sup>[17]</sup>。该信号通路活化能够细胞周期进程加快从而促进细胞增殖,同时也对肿瘤的侵袭和转移起促进作用,AKT 是 PI3K 信号途径的一个重要下游靶激酶,在许多癌症中经常发现磷酸化激活 AKT<sup>[18]</sup>。本研究发现沉默 *LINC01088* 能下调 PI3K 和 p-AKT 蛋白的表达,表明沉默 *LINC01088* 对 PI3K/AKT 信号通路有抑制作用。提示 *LINC01088* 在胶质瘤细胞的增殖、迁移、侵袭和血管生成中所起的作用可能与其调控 PI3K/AKT 信号通路有关。

综上所述,沉默 *LINC01088* 能够抑制胶质瘤细胞增殖、迁移、侵袭和血管生成,其作用机制可能与其抑制 PI3K/AKT 信号通路有关。*LINC01088* 可能是胶质瘤干预治疗的潜在靶点。

### 参考文献

- [1] Morgan LL. The epidemiology of glioma in adults: a “state of the science” review[J]. Neuro Oncol, 2015, 17(4): 623-4.
- [2] Erdem-Eraslan L, Gravendeel LA, de Rooi J, et al. Intrinsic molecular subtypes of glioma are prognostic and predict benefit from adjuvant procarbazine, lomustine, and vincristine chemotherapy in combination with other prognostic factors in ana-

- plastic oligodendroglial brain tumors: a report from EORTC study 26951[J]. *J Clin Oncol*, 2013, 31(3): 328-36.
- [3] 刘峰, 杨富, 张铃, 等. 长链非编码RNA与肿瘤诊断[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2013, 5(3): 194-199.
- [4] Zhang W, Fei J, Yu S, et al. LINC01088 inhibits tumorigenesis of ovarian epithelial cells by targeting miR-24-1-5p[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 2876.
- [5] Ai H, Xie W, Xiu AH, et al. The down-regulation of long non-coding RNA LINC01088 is associated with the poor prognosis of epithelial ovarian cancer patients[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(18): 5836-5841.
- [6] 王帆, 陈锋龙, 胡伟鹏, 等. Mig-7通过MEK/ERK信号通路抑制胶质瘤U251侵袭及血管生成拟态[J]. *南方医科大学学报*, 2019, 39(5): 566-571.
- [7] 苏伟杰, 陈文立, 王进山, 等. 长链非编码RNA与脑胶质瘤发生发展的研究进展[J]. *中国微侵袭神经外科杂志*, 2019, 24(4): 189-192.
- [8] 麦碧, 陈永秀, 胡桂英, 等. 长链非编码RNA LINC00393在子宫内膜癌临床预后判断中的意义[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2019, 11(3): 198-203.
- [9] 许家瑞, 胡剑, 刘冬冬, 等. 长链非编码RNA在乳腺癌中的研究进展[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2018, 10(1): 61-66.
- [10] Liu L, Shi Y, Shi J, et al. The long non-coding RNA SNHG1 promotes glioma progression by competitively binding to miR-194 to regulate PHLDA1 expression[J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(6): 463.
- [11] Zhang Y, Sui R, Chen Y, et al. Long noncoding RNA MT1JP inhibits proliferation, invasion, and migration while promoting apoptosis of glioma cells through the activation of PTEN/Akt signaling pathway[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(11): 19553-19564.
- [12] Song H, He P, Shao T, et al. Long non-coding RNA XIST functions as an oncogene in human colorectal cancer by targeting miR-132-3p[J]. *J Buon*, 2017, 22(3): 696-703.
- [13] Hu Y, Deng C, Zhang H, et al. Long non-coding RNA XIST promotes cell growth and metastasis through regulating miR-139-5p mediated Wnt/beta-catenin signaling pathway in bladder cancer[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(55): 94554-94568.
- [14] Ma L, Zhou Y, Luo X, et al. Long non-coding RNA XIST promotes cell growth and invasion through regulating miR-497/MACCl axis in gastric cancer[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(3): 4125-4135.
- [15] Huang YS, Chang CC, Lee SS, et al. Xist reduction in breast cancer upregulates AKT phosphorylation via HDAC3-mediated repression of PHLPP1 expression[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(28): 43256-43266.
- [16] Du Y, Weng XD, Wang L, et al. LncRNA XIST acts as a tumor suppressor in prostate cancer through sponging miR-23a to modulate RKIP expression[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(55): 94358-94370.
- [17] Yang SX, Polley E, Lipkowitz S. New insights on PI3K/AKT pathway alterations and clinical outcomes in breast cancer[J]. *Cancer Treat Rev*, 2016, 45: 87-96.
- [18] Mayer IA, Arteaga CL. The PI3K/AKT Pathway as a Target for Cancer Treatment[J]. *Annu Rev Med*, 2016, 67: 11-28.

(上接第747页)

- [4] 王晓华, 张玉娟. 凋亡蛋白抑制因子Livin在子宫内膜癌中的表达及其对肿瘤细胞侵袭和迁移能力的影响[J]. *上海医学*, 2019, 42(4): 222-226.
- [5] 王智超, 乐海桂. 血清凋亡分子caspase-3、P53与突发性耳聋病情及治疗效果的相关性[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2020, 12(11): 1497-1500.
- [6] Han C, Liu Z, Zhang Y, et al. Tumor cells suppress radiation-induced immunity by hijacking caspase 9 signaling[J]. *Nat Immunol*, 2020, 21(5): 546-554.
- [7] 全国卫生产业企业管理协会妇幼健康产业分会生殖内分泌学组. 中国子宫内膜增生诊疗共识[J]. *生殖医学杂志*, 2017, 26(10): 957-960.
- [8] 闫真, 涂金晶, 白伶俐. 屈螺酮炔雌醇片联合宫腔镜手术对子宫内膜息肉患者PBAC评分及子宫内膜厚度的影响[J]. *临床和实验医学杂志*, 2019, 18(17): 1888-1891.
- [9] 全国卫生产业企业管理协会妇幼健康产业分会生殖内分泌学组. 中国子宫内膜增生诊疗共识[J]. *生殖医学杂志*, 2017, 26(10): 957-960.
- [10] Travaglino A, Raffone A, Saccone G, et al. Immunohistochemical predictive markers of response to conservative treatment of endometrial hyperplasia and early endometrial cancer: A systematic review[J]. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 2019, 98(9): 1086-1099.
- [11] Gao J, Han W, He Y, et al. Livin promotes tumor progression through YAP activation in ovarian cancer[J]. *Am J Cancer Res*, 2020, 10(10): 3179-3193.
- [12] 王晓华, 张玉娟. 靶向抑制Livin表达对子宫内膜癌细胞增殖、侵袭及迁移能力的影响[J]. *山东医药*, 2018, 58(10): 39-41.
- [13] Ercan S, Arinc S, Yilmaz SG, et al. Investigation of Caspase 9 Gene Polymorphism in Patients With Non-small Cell Lung Cancer[J]. *Anticancer Res*, 2019, 39(5): 2437-2441.
- [14] Zhang TM. TRIAP1 Inhibition Activates the Cytochrome c/Apaf-1/Caspase-9 Signaling Pathway to Enhance Human Ovarian Cancer Sensitivity to Cisplatin[J]. *Chemotherapy*, 2019, 64(3): 119-128.

## D-二聚体、CA125、PD-L1 在卵巢癌患者中的表达及诊断价值

李仁河<sup>1</sup> 李苗<sup>1\*</sup> 梁裕萍<sup>2</sup> 沈晓苗<sup>1</sup>

**[摘要]** **目的** 分析D-二聚体(D-D)、糖类抗原(CA)125、程序性死亡配体1(PD-L1)表达在卵巢癌患者中的表达及诊断价值。**方法** 选取2019年10月至2020年11月本院接受卵巢肿物治疗的患者103例为研究对象,根据其病理学确诊分成卵巢癌组( $n=40$ )、良性肿瘤组( $n=63$ ),另选取同期本院健康体检女性50例为对照组。比较三组及卵巢癌组不同临床病理特征患者D-D、CA125、PD-L1表达,分析D-D、CA125、PD-L1表达之间相关性及其与临床病理特征的相关性,评价D-D、CA125、PD-L1表达对卵巢癌的诊断价值。**结果** D-D、CA125、PD-L1阳性率比较,卵巢癌组>良性肿瘤组>对照组,差异有统计学意义( $P<0.05$ );D-D、CA125、PD-L1阳性率与卵巢癌患者肿瘤直径、FIGO分期、肿瘤累及侧别、淋巴结转移、肌层浸润、恶性腹水均呈正相关性( $P<0.05$ );D-D与CA125、PD-L1阳性率呈正相关性,CA125与PD-L1阳性率呈正相关性( $P<0.05$ );D-D、CA125、PD-L1表达联合诊断卵巢癌的曲线下面积(AUC)最大,为0.937,优于单一诊断值( $P<0.05$ )。**结论** D-D、CA125、PD-L1表达升高与卵巢癌患者临床病理特征存在正相关关系,共同检测上述指标可为临床诊断卵巢癌和评估病情进展提供依据。

**[关键词]** D-二聚体;糖类抗原125;程序性死亡配体1;卵巢癌;临床病理特征

### The expression and diagnostic value of D-dimer, CA125, PD-L1 in patients with ovarian cancer

LI Renhe<sup>1</sup>, LI Miao<sup>1\*</sup>, LIANG Yuping<sup>2</sup>, SHEN Xiaomiao<sup>1</sup>

(1. Department of Gynecology, the Second Affiliated Hospital of Guangdong Medical University, Zhanjiang, China, 524100; 2. Department of Hematology, The Second Affiliated Hospital of Guangdong Medical University, Zhanjiang, China, 524100)

**[ABSTRACT]** **Objective** To analyze the expression and diagnostic value of D-dimer (D-D), carbohydrate antigen (CA) 125, and programmed death ligand 1 (PD-L1) in patients with ovarian cancer. **Methods** A total of 103 patients who received ovarian tumor treatment in our hospital from October 2019 to November 2020 were selected as the research objects. According to their pathological diagnosis, they were divided into the ovarian cancer group ( $n=40$ ) and the benign tumor group ( $n=63$ ). In the same period, 50 women with healthy physical examination in our hospital were selected as the control group. Compare the expression of DD, CA125, PD-L1 in the three groups and the ovarian cancer group with different clinicopathological characteristics, analyze the correlation between DD, CA125, PD-L1 expression and the correlation with clinicopathological characteristics, and evaluate DD, CA125, PD-L1 expression in the diagnosis of ovarian cancer. **Results** Comparison of the positive rates of DD, CA125, PD-L1, ovarian cancer group >benign tumor group >control group, the difference was statistically significant ( $P<0.05$ ). The positive rates of DD, CA125, PD-L1 were related to the tumor diameter and FIGO of patients with ovarian cancer staging, tumor involvement, lymph node metastasis, muscle inva-

基金项目:湛江市非资助科技攻关计划项目(19071710454281)

作者单位:1. 广东医科大学附属第二医院妇科,广东,湛江524100

2. 广东医科大学附属第二医院血透室,广东,湛江524100

\*通信作者:李苗, E-mail:lj258227@163.com

sion, and malignant ascites were all positively correlated ( $P<0.05$ ). DD was positively correlated with CA125 and PD-L1 positive rates, and CA125 and PD-L1 positive rates were positively correlated ( $P<0.05$ ). The area under the curve (AUC) of DD, CA125, and PD-L1 in the combined diagnosis of ovarian cancer is the largest, which is 0.937. **Conclusion** The increased expression of D-D, CA125, and PD-L1 is positively correlated with the clinicopathological characteristics of patients with ovarian cancer. The joint detection of the above indicators can provide a basis for clinical diagnosis of ovarian cancer and assessment of disease progression.

**[KEY WORDS]** D-dimer; carbohydrate antigen 125; Programmed death ligand 1; Ovarian cancer; Clinicopathological features

卵巢癌发病率仅次于宫颈癌、子宫内膜癌,但由于卵巢体积小、解剖结构较为复杂,导致60%~70%左右患者确诊时已处于晚期或发生腹部转移,病死率较高<sup>[1]</sup>。因此,早期诊断是提高卵巢癌患者生活质量、延长生存周期的关键环节。糖类抗原(carbohydrate antigen, CA)125是目前临床诊断卵巢癌应用最多的肿瘤标志物,但其特异度较低。近期研究表明<sup>[2]</sup>,恶性肿瘤可引起凝血前状态,参与肿瘤细胞增殖、浸润、转移及新生血管形成过程。D-二聚体(D-dimer, D-D)作为交联纤维蛋白特异降解产物,其表达上升可激活机体凝血与纤溶系统,有学者指出<sup>[3]</sup>,受肿瘤组织与血管恶性增长影响,卵巢恶性肿瘤患者体内血管内皮细胞损伤加重,促凝与纤溶系统紊乱,导致患者D-D水平显著增加,肿瘤浸润程度加剧。同时,相关研究还指出<sup>[4]</sup>,肿瘤免疫逃逸是肿瘤发生、发展过程中的关键机制之一,而程序性死亡配体1(Programmed death ligand 1, PD-L1)可促使肿瘤细胞逃避免疫监视。本研究尝试分析D-D、CA125、PD-L1表达在诊断卵巢癌的应用价值及与病情进展的关系,旨在为临床诊治提供科学指导。

## 1 资料和方法

### 1.1 一般资料

选取2019年10月至2020年11月本院接受卵巢肿瘤治疗的患者103例为研究对象,根据其病理学确诊分成卵巢癌组( $n=40$ )、良性肿瘤组( $n=63$ ),另选取同期本院健康体检女性50例为对照组。其中卵巢癌组:年龄平均( $55.64\pm 3.86$ )岁;良性肿瘤组:年龄平均( $54.74\pm 4.12$ )岁;对照组:年龄平均( $53.85\pm 5.01$ )岁。三组年龄、组织学类型比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。本院伦理委员会经审核评议同意本研究,研究对象均知情同意。

纳入标准:①卵巢癌组、良性肿瘤组均经组织病理学检查证实,且均为首次发作;②对照组均为妇科体检者,均无冠心病、糖尿病、高血压等基础疾病史;肝、肾功能正常;乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、人类免疫缺陷病毒、梅毒等血液检测均为阴性;无卵巢癌家族病史者。排除标准:①近期有放化疗、激素治疗史者;②预计生存期 $<6$ 个月者;③合并重度肝脏、肾脏功能不全、恶性肿瘤等对生命有严重威胁的疾病者;④伴有高血压、糖尿病、冠心病等慢性病者;⑤近期存在严重感染、系统性炎性或自身免疫性疾病、风湿性疾病者;⑥合并血液系统、甲状腺疾病等严重原发性疾病者;⑦失聪、言语功能障碍、昏迷或精神行为异常者。

### 1.2 方法

术前未接受任何治疗情况下清晨空腹取外周静脉血5 mL,常规离心处理[1 000 rpm 离心10 min(离心半径8 cm)],取上清液, $-80^{\circ}\text{C}$ 低温保存待检,采用酶联免疫吸附法测定血清D-D水平,严格按照德国SIEMENS公司提供的试剂盒说明书操作;采用电化学发光法测定血清CA125水平,严格按照瑞士罗氏诊断用品有限公司提供的试剂盒说明书操作。

术前未接受任何治疗情况下取正常卵巢组织、卵巢癌组织和卵巢良性肿瘤组织,采用免疫组化SP法染色检测组织中PD-L1表达水平,严格按照瑞士罗氏诊断用品有限公司提供的试剂盒说明书操作。结果判定<sup>[5]</sup>:由经验丰富的病理科医师判读,细胞膜及内膜系统呈棕黄色染色为PD-L1阳性细胞。PD-L1表达按照染色强度与阳性细胞所占比例评估PD-L1表达:①染色强度分为0分(无着色)、1分(淡黄色)、2分(棕黄色)、3分(棕褐色);②阳性细胞所占比例分为0分( $\leq 5\%$ )、1分( $5\% \sim 25\%$ )、2分( $25\% \sim 75\%$ )、3分( $>75\%$ )。总评分为染色强度与阳性细胞所占比例评分之和,其

中 0~2 分提示阴性标本, 3~6 分提示为阳性标本, 计算阳性表达率。

### 1.3 统计学方法

采用统计学软件 SPSS 22.0 处理数据, 计量资料以  $(\bar{x} \pm s)$  描述, 多组间比较采用单因素方差分析, 两组间比较采用独立样本 *t* 检验; 计数资料用 *n*(%) 表示、 $\chi^2$  检验; 采用 Spearman 相关系数模型分析 D-D、CA125、PD-L1 表达之间相关性及与临床病理特征的相关性; 绘制受试者工作特征曲线 (ROC) 得到曲线下面积 (AUC), 检验 D-D、CA125、PD-L1 单一及联合诊断卵巢癌价值, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 3 组 D-D、CA125、PD-L1 阳性率表达

3 组 D-D、CA125、PD-L1 阳性率比较, 差异有统计学意义 (*P* < 0.05)。见表 1、图 1。

表 1 3 组 D-D、CA125、PD-L1 表达比较 [*n*(%), ( $\bar{x} \pm s$ )]  
Table 1 expression comparison of D-D, CA125 and PD-L1 in 3 groups [*n*(%), ( $\bar{x} \pm s$ )]

组别	例数	D-D (mg/L)	CA125 (U/mL)	PD-L1 阳性率
卵巢癌组	40	2.58±0.74	188.62±60.38	25 (62.50)
良性肿瘤组	63	1.27±0.60	93.45±43.64	12 (19.05)
对照组	50	0.30±0.15	14.72±5.38	3 (6.00)
<i>t</i> / $\chi^2$ 值		193.601	192.633	39.532
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001

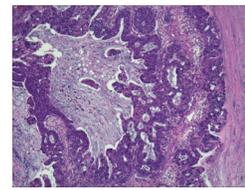


图 1 PD-L1 在卵巢癌组织中的阳性表达 (SP, ×200)  
Figure 1 Positive expression of PD-L1 in ovarian cancer (SP, ×200)

### 2.2 不同临床病理特征卵巢癌患者 D-D、CA125、PD-L1 表达

不同年龄、组织学类型 D-D、CA125、PD-L1 阳性率比较, 差异无统计学意义 (*P* > 0.05); 肿瘤直径 ≥ 8 cm、FIGO 分期 III + IV 期、肿瘤累及双侧、淋巴结转移、肌层浸润、脉管侵犯、恶性腹水患者 D-D、CA125、PD-L1 阳性率高于肿瘤直径 < 8 cm、FIGO 分期 I + II 期、肿瘤累及单侧、无淋巴结转移、无肌层浸润、无脉管侵犯、无恶性腹水患者 (*P* < 0.05)。见表 2。

### 2.3 D-D、CA125、PD-L1 表达与临床病理特征的相关性

Spearman 相关性分析, D-D、CA125、PD-L1 阳性率与卵巢癌患者肿瘤直径、FIGO 分期、肿瘤累及侧别、淋巴结转移、肌层浸润、恶性腹水均呈正相关性 (*P* < 0.05), 见表 3。

### 2.4 D-D、CA125、PD-L1 表达诊断卵巢癌价值

ROC 曲线结果显示, D-D、CA125、PD-L1 表达联合诊断卵巢癌的 AUC (0.937) 优于上述指标单一诊断及两两联合诊断。见表 4、图 2。

表 2 不同临床病理特征卵巢癌患者 D-D、CA125、PD-L1 表达

Table 2 Expression of D-D, CA125 and PD-L1 in ovarian cancer patients with different clinicopathological features

临床病理特征	<i>n</i>	D-D (mg/L)	<i>t</i> / <i>P</i> 值	CA125 (U/mL)	<i>t</i> / <i>P</i> 值	PD-L1 阳性	$\chi^2$ / <i>P</i> 值
年龄 (岁)	≤55	18	2.33±1.24	187.39±46.75	0.141/0.888	10 (55.56)	0.6738/0.412
	>55	22	2.78±1.58	189.63±52.07		15 (68.18)	
肿瘤直径 (cm)	<8	19	2.04±0.92	142.49±37.83	6.740/<0.001	6 (31.58)	14.764/<0.001
	≥8	21	3.07±1.15	239.61±51.45		19 (90.48)	
组织学类型	浆液性癌	26	2.62±0.83	192.61±33.14	0.937/0.354	17 (65.38)	0.264/0.608
	非浆液性癌	14	2.51±1.02	181.21±42.57		8 (57.14)	
FIGO 分期	I + II 期	13	2.04±0.76	135.76±44.39	4.595/<0.001	4 (30.77)	6.389/0.012
	III + IV 期	27	2.84±1.09	214.07±53.06		21 (77.78)	
肿瘤累及侧别	单侧	26	2.33±0.83	151.09±35.22	7.933/<0.001	12 (46.15)	8.469/0.004
	双侧	14	3.04±1.19	258.32±49.75		13 (92.86)	
淋巴结转移	有	23	2.79±0.76	225.49±40.47	7.751/<0.001	18 (78.26)	5.736/0.017
	无	17	2.30±0.52	138.74±25.61		7 (41.18)	
肌层浸润	是	29	2.96±1.04	213.00±38.76	7.071/<0.001	22 (75.86)	6.094/0.014
	否	11	1.58±0.69	124.35±23.59		3 (27.27)	
脉管侵犯	是	25	2.87±0.63	239.54±42.47	11.345/<0.001	19 (76.00)	5.184/0.023
	否	15	2.10±0.47	103.75±23.52		6 (40.00)	
恶性腹水	有	19	3.01±1.54	240.83±45.81	7.965/<0.001	15 (78.95)	4.177/0.041
	无	21	2.19±0.72	141.38±32.65		10 (47.62)	

表3 D-D、CA125、PD-L1 表达与临床病理特征的相关性  
Table 3 Correlation between expression of D-D, CA125, PD-L1 and clinicopathological features

指标	D-D		CA125		PD-L1 阳性	
	r 值	P 值	r 值	P 值	r 值	P 值
肿瘤直径	0.427	0.012	0.469	0.004	0.435	0.016
FIGO 分期	0.654	<0.001	0.675	<0.001	0.621	<0.001
肿瘤累及侧别	0.539	<0.001	0.564	<0.001	0.557	<0.001
淋巴结转移	0.612	<0.001	0.635	<0.001	0.586	<0.001
肌层浸润	0.603	<0.001	0.618	<0.001	0.594	<0.001
恶性腹水	0.568	<0.001	0.592	<0.001	0.532	<0.001

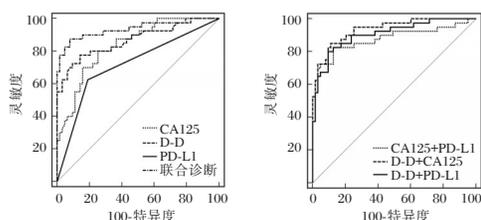


图2 诊断ROC曲线

Figure 2 diagnostic ROC curve

表4 D-D、CA125、PD-L1 表达诊断卵巢癌的ROC曲线

Table 4 ROC curve of D-D, CA125, PD-L1 expression in diagnosis of ovarian cancer

指标	AUC	95%CI	Z 值	cut-off 值	灵敏度(%)	特异度(%)	P 值
D-D	0.837	0.786-0.926	9.353	>1.94 mg/L	77.50	85.71	<0.001
CA125	0.835	0.749-0.901	8.549	>145.44 U/mL	80.00	74.60	<0.001
PD-L1	0.717	0.620-0.802	4.714	阳性	62.50	80.95	<0.001
D-D+CA125	0.935	0.869-0.974	18.370		85.00	88.89	<0.001
CA125+PD-L1	0.879	0.800-0.935	9.337		82.50	87.30	<0.001
D-D+PD-L1	0.907	0.833-0.955	13.166		80.00	90.48	<0.001
三者联合诊断	0.937	0.871-0.975	15.958		87.50	92.06	<0.001

归因于卵巢癌患者肿瘤组织血管异常增殖一定程度可加重血管内皮损伤,分泌大量纤维蛋白裂解因子与凝血因子前体等促凝物质,裂解纤维蛋白原,进而导致机体凝血与纤溶系统紊乱,从而上调D-D水平表达。故推测D-D有望成为诊断卵巢癌的血清标志物。另有文献指出<sup>[12]</sup>,细胞外基质纤维蛋白沉积与重塑是肿瘤细胞侵袭与转移的病理基础。本研究结果提示D-D表达异常增加可能参与卵巢癌发生、发展过程。

PD-L1是PD-1配体之一,二者结合可激活免疫抑制分子信号通路,降低T细胞功能,从而帮助肿瘤细胞逃脱机体免疫系统识别与攻击<sup>[13-14]</sup>。本研究通过免疫组织SP法检测可知,卵巢癌患者PD-L1阳性率显著高于卵巢良性肿瘤患者、健康体检者,并随FIGO分期增加、肿瘤累及双侧、淋巴结转移、肌层浸润、恶性腹水呈升高趋势,结合龙琼先等<sup>[15]</sup>研究考虑PD-L1在卵巢癌组织中的表达调控机制可能在于,一方面肿瘤癌基因通过激活磷

### 3 讨论

CA125是肿瘤糖蛋白因子,在卵巢癌中的诊断价值已得到临床认可<sup>[6]</sup>。本研究数据表明,卵巢癌患者CA125表达显著升高,与伍丽等<sup>[7]</sup>观点一致,可能与卵巢癌患者肿瘤细胞异常增殖存在一定相关性。但受炎症、经期等因素影响,CA125在良性肿瘤、盆腔炎等疾病也会出现升高现象,故单独检测可能出现假阳性<sup>[8]</sup>。因此,寻找一种新的肿瘤标志物联合CA125提高卵巢癌诊断价值是目前临床研究重点和热点之一。

分子学研究显示<sup>[9-10]</sup>,恶性肿瘤患者普遍存在凝血功能障碍与纤溶功能亢进。而D-D作为特异性纤溶过程标记物,可有效反映机体高凝状态。窦荣汉等<sup>[11]</sup>通过268例卵巢肿瘤患者发现,D-D在卵巢癌患者中过度升高,支持本研究观点,这可能

脂酰肌醇3-激酶-AKT、表皮生长因子受体等信号通路传导,可促使肿瘤细胞表达PD-L1;另一方面肿瘤免疫微环境中T细胞驱动一定程度可诱导抗肿瘤免疫效应释放炎症信号,进而上调PD-L1表达。推测阻断PD-L1有望成为卵巢癌免疫治疗的新靶点。而PD-L1在健康体检者中表达可能与机体免疫耐受建立等因素有关。另外,本研究经Spearman相关性还发现,D-D、CA125、PD-L1表达之间存在一定相关性,推测三者可能在卵巢癌发生、发展中起着协同作用。由此可见,共同检测D-D、CA125、PD-L1表达可作为临床卵巢癌早期诊断的一种有效辅助手段,指导临床判断病情进展,开展个性化精准治疗。

综上所述,D-D、CA125、PD-L1表达升高与卵巢癌患者临床病理特征存在正相关关系,共同检测上述指标可为临床诊断卵巢癌和评估病情进展提供依据。

(下转第761页)

## miR-200b 靶向 MAP2 对缺氧缺糖诱导的大鼠皮质神经细胞损伤的影响

王宏宇<sup>1\*</sup> 董俊兴<sup>2</sup> 陈阵仁<sup>1</sup> 任皓楠<sup>1</sup>

**[摘要]** **目的** 研究 miR-200b 对缺氧缺糖诱导的大鼠皮质神经细胞损伤的影响及潜在机制。**方法** 将大鼠皮质神经细胞分为正常对照组(不做处理),缺氧缺糖模型组(含 0.5 mmol/L 连二亚硫酸钠的无糖 Earle's 液培养 48 h), anti-miR-NC 组、anti-miR-200b 组、miR-NC 组和 miR-200b 组, qRT-PCR 检测细胞中 miR-200b、*calpain1* mRNA 和 *MAP2* mRNA 的含量, Western blot 测定 MAP2、calpain1、凋亡相关蛋白 pro-caspase3 和 cl-caspase3 的水平, CCK8 法和流式细胞术分别检测细胞存活率和凋亡率, 双荧光素酶报告系统验证 miR-200b 与 MAP2 的靶向关系。**结果** 与对照组相比, 缺氧缺糖模型组大鼠皮质神经细胞中 miR-200b 和 *calpain1* mRNA 水平均升高 ( $P < 0.05$ ), *MAP2* mRNA 水平降低 ( $P < 0.05$ ), 细胞存活率降低 ( $P < 0.05$ ), 细胞凋亡率显著升高, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 在缺氧缺糖模型组大鼠皮质神经细胞中抑制 miR-200b 可提高细胞存活率 ( $P < 0.05$ ), 降低细胞凋亡率 ( $P < 0.05$ ), 提高 pro-caspase3、*MAP2* mRNA 和蛋白含量 ( $P < 0.05$ ), 降低 cl-caspase3、*calpain1* mRNA 和蛋白含量 ( $P < 0.05$ ), 过表达 miR-200b 则结果相反; 双荧光素酶报告实验结果表明, MAP2 是 miR-200b 的靶点。**结论** miR-200b 可能靶向 MAP2 调控缺氧缺糖诱导的大鼠皮质神经细胞损伤和凋亡。

**[关键词]** 大鼠皮质神经细胞; miR-200b, 缺氧缺糖; MAP2; 存活率; 凋亡率

### Effects of miR-200b targeting MAP2 on the damage of rat cortical nerve cells induced by hypoxia and hypoglycemia

WANG Hongyu<sup>1\*</sup>, DONG Junxing<sup>2</sup>, CHEN Zhenren<sup>1</sup>, REN Haonan<sup>1</sup>

(1. Department of Emergency, Zhengzhou Seventh People's Hospital, Zhengzhou, Henan, China, 450000;

2. Department of Neurology, Seventh People's Hospital of Zhengzhou City, Zhengzhou, Henan, China, 450000)

**[ABSTRACT]** **Objective** To investigate the effect of miR-200b on the injury of rat cortical neurons induced by hypoxia and glucose deficiency and its potential mechanism. **Methods** The cortical neurons of rats were divided into the normal control group (without treatment), hypoxia and glucose deficiency model group (cells were cultured in sugar-free Earle's solution containing 0.5 mmol/L sodium dithionite for 48 h), anti-miR-NC group, anti-miR-200b group, miR-NC group and miR-200b group. qRT-PCR was used to detect the levels of miR-200b, *calpain1* mRNA and *MAP2* mRNA in the rat cortical neurons. Western blot was applied to measure the levels of MAP2, calpain1, pro-caspase3 and cl-caspase3. CCK8 assay and flow cytometry were performed to detect the cell survival rate and apoptosis rate respectively. Dual-luciferase reporting system was used to verify the targeting relationship between miR-200b and MAP2. **Results** Compared with the control group, the levels of miR-200b and *calpain1* mRNA in cortical neuron cells of rats in the hypoxia-glucose deprivation model group were increased, the level of *MAP2* mRNA was decreased, cell survival rate was decreased, and cell

基金项目:河南省医学科技攻关联合共建项目(2018020852)

作者单位:1. 河南省郑州市第七人民医院急诊科,河南,郑州 450000

2. 河南省郑州市第七人民医院神经内科,河南,郑州 450000

\*通信作者:王宏宇, E-mail: wanghongyu0902@163.com

apoptosis rate was increased, with statistical significance ( $P < 0.05$ ). Inhibiting miR-200b in rat cortical neuron cells of the hypoxia-glucose deprivation model group improved cell survival rate, reduced cell apoptosis rate, increased the levels of pro-caspase3, MAP2 mRNA and protein, and reduced the levels of cl-caspase3, calpain1 mRNA and protein. Over-expression of miR-200b had the opposite result. The results of dual-luciferase reporting system indicated that MAP2 is the target of miR-200b. **Conclusion** Mir-200b targets MAP2 to regulate the injury and apoptosis of rat cortical neurons induced by hypoxia and glucose deficiency.

**[KEY WORDS]** Cortical nerve cells of rats; MiR-200b, hypoxia and glucose deficiency; MAP2; Survival rate; Apoptosis rate

研究表明, miRNA 在神经损伤后出现异常表达, 可能通过靶向不同的 mRNA 与脑损伤后产生的炎症、细胞存活和再生有关, 也可能是神经损伤的潜在标志物<sup>[1-2]</sup>。miR-200b-3p 在缺氧缺血处理后早期大鼠脑内表达上调, 抑制 miR-200b-3p 减轻新生大鼠缺氧缺血性脑损伤<sup>[3]</sup>。钙蛋白酶 1 (calpain1) 在神经系统疾病、肿瘤细胞存活、凋亡和侵袭等过程中均发挥重要作用<sup>[4]</sup>, 微管相关蛋白 2 (MAP2) 是其底物, 大鼠皮质神经细胞缺氧缺糖损伤后 24 h 内, calpain1 含量升高, MAP2 含量降低<sup>[5]</sup>。本研究通过生物信息学预测发现, miR-200b 与 MAP2 序列中存在可结合位点, MAP2 可能是 miR-200b 的靶基因。因此, 本研究假设, 在体外建立的大鼠皮质神经细胞的缺氧缺糖模型中, miR-200b 可通过靶向 MAP2 影响大鼠皮质神经细胞缺氧缺糖诱导的损伤, 并对其进行验证, 以期对神经细胞缺氧损伤提供新的研究方向。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 动物

新生 24 h 内, 质量约为 (5.5±0.5)g 的 SD 大鼠 (批号: 061012), 雌雄兼用。

#### 1.1.2 试剂

胎牛血清 (FBS)、马血清和 DEME/F12K 培养基、B27 无血清添加剂购自美国 Gibco 公司; 连二亚硫酸钠、胰蛋白酶、阿糖胞苷购自 Sigma-Aldrich 公司; 双荧光素酶报告系统 (Dual-Luciferase Reporter Assay System) 购自美国 Promega 公司; Total RNA 提取试剂盒、Real-time PCR 试剂盒、反转录试剂盒 (RT-PCR) 和 Lipofectamine 2000 转染试剂盒购自宝生物工程 (大连) 有限公司; 引物、miR-200b mimics (miR-200b)、抑制剂 (anti-miR-200b)、对照物 (miR-NC、anti-miR-NC) 及 MAP2 野生型 (WT-MAP2) 和突变型 (MUT-MAP2) 报告载体购自上海吉玛制药

有限公司; MAP2 抗体、calpain1 抗体、pro-caspase3 抗体、cl-caspase3 抗体和 GAPDH 抗体购自美国 Santa 公司; CCK8 试剂盒、细胞凋亡检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司; 流式细胞仪购自 BD 公司, Real-time PCR 仪购自美国 Bio-Rad 公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 大鼠皮质神经细胞的分离培养<sup>[5]</sup>

根据文献<sup>[5]</sup>的方法, 取大鼠大脑皮质组织, 剪碎后用 0.25% 的胰蛋白酶消化, 离心沉淀细胞, 然后用含 15% 马血清及 1% B27 的 DEME/F12K 培养基悬浮细胞, 培养液中添加 100 U/mL 青霉素-100 μg/mL 链霉素, 置于 37℃ 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养, 48 h 后加入终浓度为 10 μmol/L 阿糖胞苷抑制胶质细胞生长, 待神经细胞生长至 7 天时, 用特异性烯醇化酶 (NSE) 免疫细胞化学染色进行鉴定, 显微镜下观察, 当大部分细胞被染为棕黄色时表明分离成功, 此时状态的细胞用于后续实验。

#### 1.2.2 细胞缺氧模型构建<sup>[6]</sup>

取培养 7 d 的神经细胞, 吸去原来的培养基, 用无糖 Earle's 液清洗 2 遍, 然后换成换含 0.5 mmol/L 连二亚硫酸钠的无糖 Earle's 液继续培养 48 h, 即为缺氧模型组; 其中常规培养 48 h 的细胞作为对照组。

#### 1.2.3 细胞转染和 Real-time PCR 检测 RNA 的表达

取对数生长期模型组细胞, 根据 Lipofectamine 2000 转染试剂盒说明书进行操作, 将各组载体 (anti-miR-NC、anti-miR-200b、miR-NC、miR-200b) 转染入缺氧模型组大鼠皮质神经细胞中, 分别作为 miR-NC 组、miR-200b 组、anti-miR-NC 组、anti-miR-200b 组。

转染 48 h 后, 收集细胞, 提取细胞总 RNA, 反转录合成 cDNA, 以 cDNA 为模板按照 Real-time PCR 试剂盒的说明书进行反应, 合成 miR-200b、calpain1 mRNA 和 MAP2 mRNA。用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 方法进行含量数据分析。

### 1.2.4 细胞凋亡率及细胞存活率测定

收集各组大鼠皮质神经细胞,接种培养细胞,PBS缓冲液洗涤2次,按照凋亡试剂盒及CCK8的试剂盒说明书操作,检测并计算细胞凋亡率及存活率。

### 1.2.5 双荧光素酶报告系统实验

使用PCR扩增包含miR-200b结合位点的MAP2序列片段,并克隆至荧光素酶表达载体中,获得MAP2野生型载体(WT-MAP2),将MAP2序列ACAGUAUUA突变为AACCAGAAC,获得MAP2突变型载体(MUT-MAP2),将WT-MAP2和MUT-MAP2双荧光素酶报告载体分别与miR-NC或miR-200b用Lipofectamine 2000脂质体共转染至培养好的大鼠皮质神经细胞。根据说明书,检测细胞相对萤火虫荧光素酶活性。

### 1.2.6 Western blot检测MAP2和凋亡相关蛋白

收集各组大鼠皮质神经细胞,破碎细胞,收集蛋白进行SDS-PAGE,然后转PVDF膜,5%脱脂奶粉室温封闭2h,加入一抗(MAP2抗体1:1000,calpain1抗体1:1000,pro-caspase3抗体1:1000,cl-caspase3抗体1:2000和GAPDH抗体1:3000),4℃过夜孵育,TBST洗膜3次,加入稀释的酶标二抗室温孵育2h,以GAPDH为内参照,分析蛋白水平。

### 1.3 统计学处理

采用SPSS 19.0软件进行数据分析,计数资料以( $\bar{x} \pm s$ )表示;两组间比较用t检验,多组间的比较采用单因素方差分析。以P<0.05为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 缺氧缺糖损伤模型的建立及miR-200b、calpain1和MAP2的表达

与对照组相比,缺氧缺糖模型组大鼠皮质神经细胞中miR-200b和calpain1 mRNA水平均升高(P<0.05),MAP2 mRNA水平降低(P<0.05),细胞存活率降低(P<0.05),细胞凋亡率显著升高,差异有统计学意义(P<0.05)。见表1。

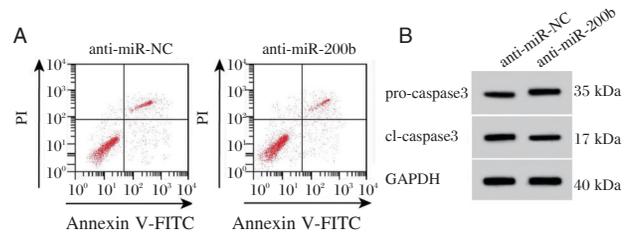
表1 缺氧缺糖对大鼠皮质神经细胞及miR-200b、calpain1和MAP2表达的影响( $\bar{x} \pm s, n=9$ )

Table 1 Effects of hypoxia and glucose deficiency on the expression of miR-200b, calpain 1 and MAP2 in rat cortical neurons ( $\bar{x} \pm s, n=9$ )

组别	miR-200b	calpain1 mRNA	MAP2 mRNA	存活率 (%)	凋亡率 (%)
对照组	1.00±0.05	1.00±0.06	1.00±0.06	100.00±7.94	8.12±1.01
模型组	3.19±0.08	2.25±0.07	0.41±0.04	45.84±5.14	25.19±1.96
t值	69.642	40.674	24.545	17.178	23.225
P值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

### 2.2 抑制miR-200b对缺氧缺糖诱导的大鼠皮质神经细胞的影响

转染anti-miR-200b抑制miR-200b,结果发现,与anti-miR-NC组相比,anti-miR-200b组大鼠皮质神经细胞中miR-200b含量降低,差异有统计学意义(P<0.05),细胞存活率升高,凋亡率降低,pro-caspase3含量升高,cl-caspase3蛋白含量降低,差异有统计学意义(P<0.05)。见图1、表2。



A:抑制miR-200b对缺氧缺糖诱导的大鼠皮质神经细胞凋亡的影响; B: caspase3蛋白的表达

图1 抑制miR-200b对缺氧缺糖诱导的大鼠皮质神经细胞凋亡及caspase3蛋白表达的影响

Figure 1 Effects of miR-200b inhibition on apoptosis and expression of caspase3 proteins in rat cortical neurons induced by hypoxia and glucose deprivation

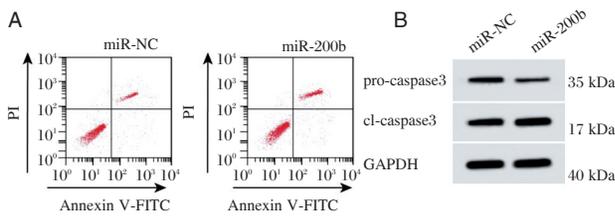
### 2.3 过表达miR-200b对缺氧缺糖诱导的大鼠皮质神经细胞的影响

与miR-NC组相比,miR-200b组细胞中miR-200b含量、细胞凋亡率和cl-caspase3含量升高,细胞存活率和pro-caspase3蛋白含量降低,差异有统计学意义(P<0.05)。见图2、表3。

表2 抑制miR-200b对缺氧缺糖诱导的大鼠皮质神经细胞的影响( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Effect of miR-200b inhibition on rat cortical neurons induced by hypoxia and glucose deficiency ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	miR-200b	存活率 (%)	凋亡率 (%)	pro-caspase3	cl-caspase3
anti-miR-NC	1.01±0.06	45.78±5.12	25.12±1.89	0.20±0.02	0.63±0.06
anti-miR-200b	0.25±0.03	84.91±6.38	15.91±1.42	0.54±0.04	0.29±0.03
t值	33.988	14.350	11.688	22.808	15.205
P值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000



注:A为过表达miR-200b对缺氧缺糖诱导的大鼠皮质神经细胞凋亡的影响;B为caspase3蛋白表达。

图2 过表达miR-200b对缺氧缺糖诱导的大鼠皮质神经细胞凋亡的影响

Figure 2 Effects of miR-200b over-expression on apoptosis and expression of caspase3 proteins in rat cortical neurons induced by hypoxia and glucose deprivation

表3 过表达miR-200b对缺氧缺糖诱导的大鼠皮质神经细胞的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=9$ )

Table 3 Effect of over-expression of miR-200b on the hypoxic injury of rat cortical neurons ( $\bar{x} \pm s, n=9$ )

组别	miR-200b	存活率 (%)	凋亡率 (%)	pro-caspase3	cl-caspase3
miR-NC	1.00±0.05	45.81±5.11	25.16±1.88	0.21±0.02	0.62±0.06
miR-200b	3.55±0.09	30.17±4.19	34.10±2.02	0.07±0.01	0.98±0.08
t值	74.303	7.100	9.719	18.783	10.800
P值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

### 2.4 抑制、过表达miR-200b对缺氧缺糖诱导的大鼠皮质神经细胞中calpain1和MAP2表达的影响

与anti-miR-NC组相比,anti-miR-200b组细胞中,calpain1 mRNA和蛋白含量均降低,MAP2 mRNA和蛋白含量均升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );与miR-NC组相比,miR-200b组细胞中calpain1 mRNA和蛋白含量均升高,MAP2 mRNA和蛋白含量均降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表4。

表4 calpain1和MAP2的表达

Table 4 Expression of calpain1 and MAP2

组别	calpain1 mRNA	MAP2 mRNA	calpain1	MAP2
anti-miR-NC	2.26±0.19	0.40±0.04	0.59±0.05	0.26±0.03
anti-miR-200b	0.99±0.15	0.79±0.05	0.20±0.03	0.52±0.05
miR-NC	2.30±0.20	0.41±0.04	0.60±0.05	0.27±0.03
miR-200b	3.18±0.23	0.14±0.02	0.99±0.07	0.15±0.02
F值	193.020	422.754	346.778	187.404
P值	0.000	0.000	0.000	0.000

### 2.5 miR-200b靶向MAP2

MAP2的3'UTR序列中含有与miR-200b互补的序列,见图3。双荧光素酶报告系统结果如表5所示,过表达miR-200b组野生型WT-MAP2的萤火虫荧光素酶相对活性显著下降,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );而突变型MUT-MAP2的荧光素酶相对活性比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。见表5。

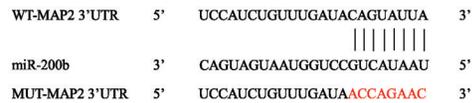


图3 MAP2的3'UTR中含有与miR-200b互补核苷酸序列  
Figure 3 The sequence of MAP2 3'UTR contains complementary nucleotide sequences with miR-200b

表5 双荧光素酶报告实验 ( $\bar{x} \pm s, n=9$ )

Table 5 Dual luciferase reporter assay ( $\bar{x} \pm s, n=9$ )

组别	WT-MAP2	MUT-MAP2
miR-NC	1.00±0.05	1.01±0.05
miR-200b	0.20±0.03	0.98±0.05
t值	41.160	1.273
P值	0.000	0.221

## 3 讨论

miRNA在多种缺氧相关疾病中表达出现异常,参与疾病细胞的炎症、细胞存活、分化和凋亡等过程<sup>[7]</sup>。神经元的凋亡时脑缺氧缺血的主要标志,报道表明,miR-200b与缺氧诱导的损伤密切相关,miR-200b与miR-200家族的miR-429及miR-200a在化学缺氧诱导剂氯化钴处理分化的嗜铬细胞瘤(PC12)细胞12h后含量显著降低,miR-200b过表达抑制了Notch1信号通路,并抑制了氯化钴诱导的PC12细胞凋亡<sup>[8]</sup>。研究表明,在高压氧联合神经脂苷钠治疗仔鼠脑缺氧缺血损伤中,miR-200b抑制剂对疗效具有协同作用,miR-200b激动剂对疗效具有抑制作用<sup>[9]</sup>。miR-200b-3p在缺氧缺血处理后早期大鼠脑内表达上调,抑制miR-200b-3p可靶向Slit2减轻新生大鼠缺氧缺血性脑损伤<sup>[3]</sup>。本研究结果说明miR-200b可减轻缺氧缺糖诱导的神经细胞损伤。但其作用机制尚不清楚。

本研究通过TargetScan预测发现,MAP2与miR-200b可能存在靶向关系,miR-200b可能通过靶向MAP2参与调控缺氧缺糖诱导的神经细胞损伤。MAP2又称微管相关蛋白2(microtubule-associated protein 2),主要存在于神经元中,在构成细胞骨架、神经元塑形等功能中发挥作用,其缺失导致神经功能障碍<sup>[10]</sup>,也是神经元损伤的评价指标之一<sup>[11]</sup>。研究表明,MAP-2在大鼠神经细胞缺氧缺糖(OGD)损伤后1h表达降低,伤后12h达低谷,24h表达升高<sup>[12]</sup>。MAP-2是钙蛋白酶-1(calpain1)的特异性底物,calpain1参与突触可塑性和神经元变性,通常具有神经保护作用<sup>[13]</sup>。在大鼠海绵神经元缺氧模型中,缺氧3h后,MAP2因水解

含量降低, calpain1 水平增加, 细胞骨架发生破坏<sup>[14]</sup>。MAP2 和 calpain1 在神经细胞缺氧损伤中均发生变化。本研究结果说明 miR-200b 负调控 MAP2 的表达。本研究通过双荧光素酶报告系统发现, miR-200b 可靶向结合 MAP2。综合结果表明, miR-200b 靶向负调控 MAP2 的表达。

综上, 在大鼠皮质神经细胞缺氧缺糖模型中, miR-200b 靶向 MAP2 调控大鼠皮质神经细胞存活和凋亡。miR-200b 和 MAP2 可能是脑缺氧损伤的分子靶点。

### 参考文献

- [1] 赵利, 李海燕. miR-142-5p 对癫痫发作后神经元损伤的作用机制[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(7):968-973.
- [2] 宋佳希, 牛冬梅, 汪俊军, 等. 中枢神经系统损伤潜在标志物 microRNAs 的研究进展[J]. 中华检验医学杂志, 2015, 38(3):211-214.
- [3] Zhang N, Yang L, Meng L, et al. Inhibition of miR-200b-3p alleviates hypoxia-ischemic brain damage via targeting Slit2 in neonatal rats[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2020, 523(4):931-938.
- [4] 齐曾鑫, 蔡加君, 姚瑜, 等. 钙蛋白酶的研究进展[J]. 中国临床神经科学, 2013, 21(04):456-462.
- [5] 孙宏杰. 原代培养大鼠皮质神经细胞缺氧缺糖损伤模型的建立及损伤后 calpain1 表达变化规律的研究[D]. 沈阳: 中国医科大学, 2010.
- [6] 李强, 赵宝东, 王冬阳. 神经生长因子对缺氧/缺糖诱导的大鼠小脑皮质神经细胞凋亡的影响[J]. 中国组织工程研究, 2005, 9(33):61-63.
- [7] Gupta A, Sugadev R, Sharma YK, et al. Role of miRNAs in hypoxia-related disorders[J]. J Biosci, 2018, 43(4):739-749.
- [8] Yang C, Zhang X, Yin H, et al. MiR-429/200a/200b negatively regulate Notch1 signaling pathway to suppress CoCl<sub>2</sub>-induced apoptosis in PC12 cells[J]. Toxicol In Vitro, 2020, 65:104787. [published online ahead of print, 2020 Jan 29].
- [9] 李瑞, 张茂, 秦云. miRNA-200b 在高压氧综合治疗缺氧缺血脑损伤小鼠中的作用[J]. 中华航海医学与高气压医学杂志, 2019, 26(4):299-302.
- [10] Samandari H, Nabavizadeh F, Ashabi G. Age-related difference in protective effect of early post-conditioning on ischemic brain injury: possible involvement of MAP-2/Synaptophysin role[J]. Metab Brain Dis, 2019, 34(6):1771-1780.
- [11] Kühn J, Meissner C, Oehmichen M. Microtubule-associated protein 2 (MAP2)--a promising approach to diagnosis of forensic types of hypoxia-ischemia[J]. Acta Neuropathol, 2005, 110(6):579-586.
- [12] 孙宏杰, 吴旭, 卢岩, 等. 大鼠皮质神经细胞缺氧缺糖损伤后 MAP-2 表达变化规律[J]. 中国法医学杂志, 2014, 029(006):511-513, 518.
- [13] Baudry M, Bi X. Calpain-1 and Calpain-2: The Yin and Yang of Synaptic Plasticity and Neurodegeneration [J]. Trends Neurosci, 2016, 39(4):235-245.
- [14] 卜婧, 张永亮, 李灵芝, 等. 大麻正丁醇部位对大鼠海马神经元缺氧致钙超载的抑制作用[J]. 医学研究生学报, 2014, 27(2):133-137.

(上接第 756 页)

### 参考文献

- [1] 王晓辉, 奈嫚嫚, 李蕾, 等. HK2、CXCR4 基因表达水平与卵巢癌临床病理及生存预后的相关性[J]. 热带医学杂志, 2020, 20(6):741-745.
- [2] Yamada Y, Kawaguchi R, Iwai K, et al. Preoperative plasma D-dimer level is a useful prognostic marker in ovarian cancer [J]. J Obstet Gynaecol, 2020, 40(1):102-106.
- [3] 石慧, 胡建国. HE4、CA125 联合 D-二聚体检测对卵巢癌的诊断价值[J]. 蚌埠医学院学报, 2020, 45(4):523-526.
- [4] Webb JR, Milne K, Kroeger DR, et al. PD-L1 expression is associated with tumor-infiltrating T cells and favorable prognosis in high-grade serous ovarian cancer[J]. Gynecol Oncol, 2016, 141(2):293-302.
- [5] 鞠策, 高景春, 张朋新, 等. PD-1 和 PD-L1 在卵巢上皮性癌组织中的表达及其意义[J]. 中华妇产科杂志, 2020, 55(8):529-534.
- [6] 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.
- [7] 伍丽, 黄健容, 兰易, 等. CEA、CA199 和 CA125 单独和联合应用在卵巢癌诊断中的效能分析[J]. 中国妇产科临床杂志, 2020, 21(1):56-57.
- [8] Dochez V, Caillon H, Vaucel E, et al. Biomarkers and algorithms for diagnosis of ovarian cancer: CA125, HE4, RMI and ROMA, a review[J]. J Ovarian Res, 2019, 12(1):28.
- [9] 刘建军, 崔林, 刘兴祥, 等. 血浆 D-二聚体水平与卵巢癌患者临床特征及化疗预后的关系研究[J]. 癌症进展, 2018, 16(6):766-769.
- [10] 马会明, 张翔, 何品芳, 等. 恶性肿瘤患者凝血功能变化的研究进展[J]. 山东医药, 2020, 60(28):112-115.
- [11] 窦荣汉, 陈焯, 杨绍雪, 等. 卵巢癌患者血浆 D-二聚体水平的变化及其与临床病理特征的关系[J]. 中国医师杂志, 2020, 22(11):1699-1702.
- [12] 刘飞, 卞荣荣, 杭兆康, 等. 恶性肿瘤患者的凝血指标与肿瘤进展、不良预后的相关性探讨[J]. 吉林医学, 2020, 41(10):2332-2333.
- [13] Xue C, Xu Y, Ye W, et al. Expression of PD-L1 in ovarian cancer and its synergistic antitumor effect with PARP inhibitor [J]. Gynecol Oncol, 2020, 157(1):222-233.
- [14] 付江萍, 蓝柳, 胡芳, 等. 食管癌组织中 PD-L1、Vim、Zeb1 的表达与放疗敏感性的关系分析[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(8):1090-1094.
- [15] 龙琼先, 彭勇, 唐治蓉, 等. 卵巢癌组织中 PD-L1 表达与 EMT 及其转录因子的相关性[J]. 现代肿瘤医学, 2020, 28(18):3214-3218.

## 急性冠脉综合征患者血浆 miR-122、miR-29b、miR-30d 水平变化及诊断价值

郝春霞<sup>1\*</sup> 张小光<sup>1</sup> 李伟<sup>2</sup> 张颖<sup>2</sup>

**[摘要]** **目的** 探讨急性冠脉综合征(ACS)患者血浆 miR-122、miR-29b、miR-30d 水平变化及诊断价值。**方法** 选取2017年1月至2020年1月本院收治102例急性冠脉综合征患者的临床资料为观察组同期选取40例健康体检人员作为对照组,比较两组血浆 miR-122、miR-29b、miR-30d 表达量,以及分析其 ROC 曲线的 AUC 值,并将观察组分为 A 组(非 ST 段抬高型心肌梗死)和 B 组(不稳定型心绞痛),各 51 例,对比不同疾病类型的 miR-122、miR-29b、miR-30d 表达量,分析 miR-122、miR-29b、miR-30d 与急性冠脉综合征严重程度的相关性。**结果** 观察组的 miR-122、miR-30d 高于对照组,而 miR-29b 低于对照组,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。ROC 曲线分析显示,miR-122、miR-30d、miR-29b、三项联合的 AUC 分别为 0.959、0.966、0.936、0.999( $P<0.05$ )。A 组血浆 miR-122、miR-30d 高于 B 组,而 miR-29b 低于 B 组,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。Spearman 相关性显示,miR-122、miR-30d 与急性冠脉综合征患者的病情严重程度呈负相关( $r=-0.937$ 、 $-0.857$ , $P<0.05$ ),miR-29b 与急性冠脉综合征患者病情严重程度呈正相关( $r=0.854$ , $P<0.05$ )。**结论** miR-122、miR-30d 在急性冠脉综合征患者血浆中呈高表达,而 miR-29b 呈低表达,会随着病情严重程度而上升或下降,能为临床诊断提供重要信息。

**[关键词]** 急性冠脉综合征; 血浆 miR-122; miR-29b; miR-30d

### Changes of plasma miR-122, miR-29b, miR-30d levels in patients with acute coronary syndrome and their diagnostic value

HAO Chunxia<sup>1\*</sup>, ZHANG Xiaoguang<sup>1</sup>, LI Wei<sup>2</sup>, ZHANG Ying<sup>2</sup>

(1. Department of Emergency, Fengtai Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Beijing, China, 100072; 2. Department of Cardiology, Fengtai Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Beijing, China, 100072)

**[ABSTRACT]** **Objective** To investigate the changes of plasma miR-122, miR-29b, miR-30d levels in patients with acute coronary syndrome (ACS) and their diagnostic value. **Methods** The clinical data of 102 patients with acute coronary syndrome admitted to this Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine from January 2017 to January 2020 were selected for retrospective analysis. During the same period, 40 cases of health examination personnel were selected as the control group, and 102 patients with acute coronary syndrome were set as the observation group. The expression levels of plasma miR-122, miR-29b, and miR-30d were compared, and the AUC value of the ROC curve was analyzed. The observation group is divided into group A (non-ST-segment elevation type muscle infarction) and group B (Unstable angina), with 51 cases in each group, the expression levels of miR-122, miR-29b, miR-30d in different disease types were compared, and the relationship between miR-122, miR-29b, miR-30d and the severity of acute coronary syndromes was analyzed. **Results** The miR-122 and miR-30d of the observation group were higher than those

基金项目:全军保健专项课题(16BJZ05)

作者单位:1. 北京市丰台中西医结合医院急诊科,北京 100072

2. 北京市丰台中西医结合医院心内科,北京 100072

\*通信作者:郝春霞, E-mail: feihuhex2021@163.com

of the control group, while miR-29b was lower than the control group, the difference was statistically significant ( $P<0.05$ ). The ROC curve analysis showed that the AUC of miR-122, miR-30d, miR-29b, and the three combination were (0.959, 0.966, 0.936, 0.999,  $P<0.05$ ); Plasma miR-122 and miR-30d in group A were higher than those in group B, while miR-29b was lower than group B, the difference was statistically significant ( $P<0.05$ ). Spearman correlation showed that miR-122 and miR-30d were negatively correlated with the severity of patients with acute coronary syndromes ( $r=-0.937, -0.857, P<0.05$ ), and miR-29b was positively correlated with patients with acute coronary syndromes ( $r=0.854, P<0.05$ ). **Conclusion** miR-122 and miR-30d are highly expressed in the plasma of patients with acute coronary syndrome, while miR-29b is lowly expressed, which will increase or decrease with the severity of the disease, which can provide important information for clinical diagnosis.

**[KEY WORDS]** Acute coronary syndrome; Plasma miR-122; miR-29b; miR-30d

经调查<sup>[1]</sup>发现,急性冠脉综合征(Acute coronary syndrome, ACS)是导致心血管疾病患者死亡的主要原因。同时也是冠状动脉粥样硬化性心脏病中的急危重症;若是早期能够准确识别,对控制病情发展及改善预后具有重要意义。有研究<sup>[2]</sup>指出,血脂、高敏C反应蛋白等指标在冠状动脉粥样硬化心脏病的发生及发展中起到重要意义。基于此,探寻一种特异性、敏感度较高的指标用于预测急性冠脉综合征病情发展十分重要,也一直是临床研究的重点。有研究<sup>[3]</sup>指出,miRNA异常表达与急性冠脉综合征的发生密切相关,但临床上关于其研究报道较少,尚不清楚 miR-122、miR-29b、miR-30d 等作用机制,故本次旨在探讨急性冠脉综合征患者血浆 miR-122、miR-29b、miR-30d 水平变化及诊断价值。现将其报告如下。

## 1 资料与方法

### 1.1 临床资料

分析2017年1月至2020年1月诊治的102例急性冠脉综合征患者(观察组)和40例健康体检人员(对照组)的临床资料。诊断标准:符合《急性冠脉综合征急诊快速诊治指南(2019)》<sup>[4]</sup>的诊断标准,经冠状动脉造影等技术确诊。纳入标准:①首次发病;②年龄>18岁;③无脑出血等疾病。排除标准:①存在全身性感染等疾病;②伴有先天性心脏病;③接受过冠脉支架植入治疗。观察组中男性52例、女性50例;年龄平均(51.23±2.45)岁;其中非ST段抬高型肌梗死51例、不稳定型心绞痛51例;NYHA心功能分级<sup>[5]</sup>:I级15例、II级28例、III级35例、IV级24例;对照组中男性21例、女性19例;年龄平均(51.32±2.41)岁;两组在性别、年龄等资料比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

### 1.2 试剂与方法

实时荧光定量PCR检测后的血浆miR-122、miR-29b、miR-30d等资料。操作步骤如下:于空腹状态下抽取受检人员外周静脉血5 mL,5 000 rpm离心20 min,取上清液至干净离心试管中待检;采用血液RNA分离试剂盒(美国赛默飞世尔科技有限公司)提取血浆RNA,将100 ng总RNA进行1%琼脂糖凝胶电泳,以此保证RNA的完整性,并采用紫外分光光度计(美国赛默飞世尔科技有限公司)检测吸光值,确定提取RNA纯度是否合格,其次采用RNA逆转录试剂盒(美国Takaya科技有限公司)对提取RNA进行逆转录,且选择SYBR-Green荧光定量PCR检测试剂盒(美国赛默飞世尔科技有限公司)对血浆miR-122;miR-29b;miR-30d进行荧光定量PCR检测;其中,miR-29b反应体系为SYBR mix 12.5  $\mu$ L,miR-30d为25  $\mu$ L,miR-29b为20  $\mu$ L。PCR扩增条件为95 $^{\circ}$ C,40 s;96 $^{\circ}$ C,10 s;59 $^{\circ}$ C,50 s,进行36个循环。最后根据 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算miR-122、miR-29b、miR-30d相对表达量,并以其相对表达量来表示血浆miR-122、miR-29b、miR-30d的表达水平。三项联合= $\text{miR-122}+(\beta \text{ miR-29b}/\beta \text{ miR-122})\times\text{miR-30d}(\beta \text{ miR-30d}/\beta \text{ miR-122})\times\text{miR-29b}$ , $\beta$ 以组别为因变量,以miR-122、miR-29b、miR-30d为自变量进行二元logistic回归的回归系数。miR-29b上游引物:5'-GGCCTTAAGTCAAATGTTCGGCT-3';下游引物:5'-AAAGGATCACTGGAACCTGCC-3';miR-122上游引物:5'-GTTTCGTGGGAGCTACATCTGGC-3';下游引物:5'-GCAGGGTCCGAGGTATTC-3';miR-30d上游引物:5'-AACCTGAGTGGAGCAGA-3';下游引物:5'-TGTAACATCCCCGAC-3'。

### 1.3 观察指标

①评估观察组与对照组的血浆miR-122、miR-

29b、miR-30d。②分析 miR-122、miR-30d、miR-29b 及三项联合的 ROC 曲线,并评估其敏感度、特异度、约登指数。③评估 A 组与 B 组的血浆 miR-122、miR-29b、miR-30d。④分析血浆 miR-122、miR-29b、miR-30d 与急性冠脉综合征患者严重程度的相关性。

### 1.4 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件进行数据分析;计量资料用  $(\bar{x} \pm s)$  表示,行独立样本 *t* 检验;预测价值评估采用 ROC 曲线分析;相关性采用 Spearman 法分析;以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 两组血浆 miR-122、miR-29b、miR-30d 比较

观察组的 miR-122、miR-30d 高于对照组,而

miR-29b 低于对照组,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 1。

表 1 两组血浆 miR-122、miR-29b、miR-30d 比较  $(\bar{x} \pm s)$

Table 1 Comparison of plasma miR-122, miR-29b, miR-30d between 2 groups  $(\bar{x} \pm s)$

组别	<i>n</i>	miR-122	miR-29b	miR-30d
观察组	102	4.83±1.94	0.70±0.23	5.01±1.14
对照组	40	1.02±0.14	1.45±0.49	1.98±0.32
<i>t</i> 值		12.382	12.404	13.238
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001

### 2.2 诊断效能

ROC 曲线分析显示,miR-122、miR-30d、miR-29b、三项联合诊断急性冠脉综合征的 AUC 分别为 0.959、0.966、0.936、0.999 ( $P < 0.05$ )。见表 2、图 1。

表 2 血浆 miR-122、miR-29b、miR-30d 及三项联合的诊断效能分析

Table 2 Analysis of the diagnostic efficacy of plasma miR-122, miR-29b, miR-30d and the combination of three items

检验结果变量	AUC	标准错误	95%CI	cut-off 值	约登指数	敏感度 (%)	特异度 (%)	<i>P</i> 值
miR-122	0.959	0.019	0.922-0.996	1.680	0.941	94.10	100.00	<0.001
miR-30d	0.966	0.019	0.928-1.000	2.835	0.921	97.10	95.00	<0.001
miR-29b	0.936	0.036	0.865-1.000	0.975	0.900	100.00	90.00	<0.001
三项联合	0.999	0.002	0.995-1.000	1.656	0.975	100.00	97.50	<0.001

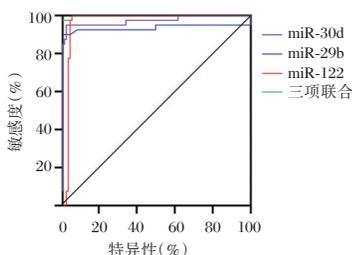


图 1 miR-122、miR-29b、miR-30d 及三项联合的 ROC 曲线分析

Figure 1 ROC curve analysis of miR-122, miR-29b, miR-30d and the combination of three

### 2.3 急性冠脉综合征患者的血浆 miR-122、miR-29b、miR-30d 比较

A 组血浆 miR-122、miR-30d 高于 B 组,而 miR-29b 低于 B 组,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 3。

表 3 A、B 组的血浆 miR-122、miR-29b、miR-30d 比较  $(\bar{x} \pm s)$

Table 3 Comparison of plasma miR-122, miR-29b, miR-30d between group A and group B  $(\bar{x} \pm s)$

组别	<i>n</i>	miR-122	miR-29b	miR-30d
A 组	51	6.68±0.69	0.45±0.10	7.95±0.75
B 组	51	2.98±0.42	0.95±0.16	2.54±0.47
<i>t</i> 值		35.775	20.697	47.739
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001

### 2.4 相关性分析

Spearman 相关性显示,miR-122、miR-30d 与急性冠脉综合征患者病情的严重程度呈负相关 ( $r = -0.937, -0.857, P < 0.05$ ),而 miR-29b 与急性冠脉综合征患者病情严重程度呈正相关 ( $r = 0.854, P < 0.05$ )。

## 3 讨论

流行病学<sup>[6]</sup>调查发现,急性冠脉综合征在临床上具有较高的发病率和死亡率。经分析发现,该病的发生与动脉粥样硬化斑块破裂、血小板聚集、血栓形成、血管痉挛等病因具有直接关系,均是导致急性冠脉综合征患者冠状动脉管腔出现完全或不完全阻塞的重要原因,最终引起心肌急性缺血或坏死<sup>[7]</sup>。有研究<sup>[8]</sup>指出,miRNA 的异常表达与心血管疾病的发生、发展密切相关。也有研究表示,miRNA 参与血管脂质斑块形成、斑块破裂、糜烂、血小板聚集及心肌细胞坏死、凋亡等过程<sup>[9]</sup>。鉴于 miRNA 异常表达与急性冠脉综合征的发生、发展具有一定相关性。本次从分析血浆 miR-122、miR-29b、miR-30d 等因子入手,以期为临床诊断急性冠脉综合征及评估预后筛选实用指标。本研究结果提示血浆 miR-122、miR-29b、miR-30d 异常表达与急性冠脉综合征发生、发展密切相关。其中,

miR-122 是一种由肝脏特异性编码的多聚腺苷酸。经分析发现,其表达水平受 miR-370 的调控,且参与体内脂肪酸和三酰甘油的合成。也有研究<sup>[10]</sup>指出,miR-122 参与胆固醇及脂肪酸代谢的调控,若是抑制血浆 miR-122 的表达量,能有效降低总胆固醇水平,以及减少肝脏三酰甘油的含量。在侯素芝等<sup>[11]</sup>学者研究中可见,急性冠脉综合征组的 TG、TC 显著高于稳定性心绞痛组和健康对照组,从中说明 TG、TC 水平的升高能增加动脉粥样硬化的风险,导致急性冠脉综合征的发生。而 miR-122 又参与了 TG、TC 水平的升高,故本文推测 miR-122 可能是胆固醇和脂肪酸代谢的调节器,可将其作为急性冠脉综合征诊疗的靶点。

有研究发现,miR-29b 异常表达与 T 淋巴细胞瘤、动脉粥样硬化、心肌纤维化等疾病的发生密切相关。譬如其在急性心肌梗死、心肌纤维化等疾病发生中均能起到一定调节作用,故临床将其作为多种疾病的诊断标志物分子<sup>[12-13]</sup>。在本研究中可见,miR-29b 与 miR-122、miR-30d 不同,在患者中其血浆 miR-29b 表达量呈明显下降趋势,经分析为,血管内皮细胞中的 miR-29b 具有抑制核因子 kB 信号通路活化的作用,在正常表达情况下,能抑制炎症反应对细胞的损害,使血管内皮细胞在细胞脂多糖的刺激下仍存活。当血浆 miR-29b 表达量下降,则无法抑制核因子 kB 信号通路的活化,并且会导致炎症因子水平升高,加大对心肌细胞的损伤,最终引发急性冠脉综合征<sup>[14]</sup>。miR-30d 作为 microRNA-30 家族中的一员,参与了多种细胞的分化。有研究指出,miR-30d 表达量变化能调节硫化氢的分泌,保护缺血缺氧状态下的心肌细胞。在石萍等<sup>[15]</sup>学者研究中可见,急性冠脉综合征患者血浆中的 miR-30d 表达量会随着胸痛时间呈动态变化,从中说明 miR-30d 表达量会随病情发生改变。在本文 Spearman 相关性显示,miR-30d 与急性冠脉综合征严重程度呈负相关,佐证上述说法的可靠性。在本文研究中也可见到,miR-122、miR-30d、miR-29b 预测急性冠脉综合征的 AUC 分别为 0.959、0.966、0.936;说明其预测价值较高,若是联合诊断,有利于提高诊断确诊率,即三项联合的 AUC 为 0.999,说明其预测价值较 miR-122、miR-30d、miR-29b 单独检测高。

综上所述,miR-122、miR-30d、miR-29b 用于诊

断急性冠脉综合征患者具有较高的临床价值,其表达量会随着病情的严重程度上升或下降。

## 参考文献

- [1] 王阳,栗印军,邢芸芸,等. 冠状动脉粥样硬化心脏病患者外周血中血小板 miR-126 水平及临床意义[J]. 内科急危重症杂志, 2019, 25(5):384-386.
- [2] Zhang YZ, Wang J, Xu F. Circulating miR-29b and miR-424 as Prognostic Markers in Patients with Acute Cerebral Infarction[J]. Clin Lab, 2017, 63(10):1667.
- [3] 张仁杰,王宁,齐杰,等. miR-133a 和 miR-208a 对急性冠脉综合征患者 PCI 术后心肌损伤的诊断价值[J]. 河北医学, 2019, 25(11):1769-1773.
- [4] 中国医师协会急诊医师分会,国家卫健委能力建设与继续教育中心急诊学专家委员会,中国医疗保健国际交流促进会急诊急救分会. 急性冠脉综合征急诊快速诊治指南(2019)[J]. 中国急救医学, 2019, 39(4):301-308.
- [5] 李琦,刘克强,齐新,等. 冠心病心力衰竭病人 NYHA 心功能分级和血清 NT-proBNP 及 HRV 各项指标的关系[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2018, 16(14):2058-2060.
- [6] 耿国英,刘恒亮,赵玉洁,等. 血清 miR-208a 在急性冠状动脉综合征早期鉴别诊断中的价值[J]. 中华老年医学杂志, 2020, 39(8):874-878.
- [7] 刘汉毅,杜小杰,王金墙,等. miR-126、miR-96 与急性心肌梗死患者血小板活化及近期预后相关性[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(8):1022-1025+1038.
- [8] 刘文华,陶潞渊,徐恩国. 非瓣膜病心房颤动患者血浆 miR-486 和 miR-150 的表达水平及临床意义[J]. 医学研究杂志, 2019, 48(1):78-83.
- [9] 温莉玲,陈家佳,梁红丽,等. 血清 miR-29 及 miR-150 对急性肾损伤患者预后的预测价值[J]. 中国急救医学, 2018, 38(7):581-585.
- [10] 吴霞,王学法,金鑫. 急性冠脉综合征患者血浆 miR-122 和 miR-3149 表达的临床意义[J]. 山东医药, 2017, 57(4):88-89+90.
- [11] 侯素芝,刘会,刘瑞芳. 急性冠脉综合征患者血清补体 C1q 水平变化及临床意义[J]. 中国循证心血管医学杂志, 2019, 11(8):978-980+985.
- [12] 齐德林,李洪利,李杨,等. 血浆 miR-29b 与急性冠脉综合征患者胞外基质蛋白含量的关系及其诊断价值分析[J]. 现代生物医学进展, 2020, 20(10):1850-1853.
- [13] 刘志立,宋菊,焦亚洲. 急性心肌梗死病人血清 miR-29b 和 miR-424 的表达水平及其与预后的关系[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2020, 18(7):1116-1120.
- [14] Ulivi P, Canale M, Passardi A, et al. Circulating Plasma Levels of miR-20b, miR-29b and miR-155 as Predictors of Bevacizumab Efficacy in Patients with Metastatic Colorectal Cancer[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(1):307.
- [15] 石萍,贾克刚,王雄关,等. 血浆循环 microRNA-30d 在急性冠状动脉综合征中应用的初探[J]. 中华检验医学杂志, 2018, 41(2):97-102.

## 高危型 HPV 感染者宫颈免疫状况及与宫颈癌的关系

程文俊 申庆文\*

**【摘要】目的** 探讨高危型人乳头瘤病毒(HR-HPV)感染者宫颈免疫状况及与宫颈癌的关系。**方法** 选取2018年6月至2020年10月本院收治的104例HR-HPV感染患者,其中宫颈癌筛查正常人群39例(正常组)、宫颈高级别上皮内瘤变36例(HSIL组)、宫颈癌29例(宫颈癌组),比较3组一般资料、CD3<sup>+</sup>T细胞、CD4<sup>+</sup>T细胞、CD8<sup>+</sup>T细胞、调节性T细胞(Treg),采用Pearson、Logistic回归方程、受试者工作特征曲线(ROC)及ROC下面积(AUC)对数据进行统计分析。**结果** 3组HR-HPV载量、CD8<sup>+</sup>T细胞、Treg比较:宫颈癌组>HSIL组>正常组,差异有统计学意义( $P<0.05$ );CD3<sup>+</sup>T细胞、CD4<sup>+</sup>T细胞比较:宫颈癌组<HSIL组<正常组,差异有统计学意义( $P<0.05$ );3组CD3<sup>+</sup>T细胞、CD4<sup>+</sup>T细胞与HR-HPV载量呈负相关( $P<0.05$ ),CD8<sup>+</sup>T细胞、Treg与HR-HPV载量呈正相关( $P<0.05$ );CD3<sup>+</sup>T细胞、CD4<sup>+</sup>T细胞、CD8<sup>+</sup>T细胞、Treg高于均值者发生宫颈癌的风险分别是低于均值的0.657、0.491、3.339、4.054倍( $P<0.05$ );CD3<sup>+</sup>T细胞、CD4<sup>+</sup>T细胞、CD8<sup>+</sup>T细胞、Treg预测宫颈癌的AUC依次为0.850、0.740、0.825、0.799,各指标联合预测宫颈癌的AUC为0.935( $P<0.05$ )。**结论** 高危型HPV感染者宫颈局部细胞免疫功能异常与宫颈癌发生显著相关,有望成为预测宫颈癌发生的新型分子标志物。

**【关键词】** 高危型HPV感染; CD3<sup>+</sup>T细胞; CD4<sup>+</sup>T细胞; HR-HPV载量; CD8<sup>+</sup>T细胞; Treg 宫颈癌

### Cervical immune status of patients with high-risk HPV infection and its relationship with cervical cancer

CHENG Wenjun, SHEN Qingwen\*

(Department of Obstetrics and Gynecology, the First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu, Anhui, China, 233000)

**【ABSTRACT】 Objective** To explore the relationship between cervical immune status and cervical cancer in patients with high-risk human papillomavirus (HR-HPV) infection. **Methods** From June 2018 to October 2020, 104 patients with HR-HPV infection were selected in our hospital. Among them, 39 cases of normal people (normal group) were detected by cervical cancer screening, 36 cases of cervical high-grade intraepithelial neoplasia (HSIL group), and 29 cases of cervical cancer (cervical cancer group). The general data of the 3 groups, CD3<sup>+</sup>T cells, CD4<sup>+</sup>T cells, CD8<sup>+</sup>T cells, and regulatory T cells (Treg) were compared. Pearson, Logistic regression equation, receiver operating characteristic curve (ROC) and area under ROC (AUC) were used for statistical analysis. **Results** HR-HPV load, CD8<sup>+</sup>T cells, Treg: cervical cancer group>HSIL group>normal group ( $P<0.05$ ). CD3<sup>+</sup>T cells, CD4<sup>+</sup>T cells: cervical cancer group <HSIL group < normal group ( $P<0.05$ ). CD3<sup>+</sup>T cells and CD4<sup>+</sup>T cells were negatively correlated with HR-HPV load, and CD8<sup>+</sup>T cells, Treg and HR-HPV load were positively correlated ( $P<0.05$ ). The risk of cervical cancer with higher than average CD3<sup>+</sup>T cells, CD4<sup>+</sup>T cells, CD8<sup>+</sup>T cells, and Tregs was 0.657, 0.491, 3.339, 4.054 times lower than the average ( $P<0.05$ ). The AUC of cervical cancer predicted by CD3<sup>+</sup>T cells, CD4<sup>+</sup>T cells, CD8<sup>+</sup>T cells and Treg were 0.850, 0.740, 0.825, 0.799, respectively, and the AUC of each index combined

基金项目:安徽省科技项目(KJ2019A0343)

作者单位:安徽省蚌埠市蚌埠医学院第一附属医院妇产科,安徽,蚌埠 233000

\*通信作者:申庆文, E-mail:13909656048@qq.com

to predict cervical cancer was 0.935 ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Cervical cellular immune function abnormalities in patients with high-risk HPV infection are significantly related to the occurrence of cervical cancer, and it is expected to become a new molecular marker for predicting the occurrence of cervical cancer.

**[KEY WORDS]** High-risk HPV infection; CD3<sup>+</sup>T cells; CD4<sup>+</sup>T cells; HR-HPV load; CD8<sup>+</sup>T cells; Treg cervical cancer

宫颈癌发病率高居女性生殖系统恶性肿瘤之首,严重危害患者生命健康,因此深入研究其发病机制,对预防宫颈癌发生和进展意义重大<sup>[1]</sup>。王芳等<sup>[2]</sup>报道,宫颈癌组高危型人乳头瘤病毒(High risk human papillomavirus, HR-HPV)感染率为77.50%,显著高于宫颈癌前病变和宫颈癌筛查正常人群患者,提示HR-HPV感染与宫颈癌的发病密切相关,但目前尚未完全阐明其通过何种机制介导了宫颈癌的发生。根据既往资料<sup>[3]</sup>,HPV感染可导致CD4<sup>+</sup>T细胞、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>降低,引起宫颈局部免疫微环境变化,而这种变化与宫颈癌关系的报道鲜见,不利于疾病的防治。鉴于此本研究探讨HR-HPV感染者宫颈免疫状况及与宫颈癌的关系,旨在为临床针对性防治宫颈癌提供循证支持,现报告如下。

## 1 对象和方法

### 1.1 研究对象

选取2018年6月至2020年10月本院收治的104例HR-HPV感染患者,其中宫颈癌筛查正常人群39例(正常组)、宫颈高级别上皮内瘤变36例(HSIL组)、宫颈癌29例(宫颈癌组)。所有患者均知情并同意。

纳入标准:①3组分别符合宫颈癌筛查正常人群、宫颈高级别上皮内瘤变、宫颈癌诊断标准<sup>[4]</sup>;②伴有HR-HPV感染者;③首次确诊,无相关治疗史。排除标准:①自身免疫疾病者;②免疫缺陷者;③合并其他急性感染类疾病者;④伴有其他系统原发性恶性肿瘤者;⑤有宫颈手术史、子宫切除史者。本实验经医院伦理委员会批准。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 资料收集

收集患者年龄、体质量指数、婚姻状况、生育史、阴道清洁度、血脂异常、糖尿病、心脏病、高血压分布,所收集数据录入数据库,核实原始资料准确性和完整性,采用Epi Data 3.02双人双录,进行一致性检验。

#### 1.2.2 标本采集与检测

于治疗前采用阴道窥器暴露宫颈,将宫颈采

样刷刷头插入宫颈管,中央较长的刷丝对准病变部位顺时针刷4圈左右,取下刷头,置入液基细胞学保存液中,通过流式细胞仪(美国Beckman Coulter公司XL型)检测CD3<sup>+</sup>T细胞、CD4<sup>+</sup>T细胞、CD8<sup>+</sup>T细胞、Treg水平,采用实时荧光定量聚合酶链反应法检测HR-HPV载量。

### 1.3 观察指标

①比较3组年龄、体质量指数、婚姻状况、生育史、阴道清洁度、血脂异常、糖尿病、心脏病、高血压分布及HR-HPV载量。②比较3组CD3<sup>+</sup>T细胞、CD4<sup>+</sup>T细胞、CD8<sup>+</sup>T细胞、Treg水平。③分析CD3<sup>+</sup>T细胞、CD4<sup>+</sup>T细胞、CD8<sup>+</sup>T细胞、Treg水平与HR-HPV载量的关系。④分析宫颈癌相关影响因素。⑤分析CD3<sup>+</sup>T细胞、CD4<sup>+</sup>T细胞、CD8<sup>+</sup>T细胞、Treg水平预测宫颈癌的价值。

### 1.4 统计学方法

采用SPSS 22.0处理数据,计量资料以( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间比较以单因素方差分析,两两比较以 $t$ 检验,计数资料用 $n(\%)$ 表示, $\chi^2$ 检验,采用Pearson分析宫颈免疫指标与HR-HPV载量相关性,采用Logistic回归方程分析宫颈癌相关影响因素,采用受试者工作特征曲线(ROC)及ROC下面积(AUC)分析CD3<sup>+</sup>T细胞、CD4<sup>+</sup>T细胞、CD8<sup>+</sup>T细胞、Treg预测宫颈癌的价值。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 3组一般资料比较

3组年龄、体质量指数、婚姻状况、生育史、阴道清洁度、血脂异常、糖尿病、心脏病、高血压分布比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ );宫颈癌组HR-HPV载量高于HSIL组、正常组( $P < 0.05$ ),HSIL组HR-HPV载量高于正常组,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表1。

### 2.2 3组宫颈免疫状况比较

宫颈癌组CD3<sup>+</sup>T细胞、CD4<sup>+</sup>T细胞低于HSIL组、正常组,CD8<sup>+</sup>T细胞、Treg高于HSIL组、正常组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );HSIL组CD3<sup>+</sup>T细

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

资料	正常组 (n=39)	HSIL组 (n=36)	宫颈癌组 (n=29)	F/ $\chi^2$ 值	P值
年龄(岁)	61.89±9.66	65.27±11.30	63.58±10.36	0.144	0.868
体质量指数 (kg/m <sup>2</sup> )					
偏瘦	6(15.38)	5(13.89)	2(6.90)	3.077	0.799
正常	18(46.15)	20(55.56)	17(58.62)		
超重	11(28.21)	9(25.00)	9(31.03)		
肥胖	4(10.26)	2(5.56)	1(3.45)		
婚姻状况					
已婚	20(51.28)	21(58.33)	19(65.52)	1.390	0.499
未婚	19(48.72)	15(41.67)	10(34.48)		
生育史					
有	17(43.59)	20(55.56)	16(55.17)	1.358	0.507
无	22(56.41)	16(44.44)	13(44.83)		
阴道清洁度					
I	3(7.69)	2(5.56)	1(3.45)	0.984	0.986
II	8(20.51)	7(19.44)	5(17.24)		
III	23(58.97)	21(58.33)	19(65.52)		
IV	5(12.82)	6(16.67)	4(13.79)		
既往史					
血脂异常	4(10.26)	3(8.33)	2(6.90)	0.245	0.885
糖尿病	2(5.13)	5(13.89)	3(10.34)	1.678	0.432
心脏病	0(0)	2(5.56)	2(6.90)	2.574	0.276
高血压	3(7.69)	4(11.11)	1(3.45)	1.328	0.515
HR-HPV载量 ( $\times 10^4$ copies/mL)	3.64±1.05	5.89±2.36	15.66±6.40	94.808	<0.001

注:总胆固醇、三酰甘油、低密度脂蛋白、高密度脂蛋白有 $\geq 1$ 项异常即为血脂异常

胞、CD4<sup>+</sup>T细胞低于正常组, ( $P<0.05$ ), CD8<sup>+</sup>T细胞、Treg 高于正常组, 差异均有统计学意义 ( $P<0.05$ )。见表2。

表2 3组宫颈免疫状况比较 $(\bar{x}\pm s)$   
Table 2 Comparison of cervical immune status in 3 groups $(\bar{x}\pm s)$

组别	n	CD3 <sup>+</sup> T 细胞(%)	CD4 <sup>+</sup> T 细胞(%)	CD8 <sup>+</sup> T 细胞(%)	Treg(%)
正常组	39	43.58±7.06	34.14±6.33	25.17±3.04	5.02±1.36
HSIL组	36	37.19±5.27	28.68±5.79	27.88±2.97	7.29±1.07
宫颈癌组	29	30.91±6.28	22.01±4.15	30.37±3.64	10.04±2.59
F值		34.251	38.916	22.311	71.052
P值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

### 2.3 宫颈免疫指标与HR-HPV载量相关性

采用 Pearson 进行相关性分析, 结果显示, CD3<sup>+</sup>T细胞( $r=-0.560, P<0.001$ )、CD4<sup>+</sup>T细胞( $r=-0.529, P<0.001$ )与HR-HPV载量呈负相关, CD8<sup>+</sup>T细胞( $r=0.552, P<0.001$ )、Treg( $r=0.565, P<0.001$ )与HR-HPV载量呈正相关( $P<0.05$ )。

### 2.4 宫颈癌影响因素的 Logistic 回归方程分析

以宫颈癌发生与否为因变量, 无=0, 有=1, 纳入各宫颈免疫指标作为自变量, 以均值为分界, 将各宫颈免疫指标转化为二分类变量, 低于均值赋值为1, 高于均值赋值为2, 采用 Logistic 回归方程分析, 结果显示, CD3<sup>+</sup>T细胞、CD4<sup>+</sup>T细胞、CD8<sup>+</sup>T细胞、Treg 高于均值者发生宫颈癌的风险( $P<0.05$ )。见表3。

表3 宫颈癌影响因素分析  
Table 3 Analysis of factors affecting cervical cancer

影响因素	$\beta$ 值	SE值	Wald $\chi^2$	OR值	95%CI	P值
CD3 <sup>+</sup> T细胞	-0.420	0.114	13.598	0.657	0.516~0.836	<0.001
CD4 <sup>+</sup> T细胞	-0.711	0.205	12.020	0.491	0.318~0.759	<0.001
CD8 <sup>+</sup> T细胞	1.206	0.274	19.359	3.339	2.315~4.815	<0.001
Treg	1.400	0.336	17.354	4.054	2.984~5.508	<0.001

注: CD3<sup>+</sup>T细胞、CD4<sup>+</sup>T细胞、CD8<sup>+</sup>T细胞、Treg 均值依次为37.84%、28.87%、27.56%、7.21%。

### 2.5 宫颈免疫指标预测宫颈癌的 ROC

ROC 结果显示, CD3<sup>+</sup>T细胞、CD4<sup>+</sup>T细胞、CD8<sup>+</sup>T细胞、Treg 联合预测值均高于单一预测值。见表4、图1。

表4 ROC分析结果  
Table 4 ROC analysis results

指标	AUC	95%CI	cut-off值	敏感度 (%)	特异度 (%)	P值
CD3 <sup>+</sup> T细胞	0.850	0.766~0.912	$\leq 35.95\%$	79.31	77.33	<0.001
CD4 <sup>+</sup> T细胞	0.740	0.645~0.821	$\leq 27.52\%$	82.76	61.33	<0.001
CD8 <sup>+</sup> T细胞	0.825	0.738~0.892	$> 27.56\%$	86.21	69.33	<0.001
Treg	0.799	0.709~0.871	$> 7.26\%$	75.86	73.33	<0.001
联合	0.935	0.869~0.974		93.10	80.00	<0.001

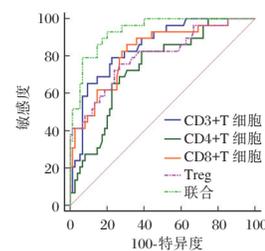


图1 宫颈免疫指标预测宫颈癌的 ROC

Figure 1 The ROC of cervical cancer predicted by cervical immune indexes

## 3 讨论

女性人群中, HPV感染普遍存在, 大多2年内可自行清除, 5%~10%进展为宫颈癌前病变或宫颈癌, 进展为宫颈癌患者中, 约70%患者伴有HR-HPV感染, 提示HR-HPV感染与宫颈癌发病有关<sup>[5]</sup>。

HR-HPV感染后, 可激活机体免疫功能。对宫

颈局部免疫微环境来讲,存在各种免疫细胞,其中T淋巴细胞对癌变细胞起到免疫监视和清除作用<sup>[6]</sup>。武丽蕊等<sup>[7]</sup>报道,宫颈癌患者CD4<sup>+</sup>T细胞低于HSIL组和宫颈癌筛查正常人群组患者,本研究观点与之相似。且本研究在此基础上还发现,宫颈癌患者宫颈局部CD3<sup>+</sup>T细胞降低,CD8<sup>+</sup>T细胞升高,伴有显著的免疫功能紊乱。CD3<sup>+</sup>T细胞存在于所有T淋巴细胞表面,可结合T细胞受体,向T淋巴细胞内传递抗原信号,并参与T细胞分化、杀伤T细胞活化和分化等,是重要的膜抗原<sup>[8]</sup>。CD4<sup>+</sup>T细胞协调B细胞分化产生抗体,CD8<sup>+</sup>T细胞则对抗体合成、分泌及T细胞增殖起抑制作用<sup>[9]</sup>。本实验结果提示HR-HPV载量越高,HR-HPV清除难度越大,倾向于HR-HPV持续感染状态,不断刺激宫颈局部组织,引起免疫-炎症刺激和组织增生,同时HR-HPV感染导致CD8<sup>+</sup>T细胞增加,使不断增殖的细胞逃逸正常的免疫监视,出现细胞周期失控,从而介导宫颈癌的发生<sup>[10-12]</sup>。Logistic回归方程及ROC分析结果可为临床防治宫颈癌的发生提供客观数据参考。另从以上结果和分析可知,靶向T淋巴细胞亚群,可能有助于抑制宫颈病变进展,从而为临床防治宫颈癌提供一个新思路。

Treg是抑制性T细胞的一种功能亚群,包括天然Treg和获得性Treg,主要来源于胸腺等,天然Treg通过细胞接触机制发挥抑制功能,获得性Treg是外周成熟T细胞在持续抗原刺激及转化生长因子-β、白介素-10等细胞因子诱导下产生,通过可溶性细胞因子发挥效应<sup>[13-14]</sup>。与低危HPV感染患者相比,HR-HPV感染者Treg显著升高,免疫抑制作用增强。本研究结果表明随着宫颈病变加重,Treg逐渐升高,参与宫颈病变的进展。Treg免疫抑制作用在HR-HPV感染中具有双向调节作用,一方面对HR-HPV诱导的持续炎性刺激形成保护性生理防御反应,减轻免疫清除病原体和过强免疫损伤失衡造成的组织损伤,另一方面增强对不断增生细胞的免疫逃逸作用,降低机体对不断增生细胞的免疫反应,因此Treg水平增高与宫颈癌发病风险增加有关<sup>[15]</sup>。从理论上讲,降低宫颈局部Treg水平,可减弱或避免Treg免疫抑制作用,增强对HR-HPV感染免疫清除效应,预防宫颈病变的进展,这为临床防治宫颈癌提供了一个新靶点,但临床实际是否能取得预期效果,仍有待后续研究的进一步验证。

综上,高危型HPV感染者宫颈局部CD3<sup>+</sup>T细胞、CD4<sup>+</sup>T细胞降低,CD8<sup>+</sup>T细胞、Treg升高,存在明显局部免疫功能异常,并与宫颈癌发生显著相关,有望成为预测宫颈癌发生的新型分子标志物。

## 参考文献

- [1] 孙涛,周建,袁亭亭. 随州市妇科门诊就诊者HPV感染及宫颈病变流行特征[J]. 华南预防医学, 2020, 46(1): 63-65.
- [2] 王芳,李卫民,刘艳丽,等. 高危型HPV亚型及病毒载量检测对宫颈癌筛查的价值探究[J]. 实用癌症杂志, 2020, 35(4): 647-650.
- [3] 叶建东,王科学,毛莉莉. HR-HPV感染患者阴道菌群检测及宫颈局部免疫状况分析[J]. 中国妇幼保健, 2020, 35(24): 4726-4729.
- [4] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 宫颈癌及癌前病变规范化诊疗指南(试行)[J]. 慢性病学杂志, 2013, 5(6): 37-46.
- [5] 胡国敏,冯丽君,王立锋. 高危型HPV感染与阴道微生态及宫颈局部细胞免疫相关性研究[J]. 陕西医学杂志, 2019, 48(11): 1447-1449+1528.
- [6] Mchome BL, Kjaer SK, Manongi R, et al. HPV types, cervical high-grade lesions and risk factors for oncogenic human papillomavirus infection among 3416 Tanzanian women [J]. Sex Transm Infect, 2021, 97(1): 56-62.
- [7] 武丽蕊,王兰朋,李红霞,等. 免疫细胞及肿瘤标志物与高危型HPV感染宫颈癌患者HPV水平的相关性及与预后的关系[J]. 癌症进展, 2019, 17(11): 1342-1346.
- [8] 余晓凤,陈玲玲,王晶华,等. 宫颈高危型HPV感染者外周血T、B淋巴细胞及NK细胞变化分析[J]. 中国实验诊断学, 2018, 22(3): 449-453.
- [9] 王永,刘大风,刘亚玲,等. 不同临床类型COVID-19患者淋巴细胞亚群的差异[J]. 热带医学杂志, 2020, 20(8): 1025-1028.
- [10] Reeves E, Wood O, Ottensmeier CH, et al. HPV Epitope Processing Differences Correlate with ERAP1 Allotype and Extent of CD8<sup>+</sup>T-cell Tumor Infiltration in OPSCC [J]. Cancer Immunol Res, 2019, 7(7): 1202-1213.
- [11] 李琦,陆相辉,赵薇. HPV不同级别宫颈病变妇女T淋巴细胞亚群的变化分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2019, 29(6): 921-924.
- [12] 余杨,付艳丽,邹晶晶,等. HR-HPV载量联合细胞免疫指标预测宫颈病变进程[J]. 中国热带医学, 2018, 18(3): 212-216.
- [13] Yang H, Ye S, Goswami S, et al. Highly immunosuppressive HLADRhi regulatory T cells are associated with unfavorable outcomes in cervical squamous cell carcinoma [J]. Int J Cancer, 2020, 146(7): 1993-2006.
- [14] Lin W, Zhang HL, Niu ZY, et al. The disease stage-associated imbalance of Th1/Th2 and Th17/Treg in uterine cervical cancer patients and their recovery with the reduction of tumor burden [J]. BMC Womens Health, 2020, 20(1): 126.
- [15] 梅琳琳,王雅莉,田晓娜,等. 宫颈病变与Treg转录因子表达及细胞因子水平的关系[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(11): 1484-1487+1492.

# 急性缺血性脑卒中患者血清 ApoE、IMA 及 Hcy 与脑侧支循环分级的相关性

邓伟胜\* 王弘 徐昆明

**[摘要]** **目的** 探究急性缺血性脑卒中(CIS)患者血清载脂蛋白E(ApoE)、缺血修饰蛋白(IMA)及同型半胱氨酸(Hcy)与脑侧支循环分级的相关性。**方法** 选取2015年1月至2020年5月本院收治的80例急性缺血性脑卒中患者,根据血流分级分为灌注良好组(3~4级,  $n=32$ )和灌注不良组(0~2级,  $n=48$ ),同期选择健康志愿者40例作为对照组,酶联免疫吸附试验(ELISA)检测受试者血清 ApoE、IMA 及 Hcy 水平;根据脑侧支循环建立情况分为三级(一级27例、二级39例、三级14例),对比不同分级血清 ApoE、IMA 及 Hcy 水平;采用多元 Logistic 回归模型分析血清 ApoE、IMA 及 Hcy 与脑侧支循环分级的相关性。**结果** 灌注良好组与灌注不良组空腹血糖、三酰甘油(TG)、总胆固醇(TC)、身体质量指数(BMI)比较差异无统计学意义( $P>0.05$ );灌注不良组的高血压病史、糖尿病史、吸烟史、高血脂病史、舒张压、收缩压、血清 ApoE、IMA、Hcy 水平、梗死体积及 NIHSS 评分均>灌注良好组>对照组,差异有统计学意义( $P<0.05$ );各组性别、年龄比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。不同脑侧支循环建立分级血清 ApoE、IMA 及 Hcy 水平比较差异有统计学意义( $P<0.05$ ),且分级越高,血清 ApoE、IMA 及 Hcy 水平也越高。CIS 患者血清 ApoE、IMA 及 Hcy 之间存在正相关性( $P<0.05$ ),并与梗死体积和 NIHSS 评分存在正相关性( $P<0.05$ )。以灌注良好组与灌注不良组之间的差异因素行多因素 Logistic 回归分析结果显示,血清 ApoE、IMA 及 Hcy 与灌注血流分级存在相关性( $P<0.05$ )。**结论** CIS 患者存在血清 ApoE、IMA 及 Hcy 高水平,并与脑侧支循环分级关系密切,即血清 ApoE、IMA 及 Hcy 水平越高,脑侧支循环分级也越高。

**[关键词]** 急性缺血性脑卒中;侧支循环;血清载脂蛋白E;缺血修饰蛋白;同型半胱氨酸

## Correlation Between Serum ApoE, IMA, Hcy and Cerebral Collateral Circulation Grading in Patients with Acute Ischemic Stroke

DENG Weisheng\*, WANG Hong, XU Kunming

(Department of Neurology, Meizhou People's Hospital, Meizhou, Guangdong, China, 514031)

**[ABSTRACT]** **Objective** To explore the correlation between serum apolipoprotein E (ApoE), ischemia modifying protein (IMA) and homocysteine (Hcy) in patients with acute ischemic stroke (CIS) and the grading of cerebral collateral circulation. **Methods** A total of 80 patients with acute ischemic stroke admitted to our hospital from January 2015 to May 2020 were selected and divided into a good perfusion group (grade 3~4,  $n=32$ ) and a poor perfusion group (0~2 Level,  $n=48$ ) according to the blood flow classification. At the same time, 40 healthy volunteers were selected as the control group. The serum ApoE, IMA and Hcy levels of the subjects were detected by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). they were divided into three levels according to the establishment of cerebral collateral circulation (The levels of serum ApoE, IMA and Hcy of different grades were compared with 27 cases of first grade, 39 cases of second grade, and 14 cases of third grade). The correlation between serum ApoE, IMA and Hcy and cerebral collateral circulation grades was analyzed by multivariate logistic regression model. **Results** There was no significant difference in fasting blood glucose, triacylglycerol (TG), total cholesterol (TC), body mass index (BMI) between the well perfusion

基金项目:梅州市医药卫生科研项目(2020-B-50)

作者单位:梅州市人民医院神经内科,广东,梅州 514031

\*通信作者:邓伟胜, E-mail:zhichenjing6@163.com

group and the poor perfusion group ( $P>0.05$ ). The history of hypertension, diabetes, smoking, history of hyperlipidemia, diastolic blood pressure, systolic blood pressure, serum ApoE, IMA, Hcy levels, infarct volume and NIHSS scores in the poorly perfused group  $>$  the well-perfused group  $>$  the control group, the difference is statistically significant ( $P<0.05$ ). There was no significant difference in gender and age among the groups ( $P>0.05$ ). The levels of serum ApoE, IMA and Hcy in different cerebral collateral circulation establishment grades were significantly different ( $P<0.05$ ), and the higher the grade, the higher the serum ApoE, IMA and Hcy levels. There was a positive correlation between serum ApoE, IMA and Hcy in patients with CIS, and a positive correlation with infarct volume and NIHSS score ( $P<0.05$ ). Multivariate logistic regression analysis of the different factors between the well-perfused group and the poorly perfused group showed that serum ApoE, IMA, and Hcy were correlated with the perfusion blood flow classification ( $P<0.05$ ). **Conclusion** CIS patients have high levels of serum ApoE, IMA, and Hcy, which are closely related to the grading of cerebral collateral circulation, that is, the higher the serum ApoE, IMA, and Hcy levels, the higher the grading of cerebral collateral circulation.

**[KEY WORDS]** Acute ischemic stroke; Collateral circulation; Serum apolipoprotein E; Ischemia modified protein; Homocysteine

急性缺血性脑卒中(cerebral ischemic stroke, CIS)是严重危害人民身体健康的疾病,在全球范围内具有较高的发病率、致死率和致残率,其主要为脑供血不足甚至中断所导致的脑组织软化坏死的急性疾病<sup>[1]</sup>。颅脑侧支循环为局部发生血管阻塞时,对侧血液通过 Willis 环、新肾毛细血管和小血管吻合支开放作为代偿,促进血液循环至阻塞部位以重建对缺血脑组织的血液供应,使得缺血组织得到不同程度的灌注代偿<sup>[2]</sup>。研究显示<sup>[3]</sup>,CIS 后缺血半暗带和梗死体积是影响脑侧支循环的重要因素。随着分子生物学相关技术的进步和研究深入,诸多标志物对于 CIS 的诊断价值逐渐受到关注。载脂蛋白 E (apolipoprotein E, ApoE)为脑组织及肝脏合成的多态性蛋白,其参与了脂蛋白的转化和代谢过程,研究显示 ApoE 与动脉粥样硬化关系密切,并在 CIS 的病理基础与进展中存在特殊变化<sup>[4]</sup>。缺铁修饰蛋白(Ischemia modifying protein, IMA)对于心脑血管事件具有显著特异性,其与缺血缺氧程度存在相关性<sup>[5]</sup>。同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)可刺激平滑肌细胞增生,造成血管内皮细胞损伤,促进动脉粥样硬化的形成和发展<sup>[6]</sup>。因此, ApoE、IMA 及 Hcy 对于 CIS 的诊断和病情评估存在显著价值,但对于三者与脑侧支循环分级的相关性尚未明确。本研究对 CIS 患者血清 ApoE、IMA 及 Hcy 与脑侧支循环分级的相关性进行了分析,以期对 CIS 的临床诊疗提供有效依据。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选取 2015 年 1 月至 2020 年 5 月本院收治的 80

例急性缺血性脑卒中患者,依照美国介入治疗神经放射学学会/介入放射学学会(American Society of Interventional Neuroradiology/Society of Interventional Radiology, ASITN/SIR)<sup>[7]</sup>评估系统将血流分级分为灌注良好组(3~4 级,  $n=32$ )和灌注不良组(0~2 级,  $n=48$ ),其中 0 级 8 例、1 级 13 例、2 级 27 例、3 级 21 例、4 级 11 例,同期选择健康志愿者 40 例作为对照组,根据脑侧支循环建立情况分为三级(一级 27 例、二级 39 例、三级 14 例)。各组在性别、年龄、BMI 比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。本研究获得医学伦理委员会批准。

纳入标准:①符合中华医学会神经病学分会制定的《中国急性缺血性脑卒中诊治指南 2014》<sup>[8]</sup>中 CIS 的诊断标准;②均经 CT 或 MRI 检查证实,病灶为前循环;③患者或家属对本研究知情并自愿签署知情同意书;④临床资料完整。排除标准:①合并颈动脉或病灶对侧大脑严重病变;②合并脑出血、颅内肿瘤或蛛网膜下隙出血者;③合并心、肺、肝等脏器功能障碍、严重感染、系统病变或恶性疾病者;④近期服用抗血小板药物、激素、他汀类调脂药物等治疗者。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 临床一般资料统计

统计所有受试者性别、年龄、身高、体重、舒张压、收缩压等资料,并收集 CIS 患者高血压病史、糖尿病史、吸烟史、高血脂病史等历史资料以及梗死体积和美国国立卫生研究院卒中量表(National Institute of Health Stroke Scale, NIHSS)神经功能缺损评分<sup>[7]</sup>, NIHSS 量表包括 11 项,15 个维度,总分 0~42 分,分数越高,症状越严重。

### 1.2.2 实验室指标检测

所有受试者均入院当日清晨抽取 5 mL 空腹静脉血, 3 000 r/min 离心 10 min, 收集血清。采用 7600 型生化分析仪(日本日立公司)检测空腹血糖、三酰甘油(triglyceride, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)水平。采用酶联免疫吸附试验(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测血清 ApoE、IMA 及 Hcy 水平, 试剂盒购自上海生工生物工程有限公司, 严格按照试剂盒说明书进行各项操作。

### 1.2.3 侧支循环分级评估<sup>[9]</sup>

均行计算机断层扫描血管造影(computed tomographic angiography, CTA)、磁共振血管成像(magnetic resonance angiography, MRA)检查, 结合数字减影血管造影(digital subtraction angiography, DSA)进行 ASITN/SIR 血流分级, 具体为: 0 级, 1 级, 2 级, 3 级, 4 级。

### 1.3 统计学分析

采用 SPSS 20.0 统计软件进行数据分析, 计数资料以  $n(\%)$  表示, 用  $\chi^2$  检验; 计量资料以  $(\bar{x} \pm s)$  表示, 两两比较采用  $t$  检验, 多组间比较采用单因素方差分析; Spearman 相关系数分析各指标相关性; 多元 Logistic 回归模型分析血清 ApoE、IMA 及 Hcy 与脑侧支循环分级的相关性。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组一般资料比较

灌注良好组与灌注不良组空腹血糖、TC、TG 比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 灌注不良组的高血压病史、糖尿病史、吸烟史、高血脂病史、舒张压、收缩压、血清 ApoE、IMA、Hcy 水平、梗死体积及 NIHSS 评分均  $>$  灌注良好组  $>$  对照组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 各组性别、年龄、BMI 比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见表 1。

### 2.2 不同脑侧支循环建立情况 CIS 患者血清 ApoE、IMA 及 Hcy 水平比较

不同脑侧支循环建立分级血清 ApoE、IMA 及 Hcy 水平比较结果: 三级  $>$  二级  $>$  一级, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 2。

### 2.3 CIS 患者血清 ApoE、IMA 及 Hcy 相关性分析

CIS 患者血清 ApoE、IMA 及 Hcy 之间存在正相关性, 与梗死体积和 NIHSS 评分存在正相关性 ( $P < 0.05$ )。见表 3。

表 1 所有受试者临床一般资料比较 [ $n(\%)$ , ( $\bar{x} \pm s$ )]

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

项目	对照组 ( $n=40$ )	灌注 良好组 ( $n=32$ )	灌注 不良组 ( $n=48$ )	$F/\chi^2$ 值	$P$ 值
性别(男/女)	24/16	19/13	28/20	0.026	0.987
年龄(岁)	58.5 $\pm$ 3.9	58.2 $\pm$ 3.4	58.9 $\pm$ 4.3	0.284	0.777
BMI(kg/m <sup>2</sup> )	24.4 $\pm$ 3.1	24.3 $\pm$ 3.0	24.7 $\pm$ 3.6	0.256	0.799
空腹血糖 (mmol/L)	4.9 $\pm$ 1.0	6.3 $\pm$ 1.1	6.5 $\pm$ 1.2	4.095	0.000
TC(mmol/L)	4.2 $\pm$ 0.7	5.4 $\pm$ 0.9	5.4 $\pm$ 0.7	6.363	0.000
TG(mmol/L)	1.2 $\pm$ 0.3	1.5 $\pm$ 0.4	1.5 $\pm$ 0.3	3.616	0.001
高血压病史		4(12.5)	16(33.3)	8.076	0.005
糖尿病史		2(6.25)	12(25.0)	4.675	0.031
吸烟史		2(6.25)	12(25.0)	4.675	0.031
高血脂病史		2(6.25)	14(29.2)	6.302	0.012
舒张压(mmHg)	77.6 $\pm$ 7.1	84.5 $\pm$ 8.6 <sup>a</sup>	88.4 $\pm$ 7.3	4.503	0.000
收缩压(mmHg)	118.2 $\pm$ 11.3	144.3 $\pm$ 12.8 <sup>a</sup>	153.1 $\pm$ 13.7	7.828	0.000
梗死体积(cm <sup>3</sup> )		6.4 $\pm$ 1.5	11.1 $\pm$ 1.9	11.755	0.000
NIHSS 评分(分)		11.2 $\pm$ 2.3	26.2 $\pm$ 3.4	23.537	0.000
ApoE(mg/L)	39.6 $\pm$ 4.7	60.7 $\pm$ 6.0 <sup>a</sup>	71.2 $\pm$ 6.9 <sup>ab</sup>	14.184	0.000
IMA(U/mL)	62.3 $\pm$ 4.1	77.5 $\pm$ 4.4 <sup>a</sup>	85.3 $\pm$ 5.4 <sup>ab</sup>	13.138	0.000
Hcy( $\mu$ mol/L)	8.6 $\pm$ 1.6	17.2 $\pm$ 2.1 <sup>a</sup>	21.6 $\pm$ 2.8 <sup>ab</sup>	14.452	0.000

注: 与对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与灌注良好组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ 。

表 2 不同脑侧支循环建立情况 CIS 患者血清 ApoE、IMA 及 Hcy 水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Comparison of serum ApoE, IMA and Hcy levels in CIS patients with different cerebral collateral circulation establishments ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	$n$	ApoE(mg/L)	IMA(U/mL)	Hcy( $\mu$ mol/L)
一级组	27	58.7 $\pm$ 6.2	72.7 $\pm$ 4.6	15.1 $\pm$ 2.2
二级组	39	63.5 $\pm$ 6.5 <sup>a</sup>	79.3 $\pm$ 5.0 <sup>a</sup>	18.8 $\pm$ 2.5 <sup>a</sup>
三级组	14	74.1 $\pm$ 6.6 <sup>ab</sup>	88.2 $\pm$ 6.1 <sup>ab</sup>	24.1 $\pm$ 2.7 <sup>ab</sup>
$F$ 值		10.472	12.232	15.691
$P$ 值		0.000	0.000	0.000

注: 与一级组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与二级组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ 。

表 3 CIS 患者血清 ApoE、IMA 及 Hcy 相关性分析

Table 3 Correlation analysis of serum ApoE, IMA and Hcy in patients with CIS

项目	ApoE		IMA		Hcy	
	$r$ 值	$P$ 值	$r$ 值	$P$ 值	$r$ 值	$P$ 值
ApoE			0.422	0.000	0.304	0.000
IMA	0.397	0.000			0.440	0.000
Hcy	0.315	0.000	0.433	0.000		
梗死体积	0.421	0.000	0.386	0.000	0.385	0.000
NIHSS	0.408	0.000	0.394	0.000	0.409	0.000

### 2.4 血清 ApoE、IMA 及 Hcy 与脑侧支循环血流分级的相关性

Logistic 回归分析结果显示, 血清 ApoE、IMA、Hcy 及梗死体积与灌注血流分级存在相关性 ( $P < 0.05$ )。见表 4。

表4 血清 ApoE、IMA 及 Hcy 与脑侧支循环血流分级的相关性分析

因素	B 值	SE 值	Wald	df	Exp(B)	P 值
ApoE	1.775	0.396	33.882	1	4.178	0.041
IMA	3.116	1.234	20.809	1	3.034	0.006
Hcy	2.963	0.698	21.912	1	4.615	0.017
梗死体积	2.352	0.537	15.437	1	5.421	0.002

### 3 讨论

脑侧支循环为脑部动脉供血不足时,通过侧支血管或新生血管吻合使得血流达到缺血部位,从而使得缺血部位获得代偿性灌注,研究显示通过建立良好的脑侧支循环可有效改善脑卒中患者病情<sup>[10]</sup>。而通过寻找有效的生物分子标志物评估脑侧支循环的代偿性灌注情况可为 CIS 的临床诊疗提供理论支持。ApoE 中含有极低密度脂蛋白、高密度脂蛋白、乳糜微粒,临床研究证实<sup>[11]</sup>,缺血性脑卒中的病理基础与动脉粥样硬化有密切关系。动脉粥样硬化的形成的重要条件之一为脂蛋白代谢异常,而 ApoE 在脂蛋白代谢过程中发挥重要作用。研究显示<sup>[12]</sup>,ApoE 基因与低密度脂蛋白胆固醇水平及冠状动脉粥样硬化性心脏病的发生存在正相关性。IMA 是急性缺血性事件诊断的具有显著价值的生物标志物,在机体缺血再灌注时,被降解修饰的人血清白蛋白氨基酸序列被自由基破坏,并与过渡金属结合导致 IMA 的产生。研究显示<sup>[13]</sup>,IMA 在进展性脑梗死患者中其水平逐渐升高,并与患者病情严重程度相关。若长时间脑灌注无法恢复,导致缺血半暗带持续低灌注,造成不可逆缺血性坏死,导致氧自由基和代谢产物不断增加,IMA 水平也随之增加,更不利于侧支循环的建立。Hcy 为甲硫氨酸的中间代谢产物,其水平受年龄、基因、营养物质、疾病等的影响。Hcy 可造成凝血纤溶系统失衡,引发血管内皮细胞功能障碍,从而导致血栓和动脉粥样硬化的发生<sup>[14]</sup>。本研究相关性分析结果提示血清 ApoE、IMA 及 Hcy 之间可能存在相互作用,并与 CIS 患者病情严重程度密切相关。

本研究结果提示,血清 ApoE、IMA 及 Hcy 对于脑侧支循环灌注不良评估具有明显价值。本研究中,不同脑侧支循环建立分级越高,血清 ApoE、IMA 及 Hcy 水平也越高。脑侧支循环代偿通过三级侧支循环途径建立,三级侧支循环属于

为新生血管,需要在缺血一段时间后才能形成。新生血管形成过程中,需要蛋白酶及粘附分子的参与,二者分别发挥细胞外基质降解和内皮细胞在原血管中的发芽作用和内皮细胞迁移和结构粘附作用。而高血清 ApoE、IMA 及 Hcy 水平不仅会损伤内皮细胞,加剧自由基反应和缺血损害,还可破坏粘附分子活性,从而降低侧支循环开放程度,不利于脑侧支循环代偿的建立<sup>[15-16]</sup>。本研究行多因素 Logistic 回归分析结果显示,血清 ApoE、IMA、Hcy 及梗死体积与灌注血流分级存在相关性。综上所述,CIS 患者存在血清 ApoE、IMA 及 Hcy 高水平,并与脑侧支循环分级关系密切,即血清 ApoE、IMA 及 Hcy 水平也越高,脑侧支循环分级也越高。

### 参考文献

- [1] 李瑶,安东侠,孙强,等.侧支循环:缺血性卒中的治疗靶点[J].国际脑血管病杂志,2019(11):853-859.
- [2] Stefania N, Carlo WC, Gaia S, et al. Collaterals are a major determinant of the core but not the penumbra volume in acute ischemic stroke[J]. Neuroradiology, 2019,61(9):971-978.
- [3] Dong X, Nao J. Fluid-attenuated inversion recovery vascular hyperintensities in anterior circulation acute ischemic stroke: associations with cortical brain infarct volume and 90-day prognosis[J]. Neurol Sci, 2019,40(8):1675-1682.
- [4] 杨春梅,刘圆圆.载脂蛋白 E 基因多态性与初发急性缺血性脑卒中的相关性及其对近期预后的影响[J].武警医学,2019,30(6):518-520.
- [5] 朱祖福.缺血性脑卒中急性期血清缺血修饰蛋白、脂肪酸结合蛋白水平的变化及与神经功能缺损程度的关系[J].中国老年学杂志,2016,36(14):3436-3438.
- [6] 韩玉华,周俐红,李艳丽. Lp-PLA2、Hcy 及 S100β 对缺血性脑卒中后 VD 的预测价值研究[J].分子诊断与治疗杂志,2020,12(7):940-943.
- [7] 蔡业峰,贾真,张新春,等.美国国立卫生院卒中量表(NIHSS)中文版多中心测评研究——附 537 例缺血性中风多中心多时点临床测评研究[J].北京中医药大学学报,2008,31(7):494-498.
- [8] 中华医学会神经病学分会.中国急性缺血性脑卒中诊治指南 2014[J].中华神经科杂志,2015,48(4):246-257.
- [9] Higashida RT, Furlan AJ, Roberts H, et al. Trial design and reporting standards for intra-arterial cerebral thrombolysis for acute ischemic stroke[J]. Stroke, 2003,34(8):109-137.
- [10] 胡杨真.影响急性缺血性脑卒中患者大脑侧支血管形成的相关因素分析[J].心脑血管病防治,2019,19(4):296-298.
- [11] Zhang Z, Chen XY, Baum L, et al. Association Between the Apolipoprotein E Gene Polymorphism and Atherosclerotic Middle Cerebral Artery Stenosis [J]. Neurologist, 2018, 23(2):47-50.

# 动态监测 LH、FSH、E<sub>2</sub>、子宫内膜厚度在排卵障碍性不孕治疗前后变化的临床意义

李宾玲\* 张丽 赵贝 严烱利

**[摘要]** 目的 动态监测黄体生成素(LH)、卵泡刺激素(FSH)、雌二醇(E<sub>2</sub>)、子宫内膜厚度在排卵障碍性不孕(ODI)治疗前后变化的临床意义。方法 选取本院2018年6月至2020年6月ODI患者72例作为研究对象,均采取来曲唑辅助排卵治疗3个疗程,治疗结束后随访3个月,根据治疗结局分为妊娠组(26例)与未妊娠组(46例)。动态监测并对比两组治疗期间LH、FSH、E<sub>2</sub>、子宫内膜厚度变化情况,分析LH、FSH、E<sub>2</sub>、子宫内膜厚度与治疗结局的关系及对治疗结局的预测价值。结果 妊娠组治疗1个疗程、2个疗程、3个疗程后LH、FSH低于未妊娠组,E<sub>2</sub>高于未妊娠组,子宫内膜厚度大于未妊娠组( $P<0.05$ );LH、FSH与治疗结局呈负相关( $P<0.05$ ),E<sub>2</sub>、子宫内膜厚度与治疗结局呈正相关( $P<0.05$ );治疗3个疗程后LH、FSH、E<sub>2</sub>、子宫内膜厚度联合预测ODI治疗结局的AUC值最大,敏感性、特异性分别为91.30%、84.62%。结论 ODI患者动态监测指标可为评估ODI患者治疗效果、预测治疗结局提供科学指导。

**[关键词]** 促黄体生成素; 卵泡刺激素; 雌二醇; 排卵障碍性不孕

## The clinical significance of dynamic monitoring of LH, FSH, E<sub>2</sub>, endometrial thickness before and after treatment of ovulatory disorder infertility

LI Binling\*, ZHANG Li, ZHAO Bei, YAN Huili

(Reproductive Technology Center, Henan Academy of Reproductive Health Science and Technology, Zhengzhou, Henan, China, 450003)

**[ABSTRACT]** **Objective** To investigate the clinical significance of dynamic monitoring of luteinizing hormone (LH), follicle stimulating hormone (FSH), estradiol (E<sub>2</sub>), and endometrial thickness before and after the treatment of ovulatory disorder infertility (ODI). **Methods** A total of 72 patients with ODI admitted to our hospital from June 2018 to June 2020 were selected as the research subjects, and all of them were treated with letrozole assisted ovulation therapy for 3 courses. They were followed up for 3 months after the treatment, and were divided into the pregnant group (26 cases) and the non-pregnant group (46 cases) according to the treatment outcome. The changes of LH, FSH, E<sub>2</sub>, and endometrial thickness during the treatment period of the two groups were dynamically monitored and compared. The relationship between LH, FSH, E<sub>2</sub>, endometrial thickness and treatment outcome and the predictive value of treatment outcome were analyzed. **Results** The LH and FSH of the pregnant group after 1 course, 2 courses and 3 courses of treatment were lower than those of the non-pregnant group, E<sub>2</sub> was higher than the non-pregnant group, and the endometrial thickness was greater than the non-pregnant group ( $P<0.05$ ). LH and FSH were negatively correlated with treatment outcome, E<sub>2</sub>, endometrial thickness were positively correlated with treatment outcome ( $P<0.05$ ). After 3 courses of treatment, the AUC value of LH, FSH, E<sub>2</sub> and endometrial thickness combined to predict the outcome of ODI treatment was the largest. The sensitivity and specificity were 91.30% and 84.62%, respectively. **Conclusion** ODI patients are Dynamic monitoring of the above indicators can provide scientific guidance for evaluating the treatment effect and predicting the treatment outcome of ODI patients.

**[KEY WORDS]** Luteinizing hormone; Follicle stimulating hormone; Estradiol; Ovulatory disorder infertility

基金项目:2020年河南省属科研院所基本科研项目(JBKY2020225)

作者单位:河南省生殖健康科学技术研究院生殖技术中心,河南,郑州450003

\*通信作者:李宾玲, E-mail:slbingling@163.com

排卵障碍是女性不孕的主要原因,发生率约为20%~40%,严重影响夫妻和谐与家庭稳定<sup>[1-2]</sup>。相关研究认为,不孕症发生与多种因素相关,其中内分泌紊乱是其发生最常见致病因素<sup>[3]</sup>,故检测性激素水平具有重要临床价值。另有学者指出,子宫内膜容受性也是女性不孕症发生的重要因素<sup>[4]</sup>,子宫内膜厚度是其重要部分。然而关于促黄体生成素(luteinizing hormone, LH)、卵泡刺激素(Follicle Stimulating Hormone, FSH)、雌二醇(Estradiol, E<sub>2</sub>)、子宫内膜厚度动态监测排卵障碍性不孕(Ovulatory disorder infertility, ODI)的应用价值及对患者治疗结局的预测效能临床仍处于摸索之中。基于此,本研究尝试分析动态监测LH、FSH、E<sub>2</sub>、子宫内膜厚度在ODI治疗前后变化的临床意义,旨在为临床实施个体化精准治疗提供有效依据。

## 1 资料和方法

### 1.1 一般资料

选取本院2018年6月至2020年6月ODI患者72例作为研究对象,平均年龄(30.85±2.04)岁;平均不孕时间(3.62±0.49)年;平均体质指数(24.18±0.72)kg/m<sup>2</sup>。本院伦理委员会经审核评议同意本研究,研究对象均知情同意。

纳入标准:①均符合《妇产科学》<sup>[5]</sup>中ODI诊断标准;②连续监测基础体温3个月均呈单相型;③B超连续监测>3个月无成熟卵泡(17~18 mm)或闭锁卵泡(<5 mm);④配偶生殖功能正常,不孕时间1~5年。排除标准:①合并子宫肌瘤、子宫内膜异位症等疾病者;②近4周内有关激素、免疫抑制剂等药物使用史者;③既往有来曲唑药物过敏史者;④精神行为异常者。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 治疗方法

所有患者均于月经来潮第5 d开始接受来曲唑(浙江海正药业股份有限公司,国药准字H20133109)辅助排卵治疗,5 mg/次,1次/d,1个月经周期为1个疗程,共治疗3个疗程。治疗结束后随访3个月,根据治疗结局将72例ODI患者分为妊娠组(26例)与未妊娠组(46例)。

#### 1.2.2 检测方法

所有患者均于治疗前、治疗1个疗程、2个疗程、3个疗程后月经周期第4~5 d进行以下指标检测:①空腹取5 mL静脉血,静置32 min后3 000

rpm离心12 min,取血清,-70℃低温保存。采用Autolumo 2000型全自动化学发光免疫分析仪以电化学发光法测定LH、FSH、E<sub>2</sub>水平,严格参照郑州安图生物工程股份有限公司提供仪器及配套试剂盒说明书操作。②采用日立阿洛卡F37型阴道超声诊断仪测量子宫内膜厚度,严格按照日立医疗(广州)有限公司提供仪器说明书操作。

### 1.3 统计学方法

采用统计学软件SPSS 22.0处理数据。计数资料用n(%)表示、 $\chi^2$ 检验;计量资料以( $\bar{x} \pm s$ )描述、*t*检验;采用Spearman相关系数法分析LH、FSH、E<sub>2</sub>、子宫内膜厚度与治疗结局的关系;采用受试者工作特征(Receiver operating characteristic curve, ROC)曲线分析LH、FSH、E<sub>2</sub>、子宫内膜厚度对ODI治疗结局的预测价值,联合预测实施Logistic二元回归拟合,返回预测概率logit(p),将其作为独立检验变量。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 两组治疗前后LH、FSH、E<sub>2</sub>子宫内膜变化情况

两组治疗前LH、FSH、E<sub>2</sub>、子宫内膜厚度变化比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ );两组治疗1、2、3个疗程后LH、FSH呈降低趋势,妊娠组降低幅度大于未妊娠组,E<sub>2</sub>呈升高趋势,妊娠组升高幅度大于未妊娠组( $P < 0.05$ );治疗1、2、3个疗程后LH、FSH低于未妊娠组,E<sub>2</sub>高于未妊娠组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表1。

### 2.2 LH、FSH、E<sub>2</sub>、子宫内膜厚度与治疗结局的关系

Spearman相关性分析,LH、FSH与治疗结局呈负相关,E<sub>2</sub>、子宫内膜厚度与治疗结局呈正相关( $P < 0.05$ )。见表3。

### 2.3 不同时间点LH、FSH、E<sub>2</sub>、子宫内膜厚度对治疗结局的预测价值

根据两组不同时间点LH、FSH、E<sub>2</sub>、子宫内膜厚度绘制ROC曲线,结果显示,随时间推移各指标预测AUC呈逐渐升高趋势。见表4、图1。

## 3 讨论

资料显示<sup>[6-7]</sup>,下丘脑-垂体-卵巢轴、神经中枢及其他内分泌腺相互调控是维持女性正常生理周期的重要环节,上述任何一个环节失衡都会导致生殖激素分泌异常,引起女性短暂性或永久性排

表1 两组治疗前后 LH、FSH、E<sub>2</sub>、子宫内膜厚度变化情况比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Comparison of changes of LH, FSH, E<sub>2</sub> and endometrial thickness changes between 2 groups before and after treatment ( $\bar{x} \pm s$ )

指标	组别	n	治疗前	治疗1个疗程后	治疗2个疗程后	治疗3个疗程后
LH(IU/L)	妊娠组	26	10.41±2.25	8.35±1.14 <sup>a</sup>	6.21±1.18 <sup>ab</sup>	4.76±1.02 <sup>abc</sup>
	未妊娠组	46	10.68±2.41	9.46±1.27 <sup>a</sup>	8.19±1.29 <sup>ab</sup>	7.12±1.13 <sup>abc</sup>
	t值		0.468	3.693	6.447	8.808
	P值		0.642	<0.001	<0.001	<0.001
FSH(IU/L)	妊娠组	26	15.18±2.14	12.61±1.71 <sup>a</sup>	10.03±1.62 <sup>ab</sup>	8.12±1.13 <sup>abc</sup>
	未妊娠组	46	15.47±2.05	13.87±1.59 <sup>a</sup>	12.38±1.84 <sup>ab</sup>	10.29±1.47 <sup>abc</sup>
	t值		0.568	3.143	5.428	6.511
	P值		0.572	0.003	<0.001	<0.001
E <sub>2</sub> (ng/L)	妊娠组	26	46.69±7.13	78.76±12.34 <sup>a</sup>	106.52±21.15 <sup>ab</sup>	162.48±42.25 <sup>abc</sup>
	未妊娠组	46	45.28±6.29	62.23±13.06 <sup>a</sup>	85.79±16.77 <sup>ab</sup>	102.21±38.04 <sup>abc</sup>
	t值		0.870	5.260	4.578	6.204
	P值		0.387	<0.001	<0.001	<0.001
子宫内膜厚度	妊娠组		6.22±0.47	7.29±0.56 <sup>a</sup>	8.40±0.65 <sup>ab</sup>	9.71±0.74 <sup>abc</sup>
	未妊娠组		6.20±0.50	6.78±0.52 <sup>a</sup>	7.31±0.57 <sup>ab</sup>	8.02±0.63 <sup>abc</sup>
	t值		0.167	3.888	7.407	10.260
	P值		0.868	<0.001	<0.001	<0.001

注:与同组治疗前比较,<sup>a</sup>P<0.05;与同组治疗1个疗程后比较,<sup>b</sup>P<0.05;与同组治疗2个疗程后比较,<sup>c</sup>P<0.05。

表2 LH、FSH、E<sub>2</sub>、子宫内膜厚度与治疗结局的关系

Table 2 Relationship between LH, FSH, E<sub>2</sub>, endometrial thickness and treatment outcome

项目	LH	FSH	E <sub>2</sub>	子宫内膜厚度
治疗结局 r值	-0.645	-0.660	0.738	0.714
P值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

卵障碍。LH、FSH均为性腺激素,由垂体前叶嗜碱性细胞分泌,其中LH可促使卵母细胞进一步成熟,进而发挥良好促排卵作用;FSH则是评估卵泡与卵巢发育成熟的有效指标<sup>[8-9]</sup>。E<sub>2</sub>属类固醇激素,其水平随卵泡生长呈上升趋势,可促使子宫内膜向增殖期转变,有效反映女性卵巢储备功能<sup>[10-11]</sup>。本研究结果显示,ODI妊娠患者治疗1个疗程、2个疗程、3个疗程后LH、FSH低于ODI未妊娠患者,E<sub>2</sub>高

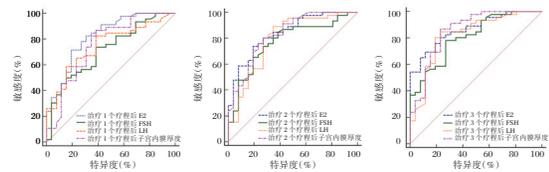


图1 不同时间点 LH、FSH、E<sub>2</sub>、子宫内膜厚度对治疗结局的预测价值

Figure 1 the predictive value of LH, FSH, E<sub>2</sub> and endometrial thickness at different time points for treatment outcome

于ODI未妊娠患者。结合周念等<sup>[12]</sup>研究考虑机制可能在于ODI患者下丘脑-垂体-卵巢轴功能紊乱,致使LH、FSH升高,E<sub>2</sub>下降,卵巢分泌功能不良,卵巢储备功能损伤,从而加重排卵障碍,影响治疗结局。进一步经Spearman相关性分析,LH、FSH与

表3 不同时间点 LH、FSH、E<sub>2</sub>、子宫内膜厚度对治疗结局的预测价值

Table 3 the predictive value of LH, FSH, E<sub>2</sub> and endometrial thickness at different time points on treatment outcome

指标	AUC	95%CI	Z值	P值	Cut-off值	敏感值(%)	特异性(%)
治疗1个疗程后							
LH	0.749	0.633-0.844	4.224	<0.001	>8.43 IU/L	82.61	61.54
FSH	0.714	0.595-0.814	3.386	0.001	>12.83 IU/L	73.91	61.54
E <sub>2</sub>	0.820	0.712-0.901	6.049	<0.001	≤70.09 ng/L	71.74	80.77
子宫内膜厚度	0.759	0.644-0.852	4.067	<0.001	≤7.23 mm	84.78	65.38
治疗2个疗程后							
LH	0.796	0.684-0.882	4.968	<0.001	>6.88 IU/L	89.13	65.38
FSH	0.774	0.660-0.864	4.724	<0.001	>11.16 IU/L	73.91	73.08
E <sub>2</sub>	0.842	0.737-0.917	7.267	<0.001	≤93.09 ng/L	73.91	80.77
子宫内膜厚度	0.832	0.725-0.910	6.565	<0.001	≤7.60 mm	80.43	73.08
治疗3个疗程后							
LH	0.823	0.715-0.903	5.936	<0.001	>5.26 IU/L	84.78	76.92
FSH	0.809	0.699-0.892	5.982	<0.001	>9.02 IU/L	78.26	73.08
E <sub>2</sub>	0.866	0.765-0.935	8.919	<0.001	≤117.96 ng/L	69.57	88.46
子宫内膜厚度	0.857	0.754-0.928	7.180	<0.001	≤8.93 mm	86.96	76.92

ODI患者治疗结局存在负相关关系, E<sub>2</sub>与ODI患者治疗结局存在正相关关系, 再次佐证了LH、FSH、E<sub>2</sub>对ODI患者治疗结局具有一定评估价值。

相关研究表明<sup>[13-14]</sup>, 胚胎着床的最佳子宫内膜厚度范围为9~11 mm, 随子宫内膜厚度降低, 女性临床妊娠率显著减少。另有学者指出<sup>[15]</sup>, 子宫内膜厚度7 mm是妊娠成功的必需条件。本研究结果表明, 随治疗周期推移, ODI未妊娠患者子宫内膜厚度不断增加, 但其增加幅度小于ODI妊娠患者, 与王丽等<sup>[16]</sup>观点相似, 这可能与子宫内膜厚度下降一定程度会抑制卵子排出, 改变宫腔内微环境, 进而影响子宫内膜容受性, 干扰胚胎植入, 从而降低妊娠成功率有关。推测动态监测ODI患者子宫内膜厚度, 可为临床判断治疗结局提供指导依据。然而受测量方法、时间不同、操作者个体误差等因素影响, 子宫内膜厚度单一预测ODI患者治疗结局存在一定局限性, 敏感性较低, 故本研究尝试联合预测模式, 结果显示, 治疗3个疗程后LH、FSH、E<sub>2</sub>、子宫内膜厚度联合预测治疗结局AUC值大于治疗1个疗程、2个疗程后, 敏感性达91.30%。提示联合检测LH、FSH、E<sub>2</sub>、子宫内膜厚度有望成为临床ODI患者来曲唑辅助治疗结局的预测手段, 有助于指导临床拟定针对性治疗方案。

综上所述, ODI患者LH、FSH、E<sub>2</sub>、子宫内膜厚度明显异常, 其变化情况与治疗结局存在显著相关性, 动态监测上述指标可为评估ODI患者治疗效果、预测治疗结局提供科学指导。然而, 本研究受时间限制, 选取样本量有限, 可能造成数据偏差, 今后需扩大样本量, 进一步做多中心研究。

## 参考文献

[1] Gao R, Guo B, Bai J, et al. Acupuncture and clomiphene citrate for anovulatory infertility: a systematic review and meta-analysis[J]. *Acupunct Med*, 2020, 38(1): 25-36.

[2] 谈勇, 黄紫微. 排卵障碍性不孕症的中西医结合诊治思考[J]. *中国中西医结合杂志*, 2019, 39(5): 521-524.

[3] 许茜亚, 全松. 排卵障碍性不孕症的诊疗策略[J]. *实用妇产科杂志*, 2020, 36(5): 328-332.

[4] 王秀娟, 周春红, 郝天羽, 等. 子宫内膜容受性与妊娠结局的相关性研究进展[J]. *实用医药杂志*, 2019, 36(5): 470-474.

[5] 谢幸, 苟文丽. 妇产科学[M]. 第8版. 北京: 人民卫生出版社, 2013: 369.

[6] 张亚芳. 人体成分与不孕女性患者生殖激素水平的相关性分析[J]. *中国妇幼保健*, 2019, 34(15): 3536-3538.

[7] 赵建藏, 赵印青, 张岭山, 等. 血清AMH水平联合FSH/LH预测PCOS不孕症促排卵效果和妊娠率的临床[J]. *中国优生与遗传杂志*, 2020, 28(5): 595-598, 643.

[8] 黄景春, 汪湾, 傅锦坚, 等. 多囊卵巢综合征不同亚组的代谢特征[J]. *热带医学杂志*, 2020, 20(8): 1044-1047.

[9] Le MT, Le VNS, Le DD, et al. Exploration of the role of anti-Mullerian hormone and LH/FSH ratio in diagnosis of polycystic ovary syndrome[J]. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2019, 90(4): 579-585.

[10] 芦爱华, 赵永新, 李洁, 等. SD/CRL比值联合血β-HCG、E<sub>2</sub>水平对IVF/ICSI-ET早期流产的预测价值[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2020, 12(10): 1371-1374, 1379.

[11] Florêncio RS, Meira MSB, Cunha MVD, et al. Plasmatic estradiol concentration in the mid-luteal phase is a good prognostic factor for clinical and ongoing pregnancies, during stimulated cycles of in vitro fertilization[J]. *JBRA Assist Rep*, 2018, 22(1): 8-14.

[12] 周念, 袁健生, 吴宝连, 等. AMH、E<sub>2</sub>、LH、FSH水平评估女性不孕症患者卵巢功能状态的价值分析[J]. *内科*, 2020, 15(1): 42-44.

[13] 王瑜, 张少静, 张少娣, 等. 宫内病变、年龄与不孕症患者妊娠结局的相关性分析[J]. *中国临床医生杂志*, 2019, 47(3): 351-353.

[14] 苟文婕, 高明霞, 张学红. 子宫内膜区动脉血流信号检测的临床价值[J]. *第三军医大学学报*, 2019, 41(15): 1501-1505.

[15] 张少娣, 赵志明, 李秋圆, 等. 激素替代冻融囊胚移植周期中经阴道超声测量子宫内膜厚度阈值和最佳厚度区间的分析[J]. *中华超声影像学杂志*, 2020, 29(3): 260-265.

[16] 王丽, 吕淑兰, 毛文军, 等. 多囊卵巢综合征患者子宫内膜容受性和妊娠率分析[J]. *山西医科大学学报*, 2020, 51(6): 577-581.

(上接第773页)

[12] 陆小林, 林志伟, 陈丽芳, 等. ApoE基因多态性与动脉粥样硬化性脑梗死的相关性研究[J]. *中国实用神经疾病杂志*, 2018, 21(22): 2463-2469.

[13] 王华梅, 王杰, 李健. 血清SAA、IMA及NSE联合检测对急性缺血性脑卒中的诊断价值[J]. *中华保健医学杂志*, 2020, 22(4): 432-435.

[14] 张曼莉, 夏磊, 薛刘军. 同型半胱氨酸、叶酸和维生素B12对缺血性脑卒中患者认知功能障碍的临床价值[J]. *中南医学科学杂志*, 2019, 47(5): 520-523.

[15] Sun Y, Guan J, Hou Y, et al. Silencing of junctional adhesion molecule-like protein attenuates atherogenesis and enhances plaque stability in ApoE<sup>0/0</sup> mice[J]. *Clin Sci*, 2019, 133(11): 1215-1228.

[16] Masoud H, Someyeh B, Masoud MD, et al. Correlation of Homocysteine with Cerebral Hemodynamic Abnormality, Endothelial Dysfunction Markers, and Cognition Impairment in Patients with Traumatic Brain Injury[J]. *World Neurosurg*, 2017, 97(1): 70-79.

# MIF、S100 $\beta$ 蛋白及 SF 检测在急性脑出血中的表达及预后

王益 刘万平 何兴林 官念 杨小芳 袁偲旖 彭川 陈倩\*

**[摘要]** **目的** 分析巨噬细胞移动抑制因子(MIF)、S100 $\beta$  蛋白(S100 $\beta$ )及血清铁蛋白(SF)检测在急性脑出血中的表达及与病情、预后的相关性。**方法** 选取2016年8月至2018年8月于本院就诊的72例急性脑出血患者作为研究组,根据患者出院时预后情况分为生存组( $n=46$ )及死亡组( $n=26$ ),同时选取同期61例本院进行健康体检的正常人群作为对照组。收集所有研究对象临床资料,比较MIF、S100 $\beta$  蛋白及SF在各组间的表达情况,采用多元Logistic 回归分析急性脑出血患者预后死亡的危险因素,采用ROC 曲线分析MIF、S100 $\beta$  蛋白及SF对急性脑出血患者预后死亡的预测价值。**结果** 研究组患者MIF、S100 $\beta$  蛋白及SF水平均明显高于对照组患者,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。死亡组患者MIF、S100 $\beta$  蛋白及SF水平均明显高于生存组患者,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。MIF、S100 $\beta$  蛋白及SF异常升高与急性脑出血患者预后死亡呈正相关( $P<0.05$ )。MIF、S100 $\beta$  蛋白及SF及三者联合曲线下面积分别为0.702、0.810、0.646、0.915,各指标曲线下面积以联合检测最大。**结论** MIF、S100 $\beta$  蛋白及SF在急性脑出血患者中呈高表达状态,可作为预测急性脑出血患者诊疗及预后的分子标志物。

**[关键词]** MIF; S100 $\beta$  蛋白; SF; 急性脑出血

## Study on the expression and prognosis of MIF, S100 $\beta$ protein and SF in acute cerebral hemorrhage

WANG Yi, LIU Wanping, HE Xinglin, GUAN Nian, YANG Xiaofang, YUAN Siyi, PENG Chuan, CHEN Qian\*

(Department of Neurology, Guang'an people's Hospital, Guang'an, Sichuan, China, 638000)

**[ABSTRACT]** **Objective** To analyze the expressions of MIF, S100 $\beta$  protein and SF detection in patients with acute cerebral hemorrhage and their correlation with disease severity and prognosis. **Method** 72 patients with acute cerebral hemorrhage treated in this hospital from August 2016 to August 2018 were selected as the study group. According to the prognosis of the patients acute cerebral hemorrhage at the time of discharge, they were divided into the survival group ( $n=46$ ) and the death group ( $n=26$ ). At the same time, 61 normal people who underwent physical examination in this hospital were selected as the control group. The clinical data of all research objects were collected to compare the expressions of MIF, S100 $\beta$  protein and SF in the groups. Multivariate logistic regression analysis was used to analyze the risk factors of prognostic death of patients with acute cerebral hemorrhage, and the ROC curve was used to analyze the predictive value of MIF, S100 $\beta$  protein and SF for the prognostic death of patients with acute cerebral hemorrhage. **Result** The MIF, S100 $\beta$  protein and SF levels in the study group were significantly higher than those in the control group, and the differences were statistically significant ( $P<0.05$ ). MIF, S100 $\beta$  protein and SF levels in the death group were significantly higher than those in the survival group, and the differences were statistically significant ( $P<0.05$ ). The abnormal increase of MIF, S100 $\beta$  protein and SF is positively correlated with the prognostic death

基金项目:2017年四川省卫生和计划生育委员会科研课题(17PJ090)

作者单位:广安市人民医院神经内科,四川,广安 638000

\*通信作者:陈倩, E-mail:605868406@qq.com

of patients with acute cerebral hemorrhage ( $P<0.05$ ). The areas under the curve of MIF, S100 $\beta$  protein, SF and the three combined curve were 0.702, 0.810, 0.646, 0.915, respectively. The area under the combined curve was the largest. **Conclusion** MIF, S100 $\beta$  protein and SF levels are highly expressed in patients with acute cerebral hemorrhage, and can be used as molecular markers to predict the diagnosis, treatment and prognosis of patients with acute cerebral hemorrhage.

[KEY WORDS] MIF; S100 $\beta$  protein; SF; Acute cerebral hemorrhage

近年来,脑血管疾病已成为严重危害人类生命健康的重大疾病之一<sup>[1]</sup>。急性脑出血作为脑血管疾病中最常见的类型,占急性脑血管疾病的40%以上,具有极高的死亡率及致残率,严重威胁患者生命安全<sup>[2]</sup>。随着神经生化标志物的研究开展,急性脑出血进展及预后与生化标志物引起广泛关注。S100 $\beta$ 蛋白(S100 $\beta$ protein, S100 $\beta$ )是钙结合蛋白家族之一,在各种原因所致的脑组织损伤中呈高表达状态,与脑组织损伤情况、脑梗死面积及预后关系密切<sup>[3]</sup>。巨噬细胞移动抑制因子(macrophage migration inhibition factor, MIF)作为神经损伤重要标志,与炎症反应及免疫应答有关,可激活细胞因子引起泡沫细胞聚集,加速巨噬细胞迁移,刺激血管硬化及斑块形成<sup>[4]</sup>。而Wang等<sup>[5]</sup>发现,血清铁蛋白(serum ferritin, SF)介导的细胞凋亡及氧化损伤在脑部损伤机制中起到十分重要的作用,是加重急性脑出血关键因素之一。本研究就急性脑出血患者MIF、S100 $\beta$ 蛋白及SF的表达情况及病情、预后的相关性进行分析,现报道如下。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选取2016年8月至2018年8月于本院就诊的72例急性脑出血患者的临床资料作为研究组,纳入标准:①所有患者临床表现及影像学检查确诊,符合中国脑出血诊治指南(2014)诊断标准<sup>[6]</sup>;②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存在其他原发性恶性肿瘤者。其中男37例,女35例,平均年龄(67.71 $\pm$ 4.82)岁。根据患者预后情况分为生存组( $n=46$ )及死亡组( $n=26$ )。

选取同期61例本院进行健康体检者作为对照组,其中男32例,女29例,平均年龄(67.75 $\pm$ 4.79)岁。两组性别、年龄等一般资料比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。所有研究对象均签署知情同意书,本研究已获得院伦理委员会批准。

### 1.2 方法

①收集所有患者临床资料,比较研究组及对照组MIF、S100 $\beta$ 蛋白及SF的表达情况;记录所有患者在出院时预后(存活及死亡)情况。

②对照组于体检当日、研究组于入院24 h内采用强生Vitros350全自动干式化学分析仪检测,以酶联免疫吸附法测定S-100 $\beta$ 蛋白及SF,试剂盒由上海江莱生物科技有限公司提供。采用免疫放射分析法测量MIF,试剂盒由美国BioSource公司提供。检测过程严格按照说明书操作流程进行。

### 1.3 诊断标准

由本科室两名副主任级别以上医师进行GCS评分<sup>[7]</sup>:根据患者睁眼、语言、肢体运动等方面进行评分,总分15分,当患者 $<9$ 分时为高,其余均为低。

MIF参考范围:34~48 ng/L,当MIF $>48.89$  ng/L提示异常升高;S100 $\beta$ 参考范围:0.18~0.22  $\mu$ g/L, S100 $\beta$ 蛋白水平 $>0.22$   $\mu$ g/L提示异常升高;SF参考范围:138~149 ng/mL, SF $>149.08$  ng/mL提示异常升高<sup>[7]</sup>。

### 1.4 统计学方法

采用SPSS 22.0软件进行统计分析,计数资料以 $n(\%)$ 表示,采用 $\chi^2$ 检验,计量资料采用 $(\bar{x}\pm s)$ 表示,行 $t$ 检验。采用多元Logistic回归分析影响急性脑出血患者预后死亡的危险因素,采用ROC曲线分析研究MIF、S100 $\beta$ 蛋白及SF对患者预后死亡的影响。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 研究组及对照组MIF、S100 $\beta$ 蛋白及SF的表达水平比较

研究组患者MIF、S100 $\beta$ 蛋白及SF水平均明显高于对照组患者,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。见表1。

### 2.2 生存组及死亡组MIF、S100 $\beta$ 蛋白及SF的表达水平比较

死亡组患者MIF、S100 $\beta$ 蛋白及SF水平高于生存组患者,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。见表2。

表1 研究组及对照组MIF、S100β蛋白及SF的表达水平比较( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Compare the expression of MIF, S100 β protein and SF in the study group and the control group ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	MIF(ng/L)	S-100β蛋白(μg/L)	SF(ng/mL)
研究组	72 58.42±8.76	0.98±0.28	182.34±12.76
对照组	61 41.55±7.34	0.20±0.02	143.23±5.84
t值	11.909	21.697	22.046
P值	<0.001	<0.001	<0.001

表2 生存组及死亡组MIF、S100β蛋白的表达水平比较( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Compare the expression of MIF, S100 β protein and SF in survival group and death group ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	MIF(ng/L)	S-100β蛋白(μg/L)	SF(ng/mL)
生存组	46	41.72±7.94	0.51±0.19	154.33±15.25
死亡组	26	61.77±5.41	1.05±0.21	189.67±5.43
t值		11.444	11.150	11.385
P值		<0.001	<0.001	<0.001

### 2.3 急性脑出血患者预后死亡的单因素和多因素分析

MIF、S100β蛋白及SF异常升高与急性脑出血患者预后死亡相关( $P < 0.05$ )。见表3。

### 2.4 MIF、S100β蛋白及SF对急性脑出血患者预后死亡的预测价值

采用ROC曲线分析MIF、S100β蛋白及SF及三者联合对急性脑出血患者预后死亡的预测价值,各指标曲线下面积以联合检测最大0.95,故联合检测的预测价值最佳。见表4、图1。

## 3 讨论

目前临床上对于急性脑出血的发病机制尚不明确,相关研究显示,急性脑出血与凝血酶、血红蛋白、炎症因子等血清生化标志物密切相关<sup>[8]</sup>。

MIF是临床上第一个发现具有炎症介质的细

表4 MIF、S100β蛋白及SF对急性脑出血患者预后死亡的预测价值

Table 4 the prognostic value of MIF, S100 β protein and SF in patients with acute cerebral hemorrhage

预测指标	最佳临界值	敏感度 (%)	特异性 (%)	AUC	95%CI
MIF	26.13	0.621	0.624	0.702	0.510~0.894
S100β蛋白	25.34	0.713	0.721	0.810	0.632~0.988
SF	26.48	0.746	0.752	0.646	0.430~0.862
MIF、S100β蛋白及SF联合检测	27.62	0.894	0.898	0.915	0.809~1.000

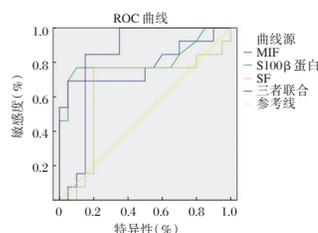


图1 MIF、S100β蛋白及SF对急性脑出血患者预后死亡的预测价值

Figure 1 The predictive value of MIF, S100 β protein and SF in the prognosis of patients with acute cerebral hemorrhage

胞因子,一方面能抑制巨噬细胞从T细胞激活区向外移动,并激活附近的巨噬细胞增强吞噬作用;另一方面,可抑制炎症细胞活性剂反向调节糖皮质激素达到促炎的目的<sup>[9]</sup>。研究发现,MIF与动脉粥样硬化、肾小球肾炎、溃疡性结肠炎、系统性红斑狼疮及肿瘤等疾病密切相关<sup>[10]</sup>。Dzmitry等<sup>[11]</sup>对败血症患者研究显示,在败血症休克时炎症细胞胞浆内MIF合成加强、聚集增加,与炎症部位炎症细胞的聚集呈现平行相关关系。相关学者<sup>[12]</sup>对急性呼吸窘迫综合征患者研究发现,MIF可能通过中性细胞趋化性巨噬细胞炎症因子2的上调而发挥作用。同时,研究发现,脑出血后,血肿周围脑组织受压、缺血缺氧、受到损伤,大量炎症细胞释放,加上

表3 影响急性脑出血患者预后死亡的单因素和多因素分析

Table 3 univariate and multivariate analysis of prognosis and survival in patients with acute cerebral hemorrhage

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岁 vs ≥60岁)	1.162	0.603~2.242	0.673			
合并糖尿病(是 vs 否)	2.330	1.679~3.232	0.006	1.849	0.893~3.827	0.418
GCS评分(高 vs 低)	2.325	1.816~2.977	0.004	1.658	0.892~3.081	0.423
合并高血压(是 vs 否)	2.653	1.950~3.610	0.005	1.181	0.617~2.260	0.591
上消化道出血(有 vs 无)	2.408	1.956~2.964	0.009	1.658	0.892~3.081	0.371
合并感染(是 vs 否)	2.643	2.105~3.137	0.007	1.162	0.603~2.242	0.573
MIF(正常 vs 异常升高)	2.537	2.029~3.172	0.002	2.565	1.859~3.537	<0.001
S100β蛋白(异常升高 vs 正常)	2.330	1.867~2.90	0.003	2.491	1.631~3.805	<0.001
SF(异常升高 vs 正常)	2.372	1.702~3.272	0.003	2.496	1.670~3.731	<0.001

急性脑出血后,患者机体处于应激反应,导致MIF在循环中水平显著上升<sup>[13]</sup>。本研究结果说明MIF水平与急性脑出血患者预后关系密切。

既往文献发现,S100 $\beta$ 蛋白与中枢神经系统肿瘤或脑血管病密切相关,其峰值浓度与急性脑缺血后的梗死体积呈正相关状态<sup>[14]</sup>。同时,近年来相关研究表示,S100 $\beta$ 蛋白浓度的变化可作为反映中枢神经系统损害程度及判断预后脑损伤的特异性标志<sup>[15]</sup>。本文发现,研究组S100 $\beta$ 蛋白明显较正常人群高,且S100 $\beta$ 蛋白异常升高为影响急性脑出血患者预后生存的危险因素。分析其原因与急性脑出血患者出血量大,压迫脑组织,致使血肿周围水肿体积增大,脑组织缺血缺氧加重,大量星形胶质细胞坏死,细胞膜完整性被破坏,S100 $\beta$ 蛋白溢出多,致使血清S100 $\beta$ 蛋白浓度增高有关<sup>[15]</sup>。

研究指出,铁离子是加重急性脑出血形成的关键因素<sup>[16]</sup>。SF是体内铁的主要贮存形式,急性脑损伤时,会产生大量自由基,SF易受氧攻击从而进入铁蛋白内,将铁蛋白中三价铁还原成二价铁使储存铁释放;还可催化Haber-weiss反应产生羟自由基及催化脂质过氧化反应,生成丙二醛,破坏血脑屏障,造成脑水肿加重神经损伤<sup>[16]</sup>。Sorour等<sup>[17]</sup>发现,SF参与脑梗死后的脑组织病理损伤过程,SF浓度越高,脑梗死体积越大,神经功能缺损评分越高。本研究结果显示,SF与急性脑出血患者预后关系密切,考虑与急性脑出血患者脑组织细胞受损,使SF水平浓度升高,影响体内代谢能力,导致自我调节能力降低,使铁离子水平异常升高,破坏神经及血管内皮细胞受体,使钙离子三磷酸腺苷酶失活,破坏细胞内稳态,对患者预后造成影响有关。另本研究通过ROC曲线分析显示,MIF、S100 $\beta$ 蛋白及SF对急性脑出血患者预后死亡的预测价值最佳,进一步提示联合检测三指标可作为预测患者预后死亡的有效手段。

综上所述,MIF、S100 $\beta$ 蛋白及SF在急性脑出血患者中呈高表达状态,可作为预测急性脑出血患者诊疗及预后的分子标志物。

## 参考文献

[1] Wang B, Zhao KL, Hu WJ, et al. Macrophage Migration Inhibitor Promoted the Intrahepatic Bile Duct Injury in Rats with Severe Acute Pancreatitis[J]. Digest Dis Sci, 2018, 64(3):275-278.

[2] 张维,李少泉,彭文龙,等.血清IL-6, TNF- $\alpha$ , MMP-9, CRP水平与高血压脑出血患者预后的相关性分析[J].解

放军医药杂志, 2020, 32(3):105-108.

- [3] 韩玉华,周俐红,李艳丽. Lp-PLA2、Hcy及S100 $\beta$ 对缺血性脑卒中后VD的预测价值研究[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(7):940-943.
- [4] Li JH, Tang Y, Lv J, et al. Macrophage migration inhibitory factor promotes renal injury induced by ischemic reperfusion[J]. J Cell Mol Med, 2019, 18(6):381-383.
- [5] Wang QJ, Han W, Niu JM, et al. Prognostic value of serum macrophage migration inhibitory factor levels in pulmonary tuberculosis[J]. Resp Res, 2019, 27(12):372-378.
- [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(2014)[J]. 中华神经科杂志, 2015, 48(6):217-219.
- [7] Rakovich T, Cunningham C, Ansboro S, et al. P169 Effect of macrophage migration inhibitory factor on human macrophages from arthritis patients[J]. Ann Rheum Dis, 2019, 21(11):531-535.
- [8] 高阳阳,李骥腾. 血清TSP-1, PDGF预测脑出血短期预后的临床价值[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(4):502-506.
- [9] Nakahara K, Fujikawa K, Hiraoka H, et al. Attenuation of Macrophage Migration Inhibitory Factor-Stimulated Signaling via S-Nitrosylation[J]. Biol Pharm Bull, 2019, 42(6):1044-1047.
- [10] Elbaradie SMY, Bakry MS, Bosilah AH. Serum macrophage migration inhibition factor for diagnosing endometriosis and its severity: case-control study[J]. BMC Womens Health, 2020, 20(1):189.
- [11] Dzmityr S, Christos K, Christine K, et al. Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF)-Based Therapeutic Concepts in Atherosclerosis and Inflammation[J]. Thromb Haemost, 2019, 13(8):338-341.
- [12] Ortiz-García YM, García-Iglesias T, Morales-Velazquez G, et al. Macrophage Migration Inhibitory Factor Levels in Gingival Crevicular Fluid, Saliva, and Serum of Chronic Periodontitis Patients[J]. Biomed Res Int, 2019, 2019:7850392.
- [13] 赵艳艳. 早期康复护理治疗脑出血偏瘫患者的效果[J]. 保健医学研究与实践, 2017, 14(1):91-93.
- [14] Ma F, Meyer-Siegler KL, Leng L, et al. Spinal macrophage migration inhibitory factor and high mobility group box 1 mediate persistent bladder pain[J]. Neurosci Lett, 2019, 699:54-58.
- [15] 白毅婕,王强,周嘉鑫,等. 青藤碱对缺氧诱导的脑神经元损伤和内质网应激性自噬的作用[J]. 医学分子生物学杂志, 2018, 14(5):302-308.
- [16] Eugenio C, Emanuela M, Santa M, et al. Overexpression of Macrophage Migration Inhibitory Factor and Its Homologue D-Dopachrome Tautomerase as Negative Prognostic Factor in Neuroblastoma[J]. Brain Sci, 2019, 9(10):284-286.
- [17] Sorour O, Nassar E, Ahmed SE, et al. Serum levels of macrophage migration inhibitory factor and interleukin 17 in patients with nonsegmental vitiligo[J]. J Egypt Womens Dermatol Soc, 2020, 17(1):13.

# TNF- $\alpha$ 、CA724 及 CEA 联合肠镜检查在结直肠癌诊断中的价值

袁焕君<sup>1\*</sup> 姚兰杰<sup>2</sup> 陈攀丽<sup>3</sup>

**[摘要]** 目的 分析肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、糖链抗原 242(CA724)及癌胚抗原(CEA)联合肠镜检查在结直肠癌诊断中的价值。方法 收集2017年6月至2020年6月在驻马店市中心医院进行手术治疗的110例结直肠癌患者作为结直肠癌组,另选取结直肠良性疾病患者90例作为对照组。对比不同人群患者 TNF- $\alpha$ 、CA724 及 CEA 水平及肠镜检查结果差异,以病理组织检查为金标准,分析 TNF- $\alpha$ 、CA724 及 CEA 和肠镜检查单一或联合的准确度,绘制 ROC 曲线分析 TNF- $\alpha$ 、CA724 及 CEA 联合肠镜检查在结直肠癌诊断中的预测价值。结果 ①结直肠癌组血清 TNF- $\alpha$ 、CA724 及 CEA 水平高于对照组,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。②TNF- $\alpha$ +CA724+CEA+肠镜检查准确度高于单一肿瘤标志物检测和单一肠镜检查,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。③TNF- $\alpha$ +CA724+CEA 的 ROC 曲线下面积为 0.529,单一肠镜检查的 ROC 曲线下面积为 0.507,各指标联合的 ROC 曲线下面积为 0.532,各指标曲线下面积以联合检测最大( $P < 0.05$ )。结论 TNF- $\alpha$ 、CA724 及 CEA 水平在结直肠癌患者中显著升高,三者联合肠镜检查可提高诊断结肠癌的敏感度、准确性,值得推广。

**[关键词]** TNF- $\alpha$ ; CA724; CEA; 肠镜检查; 结直肠癌

## Value of TNF- $\alpha$ , CA724 and CEA combined with colonoscopy in the diagnosis of colorectal cancer

YUAN Huanjun<sup>1\*</sup>, YAO Lanjie<sup>2</sup>, CHEN Panli<sup>3</sup>

(1. Department of Follow-up Office, Zhumadian Central Hospital, Zhumadian, Henan, China, 463000;

2. Department of Gastroenterology, Zhumadian Central Hospital, Zhumadian, Henan, China, 463000;

3. Department of Endoscopy, Zhumadian Central Hospital, Zhumadian, Henan, China, 463000)

**[ABSTRACT]** **Objective** To analyze the value of the levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), carbohydrate antigen (CA724) and carcinoembryonic antigen (CEA) combined with colonoscopy in the diagnosis of colorectal cancer. **Method** The clinical data of 110 patients with colorectal cancer who underwent surgical treatment in Zhumadian Central Hospital from June 2017 to June 2020 were collected as the colorectal cancer group. In addition, 90 patients with benign colorectal diseases were selected as the control group. The differences in the levels of TNF- $\alpha$ , CA724 and CEA and colonoscopy results of different patients were compared. The result of pathological examination was used as the gold standard, and the accuracies of TNF- $\alpha$ , CA724, CEA and colonoscopy alone and the accuracy of their combined examination were analyzed. The ROC curve was drawn to analyze the predictive value of TNF- $\alpha$ , CA724 and CEA combined with colonoscopy in the diagnosis of colorectal cancer. **Result** ① The levels of TNF- $\alpha$ , CA724 and CEA in serum of patients in the colorectal cancer group were higher than those in the control group, and the difference was statistically

基金项目:河南省医学科技攻关计划项目(201702136)

作者单位:1.驻马店市中心医院随访办,河南,驻马店 463000

2.驻马店市中心医院消化内科,河南,驻马店 463000

3.驻马店市中心医院内镜诊疗部,河南,驻马店 463000

\*通信作者:袁焕君, E-mail: feng530866yu2275@163.com

significant ( $P < 0.05$ ). ② The accuracy of TNF- $\alpha$  + CA724 + CEA + colonoscopy was higher than that of single tumor marker detection and single colonoscopy, and the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). ③ The area under the ROC curve of TNF- $\alpha$  + CA724 + CEA is 0.529, the area under the ROC curve of a single colonoscopy is 0.507, the area under the ROC curve of the combined the two is 0.532, and the area under the curve of combined detection is the largest ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The levels of TNF- $\alpha$ , CA724 and CEA significantly increased in patients with colorectal cancer. The three indicators combined with colonoscopy can improve the sensitivity and accuracy in the diagnosis of colon cancer, and it is worthy of promotion.

**[KEY WORDS]** TNF- $\alpha$ ; CA724; CEA; Colonoscopy; Colorectal cancer

结直肠癌发生于结、直肠和肛管黏膜上皮,是一种多步骤、多阶段、多基因参与形成的常见恶性肿瘤<sup>[1]</sup>。由于患者早期症状隐匿,大多数于中晚期确诊,肿瘤在治疗后易发生复发或转移,导致预后差,5年生存率低<sup>[2]</sup>。因此,临床早诊断、早治疗对提高患者生存质量和生存率有重要意义。

肠镜检查是经肛门将肠镜循腔插入至回盲部,从黏膜侧观察结肠病变的检查方法,是目前诊断大肠黏膜病变的最佳选择<sup>[3]</sup>。而近年来肿瘤标志物在癌症诊疗中亦发挥了重要作用,目前常用于结直肠癌辅助诊断的肿瘤标志物有癌胚抗原(Carcinoembryonic Antigen, CEA)、糖链抗原 242(carbohydrate antigen, CA724)及肿瘤坏死因子- $\alpha$ (Tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )<sup>[4]</sup>。本研究就 TNF- $\alpha$ 、CA724 及 CEA 联合肠镜检查在结直肠癌诊断中的价值进行分析,现报道如下。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

收集 2017 年 6 月至 2020 年 6 月在驻马店市中心医院进行手术治疗的 110 例结直肠癌患者的临床资料,作为结直肠癌组。其中男性 59 例,女性 51 例;平均年龄( $56.35 \pm 2.37$ )岁。纳入标准:①所有患者均满足世界卫生组织制定的结直肠癌诊断标准<sup>[5]</sup>;②未患有其他恶性肿瘤疾病者;③入组前未接受过放化疗者;④依从性较好者。排除标准:①合并血液系统性疾病、重要脏器严重损害、肝肾功能及凝血功能严重异常者;②合并良性消化道疾病者;③手术不耐受者;④家族性腺瘤性息肉病恶变者。

另选取结直肠良性疾病(包括结肠息肉、慢性结肠炎、溃疡性结肠炎)患者 90 例作为对照组,并且排除合并重要脏器感染性疾病或其他恶性肿瘤患者。其中男性 49 例,女性 41 例;平均年龄( $56.42 \pm 2.39$ )岁。两组一般资料比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),可以进行比较。所有研究对象

均签署知情同意书,本研究已获得医学伦理委员会批准。

### 1.2 检测方法

#### 1.2.1 血清肿瘤标志物检测

于治疗前空腹用一次性真空采血管采集静脉血,室温静置 30 min,3 500 r/min 离心 10 min,得到血清。血清 TNF- $\alpha$ 、TNF- $\alpha$ 、CA724 及 CEA 采用化学发光法检测,由北京美康生物技术研究中心有限责任公司提供检测所用的试剂,以上项目均按试剂盒说明检测,严格按照标准操作规程操作,并在室内质控在控范围内检测。

#### 1.2.2 肠镜检查

患者于检查前 1 天全天进食半流质饮食,按肠镜检查要求进行肠道准备,术前 4 h 将复方聚乙二醇电解质散溶于水,搅拌均匀,一次量约 2~4 mL,以 1 L/h 的速度口服,以排出液变为透明液体时结束给药。检查时嘱患者保持左侧卧位,医师操作结肠镜沿着肠道慢慢向前推送,根据需要更改体位,直至送至回盲部,仔细观察肠道情况后缓慢推进。在进镜和退镜期间仔细观察各节段肠道粘膜情况,若发现肿瘤,取材 5~8 点,并对所取出的材料进行病理活检。

#### 1.2.3 病理组织检查

取大小合适的组织样本,经固定液固定后再经脱水、透明、浸蜡、包埋后,用轮转式切片进行切片处理,切片经烤片后,用二甲苯脱蜡再用酒精脱二甲苯,经苏木素染细胞核、伊红染细胞质的染色后,酒精脱水、透明后封片,由专业病理医师用显微镜进行阅片分析。

### 1.3 统计学分析

采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析,计量资料以( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用  $t$  检验;计数资料以  $n(\%)$  表示,采用  $\chi^2$  检验。采用 ROC 曲线分析 TNF- $\alpha$ 、CA724 及 CEA 联合肠镜检查在结直肠癌诊断中的预测价值,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 两组间 TNF-α、CA724 及 CEA 水平比较

结直肠癌组 TNF-α、CA724 及 CEA 水平高于对照组,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。见表1。

表1 两组间 TNF-α、CA724 及 CEA 水平比较 ( $\bar{x}\pm s$ )

Table 1 the levels of TNF - α, CA724 and CEA between

2 groups ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	TNF-α(pg/mL)	CA724(U/mL)	CEA(ng/mL)
结直肠癌组	110	13.26±5.41	11.96±4.68	16.95±2.41
对照组	90	3.10±1.22	4.85±1.82	5.32±1.81
t 值	-	17.450	13.591	37.864
P 值	-	<0.001	<0.001	<0.001

### 2.2 结肠镜检查实施情况

110 例结直肠癌患者均完整观察并进行活检,直肠、直乙交界处及乙状结肠均可见多发息肉样隆起,表面粘膜呈分叶状,基底部多无蒂。110 例患者中,发生在直乙交界处的 2 例病灶经结肠镜检查未诊断出,对于 10 例发生在直肠、4 例发生在乙状结肠处的病变定位不准确。

90 例良性病变者检出结肠息肉 32 例、慢性结肠炎 26 例、溃疡性结肠炎 21 例,对于 9 例结肠息肉定位不准确,2 例慢性结肠炎未检出。病例组织实验图示见图 1。

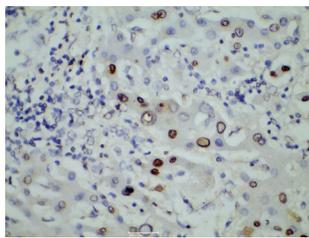


图1 结直肠癌组织病理图(SP,×400)

Figure 1 Histopathological analysis of colorectal cancer (SP, ×400)

### 2.3 肿瘤标志物及肠镜检查单一或联合检测结直肠癌的准确度

TNF-α+CA724+CEA 与单一肠镜检查准确度比较差异无统计学意义( $P>0.05$ ),TNF-α+CA724+

CEA+肠镜检查准确度高于单一肿瘤标志物检测和单一肠镜检查,差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。见表2。

表2 TNF-α、CA724 和 CEA 及肠镜检查单一或联合检测结直肠癌的准确度

Table 2 accuracy of single or combined detection of TNF-α, CA724, CEA and colonoscopy in colorectal cancer

检测方法	病理诊断		准确度 (%)
	良性 (n=90)	恶性 (n=110)	
TNF-α+CA724+CEA	75	97	86.00
单一肠镜检查	79	94	86.50
TNF-α+CA724+CEA 联合肠镜检查	80	108	94.00*
χ <sup>2</sup> 值			8.098
P 值			0.017

注:与 TNF-α+CA724+CEA 及单一肠镜检查比较,\* $P<0.05$ 。

### 2.4 TNF-α、CA724 和 CEA 及肠镜检查单一或联合检测结直肠癌的 ROC 效果评价

采用 ROC 曲线分析 TNF-α、CA724 和 CEA 及肠镜检查单一或联合检测结直肠癌的预测价值,各指标曲线下面积以联合检测最大( $P<0.05$ )。见表3、图2。

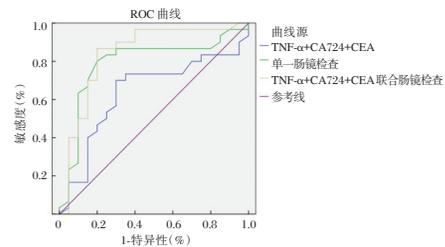


图2 ROC 曲线图

Figure 2 ROC curve er

## 3 讨论

结直肠癌是胃肠道常见肿瘤,患者早期症状不明显,但随着癌肿的增大可表现排便习惯改变、局部腹痛或全身症状<sup>[6]</sup>。研究指出,结直肠癌应做到早期诊断,肠镜、血清肿瘤标志物水平检测、病理检查均可作为结直肠癌可选择的诊断或辅助诊断方法<sup>[7-8]</sup>。

表3 TNF-α、CA724 和 CEA 及肠镜检查单一或联合检测结直肠癌的预测价值

Table 3 predictive value of single or combined detection of TNF - α, CA724, CEA and colonoscopy in colorectal cancer

预测因子	最佳临界值	敏感度 (%)	特异度 (%)	约登指数	AUC	95%CI	P 值
TNF-α+CA724+CEA	0.636	0.882	0.833	0.715	0.529	0.475~0.797	<0.01
单一肠镜检查	0.5789	0.855	0.878	0.733	0.507	0.649~0.929	<0.01
TNF-α+CA724+CEA 联合肠镜检查	0.839	0.998	0.889	0.887	0.532	0.712~0.966	<0.01

病理诊断为结直肠癌的金标准,但受到病理取材过程中具有一定创伤的影响,其存在临床局限性<sup>[9]</sup>。而肠镜是一种无创的检测方法,可直接观察到全结肠及直肠粘膜形态,对可疑病灶能够在直视下采取活体组织检查,对于提高微小病灶的早期诊断很有价值<sup>[10]</sup>。然而肠镜的缺点在于不能对肿瘤准确定位,而且由于生理弯曲或黏膜下肿瘤导致狭窄而无法进镜,常导致漏诊。肿瘤标记物的血清水平通常与肿瘤的发生发展、复发转移等有良好的相关性,临床主要用于肿瘤的早期诊断、肿瘤性质的鉴别诊断、肿瘤进展、治疗效果和预后的评估以及高危人群的肿瘤筛查<sup>[11]</sup>。研究显示,选择多种肿瘤标记物或肿瘤相关细胞因子联合检测,可提高检测的灵敏性,弥补单个指标敏感性和特异性不高的缺点,因此目前多个肿瘤标记物联合应用价值引发热议<sup>[12]</sup>。

CEA是一种酸性蛋白,广泛存在于消化系肿瘤中,属肿瘤相关抗原。CA274是一种黏蛋白样肿瘤相关糖蛋白,其水平与肿瘤大小、分期及转移有关,是胃肠道和卵巢肿瘤的标志物<sup>[13]</sup>。CEA结合CA274检测微创且高效,但在部分良性病变中亦可见CEA、CA274水平升高,其敏感度和特异度不高,且结果存在一定假阳性<sup>[14]</sup>。TNF- $\alpha$ 是一种具有多种生物活性的细胞因子,近年来,许多学者发现其不但可引起肿瘤出血和缺血坏死,还具有促进肿瘤细胞生长的作用<sup>[15]</sup>。本研究结果显示结肠癌患者TNF- $\alpha$ 、CA724及CEA水平均显著高于对照组,提示三指标与结直肠癌的发生发展关系密切。因此,本研究将TNF- $\alpha$ 、CA724及CEA纳入血清肿瘤标志物联合检测。

本研究结果表明肠镜+肿瘤标志物两项联合提高了临床诊断结直肠癌的敏感度,值得在临床广泛推广<sup>[16]</sup>。分析其原因在于,血清肿瘤标志物与肠镜检查联合检测弥补了各自的劣势,有效减少误诊、漏诊情况。然而值得注意的是,在临床应用过程中还需根据患者自身准备情况、经济条件、检查的创伤度等多方面考虑选择不同组合进行诊断,以达到最佳临床受益。

综上所述,TNF- $\alpha$ 、CA724及CEA水平在结直肠癌患者中显著升高,三者联合肠镜检查可提高诊断结肠癌的敏感度、准确性,值得推广。

## 参考文献

[1] 杜灵彬,李辉章,王悠清,等. 2013年中国结直肠癌发病

与死亡分析[J]. 中华肿瘤杂志, 2017, 39(9):701-706.

- [2] 俞希虎,王磊. 结直肠癌精准医疗的研究现状[J]. 中华实验外科杂志, 2017, 34(1):1-4.
- [3] Pak MG, Koh HJ, Roh MS. Clinicopathologic significance of TRAP1 expression in colorectal cancer: a large scale study of human colorectal adenocarcinoma tissues[J]. *Diagn Pathol*, 2017, 12(1):6-9.
- [4] Takahashi R, Sakamoto K, Sugimoto K, et al. Significance of Serum p53 Antibody as a Tumor Marker in Colorectal Cancer[J]. *Dis markers*, 2019, 2019(7):1-6.
- [5] 韩安家,黄艳,来茂德. 肿瘤病理诊断规范(结直肠癌)[J]. 中华病理学杂志, 2016, 45(12):822-824.
- [6] Kim IH, Lee JE, Yang JH, et al. Clinical Significance of Discordance between Carcinoembryonic Antigen Levels and RECIST in Metastatic Colorectal Cancer[J]. *Cancer Res Treat*, 2018, 50(1):283-292.
- [7] Groover S, Kaul R, Johnston SE, et al. Characteristics of carcinoembryonic antigen-producing colorectal cancers: A population based study[J]. *Arch Oncol*, 2019, 25(1):898-903.
- [8] 王锡山. 中美结直肠癌流行病学特征及防治策略的对比分析[J]. 中华结直肠疾病电子杂志, 2017, 6(6):447-453.
- [9] Agusry C, Sungkar T, Siregar GA. Relationship Between Staging and Carcinoembryonic Antigen Serum Levels In Colorectal Cancer Patients' [J]. *J Endocrinol Trop Med Infect Dis(JETROMI)*, 2020, 2(3):118-123.
- [10] Wang T, Xu X, Xu Q, et al. miR-19a promotes colitis-associated colorectal cancer by regulating tumor necrosis factor alpha-induced protein 3-NF-kappa B feedback loops[J]. *Oncogene*, 2017, 36(23):3240-3251.
- [11] Weiwei N, Zhe W, Jing W, et al. Tumor Necrosis Factor Ligand-Related Molecule 1A Regulates the Occurrence of Colitis-Associated Colorectal Cancer [J]. *Digest Dis Sci*, 2018, 63(52):1-10.
- [12] Krzysztof T, Marzena A, Beata S, et al. Circulating Leptin, Adiponectin, and Tumor Necrosis Factor -Alpha in Patients Undergoing Surgery Due to Colorectal Cancer [J]. *Digestion*, 2019, 52(33):1-10.
- [13] Jiang Y, Wen T. 141PTumor-associated carbohydrate antigens-Tn antigen expression and contribution in human colorectal cancer[J]. *Ann Onco1*, 2018, 29(9):894-896.
- [14] Yu Z, Chen Z, Wu J, et al. Prognostic value of pretreatment serum carbohydrate antigen 19-9 level in patients with colorectal cancer: A meta-analysis[J]. *Plos One*, 2017, 12(11):137-139.
- [15] Indelicato R, Zulueta A, Caretti A, et al. Complementary Use of Carbohydrate Antigens Lewis a, Lewis b, and Sialyl-Lewis a (CA19.9 Epitope) in Gastrointestinal Cancers: Biological Rationale towards a Personalized Clinical Application [J]. *Cancers*, 2020, 12(6):855-857.
- [16] 李艳艳,高静,吉聪聪,等. 结直肠癌 KRAS、NRAS 和 BRAF 基因罕见突变类型及其临床意义(附 1 513 例)[J]. 中华消化外科杂志, 2020, 19(3):315-323.

## s-ChE、PCT、CRP在肺结核合并肺部感染诊断及预后中的应用

党璋<sup>1\*</sup> 吴琼<sup>2</sup> 王娟<sup>3</sup> 王颖<sup>4</sup>

**[摘要]** **目的** 探讨血清胆碱酯酶(S-ChE)、降钙素原(PCT)联合C-反应蛋白(CRP)检测在肺结核合并肺部感染诊断、预后评估中的应用。**方法** 选择2018年6月至2020年5月本科室收治的110例肺结核患者作为研究对象,根据是否合并感染另分两个亚组:合并感染组( $n=64$ ),非合并感染组( $n=46$ ),同时纳入同期本院98例健康体检者作为对照组。比较各组S-ChE、PCT、CRP水平及各水平对检测肺结核合并肺部感染患者的灵敏度及特异度,并采用多元Logistic回归分析影响肺结核患者并发肺部感染的危险因素。**结果** 两组患者S-ChE水平显著低于对照组,PCT、CRP水平显著高于对照组,以合并感染组患者尤甚,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。S-ChE、PCT、CRP灵敏度、特异度分别为89.06%、90.62%、92.18%、84.78%、86.95%、80.43%,而三者联合检测灵敏度、特异度高达93.75%、97.82%,其中,S-ChE+PCT+CRP联合检测特异度较S-ChE、PCT、CRP单独检测高( $P<0.05$ )。合并感染组与非合并感染组年龄、是否长期使用糖皮质激素、肺部病变范围、S-ChE、PCT、CRP水平等比较差异有统计学意义( $P<0.05$ )。多因素Logistic回归分析显示:年龄、长期使用糖皮质激素、S-ChE、PCT、CRP水平为影响肺结核患者发生肺部感染的独立危险因素( $P<0.05$ )。**结论** S-ChE、PCT联合CRP检测肺结核合并肺部感染具有一定诊断价值,临床工作者加强对其指标检测,具有一定借鉴作用。

**[关键词]** S-ChE; PCT; CRP; 肺结核合并肺部感染

### Application of S-ChE and PCT combined with CRP detection in the diagnosis and prognosis evaluation of pulmonary tuberculosis complicated with pulmonary infection

DANG Zhang<sup>1\*</sup>, WU Qiong<sup>2</sup>, WANG Juan<sup>3</sup>, WANG Ying<sup>4</sup>

(1. Department of Emergency Ward, Beijing Shijitan Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing, China, 100038; 2. Department of General Neonatology, Children's Hospital Affiliated to Capital Institute of Pediatrics, Beijing, China, 100020; 3. Department of Neurosurgery, Beijing Fengtai YouAnMen Hospital, Beijing, China, 100069; 4. Department of General Clinic, Xinjiekou Community Health Service Center, Xicheng District, Beijing, China, 100016)

**[ABSTRACT]** **Objective** To explore the application of serum cholinesterase (S-ChE) and procalcitonin (PCT) combined with C-reactive protein (CRP) detection in the diagnosis and prognosis evaluation of pulmonary tuberculosis complicated with pulmonary infection. **Method** The 110 pulmonary tuberculosis patients admitted to this department from June 2018 to May 2020 were selected as the research objects. According to whether the patients were combined with infection or not, they were divided into two subgroups: the co-infection group was set as group A ( $n=64$ ), and the non-infection group was set as group B ( $n=46$ ). At the same

基金项目:北京市自然科学基金资助项目(Z161100000516006)

作者单位:1. 首都医科大学附属北京世纪坛医院急诊病房,北京 100038

2. 首都儿科研究所附属儿童医院普通新生儿外科,北京 100020

3. 北京丰台右安门医院神经外科,北京 100069

4. 北京市西城区新街口社区卫生服务中心全科门诊,北京 100016

\*通信作者:党璋, E-mail:zou240645wang830@163.com

time, 98 patients with normal physical examination results in this hospital were included as the control group. The levels of S-ChE, PCT and CRP in each group were compared and the sensitivity and specificity of each level in detecting patients with pulmonary tuberculosis complicated with pulmonary infection. Multivariate Logistic regression analysis was used to analyze the risk factors of pulmonary infection of patients with pulmonary tuberculosis. **Result** The S-ChE levels of patients in groups A and B were significantly lower than those in the control group, and the levels of PCT and CRP in A and B groups were significantly higher than those in the control group, especially in group A, and the differences were statistically significant ( $P<0.05$ ). The sensitivity and specificity of S-ChE, PCT, and CRP are respectively 89.06%, 90.62%, 92.18%, and 84.78%, 86.95%, and 80.43%, respectively, while the sensitivity and specificity of the combined detection of them were 93.75% and 97.82%. Among them, the specificity of the combined detection of S-ChE+PCT+CRP was higher than that of PCT, S-ChE, and CRP alone, and the difference was statistically significant ( $P<0.05$ ). There were statistically significant differences between group A and group B in age, whether to use glucocorticoids for a long time, lung lesions, S-ChE, PCT, and CRP levels ( $P<0.05$ ). Multivariate logistic regression analysis showed that age, long-term use of glucocorticoids, S-ChE, PCT, and CRP, levels were independent risk factors affecting pulmonary infection in patients with tuberculosis ( $P<0.05$ ). **Conclusion** S-ChE, PCT combined with CRP to detect pulmonary tuberculosis with pulmonary infection has a certain diagnostic value. Clinicians strengthen the detection of its indicators, which can be used as a reference.

[KEY WORDS] S-ChE, PCT, CRP, Tuberculosis complicated with pulmonary infection

肺结核是临床上常见的呼吸道疾病,据统计,全世界每年有800万~1000万人感染肺结核,死亡率占1/3以上,已成为危害我国公民健康的公共卫生问题<sup>[1]</sup>。相关研究发现,肺结核患者发病过程隐匿,部分患者可同时合并肺部感染,不仅影响肺结核诊断,还会造成误诊,导致患者病情延误<sup>[2]</sup>。因此,如何及时有效筛查肺结核患者肺部感染,提高患者诊疗,改善预后是目前研究热点。近年来,相关学者发现,肺结核合并肺部感染患者疾病的发生、发展与多项实验室指标密切相关<sup>[3]</sup>。降钙素原(Procalcitonin, PCT)作为临床用于诊断细菌感染的敏感指标,广泛应用于临床,在多种感染性疾病中呈高表达状态<sup>[4]</sup>。C-反应蛋白(C-reactive protein, CRP)作为急性期反应蛋白,可参与全身或局部炎症反应,是预测肺部感染严重程度有效的炎症指标<sup>[5]</sup>。研究发现,血清胆碱酯酶(serum cholinesterase, S-ChE)参与多种病理组织器官缺氧、感染等进程,且与病情预后密切相关<sup>[6]</sup>。鉴于此,本研究,分析S-ChE、PCT联合CRP检测在肺结核合并肺部感染患者诊断、预后评估中的价值,现报告如下。

## 1 对象与方法

### 1.1 一般资料

选择2018年6月至2020年5月本院急诊病房收治的110例肺结核患者作为研究对象,其中男

57例,女53例,平均年龄(51.79±6.93)岁。根据是否合并感染分两个亚组:其中合并感染组患者64例,男33例,女31例,平均年龄(51.71±6.12)岁;非合并感染组患者46例,男27例,女19例,平均年龄(51.53±6.32)岁。纳入同期本院健康体检者98例作为对照组。其中男52例,女46例,平均年龄(51.13±6.06)岁。各组间一般资料比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。本研究经医院伦理委员会批准,患者均签署知情同意书。

纳入标准:①符合中华医学会结核病学分会制定的《肺结核诊断和治疗指南》<sup>[7]</sup>。②临床资料完整;③合并感染组患者均有发热,咳黄痰等临床症状,影像学显示肺部有炎性浸润病变,且病灶进展,抗菌药物治疗无效。排除标准:①合并肝肾等重要器官损害者、继发性糖尿病、妊娠期糖尿病、甲状腺疾病及恶性肿瘤者;②临床及随访资料不完整或缺乏准确性者。

### 1.2 检测方法

S-ChE、PCT、CRP:所有研究对象均在清晨抽取空腹静脉血5 mL,使用乙二胺四乙酸抗凝处理后,使用3000 r/min离心机离心10 min,取上清液备用。使用酶联免疫吸附法检查血清中CRP水平,试剂盒购自欣博盛生物科技有限公司。PCT使用德国罗氏公司提供的E601电化学发光自动免疫分析仪测定,S-ChE采用日立7170全自动生

化仪予以速率法检测。所有操作均按试剂或仪器所配套说明书进行,由专业人员操作。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析,采用多元 Logistic 回归分析影响肺结核患者发生肺部感染的危险因素;计量资料采用  $(\bar{x} \pm s)$  表示,组间比较行 *t* 检验,多组间比较采用 *F* 检验;计数资料采用 *n*(%)表示,行  $\chi^2$  检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组 S-ChE、PCT、CRP 水平比较

3 组 S-ChE(kU/L)水平比较:对照组>非合并感染组>合并感染组;PCT(ng/mL)、CRP(ng/mL)比较:合并感染组>非合并感染组>对照组,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表 1。

表 2 S-ChE、PCT、CRP 灵敏度、特异度 [*n*(%)]

Table 2 sensitivity and specificity of s-che, PCT and CRP [*n*(%)]

指标	合并感染组( <i>n</i> =64)		非合并感染组( <i>n</i> =46)		灵敏度(%)	特异度(%)
	阳性	阴性	阳性	阴性		
PCT	58(90.63)	6(9.37)	6(13.04)	40(86.96)	90.63	86.96
S-ChE	57(89.06)	7(10.94)	7(15.21)	39(84.79)	89.06	84.79
CRP	59(92.19)	5(7.81)	9(19.57)	37(80.43)	92.19	80.43
S-ChE+PCT+CRP 联合	60(93.75)	4(6.25)	1(2.17)	45(97.83)	93.75	97.83

合并感染组与非合并感染组年龄、是否长期使用糖皮质激素、肺部病变范围、S-ChE、CRP、PCT 水平等比较差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表 3。

### 2.4 影响肺结核患者发生肺部感染的多因素分析

年龄、长期使用糖皮质激素、S-ChE、PCT、CRP 水平为影响肺结核患者发生肺部感染的独立危险因素( $P < 0.05$ )。见表 4。

## 3 讨论

据世界卫生组织(World Health Organization, WHO)发布的《2018 年全球结核病报告》显示,我国是全球 30 个结核病高负担国家之一,每年新发结核病患者约 90 万例,位居全球第 3 位<sup>[8]</sup>。肺部感染作为肺结核重要合并症之一,会加重患者病情,威胁患者生命安危。故及时明确肺结核合并肺部感染诊断并进行预后改善是目前临床上的研究热点<sup>[9]</sup>。肺结核患者机体代谢较差,细胞免疫功能低下,随着病情进展,肺部会出现干酪状坏死、渗出或肺部空洞等情况,易并发肺部感染,提升临床诊断难度,影响治疗效果<sup>[10]</sup>。S-ChE 作为丝氨酸酯酶家族成员

表 1 各组 S-ChE、PCT、CRP 水平比较  $(\bar{x} \pm s)$

Table 1 Comparison of s-che, PCT and CRP levels in each group  $(\bar{x} \pm s)$

组别	<i>n</i>	S-ChE(kU/L)	PCT(ng/mL)	CRP(ng/mL)
合并感染组	64	2.96±0.52	5.93±1.32	13.64±6.83
非合并感染组	46	4.87±2.14	3.44±1.05	7.15±3.11
对照组	98	7.64±5.36	1.43±0.63	4.17±1.29
<i>F</i> 值		29.91	407.10	101.26
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001

### 2.2 S-ChE、PCT、CRP 单独及联合检测灵敏度、特异度比较

S-ChE+PCT+CRP 三者联合检测灵敏度、特异度高达 93.75%、97.82%,较 S-ChE、PCT、CRP 单独检测高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表 2。

### 2.3 影响肺结核患者发生肺部感染的单因素分析

合并感染组与非合并感染组性别、吸烟、合并糖尿病等占比比较差异均无统计学意义( $P > 0.05$ ),

表 3 影响肺结核患者发生肺部感染的单因素分析 [*n*(%),  $(\bar{x} \pm s)$ ]

Table 3 single factor analysis of pulmonary infection in patients with pulmonary tuberculosis [*n*(%),  $(\bar{x} \pm s)$ ]

因素	合并感染组( <i>n</i> =64)	非合并感染组( <i>n</i> =46)	$\chi^2$ 值	<i>P</i> 值	
年龄(岁)	<60	12(18.75)	18(39.13)	5.605	0.018
	≥60	52(81.25)	28(60.87)		
性别	男	33(51.57)	27(58.70)	0.549	0.459
	女	31(48.43)	19(41.30)		
吸烟	有	29(45.31)	20(43.48)	0.036	0.849
	无	35(54.69)	26(56.52)		
肺部病变范围	<3 个	22(34.38)	31(67.40)	11.685	0.001
	≥3 个	42(65.62)	15(32.60)		
合并糖尿病	是	28(43.75)	19(41.30)	0.065	0.798
	否	36(56.25)	27(58.70)		
长期使用糖皮质激素	是	47(73.43)	13(28.27)	22.031	0.000
	否	17(26.57)	33(71.73)		
S-ChE(kU/L)	2.96±0.52	4.87±2.14	6.874	0.000	
PCT(ng/ml)	5.93±1.32	3.44±1.05	10.603	0.000	
CRP(ng/mL)	13.64±6.83	7.15±3.11	6.006	0.000	

之一,含数个分子唾液酸的糖蛋白,分布于胆碱能神经末梢突触间隙、胆碱能神经元和红细胞内,能够降解乙酰胆碱保证神经信号正常传递;同时还

表4 影响肺结核患者发生肺部感染的多因素分析

Table 4 Analysis of multiple factors influencing pulmonary infection in patients with pulmonary tuberculosis

影响因素	回归系数	标准误	Wald $\chi^2$ 值	OR	95%CI	P 值
S-ChE(kU/L)(正常 vs 异常降低)	1.884	0.450	10.254	6.579	2.724~15.894	<0.001
PCT(pg/ml)(正常 vs 异常升高)	1.758	0.358	9.854	5.801	3.287~10.237	<0.001
CRP(mg/l)(正常 vs 异常升高)	1.874	0.421	9.724	5.641	2.632~12.091	<0.001
肺部病变范围(<3个 vs $\geq$ 3个)	0.566	0.389	1.315	1.76	0.82~3.77	0.251
长期使用糖皮质激素(是 vs 否)	0.893	0.325	9.846	2.44	1.29~4.62	<0.001
年龄(<60岁 vs $\geq$ 60岁)	0.763	0.134	8.716	2.14	1.65~2.79	<0.001

可分布在血清、肝、肾等组织中,参与药物代谢,促进细胞生长<sup>[11]</sup>。相关临床研究指出,联合检测PCT和CRP对诊断肺结核合并肺部感染具有重要作用<sup>[12]</sup>。PCT是一种无激素活性降钙素前体,正常情况下主要存在于甲状腺及肺部神经内分泌细胞中,可裂解成降钙素,一旦发生细菌感染,PCT水平浓度可快速上升,且其升高程度与感染程度呈正相关<sup>[13]</sup>。CRP是一种能与肺炎球菌C多糖体反应形成复合物的急性时相反应蛋白,一方面可通过经典途径激活、消耗补体,促使炎性介质释放,增加黏附及吞噬细胞反应,溶解细胞;另一方面,单核细胞可使淋巴细胞增生、活化,增强淋巴细胞生长的同时,使T淋巴细胞一同增长,对吞噬细胞加强了吞噬作用<sup>[14]</sup>。大量研究表明,单独检测PCT、CRP水平易受多种因素影响,特异性、灵敏性不强<sup>[15]</sup>。本研究发现,S-ChE、PCT、CRP水平联合检测灵敏度、特异度高达93.75%、97.82%。因此,联合检测对诊断肺结核合并肺部感染具有重要意义。

本研究结果说明S-ChE、PCT、CRP水平与肺结核患者发生肺部感染有着密切联系。另经多因素Logistic回归分析显示,S-ChE、PCT、CRP水平是影响肺结核患者发生肺部感染的独立危险因素。考虑其原因与肺结核患者体内缺血缺氧性刺激引发血象及脏器功能受损,导致炎性标志物升高有关。

综上所述,S-ChE、PCT联合CRP检测肺结核合并肺部感染具有一定诊断价值,其水平变化与患者预后具有一定相关性,临床工作者加强对其指标检测具有一定借鉴作用。

#### 参考文献

[1] 李小平,常凯悦,张延峰.磷霉素联合加替沙星注射液对肺结核合并下呼吸道感染患者的临床价值分析[J].解放军医药杂志,2019,31(6):46-49.

[2] 黄双双,张胜男,叶君如,等.经皮肺活检组织病理、微生物培养及快速现场评价对肺部感染性疾病的诊断价值

[J].中华医学杂志,2019,99(42):3340-3344.

[3] 蔡丹磊,黄中伟,包玉华,等.慢性阻塞性肺疾病合并肺部感染患者TGF- $\beta$ 1/Smads信号通路的表达[J].中华医院感染学杂志,2020,30(21):63-67.

[4] 丁巍,王文艺,邬超,等.慢性阻塞性肺疾病肺感染患者血清细胞因子及肺功能指标变化情况[J].华南预防医学,2020,46(05):132-134+138.

[5] Nakao M, Muramatsu H, Arakawa S, et al. Immunonutritional status and pulmonary cavitation in patients with tuberculosis: A revisit with an assessment of neutrophil/lymphocyte ratio[J]. Respir Invest, 2019, 37(12):462-467.

[6] Xue X, Qiu Y, Cao S, et al. Detection and significance of TNF- $\alpha$  and hs-CRP in the pleural effusion of patients with diabetes and pulmonary tuberculosis[J]. Eur J Inflamm, 2019, 19(4):505-508.

[7] 张培元.肺结核诊断和治疗指南[J].中华结核和呼吸杂志,2001,24(2):70-74.

[8] 白明玉.肺结核患者合并肺部感染的病原菌分布及耐药性分析[J].国际感染病学(电子版),2019,8(3):18-18.

[9] Sara GM, Caballero IC, Arancha BS, et al. Disseminated Tuberculosis Complicated With Pneumatoceles in 2 Infants[J]. Pediatr Infect Dis J, 2020, 21(8):204-207.

[10] Sharma G, Tewari R, Dhatwalia SK, et al. A loop-mediated isothermal amplification assay for the diagnosis of pulmonary tuberculosis[J]. Lett Appl Microbiol, 2019, 68(3):173-175.

[11] Mao L, Zhou XT, Li JP, et al. Esophageal tuberculosis complicated with intestinal tuberculosis: A case report[J]. World J Clin Cases, 2020, 8(3):163-169.

[12] Hao YE, Shengwei D. Application of PCT and CRP Combined Detection in Cirrhosis Complicated With Pulmonary Infection[J]. China Contin Med Educat, 2019, 22(9):336-338.

[13] 胡冰,周栩平,时英才,等.血清SAA、sTREM-1、PCT联合检测在新生儿宫内感染性肺炎中的价值[J].分子诊断与治疗杂志,2021,13(3):441-444.

[14] 程国栋,王海玲,王玉清.肺结核患者合并肺部感染病原菌的种类,血清蛋白水平及分枝杆菌耐药性分析[J].中国病原生物学杂志,2020,15(2):99-102.

[15] Namaei MH, Mortazavi-Moghaddam SG, Eslami-Manoochchri R, et al. The role of Interleukin-10 and 13 in tuberculosis-associated pulmonary dysfunction[J]. Caspian J Intern Med, 2019, 10(2):223-227.

# 脑梗死溶栓后血管再闭塞高危因素及与hs-CRP、APN、TLR4的关系

王杰斌\* 刘汉臣 张琦

**[摘要]** 目的 探讨脑梗死溶栓后血管再闭塞高危因素及与超敏C反应蛋白(hs-CRP)、脂联素(APN)、Toll样受体4(TLR4)的关系。方法 选择2018年2月至2020年5月本院收治的100例接受静脉溶栓治疗的患者作为研究对象,收集患者临床资料,检测入院时血清hs-CRP、APN、TLR4水平。根据溶栓治疗后血管是否发生再闭塞将研究对象分为血管再通组和血管再闭塞组,评估溶栓治疗后血管再闭塞发生情况。结果 入组患者血管再闭塞发生率为24.00%。血管再闭塞组溶栓时间窗、入院时国立卫生研究院卒中量表(NIHSS)评分、D-二聚体、纤维蛋白原及血清hs-CRP、APN、TLR4水平显著高于血管再通组,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。Logistic多因素分析显示,溶栓时间窗、入院时NIHSS评分、D-二聚体是脑梗死溶栓治疗后血管再闭塞的独立危险因素( $P<0.05$ )。ROC曲线显示,血清hs-CRP、APN、TLR4预测血管再闭塞的曲线下面积分别为0.764、0.774、0.790,当截断值为6.05 mg/L、6.69  $\mu$ g/mL、4.19 ng/mL时约登指数最大。结论 hs-CRP、APN、TLR4等血清学指标可一定程度评估血管再闭塞风险,为临床提供参考。

**[关键词]** 脑梗死;溶栓;血管再闭塞;超敏C反应蛋白;脂联素;Toll样受体4

## High risk factors of vascular re-occlusion after cerebral infarction thrombolysis and its relationship with hs-CRP, APN and TLR4

WANG Jiebin\*, LIU Hanchen, ZHANG Qi

(Department of Neurology Ward 1, Linxi Hospital Of Kailuan General Hospital, Tangshan, Hebei, China, 063103)

**[ABSTRACT]** **Objective** To explore the high-risk factors of vascular re-occlusion after cerebral infarction thrombolysis and its relationship with high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP), adiponectin (APN) and Toll-like receptor 4 (TLR4). **Methods** 100 patients who underwent intravenous thrombolytic therapy in the hospital from February 2018 to May 2020 were enrolled as the research objects. Their clinical data were collected, and the levels of serum hs-CRP, APN and TLR4 at admission were detected. Assess the occurrence of re-occlusion of blood vessels after thrombolytic therapy. **Results** The incidence of vascular re-occlusion in the enrolled patients was 24.00%. The thrombolytic time window, scores of National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS), D-dimer and, fibrinogen levels of serum hs-CRP, APN and TLR4 at admission in the vascular re-occlusion group were significantly higher than those in the vascular re-canalization group ( $P<0.05$ ). Logistic multivariate analysis showed that thrombolytic time window, NIHSS score and D-dimer at admission were independent risk factors of vascular re-occlusion after cerebral infarction thrombolysis ( $P<0.05$ ). ROC curves showed that the area under the curve (AUC) values of serum hs-CRP, APN and TLR4 for predicting vascular re-occlusion were 0.764, 0.774 and 0.790, respectively. When their cut-off values were 6.05 mg/L, 6.69  $\mu$ g/mL and 4.19 ng/mL, Youden index was the maximal. **Conclusion** Serological indexes such as hs-CRP, APN and TLR4 can assess the risk of vascular re-occlusion after cerebral

基金项目:河北省卫生厅科研基金项目(20210578)

作者单位:开滦总医院林西医院神经内科一病区,河北,唐山 063103

\*通信作者:王杰斌, E-mail:renxiam7287086254@163.com

infarction thrombolysis to a certain extent, which can provide clinical reference.

[KEY WORDS] Cerebral infarction; Thrombolysis; Vascular re-occlusion; High-sensitivity C-reactive protein; Adiponectin; Toll-like receptor 4

急性脑梗死是高致残及致死疾病,临床多采用重组组织型纤溶酶原激活剂静脉溶栓治疗,但仍有部分患者可出现早期血管再闭塞<sup>[1]</sup>。目前认为,脑梗死的发生与机体凝血系统平衡、血脂、炎症反应等过程关系密切<sup>[2]</sup>。超敏C反应蛋白(high-sensitivity C-reactive protein, hs-CRP)是临床应用较多的急性反应蛋白,其水平可一定程度评估动脉粥样硬化严重程度<sup>[3]</sup>。脂联素(adiponectin, APN)是脂肪细胞分泌的蛋白质,在血浆中含量丰富,其对动脉粥样硬化、胰岛素抵抗、内皮细胞功能调节等方面均有一定调节作用<sup>[4-5]</sup>。Toll样受体4(Toll-like receptor 4, TLR4)是Toll样受体家族成员,研究表明,TLR4在脑缺血后的炎症反应中发挥重要作用,与脑梗死的发生及发展存在密切联系<sup>[6]</sup>。目前仍较少有研究探讨hs-CRP、APN、TLR4与脑梗死溶栓后血管再闭塞的关系,鉴于此,本研究将探讨血清hs-CRP、APN、TLR4等指标在预测血管再闭塞中的价值,以期对溶栓后血管再闭塞的预防、治疗提供一定参考。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选择2018年2月至2020年5月本院收治的100例接受静脉溶栓治疗的患者作为研究对象。纳入标准:①符合《中国急性缺血性脑卒中诊治指南》<sup>[7]</sup>中脑梗死诊断标准;②具有静脉溶栓适应症;③在发病后4.5 h时间窗内进行阿替普酶溶栓治疗;④临床资料完整。排除标准:①其他脑血管病变者;②临床资料不全者;③入院前接受其他方式干预者;④恶性肿瘤患者;⑤合并自身免疫性疾病者。其中男性65例,女性35例,年龄(66.91±10.24)岁;血管病危险因素:饮酒者30例,吸烟者24例,合并高血压者43例,合并高脂血症者56例,糖尿病者25例,冠心病者9例,房颤者17例;大动脉粥样硬化37例,小血管闭塞39例,心源性栓塞24例;入院时国立卫生研究院卒中量表(national institutes of health stroke scale, NIHSS)评分为(11.43±3.85)分。本研究经医院伦理委员会批准通过,研究对象均签署知情同意书。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 资料收集

①人口学资料:性别、年龄、体质量指数。②血管性疾病危险因素:吸烟史、饮酒史、合并症(糖尿病、高血压、冠心病)、既往心血管疾病病史。③疾病相关资料:发病至接受溶栓治疗时间、入院时NIHSS评分、抗血小板药物使用、影像学资料。④实验室检查指标:收缩压(systolic blood pressure, SBP)、舒张压(diastolic blood pressure, DBP)、糖化血红蛋白(Hemoglobin A1C, HbA1c)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglycerides, TG)、低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL-C)、高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL-C)、D-二聚体、血小板计数(platelet count, PLT)、纤维蛋白酶原(fibrinogen, FIB)。

#### 1.2.2 溶栓治疗后血管再闭塞<sup>[8]</sup>

行影像学检查排除症状性颅内出血,溶栓后NIHSS评分降低 $\geq 2$ 分为血管通畅,在此基础上72 h内出现NIHSS评分再次增高 $\geq 2$ 分视为血管再闭塞。根据溶栓治疗后血管是否发生再闭塞将研究对象分为血管再通组和血管再闭塞组。

#### 1.2.3 血清学指标检测

收集入院后当天静脉血,2 000 r/min离心10 min分离血清,采用散射免疫比浊法测定hs-CRP水平,试剂盒购自上海信帆生物科技有限公司;采用酶联免疫吸附法检测血清APN、TLR4水平,其中APN试剂盒购自深圳依诺金生物科技有限公司,TLR4试剂盒购自上海康朗生物科技有限公司。所有操作均按照试剂盒说明书进行操作。

### 1.3 统计学分析

采用SPSS 19.0进行数据处理,计数资料以 $n(\%)$ 表示,行 $\chi^2$ 检验,计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,行 $t$ 检验,采用Logistic多因素分析影响因素,绘制ROC曲线评价诊断价值,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 脑梗死溶栓治疗后血管再通组及血管再闭塞组患者临床资料比较

入组患者发生血管再闭塞24例,再闭塞发生

率为24.00%。

血管再闭塞组及血管再通组患者性别、年龄、体质量指数、血管病危险因素、分型及SBP、DBP、Glu、HbA1c、TC、TG、HDL-C、LDL-C等参数比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。血管再闭塞组患者溶栓时间窗、入院时NIHSS评分、D-二聚体、纤维蛋白原及血清hs-CRP、APN、TLR4水平显著高于血管再通组,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。见表1。

### 2.2 脑梗死溶栓治疗后血管再闭塞多因素分析

以血管再闭塞作为因变量,以溶栓时间窗、入院时NIHSS评分、D-二聚体、纤维蛋白原及血清hs-CRP、APN、TLR4等指标作为自变量进行Logistic多因素分析,溶栓时间窗、入院时NIHSS评分、D-二聚体是脑梗死溶栓治疗后血管再闭塞的独立危险因素( $P<0.05$ )。见表2。

表2 脑梗死溶栓治疗后血管再闭塞多因素分析

Table 2 multivariate analysis of vascular re occlusion after thrombolytic therapy in cerebral infarction

临床指标	$\beta$ 值	SE值	wald $\chi^2$	OR	95%CI	P值
溶栓时间窗	1.245	0.263	22.409	3.473	2.074~5.815	<0.001
入院NIHSS评分	0.528	0.201	6.900	1.696	1.143~2.514	0.009
D-二聚体	0.412	0.171	5.805	1.510	1.080~2.111	0.016
纤维蛋白原	0.385	0.265	2.111	1.470	0.874~2.470	0.147
血清Hs-CRP	0.526	0.352	2.233	1.692	0.849~3.373	0.136
血清APN	-0.201	0.110	3.339	0.818	0.659~1.015	0.068
血清TLR4	-0.310	0.165	3.530	0.733	0.531~1.013	0.061

### 2.3 hs-CRP、APN、TLR4预测血管再闭塞的价值分析

ROC曲线示,血清hs-CRP、APN、TLR4预测血管再闭塞的曲线下面积分别为0.764、0.774、0.790。见表3、图1。

表1 脑梗死溶栓治疗后血管再通组及血管再闭塞组患者临床资料比较 [ $n(\%)$ , ( $\bar{x} \pm s$ )]

Table 1 Comparison of clinical data between recanalization group and recanalization group after thrombolytic therapy for cerebral infarction [ $n(\%)$ , ( $\bar{x} \pm s$ )]

临床参数	n	血管再通组(n=76)	血管再闭塞组(n=24)	$\chi^2/t$ 值	P值		
性别	男	65	48(73.85)	17(26.15)	0.472	0.492	
	女	35	28(80.00)	7(20.00)			
年龄(岁)			66.85±9.52	67.12±8.96	0.123	0.903	
体质量指数(kg/m <sup>2</sup> )			22.63±2.52	23.01±2.85	0.624	0.534	
血管病危险因素	饮酒	30	25(32.89)	5(20.83)	1.264	0.261	
	吸烟	24	20(26.32)	4(16.67)	1.674	0.196	
	高血压	43	33(43.42)	10(41.67)	0.023	0.880	
	高脂血症	56	41(53.95)	15(62.50)	0.541	0.462	
	糖尿病	25	20(26.32)	5(20.83)	0.292	0.589	
	冠心病	9	7(9.21)	2(8.33)	0.017	0.896	
	房颤	17	15(19.74)	2(8.33)	1.681	0.195	
	既往服用抗血小板药物	17	15(19.74)	2(8.33)	1.681	0.195	
	TOAST分型	大动脉粥样硬化	37	25(32.89)	12(50.00)	3.201	0.072
		小血管闭塞	39	30(39.47)	9(37.50)		
心源性栓塞		24	21(27.63)	3(12.50)			
其他病因		0	0(0.00)	0(0.00)			
原因不明		0	0(0.00)	0(0.00)			
溶栓时间窗(min)			140.12±55.26	189.52±45.63	3.957	0.001	
入院时NIHSS评分(分)			10.22±3.26	15.26±4.71	5.893	<0.001	
实验室参数	SBP(mmHg)		152.12±22.63	150.12±19.63	0.389	0.698	
	DBP(mmHg)		88.96±14.12	82.63±12.45	1.967	0.052	
	Glu(mmol/L)		8.01±2.15	8.66±5.74	0.827	0.410	
	HbA1c(%)		6.33±1.65	6.85±1.96	1.285	0.202	
	TC(mmol/L)		5.05±1.24	5.06±1.01	0.036	0.971	
	TG(mmol/L)		1.52±0.85	1.60±0.79	0.409	0.684	
	HDL-C(mmol/L)		1.01±0.33	0.98±0.42	0.363	0.718	
	LDL-C(mmol/L)		2.58±0.96	2.85±0.89	1.222	0.225	
	D-二聚体( $\mu$ g/L)		752.41±142.12	1084.15±152.12	9.803	<0.001	
	PLT( $\times 10^9/L$ )		200.12±45.85	185.62±38.96	1.397	0.166	
	FIB(g/L)		3.48±0.57	4.52±0.59	7.728	<0.001	
	hs-CRP(mg/L)		5.27±1.52	8.52±3.71	6.208	<0.001	
	APN( $\mu$ g/mL)		5.85±1.96	7.56±2.85	3.318	0.001	
	TLR4(ng/mL)		3.77±0.52	4.56±0.85	5.499	<0.001	

表3 hs-CRP、APN、TLR4 预测血管再闭塞的价值分析

Table 3 value analysis of hs CRP, APN and TLR4 in predicting vascular re occlusion

指标	AUC	约登指数	截断值	灵敏度(%)	特异度(%)	95%CI	P值
hs-CRP(mg/L)	0.764	0.389	6.05	83.30	55.60	0.631-0.898	<0.001
APN( $\mu$ g/mL)	0.774	0.445	6.69	70.80	74.70	0.653-0.894	<0.001
TLR4(ng/mL)	0.790	0.491	4.19	83.30	65.80	0.690-0.890	<0.001

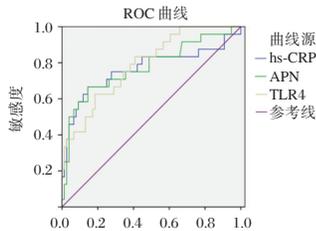


图1 hs-CRP、APN、TLR4 预测血管再闭塞的价值分析

Figure 1 value analysis of hs CRP, APN and TLR4 in predicting vascular re occlusion

### 3 讨论

国外现有研究报道,急性脑梗死溶栓治疗再闭塞率约为12%~35%<sup>[9]</sup>,本研究中这一比例为24.0%,符合前人研究报道。本研究结果显示,溶栓时间窗、入院时NIHSS评分、D-二聚体是脑梗死溶栓治疗后血管再闭塞的独立危险因素。目前普遍认为,溶栓时间与溶栓治疗效果相关,血管再通时间越短,缺血半暗带的恢复更好。但对于血管再闭塞方面存在一定争议:国外研究发现,血管再闭塞更易发生在血管开通时间较短的患者中<sup>[10]</sup>;而国内苏建等人<sup>[11]</sup>开展的一项最新研究证实,发病至溶栓时间是血管再闭塞的独立危险因素,再闭塞患者这一时间明显大于再通组。本研究与后者研究结果类似,与前者结果存在差异的原因可能与研究样本不同及溶栓治疗方式不同有关。入院时NIHSS可反映患者脑梗死严重程度,NIHSS较高( $\geq 16$ 分)与静脉溶栓后血管再闭塞相关<sup>[12]</sup>,本研究与其研究一致。分析两者之间的关系,NIHSS评分较高提示神经缺损程度较大,血管阻塞程度较为严重,部分血管极易出现再次阻塞。国外Baik等人<sup>[13]</sup>研究发现对于血管阻塞程度较大的患者,进行溶栓治疗后部分再通的血管仍易在原闭塞处形成血流剪切力,管腔内残余的栓子也极易再次堆积阻塞血管。D-二聚体是交联蛋白的降解产物,其水平可反映机体纤溶能力,在脑梗死初期,机体凝血功能失衡,在血栓形成后体内纤溶蛋白被激活,形成大量D-二聚体,因此其水平与脑梗死患者程度及预后相关。本研究中D-二聚体

水平是溶栓后血管再闭塞的危险因素,推测可能为D-二聚体较多说明患者梗死程度较高,后期更易发生血管再闭塞。

目前认为,血脂代谢、炎症因子、内皮细胞损伤与脑梗死等心脑血管疾病的发生密切相关<sup>[14]</sup>。hs-CRP是一种急性时相蛋白,由肝脏合成,参与炎症反应的发生及发展,在脑梗死患者中存在hs-CRP水平的明显升高<sup>[15]</sup>。APN是脂肪细胞分泌的多肽,具有抗炎、抗血管内皮增生的作用,脑梗死的发生及发展均伴有血管内皮损伤及炎症因子的产生,在这一过程中可出现APN代偿性的升高。TLR4是参与免疫反应中的受体物质,在脑梗死发生及发展过程中发挥重要作用。本研究结果显示,与血管再通患者比较,血管再闭塞患者hs-CRP、APN、TLR4水平较高。三者均未被纳入多因素方程,分析其原因可能为三者均为反映脑梗死严重程度的指标,但与其他因素存在交互作用。本研究对三者的预测价值进行探讨,结果显示三者预测预后的曲线下面积均 $>0.7$ ,提示三者均有一定预测效果。

综上,脑梗死溶栓后血管再闭塞发生率较高,多种因素与之相关,临床可根据危险因素评估血管再闭塞风险,另外血清hs-CRP、APN、TLR4等血清学指标也可一定程度评估血管再闭塞风险,可为临床提供参考。

### 参考文献

- [1] Edfors R, Sahlén A, Szummer K, et al. Outcomes in patients treated with ticagrelor versus clopidogrel after acute myocardial infarction stratified by renal function [J]. Heart, 2018, 7(22):5436.
- [2] Shigekiyo T, Yagi H, Sekimoto E, et al. Cerebral infarction and iron deficiency anemia due to uterine myoma in two middle-aged women with histidine-rich glycoprotein deficiency [J]. Thromb Res, 2020, 19(1):441-445.
- [3] Teng L, Meng R. Long non-coding RNA MALAT1 promotes acute cerebral infarction through miRNAs-mediated hs-CRP regulation [J]. J Mol Neurosci, 2019, 69(3):494-504.
- [4] 徐功蒲, 李曦, 曾宪容. 脂联素水平对急性脑梗死患者预后的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2019, 39(18):4405-4408.

(下转第798页)

# MGMT、h MLH1 基因在人脑胶质瘤中的表达及对常见药物化疗敏感性的影响研究

王传玺 梅洁 闫兆月 张凤平 段冉 丁良晓\*

**【摘要】** 目的 研究 O6-甲基鸟嘌呤-DNA 甲基转移酶(MGMT)、错配修复基因(h MLH1)基因在人脑胶质瘤组织中的表达情况及其对多种常见药物化疗敏感性的影响。**方法** 于2017年6月至2020年10月本院行开颅手术切除的80例胶质瘤石蜡切片标本,按照2:1比例于同一时期抽取40例患者经脑外伤减压切除的正常脑组织切片标本,均采用免疫组化法检测两种标本中MGMT和h MLH1基因表达情况,并采用组织块培养-终点染色-计算机图像分析法完成(TECIA)药敏检测,以分析其对常见药物化疗敏感性的影响。**结果** 脑胶质瘤、正常脑组织中MGMT基因阳性表达率,hMLH1基因阳性表达率比较差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。4种不同病理类型脑胶质瘤组织MGMT与h MLH1基因表达差异无统计学意义( $P>0.05$ ),而病理分级Ⅱ级、Ⅲ级、Ⅳ级脑胶质瘤组织中MGMT与h MLH1基因阳性表达率依次升高,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。洛莫司汀、替尼泊苷、替莫唑胺敏感率与病理分级有关( $P<0.05$ ),且MGMT、TopoⅡ阳性表达洛莫司汀、福莫司汀、替尼泊苷、尼莫司汀、替莫唑胺敏感率均明显低于阴性表达( $P<0.05$ )。**结论** MGMT和h MLH1基因在人脑胶质瘤标本中阳性表达率较高,且其可影响多种药物化疗敏感性。

**【关键词】** 人脑胶质瘤;MGMT基因;h MLH1基因;化疗敏感性

## Expression of MGMT and h MLH1 in glioma and its influence on chemosensitivity to common drugs

WANG Chuanxi, MEI Jie, YAN Zhaoyue, ZHANG Fengping, DUAN Ran, Ding Genxiao\*

(Department of Neurosurgery, Henan people's Hospital, Zhengzhou, Henan, China, 450007)

**【ABSTRACT】 Objective** To study the expression of O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) and human mismatches repair gene (h MLH1) in glioma tissues and its influence on chemosensitivity to common drugs. **Methods** The paraffin section specimens of 80 patients with glioma treated by craniotomy and resection in Zhumadian Central Hospital between June 2017 and October 2020 were collected. According to the ratio of 2:1, the normal brain tissue section specimens of 40 patients undergoing decompression for brain trauma were collected during the same period. Immunohistochemistry was used to detect the expression of MGMT and h MLH1 in the two kinds of specimens, and the tissue culture end point staining computer image analysis (TECIA) was used for drug sensitivity test to analyze the influence on chemosensitivity to common drugs. **Results** There were statistically significant differences in the positive expression rates of MGMT and h MLH1 in glioma and normal brain tissues ( $P<0.05$ ). There were no statistically significant differences in the expression of MGMT and h MLH1 in the four different pathological types of glioma tissues ( $P>0.05$ ). The positive expression rates of MGMT and h MLH1 in pathological grade Ⅱ, Ⅲ, and Ⅳ glioma tissues increased successively ( $P<0.05$ ). Lomustine, teniposide, and temozolomide were related to pathological grade ( $P<0.05$ ). The sensitivity rates to lomustine, fotemustine, teniposide, nimustine, and temozolomide were all significantly lower in patients with positive expression of MGMT and TopoⅡ than in those with negative expres-

基金项目:河南省医学科技攻关计划项目(201601016)

作者单位:河南省人民医院神经外科,河南,郑州 450007

\*通信作者:丁良晓, E-mail:18530863335@163.com

sion ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The positive expression rates of MGMT and hMLH1 in glioma specimens are high, and they can affect chemosensitivity to multiple drugs.

**[KEY WORDS]** Glioma; MGMT; h MLH1; Chemosensitivity

人脑胶质细胞瘤[又简称“脑胶质瘤”(glioma),后文均用简称]在所有颅内病变、颅内恶性肿瘤中占比约为45%、80%<sup>[1]</sup>。洛莫司汀、福莫司汀、替尼泊昔、尼莫司汀、替莫唑胺等一线化疗药物在临床脑胶质瘤治疗中几乎必不可少,具有生物利用度较高、易透过血脑屏障、毒副反应风险低等优势。然而实际临床中部分患者化疗疗效难以尽如人意,孙琳<sup>[2]</sup>等研究显示脑胶质瘤患者经替莫唑胺化疗药物获得有效率仅为34%,重要影响因素即化疗药物耐药。脑胶质瘤耐药机制复杂,当前认为可能与多种基因有关,进一步探索肿瘤组织中相关耐药基因表达水平对肿瘤恶性程度判断、化疗敏感性评价及指导针对性治疗有一定现实意义。O6-甲基鸟嘌呤-DNA甲基转移酶(O6-methylguanine-DNA methyltransferase, MGMT)、错配修复基因(Human mutL homolog 1, h MLH1)近年来因已被证实与胃肠道肿瘤、肺癌、乳腺癌等化疗耐药有关而引起了临床学者广泛重视<sup>[3-5]</sup>。本研究旨在分析这两者基因在人脑胶质瘤中的表达及对常见药物化疗敏感性的影响。

## 1 标本与方法

### 1.1 标本来源

于2017年6月至2020年10月,收集本院行开颅手术切除的80例胶质瘤石蜡切片标本,对应患者术后经细胞学或组织病理学获得胶质瘤明确诊断<sup>[6]</sup>;≥18岁;术前未接受化疗等其他相关治疗;标本对应病例资料信息完善。男女比例为3:2;平均年龄(47.55±10.71)岁;病理类型含有39例(48.75%)星形细胞瘤、19例(23.75%)室管膜瘤、15例(18.75%)少突胶质细胞瘤与7例(8.75%)胶质母细胞瘤;世界卫生组织胶质瘤病理分级<sup>[7]</sup>含有25例(31.25%)为Ⅱ级、35例(43.75%)为Ⅲ级、20例(25.00%)为Ⅳ级。同一时期抽取40例患者经脑外伤减压切除的脑组织切片标本,明确为正常脑组织,男女比例为3:2;平均年龄(49.07±11.60)岁,与脑胶质瘤标本对应患者的性别比例、年龄相比差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。所有患者及家属均知情同意。本实验经医院伦理委员会批准。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 MGMT与h MLH1蛋白免疫组化检测

脑胶质瘤、正常脑组织标本蜡块进行修整后,调整位置连续切割3~4 μm切片,放载玻片烘烤、100%乙醇中脱水后梯度水化,冲洗后放于含抗原修复液的高压锅中持续加热,之后于室温冷却完成抗原修复。随后室温下封闭孵育,PBS反复洗涤后即可加入对应抗体(一抗,其中鼠抗人MGMT抗体、兔抗人h MLH1抗体均购买于美国Abcam公司),4℃冰箱过夜孵育后予以PBS液再次反复冲洗后即可给予二抗,之后室温继续孵育,PBS液反复冲洗后依次完成DAB与H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>显色液配制、复染、二甲苯浸泡透明、中性树脂封片、光学显微镜下阅片等操作。

#### 1.2.2 结果判读<sup>[8]</sup>

随机择取5个高倍显微镜(400×)视野,观察阳性细胞对应染色强度及所占百分比,基于二者的乘积完成最终评分;阳性细胞无着色、着浅黄色、着棕黄色、着棕褐色依次记为0分、1分、2分、3分,阳性细胞所占百分比<5%、≥5%且<25%、≥25%且<50%、≥50%且<75%及≥75%依次记为0分、1分、2分、3分、4分;最终评分0分为阴性(-),1~4、5~8、9~12分均视为为阳性,分别为(+)、(++)及(+++)。

#### 1.2.3 敏感性试验

标本除菌洗涤液:含双抗的无血清RPMI-1640培养液,青霉素与链霉素浓度为100 μg/mL;组织培养液:含10%小牛血清的RPMI-1640培养液,噻唑蓝溶液浓度为10 mg/mL,通过生理盐水配制及除菌处理后备用,4摄氏度环境避光保存。化疗药物及其对应浓度:洛莫司汀、福莫司汀均为10 μg/mL,替尼泊昔20 μg/mL,尼莫司汀6.5 μg/mL及替莫唑胺7 μg/mL。所用药物浓度均参考说明书所给血浆峰浓度,选用灭菌注射用水作为配药溶剂。组织培养药敏采用组织块培养-终点染色-计算机分析法(tissue culture-end point staining computer image analysis, TECIA),组织培养为四孔同步法,可保证组织块存活及培养成功,即四孔培养基中平均有3孔以上存活。参照文献<sup>[9]</sup>方法计算

化疗药物抑制率(IR),药物敏感性以IR作为评价标准,IR>50%为敏感,30%~50%为中度敏感,<30%为耐药。

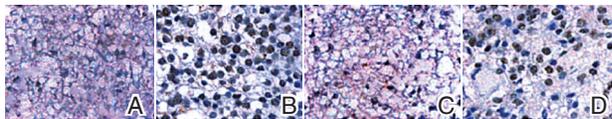
### 1.3 统计学方法

采用SPSS 22.0软件进行数据处理,计数资料用n(%)描述,行 $\chi^2$ 检验,以P<0.05为差异有统计学意义。

表1 MGMT、h MLH1 表达比较 [n(%)]

Table 1 expression comparison of MGMT and h-mlh1 [n(%)]

标本	4	MGMT 阳性表达程度				MGMT 阳性表达率	h MLH1 阳性表达程度				h MLH1 阳性表达率
		-	+	++	+++		-	+	++	+++	
脑胶质瘤组织	80	29	24	19	8	51(63.75)	36	20	12	12	44(55.00)
正常脑组织	40	37	3	0	0	3(7.50)	39	1	0	0	1(2.50)
$\chi^2$ 值						34.091					31.360
P值						0.000					0.000



注:A为正常脑组织MGMT基因表达(-);B为Ⅲ级胶质瘤MGMT基因表达(+++);C为正常脑组织h MLH1基因表达(-);D为Ⅲ级胶质瘤h MLH1基因表达(++)。

图1 MGMT、h MLH1 基因在脑胶质瘤、正常脑组织中表达(SP,×400)

Figure 1 expression of MGMT and H MLH1 genes in glioma and normal brain tissues (SP,×400)

### 2.2 不同病理类型、分级脑胶质瘤组织MGMT与h MLH1 基因表达情况

不同病理类型脑胶质瘤组织脑胶质瘤组织中MGMT与h MLH1 基因阳性表达率均无统计学意义(P>0.05),而病理分级Ⅱ级、Ⅲ级、Ⅳ级脑胶质瘤组织中MGMT与h MLH1 基因阳性表达率依次升高,差异有统计学意义(P<0.05)。见表2。

### 2.3 化疗敏感性与病理特征及MGMT、h MLH1 基因免疫组化因子表达强度的关系

莫司汀、替尼泊苷、替莫唑胺敏感率与病理分级有关(P<0.05),MGMT、h MLH1 阳性表达洛莫司汀、福莫司汀、替尼泊苷、尼莫司汀、替莫唑胺敏感率均明显低于阴性表达,差异有统计学意义(P<0.05)。见表3。

## 3 讨论

本研究发现MGMT、h MLH1 两种基因在对应脑组织标本中均在细胞核呈现棕黄色颗粒或阳性

## 2 结果

### 2.1 不同脑组织MGMT与h MLH1 基因表达情况

脑胶质瘤、正常脑组织中MGMT与h MLH1 基因表达程度差异比较均有统计学意义(P<0.05)。见表1。MGMT与h MLH1 均在细胞核呈现棕黄色颗粒或阳性显色弥散分布。见图1。

表2 不同病理、分级类型脑胶质瘤组织MGMT与h MLH1 基因表达比较 [n(%)]

Table 2 Comparison of MGMT and hMLH1 gene expression in different pathological and grading types of gliomas [n(%)]

项目	n	MGMT 阳性	h MLH1 阳性
病理类型			
星形细胞瘤	39	24(74.36)	21(53.85)
室管膜瘤	19	10(52.63)	14(73.68)
少突胶质细胞瘤	15	7(46.67)	6(40.00)
胶质母细胞瘤	7	3(71.43)	3(42.86)
$\chi^2$ 值		4.989	4.482
P值		0.173	0.214
病理分级			
Ⅱ级	25	8(38.10)	5(20.00)
Ⅲ级	35	24(68.57) <sup>a</sup>	21(46.67) <sup>a</sup>
Ⅳ级	20	19(95.00) <sup>ab</sup>	18(90.00) <sup>ab</sup>
$\chi^2$ 值		15.090	21.966
P值		0.001	0.000

注:与Ⅱ级比较,<sup>a</sup>P<0.05;与Ⅲ级比较,<sup>b</sup>P<0.05。

显色弥散分布,而且MGMT和h MLH1 基因在人脑胶质瘤标本中阳性表达率高,与Deimling<sup>[9]</sup>等及李孟凯<sup>[10]</sup>等早期报道结果一致;同时,MGMT和h MLH1 基因表达与脑胶质瘤病理类型无关,与疾病进展有一定关联。其中MGMT作为一种DNA修复酶,具有修复经亚硝胺类化疗药物引起的DNA烷基化损害作用,可直接影响脑胶质瘤化疗效果甚至促使化疗失败,最终导致肿瘤进展。Wen<sup>[11]</sup>等报道证实脑胶质瘤组织MGMT基因表达异常升高,且与病理分级及预后密切相关。事实上,h MLH1 基因为h MLH中重要的一员,在DNA错配修复功能缺陷中扮演了举足轻重的角色,被

表3 化疗敏感性与病理特征及MGMT、h MLH1基因表达强度的关系 [n(%)]

Table 3 The relationship between chemosensitivity and pathological features and the expression of MGMT and hMLH1 genes

组别	n	洛莫司汀	福莫司汀	替尼泊苷	尼莫司汀	替莫唑胺
男性	40	23(57.50)	19(47.50)	26(65.00)	18(45.00)	19(47.50)
女性	40	22(55.00)	22(55.00)	27(67.50)	21(52.50)	23(57.50)
$\chi^2$ 值		0.051	0.491	0.056	0.450	0.243
P值		0.821	0.483	0.813	0.502	0.622
<60岁	52	29(55.77)	29(55.77)	31(59.62)	25(48.08)	29(55.77)
≥60岁	28	16(57.14)	12(42.86)	22(78.57)	14(50.00)	13(46.43)
$\chi^2$ 值		0.014	1.241	2.925	0.027	0.913
P值		0.905	0.265	0.087	0.869	0.339
星形细胞瘤	29	16(55.17)	16(55.17)	20(68.97)	14(48.28)	15(51.72)
室管膜瘤	24	14(58.33)	11(45.83)	16(66.67)	12(50.00)	13(54.17)
少突胶质细胞瘤	18	10(55.56)	10(55.56)	11(61.11)	9(50.00)	9(50.00)
胶质母细胞瘤	9	5(55.56)	4(44.44)	6(66.67)	4(44.44)	5(55.56)
$\chi^2$ 值		0.006	0.761	0.311	0.096	0.113
P值		0.996	0.859	0.958	0.992	0.990
Ⅱ级	27	20(75.00)	16(59.26)	22(81.48)	14(51.85)	9(33.33)
Ⅲ级	36	20(55.56)	17(47.22)	25(69.44)	18(50.00)	20(55.56)
Ⅳ级	17	4(23.53)	8(47.06)	6(35.29)	7(41.18)	13(76.47)
$\chi^2$ 值		11.349	1.047	10.252	0.571	6.478
P值		0.003	0.593	0.006	0.772	0.034
MGMT 阴性	29	21(72.41)	26(89.66)	25(86.21)	25(86.21)	21(72.41)
MGMT 阳性	51	24(47.06)	15(29.41)	28(54.90)	14(27.45)	21(41.18)
$\chi^2$ 值		4.830	26.855	8.103	25.454	7.234
P值		0.027	0.000	0.004	0.000	0.007
h MLH1 阴性	36	24(66.67)	24(66.67)	30(83.33)	23(63.89)	25(56.82)
h MLH1 阳性	44	19(43.18)	19(43.18)	23(52.27)	16(36.36)	17(38.64)
$\chi^2$ 值		3.992	3.992	8.543	6.004	7.536
P值		0.046	0.046	0.003	0.014	0.006

视为包括脑胶质瘤在内的多种肿瘤的诊断特异性指标,王磊<sup>[12]</sup>等报道即曾证实 h MLH1 基因表达与结肠癌发生及进展有关。

本研究中除了病理分级可影响人脑胶质瘤部分药物化疗敏感性以外, MGMT 和 h MLH1 基因可影响多种药物化疗敏感性, 包括洛莫司汀、福莫司汀、替尼泊苷、尼莫司汀、替莫唑胺, 即 MGMT、h MLH1 表达程度与化疗敏感性密切相关。由于 MGMT 能够修复以烷化剂为代表的抗肿瘤药物引起的细胞损伤, 因此可通过肿瘤组织中表达水平反映对烷化剂如洛莫司汀、替莫唑胺等的敏感性<sup>[13]</sup>。Holmes<sup>[14]</sup>等学者发现, MGMT 高表达的肿瘤细胞对烷化剂抗癌药耐药性比低表达更显著, 认为下调表达阳性或高表达胶质瘤中 MGMT 表达对于提高替莫唑胺等一线药物化疗效果有助益。需指出的是, 碱基错配修复系统与 MGMT 被视为脑胶质瘤一线药物产生耐药的最重要的两个因素, 其中前者作为修复 DNA 碱基错配的安全保

障体系, 包括多个 hMLH 基因, 均能够识别并清楚错误或异常配对的胸腺嘧啶, 倘若该体系甲基化或突变, 极易导致 DNA 错配修复功能缺陷, 继而影响药物敏感性, 而 h MLH1 正是错配修复基因最重要成员之一, 极易发生甲基化, 并引发错配修复系统失活<sup>[15]</sup>。刘容容<sup>[16]</sup>等证实了 h MLH1 基因阳性表达可影响替莫唑胺化疗敏感性, 也认为可能机制为 h MLH1 基因启动子甲基化增强。上述均说明 MGMT、h MLH1 基因与脑胶质瘤治疗过程药物敏感性有关, 支持了本研究结论, 故推测以上两个基因对改善脑胶质瘤化疗耐药性有一定指导作用, 即通过降低 MGMT、hMLH 表达可能能够降低恶性脑胶质瘤对相关药物的耐药性, 增强化疗敏感性, 但其具体实践效果有待研究证实。此外, MGMT 和 h MLH1 基因影响多种化疗药物敏感性的原因还可能为二者均参与促进脑胶质瘤细胞侵袭, 但其具体机制有待后续研究论证。

## 参考文献

- [1] 吕超, 孙慧渊, 闫俊飞. CCL18, HIF-1 $\alpha$ , MIF mRNA 在人类胶质瘤中的表达及预后评估价值[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(8):1060-1063.
- [2] 孙琳, 魏琪, 刘利敏, 等. 神经胶质瘤组织及外周血中 ERCC1 的表达水平与替莫唑胺化疗效果的相关性研究[J]. 卒中与神经疾病, 2019, 26(4):69-73.
- [3] 陈鹏, 汪文杰, 李盖天, 等. hMLH1、hMSH2、hMSH6 在中青年散发性胃癌中的表达及其对其预后的影响[J]. 兰州大学学报(医学版), 2018, 44(4):44-49.
- [4] 杨洁, 袁江伟, 郭威, 等. MGMT 蛋白表达对脑恶性胶质瘤切除术后化疗方案的影响[J]. 广东医学, 2015, 22(11):1722-1725.
- [5] 付江萍, 蓝柳, 胡芳, 等. 食管癌组织中 PD-L1, Vim, Zeb1 的表达与放疗敏感性的关系分析[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(8):112-116.
- [6] 王晓冰, 荆国杰, 杨清绪, 等. 脑肿瘤术中冰冻切片 126 例病理诊断分析[J]. 中国误诊学杂志, 2006, 6(16):3161-3161.
- [7] Louis D N, Ohgaki H, Wiestler O D, et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system [J]. *Acta Neuropathol*, 2007, 114(2):97-109.
- [8] 卞伟, 戴勤弼, 童建国, 等. 59 份人脑胶质瘤组织体外培养的药敏分析[J]. 重庆医学, 2010, 39(18):66-69.
- [9] Deimling AV, Korshunov A, Hartmann C. The next generation of glioma biomarkers: MGMT methylation, BRAF fusions and IDH1 mutations[J]. *Brain Pathol*, 2015, 21(1):74-87.
- [10] 李孟凯, 孙彦辉, 张亚楠, 等. 胶质瘤干细胞错配修复基因 hMLH1 和 hMSH2 与替莫唑胺耐药相关性研究[J]. 中华神经外科杂志, 2013, 29(11):1101-1105.
- [11] Wen W, Li J S, Lin F, et al. Expression and prognostic value of mRNAs in lower grade glioma with MGMT promoter methylated[J]. *J Clin Neurosci*, 2020, 27(75):45-51.
- [12] 王磊, 张宁妹, 张晓莉, 等. 错配修复基因 hMLH1、hMSH2、hMSH6 和 hPMS2 在左、右半结肠癌表达差异研究[J]. 宁夏医科大学学报, 2019, 41(3):236-239.
- [13] 杜希越, 薛晓英, 盖晓惠, 等. 脑胶质瘤分子标志物 IDH1R132 突变、MGMT 和 Ki-67 与病理分级及预后关系的研究[J]. 安徽医科大学学报, 2017, 52(3):417-421.
- [14] Holmes JA, Paulsson AK, Page BR, et al. Genomic predictors of patterns of progression in glioblastoma and possible influences on radiation field design [J]. *J Neuro-oncol*, 2015, 124(3):447-453.
- [15] Kim JG, Shin S, Park J. Comparison between mononucleotide and dinucleotide marker panels in gastric cancer with loss of hMLH1 or hMSH2 expression[J]. *Int J Biol Markers*, 2017, 32(3):e352-e356.
- [16] 刘容容, 邱振纲, 何晓, 等. hMLH1 基因对脑胶质瘤替莫唑胺耐药的影响及机制研究[J]. 赣南医学院学报, 2018, 38(3):218-221.
- [5] Zhang C. Correlations of acute myocardial infarction complicated by cerebral infarction with insulin resistance, adiponectin and HMGB1 [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(10):4425-4431.
- [6] Qi J, Rong Y, Wang L, et al. Rab7b overexpression-ameliorated ischemic brain damage following tMCAO involves suppression of TLR4 and NF- $\kappa$ B p65 [J]. *J Mol Neurosci*, 2019, 7(5):224-227.
- [7] 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.
- [8] Grotta JC, Welch KMA, Fagan SC, et al. Clinical Deterioration Following Improvement in the NINDS rt-PA Stroke Trial [J]. *Stroke*, 2001, 32(3):661-668.
- [9] Suh SH, Cloft HJ, Fugate JE, et al. Clarifying differences among thrombolysis in cerebral infarction scale variants: is the artery half open or half closed? [J]. *Stroke*, 2013, 44(4):1166-1168.
- [10] Mosimann PJ, Kaesmacher J, Gautschi D, et al. Predictors of unexpected early reocclusion after successful mechanical thrombectomy in acute ischemic stroke patients [J]. *Stroke*, 2018, 49(11):1.
- [11] 苏建, 张津华, 蒋超. 阿替普酶静脉溶栓治疗急性脑梗死血管再闭塞的影响因素 [J]. *中国老年学杂志*, 2019, 10(4):415-417.
- [12] 赵勇, 汤其强, 许啟伍, 等. NIHSS 评分联合 DSA 检查对急性缺血性卒中患者侧支循环及静脉溶栓治疗预后的评估价值 [J]. *临床神经病学杂志*, 2018, 31(5):18-22.
- [13] Baik SK, Choi W, Oh SJ, et al. Change in cortical vessel signs on susceptibility-weighted images after full recanalization in hyperacute ischemic stroke [J]. *Cerebr Dis*, 2012, 34(3):206-212.
- [14] Zhang T. Elevated plasma haptoglobin level as a potential marker for poor prognosis in acute cerebral infarction [J]. *Eur Neurol*, 2018, 7(11):526-529.
- [15] 孙媛媛, 余其贵, 谢军. 血清 Hcy、hs-CRP 在急性脑梗死患者的表达及与病情程度的相关性 [J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2020, 12(12):1652-1656.

(上接第 793 页)

# 支气管哮喘急性发作期患儿治疗后 IFN- $\gamma$ 、IL-1 $\beta$ 及 IgE 变化研究

陈文欣<sup>1\*</sup> 张秋月<sup>2</sup> 王道方<sup>1</sup> 孟桂芝<sup>1</sup>

**【摘要】目的** 分析特布他林联合布地奈德雾化吸入治疗对支气管哮喘急性发作期患儿伽马干扰素(IFN- $\gamma$ )、白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )及免疫球蛋白E(IgE)的影响。**方法** 收集本院2018年6月至2020年6月收治的300例支气管哮喘急性发作患儿的临床资料。根据不同治疗方法分为对照组( $n=148$ 例,常规综合治疗)与研究组( $n=152$ 例,特布他林联合布地奈德雾化吸入治疗),比较两组临床疗效、临床症状与体征消失时间、肺功能、IFN- $\gamma$ 、IL-1 $\beta$ 、IgE及不良反应发生情况。**结果** 对照组治疗后总有效率为80.41%,显著低于研究组的92.11%,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。研究组咳嗽、喘憋、哮鸣音及湿罗音消失时间明显短于对照组,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。治疗后,两组肺功能指标用力吸气肺活量(FVC)、第一秒最大呼气量占预计值的百分比(FEV1%Pred)、呼气流量峰值(Peak expiratory flow, PEF)水平及血清因子IFN- $\gamma$ 均较治疗前显著上升,IL-1 $\beta$ 、IgE水平显著下降,且研究组上述因子改善更为明显,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。两组均未发生其他严重不良反应。**结论** 特布他林联合布地奈德雾化吸入治疗支气管哮喘急性发作期患儿疗效明确,可减轻机体炎症反应,改善患儿肺功能,且安全性较高。

**【关键词】** 特布他林;布地奈德;支气管哮喘急性发作;血清因子

## Study on the changes of IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ and IgE in children with acute exacerbation of bronchial asthma after treatment

CHEN Wenxin<sup>1\*</sup>, ZHANG Qiuyue<sup>2</sup>, WANG Daofang<sup>1</sup>, MENG Guizhi<sup>1</sup>

(1. Department of Pediatrics, The Second People's Hospital of Liaocheng, Liaocheng, Shandong, China, 252600; 2. Department of Laboratory, The Second People's Hospital of Liaocheng, Liaocheng, Shandong, China, 252600)

**【ABSTRACT】 Objective** To analyze the effect of terbutaline combined with budesonide aerosol inhalation therapy on interferon gamma- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), interleukin-1 $\beta$  (Interleukin, IL-1 $\beta$ ) and immunoglobulin E (Immunoglobulin E, IgE) in children with acute exacerbation of bronchial asthma. **Methods** The clinical data of 300 children with acute exacerbation of bronchial asthma admitted in this hospital from June 2018 to June 2020 were collected. According to different treatment methods, they were divided into a control group ( $n=148$  cases, conventional comprehensive treatment) and a study group ( $n=152$  cases, terbutaline combined with budesonide aerosol inhalation therapy). The clinical efficacy, disappearance time of clinical symptoms and signs, lung function, IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IgE, and adverse reactions were compared between the two groups. **Results** The total effective rate after treatment in the control group was 80.41%, which was significantly lower than the 92.11% in the study group, and the difference was statistically significant ( $P<0.05$ ). The disappearance time of cough, dyspnea, wheezing and moist rales in the study group was significantly shorter than that in the control group, and the difference was statistically significant ( $P<0.05$ ). After treatment, the lung function

基金项目:山东省卫生厅基金资助项目(2018HZ035)

作者单位:1.聊城市第二人民医院小儿科,山东,聊城 252600

2.聊城市第二人民医院检验科,山东,聊城 252600

\*通信作者:陈文欣, E-mail:zheng81637cai522@163.com

indexes forced vital capacity (FVC), the percentage of forced expiratory volume in one second to the predicted value (FEV1 % Pred), peak expiratory flow (PEF) and serum factor IFN- $\gamma$  increased in the two groups, and IL-1 $\beta$  and IgE levels decreased significantly, the above factors in the study group improved more significantly, and the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). No other serious adverse reactions occurred in the two groups. **Conclusion** Terbutaline combined with budesonide aerosol inhalation therapy has a clear curative effect in the treatment of children with acute bronchial asthma, which can reduce the body's inflammatory response and improve the lung function of children with high safety.

**[KEY WORDS]** Terbutaline; Budesonide; Acute attack of bronchial asthma; Serum factor

支气管哮喘是气道的一种慢性变态反应性炎症疾病。我国儿童支气管哮喘发病率呈逐年上升趋势,对患儿的生活质量及身心健康造成严重影响<sup>[1-2]</sup>。儿童支气管哮喘的急性发作可在短时间内导致气道痉挛、呼吸困难,是儿科常见的急重症,快速采取抢救措施,缓解其临床症状对挽救患儿生命至关重要。哮喘发病机制极为复杂,研究认为其与炎症反应、免疫调节紊乱、突发感染及遗传等因素均存在一定相关性<sup>[3-4]</sup>。目前,吸入糖皮质激素治疗是临床治疗小儿支气管哮喘的常用方法,亦是公认有效的抗炎制剂;吸入药物可以以较高浓度迅速到达病变部位,因而起效迅速<sup>[5]</sup>。本组研究应用特布他林联合布地奈德雾化吸入治疗支气管哮喘急性发作期患儿,并测定其体内伽马干扰素(Interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ )、白细胞介素-1 $\beta$ (Interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )及免疫球蛋白E(Immunoglobulin E, IgE)水平对于预测病情及判断诊疗效的临床意义,现将结果报道如下。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

收集本院2018年6月至2020年6月收治的300例支气管哮喘急性发作患儿的临床资料。纳入标准:①均符合支气管哮喘诊断标准<sup>[6]</sup>;②临床资料无丢失和缺损;③入院前6个月内未服用过激素、免疫类药物;④近6周内无呼吸道感染史者。排除标准:①中途转入或转出者;②合并肺部其他恶性病变者。遵循医嘱选取合适治疗方案,根据不同治疗方法将患儿分为对照组( $n=148$ 例)与研究组( $n=152$ 例)。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。

### 1.2 方法

两组均给予吸氧、镇静、抗感染、静脉滴注激素等常规综合治疗,研究组在此基础上加用空气压缩泵雾化吸入特布他林联合布地奈德治疗,布地

表1 两组一般资料比较( $\bar{x} \pm s$ )

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

组别	<i>n</i>	性别 (男/女)	年龄 (月)	平均病程 (d)	体重指数 (kg/m <sup>2</sup> )
对照组	148	93/55	10.71 $\pm$ 0.21	1.78 $\pm$ 0.31	14.56 $\pm$ 1.32
研究组	152	96/56	10.69 $\pm$ 0.36	1.82 $\pm$ 0.37	14.69 $\pm$ 1.28
$\chi^2$ 值		3.365	0.586	1.014	0.866
<i>P</i> 值		0.067	0.559	0.312	0.387

奈德(上海上药信谊药厂有限公司,国药准字H20010552)0.5 mg~1 mg,特布他林(成都华宇制药有限公司,国药准字H20010704)5 mg,5~10 min/次,2次/d,雾化治疗结束后漱口。两组均治疗1周。

### 1.3 观察指标

#### 1.3.1 临床疗效

疗效评估<sup>[7]</sup>:显效、有效、无效。总有效率=(显效+有效)/总例数 $\times$ 100%。

1.3.2 临床症状、体征 比较两组咳嗽、喘憋等临床症状、体征消失时间

#### 1.3.3 肺功能

检测指标包括用力吸气肺活量(Forced vital capacity, FVC)、第一秒最大呼气量占预计值的百分比(FEV1%Pred)、呼气流量峰值(Peak expiratory flow, PEF)。检测仪器采用德国JAEGER公司生产的Master Screen。

#### 1.3.4 血清因子

检测指标包括伽马干扰素(Interferon gamma- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ )、白细胞介素-1 $\beta$ (Interleukin, IL-1 $\beta$ )及免疫球蛋白E(Immunoglobulin E, IgE)。检测方法:于治疗前后抽取患儿4 mL静脉血,3 500 r/min离心15 min,分离上层血清,-20 $^{\circ}$ C低温保存待检。IFN- $\gamma$ 、IL-1 $\beta$ 及IgE水平均采用酶联免疫法检测,检测仪器:美国贝克曼AU5800全自动生化分析仪及其配套试剂盒。操作严格按照说明书执行。

#### 1.3.5 不良反应

记录并观察治疗过程中患者不良反应情况,

包括口部刺痛、胃肠道反应(恶心、呕吐等)。

### 1.4 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析, 计量资料采用  $(\bar{x} \pm s)$  描述, 行  $t$  检验; 计数资料通过  $n(\%)$  表示, 行  $\chi^2$  检验; 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 两组患儿临床疗效比较

对照组治疗后总有效率为 80.41%, 显著低于研究组的 92.11%, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 2。

表 2 两组患儿临床比较 [ $n(\%)$ ]

组别	$n$	显效	有效	无效	总有效率
对照组	148	60(40.54)	59(39.86)	29(19.59)	119(80.41)
研究组	152	96(63.16)	44(28.95)	12(7.89)	140(92.11)
$\chi^2$ 值					8.700
$P$ 值					0.003

### 2.2 两组临床症状、体征消失时间比较

两组治疗后气促缓解时间比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 研究组咳嗽、喘憋、哮鸣音及湿罗音消失时间明显短于对照组, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

表 3 两组临床症状、体征消失时间比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	$n$	咳嗽消失	喘憋消失	哮鸣音消失	湿罗音消失	气促缓解
对照组	148	7.64±2.54	5.16±1.69	5.09±1.06	6.27±1.52	2.69±1.26
研究组	152	5.59±2.41	3.05±1.01	4.11±1.42	5.03±1.87	2.45±1.19
$\chi^2$ 值		7.173	13.167	6.760	6.293	1.697
$P$ 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.091

表 4 两组治疗前后肺功能指标比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	$n$	FVC(L)		FEV1%Pred(%)		PEF(v/L·s)	
		治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
对照组	148	1.46±0.74	2.01±0.84 <sup>a</sup>	78.21±17.35	84.06±13.01 <sup>a</sup>	1.89±0.12	2.46±1.21 <sup>a</sup>
研究组	152	1.41±0.63	3.05±1.01 <sup>a</sup>	77.59±14.76	89.65±12.11 <sup>a</sup>	1.88±0.13	3.01±1.62 <sup>a</sup>
$t$ 值		0.631	9.683	0.334	3.853	0.692	3.325
$P$ 值		0.529	<0.001	0.739	<0.001	0.490	0.001

注: 与同组治疗前比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ 。

表 5 两组治疗前后 IFN- $\gamma$ 、IL-1 $\beta$  及 IgE 水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	$n$	IFN- $\gamma$ (pg/mL)		IL-1 $\beta$ (ng/L)		IgE(mg/mL)	
		治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
对照组	148	4.58±1.42	5.21±1.11 <sup>a</sup>	77.01±16.42	56.34±8.89 <sup>a</sup>	23.19±3.31	15.19±3.15 <sup>a</sup>
研究组	152	4.41±1.38	6.03±1.67 <sup>a</sup>	76.84±13.67	34.12±6.25 <sup>a</sup>	23.65±2.46	11.83±2.37 <sup>a</sup>
$t$ 值		1.052	4.995	0.098	25.097	1.369	10.458
$P$ 值		0.294	<0.001	0.922	<0.001	0.172	<0.001

注: 与同组治疗前比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ 。

义 ( $P < 0.05$ )。见表 3。

### 2.3 两组治疗前后肺功能指标比较

两组治疗后肺功能指标 FVC、FEV1%Pred 及 PEF 水平均较治疗前上升, 且研究组上升更为显著, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 4。

### 2.4 两组治疗前后 IFN- $\gamma$ 、IL-1 $\beta$ 及 IgE 水平比较

两组治疗后 IFN- $\gamma$  水平明显上升, IL-1 $\beta$ 、IgE 水平显著下降, 且研究组 IFN- $\gamma$  水平显著高于对照组, IL-1 $\beta$ 、IgE 水平低于对照组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 5。

### 2.5 不良反应

治疗后, 对照组无不良反应发生; 研究组仅 1 例口咽部轻微刺痛, 经漱口等对症处理后好转, 两组均未发生其他严重不良反应。

## 3 讨论

哮喘是小儿呼吸道常见的一种变态反应性疾病, 病因复杂。哮喘急性发作时缺氧、呼吸困难明显, 在给予常规治疗的同时, 迅速解除患儿呼吸困难, 保证正常的通气/血流比值, 改善其缺氧状态, 避免呼吸衰竭、心力衰竭的发生尤其重要<sup>[8-9]</sup>。

特布他林属于一种短效  $\beta_2$  受体激动剂, 支气管舒张作用较强, 吸入 3 min 后起效, 是哮喘急性发作期使用的基础药物<sup>[10]</sup>。特布他林可通过选择性兴奋  $\beta_2$  受体扩张支气管并可增加由于阻塞性肺疾病降低的黏液纤毛清洁功能, 从而加速黏液分泌物的清除, 缓解患儿哮喘症状<sup>[11]</sup>。

布地奈德则是一种非卤代化糖皮质激素, 局部抗炎效果较强, 是地塞米松的 900 倍<sup>[12]</sup>。Chernyavsky 等<sup>[13]</sup> 研究发现, 布得奈得联合特布他林可有效治疗儿童支气管炎, 两种药物共同作用, 可短时间内缓解患儿临床症状, 改善其病情, 消除炎症。Andrea 等<sup>[14]</sup> 研究则表明, 氧气驱动雾化吸入的药物可短时间内到达整个肺部, 在肺部的分布较均匀, 可及时缓解患者的呼吸困难以及喘息等症状, 可有效控制病情发展, 修复受损的气道。本研究结果表明联合特布他林、布得奈得治疗后, 患儿临床症状、肺功能得到明显改善, 具有良好效果。

炎症反复感染是支气管哮喘的重要病因之一。IFN- $\gamma$  是一种具有免疫调节作用的细胞因子, 在支气管哮喘急性发作时, 其水平明显降低, 引起异常的免疫应答和炎症反应<sup>[15]</sup>。IL-1 $\beta$  是 IL-1 基因编码的亚型之一, 作为 IL-1 的主要活化形式, 是一种特异性的敏感炎症指标。Bakr 等<sup>[16]</sup> 研究证实, IL-1 $\beta$  参与了哮喘的发病, 且是哮喘急性发作的一个重要指标。IgE 是在 T 淋巴细胞的控制和调节下, 由 B 淋巴细胞合成的。T 淋巴细胞是 IgE 合成调节的主要效应细胞, 当患儿发生支气管哮喘时, 其体内的淋巴细胞会受到刺激, 分泌免疫球蛋白。故 IgE 水平可作为评估支气管哮喘患儿病情的指标之一, 根据其水平的增减, 可评估治疗的效果。本组研究结果经药物治疗后可有效缓解哮喘患儿机体炎症反应。研究组 IFN- $\gamma$  水平显著高于对照组, IL-1 $\beta$ 、IgE 水平低于对照组, 与 El-Din 等<sup>[17]</sup> 研究报道一致。说明两种药物联合治疗缓解炎症反应效果更明显, 且不会增加不良反应发生, 具有一定安全性。

综上所述, 特布他林联合布地奈德雾化吸入治疗支气管哮喘急性发作期患儿疗效明确, 可减轻机体炎症反应, 改善其肺功能, 且安全性较高。

## 参考文献

[1] 江银玲, 杨万春, 沈欣. 呼出气一氧化氮与支气管哮喘患者外周嗜酸性粒细胞相关性及其联合检测价值[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(8):137-140.

- [2] 林广民. 血清 MIF, ECP, DF-sIgE 及 EOS 检测对预防儿童哮喘的临床意义[J]. 华南预防医学, 2018, 44(6):87-89.
- [3] 卓艳萍, 吉萍, 朱玉蓉. 特布他林联合阿奇霉素治疗原体肺炎患儿的疗效及安全性分析[J]. 中国妇幼保健, 2019, 34(7):121-124.
- [4] Hasegawa T, Okazawa T, Uga H, et al. Serum CXCL9 as a potential marker of Type 1 inflammation in the context of eosinophilic asthma[J]. Allergy, 2019, 74(1):54-55.
- [5] 陈元菁, 王湘云, 艾红军, 等. 雾化特布他林联合布地奈德治疗急性加重期慢性阻塞性肺疾病的临床疗效及对炎症因子的影响[J]. 山西医药杂志, 2019, 48(13):1531-1534.
- [6] 潘慧, 朱莉莉, 王晨岑, 等. 特布他林雾化治疗哮喘患儿的临床研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2019, 35(22):62-65.
- [7] Hasegawa K, Brenner BE, Nowak RM, et al. Association of Guideline-concordant Acute Asthma Care in the Emergency Department With Shorter Hospital Length of Stay: A Multi-center Observational Study [J]. Acad Emerg Med, 2016, 33(2):329-335.
- [8] Yousif M, Ali AAE, Bakr R, et al. Assessment of serum magnesium level in patients with bronchial asthma [J]. Eur Res J, 2016, 48(suppl 60):PA1005.
- [9] Hostrup M, Jessen S, Onsløv J, et al. Two-week inhalation of budesonide increases muscle Na, K ATPase content but not endurance in response to terbutaline in men[J]. Scand J Med Sci Sports, 2017, 687(3):234-240.
- [10] Gonczi CMC, Shafiei MT, East A, et al. Reciprocal modulation of helper Th1 and Th17 cells by the  $\beta_2$ -adrenergic receptor agonist drug terbutaline[J]. FEBS J, 2017, 284(18):456-457.
- [11] Salido-Fortuna S, Greo M, María Castro-Puyana, et al. Amino acid chiral ionic liquids combined with hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin for drug enantioseparation by capillary electrophoresis[J]. J Chromatogr A, 2019, 1607(105):460375.
- [12] Yap HM, Lee YZ, Harith HH, et al. The geranyl acetophenone tHGA attenuates human bronchial smooth muscle proliferation via inhibition of AKT phosphorylation [J]. Sci Rep, 2018, 8(1):465-466.
- [13] Chernyavsky IL, Russell RJ, Saunders RM, et al. In vitro, in silico and in vivo study challenges the impact of bronchial thermoplasty on acute airway smooth muscle mass loss [J]. Eur Res J, 2018, 51(5):798.
- [14] Andrea M, Alessandra V, Enrico M, et al. Is IgE or eosinophils the key player in allergic asthma pathogenesis? Are we asking the right question?[J]. Respirat Res, 2018, 19(1):113.
- [15] Arnold DH, Driest SL, Reiss TF, et al. Pilot Study of Peak Plasma Concentration After High-Dose Oral Montelukast in Children With Acute Asthma Exacerbations [J]. J Clin Pharmacol, 2020, 56(10):140-142.
- [16] Bakr YM, Shahin MM, Zidan MH, et al. Relation bronchial asthma and parasitic (nematodes) infection in Egyptian children[J]. Thorax, 2017, 72(Suppl 3):A119-120.
- [17] El-Din YME, Aboseif AA, Khalaf MM. Potential anti-inflammatory and immunomodulatory effects of carvacrol against ovalbumin-induced asthma in rats [J]. Life Sci, 2019, 242(15):117222.

· 论 著 ·

# NSCLC组织中Ape1/Ref-1及microRNA-21表达与预后关系

张海燕<sup>1\*</sup> 冯平<sup>2</sup> 张洪艳<sup>3</sup> 杨雅婷<sup>2</sup> 路云涛<sup>4</sup>

**[摘要]** **目的** 探讨非小细胞肺癌(NSCLC)组织中脱嘌呤脱嘧啶核酸内切酶/氧化还原因子-1(Ape1/Ref-1)及微小RNA-21(microRNA-21)表达与化疗疗效及预后的关系。**方法** 选取2015年10月至2017年10月期间本院78例晚期NSCLC化疗患者组织及癌旁组织,均接受NSCLC标准一线化疗方案。比较Ape1/Ref-1、microRNA-21的表达水平,根据化疗疗效分为有效组、无效组。比较癌灶组织与癌旁组织、有效组与无效组Ape1/Ref-1、microRNA-21表达情况,采用Spearman相关性分析化疗疗效与癌灶组织Ape1/Ref-1、microRNA-21表达水平的相关性。Kaplan-Meier法分析患者总生存期(OS)与癌灶组织Ape1/Ref-1、microRNA-21表达的相关性,COX回归模型分析影响生存率的独立相关因素。**结果** 癌灶组织Ape1/Ref-1高表达率及microRNA-21相对表达量均高于癌旁组织,有效组癌灶组织Ape1/Ref-1、microRNA-21高表达率均低于无效组,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。化疗疗效与癌灶组织Ape1/Ref-1、microRNA-21表达均呈负相关( $P<0.05$ )。Ape1/Ref-1、microRNA-21低表达患者3年生存率均高于高表达患者,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。癌灶组织Ape1/Ref-1、microRNA-21表达是NSCLC患者长期生存的独立相关因素( $P<0.05$ )。**结论** NSCLC癌灶组织中Ape1/Ref-1、microRNA-21的表达与化疗疗效及预后密切相关。

**[关键词]** 脱嘌呤脱嘧啶核酸内切酶/氧化还原因子-1; 微小RNA-21; 非小细胞肺癌

## Relationship between the expressions of Ape1/Ref-1 and microRNA-21 in NSCLC tissues and prognosis

ZHANG Haiyan<sup>1\*</sup>, FENG Ping<sup>2</sup>, ZHANG Hongyan<sup>3</sup>, YANG Yating<sup>2</sup>, LU Yuntao<sup>4</sup>

(1. Department of Outpatient, The First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou, Hebei, China, 075000; 2. Department of Respiratory and Critical Care Medicine, The First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou, Hebei, China, 075000; 3. Third Department of Neurology, The First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou, Hebei, China, 075000; 4. Department of Neurosurgery, The First Hospital of Xingtai, Xingtai, Hebei, China, 054001)

**[ABSTRACT]** **Objective** To investigate the relationship between the expression of apurinic/aprimidinic endonuclease/redox factor - 1 (Ape1/Ref - 1) and microRNA - 21 in non - small cell lung cancer (NSCLC) tissues and chemotherapy efficacy and prognosis. **Methods** A total of 78 patients with advanced NSCLC undergoing chemotherapy were included and received NSCLC standard first - line chemotherapy. Immunohistochemistry was used to detect the expression levels of Ape1/Ref - 1 and microRNA - 21 in cancer tissues and adjacent tissues in pathological samples obtained before chemotherapy. According to the chemotherapy efficacy, the patients were divided into the effective group and the ineffective group. The

基金项目:河北省医学科学研究课题计划资助项目(20150857)

作者单位:1. 河北北方学院附属第一医院门诊部,河北,张家口 075000

2. 河北北方学院附属第一医院呼吸与危重症医学科,河北,张家口 075000

3. 河北北方学院附属第一医院神经内三科,河北,张家口 075000

4. 邢台市第一医院神经外科,河北,邢台 054001

\*通信作者:张海燕, E-mail:zhao07786lin6775@163.com

expressions of Ape1/Ref-1 and microRNA-21 were compared between cancer tissues and adjacent tissues and between the effective group and the ineffective group. Spearman correlation analysis was used to analyze the correlation between chemotherapy efficacy and the expression levels of Ape1/Ref-1 and microRNA-21 in cancer tissues. Kaplan-Meier method was used to analyze the correlation between overall survival (OS) and expressions of Ape1/Ref-1 and microRNA-21 in cancer tissues. COX regression model analysis was used to analyze the independent related factors affecting the survival rate. **Results** The high expression rate of Ape1/Ref-1 and the relative expression of microRNA-21 in cancer tissues were higher than those in adjacent tissues, and the high expression rates of Ape1/Ref-1 and microRNA-21 in cancer tissues in the effective group were lower than those in the ineffective group ( $P<0.05$ ). Chemotherapy efficacy was negatively correlated with the expressions of Ape1/Ref-1 and microRNA-21 in cancer tissues ( $P<0.05$ ). The 3-year survival rate of patients with low expression of Ape1/Ref-1 was higher than that of patients with high expression of Ape1/Ref-1, and the 3-year survival rate of patients with low expression of microRNA-21 was higher than that of patients with high expression of microRNA-21 ( $P<0.05$ ). Expressions of Ape1/Ref-1 and microRNA-21 in cancer tissues were independent related factors affecting the long-term survival of patients with NSCLC ( $P<0.05$ ). **Conclusion** The expression of Ape1/Ref-1 and microRNA-21 in NSCLC cancer tissues is closely related to the efficacy and prognosis of chemotherapy.

**[KEY WORDS]** Apurinic/aprimidinic endonuclease/redox factor-1; MicroRNA-21; Non-small cell lung cancer

肺癌根据病理形态可分为小细胞肺癌 (small cell lung cancer, SCLC)、非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC), 其中后者占比 80%<sup>[1]</sup>。由于早期症状不明显, 多数患者确诊时已进展至晚期, 预后较差<sup>[2]</sup>。临床常用基于铂类药物的一线化疗方案, 有效率仅有 40% 左右, 多数患者无法从中获益<sup>[3]</sup>。为了改善患者生存质量, 应根据患者对化疗的反应修整治疗方案, 以获取最佳疗效<sup>[4]</sup>。脱嘌呤/脱嘧啶核酸内切酶/氧化还原因子-1 (apurinic/aprimidinic endonuclease/redox factor-1, Ape1/Ref-1) 是一种功能性蛋白, 通过调控核转录因子氧化还原而影响细胞增殖。既往研究显示, Ape1/Ref-1 在许多恶性肿瘤中高度表达且影响预后, 可能与化疗耐药性有关<sup>[5]</sup>。微小 RNA-21 (microRNA-21) 为非编码短链 RNA, 研究证实其表达变化在恶性肿瘤的不同发展阶段有所差异<sup>[6]</sup>。目前关于 microRNA-21 与 NSCLC 化疗患者预后关系的报道较少。本研究旨在探讨二者在 NSCLC 组织中表达与化疗疗效及预后的关系, 现报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究对象

选取 2015 年 10 月至 2017 年 10 月期间本院 78 例晚期 NSCLC 化疗患者组织及癌旁组织。纳入标准: ①符合 NSCLC 诊断标准<sup>[7]</sup>并经病理组织学确诊; ②均接受 NSCLC 标准一线化疗方案; ③临床资料完整。排除标准: ①妊娠期、哺乳期

女性; ②有化疗禁忌症者; ③随访资料不完整者。其中男 46 例, 女 32 例; 年龄, 平均 ( $57.62\pm 11.35$ ) 岁; 鳞癌 47 例, 腺癌 31 例。本研究在医院伦理委员会批准下开展, 患者均签署知情同意书。

### 1.2 治疗方法

第 1~4 d, 予以顺铂注射液 (江苏豪森药业; H20040813) 20 mg/m<sup>3</sup>/d 静滴, 21 d 为一个治疗周期, 治疗两个周期后评估疗效。

### 1.3 检测方法

收集患者癌灶组织及其对应距病灶 3 cm 的癌旁组织标本, 部分标本常规固定并经石蜡包埋切片, 用于免疫组织化学分析, 其他标本迅速保存于液氮中, 用于 RNA 提取。

#### 1.3.1 Ape1/Ref-1 表达检测

鼠抗人 Ape1 单克隆抗体购自美国 Novus Biologicals, 免疫组化试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。400 倍镜下, 避开坏死区, 取 10 个视野。染色强度: 淡黄色计 1 分, 黄色计 2 分, 棕黄色计 3 分。阳性细胞数<sup>[8]</sup>: 0 分, 1 分, 2 分, 3 分, 4 分。染色强度与阳性细胞数计相加, 1 分为-, 2~3 分为+, 4~5 分为++, 6~7 分为+++。记-, + 为低表达, ++, +++ 为高表达。

#### 1.3.2 microRNA-21 表达检测

制备组织匀浆, 加入 TRIZOL 试剂 (美国 Sigma-Aldrich), Taqman microRNA 逆转录试剂盒 (美国 ABI) 进行逆转录, 得到的 cDNA 样本采用 Taqman Universal PCR master Mix 试剂盒 (美国 ABI)

扩增。microRNA-21 表达量采用  $2^{-\Delta Ct}$  表示,其中  $\Delta Ct=Ct_{\text{microRNA-21}}-Ct_{\text{内参}}$ 。以癌灶组织 microRNA-21 表达量/癌旁组织 microRNA-21 表达量  $<2$  为 microRNA-21 低表达,癌灶组织 microRNA-21 表达量/癌旁组织 microRNA-21 表达量  $\geq 2$  为 microRNA-21 高表达<sup>[9]</sup>。

#### 1.4 疗效评估<sup>[10]</sup>

完全缓解 (complete response, CR); 部分缓解 (partial response, PR); 疾病稳定 (stable disease, SD); 疾病进展 (progressive disease, PD)。以 (CR+PR) 为有效, 根据治疗效果将患者分为有效组、无效组。

#### 1.5 观察指标

比较各组 Ape1/Ref-1、microRNA-21 表达水平, 采用 Spearman 相关性分析化疗疗效与癌灶组织 Ape1/Ref-1、microRNA-21 表达水平的相关性, 采用生存曲线分析总生存期 (overall survival, OS) 与癌灶组织 Ape1/Ref-1、microRNA-21 表达的相关性。

#### 1.6 统计学处理

采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析, 计量资料采用  $(\bar{x} \pm s)$  表示, 采用独立  $t$  检验; 计数资料采用  $n(\%)$  表示, 采用  $\chi^2$  检验; 采用 spearman 秩相关系数进行相关性分析, Kaplan-Meier 法进行单因素生存分析, COX 回归模型进行多因素生存分析。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 癌灶组织与癌旁组织 Ape1/Ref-1、microRNA-21 表达比较

癌灶组织 Ape1/Ref-1 高表达率及 microRNA-21 相对表达量均高于癌旁组织, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见表 1。

### 2.2 有效组、无效组癌灶组织 Ape1/Ref-1、microRNA-21 表达比较

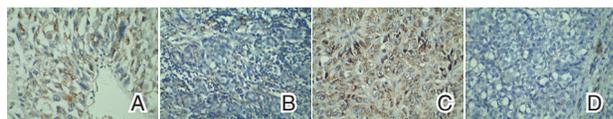
有效组癌灶组织 Ape1/Ref-1、microRNA-21 高表达率均低于无效组, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见表 2、图 1。

表 1 癌灶组织与癌旁组织 Ape1/Ref-1, microRNA-21 表达比较 [ $n(\%)$ ,  $(\bar{x} \pm s)$ ]

组别	-	+	++	+++	高表达	microRNA-21 相对表达量
癌灶组织	2(2.56)	4(5.13)	52(66.67)	20(25.64)	72(92.31)	4.65±1.27
癌旁组织	13(16.67)	22(28.21)	39(50.00)	4(5.13)	43(55.13)	2.49±1.62
$\chi^2$ 值		5.656			27.825	9.267
$P$ 值		<0.001			<0.001	<0.001

表 2 有效组、无效组癌灶组织 Ape1/Ref-1、microRNA-21 表达比较 [ $n(\%)$ ]

组别	$n$	Ape1/Ref-1				microRNA-21		
		-	+	++	+++	高表达	低表达	
有效组	25	2(2.56)	3(3.85)	18(23.08)	2(2.56)	20(25.64)	5(20.00)	20(80.00)
无效组	53	0(0.00)	1(1.89)	34(64.15)	18(33.96)	52(98.11)	27(50.94)	26(49.06)
$\chi^2$ 值	-			3.211		7.849		6.723
$P$ 值	-			0.001		0.005		0.010



注: A 为 Ape1/Ref-1 高表达; B 为 Ape1/Ref-1 低表达; C 为 microRNA-21 高表达; D 为 microRNA-21 低表达。

图 1 癌灶组织免疫组化染色结果示意图 (SP, ×400)

Figure 1 Schematic diagrams in cancer tissues by immunohistochemical staining (SP, ×400)

### 2.3 化疗疗效与 Ape1/Ref-1、microRNA-21 表达相关性分析

Spearman 相关性分析显示, 化疗疗效与癌灶

组织 Ape1/Ref-1 ( $r = -0.615$ )、microRNA-21 ( $r = -0.492$ ) 表达均呈负相关性 ( $P < 0.05$ )。

### 2.4 化预后与 Ape1/Ref-1、microRNA-21 表达相关性分析

COX 多因素分析显示, 癌灶组织 Ape1/Ref-1、microRNA-21 表达是影响 NSCLC 患者生存率的独立相关因素 ( $P < 0.05$ )。Ape1/Ref-1 低表达者 3 年生存率 (50.00%) 高于高表达者 (19.44%), microRNA-21 低表达者 3 年生存率 (32.61%) 高于高表达者 (9.38%), 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 3、图 2。

表3 NSCLC 预后的 COX 多因素回归分析

Table 3 Cox multivariate regression analysis of prognosis of NSCLC

指标	回归系数	标准误	RR 值	95%CI	P 值
Ape1/Ref-1 表达	1.092	0.379	2.980	1.418~6.264	0.004
microRNA-21 表达	1.044	0.262	2.841	1.700~4.747	<0.001

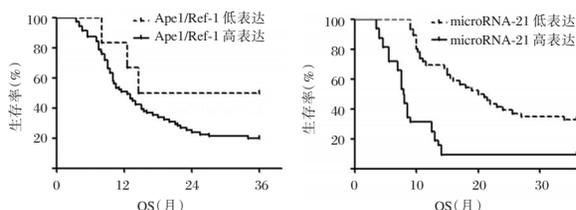


图2 Ape1/Ref-1、microRNA-21 不同表达患者生存曲线  
Figure 2 survival curves of patients with different expression of Ape1/Ref-1 and microRNA-21

### 3 讨论

尽管近年来肺癌的早期诊断和治疗取得了明显进展,但仍有多数患者确诊时已进展至晚期。早期肿瘤虽可行手术完全切除,但仍有约半数术后出现复发或转移,预后较差<sup>[11]</sup>。

NSCLC 的治疗中,化疗起着重要作用,对于失去手术切除机会的晚期 NSCLC 患者,以铂类为基础的化疗仍是一线治疗方案。研究证实,化疗可延长 NSCLC 患者生存期,但化疗耐药也是造成病情进展的重要因素<sup>[12]</sup>。近年来针对肿瘤细胞耐药性机制的研究很多,但仍缺乏可预测、评估 NSCLC 化疗疗效的有效且简便的生物学指标<sup>[13]</sup>。Ape1/Ref-1 是具有多重功能的 DNA 碱基切除修复限速酶,在细胞损伤修复中发挥重要作用,同时也是氧化还原因子,具有调节细胞内核转录因子表达的作用。根据既往研究,Ape1/Ref-1 的过表达可增强生殖细胞瘤、脑胶质瘤对放疗的抗性<sup>[14]</sup>。Spearman 相关性分析显示,化疗疗效与癌灶组织 Ape1/Ref-1 表达呈负相关。分析其可能机制,目前认为主要是由于 Ape1/Ref-1 的过表达伴随 DNA 内切酶活性增强,进而导致化疗耐药;同时,Ape1/Ref-1 的结构决定其可调控多种核转录因子的表达,这在化疗耐药中发挥更大作用<sup>[15]</sup>。癌灶组织 Ape1/Ref-1 的表达与 NSCLC 化疗患者预后生存期密切相关,表明 Ape1/Ref-1 可作为评估预后的重要参考指标。

microRNA 是一种单链非编码 RNA,可调控转录后水平基因表达,其中 microRNA-21 是目前研究最为广泛的一种<sup>[16]</sup>。在既往研究中可见相似结

论<sup>[17]</sup>,提示 NSCLC 的发生伴随 microRNA-21 的上调,且 microRNA-21 的表达与化疗疗效密切相关。一方面,microRNA-21 对抑癌基因的表达具有抑制作用;另一方面,microRNA-21 通过调控蛋白酪氨酸磷酸酶基因 (protein tyrosine phosphatase gene, *PTEN*) 导致的化疗耐药,使肿瘤细胞顺铂类药物耐药性显著增强,进而影响化疗疗效。进一步的 COX 多因素分析表明,NSCLC 的预后与 microRNA-21 表达密切相关,表明 NSCLC 组织中 microRNA-21 表达可作为预后生存的预测指标。

综上所述,NSCLC 患者癌灶组织中 Ape1/Ref-1、microRNA-21 的表达与化疗疗效及预后密切相关,可为 NSCLC 患者预后预测提供参考,其介导化疗耐药的更多机制,尚需进一步研究探讨。

### 参考文献

- [1] 朱丽,龚波. 下调 miR-4262 抑制肺癌细胞 A549 转移潜能的机制[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(10): 103-107.
- [2] Takeuchi A, Oguri T, Sone K, et al. Predictive and Prognostic Value of CYFRA 21-1 for Advanced Non-small Cell Lung Cancer Treated with EGFR-TKIs [J]. *Antic Res*, 2017, 37(10): 5771-5776.
- [3] 杨颖,夏曙,何肇晴,等. 血清 CA125, Cyfra21-1 和 VEGF 水平在非小细胞肺癌患者放化疗敏感性和预后评估中的应用价值[J]. 实用癌症杂志, 2019, 34(6): 940-943.
- [4] Han H, Chen H. Selective lymph node dissection in early-stage non-small cell lung cancer [J]. *J Thorac Dis*, 2017, 9(7): 2102-2107.
- [5] 陆友国,叶兵,夏丽丽. CYFRA21-1,  $\beta$ 2-MG 和 SCC-Ag 表达水平与晚期非小细胞肺癌化疗疗效及预后的关系分析 [J]. 标记免疫分析与临床, 2018, 25(11): 1716-1720.
- [6] Sone K, Oguri T, Ito K, et al. Predictive Role of CYFRA21-1 and CEA for Subsequent Docetaxel in Non-small Cell Lung Cancer Patients [J]. *Antic Res*, 2017, 37(9): 5125.
- [7] 钟文昭,董嵩,李磊,等. 国际肺癌研究协会/美国胸科学会/欧洲呼吸学会肺腺癌的国际多学科分类 [J]. 循证医学, 2011, 11(4): 193-225.
- [8] 王忱,赵晓辉,史玉荣,等. APE1 与 P-gp 在晚期非小细胞肺癌中的表达及其临床意义 [J]. 实用癌症杂志, 2010, 25(2): 146-149.
- [9] 李斌,潘跃银,杜瀛瀛. microRNA-21 对肺癌 A549 细胞增殖和 Smad7 表达的影响 [J]. 安徽医科大学学报, 2015, 50(12): 1766-1769.
- [10] 石远凯,牛奕. 美国国家综合癌症网非小细胞肺癌治疗指南 2007 年第一版介绍 [J]. 中华肿瘤杂志, 2007, 29(10): 799-800.
- [11] 李媛. 晚期非小细胞肺癌患者放疗前后肿瘤标志物变化与近期疗效的临床分析 [J]. 中国实验诊断学, 2017, 21(8): 1335-1337.

(下转第 815 页)

## TGF- $\beta$ 1、GM-CSF及TNF- $\alpha$ 对急性髓系白血病患者病情转归的评估

仲华 林志强 薄德映 王亚南 武艳伟 翟志佳 焦路阳\*

**[摘要]** 目的 探讨转化生长因子(TGF- $\beta$ 1)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)及肿瘤坏死因子-a(TNF- $\alpha$ )在急性髓系白血病患者病情转归的影响。方法 选取2015年2月至2018年2月本院收治的136例急性髓系白血病患者设为观察组(完全缓解组58例,未缓解组45例,难治复发组33例),选取同期本院的140例健康体检者设为对照组。对比各组之间TGF- $\beta$ 1、TNF- $\alpha$ 、GM-CSF的浓度变化情况,分析三者水平与患者病理特征、预后的关系。结果 观察组GM-CSF水平明显高于对照组,TGF- $\beta$ 1、TNF- $\alpha$ 水平明显低于对照组,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。完全缓解组GM-CSF水平明显低于未缓解组、难治复发组,TGF- $\beta$ 1及TNF- $\alpha$ 水平明显高于未缓解组、难治复发组,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。TGF- $\beta$ 1、TNF- $\alpha$ 、GM-CSF水平与急性髓系白血病患者髓外浸润、危险度分型有显著相关性( $P<0.05$ )。TGF- $\beta$ 1及TNF- $\alpha$ 异常降低、GM-CSF异常增高的急性髓系白血病患者死亡率更高( $P<0.05$ )。髓外浸润、危险度分型、TGF- $\beta$ 1、TNF- $\alpha$ 、GM-CSF为影响急性髓系白血病患者预后死亡的独立危险因素( $P<0.05$ )。结论 TGF- $\beta$ 1、TNF- $\alpha$ 、GM-CSF与急性髓系白血病患者病情进展、预后密切相关,提示临床可加强三者联合检测,以尽快掌握患者病情,评估患者预后。

**[关键词]** TGF $\beta$ 1; GM-CSF; TNF $\alpha$ ; 急性髓系白血病

### Evaluation of TGF- $\beta$ 1, GM-CSF and TNF- $\alpha$ on the outcome of patients with acute myelogenous leukemia

ZHONG Hua, LIN Zhiqiang, BO Deying, WANG Yanan, WU Yanwei, ZHAI Zhijia, JIAO Luyang\*

(Department of Clinical Laboratory, The First Affiliated Hospital Of Xinxiang Medical University, Weihui, Henan, China, 453100)

**[ABSTRACT]** **Objective** To explore the changes of transforming growth factor (TGF- $\beta$ 1), granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) and tumor necrosis factor-a (TNF- $\alpha$ ) in the serum of patients with acute myelogenous leukemia, and the influence of the three indicators on the outcome of the disease. **Methods** A total of 136 patients with acute myelogenous leukemia admitted to this hospital from March 2017 to March 2020 were selected as the observation group (58 cases in the complete remission group, 45 cases in the non-remission group, 33 cases in the refractory relapse group), and 140 patients with physical examination in our hospital during the same period were selected as the control group. The changes in the concentrations of TGF- $\beta$ 1, TNF- $\alpha$ , and GM-CSF between the groups were compared, and the relationships between the three indicators and the pathological characteristics and prognosis of patients were analyzed. **Results** The level of GM-CSF in the observation group was significantly higher than that in the control group, and the levels of TGF- $\beta$ 1 and TNF- $\alpha$  were significantly lower than those in the control group, and the differences were statistically significant ( $P<0.05$ ). The level of GM-CSF in the complete remission group was significantly lower than that in the non-remission group and the refractory relapse group. The levels of TGF- $\beta$ 1 and TNF- $\alpha$

基金项目:河南省医学科技攻关计划项目(201802163)

作者单位:新乡医学院第一附属医院检验科,河南,卫辉 453100

\*通信作者:焦路阳, E-mail: jiaoluyang2009@163.com

were significantly higher than those in the non-remission group and the refractory relapse group. The differences were statistically significant ( $P<0.05$ ). The levels of TGF- $\beta$ 1, TNF- $\alpha$ , GM-CSF were correlated with the extramedullary infiltration and risk classification of patients with acute myelogenous leukemia ( $P<0.05$ ). The mortality of patients with acute myelogenous leukemia and abnormal decreasing of TGF- $\beta$ 1 and TNF- $\alpha$  and abnormal increasing of GM-CSF was higher ( $P<0.05$ ). Extramedullary infiltration, risk classification, TGF- $\beta$ 1, TNF- $\alpha$ , GM-CSF were independent factors that affect the prognosis death of patients with acute myelogenous leukemia ( $P<0.05$ ). **Conclusion** TGF- $\beta$ 1, TNF- $\alpha$ , and GM-CSF are closely related to the disease progression and prognosis of patients with acute myelogenous leukemia, suggesting that the combined detection of the three can be strengthened in clinical practice to understand the patient's condition as soon as possible and assess the patient's prognosis.

**[KEY WORDS]** TGF $\beta$ 1; GM-CSF; TNF $\alpha$ ; Acute myelogenous leukemia

急性髓系白血病是一类源于造血干细胞的恶性克隆性疾病,其会抑制机体正常造血功能,影响机体组织器官的功能。近年来有学者发现,在急性髓系白血病的发生、发展的过程中,有较多的生化指标发挥着重要的调控作用<sup>[1]</sup>。Koichi等<sup>[2]</sup>学者报道转化生长因子(Transforming growth factor- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 1)广泛参与机体病理生理的过程,可抑制白血病细胞的增殖。肿瘤坏死因子- $\alpha$ (Tumor necrosis factor, TNF- $\alpha$ )在诊断恶性肿瘤、心血管疾病的临床价值已得到肯定,近年来 TNF- $\alpha$  与急性髓系白血病的关系得到广大学者的重视,认为急性髓系白血病患者体内高水平的 TNF- $\alpha$  会导致患者预后不良<sup>[3]</sup>。粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(ranulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF)来源于适应性免疫系统的细胞、骨髓细胞等,较多研究发现其在类风湿性关节炎的关节中浓度较高<sup>[4]</sup>,但其与急性髓系白血病的相关研究较少。本研究旨在探讨 TGF- $\beta$ 1、GM-CSF 及 TNF- $\alpha$  在急性髓系白血病患者血清中的表达情况及三者对其病情转归的影响。现报告如下。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选取2015年2月至2018年2月本院收治的136例急性髓系白血病患者设为观察组。纳入标准:①均临床、血常规、骨髓象确诊为急性髓系白血病;②病历资料完整。排除标准:①纳入研究前1个月内,服用过影响本研究指标水平的药物,或接受相关治疗者;②合并心、肝、肾等器官和系统严重疾病或恶性肿瘤者;③妊娠期、哺乳期女性、精神障碍者。

经对症予以 VDP/VDCP/DA/MEA 方案治疗后,根据相关分组标准<sup>[9]</sup>分为完全缓解组 58 例,未

缓解组 45 例,难治复发组 33 例。选取同期本院的 140 例健康体检者,设为对照组。观察组男性 72 例,女性 64 例;平均年龄(43.35 $\pm$ 5.71)岁。对照组男性 71 例,女性 69 例;平均年龄(43.44 $\pm$ 5.78)岁。2 组一般资料比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。本研究经医院医学伦理委员会批准通过,所有受试者均签署知情同意书。

### 1.2 方法

观察组患者在入院后第 2 日、对照组患者于体检当日清晨空腹抽取静脉血 3 mL,离心 10 min,分离血清及血浆,样本置于-20 $^{\circ}$ C 下保存待检。采用双抗体夹心酶联免疫吸附试验检测 TGF- $\beta$ 1、TNF- $\alpha$ 、GM-CSF 水平。相关试剂盒采购于北京中杉金桥生物技术有限公司。TGF- $\beta$ 1 参考范围:20~55  $\mu$ g/L, <20  $\mu$ g/L 视为异常降低<sup>[6]</sup>; TNF- $\alpha$  参考范围:180~320 pg/mL, <180 pg/mL 视为异常降低<sup>[7]</sup>; GM-CSF 参考范围:32~65 ng/L, >65 ng/L 视为异常升高<sup>[8]</sup>。

### 1.3 观察指标

①收集患者的病历资料,包括姓名、性别、年龄、是否合并髓外浸润、白细胞水平、FAB 分型、危险度分型等资料,分析 TGF- $\beta$ 1、TNF- $\alpha$ 、GM-CSF 水平与患者病理特征的关系。②对患者进行为期 3 年的随访(方式:电话随访、门诊复查,随访截止时间:2021 年 2 月),了解患者预后情况。③采用多元 Logistic 回归分析影响急性髓系白血病患者预后不良的相关危险因素。

### 1.4 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件进行数据分析,计数资料用  $n(\%)$  表示,采用  $\chi^2$  检验;计量资料采用 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,两组间比较行  $t$  检验,多组间比较行  $F$  检验;采用多元 Logistic 回归分析影响急性髓系白血病患者

预后不良的相关危险因素;以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 观察组与对照组 TGF- $\beta$ 1、TNF- $\alpha$ 、GM-CSF 水平比较

观察组 GM-CSF 水平高于对照组, TGF- $\beta$ 1、TNF- $\alpha$  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 TGF- $\beta$ 1、TNF- $\alpha$ 、GM-CSF 水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Comparison of TGF- $\beta$ 1, TNF- $\alpha$  and GM-CSF

levels between 2 groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	TGF- $\beta$ 1( $\mu$ g/L)	TNF- $\alpha$ (pg/mL)	GM-CSF(ng/L)
观察组	136	7.32 $\pm$ 2.14	105.52 $\pm$ 17.55	90.25 $\pm$ 8.65
对照组	140	32.65 $\pm$ 7.54	227.25 $\pm$ 25.14	43.77 $\pm$ 5.19
t 值	-	38.199	46.519	54.309
P 值	-	<0.001	<0.001	<0.001

### 2.2 完全缓解组、未缓解组及难治复发组的急性髓系白血病患者 TGF- $\beta$ 1、TNF- $\alpha$ 、GM-CSF 水平比较

完全缓解组 GM-CSF 水平明显低于未缓解组、难治复发组, TGF- $\beta$ 1 及 TNF- $\alpha$  水平明显高于未缓解组、难治复发组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 2。

### 2.3 TGF- $\beta$ 1、TNF- $\alpha$ 、GM-CSF 水平与急性髓系白血病患者病理特征的关系

TGF- $\beta$ 1、TNF- $\alpha$ 、GM-CSF 水平与急性髓系白血病患者髓外浸润、危险度分型显著相关 ( $P < 0.05$ )。见表 3。

表 3 TGF- $\beta$ 1、TNF- $\alpha$ 、GM-CSF 水平与急性髓系白血病患者病理特征的关系 [ $n(\%)$ ]

Table 3 the relationship between the levels of TGF- $\beta$ 1, TNF- $\alpha$ , GM-CSF and the pathological characteristics of patients with acute leukemia [ $n(\%)$ ]

病理特征	n	TGF- $\beta$ 1( $\mu$ g/L)		$\chi^2$ 值	P 值	TNF- $\alpha$ (pg/mL)		$\chi^2$ 值	P 值	GM-CSF(ng/L)		$\chi^2$ 值	P 值	
		异常降低 (n=62)	正常表达 (n=74)			异常降低 (n=69)	正常表达 (n=67)			异常增高 (n=61)	正常表达 (n=75)			
年龄(岁)	$\geq 30$	58	30(48.39)	28(37.84)	1.535	0.215	35(50.72)	23(34.33)	3.736	0.053	22(36.07)	36(48.00)	1.959	0.162
	$< 30$	78	32(51.61)	46(62.16)			34(49.28)	44(65.67)			39(63.93)	39(52.00)		
性别	男	72	35(56.45)	37(50.00)	0.564	0.453	38(55.07)	34(50.75)	0.255	0.613	35(57.38)	37(49.33)	0.874	0.350
	女	64	27(43.55)	37(50.00)			31(44.93)	33(49.25)			26(42.62)	38(50.67)		
高白细胞	是	69	31(50.00)	38(51.35)	0.025	0.875	34(49.28)	35(52.24)	0.119	0.730	29(47.54)	40(53.33)	0.452	0.502
	否	67	31(50.00)	36(48.65)			35(50.72)	32(47.76)			32(52.46)	35(46.67)		
髓外浸润	有	70	51(82.26)	19(25.68)	43.240	<0.001	49(71.01)	21(31.34)	21.418	<0.001	44(72.13)	26(34.67)	19.803	<0.001
	无	66	11(17.74)	55(74.32)			20(28.99)	46(68.66)			17(27.87)	49(65.33)		
FAB 分型	L <sub>1</sub>	57	22(35.48)	35(47.30)	1.934	0.164	29(42.03)	28(41.79)	0.001	0.978	25(40.98)	32(42.67)	0.039	0.843
	L <sub>2</sub>	79	40(64.52)	39(52.70)			40(57.97)	39(58.21)			36(59.02)	43(57.33)		
危险度分型	低、中危	62	4(6.45)	58(78.38)	70.359	<0.001	7(10.14)	55(82.09)	70.931	<0.001	11(18.03)	51(68.00)	33.859	<0.001
	高危	74	58(93.55)	16(21.62)			62(89.86)	12(17.91)			50(81.97)	24(32.00)		

表 2 完全缓解组、未缓解组及难治复发组的急性髓系白血病患者 TGF- $\beta$ 1、TNF- $\alpha$ 、GM-CSF 水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Comparison of the levels of TGF- $\beta$ 1, TNF- $\alpha$  and GM-CSF in patients with complete remission, unremission and relapsed acute leukemia ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	TGF- $\beta$ 1( $\mu$ g/L)	TNF- $\alpha$ (pg/mL)	GM-CSF(ng/L)
完全缓解组	58	41.25 $\pm$ 8.65	120.32 $\pm$ 20.33	84.23 $\pm$ 7.14
未缓解组	45	35.64 $\pm$ 7.22	97.67 $\pm$ 17.52	93.27 $\pm$ 8.34
难治复发组	33	30.21 $\pm$ 5.59	85.14 $\pm$ 15.65	108.65 $\pm$ 9.74
F 值	-	26.980	42.920	92.660
P 值	-	<0.001	<0.001	<0.001

### 2.4 急性髓系白血病患者预后情况

TGF- $\beta$ 1 及 TNF- $\alpha$  异常降低、GM-CSF 异常增高的急性髓系白血病患者死亡率明显高于 TGF- $\beta$ 1、TNF- $\alpha$ 、GM-CSF 正常水平的患者, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 4。

表 4 急性髓系白血病患者预后情况 [ $n(\%)$ ]

Table 4 prognosis of patients with acute leukemia [ $n(\%)$ ]

指标	死亡(n=23)	生存(n=113)	$\chi^2$ 值	P 值	
TGF- $\beta$ 1	异常降低	20(60.61)	52(46.02)	12.856	<0.001
	正常水平	3(13.04)	61(59.22)		
TNF- $\alpha$	异常降低	18(78.26)	45(43.69)	11.355	<0.001
	正常水平	5(21.74)	68(60.18)		
GM-CSF	异常增高	19(82.61)	50(44.25)	11.251	<0.001
	正常水平	4(17.39)	63(61.17)		

### 2.5 影响急性髓系白血病患者预后死亡的相关危险因素

髓外浸润、危险度分型、TGF- $\beta$ 1、TNF- $\alpha$ 、GM-CSF 为影响急性髓系白血病患者预后死亡的独立危险因素 ( $P < 0.05$ )。见表 5。

表5 影响急性髓系白血病患者预后死亡的相关危险因素

Table 5 related risk factors of death in patients with acute leukemia

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(岁)(≥65岁 vs <65岁)	1.359	0.354~1.365	0.359			
性别(男 vs 女)	1.547	0.135~1.652	0.644			
高白细胞(是 vs 否)	1.325	0.154~1.658	0.019	1.354	0.254~1.265	0.085
髓外浸润(有 vs 无)	1.472	1.124~1.785	0.023	1.254	1.141~1.698	0.021
FAB分型(L <sub>1</sub> vs L <sub>2</sub> )	1.587	0.233~1.885	0.357			
危险度分型(高危 vs 低、中危)	1.625	1.214~1.708	0.016	1.524	1.231~1.825	0.004
TGF-β1(异常降低 vs 正常)	1.354	1.268~1.778	0.022	1.325	1.127~1.758	0.011
TNF-α(异常降低 vs 正常)	1.447	1.130~1.852	0.025	1.547	1.278~1.854	0.015
GM-CSF(异常增高 vs 正常)	1.324	1.210~1.652	0.026	1.256	1.111~1.657	0.023

### 3 讨论

急性髓系白血病是造血干细胞的恶性克隆性疾病,平均生存期仅3个月左右,严重危害患者生命健康<sup>[10]</sup>。部分急性髓系白血病患者可以通过化疗或骨髓移植延长生存期,但该病生存率仍不理想。积极寻找可在急性髓系白血病发病早期发现病情变化、评价疗效并判断预后的指标对延长患者生存时间临床意义重大。

TGF-β1是由Treg细胞分泌产生的细胞因子,它通过参与多种免疫细胞的调控作用下调机体免疫应答反应,是目前已知的作用较强的负性造血细胞调控因子,在造血方面主要起负调控作用。Ramaswamy K等<sup>[11]</sup>学者研究认为TGF-β1可以显著抑制血细胞增殖,并在正常造血细胞生长分化的各个阶段均有表达。本研究结果,这一研究结果与既往文献报道结果一致<sup>[12]</sup>。考虑为TGF-β1水平降低,导致白血病细胞抑制作用减弱,促进了白细胞的增殖,从而加重了急性髓系白血病患者的病情。

GM-CSF作用于造血干细胞、祖细胞等细胞中,可促进骨髓造血,是机体必需的造血生长因子之一<sup>[13]</sup>。本研究结果显示急性髓系白血病患者血清GM-CSF水平呈异常增高表达状态,完全缓解组GM-CSF水平明显低于未缓解组、难治愈发组。Otegbeye F等<sup>[14]</sup>学者研究报道,急性髓系白血病患者GM-CSF水平与其预后有着显著相关性,这与本研究所得结果一致,提示GM-CSF可作为评估急性髓系白血病患者预后的重要指标之一。

TNF-α是重要的炎症和免疫反应调节物,主要由激活的单核-巨噬细胞产生,具有较强的抗肿瘤及促炎功能。Sternier等学者<sup>[15]</sup>研究指出,正常表达的TNF-α可提高白细胞对病原体吞噬能力。本研究中,TNF-α

异常升高的急性髓系白血病患者预后死亡的风险大。分析导致TNF-α水平异常升高的原因:急性髓系白血病患者对病原菌具有易感性,易并发多种机会性感染,刺激单核-巨噬细胞的表达水平,使得患者发生持续的炎症反应,引起TNF-α水平升高<sup>[16]</sup>。

本研究结果显示,TGF-β1、TNF-α、GM-CSF水平与急性髓系白血病患者髓外浸润、危险度分型有显著相关性,TGF-β1异常降低、TNF-α异常升高、GM-CSF异常降低的急性髓系白血病患者髓外浸润发生的风险越高,危险度分型为高危型的几率越大,同时TGF-β1、TNF-α、GM-CSF水平与急性髓系白血病患者疾病进展有着密切联系。

综上所述,TGF-β1、TNF-α、GM-CSF与急性髓系白血病患者病情进展密切相关,TGF-β1(异常降低)、TNF-α(异常升高)、GM-CSF(异常降低)的患者预后死亡的风险更大,提示临床可加强三者联合检测,以尽快掌握患者病情,评估患者预后。

### 参考文献

- [1] 陈文婷,姚红霞,吴从明,等. TGFβ1及VEGF基因在急性髓系白血病患者中的表达水平及其临床预后价值[J]. 中国实验血液学杂志, 2020, 28(1):142-147.
- [2] Koichi T, Feng W, Kiyomi M, et al. Integrative genomic analysis of adult mixed phenotype acute leukemia delineates lineage associated molecular subtypes [J]. Nature Commun, 2018, 9(1):2670-2677.
- [3] 邢东文,张余转,林坚,等. 急性淋巴细胞白血病患者血清TK1及E-cadherin蛋白表达水平及意义[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(8):1010-1013.
- [4] Roberts KG, Mullighan CG. The Biology of B-Progenitor Acute Lymphoblastic Leukemia [J]. Cold Spring Harb Perspect Med, 2019, 10(7):348-353.
- [5] Sbirkov Y, Burnusuzov H, Sarafian V. Metabolic reprogramming in childhood acute lymphoblastic leukemia [J]. Pediatr Blood Cancer, 2020, 23(1):282-289.

## T细胞亚群、IL-6及IL-10在支气管哮喘患儿治疗中的变化

黄国玲 陈红兵\* 谭忠友

**[摘要]** **目的** 探究T细胞亚群、白介素-6(IL-6)及白介素-10(IL-10)在支气管哮喘患儿治疗中的变化。**方法** 选取2018年8月至2020年1月本院收治的102例支气管哮喘的患儿作为研究对象,根据治疗方法不同分为研究组(孟鲁司特联合布地奈德治疗52例)和基础组(布地奈德治疗50例),比较两组治疗效果,比较两组T淋巴细胞亚群水平,IL-6、IL-10水平以及用力肺活量(FVC)、第一秒用力呼气容积(FEV1)、最大呼气流量(PEF)等肺功能指标的水平。**结果** 研究组治疗总有效率(96.15%)高于基础组治疗总有效率(84.00%),差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。治疗后,两组 $CD_3^+$ 、 $CD_4^+$ 、 $CD_4^+/CD_8^+$ 水平升高, $CD_8^+$ 水平下降,研究组变化程度明显高于基础组,差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。用药后,两组IL-6含量下降,IL-10含量上升,研究组IL-6、IL-10变化水平较基础组高,差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。用药后,两组FVC、PEF、FEV1等肺功能指标数值均有不同程度的上升,研究组上升幅度明显高于基础组,差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。**结论** 孟鲁司特联合布地奈德治疗支气管哮喘临床疗效显著,能够有效改善患儿肺功能,提高 $CD_3^+$ 、 $CD_4^+$ 、 $CD_4^+/CD_8^+$ 以及IL-10水平,降低 $CD_8^+$ 、IL-6水平。

**[关键词]** 孟鲁司特;布地奈德;支气管哮喘患儿;T淋巴细胞亚群;IL-6;IL-10

### Study on the changes of T cell subsets, IL-6 and IL-10 in the treatment of children with bronchial asthma

HUANG Guoling, CHEN Hongbing\*, TAN Zhongyou

(Department of Children's Ward, Three Gorges Hospital Affiliated to Chongqing University, Chongqing, China, 404000)

**[ABSTRACT]** **Objective** To explore the changes of T cell subsets, interleukin-6(IL-6) and interleukin-10(IL-10) in the treatment of children with bronchial asthma. **Method** 102 children with bronchial asthma admitted to this hospital from August 2018 to January 2020 were selected. According to different treatment methods, they were divided into a study group (Montelukast combined with budesonide, 52 cases) and a basic group (budesonide, 50 cases). The treatment effects, T lymphocyte subgroup levels, the levels of IL-6, IL-10, and the levels of lung function indexes such as forced vital capacity (FVC), forced expiratory volume in one second (FEV1) and peak expiratory flow (PEF) were compared between the two groups. **Result** The total effective rate of treatment between the study group (96.15%) and the basic group (84.00%) were compared, and the difference was statistically significant ( $P<0.05$ ). After treatment, the levels of  $CD_3^+$ ,  $CD_4^+$ ,  $CD_4^+/CD_8^+$  in the two groups increased, and the level of  $CD_8^+$  decreased. The degree of change in the study group was significantly higher than that in the basic group, and the difference was statistically significant ( $P<0.05$ ). After medication, the level of IL-6 in the two groups decreased and the level of IL-10 increased. The changes in levels of IL-6 and IL-10 in the study group were higher than those in the basic group, and the differ-

基金项目:重庆市自然科学基金(cstc2018jcyj-msxm X0615)

作者单位:重庆大学附属三峡医院儿童神经内科,重庆 404000

\*通信作者:陈红兵, E-mail: chbchb@tom.com

ence was statistically significant ( $P < 0.05$ ). After medication, the values of lung function indexes such as FVC, PEF, FEV1 and so on in the two groups increased to varying degrees, and the increase in the study group was significantly higher than that of the basic group, and the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Montelukast combined with budesonide has a significant clinical effect in the treatment of bronchial asthma, which can effectively improve the lung function of children, increase CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> and IL-10 levels, and reduce CD8<sup>+</sup> and IL-6 levels.

**[KEY WORDS]** Montelukast; Budesonide; Children with bronchial asthma; T lymphocyte subsets; IL-6; IL-10

支气管哮喘是一种气道慢性炎症反应,常伴有广泛而多变的气流阻塞,该病在儿童中发病率较高,是常见的小儿呼吸道疾病,目前该病发病的机制尚不明确,可能与儿童过敏体质、肥胖以及遗传等因素有关<sup>[1]</sup>。患儿发病时主要表现为反复的喘息、咳嗽、气促、胸闷,常在夜间或凌晨发作或加重,危重时还可表现出端坐呼吸的状态。支气管哮喘患儿的病情若长期未得到有效的治疗予控制会影响儿童的生长发育和肺功能发育,形成慢性阻塞性肺疾病、肺动脉高压、慢性肺源性心脏病等<sup>[2]</sup>。支气管哮喘的治疗应及早开始,并坚持长期、持续、规范的治疗,多数患儿经过正规的治疗后,能够完全控制病情,对患儿的生长发育影响不大,因此为患儿选择能够有效治疗并长期安全控制病情的治疗方案是治疗的要点<sup>[3]</sup>。本研究就孟鲁司特联合布地奈德治疗对支气管哮喘患儿T淋巴细胞亚群、IL-6及IL-10水平的影响展开探讨,现报道如下。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

收集2018年8月至2020年1月本院收治的102例支气管哮喘患儿。纳入标准:①所有患儿均符合《支气管哮喘防治指南(2016年版)》<sup>[4]</sup>中的相关诊断标准;②未合并重要器官严重疾病;③此次入院前4周内未经过相关治疗;④患儿临床资料完整,患儿及家长对研究知情且自愿参加。排除标准:①年龄>14岁;②既往长期应用免疫抑制剂;③合并全身感染性疾病;④既往有相关药物过敏史或者过敏体质者。

根据治疗方法不同分为研究组( $n=52$ )和基础组( $n=50$ )。研究组:男37例,女15例,年龄平均( $7.23 \pm 2.10$ )岁,病程平均( $1.72 \pm 0.88$ )年。基础组:男36例,女14例,年龄平均( $7.05 \pm 1.96$ )岁,病程平均( $1.69 \pm 0.85$ )年;两组患儿年龄、性别、病程等比

较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。见表1。本研究经伦理委员会批准,所有患儿家属均知情同意。

表1 两组基线资料比较( $\bar{x} \pm s$ )

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

组别	<i>n</i>	平均年龄(岁)	平均病程(年)	性别(男/女)
研究组	52	7.23±2.10	1.72±0.88	37/15
基础组	50	7.05±1.96	1.69±0.85	36/14
<i>t</i> / $\chi^2$ 值	-	0.447	0.175	0.009
<i>P</i> 值	-	0.656	0.861	0.925

### 1.2 方法

两组患儿入院后均予常规解痉、平喘、化痰、吸氧、补液等对症支持治疗。在此基础上,予研究组患者孟鲁司特联合布地奈德治疗,具体用药方法如下:布地奈德吸入气雾剂(Chiesi Farmaceutici S.p.A.公司生产;H20120320;每瓶200揆,每揆含布地奈德200 μg)经口吸入,3~6岁的患儿:200 μg每次,2次每天;7~13岁的患儿:400 μg每次,2次每天;再予患儿孟鲁司特钠咀嚼片(四川大冢制药有限公司生产;国药准字H20064828)口服,于睡前服用,4~5岁的患儿:4 mg每次,1次每天;6~13岁的患儿:5 mg每次,1次每天。予基础组患者布地奈德治疗,用药方法同研究组。两组患儿均以连续用药4周为一个周期,治疗2个周期,用药过程中观察患儿的用药反应,若出现不良反应可减少用药剂量,若出现严重的不良反应立即停止用药并予治疗。

### 1.3 观察指标

#### 1.3.1 临床疗效<sup>[5]</sup>

根据患者治疗后临床症状缓解情况作为评定标准。临床控制:治疗后患儿相关症状体征极肺部哮鸣音完全消失;显效:治疗后患儿相关症状体征及肺部哮鸣音明显改善;有效:较治疗前,患儿相关症状体征及肺部哮鸣音有一定的改善;无效:治疗后,患儿相关症状体征及肺部哮鸣音无改善甚至有加重者。总有效率=(临床控制+显效+有效)例数/总例数×100%。

### 1.3.2 T淋巴细胞亚群

于治疗前1天和治疗结束后2天进行检测,所有受检者抽取外周静脉血5 mL,使用荧光标记全血溶血法对荧光抗体进行标记,使用流式细胞仪Flow Cytometry System进行检测,20 μL CD4-FITC/CD8-PE/CD3-PerCP与同型对照荧光单抗加入检测管,再各加入100 μL EDTA-K2抗凝全血,将其混合均匀之后室温放置15~20 min,上COULTERQ-PREP自动溶血仪溶血35 s,置入流式细胞仪检测,使用CyView软件分析CD3+、CD4+、CD8+等T细胞亚群的百分比。

### 1.3.3 IL-6、IL-10水平

分别于治疗前1天和治疗结束后2天检测患者白介素-6(interleukin 6, IL-6),白介素-10(interleukin 10, IL-10)的水平。采用双抗体夹心ELISA法进行检测,所有试剂盒均由上海江莱生物科技有限公司提供,相关操作严格按照试剂盒说明书进行。

### 1.3.4 肺功能

于治疗前1天和治疗结束后2天分别测定两组患儿的用力肺活量(forced vital capacity, FVC)、第一秒用力呼气容积(Forced expiratory volume in one second, FEV1)以及最大呼气流量(peak expiratory flow, PEF)等肺功能指标的水平。采用肺功能测定仪(北京领锋创业科技有限公司生产)进行测定并记录。

### 1.4 统计学方法

采用SPSS 22.0软件进行统计分析,计数资料以n(%)表示,采用χ<sup>2</sup>检验,计量资料采用( $\bar{x} \pm s$ )描述,行t检验,以P<0.05为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 两组治疗效果的比较

研究组治疗总有效率(96.15%)高于基础组治疗总有效率(84.00%),差异具有统计学意义(P<0.05)。见表2。

表2 两组治疗效果比较 [n(%)]

Table 2 Comparison of treatment effect between 2 groups [n(%)]

组别	n	临床控制	显效	有效	无效	总有效率
研究组	52	29(55.77)	15(28.84)	6(11.54)	2(3.85)	50(96.15)
基础组	50	20(40.00)	12(24.00)	10(20.00)	8(16.00)	42(84.00)
χ <sup>2</sup> 值	-			8.000		
P值	-			0.005		

### 2.2 两组治疗前后T淋巴细胞亚群水平的比较

治疗前,两组CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>水平比较差异无统计学意义(P>0.05)。治疗后,两组CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>水平升高,CD8<sup>+</sup>水平下降,研究组变化程度明显高于基础组,差异具有统计学意义(P<0.05)。见表3。

### 2.3 两组用药前后IL-6、IL-10水平的比较

用药前,两组IL-6、IL-10含量比较差异无统计学意义(P>0.05)。用药后,两组IL-6含量下降,IL-10含量上升,研究组IL-6、IL-10变化水平较基础组高,差异具有统计学意义(P<0.05)。见表4。

表4 两组用药前后IL-6、IL-10水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 4 Comparison of IL-6 and IL-10 levels between the two groups before and after treatment ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	IL-6(pg/mL)		IL-10(pg/mL)	
		用药前	用药后	用药前	用药后
研究组	52	11.96±2.88	6.23±3.12 <sup>a</sup>	35.62±5.12	22.86±5.87 <sup>a</sup>
基础组	50	12.02±2.86	8.86±3.65 <sup>a</sup>	36.24±4.89	28.82±6.13 <sup>a</sup>
t值	-	0.106	3.917	1.096	5.016
P值	-	0.916	<0.001	0.748	<0.001

注:与同组用药前比较,<sup>a</sup>P<0.05。

### 2.4 两组用药前后肺功能变化的比较

用药前,两组FVC、PEF、FEV1等肺功能指标比较差异无统计学意义(P>0.05)。用药后,两组各项指标数值均有不同程度的上升,研究组上升幅度明显高于基础组,差异具有统计学意义(P<0.05)。见表5。

表3 两组治疗前后T淋巴细胞亚群水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 3 Comparison of T lymphocyte subsets before and after treatment between the two groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	CD3 <sup>+</sup> (%)		CD4 <sup>+</sup> (%)		CD8 <sup>+</sup> (%)		CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>	
	用药前	用药后	用药前	用药后	用药前	用药后	用药前	用药后
研究组	66.25±7.36	92.23±12.24 <sup>a</sup>	28.27±5.12	51.42±12.26 <sup>a</sup>	39.16±4.58	24.10±3.87 <sup>a</sup>	0.59±0.21	1.80±0.22 <sup>a</sup>
基础组	66.92±8.08	80.10±11.78 <sup>a</sup>	28.86±5.31	36.86±8.32 <sup>a</sup>	39.65±4.41	31.18±3.69 <sup>a</sup>	0.60±0.20	1.10±0.12 <sup>a</sup>
t值	0.438	5.096	0.571	6.991	0.550	9.449	0.246	19.837
P值	0.662	<0.001	0.569	<0.001	0.584	<0.001	0.806	<0.001

注:与同组用药前比较,<sup>a</sup>P<0.05。

表5 两组用药前后肺功能变化比较 ( $\bar{x} \pm s$ )Table 5 Comparison of lung function changes between the two groups before and after treatment ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	FVC(L)		PEF(L/s)		FEV1(L)	
		用药前	用药后	用药前	用药后	用药前	用药后
研究组	52	2.65±0.52	4.20±0.73 <sup>a</sup>	2.72±0.41	4.51±0.60 <sup>a</sup>	1.59±0.28	2.81±0.40 <sup>a</sup>
基础组	50	2.70±0.50	3.51±0.66 <sup>a</sup>	2.75±0.42	3.81±0.51 <sup>a</sup>	1.60±0.26	2.42±0.36 <sup>a</sup>
t值	-	0.495	5.001	0.365	6.337	0.187	5.169
P值	-	0.622	<0.001	0.716	<0.001	0.852	<0.001

注:与同组用药前比较,<sup>a</sup>P<0.05。

### 3 讨论

小儿支气管哮喘是常见的小儿呼吸道慢性炎症性疾病,哮喘的发病机制尚未有明确的定论,多数学者认为哮喘是一种涉及多种炎症细胞、介质与细胞因子参与的炎症疾病,主要表现为多种炎症因子在气道的浸润和聚集,使气道反应增高、气道收缩、粘液分泌增加<sup>[6-7]</sup>。

白三烯以及IL-6等炎症因子是诱发小儿哮喘的重要炎症因子。白三烯是鼻炎的主要致病因子,有研究发现,其在上下呼吸道的炎症中起到了重要的作用,哮喘患者白三烯释放的数量要明显高于正常人,其能够与其他炎症因子互相作用使机体分泌更多炎症介质、细胞因子,加重病情<sup>[8]</sup>。IL-6是一种多效细胞因子,正常人血清中该因子的水平含量较低,但当机体出现某些疾病时,其含量会急剧上升,是判断机体是否存在炎症的重要指标<sup>[9]</sup>。IL-10是一种以抑制炎症反应为主的细胞因子,但部分哮喘患者存在IL-10的合成障碍,导致体内该因子水平降低,对气道炎症的抑制力下降,使哮喘患者的气道炎症长期存在<sup>[10]</sup>。针对哮喘患者存在的长期炎症反应,临床主要治疗原则是急性期抗炎、平喘以缓解症状,慢性持续其长期抗炎以控制病情<sup>[11]</sup>。布地奈德是一种糖皮质激素药物,能够减轻全身的炎症反应,其局部应用能够起到更高效的抗炎作用。有研究发现布地奈德能够促进机体产生IL-10共同发挥抗炎作用,但其对白三烯的合成与分泌无明显的抑制作用,因此单独使用该药物治疗小儿支气管哮喘的疗效并不能达到预期的效果<sup>[12]</sup>。孟鲁司特是一种白三烯受体拮抗剂,其主要通过竞争性与半胱氨酸白三烯受体结合而阻断白三烯的活性而发挥作用,能够抑制白三烯对气道的致炎作用从而起到抑制炎症反应、病情进展、改善肺功能的作用<sup>[13]</sup>。本研究结果这表明孟鲁司特与布地奈德联合能够协同发挥

抗炎的作用,改善患者的症状体征,从而达到控制病情发展、改善患儿肺功能以提高治疗的效果。

相关研究表明,T淋巴细胞亚群的异常变化亦参与了支气管哮喘的发生发展过程,CD<sub>4</sub><sup>+</sup>诱导和增强T细胞及巨噬细胞的免疫应答<sup>[14]</sup>。CD<sub>8</sub><sup>+</sup>是一种细胞毒性T淋巴细胞,具有抑制CD<sub>4</sub><sup>+</sup>及诱导靶细胞凋亡的作用。正常时这两类细胞保持一定的比例,功能上相互影响,相互拮抗,共同维持机体免疫系统功能平衡。CD<sub>3</sub><sup>+</sup>是T细胞成熟的标志,其降低通常提示机体可能存在炎症反应<sup>[15]</sup>。有研究发现,哮喘急性发作期患儿CD<sub>3</sub><sup>+</sup>、CD<sub>4</sub><sup>+</sup>、CD<sub>4</sub><sup>+</sup>/CD<sub>8</sub><sup>+</sup>水平下降,而CD<sub>8</sub><sup>+</sup>水平升高,表现出免疫功能受损<sup>[16]</sup>。本研究结果表明联合用药治疗能够改善患儿的免疫功能。

综上所述,孟鲁司特联合布地奈德治疗支气管哮喘临床疗效显著,能够有效改善患儿肺功能,提高CD<sub>3</sub><sup>+</sup>、CD<sub>4</sub><sup>+</sup>、CD<sub>4</sub><sup>+</sup>/CD<sub>8</sub><sup>+</sup>以及IL-10水平,降低CD<sub>8</sub><sup>+</sup>、IL-6水平。

### 参考文献

- [1] Reinehr T, Langrock C, Hamelmann E, et al. 25-Hydroxvitamin D concentrations are not lower in children with bronchial asthma, atopic dermatitis, obesity, or attention deficient/hyperactivity disorder than in healthy children [J]. Nutr Res, 2018, 52(8):39-47.
- [2] Tayel SI, El-Hefnway SM, Gayed E M AE, et al. Association of stem cell factor gene expression with severity and atopic state in patients with bronchial asthma [J]. Respir Res, 2017, 18(1):256-258.
- [3] Ishii S, Iikura M, Hojo M, et al. Use of 3D-CT airway analysis software to assess a patient with severe persistent bronchial asthma treated with bronchial thermoplasty [J]. Allergol Int, 2017, 66(3):501-503.
- [4] 吕小东. [指南]支气管哮喘防治指南(2016年版)[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2017, 64(10):235-237.
- [5] 李斌, 谢俊刚, 陈奇志, 等. 穴位疗法对支气管哮喘缓解期患者炎症因子及临床疗效的影响[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2016, 38(12):920-923.

- [6] Chauhan BF, Jeyaraman MM, Mann AS, et al. Addition of anti-leukotriene agents to inhaled corticosteroids for adults and adolescents with persistent asthma [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2017, 19(3):473-474.
- [7] Gladue RP. Inhibition of leukotriene B4-receptor interaction suppresses eosinophil infiltration and disease pathology in a murine model of experimental allergic encephalomyelitis [J]. *J Exp Med*, 2018, 22(4):1893-1898.
- [8] Phosat C, Panprathip P, Chumpathat N, et al. Elevated C-reactive protein, interleukin 6, tumor necrosis factor alpha and glycemic load associated with type 2 diabetes mellitus in rural Thais: a cross-sectional study [J]. *BMC Endocr Disord*, 2017, 17(1):44-46.
- [9] Ghitarrini S, Carmen G, Frenguelli G, et al. Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease [J]. *Aerobiologia*, 2017, 33(3):1-11.
- [10] Bergmann KC. Asthma bronchiale-viele Formen, viele Therapien [Bronchial asthma-many types, different therapies] [J]. *Dtsch Med Wochenschr*, 2016, 141(10):687-692.
- [11] López-Sanromán Antonio, Joan C, Esther GP, et al. Reviewing the therapeutic role of budesonide in Crohn's disease [J]. *Gastroenterol Hepatol*, 2018, 41(7):458-471.
- [12] 李伟豪, 谢泽荣, 黄桂磐. 虎奶菇提纯物联合布地奈德对小儿支气管哮喘发作期呼吸力学及细胞免疫功能的影响 [J]. *中国医学创新*, 2017, 14(17):5-9.
- [13] Hoxha M, Rovati GE, Cavanillas AB. The leukotriene receptor antagonist montelukast and its possible role in the cardiovascular field [J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 2017, 73(7):799-809.
- [14] Liuhua L, Riyang L, Xinru H, et al. Analysis of the differences in T lymphocyte subsets between children with acute laryngitis and in normal [J]. *Clin Med*, 2018, 10(4):55-57.
- [15] Park SL, Gebhardt T, Mackay LK. Tissue-Resident Memory T Cells in Cancer Immunosurveillance [J]. *Trends Immunol*, 2019, 40(8):735-747.
- [16] Tong C, Guo Z, Lou JX, et al. Clinical Significance of Monitoring T Lymphocyte Subsets after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation [J]. *J Exp Hematol*, 2016, 24(1):167-169.

(上接第 806 页)

- [12] 郑文, 赵娟娟, 崔盼盼, 等. 微小RNA-21 与非小细胞肺癌关系的研究新进展 [J]. *现代免疫学*, 2017, 37(1):61-65.
- [13] 范凡. 晚期非小细胞肺癌循环肿瘤细胞的测定及其意义 [J]. *肿瘤学杂志*, 2018, 24(5):429-433.
- [14] 臧宇, 傅恩清. 同步放化疗联合甘氨双唑钠治疗难治性非小细胞肺癌的疗效及对 microRNA-21 和 SIRT1 表达的影响 [J]. *中国肿瘤临床与康复*, 2019, 26(8):7-10.
- [15] Shi GL, Chen Y, Sun Y, et al. Significance of Serum MicroRNAs in the Auxiliary Diagnosis of Non-Small Cell Lung Cancer [J]. *Clin Labor*, 2017, 63(1):133-140.
- [16] 龙涛, 郎松. 非小细胞肺癌患者化疗后血浆循环肿瘤DNA水平与预后的相关性 [J]. *广西医学*, 2019, 41(22):2842-2845, 2849.
- [17] 胡海雷, 林君平, 乐梅, 等. miR-19a 和 miR-21 联合检测在非小细胞肺癌中的应用 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2019, 29(20):106-107+111.

(上接第 810 页)

- [6] 赵强强, 冯建明, 李文倩, 等. 急性髓系白血病患者 miR-372 的表达水平及其临床意义 [J]. *实用医学杂志*, 2018, 46(12):2030-2034.
- [7] Rezaei R, Marhemati F, Meybodi AM, et al. Transforming growth factor beta 1 (TGFβ1) polymorphisms and unexplained infertility: A genetic association study [J]. *Systems Biol Rep Med*, 2020, 66(1):5-10.
- [8] Dhakal P, Pyakuryal B, Pudasainee P, et al. Treatment Strategies for Therapy-related Acute Myeloid Leukemia [J]. *Clin Lymph, Myeloma Leuk*, 2019, 20(3):12-19.
- [9] Kelly AD, Madzo J, Madireddi P, et al. Demethylator phenotypes in acute myeloid leukemia [J]. *Leukemia*, 2018, 32(1):1-3.
- [10] Agrawal V, Gbolahan OB, Stahl M, et al. Vaccine and Cell-based Therapeutic Approaches in Acute Myeloid Leukemia [J]. *Current Cancer Drug Targets*, 2020, 20(23):85-91.
- [11] Ramaswamy K, Forbes L, Minuesa G, et al. Peptidomimetic blockade of MYB in acute myeloid leukemia [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1):110-118.
- [12] Laurence J, Elhadad S, Gostynska S, et al. HIV protease inhibitor ritonavir induces renal fibrosis and dysfunction: role of platelet-derived TGF-β1 and intervention via anti-oxidant pathways [J]. *AIDS*, 2020, 34(7):1-7.
- [13] Shih TW, Lee LJ, Chang HC, et al. An important role of PHRF1 in dendritic architecture and memory formation by modulating TGF-β signaling [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1):52-58.
- [14] Otegbeye F, Ojo E, Moreton S, et al. Inhibiting TGF-beta signaling preserves the function of highly activated, in vitro expanded natural killer cells in AML and colon cancer models [J]. *Plos One*, 2018, 13(1):191-199.
- [15] Sterner RM, Sakemura R, Cox MJ, et al. GM-CSF inhibition reduces cytokine release syndrome and neuroinflammation but enhances CAR-T cell function in xenografts [J]. *Blood*, 2018, 133(7):881-887.
- [16] Sugaya K, Ino M, Matsuo N, et al. Variegatic acid from the edible mushroom *Tylopilus ballouii* inhibits TNF-α production and PKCβ1 activity in leukemia cells [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2019, 30(4):126-135.

## CP、Hcy 及 25(OH)D3 在糖尿病周围神经病变中的变化及意义

汤步阳\* 黄莹芝 胡恒贵 刘珍

**[摘要]** 目的 分析血清 C 肽(CP)、同型半胱氨酸(Hcy)及 25-羟维生素 D3[25(OH)D3]在糖尿病周围神经病变(DPN)中的变化及意义。方法 分析本院内分泌科收治的 120 例糖尿病患者的临床资料,其中合并 DPN 者 40 例(DPN 组),未合并 DPN 者 80 例(无 DPN 组),比较两组 CP、Hcy、25(OH)D3、空腹血糖(FPG)、总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)及神经传导功能情况,分析 CP、Hcy、25(OH)D3 与其他指标的相关性,并采用多元 Logistic 回归分析影响糖尿病患者并发 DPN 的危险因素。结果 DPN 组 CP、25(OH)D3 水平显著低于无 DPN 组,Hcy、FPG、TC 及 TG 显著高于无 DPN 组,正中神经和胫后神经传导速度均慢于无 DPN 组,差异均具有统计学意义( $P<0.05$ )。相关性分析显示:DPN 患者的 Hcy 水平与 FPG、TC、TG 呈正相关( $P<0.05$ ),与神经传导速度均呈负相关( $P<0.05$ );而 CP、25(OH)D3 水平与 FPG、TC、TG 呈负相关( $P<0.05$ ),与神经传导速度均呈正相关( $P<0.05$ )。经 logistic 回归模型分析,病程、CP、25(OH)D3 水平降低及 Hcy 升高是影响糖尿病患者并发 DPN 的危险因素( $P<0.05$ )。结论 DPN 患者存在 CP、Hcy 及 25(OH)D3 水平的异常表达,维持机体的 CP、Hcy 及 25(OH)D3 水平,有助于延缓 DPN 的发生、发展。

**[关键词]** 血清 C 肽;同型半胱氨酸;25-羟维生素 D3;糖尿病周围神经病变

### Changes and significance of CP, Hcy and 25(OH)D3 in diabetic peripheral neuropathy

TANG Buyang\*, HUANG Yingzhi, HU Henggui, LIU Zhen

(Department of Endocrinology, Wanbei Coal Power Group General Hospital, Suzhou, Anhui, China, 234000)

**[ABSTRACT]** **Objective** To analyze the changes and significance of serum C peptide (CP), homocysteine (Hcy) and 25-hydroxyvitamin D3 [25(OH)D3] in diabetic peripheral neuropathy (DPN). **Methods** The clinical data of 120 patients with diabetes admitted to the Department of Endocrinology in our hospital was retrospectively analyzed, including 40 patients with DPN (DPN group) and 80 patients without DPN (non-DPN group). The two groups were compared with CP, Hcy, 25(OH)D3, Fasting blood glucose (FPG), Total cholesterol (TC), Triacylglycerol (TG) and nerve conduction function. The correlation between CP, Hcy, 25(OH)D3 and other indicators was analyzed. Multivariate Logistic regression analysis was used to analyze the risk factors that affect diabetic patients with DPN. **Results** The levels of CP and 25(OH)D3 in the DPN group were significantly lower than those in the non-DPN group, and Hcy, FPG, TC and TG were significantly higher than those in the non-DPN group ( $P<0.05$ ). The conduction velocity of the median nerve and posterior tibial nerve was slower than that of the non-DPN group, and the differences were statistically significant ( $P<0.05$ ). Correlation analysis showed that Hcy level in DPN patients was positively correlated with FPG, TC, and TG ( $P<0.05$ ), and negatively correlated with nerve conduction velocity ( $P<0.05$ ). The levels of CP and 25(OH)D3 were negatively correlated with FPG, TC, and TG ( $P<0.05$ ), and positively correlated with nerve conduction velocity ( $P<0.05$ ). According to logistic regression model analysis, the course of disease,

基金项目:安徽省自然科学基金资助项目(1708085MC13)

作者单位:皖北煤电集团总医院内分泌科,安徽,宿州 234000

\*通信作者:汤步阳, E-mail:t13855705312@163.com

the decrease of CP and 25(OH)D3 levels, and the increase of Hcy are the risk factors that affect the occurrence of DPN in diabetic patients ( $P<0.05$ ). **Conclusion** DPN patients have abnormal expressions of CP, Hcy and 25(OH)D3 levels. Maintaining the body's CP, Hcy and 25(OH)D3 levels helps delay the occurrence and development of DPN.

**[KEY WORDS]** Serum C peptide; Homocysteine; 25-hydroxyvitamin D3; Diabetic peripheral neuropathy

糖尿病属于一种慢性疾病,近年来随着我国人们生活方式、经济水平的提高,该病的患病率呈上升趋势<sup>[1]</sup>。目前临床尚无根治糖尿病的手段,病情迁延进展容易诱发一系列并发症,对患者生活造成严重影响。糖尿病周围神经病变(Diabetic peripheral neuropathy, DPN)是糖尿病患者常见的并发症之一<sup>[2]</sup>,确切的发病机制尚未明确。近年来有学者认为,免疫炎症反应、细胞因子等参与 DPN 的发病过程<sup>[3]</sup>。血清 C 肽(C peptide, CP)是胰岛素原转变为胰岛素过程中的裂解产物,而同型半胱氨酸(Homocysteine, Hcy)是人体甲硫氨酸的中间代谢产物,与炎症反应密切相关<sup>[4]</sup>。维生素 D 是一种常见的细胞因子,具有调节免疫,抑制变应原诱导的作用。25-羟维生素 D3 [25-hydroxyvitamin D3, 25(OH)D3] 是维生素 D 的体内主要存在形式,在疾病诊断中具有一定作用<sup>[5]</sup>。基于此,本组研究就 CP、Hcy 及 25(OH)D3 在 DPN 中变化及意义进行了研究,以此为临床诊疗 DPN 提供可靠依据。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

分析本院 2019 年 3 月至 2020 年 3 月收治的 157 例糖尿病患者的临床资料。纳入标准:①均符合糖尿病的诊断标准<sup>[6]</sup>;②临床资料无丢失和缺损;③未合并其他系统严重疾病者;④年龄 $\geq 18$ 岁。排除标准:①中途转入或转出者;②合并其他恶性疾病者;③合并免疫系统及全身炎症疾病者;④哺乳期或妊娠期孕妇。

根据纳入排除标准共纳入 120 例糖尿病患者,其中合并 DPN 者 40 例(DPN 组),未合并 DPN 者 80 例(无 DPN 组)。两组患者基线资料比较差异无统计学意义,具有可比性( $P>0.05$ ),见表 1。

### 1.2 方法

空腹抽取所有受检者 6 mL 静脉血,采用 mindray 全自动生化仪及配套试剂检测其空腹血糖(Fasting blood glucose, FPG)、总胆固醇(Total cholesterol, TC)及三酰甘油(Triacylglycerol, TG)水平。CP、Hcy 及 25(OH)D3 水平均采用酶联免疫吸附法检测,CP、Hcy 试剂盒由南京建成生物公司提供,25(OH)D3 试剂盒由美国 IDS 有限公司提供,具体操作严格按照说明书执行。

神经传导功能采用上海海神医疗电子仪器有限公司生产的肌电图诱发电位仪进行检测,均由专业人员进行测量,测量条件是保持皮温 32℃~35℃,分别对正中神经和胫后神经传导速度进行测量,均测 2 次,取其平均值。

### 1.3 观察指标

①比较两组 CP、Hcy、25(OH)D3、血糖、血脂指标及神经传导功能情况;②分析 CP、Hcy、25(OH)D3 与其他指标的相关性;③采用多元 Logistic 回归分析影响糖尿病患者并发 DPN 的危险因素。

### 1.4 统计学方法

采用 SPSS 22.0 统计软件进行统计分析。计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,采用  $t$  检验;计数资料以  $n(\%)$  表示,采用  $\chi^2$  检验;以  $P<0.05$  表示差异具有统计学意义。相关性使用 Pearson 相关性分析;影响因素采用多元 Logistic 回归分析。

表 1 两组患者一般资料比较 [ $n(\%)$ ,  $(\bar{x} \pm s)$ ]

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

组别	n	性别		平均年龄(岁)	病程(年)	体重指数(kg/m <sup>2</sup> )	收缩压(mmHg)	舒张压(mmHg)
		男	女					
DPN 组	40	23(57.50)	17(42.50)	61.42±3.35	5.14±1.87	23.88±3.05	133.75±11.46	74.85±5.72
无 DPN 组	80	44(55.00)	36(45.00)	61.22±3.98	5.84±1.96	23.68±2.87	135.69±12.09	75.33±5.14
$t/\chi^2$ 值		0.068		0.273	1.872	0.352	0.843	0.464
P 值		0.795		0.785	0.064	0.725	0.401	0.643

## 2 结果

### 2.1 两组 CP、Hcy 及 25(OH)D3 水平比较

DPN 组 CP、25(OH)D3 水平显著低于无 DPN 组, Hcy 水平显著高于无 DPN 组, 差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表 2。

表 2 两组 CP、Hcy 及 25(OH)D3 水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	<i>n</i>	CP ( $\mu\text{g/L}$ )	Hcy ( $\mu\text{mol/L}$ )	25(OH)D3 ( $\text{ng/mL}$ )
DPN 组	40	3.42 $\pm$ 2.73	15.19 $\pm$ 2.84	26.71 $\pm$ 6.87
无 DPN 组	80	5.16 $\pm$ 2.16	7.83 $\pm$ 1.25	41.67 $\pm$ 11.34
<i>t</i> 值		3.802	19.727	7.666
<i>P</i> 值		0.001	<0.001	<0.001

### 2.2 两组 FPG、TC、TG 水平及正中神经和胫后神经传导速度比较

DPN 组 FPG、TC 及 TG 水平均显著高于无 DPN 组, 正中神经和胫后神经传导速度均慢于无 DPN 组, 差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表 3。

### 2.3 CP、Hcy 及 25(OH)D3 水平与 FPG、TC、TG 水平及正中神经和胫后神经传导速度的相关性分析

DPN 患者的 Hcy 水平与 FPG、TC、TG 呈正相关( $P < 0.05$ ), 与神经传导速度均呈负相关( $P < 0.05$ ); 而 CP、25(OH)D3 水平与 FPG、TC、TG 呈负相关( $P < 0.05$ ), 与神经传导速度均呈正相关( $P < 0.05$ )。见表 4。

表 3 两组患者 FPG、TC、TG 水平及正中神经和胫后神经传导速度比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	<i>n</i>	FPG (mmol/L)	TC (mmol/L)	TG (mmol/L)	正中神经传导 (m/s)	胫后神经传导 (m/s)
DPN 组	40	7.06 $\pm$ 1.81	1.58 $\pm$ 0.32	5.58 $\pm$ 1.02	1.45 $\pm$ 0.57	1.31 $\pm$ 0.36
无 DPN 组	80	5.62 $\pm$ 1.43	1.34 $\pm$ 0.24	4.72 $\pm$ 1.16	4.01 $\pm$ 1.54	3.01 $\pm$ 0.86
<i>t</i> 值		4.749	4.606	3.981	10.154	11.969
<i>P</i> 值		< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001

表 4 CP、Hcy 及 25(OH)D3 水平与 FPG、TC、TG 水平及正中神经和胫后神经传导速度的相关性分析

Table 4 Correlation Analysis of CP, Hcy and 25 (OH) D3 levels with FPG, TC, TG levels and conduction velocity of median nerve and posterior tibial nerve

相关因子	CP		Hcy		25(OH)D3	
	<i>r</i> 值	<i>P</i> 值	<i>r</i> 值	<i>P</i> 值	<i>r</i> 值	<i>P</i> 值
FPG	-0.587	0.002	0.301	0.024	-0.295	0.022
TC	-0.641	0.001	0.485	0.004	-0.501	0.006
TG	-0.465	0.011	0.364	0.008	-0.302	0.018
正中神经传导速度	0.411	0.006	-0.503	0.003	0.362	0.010
胫后神经传导速度	0.356	0.011	-0.324	0.013	0.521	0.001

### 2.4 影响糖尿病患者并发 DPN 的危险因素分析

经 logistic 回归模型分析得, 病程、CP、25(OH)D3 水平降低及 Hcy 升高是影响糖尿病患者并发 DPN 的危险因素( $P < 0.05$ )。见表 5。

## 3 讨论

糖尿病是一种终身性慢性疾病, 随着病情进展, 会导致多个系统出现并发症, 具有较高的致残、致死性, 有效防治糖尿病并发症发生, 对改善患者生存质量具有重要意义<sup>[7]</sup>。DPN 是指在排除其他原因的情况下, 糖尿病患者出现周围神经功能障碍相关的症状和体征。Yahya 等<sup>[8]</sup>研究发现, Hcy 水平上升会导致大量氧化物产生, 导致周围神经损伤。大量研究发现, 遗传因素、某些药物、胰岛素缺乏、胰岛素抵抗等均可造成血浆 Hcy 水平异常<sup>[9-10]</sup>。高浓度的 Hcy 可进一步引发氧化应激反应, 从而损伤血管内皮细胞, 进而又会对神经髓鞘碱基蛋白产生损害, 造成周围神经损伤<sup>[11]</sup>。CP 是胰岛素原转变为胰岛素过程中的裂解产物, 由 B 细胞分泌。既往研究发现, CP 无生物活性, 临床上仅作为判断胰岛 B 细胞功能的指标<sup>[12]</sup>。但新近研究发现, CP 有神经保护和抗凋亡作用, 且能促进 C 纤维再生, 延缓和减少神经病变<sup>[13]</sup>。维生素 D 是一类脂溶性的维生素, 同时也是一种能够维护身体健康的多功能激素。维生素 D 存在于各类食物中, 人体摄取的天然维生素 D 经日光照射皮肤后, 在体内可转化形成 25

(OH)D3, 并在肾脏内被进一步羟基化生成具有活性的 25(OH)D3, 25(OH)D3 在控制体内钙磷水平和骨骼钙化上具有重要作用, 且对心血管系统、免疫系统、神经系统、糖代谢及细胞增殖分化等方面都具有重要作用<sup>[14-15]</sup>。Alexander 等<sup>[16]</sup>研究发现, 25(OH)D3 可调节神经营养因子的产生, 调控神经元细胞内钙稳态, 发挥神经保护作用, 避免神经退行性变发生, 对神经系统发育及损伤均有调控作用。

本组研究结果提示 CP、Hcy 及 25(OH)D3 在 DPN 发病过程中可能发挥重要作用。且 DPN 组患

表5 影响糖尿病患者并发DPN的危险因素分析

Table 5 Analysis of risk factors of diabetic patients complicated with DPN

变量	单因素分析			多因素分析		
	OR 值	95%CI	P 值	OR 值	95%CI	P 值
性别:男(参照组:女)	1.239	0.989~1.552	0.724			
年龄:≥50岁(参照组:<50岁)	1.250	0.871~1.793	0.697			
病程:≥5年(参照组:<5年)	1.644	1.312~2.059	0.014	1.749	1.261~2.426	<0.001
FPG:≥10.13 mmol/L(参照组:<10.13 mmol/L)	1.260	0.850~1.868	0.514			
TC:≥5.1 mmol/L(参照组:<5.1 mmol/L)	1.121	0.756~1.662	0.541			
TG:≥4.5 mmol/L(参照组:<4.5 mmol/L)	1.131	0.643~1.514	0.486			
CP:<4.22 μg/L(参照组:≥4.22 μg/L)	1.960	1.595~2.048	0.007	1.842	1.111~3.055	<0.001
Hcy:≥7.89 μmol/L(参照组:<7.89 μmol/L)	1.692	1.269~2.257	0.002	2.401	1.775~3.247	<0.001
25(OH)D3:<22n g/mL(参照组:≥22 ng/mL)	1.571	1.253~1.970	0.014	2.575	1.949~3.401	<0.001

者FPG、TC及TG水平均显著高于无DPN组,正中神经和胫后神经传导速度均慢于无DPN组,与既往研究报道一致<sup>[17]</sup>。DPN患者由于代谢紊乱、血管损伤、神经营养因子缺乏、氧化应激和免疫因素等均可引起神经髓鞘、轴索损害,继而引起神经传导异常。相关分析结果说明CP、Hcy及25(OH)D3水平与DPN患者周围神经传导功能病变及其血脂水平关系密切。上述因子可作为周围神经病变的预测指标,对糖尿病患者进行CP、Hcy及25(OH)D3水平检测,可早期发现周围神经病变情况。本研究结果说明在DPN发生过程中,糖尿病患者病程越长,发生DPN的风险越大,且可能存在CP、Hcy及25(OH)D3共同作用加剧DPN的发生。

综上所述,DPN患者存在CP、Hcy及25(OH)D3水平的异常表达,维持机体的CP、Hcy及25(OH)D3水平,有助于延缓DPN的发生、发展。

参考文献

[1] 韩晨鹏,徐清芳,张美华,等. 2型糖尿病患者血清抵抗素、VEGF、糖化白蛋白联合检测在糖尿病肾病早期诊断中的价值分析[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2019, 11(2):128-131.

[2] Iqbal Z, Azmi S, Yadav R, et al. Diabetic Peripheral Neuropathy: Epidemiology, Diagnosis, and Pharmacotherapy[J]. Clin Ther, 2018, 40(6):828-849.

[3] 伍一鸣. 2型糖尿病周围神经病变患者血清中NSE、Hcy、CRP的表达及其临床意义[J]. 医学临床研究, 2019, 36(6):1157-1159.

[4] Hiroaki U, Tomomi S, Kazuhiro N, et al. Clinical application of ghrelin for diabetic peripheral neuropathy[J]. Endocr J, 2017, 64(Suppl.):S53-S57.

[5] 贾强,杨锐,刘小粉,等. 金雀异黄酮对糖尿病大鼠心肌损伤的保护作用[J]. 四川大学学报(医学版), 2018, 49(5):23-28.

[6] Jin HY, Park TS. Role of inflammatory biomarkers in diabetic peripheral neuropathy[J]. J Diabet Investig, 2018, 9(5):78-79.

[7] 赵艾苹,魏剑芬,王建荣,等. 糖尿病微血管病变患者血清25-OH维生素D3水平的变化及其影响因素[J]. 中国医师杂志, 2019, 21(1):112-114.

[8] Yahya A, Kluding P, Pasnoor M, et al. The impact of diabetic peripheral neuropathy on pinch proprioception [J]. Exp Brain Res, 2019, 237(12):3165-3174.

[9] 王丽晖,吴广礼,林静,等. 丝裂原活化蛋白激酶磷酸酶1在糖尿病大鼠肾组织细胞外基质重构中的作用[J]. 解放军医药杂志, 2018, 30(5):15-20.

[10] Hor CP, Fung WY, Ang HA, et al. Efficacy of Oral Mixed Tocotrienols in Diabetic Peripheral Neuropathy: A Randomized Clinical Trial[J]. JAMA Neurol, 2018, 75(4):465.

[11] Mcgregor BA, Eid S, Rumora AE, et al. Conserved Transcriptional Signatures in Human and Murine Diabetic Peripheral Neuropathy[J]. Sci Rep, 2018, 8(1):415-416.

[12] Alexander J, Parsons B, Edwards R, et al. (464) Identification of Subgroups in Responses to pregabalin in patients with Painful Diabetic Peripheral Neuropathy (pDPN) Enables Utilization of Randomized Controlled Trial (RCT) Data to Reduce Covariate Bias in Observational Study (OS) Data [J]. J Pain, 2017, 18(4):S89-S90.

[13] Javed S, Hayat T, Menon L, et al. Diabetic peripheral neuropathy in people with type 2 diabetes: too little too late [J]. Diabet Med, 2020, 37(8):1-7.

[14] Mathukumalli N, Kandadai M, Shaik J, et al. Serum B12, Homocysteine Levels, and their Effect on Peripheral Neuropathy in Parkinson's Disease: Indian Cohort [J]. Ann Indian Acad Neurol, 2019, 23(1):49-51.

[15] Park JS, Park D, Ko PW, et al. Serum methylmalonic acid correlates with neuropathic pain in idiopathic Parkinson's disease [J]. Neurol Sci, 2017, 38(10):26-28.

[16] Alexander J, Edwards RA, Manca L, et al. Dose Titration of Pregabalin in Patients with Painful Diabetic Peripheral Neuropathy: Simulation Based on Observational Study Patients Enriched with Data from Randomized Studies [J]. Adv Ther, 2018, 39(10):4654.

[17] Impellizzeri D, Peritore AF, Cordaro M, et al. The neuroprotective effects of micronized PEA (PEA-m) formulation on diabetic peripheral neuropathy in mice [J]. FASEB J, 2019, 33(4):531-543.

# 重症呼吸衰竭患者心肌损害与ET-1、IL-18、NO水平的关系

吴畏<sup>1</sup> 郭晓鹤<sup>2</sup> 杨飞云<sup>1</sup> 孔令宇<sup>1</sup> 牛丽丹<sup>1</sup> 石金河<sup>1\*</sup>

**[摘要]** 目的 分析重症呼吸衰竭患者心肌损害与内皮素-1(ET-1)、白细胞介素-18(IL-18)及内源性一氧化氮(NO)水平的关系。方法 选取2017年4月至2020年4月本院收治的120例重症呼吸衰竭患者设为研究组,根据是否发生心肌损伤分为心肌损害组( $n=37$ 例)、非心肌损害组( $n=83$ 例),同时纳入同期本院接受健康体检结果正常者(共52例)作为对照组。记录血清ET-1、IL-18及NO水平,比较不同人群血清ET-1、IL-18及NO水平差异,采用多元Logistic回归分析影响重症呼吸衰竭患者发生心肌损害的危险因素,绘制ROC曲线分析ET-1、IL-18及NO水平对重症呼吸衰竭患者发生心肌损害的预测价值。结果 研究组患者ET-1、IL-18及NO水平显著高于对照组,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。心肌损害组患者ET-1、IL-18及NO水平显著高于非心肌损害组,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。Logistic回归模型得出:ET-1、IL-18、NO异常升高为影响重症呼吸衰竭患者发生心肌损害的独立危险因素( $P<0.05$ )。ROC曲线得出:ET-1曲线下面积为0.780,IL-18曲线下面积为0.688,NO曲线下面积为0.784,三者联合曲线下面积为0.938,以联合检测下面积值最大( $P<0.05$ )。结论 血清ET-1、IL-18及NO水平与重症呼吸衰竭患者心肌损害密切相关,临床工作者可通过加强监测这三项指标,评估疾病进展与预后情况。

**[关键词]** 重症呼吸衰竭; ET-1; IL-18; NO; 心肌损害

## Relationship between myocardial damage and the levels of serum ET-1, IL-18 and NO in patients with severe respiratory failure

WU Wei<sup>1</sup>, GUO Xiaohu<sup>2</sup>, YANG Feiyun<sup>1</sup>, KONG Lingyu<sup>1</sup>, NIU Lidan<sup>1</sup>, SHI Jinhe<sup>1\*</sup>

(1. Department of EICU, the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical College, Weihui, Henan, China, 453100; 2. Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Weihui, Henan, China, 453100)

**[ABSTRACT]** **Objective** To analyze the relationship between myocardial damage and endothelin-1 (ET-1), interleukin-18 (IL-18) and endogenous nitric oxide (NO) levels in patients with severe respiratory failure. **Methods** A total of 120 patients with severe respiratory failure admitted to this hospital from April 2017 to April 2020 were selected as the study group. According to whether myocardial injury occurred or not, they were divided into the myocardial damage group ( $n=37$  cases) and the non-myocardial damage group ( $n=83$  cases). At the same time, patients with normal physical examination results in this hospital during the same period (52 cases in total) were included as the control group. The serum ET-1, IL-18 and NO levels were recorded, and the differences in serum ET-1, IL-18 and NO levels in different people were compared. Multivariate logistic regression was used to analyze the risk factors of myocardial damage in patients with severe respiratory failure, and ROC curve was drawn to analyze the value of ET-1, IL-18, and NO levels in predicting myocardial damage in patients with severe respiratory failure. **Results** The levels of ET-1, IL-18, and NO in the study group were significantly higher than those in the control group, and the differences were statistically sig-

基金项目:河南省医学科技攻关计划项目(201702129)

作者单位:1. 新乡医学院第一附属医院EICU,河南,卫辉 453100

2. 新乡医学院第一附属医院消化内科,河南,卫辉 453100

\*通信作者:石金河, E-mail: sjh4402901@163.com

nificant ( $P<0.05$ ). The levels of ET-1, IL-18 and NO in the myocardial damage group were significantly higher than those in the non-myocardial damage group, and the differences were statistically significant ( $P<0.05$ ). Logistic regression model showed that the abnormal increasing of ET-1, IL-18 and NO were independent risk factors affecting myocardial damage in patients with severe respiratory failure ( $P<0.05$ ). The ROC curve shows that the area under the ET-1 curve is 0.780, the area under the IL-18 curve is 0.688, the area under the NO curve is 0.784, and the area under the three combined curve is 0.938, the area under the combined detection is the largest ( $P<0.05$ ). **Conclusion** Serum ET-1, IL-18 and NO levels are closely related to myocardial damage in patients with severe respiratory failure. Clinicians can strengthen the monitoring of these three indicators to assess disease progression and prognosis.

[KEY WORDS] Severe respiratory failure; ET-1; IL-18; NO; Myocardial damage

呼吸衰竭是指各种原因引起的肺通气或换气功能严重障碍,以至在静息状态下不能维持足够的气体交换,导致低氧血症伴(或不伴)高碳酸血症,进而引起的一系列病理生理改变和相应临床表现的综合征<sup>[1]</sup>。近年来,大量临床研究发现,重症呼吸衰竭患者疾病的发生、发展与细胞因子密切相关<sup>[2]</sup>。白细胞介素-18(Interleukin-18, IL-18)是重要的促炎介质,在多种炎症性疾病中呈高表达状态,对炎症性疾病及进展有重要作用。内源性一氧化氮(Nitric oxide, NO)是一氧化氮合酶的作用下,由体内精氨酸反应生成,可使内皮细胞增生、凋亡,促进炎症因子产生,导致机体出现慢性炎症<sup>[3]</sup>。相关研究发现,内皮素-1(Endothelin 1, ET-1)含量增加可能参与了低氧状态下肺小动脉痉挛及肺动脉高压的形成,对重症呼吸衰竭患者病情的进展具有重要意义<sup>[4]</sup>。本研究将分析血清ET-1、IL-18及NO水平在重症呼吸衰竭中表达及与心肌损害的相关性进行分析,现报告如下。

## 1 对象与方法

### 1.1 一般资料

选取2017年4月至2020年4月本院收治的120例重症呼吸衰竭患者设为研究组,其中男69例,女51例,平均年龄( $66.79\pm 6.93$ )岁。根据是否发生心肌损伤分为心肌损害组( $n=37$ ):其中男21例,女16例,平均年龄( $65.71\pm 6.12$ )岁;非心肌损害组( $n=83$ ):男48例,女35例,平均年龄( $65.83\pm 6.11$ )岁。

纳入标准:①所有患者均经实验室检查、临床症状及体征确诊<sup>[5]</sup>。②临床资料完整;③本研究经医院伦理委员会批准,患者均签署知情同意。排除标准:①合并肝肾疾病。②合并严重感染及恶性肿瘤。③存在急性心力衰竭、恶性心律失常、肺源性心脏病、先天性心脏病及其他心脏瓣膜病

等。④临床及随访资料不完整或缺乏准确性者。同时纳入52例同期本院接受健康体检结果正常者作为对照组。其中男30例,女22例,平均年龄( $66.73\pm 6.86$ )岁。各组间一般资料比较差异无统计学意义( $P>0.05$ ),具有可比性。

### 1.2 观察指标

对照组于体检当日、研究组于入院后次日抽取清晨空腹静脉血3 mL,置于肝素锂抗凝管中,在低温离心机中离心(3 000 rpm, 15 min)。取400  $\mu$ L血浆送检,采用酶联免疫吸附测定磷酸肌酸激酶同工酶(creatine phosphokinase-isoenzyme-MB, CK-MB)、ET-1、IL-8的水平,试剂盒选择上海鑫乐生物科技有限公司;应用VIS-723型分光光度计通过检测波长550 nm外的吸光度值间接测定NO含量;采用酶速率法检测肌酸激酶(Creatine kinase, CK);采用全自动生化分析仪心肌钙蛋白(Cardiac troponin I, cTnI),检测试剂盒均购自武汉默沙克生物科技有限公司。操作过程严格按照说明书进行。CK-MB、ET-1、IL-8、NO、CK、cTnI的参考值分别为:1~25 U/L、1.6~3.06 ng/L、8.11~15.53  $\mu$ g/L、5.69~6.55  $\mu$ mol/L、30~150 U/L、0.13~0.47 ng/mL<sup>[6-11]</sup>。

### 1.3 统计学处理

采用SPSS 22.0软件进行分析,计数资料以 $n(\%)$ 表示, $\chi^2$ 检验;计量资料以( $\bar{x}\pm s$ )表示, $t$ 检验,采用多元Logistic回归分析影响重症呼吸衰竭患者发生心肌损害的危险因素,绘制ROC曲线分析ET-1、IL-18及NO水平对重症呼吸衰竭患者发生心肌损害的预测价值, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 两组ET-1、IL-18及NO水平比较

研究组ET-1、IL-18及NO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ET-1、IL-18及NO水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Comparison of ET-1, IL-18 and no levels between the two groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	ET-1(ng/L)	IL-18( $\mu$ g/L)	NO( $\mu$ mol/L)
研究组	120	4.85 $\pm$ 1.36	95.52 $\pm$ 6.63	8.72 $\pm$ 1.94
对照组	52	2.33 $\pm$ 0.73	11.82 $\pm$ 3.71	6.12 $\pm$ 0.43
t值	-	12.585	85.441	9.548
P值	-	<0.001	<0.001	<0.001

## 2.2 心肌损害组与非心肌损害组ET-1、IL-18及NO水平比较

心肌损害组患者ET-1、IL-18及NO水平显著高于非心肌损害组,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。见表2。

表2 心肌损害组与非心肌损害组ET-1、IL-18及NO水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Comparison of ET-1, IL-18 and NO levels between myocardial damage group and non myocardial damage group ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	ET-1(ng/L)	IL-18( $\mu$ g/L)	NO( $\mu$ mol/L)
心肌损害组	37	5.11 $\pm$ 1.10	90.11 $\pm$ 12.04	7.94 $\pm$ 2.72
非心肌损害组	83	3.06 $\pm$ 0.45	71.12 $\pm$ 17.77	5.41 $\pm$ 1.37
t值	-	14.524	5.916	6.782
P值	-	<0.001	<0.001	<0.001

## 2.3 影响重症呼吸衰竭患者发生心肌损害的危险因素分析

通过Logistic回归模型分析影响重症呼吸衰竭患者发生心肌损害的相关因素,得出:CK、CK-MB、cTnI、ET-1、IL-18、NO为影响重症呼吸衰竭患者发生心肌损害的单因素( $P<0.05$ );选取有条件的单

因素进一步分析,得出:ET-1、IL-18、NO异常升高为影响重症呼吸衰竭患者发生心肌损害的独立危险因素( $P<0.05$ )。见表3。

## 2.4 ET-1、IL-18及NO及三者联合检测重症呼吸衰竭患者发生心肌损害的诊断价值

ROC曲线得出三者联合曲线下面积为0.938,以联合检测下面积值最大( $P<0.05$ )。见表4、图1。

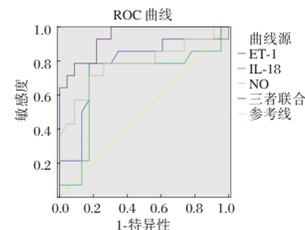


图1 ET-1、IL-18及NO及三者联合检测重症呼吸衰竭患者发生心肌损害的诊断价值

Figure 1 diagnostic value of ET-1, IL-18 and NO combined detection in myocardial damage in patients with severe respiratory failure

## 3 讨论

现临床对于重症呼吸衰竭发病机制尚未为明确,研究发现其与细胞因子及免疫功能紊乱有关<sup>[11]</sup>。

ET-1对肺血管及支气管具有强烈的血管收缩作用,与哮喘急性发作、肝肾综合征、心肌梗死、急性肾功能衰竭等各种脏器功能不全密切相关。孟承颖等<sup>[12]</sup>研究发现,HIF-1 $\alpha$ 介导血管内皮细胞中ET-1及其受体表达,参与低氧条件下血管通透性变

表3 影响重症呼吸衰竭患者发生心肌损害的危险因素分析

Table 3 Risk factors of myocardial damage in patients with severe respiratory failure

变量	单因素分析			多因素分析		
	OR值	95%CI	P值	OR值	95%CI	P值
年龄(<65岁 vs $\geq$ 65岁)	1.139	0.713~1.513	0.569			
BMI(<24 kg/m <sup>2</sup> vs $\geq$ 24 kg/m <sup>2</sup> )	1.065	1.341~1.912	0.727			
CK(异常升高 vs 正常)	1.791	1.325~1.616	0.019	1.658	0.892~3.731	0.061
CK-MB(异常升高 vs 正常)	1.716	1.236~1.497	0.010	1.162	0.603~2.242	0.084
cTnI(异常升高 vs 正常)	1.765	1.212~1.535	0.015	1.181	0.617~2.260	0.091
ET-1(异常升高 vs 正常)	1.831	1.644~1.972	0.016	1.636	1.365~1.784	0.035
IL-18(异常升高 vs 正常)	1.586	1.357~1.867	0.022	1.754	1.452~1.885	0.008
NO(异常升高 vs 正常)	1.658	1.575~1.587	0.004	1.658	1.369~1.789	0.017

表4 ET-1、IL-18及NO及三者联合检测重症呼吸衰竭患者发生心肌损害的诊断价值

Table 4 Diagnostic value of ET-1, IL-18 and NO combined detection in myocardial damage in patients with severe respiratory failure

预测指标	Cut-off值	敏感度(%)	特异度(%)	约登指数	AUC	95%CI	P值
ET-1(ng/L)	25.10	61.94	62.81	123.75	0.780	0.614~0.945	<0.001
IL-18( $\mu$ g/L)	26.41	72.02	73.57	144.59	0.688	0.487~0.889	<0.001
NO( $\mu$ mol/L)	25.42	75.81	71.46	146.27	0.784	0.616~0.952	<0.001
三者联合检测	27.59	89.54	89.93	178.47	0.938	0.842~1.000	<0.001

化。IL-18是最早命名的趋化因子,是由多种细胞产生的小分子量多肽,可趋化和激活中性粒细胞,并参与中性粒细胞与内皮细胞粘附过程的调节,加重组织损伤。冶秀花<sup>[13]</sup>通过研究发现,呼吸衰竭时机体产生的IL-18会导致肝组织产生大量炎症细胞因子并大量活化,形成级联效应,引起病变的进展。本研究结果显示,研究组患者血清ET-1、IL-18水平显著高于对照组及非心肌损害人群,说明ET-1、IL-18水平与患者发生心肌损害有着密切联系。

NO是一氧化氮合酶的作用下,由体内L2精氨酸反应生成,是人体内重要的生物学信使。NO在生理情况下可以松弛支气管平滑肌,抑制病原微生物生长,防止白细胞粘附、聚集和激活,扩张血管平滑肌;NO在病理情况下,可在其他因子作用下,介导血管内皮细胞损伤,产生大量NO,形成环式循环,参与炎症反应的过程。近年来,研究发现趋化因子的可溶性小分子多肽物质在呼吸衰竭的炎症反应中起着重要作用<sup>[14]</sup>。Demir等<sup>[15]</sup>在呼吸衰竭患者研究中发现,NO水平随病变程度程度升高而上升,与呼吸衰竭的严重程度密切相关。这与本研究结果基本一致,进一步表明NO水平参与呼吸衰竭引起的心肌损害的过程。

为明确影响重症呼吸衰竭患者发生心肌损害的危险因素,本研究进行了Logistic回归模型分析,结果显示ET-1、IL-18、NO异常升高为影响重症呼吸衰竭患者发生心肌损害的独立危险因素。这与既往学者研究IL-18、ET-1水平结果相似,考虑与重症呼吸衰竭患者体内缺血缺氧性刺激导致患者血象以及脏器功能发生异常改变,引发ET-1、IL-18、NO水平升高有关<sup>[16-17]</sup>,进一步提示ET-1、IL-18、NO水平在重症呼吸衰竭患者发生心肌损害中意义深重。ROC曲线分析结果进一步提示联合检测三指标可作为预测患者心肌损害的有效手段。

综上所述,血清ET-1、IL-18及NO水平与重症呼吸衰竭患者心肌损害密切相关,临床工作者可通过加强监测这三项指标,评估疾病进展与预后情况。

## 参考文献

- [1] 王恺隽,李铁威,王棕健,等.高敏心肌肌钙蛋白T与冠状动脉粥样硬化特征的相关性[J].检验医学,2019,34(1):19-26.
- [2] 孙彩玲,张华钊,孙淑红.血清NT-proBNP,D-二聚体,ST2水平与COPD合并呼吸衰竭患者预后的相关性分析[J].分子诊断与治疗杂志,2020,12(2):229-233.
- [3] Sarak T, Karadeniz M. The relationship between serum NT-proBNP levels and severity of coronary artery disease assessed by SYNTAX score in patients with acute myocardial infarction[J]. Turkish J Med Sci, 2019, 49(5):1366-1373.
- [4] Dural M, Sunman H, Engin Algül, et al. Relationship between serum bilirubin levels and presence of fragmented QRS in patients with acute coronary syndrome[J]. Biom ark Med, 2019, 14(2):269-271.
- [5] Mizuiri S, Nishizawa Y, Yamashita K, et al. Relationship of serum magnesium level with body composition and survival in hemodialysis patients[J]. Hemodial Int, 2019, 24(1):99-107.
- [6] Akil A, Ziegeler S, Reichelt J, et al. Combined Use of CytoSorb and ECMO in Patients with Severe Pneumogenic Sepsis [J]. Thorac Cardiovasc Surg, 2020, 36(5):167-169.
- [7] Betül K, Akku N. Novel mutation and severe respiratory failure in congenital disorders of glycosylation Type Ix [J]. Turk J Pediatr, 2020, 62(1):114.
- [8] Rovina N, Akinosoglou K, Eugen-Olsen J, et al. Soluble urokinase plasminogen activator receptor (suPAR) as an early predictor of severe respiratory failure in patients with COVID-19 pneumonia[J]. Critical Care, 2020, 24(1):208-210.
- [9] Camporota L, Meadows C, Ledot S, et al. Consensus opinion on the referral and admission of patients with severe respiratory failure to the NHS respiratory ECMO service[J]. Lancet Res Med, 2021, 20(6):2213-2600.
- [10] Aizawa N, Ishiiji Y, Tominaga M, et al. Relationship between the Degrees of Itch and Serum Lipocalin-2 Levels in Patients with Psoriasis[J]. J Immun Res, 2019, 14(5):1-8.
- [11] Suwalski P, Rydzewski A, Rafa W, et al. Severe respiratory failure in the course of COVID-19, treated with extracorporeal membrane oxygenation (ECMO)[J]. Kardiologia, 2020, 16(8):192-195.
- [12] 孟承颖,孙业祥,方林森,等.HIF-1 $\alpha$ 介导大鼠血管内皮细胞ET-1及其受体表达的机制研究[J].安徽医科大学学报,2019,54(3):413-418.
- [13] 冶秀花. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 和IL-18在心肌梗死合并急性呼吸衰竭患者血清中的表达及意义[J].河北医药,2019,41(21):106-109.
- [14] Mustafa AK, Alexander PJ, Joshi DJ, et al. Extracorporeal Membrane Oxygenation for Patients With COVID-19 in Severe Respiratory Failure[J]. JAMA Surg, 2020, 155(10):461-465.
- [15] Demir E, Harmankaya N, Kıraç Uİ, et al. The Relationship between Epicardial Adipose Tissue Thickness and Serum Interleukin-17a Level in Patients with Isolated Metabolic Syndrome[J]. Biomolecules, 2019, 9(3):336-339.
- [16] 张洁,艾芬.柴胡皂苷D对急性心肌梗死大鼠血流动力学和心肌氧化应激损伤的保护作用[J].医学分子生物学杂志,2019,16(1):81-86.
- [17] Sun K, Xia H. Serum levels of NLRP3 and HMGB-1 are associated with the prognosis of patients with severe blunt abdominal trauma[J]. Clinics (So Paulo), 2019, 74(1):729.

# 前列腺癌中 *CD147*、*MMP-2* mRNA 表达与临床分期、病理学分级的关系

吴狄<sup>1\*</sup> 邓海媚<sup>1</sup> 姚睿智<sup>2</sup> 陈铭<sup>2</sup>

**[摘要]** 目的 分析前列腺癌病灶组织中细胞外基质金属蛋白酶诱导因子 *CD147*、基质金属蛋白酶(*MMP*)-2(*MMP-2*)mRNA 表达与临床分期、病理学分级的关系。方法 选取2015年4月至2018年12月本院收治的前列腺癌患者58例及同期行手术治疗的前列腺增生患者50例为研究对象,取前列腺癌患者病灶组织、癌旁组织及前列腺增生患者的组织标本,以原位杂交法测定各组织中 *CD147* mRNA 表达水平,采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)测定 *MMP-2* mRNA,并评估 *CD147* mRNA 表达与临床分期、病理学分级等的关系。结果 前列腺癌病灶组织中 *CD147* mRNA 阳性率及 *MMP-2* 表达水平高于前列腺癌癌旁组织、前列腺增生组织( $P<0.05$ ),前列腺癌癌旁组织 *CD147* mRNA 阳性率及 *MMP-2* 表达水平也高于前列腺增生组织( $P<0.05$ );前列腺癌患者中,临床分期 T3~T4 期、病理学分级  $\geq 5$  级、淋巴结转移 N1 期、远处转移 M1 期者的 *CD147* mRNA 阳性率、*MMP-2* mRNA 表达水平高于临床分期 T1~T2 期、病理学分级 2~4 级、淋巴结转移 N0 期、远处转移 M0 期者,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。结论 检测 *CD147*、*MMP-2* mRNA 的表达对评估肿瘤恶性程度与生物学行为、预后积极意义。

**[关键词]** 前列腺癌;前列腺增生;*CD147* mRNA;*MMP-2* mRNA

## Relationship between the expression of *CD147*, *MMP-2* mRNA and clinical stage and pathological grade in prostate cancer

WU Di<sup>1\*</sup>, DENG Haimei<sup>1</sup>, YAO Ruizhi<sup>2</sup>, CHEN Ming<sup>2</sup>

(1. First Clinical Medical College of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong, China, 510405; 2. First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong, China, 510405)

**[ABSTRACT]** **Objective** To analyze the relationship between expression of (Extracellular Matrix Metalloproteinase Induce) *CD147*, matrix metalloproteinase-2 (*MMP-2*) mRNA and clinical staging, pathological grading in tissues from prostate cancer (PCA). **Methods** A total of 58 PCA patients who were admitted to the First Clinical Medical College of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine from April 2015 to December 2018 and 50 patients with benign prostatic hyperplasia (BPH) who underwent surgery in the same period were enrolled in the study. The tissues and adjacent tissues of PCA patients, and tissue specimens of BPH patients were collected. The expression levels of *CD147* mRNA in all tissues were measured by in situ hybridization. The reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed to measure *MMP-2* mRNA. The relationship between expression of *CD147* mRNA and clinical staging, pathological grading was evaluated. **Results** The positive rate of *CD147* mRNA and *MMP-2* expression level in PCA tissues were higher than those in PCA adjacent tissues and BPH tissues ( $P<0.05$ ). The positive rate of *CD147* mRNA and *MMP-2* expression level in PCA adjacent tissues were higher than those in BPH tissues ( $P<0.05$ ). Among

基金:安徽省高等学校自然科学研究项目(KJ2015B111by)

作者单位:1. 广州中医药大学第一临床医学院泌尿外科,广东,广州 510405

2. 广州中医药大学第一附属医院泌尿外科,广东,广州 510405

\*通信作者:吴狄, E-mail: areswd@sina.com

PCA patients, the positive rates of *CD147* mRNA and MMP-2 expression level in patients with clinical stage at T3 to T4 stage, pathological grade of greater than 5 level, lymph node metastasis at N1 stage and distant metastasis at M1 stage were higher than those with clinical stage at T1 to T2 stage, pathological grade within 2 to 4 level, lymph node metastasis at N0 stage and distant metastasis at M0 stage ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The expression of *CD147* and *MMP-2* mRNA in PCA tissues is closely related to the clinical staging and pathological grading. The detection of both *CD147* and *MMP-2* mRNA is of positive significance for evaluating the tumor malignancy degree, biological behavior, and prognosis.

**[KEY WORDS]** Prostate cancer; Benign prostatic hyperplasia; *CD147* mRNA; *MMP-2* mRNA

前列腺癌(prostate cancer, PCA)为前列腺泡细胞异常无序生长而产生的恶性肿瘤,其在全世界范围内发病率位居第二位,死亡率位居第六位<sup>[1]</sup>。近年来我国前列腺癌发病率呈显著上升趋势<sup>[2]</sup>,如何提高其早期诊断水平是目前研究热点。肿瘤的发生、生长失控及浸润和转移为一个涉及多因素、多步骤的复杂过程,而细胞外基质金属蛋白酶诱导因子(extracellular matrix metalloproteinase inducer, EMMPRIN)又称为CD147,作为一种重要的跨膜糖蛋白,CD147在肿瘤生长、浸润与转移等过程中均发挥着重要作用。其在多种肿瘤细胞中均有不同程度表达,可能与其促进肿瘤生长有密切关系,是目前肿瘤研究的新兴热点<sup>[3]</sup>。基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinase, MMP-2)属于明胶酶,为基质金属蛋白酶的一种,可特异性破坏基底膜,同肿瘤转移有密切关系,对判断疾病病情进展有指导意义<sup>[4]</sup>。但目前关于CD147、MMP-2在前列腺癌中的表达现状研究较少。本文将评估CD147、MMP-2在前列腺癌中的临床意义,旨在为临床准确诊断前列腺癌提供借鉴。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选取2015年4月至2018年12月本院收治的前列腺癌患者58例及同期行手术治疗的前列腺增生患者50例为研究对象。前列腺癌纳入标准:①均符合前列腺癌诊断标准<sup>[5]</sup>,且在术前未接受内分泌治疗或放化疗;②入院时Gleason评分在2分及以上,TNM分期T1~4期;③知情同意本研究并签署知情同意书。排除标准:①其他类型恶性肿瘤患者;②病历资料不全;③配合依从性差者。58例前列腺癌:年龄平均(60.15±6.18)岁;临床分期:T1~T2期31例,T3~T4期27例;病理学分级2~4级31例,≥5级27例;淋巴结转移N0期30例,N1期28例;远处转移M0期30例,M1期28例。另选择同期行前列腺

摘除术与经尿道前列腺电切术的良性前列腺增生患者50例,年龄平均(60.11±6.24)岁,均知情同意本研究。本研究获得院伦理委员会批准。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 标本采集

术中收集前列腺癌患者的病灶组织、癌旁组织及前列腺增生患者的组织标本。将所有前列腺组织以石蜡包埋,每张切片0.5 μm,连续切片5张,压片烘干后标记上病例编号。

#### 1.2.2 实验试剂

*CD147* mRNA原位杂交试剂盒与地高辛标记的CD147相关寡核苷酸探针均购自武汉博士德公司;*MMP-2* mRNA PCR检测试剂盒购自日本TaKaRa公司。

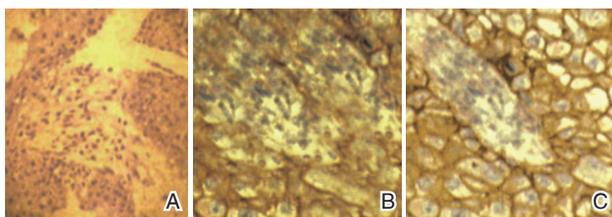
#### 1.2.3 检测方法

*CD147* mRNA以焦炭酸二乙酯(DEPC)清洗原位杂交试验中的器皿、蒸馏水。阴性对照组中只加杂交液,不加探针。检测步骤:将石蜡切片进行脱蜡和水化,应用3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>将过氧化物灭活,以蛋白酶K进行消化处理,暴露mRNA的核酸片段,以预杂交封闭片段上非特异性杂交点,后进行二次杂交,以地高辛标记的CD147探针处理。杂交后,去除非碱基配对RNA,以抗体连接,二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)显色,常规采用苏木精复染,后脱水,透明,封片。*MMP-2* mRNA:依据试剂盒说明书提取RNA,逆转录获得cDNA,将cDNA扩增为MMP-2,以β-actin为内参,PCR反应条件:95℃ 30 s,循环42次;95℃ 5 s,循环42次;60℃,45 s,循环42次。以 $-2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算mRNA相对表达强度,重复测定3次后取平均值。

#### 1.2.4 病理结果的判读

由2名经验丰富的病理医师进行评判,细胞膜与细胞质内出现淡黄色或棕黄色为阳性细胞,以半定量积分法<sup>[6]</sup>对原位杂交结果进行判断,其中染色强度为浅黄色记1分,深黄色记2分,棕黄色记3

分,随机找到5个400倍的视野进行观察,统计阳性细胞在视野范围内占比,阳性细胞率<5%记1分,阳性细胞率在5%~25%记2分,阳性细胞率在26%~50%记3分,阳性细胞率>50%记4分。以上两部分分值之和作为最终总分,总分1~3分为阴性(-),4~6分为阳性(+),7分为强阳性(++),阳性率=(阳性+强阳性)/总例数×100%。如图1。



注:图A、B、C分别为阴性、阳性、强阳性表达结果。

图1 病理结果判读(SP,×400)

Figure 1 Interpretation of pathological results (SP,×400)

### 1.2.5 资料搜集

搜集前列腺癌患者的临床资料,包括年龄、临床分期、病理学分级、淋巴结转移、远处转移等,分析前列腺癌患者病灶组织中CD147、MMP-2 mRNA表达水平与各参数的关系。

### 1.3 统计学方法

采用SPSS19.0软件处理数据,计数资料以n(%)表示,采用 $\chi^2$ 检验,计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,采用配对样本t检验或独立样本t检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 不同组织中CD147、MMP-2 mRNA表达水平比较

前列腺癌病灶组织中CD147 mRNA阳性率及MMP-2 mRNA表达水平高于前列腺癌癌旁组织、前列腺增生组织( $Z$ 值=16.207, $t_{\text{配对}}$ =17.771, $P < 0.05$ ),前列腺癌癌旁组织CD147 mRNA阳性率及

MMP-2 mRNA表达水平也高于前列腺增生组织( $\chi^2=4.776$ , $t_{\text{独立}}=23.193$ , $P < 0.05$ )。见表1。

表1 不同组织中CD147、MMP-2 mRNA表达水平比较 [n(%)]

组织类型	n	CD147 mRNA 阳性率	MMP-2 mRNA
前列腺癌病灶组织	58	49(84.48)	0.42±0.07
前列腺癌癌旁组织	58	20(34.48) <sup>a</sup>	0.28±0.05 <sup>a</sup>
前列腺增生组织	50	8(16.00) <sup>ab</sup>	0.16±0.04 <sup>ab</sup>

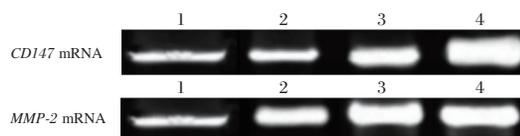
注:与前列腺癌病灶组织比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与前列腺癌癌旁组织比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ 。

### 2.2 CD147、MMP-2 mRNA表达水平与各参数的关系

前列腺癌患者临床分期T3~T4期、病理学分级≥5级、淋巴结转移N1期、远处转移M1期者的CD147 mRNA阳性率及MMP-2表达水平高于临床分期T1~T2期、病理学分级2~4级、淋巴结转移N0期、远处转移M0期者,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表2。

### 2.3 电泳结果

电泳结果显示,前列腺癌病灶组织中CD147 mRNA、MMP-2 mRNA表达水平较前列腺癌癌旁组织、前列腺增生组织高。见图2。



注:1为 $\beta$ -actin,2为前列腺增生组织,3为前列腺癌癌旁组织,4为前列腺癌病灶组织。

图2 电泳结果

Figure 2 Electrophoresis results

## 3 讨论

肿瘤的发生是多个基因协调作用的结果,其主要含原癌基因的表达上调及抑癌基因的表达下

表2 CD147 mRNA、MMP-2 mRNA表达水平与各参数的关系 [n(%)]

Table 2 Relationship between CD147 mRNA, MMP-2 mRNA and various parameters [n(%)]

参数	类型	例数	CD147 mRNA 阳性率	$\chi^2$ 值	P值	MMP-2 mRNA	t值	P值
年龄(岁)	<65	30	24(80.00)	0.953	0.329	0.41±0.05	1.674	0.100
	≥65	28	25(89.29)			0.43±0.04		
临床分期	T1~2	31	22(70.97)	0.002	0.002	0.38±0.05	5.055	0.000
	T3~4	27	27(100.00)			0.46±0.07		
病理学分级	2~4	31	23(74.19)	0.029	0.029	0.35±0.04	4.751	0.000
	≥5	27	26(96.30)			0.42±0.07		
淋巴结转移	N0	30	21(70.00)	0.002	0.002	0.34±0.05	8.987	0.000
	N1	28	28(100.00)			0.47±0.06		
远处转移	M0	30	22(73.33)	6.775	0.009	0.37±0.05	5.861	0.000
	M1	28	27(96.43)			0.44±0.04		

调。研究发现,前列腺癌的发生可能与遗传、环境、性激素、基因调控异常等有关,其中基因异常在前列腺癌发生发展中扮演重要角色,不仅能促进肿瘤细胞增殖、抑制肿瘤细胞凋亡,也可促进肿瘤细胞向周围组织、远处器官及淋巴结转移<sup>[7]</sup>。本研究结果与邹桂成等<sup>[8]</sup>的报道结果(前列腺癌组织、前列腺癌旁组织、前列腺增生组织 CD147 mRNA 阳性率分别为 95.08%、32.79%、16.32%)一致,表明 CD147 在前列腺癌患者病灶组织中呈高表达状态。正常组织上皮细胞由一层基底膜及躯体其他部位隔离开,正常细胞无法突破这一层基底膜屏障,而肿瘤细胞经刺激基质细胞释放基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMPs)可破坏基底膜屏障。在前列腺患者中随病理分级增加,其恶性程度升高,而基底膜缺失也越大,当肿瘤增大到一定程度时,获得生成血管能力,这为前列腺上皮肉瘤演变为浸润性肿瘤提供了良好条件。CD147 作为一种细胞外基质类金属蛋白酶型诱导分子,可刺激前列腺癌患者外周间质细胞,促进其生成 MMPs,继而使前列腺癌病灶组织中 MMPs 水平升高,活性增强,有利于降解细胞外部基底膜与间质等成分,促进了前列腺癌的发生发展<sup>[9]</sup>。Liang 等<sup>[10]</sup>的研究也发现,CD147 的 DNA 启动子低甲基化可能是与癌症相关的 CD147 过度表达相关调节机制之一,并可能在前列腺癌发生中起到关键作用。但本研究前列腺癌病灶组织中 CD147 mRNA 阳性率较邹桂成报道的略低,可能因患者配合度差或所采用的检测方法灵敏度不一等因素有关,因此原位杂交法检测 CD147 mRNA 的灵敏度仍有待提高。此外本研究结果说明在前列腺癌中 MMP-2 表达水平上升,MMP-2 可能在酶解基底膜与细胞间基质成分中起着“钻头”作用,因此也与前列腺癌的发生发展密切相关<sup>[11]</sup>。

本研究也发现,前列腺癌患者中,临床分期 T3~T4 期、病理学分级 $\geq 5$  级、淋巴结转移 N1 期、远处转移 M1 期的 CD147 mRNA 阳性率及 MMP-2 表达水平较临床分期 T1~T2 期、病理学分级 2~4 级、淋巴结转移 N0 期、远处转移 M0 期者高,与既往研究<sup>[12-13]</sup>一致,说明前列腺癌患者病灶组织中 CD147、MMP-2 mRNA 的表达水平与临床分期、病理分级、淋巴结转移及远处转移等关系密切。此外 CD147 也能与 MMP-2 等形成复合物,而粘附到肿瘤细胞表面,加强对肿瘤细胞外基质与基底膜的降解,增加肿瘤细胞侵袭力,并诱导血管内皮生长因

子生成,介导肿瘤转移等生物学过程<sup>[14-15]</sup>。

综上所述,检测前列腺癌患者病灶组织 CD147、MMP-2 mRNA 有助于推断其临床分期、病理学分级及淋巴结转移、远处转移等情况,值得在临床推广实践。

## 参考文献

- [1] Wang Q, Zhang JG, Wang W. Expression and significance of S100P, CD147, and OCT4 in different prostate cancer tissue TNM stages[J]. Genet Mol Res, 2015, 14(2):6844-6851.
- [2] 王跃,杜少静,张晋夏,等. 年轻前列腺癌患者 28 例临床病理特征及预后分析[J]. 中华病理学杂志, 2017, 46(6):373-377.
- [3] Rodriguez-Teja M, Gronau JH, Minamidate A, et al. Survival outcome and EMT suppression mediated by a lectin domain interaction of endo 180 and CD147 [J]. Mol Cancer Res, 2015, 13(3):538-547.
- [4] 董磊,夏猛,尚康兴,吴情. 胃癌患者手术前后血清 VEGF、MMP-2、MMP-9 水平变化及其临床意义[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(9):1221-1225.
- [5] 中华医学会泌尿外科学分会前列腺癌联盟. 中国前列腺癌早期诊断专家共识[J]. 中华泌尿外科杂志, 2015, 36(8):561-564.
- [6] 谢晓. 多效生长因子在结直肠癌中表达的比较解析[J]. 中华实验外科杂志, 2016, 33(3):581-583.
- [7] Fang F, Wang L, Zhang S, et al. CD147 modulates autophagy through the PI3K/Akt/mTOR pathway in human prostate cancer PC-3 cells[J]. Oncol Lett, 2015, 9(3):1439-1443.
- [8] 邹桂成,于辉,仲崇副,等. CD147 在前列腺癌中的表达及其与肿瘤临床病理特征的关系[J]. 现代生物医学进展, 2016, 16(22):4283-4285, 4321.
- [9] 马振. CD147 及 MMP-2 在前列腺癌组织中的相关性研究[D]. 天津:天津医科大学, 2014.
- [10] Liang YX, Mo RJ, He HC, et al. Aberrant hypomethylation-mediated CD147 overexpression promotes aggressive tumor progression in human prostate cancer[J]. Oncol Rep, 2015, 33(5):2648-2654.
- [11] 滕井卫,黄成,毛立军,等. SPAG9 调控前列腺癌迁移侵袭能力的研究[J]. 现代泌尿外科杂志, 2017, 22(1):54-57, 62.
- [12] 蔡崇岳,伍彩云,杨宇峰,等. 前列腺癌组织中 CD147 mRNA 的表达及临床意义[J]. 临床泌尿外科杂志, 2017, 30(9):804-810.
- [13] 梁昌卫. CD147 mRNA 在前列腺癌组织中的表达及与临床生物学特性的关系[J]. 中国老年学杂志, 2016, 36(17):4251-4252.
- [14] Li HL, Han L, Chen HR, et al. PinX1 serves as a potential prognostic indicator for clear cell renal cell carcinoma and inhibits its invasion and metastasis by suppressing MMP-2 via NF-kappaB-dependent transcription[J]. Oncotarget, 2015, 6(25):21406-21420.
- [15] Bauman TM, Ewald JA, Huang W, et al. CD147 expression predicts biochemical recurrence after prostatectomy independent of histologic and pathologic features[J]. BMC Cancer, 2015, 25(15):549-549.

## 非小细胞肺癌患者血清 HDAC1 和 DNMT1 浓度变化及临床意义

陈艳红\* 马丽 李峰

**【摘要】** 目的 探究非小细胞肺癌(NSCLC)患者手术前后血清中组蛋白去乙酰化酶1(HDAC1)和DNA甲基化转移酶1(DNMT1)的浓度变化情况与临床病理特征的关系。方法 选取2018年1月至2020年1月在本院接受手术治疗的NSCLC患者117例为观察组,另选取同期在本院接受体检的健康体检者93例为对照组,比较两组患者血清中HDAC1和DNMT1浓度,分析手术前后观察组患者血清中HDAC1和DNMT1的浓度变化情况,比较不同临床病理特征下二者浓度,采用Spearman相关性分析法分析HDAC1、DNMT1浓度与患者临床分期的相关性。**结果** 观察组患者的血清HDAC1和DNMT1浓度均明显高于对照组,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。观察组患者中,术前Ⅲ~Ⅳ期患者的血清HDAC1、DNMT1浓度均高于Ⅰ~Ⅱ期,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),不同病理类型患者的血清HDAC1、DNMT1浓度比较差异均无统计学意义( $P>0.05$ );术后不同病理类型和临床分期患者的血清HDAC1、DNMT1浓度均较术前明显下降,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),Ⅲ~Ⅳ期患者的HDAC1、DNMT1浓度均高于Ⅰ~Ⅱ期,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),不同病理类型患者的血清HDAC1浓度比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。相关性分析结果显示,NSCLC患者临床分期与血清HDAC1、DNMT1浓度均呈明显正相关( $P<0.05$ )。**结论** NSCLC患者血清中HDAC1和DNMT1浓度较高,手术后明显下降,且与患者临床分期存在相关性。

**【关键词】** 非小细胞肺癌;组蛋白去乙酰化酶1;DNA甲基化转移酶1

### Changes of serum HDAC1 and DNMT1 levels in patients with non-small cell lung cancer and their clinical significance

CHEN Yanhong\*, MA Li, LI Feng

(Department of Respiratory and Critical Care Medicine, the First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou, Hebei, China, 075000)

**【ABSTRACT】** **Objective** To investigate the changes of serum histone deacetylase 1 gene (HDAC1) and DNA methyltransferase 1 (DNMT1) levels in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC) before and after surgery and analyze the relationship between the levels of the two and clinicopathological features. **Methods** From January 2018 to January 2020, 117 patients with NSCLC who received surgical treatment were selected as the observation group, and 93 healthy individuals were selected as the control group. Serum HDAC1 and DNMT1 levels were compared between the two groups, and their changes in the observation group before and after surgery were analyzed. The levels of the two indicators in patients with different clinicopathological features were compared, and Spearman correlation analysis of the HDAC1 and DNMT1 levels with clinical staging was performed. **Results** The levels of serum HDAC1 and DNMT1 in the observation group were significantly higher than those in the control group ( $P<0.05$ ). In the observation group before surgery, serum HDAC1 and DNMT1 levels were higher in patients with stage Ⅲ~Ⅳ than in those with stage Ⅰ~Ⅱ ( $P<0.05$ ).

基金项目:河北省医学科学研究课题计划资助项目(20180886)

作者单位:河北北方学院附属第一医院呼吸与危重症医学科,河北,张家口 075000

\*通信作者:陈艳红, E-mail: song778074su1787@163.com

Patients with different pathological types had similar serum HDAC1 and DNMT1 levels before and after surgery ( $P>0.05$ ). After surgery, serum HDAC1 and DNMT1 levels were decreased significantly in the observation group ( $P<0.05$ ), which were higher in patients with stage III~IV than in those with stage I~II ( $P<0.05$ ). Correlation analysis showed that the clinical stage of NSCLC was significantly positively correlated with the levels of HDAC1 and DNMT1 ( $P<0.05$ ). **Conclusion** Serum HDAC1 and DNMT1 levels are relatively high in patients with NSCLC, and they decrease significantly after surgery, and are related to the clinical stage.

**[KEY WORDS]** Non-small cell lung cancer; Histone deacetylase 1 gene; DNA methyltransferase 1

肺癌是临床常见的恶性肿瘤之一,其中约有80%以上的为非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC),包括鳞癌、腺癌和大细胞癌等,临床发病率、病死率较高<sup>[1]</sup>。研究认为,基因表达调控失衡与NSCLC的发生发展密切相关,其中,抑癌基因异常甲基化在NSCLC的发展中发挥了重要作用<sup>[2]</sup>。DNA甲基化转移酶1(DNA methyltransferase 1, DNMT1)是DNA甲基化反应的催化剂,可通过调控细胞内甲基化过程促进肿瘤的发生<sup>[3]</sup>。而组蛋白乙酰化酶1(histone deacetylase 1, HDAC1)是多种蛋白质复合物的催化亚单位,可调节组蛋白乙酰化参与肿瘤细胞增殖和迁移<sup>[4]</sup>。当前,有关HDAC1、DNMT1表达水平的研究多集中在NSCLC组织及癌旁组织中,有关NSCLC患者手术前后血清中HDAC1和DNMT1浓度研究报道较少。本研究将分析手术前后血清中HDAC1和DNMT1浓度与临床病理特征的关系,以进一步探讨HDAC1和DNMT1对NSCLC的诊疗价值。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选取2018年1月至2020年1月在本院接受手术治疗的NSCLC患者117例为观察组。纳入标准:①临床检查符合NSCLC的诊断标准<sup>[5]</sup>,且均经影像学、术后病理学检查确诊;②患者性别不限,年龄 $\geq 18$ 岁;③符合手术指征,均接受手术切除治疗;④患者及其家属知情同意,均签署知情同意书。排除标准:①合并其他恶性肿瘤、自身免疫性疾病或血液疾病患者;②术前存在放疗史患者;③存在严重肝肾功能障碍患者。另选取同期在本院接受体检的93例健康体检者为对照组。两组的性别、年龄和身体质量指数(body mass index, BMI)一般临床资料比较差异无统计学意义( $P>0.05$ ),见表1。本研究经医院伦理委员会批准。

表1 两组一般临床资料比较( $\bar{x}\pm s$ )

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

指标	观察组 ( $n=117$ )	对照组 ( $n=93$ )	$t$ 值	$P$ 值
年龄(岁)	51.28 $\pm$ 6.43	50.63 $\pm$ 5.27	0.787	0.432
BMI(kg/m <sup>2</sup> )	23.25 $\pm$ 1.35	22.97 $\pm$ 1.28	1.527	0.128

### 1.2 研究方法

#### 1.2.1 手术方法

所有患者均接受胸腔镜手术切术治疗,患者取侧卧位,行气管插管静脉复合麻醉,于腋中线第7或第8肋间开一1.0~1.5 cm切口为观察口,腋前线与锁骨中线之间第4或第5肋间开一3~4 cm切口为主操作孔,腋后线第7肋间开一1~2 cm切口为副操作孔;将胸腔镜及胸腔镜器械分别置入观察孔和操作孔,在胸腔镜下行肺叶切除术,常规淋巴结清扫;淋巴结清扫结束后,常规止血、胀肺,放置好胸管后,关闭切口。

#### 1.2.2 血清中HDAC1和DNMT1蛋白浓度检测

分别于入院后、手术后次日清晨取观察组患者的空腹静脉血3 mL,于同时段取对照组的空腹静脉血3 mL,低温下3 000 r/min离心3 min,分离血清,于-80℃下低温保藏待测。采用酶联免疫吸附法检测HDAC1和DNMT1蛋白浓度,试剂盒购于北京鼎国生物研究有限公司,严格按照相关操作步骤进行。采用酶标仪(MR-96A型,深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司)测定吸光度( $A_{450nm}$ ),根据标准曲线得出血清样本中HDAC1和DNMT1的浓度。

### 1.3 统计学处理

采用SPSS 20.0统计软件进行统计分析。计量资料以( $\bar{x}\pm s$ )表示,组间比较行独立样本 $t$ 检验,同组手术前后比较行配对 $t$ 检验,多组间比较行 $F$ 检验;计数资料以 $n(\%)$ 表示,行 $\chi^2$ 检验;临床分期与HDAC1、DNMT1浓度的相关性分析采用Spear-

man 相关性分析法;  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 两组血清 HDAC1 和 DNMT1 浓度比较

术前观察组患者的血清 HDAC1 和 DNMT1 浓度均明显高于对照组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 2。

表 2 两组血清 HDAC1 和 DNMT1 蛋白浓度比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	<i>n</i>	HDAC1 (ng/L)	DNMT1 ( $\mu\text{g/L}$ )
观察组	117	504.26 $\pm$ 121.35	25.27 $\pm$ 6.74
对照组	93	347.63 $\pm$ 74.82	11.38 $\pm$ 4.06
<i>t</i> 值		10.905	17.504
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001

### 2.2 手术前后观察组不同临床病理特征患者血清 HDAC1、DNMT1 浓度比较

术前 III~IV 期患者的血清 HDAC1、DNMT1 浓度高于 I~II 期, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 不同病理类型患者的血清 HDAC1、DNMT1 浓度比较差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 术后不同病理类型和临床分期患者的血清 HDAC1、DNMT1 浓度均较术前明显下降, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), III~IV 期患者的血清 HDAC1、DNMT1 浓度高于 I~II 期, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 不同

病理类型患者的血清 HDAC1、DNMT1 浓度比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见表 3。

### 2.3 NSCLC 患者临床分期与血清 HDAC1、DNMT1 浓度的相关性分析

相关性分析结果显示, NSCLC 患者临床分期与血清 HDAC1、DNMT1 浓度均呈明显正相关 ( $r = 0.287, 0.367, P = 0.025, 0.009$ )。

## 3 讨论

DNA 甲基化被认为是 NSCLC 发展过程中最早发生改变的结构, 当抑癌基因发生异常甲基化时, 可诱导细胞转化, 促进肿瘤的发生发展<sup>[6]</sup>。DNMT1 作为体细胞中最丰富的甲基转移酶, 可使抑癌基因启动子 CpG 岛胞嘧啶甲基化, 抑制基因转录, 增加肿瘤细胞的增殖、侵袭。多项研究表明, DNMT1 在宫颈癌、肺癌、膀胱癌等恶性肿瘤组织中呈高表达, 与肿瘤的组织分化、恶性程度及患者预后存在明显相关性<sup>[7-9]</sup>。HDAC1 可与 DNA 紧密结合, 通过调节组蛋白的去乙酰化参与细胞增殖及凋亡过程, 其在因 DNA 异常甲基化引发的肿瘤中发挥重要作用<sup>[10]</sup>。

闫伟等<sup>[11]</sup>研究了 NSCLC 患者血清 HDAC1 和 DNMT1 含量对临床病理分期、恶性分子表达的评估价值, 发现 NSCLC 患者血清中的 HDAC1 和 DNMT1 含量显著高于健康人群, 且二者含量会随着病情进

表 3 手术前后观察组不同临床病理特征患者血清 HDAC1、DNMT1 浓度比较 ( $\bar{x} \pm s$ , ng/L)

Table 3 Comparison of serum HDAC1、DNMT1 levels in patients with different clinicopathological features in the observation group before and after surgery ( $\bar{x} \pm s$ , ng/L)

项目	<i>n</i>	手术前	手术后	<i>t</i> 值 <sup>a</sup>	<i>P</i> 值		
HDAC1	病理类型	鳞癌	41	508.76 $\pm$ 102.43	401.56 $\pm$ 86.25	5.126	<0.001
		腺癌	54	487.64 $\pm$ 95.26	387.24 $\pm$ 78.46	8.640	<0.001
		大细胞癌	22	496.33 $\pm$ 89.25	396.22 $\pm$ 71.45	5.844	<0.001
	<i>F</i> 值		0.555	0.384			
	<i>P</i> 值		0.576	0.682			
	临床分期	I~II 期	56	497.46 $\pm$ 72.53	391.25 $\pm$ 68.43	7.971	<0.001
		III~IV 期	61	526.87 $\pm$ 74.31	409.24 $\pm$ 65.22	8.903	<0.001
<i>t</i> 值 <sup>b</sup>		2.163	2.184				
<i>P</i> 值		0.033	0.031				
DNMT1	病理类型	鳞癌	41	26.68 $\pm$ 5.24	17.28 $\pm$ 5.41	7.992	<0.001
		腺癌	54	24.53 $\pm$ 6.17	16.36 $\pm$ 4.27	8.001	<0.001
		大细胞癌	22	25.37 $\pm$ 6.25	15.53 $\pm$ 6.17	5.255	<0.001
	<i>F</i> 值		1.562	0.905			
	<i>P</i> 值		0.217	0.407			
	临床分期	I~II 期	56	24.51 $\pm$ 5.37	15.22 $\pm$ 5.87	8.738	<0.001
		III~IV 期	61	27.14 $\pm$ 7.28	18.72 $\pm$ 5.54	7.189	<0.001
<i>t</i> 值 <sup>b</sup>		2.207	3.318				
<i>P</i> 值		0.029	0.001				

注:<sup>a</sup>行配对 *t* 检验; <sup>b</sup>行独立样本 *t* 检验。

展逐渐升高,与本研究结果一致。DNMT1可对DNA单链进行甲基化修饰,使甲基转移至胞嘧啶核苷酸的胞嘧啶环,形成甲基化胞嘧啶,从而抑制基因转录。HDAC1可使组蛋白发生去乙酰化,诱导染色质形成阻抑结构,影响转录翻译。当细胞内抑癌基因发生甲基化和去乙酰化后,原癌基因被激活,肿瘤细胞出现恶性增殖与分化,加速了癌症的发生发展<sup>[12-13]</sup>。本研究结果提示血清HDAC1、DNMT1浓度升高可能参与了NSCLC的生长、浸润及转移,手术治疗可明显降低其浓度。手术切除是临床治疗NSCLC的主要手段,通过完全或部分切除原发病灶及转移淋巴结,可明显降低HDAC1、DNMT1蛋白合成量,从而达到临床治愈或提高患者生存率的目的<sup>[14]</sup>,故血清HDAC1、DNMT1浓度变化可作为评估手术疗效的潜在指标。肖海励等<sup>[15]</sup>在对肺癌患者血清中甲基化转移组酶和HDAC1蛋白的表达意义进行研究时发现, DNMT1、DNMT3a、DNMT3b和HDAC1蛋白在肺癌患者体内表达均显著增高,且以上指标的高表达水平提示患者预后不良,其认为对甲基化转移组酶和HDAC1蛋白水平进行监测,对临床肺癌患者的治疗具有重要指导意义。本研究结果也进一步表明,NSCLC的临床治疗效果或可通过血清HDAC1、DNMT1浓度变化表现。

既往研究发现,当HDAC1基因表达被下调时,肺癌细胞的增殖受到抑制,细胞凋亡率增加,侵袭力明显下降;上调HDAC1基因表达后,HDAC1在癌细胞中的表达明显升高,细胞凋亡率下降<sup>[16]</sup>。NSCLC患者体内HDAC1和DNMT1的浓度升高可增加细胞去乙酰化和甲基化水平,进而调节抑癌基因和原癌基因的表达,促进NSCLC的发生发展。因此,NSCLC患者的临床分期可能与血清HDAC1、DNMT1浓度存在相关性,本研究结果也证实这一结论。

综上所述,NSCLC患者血清中HDAC1和DNMT1浓度较高,手术后明显下降,且二者表达水平与患者临床分期存在相关性。

## 参考文献

- [1] 杨澜,陈勃江,李镭,等.循环肿瘤DNA甲基化在非小细胞肺癌中的研究进展[J].中华结核和呼吸杂志,2018,41(12):967-970.
- [2] Heller G, Altenberger C, Steiner I, et al. DNA methylation of microRNA-coding genes in non-small-cell lung cancer patients [J]. J Pathol, 2018,245(4):387-398.
- [3] Zhang X, Rong X, Chen Y, et al. Methylation-mediated loss of SFRP2 enhances invasiveness of non-small cell lung cancer cells [J]. Hum Exp Toxicol, 2018,37(2):155-162.
- [4] 田志辉,倪晓辰,李芳,等.肾透明细胞癌中DNMT1和HDAC1表达相关性研究[J].解放军医药杂志,2015,27(12):59-62.
- [5] Dietel M, Bubendorf L, Dingemans AMC, et al. Diagnostic procedures for non-small-cell lung cancer (NSCLC): Recommendations of the European Expert Group [J]. BMJ Open Access, 2016,71(2):177-184.
- [6] Feng H, Shao W, Du L, et al. Detection of SHOX2 DNA methylation by methylation-specific PCR in non-small cell lung cancer [J]. Trans Cancer Res, 2020,9(10):6070-6077.
- [7] 罗舒,陈非,郭黔,等.宫颈癌中DNMT1的高表达与其不良生存结局的相关性[J].实用医学杂志,2018,34(17):2921-2924.
- [8] Wu XY, Chen HC, L WW, et al. DNMT1 promotes cell proliferation via methylating hMLH1 and hMSH2 promoters in EGFR-mutated non-small cell lung cancer [J]. J Biochem, 2020,168(2):151-157.
- [9] 魏福奎,王耀锋.膀胱尿路上皮癌组织中DNMT1, HMGA2的表达及临床意义[J].中国医药导报,2017,14(33):78-81, 195.
- [10] Cao LL, Song X, Pei L, et al. Histone deacetylase HDAC1 expression correlates with the progression and prognosis of lung cancer: A meta-analysis [J]. Medicine, 2017,96(31):e7663.
- [11] 闫伟,汤小山,王瑞东. NSCLC患者血清HDAC1和DNMT1含量对临床病理分期、恶性分子表达的评估价值[J].海南医学院学报,2016,22(19):2251-2254.
- [12] Ceccarelli V, Ronchetti S, Marchetti MC, et al. Molecular mechanisms underlying eicosapentaenoic acid inhibition of HDAC1 and DNMT expression and activity in carcinoma cells [J]. Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech, 2020,1863(2):194481.
- [13] Joensuu EI, Nieminen TT, Lotsari JE, et al. Methyltransferase expression and tumor suppressor gene methylation in sporadic and familial colorectal cancer [J]. Gene Chromosome Cancer, 2015,54(12):776-787.
- [14] 杨焕松,牟巨伟.非小细胞肺癌手术入路及切除方式研究进展[J].中国肺癌杂志,2018,21(9):692-696.
- [15] 肖海励,王静,魏海霞.血清DNMT1, DNMT3a, DNMT3b和HDAC1蛋白在肺癌患者中的表达及意义[J].中国老年学,2015,35(20):5825-5826.
- [16] 郭佳,何彬,黄际远,等.组蛋白去乙酰化酶1在人肺癌细胞株A549中的表达及其对裸鼠移植瘤放射敏感性的影响[J].中华实验外科杂志,2017,34(11):1931-1933.

## PV患者外周血T细胞亚群、IL-17A和IL-23表达及临床意义

张小静\* 陈绍斐 李硕 张冰

**[摘要]** 目的 探究寻常型银屑病(PV)患者外周血T细胞亚群结构、白细胞介素-17A(IL-17A)和白细胞介素-23(IL-23)表达的临床意义。方法 选取2018年4月至2020年3月入院的银屑病患者114例作为PV组,选取60例本院同期健康体检者作为对照组。比较两组外周血T细胞亚群白细胞分化抗原3(CD3<sup>+</sup>)、白细胞分化抗原4(CD4<sup>+</sup>)、白细胞分化抗原8(CD8<sup>+</sup>)、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>及炎症因子IL-17A、IL-23、白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )表达水平,比较不同严重程度PV患者T细胞亚群结构及炎症因子水平;对PV患者治疗前后上述指标进行比较;分析PV患者T细胞亚群与炎症因子的相关性。结果 PV组CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>明显低于对照组,CD8<sup>+</sup>明显高于对照组,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。PV组IL-17A、IL-23、IL-6、TNF- $\alpha$ 水平明显高于对照组,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。PV患者CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>水平:轻度组>中度组>重度组,CD8<sup>+</sup>、IL-17A、IL-23、IL-6、TNF- $\alpha$ 水平:轻度组<中度组<重度组,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。与治疗前相比,PV组治疗后CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>水平明显上升,CD8<sup>+</sup>、IL-17A、IL-23、IL-6、TNF- $\alpha$ 水平明显下降,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。PV患者CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>水平与IL-17A、IL-23、IL-6、TNF- $\alpha$ 呈负相关( $P<0.05$ ),CD8<sup>+</sup>水平与IL-17A、IL-23、IL-6、TNF- $\alpha$ 水平呈正相关( $P<0.05$ )。结论 PV患者外周血T细胞亚群结构及炎症因子的检测对于病情程度评估诊断具有一定的意义。

**[关键词]** 银屑病; T细胞亚群; 白细胞介素-17A; 白细胞介素-23

### Clinical significance of peripheral blood T cell subsets and expression of IL-17A and IL-23 in patients with psoriasis vulgaris

ZHANG Xiaojing\*, CHEN Shaofei, LI Shuo, ZHANG Bing

(Department of Dermatology, the First Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou, Henan, China, 450000)

**[ABSTRACT]** **Objective** To explore the structure of peripheral blood T cell subsets, and clinical significance of interleukin-17A (IL-17A) and interleukin-23 (IL-23) in patients with psoriasis vulgaris (PV). **Methods** A total of 114 PV patients treated in the hospital from April 2018 to March 2020 were enrolled as the PV group, while another 60 healthy controls during the same period were enrolled as the control group. The expression levels of peripheral blood T cell subsets [cluster of differentiation 3 (CD3<sup>+</sup>), cluster of differentiation 4 (CD4<sup>+</sup>), cluster of differentiation 8 (CD8<sup>+</sup>), CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>] and inflammatory factors [IL-17A, IL-23, interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )] were compared between the two groups. The structure of T cell subsets and levels of inflammatory factors among PV patients with different severity were compared. The above indicators in PV patients before and after treatment were compared. The correlation between T cell subsets and inflammatory factors was analyzed. **Results** CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> in the PV group were significantly lower than those in the control group, while CD8<sup>+</sup> was significantly higher than that in the

基金项目:河南省科技攻关项目(1821023111153)

作者单位:河南中医药大学第一附属医院皮肤科,河南,郑州 450000

\*通信作者:张小静, E-mail:tan47431wang1697@163.com

control group ( $P<0.05$ ). The levels of IL-17A, IL-23, IL-6 and TNF- $\alpha$  in the PV group were significantly higher than those in the control group ( $P<0.05$ ). The levels of CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> were the highest in the mild group, followed by the moderate group and the severe group. The levels of CD8<sup>+</sup>, IL-17A, IL-23, IL-6 and TNF- $\alpha$  were the highest in the severe group, followed by the moderate group and the mild group ( $P<0.05$ ). After treatment, levels of CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> were significantly increased, while the levels of CD8<sup>+</sup>, IL-17A, IL-23, IL-6 and TNF- $\alpha$  were significantly decreased in the PV group ( $P<0.05$ ). The levels of CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> were negatively correlated with IL-17A, IL-23, IL-6 and TNF- $\alpha$ , while CD8<sup>+</sup> level was positively correlated with them ( $P<0.05$ ). **Conclusion** The detection of T cell subgroup structure and inflammatory factors in peripheral blood of patients with PV has certain significance for the evaluation and diagnosis of disease severity.

**[KEY WORDS]** Psoriasis; T cell subset; Interleukin-17A; Interleukin-23

寻常型银屑病(psoriasis vulgaris, PV)又称“牛皮癣”,是一种以T淋巴细胞异常活化和浸润为主要特征的慢性炎症性皮肤病。据统计,我国银屑病发病率为0.1%~3%,尤以青壮年居多<sup>[1]</sup>。PV具有发病率高、病程长、易复发等特点,严重者可致残疾性银屑病关节炎,严重影响患者身心健康。PV产生机制复杂,目前认为其主要与遗传、感染、免疫等因素有关<sup>[2]</sup>。研究表明T淋巴细胞为主的细胞免疫功能异常为PV产生的重要因素,炎症因子在银屑病的产生中发挥重要作用<sup>[3]</sup>。白细胞介素-17A(interleukin-17A, IL-17A)、白细胞介素-23(interleukin-23, IL-23)炎症反应轴在多种自身免疫性疾病和炎症反应疾病中起关键作用。本研究拟对PV患者T细胞亚群结构及IL-17A、IL-23水平进行测定,探究其对该病的影响,现报告如下。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选择2018年4月至2020年3月入院接受治疗的PV患者114例纳入PV组,其中男性66例,女性48例,平均年龄(44.82±5.34)岁;平均病程(6.42±1.21)月。根据《中国银屑病诊疗指南》<sup>[4]</sup>,按照病症严重程度分为轻度32例,中度52例,重度30例。纳入标准:①符合《临床皮肤病学》<sup>[5]</sup>中相关诊断标准,并经病理学检查为银屑病进行期者;②近期末使用免疫治疗者;③病史资料完整者;④近期末服用可能干扰试验药物者;⑤经本院医学伦理委员会批准并自愿签署知情同意书者。排除标准:①严重精神疾病及血液系统疾病患者;②严重心肝肾等脏器功能障碍者;③妊娠期及哺乳期妇女;④入组前使用免疫抑制剂、激素类药物者;⑤近1月内发生真菌、细菌及病毒感染。另选择

本院同期健康体检者60例作为对照组,其中男性37例,女性23例,平均年龄(44.62±5.23)岁,两组性别年龄相比差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

### 1.2 治疗方法

对PV组患者采用常规方法,利用糖皮质激素、维生素D、维生素A等常规药物治疗。

### 1.3 观察指标

采集对照组健康体检时以及PV组患者入院时和治疗后1个月空腹外周静脉血5 mL, 3 000 r/min离心10 min后进行相关检测。①炎症因子:采用酶联免疫吸附沉淀法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)对白细胞介素-17A(interleukin-17A, IL-17A)、白细胞介素-23(interleukin-23, IL-23)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )进行检测,试剂盒购自上海西唐生物科技有限公司。②T细胞亚群:采用Attune N×T流式细胞仪(美国ThermoFisher Scientific公司)对白细胞表面分化抗原3(Cluster of Differentiation 3, CD3<sup>+</sup>)、白细胞表面分化抗原4(Cluster of Differentiation 4, CD4<sup>+</sup>)、白细胞表面分化抗原8(Cluster of Differentiation 8, CD8<sup>+</sup>)水平进行检测,并计算CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>值。

### 1.4 统计学方法

采用SPSS 20.0软件进行统计分析,计量资料采用( $\bar{x}\pm s$ )表示,两组间比较采用独立样本 $t$ 检验,多组间比较采用 $F$ 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 两组T细胞亚群水平比较

PV组CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>明显低于对照组,CD8<sup>+</sup>明显高于对照组,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。见表1。

表1 两组T细胞亚群水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Comparison on the levels of T cell subsets between 2 groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	CD3 <sup>+</sup> (%)	CD4 <sup>+</sup> (%)	CD8 <sup>+</sup> (%)	CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>
PV组	114	43.18±4.23	24.88±3.18	35.40±4.19	0.70±0.32
对照组	60	64.25±5.28	34.46±4.02	28.25±3.08	1.22±0.47
t值		28.612	17.206	11.66	8.620
P值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

## 2.2 两组炎症因子水平比较

PV组IL-17A、IL-23、IL-6、TNF-α水平明显高于对照组,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。见表2。

表2 两组炎症因子水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Comparison on the levels of inflammatory factors between 2 groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	IL-17A (pg/mL)	IL-23 (pg/mL)	IL-6 (ng/mL)	TNF-α (pg/mL)
PV组	114	563.25±134.28	226.10±34.18	4.59±0.51	39.16±4.15
对照组	60	226.46±64.82	144.89±28.54	2.27±0.24	24.37±3.50
t值		18.319	15.736	33.315	25.541
P值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

## 2.3 不同严重程度PV患者T细胞亚群、炎症因子水平比较

PV患者CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>水平:轻度组

>中度组>重度组,CD8<sup>+</sup>、IL-17A、IL-23、IL-6、TNF-α水平:轻度组<中度组<重度组,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。见表3。

## 2.4 PV患者治疗前后T细胞亚群与炎症因子水平比较

与治疗前相比,PV组治疗后CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>、水平明显上升,CD8<sup>+</sup>、IL-17A、IL-23、IL-6、TNF-α水平明显下降,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。见表4。

## 2.5 PV患者T细胞亚群与炎症因子水平相关性分析

PV患者CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>水平与IL-17A、IL-23、IL-6、TNF-α呈负相关( $P<0.05$ ),CD8<sup>+</sup>水平与IL-17A、IL-23、IL-6、TNF-α水平呈正相关( $P<0.05$ )。见表5。

## 3 讨论

T细胞在调节机体免疫功能中发挥重要作用,CD3<sup>+</sup>细胞代表T淋巴细胞总数白细胞分化抗原3型T细胞,为银屑病发病的关键性细胞;CD4<sup>+</sup>细胞参与细胞免疫、体液免疫及炎症反应<sup>[6-8]</sup>。研究发现,Th17细胞异常为银屑病主要发病机制之一,其

表3 不同严重程度PV患者T细胞亚群、炎症因子水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 3 Comparison on the levels of T cell subsets and inflammatory factors in PV patients with different severity ( $\bar{x} \pm s$ )

指标	轻度组(n=32)	中度组(n=52)	重度组(n=30)	F值	P值
CD3 <sup>+</sup> (%)	45.73±2.24	43.04±2.16	40.70±2.61	36.961	<0.001
CD4 <sup>+</sup> (%)	26.63±1.51	24.66±1.02	23.40±1.17	56.446	<0.001
CD8 <sup>+</sup> (%)	32.01±3.54	35.34±2.69	39.11±2.76	44.293	<0.001
CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>	0.83±0.08	0.70±0.09	0.62±0.07	51.967	<0.001
IL-17A (pg/mL)	520.33±31.58	572.00±34.09	594.75±26.21	46.721	<0.001
IL-23 (pg/mL)	198.63±18.02	229.16±24.62	251.58±26.40	39.992	<0.001
IL-6 (ng/mL)	3.84±0.30	4.59±0.42	5.39±0.51	106.812	<0.001
TNF-α (pg/mL)	36.01±2.78	39.43±2.15	42.06±3.05	42.726	<0.001

表4 PV患者治疗前后T细胞亚群与炎症因子水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 4 Comparison on the levels of T cell subsets and inflammatory factors in PV patients before and after treatment ( $\bar{x} \pm s$ )

指标	治疗前 (n=114)	治疗后 (n=114)	t值	P值
CD3 <sup>+</sup> (%)	43.18±4.23	57.31±6.11	20.30	<0.001
CD4 <sup>+</sup> (%)	24.88±3.18	31.49±3.01	16.118	<0.001
CD8 <sup>+</sup> (%)	35.40±4.19	28.42±3.23	14.087	<0.001
CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>	0.70±0.32	1.21±0.15	15.408	<0.001
IL-17A (pg/mL)	563.25±134.28	284.89±45.08	20.983	<0.001
IL-23 (pg/mL)	226.10±34.18	183.51±24.15	10.866	0.000
IL-6 (ng/mL)	4.59±0.51	3.28±0.36	22.406	0.000
TNF-α (pg/mL)	39.16±4.15	31.49±3.27	15.450	0.000

表5 PV患者T细胞亚群与炎症因子水平相关性分析

Table 5 Correlation between T cell subsets and inflammatory factors in PV patients

变量	CD3 <sup>+</sup>		CD4 <sup>+</sup>		CD8 <sup>+</sup>		CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>	
	r值	P值	r值	P值	r值	P值	r值	P值
IL-17A	-0.328	0.003	-0.511	0.024	0.492	0.004	-0.472	0.011
IL-23	-0.421	0.015	-0.483	0.006	0.487	0.007	-0.468	0.009
IL-6	-0.479	0.009	-0.469	0.015	0.513	0.014	-0.502	0.006
TNF-α	-0.411	0.005	-0.442	0.017	0.405	0.018	-0.412	0.015

作用机制为通过分泌多种炎性因子如IL-17、IL-6等参与调控机体炎症反应及自身免疫反应引起相关疾病的产生<sup>[9]</sup>。PV患者CD4<sup>+</sup>细胞在机体真皮中含量较高,其与皮肤病患者角质细胞过度增殖

密切相关,CD8<sup>+</sup>细胞在表皮中含量较高<sup>[10]</sup>。本研究结果提示PV的产生与机体免疫功能异常有关,结论与以往研究<sup>[11]</sup>相符。分析原因可能为PV患者免疫功能低下,患者机体产生的应激状态对免疫功能造成一定影响,抑制迟发性超敏反应、T淋巴细胞杀伤等免疫应答反应,导致相关免疫因子异常情况产生。

IL-17A作为IL-17细胞因子家族成员之一,在皮肤感染类疾病中发挥重要作用<sup>[12]</sup>。研究发现,IL-17A可诱导角质形成细胞产生急性淀粉样蛋白,导致局部炎症反应的发生,引起T淋巴细胞功能异常,导致银屑病产生<sup>[13]</sup>。研究表明,机体IL-17水平增高可刺激内皮细胞及上皮细胞等分泌大量炎症因子<sup>[14-15]</sup>。IL-23为机体常见炎症因子,对免疫细胞的增殖分化起着重要作用。研究发现,IL-23/Th17通路为银屑病发病的核心机制,而IL-23为Th17分化和表型维持的关键因子,因此IL-23水平与银屑病的发病密切相关<sup>[16]</sup>。TNF- $\alpha$ 、IL-6是机体重要细胞因子,在机体一系列生理病理过程中发挥重要作用。TNF- $\alpha$ 可激活与机体免疫功能密切相关的T细胞及巨噬细胞<sup>[17]</sup>。IL-6对B淋巴细胞增殖分化具有良好的调控作用,其可促进T淋巴细胞增殖分化。本研究结果表明利用上述炎症因子对PV严重程度进行评估具有一定价值。

本研究对PV患者外周血T细胞亚群与相关炎症因子水平相关性进行比较,结果显示CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>水平与IL-17A、IL-23、IL-6、TNF- $\alpha$ 呈负相关,CD8<sup>+</sup>水平与IL-17A、IL-23、IL-6、TNF- $\alpha$ 水平呈正相关,提示PV患者外周血T淋巴细胞亚群结构与炎症因子水平存在显著相关性,二者水平的监测对PV患者的诊断可能具有良好的价值。

综上所述,PV的产生与患者炎症因子水平上升及免疫功能降低密切相关,PV患者外周血T细胞亚群结构及炎症因子的检测对于病情程度评估诊断具有一定的意义。

## 参考文献

[1] 陈小凡,左永辉,杨永斌,等.穴位注射联合凉血解毒汤治疗寻常型银屑病(血燥证)的疗效观察及其作用机制分析[J].河北中医,2018,40(7):1079-1083.

[2] Wu JJ, Schrader A, Mclean RR, et al. Improvement in Body Surface Area is Associated with Better Quality of Life Among Patients with Psoriasis in the Corrona Psoriasis Registry[J]. J

Am Acad Dermatol, 2020, 15(9):26-30.

[3] Deng Y, Chang C, Lu Q. The Inflammatory Response in Psoriasis: a Comprehensive Review [J]. Clin Rev Allerg Immunol, 2016, 50(3): 377-389.

[4] 中华医学会皮肤性病学分会银屑病专业委员会.中国银屑病诊疗指南(2018完整版)[J].中华皮肤科杂志,2019,52(10):667-710.

[5] 赵辨.中国临床皮肤病学[M].南京:江苏科学技术出版社,2010:103.

[6] Zanin-Zhorov A, Weiss JM, Trzecia A, et al. Cutting Edge: Selective Oral ROCK2 Inhibitor Reduces Clinical Scores in Patients with Psoriasis Vulgaris and Normalizes Skin Pathology via Concurrent Regulation of IL-17 and IL-10 [J]. J Immunol, 2017, 198(10): 3809-3815.

[7] 李迎,宋宇,张天琦,等.外周血T淋巴细胞亚群变化量在寻常型银屑病中的相对危险性研究[J].中国实验诊断学,2019,23(7):1177-1180.

[8] 李圆圆,郝宝珍,孟云芳. Caspase抑制剂对特异性皮炎患者外周血CD4<sup>+</sup>T细胞亚群分泌细胞因子的影响[J].中国麻风皮肤病杂志,2020,36(9):533-536.

[9] Matsuzaki G, Umemura M. Interleukin-17 family cytokines in protective immunity against infections: role of hematopoietic cell-derived and non-hematopoietic cell-derived interleukin-17s [J]. Microbiol Immunol, 2018, 62(1): 1-13.

[10] Mahnaz M, Parvine M, Ali RA, et al. The potential role of Th17 lymphocytes in patients with psoriasis [J]. An Bras Dermatol, 2018, 93(1): 63-66.

[11] 肖勤,黄巍,汪亚利,等.寻常型银屑病患者血清IL-4、IL-8、TNF- $\alpha$ 水平和T细胞亚群结构与预后转归的关系[J].河北医药,2019,41(22):3376-3379,3384.

[12] Roman II, Mocan T, Orasan MS, et al. Relationship between etanercept and thyroid function in patients with psoriasis vulgaris [J]. Clujul Med, 2018, 91(1): 42-47.

[13] Couderc E, Morel F, Levillain P, et al. Interleukin-17A-induced production of acute serum amyloid A by keratinocytes contributes to psoriasis pathogenesis [J]. Plos One, 2018, 12(7): e0181486.

[14] 喻路,朱菡,肖均建.免疫球蛋白联合白芍总苷对系统性红斑狼疮炎性作用和免疫功能的影响[J].解放军预防医学杂志,2019,37(7):112-113.

[15] Andrew B, Andrea C. The Immunologic Role of IL-17 in Psoriasis and Psoriatic Arthritis Pathogenesis [J]. Clin Rev Allerg Immunol, 2018, 28(55): 379-390.

[16] 杨春,林金祥,王维,等.复方青黛胶囊联合钙泊三醇倍他米松乳膏对银屑病患者血清IL-17、TNF- $\alpha$ 、IL-23水平的影响[J].中国中西医结合皮肤性病学杂志,2019,18(6):602-604.

[17] 董景玉.脐带血PCT、TNF- $\alpha$ 、IL-6对新生儿宫内细菌感染的诊断价值[J].分子诊断与治疗杂志,2021,13(1):136-139.

# 老年慢性肾功能衰竭患者经治疗后 BUN、Scr 及 ALb 的变化

刘博\* 屠恩玲 赵娜 郭婧

**【摘要】** 目的 分析老年慢性肾功能衰竭患者经维持性血液透析联合血液灌流治疗后尿素氮(BUN)、血肌酐(Scr)及白蛋白(ALb)的变化。方法 选取2018年3月至2020年5月本院收治的102例老年慢性肾功能衰竭患者作为本研究对象,根据不同治疗方式分为参照组51例(常规血液透析治疗)和实验组51例(血液透析联合血液灌流治疗),比较两组临床疗效、BUN、Scr及Alb、炎症因子水平及不良反应发生情况。结果 实验组治疗后总有效率高于参照组,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。治疗后,实验组BUN、Scr及ALb指标改善程度明显优于参照组,差异有统计学意义( $P<0.05$ );实验组的IL-6、TNF- $\alpha$ 及CRP指标水平改善优于参照组,不良反应总发生率低于参照组,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。结论 维持性血液透析联合血液灌流治疗老年慢性肾功能衰竭患者的临床疗效佳,可有效改善患者BUN、Scr及Alb水平,降低炎症因子水平及不良反应发生率。

**【关键词】** 维持性血液透析;血液灌流;老年慢性肾功能衰竭;BUN;Scr;白蛋白

## Changes of BUN, Scr and ALb in elderly patients with chronic renal failure after treatment

LIU Bo\*, TU Enling, ZHAO Na, GUO Jing

(Hemodialysis Center, Beijing Shijitan Hospital, CMU, Beijing, China, 100038)

**【ABSTRACT】** **Objective** To analyze the changes of blood Urea Nitrogen (BUN), Serum Creatinine (Scr) and Albumin (ALb) of elderly patients with chronic renal failure after maintenance hemodialysis combined with hemoperfusion. **Methods** 102 elderly patients with chronic renal failure admitted to this hospital from March 2018 to May 2020 were selected as the object in this study. According to different treatment methods, they were divided into a reference group, 51 cases (conventional hemodialysis treatment) and an experimental group, 51 cases (hemodialysis combined with hemoperfusion therapy). The clinical efficacy, BUN, Scr and Alb, the levels of inflammatory factors and the occurrence of adverse reactions were compared between the two groups. **Results** After treatment, the total effective rate of the experimental group was higher than that of the reference group, and the difference was statistically significant ( $P<0.05$ ). After treatment, the improvement of BUN, Scr and ALb indicators in the experimental group was significantly better than that in the reference group, and the difference was statistically significant ( $P<0.05$ ). And the improvement of IL-6, TNF- $\alpha$  and CRP levels in the experimental group was better than that in the reference group, and the total incidence of adverse reactions was lower than that in the reference group, and the differences all were statistically significant ( $P<0.05$ ). **Conclusion** Maintenance hemodialysis combined with hemoperfusion has a good clinical effect in the treatment of elderly patients with chronic renal failure. It can effectively improve the levels of BUN, Scr and Alb in patients, and reduce the levels of inflammatory factors and the incidence of adverse reactions.

**【KEY WORDS】** Maintenance hemodialysis; Hemoperfusion; Chronic renal failure in the elderly; BUN; Scr; Albumin

基金项目:北京市自然科学基金资助项目(2018015)

作者单位:首都医科大学附属北京世纪坛医院血液透析中心,北京 100038

\*通信作者:刘博, E-mail: liubo2954@bjsjth.cn

慢性肾功能衰竭是在各种慢性肾脏疾病基础上出现缓慢的肾功能减退直至衰弱的现象<sup>[1]</sup>。慢性肾小球肾炎、高血压肾病、糖尿病肾病等为引发慢性肾功能衰竭的常见病因,在临床上患者常表现为水、电解质和酸碱平衡失调等情况<sup>[2]</sup>。由于慢性肾功能衰竭的发病率逐年升高,血液透析率也随之上升<sup>[3]</sup>。目前维持性血液透析是治疗终末期肾病患者的主要方法。文献研究指出<sup>[4]</sup>,慢性肾功能衰竭患者的尿素氮(Blood Urea Nitrogen, BUN)、血肌酐(Serum Creatinine, Scr)水平高表达及白蛋白(Albumin, ALb)水平低表达为评估患者病情的重要指标。除了单纯的维持血液透析外,还可以通过联合血液滤过或血液灌流等治疗方法增加对中、大毒素分子的清除,从而改善患者的BUN、Scr及ALb水平<sup>[5]</sup>。本文旨在分析维持性血液透析联合血液灌流治疗对老年慢性肾功能衰竭患者BUN、Scr及白蛋白的影响,报道如下。

表1 两组一般资料比较 [ $n(\%)$ , ( $\bar{x} \pm s$ )]Table 1 Comparison of general data between the two groups [ $n(\%)$ , ( $\bar{x} \pm s$ )]

组别	n	性别(男/女)	体重(kg)	年龄(岁)	平均病程(年)	合并疾病(n)			
						高血压	糖尿病	冠心病	无
参照组	51	32/19	60.59±10.26	70.36±3.52	5.78±1.31	22(43.14)	12(23.53)	7(13.73)	10(19.61)
实验组	51	30/21	59.15±10.69	71.64±3.21	5.82±1.37	24(47.06)	10(19.61)	8(15.69)	9(17.65)
$\chi^2/t$ 值	-	0.001	0.694	0.586	1.014	-	-	0.065	-
P值	-	0.990	0.489	0.559	0.312	-	-	0.799	-

## 1.2 方法

两组患者均采取饮食控制,保肾排毒、补充钙剂、叶酸等常规治疗,合并高血压者给予降压药治疗,呼吸困难者给予氧气吸入,强化健康宣教。

参照组选择常规维持性血液透析治疗,透析前对患者各生命体征进行监测,无异常者可进行透析,具体方式为:采用威海威高血液净化制品有限公司,聚砜膜透析器HF18[超滤系数50 mL/(h·mmHg)(1 mmHg=0.133 kPa),膜面积1.8 m<sup>2</sup>]。血流量设置为200~250 mL/min,予以低分子肝素(生产厂家:Aspen Pharma Trading Limited;批准文号:H20181136)抗凝,根据患者体重,按照100 U/kg给予低分子肝素量,透析时间设置为240 min,血浆置换液20 L。患者每周进行2~3次透析。

实验组在参照组的透析治疗基础上联合血液灌流治疗,灌流方法如下:采用健帆HA80型树脂血液灌流器,用500 mL生理盐水以150 mL/min的速度冲洗灌流器,轻拍灌流器,排净灌流器里气体,将灌流器与透析器串联,给予40 mg/L的普通肝素生

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选取2018年3月至2020年5月本院收入治疗的102例老年慢性肾功能衰竭患者作为本研究对象,遵医嘱根据治疗方式不同将102例患者分别分为参照组和实验组,各51例。纳入标准:①患者均符合世界卫生组织(World Health Organization, WHO)规定的尿毒症诊断标准<sup>[6]</sup>,经检查确诊为慢性肾衰竭终末期且病程均>3年;②临床资料完整无缺漏;③无血液净化禁忌症;④所有患者均自愿参与本研究并已签署知情同意书。排除标准:①合并血液系统、恶性肿瘤等疾病者;②合并严重感染或有严重消化道疾病者;③合并精神障碍者;④排除血液透析前使用过激素类、降血脂类药物者。本研究已获得医院伦理会批准,两组患者一般资料比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。见表1。

理盐水预冲管路,保留灌注20 min后,再给予生理盐水500 mL冲洗。灌流时间为2~2.5 h,灌流结束后患者继续进行血液透析2 h。灌流为每2周1次,透析规律同参照组。两组患者均连续治疗6个月。

### 1.3 观察指标

#### 1.3.1 临床疗效评估<sup>[7]</sup>

临床疗效评估分为:显效、有效、无效。总有效率=(显效例数+有效例数)/总例数×100%。

#### 1.3.2 肾功能及营养指标

采集两组患者透析前和治疗6个月后晨起空腹静脉血3 mL,于采血30 min内进行离心(4℃,3 000 rpm,10 min),取上清测定。采用日立HITACHI7100生化分析仪检测两组患者的BUN、Scr及ALb。

#### 1.3.3 血清炎性因子指标

采集两组患者透析前和治疗6个月后晨起空腹肘静脉血3 mL,于采血30 min内进行离心(4℃,3 000 rpm,10 min),取上清测定。采用双抗夹心酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测白介素-6(Interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏

死因子(tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ );采用免疫比浊法检测C反应蛋白(C-reactive protein, CRP)。

### 1.3.4 不良反应观察

观察治疗过程中患者不良反应发生情况,包括:低血压或高血压、发热寒战、心律失常、皮肤瘙痒、肌肉痉挛、空气栓塞等。

### 1.4 统计学方法

采用SPSS 22.0软件进行统计分析,计量资料以( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用 $t$ 检验;计数资料以 $n(\%)$ 表示,采用 $\chi^2$ 检验;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

治疗后实验组总有效率显著高于参照组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表2。

表2 两组临床疗效比较 [ $n(\%)$ ]

Table 2 Comparison of clinical efficacy between 2 groups

[ $n(\%)$ ]					
组别	$n$	显效	有效	无效	总有效率
参照组	51	29(56.86)	13(25.49)	9(17.65)	42(82.35)
实验组	51	38(74.51)	12(23.53)	1(1.96)	50(98.04)
$\chi^2$ 值					7.095
$P$ 值					0.007

### 2.2 两组治疗前后BUN、Scr及ALb比较

治疗前实验组和参照组的BUN、Scr及ALb水平比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。治疗后实验组BUN、Scr水平显著低于参照组,ALb水平显著高于参照组,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表3。

表3 两组治疗前后BUN、Scr及ALb的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 3 Comparison of bun, SCR and ALB between the two groups before and after treatment ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	$n$	BUN(mmol/L)		Scr( $\mu$ mol/L)		ALb(g/L)	
		治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
参照组	51	32.59 $\pm$ 5.39	28.49 $\pm$ 4.59 <sup>a</sup>	334.26 $\pm$ 48.28	184.73 $\pm$ 42.16 <sup>a</sup>	28.20 $\pm$ 3.78	30.67 $\pm$ 4.16 <sup>a</sup>
实验组	51	33.48 $\pm$ 5.48	16.48 $\pm$ 4.05 <sup>a</sup>	337.26 $\pm$ 47.17	136.72 $\pm$ 39.61 <sup>a</sup>	28.19 $\pm$ 3.48	35.49 $\pm$ 4.18 <sup>a</sup>
$t$ 值		0.827	14.011	0.317	5.869	0.014	5.837
$P$ 值		0.410	<0.001	0.752	<0.001	0.989	<0.001

注:<sup>a</sup>与治疗前相比, $P < 0.05$ 。

表4 两组患者治疗前后血清炎症因子水平的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 4 Comparison of serum inflammatory factor levels between the two groups before and after treatment ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	$n$	IL-6(ng/L)		TNF- $\alpha$ (pg/L)		CRP(mg/L)	
		治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
参照组	51	98.52 $\pm$ 15.46	72.42 $\pm$ 12.46 <sup>a</sup>	865.23 $\pm$ 94.52	786.75 $\pm$ 76.23 <sup>a</sup>	17.26 $\pm$ 3.20	13.20 $\pm$ 2.26 <sup>a</sup>
实验组	51	96.89 $\pm$ 15.76	52.26 $\pm$ 12.30 <sup>a</sup>	857.26 $\pm$ 95.12	642.23 $\pm$ 73.16 <sup>a</sup>	17.23 $\pm$ 3.12	10.26 $\pm$ 2.21 <sup>a</sup>
$t$ 值		0.527	8.223	0.424	9.768	0.047	6.642
$P$ 值		0.599	<0.001	0.672	<0.001	0.962	<0.001

注:<sup>a</sup>与治疗前相比, $P < 0.05$ 。

### 2.3 两组治疗前后炎症因子水平比较

治疗前实验组和参照组的IL-6、TNF- $\alpha$ 及CRP水平比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。治疗后实验组IL-6、TNF- $\alpha$ 及CRP水平显著低于参照组,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表4。

### 2.4 两组患者不良反应发生情况比较

治疗过程中,实验组不良反应总发生率明显低于参照组,差异具有统计意义( $P < 0.05$ )。见表5。

表5 两组患者不良反应发生情况比较 [ $n(\%)$ ]

Table 5 Comparison of adverse reactions between 2 groups

[ $n(\%)$ ]						
组别	$n$	低血压或 高血压	皮肤瘙痒	肌肉痉挛	心律失常	合计
参照组	51	8(15.69)	3(5.88)	2(3.92)	2(3.92)	15(29.41)
实验组	51	2(3.92)	2(3.92)	1(1.96)	0(0.00)	5(9.80)
$\chi^2$ 值						6.220
$P$ 值						0.013

## 3 讨论

慢性肾功能衰竭属于临床上常见的代谢性疾病,是各类肾脏疾病发展的最终结局,其病情进展缓慢,却是呈进行性不可逆的加重,直至终末期发展为尿毒症。肾衰患者由于肾功能受损,体内的尿素氮、肌酐等毒素不能正常排出体外,堆积在体内继而造成了各系统的并发症。据相关研究表明,引起肾衰患者病死率高的原因不止高龄、心血管并发症、炎症感染等,BUN、Scr水平过高和ALb过低也是造成病死率增高的重要因素<sup>[8-9]</sup>。因此,积极控制患者BUN、Scr和ALb水平是治疗过程中

不容忽视的方面。目前认为,血液净化是维持慢性肾衰患者生命的有效手段,其中血液透析、血液滤过和血液灌流是最常见的治疗方式<sup>[10-11]</sup>。本文主要研究血液透析联合血液灌流应用于老年慢性肾功能衰竭的作用。

血液透析是慢性肾衰患者的常规治疗手段,通过弥散清除血液中的小分子物质<sup>[12]</sup>。血液透析通过透析膜的平衡将患者的血液与透析液相互连接,两侧的跨膜运动将血液中的代谢产物排出体外,透析液中配置的碳酸氢根等有益物质进入人体,对体内所需物质进行补充,从而达到消除临床症状的作用。但有研究表明,血液透析只能对小分子物质进行清除,在清除大、中分子上的效果并不理想<sup>[13]</sup>。本研究结果表明血液透析联合血液灌流能够同时对大、中、小分子毒素进行清除,解除患者的临床症状。分析其原因主要为,血液灌流将血液引入灌流器中后通过吸附剂清除各种毒素,将清除干净后的血液导回患者体内,从而达到血液净化的目的。本研究结果表明血液透析联合血液灌流治疗对改善BUN、Scr及Alb水平具有积极作用。究其原因,灌流的吸附容量大且吸附速度快,能够有效清除大分子物质,弥补了透析和滤过无法清除大分子物质的缺点。慢性肾功能衰竭常会诱发体内的炎症反应,引起IL-6、TNF- $\alpha$ 、CRP等炎性因子水平的升高,IL-6、TNF- $\alpha$ 水平越高,则表明患者体内炎症反应越严重。本组研究结果发现,两组治疗后CRP、IL-6、TNF- $\alpha$ 水平均较治疗前降低,说明两组均可有效缓解机体的炎症反应,且实验组对于机体炎症反应改善程度显著优于参考组,这与既往研究报道相一致<sup>[14-15]</sup>,说明血液透析联合血液灌流治疗对缓解机体炎症反应效果更为显著。即便两组均有出现不同程度的不良反应,但实验组的不良反应总发生率明显低于参照组。

综上所述,维持性血液透析联合血液灌流治疗老年慢性肾功能衰竭患者的临床疗效好,可有效改善患者BUN、Scr及Alb水平,降低炎症因子水平及不良反应发生率,安全性较高,具有使用价值。

## 参考文献

[1] 张曼,张京慧,温小军.老年血液透析患者血清hs-CRP、Fetuin-A水平与心脏瓣膜钙化和血管钙化的关系[J].分子诊断与治疗杂志,2020,12(3):46-49.

- [2] 王克坤,蒙绪君,韩辉,等.血液透析与连续性血液净化透析治疗急性肾衰竭的疗效及对患者毒素清除率和肾功能指标的影响[J].河北医学,2020,26(5):88-92.
- [3] 王萌,蒋红利,何荃,等.血液透析联合血液灌流治疗对慢性肾衰竭患者肾功能、微炎症状态和血液净化效果的影响[J].现代生物医学进展,2018,18(8):1413-1413.
- [4] 郭莉,李晶,郭珊珊,等.血液透析治疗慢性肾衰竭合并心力衰竭的效果及对肾功能、鸢尾素的影响[J].中国临床医生杂志,2019,47(5):550-553.
- [5] 牛文明,薛兰芬,康希,等.多模式组合透析对慢性肾功能衰竭患者铁调素、骨硬化蛋白、N末端脑钠肽前体的影响[J].疑难病杂志,2019,18(9):52-56.
- [6] 李文冬,张艳琴,王静,等.综合血液净化对慢性肾功能衰竭患者p66Shc蛋白、sFlt-1和TIMP-1的影响[J].中国煤炭工业医学杂志,2018,21(4):56-59.
- [7] Li Z, Wang G, Zhen G, et al. Effects of hemodialysis combined with hemoperfusion on severe acute pancreatitis [J]. Turkish J Gastroenterol, 2018, 29(2):198-199.
- [8] Suzuki N, Hitomi Y, Tsuji Y, et al. Effect of hemoperfusion with hexadecyl-immobilized cellulose beads on myocardial fatty acid imaging in hemodialysis patients: a case series study [J]. Renal Replacement Ther, 2019, 5(1):234-240.
- [9] 朱枫.血液透析联合血液灌流对老年血液透析患者肾骨病的影响[J].中外医学研究,2019,17(6):110-112.
- [10] 谢毅,刘宗旸,陈彦.血液灌流联合序贯透析对老年终末期糖尿病肾病患者炎症介质及氧化应激的影响[J].中国老年学杂志,2017,37(10):2419-2421.
- [11] Zheng B, Fan J, He R, et al. Antioxidant status of uric acid, bilirubin, albumin and creatinine during the acute phase after traumatic brain injury: Sex-specific features [J]. Int J Neurosci, 2020,28(4):1-11.
- [12] Joh M, Li E, Mutonga M, et al. 4:21 PM Abstract No. 291 MELD, MELD-Na, serum creatinine, and serumalbumin as predictors of mortality aftertransjugular intrahepatic portosystemic shunt (TIPS) creation with covered stents [J]. J Vasc Interv Radiol, 2018, 29(4):125.
- [13] Arase H, Yamada S, Hiyamuta H, et al. Modified creatinine index and risk for long-term infection-related mortality in hemodialysis patients: ten-year outcomes of the Q-Cohort Study [J]. Sci Rep, 2020, 10(1):1241.
- [14] Bernhard W, Michael L, Vellinga NAR, et al. Blood urea nitrogen (BUN) independently predicts mortality in critically ill patients admitted to ICU: A multicenter study [J]. Clin Hemorheol Microcirc, 2018, 69(1):123-131.
- [15] Putri KY, Srianto P, Lestari TD, et al. Reproductive efficiency and serum progesterone concentration on dairy cattle based on blood urea nitrogen (BUN) concentrations [J]. Iraqi J Vet-er Sci, 2019, 32(2):143-148.

## β-地中海贫血修饰基因研究进展

龙岚<sup>1</sup> 贺静<sup>2\*</sup>

**[摘要]** β-地中海贫血(β-地贫)是由于β-珠蛋白基因突变后,导致β-珠蛋白链合成减少,正常合成的α-链过多而游离聚集在红细胞膜上,引起细胞膜破裂造成溶血性贫血。研究发现,在成人体内重新激活γ-珠蛋白基因(γ-基因)表达γ-珠蛋白,可以结合多余的α-珠蛋白,缓解了β-地贫患者的贫血程度。本文从Xmn1-*HBG2*基因、*HBSIL-MYB*基因、反式作用因子、红系相关转录因子和锌指转录因子对γ-基因调控作用机制进行综述。以期深入理解它们在β-地贫中对γ-基因的调控作用和意义,并为临床治疗等提供指导,为β-地贫患者提供治疗的可能。

**[关键词]** β-地中海贫血;修饰基因;胎儿血红蛋白

### Research progress in β-thalassemia modified gene

LONG Lan<sup>1</sup>, HE Jing<sup>2\*</sup>

(1. Department of Medical Genetics, Meical 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 Province, Kunming, Yunnan, China, 650032)

**[ABSTRACT]** β-thalassemia is due to the decrease of β-globin chain synthesis after globin gene mutation and the excessive α-chain of normal synthesis is free accumulation on the erythrocyte membrane, and leads to the rupture of cell membrane and hemolytic anemia. Extensive research found that reactivation of γ-gene expression in adults can combine excess α-globin and relieve anemia symptoms in β-thalassemia patients. In this review, we described the regulatory mechanisms of Xmn1-*HBG2* genes, *HBSIL-MYB* genes, trans-acting factors, erythroid related transcription factors and zinc finger transcription factors. In order to understanding their regulatory role and significance of γ-genes in β-thalassemia, and providing guidance for clinical treatment, and providing treatment possibilities for β-thalassemia patients.

**[KEY WORDS]** β-Thalassemia; Modifying Gene; Fetal Hemoglobin

人类β-珠蛋白基因簇位于11p15.3,5个功能基因从5'→3'端依次为ε-Gγ-Aγ-δ-β(图1),其中,ε-基因在胚胎期表达,Gγ和Aγ-基因在胎儿期表达,δ和β-基因在出生后表达<sup>[1]</sup>。在红系发育过程中,β-珠蛋白基因的表达经历2次转换,第一次是胚胎期表达的ε-基因被胎儿期的γ-基因取代;第二次是胎儿期的γ-基因被成人期的β-和δ-基因取

代<sup>[1]</sup>。珠蛋白基因表达转换过程中,都有特异性红系因子的参与<sup>[2]</sup>。1975年,Stamatoyannopoulos G报道了同时患有镰刀型细胞贫血(Sickle cell anaemia, SCA)和遗传性胎儿血红蛋白持续增高症(Hereditary persistence of fetal hemoglobin, HPFH)的黑人患者并没有表现出贫血的症状,这种以前未确定的HPFH的形式可能解释了胎儿血红蛋白

基金项目:云南省技术创新人才培养项目(2019HB071);云南省科技厅-昆明医科大学联合资助项目(2018FE001(-111));云南省卫生健康委员会资助项目(2019LCZXKF-XY04)

作者单位:1.昆明理工大学医学院&附属医院医学遗传科,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

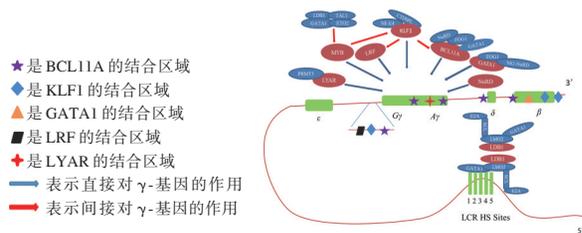
\*通信作者:贺静, E-mail:Hejing1211@163.com

(Fetal haemoglobin, Hb F)异常升高的 SCA 患者轻度的临床表现和血红蛋白表型<sup>[3]</sup>。这种 HPFH 对重型  $\beta$ -地贫患者也有修饰作用<sup>[4-5]</sup>。 $\beta$ -地中海贫血修饰基因 ( $\beta$ -Thalassemia modifier genes)能影响珠蛋白的表达、合成及稳定性,导致具有相同致病基因型患者的临床表型出现差异<sup>[6]</sup>。研究发现,中国南方是  $\beta$ -地贫高发区<sup>[7-8]</sup>。本文将对国内外影响 Hb F 表达的修饰基因: Xmn1- HBG2 基因、HBSIL-MYB 基因、反式作用因子、红系相关转录因子和锌指转录因子调控  $\gamma$ -珠蛋白进行总结,并对它们调控  $\gamma$ -珠蛋白表达的机制进行阐述,以期为中国  $\beta$ -地贫患者的  $\gamma$ -基因表达减轻或治愈  $\beta$ -地贫患者症状提供参考。

## 1 Xmn1-HBG2 基因、HBSIL-MYB 基因对 $\gamma$ -珠蛋白基因的调控

### 1.1 Xmn1-HBG2 基因

Xmn1 (C>T)多态性是 HBG2 基因中对  $\beta$ -地贫起修饰作用的重要数量性状位点 (Quantitative trait loci, QTL), 研究发现, HBG2 基因-158 位点 Xmn1 (C>T)的多态性能明显提高欧洲、美洲、非洲和亚洲等不同人群中  $\beta$ -地贫患者或 SCA 患者的 Hb F 的表达水平,减轻  $\beta$ -地贫或 SCA 的严重程度<sup>[5, 9-12]</sup>。研究人员对该位点的不同基因型进行研究,发现相比于“CT”和“CC”等位基因型的人群“TT”等位基因型的人群 Hb F 有更高表达水平<sup>[13-14]</sup>。最近研究表明,Xmn1 多态性的“T”等位基因会导致转录抑制子与  $\beta$ -LCR 的结合减弱,引起 HBG2 基因在成人期持续表达<sup>[14]</sup>。进一步研究表明,Xmn1 对  $\beta$ -地贫的修饰作用与位于  $\beta$ -珠蛋白基因位点控制区 (Locus control region, LCR) 超敏位点 (DNase I-hypersensitive site, HS) (图 1) 处的回文位点有关<sup>[15-16]</sup>。



注:紫色五角星;蓝色菱形;橙色三角形;黑色平行四边形;红色四角星;蓝色箭头;红色箭头。

图 1  $\gamma$ -珠蛋白基因调控示意图<sup>[1]</sup>

Figure 1  $\gamma$ -globin gene regulation schematic diagram<sup>[1]</sup>

### 1.2 HBSIL-MYB 基因

骨髓母细胞瘤基因 (Myeloblastosis oncogene, MYB) 编码一个特异性序列的 DNA 结合蛋白 MYB, MYB 是造血和红细胞生成的关键转录因子,它对调节  $\gamma$ -基因表达起重要作用,是  $\beta$ -地贫的关键修饰因子<sup>[17]</sup>。研究表明,MYB 可以通过两种方式抑制  $\gamma$ -珠蛋白基因表达<sup>[1, 18]</sup>。其一,它能直接激活红系 Kruppel 样因子 (Kruppel-like factor 1, KLF1) 的表达,通过 KLF1 抑制  $\gamma$ -珠蛋白基因的表达。其二,2014 年 Stadhouders 等<sup>[18]</sup>发现该基因间区域存在红系转录因子复合物结合的保守核心调控序列 (-87, -84, -71 和 -63),它们是红系转录因子复合物 (LDB-1/NLI, GATA-1, TAL-1 和 ETO-2) 的主要结合位点,这些红系转录因子能与远距离的 MYB 相互作用并调控 MYB 表达,通过调控 MYB 的表达进一步调控红系分化 (图 1)。进一步研究表明, HBSIL-MYB 基因间的突变减少了红系转录因子 (LDB-1, GATA-1, TAL-1, ETO-2 以及 KLF-1) 与该基因的结合,影响了红系转录因子与远距离增强子 MYB 基因的相互作用和 MYB 的表达水平,引起 Hb F 表达升高<sup>[18]</sup>。大多数报道的 HBSIL-MYB 基因区域上引起 Hb F 升高的 SNP 位点包括 rs66650371 位点 3-bp 缺失, rs9399137, rs4895441 等<sup>[19]</sup>。

## 2 反式作用因子对 $\gamma$ -珠蛋白基因的调控

### 2.1 BCL11A

B-cell lymphoma/leukemia 11A (BCL11A) 是  $\gamma$ -基因的抑制子,由位于染色体 2p15-16.1 上的 BCL11A 基因表达,主要存在于脑和造血组织中; BCL11A 基因与 Hb F 的表达相关,在成人红系祖细胞中 BCL11A 基因的高表达引起 Hb F 表达水平降低,而 BCL11A 基因的低表达则会引起 Hb F 的表达水平升高<sup>[20-21]</sup>。全基因组关联研究表明, BCL11A 与  $\beta$ -珠蛋白基因中富含 G 的 GGCCGG 序列特异性结合,抑制了  $\gamma$ -基因的表达<sup>[21]</sup>。这种富含 G 的 GGCCGG 序列主要存在于 LCR 的 HS3、 $\delta$ -珠蛋白基因上游与 Hb F 高表达相关的 Corfu 缺失区域以及  $A\gamma$ -珠蛋白基因的下游区域。 BCL11A 可通过招募核小体重塑和去乙酰化酶复合物 (The nucleosome remodeling and deacetylase complex, NuRD) 与 GATA-1 和 FOG-1 协同作用,导致  $\gamma$ -珠蛋白基因沉默。在成人红系细胞中, BCL11A 基因的突变导致了 BCL11A 表达下调可以重新激活  $\gamma$ -基因表达,升高 Hb F 水平<sup>[21-22]</sup>。

*BCL11A* 基因间引起 Hb F 升高的 SNP 位点包括 rs766432、rs4671393 和 rs11886868 等<sup>[23]</sup>。

## 2.2 KLF1

KLF1 是红系分化过程中重要的调控因子,通过多种机制调控红系分化。KLF1 是由位于染色体 19p13.2 上全长约 3kb 的含有三个外显子的 *KLF1* 基因编码的包含 362 个氨基酸的含有锌指结构的蛋白,其功能结构域有两个:一个是羧基末端结构域,另一个是富含脯氨酸的氨基末端激活结构域<sup>[24]</sup>。KLF1 与  $\beta$ -珠蛋白基因启动子区域的 CACCC 盒结合,促进了 LCR 区的 HS3 位点与  $\beta$ -基因启动子区域结合,进一步激活  $\beta$ -珠蛋白的表达<sup>[25]</sup>。KLF1 也能直接调控 *BCL11A* 表达,在人脐带血来源的红系祖细胞-2 (Human umbilical cord blood derived erythroid progenitor-2, HUDEP-2) 中,敲除 *KLF1* 基因的增强子 HS1 能够引起 KLF1 和 *BCL11A* 的表达同时降低,从而开放  $\gamma$ -基因表达;进一步研究发现 *BCL11A* 基因启动子的 -371 位点存在保守的 KLF1 的结合位点 CACCC 盒,表明 KLF1 在体内直接调节 *BCL11A* 的表达<sup>[26]</sup>。*KLF1* 基因的一些良性突变引起的 HPFH 对重型  $\beta$ -地贫患者起到修饰作用,中国人群 *KLF1* 基因的 c.525\_526insCGGCGCC、c.892G>C 和 c.1012C>T 突变引起 Hb F 水平升高<sup>[27]</sup>。

## 2.3 ZBTB7A

Zinc finger and BTB domain containing 7A (ZBTB7A) 或称 The lymphoma/leukemia related factor (LRF) 是  $G\gamma$ -基因的抑制子,是由 *ZBTB7A* 基因编码的 Krüppel 家族的锌指结构域的转录因子<sup>[28, 30]</sup>。研究发现,ZBTB7A 和 *BCL11A* 分别结合在  $G\gamma$ -基因的 -200 和 -115 位点,抑制  $G\gamma$ -基因表达;这些结合位点的点突变导致 ZBTB7A 和 *BCL11A* 与  $G\gamma$ -基因 -200 和 -115 位点的结合减弱,引起  $G\gamma$ -基因开放表达<sup>[28, 30]</sup>。*ZBTB7A* 基因的启动子区包含保守的 CACCC 盒,在 HUDEP-2 中,KLF1 与 *ZBTB7A* 的启动子区 CACCC 盒结合直接激活 *ZBTB7A* 表达 *ZBTB7A* 蛋白,并通过 *ZBTB7A* 调控红系分化。*ZBTB7A* 启动子区 KLF1 的结合位点突变会导致 KLF1 结合减弱, $\gamma$ -珠蛋白基因开放表达<sup>[29-30]</sup>。

## 3 红系相关转录因子对 $\gamma$ -珠蛋白基因的调控

1988 年,Evans 等<sup>[31]</sup>发现了第一个红系转录因子 GATA-1,它通过识别并结合珠蛋白基因簇

上的 GATA 盒,调控红系分化。从胚胎发育的第 5 天起,在每个阶段的红系细胞中都包含某种活性因子,即红细胞特异性因子(The erythroid-specific factor, Eryfl),Eryfl 是红细胞特有的,在其他类型的细胞中,这种 Eryfl 不存在或者其活性受到抑制<sup>[31]</sup>。

## 3.1 NF-E4

NF-E4 是红系分化的重要调控因子,对调控  $\beta$ -珠蛋白基因簇上的基因表达起重要作用。1988 年,Choi OR 和 Engel JD<sup>[32]</sup>首次提出珠蛋白基因之间竞争单一调控序列(即启动子竞争),它是一种珠蛋白时序性表达的调控机制,启动子竞争表明,阶段选择性元件(Stage selector element, SSE)是  $\beta$ -珠蛋白基因簇上的每个独立的基因优先表达所必须的一个元件。在胎儿红系细胞中,NF-E4 与 CP2 形成阶段选择性蛋白(Stage selector protein, SSP)复合物,然后 SSP 结合到  $\gamma$ -基因的 SSE 上并形成 SSP-SSE 复合物,调控  $\gamma$ -基因表达<sup>[33-34]</sup>。在成人红细胞生成过程中,SSP 复合物与  $\beta$ -基因的启动子中的 SSE 结合,使得  $\beta$ -基因与 LCR 相互作用引起  $\beta$ -珠蛋白表达<sup>[33]</sup>。在成人红细胞中,SSP 复合物结合在  $\gamma$ -基因启动子 -202(C→G)的突变位点上,引起 HPFH,对  $\beta$ -地贫患者起修饰作用<sup>[35]</sup>。研究证明了由 NF-E4 组成的 SSP 复合物的结合位点是绝对保守的,这些位点包括  $\epsilon$ -启动子、HS2 和 HS3 等<sup>[33]</sup>。

## 3.2 CTDSPL2

CTD 小磷酸酶样 2 蛋白(CTDSPL2)由 RNA 聚合酶 II C-末端结构域磷酸酶 2(RNA polymerase II c-terminal domain small phosphatase like 2, *CTD-SPL2*)基因表达,它在 K562 细胞和脐带血来源的 CD34+细胞中高表达<sup>[36]</sup>。研究认为,该蛋白一方面可能与一些重要的珠蛋白相关转录因子如 EKLF,FKLF 和 NF-E4 等相互作用而被招募到  $\epsilon$ -和  $\gamma$ -珠蛋白基因的转录起始复合物中,促进红系细胞的红系分化(图 1)<sup>[36]</sup>;另一方面,CTDSPL2 是一个新出现的磷酸酶家族,它的亚家族包括小 CTD 磷酸酶(Small CTD phosphatases, SCPs),CTDSPL2 可能调节珠蛋白基因表达中关键因子的磷酸化状态,促进红系细胞的红系分化,这些结论还需进一步深入研究<sup>[37]</sup>。

## 3.3 NuRD 复合物

NuRD 是分子量为 1MDa 的多亚基蛋白复合物,包括 CHD4 (Mi2 $\beta$ ), MTA1/2/3, p66 $\beta$

(GATAD2b), p66 $\alpha$  (GATAD2a), HDAC1/2 和 MBD3<sup>[21, 38]</sup>。研究发现, NuRD 在调控  $\gamma$ -珠蛋白表达中扮演重要角色, GATA1-FOG1-Mi2-NuRD 复合物结合在-566的 GATA 位点导致  $A\gamma$ -基因的沉默; MBD3-NuRD 可以直接和 GATA1-FOG1 结合, 形成 GATA1-FOG1-MBD3-NuRD 复合物并通过 GATA1 直接结合在  $\gamma$ -基因启动子区来抑制  $\gamma$ -基因的表达<sup>[39]</sup>。MBD2-NuRD 以间接方式使  $\gamma$ -基因启动子区高度甲基化, 抑制  $\gamma$ -基因的表达<sup>[40]</sup>。CHD4 (Mi2 $\beta$ )-NuRD 则直接与 *KLF-1* 和 *BCL11A* 的启动子区结合, 正向调控这两个转录因子来调控  $\gamma$ -基因表达, 而 GATAD2A 抑制  $\gamma$ -基因表达的机制主要有两种: 首先它能直接和 *MYB* 启动子区结合来正向调控 *MYB* 表达, 从而抑制  $\gamma$ -基因表达; 其次它与 TGATAA 序列结合, 直接抑制  $\gamma$ -基因表达<sup>[41]</sup>。

## 4 锌指转录因子对 $\gamma$ -珠蛋白基因的调控

### 4.1 LYAR

Ly-1 antibody reactive clone (LYAR) 是具有锌指结构的 DNA 结合转录因子, 在 K562 细胞以及人类红系祖细胞中, LYAR 与  $\gamma$ -基因 5'-非翻译区 (5'-Untranslated region, 5'-UTR) 的 +26 或 +32 GGTAT 序列结合, 与组蛋白精氨酸甲基转移酶 PRMT5 相互作用, 引起组蛋白 H4 精氨酸 3 的对称甲基化 (Symmetric methylation of histone H4 Arginine 3, H4R3me2s), 调控  $\gamma$ -基因的表达 (图 1)<sup>[22]</sup>。研究发现  $A\gamma$ -基因 (*HBG1*) 5'UTR 上 +25 处的 rs368698783 位点突变率相当高, 它处于  $\gamma$ -基因抑制因子 LYAR 结合序列 GGTAT 上, 并与 *G $\gamma$ -158* (XmnI) 多态性几乎完全连锁,  $A\gamma$ +25 突变会使 LYAR 结合程度减弱, 导致在红系压力下开放  $\gamma$ -基因表达<sup>[42]</sup>。

### 4.2 GATA-1

GATA-1 由位于 X 染色体上的 *GATA* 基因表达, 它通过识别珠蛋白基因簇上的 GATA 盒并与其结合, 以多种方式调控珠蛋白基因表达<sup>[43]</sup>。在人成熟红细胞生成过程中, GATA1、FOG1 和 Mi2 形成 GATA1/FOG1/Mi2 复合物然后结合到  $\gamma$ -基因近端启动子-566/-567 的 GATA 基序位点, 部分参与沉默  $\gamma$ -基因 (图 1)<sup>[44]</sup>。在红系细胞中的  $\beta$ -基因 HSSs 位点, 尤其是在 HS2 核心区域, 发现一个复合物 E 盒/GATA 复合物, 由 GATA-1/LMO-2/TAL-1/

LDB-1 组成, 其中 LDB-1/NLI 的 N-端保守的自交互结构域直接与 GATA-1 相互作用, 而保守的 C-端 LIM 结构域和 LIM 蛋白 (LMO2) 相互作用, 然后结合 SCL 组成新的复合物 LDB-1/GATA-1/SCL/LMO2<sup>[45]</sup>。在 GATA1 的作用下, LDB-1/GATA-1/SCL/LMO2 结合到  $\beta$ -基因的 HS2 上形成染色质环调控  $\gamma$ -基因沉默, 此复合物的高表达对调控红系分化是必要的<sup>[45]</sup>。GATA1 还和 NF-E2 蛋白协同激活 LCRs, LCR 是强大的远距离增强子, 在红细胞生长发育过程中以适当的方式调控珠蛋白基因簇转录<sup>[45]</sup>。

## 5 小结与展望

$\beta$ -地贫修饰基因是目前研究  $\beta$ -地贫基因治疗的热点, 它通过调控珠蛋白的表达, 影响  $\beta$ -地贫的症状。其中最为常见的修饰基因有 Xmn1-*HBG2* 基因、*HBS1L-MYB* 基因、反式作用因子、红系相关转录因子和锌指转录因子等, 它们都能调控珠蛋白的表达, 但是调控方式却不尽相同, 作用机制也尚不完全清楚。是否还有其他的修饰基因通过另外的调控方式和作用机制影响珠蛋白表达水平, 这就需要科研人员进一步对  $\beta$ -地贫开展大样本量的遗传学分析和机制研究, 以期发现新的修饰基因并阐明新的作用机制, 并为  $\beta$ -地贫的临床用药、基因治疗和个体化医疗提供指导。

## 参考文献

- [1] Paikari A, Sheehan VA. Fetal haemoglobin induction in sickle cell disease [J]. Br J Haematol, 2018, 180(2):189-200.
- [2] Doré LC, Crispino JD. Transcription factor networks in erythroid cell and megakaryocyte development [J]. Blood, 2011, 118(2):231-239.
- [3] Stamatoyannopoulos G, Wood WG, Papayannopoulou T, et al. A new form of hereditary persistence of fetal hemoglobin in blacks and its association with sickle cell trait [J]. Blood, 1975, 46(5):683-692.
- [4] Menzel S, Thein SL. Genetic Modifiers of Fetal Haemoglobin in Sickle Cell Disease [J]. Mol Diagn Ther, 2019, 23(2):235-244.
- [5] Rujito L, Basalamah M, Siswandari W, et al. Modifying effect of XmnI, BCL11A, and HBS1L-MYB on clinical appearances: A study on  $\beta$ -thalassemia and hemoglobin E/ $\beta$ -thalassemia patients in Indonesia [J]. Hematol Oncol Stem Cell Ther, 2016, 9(2):55-63.
- [6] 李倩, 褚嘉祐, 杨昭庆, 等.  $\beta$ -地中海贫血修饰基因的研究进展 [J]. 国际遗传学杂志, 2012, 35(4):238-242.

- [7] He J, Song W, Yang J, et al. Next-generation sequencing improves thalassemia carrier screening among premarital adults in a high prevalence population: the Dai nationality, China[J]. *Genet Med*, 2017, 19(9):1022-1031.
- [8] 杨阳, 张杰. 中国南方地区地中海贫血研究进展[J]. *中国实验血液学*, 2017, 25(1):276-280.
- [9] Gardner K, Fulford T, Silver N, et al. g(HbF): a genetic model of fetal hemoglobin in sickle cell disease [J]. *Blood Adv*, 2018, 2(3):235-239.
- [10] Cardoso GL, Diniz IG, Silva AN, et al. DNA polymorphisms at BCL11A, HBS1L-MYB and Xmn1-HBG2 site loci associated with fetal hemoglobin levels in sickle cell anemia patients from Northern Brazil [J]. *Blood Cells Mol Dis*, 2014, 53(4):176-179.
- [11] Pandey S, Pandey S, Mishra RM, et al. Modulating Effect of the -158  $\gamma$  (C $\rightarrow$ T) Xmn1 Polymorphism in Indian Sickle Cell Patients [J]. *Mediterr J Hematol Infect Dis*, 2012, 4(1):e2012001.
- [12] Lai Y, Zhou L, Yi S, et al. The association between four SNPs (rs7482144, rs4671393, rs28384513 and rs4895441) and fetal hemoglobin levels in Chinese Zhuang  $\beta$ -thalassemia intermedia patients[J]. *Blood Cells Mol Dis*, 2017, 63:52-57.
- [13] Dadheech S, Jain S, Madhulatha D, et al. Association of Xmn1 -158  $\gamma$ G variant with severity and HbF levels in  $\beta$ -thalassemia major and sickle cell anaemia [J]. *Mol Biol Rep*, 2014, 41(5):3331-3337.
- [14] Prasing W, Odawara T, Traisathit P, et al. Analysis of the Xmn1-(G)  $\gamma$  polymorphism in  $\beta$ -thalassemia/hemoglobin E (HbE) and homozygous HbE patients with low and high levels of HbF[J]. *Int J Lab Hematol*, 2015, 37(2):e25-28.
- [15] Miri-Moghaddam E, Bahrami S, Naderi M, et al. Xmn1-158  $\gamma$ G Variant in B-Thalassemia Intermediate Patients in South-East of Iran [J]. *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res*, 2017, 11(2):165-171.
- [16] Weatherall DJ. Commentary on "The modifying effect of Xmn1-HBG2 on thalassaemic phenotype is associated with its linked elements in the beta globin locus control region, including the palindromic site at 5'HS4" by M. Neishabury et al [J]. *Blood Cells Mol Dis*, 2012, 48(1):6.
- [17] Wang X, Angelis N, Thein SL, et al. MYB - A regulatory factor in hematopoiesis [J]. *Gene*, 2018, 665:6-17.
- [18] Stadhouders R, Aktuna S, Thongjuea S, et al. HBS1L-MYB intergenic variants modulate fetal hemoglobin via long-range MYB enhancers[J]. *J Clin Invest*, 2014, 124(4):1699-1710.
- [19] Farrell JJ, Sherva RM, Chen ZY, et al. A 3-bp deletion in the HBS1L-MYB intergenic region on chromosome 6q23 is associated with HbF expression [J]. *Blood*, 2011, 117(18):4935-4945.
- [20] Yin J, Xie X, Ye Y, et al. BCL11A: a potential diagnostic biomarker and therapeutic target in human diseases [J]. *Biosci Rep*, 2019, 39(11):BSR20190604.
- [21] Sankaran VG, Menne TF, Xu J, et al. Human fetal hemoglobin expression is regulated by the developmental stage-specific repressor BCL11A [J]. *Science*, 2008, 322(5909):1839-1842.
- [22] Ju J, Wang Y, Liu R, et al. Human fetal globin gene expression is regulated by LYAR [J]. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42(15):9740-9752.
- [23] Nguyen TK, Joly P, Bardel C, et al. The XmnI (G) gamma polymorphism influences hemoglobin F synthesis contrary to BCL11A and HBS1L-MYB SNPs in a cohort of 57 beta-thalassemia intermedia patients [J]. *Blood Cells Mol Dis*, 2010, 45(2):124-127.
- [24] Wayne JS, Eng B. Krüppel-like factor 1: hematologic phenotypes associated with KLF1 gene mutations [J]. *Int J Lab Hematol*, 2015, 37(Suppl 1):78-84.
- [25] Pandya K, Donze D, Townes TM, et al. Novel transactivation domain in erythroid Kruppel-like factor (EKLF) [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(11):8239-8243.
- [26] Zhou D, Liu K, Sun CW, et al. KLF1 regulates BCL11A expression and gamma-to beta-globin gene switching [J]. *Nat Genet*, 2010, 42(9):742-744.
- [27] Liu D, Zhang X, Yu L, et al. KLF1 mutations are relatively more common in a thalassemia endemic region and ameliorate the severity of  $\beta$ -thalassemia [J]. *Blood*, 2014, 124(5):803-811.
- [28] 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.
- [29] Norton LJ, Funnell APW, Burdach J, et al. KLF1 directly activates expression of the novel fetal globin repressor ZBTB7A/LRF in erythroid cells [J]. *Blood Adv*, 2017, 1(11):685-692.
- [30] Constantinou C, Spella M, Chondrou V, et al. The multi-faceted functioning portrait of LRF/ZBTB7A [J]. *Hum Genomics*, 2019, 13(1):66.
- [31] Evans T, Reitman M, Felsenfeld G, et al. An erythrocyte-specific DNA-binding factor recognizes a regulatory sequence common to all chicken globin genes [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85(16):5976-5980.
- [32] Choi OR, Engel JD. Developmental regulation of beta-globin gene switching [J]. *Cell*, 1988, 55(1):17-26.
- [33] Zhou W, Clouston DR, Wang X, et al. Induction of human fetal globin gene expression by a novel erythroid factor, NF-E4 [J]. *Mol Cell Biol*, 2000, 20(20):7662-7672.
- [34] Amrolia PJ, Cunningham JM, Ney P, et al. Identification of two novel regulatory elements within the 5'-untranslated region of the human A gamma-globin gene [J]. *J Biol Chem*, 1995, 270(21):12892-12898.
- [35] Jane SM, Gumucio DL, Ney PA, et al. Methylation-enhanced binding of Sp1 to the stage selector element of the human gamma-globin gene promoter may regulate development specificity of expression [J]. *Mol Cell Biol*, 1993, 13(6):3272-3281.

# 高通量基因测序在血液肿瘤临床应用的质量管理现状及展望

吴祁生<sup>1</sup> 王芳<sup>2</sup> 聂代静<sup>2</sup> 周晓苏<sup>3</sup> 陈佳琦<sup>2</sup>, 刘红星<sup>1,2,3\*</sup>

**[摘要]** 高通量基因测序技术,即下一代测序(NGS)在血液肿瘤的筛查、诊断分型、治疗指导,预后分层、微小残留病监测和复发预测有着重要临床应用价值。虽然已有众多国内外诊疗指南推荐,血液肿瘤NGS的临床应用仍处于初期阶段。加强NGS实验流程的质量管理是保证技术正确应用的重要环节。NGS技术原理和实验流程复杂,实现高质量的临床检测对“人、机、料、法、环”等质量管理要素的系统管理要求高。本文基于NGS在血液肿瘤临床应用中的质量管理要素现状提出见解,并做以展望,以期对血液肿瘤NGS临床应用的规范化起到正向作用。

**[关键词]** 高通量基因测序技术;血液肿瘤;临床应用;质量管理

## Status and prospects of quality management elements of high-throughput sequencing in clinical application of hematological malignancies

WU Qisheng<sup>1</sup>, WANG Fang<sup>2</sup>, NIE Daijing<sup>2</sup>, ZHOU Xiaosu<sup>3</sup>, CHEN Jiaqi<sup>2</sup>, LIU Hongxing<sup>1,2,3\*</sup>

(1. Department of Pathology and Laboratory Medicine, Beijing Ludaopei Hospital, Beijing 100176, China; 2. Department of Pathology and Laboratory Medicine, Hebei Yanda Ludaopei Hospital, Langfang 065201, China; 3. Beijing Ludaopei Institute of Hematology, Beijing 100176, China)

**[ABSTRACT]** High-throughput sequencing technology (NGS) has important clinical applications in screening, disease classification, clinical management, prognostic stratification, minimal residual disease monitoring and relapse prediction in hematological malignancies. Although there are many domestic and international guidelines have been recommended, the clinical application of NGS in hematological malignancies is still in the early stage. Strengthening the quality management of the NGS experimental process is an important part of ensuring the correct application of this technology. The technical principles and experimental procedures of NGS are complex, and the implementation of high-quality clinical testing has high requirements for the systematic management of quality management elements such as “human, machine, material, method, and environment”. This article proposes insights and prospects based on the status of quality management elements of NGS in the clinical application of hematological malignancies, hoping to play a positive role in the standardization of clinical applications of NGS in hematological malignancies.

**[KEY WORDS]** High-throughput sequencing technology; Hematological malignancies; Clinical applications; Quality management

血液肿瘤是发生于造血或淋巴组织的具有高度异质性的疾病,其临床诊疗需要结合病理、血细胞形态、免疫表型、细胞遗传、分子生物学和临床

表现进综合分析。世界卫生组织(world health organization, WHO)的《造血与淋巴组织肿瘤分类》<sup>[1-2]</sup>与美国国家综合癌症网络(national compre-

基金项目:河北省医学科学研究课题(20210022)

作者单位:1. 北京陆道培医院病理和检验医学科,北京 100076

2. 河北燕达陆道培医院检验科,河北,廊坊 065201

3. 北京陆道培血液病研究院,北京 100076

\*通信作者:刘红星, E-mail: starliu@pku.edu.cn

hensive cancer network, NCCN)的血液肿瘤临床诊疗指南<sup>[3-5]</sup>都越来越多纳入了具有临床诊断分型和/或预后意义的基因变异指标,包括基因突变、融合基因及基因异常表达等。这些基因变异在血液肿瘤的诊断分型、预后分层、治疗指导、微小残留病监测和耐药突变监测等方面有重要临床应用价值<sup>[1-5]</sup>。下一代高通量基因测序(next generation sequencing, NGS)可一次对多个肿瘤相关基因、全外显子或基因转录本进行检测,具有通量高、灵敏度高、成本低等优势<sup>[6-7]</sup>。

血液肿瘤临床诊疗对NGS的应用有着迫切的需求。相对于病理机制研究和治疗手段的巨大进步,血液肿瘤的实验室检测严重滞后,尤其是NGS的应用方面。不同于传统的分子诊断技术,血液肿瘤NGS技术流程复杂,除核酸提取、PCR扩增、产物分析等步骤,还有文库构建、文库富集和上机测序过程,更有测序结果的生物信息学分析<sup>[8-9]</sup>。这套复杂的系统对“人、机、料、法、环”各方面的质量管理和保证提出了更高的要求<sup>[10]</sup>。本文基于NGS在血液肿瘤临床应用中的质量管理要素现状提出见解,并做以展望,以期对血液肿瘤NGS临床应用的规范化起到正向作用。

## 1 “人”

NGS技术操作步骤多、程序复杂,需不同岗位的专业人员分工协作,包括做“湿实验”的操作人员、“干实验”的生物信息分析人员和报告分析解读人员等。虽然不同的岗位人员需要具备不同的技术能力,但又非截然分开,需要实验室负责人统筹分配和岗位间的互相配合。国家卫健委临床检验中心2019年白血病融合基因*BCR-ABL1*的室间质评活动数据显示,95%的做血液肿瘤基因检测的实验室为血液科自建实验室<sup>[11]</sup>。

开展血液肿瘤NGS检测的实验室应配备获得国家要求的相应资质的专业人员(如医师、技师和研究员等系列),实验室负责人或技术负责人应有全面的NGS知识和质量管理能力,人员能力和数量应满足所开展检测项目的要求。目前除少数血液病专科或特色医院外,血液科自建实验室基本都存在专业人员配置和岗位资质考核等方面的欠缺。另外,国家和行业层面尚无针对血液肿瘤NGS“湿/干实验”的专业技术人员的能力评估和培训,临床实验室也欠缺相应的制度。目前血液肿

瘤NGS检测均是使用实验室自建方法(laboratory developed tests, LDTs)，“湿/干实验”项目研发人员的短缺也是临床实验室常态。当前血液肿瘤NGS检测专业技术人员的培养和储备尚显薄弱,有待进一步的行业建设和发展。

## 2 “机”

目前国内使用的NGS仪器主要为Illumina测序平台、Ion Torrent半导体测序平台和华大基因的CG测序平台<sup>[7]</sup>。除高通量基因测序仪外,开展血液肿瘤NGS检测的实验室还应配备满足所开展检测项目需求的其他仪器设备,如超净台、生物安全柜、纯水仪、离心机、移液器、冰箱、PCR仪和生物分析仪等。有能力开展血液肿瘤NGS检测的实验室,应根据所开展项目合理选择测序平台和相关辅助设备,还应考虑标本类型、标本量、项目内涵、所需测序通量、周转时间等因素。

当前临床实验室购置的高通量测序仪,大多数为尚未经国家药品监督管理局(national medical product administration, NMPA)批准的仪器,需要实验室进行确认试验,以证明可满足临床预期用途。同时,实验室应建立仪器使用、维护和校准程序,并在日常工作中例行维护和定期校准,以保证仪器设备的正常运行,仪器设备维护和校准应保存相应记录<sup>[12]</sup>。

## 3 “料”

不同于实体肿瘤的取材困难,血液肿瘤的标本类型有骨髓、外周血和淋巴结等,样本取材和保存相对容易,易获得高质量的核酸样本。这对开展NGS检测是很大的优势。实验室应对样本的采集容器、采集量、保存和运输条件等进行确认,以保证样本质量、避免交叉污染。实验室应做好样本不合格率、样本容器错误率、标本类型错误率等质量指标记录<sup>[13]</sup>。只有采集到符合质量要求的样本,才能为后续的NGS“湿实验”和得到高质量的测序数据打好基础。

在血液肿瘤领域,目前国内尚无已通过NMPA审批的成套的商品化NGS检测试剂。如何严谨负责地研发和建立LDTs项目,并进行性能评价(包括性能确认和验证),是开展NGS项目的临床实验室必须解决的首要问题<sup>[14]</sup>。设计不合理或结果不可靠的LDTs项目不仅不能发挥应有的临床

价值,甚至可能造成 NGS 推广应用的障碍。目前已有血液专科或特色实验室开始积极进行 LDTs 的性能确认工作,这是令人欣慰的事。但是对于大多数临床实验室,建立血液肿瘤 NGS-LDTs 项目的全流程工作,包括项目设计、技术路线选择和试剂性能评价等,仍然存在很大挑战。由于高建设门槛,很多医院没有能力开展 NGS 检测项目,这部分检测需求被转移到有能力的第三方独立实验室。

#### 4 “法”

开展血液肿瘤 NGS 检测,临床实验室应通过试剂方法建立和性能确认的过程,建立及完善整个检测系统(包括“干/湿”实验流程),明确日常检测的质量控制标准及关键点,形成检测操作全过程的标准程序文件,并明确检测系统的性能指标和检测局限性<sup>[15-16]</sup>。血液肿瘤 NGS-LDTs 项目的全流程性能评价是人、机、料、法、环等要素的全面评价,相应的指标包括精密度、准确度、分析敏感性、分析特异性和可报告范围等<sup>[17-18]</sup>。

与其他实体肿瘤相比,血液肿瘤的发生率相对较低,临床血液病实验室可能在人力、物力和财力上得到的支持有限。因此,首先需要清楚本实验室使用 NGS 的临床预期用途是什么?比如融合基因筛查对白血病的诊疗、危险度分层和预后判断都有重要的意义,但用逆转录荧光 PCR 进行有限数量的融合基因筛查会漏检未涵盖在检测范围内的融合基因,只能解决部分问题<sup>[19-20]</sup>。使用转录组基因测序(RNA sequencing, RNA-seq)<sup>[21]</sup>,可接近全面地分析血液肿瘤中各种可能存在的融合转录本,同时还能显示基因变异的表达量<sup>[15]</sup>。如果将 RNA-seq 融合基因筛查的 LDTs 应用于临床检测,就必须对该检测系统进行性能评价,用客观数据证实其可显著提高融合基因筛查的阳性率。

除了性能评价外,血液肿瘤 NGS 临床检测还面临着无商品化室内质量控制品(internal quality control, IQC)和室间质量评价计划(external quality assessment, EQA)的难题。临床血液病实验室需主动进行室内质量控制,以监控每一次 NGS 检测结果,并且进行周期性评价,以保证检测系统的精密度。有少数临床血液病实验室参加了国家卫健委临检中心的“全国实体肿瘤体细胞突变高通量测序检测室间质量评价”项目,以考核所开展的 NGS 项目的结果准确性。但是,血液肿瘤与实体肿

瘤的体细胞突变频率、样本类型和处理方式均有很大不同,针对实体肿瘤设计的 EQA 计划并不完全适合血液肿瘤。临床实验室还可选择与已获得能力认可或使用相同测序平台的外部实验室进行 NGS 项目的实验室间比对,以达到能力验证的目的。

#### 5 “环”

开展血液肿瘤 NGS 临床检测的实验室应根据拟开展的检测项目数量、所用技术流程、测序平台和标本量进行实验室环境设计。实验室应至少设置 5 个功能区:试剂存储和准备区、样本与文库制备区、文库扩增与检测区、上机测序区、数据分析和报告解读区<sup>[12]</sup>。对开展测序深度及检测限有很大差别的 NGS 测序项目,实验室宜设置不同的样本制备和文库制备区域,以防止交叉污染发生。实验室环境需注意通风、洁净度、温湿度、震动和光照等要求,以保证仪器设备的正常运行和实验过程的稳定性。

#### 6 小结和展望

血液肿瘤标本容易获得,进行 NGS 检测有着先天的优势。自从“精准医学(precision medicine)”的概念提出以来,血液肿瘤的精准医学研究和临床应用也走在各种肿瘤的前列。NGS 已在血液肿瘤临床诊疗方面显示出很好的应用价值,例如:用 RNA-seq 较为全面分析常见和少见型融合基因,用于血液肿瘤有明确意义的突变基因的靶向测序,用于指导个体化用药的药物基因组分析,用于血液肿瘤遗传病基因突变筛查等。

NGS 提供了分析基因变异的强大工具,但检测系统的复杂性增加了 NMPA 审核的难度,限制了其落地临床检测的速度。建立和使用 NGS-LDTs 是一种可行的方案,但应坚持严格的考查和准入标准,即有明确的临床预期用途,在临床应用中始终基于医学科学证据和数据支持。国内血液肿瘤和分子诊断领域的专家们已经开始商讨和制定一些 NGS 在血液肿瘤应用方面规范化的专家共识或专家建议,这将有助于促进 NGS 技术在临床诊疗中的规范化应用。

#### 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] Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms[J]. *Blood*, 2016, 127(20):2375-2390.
- [3] Radich JP, Michael D, Abboud CN, et al. Chronic Myeloid Leukemia, Version 1.2019, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology[J]. *J Natl Compreh Canc Netw*, 2018, 16(9):1108-1135.
- [4] Tallman MS, Wang ES, Altman JK, et al. Acute Myeloid Leukemia, Version 3.2019, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology[J]. *J Natl Compreh Canc Netw*, 2019, 17(6):721-749.
- [5] Alvarnas JC, Brown PA, Aoun P, et al. Acute lymphoblastic leukemia, Version 1.2019, NCCN Clinical practice guidelines in oncology[J]. *J Natl Compreh Canc Netw*, 2019, 18(7):858-914.
- [6] 邵向阳,徐伟文.下一代测序(NGS)技术的发展及在肿瘤研究的应用[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2016,8(5):289-296.
- [7] 李金明.高通量测序技术[M].北京:科学出版社,2018.
- [8] 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.
- [9] 许成山,李小青,刘红星,等.血液肿瘤二代测序实验室检测规范化的建议[J]. *中华医学杂志*, 2019,99(41):3204-3208.
- [10] 张瑞,李金明,王清涛.重视高通量测序技术临床应用的规范化[J]. *中华医学杂志*, 2019, 99(43):3361-3363.
- [11] Fu Y, Zhang R, Wu Q, et al. External quality assessment of p210 BCR-ABL1 transcript quantification by RT-qPCR: Findings and recommendations [J]. *Int J Lab Hematol*, 2019, 41(1):46-54.
- [12] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会.医疗机构临床基因扩增检验实验室管理办法 [EB/OL]. (2010-12-6).
- [13] 中华人民共和国卫生和计划生育委员会. WST 496-2017 中华人民共和国卫生行业标准临床实验室质量指标[S]. 2017.
- [14] Gargis AS, Kalman L, Berry MW, et al. Assuring the quality of next-generation sequencing in clinical laboratory practice [J]. *Nat Biotechnol*, 2012, 30(11):1033-1036.
- [15] 中国临床肿瘤学会肿瘤标志物专家委员会,中国肿瘤驱动基因分析联盟.二代测序技术在肿瘤精准医学诊断中的应用专家共识 [J]. *中华医学杂志*, 2018, 98(26):2057-2065.
- [16] 北京市临床检验中心,北京医学会检验医学分会,首都医科大学临床检验诊断学系,等.高通量测序技术临床规范化应用北京专家共识(第一版肿瘤部分)[J]. *中华医学杂志*, 2020,100(9):648-659.
- [17] Centers for Medicare & Medicaid Services. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988; final rules and notice [S]. 2017.
- [18] Rehm HL, Bale SJ, Bayrak-Toydemir P, et al. ACMG clinical laboratory standards for next-generation sequencing [J]. *Genet Med*, 2013, 15(9):733-747.
- [19] 王芳,陈雪,袁丽莉,等.血液肿瘤中融合基因和融合基因家族的研究进展与挑战[J]. *中华医学杂志*, 2019, 99(41):3216-3220.
- [20] Ikeda J, Shiba N, Tsujimoto SI, et al. Whole transcriptome sequencing reveals a KMT2A-USP2 fusion in infant acute myeloid leukemia [J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 2019, 58(9):669-672.
- [21] Stark R, Grzelak M, Hadfield J. RNA sequencing: the teenage years [J]. *Nat Rev Genet*, 2019,20(11):631-656.

(上接第 844 页)

- [36] Wani S, Sugita A, Ohkuma Y, et al. Human SCP4 is a chromatin-associated CTD phosphatase and exhibits the dynamic translocation during erythroid differentiation [J]. *J Biochem*, 2016, 160(2):111-120.
- [37] Ma YN, Zhang X, Yu HC, et al. CTD small phosphatase like 2 (CTDSPL2) can increase  $\epsilon$ - and  $\gamma$ -globin gene expression in K562 cells and CD34+ cells derived from umbilical cord blood[J]. *BMC Cell Biol*, 2010, 11:75-85.
- [38] Torchy MP, Hamiche A, Klaholz BP, et al. Structure and function insights into the NuRD chromatin remodeling complex[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2015, 72(13):2491-2507.
- [39] Harju-Baker S, Costa FC, Fedosyuk H, et al. Silencing of Agamma-globin gene expression during adult definitive erythropoiesis mediated by GATA-1-FOG-1-Mi2 complex binding at the -566 GATA site[J]. *Mol Cell Biol*, 2008, 28(10):3101-3113.
- [40] Yu X, Azzo A, Bilinovich SM, et al. Disruption of the MBD2-NuRD complex but not MBD3-NuRD induces high level HbF expression in human adult erythroid cells [J]. *Hematologica*, 2019, 104(12):2361-2371.
- [41] 梁云浩. GATAD2A 缺乏通过下调 MYB 重新激活胎儿血红蛋白合成并减轻  $\beta$  地中海贫血的严重性[D]. 2018.
- [42] 左杨瑾.  $\beta$ -珠蛋白基因簇潜在功能性 rSNP 的系统扫描:评价一个 HBG1 5'UTR 变异对  $\beta$ -地中海贫血的遗传修饰作用[D]. 2016.
- [43] Gutiérrez L, Caballero N, Fernández-Calleja L, et al. Regulation of GATA1 levels in erythropoiesis [J]. *IUBMB Life*, 2020, 72(1):89-105.
- [44] Katsumura KR, Bresnick EH. The GATA factor revolution in hematology[J]. *Blood*, 2017, 129(15):2092-2102.
- [45] Song SH, Hou C, Dean A, et al. A positive role for NLI/Ldb1 in long-range beta-globin locus control region function [J]. *Mol Cell*, 2007, 28(5):810-822.

## 山东省立医院临床医学检验部

山东省立医院临床医学检验部位于山东省济南市经三路240,是国家首批“高通量基因测序技术临床应用试点单位”(山东省唯一一家)、山东省重点专科、山东省医药卫生重点实验室、山东省临床检验中心主委单位、山东省医院管理协会检验分会主委单位、山东省免疫学会临床免疫专业委员会主委单位,山东省肿瘤协会细胞学专业委员会主委单位。拥有员工181人,博士生导师1人,硕士生导师7人。山东省有突出贡献中青年专家1人,青年泰山学者1人,30余人在中华医学会、山东省医学会等学术团体中任副主任委员、委员等。实验室功能齐全,拥有国际一流水平的、现代化医学检测设备。其中高端设备如:MALDI-TOF MS质谱仪、粒子耦合质谱仪、焦磷酸测序仪、I代核酸检测仪、II代核酸检测仪、全自动遗传检测分析系统等,总价值1.5亿元。

临床医学检验部主要研究方向紧密围绕国家和山东重点鼓励发展战略性新兴产业之一的分子诊断,研究衰老与阿尔茨海默病、遗传性耳聋、慢性非传染性疾病的分子机制,确定新的分子诊断靶点,属于具有前瞻性的产学研领域。近5年,临床医学检验部开展新技术/新项目105项。先后承担了国家级自然科学基金课题7项及省级科研项目14项。荣获山东省自然科学三等奖1项;山东省医学科技奖:二等奖2项和三等奖1项。发表论文70余篇,主编论著11部。共培养硕士博士研究生40余名。

科室主任、学术带头人卢志明教授,医学博士,山东大学教授,山东大学博士生导师,山东第一医科大学博士生导师,山东省有突出贡献的中青年专家。兼任:山东省医学会临床检验分会主任委员,山东省临床检验专家委员会主任委员、山东省免疫学会临床免疫专业委员会主任委员、中国医院协会检验管理专业委员会常务委员、中国中西医结合学会临床检验专委会常务委员、山东省医师协会、山东省医院协会、山东省健康管理协会、山东省中西医结合学会的检验专业副主任委员等。



### 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。

