



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

分子诊断与治疗杂志

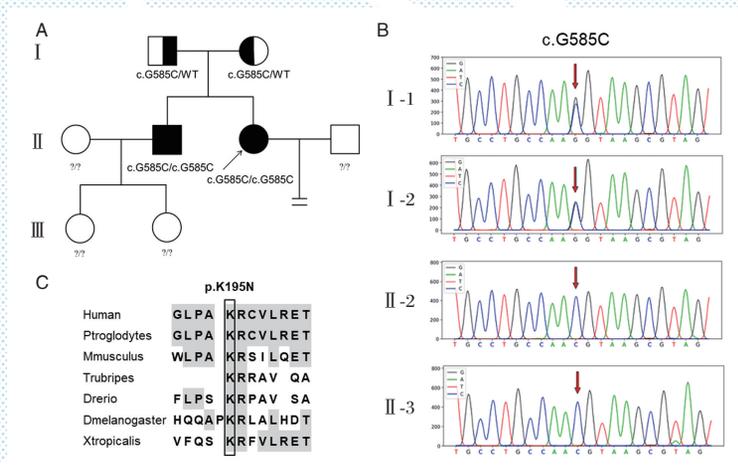
FENZI ZHENDUAN YU ZHILIAO ZAZHI

2021年7月 第13卷 第7期 总第83期

JOURNAL OF

MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Volume 13 Number 7 July 2021



注:A为先证者遗传家系图。B为先证者及其家人 Sanger 测序结果显示 WEE2:c.G585C(p.K195N)错义突变。红色箭头是突变位点。C为 WEE2 蛋白的(p.K195N)氨基酸序列保守性比对。

图(P1037) 先证者家系 Sanger 测序结果和 WEE2 蛋白(p.K195N)不同物种氨基酸序列

Figure(P1037) Sanger sequencing results of proband family and WEE2(p.K195N)amino acid sequence of different species

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

07>

李富荣



1962年9月出生,1999年毕业于同济医科大学,获病原生物学博士学位。

研究员,博士生导师,深圳市高层次国家领军人才,深圳市卫生系统学科带头人。深圳市人民医院(暨南大学第二临床医学院,南方科技大学第一附属医院)转化医学协同创新中心主任,国家干细胞临床研究备案机构负责人,广东省干细胞与细胞治疗工程技术研究中心主任,深圳市干细胞与细胞治疗重点实验室主任,深圳细胞治疗公共服务平台主任。中国药学会细胞药物专业委员会副主任委员,中国衰老与抗衰老学会委员,国际细胞治疗协会会员,国际干细胞研究协会会员。

近年来,先后承担国家863项目1项,国家973子项目2项,国家自然科学基金5项,以及其他省部级重大项目20余项,获资助3000万元。先后在Cell Research, Journal of Hepatology, circulation research等SCI收录杂志上发表论著60余篇,总影响因子超过400分;在国内CSCD核心期刊上发表论著200余篇;主编和参编3部学术著作;获得国家发明专利6项。先后获得2014年广东省科学技术进步二等奖,2003年教育部科技进步奖二等奖和2003年广东省科技进步三等奖各1项。2013年深圳市科学技术进步一等奖,2007年和2009年深圳市科技进步二等奖各1项,2003年和2005年深圳市科学技术进步三等奖各1项。培养博士、硕士研究生50余人。Cell transplantation, Int J Nanomedicine, Cell Science, 中国病理生理学杂志,新发传染病电子杂志等编委。

分子诊断与治疗杂志

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

月刊 2021年7月 第13卷 第7期 总第83期 Bimonthly Volume 13 Number 7 July 2021

主管	中山大学
主办	《中国家庭医生》杂志社有限公司
承办	广州达安基因股份有限公司
总编辑	张翼鹏
顾问	申子瑜
主编	李明
编辑部主任	蒋析文
编辑部副主任	刘悦
编辑部	《分子诊断与治疗杂志》编辑部
编辑	李晓兰 李彩珍 莫源浩
出版	《中国家庭医生》杂志社有限公司
地址	广州市天河区天河北路179号祥龙大厦11楼(510620)
电话	(020) 32290789-206, 32290789-201
电子邮箱	jmdt@vip.163.com
刊号	ISSN 1674-6929 CN 44-1656/R
邮发代号	46-283
发行单位	广东省报刊发行局
发行范围	国内外公开发售
广告发布登记通知书	440100190057
印刷	天意有福科技股份有限公司
出版日期	2021年7月18日
定价	RMB 15.00元
Responsible Institution	<i>Sun Yat-sen University</i>
Sponsor	<i>China Family Doctors Magazine Publisher Co., Ltd.</i>
Organizer	<i>Daan Gene Co., Ltd.</i>
Editor in Chief	<i>ZHANG Yipeng</i>
Consultant	<i>SHEN Ziyu</i>
Editor in Chief	<i>LI Ming</i>
Managing Director	<i>JIANG Xiwen</i>
Associate Editor	<i>LIU Yue</i>
Editorial Office	<i><JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY> Editorial Office</i>
Editors	<i>LI Xiaolan LI Caizhen MO Yuanhao</i>
Editing	<i>China Family Doctors Magazine Publisher Co., Ltd.</i>
Add	<i>11 Fl., Xianglong Building, 179# Tian he bei Lu, Guangzhou, China 510620</i>
Tel	<i>(020) 32290789-206, 32290789-201</i>
E-mail	<i>jmdt@vip.163.com</i>
CSSN	<i>ISSN 1674-6929 CN 44-1656/R</i>
Printing	<i>TianYi Yofus Technology Co., Ltd.</i>
Publish Date	<i>2021.7.18</i>
Price	<i>RMB 15.00</i>



扫码订阅《分子诊断与治疗杂志》

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



中国科技核心期刊

(中国科技论文统计源期刊)

收录证书

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

分子诊断与治疗杂志

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

特颁发此证书。

中国科学技术信息研究所

Institute of Scientific and Technical Information of China

北京复兴路 15 号 100038

www.istic.ac.cn

2020年12月

证书编号: 2019-G556-0386
有效期至: 2021年12月



分子诊断与治疗杂志

月刊 2021年7月 第13卷 第7期

目次

述评

二维纳米材料在癌症精准治疗应用的进展..... 丁琳 杨晓菲 梁敏莉 等(1023)

论著

高通量基因测序仪行业标准的验证..... 孙楠 曲守方 陈祥宜 等(1027)

2019年深圳市HIV确证非阳性样本核酸检测结果分析..... 李浩 钟一帆 石向东 等(1031)

WEE2基因纯合突变Lys195Asn导致受精失败和女性不孕的家系分析
..... 刘顿 陈创奇 苏念军 等(1035)

生化指标及自身抗体对原发性胆汁性肝硬化的诊断价值研究
..... 冯婧 高洪燕 黄山(1039)

老年高血压患者认知功能障碍与ApoA5 IVS3+476G>A基因多态性关系
..... 施勇 谢月萍 张春丽(1043)

非小细胞肺癌患者血浆LncRNA UCA1与吉西他滨耐药相关性研究..... 韦瑞富(1047)

磷酸西格列汀与瑞格列奈对2型糖尿病的疗效及对GLP-1的影响
..... 龚为红 叶云辉 刘红景(1051)

急性胰腺炎患者血清cf-DNA/NETs、MAP1-LC3、DPB表达水平及临床意义
..... 袁燕文 陈孟君 许哲 等(1055)

CGRP、EGF及TGF- β 1与创伤性骨折患者应激状态及骨折愈合的关系
..... 周伟 罗亮 向勇 等(1059)

磁共振扩散张量成像联合1H-MRS技术在HIE诊断及病情评估中的应用
..... 于洪福 尹超 姜云飞(1063)

骨髓细胞形态学、M蛋白定量及免疫固定电泳在MM患者诊断中的应用
..... 崇翔 曾慧 万晓婷(1067)

CK-MB、25-(OH)D3及NSE与高胆红素血症新生儿病情及预后的关系
..... 杜丽君 罗菲菲 阮颖 等(1071)

ACI后肢体运动功能障碍患者EphA2蛋白与Bold-f MRI、DTI参数相关性
..... 陈历 蒋炳虎 季一飞 等(1075)

sCD14、hs-CRP、HNL对CRF腹膜透析细菌性腹膜炎诊断价值及意义
..... 贺晓蕾 徐雪英 王丽莹(1080)

PTEN、uPA和EZH2表达对胃癌术后复发预测..... 胡楠 汤佳琦 张竞舟 等(1084)

S100 β 、Hcy对阿尔茨海默病诊断及病情评估的价值..... 杜韵华 刘军 郭丽冰 等(1089)

hsa_circ_0006220对子痫前期滋养细胞的增殖和迁移的影响..... 周俏苗 林丹 许晶 等(1093)

IL-17A、sICAM-1及sE-选择素与RA患者疾病活动度及疗效的关系
..... 任占芬 郑学军 罗寰 等(1098)

外周血 NLR、PLR 及胸水 ADA、LDH 在鉴别胸腔积液性质中的应用	雷震 王震 郭锋(1102)
TPOAb、TRAb、TGAb 与妊娠期合并甲减患者甲状腺功能关系及预测妊娠结局价值	王力川 王舒婷 李玫蓉 等(1106)
降钙素原、CRP 在腹腔镜胆总管探查术后腹腔感染的诊断价值	许威风 李洁 王军(1110)
动态监测 VEGF、HBP、NGAL 在肺癌手术前后水平变化及与预后的关系	李伟 茹玉航 王林(1114)
CD14、HIF-1 α 、CX3CL1 与儿童急性牙髓炎易感性关系及诊断价值	白冰 陈梅梅 黄海燕(1118)
KLF4、LDH 联合 P53 预测 DLBCL 标准治疗反应性价值及意义	秦福丽 郭志强 李小雨(1122)
吸烟相关 COPD 肺微生物群、Treg/Th17、炎症在发病中的作用机制	王辉 叶彩虹 马焕丽 等(1126)
7 例遗传性凝血因子 XI 缺陷症患者基因型与临床表型分析	翁妙珊 杨立业 吴教仁 等(1130)
急性脑梗死患者外周血 miR-497-5p 表达的变化及临床意义	王娜 刘敏 傅美丽(1134)
上消化道癌术前胃镜活检、CA199 检测与 ESD 术后病理结果比较	张世栋 王菲(1138)
MMP-9、PBEF 及炎性因子预测重症急性胰腺炎肺损伤预后	朱丽娟 薛乾隆 林雪容 等(1142)
脑脊液乳酸、NF- κ B 及 BAFF 对颅内动脉瘤破裂出血术后转归的预测	李博 蒋铭 张志国 等(1146)
CA72-4、CA19-9、CA125、CA50 医学参考值范围及其对胃癌早期诊断价值的研究	杨剑 万成乐 金雷(1150)
重症肺炎所致 ARDS 患者血清 cTnI、NT-proBNP 及 CRP 水平变化及临床意义	刘春 邹勇 郭燕 等(1154)
创伤性四肢骨折患者血液因子变化及其与术后血栓的关系	郑海亮 刘晶 任志勇 等(1158)
CRP、LDH、SF 预测小儿 MPP 并发全身炎症反应综合征效能	李锐 周大权 纵雪峰(1162)
ROC 曲线在河源市新生儿 G6PD 缺乏症筛查截断值中的应用	刘运华 吴坤 刘晓燕(1166)
氨甲环酸联合缩宫素对剖宫产术后 PLT、FIB 及 Hb 水平的影响	俞萍 徐璨 杨志英 等(1171)
PD-1、sTREM-1 及 NLR 在创伤性胫骨平台骨折术后感染中的预测价值	罗富初 包一涵 姜南星 等(1175)
不同剂量阿托伐他汀对心肌梗死患者 MMP-9、COX-2 及 CD40L 水平的影响	王欢 熊辉 曾莉娜 等(1179)
2017 年-2019 年铜仁市城区手足口病流行病学分析	龙丽 雷星 田松娅(1183)
BRCA1、DACH1 及 S100A4 在子宫内膜癌病情进展及治疗预后中的预测价值	潘月 郑振荣 张开红 等(1188)

综 述

特异位点 DNA 甲基化常用检测技术及应用进展	姚燕丽 黄宇哲 韩芝斌 等(1192)
外泌体在肿瘤转移和耐药相关研究中的进展	魏欣宇 王文锐 杨清玲 等(1197)

专家风采

李富荣	(封二)
-----------	------

实验室巡礼

深圳市人民医院转化医学协同创新中心	(封三)
-------------------------	------

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Monthly Volume 13 Number 7 July 2021

CONTENTS

COMMENTS

- Application of two-dimensional nanomaterials in cancer precision therapy
DING Lin, YANG Xiaofei, LIANG Minli, LI Furong (1023)

ORIGINAL ARTICLES

- Verification of industry standards for high-throughput gene sequencers
SUN Nan, QU Shoufang, CHEN Yangyi, GAO Fei, ZHANG Wenxin, YU Ting, HUANG Jie (1027)
- Analysis of nucleic acid test results of non-positive HIV confirmed samples in Shenzhen in 2019
LI Hao, ZHONG Yifan, SHI Xiangdong, YANG Zhengrong, ZHAO Jin (1031)
- Lys195Asn homozygous mutation of *WEE2* gene causes fertilization failure and a pedigree analysis of female infertility
LIU Dun, CHEN Chuangqi, SU Nianjun, HE Tianwen, YAN Jin, LIU Fenghua, ZHANG Xiqian (1035)
- Study on the diagnostic value of biochemical indicators and autoantibodies in primary biliary cirrhosis
FENG Jing, GAO Hongyan, HUANG Shan (1039)
- The relationship between cognitive dysfunction and *ApoA5* IVS3+476G > A gene polymorphism in elderly hypertensive patients
SHI Yong, XIE Yueping, ZHANG Chunli (1043)
- Study on the correlation between plasma lncRNA UCA1 and gemcitabine resistance in patients with non-small cell lung cancer
WEI Ruifu (1047)
- Efficacy of Sigitazine Phosphate and Reglinide on Type 2 Diabetes and the influence on GLP-1
GONG Weihong, YE Yunhui, LIU Hongjing (1051)
- The levels of serum cf-DNA/NETs, MAP1-LC3, DPB in patients with acute pancreatitis and their clinical significance
YUAN Yanwen, CHEN Mengjun, XU Zhe, HUANG Miaoxing, CHEN Zhicao, YE Chenxuan (1055)
- The relationship of CGRP, EGF and TGF- β 1 with stress state and fracture healing in patients with traumatic fracture
ZHOU Wei, LUO Liang, XIANG Yong, YANG Yunkang (1059)
- Application of MRI diffusion tensor imaging combined with 1H-MRS technology in HIE diagnosis and disease assessment
YU Hongfu, YIN Chao, JIANG Yunfei (1063)
- Application of bone marrow cell morphology, M protein quantification and immunofixation electrophoresis in the diagnosis of multiple myeloma patients
CHONG Xiang, ZENG Hui, WAN Xiaoting (1067)
- Study on the relationship between CK-MB, 25-(OH) D3 and NSE and the condition and prognosis of neonates with hyperbilirubinemia
DU Lijun, LUO Feifei, RUAN Ying, WANG Lijuan (1071)
- Correlation between EphA2 protein and Bold-f MRI and DTI parameters in patients with post-ACI limb motor dysfunction
CHEN Li, JIANG Binghu, JI Yifei, JIN Yu, YIN Shubin, ZHAO Yuping (1075)
- The diagnostic value and significance of sCD14, hs-CRP and HNL on bacterial peritonitis caused by peritoneal dialysis in CRF
HE Xiaolei, XU Xueying, WANG Liying (1080)
- Immunohistochemical detection of protein PTEN, uPA and *EZH2* expression in predicting postoperative recurrence of gastric cancer
HU Nan, TANG Jiaqi, ZHANG Jingzhou, ZHOU Kangjie, WU Xueyu, HONG Yidong, WU Fenglei (1084)
- The value of S100 β and Hcy in the diagnosis and evaluation of Alzheimer's disease
DU Yunhua, LIU Jun, GUO Libing, XU Weijie, YOU Qingqing (1089)
- Effect of hsa_circ_0006220 on the proliferation and migration of trophoblast cells in preeclampsia
ZHOU Qiaomiao, LIN Dan, XU Jing, WU Xiuju, ZHONG Gaobu, WANG Qiuyan (1093)
- The relationship between the levels of IL-17A, sICAM-1 and sE-selectin and disease activity and efficacy in RA patients
REN Zhanfen, ZHENG Xuejun, LUO Huan, FANG Xiao, Li Hongyan, ZHAO Chuntao (1098)

Application of peripheral blood NLR, PLR, and pleural effusion ADA, LDH in differentiating the nature of pleural effusion <i>LEI Zhen, WANG Zhen, GUO Feng</i>	(1102)
The relationship between TPOAb, TRAb, TGAb and thyroid function in patients with hypothyroidism during pregnancy and the value of predicting pregnancy outcome <i>WANG Lichuan, WANG Shuting, LI Meirong, LUO Huan</i>	(1106)
Diagnostic value of procalcitonin and CRP in intra-abdominal infection after laparoscopic common bile duct exploration <i>XU Weifeng, LI Jie, WANG Jun</i>	(1110)
Dynamics of serum VEGF, HBP, NGAL levels in lung cancer patients before and after surgery and their relationship with prognosis <i>LI Wei, RU Yuhang, WANG Lin</i>	(1114)
The relationship between CD14, HIF-1 α , CX3CL1 and susceptibility to acute pulpitis in children and its diagnostic value <i>BAI Bing, CHEN Meimei, HUANG Haiyan</i>	(1118)
The value and significance of the detection of KLF4, LDH combined with P53 in predicting the responsiveness of DLBCL to standard treatment <i>QIN Fuli, GUO Zhiqiang, LI Xiaoyu</i>	(1122)
Smoking-related COPD lung microecological flora, Treg/Th17, and the mechanism of inflammation in the pathogenesis <i>WANG Hui, YE Caihong, MA Huanli, SUN Junsheng, CHEN Siliang, ZHANG Shaobin</i>	(1126)
Analysis of genotype and clinical phenotype of 7 patients with hereditary factor XI deficiency <i>WENG Miaoshan, YANG Liye, WU Jiaoren, ZHANG Jincan, YUANWeisi, ZHUANG Dan, LIN Fen</i>	(1130)
Changes and clinical significance of miR-497-5p expression in peripheral blood of patients with acute cerebral infarction <i>WANG Na, LIU Min, FU Meili</i>	(1134)
Comparison between preoperative gastroscopic biopsy of early upper gastrointestinal cancer, CA199 detection and the pathological results after ESD <i>ZHANG Shidong, WANG Fei</i>	(1138)
MMP-9, PBEF and Inflammatory Factors Predict the Prognosis of Severe Acute Pancreatitis-related Lung injury <i>ZHU Lijuan, XUE Qianlong, LIN Xuerong, HAN Shuchi</i>	(1142)
The prediction of cerebrospinal fluid lactic acid, NF- κ B and BAFF on the postoperative outcome of intracranial aneurysm rupture and hemorrhage <i>LI Bo, JIANG Ming, ZHANG Zhiguo, ZHANG Chengwen</i>	(1146)
Study on the medical reference value ranges of CA72-4, CA19-9, CA125, CA50 and their value in early diagnosis of gastric cancer <i>YANG Jian, WAN Chengle, Jin Lei</i>	(1150)
Changes and clinical significance of serum cTnl, NT-proBNP and CRP levels in patients with ARDS caused by severe pneumonia <i>LIU Chun, ZOU Yong, GUO Yan, TAO lin, WANG Xiaochun</i>	(1154)
Changes of blood factors in patients with traumatic limb fractures and their relationship with postoperative thrombus <i>ZHENG Hailiang, LIU Jing, REN Zhiyong, SONG Jun, MAO Qingjun</i>	(1158)
Efficacy of CRP, LDH and SF in predicting the systemic inflammatory response syndrome in children with MPP <i>LI Rui, ZHOU Daquan, ZONG Xuefeng</i>	(1162)
Application of ROC curve in the cut-off value of G6PD deficiency screening for newborns in Heyuan City <i>LIUYunhua, WU Kun, LIU Xiaoyan</i>	(1166)
Effect of tranexamic acid combined with oxytocin on PLT, FIB and Hb levels after cesarean section <i>YU Ping, XU can, YANG Zhiying, WANG Jiajia</i>	(1171)
The value of PD-1, sTREM-1 and NLR in predicting postoperative infection of patients with traumatic tibial plateau fractures <i>LUO Fureng, BAO Yihan, JIANG Nanxing, HE Zuhao, XIE Jin, LUO Xianmin</i>	(1175)
Effect of different doses of atorvastatin on the levels of MMP-9, COX-2 and CD40L in patients with myocardial infarction <i>WANG Huan, XIONG Hui, ZENG Lina, YAO Song, CHENG Liqing</i>	(1179)
Epidemiological analysis of hand foot mouth disease in Tongren City from 2017 to 2019 <i>LONG Li, LEI Xing, TIAN Songya</i>	(1183)
The value of BRCA1, DACH1 and S100A4 in predictingn the progression and prognosis of endometrial cancer <i>PAN Yue, ZHENG Zhenrong, ZHANG Kaihong, LIU Xueqin, WANG Min</i>	(1188)

REVIEWS

Common detection techniques and application progress of DNA methylation at specific sites <i>YAO Yanli, HUANG Yuzhe, HAN Zhibin, CAO Chunling, WU Jingbiao</i>	(1192)
Advances in the relevant study of exosomes in tumor metastasis and drugresistance <i>WEI Xinyu, WANG Wenrui, YANG Qingling, CHEN Changjie</i>	(1197)

二维纳米材料在癌症精准治疗应用的进展

丁琳 杨晓菲 梁敏莉 李富荣*

[摘要] 癌症是威胁人类健康的重大疾病之一,传统的治疗方法存在副作用大、复发率高等问题,严重限制癌症的治愈率,因此,发展更为安全高效的癌症治疗方法成为科学研究的重点。2011年由美国国家科学基金会正式提出“精准医疗”这一概念。精准医疗旨在准确识别疾病的病因和治疗靶点,提供更精准的个性化医疗服务,其对治疗试剂的精准靶向、精准诊断、精准治疗提出了更高的要求。二维纳米材料(2D NMs)由于其特殊的结构功能、优异的光学、电学和热学特性在生物成像、药物传递和临床治疗等领域具有广阔的应用前景。本文将综述目前2D NMs在肿瘤精准治疗方面的方法和应用策略,以期加深临床工作者对2D NMs的认识,推动2D NMs在临床肿瘤精准治疗中的合理应用。

[关键词] 二维纳米材料;精准医疗;癌症精准治疗

Application of two-dimensional nanomaterials in cancer precision therapy

DING Lin, YANG Xiaofei, LIANG Minli, LI Furong*

[Translational Medicine Collaborative Innovation Center, the First Affiliated Hospital (Shenzhen People's Hospital), Southern University of Science and Technology, Shenzhen, Guangdong, China, 518055]

[ABSTRACT] Cancer is one of the major diseases threatening human health. The traditional treatment methods have the problems of large side effects and high recurrence rate, which seriously limit the cure rate of cancer. Therefore, the development of more safe and efficient cancer treatment methods has become the focus of scientific research. In 2011, the concept of “precision medicine” was formally proposed by the United States National Research Council. In 2015, US President Barack Obama announced the implementation of the precision medicine plan, which aroused widespread international attention. Precision medicine aims to accurately identify the causes and treatment targets of diseases, and provide more accurate personalized medical services. It puts forward higher requirements for the precise targeting, diagnosis and treatment of therapeutic reagents. Two-dimensional nanomaterials (2D NMs) have broad application prospects in biological imaging, drug delivery and clinical treatment due to their special structure and function, excellent optical, electrical and thermal properties. This article will review the current methods and application strategies of 2D NMs in tumor precision therapy, in order to deepen the understanding of clinical workers on 2D NMs, and promote the rational application of 2D NMs in clinical treatment.

[KEY WORDS] Two-dimensional nanomaterials; Precision medicine; Cancer precise therapy

世界癌症报告(2020年)指出,癌症是全球第二大常见死因^[1],开发安全高效的治疗新方法是科学研究的重点。2011年“精准医疗”概念的正式提出,预示癌症治疗进入新时代^[2]。精准医疗的本质就是通过最先进的技术,准确地找出疾病的发病

机制和治疗靶点,对疾病进行精准分类,达到个性化精准治疗的目的,精准医疗时代对疾病的精准诊断和精准治疗提出了更高的要求。

二维纳米材料(two-dimensional nanomaterials, 2D NMs)是某一维度小于100 nm的超薄纳米材

基金项目:深圳国际科技合作研发项目(GJHZ20190821161420866);深圳市重点实验室组建项目(ZDSYS20190902093203727)

作者单位:南方科技大学第一附属医院(深圳市人民医院),转化医学协同创新中心,广东,深圳 518055

*通信作者:李富荣, E-mail: frli62@163.com

料^[3],其在癌症精准治疗方面具有独特的优势:① 2D NMs 极大的比表面积有效提高载药率和肿瘤精准靶向治疗效率^[4];② 2D NMs 优异的光热转化效率成为精准光疗法的治疗试剂^[5];③ 2D NMs 光学特性可加强生物成像分辨率,提高精准诊断准确性^[6]。2D NMs 在肿瘤预估、给药、临床治疗等方面均优于其他纳米材料,为精准医疗提供强大的平台。

本文主要就 2D NMs 在癌症精准靶向、精准治疗方面的策略展开综述,以期为推动 2D NMs 肿瘤精准治疗在临床治疗中的合理应用提供参考。

1 化学精准疗法

化疗是指利用抗癌药物杀死肿瘤的治疗方法,与手术和放射治疗一起作为癌症的三种主要临床治疗方法。然而,由于化疗药物缺乏选择性,对正常细胞造成严重的损伤^[7]。2D NMs 其超薄层径、各向异性以及超高比表面积的特性具有改善抗癌药物与纳米载体结合的功能,为载药提供了一个强大的平台。其通过增加抗癌药物负载率、精确靶向给药和控制药物释放来提高化疗的疗效。

1.1 化疗药物的高负载及精准靶向输送

DOX 作为一种有效的抗癌药物,通过 π - π 相互作用和疏水部分与 2D NMs 形成强键^[8]。研究证实,DOX 与 2D NMs 结合,降低了 DOX 的非特异性毒性,增加了循环时间,通过 2D NMs 表面修饰提高药物的肿瘤靶向性和积累。如 Zhang 等人^[9]开发了聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG) 修饰的氧化石墨烯 (Graphene oxide, GO) 负载 DOX,在毒性研究中,通过主要脏器病理检查证实 GO-PEG-DOX 的全身毒性低于 DOX。其他一些 2D NMs 与抗癌药物复合系统如六方氮化硼 (Hexagonal boron nitride, h-BN)-卡铂、h-BN-顺铂、GO-PEG-喜树碱、GO-紫杉醇也被证实可有效地降低药物毒副作用。由此可见,2D NMs 通过超大的比表面积,提高了载药量,并通过主动靶向、被动靶向等方式,达到药物精准靶向肿瘤部位的目的,提高药物递送的效率,降低毒副作用。

1.2 化疗药物的精准控制释放

化疗药物递送及释放直接决定了治疗效率,外部物理刺激,如磁场、电场、温度和光照等,可诱

导 2D NMs 药物的精准释放。例如, Ma 等人^[10]开发了氧化铁修饰的 2D NMs 递送 DOX,利用磁场控制药物释放,在体外实验中,将磁铁放置在培养基中心,显示出良好的磁靶向特性,癌细胞得到高效的定点杀伤。电场可激活电响应材料的药物释放系统, Zhu 等人^[11]开发了一种导电电极修饰的石墨烯,以负载抗癌药物,导电复合电极通过施加电压实现药物的控制释放。此外,温度可作为热敏物质的刺激源。聚异丙基丙烯酰胺 (PNIPAM) 是最常用的热敏材料之一。Pan 等人^[12]合成了一种接枝 PNIPAM 的石墨烯片,用于加载化疗药。该化合物在 37℃ 的水和 PBS 中均表现出较高的药物释放率,并且对癌细胞具有很高的杀伤性。

2 物理精准疗法

2.1 放射疗法

放射疗法是临床癌症治疗中最常用和最有效的策略之一。放射治疗从体外发射高能电离辐射 (如 x 射线、质子或电子束) 破坏 DNA 诱导靶部位的细胞死亡^[13]。然而,放射疗法需要高剂量的辐射才能有效清除癌细胞,不可避免的对附近正常组织造成损伤;此外,某些类型的癌症对放射疗法具有高度耐受性,肿瘤内的缺氧环境会降低放疗的疗效。2D NMs 用于放射治疗,一方面,可用作放射增敏剂,提高放射治疗的疗效,减轻副作用;另一方面,可以通过改善肿瘤部位的缺氧状况来降低放疗耐受性。

肿瘤微环境富含抗氧化剂、过氧化氢等,被认为是放疗的巨大障碍。Zhou 等人^[14]首次报道了 2D NMs BiP₅W₃₀ 利用肿瘤微环境增强放疗效果的可能性。结果表明,在 x 射线辐射下, BiP₅W₃₀ 可以耗尽谷胱甘肽,并催化 H₂O₂ 转化为 HO[•],以加强活性氧自由基 (Reactive oxygen species, ROS) 的产生,增强了对肿瘤的杀伤力。Yang 等^[15]报道了一种 2D Pd@Au 双金属核壳纳米结构,通过催化内源性 H₂O₂ 连续稳定地生成 O₂。近红外激光 (Near Infrared, NIR) 辐照激活了金属表面等离子体共振效应,增强了 Pd@Au 纳米结构的催化活性,从而提高了 O₂ 的生成及缓解了肿瘤的缺氧。氧气的持续产生缓解了肿瘤部位的缺氧状况,提高放射治疗的疗效。

2.2 光疗法

近年来,光疗法逐渐发展成为肿瘤精准治疗

的新兴手段。光疗主要包括光热治疗(photothermal therapy, PTT)和光动力治疗(photodynamics therapy, PDT)。PTT的治疗作用仅发生在NIR激光照射和PTT药物积累的病变部位,具有选择性强、操作简单、侵袭性小、低/无全身毒性的独特优势。2D NMs在NIR照射下表现出等离子体效应,有利于光能转化为热能,被认为是理想的PTT材料。Yang等人^[16]首次发表了碳纳米材料(包括碳纳米管、C60、石墨烯等)在体内实现癌症PTT的研究。其制备了PEG-石墨烯,结果显示在4T1、KB和U87MG荷瘤小鼠中,PEG-石墨烯通过高渗透滞留效应聚集在肿瘤部位,随后使用适当功率的808 nm激光器照射肿瘤部位5 min,治疗后肿瘤完全消融。近些年,黑磷(Black phosphorus, BP)展现出优异的PTT治疗潜力,Wang等人^[17]证明BP的量子产率可达0.91,在低剂量、低光强下,BP对肿瘤生长也有明显抑制作用,此外,BP易于降解为生物相容性磷,对人体更安全。

PDT是一种利用光敏剂在光照下通过产生ROS介导癌细胞死亡的方法,与化疗和放疗相比,PDT的副作用更少,靶向性更好,PDT已成为临床应用日益广泛的治疗方法。肿瘤局部缺氧、¹O₂寿命短、作用面积有限是PDT的不利障碍,导致疗效大大降低。因此,一些研究者通过改善肿瘤缺氧状况来提高PDT的疗效。Fan等^[18]报道了一种携带pH响应发光成像纳米探针的MnO₂纳米片,MnO₂纳米片在肿瘤酸性条件下还原为Mn²⁺,释放出大量的O₂,同时,纳米探针为肿瘤的精确定位提供了高分辨率发光成像引导,取得了良好的精准治疗效果。

2.3 声动力疗法

声动力疗法(Sonodynamic therapy, SDT)是由PDT发展而来的,SDT利用声源刺激和声敏化剂产生ROS并杀死肿瘤。由于激光对一些深层组织的穿透能力差会影响PDT的疗效。作为光的替代品,超声波不仅对人体安全,更重要的是,它对组织的穿透更深,可达10 cm。Dai等^[19]报道将二维超薄石墨烯与TiO₂纳米增敏剂集成制备出MnOx/TiO₂-GR-PVP,以提高半导体TiO₂纳米增敏剂的声催化效率。石墨烯优异的电导率促进了TiO₂中电子(e⁻)和空穴对(h⁺)的隔离,避免了体外超声照射后它们的重新融合。因此,SDT的作用增强了。结果显示,双重疗效消融了肿瘤。

3 基因精准治疗

基因治疗是指将外源正确基因导入靶细胞,治疗因基因缺陷和异常引起的疾病,从而达到分子水平上的精准治疗目的。2D NMs由于其低毒性、高负载量和良好的生物相容性,被认为是优良的基因治疗载体。最近,Liu等人^[20]制备出一种多功能超薄2D配位聚合物纳米片(Coordination polymer, CPs),CPs纳米片既可以作为基因治疗的有效DNAzyme纳米载体,也可以作为耐缺氧I型PDT的固有光敏剂,负载DNAzyme的CP纳米片对早期生长反应因子表现出极好的肿瘤细胞靶向基因沉默,信使RNA在人类乳腺癌细胞中被抑制了84%,而在正常人类乳腺上皮细胞中仅被抑制了6%,经荷瘤小鼠尾静脉注射后,在光照射下,负载二氢卟吩E6修饰DNAzyme的CP纳米片具有较高的抗肿瘤疗效(肿瘤消退88.0%),显示了一个具有高效选择性基因沉默和肿瘤PDT的治疗平台。

4 免疫精准疗法

免疫治疗是利用患者固有免疫系统识别、攻击和破坏肿瘤细胞的一种革命性的癌症临床治疗新方法,在预防肿瘤转移和复发方面具有很好的临床疗效。现有的免疫疗法包括检查点阻断免疫疗法、过继细胞疗法和癌症疫苗等。近年来,2D NMs在癌症免疫治疗中的应用也成为了研究热门。Loftus等人^[21]使用纳米级GO激活自然杀伤细胞(Natural killer, NK),通过刺激CD16 NK细胞受体成功地诱导了NK细胞的激活,激活效果优于单独抗体的激活效率。He等人^[22]利用红细胞膜修饰2D MoSe₂纳米片(RBC-MoSe₂)成功激活肿瘤相关抗原的生成,触发细胞毒性T淋巴细胞,沉默PD-1/PDL1通路,避免免疫逃逸。并且RBC-MoSe₂纳米片具有良好的生物相容性和较高的光热转化能力,激光照射下,小鼠肿瘤温度达到53.5℃,影像学显示PTT治疗后21天RBC-MoSe₂组肿瘤体积最小,成像数据提示RBC-MoSe₂组肿瘤细胞死亡。

5 小结与展望

2D NMs的优异特性使其在癌症精准治疗方面具有巨大的潜力。目前基于2D NMs开发的癌症精准治疗策略均在动物实验水平被证实可有效

地提高肿瘤治疗效率,例如实现肿瘤的精准靶向和药物的控释,降低化疗副作用;改善肿瘤微环境,减少电离辐射提高放射治疗效果;光疗、声疗等新疗法实现局部精准治疗,降低对正常组织的伤害;基因治疗在分子水平上实现精准治疗等。多种治疗方案联合疗法被证实为更高效的治疗策略,基于2D NMs的多功能纳米治疗平台已成为未来的发展趋势。但是,2D NMs的生物安全性及代谢生物学还缺乏深入研究,因此在未来的研究中需加强2D NMs长期生物毒性及体内代谢数据的观察及研究。加速2D NMs的临床应用,还需进一步大量广泛的临床试验,对其进行不断的验证与改进。2D NMs具有融合生物成像检测、药物递送系统及直接治疗试剂为一体的潜力,为癌症精准医疗提供强大的工具,加速2D NMs的开发和研究为癌症患者带来新的曙光。

参考文献

- [1] Wild CP, Weiderpass E, Stewart BW. World Cancer Report 2020[J]. IARC, 2021.
- [2] National Research Council (US) Committee on A Framework for Developing a New Taxonomy of Disease. Toward Precision Medicine: Building a Knowledge Network for Biomedical Research and a New Taxonomy of Disease. Washington (DC): National Academies Press (US)[M]. 2011.
- [3] Donaldson L. New material offers potential for designing 2D nanomaterials[J]. Materialstoday, 2021, 46: 3.
- [4] Qiu M, Singh A, Wang D, et al. Biocompatible and biodegradable inorganic nanostructures for nanomedicine: Silicon and black phosphorus[J]. Nano Today, 2019, 25: 135-155.
- [5] Liu M, Zhu H, Wang Y, et al. Functionalized MoS₂-based nanomaterials for cancer phototherapy and other biomedical applications[J]. ACS Mater Lett, 2021, 3(5): 462-496.
- [6] Song YF, Shi XJ, Wu CF, et al. Recent progress of study on optical solitons in fiber lasers[J]. Appl Phys Rev, 2019, 6(2): 021313.
- [7] 安晓飞,李智慧,韩凤娟. 乳腺癌化疗患者 Q-T 间期离散度的变化及意义[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2021, 13(5): 740-743.
- [8] Cheng L, Wang X, Gong F, et al. 2D nanomaterials for cancer theranostic applications[J]. Adv Mater, 2020, 32(13): 1902333.
- [9] hang W, Guo ZY, Huang DQ, et al. Synergistic effect of chemo-photothermal therapy using PEGylated graphene oxide [J]. Biomaterials, 2011, 32(33): 8555-8561.
- [10] Ma XX, Tao HQ, Yang K, et al. A functionalized graphene oxide - iron oxide nanocomposite for magnetically targeted drug delivery, photothermal therapy, and magnetic resonance imaging[J]. Nano Res, 2012, 5(3): 199-212.
- [11] Zhu M, Hao Y, Ma X, et al. Construction of a graphene/poly-pyrrole composite electrode as an electrochemically controlled release system[J]. RSC Adv, 2019, 9(22): 12667-12674.
- [12] Pan YZ, Bao HQ, Sahoo NG, et al. Water-soluble poly(N-isopropylacrylamide) - graphene sheets synthesized via click chemistry for drug delivery[J]. Adv Funct Mater, 2011, 21(14): 2754-2763.
- [13] Bosch L, Schaaf A, Laan H, et al. Comprehensive toxicity risk profiling in radiation therapy for head and neck cancer: a new concept for individually optimised treatment[J]. Radiother Oncol, 2021, 157: 147-154.
- [14] Zhou RY, Wang HM, Yang YF, et al. Tumor microenvironment-manipulated radiocatalytic sensitizer based on bismuth heteropolytungstate for radiotherapy enhancement[J]. Biomaterials, 2019, 189: 11-22.
- [15] Yan Y, Chen M, Wang BZ, et al. NIR-II driven plasmon-enhanced catalysis for a timely supply of oxygen to overcome hypoxia-induced radiotherapy tolerance[J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2019, 58(42): 15069-15075.
- [16] Yang K, Zhang SA, Zhang GX, et al. Graphene in mice: ultrahigh in vivo tumor uptake and efficient photothermal therapy[J]. Nano Lett, 2010, 10(9): 3318-3323.
- [17] Wang H, Yang XZ, Shao W, et al. Ultrathin black phosphorus nanosheets for efficient singlet oxygen generation[J]. J Am Chem Soc, 2015, 137(35): 11376-11382.
- [18] Fan WP, Bu WB, Shen B, et al. Intelligent MnO₂ nanosheets anchored with upconversion nanoprobe for concurrent pH-/H₂O₂-responsive UCL imaging and oxygen-elevated synergetic therapy[J]. Adv Mater, 2015, 27(28): 4155-4161.
- [19] Dai C, Zhang SJ, Liu Z, et al. Two-dimensional graphene augments nanosonosensitized sonocatalytic tumor eradication[J]. ACS Nano, 2017, 11(9): 9467-9480.
- [20] Liu SY, Xu YZ, Y HH, et al. Ultrathin 2D copper(I) 1,2,4 triazolate coordination polymer nanosheets for efficient and selective gene silencing and photodynamic therapy[J]. Adv Mater, 2021, 33(18): 2100849.
- [21] Loftus C, Saeed M, Davis DM, et al. Activation of human natural killer cells by graphene oxide - templated antibody nanoclusters[J]. Nano Lett, 2018, 18(5): 3282-3289.
- [22] He LZ, Nie TQ, Xia XJ, et al. Designing bioinspired 2D MoSe₂ nanosheet for efficient photothermal triggered cancer immunotherapy with reprogramming tumor-associated macrophages[J]. Adv Funct Mater, 2019, 29(30): 1901240.

高通量基因测序仪行业标准的验证

孙楠¹ 曲守方¹ 陈样宜² 高飞¹ 张文新¹ 于婷^{1*} 黄杰^{1*}

[摘要] **目的** 按照制定的高通量基因测序仪行业标准的性能指标,使用测序通量<20 Gb/run且 ≥ 2 Gb/run高通量基因测序仪进行验证。**方法** 取测序仪性能评价用脱氧核糖核酸国家参考品的DNA,经过DNA片段化处理、末端修复、接头连接和文库扩增等步骤后构建文库;然后将文库PCR扩增;最后使用测序反应通用试剂盒(半导体法)和BES4000基因测序仪进行测序。**结果** 测序覆盖率为99.99%,测序平均深度为166 \times 。国家参考品中人基因组DNA样本的比对率为86.14%,碱基测序准确率为98.97%;SNP、Indel准确率为95.40%;SNP、Indel灵敏度为85.75%。人基因组DNA、人乳头瘤病毒11型基因组DNA、大肠杆菌基因组DNA和高GC含量细菌基因组DNA样本的一致序列准确率分别为99.94%、100%、99.95%和99.88%。国家参考品进行三次重复测序,重复性结果均符合要求。**结论** 制定的行业标准可以用于高通量基因测序仪的性能评价,为产品注册检定及上市后监督管理提供依据。

[关键词] 高通量基因测序仪;行业标准;单核苷酸多态性;插入;缺失

Verification of industry standards for high-throughput gene sequencers

SUN Nan, QU Shoufang, CHEN Yangyi, GAO Fei, ZHANG Wenxin, YU Ting*, HUANG Jie*

(1. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing, China, 100050; 2. CapitalBio Genomics Co., Ltd., Dongguan, Guangdong China, 523808)

[ABSTRACT] **Objective** According to the established performance indicators of the industry standard for high-throughput gene sequencers, a high-throughput gene sequencer with a sequencing throughput of <20 Gb/run and ≥ 2 Gb/run is used for verification. **Methods** The DNA reference sequence control materials were used for sequencing performance evaluation. The library was constructed after DNA fragment treatment, terminal repair, adapter ligation and library amplification. Then the library is amplified by PCR. Finally, the sequencing was performed by using the Universal Sequencing Reaction Kit (semiconductor method) and BES4000 gene sequencer. **Results** The sequencing coverage rate was 99.99%, and the average depth of sequencing was 166 \times . For human DNA sample of national reference material, the mapped rate was 86.14% and the sequencing base accuracy was 98.97%. The accuracy of SNP and Indel was 95.40%. The sensitivity of SNP and Indel was 85.75%. Consensus sequence accuracy was 99.94% (human), 100% (Hpv11), 99.95% (E. coli) and 99.88% (Olsenella), respectively. The national reference materials were sequenced three times, and the reproducible results all met were the requirements. **Conclusion** The established industry standards can be used for the performance evaluation of high-throughput gene sequencers, and to provide a basis for product registration verification and post-marketing supervision and management.

[KEY WORDS] High-throughput gene sequencer; Industry standard; Single nucleotide polymorphisms; Insertion; Deletion

基金项目:国家重点专项(2017YFC0906500)

作者单位:1. 中国食品药品检定研究院,北京 100050

2. 东莞博奥木华基因科技有限公司,广东,东莞 523808

*通信作者:于婷, E-mail: yuting@nifdc.org.cn; 黄杰, E-mail: jhuang5522@126.com

随着检测技术发展,高通量测序技术已经在临床被广泛应用于遗传和肿瘤检测领域,如无创产前基因检测(NIPT)、胚胎植入前遗传学筛查与诊断(PGS/PGD)、遗传病筛查与诊断、肿瘤诊断与治疗等^[1-4]。目前商业上常用的二代测序平台根据测序原理可分为光学技术(Illumina公司和华大基因公司为代表)和半导体技术(Thermo公司为代表)^[5-6]。每个测序平台都有各自的特异性参数,包括仪器大小、通量、读长、运行时间及测序成本等,应结合具体的临床应用需求选择合适的测序平台进行评估^[7]。不同测序平台之间存在显著的系统性差异,对测序平台性能进行综合评估能够有效规范临床应用平台的使用和应用开发。为实现对第二代测序仪器性能评估,中国食品药品检定研究院研制了测序仪性能评价用脱氧核糖核酸国家参考品,也制定了高通量基因测序仪行业标准。本研究按照制定的高通量基因测序仪行业标准的性能指标的要求,使用测序通量 <20 Gb/run且 ≥ 2 Gb/run高通量基因测序仪进行验证,评价该标准的可行性。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

测序仪性能评价用脱氧核糖核酸国家参考品,包括四种基因组DNA样本,分别是人基因组DNA样本(Human_1~3)、大肠杆菌基因组DNA样本(Ecoli_1~3)、高GC含量细菌基因组DNA样本(Olsenella_1~3)、人乳头瘤病毒11型基因组DNA样本(HPV11_1~3),中国食品药品检定研究院(简称中检院)提供。

文库构建试剂盒、测序反应通用试剂盒(半导体法)和BioelectronSeq 4000基因测序仪,东莞博奥木华基因科技有限公司提供。

1.2 文库构建

采用文库构建试剂盒(半导体测序法)对样本进行文库制备。先将国家参考品DNA酶切,接头连接,进行目标DNA片段的PCR扩增,获得待测序分析的文库。使用荧光定量PCR仪测定各个文库的浓度,按照等物质的量混合文库。

1.3 测序

采用测序反应通用试剂盒(半导体法)(S10010)并按照试剂盒说明书进行操作。将一定量的混合文库,加到测序芯片上,用Bioelectron-

Seq 4000基因测序仪,将带有测序接头的DNA文库加入乳液扩增反应体系,使每个DNA模板在独立的微扩增环境中扩增放大,然后将其作为测序模板载入测序芯片。将四种脱氧核苷酸分别标记不同的荧光基团,每一个循环添加一种核苷酸,该核苷酸如果被合成到DNA中会释放氢离子,引起溶液pH值变化从而得到核苷酸序列信息。

1.4 数据分析

测序完成后通过生物信息软件,对获得的fastq数据进行过滤,使用BWA软件,将每个read与参考序列进行比对,使用软件GATK Haplotype Caller对比对结果进行变异分析。

2 结果

2.1 测序覆盖率和测序平均深度

对于“测序覆盖率和测序平均深度”,标准要求制造商应规定检测国家参考品或标准品的测序覆盖率和测序平均深度。制造商规定的要求为:测序覆盖率要求 $>95\%$,测序平均深度应 $>100\times$ 。结果表明,测序覆盖率为99.99%,测序平均深度为166 \times ,符合制造商的规定。

2.2 测序准确率

对于“测序准确率”,标准规定在制造商规定的测序覆盖率和测序平均深度下,符合以下要求:①检测人基因组DNA参考品或标准品中指定的全外显子区域,比对率应符合制造商的要求,与指定全外显子区域单核苷酸多态性(Single nucleotide polymorphisms, SNP)和插入缺失(Insertion-deletion, Indel)参考数据集比较,SNP、Indel的准确率和灵敏度应符合制造商的要求;②检测人基因组DNA参考品或标准品中指定的全外显子区域,比对率应符合制造商的要求,与人基因组DNA参考序列中指定的全外显子区域比对,测序一致序列准确率应不低于99.0%;③检测细菌和病毒DNA参考品,与对应参考序列比对,测序一致序列准确率应不低于99.0%。结果表明,对国家参考品中人基因组DNA样本(Human)的比对率为86.14%,碱基测序准确率为98.97%;SNP、Indel准确率为95.40%;SNP、Indel灵敏度为85.75%,均符合制造商的要求:比对率应 $>80\%$,碱基测序准确率应 $>95\%$,SNP、Indel准确率应 $>90\%$,灵敏度应 $>80\%$ 。对国家参考品中人基因组DNA样本的一致序列准确率为99.94%,符合制造商的一致序列准确率 $>99.0\%$ 要求。对国家参考

品中人乳头瘤病毒 11 型基因组 DNA 样本 (HPV11)、大肠杆菌基因组 DNA 样本 (E.coli)、高 GC 含量细菌基因组 DNA 样本 (Olsenella), HPV11 的测序一致序列准确率为 100%; E.coli 的准确率为 99.95%; Olsenella 的准确率为 99.88%, 均符合制造商的一致序列准确率 >99.0% 要求。

将下机数据分别与参考基因组进行比对, 统计比对率和错配率, 进而计算出碱基准确率 (1-错配率), 将人基因组样本的数据与人类参考基因组 hs37d5 使用 BWA 比对, 然后使用 GATK Haplotype Caller 对比对结果进行变异分析获得检测的变异数据集, 最后分析该数据集在 27 Mb 外显子区域的结果与高置信变异集的比对一致性情况, 将大肠杆菌 E.coli, 高 GC 菌 Olsenella 和 HPV-11 下机数据与各自基因组的一致性序列比对。见图 1。

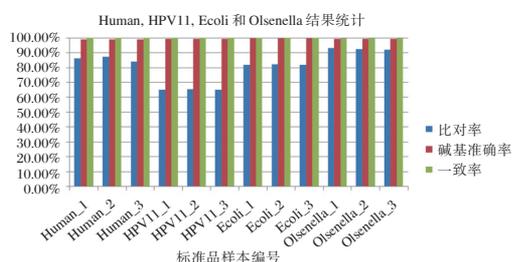


图 1 国家参考品比对结果

Figure 1 Mapped results of national reference materials

人基因组样本数据与人类参考基因组 hs37d5 进行比对和变异检测, 与高置信变异标准集进行比较, 变异评估结果见表 1 和图 2。

2.3 重复性

对于“重复性”, 取国家参考品进行三次重复测序, 每次结果均符合“测序覆盖率和测序平均深度”和“测序准确率”要求, 结果见图 1、表 1。

3 讨论

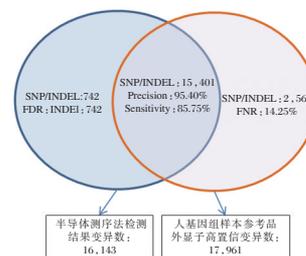
传统的化学降解法、双脱氧链终止法以及在其们的基础上发展来的测序技术统称为第一代测序。它在分子生物学研究中发挥了重要的作用, 如人类基因组计划。第二代测序主要包括罗氏 454 公司的 454 测序技术、Illumina 公司的 Solexa 测序技术和 Life Technologies 公司的 Ion Torrent 测序技术^[8-10]。与传统测序技术相比, 二代测序技术的核心思想是边合成边测序, 具有高通量、低成本等优点。

许多公司进行了高通量测序仪的开发和应用。但是目前尚无统一的标准对高通量测序仪的

表 1 外显子 27M 区域人基因组样本的变异评估结果

Table 1 Variation assessment results of human genome samples from exon 27M region

项目		人基因组 DNA 样本 (Human)	人基因组 DNA 样本 (Human)	人基因组 DNA 样本 (Human)
		重复 1	重复 2	重复 3
SNP	真阳性	15212	15292	15218
	假阳性	368	336	387
	假阴性	2354	2274	2348
	准确率 (%)	97.64	97.85	97.52
	灵敏度 (%)	86.60	87.05	86.63
Indel	真阳性	189	236	265
	假阳性	374	389	390
	假阴性	206	159	130
	准确率 (%)	33.57	37.76	40.46
	灵敏度 (%)	47.85	59.75	67.09
SNP、Indel	总准确率 (%)	95.40	95.54	95.22
	总灵敏度 (%)	85.75	86.45	86.20



注: 准确率 = 真阳性 / (真阳性 + 假阳性) * 100%, 灵敏度 = 真阳性 / (真阳性 + 假阴性) * 100%

图 2 外显子 27M 区域人基因组样本的变异评估结果

Figure 2 Variation assessment results of human genome samples from exon 27M region

性能及使用进行规范, 对其临床上的风险不易把控, 所以亟需研制相应的行业标准对其性能进行评估。行业标准的制定将有助于提高并统一产品的标准^[11-12]。中国食品药品检定研究院制定了高通量基因测序仪行业标准。经过对各测序指标的筛选、比较与分析, 最后确定了符合高通量基因测序仪的评价指标, 包含测序读长和通量、碱基识别质量百分比、测序覆盖率和测序平均深度、测序准确率、重复性、软件功能、安全要求、环境试验要求和电磁兼容性要求等。鉴于不同测序平台因为其测序原理和技术手段不同, 具有不同的测序平均读长。测序平均读长过短会影响后续拼接、组装和比对等, 从而影响测序效果。因此需要对测序读长这一指标加以规范。测序通量也是代表性的指标之一, 因为高通量测序区别于一代 Sanger 测序的明显差别之一就在于其测序通量。而测序准确率这一指标, 可以最直观的表现每次测序结果的精确程度, 其对

高通量基因测序结果评价具有重要意义。

二代基因测序技术检出数据量非常庞大,要借助生物信息学分析,对检测结果进行初步分析。研究表明在进行 Indel 分析时,由于 Indel 存在导致 Indel 周边碱基的测序质量会有所降低,从而对 Indel 的检出以及可靠性评估都会造成较大影响^[13]。在测序一致序列准确率均不低于 99.0%的情况下,在 SNP、Indel 的准确率和灵敏度存在较大的差别,主要是平台本身的技术原理和技术性能决定的。本研究的一致序列准确率是计算平台在所有覆盖区域上的主要碱基与参考序列一致的占比,次要碱基不列入统计,次要碱基可能为测序错误,也可能为真实存在的变异。本研究的平台采用 GATK Haplotype Caller 软件获得 SNP 和 Indel,该软件对某位置上存在两种以上的碱基时,会用隐马尔科夫模型在给定的 read 数据下,计算各单倍型的进行最大似然值,给出可信变异的列表。因此在平均深度为 100×的测序中,测序有效覆盖区域的一致序列准确率可以达到 99.0%甚至 99.9%的水平。半导体测序法的特点是快速实时读取碱基,碱基准确率相比基于荧光信号识别碱基的高通量测序平台稍差,特别是连续相同碱基(homopolymer)的区域测序获得的错配碱基部分为可重复的情况,在未进行系统性校正的情况下容易超过软件统计模型设定的阈值,从而导致准确性和灵敏度下降。Ion Proton 平台一般采用扩增子法进行文库构建。SNP 仅是单个碱基的变化,因此对于 PCR 扩增的影响极小,但 Indel 一般是多个碱基的插入或者缺失,若发生 Indel 的位置与 PCR 引物的位置有交叉时,则极有可能导致扩增失败,Indel 的扩增失败率要远远高于 SNP,导致其准确性和灵敏度远远低于 SNP。比对基因组主要是观察测序序列与参考序列的相似程度,扩增子长度在 200 bp 左右,SNP 的单个碱基变化导致测序序列与参考序列的差别是非常小的。但是 Indel 的十几个碱基的插入与缺失,使测序序列与参考序列的差别大幅增加,增加了基因组比对的困难,导致 Indel 的 reads 被丢弃。因此在生信分析比对基因组过程中也会导致 Indel 的准确性和灵敏度远远低于 SNP。实际临床应用中,可采用基于半导体测序平台测序偏好的相关分析方法如 TMAP 和 TVC 配套软件,准确性可提高至 97%;或者开发基于特定基因位点变异模式的贝叶斯分析方法,降低测序

错误的影响,提高检测性能。国家参考品中增加了 SNP、Indel 的准确率和灵敏度的要求,但并未对平台进行统一规定,要求制造商给出各自平台的具体要求。这一评价方式和国际上评价测序仪的方式一致。

本研究采用 BioelectronSeq 4000 基因测序仪按照高通量基因测序仪行业标准对国家参考品进行检验,测序通量 <20 Gb/run 且 ≥2 Gb/run。验证结果显示符合行业标准的测序覆盖率和测序平均深度、测序准确率和重复性的要求,表明该行业标准具有很好的适用性,可以用于高通量测序仪的性能评价和上市后的监督管理工作。

参考文献

- [1] Xue Y, Zhao G, Qiao L, et al. Sequencing Shorter cfDNA Fragments Decreases the False Negative Rate of Non-invasive Prenatal Testing[J]. *Front Genet*, 2020, 11:280.
- [2] 张宁媛,黄国宁,范立青,等. 胚胎植入前遗传学诊断与筛查实验室技术指南[J]. *生殖医学杂志*, 2018, (9):819-827.
- [3] 孙云,蒋涛,马定远,等. 新一代半导体测序技术检测甲基丙二酸血症 MMAA 基因突变[J]. *中华医学遗传学杂志*, 2015, 32(1):56-59.
- [4] Jennings LJ, Arcila ME, Corless C, et al. Guidelines for Validation of Next-Generation Sequencing-Based Oncology Panels: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology and College of American Pathologists [J]. *J Mol Diagn*, 2017, 19(3):341-365.
- [5] Reuter JA, Spacek DV, Snyder MP. High-throughput sequencing technologies[J]. *Mol Cell*, 2015, 58(4):586-597.
- [6] Alekseyev YO, Fazeli R, Yang S, et al. A Next-Generation Sequencing Primer-How Does It Work and What Can It Do? [J]. *Acad Pathol*, 2018, 5:2374289518766521.
- [7] 郑磊,熊铁,王前. 新一代高通量测序技术——检验医学发展的挑战与机遇[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2011, 3(6):361-367.
- [8] 陈伟,程咏梅,张绍武,等. 二代测序技术 454 测序仪模拟测序算法[J]. *计算机科学*, 2014, 41(2):261-263+284.
- [9] Zhong Y, Xu F, Wu J, et al. Application of Next Generation Sequencing in Laboratory Medicine [J]. *Ann Lab Med*, 2021, 41(1):25-43.
- [10] Gupta N, Verma VK. Next-Generation Sequencing and Its Application: Empowering in Public Health Beyond Reality [J]. *Microbial Technol Welf Soc*, 2019, 17:313-341.
- [11] 张文新,于婷,孙楠,等. 胎儿染色体非整倍体 21 三体、18 三体和 13 三体检测试剂盒(高通量测序法)行业标准的制定[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2020, 12(8):991-994+1000.
- [12] 曲守方,于婷,孙楠,等. 甲状腺激素测定试剂盒行业标准的验证[J]. *中国医药导报*, 2019, 16(3):105-108.
- [13] 刘菲菲,孙明明,胡昌明,等. 三种人全外显子组捕获探针的性能比较[J]. *中华临床实验室管理电子杂志*, 2020, 8(1):18-25.

2019年深圳市HIV确证非阳性样本核酸检测结果分析

李浩 钟一帆 石向东 杨峥嵘 赵锦*

[摘要] 目的 对深圳市2019年HIV确证试验结果为非阳性的样本进行核酸检测并分析结果,为艾滋病确诊及防控提供数据支持。**方法** 采集深圳市2019年HIV筛查试验有反应性而确证试验结果为不确定或阴性的样本,进行HIV-1核酸检测。**结果** 确证试验结果为不确定的样本277例,检出核酸阳性67例,行政区域、性别、样本来源的核酸阳性率比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。确证试验结果为阴性的样本624例,检出核酸阳性13例,性别的核酸阳性率比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。确证试验结果为阴性的样本中,不同筛查方法的核酸阳性率比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。确证试验结果为不确定和阴性样本的核酸检测结果比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。核酸阳性和未检出样本的CD4⁺T淋巴细胞计数比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。单条带型总体核酸阳性率较低(3.8%),多条带型中同时包含gp160和gp120(75.0%)或gp160和p24(72.5%)的核酸阳性率较高。**结论** 对于筛查试验结果阳性而确证试验结果为非阳性的样本,核酸检测可以有效提高HIV的检出效率。

[关键词] 人类免疫缺陷病毒; 核酸检测; 确证试验; 筛查试验; 免疫印迹试验带型

Analysis of nucleic acid test results of non-positive HIV confirmed samples in Shenzhen in 2019

LI Hao, ZHONG Yifan, SHI Xiangdong, YANG Zhengrong, ZHAO Jin*

(Institute of AIDS Prevention Control, Shenzhen Municipal Center for Disease Control and Prevention, Shenzhen, Guangdong, China, 518055)

[ABSTRACT] **Objective** To test HIV viral load for samples with non-reactive western blot (WB) results in Shenzhen in 2019, and provide data support for diagnosis and control of HIV. **Methods** Samples were collected from Shenzhen in 2019. Those samples were responsive in the HIV screening test and confirmed that the test results are indeterminate or negative for WB results. The viral loads were tested by HIV-1 nucleic acid testing in Shenzhen in 2019. **Results** There were 67 RNA positive samples out of 277 samples with uncertain WB results, and the differences were statistically significant in the RNA positive rate for administrative region, gender and source ($P<0.05$). The confirmation test results were negative in 624 samples, and 13 nucleic acid-positive cases were detected. There was a statistically significant difference in the nucleic acid-positive rate of gender ($P<0.05$). Among the samples with negative confirmation test results, the difference in the positive rate of nucleic acid of different screening methods was statistically significant ($P<0.05$). The confirmation test results were compared with the nucleic acid test results of the uncertain and negative samples, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). There was a statistically significant difference in the counts of CD4⁺T lymphocytes between nucleic acid-positive and undetected samples ($P<0.05$). The overall nucleic acid positive rate of single-band type is low (3.8%), and the positive rate of nucleic acid that contains both gp160 and gp120 (75.0%) or gp160 and p24 (72.5%) in multiple-band type is higher. **Conclusion** For samples that have a positive screening test result but confirm that the test result is non-positive, nucleic acid testing can effectively improve the detection efficiency of HIV.

[KEY WORDS] HIV; Viral load test; Confirmatory test; Screening test; Band pattern of western blot

基金项目:广东省基础与应用基础研究基金(2019B1515120003);广东省医学科学技术研究基金项目(A2019474);

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艾滋病预防控制所,广东,深圳 518055

*通信作者:赵锦, E-mail: zhaoj@szcdc.net

联合国艾滋病规划署确定全球终结艾滋病流行的三个90%防治策略包括诊断90%、治疗90%和有效90%^[1]。深圳市后两个90%已经超额完成任务,但是距离90%的人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)感染者被发现尚有很大差距^[2],因此进一步扩大HIV检测是当前艾滋病防治工作中的重要一项。目前,抗体检测仍是HIV诊断的常规手段,国内主要采用免疫印迹试验(western blot, WB)进行确证^[3-4]。早期诊断和发现HIV感染对预防艾滋病的传播和控制至关重要,而HIV核酸检测相比抗体检测能有效缩短窗口期^[5-6]。因为深圳市男男性行为者(men who have sex with men, MSM)传播途径超过50%,本研究拟对2019年深圳市HIV确证试验结果为不确定以及阴性样本的核酸检测结果进行分析。

1 对象与方法

1.1 对象

选取2019年深圳市全市范围内HIV筛查试验有反应性,抗体确证试验(WB)结果为不确定或阴性的样本。筛查样本来自包括自愿咨询检测(Voluntary Counseling & Testing, VCT)、医疗机构、血液中心和监管场所等144家筛查实验室,确证样本来自市或区疾控中心等13家确证实验室。实验经过伦理委员会同意通过,伦理审查批件:深疾伦字[2018]第025A号。

1.2 方法

抗体筛查试验、抗体确证试验、HIV-1核酸检测和CD4+T淋巴细胞检测流程按《全国艾滋病检测技术规范》(2015年修订版)要求进行^[6]。筛查试验包括单独抗体检测试剂和抗原抗体联合检测试剂。对确证试验结果为阴性或不确定的样本进行HIV-1 RNA定量检测。使用HIV-1核酸测定试剂盒(PCR-荧光探针法)(DA-Z195,广州达安基因股份有限公司),仪器为Smart32型核酸提取仪(达安/中国)和ABI7500实时荧光定量PCR仪(ABI/美国),最低检测限为100 IU/mL,所有试验操作均严格按照试剂盒和仪器说明书进行。

1.3 统计分析

应用SPSS 22.0进行数据整理和分析;对各组结果进行正态性检验和方差齐性检验,符合正态分布并且方差齐的数据以($\bar{x} \pm s$)表示,不符合正态分布或者方差不齐的数据以中位数(四分位间距)

[M(P25, P75)]表示,计量资料比较采用独立样本t检验(正态分布)或Mann-Whitney U检验(非正态分布);计数资料以n(%)表示,计数资料采用 χ^2 检验或Fisher精确检验(有理论数T<1);P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 样本特征

深圳市2019年HIV筛查试验有反应性而确证试验结果为不确定的样本共277例。其中男性162例,女性115例,男女比例1.4:1。年龄范围0~83岁,中位数[31(26, 42)]岁。其中20~29岁占比最高。按行政区划分,来自龙岗区、福田区和宝安区居多。样本来源医院占七成以上,其次为VCT。见表1。

表1 确证试验结果为不确定样本核酸阳性率[n(%)]

特征	检测例数	阳性例数	阳性率(%)	χ^2 值	P值
行政区	市级	12(4.3)	5(7.5)	41.7	23.842 0.002*
	罗湖	20(7.2)	1(1.5)	5.0	
	福田	48(17.3)	10(14.9)	20.8	
	南山	16(5.8)	8(11.9)	50.0	
	宝安	46(16.6)	12(17.9)	26.1	
	龙华	32(11.6)	3(4.5)	9.4	
	龙岗	65(23.5)	22(32.8)	33.8	
	大鹏	1(0.4)	0(0.0)	0.0	
	坪山	4(1.4)	2(3.0)	50.0	
	光明	33(11.9)	4(6.0)	12.1	
年龄(岁)	<20	19(6.9)	2(3.0)	10.5	6.072 0.200
	20~29	104(37.5)	32(47.8)	30.8	
	30~39	77(27.8)	18(26.9)	23.4	
	40~49	39(14.1)	6(9.0)	15.4	
	≥50	38(13.7)	9(13.4)	23.7	
性别	男	162(58.5)	63(94.0)	38.9	45.990 <0.001
	女	115(41.5)	4(6.0)	3.5	
来源机构	VCT	45(16.2)	15(22.4)	33.3	10.252 0.032*
	医院	199(71.8)	51(76.1)	25.6	
	妇幼保健院	12(4.3)	0(0.0)	0.0	
	血液中心	13(4.7)	1(1.5)	7.7	
	监管场所	8(2.9)	0(0.0)	0.0	

注:*P为Fisher精确检验。

深圳市2019年HIV筛查试验有反应性而确证试验结果为阴性的样本共624例。其中男性296例,女性328例,男女比例0.9:1。年龄范围1~91岁,中位数[34(28, 46)]岁。其中30~39岁占比最高。按行政区划分,来自福田区、龙岗区和宝安区居多。样本来源医院占六成以上,其次为血液中心。见表2。

表2 确证试验结果为阴性样本的核酸阳性率 [n(%)]

Table 2 RNA positive rate of samples with negative WB results [n(%)]

特征	检测例数	阳性例数	阳性率 (%)	χ^2 值	P值		
行政区 市级	31(5.0)	1(7.7)	3.2	8.770	0.488 ^a		
罗湖	36(5.8)	1(7.7)	2.8				
福田	226(36.2)	3(23.1)	1.3				
南山	50(8.0)	1(7.7)	2.0				
宝安	69(11.1)	1(7.7)	1.4				
龙华	43(6.9)	2(15.4)	4.7				
龙岗	110(17.6)	3(23.1)	2.7				
大鹏	7(1.1)	0(0.0)	0.0				
盐田	2(0.3)	0(0.0)	0.0				
坪山	12(1.9)	1(7.7)	8.3				
光明	38(6.1)	0(0.0)	0.0				
年龄(岁) <20	37(5.9)	0(0.0)	0.0			0.577	1.000 ^a
20~29	176(28.2)	4(30.8)	2.3				
30~39	185(29.6)	4(30.8)	2.2				
40~49	107(17.1)	2(15.4)	1.9				
≥50	119(19.1)	3(23.1)	2.5				
性别 男	296(47.4)	11(84.6)	3.7			7.360	0.007
女	328(52.6)	2(15.4)	0.6				
来源机构 VCT	60(9.6)	1(7.7)	1.7			2.367	0.587 ^a
医院	422(67.6)	12(92.3)	2.8				
妇幼保健院	35(5.6)	0(0.0)	0.0				
血液中心	83(13.3)	0(0.0)	0.0				
监管场所	24(3.8)	0(0.0)	0.0				

注:^aP为 Fisher 精确检验。

2.2 核酸检测结果

核酸检测结果低于检测限 821 例(91.1%),高于检测限 80 例(8.9%)。核酸检测结果中位数 [2.29E+6(3.45E+5, 1.28E+7)] IU/mL。(因核酸检测结果均大于 5 000 IU/mL,以下简称核酸阳性)。

确证试验结果为不确定的样本中检出核酸阳性 67 例(24.2%),检测结果中位数 [1.53E+6(2.2E+5, 7.4E+6)] IU/mL;确证试验结果为阴性的样本中检出核酸阳性 13 例(2.1%),检测结果中位数 [5.98E+6(3.98E+6, 2.98E+7)] IU/mL;两组间比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。

核酸阳性 79 例(1 例随访失访)中,MSM 传播 61 例(77.2%);异性性行为传播 18 例(22.8%)。

2.3 核酸阳性率

2.3.1 确证试验为不确定样本

行政区域、性别、样本来源的核酸阳性率比较,差异有统计学意义。年龄的核酸阳性率比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 1。

2.3.2 确证试验为阴性样本

性别的核酸阳性率比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。行政区域($P>0.05$)、年龄($P>0.05$)以

及样本来源($P>0.05$)的核酸阳性率比较,差异无统计学意义。见表 2。

2.3.3 不同筛查方法比较

确证试验结果为不确定的样本中,不同筛查方法的核酸阳性率比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。确证试验结果为阴性的样本中,不同筛查方法的核酸阳性率比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 3。

表3 不同筛查方法核酸阳性率 [n(%)]

Table 3 RNA positive rate of different screening methods

筛查方法	检测例数	阳性例数	阳性率 (%)	χ^2 值	P值
WB 不确定样本 单独抗体检测	139(50.2)	31(46.3)	22.3	0.714	0.707
抗原抗体联合检测 不详	73(26.4) 65(23.5)	18(26.9) 18(26.9)	24.7 27.7		
WB 阴性样本 单独抗体检测	329(52.7)	3(23.1)	0.9	6.230	0.032
抗原抗体联合检测 不详	185(29.6) 110(17.6)	8(61.5) 2(15.4)	4.3 1.8		

2.4 CD4+T 淋巴细胞检测

906 例样本中有 783 例进行了 CD4+T 淋巴细胞检测。核酸低于检测限的样本共 704 例,CD4+T 淋巴细胞计数中位数 [561.5(425.75, 744.75)];核酸阳性的样本共 79 例,CD4+T 淋巴细胞计数中位数 [244(153, 358)];两组间比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。79 例核酸阳性样本中,CD4+T 淋巴细胞计数 0~200 个/ μ L 29 例,200~350 个/ μ L 30 例,350~500 个/ μ L 10 例,>500 个/ μ L 10 例。

2.5 WB 带型分析

单条带带型的总体核酸阳性率为 3.8%,核酸阳性率最高为 gp120 和 gp160, p24 偶见核酸阳性,其他均未检出。多条带带型中,同时包含 gp160 和 gp120 的核酸阳性率为 75.0%,同时包含 gp160 和 p24 的核酸阳性率为 72.5%。见表 4。

3 讨论

确证试验结果为不确定的受检者被要求随访,但这些病例不能被及时、明确诊断,会给艾滋病防治工作带来很大的困难^[7-8]。确证试验结果为阴性的受检者会拿到抗体阴性报告并排除 HIV 感染。其中部分感染者会因为阴性报告而发生高危性行为,产生的社会危害不容小觑^[9]。因此,核酸检测及早诊断 HIV 感染可以帮助三个 90% 防治策略的成功实施。

表4 WB带型核酸阳性率

带型	检测例数	阳性例数	阳性率(%)
p24	114	2	1.8
gp160, p24	64	48	75.0
gp160	48	4	8.3
gp41	7	0	0.0
p24, p17	7	0	0.0
gp120	6	1	16.7
gp160, gp120, gp41	6	5	83.3
gp160, gp120	5	3	60.0
p66	5	0	0.0
gp160, p17	3	1	33.3
gp160, p24, p17	3	1	33.3
p51	3	0	0.0
p31	2	0	0.0
gp160, gp120, p17	1	1	100.0
gp160, p66, p24	1	1	100.0
gp160, p66, p51, p24	1	0	0.0
p41	1	0	0.0
合计	277	67	24.2

确证试验结果为阴性的样本中,不同筛查方法的核酸阳性率比较,差异有统计学意义,说明抗原抗体联合检测试剂确实可以比单独抗体检测试剂检测出更多的早期感染者。在以后的检测过程中,应该重点关注抗原抗体联合检测试剂筛查有反应而确证试验结果为阴性的样本,因其有高达4.3%的核酸阳性率。不同WB带型样本的核酸阳性率不一。单条带中以p24最为常见(114/186),导致这种不确定p24条带出现的影响因素很多,比如人体自身免疫交叉反应、HIV急性感染期、或艾滋病感染的终末期^[10-11]。多条带带型中,出现gp160条带的核酸阳性率70%以上(60/83),预示env带在HIV感染中意义较大^[12]。

在确证试验结果为不确定和阴性的样本中,男性核酸阳性率显著高于女性,与深圳HIV感染的传播途径有关。2005至2012年间,深圳市每年新报告的HIV感染病例中,MSM占比在2012年已剧增至42.8%^[13],近年更是超过50%,而深圳MSM的新发感染率(2013-2015年平均7.46%)处于较高水平^[14-15]。本研究中核酸阳性者MSM传播占比77.2%(61/79),其中男性的MSM传播更是高达83.6%(61/73)。

行政区域对于确证试验结果为不确定样本的核酸阳性率有影响,因为区级疾控检验人员对于条带判别的认知不同。最主要的就是gp160, gp120, p24的带型中,对于弱或极弱的gp120条带

究竟是判断有还是无,而这种判断直接影响到确证结果是阳性还是不确定。不同的样本来源对于确证试验结果为不确定样本的核酸阳性率有影响。医院来源的样本属于被动检测,可以代表普通人群水平。VCT主要是MSM光顾的场所,核酸阳性率高于医院说明MSM的窗口期感染者比例更高。妇幼保健院的核酸阳性率低与深圳市母婴传播常年低水平甚至零传播的数据相一致。血液中心的核酸阳性率低表明了深圳市高质量的献血宣教以及筛查检测。然而,不同的样本来源对于确证试验结果为阴性样本的核酸阳性率没有影响,主要原因应该是与筛查方法有关。本市VCT全部采用单独抗体检测试剂而医院一般采用抗原抗体联合检测试剂。虽然VCT的极早期感染者可能比医院高,但医院的筛查方法比VCT更灵敏。

核酸阳性样本和核酸未检出样本的CD4+T淋巴细胞计数比较,差异有统计学意义,提示早期及窗口期感染与CD4+T淋巴细胞计数密切相关^[16]。值得注意的是,核酸检测结果低于检测限不能排除HIV-1感染。核酸检测结果特别是阴性结果一定要结合流行病学史、CD4+T淋巴细胞计数等资料进行综合判断。

本研究系统的分析了HIV确证试验结果为非阳性样本的核酸检测结果,对于这部分样本,核酸检测可以有效地提高HIV的检出效率。

参考文献

- [1] 徐聪慧,陈清峰,王璐,等. 艾滋病防治三个90%策略实施进展分析[J]. 中国艾滋病性病, 2018, 24(9): 957-960.
- [2] 谢炜,赵锦,刘少础,等. 深圳1198例移动APP交友型男男性行为者HIV感染状况及影响因素[J]. 中国艾滋病性病, 2019, 25(3): 251-255.
- [3] 陈尚良,郑欣,曾月婷,等. 第四代HIV抗原抗体检测试剂在血液筛查中的应用[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2014, 6(1): 30-32.
- [4] 中国疾病预防控制中心. 全国艾滋病检测技术规范(2015年修订版)[S]. 2015.
- [5] Mellors JW, Munoz A, Giorgi JV, et al. Plasma Viral Load and CD4+ Lymphocytes as Prognostic Markers of HIV-1 Infection[J]. Ann Intern Med, 1997, 126(12): 946-954.
- [6] Lorenzo-Redondo R, Ozer EA, Achenbach CJ, et al. Molecular epidemiology in the HIV and SARS-CoV-2 pandemics[J]. Curr Opin HIV AIDS, 2021, 16(1): 11-24.
- [7] Hecht FM, Wellman R, Busch MP, et al. Identifying the early post-HIV antibody seroconversion period[J]. J Infect Dis, 2011, 204(4): 526-533.

(下转第1038页)

· 论 著 ·

WEE2 基因纯合突变 Lys195Asn 导致受精失败和女性不孕的家系分析

刘 颖¹ 陈创奇¹ 苏念军¹ 何天文² 燕瑾¹ 刘风华^{1*} 张曦倩^{1*}

[摘要] 目的 鉴定一个在辅助生殖治疗中表现出反复受精失败和不孕的患者的遗传致病基因。方法 通过全外显子组测序技术对夫妻双方DNA进行检测,然后对可疑的致病突变进行Sanger测序验证,并通过生物信息学预测其有害性。另外,通过先证者家系分析对突变携带者的表型进行分析。结果 夫妇双方中男性未检测到与表型有关的可疑致病突变,而女性患者WEE2基因检测出c.G585C(p.K195N)纯合错义突变,其哥哥同为突变纯合子,父母均为突变杂合子。该突变暂未收录在ExAC、gnomoAD和HGMD数据库中。结论 全外显子测序适合于辅助生殖治疗中受精失败案例的遗传学病因的确诊。鉴定出的WEE2基因纯合突变导致受精失败和女性不孕的遗传方式符合常染色体隐性遗传。该家系中WEE2基因突变纯合子男性表型正常,为世界首次报道。

[关键词] 受精失败;女性不育;WEE2基因;全外显子测序

Lys195Asn homozygous mutation of WEE2 gene causes fertilization failure and a pedigree analysis of female infertility

LIU Dun¹, CHEN Chuangqi¹, SU Nianjun¹, HE Tianwen², YAN Jin¹, LIU Fenghua^{1*}, ZHANG Xiqian^{1*}

(1. Reproductive Medical Center, Guangdong Women and Children Hospital, Guangzhou, Guangdong, China, 510000; 2. Medical Genetics Center, Guangdong Women and Children Hospital, Guangzhou, Guangdong, China, 510000)

[ABSTRACT] **Objective** To determine the disease-causing gene in a family with fertilization failure and female infertility during assisted reproductive technology (ART) treatment. **Methods** Whole-exome sequencing (WES) and Sanger sequencing were performed for the couple and family. The possible pathogenic variant was evaluated with *in silico* tools. Genotype and phenotypic relationship were further analyzed through pedigree analysis. **Results** No suspicious pathogenic mutations related to the phenotype were detected in the males of spouses. In female patients, a homozygous missense mutation of c.G585C (p.K195N) was detected in the WEE2 gene. Both her brother and her parents are heterozygous carriers. The mutation has not yet been included in the ExAC, gnomoAD and HGMD database. **Conclusion** The whole-exome sequencing can be used to discover the genetic etiology of fertilization failure and female infertility. The phenotype of fertilization failure caused by WEE2 mutation was shown to follow a Mendelian recessive inheritance pattern. To our knowledge, the male homozygous for the WEE2 gene mutation in this family has a normal phenotype, which is the first report in the world.

[KEY WORDS] Fertilization failure; Female infertility; WEE2 gene; Whole-exome sequencing

成功受精是人类生育的重要前提,而正常受精的基础是获能后的单倍体精子与成熟的单倍体卵子相互融合^[1]。在辅助生殖(Assisted reproduc-

tion, ATR)治疗中,成熟卵子经体外受精(In vitro fertilization, IVF)或卵胞浆内单精子显微注射(Intracytoplasmic sperm injection, ICSI)后实现精卵

基金项目:国家自然科学基金-青年科学基金项目(81800184);广州市科技计划项目(202102021170)

作者单位:1. 广东省妇幼保健院生殖医学中心,广东,广州510000

2. 广东省妇幼保健院医学遗传中心,广东,广州510000

*通信作者:刘风华, E-mail:liushine2006@163.com; 张曦倩, E-mail:651557075@qq.com

融合,体外受精率通常可达70%~80%^[2],然而仍有1%~3%的ICSI周期出现低受精率($\leq 25\%$)或完全受精失败^[3-4]。导致ICSI周期低受精率或完全受精失败的因素比较复杂,如卵子细胞核与细胞质成熟不同步,纺锤体异常或者是缺乏卵子激活过程中的一些关键酶等^[5]。近年来,随着基因检测技术的发展与普及,一些由遗传致病基因突变导致的受精障碍案例逐渐被报道,例如男性中*PLCZ1*基因突变导致卵母细胞激活失败^[6-8],女性中*WEE2*基因突变导致卵子授精后无法形成原核等^[9-11]。*WEE2*基因(*WEE1*同源体,也称为*WEE1B*)属于母源基因,仅在卵巢的卵母细胞中高表达。在小鼠GV期卵子中降调*Wee2*基因表达后,小鼠卵母细胞能够完成减速第一次分裂后排出极体,由MI卵子发育至PB1卵子,但通过IVF受精后,卵子不能形成原核,表现为受精障碍^[12]。由此可见*WEE2*基因在卵母细胞受精过程中发挥至关重要的作用。本研究中应用全外显子组测序技术对一受精失败家系进行了遗传学病因的鉴定,发现该案例中女性*WEE2*基因纯合错义突变是导致其反复ART失败的原因,并通过家系研究进一步阐明了*WEE2*基因型与表型的关系。

1 材料与方法

1.1 患者资料

夫妇2017年7月首次就诊于本院生殖医学中心时女方27岁,男方26岁。女方双侧输卵管通畅,其余妇科检查基本正常。男方精液检查参数基本正常(密度: $54.2 \times 10^6/\text{mL}$,前向运动比率:66.4%,活率:72.5%,正常形态率:4.8%)。临床诊断为不明原因的原发不孕症,不孕年限为3年。患者夫妇通过ART治疗反复失败,主要表现为不孕和受精障碍。本研究通过了广东省妇幼保健院医学伦理委员会审查批准,同时征得了患者及其家人遗传基因分析的知情同意。

1.2 控制性促排卵方案和体外受精

根据患者年龄、体重、激素水平及卵巢储备情况选择相应的经典促排卵方案。取卵、精液处理、体外

授精、人工卵母细胞激活(Intracytoplasmic sperm injection, AOA)和胚胎培养技术均采用标准方法^[13]。

1.3 遗传基因分析

采集夫妇双方及女方父母和哥哥的外周血,采用传统的酚氯仿方法提取基因组DNA用于遗传分析。首先,根据标准实验方法对夫妇双方进行全外显子组测序(Whole Exome Sequencing, WES):基因组DNA经片段化、末端修复、3'端加A尾、连接测序接头、PCR扩增,使用杂交捕获方法制备DNA文库,然后使用Illumina NovaSeq高通量测序平台进行全外显子组的测序。随后,对下机数据进行后续的生物信息学分析,包括将原始的FASTQ格式文件与人类基因组hg19(GRCh37)参考序列进行比对;对短序列变异的检出、过滤和注释;分别应用PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>)和Mutation Taster (<http://www.mutationtaster.org>)蛋白质预测软件对变异的有害性进行预测;利用人类外显子组数据库ExAC (<http://exac.broadinstitute.org/>)和基因组变异频率数据库gnomAD (<http://gnomad.broadinstitute.org/>)查找突变位点频率,用人类基因突变数据库HGMD (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/>)查询突变是否被收录;应用Clustal Omega软件通过比对不同物种蛋白序列,分析变异位点在不同物种之间的保守性。最后,对潜在的致病基因突变进行Sanger测序验证以及进一步的家系验证和表型分析。

2 结果

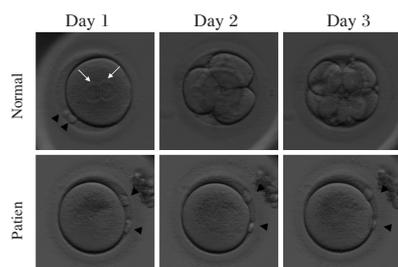
2.1 临床结果

不孕症夫妇双方通过ART助孕过程和结果总结如下:3个周期B超监测排卵指导同房后未妊娠;两人工授精(Artificial insemination of husband's sperm, AIH)周期未妊娠;1个IVF周期低受精率,无可移植胚胎;1个ICSI周期完全受精失败;1个ICSI-AOA周期完全受精失败。体外授精的具体临床实验结果见表1。在ICSI-AOA治疗周期中,1个卵子授精后出现了第二极体,但无法形成原核和进一步卵裂(见图1)。

表1 患者ART治疗中的临床表型

Table 1 Clinical genotypes of the affected couple

ART周期	促排卵方案	授精方式	获卵数	GV	MI	PB1	2PB	2PN	可移植胚胎数
1	长效长方案	IVF	12	0	0	10	0	2	0
2	拮抗剂方案	ICSI	11	3	1	7	0	0	0
3	长效长方案	ICSI-AOA	9	4	1	3	1	0	0



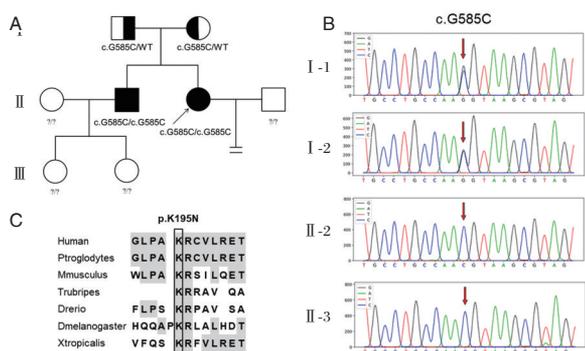
注:白色箭头指示原核。黑色三角指示第一极体和第二极体。

图1 授精后观察正常合子和患者卵子的形态学变化

Figure 1 Morphology of a normal zygote and a affected individual oocyte after ICSI-AOA

2.2 全外显子组基因测序、Sanger 测序验证和家系分析

男方全外显子组基因测序未找到与受精障碍相关致病基因变异。女方测序发现一个与受精障碍高度相关的基因变异 *WEE2* (NM_001105558): c.G585C(p.K195N)纯合错义突变(图1)。蛋白预测软件 PolyPhen-2 和 MutationTaster 的算法预测均提示该变异为有害突变。通过对先证者家系分析和 Sanger 测序验证发现该患者 *WEE2* 纯合突变分别遗传至患者无症状的父亲(I-1)和母亲(I-2),先证者的哥哥(II-2)与先证者一样发生了 *WEE2* 基因突变纯合突变。氨基酸保守性分析表明, *WEE2* 蛋白第 195 位氨基酸 Lys 在不同物种间高度保守。见图2。



注:A为先证者遗传家系图。B为先证者及其家人 Sanger 测序结果显示 *WEE2*:c.G585C(p.K195N)错义突变。红色箭头是突变位点。C为 *WEE2* 蛋白的(p.K195N)氨基酸序列保守性比对。

图2 先证者家系 Sanger 测序结果和 *WEE2* 蛋白(p.K195N)不同物种氨基酸序列

Figure 2 Sanger sequencing results of proband family and *WEE2*(p.K195N) amino acid sequence of different species

3 讨论

人类正常受精过程需要经历一系列的生化过程,包括精子获能,顶体反应,精卵结合,精卵质膜

融合,卵子激活,完成第二次减速分裂,雌、雄原核形成和融合^[1,14]。ART 周期中完全受精失败并不十分常见,仅有 1%~3% 的 ICSI 周期出现低受精率($\leq 25%$)或完全受精失败^[3-4]。由于伦理和研究技术的限制,目前 ICSI 完全受精失败的分子机制并不完全清楚,且难于改善和治疗。遗传学因素导致的受精失败中,由于男性 *PLCZ1* 基因突变或圆头精子症导致卵母细胞激活失败,可以通过 ICSI-AOA 技术进行治疗改善^[6-8],而女性的遗传学因素导致的受精障碍,临床上尚无良好的补救措施。

本研究通过 WES 技术鉴定了 *WEE2* (NM_001105558):c.G585C(p.K195N)纯合错义突变导致 ART 周期中受精失败和女性不孕的家系。PolyPhen-2 和 MutationTaster 软件的算法预测该突变为有害变异,且通过检索人类外显子组数据库 ExAC 和基因组变异频率数据库 gnomAD 发现该变异频率为 0,目前人类基因突变数据库 HGMD 尚未收录该突变。根据 Sanger 测序验证和随后的家系分析,发现先证者父母均为无症状的 *WEE2* 杂合突变携带者,说明疾病的遗传方式符合孟德尔常染色体隐性遗传,女性杂合子携带者不致病。此外,由于 *WEE2* 基因是母源基因,在卵母细胞中高度特异性表达,因此一般推断 *WEE2* 纯合杂合突变可能不影响男性生育力。本研究结果证实了 *WEE2* 基因纯合突变仅仅会导致女性不孕,并不影响男性生育。这也是目前世界上首个报道 *WEE2* 基因纯合突变的男性案例。目前对于该类患者,王磊教授研究团队通过向 *WEE2* 突变的卵母细胞中注射野生型 *WEE2*-cRNA 进行治疗^[9],拯救实验结果显示注射后的卵子能正常形成原核并受精,且能进一步培养后发育至囊胚阶段,但是由于生物安全方面因素考虑,研究者并未移植囊胚到患者子宫,此项技术还无法应用到临床治疗当中,因此对于此类患者一旦明确了基因突变诊断结果,推荐直接采用供卵进行治疗。

近年来,越来越多的遗传基因突变被证明与 ART 周期中卵子和胚胎异常有关,从而导致女性不孕。例如, *TUBB8* 和 *PATL2* 基因突变导致女性卵子成熟障碍^[15-17], *ZP1/ZP2/ZP3* 基因突变导致卵子透明带异常或空卵泡综合征^[18], *PADI6* 基因突变导致胚胎早期发育阻滞^[19], *WEE2*^[9-11] 和 *TLE6*^[20] 基因突变导致受精障碍和 *PANX1* 基因突变导致卵子死亡^[21]等。WES 技术适合于 ART 周期中各种极端异常表型的遗传学病因的确诊和研究,为患者进

一步的助孕治疗提供合理指导。本研究中 *WEE2* 基因突变家系完整的展示了 *WEE2* 基因型、表型以及性别的关系,为 ART 周期中低受精率和完全受精失败的分子诊断和遗传咨询提供了理论依据。

参考文献

- [1] Clift D, Schuh M. Restarting life: fertilization and the transition from meiosis to mitosis [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2013, 14(9):549-562.
- [2] Neri QV, Lee B, Rosenwaks Z, et al. Understanding fertilization through intracytoplasmic sperm injection (ICSI) [J]. *Cell Calcium*, 2014, 55(1):24-37.
- [3] Vanden Meerschaut F, Leybaert L, Nikiforaki D, et al. Diagnostic and prognostic value of calcium oscillatory pattern analysis for patients with ICSI fertilization failure [J]. *Hum Reprod*, 2013, 28(1):87-98.
- [4] Sfountouris IA, Natri CO, Lima ML, et al. Artificial oocyte activation to improve reproductive outcomes in women with previous fertilization failure: a systematic review and meta-analysis of RCTs [J]. *Hum Reprod*, 2015, 30(8):1831-1841.
- [5] Li Z, Wang AY, Bowman M, Hammarberg K, et al. ICSI does not increase the cumulative live birth rate in non-male factor infertility [J]. *Hum Reprod*, 2018, 33(7):1322-1330.
- [6] Yan Z, Fan Y, Wang F, et al. Novel mutations in *PLCZ1* cause male infertility due to fertilization failure or poor fertilization [J]. *Hum Reprod*, 2020, 35(2):472-481.
- [7] Dai J, Dai C, Guo J, et al. Novel homozygous variations in *PLCZ1* lead to poor or failed fertilization characterized by abnormal localization patterns of *PLCζ* in sperm [J]. *Clin Genet*, 2020, 97(2):347-351.
- [8] Mu J, Zhang Z, Wu L, et al. The identification of novel mutations in *PLCZ1* responsible for human fertilization failure and a therapeutic intervention by artificial oocyte activation [J]. *Mol Hum Reprod*, 2020, 26(2):80-87.
- [9] Sang Q, Li B, Kuang Y, et al. Homozygous Mutations in *WEE2* Cause Fertilization Failure and Female Infertility [J]. *Am J Hum Genet*, 2018, 102(4):649-657.
- [10] Zhao S, Chen T, Yu M, et al. Novel *WEE2* gene variants identified in patients with fertilization failure and female infertility [J]. *Fertil Steril*, 2019, 111(3):519-526.
- [11] Tian Y, Wang G, Wang J, et al. Novel compound heterozygous mutation in *WEE2* is associated with fertilization failure: case report of an infertile woman and literature review [J]. *BMC Womens Health*, 2020, 20(1):246.
- [12] Oh JS, Susor A, Conti M. Protein tyrosine kinase *Wee1B* is essential for metaphase II exit in mouse oocytes [J]. *Science*, 2011, 332(6028):462-465.
- [13] Ferrer-Buitrago M, Bonte D, Dhaenens L, et al. Assessment of the calcium releasing machinery in oocytes that failed to fertilize after conventional ICSI and assisted oocyte activation [J]. *Reprod Biomed Online*, 2019, 38(4):497-507.
- [14] Tosti E, Ménéz Y. Gamete activation: basic knowledge and clinical applications [J]. *Hum Reprod Update*, 2016, 22(4):420-439.
- [15] Feng R, Sang Q, Kuang Y, et al. Mutations in *TUBB8* and Human Oocyte Meiotic Arrest [J]. *N Engl J Med*, 2016, 374(3):223-232.
- [16] Chen B, Wang W, Peng X, et al. The comprehensive mutational and phenotypic spectrum of *TUBB8* in female infertility [J]. *Eur J Hum Genet*, 2019, 27(2):300-307.
- [17] Chen B, Zhang Z, Sun X, et al. Biallelic Mutations in *PATL2* Cause Female Infertility Characterized by Oocyte Maturation Arrest [J]. *Am J Hum Genet*, 2017, 101(4):609-615.
- [18] Zhou Z, Ni C, Wu L, et al. Novel mutations in *ZP1*, *ZP2*, and *ZP3* cause female infertility due to abnormal zona pellucida formation [J]. *Hum Genet*, 2019, 138(4):327-337.
- [19] Xu Y, Shi Y, Fu J, et al. Mutations in *PADI6* Cause Female Infertility Characterized by Early Embryonic Arrest [J]. *Am J Hum Genet*, 2016, 99(3):744-752.
- [20] Lin J, Xu H, Chen B, et al. Expanding the genetic and phenotypic spectrum of female infertility caused by *TLE6* mutations [J]. *J Assist Reprod Genet*, 2020, 37(2):437-442.
- [21] Sang Q, Zhang Z, Shi J, et al. A pannexin 1 channelopathy causes human oocyte death [J]. *Sci Transl Med*, 2019, 11(485):eaav8731.

(上接第 1034 页)

- [8] Liu P, Tang L, Kong WH, et al. Anti-HIV-1 antibodies based confirmatory results in Wuhan, China, 2012-2018 [J]. *PLoS One*, 2020, 15(9):e0238282.
- [9] Zhang H, Hsieh E, Wang L, et al. HIV/AIDS Among Female Sex Workers in China: Epidemiology and Recent Prevention Strategies [J]. *Curr HIV/AIDS Rep*, 2020, 17(2):151-160.
- [10] 宋伟, 陈祥雨, 邵一鸣, 等. HIV-1 p24 抗原的真核表达及其血清学诊断应用 [J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2019, 39(8):591-595.
- [11] Gray ER, Bain R, Varsaneux O, et al. p24 revisited: a landscape review of antigen detection for early HIV diagnosis [J]. *AIDS*, 2018, 32(15):2089-2102.
- [12] Ward AB. Playing Chess with HIV [J]. *Immunity*, 2019, 50(2):283-285.
- [13] Zhao J, Chen L, Antoine C, et al. The dynamics of the HIV epidemic among men who have sex with men (MSM) from 2005 to 2012 in Shenzhen, China [J]. *Sci Rep*, 2016, 6:28703.
- [14] Jia D, Zhao J, Liu Y, et al. Two-year cross-sectional studies reveal that single, young MSMs in Shenzhen, China are at high risk for HIV infection [J]. *Virol J*, 2019, 16(1):83.
- [15] 于国龙, 秦冰, 鄢心革, 等. 广东男男性行为 HIV-1 感染者中耐药情况及基因型分布 [J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2015, 7(3):156-160.
- [16] Cao Z, Li J, Chen H, et al. Effects of HIV-1 genotype on baseline CD4+ cell count and mortality before and after anti-retroviral therapy [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1):15875.

生化指标及自身抗体对原发性胆汁性肝硬化的诊断价值

冯婧^{1,2} 高洪燕² 黄山^{3*}

[摘要] **目的** 探讨肝功能指标、免疫球蛋白以及自身抗体对原发性胆汁性肝硬化(PBC)的临床诊断价值。**方法** 收集PBC患者共78例,同时选取同期药物性肝损伤(DILI)患者75例,健康体检者75例。分析三组肝功能指标(ALT、AST、ALP、GGT、TBA、TBIL),免疫球蛋白(IgA、IgG、IgM),以及抗核抗体和抗核抗体谱(其中包括AMA-M2、抗体ACA、抗Ro-52抗体等)的血清学特点。**结果** PBC组的ALT、AST低于DILI组,差异有统计学意义($P<0.05$),ALP、IgG、IgM高于DILI组,差异有统计学意义($P<0.05$);除IgA外,PBC组与DILI组的肝功能指标和免疫球蛋白均高于健康组,差异有统计学意义($P<0.05$)。除核周型外,PBC组各项自身抗体指标阳性率均高于DILI组,差异有统计学意义($P<0.05$),PBC组各项自身抗体指标阳性率均高于健康组,差异有统计学意义($P<0.05$)。各自身抗体指标诊断敏感性最高的是胞浆颗粒型和AMA-M2(56.4%),特异性最高的是着丝点型和ACA均为(99.3%),约登指数最高的是AMA-M2(0.554)。AMA-M2、胞浆颗粒型抗、抗Ro-52抗体联合检测诊断PBC的约登指数最高(0.669),余下四组联合检测项目随着指标的增加其约登指数并没升高。**结论** 肝功能指标和免疫球蛋白对PBC和DILI鉴别诊断具有局限性;ANA和ANAs能较好鉴别诊断PBC与DILI、健康体检者,其次,联合检测AMA-M2、胞浆颗粒型、抗Ro-52抗体能提高PBC的诊断准确率。

[关键词] 原发性胆汁性胆管炎;药物性肝损伤;肝功能;免疫球蛋白;自身抗体

The diagnostic value of biochemical indicators and autoantibodies in primary biliary cirrhosis

FENG Jing^{1,2}, GAO Hongyan², HUANG Shan^{3*}

(1. School of Clinical Laboratory Medicine of Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou, China, 550000; 2. The Laboratory of Traditional Chinese Medicine to Prevent and Treat Autoimmune Disease in Chongqing, Chongqing, China, 400021; 3. Guizhou Vocational and Technical College of Nursing, Guiyang, Guizhou, China, 550000)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the clinical diagnostic value of liver function indicators, immunoglobulins and autoantibodies for primary biliary cirrhosis (PBC). **Methods** A total of 78 patients with PBC were collected, and 75 patients with drug-induced liver injury (DILI), and 75 patients with healthy physical examination were selected at the same time. The serological characteristics of three groups of liver function indicators (ALT, AST, ALP, GGT, TBA, TBIL), immunoglobulins (IgA, IgG, IgM), and antinuclear antibody and antinuclear antibody spectrum (such as AMA-M2, ACA, anti-Ro-52 antibody, etc) were analyzed. **Results** The values of ALT and AST in the PBC group were lower than those in the DILI group, the difference was statistically significant ($P<0.05$), and the ALP, IgG, IgM were higher than those in the DILI group, the difference was statistically significant ($P<0.05$). Except for IgA, the liver function indicators, and immunoglobulins in the PBC group and the DILI group were higher than those in the healthy group, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). Except for the perinuclear type, the positive rates of all auto-

基金项目:重庆市科技局项目基金(cstc2018jxjl130007)

作者单位:1. 贵州医科大学检验医学院,贵州,贵阳 550000

2. 重庆市中医院中医药防治自身免疫性疾病重庆市重点实验室,重庆 400021

3. 贵州护理职业技术学院,贵州,贵阳 550000

*通信作者:黄山, E-mail: huangshan263@sina.com

antibody indicators in the PBC group were higher than those in the DILI group and the healthy group, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). The highest diagnostic sensitivity of autoantibody indicators is cytoplasmic granular type and AMA-M2 (56.4%), the highest specificity is centromere type and ACA (99.3%), and the highest Youden index is AMA-M2. (0.554). The Youden index of AMA-M2, anti-cytoplasmic granular antibody and anti-Ro-52 antibody combined detection to diagnose PBC was the highest (0.669), and the Youden index of the remaining four groups of combined detection items did not increase with the increase of the indicators. **Conclusion** Liver function indicators and immunoglobulins have limitations in the differential diagnosis of PBC and DILI; ANA and ANAs can better differentiate between PBC and DILI, and healthy subjects. In addition, the combination of AMA-M2, cytoplasmic granular type, and anti-Ro-52 antibodies can improve the diagnostic accuracy of PBC.

[KEY WORDS] Primary biliary cholangitis; Drug-induced liver injury; Liver function indicators; Immunoglobulin; Autoantibodies

原发性胆汁性胆管炎(primary biliary cholangitis, PBC)又称原发性胆汁性肝硬化,多发生于中年女性,是一种慢性胆汁淤积性自身免疫性肝脏疾病,在临床上以肝内小胆管慢性进行性非化脓炎性损伤为特征,最终可导致肝硬化和(或)肝衰竭^[1]。药物性肝损伤(drug-induced liver injury, DILI)是指化学药物、中草药、生物制剂等及其代谢产物对肝脏引起的损伤^[2]。PBC和DILI临床表现相似且缺乏特异性,其早期诊断主要依靠实验室检查^[3]。本文通过分析肝功能指标、免疫球蛋白以及自身抗体与PBC、DILI的临床诊断关系,以期为临床诊断PBC提供参考依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2015年10月~2019年10月重庆市中医院PBC患者共78例,其中男7例,女71例,年龄平均(59.7±10.1)岁;入组标准:PBC的诊断参照2009年美国肝病学会(American association for the study of liver diseases, AASLD)PBC诊断指导建议^[2]。同时选取本院住院DILI患者75例,其中男27例,女48例,年龄平均(50.4±15.1)岁;入组标准:应用RUCAM进行评估,评分结果≥6分^[3]纳入本研究。健康组75例来自同期本院的健康体检者,其中男7例,女68例,年龄平均(56.3±15.5)岁。排除标准:①合并自身免疫性疾病、肝炎者;②诊断为其他肝胆疾病者;③伴有严重心脏、肝脏、肾脏损害者。所有患者或家属知情同意,本实验通过医院伦理委员会批准。

1.2 方法

德国SIEMENS 2400全自动生化分析和浙江宁波康美生物生化体外诊断试剂检测肝功能指标和免疫球蛋白;德国欧蒙抗核抗体(antinuclear an-

tibody, ANA)间接免疫荧光法实验诊断试剂盒检测ANA, LEICA DM500荧光显微镜见特异性荧光模型为阳性;EUROBIot Master44欧蒙印迹仪检测抗核抗体谱(antinuclear antibody spectrum, ANAs),根据模条颜色深浅判断结果。

比较阳性率较高的荧光核型(胞浆颗粒型、着丝点型、核颗粒型、核周型)和ANAs阳性率较高的抗体,其中包括抗线粒体抗体M2亚型(antimitochondrial antibody M2 subtype, AMA-M2)、抗Ro-52抗体、抗着丝点抗体(anti-centromere antibody, ACA)在各组中的差异。

1.3 统计学处理

采用SPSS 19.0进行统计学处理;计量资料进行方差齐性分析,若方差齐,以($\bar{x} \pm s$)描述,进行 t 检验分析,若方差不齐以 $M(P_{25} \sim P_{75})$ 描述,进行非参数秩和检验分析;计数资料以 $[n(\%)]$ 描述;组间阳性率比较进行 χ^2 检验分析;联合检测采用并联试验;以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 三组肝功能指标和免疫球蛋白差异比较

三组肝功能指标其中包括丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)、 γ -谷氨酰基转移酶(GGT)、总胆汁酸(TBA)、总胆红素(TBIL)和免疫球蛋白比较,除IgA外,差异有统计学意义($P<0.05$)。PBC组的ALT、AST低于DILI组(U 分别为930.00、1655.50)差异有统计学意义($P<0.05$);ALP、IgG、IgM高于DILI组(U 分别为2220.00、1732.00、1280.50),差异有统计学意义($P<0.05$);两组GGT、TBA、TBIL比较,差异无统计学意义;除IgA外,PBC组与DILI组的肝功能指标和免疫球蛋白均高于健康组(PBC

组与健康组的 U 依次为 258.00、280.00、439.00、924.00、1177.00、894.00、1327.50、2278.00, DILI 组与健康组的 U 依次为 258.00、280.00、439.00、924.00、1177.00、894.00、1327.50、2278.00), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 3组 ANA 荧光核型和 ANAs 比较

除核周型外, PBC 组各项阳性率均高于 DILI 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); PBC 组各项阳性率均高于健康组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); DILI 组与健康组各自抗体指标比较, 差异无统计学意义。各自身抗体指标敏感性最高的是胞浆颗粒型和 AMA-M2, 特异性最高的是着丝点型和 ACA, 约登指数最高的是 AMA-M2。见表 2。

2.3 3组 ANA 荧光核型与 ANAs 联合方案临床价值比较

ANA 荧光核型与 ANAs 联合检测, AMA-M2、

胞浆颗粒型抗、抗 Ro-52 抗体联合检测的约登指数最高, 余下四组联合检测项目随着指标的增加但是约登指数并没升高, MA-M2、胞浆颗粒型联合检测的约登指数高于 AMA-M2、胞浆颗粒型、抗 Ro-52 抗体、ACA、着丝点型、核颗粒型联合检测。见表 3。

3 讨论

PBC 是一种慢性自身免疫性胆汁淤积性肝病, 其特征是以女性为主, 可能与遗传背景及环境等因素相互作用所导致的异常自身免疫反应有关^[4]。DILI 患者中体内可能出现多种自身抗体, 可表现为自身免疫性肝炎或类似 PBC 和原发性硬化性胆管炎等自身免疫性肝病, DILI 与 PBC 二者均有黄疸、乏力、纳差、上腹部不适等临床症状^[5]。肝功能指标常用于探测肝脏有无疾病, 肝脏损害程度以及查明肝病原因等, 有助于肝脏疾病的早期筛查和诊断。ALT

表 1 3组肝功能和免疫球蛋白差异比较 [M(P₂₅~P₇₅), ($\bar{x} \pm s$)]

Table 1 Comparison of differences in liver function and immunoglobulin between 3 group [M(P₂₅~P₇₅), ($\bar{x} \pm s$)]

检测指标(单位)	PBC组(n=78)	DILI组(n=75)	健康组(n=75)	F/ χ^2 值	P值
ALT(U/L)	40.50(23.00~722.00) ^a	227.0(90.00~514.00) ^b	17.00(13.00~23.00) ^{ab}	99.23	0.000
AST(U/L)	48.00(32.75~97.50) ^a	127.00(46.00~322.00) ^b	18.00(15.00~23.00) ^{ab}	93.45	0.000
GGT(U/L)	138.00(52.00~230.00)	152.00(67.00~261.00)	18.00(14.00~35.00) ^{ab}	65.23	0.000
ALP(U/L)	151.00(103.50~250.75) ^a	129.00(84.00~178.00) ^b	64.00(3.00~83.00) ^{ab}	81.58	0.000
TBA(μ mol/L)	22.45(9.00~64.00)	12.40(4.00~67.00)	3.00(2.00~5.60) ^{ab}	56.46	0.000
TBIL(μ mol/L)	18.00(11.30~32.53)	17.40(11.10~66.40)	7.70(6.20~10.30) ^{ab}	61.68	0.000
IgA(g/L)	3.84 \pm 2.48	6.34 \pm 33.225	2.26 \pm 0.98	0.858	0.425
IgG(g/L)	18.24(16.13~24.35) ^a	15.48(12.26~17.92) ^b	11.85(9.90~13.93) ^{ab}	67.10	0.000
IgM(g/L)	2.93(1.90~3.99) ^a	1.47(1.09~1.84) ^b	1.25(0.81~1.73) ^{ab}	45.08	0.000

注:与 DILI 组比较 ^a $P < 0.05$; 与 PBC 组表示 ^b $P < 0.05$ 。

表 2 3组 ANA 荧光核型和 ANAs 比较 [n(%)]

Table 2 Comparison of 3 groups of ANA fluorescence karyotypes and ANAs [n(%)]

自身抗体 检测指标	阳性率			敏感性(%)	特异性(%)	约登指数
	PBC组(n=78)	DILI(n=75)	健康组(n=75)			
胞浆颗粒型	44(56.4) ^a	3(4.0) ^b	4(5.3) ^b	56.4	95.3	0.517
着丝点型	18(23.1) ^a	0(0.0) ^b	1(1.3) ^b	23.1	99.3	0.224
核颗粒型	16(20.5) ^a	5(6.7) ^b	6(8.0) ^b	20.5	92.7	0.132
核周型	11(14.1)	5(6.7)	0(0.0) ^b	14.1	96.7	0.107
AMA-M2	44(56.4) ^a	2(2.7) ^b	1(1.3) ^b	56.4	98.0	0.554
抗 Ro-52 抗体	30(38.5) ^a	4(5.3) ^b	1(1.3) ^b	38.5	96.7	0.352
ACA	11(28.2) ^a	5(1.3) ^b	0(0.0) ^b	28.2	99.3	0.275

注:与 DILI 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 PBC 组比较, ^b $P < 0.05$ 。

表 3 ANA 荧光核型和 ANAs 多指标联合方案的临床价值比较

Table 3 Comparison of clinical value of ANA fluorescence karyotype and ANAs multi-index combination scheme

检测项目	敏感度(%)	特异度(%)	约登指数
AMA-M2+胞浆颗粒型抗	69.2	94.0	0.632
AMA-M2+胞浆颗粒型抗+Ro-52 抗体	75.6	91.3	0.669
AMA-M2+胞浆颗粒型抗+Ro-52 抗体+ACA	76.9	89.3	0.662
AMA-M2+胞浆颗粒型抗+Ro-52 抗体+ACA+着丝点型	76.9	89.3	0.662
AMA-M2+胞浆颗粒型抗+Ro-52 抗体+ACA+着丝点型+核颗粒型	78.2	84.0	0.622

和AST均为反映肝细胞损伤的指标,分别存在于肝细胞胞浆和肝线粒体中,其水平越高肝细胞受损越严重^[6],在本研究结果与杨俊等人^[7]的结果一致。血清ALP是诊断肝胆和骨骼系统疾病常用指标。此外,PBC组的IgG、IgM高于DILI组,而两组的IgA差异不明显,这有助于区分PBC与DILI。在本研究中PBC组与DILI组的GGT、TBA、TBIL差异不具有统计学意义,具体原因还有待进一步研究。

AMA-M2是PBC特异性血清学诊断指标,特异性为90%以上,在PBC的整个病程中抗AMA-M2抗体是波动的,有些患者开始检测时抗AMA-M2抗体为阴性,但是随着疾病的发展该抗体会变成阳性^[2]。在本研究中PBC组的AMA-M2阳性率低于相关报道,可能是由于有的患者处于疾病初期,此外,因为本实验检测AMA-M2采用的免疫印迹法,其灵敏度低于ELISA对单一抗原的检测,亦会使阳性率降低^[7-9]。抗Ro抗体即抗SSa抗体,SSa抗原是小分子细胞质核糖核蛋白,是蛋白和小分子核糖核酸形成的复合物,抗Ro-52身抗体就是其中一种,其存在于多种自身免疫性疾病中,缺乏特异性^[10]。本研究中抗Ro-52抗体阳性率与报道^[10]一致,由于其单独阳性缺乏特异性,在临床工作中多与其他自身抗体联合检测。李勇等人^[11]发现,ACA是PBC患者并发慢性肾病的独立危险因素,故ACA阳性的PBC患者值得临床医生重视。在PBC患者中大约30%~50% ANA阳性,对AMA阴性患者诊断具有重要意义,诊断PBC的特异性ANA荧光核型多是核点型、核周型、着丝点型^[12],本研究结果除以上核型外还有胞浆颗粒型,其约登指数最高,还具有较高的敏感性和特异性,故笔者建议,可以将胞浆颗粒型作为诊断PBC的ANA荧光核型。有文献报道^[9,13],DILI患者ANA亦存在较高阳性,但采用的是ELISA检测未对ANA作出分型,分析本实验结果发现,DILI组核颗粒型阳性率最高,并且与PBC组存在明显差异。由此可见,ANA和ANAs能较好鉴别诊断PBC与DILI。

随着研究的深入,有文献报道^[14]联合检测ANA和ANAs能提高PBC的灵敏度,本研究结果与报道一致。分析本实验结果发现,随着联合自身抗体指标的增多诊断结果的灵敏度随之增加,但特异性也相应的下降,并且登指数并未随之增高故笔者建议在临床工作中,可以将所在实验检测结果中约登指数较高的联测项目联合检测,以此提高诊断PBC准确性。

综上所述,肝功能指标和免疫球蛋白对PBC和DILI进行鉴别诊断具有局限性,提示临床医生在对二者进行鉴别诊断时,还需注意联合检测ANA和ANAs的结果,减少漏诊和误诊的可能。

参考文献

- [1] Beuers U, Gershwin ME, Gish RG, et al. Changing nomenclature for PBC: From 'cirrhosis' to 'cholangitis' [J]. *Dig Liver Dis*, 2015, 47(11):924-926.
- [2] Reshetnyak V I. Primary biliary cirrhosis: Clinical and laboratory criteria for its diagnosis [J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(25): 7683.
- [3] Peta V, Tse C, Perazzo H, et al. Serum apolipoprotein A1 and haptoglobin, in patients with suspected drug-induced liver injury (DILI) as biomarkers of recovery [J]. *PloS One*, 2017, 12(12): e0189436.
- [4] 高琪,张华.原发性胆汁性胆管炎易感基因多态性的研究现状[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2020, 12(1): 118-122.
- [5] Palmer M, Regev A, Lindor K, et al. Consensus guidelines: best practices for detection, assessment and management of suspected acute drug-induced liver injury occurring during clinical trials in adults with chronic cholestatic liver disease [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2020, 51(1): 90-109.
- [6] 杨明会,韩崇旭.抗AMA-M2抗体、抗GP210抗体与原发胆汁性胆管炎患者临床症状及相关检测指标的关系[J]. *国际检验医学杂志*, 2021, 42(03): 282-287.
- [7] 杨俊,于雅丽,郑长青.药物性肝损伤与原发胆汁性肝硬化的临床特征比较[J]. *临床肝胆病杂志*, 2016, 32(4): 728-731.
- [8] 陈成伟,成军,窦晓光,等.原发性胆汁性肝硬化(又名原发性胆汁性胆管炎)诊断和治疗共识(2015)[J]. *中华肝脏病杂志*, 2016, 24(1): 5-13.
- [9] 孙丽梅,闫惠平,娄金丽,等.抗线粒体抗体M2亚型在药物性肝损伤与原发胆汁性胆管炎患者中血清学特点分析[J]. *中华肝脏病杂志*, 2019, 27(4): 298-303.
- [10] 赵丹彤,闫惠平,檀玉芬,等.抗Ro-52抗体在自身免疫性肝病中的检测[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2009(7): 656-659.
- [11] 李勇,蒋廷旺,王金湖,等.原发性胆汁性肝硬化患者抗着丝粒抗体与慢性肾功能损伤的相关性研究[J]. *中国基层医药*, 2016, 23(24): 3734-3737.
- [12] De Liso F, Matinato C, Ronchi M, et al. The diagnostic accuracy of biomarkers for diagnosis of primary biliary cholangitis (PBC) in anti-mitochondrial antibody (AMA)-negative PBC patients: a review of literature [J]. *Clin Chem Lab Med*, 2017, 56(1): 25-31.
- [13] Boer YS, Kosinski AS, Urban TJ, et al. Drug-Induced Liver Injury Network. Features of Autoimmune Hepatitis in Patients With Drug-induced Liver Injury [J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2017, 15(1): 103-112.e2.
- [14] 李齐光,魏秋静,梁雅茹,等.多种自身抗体在原发胆汁性胆管炎中的临床意义[J]. *新医学*, 2020, 51(6): 468-472.

· 论 著 ·

老年高血压患者认知功能障碍与 *ApoA5* IVS3+476G>A 基因多态性关系

施勇* 谢月萍 张春丽

[摘要] 目的 探究老年高血压患者认知功能障碍与载脂蛋白 A5(*ApoA5*) IVS3+476G>A 基因多态性的关系。方法 选取 2015 年 7 月至 2018 年 7 月于本院诊治的 90 例老年高血压患者且分为老年高血压认知功能障碍组($n=40$)和认知正常组($n=50$)。利用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)技术联合国际通用智力状况量表(MMSE)测定患者的 *ApoA5* IVS3+476G>A 基因多态性和认知功能。结果 认知障碍组 *ApoA5* 多态性基因型频率显著高于正常组 *ApoA5* 多态性基因型频率,差异有统计学意义($P<0.05$)。认知障碍组 *ApoA5* IVS3+476G>A 等位基因频率与正常组 *ApoA5* IVS3+476G>A 等位基因频率比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。认知障碍组 *ApoA5* IVS3+476G>A 基因的 TT、TC、CC 与认知功能障碍呈现出正向相关性($P<0.05$),文化程度是影响认知功能障碍的保护因素($P<0.05$)。结论 载脂蛋白 *ApoA5* IVS3+476G>A 基因影响患者的认知功能,对深入研究高血压患者认知功能障碍有着重要意义。

[关键词] 老年高血压; 认知功能障碍; 载脂蛋白 A5 基因(800)IVS3+476G>A 基因多态性

The relationship between cognitive dysfunction and *ApoA5* IVS3+476G > A gene polymorphism in elderly hypertensive patients

SHI Yong*, XIE Yueping, ZHANG Chunli

(Department of Geriatric Medicine, Nanning First People's Hospital, Nanning, Guangxi, China, 530022)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the relationship between cognitive dysfunction in elderly hypertensive patients and apolipoprotein A5 (*ApoA5*) IVS3+476G > A gene polymorphism. **Methods** A total of 90 elderly hypertensive patients diagnosed and treated in our hospital from July 2015 to July 2018 were selected and divided into elderly hypertensive cognitive dysfunction group ($n=40$) and cognitive normal group ($n=50$). The polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) technology combined with the International General Intelligence Status Scale (MMSE) was used to determine the *ApoA5* IVS3+476G>A gene polymorphism and cognitive function of patients. **Results** The frequency of *ApoA5* polymorphism genotype in the cognitive impairment group was significantly higher than that in the normal group, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). There is a significant difference of the *ApoA5* IVS3+476 G>A allele frequency between the cognitive impairment group and the normal group ($P<0.05$). Cognitive impairment group of *ApoA5* IVS3+476G>A gene TT, TC, CC and cognitive dysfunction shows a positive correlation ($P<0.05$). Education level is a protective factor affecting cognitive dysfunction ($P<0.05$). **Conclusion** The *ApoA5* IVS3 476G > A gene affects the cognitive function of patients, which is of great significance for the in-depth study of cognitive dysfunction in patients with hypertension.

[KEY WORDS] Elderly hypertension; Cognitive dysfunction; Apolipoprotein A5 gene (800) IVS3+476G>A gene polymorphism

基金项目:广西南宁市科学研究与技术开发计划项目资助(201003044C-6)

作者单位:广西医科大学第五附属医院老年医学科,广西,南宁 530022

*通信作者:施勇, E-mail:gxnnson@126.com

高血压疾病是老年人常见慢性疾病之一,严重影响着老年人的生活与工作,有效预防老年人高血压疾病成为了医学界的主要研究的课题之一^[1]。高血压疾病患者易出现认知功能障碍症状,尤其是老年高血压患者^[2]。随着我国分子生物学技术以及生物信息学的不断发展,研究高血压疾病的遗传因素成为了当前医学界的热点之一。随着人们对高血压患者的认知功能障碍的关注度越来越高,更多的学者研究高血压认知功能障碍与遗传因素的关系^[3]。载脂蛋白 A5 (Apolipoprotein A5, ApoA5) 是载脂蛋白家族成员之一,是血浆重要的组成部分,且对血浆甘油三酯水平有着巨大的影响。载脂蛋白 A5 有两个等位基因(T,C),共有三种基因型(TT、TC、CC)^[4]。ApoA5 基因在国内外已有研究,主要集中在与血脂代谢、动脉粥样硬化及冠心病方面,其基因研究位点主要是-1131T>C、C56G,亦有少量文献报道 ApoA5 基因变异与脑梗死关系^[5],载脂蛋白 A5 对中枢神经系统有着不利的影响,是导致患者发生认知功能障碍的主要因素^[6]。而 IVS3+476G>A 位点与认知功能障碍的关系尚未见有文献报道。因此本文探究老年高血压患者认知功能障碍与 ApoA5 IVS3+476G>A 基因多态性的关系。报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2015 年 7 月至 2018 年 7 月于本院诊治的 90 例老年高血压患者。且分为老年高血压认知功能障碍组($n=40$)和认知正常组($n=50$)。正常组患者男性患者为 25 例,女性患者为 25 例,最小年龄为 65 岁,最大的年龄为 82 岁,平均年龄为(73.58±5.71)岁,文化程度初中及以下 16 例,高中 14 例,大学及以上 20 例,平均舒张压为(83.58±10.71) mmHg,平均收缩压为(143.89±18.74) mmHg;老年高血压认知功能障碍组患者男性患者为 20 例,女性患者为 20 例,最小年龄为 66 岁,最大的年龄为 83 岁,平均年龄为(74.85±5.14)岁。初中及以下 16 例,高中 9 例,大学及以上 15 例,平均舒张压为(84.78±10.25) mmHg,平均收缩压为(142.14±17.65) mmHg;两组患者一般资料及学历比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。纳入标准:①在未服用抗高血压药物的情况下,收缩压 ≥ 140 mmHg(1 mmHg=0.133 kPa)和(或)舒张压 ≥ 90 mmHg;②患

者依从性良好且所选患者临床资料完整。排除标准:①既往有高血压史,目前正在服用抗高血压药物,血压虽然 $<140/90$ mmHg,亦诊断为高血压,临床资料不完整者;②继发性高血压、严重心脏病和脑血管意外者、糖尿病、甲状腺功能异常等内分泌疾病、抑郁、严重视听功能障及失语者,中神经系统感染性疾病、脑外伤、颅内脚以及神经外科手术史者;③恶性肿瘤、肝肾功能不全、其他严重躯体疾病和精神疾病等患者。本研究所选患者均知情同意并签署知情同意书,研究经伦理委员会同意。

1.2 研究方法

1.2.1 一般资料的收集

采用调查问卷的形式收集患者的一般资料,即年龄、性别、身高、体重以及学历等因素,且询问患者的吸烟和饮酒史。

1.2.2 血压测量

按照 WHO 标准^[7],采用汞柱式标准袖带血压计对患者的血压情况进行测量,需测量 3 次,时间间隔控制在 2 min,取 3 次测量值的平均值作为患者的血压值。

1.2.3 认知功能的测定和分组

本文的认知功能障碍和认知功能正常分组标准如下:利用国际通用智力状况量表(Mini Mental state examination, MMSE)^[8]测定患者的认知功能。0~30 分是量表的评分范围,其中 ≤ 24 分者为认知功能障碍组, >24 分者为认知功能正常者。

1.2.4 载脂蛋白 A5 基因多态性检测

本文的载脂蛋白 A5 基因多态性检测为:利用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)技术测定患者的 ApoA5 基因。

1.2.4.1 标本采集及检测 所有研究对象均为入院后第二天清晨空腹坐位抽取肘静脉血两管各 3 mL,一管不抗凝,待血液凝固后,以 3 000 rpm 离心 10 min,分离血清。ApoA5 采用免疫透射比浊法,试剂盒由英国 RAnDOX 公司提供。全部测定工作在南宁市第一人民医院检验科完成,使用日立 7170 全自动生化分析仪进行检测。另一管用 EDTA 抗凝,低渗法裂解红细胞,离心获得白细胞,采用 DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA(ABI 公司,美国)。

1.2.4.2 引物设计与 PCR 依据 APO A5 基因的等位点的核苷酸碱基序列设计引物,正义链:5'-CTC AAG GCT GTC TTC AG-3'。反义链:5'-CCT TTG ATT CTG GGG ACTG G-3'(上海生工生

物工程有限公司合成)。PCR反应体系:总反应体系10 μL 中含有模板基因组1.0 μL , 2.5 \times buffer(含 Mg^{2+}) 4.0 μL , 4 \times dnTP 4.7 μL , taq酶 0.1 μL , 引物各0.2 μL 。反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性5 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 64 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s共35个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸10 min。取PCR产物约10 μL 用2%琼脂糖凝胶电泳后,结果约为280 bp大小的目标条带。

1.2.4.3 基因型分析 取PCR产物约5 μL 进行酶切,内切酶Fau I(由NEB公司提供)。酶切总反应15 μL 反应体系中含:10 \times NEB缓冲液1.5 μL , PCR产物5 μL ,内切酶0.8 μL 。反应条件:55 $^{\circ}\text{C}$ 温育3 h, 4%琼脂糖凝胶电泳。根据本所研究片段酶切位点,酶切结果:141 bp、114 bp、25 bp大小的三条带为纯合子TT型;141 bp、73 bp、41 bp、25 bp大小的四条带为杂合子TC型;141 bp、73 bp、41 bp、25 bp大小的两条带为纯合子CC型。为进一步证实PCR结果,将PCR产物及酶切产物进行基因测序(广州达安基因股份有限公司完成)。

1.3 统计学分析

采用SPSS 25.0进行数据分析;计量资料采用($\bar{x}\pm s$)表示,采用 t 检验;计数资料以 $n(\%)$ 表示,采用 χ^2 检验;比较影响因素采用单因素及Logistic多因素回归分析并筛选差异明显的危险因素;以统计学 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者的ApoA5 IVS3+476G>A位点多态性基因型频率比较

认知障碍组ApoA5 IVS3+476G>A位点多态性基因型频率与正常组比较,差异有统计学意义($P<0.05$),认知障碍组TC的频率和CC的频率明显高于认知正常组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表1。

表1 两组患者的ApoA5 IVS3+476G>A位点多态性基因型频率比较 [$n(\%)$]

组别	n	TT	TC	CC	χ^2 值	P 值
认知正常组	40	24(60.00)	14(35.00)	2(5.00)	13.050	0.001
认知障碍组	50	12(24.00)	28(56.00)	10(20.00)		

2.2 两组患者的ApoA5 IVS3+476G>A位点等位基因频率比较

认知障碍组ApoA5 IVS3+476G>A等位基因频

率与正常组比较,差异有统计学意义($P<0.05$),认知障碍组明显高于认知正常组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表2。

表2 两组患者的ApoA5 IVS3+476G>A位点等位基因频率比较 [$n(\%)$]

Table 2 Comparison of ApoA5 IVS3+476G>A locus allele frequency between 2 groups of patients [$n(\%)$]

组别	n	基因总数	T	C	χ^2 值	P 值
认知正常组	40	80	62(77.50)	18(22.50)	12.445	<0.001
认知障碍组	50	100	52(52.00)	48(48.00)		

2.3 高血压患者认知功能障碍因素分析

认知障碍组ApoA5 IVS3+476G>A基因的TT、TC、CC与认知功能障碍呈现出正向相关性($P<0.05$),文化程度是影响认知功能障碍的保护因素($P<0.05$)。见表3。

表3 高血压患者认知功能障碍影响因素

Table 3 Analysis of influencing factors of cognitive dysfunction in patients with hypertension

变量名称	β 值	OR值	95%CI	P 值
小学文化	-0.322	0.725	0.528~0.996	0.047
中学文化	-3.289	0.038	0.003~0.374	0.005
大专以上	-5.424	0.002	0.005~0.082	0.000
CC	0.1169	2.245	1.638~3.078	0.000
TT	-7.451	0.001	0.054~0.850	0.004
TC	0.538	1.741	1.587~5.347	0.046

3 讨论

高血压疾病具有诸多特点,如①血压变异性较大,患者极易发生低血压症状;②患者的收缩压增加,促使患者的脉压也在增加;③患者在患有高血压疾病时,其患有的并发症以及合并症也多,包含糖尿病、高血脂、高尿酸血症等。相关研究表明,30%~50%的高血压患者的致病因素为遗传因素。即该种疾病是环境因素与遗传因素相互作用的一种多基因遗传性疾病,其可以分为两种遗传形式,即显著遗传和多基因关联遗传^[9]。

ApoA5基因位于人类染色体11q23,长约2.5 Kb,与载脂蛋白A1/C3/A4基因簇紧密相连,组成一个基因家族。apoAV由肝脏特异性表达,分泌于血浆后存在于高密度脂蛋白、极低密度脂蛋白及乳糜颗粒中,生理情况下血液中apoAV浓度极低,仅有114~258 $\mu\text{g/L}$ 。多项研究表明,ApoA5基因多态性与TG升高、冠心病、脑梗死及代谢性疾病有一定的关联性且存在种族及地域差异^[10-12]。如今,高血压患者的认知功能障碍与载脂蛋白A5

基因多态性的关系成为了热门话题,且国内外的研究较少^[13]。本文认为载脂蛋白A5基因对于高血压患者认知功能障碍有着较大的影响,它是导致患者发生认知功能障碍的危险因素^[14]。且随着患者年龄的增加,患者的认知功能越来越低,如果患者具有较高的学历,其可以有效的预防高血压患者发生认知功能障碍症状^[15]。

多项研究表明,ApoA5基因位于人类的染色体11q23,长约2.5 kb,与载脂蛋白A1/C3/A4基因簇紧密相连,组成一个基因家族。ApoA5由肝脏特异性表达,分泌于血浆后存在于高密度脂蛋白(HDL)、极低密度脂蛋白(VLDL)及乳糜颗粒中,生理情况下血液中ApoA5浓度极低,仅有(114~258) $\mu\text{g/L}$ 。ApoA主要影响血浆TG代谢并呈负相关。敲除纯合子基因的小鼠的VLDL水平升高,相反,转染ApoA5基因的小鼠VLDL水平下降;而敲除杂合子基因的小鼠的VLDL水平介于纯合子基因敲除小鼠和野生型小鼠之间,以上这些结果均表明ApoA5基因对TG有负性调节作用。ApoA5基因多态性与TG升高、冠心病、脑梗死及代谢性疾病有一定的关联性且存在种族及地域差异,研究发现,ApoA5 IVS3+476G>A基因型是所有缺血性卒中的危险因素,其机制主要是通过提高TG水平,加速动脉粥样硬化进程,从而增加高血压的发生风险。目前国内尚无研究报道ApoA5 IVS3+476G>A位点与脑梗死的关系,中国汉族人群的高血压患者是否与ApoA5 IVS3+476G>A位点变异有关尚未明确。与国外关于白种人的ApoA5 IVS3+476G>A位点突变作为脑梗死危险因素的研究结果相似。

由于本实验例数较少,尚不能准确的反映APOA5基因IVS3+476G>A位点是否在我国汉族人群中存在突变,更无法进一步研究此位点突变是否与认知功能障碍的发生有关,有待进一步扩大样本研究。综上所述,本文的实验分析说明ApoA5 IVS3+476G>A基因多态性可能影响患者的认知功能,对深入研究高血压患者认知功能障碍具有着重要意义。同时对预防高血压患者发生认知功能障碍具有指导意义。综上所述,本文的实验分析说明ApoA5 IVS3+476G>A基因多态性可能影响患者的认知功能,对深入研究高血压患者认知功能障碍具有着重要意义。同时对预防高血压患者发生认知功能障碍具有指导意义。

参考文献

- [1] 王妍,冉炜,郭煦.中青年肥胖对高血压亚型患病率和同型半胱氨酸水平影响的研究[J].分子诊断与治疗杂志,2013,5(5):306-310.
- [2] 刘美玲,王晓春. CYP11B2及APOA5基因多态性与原发性高血压的相关性研究[J].临床心血管病杂志,2017,33(10):958-961.
- [3] 尹艳霞,尚文俊,郭华,等.轴突生长抑制因子A,核因子-kB p65对急性高血压脑出血患者病情及预后的评估[J].分子诊断与治疗杂志,2020,12(8):78-81+90.
- [4] 肖代敏,耿争光,杨昌伟,等.遵义汉族人群载脂蛋白A5基因多态性与高胆固醇血症的关系[J].中国动脉硬化杂志,2017,25(5):485-489.
- [5] Li S, Hu B, Wang Y, et al. Influences of APOA5 variants on plasma triglyceride levels in Uyghur population [J]. PLoS One, 2014, 9(10): e110258.
- [6] Can Demirdöğen B, Şahin E, Türkanoglu Özçelik A, et al. Apolipoprotein A5 polymorphisms in Turkish population: association with serum lipid profile and risk of ischemic stroke [J]. Mol Biol Rep, 2012, 39(12): 10459-10468.
- [7] 刘力生.中国高血压防治指南2010[J].中国医学前沿杂志(电子版),2011,3(5):42-93.
- [8] 谷新,鹿克凤,王祥华,等.苯磺酸左旋氨氯地平联合阿托伐他汀钙片治疗高血压合并冠心病疗效分析[J].临床军医杂志,2019,47(5):529-531.
- [9] 刘海松,温有锋.西藏藏族人群和汉族人群载脂蛋白A5-1131T>C多态性与机体脂肪含量的关系[J].安徽医科大学学报,2017,52(5):687-691.
- [10] Chokshi N, Blumenschein SD, Ahmad Z, et al. Genotype-phenotype relationships in patients with type I hyperlipoproteinemia[J]. J Clin Lipidol, 2014, 8(3): 287-295.
- [11] 赵一梅,刘海燕,刘莹莹,等.妊娠高血压患者血浆D-二聚体、凝血指标表达水平及临床意义[J].临床军医杂志,2019,47(8):875-876.
- [12] Shou W, Wang Y, Xie F, et al. A functional polymorphism affecting the APOA5 gene expression is causally associated with plasma triglyceride levels conferring coronary atherosclerosis risk in Han Chinese Population [J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1842(11): 2147-2154.
- [13] Jiang Y, He T, Deng W, et al. Association between apolipoprotein E gene polymorphism and mild cognitive impairment: a meta-analysis[J]. Clin Interv Aging, 2017, 12(3):1941-1949.
- [14] Sari MI, Sari DI. Nutrient Intake, Apolipoprotein A5 -1131T>C Polymorphism and Its Relationship with Obesity [J]. IOP Conference Series, 2017, 180(10):012094-012105.
- [15] Kefi R, Hechmi M, Dallali H, et al. Association of apolipoprotein A5 gene variants with metabolic syndrome in Tunisian population [J]. Ann Endocrinol (Paris), 2017, 78(3): 146-155.

· 论 著 ·

非小细胞肺癌患者血浆 LncRNA UCA1 与吉西他滨耐药相关性研究

韦瑞富

[摘要] **目的** 研究非小细胞肺癌患者血浆长链非编码 RNA(LncRNA) 上皮癌胚抗原 1(UCA1) 表达水平与吉西他滨耐药的相关性。**方法** 选取 2017 年 4 月至 2020 年 10 月本院收治的非小细胞肺癌患者 84 例, 随机分为吉西他滨组($n=43$, 予以吉西他滨/顺铂治疗)、紫杉醇组($n=41$, 予以紫杉醇/顺铂治疗), 治疗结束评估疗效, 并分为敏感亚组、中介亚组、耐药亚组, 采用实时荧光定量 PCR 法测定所有患者化疗前、化疗 1 个周期、化疗 2 个周期时血浆 LncRNA UCA1 表达水平。**结果** 吉西他滨组中化疗敏感 19 例, 中介 8 例, 耐药 16 例, 耐药亚组化疗后 LncRNA UCA1 表达水平高于敏感亚组、中介亚组, 差异有统计学意义($P<0.05$)。化疗后吉西他滨组疾病进展(PD)患者 LncRNA UCA1 表达水平高于完全缓解(CR)患者、部分缓解(PR)患者、疾病稳定(SD)患者, 差异有统计学意义($P<0.05$)。紫杉醇组不同化疗效果患者的 LncRNA UCA1 表达水平比较差异无统计学意义($P>0.05$)。化疗 1 个周期、2 个周期, 吉西他滨耐药亚组的 LncRNA UCA1 表达水平增加, 敏感亚组的 LncRNA UCA1 表达水平下降($P<0.05$), 而中介亚组的 LncRNA UCA1 表达水平无明显变化($P>0.05$)。**结论** 非小细胞肺癌患者血浆 LncRNA UCA1 表达水平与吉西他滨耐药有相关性, LncRNA UCA1 可作为预测吉西他滨耐药的标志物。

[关键词] 非小细胞肺癌; 长链非编码 RNA; UCA1; 吉西他滨; 耐药

Study on the correlation between plasma LncRNA UCA1 and gemcitabine resistance in patients with non-small cell lung cancer

WEI Ruifu

(Department of Internal Medicine, Dongfang Hospital of Dongfang City, Dongfang, Hainan, China, 572600)

[ABSTRACT] **Objective** To study the correlation between the expression level of long non-coding RNA (LncRNA) urothelial carcinoma associated antigen 1 (UCA1) and gemcitabine resistance in lung cancer patients with non-small cell lung cancer (NSCLC). **Methods** Between April 2017 and October 2020, 84 patients with NSCLC were selected and randomly divided into the gemcitabine group (43 cases treated with gemcitabine/cisplatin) and the paclitaxel group (41 cases treated with paclitaxel/cisplatin). After treatment, the curative effect was evaluated, and the patients were divided into the sensitive subgroup, the intermediary subgroup, and the drug-resistant subgroup. The expression levels of plasma LncRNA UCA1 in all patients before chemotherapy, after 1 cycle and 2 cycles of chemotherapy were determined by real-time fluorescent quantitative PCR method. **Results** In the gemcitabine group, 19 cases were chemotherapy sensitive, 8 cases were intermediary, and 16 cases were drug-resistant. The expression level of LncRNA UCA1 in the drug-resistant subgroup after chemotherapy was higher than that in the sensitive subgroup and the intermediary subgroup ($P<0.05$). After chemotherapy, the expression level of LncRNA UCA1 in patients with disease progression (PD) in gemcitabine group was higher than that in patients with complete remission (CR), partial remission (PR), and stable disease (SD), and the difference was statistically significant ($P<0.05$). There were no

基金项目: 海南省自然科学基金项目(2017CFB153)

作者单位: 海南省东方市东方医院内科, 海南, 东方 572600

通信作者: 韦瑞富, E-mail: xu927293tang7139@163.com

significant differences in the expression level of LncRNA UCA1 between patients with different chemotherapy effects in the paclitaxel group ($P>0.05$). After 1 cycle and 2 cycles of chemotherapy, the expression level of LncRNA UCA1 in the gemcitabine-resistant subgroup increased, but decreased in the sensitive subgroup ($P<0.05$). There is no significant change in the intermediate subgroup ($P>0.05$). **Conclusion** The expression level of plasma LncRNA UCA1 in patients with NSCLC is correlated with gemcitabine resistance. LncRNA UCA1 can be used as a marker to predict gemcitabine resistance.

[KEY WORDS] Non-small cell lung cancer; Long non-coding RNA; UCA1; Gemcitabine; Drug resistance

肺癌为全球发病率及致死率较高的恶性肿瘤,其中非小细胞肺癌占比较高。吉西他滨联合顺铂为中晚期肺癌患者的常用方案,但个体耐药性、化疗敏感性有差异,因而筛选与化疗药物敏感相关分子标志物,选择适宜方案是研究重点^[1]。长链非编码RNA(long non-coding RNA, LncRNA)在癌症发展过程中发挥重要作用,LncRNA异常表达可广泛调控基因表达,经参与X染色体沉默、基因组印迹及转录激活等途径,调控细胞增殖、分化及凋亡,参与肿瘤发生发展^[2]。尿路上皮癌胚抗原1(urothelial carcinoma associated 1, LncRNA UCA1)为尿路上皮癌中一类LncRNA,经靶向调控微小RNA(microRNA, miRNA)而影响癌症^[3]。研究发现,LncRNA UCA1在非小细胞肺癌中有重要临床意义,且对caspase-3/7活化和细胞凋亡诱导有一定影响^[4]。本文主要分析LncRNA UCA1与非小细胞肺癌患者吉西他滨耐药的相关性,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2017年4月至2020年10月本院收治的非小细胞肺癌患者84例。纳入标准:①符合非小细胞肺癌的相关诊断标准^[5],且经病理组织学检查确诊;②临床分期为ⅢB~Ⅳ期,且预计生存期>2年,卡氏评分(karnofsky performance status, KPS)^[6]>60分;③均有可客观评价的病灶,且美国东部肿瘤协作组(Eastern Cooperative Oncology

Group, ECOG)全身功能状态评分^[6]≤2分。排除标准:①合并严重心、肝、肾功能不全者;②合并恶性肿瘤或有精神障碍性疾病者;③未完成既定化疗方案或因不耐受化疗而中途退出者。研究经本院伦理委员会批准,患者均签署知情同意书。84例患者随机分为吉西他滨组($n=43$,予以吉西他滨/顺铂治疗)、紫杉醇组($n=41$,予以紫杉醇/顺铂治疗)。见表1。

1.2 方法

1.2.1 治疗方法

吉西他滨组予以吉西他滨/顺铂治疗:吉西他滨1000 mg/m²,第1 d、第8 d静滴;顺铂25 mg/m²,d1~d3静滴,以21 d为1个周期,连续治疗2个周期。紫杉醇组予以紫杉醇/顺铂治疗:紫杉醇150 mg/m²,d1静滴;顺铂25 mg/m²,d1~d3静滴。均以21 d为1个周期,连续治疗2个周期。

1.2.2 化疗疗效评定

依据世界卫生组织(world health organization, WHO)的实体瘤近期疗效评价标准^[6],分为完全缓解(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为化疗有效/敏感,以SD为化疗效果中介,以PD为化疗耐药。

1.2.3 血浆LncRNA UCA1表达水平测定

采集化疗前、化疗1个周期、化疗2个周期时的静脉血4 mL,4 000 r/min速率离心10 min,取上

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

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

组别	n	性别		年龄(岁)	临床分期		吸烟	饮酒	分化程度			病理类型	
		男	女		ⅢB	Ⅳ期			低	中	高	腺癌	鳞癌
吉西他滨组	43	28(65.12)	15(34.88)	54.15±5.63	23(53.49)	20(46.51)	31(72.09)	22(51.16)	20(46.51)	22(51.16)	1(2.33)	10(23.26)	33(76.74)
紫杉醇组	41	24(58.54)	17(41.46)	54.26±5.57	21(51.22)	20(48.78)	26(63.41)	18(43.90)	18(43.90)	19(46.34)	4(9.76)	8(19.51)	33(80.49)
χ^2 值		0.385		0.090	0.043		0.725	0.443		2.078			0.175
P值		0.535		0.928	0.835		0.394	0.505		0.354			0.676

层血浆置于无RNA酶的5 mL离心管, -80℃冰箱保存备用。采用Trizol™ LS Reagent(中国赛默飞世尔科技有限公司)提取总RNA后对RNA浓度进行检测,应用逆转录cDNA合成试剂盒(中国赛默飞世尔科技有限公司)合成cDNA。qRT-PCR仪检测血清中LncRNA UCA1表达水平,其引物序列为:上游引物为5'-TGCCAGCCTCAGCTTAATCC-3',下游引物5'-TCCCTGTTGCTAAGCCGATG-3',内参选择GAPDH,其上游引物为5'-AAGATGTTGCCAGGGAGGAC-3',下游引物5'-TGTCAGAAAGACTTCCCTGG-3'。反应条件:95℃预变性60 s,1个循环;95℃变性30 s,62℃退火30 s,72℃延伸20 s,共45个循环。采用实时荧光定量仪对LncRNA UCA1水平进行测定,以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算LncRNA UCA1的相对表达量。

1.3 统计学方法

采用SPSS 23.0软件对数据进行处理。计数资料采用 $n(\%)$ 表示,采用 χ^2 检验;计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,采用独立样本 t 检验、单因素方差分析及LSD- t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血浆LncRNA UCA1表达水平及与临床参数的关系

耐药亚组LncRNA UCA1表达水平高于中介亚组、敏感亚组,差异具有统计学意义($P < 0.05$),三组其他临床参数比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表2。

2.2 不同化疗效果患者的LncRNA UCA1表达水平

化疗后吉西他滨组不同化疗效果患者的LncRNA UCA1表达水平比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。紫杉醇组不同化疗效果患者的LncRNA UCA1表达水平比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表3。

2.3 LncRNA UCA1表达水平随化疗周期变化

化疗1个周期、2个周期,吉西他滨耐药亚组的LncRNA UCA1表达水平增加,敏感亚组的LncRNA UCA1表达水平下降($P < 0.05$),而中介亚组的LncRNA UCA1表达水平无明显变化($P > 0.05$)。化疗1个周期、2个周期耐药亚组LncRNA UCA1表达水平高于敏感亚组,中介亚组化疗2个周期LncRNA UCA1表达水平高于敏感亚组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表4。

表2 血浆LncRNA UCA1表达水平及与临床参数的关系
[$n(\%)$, ($\bar{x} \pm s$)]

Table 2 Expression level of plasma LncRNA UCA1 and its relationship with clinical parameters [$n(\%)$, ($\bar{x} \pm s$)]

临床资料	敏感亚组 ($n=19$)	中介亚组 ($n=8$)	耐药亚组 ($n=16$)	χ^2/F 值	P 值
性别					
男	10(52.63)	5(62.50)	13(81.25)	3.161	0.206
女	9(47.37)	3(37.50)	3(18.75)		
年龄(岁)	53.78±5.46	53.69±5.42	54.83±5.57	0.194	0.825
临床分期					
ⅢB	11(57.89)	5(62.50)	7(43.75)	1.019	0.601
Ⅳ期	8(42.10)	3(37.50)	9(56.25)		
吸烟	12(63.16)	6(75.00)	13(81.25)	1.454	0.483
饮酒	10(52.63)	4(50.00)	8(50.00)	0.029	0.985
分化程度					
低	9(47.37)	3(37.50)	8(50.00)	1.706	0.841
中	9(47.37)	5(62.50)	8(50.00)		
高	1(5.26)	0(0)	0(0)		
病理类型					
腺癌	5(26.32)	1(12.50)	4(25.00)	0.645	0.724
鳞癌	14(73.68)	7(87.50)	12(75.00)		
LncRNA UCA1	0.43±0.06	0.64±0.07	0.75±0.09	83.033	<0.001

表3 不同化疗效果患者的LncRNA UCA1表达水平
[$n(\%)$, ($\bar{x} \pm s$)]

Table 3 Expression level of LncRNA UCA1 in patients with different chemotherapy effects [$n(\%)$, ($\bar{x} \pm s$)]

化疗效果	吉西他滨组($n=43$)		紫杉醇组($n=41$)	
	例数	表达水平	例数	表达水平
CR	9(20.93)	0.38±0.05 ^{abc}	6(14.63)	0.53±0.07
PR	10(23.26)	0.47±0.06 ^{ab}	8(19.51)	0.55±0.06
SD	8(18.60)	0.64±0.07 ^a	14(34.16)	0.58±0.07
PD	16(37.21)	0.75±0.09	13(31.70)	0.60±0.07
F 值		60.573		1.825
P 值		<0.001		0.159

注:与PD比较,^a $P < 0.05$;与SD组比较,^b $P < 0.05$;与PR比较,^c $P < 0.05$ 。

表4 LncRNA UCA1表达水平随化疗周期变化($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Changes of the expression level of LncRNA UCA1 with chemotherapy cycle ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	化疗前	化疗1个周期	化疗2个周期
敏感亚组	19	0.64±0.07	0.57±0.08 ^a	0.43±0.06 ^{ab}
中介亚组	8	0.61±0.07	0.62±0.07	0.64±0.07 ^c
耐药亚组	16	0.65±0.07	0.70±0.06 ^{acd}	0.75±0.09 ^{acd}
F 值		456.712	22.357	18.697
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

注:与化疗前比较,^a $P < 0.05$;与化疗1周比较,^b $P < 0.05$;与敏感亚组比较,^c $P < 0.05$;与中介亚组比较,^d $P < 0.05$ 。

3 讨论

多数非小细胞肺癌患者在确诊时已处于晚期,吉西他滨为其一线化疗方案,但有效率仅25%左右,联合用药疗效也在50%左右^[7]。LncRNA为一类因缺乏开放阅读框架导致缺乏蛋白编码能力

的非编码 RNA, 其中 LncRNA UCA1 可在多种肿瘤中表达上调。Wang 等^[8]发现 LncRNA UCA1 在较多肿瘤抗癌药物耐药中起着关键作用, 下调 LncRNA UCA1 可恢复药物敏感性。

本研究结果这表明非小细胞肺癌患者 LncRNA UCA1 表达水平可能与其接受吉西他滨化疗的效果有相关性, 与顺铂无相关性。吉西他滨为细胞周期特异性抗代谢类药物, 其主要作用于 DNA 合成期的肿瘤细胞, 有抗癌谱广、毒副反应轻等特点。LncRNA UCA1 可通过调节上皮细胞-间充质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 及细胞凋亡参与肿瘤发生发展, 且和多种肿瘤耐药有关, 也可能参与吉西他滨耐药发展^[9]。早期 Liu 等^[10]发现沉默 LncRNA UCA1 可抑制肺癌细胞株 A549 细胞迁移和侵袭, 其作用机制可能与下调 EMT 有关。Jun 等^[11]则发现, LncRNA UCA1 可通过调节 microRNA-143 表达来调控肺癌细胞增殖、迁移和侵袭。

本研究也发现, 化疗 1 个周期、2 个周期, 吉西他滨耐药亚组的 LncRNA UCA1 表达水平增加, 敏感亚组的 LncRNA UCA1 表达水平下降, 而中介亚组的 LncRNA UCA1 表达水平无明显变化, 表明在化疗期间对非小细胞肺癌患者予以血浆 LncRNA UCA1 水平监测可能有利于帮助判断其化疗效果。吉西他滨在细胞内代谢过程较复杂, 有多种相关蛋白及因子参与, 近年来临床对肺癌耐药研究逐渐从蛋白质拓展至 RNA 及 DNA 水平^[12]。LncRNA UCA1 主要通过表观遗传学转录及转录后水平调控基因表达与翻译, 从而参与肿瘤生物学功能^[13-14]。本次也得出了相似结论, 因此认为 LncRNA UCA1 可能是未来非小细胞肺癌防治新策略的潜在靶点, 对其进行监测有重要意义。既往有研究^[15]发现, LncRNA UCA1 可抑制糖代谢的关键酶并促进肺腺癌的转移能力, 其可能成为肺癌新诊断指标及治疗靶点。Wu 等^[16]发现, Lnc RNA UCA1 可通过 microRNA-193a/HMGB1 轴促进肺癌细胞增殖、迁移。蔡华荣等^[17]的研究显示, LncRNA UCA1 可通过靶向调控 miR-185-5p 而促进非小细胞肺癌增殖、侵袭和转移, 其作用机制可能与 Wnt1/ β -catenin 信号通路激活有关。本研究因条件限制, 未作此方面的研究, 后期将进一步开展体外实验进行探讨。

综上所述, 非小细胞肺癌患者 LncRNA UCA1 与吉西他滨耐药有密切关系, LncRNA UCA1 可能是未来非小细胞肺癌防治新策略的潜在靶点。

参考文献

- [1] 李琳琳, 项保利, 薛乾隆, 等. 吉西他滨对非小细胞肺癌患者化疗疗效与其病理组织基因表达的相关性[J]. 中国临床药理学杂志, 2018, 34(7): 793-795+799.
- [2] 肖永平, 李庆科, 王兴昌, 等. LncRNA MCM3AP-AS1 靶向 miR-524-5p 在 CIK 细胞诱导肺癌细胞 A549 凋亡中作用机制研究[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(9): 1142-1146+1151.
- [3] Tang RX, Chen ZM, Zeng JJ, et al. Clinical implication of UCA1 in non-small cell lung cancer and its effect on caspase-3/7 activation and apoptosis induction in vitro[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2018, 11(5): 2295-2304.
- [4] Jun T, Zheng FS, Ren KM, et al. Suppression of long non-coding RNA UCA1 inhibits proliferation and invasion and induces apoptosis in human lung cancer cells[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018, 22(21): 7274-7281.
- [5] 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.
- [6] 王立文, 沈晓洁, 林彬. 非小细胞肺癌中 LncRNA MVIH 与吉西他滨耐药的相关性研究[J]. 重庆医学, 2017, 46(7): 946-948.
- [7] 王运, 翟展艺, 赵冲, 等. Zeste 基因同源蛋白 2 对非小细胞肺癌吉西他滨耐药性的影响[J]. 中华实验外科杂志, 2020, 37(8): 1481-1484.
- [8] Wang H, Guan Z, He K, et al. LncRNA UCA1 in anti-cancer drug resistance [J]. Oncotarget, 2017, 8(38): 64638-64650.
- [9] Esfandi F, Fallah H, Arsang-Jang S, et al. The expression of CCAT2, UCA1, PANDA and GHET1 long non-coding RNAs in lung cancer[J]. Rep Biochem Mol Biol, 2019, 8(1): 36-41.
- [10] Liu X, Huang Z, Qian W, et al. Silence of LncRNA UCA1 rescues drug resistance of cisplatin to non-small-cell lung cancer cells[J]. J Cell Biochem, 2019, 120(6): 9243-9249.
- [11] Jun T, Zheng FS, Ren KM, et al. Long non-coding RNA UCA1 regulates the proliferation, migration and invasion of human lung cancer cells by modulating the expression of microRNA-143 [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018, 22(23): 8343-8352.
- [12] Krug AK, Enderle D, Karlovich C, et al. Improved EGFR mutation detection using combined exosomal RNA and circulating tumor DNA in NSCLC patient plasma[J]. Ann Oncol, 2018, 29(3): 700-706.
- [13] 刘冰洁, 黄智, 张帅, 等. 长链非编码 RNA 尿路上皮癌相关基因 1 表达对宫颈癌顺铂耐药的影响[J]. 介入放射学杂志, 2019, 28(5): 448-453.
- [14] 王碧, 吉茂礼. 乳腺癌组织长链非编码 RNA UCA1 和 BCAR4 表达与辅助化疗效果的相关性研究[J]. 现代检验医学杂志, 2019, 34(5): 77-80.
- [15] 张卉, 王姝, 李雪娜, 等. 长链非编码 RNA UCA1 对肺腺癌 A549 细胞糖代谢及侵袭转移的影响[J]. 国际放射医学核医学杂志, 2020, 44(7): 435-440. (下转第 1054 页)

· 论 著 ·

磷酸西格列汀与瑞格列奈对2型糖尿病的疗效及对GLP-1的影响

龚为红* 叶云辉 刘红景

[摘要] **目的** 比较DPP-4抑制剂磷酸西格列汀与瑞格列奈对2型糖尿病(T2DM)患者的疗效以及对胰高血糖素样肽(GLP-1)的影响。**方法** 将2018年12月至2020年12月92例早期的2型糖尿病患者随机分为磷酸西格列汀组($n=46$)和瑞格列奈组($n=46$),分别给予12周磷酸西格列汀和瑞格列奈单药治疗,观察空腹血糖(FBG)、餐后血糖(PBG)、糖化血红蛋白(HbA1c)、体质指数(BMI)、平均动脉压(MAP)及GLP-1等指标的变化。**结果** 治疗后两组FBG、2hPG、HbA1c均有显著下降,瑞格列奈组FBG、HbA1c下降更明显,差异有统计学意义($P<0.05$);磷酸西格列汀组MAP、BMI指数较治疗前明显降低,GLP-1较治疗前明显增高,差异有统计学意义($P<0.05$),而瑞格列奈组治疗前后MAP、BMI指数、GLP-1比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 磷酸西格列汀与瑞格列奈单药治疗均能有效控制早期2型糖尿病患者血糖,瑞格列奈降糖方面更占优势,但磷酸西格列汀在降低体重、血压及改善胰岛功能上更占优势;瑞格列奈改善血糖与GLP-1无直接联系。

[关键词] 2型糖尿病;磷酸西格列汀;瑞格列奈 GLP-1

Efficacy of Sitagliptin Phosphate and Repaglinide on Type 2 Diabetes and the influence on GLP-1

GONG Weihong*, YE Yunhui, LIU Hongjing

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

[ABSTRACT] **Objective** To compare the efficacy of DPP-4 inhibitor sitagliptin and repaglinide in patients with early type 2 diabetes (T2DM) and the effect on GLP-1. **Method** December 2018 to December 2020 a total of 80 patients with early type 2 diabetes were randomly divided into the sitagliptin group ($n=46$) and the repaglinide group ($n=46$), and were given sitagliptin and repaglinide for 12 weeks, monotherapy. The changes of FBG, PBG, HbA1c, BMI, MAP, HOMR- β and GLP-1 were observed. **Result** After treatment, FBG, 2hPG, and HbA1c decreased significantly in the two groups. FBG and HbA1c decreased more significantly in the repaglinide group, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). The MAP and BMI indexes in the sitagliptin group were significantly lower than those before treatment, and the HOMR- β and GLP-1 were significantly higher than those before treatment, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). There was no significant difference in MAP, BMI index, and GLP-1 before and after treatment in the repaglinide group ($P>0.05$). **Conclusion** Both sitagliptin and repaglinide monotherapy can effectively control blood glucose in early type 2 diabetic patients. Repaglinide is more dominant in reducing blood sugar, but sitagliptin can reduce body weight, blood pressure and improve islet function. Repaglinide improves blood sugar and has no direct relationship with GLP-1.

[KEY WORDS] Type 2 diabetes; Sitagliptin; Repaglinide; GLP-1

作者单位:芜湖市第五人民医院内分泌科,安徽,芜湖 241000

*通信作者:龚为红, E-mail: gong18009637280@163.com

磷酸西格列汀(Sitagliptin Phosphate)为一类新型的肠促胰岛素类降糖药物,是2017年版中国糖尿病防治指南在二甲双胍基础上二联治疗的一线用药^[1],作为新型抗糖尿病药物,磷酸西格列汀与其它传统抗糖尿病药物的疗效比较研究报道并不鲜见。瑞格列奈(Repaglinide)单药在早期2型糖尿病(Type 2 diabetes, T2DM)的疗效比较研究在国内外并不多见。瑞格列奈作为世界上第一个餐时血糖调节剂,其按需促泌,模仿生理性胰岛素分泌,对恢复早相胰岛分泌功能从而改善血糖方面具有良好的疗效。磷酸西格列汀与瑞格列奈均为主要作用于餐时的促胰岛素分泌剂,而磷酸西格列汀主要是通过升高胰高血糖素样肽(Glucagon-like peptide-1, GLP-1)而发挥保护胰岛功能、改善血糖的作用,因此推测瑞格列奈是通过促进GLP-1分泌而具有模仿生理性胰岛素分泌的作用。国外曾有一篇报道指出^[2]“二甲双胍控制不良的2型糖尿病患者加用瑞格列奈与格列齐特治疗对GLP-1的影响”,结果发现二者对GLP-1无直接影响,而国内外无其他相关文献报道,值得进一步研究。

1 对象与方法

1.1 一般资料

2018年12月至2020年12月按1999年糖尿病诊断标准和分型^[3],筛查出的2型糖尿病患者92例,男50例,女42例,平均年龄(48.7±8.6)岁,BMI(25.62±3.06)kg/m²。随机将研究对象分为磷酸西格列汀组(男26例,女20例)和瑞格列奈组(男24例,女22例)。纳入标准:入选患者均未进行过降糖治疗,主观依从性好。排除标准:排除糖尿病急性并发症,急性严重感染,严重心、肝、肾功能不全,存在手术或其他应激情况者。研究获芜湖市第五人民医院伦理委员会批准,所有受试者均知情同意。

1.2 研究方法

治疗前:所有患者均在门诊治疗,进行糖尿病教育,问病史、体检、记录一般资料(身高、体重、血压),禁食至少12h清晨空腹行葡萄糖耐量试验(OGTT)及胰岛素释放试验、HbA1c、血脂、肝肾功能测定,OGTT后120min血样,室温静置,于1h内以3600r/min离心10min,提取血清,标本于-70摄氏度冰箱保存待测GLP-1。整个试验期不使用其他影响血糖的药物。短期治疗:两组均在饮食

控制及运动干预的基础上,分别给予磷酸西格列汀[规格:100mg,批号:国药准字J20140095 Merck Sharp & Dohme (Australia) Pty.Limited]100mg,1次/日,瑞格列奈[规格:2mg,批号:H20130021 诺和诺德(中国)制药有限公司]1mg,3次/日,餐前服用。整个实验过程中,所有受试者均被指导维持相同水平的能量摄入和体力活动。以空腹血糖(FBG)<6.1mmol/L为血糖控制目标,磷酸西格列汀[规格:100mg,批号:国药准字J20140095 Merck Sharp & Dohme (Australia) Pty.Limited]治疗组药物剂量不做调整,瑞格列奈治疗组:起始剂量为1mg,3次/日,如出现FPG≥6.0mmol/L,则增加瑞格列奈剂量,最高可调整至2mg,3次/日,每月调整1次药物剂量。观察不良反应及低血糖发生情况。低血糖症状定义为心慌、乏力、出冷汗,进食后缓解,低血糖定义为血糖小于3.9mmol/L,严重的低血糖反应定义为血糖小于3.0mmol/L,同时伴有抽搐、意识障碍或定向力障碍、昏迷等。治疗12周后所有患者重复检测治疗前基线观察指标。采用本院生化实验室自动生化分析仪测定血糖、血脂,采用本院内分泌科实验室离子交换高压液相色谱分析法测定HbA1c,化学发光法测定胰岛素,ELISA法检测GLP-1(上海联硕生物技术公司提供)。采用HOMA模型计算治疗前后胰岛β细胞功能指数HOMA-β=20XFINS/(FBG-3.5),胰岛素早期分泌指数,即 $\Delta I_{30}/\Delta G_{30}=(INS_{30}-INS_0)/(G_{30}-G_0)$,评价胰岛功能及早时相胰岛分泌功能;胰岛素抵抗指数(HOMA-IR=FINSaFPG/22.5)评价胰岛素抵抗程度。安全指标:肝肾功能均在本院相关实验室检测。FBG、PBG、HbA1c、TG、TC等的值可以改变血糖及胰岛素的大小。

1.3 统计学处理

使用SPSS 25.0对数据进行统计学处理;计量资料以($\bar{x}\pm s$)表示,两组间用 t 检验,多组间采用单因素方差检验;计数资料以 n 表示,采用 χ^2 检验;以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 疗效比较

试验共进行12周,瑞格列奈组有2例患者均因血糖控制良好自行停药脱落。两组的年龄、BMI、HbA1c和GLP-1等基线指标比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表1。

表1 两组患者基线时各指标的比较 ($\bar{x} \pm s$)Table 1 Comparison of indicators between 2 groups of patients at baseline ($\bar{x} \pm s$)

项目	磷酸西格列汀组(n=46)	瑞格列奈组(n=46)	t/ χ^2 值	P值
男/女	26/20	24/22	0.175	0.675
BMI(kg/m ²)	26.02±3.47	25.01±2.42	0.020	0.887
Wt(Kg)	69.40±15.53	68.54±9.35	0.009	0.993
MAP(mmHg)	101.10±12.70	103.90±12.10	-0.041	0.967
FBG(mol/L)	7.35±1.29	7.61±1.41	0.080	0.777
PBG(mol/L)	15.10±3.00	15.58±3.38	-0.020	0.886
HbA1c(%)	7.73±0.71	7.85±1.06	0.082	0.774
HOMR- β	54.20±22.28	45.88±37.76	0.043	0.836
$\Delta I_{30}/\Delta G_{30}$	4.06±2.35	2.60±2.39	0.032	0.975
HOMR-IR	3.21±1.65	2.82±1.59	0.269	0.789
TG(mmol/L)	2.64±2.49	3.18±3.25	0.125	0.900
TC(mmol/L)	5.12±0.98	5.55±1.34	0.161	0.688
HDL(mmol/L)	1.41±0.35	1.47±0.76	1.094	0.090
LDL(mmol/L)	2.51±0.94	2.59±1.10	2.881	0.080
GLP-1(0)(pg/mL)	116.44±21.22	119.15±21.95	-0.109	0.140
GLP-1(120)(pg/mL)	134.72±21.63	135.72±26.22	-0.048	0.776

2.2 两组治疗后一般资料及生化资料的比较

治疗12周后,两组FPG、2hPG、HbA1c较基线均下降,差异有统计学意义($P < 0.01$),但瑞格列奈组FPG、HbA1c下降更明显,差异有统计学意义($P < 0.05$)。磷酸西格列汀组BMI、MAP及TG均有下降,差异有统计学意义($P < 0.05$),而瑞格列奈组变化比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表2。

表2 两组治疗前后各指标的比较 ($\bar{x} \pm s$)Table 2 Comparison of indicators before and after treatment in 2 groups ($\bar{x} \pm s$)

项目	磷酸西格列汀组(n=46)		瑞格列奈组(n=46)	
	治疗后	降(升)幅	治疗后	降(升)幅
WHR	0.91±0.58 ^a	0.01±0.03	0.80±0.07	0.00±0.02
BMI(kg/m ²)	24.89±3.03 ^b	1.13±1.40	24.79±2.30	0.31±0.66 ^c
Wt(kg)	68.12±15.43 ^b	1.28±1.88	67.75±9.06	0.79±1.78
MAP(mmHg)	93.4±6.3 ^b	7.7±9.8	102.7±7.0	2.4±1.3 ^c
FBG(mol/L)	6.47±0.90 ^b	0.88±1.31	4.99±1.06 ^b	2.63±1.58 ^c
PBG(mol/L)	11.30±3.62 ^b	3.81±3.03	9.90±3.25 ^b	5.69±5.11
HbA1c(%)	6.65±0.40 ^b	1.08±0.87	5.87±0.58 ^b	1.98±1.00 ^c
HOMR- β	65.54±30.62 ^a	11.34±25.68	62.73±54.57	16.85±61.27
HOMR-IR	2.67±1.60	0.54±1.41	2.03±1.18 ^b	0.78±0.83
$\Delta I_{30}/\Delta G_{30}$	5.67±3.87 ^b	1.61±2.63	4.91±4.91 ^b	2.31±3.97
TG(mmol/L)	1.65±0.88 ^b	0.99±2.38	2.35±1.26	0.84±3.25
TC(mmol/L)	4.88±0.81	0.21±0.86	4.97±1.04 ^a	0.53±1.06
HDL(mmol/L)	1.41±0.36	0.00±0.26	1.31±0.31	0.16±0.76
LDL(mmol/L)	2.72±0.72	0.24±1.06	2.60±0.99	0.01±1.11

注:与治疗前比较,^a $P < 0.05$;两组变化量比较,表示^c $P < 0.05$ 。

2.3 两组治疗前后胰岛功能及GLP-1的比较

治疗后磷酸西格列汀组0及120 min GLP-1较治疗前均升高,差异有统计学意义($P > 0.05$);而瑞

格列奈组0及120 min GLP-1变化比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表3。

表3 两组患者治疗前后GLP-1的比较 ($\bar{x} \pm s$)Table 3 Comparison of GLP-1 before and after treatment in 2 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别		GLP-1(0分)	GLP-1(120分)
磷酸西格列汀(n=46)	治疗前	116.44±21.22	134.27±21.5
	治疗后	134.72±21.63	117.36±15.25
	t值	55.114	14.800
P值		0.000	0.000
瑞格列奈(n=46)	治疗前	119.15±21.95	154.7±24.13
	治疗后	135.72±26.22	123.2±19.35
	t值	31.619	63.149
P值		0.000	0.000

2.4 安全性比较

两组均未出现严重低血糖反应、严重胃肠道反应、肝肾功能损害及其他不能耐受的副作用,表明在本研究中两药均表现出了良好的耐受性。磷酸西格列汀组在受试期间有3例患者出现轻度腹胀不适、食欲下降,1例出现轻度头晕,均可耐受;瑞格列奈组有3例患者出现轻微低血糖症状(饥饿感,乏力),测血糖大于3.9 mmol/L,进食后均自行缓解。整个试验过程均无患者因不良反应退出。两组比较:磷酸西格列汀更易出现食欲下降,从而更有利于体重的控制,且低血糖症状的发生率较瑞格列奈低。

3 讨论

2型糖尿病是一种慢性进展性多系统性代谢性疾病。其主要的生理病理机制是胰岛素抵抗和胰岛 β 细胞功能缺陷导致的胰岛素分泌相对或绝对不足。此外,近来的研究表明^[3],磷酸西格列汀作为一种肠促胰岛素类药物,其主要通过抑制GLP-1的降解而发挥葡萄糖依耐性的降糖作用且在国外的诸多研究都被证明具有肯定的疗效和安全性^[4-5],meta分析表明磷酸西格列汀确有改善 β 细胞功能的作用^[6]。而瑞格列奈与磺脲类促泌剂不同的是^[7-8],它与胰岛素受体结合具有“快速结合、快速解离”的特点,且其促胰岛素分泌作用也具有葡萄糖依耐性,有离体动物实验证明其仅在3.0~10.0 mmol/L血糖浓度下才表现出显著增加胰岛素释放的功能,且其主要的代谢产物几乎不具降糖活性。

磷酸西格列汀与瑞格列奈对2型糖尿病的疗效,与胰岛素受体的作用特点还可防止对 β 细胞的过度刺激,从而起到了保护胰岛功能的作用。

用。此外,瑞格列奈能模仿生理性胰岛素分泌,明显改善T2DM患者早时相胰岛素分泌的质与量,有利于降低餐后血糖及全天的平均血糖波动幅度^[9]。新近研究发现二甲双胍可同时促进GLP-1分泌和增加其敏感性,其机制可能是由过氧化物酶体增殖物激活受体 α 介导的^[10-13]。而有研究表明格列奈类药物亦可激活过氧化物酶体增殖物受体 γ 基因,促进胰岛素分泌及改善胰岛素敏感性。

磷酸西格列汀与瑞格列奈对GLP-1的影响。本研究结果表明,磷酸西格列汀组体重及平均动脉压的下降可能均与磷酸西格列汀升高GLP-1水平作用有关,减少能量摄入从而降低体重^[14]。而GLP-1上升还可减少患者水钠摄入增加尿钠排出从而降低血压^[15]。磷酸西格列汀胰岛功能有所改善,同时刺激B细胞新生和增殖有关^[16]。由于瑞格列奈降糖作用更强,而GLP-1的变化差异无统计学意义,提示瑞格列奈改善血糖的机制与GLP-1无直接关系。本研究不良反应结果显示,磷酸西格列汀与瑞格列奈均具有良好的耐受性,前者饱腹症状较后者多,与国内余亚信、陈军等的研究结果一致。

综上所述,单用磷酸西格列汀与瑞格列奈在控制早期T2DM患者血糖各项指标及早相胰岛功能均具有良好的疗效,且依从性和耐受性高。较瑞格列奈相比,磷酸西格列汀在低血糖发生率、减轻体重和降低血压方面更具优势,且服药方便灵活,依从性好,是肥胖及或伴有高血压的糖尿病患者的优先选择。

参考文献

- [1] Tankova T, Koev D, Dakovska L, et al. The effect of repaglinide on insulin secretion and oxidative stress in type 2 diabetic patients[J]. *Diabet Res Clin Pract*, 2003, 59(1): 43-49.
- [2] Stephens JW, Bodvarsdottir TB, Wareham K, et al. Effects of short-term therapy with glibenclamide and repaglinide on incretin hormones and oxidative damage associated with postprandial hyperglycaemia in people with type 2 diabetes mellitus[J]. *Diabet Res Clin Pract*, 2011, 94(2): 199-206.
- [3] Holst JJ, Gromada J. Role of incretin hormones in the regulation of insulin secretion in diabetic and nondiabetic humans[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2004, 287(2): E199-206.
- [4] 白兴合,代玉川,刘平,等.慢性心力衰竭合并糖尿病患者血浆BNP、CRP和HbA1c的表达及与心功能分级的相关性[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2021, 13(1): 119-122+127.
- [5] Aschner P, Kipnes MS, Luceford JK, et al. Williams-Herman DE. Effect of the dipeptidyl peptidase-4 inhibitor sitagliptin as monotherapy on glycemic control in patients with type 2 diabetes[J]. *Diabet Care*, 2006, 29(12): 2632-2637.
- [6] Riche DM, East HE, Riche KD. Impact of sitagliptin on markers of beta-cell function: a meta-analysis[J]. *Am J Med Sci*, 2009, 337(5): 321-328.
- [7] 过依,顾卫琼,王卫庆,赵咏桔.不同胰岛素促泌剂对胰岛 β 细胞分泌胰岛素的影响. *中华内分泌代谢杂志*, 2005, 69(3): 206-210.
- [8] Hu S, Wang S, Fanelli B, et al. Pancreatic beta-cell K(ATP) channel activity and membrane-binding studies with nateglinide: A comparison with sulfonylureas and repaglinide[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2000, 293(2): 444-452.
- [9] Li Y, Xu L, Shen J, et al. Effects of short-term therapy with different insulin secretagogues on glucose metabolism, lipid parameters and oxidative stress in newly diagnosed Type 2 Diabetes Mellitus[J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2010, 88(1): 42-47.
- [10] Conventional triple therapy as good as etanercept for uncontrolled rheumatoid arthritis[J]. *BMJ*, 2013, 340(26): f3840.
- [11] 付慧清,王新颜,吴洁清,等.2型糖尿病患者HbA1c、25-OH-D3及T淋巴细胞亚群与胰岛素分泌的相关性分析[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2020, 12(12): 1713-1716+1721.
- [12] Lives lost with every 15 minute delay in thrombolysis after acute stroke[J]. *BMJ*, 2013, 340(103): f3962.
- [13] Why we can't trust clinical guidelines[J]. *BMJ*, 2013, 340(17): f3998.
- [14] Zander M, Madsbad S, Madsen JL, Holst JJ. Effect of 6-week course of glucagon-like peptide 1 on glycaemic control, insulin sensitivity, and beta-cell function in type 2 diabetes: a parallel-group study[J]. *Lancet*, 2002, 359(9309): 824-830.
- [15] Ogawa S, Ishiki M, Nako K, et al. Sitagliptin, a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, decreases systolic blood pressure in Japanese hypertensive patients with type 2 diabetes[J]. *Tohoku J Exp Med*, 2011, 223(2): 133-135.
- [16] Bulotta A, Hui H, Anastasi E, et al. Cultured pancreatic ductal cells undergo cell cycle re-distribution and beta-cell-like differentiation in response to glucagon-like peptide-1[J]. *J Mol Endocrinol*, 2002, 29(3): 347-360.
- [16] Wu H, Zhou C. Long non-coding RNA UCA1 promotes lung cancer cell proliferation and migration via microRNA-193a/HMGB1 axis[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 496(2): 738-745.
- [17] 蔡华荣,王志强,江跃全.长链非编码RNA UCA1靶向调控miR-185-5p对非小细胞肺癌A549细胞的作用及其机制[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2018, 25(6): 555-561.

(上接第1050页)

· 论 著 ·

急性胰腺炎患者血清 cf-DNA/NETs、MAP1-LC3、DPB 表达水平及临床意义

袁燕文 陈孟君* 许哲 黄妙兴 陈至操 叶衬轩

[摘要] **目的** 探究血清游离DNA/中性粒细胞胞外诱捕网(cf-DNA/NETs)、微管相关蛋白1轻链3(MAP1-LC3)、维生素D结合蛋白(DPB)在急性胰腺炎患者中的表达水平及临床意义。**方法** 收集2015年9月至2020年9月本院收治的急性胰腺炎患者150例,随访30d,根据预后分为生存组(138例)与死亡组(12例),比较两组临床资料、治疗前后血清cf-DNA/NETs、MAP1-LC3、DPB水平、急性生理与慢性健康评价系统II(APACHE II)评分、Ranson评分,分析血清cf-DNA/NETs、MAP1-LC3、DPB与APACHE II、Ranson评分相关性及各指标与急性胰腺炎患者预后的关系。**结果** 死亡组入院时、治疗3、7d后血清cf-DNA/NETs、MAP1-LC3高于生存组,DPB低于生存组,差异均有统计学意义($P<0.05$);死亡组入院时、治疗3、7d后APACHE II、Ranson评分高于生存组,差异有统计学意义($P<0.05$)。入院时、治疗3、7d后血清cf-DNA/NETs、MAP1-LC3与APACHE II、Ranson评分呈正相关,DPB与APACHE II、Ranson评分呈负相关($P<0.05$);入院时、治疗3、7d后血清cf-DNA/NETs、MAP1-LC3、DPB均为急性胰腺炎患者预后的影响因素($P<0.05$)。**结论** 急性胰腺炎患者血清cf-DNA/NETs、MAP1-LC3、DPB表达水平明显异常,且与患者APACHE II、Ranson评分及预后密切相关。

[关键词] 急性胰腺炎;游离DNA/中性粒细胞胞外诱捕网;微管相关蛋白1轻链3;维生素D结合蛋白

The levels of serum cf-DNA/NETs, MAP1-LC3, DPB in patients with acute pancreatitis and their clinical significance

YUAN Yanwen, CHEN Mengjun*, XU Zhe, HUANG Miaoxing, CHEN Zhicao, YE Chenxuan

(Department of Gastroenterology, Dongguan People's Hospital, Dongguan, Guangdong, China, 523000)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the expression levels and clinical significance of serum cell-free DNA/nertrophil extracellular traps (cf-DNA/NETs), microtubule-associated protein 1 light chain 3 (MAP1-LC3), vitamin D binding protein (DPB) in patients with acute pancreatitis. **Methods** From September 2015 to September 2020, 150 cases of acute pancreatitis in our hospital were collected. Followed up for 30 days, according to the prognosis, they were divided into the survival group (138 cases) and the death group (12 cases). The clinical data, serum cf-DNA/NETs, MAP1-LC3, DPB levels, acute physiology, and chronic health evaluation II (APACHE II) score, Ranson score before and after treatment were compared between the two groups. The correlation between serum cf-DNA/NETs, MAP1-LC3, DPB and APACHE II, Ranson score and the relationship between serum indicators and the prognosis of patients with acute pancreatitis were analyzed. **Results** Serum cf-DNA/NETs and MAP1-LC3 in the death group were higher than those in the survival group at admission, 3 and 7 days after treatment, and DPB was lower than that in the survival group. The difference was statistically significant ($P<0.05$). The APACHE II and Ranson scores of the death group were higher than those of the survival group at admission, 3 and 7 days after treatment, and the difference was

基金项目:东莞市科技计划项目(2015105101195)

作者单位:东莞市人民医院消化内科,广东,东莞523000

*通信作者:陈孟君, E-mail: mjchun@126.com

statistically significant ($P<0.05$). Serum cf-DNA/NETs and MAP1-LC3 were positively correlated with APACHE II and Ranson scores at admission, 3 and 7 days after treatment. DPB was negatively correlated with APACHE II and Ranson scores ($P<0.05$). Serum cf-DNA/NETs, MAP1-LC3 and DPB at admission, 3 and 7 days after treatment were all influencing factors for the prognosis of patients with acute pancreatitis ($P<0.05$).

Conclusion The expression levels of serum cf-DNA/NETs, MAP1-LC3 and DPB in patients with acute pancreatitis are abnormal, and are closely related to the patients' APACHE II, Ranson score and prognosis.

[KEY WORDS] Acute pancreatitis; cf-DNA/NETs; MAP1-LC3; DPB

急性胰腺炎为消化内科常见急症,具有较高病死率,尽早给予急性胰腺炎患者有效治疗对改善患者预后至关重要^[1-2]。急性胰腺炎患者体内有强烈的炎症应答,可能有促炎和抗炎反应失衡紊乱的现象^[3]。新近研究^[4]证实,中性粒细胞胞外诱捕网(Neutrophil extracellular traps, NETs)参与多种疾病的发生、发展,可捕杀人体内病原体,但同时也可造成自身细胞或组织损伤,急性胰腺炎患者血清中游离DNA/NETs(Cell-free DNA/NETs, cf-DNA/NETs)明显升高,且随着病情加重而升高。微管相关蛋白1轻链3(Microtubule-associated protein 1 light chain 3, MAP1-LC3)、维生素D结合蛋白(Vitamin D binding protein, DPB)也被证实参与急性胰腺炎的发生发展,可能有助于评估病情^[5-6]。本研究尝试探究血清cf-DNA/NETs、MAP1-LC3、DPB在急性胰腺炎患者中的表达水平及临床意义,旨在为临床治疗本病提供参考。报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集2015年9月至2020年9月本院收治的急性胰腺炎患者150例,随访30d,根据预后分为生存组(138例)与死亡组(12例),死亡组入院时间13~30d,平均(19.25±3.12)d。

纳入标准:①患者临床诊断符合《急性胰腺炎诊治指南(2014)》标准^[7]。②年龄>18岁;③发病48h入院并维持相关检测;④就诊前未进行任何治疗;⑤入院前3个月内无严重外伤或手术史;⑥患者及家属均知晓同意。排除标准①伴有严重颅脑损伤、心脏骤停等可能成为主要死因疾病者;②恶性肿瘤患者;③脓毒症患者;④自身免疫性疾病患者;⑤传染性疾病患者;⑥精神疾病患者;⑦合并原发性严重心脑肝肾功能障碍者;⑧妊娠或哺乳期女性;⑨贫血及营养不良。本实验经医院伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 血清指标检测方法

所有患者入院后均立即采集外周静脉血6mL,

取其中3mL离心处理(8cm半径,3500r/min转速)10min后取血清,置于-80℃冷藏室保存,由专业人员统一检测,采用PicoGreen荧光染料法,用荧光酶标仪(购自上海美谷分子仪器有限公司)测定荧光值,按照标准曲线计算血清cf-DNA/NETs水平;采用酶联免疫吸附试验检测血清MAP1-LC3、DPB水平,试剂盒购自北京百奥莱博科技有限公司。

1.2.2 治疗方法

所有采集静脉血标本后立即开展对症治疗,主要包括禁食、胃肠减压、纠正水电解质紊乱、改善微循环、预防性应用抗生素、并发症对症治疗等,并给予生长抑素治疗,剂量3mg/12h,通过微量注射泵持续静脉给药,单位输液量0.25mg/h,在患者临床症状缓解3d后停药。病情进展者根据患者具体情况积极调整治疗方案,治疗30d后统计预后情况。

1.3 观察指标

①两组临床资料,包括性别、年龄、身体质量指数(Body mass index, BMI)、发病原因、合并症。②两组入院时、治疗3、7d后血清cf-DNA/NETs、MAP1-LC3、DPB水平。③两组入院时、治疗3d、7d后急性生理与慢性健康评价系统II(APACHE II)评分^[8]、Ranson评分^[9]。④分析血清cf-DNA/NETs、MAP1-LC3、DPB与APACHE II、Ranson评分的相关性。⑤分析血清各指标与急性胰腺炎患者预后的关系。

1.4 统计学方法

采用SPSS 22.0软件进行数据处理,计数资料以 $n(\%)$ 表示,采用 χ^2 检验,计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,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Logistic进行多因素回归分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组临床资料

两组年龄、性别、BMI、发病原因、合并症比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表1。

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

Table 1 Comparison of clinical data between two groups

资料	生存组 (n=138)	死亡组 (n=12)	t/χ^2 值	P值
年龄(岁)	52.17±6.13	53.52±7.08	0.723	0.471
性别			0.014	0.907
男	95(68.84)	9(75.00)		
女	43(31.16)	3(25.00)		
BMI(kg/m ²)	22.79±1.81	23.02±2.03	0.418	0.676
发病原因			0.001	0.981
胆源性	80(57.97)	7(58.33)		
非胆源性	58(42.03)	5(41.67)		
合并症				
低氧血症	12(8.70)	2(16.67)	0.157	0.694
糖尿病	44(31.88)	3(25.00)	0.029	0.866
高血压	58(42.03)	6(50.00)	0.287	0.592

2.2 两组治疗前后血清 cf-DNA/NETs、MAP1-LC3、DPB 水平

死亡组入院时、治疗 3、7 d 后血清 cf-DNA/NETs、MAP1-LC3 较生存组高, DPB 较生存组低, 差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 2。

2.3 两组治疗前后 APACHE II、Ranson 评分

死亡组入院时、治疗 3、7 d 后 APACHE II、Ranson 评分较生存组高, 差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 3。

2.4 血清 cf-DNA/NETs、MAP1-LC3、DPB 与 APACHE II、Ranson 评分相关性

Pearson 相关性分析, 发现入院时、治疗 3、7 d 后血清 cf-DNA/NETs、MAP1-LC3 与 APACHE II、Ranson 评分间存在正相关关系, DPB 与 APACHE II、Ranson 评分间存在负相关关系($P<0.05$)。见表 4。

表3 两组治疗前后 APACHE II、Ranson 评分比较 $(\bar{x} \pm s, 分)$

Table 3 Comparison of APACHE II and Ranson scores between 2 groups before and after treatment $(\bar{x} \pm s, 分)$

组别	n	APACHE II 评分			Ranson 评分		
		入院时	治疗 3 d 后	治疗 7 d 后	入院时	治疗 3 d 后	治疗 7 d 后
死亡组	12	21.89±2.41	22.30±2.56	21.75±2.38	4.73±1.40	5.06±1.54	4.82±1.31
生存组	138	18.03±2.05	17.68±3.11	15.19±2.92	2.24±0.71	2.03±0.66	1.69±0.52
t 值		7.850	4.996	7.560	10.573	13.225	16.919
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

表4 血清 cf-DNA/NETs、MAP1-LC3、DPB 与 APACHE II、Ranson 评分相关性

Table 4 Correlation of serum cf-DNA/NETs, MAP1-LC3, DPB with APACHE II, Ranson score

时间	项目	cf-DNA/NETs		MAP1-LC3		DPB	
		r 值	P 值	r 值	P 值	r 值	P 值
入院时	APACHE II 评分	0.710	<0.001	0.704	<0.001	-0.703	<0.001
	Ranson 评分	0.725	<0.001	0.713	<0.001	-0.703	<0.001
治疗 3 d 后	APACHE II 评分	0.731	<0.001	0.759	<0.001	-0.734	<0.001
	Ranson 评分	0.802	<0.001	0.730	<0.001	-0.801	<0.001
治疗 7 d 后	APACHE II 评分	0.794	<0.001	0.810	<0.001	-0.826	<0.001
	Ranson 评分	0.833	<0.001	0.806	<0.001	-0.849	<0.001

表2 两组治疗前后血清 cf-DNA/NETs、MAP1-LC3、DPB 水平比较 $(\bar{x} \pm s)$

Table 2 Comparison of serum cf-DNA/NETs, MAP1-LC3, DPB levels before and after treatment in 2 groups $(\bar{x} \pm s)$

时间	组别	例数	cf-DNA/NETs ($\mu\text{g/L}$)	MAP1-LC3 (ng/L)	DPB (mg/L)
入院时	死亡组	12	1482.35±304.58	1.10±0.23	401.37±56.71
	生存组	138	1108.28±251.39	0.81±0.20	469.16±80.25
	t 值		4.860	4.761	2.861
	P 值		<0.001	<0.001	0.001
治疗 3 d 后	死亡组	12	1423.57±426.59	1.13±0.21	398.10±73.45
	生存组	138	928.28±264.20	0.72±0.16	487.53±102.77
	t 值		5.887	8.295	2.945
	P 值		<0.001	<0.001	0.004
治疗 7 d 后	死亡组	12	1379.40±403.86	1.06±0.17	405.48±76.29
	生存组	138	620.71±202.55	0.57±0.13	506.22±113.43
	t 值		11.262	12.206	3.013
	P 值		<0.001	<0.001	<0.001

2.5 血清 cf-DNA/NETs、MAP1-LC3、DPB 与急性胰腺炎患者预后的关系

以急性胰腺炎患者预后作为因变量(生存=0, 死亡=1), 入院时、治疗 3、7 d 后血清 cf-DNA/NETs、MAP1-LC3、DPB 作为自变量, 纳入 Logistic 回归方程, 结果显示, 入院时、治疗 3、7 d 后血清 cf-DNA/NETs、MAP1-LC3、DPB 与急性胰腺炎患者预后显著相关($P<0.05$)。见表 5。

3 讨论

NETs 是活化的中性粒细胞与颗粒蛋白结合形成细胞外网状结构, 在病原体入侵或感染人体过程中, 中性粒细胞被激活, 导致血液中 cf-DNA/

表5 血清 cf-DNA/NETs、MAP1-LC3、DPB 与急性胰腺炎患者预后的关系

变量	β 值	S.E. 值	Wald χ^2 值	OR 值	95%CI	P 值	
入院时	cf-DNA/NETs	1.489	0.436	11.658	4.431	2.718~7.224	<0.001
	MAP1-LC3	1.466	0.502	8.523	4.330	2.341~8.009	<0.001
	DPB	-0.798	0.244	10.685	0.450	0.268~0.757	<0.001
治疗 3 d 后	cf-DNA/NETs	1.952	0.581	11.291	7.045	4.116~12.058	<0.001
	MAP1-LC3	1.837	0.492	13.936	6.275	3.812~10.331	<0.001
	DPB	-0.615	0.175	12.366	0.540	0.342~0.854	<0.001
治疗 7 d 后	cf-DNA/NETs	2.142	0.525	16.639	8.512	4.822~15.027	<0.001
	MAP1-LC3	2.089	0.491	18.097	8.075	4.307~15.139	<0.001
	DPB	-0.499	0.123	16.431	0.607	0.401~0.920	<0.001

注:因入院时、治疗 3 d、7 d 后 APACHE II、Ranson 评分与血清 cf-DNA/NETs、MAP1-LC3、DPB 多重共线性较强(VIF 值=10),故纳入 Logistic 回归方程时将入院时、治疗 3 d、7 d 后 APACHE II、Ranson 评分剔除,此时 VIF 值=3,多重共线性较弱。

NETs 含量明显升高,而 NETs 可通过捕获血液及组织中病原体发挥良好抗菌作用,但也会引起机体上皮及内皮细胞损伤^[10]。闫雪梅^[11]通过对 48 例脓毒症患者开展的一项健康对照研究,发现脓毒症患者血浆 cf-DNA/NETs 水平明显升高,可作为脓毒症某时期反映炎症损伤程度的标志物。支持本研究结果。

相关研究^[12]指出,急性胰腺炎发生发展过程中自噬信号通路参与胰酶的激活,MAP1-LC3 介导了自噬的形成过程。本研究结果推断 MAP1-LC3 可能参与急性胰腺炎的病情进展。MAP1-LC3 是自噬信号通路的关键蛋白,具有调控自噬体形成的作用,其表达量越高表明自噬程度越高^[13],胰腺组织的自身消化作用越严重,从而促进急性胰腺炎病情进展,增加患者病死风险。

本研究还发现不同预后急性胰腺炎患者的血清 DPB 水平存在明显差异,患者预后越差血清 DPB 水平越低,与国内相关研究^[14]结果一致。DPB 是机体内参与维生素 D 合成与代谢的重要因子,在机体异常患者体内肌动蛋白、内毒素和异常细胞的清除过程中并发挥重要作用。笔者认为,急性胰腺炎发生后胰腺内存在明显炎症,病情严重者甚至发生胰腺组织坏死,导致胰腺细胞内肌动蛋白被释放,DPB 因与大量肌动蛋白结合导致血液系统中 DPB 含量明显减少,且 DPB 在发挥清除内毒素的过程中被大量消耗,因此血清 DPB 水平可在一定程度上反映胰腺损伤情况。

此外,本研究通过 Logistic 回归分析,发现随着血清 cf-DNA/NETs、MAP1-LC3 水平的升高、血清 DPB 水平的降低,患者病死风险逐渐增加,进一步证实各指标参与急性胰腺炎的病情进展。

APACHE II、Ranson 评分均为评估急性胰腺炎患者病情程度的工具,本研究进一步通过相关性分析发现急性胰腺炎早期血清 cf-DNA/NETs、MAP1-LC3 与 APACHE II、Ranson 评分呈正相关,DPB 与 APACHE II、Ranson 评分呈负相关,提示早期检测各指标有助于评估患者疾病程度。

综上可知,血清 cf-DNA/NETs、MAP1-LC3、DPB 水平与急性胰腺炎患者疾病转归情况密切相关,早期检测各指标表达水平可在一定程度上指导医生预测患者预后情况,具有较高临床应用价值。但本研究仍存在一定不足,如未设置健康对照、样本量较少,研究结果仍需通过多中心大样本研究进一步验证。

参考文献

- [1] Leppäniemi A, Tolonen M, Tarasconi A, et al. 2019 WSES guidelines for the management of severe acute pancreatitis [J]. World J Emerg Surg, 2019, 14(1):27.
- [2] 吴艳朋,丁勇,候军. 生长抑素辅助治疗急性胰腺炎患者的疗效分析[J]. 热带医学杂志, 2018, 18(11):1474-1477.
- [3] 王长起,李凯,索胜利. 血尿淀粉酶,CRP,Card9 蛋白在 AP 患者中的变化及其意义[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(1):107-110.
- [4] 陈广生,赵琳,何凤棣,等. 重症急性胰腺炎 cf-DNA/NETs、sTREM-1 及 GP-2 α 水平与病情关系[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2020, 34(6):50-53.
- [5] 夏乐,李春华,沈佳庆. BISAP 评分联合 TG、MAP1-LC3 对急性胰腺炎预后的预测价值[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2018, 26(12):1009-1012.
- [6] 周静,程军. 超声结合血清维生素 D 结合蛋白检测在急性胰腺炎诊断中的价值[J]. 安徽医药, 2018, 1(22):104-107.
- [7] 中华医学会外科学分会胰腺外科学组. 急性胰腺炎诊治指南(2014)[J]. 中国实用外科杂志, 2015, 35(1):4-7.

(下转第 1062 页)

CGRP、EGF及TGF- β 1与创伤性骨折患者应激状态及骨折愈合的关系

周伟 罗亮 向勇 阳运康*

[摘要] 目的 探讨降钙素基因相关肽(CGRP)、表皮生长因子(EGF)及转化生长因子- β 1(TGF- β 1)与创伤性骨折患者应激状态、骨折愈合的关系研究。方法 选取2017年5月-2019年5月在本院进行治疗的116例创伤性骨折患者设为观察组根据预后分为愈合良好组($n=62$),愈合不良组($n=54$),选取同期本院的120例健康体检者设为对照组。对比不同组别CGRP、EGF、TGF- β 1水平及应激指标水平,分析CGRP、EGF、TGF- β 1与应激指标、LaneSandhuX线评分的相关性。结果 观察组CGRP、EGF、TGF- β 1、MDA水平明显高于对照组,SOD水平明显低于对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。愈合良好组CGRP、EGF、TGF- β 1、MDA水平明显低于愈合不良组,SOD水平明显高于愈合不良组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。CGRP、EGF及TGF- β 1与SOD水平呈负相关($P<0.05$),与MDA水平呈正相关($P<0.05$)。CGRP、EGF及TGF- β 1水平与Lane-Sandhu X线评分呈负相关($P<0.05$)。结论 CGRP、EGF、TGF- β 1水平可作为观察创伤性骨折患者应激反应、骨折愈合情况的重要指标。

[关键词] CGRP; EGF; TGF- β 1; 创伤性骨折; 应激状态

The relationship of CGRP, EGF and TGF- β 1 with stress state and fracture healing in patients with traumatic fracture

ZHOU Wei, LUO Liang, XIANG Yong, YANG Yunkang*

(Department of Bone and Joint Surgery, the Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan, China, 646000)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the relationship between the levels of calcitonin-generelated peptide (CGRP), epidermal growth factor (EGF) and transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) and stress state and fracture healing in patients with traumatic fractures. **Methods** The 116 patients with traumatic fractures treated in this hospital from May 2017 to May 2019 were selected as the observation group. According to the prognosis, they were divided into a well-healed group ($n=62$) and a poor-healed group ($n=54$). 120 subjects with healthy physical examination in this hospital during the same period were selected as the control group. The levels of CGRP, EGF, TGF- β 1 and stress index levels in different groups were compared, and the correlation between CGRP, EGF, TGF- β 1 and stress indexes and LaneSandhu X-ray score was analyzed. **Results** The levels of CGRP, EGF, TGF- β 1, and MDA in the observation group were significantly higher than those in the control group, and the SOD level was significantly lower than that in the control group, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). The levels of CGRP, EGF, TGF- β 1, and MDA in the well-healing group were significantly lower than those in the poor-healing group, and the SOD levels were significantly higher than those in the poor-healing group, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). CGRP, EGF and TGF- β 1 were negatively correlated with SOD levels ($P<0.05$), and positively correlated with MDA levels ($P<0.05$). The levels of CGRP, EGF and TGF- β 1 were negatively correlated with Lane-

基金项目:四川省应用基础研究基金(2017JY0215)

作者单位:西南医科大学附属医院骨与关节外科,四川,泸州 646000

*通信作者:阳运康, E-mail: droyyk@163.com

Sandhu X-ray score ($P<0.05$). **Conclusion** The levels of CGRP, EGF and TGF- β 1 can be used as important indicators to observe the stress response and fracture healing in patients with traumatic fractures.

[KEY WORDS] CGRP; EGF; TGF- β 1; Traumatic fracture; Stress state

随着经济的发展,机动车量的增多,创伤性骨折发生率不断上升,临床多采用影像学检查(数字X线摄影、电子计算机断层扫描)确诊^[1-2]。机体发生创伤性骨折后,会发生不同程度的应激反应,若不及时予以干预措施,会增加患者发生深静脉血栓的风险,不利于骨结构重建,影响患者康复^[3]。降钙素基因相关肽(Calcitonin-related peptide, CGRP)是一种神经肽,国外文献报道,CGRP是神经系统影响骨代谢及骨重建的重要因子,可促进骨损伤修复^[4]。相关研究报道,表皮生长因子(Epidermal Growth Factor, EGF)及转化生长因子- β 1(Transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)参与骨愈合的过程^[5-6]。本研究旨在探讨CGRP、EGF及TGF- β 1与创伤性骨折患者应激状态、骨折愈合的相关性,以期为临床治疗创伤性骨折提供指导。报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2017年5月至2019年5月在本院进行治疗的116例创伤性骨折患者设为观察组。纳入标准:①均经X线检查,确诊为创伤性骨折,并符合骨科相关诊断标准^[7];②临床资料及影像资料完整;③年龄在80岁以下。排除标准:①凝血功能障碍者、合并心、肝、肾等重要器官严重疾病者;②纳入研究前服用过影响CGRP、EGF及TGF- β 1水平的药物者;③合并其他器官严重创伤者、全身感染性疾病者;④治疗依从性不佳者。

治疗4个月后根据LaneSandhuX线评分^[8]评估患者骨折愈合情况,分为愈合良好组($n=62$),其中男38例,女24例;平均年龄(48.39 ± 6.03)岁;骨折部位:上肢骨折35例、下肢骨折27例。愈合不良组($n=54$),其中男34例,女20例;平均年龄(48.50 ± 6.09)岁;骨折部位:上肢骨折31例、下肢骨折23例。观察组男72例,女44例;平均年龄(48.65 ± 6.12)岁;骨折部位:上肢骨折63例、下肢骨折53例。选取同期本院的120例健康体检者设为对照组,男53例,女67例;平均年龄(48.73 ± 6.19)岁。2组基线资料比较差异无统计学意义($P>$

0.05)。本研究经医院伦理委员会批准,受试者均签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 CGRP、EGF及TGF- β 1检测方法

观察组在入院第2日清晨空腹、对照组在体检当日清晨空腹抽取静脉血3 mL,常温1 000 r/min、离心10 min,分离血清及血浆,样本置于 -20°C 下保存待检。采用葡萄糖氧化酶法检测CGRP水平,放射免疫法检测EGF及TGF- β 1水平。检测仪器为日立全自动生化分析仪检测,相关试剂盒采购于北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2.2 应激指标检测方法

采用ELISA试剂盒(赛默飞世尔有限公司)检测所有研究对象血清氧化应激指标:超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和丙二醛(malondialdehyde, MDA),检测过程依据说明书进行。

1.2.3 骨折愈合标准

由两名放射科医师采用LaneSandhuX线评分标准^[8]评估患者的骨折愈合情况,该评分包括骨形成、连接及塑性三个方面,分值为0~12分,分值越高则表明骨折愈合程度越高。观察CGRP、EGF及TGF- β 1与骨折愈合进度的相关性。

1.4 统计学方法

采用SPSS 22.0软件进行统计分析,计量资料以($\bar{x}\pm s$)表示,采用 t 检验;计数资料以 $n(\%)$ 表示,采用 χ^2 检验;采用Pearson直线相关分析CGRP、EGF及TGF- β 1与创伤性骨折患者Lane-Sandhu X线评分的相关性;以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2组CGRP、EGF、TGF- β 1及应激指标水平比较

观察组CGRP、EGF、TGF- β 1、MDA水平明显高于对照组,SOD水平明显低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表1。

2.2 不同骨折愈合情况的患者CGRP、EGF、TGF- β 1水平、应激指标水平比较

愈合良好组CGRP、EGF、TGF- β 1、MDA水平明显低于愈合不良组,SOD水平明显高于愈合不良组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表2。

表1 2组 CGRP、EGF、TGF-β1 及应激指标水平水平对比 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of CGRP, EGF, TGF-β1 and stress index levels between the two groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	CGRP (pg/mL)	EGF (μg/L)	TGF-β1 (μg/L)	SOD (nU/mL)	MDA (μmol/L)
观察组	116	63.25±6.89	1.34±0.32	45.12±5.26	72.65±4.32	6.32±0.78
对照组	120	37.67±5.68	0.53±0.15	8.89±1.88	90.05±5.25	2.22±0.54
t值		31.165	25.031	70.916	27.751	47.082
P值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

表2 不同骨折愈合情况的患者 CGRP、EGF、TGF-β1 水平、应激指标水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of CGRP, EGF, TGF-β1 levels and stress index levels in patients with different fracture healing conditions ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	CGRP (pg/mL)	EGF (μg/L)	TGF-β1 (μg/L)	SOD (nU/mL)	MDA (μmol/L)
愈合良好	116	53.45±6.24	1.12±0.28	40.25±4.81	76.65±4.68	5.89±0.70
愈合不良	120	75.45±8.45	1.68±0.43	51.36±5.75	62.35±4.10	6.67±0.89
t值		20.414	8.412	11.330	17.382	5.278
P值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

2.3 CGRP、EGF 及 TGF-β1 与应激指标水平相关性分析

CGRP、EGF 及 TGF-β1 与 SOD 水平呈负相关 ($P<0.05$), 与 MDA 水平呈正相关 ($P<0.05$)。见表3。

表3 CGRP、EGF 及 TGF-β1 与应激指标水平相关性分析
Table 3 Correlation Analysis of CGRP, EGF, TGF-β1 and stress index levels

指标	CGRP		EGF		TGF-β1	
	r值	P值	r值	P值	r值	P值
SOD	-0.656	0.025	-0.465	0.019	-0.521	0.011
MDA	0.589	0.027	0.568	0.015	0.653	0.009

2.4 GRP、EGF 及 TGF-β1 与 Lane-Sandhu X线评分的相关性

CGRP ($r=-0.568$)、EGF ($r=-0.325$) 及 TGF-β1 水平 ($r=-0.631$) 与 Lane-Sandhu X线评分呈负相关 ($P<0.05$)。见图1。

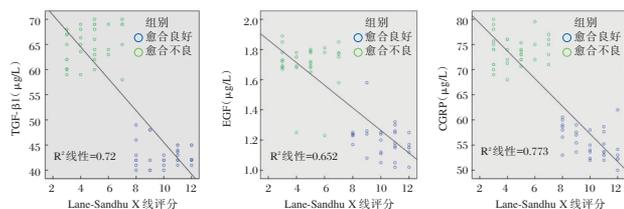


图1 CGRP、EGF 及 TGF-β1 与 Lane-Sandhu X线评分的相关性分析

Figure 1 Correlation Analysis of CGRP, EGF, TGF-β1 and lane Sandhu X-ray score

3 讨论

发生创伤性骨折时, 患者机体内会发生一些急性期反应, 会导致实验室相关指标水平变化^[9]。本研究重点分析不同愈合情况的创伤性骨折患者血清 CGRP、EGF 及 TGF-β1 水平情况, 确定创伤性骨折患者应激反应及骨折愈合情况是否与 CGRP、EGF 及 TGF-β1 水平存在关系。

CGRP 是一种神经肽, 在骨组织中分布较广, 多项研究表明 CGRP 在骨代谢及骨损伤病理过程中发挥重要作用^[10]。CGRP 可通过与靶细胞表面的受体结合, 发挥功能作用^[11]。本研究中, 愈合良好组 CGRP 水平显著低于愈合不良组, 这一研究结果与 Mollahosseini 等学者^[12]报道结果相一致。Lee 等学者^[13]通过动物实验得出, 颅骨骨折的大鼠血清 CGRP 水平明显高于正常大鼠, 且局部 CGRP mRNA 表达明显升高。可见血清 CGRP 浓度的变化对骨折愈合意义重大。

国外文献报道, 在创伤组织修复过程中, 细胞因子可调节局部细胞的活性以促进细胞增殖^[14]。有学者发现, EGF 是由炎症细胞以及单核细胞分泌而来的细胞因子, 其能对细胞成纤维细胞以及表皮细胞等产生有效的修复作用, 并可促进细胞分裂增殖及向骨细胞转化, 加速骨折的修复^[15]。TGF-β1 可促进胶原合成, 同时还能够增加非胶原蛋白合成, 如纤维连接蛋白、胶状蛋白与内皮素, 调节整合素, 促进细胞外基质蛋白合成, 促进骨折愈合。

SOD 为体内重要活性物质, 对创伤性患者骨折后的愈合进度具有积极作用, MDA 能有效反映体内脂质过氧化程度, 两者的检测能有效地反应出患者机体应激反应^[16]。Lane-Sandhu X线评分为临床常用的评估骨折患骨形成、骨连接、骨塑型情况的标准^[17]。检索国内外文献, 尚未见 CGRP、EGF、TGF-β1 水平与 SOD、MDA、Lane-Sandhu X线评分相关的报道。本研究结果显示, CGRP、EGF、TGF-β1 与 SOD 水平、Lane-Sandhu X线评分呈负相关, 与 MDA 水平呈正相关。可见, CGRP、EGF、TGF-β1 与创伤性骨折患者应激反应程度、骨折愈合情况密切相关。因此, 在患者骨折发生后2周左右检测 CGRP、EGF、TGF-β1 水平是评估患者预后状态的最佳时机。

综上所述, CGRP、EGF、TGF- β 1 可作为观察创伤性骨折患者应激反应、骨折愈合情况的重要指标, 临床需加强动态加测创伤性骨折患者 CGRP、EGF、TGF- β 1 水平。后续将扩大研究范围, 进一步分析 CGRP、EGF、TGF- β 1 对评估创伤性骨折患者应激反应程度、骨折愈合情况的灵敏度及特异度, 增加诊断准确性。

参考文献

- [1] Zhu MZL, Mannambeth RV, Mcgiffin DC, et al. Traumatic fracture dislocation of the thoracic spine sparing both the spinal cord and aorta[J]. ANZ J Surg, 2019, 15(23):85-89.
- [2] 孙贵耀, 张雪华, 乔晓光, 等. 密骨方对股骨粗隆间骨折患者 TGF- β 1 与骨折愈合的影响[J]. 川北医学院学报, 2019, 34(1):81-84.
- [3] Beaudoin C, Moore L, Gagné M, et al. Performance of predictive tools to identify individuals at risk of non-traumatic fracture: a systematic review, meta-analysis, and meta-regression[J]. Osteoporosis Int, 2019, 23(15):85-89.
- [4] Zhao-Min L, Ah TSL, Bailing C, et al. Dietary sugar intake does not pose any risk of bone loss and non-traumatic fracture and is associated with a decrease in all-cause mortality among Chinese elderly: Finding from an 11-year longitudinal study of Mr. and Ms. OS Hong Kong [J]. Bone, 2018, 116(22):154-161.
- [5] 冯洋, 陈跃平, 章晓云, 等. 骨生长因子调控骨折愈合机制及在骨再生修复中的作用[J]. 中国组织工程研究, 2019, 23(4):613-620.
- [6] 何峰, 张文菊, 唐毓金, 等. PA、TGF- β 1 及 ACTH 在创伤性骨折中的表达及临床意义[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2021, 13(4):659-662+666.
- [7] Cavada MN, Patel N. Isolated Traumatic Fracture of the Malleus Handle Causing Hearing Fluctuation[J]. AM J Otol Neurol, 2019, 40(13):36-39.
- [8] 张昊, 徐新禹, 崔秀洁, 等. RRM1、PDCD-5、VEGF 对非小细胞肺癌放疗后近期疗效及预测价值[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2021, 13(2):191-194+198.
- [9] 王裕祥, 王卫东, 杨应忠, 等. NGF、转化生长因子 β 1、成纤维细胞生长因子在骨折愈合中的作用效果分析[J]. 湖南师范大学学报(医学版), 2018, 15(3):101-104.
- [10] 陈懿, 袁太珍, 陈晟. 血清 OPG、RANKL、PDGFs、BMP-2、BMP-7、TGF- β 1、bFGF 水平与骨折愈合的关系[J]. 中国伤残医学, 2020, 27(8):8-10.
- [11] 王艳, 黄磊, 董传菲, 等. 制动与失神经对兔胫骨生物力学性能及降钙素基因相关肽表达的对比研究[J]. 中国康复医学杂志, 2018, 32(5):67-72.
- [12] Mollahosseini M, Ahmadi-rad H, Goujani R, et al. The Association Between Traumatic Brain Injury and Accelerated Fracture Healing: A Study on the Effects of Growth Factors and Cytokines[J]. J Mol Neurosci, 2020, 15(8):1-7.
- [13] Lee G, Han MS, Lee SK, et al. Traumatic intradural ruptured lumbar disc with a spinal compression fracture: A case report[J]. Medicine, 2020, 99(7):190-198.
- [14] Albrecht JS, Kibria GA, Ann Gruber-Baldini, et al. Risk of Mortality in Individuals with Hip Fracture and Traumatic Brain Injury[J]. J AM Geriatr Soc, 2019, 67(1):36-39.
- [15] Slentz DH, Rajjoub L, Domanski M. Atraumatic Delayed Orbital Hematoma Sixteen Years After Orbital Floor Fracture Repair With Porous Polyethylene Implant [J]. J Craniofac Surg, 2019, 30(2):37-42.
- [16] Loewenstern J, Kessler RA, Caridi J. Diabetes Comorbidity Increases Risk of Postoperative Complications in Traumatic Thoracic Vertebral Fracture Repair: A Propensity Score Matched Analysis[J]. World Neurosurg, 2018, 121(13):367-373.
- [17] Alas H, Segreto FA, Chan HY, et al. The Association between Frailty Status and Odontoid Fractures Following Traumatic Falls: Investigation of Varying Injury Mechanisms among 70 Elderly Odontoid Fracture Patients [J]. J Orthop Trauma, 2019, 33(12):1-9.

(上接第 1058 页)

- [8] Martos-Benítez FD, Cordero-Escobar I, Soto-García A, et al. APACHE II score for critically ill patients with a solid tumor: A reclassification study[J]. Rev Esp Anestesiol Reanim (Engl Ed), 2018, 65(8):447-455.
- [9] Abaylı B, Gençdal G, Değirmencioglu Ş. Correlation between neutrophil/lymphocyte ratio and Ranson score in acute pancreatitis[J]. J Clin Lab Anal, 2018, 32(6):e22437.
- [10] Gao F, Hui J, Yang L, et al. Changes in neutrophil function in septic liver injury and its effect on prognosis: a prospective observational study [J]. Chin Critical Care Med, 2019, 31(11):1324-1329.
- [11] 闫雪梅. 脓毒症患者 cf-DNA/NETs、炎症细胞亚群以及血清 IL-6、IL-10 水平变化的意义[J]. 检验医学与临床, 2020, 17(4):537-539.
- [12] 陈莹, 李越. BISAP 评分联合血清 TG、MAP1-LC3 检测对急性重症胰腺炎患者病情及预后的评估价值[J]. 山东医药, 2020, 60(1):27-30.
- [13] 郭长红. MAP1LC3 在宫颈癌、子宫内膜癌、卵巢上皮癌、乳腺癌发病中作用的研究进展[J]. 山东医药, 2018, 58(32):108-110.
- [14] 丁虎. 血清维生素 D 结合蛋白对急性胰腺炎的预警效应及其变化机制研究[J]. 蚌埠医学院学报, 2020, 45(2):70-72.

磁共振扩散张量成像联合 1H-MRS 技术在 HIE 诊断及病情评估中的应用

于洪福* 尹超 姜云飞

[摘要] **目的** 探究磁共振扩散张量成像(DTI)联合氢质子磁共振波谱(1H-MRS)技术在新生儿缺氧缺血性脑病(HIE)诊断及病情评估中的应用。**方法** 选取本院 HIE 患儿 108 例作为观察组,另选取同期高胆红素血症患儿 54 例作为对照组。比较两组、观察组不同病情程度患儿 DTI、1H-MRS 技术参数,并对比观察组不同病情程度患儿神经行为发育(NBNA)评分,分析 DTI、1H-MRS 技术参数与病情程度、NBNA 评分相关性以及对 HIE 诊断价值。**结果** 内囊后肢、内囊前肢、胼胝体压部、胼胝体膝部、半卵圆中心、额叶白质、豆状核各向异分数(FA)值、基底节区、额叶区 N-乙酰天门冬氨酸/肌酸(NAA/Cr)、NAA/胆碱复合物(NAA/Cho)与 HIE 患儿病情程度呈负相关,与 NBNA 评分呈正相关($P<0.05$)。内囊后肢、胼胝体压部、额叶白质 FA 值、基底节区 NAA/Cr、NAA/Cho 联合诊断 HIE 的 AUC 为 0.888。**结论** DTI 联合 1H-MRS 技术可为新生儿 HIE 早期诊断、病情程度评估提供有效影像学信息。

[关键词] 磁共振扩散张量成像;氢质子磁共振波谱技术;新生儿缺氧缺血性脑病;各向异分数值

Application of MRI diffusion tensor imaging combined with 1H-MRS technology in HIE diagnosis and disease assessment

YU Hongfu*, YIN Chao, JIANG Yunfei

(Department of CT, MRI Room, Fuyang Women and Children's Hospital, Fuyang, Anhui, China, 236000)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the application of diffusion tensor imaging (DTI) combined with 1H-magnetic resonance spectroscopy (1H-MRS) in the diagnosis and assessment of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy (HIE). **Methods** 108 children with HIE in our hospital were selected as the observation group, and 54 children with hyperbilirubinemia in the same period were selected as the control group. The DTI and 1H-MRS technical parameters of children with different disease levels in the two groups and the observation group were compared. The neonatal behavioral neurological assessment (NBNA) scores of children with different disease levels in the observation group were compared, and the correlation between DTI and 1H-MRS technical parameters and disease severity, NBNA scores and the diagnostic value of HIE were analyzed. **Results** The fractional anisotropy (FA) value of the posterior limb of internal capsule, anterior limb of internal capsule, splenium of corpus callosum, knee of corpus callosum, centrum semiovale, white matter of frontal lobe and lenticular nucleus, N-acetylaspartic acid/creatine (NAA/Cr) and NAA/choline complex (NAA/Cho) in basal ganglia and frontal lobe were negatively correlated with the severity of the disease in children with HIE, and positively correlated with the NBNA score ($P<0.05$). The AUC of the combined diagnosis of HIE by FA value of posterior limb of internal capsule, splenium of corpus callosum, white matter of frontal lobe, NAA/Cr and NAA/Cho in basal ganglia was 0.888. **Conclusion** DTI combined with 1H-MRS technology can provide effective imaging information for early diagnosis of neonatal HIE and assessment of disease severity.

[KEY WORDS] Magnetic resonance diffusion tensor imaging; 1H-magnetic resonance spectroscopy; Neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy; Fractional anisotropy value

基金项目:安徽省医学会急诊临床研究项目(ky2018009)

作者单位:阜阳市妇女儿童医院 CT、MRI 室,安徽,阜阳 236000

*通信作者:于洪福, E-mail:yu13275589799@163.com

新生儿缺氧缺血性脑病(Hypoxic ischemic encephalopathy, HIE)是导致新生儿死亡、遗留永久性神经缺陷的重要原因^[1-2]。目前临床诊断新生儿HIE 主要根据患儿窒息史、阿氏评分(Apgar)<5分、神经系统体征异常等,但其存在一定主观性,缺少量化指标。近年来,随影像学技术持续发展,磁共振成像(Magnetic Resonance Imaging, MRI)逐渐成为多种疾病的重要检查手段^[3],但在脑损伤评估方面存在延迟性。磁共振扩散张量成像(diffusion tensor imaging, DTI)可呈现脑白质纤维束损伤程度,定量判断脑损伤与脑髓鞘发育程度。氢质子磁共振波谱(1H-magnetic resonance spectroscopy, 1H-MRS)技术通过分子水平可弥补常规MRI 检查缺点,无创定量评价活体器官组织代谢及生化代谢物^[4],然而关于其与DTI联合对新生儿HIE 的诊断价值临床鲜有报道。基于此,本研究尝试分析DTI联合1H-MRS 技术参数在新生儿HIE 诊断及病情评估中的应用效果。详情如下。

1 资料和方法

1.1 一般资料

选取本院2018年1月至2020年6月HIE 患儿108例作为观察组,另选取同期正常新生儿54例作为对照组。其中观察组女45例,男63例,日龄平均(3.46±0.65)d;对照组女20例,男34例,胎龄平均(39.25±0.37)周。两组性别、日龄等基本资料均衡可比(P>0.05)。本院伦理委员会经审核评议同意所有研究对象监护人均签署知情同意书。

纳入标准:①观察组均符合《新生儿缺氧缺血性脑病诊断标准》^[5]中HIE 诊断标准;②对照组无围生期窒息史与宫内窘迫史及羊水Ⅲ度污染;未出现持续≥5 min胎心<100次/min;出生后1 min、5 min Apgar 分均≥8分。排除标准:①合并中枢系统异常、神经系统感染或染色体病症者;②先天畸形或遗传代谢障碍者;③电解质紊乱、颅内出血或产伤等原因所致抽搐者;④血红蛋白<120 g/L者;⑤监护人精神行为异常。

1.2 方法

两组检查前均由儿科医生对新生儿检查耐受情况进行评估,以保证安全性。于检查前20~30 min 注射(3~5)mg/kg 苯巴比妥钠,棉花团填塞外耳道,固定头部。应用GE360 1.5T 超导型MR成

像仪,选择头颅专用线圈,行仰卧位,头朝向进场方向。扫描参数:①DTI:采用单次激发自旋回波-回波平面成像、矢状位3D-T1WI 序列,回波时间/重复时间为88/2 700 ms,层距/层厚为1.0/4.0 mm,矩阵为128×128,弥散敏感梯度方向数30个,b 值为1 000 s/m²,视野为180 mm×180 mm。②1H-MRS 技术:采用液体衰减反转恢复序列、轴位T1WI-自旋回波、快速自旋回波T2 加权像序列对颅顶至颅底扫描,层距/层厚为1.0/4.0 mm,矩阵为512×512,视野为180 mm×180 mm,层数15层;液体衰减反转恢复序列回波时间/重复时间为94/8 500 ms;T2WI 序列回波时间/重复时间为95/5 500 ms。采集总时间为6 min 45 s。将上述所得数据传至工作站进行后处理,在内囊后肢、内囊前肢、胼胝体压部、胼胝体膝部、半卵圆中心、额叶白质及豆状核选取感兴趣区域,计算各向异分数(FA)值,并获取1H-MRS 图,自动测量基底节区、额叶区N-乙酰天门冬氨酸(NAA)、肌酸(Cr)、胆碱复合物(Cho)峰下面积,人工计算NAA/Cr、NAA/Cho、Cho/Cr 值,上述均测量3次取平均值。见图1。

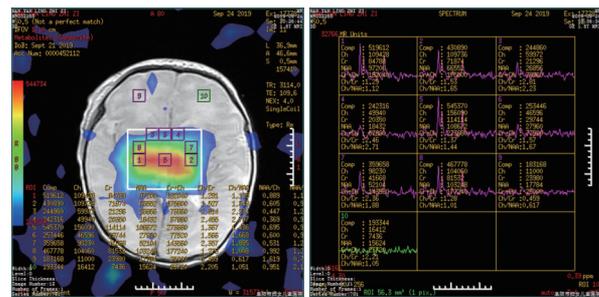


图1 感兴趣区域的测量

Figure 1 Measurement of the region of interest

1.3 观察指标

①比较两组DTI、1H-MRS 技术参数。②比较观察组不同病情程度患儿DTI、1H-MRS 技术参数及神经行为发育(neonatal behaviors neurological assessment, NBNA)评分,其中病情程度根据MRI 表现进行评估^[6]:皮质及皮质下沿脑回发现细条状、斑点状异常信号为轻度;伴有上述轻度表现外,深部脑白质发现对称性片状、点状异常信号为中度;伴有上述中度表现外,基底神经节区信号异常,存在内囊后肢T1WI 低信号,弥漫性脑水肿,脑室内出血且系统扩大为重度;NBNA 评分包括一般状态、原始反射、被动肌张力、主动肌张力及行为能力,共20项,每项0~2分,得分与神经行为发育呈

负相关。③分析DTI、1H-MRS技术参数与HIE患儿病情程度、NBNA评分相关性。④分析DTI参数、1H-MRS技术参数对HIE的诊断价值。

1.4 统计学方法

采用统计学软件SPSS 22.0处理数据,计量资料以($\bar{x} \pm s$)描述,两组间比较采用独立样本 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析;计数资料用 $n(\%)$ 表示, χ^2 检验;相关性分析采用Pearson相关系数模型;诊断效能分析采用受试者工作特征(ROC)曲线,获取曲线下面积(AUC),联合诊断实施Logistic二元回归拟合,返回预测概率logit(p),将其作为独立检验变量。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组DTI、1H-MRS技术参数

观察组内囊后肢、内囊前肢、胼胝体压部、胼胝体膝部、半卵圆中心、额叶白质FA值、基底节区、额叶区NAA/Cr、NAA/Cho低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表1。

2.2 观察组不同病情程度患儿DTI、1H-MRS技术参数及NBNA评分

观察组内囊后肢、内囊前肢、胼胝体压部、胼胝体膝部、半卵圆中心、额叶白质FA值、基底节区、额叶区NAA/Cr、NAA/Cho、NBNA评分随病情程度增加呈逐渐降低趋势($P < 0.05$)。见表2。

表1 两组DTI、1H-MRS技术参数比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of DTI and 1H-MRS technical parameters of the two groups ($\bar{x} \pm s$)

参数	观察组($n=108$)	对照组($n=54$)	t 值	P 值
DTI参数(FA值)				
内囊后肢	0.492±0.027	0.533±0.036	8.124	<0.001
内囊前肢	0.391±0.018	0.408±0.022	5.253	<0.001
胼胝体压部	0.603±0.014	0.613±0.015	4.184	<0.001
胼胝体膝部	0.570±0.020	0.592±0.027	5.851	<0.001
半卵圆中心	0.236±0.031	0.258±0.020	4.741	<0.001
额叶白质	0.233±0.022	0.260±0.025	7.032	<0.001
豆状核	0.140±0.019	0.142±0.016	0.664	0.507
1H-MRS技术参数				
基底节区				
NAA/Cr	0.96±0.05	1.02±0.06	6.727	<0.001
NAA/Cho	0.74±0.06	0.80±0.07	5.670	<0.001
Cho/Cr	1.13±0.15	1.15±0.17	0.765	0.064
额叶区				
NAA/Cr	1.20±0.09	1.28±0.10	5.138	<0.001
NAA/Cho	0.68±0.07	0.79±0.12	7.358	<0.001
Cho/Cr	1.63±0.18	1.61±0.17	0.679	0.498

2.3 DTI、1H-MRS技术参数与HIE患儿病情程度、NBNA评分相关性

Pearson相关性分析,内囊后肢、内囊前肢、胼胝体压部、胼胝体膝部、半卵圆中心、额叶白质FA值、基底节区、额叶区NAA/Cr、NAA/Cho与HIE患儿病情程度呈负相关,与NBNA评分呈正相关($P < 0.05$)。见表3。

2.4 DTI联合1H-MRS技术参数对HIE诊断价值

选取DTI诊断价值最优的参数与1H-MRS技术诊断价值最优的参数获取联合诊断AUC为0.888,95%CI为0.829~0.947,敏感度为86.11%,特异度为81.48%,优于各参数单独诊断($P < 0.05$)。见图2。

表2 观察组不同病情程度患儿DTI、1H-MRS技术参数及NBNA评分比较($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of DTI, 1H-MRS technical parameters and NBNA scores of children with different disease levels in the observation group ($\bar{x} \pm s$)

参数	轻度患儿($n=43$)	中度患儿($n=36$)	重度患儿($n=29$)	F 值	P 值
DTI参数(FA值)					
内囊后肢	0.511±0.020	0.494±0.016	0.460±0.013	78.080	<0.001
内囊前肢	0.405±0.013	0.393±0.010	0.370±0.008	90.347	<0.001
胼胝体压部	0.614±0.015	0.602±0.011	0.591±0.007	32.572	<0.001
胼胝体膝部	0.584±0.017	0.569±0.014	0.552±0.010	42.972	<0.001
半卵圆中心	0.253±0.012	0.238±0.009	0.211±0.006	162.631	<0.001
额叶白质	0.248±0.014	0.237±0.008	0.209±0.009	110.748	<0.001
豆状核	0.143±0.022	0.140±0.019	0.138±0.023	0.502	0.607
1H-MRS技术参数					
NAA/Cr	1.02±0.05	0.94±0.03	0.90±0.02	97.204	<0.001
NAA/Cho	0.79±0.06	0.75±0.04	0.66±0.05	56.130	<0.001
Cho/Cr	1.11±0.13	1.12±0.15	1.17±0.18	1.467	0.235
NAA/Cr	1.29±0.04	1.18±0.12	1.09±0.14	33.449	<0.001
NAA/Cho	0.75±0.10	0.66±0.07	0.60±0.05	32.595	<0.001
Cho/Cr	1.65±0.21	1.63±0.20	1.60±0.16	0.573	0.566
NBNA评分(分)	34.15±2.38	28.03±2.17	21.46±2.04	284.468	<0.001

表3 DTI、1H-MFA值RS技术参数与HIE患儿病情程度、NBNA评分相关性

Table 3 Correlation between DTI, 1H-MFA value, RS technical parameters, disease severity and NBNA score in children with HIE

项目	病情程度		NBNA评分		
	r值	P值	r值	P值	
FA值	内囊后肢	-0.724	<0.001	0.763	<0.001
	内囊前肢	-0.539	<0.001	0.597	<0.001
	胼胝体压部	-0.703	<0.001	0.726	<0.001
	胼胝体膝部	-0.558	<0.001	0.594	<0.001
	半卵圆中心	-0.642	<0.001	0.683	<0.001
基底节区	额叶白质	-0.601	<0.001	0.655	<0.001
	NAA/Cr	-0.715	<0.001	0.730	<0.001
	NAA/Cho	-0.631	<0.001	0.722	<0.001
额叶区	NAA/Cr	-0.656	<0.001	0.679	<0.001
	NAA/Cho	-0.584	<0.001	0.613	<0.001

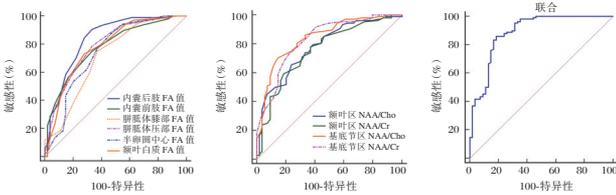


图2 各参数对HIE诊断价值

Figure 2 The diagnostic value of each parameter to HIE

3 讨论

调查显示,HIE所致脑白质发育不良与髓鞘化功能障碍是患儿遗留脑性瘫痪、智力障碍等后遗症的主要因素^[7]。DTI是目前唯一无创性探讨活体脑白质纤维的MR技术,以各向异性为基础,可有效反映缺氧缺血所致脑白质损伤程度^[8]。FA值是DTI常用描述参数,可评价脑组织水分子扩散状态,其水平越靠近1,代表扩散趋于各向异性,表明纤维束细胞膜、髓鞘及轴索功能完整性越好^[9]。本研究通过对比研究可知,与正常新生儿比较,HIE患儿内囊后肢、内囊前肢、胼胝体压部、胼胝体膝部、半卵圆中心、额叶白质FA值更低,结合黄莹^[10]、黄珍欢等^[11]研究推测这可能归因于缺血缺氧影响脑部细胞与组织内线粒体供能,破坏细胞膜离子梯度,造成髓鞘功能障碍,甚至缺损、坏死,进而减少轴突生长数量,引起轴突生长障碍,损坏脑白质纤维束完整性,从而降低水分子各向异性程度,主要表现为FA值下降。由于豆状核为灰质,轴突髓鞘与脑白质纤维含量较少,扩散呈各向同性,故HIE患儿豆状核FA值未发生明显改变。

1H-MRS可从细胞水平上了解缺血缺氧发生时脑代谢物变化情况,为临床评估脑损伤提供细胞能量代谢、神经元功能等相关信息^[12-13]。NAA、Cr、Cho为1H-MRS常见代谢产物。本研究数据表明,HIE患儿基底节区、额叶区NAA/Cr、NAA/Cho较低,与郭莉莉等^[14]观点具有相似性,并随病情程度加重、NBNA评分下降而降低,这主要是由于HIE患儿脑损伤可增加线粒体功能障碍发生风险,释放大葡萄糖,诱发无氧酵解,促使大量丙酮酸向乳酸转化,进而引起氧化磷酸化不足、细胞酸中毒,造成神经元破坏或丢失,相应减少NAA、Cho含量。而HIE患儿基底节区、额叶区Cho/Cr未发生明显变化可能与检查时间点不一、脑白质急性期损伤不明显等因素有关。然而采用DTI、1H-MRS技术单一诊断效能均存在一定局限性,故本研究尝试选取DTI诊断价值最优的参数与1H-MRS技术诊断价值最优的参数做联合诊断,结果显示,内囊后肢、胼胝体压部、额叶白质FA值、基底节区NAA/Cr、NAA/Cho联合诊断新生儿HIE AUC值最大,为0.888,优于各参数单独诊断。提示可见DTI联合1H-MRS技术可进一步为临床提供更为可靠的诊断方式。

综上可知,DTI联合1H-MRS技术可无创定量反映脑白质结构损伤情况,为新生儿HIE早期诊断、病情程度评估提供有效影像学信息。但由于选取时间限制,本研究选取病例数较少,今后需扩大样本量对研究结果做进一步论证。

参考文献

- [1] Yildiz EP, Ekici B, Tatlı B. Neonatal hypoxic ischemic encephalopathy: an update on disease pathogenesis and treatment[J]. Exp Rev Neurother, 2017, 17(5): 449-459.
- [2] 方汉贞,陈镇城,黄日华,等. 磁共振在新生儿缺氧缺血性脑病中的应用[J]. 广东医学, 2019, 40(9): 1326-1329.
- [3] 孟兆伟,王洪涛,管唯唯. MRI在肝癌合并肝硬化经皮穿刺射频消融效果及术后复发中的预测价值[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(6): 786-789, 798.
- [4] 王宏,许建铭,秦明明,等. 多体素磁共振波谱成像在早产儿脑发育研究中的价值探讨[J]. 临床放射学杂志, 2019, 38(3): 516-522.
- [5] 中华医学会儿科学分会新生儿学组. 新生儿缺氧缺血性脑病诊断标准[J]. 中华儿科杂志, 2005, 43(8): 584-584.
- [6] 杜奕. 1H-MRS在足月新生儿缺氧缺血性脑病中的应用及其与NBNA评分的相关性[D]. 银川:宁夏医科大学, 2014:1-44.
- [7] 潘鸿,於志华,侯春晓. 磁共振扩散张量成像技术在新生儿缺氧缺血性脑病诊断中的价值[J]. 中国妇幼保健, 2020, 35(21): 4136-4139.

(下转第1070页)

· 论 著 ·

骨髓细胞形态学、M蛋白定量及免疫固定电泳在MM患者诊断中的应用

崇翔^{1*} 曾慧² 万晓婷¹

[摘要] 目的 分析骨髓细胞形态学、M蛋白定量及免疫固定电泳在多发性骨髓瘤(MM)中的应用价值。方法 选取2017年1月至2020年12月本院收治的120例MM患者作为研究对象,另择同期体检正常的30例健康人作为对照组。所有患者行骨髓穿刺术获取骨髓液观察骨髓细胞形态;取血清标本行免疫固定电泳及免疫球蛋白检查。结果 120例MM患者IgA型、IgD型、IgG型、轻链型分别为43例、18例、35例、24例。四组患者 κ 、 λ 检出率比较差异无统计学意义($P>0.05$)。四组MM患者及对照组血清IgA、IgM及IgG水平比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。四组MM患者骨髓细胞增生程度分级及原始浆细胞、幼稚浆细胞占比比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 骨髓细胞形态学、M蛋白定量及免疫固定电泳均可用于MM的诊断。

[关键词] 骨髓细胞形态学; M蛋白; 免疫固定电泳; 多发性骨髓瘤; 应用价值

Application of bone marrow cell morphology, M protein quantification and immunofixation electrophoresis in the diagnosis of multiple myeloma patients

CHONG Xiang^{1*}, ZENG Hui², WAN Xiaoting¹

(1. Department of Hematology, Maanshan No.17 Metallurgical Hospital, Maanshan, Anhui, China, 243000;

2. Department of Hematology, Nanjing Gulou Hospital, Nanjing, Jiangsu, China, 230032)

[ABSTRACT] **Objective** To analyze the application value of bone marrow cell morphology, M protein quantification and immunofixation electrophoresis in multiple myeloma (MM). **Methods** 120 cases of MM patients admitted to our hospital from January 2017 to December 2020 were selected retrospectively as the research subjects, and 30 cases of healthy people with normal physical examination during the same period were selected as the control group. All patients were treated of The bone marrow fluid was collected by bone marrow puncture to observe the morphology of bone marrow cells. Serum samples were collected for immunofixation electrophoresis and immunoglobulin examination. **Results** The 120 cases of MM patients with IgA, IgD, IgG, and light chain types were 43, 18, 35, and 24, respectively. There was no significant difference in the detection rates of κ and λ among the four groups of patients ($P>0.05$). There were significant differences in serum IgA, IgM and IgG levels between the four groups of MM patients and the control group ($P<0.05$). There were significant differences in the grades of bone marrow cell proliferation and the proportion of plasmablastcells and naive plasma cells in MM patients among the four groups ($P<0.05$). **Conclusion** Bone marrow cell morphology, M protein quantification and immunofixation electrophoresis can be used for the diagnosis of MM.

[KEY WORDS] Bone marrow cell morphology; M protein; Immunofixation electrophoresis; MM; Application value

基金项目:马鞍山市科技计划项目(YL-2020-08)

作者单位:1.安徽省马鞍山十七冶医院血液科,安徽,马鞍山243000

2.南京市鼓楼医院血液科,江苏,南京230032

*通信作者:崇翔, E-mail: chongxiang666666@163.com

多发性骨髓瘤(*multiple myeloma*, MM)是恶性克隆性浆细胞疾病,以原发性恶性浆细胞在骨髓中无节制增殖并伴单克隆免疫球蛋白生成为特征^[1]。虽然MM临床发病率并不高,为全身恶性肿瘤的1%,但随着我国人口老龄化的发展,逐年增加的发病率已经对我国人口健康构成威胁,因此,加强对MM的诊断、治疗和预后研究也迫在眉睫。受限于非血液科医师对该病认识缺乏,极易导致本病的漏诊、误诊^[2-3],尤其是MM伴随的骨痛、蛋白尿、肾功能损害会被误诊为骨质增生、骨折、肾功能不全等疾病,而患者伴随明显症状但不能得到及时、妥当的治疗,病情快速发展至骨髓坏死、尿毒症等阶段,从而失去了最佳治疗时机。可见,提高诊断对于改善MM治疗效果具有积极作用。骨髓细胞形态学、血清蛋白电泳及免疫学方法是诊断MM及识别MM分型的重要手段。本文将MM患者作为研究对象,分析骨髓细胞形态学、血清蛋白及免疫固定电泳在MM诊断中的应用,以期帮助临床医师提高对MM的诊断效果。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2017年1月至2020年12月本院收治的120例MM患者作为研究对象。患者男73例、女47例,平均年龄(63.25±5.31)岁。另择同期体检正常的30例健康人作为对照组,男17例、女13例,平均年龄(64.08±5.19)岁。所有患者均知情同意,且经医院伦理委员会同意批准。

纳入标准:①年龄>45岁;②均符合《中国多发性骨髓瘤诊治指南》^[4]中相关诊断标准;③临床资料完整;④检查前,未接受化疗、手术切除、局部放射等治疗。排除标准:①合并其他恶性肿瘤;②合并严重心、肺、肝等重大脏器功能障碍者;③合并其他红细胞疾病、白细胞系统疾病、出血性疾病及免疫系统疾病;④精神疾病患者;⑤妊娠期或哺乳期女性。

1.2 方法

1.2.1 细胞形态学

所有患者知情同意的前提下,行骨髓穿刺术,获取骨髓液,并加肝素钠抗凝制取标本,获取骨髓液标本后于6h内检测:取一份标本自然干燥,加瑞士吉姆萨染60s后,加磷酸盐缓冲液并用洗耳球吹匀以充分混合,15min后,流动水冲洗、晾干、

上显微镜观察;于低倍镜下观察骨髓增生程度;于高倍镜(或油镜)下观察骨髓浆细胞(数量、分布、形态特征),并计算成熟浆细胞、原始浆细胞、幼稚浆细胞百分比,并分型。

1.2.2 免疫固定电泳

所有受试者均抽取空腹肘静脉血,离心制取血清标本。取患者血清标本,生理盐水稀释,上样品盘,放入全自动电泳仪中做点样、电泳等步骤,之后将胶片放入扫描仪扫描,自动计算结果并上传系统。

1.2.3 免疫球蛋白

取所有受试者血清标本,上BICS免疫化学分析仪(Beckman公司,美国)以速率散射比浊法检测免疫球蛋白(IgA、IgM、IgG)水平。

1.3 观察指标

①免疫固定电泳及M蛋白。所有MM患者以异常增多的免疫球蛋白类型分为IgA型、IgD型、IgG型、轻链型,并根据轻链类型分为 κ 、 λ 亚型。且分析不同受试者血清免疫球蛋白水平。②骨髓细胞形态学。细胞形态学主要观察增生程度及骨髓瘤类型:增生程度依据五级分类法^[5]分为I~V级:I级:增生极度活跃,成熟红细胞/有核细胞比例1:1,且有核细胞>600 LP;II级:增生明显活跃,成熟红细胞/有核细胞比例10:1,且有核细胞200~600 LP;III级:增生活跃,成熟红细胞/有核细胞比例20:1,有核细胞20~200 LP;IV级:增生减低,成熟红细胞/有核细胞比例50:1,有核细胞10~20 LP;V级:增生极度减低,成熟红细胞/有核细胞300:1,有核细胞10 LP以下。骨髓瘤类型包括原始浆细胞、幼稚浆细胞及成熟浆细胞。

1.4 统计学处理

采用统计软件SPSS 22.0处理数据,计数资料用 $n(\%)$ 表示,行 χ^2 检验;符合正态分布的计量资料用 $(\bar{x}\pm s)$ 表示,多组分析采用单因素方差分析、组间两两比较采用多重比较:以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫固定电泳及M蛋白检测结果

120例患者血清蛋白电泳结果显示,85例患者血清蛋白电泳图谱中出现了M蛋白,表达率70.83%(85/120)。四组不同免疫表型在亚型 κ 、 λ

均有检出,但 κ 、 λ 亚型检出率比较差异无统计学意义($P>0.05$)。见表1。

表1 MM患者免疫表型比较 [n(%)]

免疫表型	n	κ 亚型	λ 亚型
IgA型	43	23(53.49)	20(46.51)
IgD型	18	7(38.89)	11(61.11)
IgG型	35	14(39.53)	21(60.47)
轻链型	24	9(50.00)	9(50.00)
χ^2 值		1.326	
P值		0.249	

MM不同免疫表型患者及对照组血清免疫球蛋白水平分析结果显示,血清IgA、IgM及IgG水平差异显著,差异有统计学意义($P<0.05$)。MM各亚组患者血清IgM均显著低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),血清IgA水平以IgA型>IgD型>IgG型>轻链型($P<0.05$),血清IgM水平以IgA型、IgD型>IgG型>轻链型($P<0.05$),血清IgG水平以IgG型>IgD型>IgA型>轻链型,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表2。

表2 受试者血清免疫球蛋白水平比较 ($\bar{x}\pm s$, g/L)

Table 2 Comparison of serum immunoglobulin levels of subjects ($\bar{x}\pm s$, g/L)

分组	例数	IgA水平	IgM水平	IgG水平
MM组	IgA型	43 45.32±8.23	0.32±0.08	2.73±0.24
	IgD型	18 0.40±0.12 ^a	0.33±0.08	6.03±1.34 ^a
	IgG型	35 0.16±0.05 ^{ab}	0.24±0.05 ^{ab}	83.25±21.43 ^{ab}
	轻链型	24 0.06±0.02 ^{abc}	0.17±0.05 ^{abc}	2.84±0.72 ^c
对照组	30	1.06±0.33	5.42±0.63	0.24±0.11
F值		725.012	24.510	290.060
P值		0.000	0.000	0.000

注:^a与IgA型组比较,^b与IgD型组比较,^c与IgG型组比较,均 $P<0.05$ 。

2.2 骨髓细胞形态学

四组MM患者骨髓细胞增生程度分级比较,差异有统计学意义($P<0.05$),增生程度I级占比

以IgG型>IgA型>IgD型>轻链型,差异有统计学意义($P<0.05$),增生程度II级占比以IgD型、轻链型>IgA型>IgG型,差异有统计学意义($P<0.05$),增生程度III级则以轻链型>IgA型、IgD型>IgG型,差异有统计学意义($P<0.05$)。四组MM患者原始浆细胞、幼稚浆细胞占比以轻链型、IgD型>IgG型>IgA型,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表3。

3 讨论

MM是一种B淋巴细胞介导的浆细胞恶性增殖性疾病,以中老年人群为高发群体,其生存期数月数十年不等^[6-7]。当前认为,MM细胞可通过自分泌方式促进恶性增殖,也可通过旁分泌方式作用于骨髓基质细胞,两者相互作用并引起骨髓微环境的变化而利于MM细胞的生长,同时,MM细胞又会引起溶骨性病变、肾功能损害、贫血等症状。据统计^[8],70%~80%MM患者存在不同程度的骨质破坏,其可能是MM细胞刺激会导致核NF- κ B受体激活因子和骨保护素之间失衡^[9],导致破骨持续活化而产生进行性骨质破坏,并引发病理性骨折、骨痛等骨病。MM细胞侵袭骨髓而抑制促红细胞生成素的生成、骨髓中炎症因子的作用、自身免疫性溶血性贫血等又会引发贫血。此外,M蛋白在肾小球沉积、过量游离轻链毒性/自聚集/等电点引发近端肾小管复合性功能缺陷疾病,溶骨性病变所引发的高钙血症也会引起钙沉积而损伤肾功能^[10]。另有研究显示^[11],不同分子免疫表型的MM患者生存时间有所差异,并以IgD型生存时间相对较短。可见,分析免疫表型对于指导MM患者的治疗及预后干预方案具有重要意义。

对于MM患者而言,由于单克隆恶性浆细胞合成的 κ (或 λ)过量而 λ (或 κ)抑制时,导致 κ 、 λ 明显差异,且已有诸多研究表明^[12-13], κ 、 λ 与MM

表3 MM不同免疫表型骨髓形态学比较 [n(%), ($\bar{x}\pm s$)]

Table 3 Comparison of bone marrow morphology with different immunophenotypes in MM [n(%), ($\bar{x}\pm s$)]

分组	n	增生程度					浆细胞占比		
		I级	II级	III级	IV级	V级	原始浆细胞	幼稚浆细胞	成熟浆细胞
IgA型	43	25(58.14)	12(27.91)	6(13.95)	0(0)	0(0)	14.75±3.25	15.87±4.1	11.35±2.10
IgD型	18	6(33.33)	10(55.56) ^a	2(11.11)	0(0)	0(0)	31.07±6.39 ^a	32.79±6.65 ^a	12.06±2.18
IgG型	35	29(82.86) ^{ab}	6(17.14) ^{ab}	0(0) ^{ab}	0(0)	0(0)	19.93±3.87 ^{ab}	20.14±4.11 ^{ab}	10.24±2.21
轻链型	24	0(0) ^{abc}	12(50.00) ^{ac}	12(50.00) ^{abc}	0(0)	0(0)	32.66±6.42 ^{ac}	31.16±6.72 ^{ac}	11.92±2.15
χ^2/F 值		46.903					98.464	72.850	0.879
P值		0.000					<0.001	<0.001	0.460

注:增生程度:^a示与IgA型组比较,^b示与IgD型组比较,^c示与IgG型组比较,均 $P<0.05$ 。

早期进展相关,依据 κ 、 λ 可预测自体干细胞移植效果。准确了解骨髓瘤细胞负荷、增生程度、各类浆细胞情况非常重要。本组案例结果与既往研究一致^[14]。因此,单纯依靠骨髓瘤细胞诊断MM效果不佳。结合三种检查手段的优势与不足,且考虑免疫表型与瘤细胞多种抗原表达的特异性相关、骨髓细胞形态学观察的增生程度、浆细胞占比等又是评估预后的重要因素之一,临床医师应当综合考虑骨髓细胞形态学、M蛋白及免疫固定电泳结果制定治疗手段。

本研究仅选择较常见的四种分型纳入分析,对于其他免疫表型免疫固定电泳亚型及骨髓细胞形态学又是如何,有待于后续更为细致的研究;除免疫表型外,Durie-Salmon(DS)分期标准也是临床常用分型,本研究未分析免疫表型与DS分期之间是否存在相关性;此外研究其获取资料有限,未能分析不同分型患者临床特征以及预后差异,且部分患者因移植后反应性改变、治疗导致易感基因的表达、原克隆通路受抑制等导致的Ig类型转变,其细胞形态学又如何变化,都需要后续工作者的探究。总体而言,本研究结果显示免疫固定电泳检测不同免疫表型的MM患者血清IgA、IgM及IgG等水平具显著差异,且骨髓细胞形态学观察的增生程度及原始浆细胞、幼稚浆细胞占比也有差异。

参考文献

- [1] Tsukamoto S, Hirotsu K, Kumazoe M, et al. Multiple Myeloma Cells[J]. *Biochem J*, 2019, 443(2):525-534.
- [2] Joshua DE, Bryant C, Dix C, et al. Biology and therapy of multiple myeloma.[J]. *Med J Austral*, 2019, 210(8):375-380.
- [3] 张睿婷,方霁,周雅莹,等.外周血与骨髓组织髓系来源抑

制细胞在多发性骨髓瘤患者诊断中的价值比较[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2020, 12(7):874-877+896.

- [4] 中国医师协会血液科医师分会,中华医学会血液学分会,中国医师协会多发性骨髓瘤专业委员会.中国多发性骨髓瘤诊治指南(2017年修订)[J]. *中华内科杂志*, 2017, 56(11):866-870.
- [5] Cavo M, Terpos E, Bargay J, et al. The multiple myeloma treatment landscape: international guideline recommendations and clinical practice in Europe[J]. *Exp Rev Hematol*, 2018, 11(3):219-237.
- [6] Padala S A, Barsouk A, Barsouk A, et al. Epidemiology, Staging, and Management of Multiple Myeloma[J]. *Med Sci*, 2021, 9(1):3.
- [7] Liu J, Liu W, Mi L, et al. Incidence and mortality of multiple myeloma in China, 2006-2016: an analysis of the Global Burden of Disease Study 2016[J]. *J Hematol Oncol*, 2019, 12(1):136.
- [8] Langseth YO, Myklebust T, Johannesen TB, et al. Incidence and survival of multiple myeloma: a population-based study of 10 524 patients diagnosed 1982-2017[J]. *British J Haematol*, 2020, 191(3):418-425.
- [9] 魏铃,王丰哲,殷国良,等.PDFP和OP/IP对胸、腰椎多发性骨髓瘤骨病的诊断价值[J]. *肿瘤防治研究*, 2020, 47(2):39-42.
- [10] 毛永炎,翟小琳,朱俊利.伴肾功能异常的多发性骨髓瘤的临床特征[J]. *实用癌症杂志*, 2020, 35(6):44-47.
- [11] 周梅,张立明.114例多发性骨髓瘤诊治的临床现状分析[J]. *浙江医学*, 2019, 41(10):1017-1020.
- [12] Caponi L, Romiti N, Koni E, et al. Inter-assay variability in automated serum free light chain assays and their use in the clinical laboratory[J]. *Crit Rev Clin Labor Sci*, 2020, 57(2):73-85.
- [13] 吴一狄,王海鹏,王金英,等.多发性骨髓瘤早期发现的实验室研究探讨[J]. *标记免疫分析与临床*, 2019, 26(5):89-91.
- [14] Das D K. Multiple Myeloma: MMRF CureCloud Study Updates[J]. *Oncol Times*, 2021, 43(1):12-13.

(上接第1066页)

- [8] Provenzale JM, Taylor BA, Wilde EA, et al. Analysis of variability of fractional anisotropy values at 3T using a novel diffusion tensor imaging phantom [J]. *Neuroradiol J*, 2018, 31(6):581-586.
- [9] Siasios I, Kapsalaki EZ, Fountas KN, et al. The role of diffusion tensor imaging and fractional anisotropy in the evaluation of patients with idiopathic normal pressure hydrocephalus: a literature review[J]. *Neurosurg Focus*, 2016, 41(3):E12.
- [10] 黄莹.磁共振扩散张量成像在婴幼儿缺氧缺血性脑病病情评估及预后预测中的应用研究[D].新乡:新乡医学院, 2020.
- [11] 黄珍欢,詹泽娟,涂学招,等.常规MRI和扩散张量成像在足月新生儿HIE的诊断价值[J]. *磁共振成像*, 2019, 10(3):185-189.
- [12] 邹蓉,唐军,鲍珊,等.氢质子磁共振波谱在新生儿缺氧缺血性脑病中的应用现状分析[J]. *中国当代儿科杂志*, 2018, 20(6):449-455.
- [13] 沈丹丹,蒋佳琦,贾中正,等.磁共振波谱对早产儿缺血缺氧性脑病的诊断价值[J]. *中国临床医学*, 2018, 25(6):958-962.
- [14] 郭莉莉,柏根基,张辉,等.常规磁共振及磁共振波谱评估新生儿缺氧缺血性脑病[J]. *南京医科大学学报*, 2018, 38(10):1388-1393.

· 论 著 ·

CK-MB、25-(OH)D3及NSE与高胆红素血症新生儿病情及预后的关系

杜丽君 罗菲菲 阮颖 王丽娟*

[摘要] **目的** 探讨肌酸激酶同工酶(CK-MB)、25羟基维生素D3(25-(OH)D3)及血清神经元特异性烯醇化酶(NSE)在高胆红素血症新生儿中的变化及与病情、预后的相关性。**方法** 选取2017年1月~2019年1月本院治疗的120例高胆红素血症患儿设为观察组(轻度38例、中度42例、重度40例),选取同期在本院出生的124例健康新生儿作为对照组。对比2组及不同病情程度的患儿CK-MB、25-(OH)D3及NSE水平,进行为期1年的随访,了解预后情况,分析影响其预后的相关危险因素。**结果** 观察组CK-MB、NSE水平明显高于对照组,25-(OH)D3水平低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。轻度组患儿CK-MB、NSE水平显著低于中度组及重度组,25-(OH)D3水平显著高于中度组及重度组,差异有统计学意义($P<0.05$)。预后良好108例(90.00%),预后不良12例(10.0%);预后良好的患儿CK-MB及NSE异常增高率、25-(OH)D3异常降低率明显低于预后不良的患儿,差异有统计学意义($P<0.05$)。胎龄<37周、围产期并发症、开始喂奶时间>24 h、胎粪排出时间>24 h、CK-MB(异常增高)、NSE(异常增高)、25-(OH)D3(异常降低)为影响高胆红素血症新生儿预后不良的独立危险因素($P<0.05$)。**结论** CK-MB、25-(OH)D3、NSE三者为高胆红素血症新生儿预后不良的独立危险因素,提示临床可通过加强三者监测,评估患儿病情及预后。

[关键词] CK-MB; 25-(OH)D3; NSE; 高胆红素血症

Study on the relationship between CK-MB, 25-(OH) D3 and NSE and the condition and prognosis of neonates with hyperbilirubinemia

DU Lijun, LUO Feifei, RUAN Ying, WANG Lijuan*

(Department of Neonatology, the Fifth People's Hospital of Chengdu, Chengdu, Sichuan, China, 611138)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the changes of Creatine kinase isoenzyme (CK-MB), 25-hydroxyvitamin D3 (25-(OH) D3) and serum neuron-specific enolase (NSE) in neonates with hyperbilirubinemia and their correlations with the severity and prognosis of the disease. **Methods** 120 children with hyperbilirubinemia treated in this hospital from January 2017 to January 2019 were selected as the observation group (38 cases with mild disease, 42 cases with moderate disease, 40 cases with severe disease). The 124 healthy newborns born in this hospital during the same period were selected as the control group. The levels of CK-MB, 25-(OH) D3 and NSE in children with different severity were compared. The patients were followed up for 1 year to observe the prognosis and analyze the related risk factors affecting their prognosis. **Result** The levels of CK-MB and NSE in the observation group were significantly higher than those in the control group, and the 25-(OH) D3 level was lower than those in the control group. The difference was statistically significant ($P<0.05$). The levels of CK-MB and NSE in the mild group were significantly lower than those in the moderate and the severe groups, and the 25-(OH) D3 level was significantly higher than those in the moderate and the severe groups. The difference was statistically significant ($P<0.05$). 108 cases

基金项目:四川省卫生和计划生育委员会科研课题(17PJ017)

作者单位:成都市第五人民医院新生儿科,四川,成都611138

*通信作者:王丽娟, E-mail: dulijun1231@163.com

(90.00%) had good prognosis and 12 cases (10.00%) had poor prognosis. The abnormal increase rate of CK-MB and NSE and the abnormal decrease rate of 25-(OH) D3 in children with good prognosis were significantly lower than those of children with poor prognosis, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Gestational age < 37 weeks, perinatal complications, feeding time > 24 h, time of meconium discharge > 24 h, CK-MB (abnormal increase), NSE (abnormal increase), 25-(OH) D3 (abnormal decrease) were independent risk factor affecting the prognosis of neonates with hyperbilirubinemia ($P < 0.05$). **Conclusion** There are significant differences in the expression levels of CK-MB, 25-(OH) D3 and NSE between neonates with hyperbilirubinemia and healthy newborns. The three are independent risk factors for the poor prognosis of neonates with hyperbilirubinemia, suggesting that clinical monitoring of the three can be strengthened to assess the condition and prognosis of children.

[KEY WORDS] CK-MB; 25-(OH) D3; NSE; Hyperbilirubinemia

新生儿高胆红素血症发病率较高,胆红素高水平状态会损伤心肌细胞,临床表现有:肝细胞性黄疸、溶血性黄疸、肝内胆汁淤积性黄疸等,对患儿神经、免疫等多系统造成损害,对新生儿的生命健康造成严重威胁。因此,早期诊断高胆红素血症对提高新生儿存活率及生存质量至关重要。目前,临床尚无明确、检测便捷的客观指标辅助诊断。随着较多学者深入研究,发现血清神经元特异性烯醇化酶(Serum neuron-specific enolase, NSE)与高胆红素血症密切相关^[1]。肌酸激酶同工酶(Creatine kinase isoenzyme, CK-MB)是评估心肌受损程度的重要指标,既往学者研究指出,可通过加强监测新生儿CK-MB水平,以评估高胆红素血症患儿病情严重程度,掌握病情变化^[2]。25羟基维生素D3[25 hydroxyvitamin D3, 25-(OH)D3]对于诊断婴幼儿佝偻病有重要价值,但其与高胆红素血症发生的相关研究较少。本研究旨在探讨CK-MB、25-(OH)D3及NSE在高胆红素血症新生儿中的变化情况,并分析三者与患儿病情严重程度、预后的相关性。报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

对2017年1月至2019年1月本院院部收治的高胆红素血症患儿的临床资料进行收集、整理。纳入标准:①体征表现及实验室检查结果均符合高胆红素血症相关诊断标准^[3];②胎龄为35~42周的新生儿;③无畸形及其他疾病。排除标准:①合并窒息、先天性心脏病、感染性疾病者;②纳入研究前服用过影响CK-MB、25-(OH)D3及NSE水平的药物者;③脑发育异常、严重酸中毒、遗传性代谢疾病者;④随访资料不全者。

最终纳入符合纳入排除标准的120例高胆红素血症新生儿,设为观察组,根据病情严重程度^[4]分为:轻度组(血清总胆红素:220.6~256.5 $\mu\text{mol/L}$)38例、中度组(血清总胆红素:256.6~342.0 $\mu\text{mol/L}$)42例、重度组(血清总胆红素: > 342.0 $\mu\text{mol/L}$)40例。选取同期在本院出生的124例健康新生儿作为对照组。两组患儿基线资料比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表1。

表1 两组患儿基线资料比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	性别(男/女)	平均胎龄(周)	平均体质量(g)
观察组	120	56/64	39.50 \pm 0.58	3188.32 \pm 254.23
对照组	124	61/63	39.55 \pm 0.60	3195.65 \pm 258.50
t/ χ^2 值	-	0.156	0.662	0.223
P值	-	0.693	0.509	0.824

1.2 方法

观察组于入院后次日清晨、对照组为体检当日清晨空腹抽取静脉血4 mL,离心10 min,分离血清后放置 -80°C 的冰箱冷藏待测。使用日立7600全自动生化分析仪及配套试剂盒,检测CK-MB水平;采用深圳新产业MAGLUMI4000全自动化学发光分析仪及配套试剂测定25(OH)D3水平;2 h内采用德国Roche E601电化学发光免疫分析仪及配套试剂测定血清NSE水平。CK-MB正常参考值^[5]:0~18 U/L, > 18 U/L则视为异常增高;25-(OH)D3正常参考值^[6]:30~60 ng/mL, < 30 ng/mL视为异常降低;NSE正常参考值^[7]:12.5~25.0 $\mu\text{g/L}$, > 25.0 $\mu\text{g/L}$ 则视为异常增高。

1.3 观察指标

①收集所有研究对象的一般资料,包括姓名、性别、胎龄、胎次、分娩方式、是否出现围产期并发症、开始喂奶时间、胎粪排出时间等。②对比观察

组及对照组 CK-MB、25-(OH)D3、NSE 水平,再对比不同病情严重程度患儿 CK-MB、25-(OH)D3、NSE 水平。③对 120 例高胆红素血症新生儿家属随访 1 次,随访时间为患儿出院后的 6 个月~12 个月以内。随访方式:患儿家属带患儿来院复查脑电图,并通过 52 项神经运动检查方法评估预后^[8]。在随访过程中,出现不良预后症状,即判断为预后不良,以了解不同 CK-MB、25-(OH)D3、NSE 水平的患儿预后情况。预后不良判定标准^[9]:存在语言发育迟滞、听力缺陷,神经系统(运动、肌力、肌张力、反射)功能受损。④采用多元 Logistic 回归分析影响高胆红素血症新生儿预后不良的相关危险因素。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析,计数资料用 $n(\%)$ 表示,采用 χ^2 检验;计量资料采用 $(\bar{x} \pm s)$ 描述,组间比较行 t 检验,多组间比较行 F 检验;采用多元 Logistic 回归分析影响高胆红素血症新生儿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 2 组 CK-MB、25-(OH)D3、NSE 水平比较

观察组 CK-MB、NSE 水平明显高于对照组,25-(OH)D3 水平低于对照组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 2 组 CK-MB、25-(OH)D3、NSE 水平比较 $(\bar{x} \pm s)$

组别	n	CK-MB(U/L)	25-(OH)D3(ng/mL)	NSE(μ g/L)
观察组	120	42.15 \pm 12.26	20.65 \pm 8.45	34.25 \pm 7.14
对照组	124	12.35 \pm 5.12	56.89 \pm 9.55	16.14 \pm 5.58
t 值		24.916	31.355	22.115
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

2.2 不同病情严重程度的高胆红素血症新生儿 CK-MB、25-(OH)D3、NSE 水平比较

CK-MB、NSE 水平比较结果:轻度<中度<重度,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);25-(OH)D3 水平比较

结果:轻度>中度>重度,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 不同病情严重程度的高胆红素血症新生儿 CK-MB、25-(OH)D3、NSE 水平比较 $(\bar{x} \pm s)$

组别	n	CK-MB(U/L)	25-(OH)D3(ng/mL)	NSE(μ g/L)
轻度	38	28.65 \pm 8.65	25.25 \pm 7.56	26.35 \pm 6.11
中度	42	36.54 \pm 9.88	16.65 \pm 6.28	35.65 \pm 7.56
重度	40	47.68 \pm 11.63	12.36 \pm 5.65	41.65 \pm 8.86
F 值		34.740	39.330	39.820
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

2.3 不同 CK-MB、25-(OH)D3、NSE 表达的高胆红素血症新生儿预后情况

120 例患儿预后良好 108 例(90.00%),预后不良 12 例(10.00%)。预后良好的患儿 CK-MB 及 NSE 异常增高率、25-(OH)D3 异常降低率明显低于预后不良的患儿,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 4。

2.4 影响高胆红素血症新生儿预后不良的相关因素分析

胎龄<37 周、围产期并发症、开始喂奶时间>24 h、胎粪排出时间>24 h、CK-MB(异常增高)、NSE(异常增高)、25-(OH)D3(异常降低)为影响高胆红素血症新生儿预后不良的独立危险因素 ($P < 0.05$)。见表 5。

3 讨论

高胆红素血症会损害新生儿听神经通道功能,造成听力、智力等神经系统异常。既往研究指出在新生儿重症监护病房住院的高胆红素血症患儿中,有 26% 左右的患儿出现智力障碍,有 21% 的患儿出现听力障碍^[10]。近年来,低水平胆红素对新生儿神经系统的影响受到新生儿学界的关注,广大学者均致力于寻找敏感、特异及便捷的指标,以应用于临床评估高胆红素血症新生儿病情进展及预后情况。

表 4 不同预后的高胆红素血症新生儿 CK-MB、25-(OH)D3、NSE 表情况 $[n(\%)]$

Table 4 CK-MB, 25-(OH) D3 and NSE in neonates with hyperbilirubinemia with different prognosis $[n(\%)]$

组别	n	CK-MB		25-(OH)D3		NSE	
		异常增高	正常表达	异常降低	正常表达	异常增高	正常表达
预后良好	108	50(46.30)	58(53.70)	47(43.52)	61(56.48)	45(41.67)	63(58.33)
预后不良	12	10(83.33)	2(16.67)	9(75.00)	3(25.00)	11(91.67)	1(8.33)
χ^2 值		5.926		4.301		10.848	
P 值		0.015		0.038		<0.001	

表5 影响高胆红素血症新生儿预后不良的相关因素分析

Table 5 Analysis of related factors affecting the poor prognosis of neonates with hyperbilirubinemia

变量	单因素分析			多因素分析		
	OR 值	95%CI	P 值	OR 值	95%CI	P 值
胎龄(周)(<37 周 vs ≥ 37 周)	1.258	1.113~1.513	0.029	1.541	1.324~1.895	0.033
性别(男 vs 女)	1.254	0.892~3.081	0.644			
出生时体重(kg)(<3 vs ≥ 3)	1.451	1.325~1.556	0.019	0.564	1.425~1.689	0.587
分娩方式(剖宫产 vs 顺产)	1.365	0.236~1.797	0.884			
围产期并发症(有 vs 无)	1.598	1.212~1.865	0.015	1.685	1.368~1.779	0.038
开始喂奶时间(h)(>24 vs ≤ 24)	1.785	1.631~1.972	0.016	1.25	1.365~1.784	0.035
胎粪排出时间(h)(>24 vs ≤ 24)	1.658	1.584~1.884	0.025	1.598	1.254~1.785	0.031
CK-MB(异常增高 vs 正常)	1.523	1.127~1.867	0.022	1.754	1.452~1.885	0.008
NSE(异常增高 vs 正常)	1.654	1.417~1.975	0.004	1.658	1.369~1.789	0.017
25-(OH)D3(异常降低 vs 正常)	1.667	1.352~1.844	0.011	1.623	1.265~1.796	0.026

过多的胆红素作为氧自由基存在,会损伤新生儿心肌细胞,导致体内心肌酶谱升高。早期的心肌损伤难以通过超声、心电图等检查方式诊断,易延误病情,不利于预后。CK-MB 是一种心肌特异酶,新生儿期血清中 CK-MB 主要来源于心肌细胞。Taherzadeh 等学者^[11]研究指出,CK-MB 水平与高胆红素血症新生儿病情严重程度成正相关,这与本研究结果一致。可见 CK-MB 可作为诊断心肌损伤的重要指标,可评估高胆红素血症新生儿病情,便于临床确定针对性治疗方案,控制患儿病情进展。

NSE 特异定位于神经元及神经内分泌细胞中,是中枢神经系统损伤的敏感和特异性指标,较多文献报道 NSE 对脑损伤、肿瘤等方面的检测敏感度、特异度高^[12]。国外学者通过高胆红素血症动物模型研究显示,胆红素可使血清 NSE 显著升高,且 NSE 水平与结局密切相关,但这一研究结果亦有学者持反对意见^[13]。目前,国内外关于 NSE 与高胆红素血症新生儿预后的相关性研究的报道较少。鉴于此,笔者通过对比高胆红素血症新生儿及健康新生儿 NSE 水平,分析 NSE 与高胆红素血症新生儿病情进展及预后的关系。研究结果提示 NSE 可用于新生儿高胆红素血症的早期诊断的重点指标之一。

25-(OH)D3 是维生素 D 的三类常见代谢产物之一,在外周血液系统中水平较为稳定,对维持体内钙磷代谢,调控血磷、血钙水平并协调骨骼矿化作用,以及儿童骨骼发育与牙齿生长发挥重要作用。Maiti 等学者^[14]报道,儿童体内 25-(OH)D3 水平表达过低,会引发佝偻病、骨软化症等疾病。本研究结果显示:随着高胆红素血症新生儿

病情加重,25-(OH)D3 水平逐渐下降,25-(OH)D3 水平异常降低为影响高胆红素血症新生儿预后不良的独立危险因素。索检文献库,国内外关于 25-(OH)D3 与高胆红素血症关系的研究较少,且尚无明确定论。也有学者研究报道,高胆红素血症新生儿 25-(OH)D3 与健康新生儿比较差异无统计学意义^[15]。这与本研究结果存在一定偏倚,因此 25-(OH)D3 能否成为评估高胆红素血症新生儿病情进展、预后的重要指标有待进一步深入研究。

综上所述,本研究中 CK-MB、25-(OH)D3、NSE 在高胆红素血症新生儿及健康新生儿中表达水平存在显著差异,提示医师可通过加强三者检测,评估患儿病情及预后,在新生儿出现异常临床症状之前进行早期干预治疗,以保障患儿预后。

参考文献

- [1] 高淑强,悦光,杜逸婷.高胆红素血症新生儿血清 NSE、B/A 比值水平与胆红素脑损伤的关系[J].解放军预防医学杂志,2018,36(7):896-898,917.
- [2] 张昊,李久伟.血清 NSE 联合颅脑 MRI 在预测新生儿高胆红素血症脑损伤中的应用价值[J].川北医学院学报,2019,34(3):103-106.
- [3] Yueh MF, Chen S, Nguyen N, et al. Developmental, Genetic, Dietary, and Xenobiotic Influences on Neonatal Hyperbilirubinemia[J]. Mol Pharmacol, 2017, 91(5):545-549.
- [4] Vodret S, Bortolussi G, Jana J, et al. Inflammatory signature of cerebellar neurodegeneration during neonatal hyperbilirubinemia in Ugt1 -/- mouse model[J]. J Neuroinflamm, 2017, 14(1):64-68.
- [5] Plavskii VY, Mikulich AV, Leusenka IA, et al. Spectral Range Optimization to Enhance the Effectiveness of Phototherapy for Neonatal Hyperbilirubinemia [J]. J Appl Spectrosc, 2017, 84(1):92-102.

(下转第 1079 页)

· 论 著 ·

ACI后肢体运动功能障碍患者 EphA2 蛋白与 Bold-f MRI、DTI 参数相关性

陈历^{1*} 蒋炳虎² 季一飞¹ 靳雨² 尹书斌¹ 赵玉萍¹

[摘要] 目的 探究急性脑梗死(ACI)后肢体运动功能障碍患者治疗前后血清 EphA2 蛋白与静息态血氧水平依赖功能磁共振成像(Bold-f MRI)、弥散张量成像(DTI)参数的相关性。方法 选取本院143例ACI后肢体运动功能障碍患者作为研究组,另选同期60例体检正常者作为对照组,检测血清 EphA2 蛋白水平、Bold-f MRI 参数[运动前区(PM)、辅助运动区(SMA)、初级感觉运动区(SMC)、后顶叶皮层(PPC)的低频震荡幅度(ALFF)值]、DTI 参数[各向异性分数(FA)值、走行区平均扩散率(rMD)],并分析其临床意义。结果 研究组血清 EphA2 蛋白水平高于对照组,PM、SMA、SMC、PPC 的 ALFF 值、FA 值、rMD 值均低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);疗效不良患者治疗前、治疗3个月后血清 EphA2 蛋白水平均高于疗效良好患者,PM、SMA、SMC、PPC 的 ALFF 值、FA 值均低于疗效良好患者,差异有统计学意义($P<0.05$);ACI后肢体运动功能障碍患者治疗前血清 EphA2 蛋白与 PM、SMA、SMC、PPC 的 ALFF 值、FA 值呈负相关($P<0.05$);ACI后肢体运动功能障碍患者的治疗前血清 EphA2 蛋白、PM、SMA、SMC、PPC 的 ALFF 值、FA 值均与治疗效果显著相关($P<0.05$);治疗3个月后血清 EphA2 蛋白、静息态 Bold-f MRI、DTI 联合评估的 AUC 为 0.932,大于各指标单独评估。结论 检测 ACI 后肢体运动功能障碍患者血清 EphA2 蛋白与静息态 Bold-f MRI、DTI 可为疗效评估提供循证依据。

[关键词] 急性脑梗死;肢体运动功能障碍;EphA2 蛋白;血氧水平依赖功能磁共振成像;弥散张量成像

Correlation between EphA2 protein and Bold-f MRI and DTI parameters in patients with post-ACI limb motor dysfunction

CHEN Li^{1*}, JIANG Binghu², JI Yifei¹, JIN Yu², YIN Shubin¹, ZHAO Yuping¹

(1. Department of Neurology, Nanchong Central Hospital, Nanchong, Sichuan, China, 637000; 2. Department of medical imaging, Nanchong Central Hospital, Nanchong, Sichuan, China, 637000)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the correlation between serum EphA2 protein and resting blood oxygen level dependent functional magnetic resonance imaging (Bold-f MRI) and diffusion tensor imaging (DTI) parameters before and after treatment in patients with limb motor dysfunction after acute cerebral infarction (ACI), and analyze the clinical significance of changes in serum EphA2 protein and resting state Bold-f MRI and DTI technical parameters. **Methods** From January 2020 to December 2020, 143 patients with limb motor dysfunction after ACI in our hospital were selected as the study group, and 60 patients with normal physical examination during the same period were selected as the control group. The clinical data, serum EphA2 protein levels, Bold-f MRI parameters [the amplitude of low-frequency fluctuation (ALFF) values of premotor zone (PM), supplementary motor area (SMA), primary sensorimotor cortex (SMC), posterior parietal cortex

基金项目:四川省南充市市校科技战略合作项目应用基础课题研究(19SXHZ0264)

作者单位:1.南充市中心医院神经内科,四川,南充637000

2.南充市中心医院医学影像科,四川,南充637000

*通信作者:陈历, E-mail:787673571@qq.com

(PPC)], DTI parameters [fractional anisotropy (FA) value, ratio of mean diffusivity (rMD)] were compared between the two groups. The study group was given rehabilitation treatment, and the curative effect was calculated after 3 months of treatment. The serum EphA2 protein level, Bold-f MRI parameters, and DTI parameters in patients of the study group with different curative effects were compared before and after 3 months treatment. The correlation between the serum EphA2 protein and resting Bold-f MRI and DTI parameters before treatment was analyzed, and the correlation between the various indicators before treatment and the curative effect of patients with limb motor dysfunction after ACI was explored. The value of serum EphA2 protein, resting Bold-f MRI, and DTI parameters in evaluating the efficacy of patients after 3 months treatment was also explored. **Results** The serum EphA2 protein level of the study group was higher than that of the control group, and the ALFF, FA and rMD values of PM, SMA, SMC, and PPC were lower than those of the control group ($P<0.05$). The serum EphA2 protein levels in patients with poor efficacy before treatment and after 3 months of treatment were higher than those with good efficacy, and the ALFF and FA values of PM, SMA, SMC, and PPC were lower than those with good efficacy ($P<0.05$). The serum EphA2 protein in patients with limb motor dysfunction after ACI was negatively correlated with the ALFF and FA values of PM, SMA, SMC, and PPC before treatment ($P<0.05$). The serum EphA2 protein and the ALFF and FA values in PM, SMA, SMC, and PPC in patients with limb motor dysfunction after ACI were significantly correlated with the treatment effect ($P<0.05$). After 3 months of treatment, the AUC of serum EphA2 protein, resting state Bold-f MRI, and DTI parameters of the joint evaluation was 0.932, which was greater than that of the individual evaluations. **Conclusion** Detection of serum EphA2 protein and resting state Bold-f MRI and DTI in patients with motor dysfunction after ACI can provide evidence-based basis for the evaluation of therapeutic effects

[**KEY WORDS**] ACI; Limb motor dysfunction; EphA2 protein; Bold-f MRI; DTI

急性脑梗死 (Acute cerebral infarction, ACI) 为临床常见脑卒中类型, 患者多预后差, 严重影响患者的生存质量^[1]。目前临床上多采用 CT、核磁等现代影像学对缺血性脑血管病辅助诊断, 如血氧水平依赖功能磁共振成像 (Blood oxygenation level dependent functional magnetic resonance imaging, Bold-f MRI)、弥散张量成像 (Diffusion tensor imaging, DTI), 但影像学仅能描述梗死病灶形态学的改变, 无法描述神经功能缺损情况^[2-3]。血清生物学标志物具有检测具有床旁操作的可能性与便利性, 使其在脑血管疾病方面的应用充满前景^[4-5]。笔者前期研究^[6]发现, 小鼠脑梗死组织中 EphA2 表达随着时间不断增多, 导致血脑屏障通透性增高, 破坏血脑屏障紧密连接的形成, 增加大脑内皮细胞通透性, 并且抑制神经元再生, 促进细胞凋亡。因此本研究尝试探究 ACI 后肢体运动功能障碍患者治疗前后血清 EphA2 蛋白与静息态 Bold-f MRI、DTI 参数相关性及其临床意义。报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2020 年 1 月至 2020 年 12 月本院 143 例

ACI 后肢体运动功能障碍患者作为研究组, 男 80 例, 女 63 例; 年龄平均 (58.05±5.97) 岁。另选同期 60 例体检正常者 (经核磁或 CT 排除脑血管疾病) 作为对照组, 男 39 例, 女 21 例; 年龄平均 (57.30±5.64) 岁。

纳入标准: 研究组患者均有明确 ACI^[7] 病史; 年龄 18~70 岁; 发病前 mRS 为 0 分, 右利手; 入院时右侧上下肢体肌力均为 3 级及以下 (由 2 名受过培训的神经内科医师共同完成); Glasgow 评分 >8 分, 无智能缺陷; 经头颅 CT/MRI 检查证实梗死部位包括左侧半卵圆中心、基底核区、放射冠区和内囊中的一个或多个部位, 梗死总面积 <3 cm², 无明显占位效应、对周围脑组织结构无明显影响; 发病时间至入院时间 48 h 内。对照组均为全身体检均未发现明显异常, 且经核磁或 CT 排除脑血管疾病。两组研究对象均知晓本研究, 已签署同意书, 且本研究经本院伦理委员会审批通过。排除标准: 无症状脑梗死者; 脑梗死后 3 个月内出血转化者; 严重肝肾功能不全、严重感染等可能影响本研究指标检测者; 血液系统疾病患者; 治疗期间有任何部位新发脑梗死者; 既往有精神系统疾病、头部严重外伤和手术史者; 有 MRI 检查禁忌者。

1.2 方法

治疗方法: 研究组均给予抗血小板聚集及他汀等常规治疗, 同时住院期间行传统康复治疗, 持续治疗3个月后根据肌力分级标准^[8]评估疗效, 上下肢体肌力均提高2级及以上为疗效良好, 共99例, 未达到疗效良好评定为疗效不良, 共44例。

静息态 Bold-f MRI、DTI 检查: 分别于治疗前、治疗1、3个月后进行检查, 采用1.5T磁共振扫描仪(GE公司生产)进行多模态MRI检查, 采集静息态 Bold-fMRI 图像, 采用回波平面成像(EPI)序列, 同时进行三维高分辨率结构图像采集。采用SPM5软件观察分析患侧颅内初级感觉运动区(SMC)、辅助运动区(SMA)、运动前区(PM), 后顶叶皮层(PPC)的低频振幅(ALFF)图像; 同时, 对受试者行磁共振弥散张量成像(DTI), 测量患侧各向异性参数(FA), 并计算走行区平均扩散率(Ratio of mean diffusivity, rMD)值。

血清 EphA2 蛋白检测: 分别于治疗前、治疗1、3个月后采集空腹外周静脉血5 mL, 离心处理取血清, 采用酶联免疫吸附法测定血清 EphA2 蛋白, 试剂盒购自江苏江莱生物技术有限公司。

1.3 统计学方法

数据处理采用SPSS 22.0统计软件, 计数资料以 $n(\%)$ 描述, 采用 χ^2 检验, 计量资料采用 $(\bar{x} \pm s)$ 描述, 采用 t 检验, 相关性分析采用Pearson相关系数模型, 通过Logistic进行验证关联性, 评估效能分析采用受试者工作特征(ROC)曲线。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组临床资料比较

研究组血清 EphA2 蛋白水平高于对照组,

Bold-f MRI 参数、DTI 参数低于对照组, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表1。

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

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

项目	研究组 ($n=143$)	对照组 ($n=60$)	χ^2/t 值	P 值
性别(男/女)	80/63	39/21	0.587	0.444
年龄(岁)				
<60	82(57.34)	36(60.00)	0.051	0.822
≥ 60	61(42.66)	24(40.00)		
BMI(kg/m^2)				
<18.5	10(6.99)	6(10.00)		
18.5~23.9	67(46.85)	30(50.00)	0.533	0.297
≥ 24	66(46.15)	24(40.00)		
吸烟(是/否)	64/79	21/39	0.679	0.410
饮酒(是/否)	53/90	18/42	0.379	0.538
EphA2 蛋白(pg/mL)	49.44 \pm 12.35	12.35 \pm 3.51	13.323	<0.001
PM 的 ALFF 值	0.74 \pm 0.10	0.97 \pm 0.13	9.264	<0.001
SMA 的 ALFF 值	0.76 \pm 0.09	0.96 \pm 0.17	8.155	<0.001
SMC 的 ALFF 值	0.77 \pm 0.08	0.98 \pm 0.13	10.064	<0.001
PPC 的 ALFF 值	0.84 \pm 0.09	1.04 \pm 0.17	8.155	<0.001
FA 值	0.86 \pm 0.08	0.93 \pm 0.09	3.609	<0.001
rMD 值	0.97 \pm 0.07	1.12 \pm 0.09	8.937	<0.001

2.2 研究组疗效及不同疗效患者血清 EphA2 蛋白水平、Bold-f MRI 参数、DTI 参数比较

治疗前、治疗3个月后, 疗效不良患者血清 EphA2 蛋白水平均较疗效良好患者高, PM、SMA、SMC、PPC 的 ALFF 值、FA 值均较疗效良好患者低($P < 0.05$); 疗效良好患者治疗3个月后血清 EphA2 蛋白水平低于治疗前, PM、SMA、SMC、PPC 的 ALFF 值、FA 值均高于治疗前($P < 0.05$)。见表2。

2.3 治疗前各指标相关性分析

ACI 后肢体运动功能障碍患者治疗前血清 EphA2 蛋白与 PM($r = -0.716$)、SMA($r = 0.648$)、SMC

表2 不同疗效患者血清 EphA2 蛋白水平、Bold-f MRI 参数、DTI 参数比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Serum EphA2 protein levels, Bold-f MRI parameters and DTI parameters of patients with different curative effects ($\bar{x} \pm s$)

时间	组别	n	EphA2 蛋白 (pg/mL)	PM 的 ALFF 值	SMA 的 ALFF 值	SMC 的 ALFF 值	PPC 的 ALFF 值	FA 值	rMD 值
治疗前	疗效良好	99	43.05 \pm 11.09	0.82 \pm 0.11	0.82 \pm 0.10	0.83 \pm 0.09	0.92 \pm 0.10	0.48 \pm 0.09	0.98 \pm 0.07
	疗效不良	44	55.83 \pm 14.37	0.66 \pm 0.09	0.70 \pm 0.08	0.70 \pm 0.08	0.76 \pm 0.08	0.38 \pm 0.07	0.97 \pm 0.08
	t 值		5.789	8.466	7.020	8.240	9.359	6.539	0.754
	P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.452
治疗3个月后	疗效良好	99	35.58 \pm 9.72 ^a	0.88 \pm 0.12 ^a	0.91 \pm 0.13 ^a	0.90 \pm 0.13 ^a	0.99 \pm 0.14 ^a	0.52 \pm 0.11 ^a	1.10 \pm 0.09 ^a
	疗效不良	44	51.63 \pm 11.97	0.69 \pm 0.11	0.74 \pm 0.10	0.74 \pm 0.11	0.80 \pm 0.12	0.40 \pm 0.09	1.08 \pm 0.09 ^a
	t 值		8.471	8.960	7.714	7.108	7.813	6.350	1.227
	P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.222

注: 与同组治疗前比较, ^a $P < 0.05$ 。

($r=-0.682$)、PPC($r=-0.688$)的 ALFF($r=-0.660$)、FA($r=-0.688$)值间均存在负相关关系($P<0.05$)。

2.4 血清 EphA2 蛋白、静息态 Bold-f MRI、DTI 参数评估疗效的价值

绘制治疗 3 个月后血清 EphA2 蛋白、静息态

Bold-f MRI、DTI 参数评估患者疗效的 ROC 曲线,结果显示,各指标评估疗效的曲线下面积(Area under the curve, AUC)均在 0.7 以上,具有良好评估效能,且联合评估的 AUC 为 0.932,大于各指标单独评估。见表 3、图 1。

表 3 治疗 3 个月后各指标评估疗效的效能

Table 3 Effectiveness of evaluation of efficacy by indicators after 3 months of treatment

指标	AUC	95%CI	Z 值	截断值	敏感度(%)	特异度(%)	P 值
EphA2 蛋白	0.831	0.743~0.898	7.633	>49.71 pg/mL	59.38%	94.12%	<0.001
PM 的 ALFF 值	0.789	0.696~0.864	6.148	≤ 0.78	84.78%	66.18%	<0.001
SMA 的 ALFF 值	0.793	0.700~0.867	6.660	≤ 0.87	90.62%	58.82%	<0.001
SMC 的 ALFF 值	0.798	0.706~0.872	6.498	≤ 0.93	93.75%	55.88%	<0.001
PPC 的 ALFF 值	0.783	0.689~0.859	6.235	≤ 0.91	84.37%	63.24%	<0.001
FA 值	0.772	0.678~0.850	5.532	≤ 0.43	71.87%	80.88%	<0.001
联合	0.932	0.863~0.972	17.876	-	90.62%	77.94%	<0.001

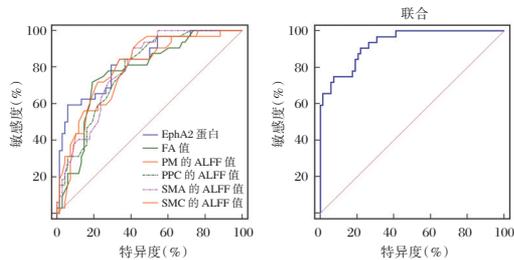


图 1 治疗 3 个月后各指标评估疗效的 ROC

Figure 1 ROC of evaluation of curative effect after 3 months

3 讨论

ACI 后肢体运动功能障碍的发生机制复杂,其治疗结果易受多方面因素影响。本研究结果提示上述指标变化可能与 ACI 后肢体运动功能障碍的发生有关。由于 ACI 后肢体运动功能障碍不同疗效患者的 rMD 值无明显差异,故本研究后续的相关性、评估价值中未将 rMD 值纳入。本研究还发现,静息态 Bold-f MRI 参数、DTI 参数均是 ACI 后肢体运动功能障碍患者疗效的关联性因素。Bold-f MRI 是利用磁共振测量神经元活动引起的血液动力的改变,可直观显示脑卒中和针刺所致大脑皮层的功能区活动情况,以及神经纤维束损伤等情况^[9-10]。然而,影像学参数仅能反映梗死病灶形态学的改变,在评估神经功能缺损方面存在一定局限性。

本研究结果提示 EphA2 蛋白可能与患者疾病转归情况有关。EphA2 蛋白是在促红细胞生成素产生肝细胞中发现的具有酪氨酸酶活性的基因编码产物,国内石秋艳等^[11]通过 ACI 大鼠模型的研究,发现少量的 EphA2 蛋白可能与维持

正常的中枢神经功能有关,ACI 发生可导致 EphA2 蛋白表达不断增加,过多的 EphA2 蛋白对机体组织具有毒害作用,且 EphA2 蛋白表达增高可导致血脑屏障通透性增加、抑制神经元再生、促进脑细胞凋亡。国外 Finney AC 等^[12]研究证实,内皮细胞 EphA2 蛋白通过促进单核细胞的粘附而参与斑块炎症和动脉粥样硬化病变进展,平滑肌 EphA2 蛋白可能通过调节平滑肌增殖和细胞外基质沉积而调控动脉粥样硬化进展。但国内外尚无血清 EphA2 蛋白水平与 ACI 后肢体运动功能障碍患者疗效相关的研究,本研究通过多因素分析提示血清 EphA2 蛋白在 ACI 后肢体运动功能障碍患者治疗过程中呈负向调节作用,通过抑制其表达水平,或许有助于改善治疗效果。基于上述结果,本研究首次采用 ROC 曲线探究血清 EphA2 蛋白、静息态 Bold-f MRI、DTI 参数评估 ACI 后肢体运动功能障碍患者疗效的价值,发现治疗 3 个月后血清 EphA2 蛋白、静息态 Bold-f MRI、DTI 参数评估患者疗效的 AUC 均在 0.7 以上,具有良好评估效能,尤其是联合评估的 AUC 高达 0.932,大于各指标单独评估,其原因可能在于 EphA2 蛋白可从分子生物学方面对患者病情进行评价,从而对影像学参数的局限性进行补充,可为医生提供更全面的分析数据,从而改善评估效果。

综上所述,ACI 后肢体运动功能障碍患者血清 EphA2 蛋白与静息态 Bold-f MRI、DTI 参数呈负相关,均与患者疗效显著相关,行血清 EphA2 蛋白与静息态 Bold-f MRI、DTI 检测有助于临床评估治疗效果。

参考文献

- [1] 中华医学会神经病学分会, 中华医学会神经病学分会脑血管病学组. 中国脑出血诊治指南(2019)[J]. 中华神经科杂志, 2019, 52(12):994-1005.
- [2] 张金凤, 李光, 苏果, 等. 阿替普酶治疗溶栓时间窗外脑梗死临床疗效的 BOLD-fMRI 评价[J]. 泰山医学院学报, 2018, 39(9):961-964.
- [3] Dai ZY, Chen F, Yao LZ, et al. The combined application of magnetic resonance DTI and 3D-pcASL in differential diagnosis of hyper-acute and acute ischemic cerebral infarction [J]. Natl Med J Chin, 2018, 98(17):1327-1332.
- [4] 王曦, 王勋, 张黎明. β -淀粉样蛋白在脑血管病中的研究[J]. 脑与神经疾病杂志, 2018, 26(7):56-59.
- [5] Talebi A, Amirabadizadeh A, Nakhaee S, et al. Cerebrovascular disease: how serum phosphorus, vitamin D, and uric acid levels contribute to the ischemic stroke [J]. BMC Neurol, 2020, 20(1):116.
- [6] 陈历, 石秋艳, 张春阳, 等. 观察肢体缺血后处理对急性脑梗死大鼠血脑屏障的保护效应及其机制的探讨[J]. 中风与神经疾病, 2015, 32(2):100-103.
- [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 2018[J]. 中华神经科杂志, 2018, 51(9):666-682.
- [8] 张鑫, 刘芳, 龚立超, 等. 神经内科 ICU 患者下肢不同肌力对深静脉血栓形成的影响[J]. 中国实用护理杂志, 2019, 35(30):2352-2357.
- [9] 何晓浩, 孙淑霞. 针刺推拿联合治疗偏瘫后的脑区改变 BOLD-fMRI 评价[J]. 影像研究与医学应用, 2019, 3(20):40-43.
- [10] Chen J, Liu M, Sun D, et al. Effectiveness and neural mechanisms of home-based telerehabilitation in patients with stroke based on fMRI and DTI: A study protocol for a randomized controlled trial[J]. Medicine (Baltimore), 2018, 97(3):e9605.
- [11] 石秋艳, 陈历, 刘爱东, 等. 观察远隔肢体缺血对大鼠急性脑梗死再灌注损伤的保护效应及其机制的探讨[J]. 现代预防医学, 2015, 42(11):2042-2044, 2053.
- [12] Finney AC, Funk SD, Green JM, et al. EphA2 Expression Regulates Inflammation and Fibroproliferative Remodeling in Atherosclerosis[J]. Circulation, 2017, 136(6):566-582.
- [6] Wisnumurti DA, Sribudiani Y, Porsch RM, et al. G6PD genetic variations in neonatal Hyperbilirubinemia in Indonesian Deutromalay population [J]. BMC Pediatr, 2019, 19(1):58-83.
- [7] Daunhawer I, Kasser S, Koch G, et al. Enhanced early prediction of clinically relevant neonatal hyperbilirubinemia with machine learning [J]. Pediatr Res, 2019, 86(1):1-5.
- [8] 张婕, 贺莉, 赵小艳, 等. 儿童早期脑损伤血清神经元特异性烯醇化酶与发育行为异常的相关性研究[J]. 医学分子生物学杂志, 2017, 14(3):142-146.
- [9] 俞君, 高建娣, 陈正, 等. 154 例新生儿重度高胆红素血症换血治疗的临床特点及预后分析[J]. 中华急诊医学杂志, 2019, 28(9):1141-1145.
- [10] Taherzadeh Z, Montfrans GAV, van der Zee CEEM, et al. Structure and function of resistance arteries from BB-creatin kinase and ubiquitous Mt-creatin kinase double knockout mice [J]. Amino Acids, 2020, 52(6):48-53.
- [11] Emokpae M, Nwagbara G. Serum Creatine Kinase-MB Isoenzyme Activity among Subjects with Uncomplicated Essential Hypertension: Any Sex Differences [J]. Med Sci, 2017, 5(2):65-69.
- [12] Sacheck JM, Van RMI, Chomitz VR, et al. Impact of Three Doses of Vitamin D3 on Serum 25(OH)D Deficiency and Insufficiency in At-Risk Schoolchildren [J]. J Clin End Met, 2017, 102(12):44-46.
- [13] Amundson LA, Hernandez LL, Crenshaw TD. Serum and tissue 25-OH vitamin D3 concentrations do not predict bone abnormalities and molecular markers of vitamin D metabolism in the hypovitaminosis D kyphotic pig model [J]. Br J Nutr, 2017, 118(1):1-11.
- [14] Maiti R, Mishra BR, Sanyal S, et al. Effect of carbamazepine and oxcarbazepine on serum neuron-specific enolase in focal seizures: A randomized controlled trial [J]. Epilepsy Res, 2017, 138(25):5-10.
- [15] Elshorbagy HH, Barseem NF, Elsadek AE, et al. Serum Neuron-specific Enolase and S100 Calcium-binding Protein B in Pediatric Diabetic Ketoacidosis [J]. J Clin Res Pediatr E, 2019, 11(4):587-590.

(上接第 1074 页)

sCD14、hs-CRP、HNL对CRF腹膜透析细菌性腹膜炎诊断价值及意义

贺晓蕾* 徐雪英 王丽莹

[摘要] **目的** 探讨可溶性CD14(sCD14)、高敏C反应蛋白(hs-CRP)、中性粒细胞载脂蛋白(HNL)对慢性肾衰竭(CRF)腹膜透析细菌性腹膜炎诊断价值及意义。**方法** 选取2017年9月至2020年9月本院收治的70例CRF腹膜透析细菌性腹膜炎患者(腹膜炎组)、142例CRF腹膜透析患者(透析组)及33例健康人群(对照组),比较各组基线资料、sCD14、hs-CRP、HNL水平,并比较不同sCD14、hs-CRP、HNL水平者感染可能性(IPS)评分、Kt/V,采用Pearson分析各指标与IPS评分、Kt/V关系,采用Logistic回归方程分析细菌性腹膜炎的相关影响因素,采用受试者工作特征曲线(ROC)及ROC下面积(AUC)分析各指标的诊断价值。**结果** 腹膜炎组糖尿病患者占比高于透析组,sCD14、hs-CRP:腹膜炎组>透析组>对照组,腹膜炎组HNL高于透析组、对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$);sCD14、hs-CRP、HNL高水平者IPS评分高于低水平患者,Kt/V低于低水平患者差异有统计学意义($P<0.05$);sCD14、hs-CRP、HNL与IPS评分呈正相关,与Kt/V呈负相关($P<0.05$);Logistic回归方程分析显示,将糖尿病控制后,sCD14、hs-CRP、HNL仍与细菌性腹膜炎的发生相关($P<0.05$);sCD14、hs-CRP、HNL诊断细菌性腹膜炎的AUC为0.822、0.810、0.819,hs-CRP+sCD14诊断细菌性腹膜炎的AUC为0.903($P<0.05$)。**结论** sCD14、hs-CRP、HNL在CRF腹膜透析细菌性腹膜炎诊断中具有重要的临床意义,并与腹膜透析患者感染风险和透析充分性有关。

[关键词] sCD14; hs-CRP; HNL; CRF; 腹膜透析; 细菌性腹膜炎

The diagnostic value and significance of sCD14, hs-CRP and HNL on bacterial peritonitis caused by peritoneal dialysis in CRF

HE Xiaolei*, XU Xueying, WANG Liying

(Department of Nephrology, Shenzhen People's Hospital, Shenzhen, Guangdong, China, 518020)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the diagnostic value and significance of soluble cluster of differentiation 14 (sCD14), hypersensitive C-reactive protein (hs-CRP), and human neutrophil lipocalin (HNL) for bacterial peritonitis caused by peritoneal dialysis in chronic renal failure (CRF). **Methods** From September 2017 to September 2020, 70 CRF patients with bacterial peritonitis caused by peritoneal dialysis (peritonitis group), 142 CRF patients with peritoneal dialysis (dialysis group) and 33 healthy people (control group) were selected from our hospital. The baseline data, sCD14, hs-CRP, and HNL levels of each group were compared, and the infection probability score (IPS), Kt/V, and Kt/V of people with different levels of sCD14, hs-CRP and HNL were compared. Pearson was used to analyze the relationship between each indicator and the IPS score and Kt/V, and the Logistic regression equation was used to analyze the relevant influencing factors of bacterial peritonitis. Receiver operating characteristic curve (ROC) and area under ROC (AUC) were used to analyze the diagnostic value of each indicator. **Results** The proportion of diabetic patients in the peritonitis group was higher than that of the dialysis group. The sCD14, hs-CRP levels: peritonitis group>

基金项目:深圳市科技计划项目(JCYJ20170307164104491)

作者单位:深圳市人民医院肾内科,广东,深圳 518020

*通信作者:贺晓蕾, E-mail:hx1197310@163.com

dialysis group > control group, HNL in the peritonitis group was higher than that in the dialysis group and the control group ($P < 0.05$). The IPS scores of patients with high levels of sCD14, hs-CRP and HNL were higher than those with low levels, and the Kt/V was lower than those with low levels ($P < 0.05$). sCD14, hs-CRP, HNL were positively correlated with IPS score, and negatively correlated with Kt/V ($P < 0.05$). Logistic regression analysis showed that after diabetes was controlled, sCD14, hs-CRP, and HNL were still related to the occurrence of bacterial peritonitis ($P < 0.05$). The AUC of sCD14, hs-CRP and HNL for the diagnosis of bacterial peritonitis were 0.822, 0.810, 0.819, and the AUC of hs-CRP+sCD14 for the diagnosis of bacterial peritonitis was 0.903 ($P < 0.05$). **Conclusions** The sCD14, hs-CRP and HNL have important clinical significance in the diagnosis of bacterial peritonitis caused by peritoneal dialysis in CRF and are related to the risk of infection and adequacy of dialysis in peritoneal dialysis patients.

[KEY WORDS] sCD14; hs-CRP; HNL; CRF; Peritoneal dialysis; Bacterial peritonitis

腹膜透析是慢性肾衰竭(Chronic renal failure, CRF)的重要治疗手段之一,但由于导管感染、肠源性感染、污染、医源性操作等原因,可能并发细菌性腹膜炎^[1]。根据相关资料,腹膜透析相关性腹膜炎发生率为0.14~0.17次/病人年,是腹膜透析患者技术失败的主要原因,严重者可导致腹膜功能衰竭、脓毒血症、感染性休克,甚至死亡,因此及时诊断至关重要^[2]。可溶性CD14(Soluble cluster of differentiation 14, sCD14)是单核细胞和巨噬细胞表达的糖蛋白游离片段,接触感染因子后,可激活促炎级联信号,并释放至外周循环系统中,是诊断脓毒症一个分子标志物^[3]。高敏C反应蛋白(Hypersensitive C-reactive protein, hs-CRP)在细菌感染时升高,是诊断细菌感染疾病的重要辅助指标^[4]。中性粒细胞载脂蛋白(Human neutrophil lipocalin, HNL)存在于中性粒细胞二级颗粒中,当中性粒细胞受到刺激活化时, HNL可释放至细胞外,引起外周血HNL水平升高^[5]。目前关于sCD14、hs-CRP、HNL在CRF腹膜透析细菌性腹膜炎中研究较少,本研究对此进行探讨,旨在为临床诊治疾病,加深对腹膜透析细菌性腹膜炎发病机制的认识提供参考,报告如下。

1 对象和方法

1.1 研究对象

选取2017年9月至2020年9月本院收治的70例CRF腹膜透析细菌性腹膜炎患者(腹膜炎组)、142例CRF腹膜透析患者(透析组)及33例健康人群(对照组)作为研究对象,纳入标准:①符合CRF诊断标准^[6]及细菌性腹膜炎诊断标准^[7];②规律接受腹膜透析者;③入组前无激素、免疫调节剂、抗菌药物等相关药物应用史。排除标准:①自身免疫性疾病者;②血液系统疾病者;③恶性肿瘤患者。

本研究经医院伦理委员会审核通过,患者及家属、入组人员充分知情,自愿签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 资料收集

收集入组者年龄、性别、体质量指数、饮酒史、吸烟史、高脂血症、糖尿病、心脏病、高血压、透析龄、基础肾脏病资料,采用双人双录法,保证数据的正确性。

1.2.2 各指标检测

腹膜炎组、透析组均在透析前,对照组于清晨分别抽取外周静脉血5 mL,应用流式细胞仪(美国BD公司)检测血清sCD14水平,应用免疫发光法检测hs-CRP水平,应用酶联免疫吸附法检测HNL水平,均严格按照试剂盒说明书进行;计算Kt/V, $Kt/V = -\ln(R - 0.008 \times t) + (4 - 3.5 \times R) \times UF/W$,其中ln:自然对数;R:透析后BUN/透析前BUN;t:一次透析的时间(h);超滤体积(UF)=透析前体质量-透析后体质量;W:透析后体质量;采用感染可能性(IPS)评分^[8]评估感染风险和病情,包括体温、序贯性器官功能衰竭等,最高分26分,分值越高患者感染风险及病情越严重。

1.3 统计学方法

采用SPSS 22.0处理数据,计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,多组间比较以单因素方差分析,两两比较以 t 检验,计数资料用 $n(\%)$ 表示, χ^2 检验,采用Pearson分析各指标与IPS评分、Kt/V关系,采用Logistic回归方程分析细菌性腹膜炎的相关影响因素,采用受试者工作特征曲线(ROC)及ROC下面积(AUC)分析各指标的诊断价值。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组基线资料比较

各组间年龄、性别、体质量指数、饮酒史、吸烟

史、高脂血症、心脏病、高血压、透析龄、基础肾脏病比较,差异无统计学意义($P>0.05$);组间糖尿病、sCD14、hs-CRP、HNL比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表1。

2.2 各指标不同水平者 IPS 评分、Kt/V 比较

sCD14、hs-CRP、HNL 高水平者 IPS 评分高于低水平患者, Kt/V 低于低水平患者,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表2。

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

Table 1 Comparison of baseline data and indicators of each group [($\bar{x} \pm s$), n(%)]

资料	腹膜炎组(n=70)	透析组(n=142)	对照组(n=33)	F/t/ χ^2 值	P值
年龄(岁)	62.25±12.47	60.93±13.18	61.19±10.96	0.256	0.775
性别(男/女)	38/32	72/70	15/18	0.713	0.700
体质量指数(kg/m ²)	23.76±1.53	23.82±1.49	24.02±1.87	0.320	0.727
饮酒史	42(60.00)	89(62.68)	23(69.70)	0.908	0.635
吸烟史	33(47.14)	69(48.59)	13(39.39)	0.911	0.634
既往病史					
高脂血症	4(5.71)	5(3.52)	-	0.146	0.702
糖尿病	40(57.14)	44(30.99) ^a	-	13.409	<0.001
心脏病	6(8.57)	16(11.27)	-	0.367	0.545
高血压	5(7.14)	14(9.86)	-	0.424	0.515
透析龄(月)	48.68±10.25	45.97±11.03	-	1.721	0.087
基础肾脏病					
糖尿病肾病	25(35.71)	40(28.17)	-	1.256	0.263
慢性肾小球肾炎	45(64.29)	102(71.83)	-	1.256	0.263
sCD14(mg/L)	15.68±5.04	5.68±1.70 ^a	1.01±0.32 ^{ab}	363.724	<0.001
hs-CRP(mg/L)	26.89±8.55	14.03±4.59 ^a	5.45±1.76 ^{ab}	185.692	<0.001
HNL(ng/mL)	104.47±32.82	54.68±11.29 ^a	50.11±12.05 ^a	160.813	<0.001

注:“-”表示无此项资料;与腹膜炎组比较,^a $P<0.05$;与透析组比较,^b $P<0.05$ 。

表2 各指标不同水平者 IPS 评分、Kt/V 比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of IPS scores and Kt/V of different levels of indicators ($\bar{x} \pm s$)

指标	sCD14		t值	P值	hs-CRP		t值	P值	HNL		t值	P值
	低水平 (n=153)	高水平 (n=59)			低水平 (n=134)	高水平 (n=78)			低水平 (n=150)	高水平 (n=62)		
IPS 评分(分)	7.15±2.08	11.28±3.19	11.056	<0.001	6.97±2.25	10.58±3.34	9.384	<0.001	6.87±2.21	11.76±3.80	11.702	<0.001
Kt/V	1.26±0.28	1.09±0.32	3.804	<0.001	1.27±0.22	1.11±0.24	4.937	<0.001	1.30±0.20	0.99±0.21	10.117	<0.001

2.3 各指标与 IPS 评分、Kt/V 关系

采用 Pearson 进行相关性分析,结果显示 sCD14、hs-CRP、HNL 与 IPS 评分呈正相关, sCD14、hs-CRP、HNL 与 Kt/V 呈负相关。见表3。

表3 相关性参数

Table 3 Correlation parameter

指标	IPS 评分	Kt/V
sCD14	r值	-0.775
	P值	<0.001
hs-CRP	r值	-0.807
	P值	<0.001
HNL	r值	-0.877
	P值	<0.001

2.4 细菌性腹膜炎的多因素 Logistic 回归方程分析

以细菌性腹膜炎发生与否为因变量(0=否, 1=是), 纳入 sCD14、hs-CRP、HNL 作为自变量(低于腹

膜炎组均值赋值为1, 高于腹膜炎组均值赋值为2), 结果显示, 将糖尿病控制后, sCD14、hs-CRP、HNL 仍与细菌性腹膜炎的发生相关($P<0.05$)。见表4。

表4 细菌性腹膜炎影响因素的 Logistic 回归方程分析

Table 4 Logistic regression equation analysis of influencing factors of bacterial peritonitis

影响因素	β 值	SE	Wald χ^2	OR 值	95%CI	P 值
sCD14	1.122	0.331	11.492	3.071	2.069~4.559	<0.001
hs-CRP	0.856	0.213	16.140	2.353	1.451~3.816	<0.001
HNL	0.834	0.226	13.616	2.302	1.007~5.264	<0.001

2.5 各指标诊断价值

以腹膜炎组为阳性样本, 以透析组为阴性样本, 绘制各指标诊断细菌性腹膜炎的 ROC 结果显示, hs-CRP+sCD14 诊断细菌性腹膜炎的 AUC 为 0.903($P<0.05$)。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
sCD14	0.822	0.764~0.871	>11.67 mg/L	65.71	94.37	<0.001
hs-CRP	0.810	0.750~0.860	>21.08 mg/L	67.14	85.92	<0.001
HNL	0.819	0.760~0.868	>89.90 ng/ml	64.29	90.85	<0.001
hs-CRP+sCD14+HNL	0.979	0.962~0.997		91.43	97.89	<0.001

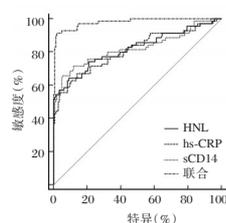


图1 各指标诊断价值

Figure 1 Diagnostic value of each index

3 讨论

细菌性腹膜炎是CRF腹膜透析患者常见的一种并发症,虽然近年来随着腹膜透析导管及相关技术进步,腹膜炎发生率已有大幅降低,但仍是制约腹膜透析发展和应用的主要原因,因此加强对腹膜透析相关腹膜炎的诊治研究是推进腹膜透析事业的重要环节。

sCD14系可溶性CD14亚型,其水平升高可导致单核细胞活化,增加感染类疾病发生风险^[9]。结果sCD14是脂多糖-脂多糖结合蛋白复合物的受体,细菌感染后,可释放内毒素,形成脂多糖-脂多糖结合蛋白复合物,刺激sCD14产生,因此在细菌性腹膜炎中水平升高,且其能介导白介素-1 β 、白介素-6等炎性介质合成与分泌,放大炎症反应,引起炎性损伤^[10-11]。同时sCD14与IPS评分呈正相关,提示sCD14越高,透析患者感染风险越高。且sCD14与Kt/V呈负相关,提示sCD14与腹膜透析患者透析充分性有关,透析不充分患者,sCD14水平较高,感染风险随之增加,可见临床应加强对sCD14高水平患者细菌性腹膜炎的预防管理,并注意调节腹膜透析参数,提高透析的充分性,以降低细菌性腹膜炎发生风险。

hs-CRP系经典的敏感性炎症标志物之一,在多种感染类疾病中水平均升高,并与感染程度有关^[12-13]。本研究结果与周飞燕等^[14]结论一致,佐证了hs-CRP的诊断价值。腹膜透析患者机体长期处于慢性炎症刺激状态,引起hs-CRP水平升高,且发生细菌性腹膜炎后,机体处于急性炎症反应状态,

使hs-CRP进一步升高^[15]。同时在以上研究基础上,本研究结果表明hs-CRP水平可反映腹膜透析患者感染风险和透析充分性,因此当患者hs-CRP处于较高水平时,不仅应警惕患者细菌性腹膜炎等感染类疾病的发生,还应注意透析充分性的评估和改进,以减少感染并发症的发生,改善患者预后。

HNL属于载脂蛋白超家族成员,生理状态下低度表达于肺、肾脏等组织中,不易波动^[16]。在感染疾病早期,HNL水平即升高,根据相关资料^[17],HNL峰值较hs-CRP及降钙素原早18h,可用于感染早期的诊断,且感染控制后,HNL水平随之降低,还能用于疗效的监测。本研究结果表明HNL具有作为细菌性腹膜炎诊断标志物的潜质。另腹膜透析细菌性腹膜炎发生后,一旦出现引流液混浊,应立即给予广谱强效抗生素治疗,一旦得到培养结果和药敏,应根据结果调整抗生素。虽然本研究中各指标呈现出较高的应用价值,但仍不能取代传统的方法,临床应用时应注意。

综上,sCD14、hs-CRP、HNL在CRF腹膜透析细菌性腹膜炎诊断中具有重要的临床意义,并与腹膜透析患者感染风险和透析充分性有关,可作为评估患者感染风险、透析充分性及诊断细菌性腹膜炎的生物标志物。本研究不足之处在于,纳入患者均为细菌性腹膜炎者,而sCD14、hs-CRP、HNL在真菌性腹膜炎中是否具有相同的应用价值及是否有助于细菌性和真菌性的鉴别尚不明确,有待后续纳入真菌性腹膜炎样本进行验证。

参考文献

- [1] 林媚,易春燕,林建雄,等.老年腹膜透析患者首次腹膜炎的临床特征分析[J].中华肾脏病杂志,2020,36(12):904-910.
- [2] 中国腹膜透析相关感染防治专家组.腹膜透析相关感染的防治指南[J].中华肾脏病杂志,2018,34(2):139-148.
- [3] 邓梦芸,黄明均,史清海,等.血清sCD14、HMGB1在脓毒症诊断与病情评估中的价值[J].西北国防医学杂志,2019,40(8):473-479.

(下转第1088页)

PTEN、uPA 和 EZH2 表达对胃癌术后复发预测

胡楠 汤佳琦 张竞舟 周康杰 吴学雨 洪义东 吴风雷*

【摘要】目的 探讨磷脂酶和张力蛋白同源物(PTEN)、尿激酶型纤溶酶原激活物(uPA)联合 EZH2 基因检测在胃癌术后复发预测中的应用研究。**方法** 选取2015年1月至2019年1月本院进行胃癌根治术治疗的80例患者(80份胃癌组织标本)设为胃癌组,选取上述患者远离肿瘤3 cm的癌旁正常组织作为癌旁组织组。比较不同组织中PTEN、uPA、EZH2表达情况,随访2年了解术后复发情况。收集影响胃癌患者术后复发的相关危险因素,分析PTEN、uPA、EZH2检测及三者联合检测对胃癌术后复发的预测价值。**结果** 胃癌组PTEN阴性表达率显著高于癌旁组织组,uPA及EZH2阳性表达率显著高于癌旁组织组,差异有统计学意义($P<0.05$)。80例胃癌患者随访期间内有17例患者死亡,死亡率为21.25%。80例患者中复发率为26.25(21/80)。PTEN阴性、uPA阳性及EZH2阳性者术后复发率明显高于PTEN阳性、uPA阴性及EZH2阴性者,差异有统计学意义($P<0.05$)。浸润深度T₄、有淋巴结、PTEN阴性、uPA阳性、EZH2阳性为影响胃癌患者术后复发的独立危险因素($P<0.05$)。PTEN、uPA、EZH2及三者联合检测AUC分别为0.552、0.675、0.672、0.899,各指标AUC以联合检测最高。**结论** 临床可通过对胃癌根治术患者加强PTEN、uPA、EZH2三者联合检测,以综合判断患者术后预后情况。

【关键词】 PTEN; uPA; EZH2; 胃癌; 术后复发

Immunohistochemical detection of protein PTEN, uPA and EZH2 expression in predicting postoperative recurrence of gastric cancer

HU Nan, TANG Jiaqi, ZHANG Jingzhou, ZHOU Kangjie, WU Xueyu, HONG Yidong, WU Fenglei*

(Department of Oncology, Lianyungang Hospital Affiliated to Xuzhou Medical University, Lianyungang, Jiangsu, China, 222000)

【ABSTRACT】Objective To explore the application value of phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten (PTEN), urokinase-type plasminogen activator (uPA) combined with EZH2 gene detection in the prediction of postoperative recurrence of gastric cancer. **Methods** 80 patients (80 specimens of gastric cancer tissue) who underwent radical gastrectomy for cancer in this hospital from January 2015 to January 2019 were selected as the gastric cancer group, and the normal tissues adjacent to the cancer 3 cm away from the tumor of above patients were selected as the adjacent tissue group. The expressions of PTEN, uPA, and EZH2 in different tissues were compared. The patients were followed up for 2 years to observe the postoperative recurrence. The related risk factors affecting postoperative recurrence of patients with gastric cancer were collected, and the values of PTEN, uPA, EZH2 detection and the combined detection of three in predicting the recurrence of gastric cancer after surgery were analyzed. **Results** The negative expression rate of PTEN and the positive expression rates of uPA and EZH2 in the gastric cancer group were significantly higher than those in the adjacent tissue group, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). During the follow-up period of 80 gastric cancer patients, 17 patients died, and the mortality rate was

基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(81802347);江苏省社会发展面上项目(BE2019693);吴阶平医学基金(320.6750.19058)

作者单位:徐州医科大学附属连云港医院肿瘤科,江苏,连云港 222000

*通信作者:吴风雷, E-mail: wufenglei1981@163.com

21.25%。The recurrence rate among 80 patients was 26.25 (21/80)。The postoperative recurrence rate of patients with PTEN-negative, uPA-positive and EZH2-positive was significantly higher than that of patients with PTEN-positive, uPA and EZH2-negative, and the difference was statistically significant ($P<0.05$)。The infiltration depth T4, pelvic nodules, PTEN-negative, uPA-positive, and EZH2-positive were independent risk factors affecting postoperative recurrence of gastric cancer patients ($P<0.05$)。The AUC of PTEN, uPA, EZH2 and the combined detection of the three were 0.552, 0.675, 0.672, 0.899, respectively, and the AUC of combined detection was the highest。Conclusion Clinically, the combined detection of PTEN, uPA, and EZH2 of patients with radical gastrectomy can be strengthened to comprehensively judge the postoperative prognosis of patients。

[KEY WORDS] PTEN; uPA; EZH2; Gastric cancer; Postoperative recurrence

胃癌是一种起源于胃壁表层黏膜上皮细胞的恶性肿瘤,其发病率位居恶性肿瘤第2位,死亡率较高^[1]。国内外文献均有报道,可通过CA125、CEA等血清肿瘤标志物检测部分胃癌患者术后是否发生复发、转移,但这些标志物对胃癌术后复发监测特异性不高,诊断率不理想^[2]。近年来,有学者报道抑癌基因磷脂酶和张力蛋白同源物(Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten, PTEN)表达会促进肿瘤的发生发展^[3]。已有相关研究报道,胃癌组织中尿激酶型纤溶酶原激活物(Urokinase-type plasminogen activator, uPA)阳性表达率较高^[4],但其与胃癌术后复发的关系研究较少。本研究旨在探讨PTEN、uPA、EZH2在胃癌患者中的表达情况,并分析联合三者检测对胃癌术后复发的预测价值,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集2015年1月至2019年1月本院接受胃癌根治术治疗的80例胃癌患者(80份胃癌组织标本)作为胃癌组。其中男59例,女21例;平均年龄(63.44 ± 5.78)岁;肿瘤位于胃底贲门者33例,胃体者27例,胃窦者20例。选取上述患者远离肿瘤3 cm的癌旁正常组织作为癌旁组织组。

纳入标准:①所有患者均经影像学检查及术后病理检查确诊为胃癌^[5];②符合胃癌根治术的手术指征;③未合并凝血功能障碍;④未合并严重的心、肺等重要器官功能障碍;⑤临床资料完整;⑥所有患者均已签署知情同意书,研究通过医院医学伦理委员会批准。排除标准:①合并其他系统恶性肿瘤;②合并肠道息肉、感染性肠道疾病;③治疗依从性不佳;④随访资料不全者。

1.2 方法

1.2.1 PTEN、uPA、EZH2检测方法

采用免疫组化染色法检测PTEN、uPA、EZH2表达情况。每例组织蜡块均切片4张,厚度约4 μm 。PTEN、uPA、EZH2标本均经甲醛溶液固定,石蜡包埋、载玻片泡酸、高温灭菌及多聚赖氨酸涂片等处理。DAB显色剂显色,苏木精复染,乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封固。操作步骤严格按照试剂说明书进行。PTEN、uPA、EZH2兔多克隆抗体均采购自美国Epitomics公司。DAB显色剂及配套试剂盒采购自北京中杉金桥生物技术有限公司。L3回旋式切片由北京手术器械厂提供。

1.2.2 判定标准

3位病理科医师在光学显微镜下随机观察5个视野,要求每个视野至少计数100个完整的肿瘤细胞。PTEN、uPA、EZH2免疫组化阳性判定标准^[6]:肿瘤细胞胞质或细胞核中出现棕黄色或棕褐色颗粒,反之则为阴性。阳性细胞比例评分:0、1、2、3、4分;染色强度评分:未染色为0分,淡黄色为1分,棕黄色为2分,棕褐色为3分。染色指数=阳性细胞比例评分+染色强度评分。染色指数>3分为阳性;染色指数 ≤ 3 分为阴性。阳性率=阳性例数/总例数 $\times 100\%$ 。

1.3 随访

对80例胃癌患者进行为期2年的随访,了解患者胃癌复发情况。随访开始时间为患者进行胃癌根治术后,随访截止时间为2021年1月。随访平均随访时间(15.11 ± 2.87)个月。随访方式:来院复查及电话随访。胃癌复发标准^[7]:术后2个月,复查腹部CT,提示腔内肿块/溃疡,可见环提征,胃腔狭窄等影像征象,腹部增强CT提示胃壁异常强化。

1.4 统计学方法

采用SPSS 22.0软件进行统计分析,计量资料以

($\bar{x} \pm s$)表示,采用 t 检验;计数资料以 $n(\%)$ 表示,采用 χ^2 检验;通过 Logistic 回归模型分析影响胃癌复发的非条件单因素和多因素;绘制 ROC 曲线,计算曲线下面积(AUC),以分析不同 PTEN、uPA、*EZH2* 表达鉴别诊断胃癌复发的相对灵敏度、特异度,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

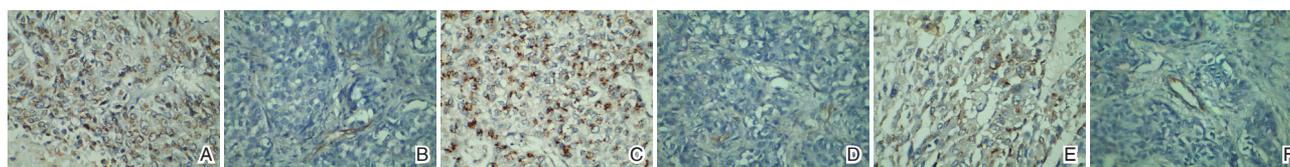
2.1 不同组织中 PTEN、uPA、*EZH2* 水平比较

胃癌组 PTEN 阴性表达率显著高于癌旁组织组,uPA 及 *EZH2* 阳性表达率显著高于癌旁组织组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表1、图1。

表1 不同组织中 PTEN、uPA、*EZH2* 水平比较 [$n(\%)$]

Table 1 Comparison of PTEN, uPA and *EZH2* levels in different tissues [$n(\%)$]

组别	<i>n</i>	PTEN		uPA		<i>EZH2</i>	
		阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性
胃癌组	80	20(25.00)	60(75.00)	51(63.75)	29(36.25)	55(68.75)	25(31.25)
癌旁组织组	80	54(67.50)	26(32.50)	12(15.00)	68(85.00)	15(18.75)	65(81.25)
χ^2 值		29.063		39.823		40.635	
<i>P</i> 值		<0.001		<0.001		<0.001	



注:A、B为PTEN阳、阴性表达;C、D为uPA阳、阴性表达;E、F为*EZH2*阳、阴性表达。

图1 胃癌组织中 PTEN、uPA、*EZH2* 免疫组化染色图(SP, $\times 500$)

Figure 1 immunohistochemical staining of PTEN, uPA and *EZH2* in gastric cancer (SP, $\times 500$)

2.2 胃癌组织中不同 PTEN、uPA、*EZH2* 表达的患者术后复发情况

80例胃癌患者随访期间内有17例患者死亡,死亡率为21.25%。80例患者中复发率为26.25(21/

80)。PTEN 阴性、uPA 阳性及 *EZH2* 阳性的患者术后复发率明显高于 PTEN 阳性、uPA 阴性及 *EZH2* 阴性的患者,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表2。

表2 胃癌组织中不同 PTEN、uPA、*EZH2* 表达的患者术后复发情况 [$n(\%)$]

Table 2 recurrence of gastric cancer patients with different expression of PTEN, uPA and *EZH2* [$n(\%)$]

组别	<i>n</i>	PTEN		uPA		<i>EZH2</i>	
		阳性($n=20$)	阴性($n=60$)	阳性($n=51$)	阴性($n=29$)	阳性($n=55$)	阴性($n=25$)
复发	21	1(5.00)	20(95.00)	18(35.29)	3(10.34)	19(34.55)	2(8.00)
未复发	59	19(33.33)	40(66.67)	33(64.71)	26(89.66)	36(65.45)	23(92.00)
χ^2 值		6.220		5.944		6.256	
<i>P</i> 值		0.013		0.015		0.012	

2.3 胃癌患者术后复发的影响因素分析

浸润深度 T_1 、有淋巴结、PTEN 阴性、uPA 阳性、*EZH2* 阳性为影响胃癌患者术后复发的独立危险因素($P < 0.05$)。见表3。

2.4 PTEN、uPA、*EZH2* 及三者联合检测对胃癌患者术后复发的预测价值

PTEN、uPA、*EZH2* 及三者联合检测 AUC 分别为 0.552、0.675、0.672、0.899,各指标 AUC 以联合检测最大,三者联合检测灵敏度、特异度显著高于 PTEN、uPA、*EZH2* 单一检测($P < 0.05$)。见表4及图2。

3 讨论

胃癌发病机制尚不明确,但有学者研究发现该病的发生与地域环境、患者饮食习惯、幽门螺杆菌感染、癌前病变及遗传因素密切相关^[8]。早期胃癌患者可通过根治手术治疗切除病灶,据相关研究统计,有50%~80%的患者术后仍面临复发、转移的风险^[9]。可见,对于胃癌患者根治术后加强监测高灵敏度、高特异度的肿瘤标志物,对评估患者预后意义重大。

PTEN 基因是近年来发现的一个具有磷酸酶活性的抑癌基因,具有负性调控 PI3K/AKT 通路,

表3 胃癌患者术后复发的影响因素分析

Table 3 Analysis of influencing factors of postoperative recurrence in patients with gastric cancer

变量	单因素分析			多因素分析		
	OR值	95%CI	P值	OR值	95%CI	P值
年龄(岁)(≥65 vs <65)	1.354	0.354~1.257	0.854			
性别(男 vs 女)	1.330	0.421~1.651	0.952			
腹水(有 vs 无)	1.354	0.465~1.754	0.731			
腹膜侵犯(有 vs 无)	1.365	1.125~1.889	0.032	1.365	0.567~1.654	0.758
浆膜浸润(有 vs 无)	1.352	1.125~1.685	0.028	1.354	0.254~1.589	0.885
浸润深度(T ₁ vs T ₂ vs T ₃ 或T ₄)	1.458	1.125~1.885	0.012	1.426	1.254~1.869	0.021
分化程度(高、中分化V低、未分化)	1.241	0.251~1.724	0.663			
淋巴结(有 vs 无)	1.369	1.105~1.569	0.005	1.327	1.108~1.569	0.011
PTEN(阴性 vs 阳性)	1.324	1.254~1.753	0.022	1.268	1.123~1.689	0.027
uPA(阳性 vs 阴性)	1.427	1.204~1.880	0.017	1.365	1.205~1.658	0.023
EZH2(阳性 vs 阴性)	1.434	1.237~1.734	0.009	1.254	1.201~1.669	0.016

表4 PTEN、uPA、EZH2及三者联合检测对胃癌患者术后复发的预测价值

Table 4 predictive value of PTEN, uPA, EZH2 and their combined detection for postoperative recurrence of gastric cancer

预测指标	Cut-off值	灵敏度(%)	特异度(%)	AUC	95%CI	约登指数(%)
PTEN	25.32	81.45	80.26	0.552	0.422~0.683	186.45
uPA	25.44	84.65	82.36	0.675	0.556~0.793	166.01
EZH2	26.32	87.21	85.07	0.672	0.555~0.789	171.28
三者联合检测	26.88	91.94	89.20	0.899	0.818~0.980	180.14
预测指数模型	25.16	86.35	86.14	0.811	0.734~0.994	171.49

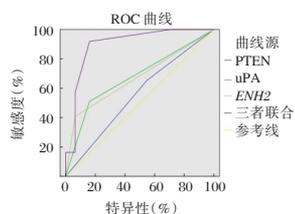


图2 PTEN、uPA、EZH2及三者联合检测对胃癌患者术后复发的预测价值

Figure 2 predictive value of PTEN, uPA, EZH2 and their combined detection for postoperative recurrence of gastric cancer

抑制丝裂原活化的蛋白激酶通路的作用^[10]。已有较多文献报道,包括乳腺癌、卵巢癌、胃癌、口腔鳞状细胞癌等多种恶性肿瘤中均存在 *PTEN* 基因缺失,因此认为 *PTEN* 基因与恶性肿瘤发生、发展密切相关^[11]。本研究中胃癌组织中 *PTEN* 阳性表达率明显低于癌旁正常组织中的阳性表达率, *PTEN* 阴性表达的胃癌患者术后复发风险明显高于 *PTEN* 阳性表达的患者,进一步证实上述观点。

uPA 是一种高度特异性的丝氨酸蛋白酶,可将纤溶酶原激活呈纤溶酶,纤溶酶可降解纤维蛋白、层粘连蛋白,促进肿瘤侵袭、转移^[12]。已有相关研究报道, *uPA* 与血管内皮因子之间有着显著相关性,且 *uPA* 可为血管生成提供有利条件,影响细胞生长、分化及凋亡^[13]。Haghighi 等学者^[14]通过动物

实验发现, *uPA* 抗体具有较强的阻断癌细胞侵袭的能力,证实 *uPA* 在恶性肿瘤侵袭、转移中的作用。本研究中, *uPA* 阳性表达的胃癌患者术后复发率为 80.65%,与 Lee 等学者^[15]报道结果大致相同。

EZH2 与细胞生长调节相关,通过抑制染色质中的靶基因而调节细胞增殖。作为转录阻遏因子, *EZH2* 控制细胞的记忆系统,能够促进细胞增殖、肿瘤细胞扩散,在多种肿瘤组织中高表达,已成为近年来研究焦点。本研究结果与国外学者报道结果相一致^[16]。分析胃癌组织中 *EZH2* 阳性表达率较高的原因:可能为 *EZH2* 参与细胞周期的调控,导致胃粘膜上皮细胞周期异常,癌细胞增殖速度加快,导致胃癌患者术后复发。本研究通过绘制 ROC 曲线提示联合三者检测比单一检测更具预后判断价值。

综上,胃癌的发展、侵袭、转移及术后复发是一个由多种基因、蛋白参与的过程,需在胃癌根治术患者术后加强 *PTEN*、*uPA*、*EZH2* 三者联合检测,有利于临床综合判断患者术后预后情况,对指导临床治疗具有重要意义。

参考文献

- [1] Yuge R, Kitadai Y, Takigawa H, et al. Abstract 1987: Inhibition of collagen receptor discoidin domain receptor - 1 (DDR1) reduces gastric cancer cell motility and metastasis [J]. Cancer Res, 2017, 77(13): 1987-1987.

- [2] 慕星, 白志刚, 张忠涛, 等. 核 PTEN 和 p53 基因在胃癌组织中的表达及临床意义[J]. 临床和实验医学杂志, 2019, 18(12):78-83.
- [3] Chen HF, Ma RR, He J Y, et al. Protocadherin 7 inhibits cell migration and invasion through E-cadherin in gastric cancer[J]. *Tumour Biol*, 2017, 39(4):10-15.
- [4] 王昕楠, 江龙洋, 张明, 等. 大肠癌患者不同临床特征中 uPA 表达的 Meta 分析[J]. 现代肿瘤医学, 2017, 24(15):87-90.
- [5] Anshuman P, Mehnert JM, Hirshfield KM, et al. Immune Activation and Benefit From Avelumab in EBV-Positive Gastric Cancer[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2017, 132(3):1-9.
- [6] Padmanabhan N, Ushijima T, Tan P. How to stomach an epigenetic insult: the gastric cancer epigenome[J]. *Nat Rev Gastro Hepatol*, 2017, 15(26):85-89.
- [7] Ojima T, Nakamori M, Nakamura M, et al. Internal Hernia After Laparoscopic Total Gastrectomy for Gastric Cancer[J]. *Surg Laparo Endo Per*, 2017, 25(22):1-8.
- [8] 闵捷, 曹丽莉, 沈彬彬, 等. 长链非编码 RNA XIST 靶向 miR-101/EZH2 对胰腺癌细胞增殖和迁移的影响[J]. 中华胰腺病杂志, 2020, 20(3):200-206.
- [9] 相绿竹, 王晔, 陈文, 等. miR-182-5p 调节细胞自噬促进胃癌细胞的增殖, 迁移和侵袭[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(5):596-600+638.
- [10] Baratieh Z, Khalaj Z, Honardoost MA, et al. Aberrant expression of PlncRNA-1 and TUG1: potential biomarkers for gastric cancer diagnosis and clinically monitoring cancer progression[J]. *Biomark Med*, 2017, 11(37):89-93.
- [11] Singh P, Toom S, Huang Y. Anti-claudin 18.2 antibody as new targeted therapy for advanced gastric cancer[J]. *J Hematol Oncol*, 2017, 10(1):23-28.
- [12] Lee S, Kim JK, Kim YN, et al. Safety and feasibility of reduced-port robotic distal gastrectomy for gastric cancer: a phase I/II clinical trial[J]. *Surg Endosc*, 2017, 17(14):33-39.
- [13] Masaru H, Naoki H, Souya N, et al. Clinical Outcomes and Evaluation of Laparoscopic Proximal Gastrectomy with Double-Flap Technique for Early Gastric Cancer in the Upper Third of the Stomach[J]. *Ann Surg Oncol*, 2017, 17(12):74-82.
- [14] Haghighi SR, Asadi MH, Akrami H, et al. Anti-carcinogenic and anti-angiogenic properties of the extracts of *Acorus calamus* on gastric cancer cells[J]. *AJP*, 2017, 7(2):145-156.
- [15] Lee CM, Park S, Park SH, et al. Sentinel Node Mapping Using a Fluorescent Dye and Visible Light During Laparoscopic Gastrectomy for Early Gastric Cancer: Result of a Prospective Study From a Single Institute[J]. *Ann Surg*, 2017, 265(4):766-772.
- [16] Sonohara F, Inokawa Y, Hayashi M, et al. Epigenetic modulation associated with carcinogenesis and prognosis of human gastric cancer (Review)[J]. *Oncol Lett*, 2017, 13(5):3363-3367.

(上接第 1083 页)

- [4] 谢永祥, 徐佳佳, 杨旭. hs-CRP、WBC 及 PCT 检测诊断儿童呼吸道感染[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2021, 13(1):21-24.
- [5] 赵海鹏, 李俊莹, 张晓红, 等. 肝素结合蛋白、降钙素原、中性粒细胞载脂蛋白联合检测对重症急性胰腺炎患者继发感染的评估作用[J]. 中国实验诊断学, 2020, 24(11):1816-1818.
- [6] 中国中西医结合学会肾脏疾病专业委员会. 慢性肾衰竭中西医结合诊疗指南[J]. 中国中西医结合杂志, 2015, 35(9):1029-1033.
- [7] Li PK, Szeto CC, Piraino B, et al. Peritoneal dialysis-related infections recommendations: 2010 update[J]. *Perit Dial Int*, 2010, 30(4):393-423.
- [8] 刘文慧, 甘建和, 秦爱兰. 降钙素原联合感染可能性评分对肝衰竭患者并发感染的预测价值[J]. 临床肝胆病杂志, 2019, 35(9):1995-2000.
- [9] Paillaud E, Bastuji-Garin S, Plonquet A, et al. Combined Plasma Elevation of CRP, Intestinal-Type Fatty Acid-Binding Protein (I-FABP), and sCD14 Identify Older Patients at High Risk for Health Care-Associated Infections[J]. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2018, 73(2):211-217.
- [10] Tsukamoto H, Takeuchi S, Kubota K, et al. Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein stimulates CD14-dependent Toll-like receptor 4 internalization and LPS-induced TBK1-IKK-IRF3 axis activation[J]. *J Biol Chem*, 2018, 293(26):10186-10201.
- [11] Ciesielska A, Matyjek M, Kwiatkowska K. TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2021, 78(4):1233-1261.
- [12] 江玲, 王运铎, 赵晓慧, 等. 初始治疗无效肺炎患者肺部灌洗液病原菌构成及血清 CRP、PCT 研究[J]. 中华生物医学工程杂志, 2019, 25(6):781-785.
- [13] 王华东. 血清 PCT 和 hs-CRP 水平对急性脑梗死患者伴发感染的预测价值[J]. 中华危重病急救医学, 2019, 31(8):962-966.
- [14] 周飞燕, 吴凌慧, 汤素华, 等. IL-6 和 CRP 与 PCT 检测早期诊断腹膜透析感染性腹膜炎及预后的临床价值[J]. 中华医院感染学杂志, 2020, 30(18):2772-2775.
- [15] 柳秀平, 彭敏峰, 吕凌云. 白细胞计数、降钙素原和 C-反应蛋白检测在日间非卧床腹膜透析相关性腹膜炎诊疗中的应用价值[J]. 中国卫生检验杂志, 2020, 30(6):732-734.
- [16] 王艳欣, 侯凤琴. 中性粒细胞脂质运载蛋白对细菌感染的诊断价值[J]. 中华传染病杂志, 2020, 38(5):324-328.
- [17] 李丹, 郑裕鹏, 邱玉杏, 等. HNL、ANXA1 mRNA 表达水平与 COPD 合并肺部感染病原菌分布及药物敏感性的关系[J]. 热带医学杂志, 2019, 19(10):1233-1236.

· 论 著 ·

S100 β 、Hcy 对阿尔茨海默病诊断及病情评估的价值

杜韵华^{1*} 刘军² 郭丽冰¹ 许伟杰³ 游青青⁴

[摘要] **目的** 探讨星形胶质源性蛋白(S100 β)、同型半胱氨酸(Hcy)对阿尔茨海默病(AD)诊断及病情评估的价值。**方法** 选取本院2018年6月至2020年12月96例AD患者作为观察组,另选取同期健康体检者48例作为对照组。比较两组血清S100 β 、Hcy水平,评价血清S100 β 、Hcy对AD的诊断价值,观察组根据临床痴呆评定量表(CDR)分轻度、中度、重度,对比不同病情患者血清S100 β 、Hcy、认知功能(MMSE)评分、精神行为(BEHAVE-AD)评分,分析血清S100 β 、Hcy与MMSE、BEHAVE-AD评分及病情程度间关系。**结果** 观察组血清S100 β 、Hcy水平高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);血清S100 β 与Hcy呈正相关($r=0.585, P<0.05$);血清S100 β 、Hcy联合诊断AD的AUC为0.905;随病情加重血清S100 β 、Hcy、BEHAVE-AD评分升高,MMSE评分降低,血清S100 β ($r=-0.775, 0.736, P<0.001$)、Hcy($r=-0.682, 0.728, P<0.001$)与MMSE评分呈负相关,与BEHAVE-AD评分呈正相关($P<0.05$);多元线性回归校正MMSE、BEHAVE-AD评分等其他因素,血清S100 β 、Hcy仍与AD病情程度相关($P<0.05$)。**结论** 血清S100 β 、Hcy水平变化与AD发生发展成独立显著相关,二者联合检测为临床完善AD诊断机制提供参考。

[关键词] 星形胶质源性蛋白;同型半胱氨酸;阿尔茨海默病

The value of S100 β and Hcy in the diagnosis and evaluation of Alzheimer's disease

DU Yunhua^{1*}, LIU Jun², GUO Libing¹, XU Weijie³, YOU Qingqing⁴

(1. Department of Neurology, The Third People's Hospital of Foshan, Foshan, Guangdong, China, 528041; 2. Department of Neurology, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong, China, 510000; 3. Department of Neuroimaging, The Third People's Hospital of Foshan, Foshan, Guangdong, China, 528041; 4. Department of Neurology, The Third People's Hospital of Foshan, Foshan, Guangdong, China, 528041)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the value of astrocyte-derived protein (S100 β) and homocysteine (Hcy) in the diagnosis and evaluation of Alzheimer's disease (AD). **Methods** A total of 96 AD patients in our hospital from June 2018 to December 2020 were selected as the observation group, and 48 patients with healthy physical examination during the same period were selected as the control group. The serum S100 β and Hcy levels were compared between the two groups, and the diagnostic value of serum S100 β and Hcy in AD was evaluated. The observation group was divided into mild, moderate, and severe according to the Clinical Dementia Rating (CDR). The serum S100 β , Hcy, cognitive function (MMSE) scores, and mental behavior (BEHAVE-AD) scores of patients with different conditions were compared, and the relationship between serum S100 β , Hcy and MMSE, BEHAVE-AD scores and the severity of the disease were analyzed. **Results** The levels of serum S100 β and Hcy in the observation group were higher than those in the control group, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). Serum S100 β and Hcy were

基金项目:广东省佛山市卫生局项目(20170133)

作者单位:1. 广东省佛山市第三人民医院神经内科,广东,佛山 528041

2. 中山大学孙逸仙纪念医院神经内科,广东,广州 510000

3. 广东省佛山市第三人民医院神经影像科,广东,佛山 528041

4. 广东省佛山市第三人民医院神经检验科,广东,佛山 528041

*通信作者:杜韵华, E-mail:autumn_1981@163.com

positively correlated ($r=0.585, P<0.05$); the AUC of the combined diagnosis of AD by serum S100 β and Hcy was 0.905. Serum S100 β , Hcy, BEHAVE-AD score increased, MMSE score decreased, serum S100 β ($r=-0.775, 0.736, P<0.001$), Hcy ($r=-0.682, 0.728, P<0.001$) were negatively correlated with MMSE score, and positively correlated with BEHAVE-AD score ($P<0.05$). Multiple linear regression was used to adjust for other factors such as MMSE, BEHAVE-AD score, serum S100 β and Hcy were still correlated with the severity of AD ($P<0.05$). Changes in serum S100 β and Hcy levels are independently and significantly correlated with the occurrence and development of AD. The combined detection of the two provides a reference for the clinical improvement of the diagnosis mechanism of AD.

[KEY WORDS] Astrocyte-derived protein; Homocysteine; Alzheimer's disease; Clinical dementia rating

阿尔茨海默病(Alzheimer disease, AD)是临床常见老年痴呆类型,主要表现为认知功能障碍及精神行为异常等临床特征。目前AD病因、病机尚未明确,尽管相继有报道表明,AD是在年龄、营养、遗传等多种因素共同作用下发生,但仍缺乏AD早期诊断及病情评价的有效机制^[1]。临床痴呆评定量表(Clinical dementia rating, CDR)是当前临床评价AD病情常用工具,可从定向力、记忆力、注意力等6个方面提供评价信息,内容全面但缺点是易受评价者主观因素影响,缺乏客观性^[2]。同型半胱氨酸(Homocysteine, Hcy)是甲硫氨酸脱甲基后生成的一种含硫必需氨基酸,临床研究表明,AD发生发展过程始终伴随Hcy升高,且高Hcy血症可增加个体AD发生风险至一倍^[3];星形胶质源性蛋白(S100 β)由脑星形胶质细胞表达、释放,有研究证实,在AD患者老年斑区、弥散性A β 沉积区常伴星形胶质细胞聚集,加之S100 β 具多层面神经生物学效应,其水平变化可能与AD发生发展有关^[4-5]。基于此,本研究尝试分析S100 β 、Hcy对AD诊断及病情评估的价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取本院2018年6月至2020年12月96例AD患者作为观察组,另选取同期健康体检者48例作为对照组。纳入标准:①观察组符合AD诊断标准^[6];②自觉认知功能及日常生活能力降低超过6个月;③对照组体健,无脑血管疾病史,无认知及精神性疾病;④知情理解签署同意书。排除标准:①伴糖尿病者;②有严重肝肾心功能障碍者;③存在抑郁症等其他精神疾病者;④血管性痴呆或其他病因所致痴呆者;⑤恶性肿瘤者;⑥合并自身免疫性疾病者。本研究经医学伦理委员会审批通过。

1.2 方法

①生化指标检测:采用非抗凝真空管采集肘

晨空腹静脉血2 mL,离心(半径8 cm,转速3 500 r/min,时间15 min),采集上层血清,采用武汉明德生物科技有限公司免疫层析法试剂盒测S100 β 水平;上海抚生实业有限公司酶联免疫法试剂盒测Hcy水平。②认知功能、精神行为评价方法:采用简易精神状态量表(Mini-mental state examination, MMSE)^[6]评价认知功能,30分最高,得分越高认知功能越高;采用阿尔茨海默病病理行为评分量表(Behavioral pathology in Alzheimer's disease, BEHAVE-AD)评价精神行为包括焦虑和恐惧、情感障碍、幻觉、妄想和偏执等共25个条目,30分,得分越高病情越严重。

1.3 统计学处理

采用统计学软件SPSS 25.0处理数据;计数资料以 $n(\%)$ 描述,采用 χ^2 检验;计量资料以 $(\bar{x}\pm s)$ 描述,两组间比较采用独立样本 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,两两组间比较采用LSD- t 检验;Pearson、多元线性回归分析变量间关系;采用ROC曲线分析诊断价值。均采用双侧检验, $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 两组一般资料对比

两组性别、年龄、体质量指数、饮食习惯、AD家族史、吸烟史、酗酒史、最高学历比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表1。

2.2 两组血清S100 β 、Hcy水平比较

观察组血清S100 β 、Hcy水平高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表2。

2.3 血清S100 β 与Hcy相关性

血清S100 β 与Hcy呈正相关($r=0.585, P<0.001$)。

2.4 血清S100 β 、Hcy对AD的诊断价值

根据两组血清S100 β 、Hcy水平绘制单独及联合诊断AD的ROC。见表3、图1。

表1 两组一般资料比较 [n(%), ($\bar{x} \pm s$)]

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

一般资料	观察组 (n=96)	对照组 (n=48)	t/ χ^2 值	P值
年龄(岁)	66.89±5.03	65.27±4.46	1.890	0.061
性别	男	51(53.13)	0.125	0.723
	女	45(46.88)		
体质量指数(kg/m ²)	21.39±1.29	20.97±1.03	1.963	0.052
饮食习惯	偏素食	34(35.42)	0.094	0.954
	偏肉食	38(39.58)		
	均衡	24(25.00)		
AD家族史	有	10(10.42)	0.264	0.607
	无	86(89.58)		
吸烟史	56(58.33)	26(54.17)	0.227	0.634
酗酒史	34(35.42)	15(31.25)	0.248	0.619
最高学历	小学及以下	28(29.17)	0.217	0.828
	初中、高中	57(59.38)		
	大专及以上	11(11.46)		

表2 两组血清S100 β 、Hcy水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of serum S100 β and Hcy levels between 2 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	S100 β (ng/mL)	Hcy(μ mol/L)
观察组	96	0.18±0.05	15.82±4.37
对照组	48	0.07±0.02	10.69±3.16
t值		14.647	7.237
P值		<0.001	<0.001

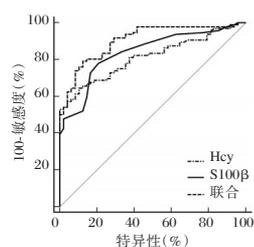


图1 血清S100 β 、Hcy对AD的诊断价值

Figure 1 The diagnostic value of serum S100 β and Hcy in AD

2.5 不同病情程度患者血清S100 β 、Hcy、MMSE、BEHAVE-AD评分

不同病情程度患者血清S100 β 、Hcy、MMSE、BEHAVE-AD评分比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);随病情加重,血清S100 β 、Hcy、BEHAVE-AD评分呈升高趋势,MMSE评分呈降低趋势,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表4。

表4 不同病情程度患者血清S100 β 、Hcy、MMSE、BEHAVE-AD评分比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Comparison of serum S100 β , Hcy, MMSE, BEHAVE-AD scores in patients with different disease levels ($\bar{x} \pm s$)

病情程度	n	S100 β (ng/mL)	Hcy (μ mol/L)	MMSE (分)	BEHAVE-AD (分)
轻度患者	45	0.12±0.04 ^b	13.15±2.04 ^b	23.17±2.54 ^b	8.12±1.13 ^b
中度患者	33	0.21±0.06 ^{ab}	16.02±2.43 ^{ab}	15.38±3.06 ^{ab}	13.67±2.24 ^{ab}
重度患者	18	0.28±0.09 ^a	22.13±3.18 ^a	7.76±1.13 ^a	20.39±3.05 ^a
F值		53.449	88.799	253.671	251.321
P值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

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

2.6 血清S100 β 、Hcy与MMSE、BEHAVE-AD评分相关性

Pearson相关性分析,血清S100 β ($r = -0.775$ 、 0.736 , $P < 0.001$)、Hcy($r = -0.682$ 、 0.728 , $P < 0.001$)与MMSE评分呈负相关,与BEHAVE-AD评分呈正相关。

2.7 血清S100 β 、Hcy与AD病情程度的关系

多元线性回归分析,将MMSE、BEHAVE-AD评分等其他因素调整后,血清S100 β 、Hcy仍与AD病情程度显著相关($P < 0.05$)。见表5。

表5 血清S100 β 、Hcy与AD病情程度的关系

Table 5 The relationship between serum S100 β , Hcy and the severity of AD

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	2.591				
S100 β	0.718	0.066	0.743	10.879	<0.001
Hcy	0.804	0.071	0.829	11.324	<0.001

3 讨论

AD是进行性神经变性疾病,近年随我国逐渐步入超级老龄化社会,此疾病发病率呈显著增加趋势^[7]。目前AD尚无有效治疗方案,而早期确诊并积极干预是抑制病情进展,改善患者预后的关键环节。

当前AD的临床诊断主要通过患者临床症状、神经影像学检查及量表评估等,但均存在一定不足,如:特异性差、滞后性等。中枢神经系统信号传导、

表3 血清S100 β 、Hcy对AD的诊断价值

Table 3 The diagnostic value of serum S100 β and Hcy in AD

指标	AUC	95%CI	Z值	截断值	敏感度(%)	特异度(%)	P值
S100 β	0.840	0.769~0.896	10.245	>0.11 ng/mL	78.12	79.17	<0.001
Hcy	0.813	0.739~0.873	9.081	>14.90 μ mol/L	64.58	89.58	<0.001
联合	0.905	0.844~0.947	16.160	-	79.17	87.50	<0.001

脑血管病变是AD发生的主要病理生理性基础,或可为临床早期诊治提供新视角^[8-9]。S100 β 是酸性蛋白,可连接Ca²⁺而影响信号传导通路,其广泛分布在中枢神经系统内,能有效维持神经细胞内外Ca²⁺稳态以促进中枢神经系统胶质细胞的生长及分化。目前S100 β 已被多项研究证实,其与脑中风、脑外伤等多种疾病所致认知障碍有关^[10-11]。本研究结果显示血清S100 β 水平可能与AD发病有关。结合现有研究^[12]分析,S100 β 在AD发生中的病理生理特性可能是正常情况主要定位于星形细胞、胶质细胞,AD发生发展过程伴随上述细胞异常损伤、凋亡,持续释放S100 β 入血,同时机体为适应此病理生理性改变而大量生成S100 β 以代偿出现的信号传导通路缺陷。

Hcy是含硫氨基酸代谢重要中间产物。正常情况Hcy含量较低,空腹血清值5~15 $\mu\text{mol/L}$ 。近年有关Hcy的研究集中在动脉粥样硬化层面,也有研究指出,其水平变化与神经变性疾病有关,如靳秀等^[13]指出,血清Hcy与AD患者MMSE评分呈负相关。本研究结果提示二者在AD发生发展中可能具有密切关系。分析此机制可能是:①高浓度Hcy可诱导神经细胞外 β -淀粉样蛋白沉积、细胞内Tau蛋白过磷酸化及神经元DNA损伤等,而此病理性改变可在影响中枢神经系统信号传导的同时通过损伤星形细胞、胶质细胞增加外周血S100 β 含量^[14];②高浓度Hcy能影响基因表达,诱发一系列细胞应答及信号通路,包括星形细胞、胶质细胞及小胶质细胞激活、血脑屏障破坏、微循环变化等,同样可造成S100 β 释放入血^[15]。因此,血清S100 β 、Hcy联合有助于更客观反映AD发生情况。

此外,本研究结果提示二者水平变化可能同时适用于AD病情评估。目前AD病情的评估主要依托于认知功能及精神行为的改变,MMSE、BEHAVE-AD评分是临床评价AD患者认知功能及精神行为的常用工具,但相关研究显示,AD患者认知功能及精神行为受多种因素影响,如:受教育程度等可能影响相关评价^[16]。本研究结果客观说明血清S100 β 、Hcy可应用于AD病情程度的评估。本研究不足之处在于,AD发生发展涉及多因素、多过程,而S100 β 、Hcy对应调控机制是否可为临床治疗AD提供新视角。尚需继续探究。

综上所述,血清S100 β 、Hcy水平变化与AD发生发展成独立显著相关,二者联合检测可为临床完善AD诊断机制提供参考。

参考文献

- [1] 李笑阳,刘冠含,尹昊文,等. 中国老年人群阿尔茨海默病发病危险因素的Meta分析[J]. 现代预防医学, 2020, 47(6): 1100-1103+1119.
- [2] Ji EK, Wang HH, Jung SJ, et al. Is the modified Mann Assessment of Swallowing Ability useful for assessing dysphagia in patients with mild to moderate dementia[J]. J Clin Neurosci, 2019, 70(1): 169-172.
- [3] 赵昕,朱小泉,李小玲,等. 阿尔茨海默病患者血清脂蛋白相关磷脂酶A2高敏C-反应蛋白补体成分C1q和同型半胱氨酸水平的研究[J]. 中华老年医学杂志, 2019, 38(4): 388-392.
- [4] 韩玉华,周俐红,李艳丽. Lp-PLA2、Hcy及S100 β 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.
- [5] Ribon M, Leone C, Chiot A, et al. Deletion of the inflammatory S100-A9/MRP14 protein does not influence survival in hSOD1 G93A ALS mice[J]. Neurobiol Aging, 2021, 101(1): 181-186.
- [6] 国家卫生健康委办公厅,中华人民共和国国家卫生健康委员会. 阿尔茨海默病的诊疗规范(2020年版)[J]. 全科医学临床与教育, 2021, 19(1): 4-6.
- [7] 马蔚蔚,张晓玲. 阿尔茨海默病社区筛查和诊断的研究进展[J]. 中国全科医学, 2021, 24(6): 643-651.
- [8] 李莹,黄南渠,李园园,等. AMPK/SIRT1-PPAR γ -PGC1 α -BACE1信号通路及其相关因子在阿尔茨海默病病理改变中的作用[J]. 医学综述, 2019, 25(5): 850-855+861.
- [9] Shang J, Yamashita T, Fukui Y, et al. Different Associations of Plasma Biomarkers in Alzheimer's Disease, Mild Cognitive Impairment, Vascular Dementia, and Ischemic Stroke[J]. J Clin Neurol, 2018, 14(1): 29-34.
- [10] 程毅坚,唐建成. 右美托咪定对体外循环心脏手术病人脑损伤的作用[J]. 热带医学杂志, 2017, 17(7): 949-951, 955.
- [11] 刘姚,王建林,罗丽华,等. 石菖蒲对颅脑损伤模型大鼠认知功能障碍、血清炎症因子及s100 β 、NSE蛋白水平的影响[J]. 中医学报, 2020, 35(2): 334-337.
- [12] 邱永升,贾英萍,李小芹,等. 婴幼儿体外循环应用 α 2肾上腺素能受体激动剂的神经保护作用[J]. 中华生物医学工程杂志, 2018, 24(3): 172-177.
- [13] 靳秀,王圣海,马晓佳,等. 痴呆患者认知功能障碍与血清IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、Hcy、hs-CRP和IL-1RA水平的相关性[J]. 精神医学杂志, 2019, 32(2): 111-114.
- [14] 王兴萍,岳学静,程度,等. 单核细胞/高密度脂蛋白胆固醇比值评估高血压患者并发急性脑梗死预后价值[J]. 华南预防医学, 2020, 46(1): 66-68.
- [15] 肖猛,任传忠. 同型半胱氨酸通过Rho激酶信号通路促进大鼠脑基底动脉平滑肌细胞活力与迁移[J]. 中国病理生理杂志, 2019, 35(8): 1372-1378.
- [16] 孙金菊,陈晓,焦方阳,等. 11C-PIB在轻度认知障碍及阿尔茨海默病诊断中的价值及其影响因素[J]. 中华核医学与分子影像杂志, 2021, 41(1): 12-17.

hsa_circ_0006220 对子痫前期滋养细胞的增殖和迁移的影响

周俏苗* 林丹 许晶 吴秀菊 钟高布 王秋艳

[摘要] **目的** 探讨 hsa_circ_0006220 通过 miR-203a-3p/SOCS3 轴在子痫前期滋养细胞增殖、侵袭、迁移中发挥的作用。**方法** 收集 2018 年 9 月至 2019 年 8 月海南省妇女儿童医学中心妇产科单胎剖宫产分娩的子痫前期(PE)患者和正常妊娠胎盘组织(NC)各 8 例。qPCR 检测 hsa_circ_0006220 在子痫前期患者胎盘组织中的表达情况。滋养细胞 HTR-8/Svneo 中转染 si-hsa_circ_0006220, 建立基因过沉默的细胞模型, qPCR 检测 miR-203a-3p 和 SOCS3 基因的表达情况。MTS 法、Transwell 实验检测转染后细胞增殖、侵袭和迁移情况。**结果** 子痫前期的胎盘组织中与正常妊娠胎盘组织比较, hsa_circ_0006220 ($t=3.50, P=0.01$) 和 hsa_circ_0001681 ($t=2.71, P=0.03$) 的表达, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。在滋养细胞 HTR-8/Svneo 细胞中沉默 hsa_circ_0006220 后, HTR-8/Svneo 细胞的活力在 72 h 时呈明显增加趋势, 侵袭和迁移能力均明显增加, miR-203a-3p 呈高表达, SOCS3 基因呈低表达。**结论** hsa_circ_0006220 通过结合 miR-203a-3p 抑制滋养细胞的迁移和侵袭, 可能是导致子痫前期的原因之一。

[关键词] 子痫前期; HTR-8/Svneo 细胞; hsa_circ_0006220; miR-203a-3p/SOCS3 轴; 增殖; 侵袭; 迁移

Effect of hsa_circ_0006220 on the proliferation and migration of trophoblast cells in preeclampsia

ZHOU Qiaomiao^{1*}, LIN Dan¹, XU Jing¹, WU Xiuju¹, ZHONG Gaobu¹, WANG Qiuyan¹
(Hainan Women and Children's Medical Center, Haikou, Hainan, China, 570000)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the role of hsa_circ_0006220 in the proliferation, invasion and migration of trophoblast cells in preeclampsia through the miR-203a-3p/SOCS3 axis. **Methods** From September 2018 to August 2019, 8 cases of preeclampsia (PE) patients and placental tissue (NC) of normal pregnancy who were delivered by singleton cesarean section in the Department of Obstetrics and Gynecology of Hainan Women and Children's Medical Center were collected. qPCR was used to detect the expression of hsa_circ_0006220 in the placenta of patients with preeclampsia. The trophoblast cells HTR-8/Svneo were transfected with si-hsa_circ_0006220 to establish a gene-silenced cell model, and qPCR was used to detect the expression of miR-203a-3p and SOCS3 genes. MTS method and Transwell experiment were used to detect cell proliferation, invasion and migration after transfection. **Results** Compared with normal pregnancy placenta tissue in preeclampsia placenta tissue, the expressions of hsa_circ_0006220 ($t=3.50, P=0.01$) and hsa_circ_0001681 ($t=2.71, P=0.03$) were significantly different ($P<0.05$). After silencing hsa_circ_0006220 in trophoblast HTR-8/Svneo cells, the viability of HTR-8/Svneo cells increased significantly at 72 h. Both invasion and migration capabilities increased significantly, miR-203a-3p was highly expressed, and the SOCS3 gene showed Low expression. **Conclusion** hsa_circ_0006220 inhibits the migration and invasion of trophoblast cells by sponging miR-203a-3p, which may be one of the causes of preeclampsia.

[KEY WORDS] Preeclampsia; HTR-8/Svneo cell; hsa_circ_0006220; miR-203a-3p/SOCS3 axis; Proliferation; Invasion; Migration

基金项目:海南省卫生健康行业科研项目(20A200181)

作者单位:海南省妇女儿童医学中心,海南,海口 570000

*通信作者:周俏苗, E-mail:zhouqiaomiao@163.com

子痫前期(Preeclampsia, PE)是一种人类妊娠特异性、异质性、多系统疾病,以妊娠20周后高血压和蛋白尿新发为特征,影响3%~5%的妊娠^[1]。2015年,全球有2%~8%的孕妇患有PE,死亡人数达46 900人^[2]。专家认为胎盘在这种疾病的发病机制中起着核心作用^[3]。胎盘缺损,特别是滋养细胞功能障碍,包括增殖减少、过度凋亡、分化异常、迁移和侵袭受限等都与子痫前期有关^[4]。既往研究表明,妊娠期间滋养细胞适时适量地增殖、分化、迁移、浸润和凋亡,这些过程失控,滋养细胞侵袭会出现异常,导致胎盘浅着床及血管重铸障碍,最终引起子痫前期^[5]。环状RNA(circRNAs)是一种具有共价闭合的结构,可以保护自身免受外切酶干扰的核酸分子^[6],常出现于外显子、内含子和基因间区域^[7],通过充当蛋白质复合物组装中的支架来调控基因表达,调节选择性剪接及RNA-蛋白质相互作用,还可以作为miRNA海绵发挥作用^[8]。因此,circRNAs在子痫前期中的功能作用值得深入探讨。CircRNAs在子痫前期异常表达的机制还不清楚。circRNA_001569可以通过miR-145/HBXIP轴影响乳腺癌细胞的恶性生物学行为^[9]。circTADA2As通过靶向miR-203a-3p/SOCS3轴抑制乳腺癌进展和转移^[10]。ER α 相关的circ-SMGI1通过72/miR-141-3p/gelsolin轴抑制肝癌细胞侵袭^[11]等。滋养细胞的迁移和侵袭与肿瘤细胞迁移和侵袭的内在分子机理非常相近。因此,本研究,探索异常表达的circRNA在子痫前期的作用机制。

1 对象与方法

1.1 对象

选取2018年9月至2019年8月本院妇产科住院的子痫前期患者和正常妊娠胎盘组织各8例,诊断及分类标准参考全国统编教材第九版《妇产科学》^[12]。纳入标准:①均为单胎妊娠;②均为剖宫产分娩。排除标准:①原发性高血压、既往心肝肾及内分泌病史;②胎膜早破早产和感染征象。所有组织均保存在液氮中。本研究已获得院伦理委员会批准同意,所有患者均签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

滋养层细胞株HTR-8/Svneo购自于中国科学院生物化学与细胞生物学研究所。用10%胎牛血清的RPMI-1640培养基(SH30809.01;美国HyClone

公司)(100 U/mL,青霉素,0.1 mg/mL链霉素)(15140-122;美国Invitrogen),采用37℃、5% CO₂培养箱(371;美国Thermo Scientific)培养。

1.2.2 siRNA及miR-203a-3p的抑制物inhibitor设计合成及转染

hsa_circ_0006220的特异siRNA序列(SS: CACUGCAGGAUGUAGCCAAdTdT; AS: GAUUGGCUACAUCCUGCAGUG),细胞用0.25%胰酶-EDTA(40127ES60;上海翊圣)溶液消化,5×10⁵个/孔接种到6孔板中,用无RNase水溶解siRNA片段溶于opti-MEM中,通过Lipofectamine™ 2000(11668-027;美国Invitrogen)进行转染,si-NC序列(SS: UUCUCCGAACGUGUCACGUTT; AS: ACGUGACACGUUCGGAGAATT)作为阴性对照。48 h后收集细胞。

1.2.3 组织和细胞的RNA提取和荧光定量PCR

用总RNA提取试剂盒(上海生工生物工程有 限公司)提取总RNA。在梯度PCR仪(美国ABI-MinAmp)上利用cDNA逆转录试剂盒(K1691;美国Thermo Scientific)将RNA逆转录成为cDNA,PCR反应体系:cDNA模板1 μL、上/下游引物2 μL、SYBR premix Ex Taq 5 μL。PCR反应条件:95℃预变性10 s、95℃变性5 s、61℃复性20 s、72℃延伸10 min(40个循环)。结果分析:采用Comparative Ct法计算目标RNA的表达量。每个cDNA样本每对引物重复测定3次,SOCS3基因表达测定以GADPH作为内参对照。其他RNA的表达测定,以U6为内参对照。引物序列见表1。

1.2.4 MTS法检测HTR-8/Svneo细胞增殖

取对数生长期的两组HTR-8/Svneo细胞,分别以3 000个细胞/孔接种于96孔板中,每株细胞3个复孔,于37℃、5% CO₂培养箱中继续培养。分别在0、24、48、72 h后加入MTS试剂(ab223881;美国abcam),比例为1:10。37℃孵育4 h后,检测490 nm波长处的光密度(optical density, OD)值(SynergyH1酶标仪;美国Biotek),绘制细胞生长曲线。

1.2.5 划痕实验检测细胞侵袭

对数生长期的细胞经胰酶消化,接种至6孔板中,1×10⁶个细胞/孔,分别转染si-NC和siRNA培养24 h。待细胞完全贴壁后换液,用1 μg/mL丝裂霉素C(10107409001;瑞士罗氏)处理1 h,划痕,基础培养基培养,分别于0、6、24、48 h随机选取8个划痕视野拍照,Image-J软件量取距离并计算迁移

表1 引物序列
Table 1 Primer sequences

RNA 或基因名称	引物方向	序列
hsa_circ_0006220	上游	GCCATTCCATTCACTGCAG
	下游	AGGTTTCAGCAGGGTAGAT
hsa_circ_0001681	上游	TGCCTCTCATTCTGCCAGA
	下游	TCTTGATAGAGTCGCAGATGTTAGA
hsa_circ_0006990	上游	GCTCCACCAAACACTTCAGA
	下游	TACATCTGTGAAGGGGCCAA
hsa_circ_0072309	上游	GTATGGAGCTCGTAAAATTAGACTG
	下游	CTGTTCCAGAGGGTGCTTTC
GAPDH	上游	GAGTCAACGGATTTGGTCGT
	下游	GACAAGCTTCCCGTTCTCAG
SOCS3	上游	TGGTCACCCACAGCAAGTTT
	下游	CTGTCGCGGATCAGAAAGGT
miR-302b	逆转录	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGACTGGATACGACGAAAGC
	上游	ACTTTAACATGGAAGTGC
miR-203a	逆转录	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGACTGGATACGACAACTGT
	上游	AGTGGTTCTTAACAGTTCAAC
miR-302d	逆转录	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGACTGGATACGACGCAAGT
	上游	ACTTTAACATGGAGGCAC
miR-520d	逆转录	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGACTGGATACGACGAAAGG
	上游	CTACAAAGGGAAGCCC
miR-302c	逆转录	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGACTGGATACGACCAGCAG
	上游	TTTAACATGGGGGTACCT
miRNA 通用 U6	下游	GTGCAGGGTCCGAGGT
	逆转录/下游	AACGCTTACGAAATTTGCGT
	上游	CTCGCTTCGGCAGCACA

率, 迁移率=(0 h-其他时间点)/0 h。

1.2.6 Transwell 检测细胞迁移

将细胞悬浮于无血清培养基用 siRNA 或 NC 片段处理 24 h。1×10⁵ 个细胞接种到上室培养过夜。用棉签擦拭上表面细胞, 其中低表面重新混合并用 0.1% 结晶紫染色。每个孔室随机 200× 拍照五个视野, 并计数。

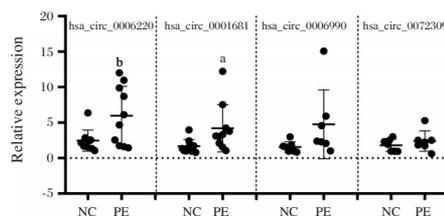
1.3 统计学分析

采用 SPSS 19.0 软件进行数据分析; 计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 双尾 *t* 检验用来分析各组指标之间的关系; 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 hsa_circ_0006220 在子痫前期胎盘组织中的表达

qRT-PCR 结果显示, 子痫前期的胎盘组织与正常妊娠胎盘组织比较, hsa_circ_0006220 ($t=3.50$, $P=0.01$) 和 hsa_circ_0001681 ($t=2.71$, $P=0.03$) 的表达差异有统计学意义 ($P < 0.05$); hsa_circ_0006990 ($t=1.16$, $P=0.31$) 和 hsa_circ_0072309 ($t=0.65$, $P=0.55$) 的表达在两组的表达比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 1。



注: 与 NC 组比较, ^a $P < 0.05$ (hsa_circ_0001681), ^b $P < 0.05$ (hsa_circ_0006220)。

图1 正常妊娠胎盘组织和子痫前期胎盘组织中 4 种 circRNA 的表达情况

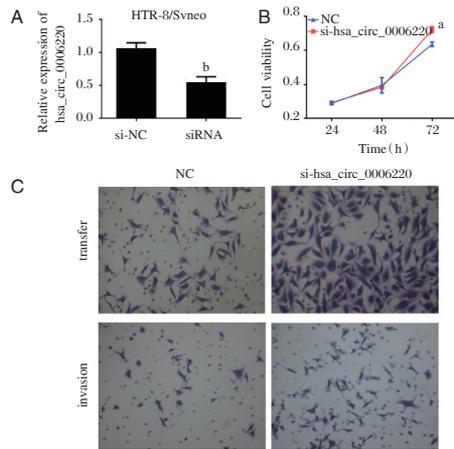
Figure 1 The expression of 4 circRNAs in normal pregnancy placental tissues and preeclampsia (PE) placental tissues

2.2 沉默 hsa_circ_0006220 对滋养细胞株 HTR-8/Svneo 的增殖、侵袭与迁移的影响

转染 siRNA 后 hsa_circ_0006220 的表达明显下降, 见图 2A。沉默 hsa_circ_0006220 后, HTR-8/Svneo 细胞的活力在 72 h 时呈明显增加趋势, 见图 2B。HTR-8/Svneo 细胞的侵袭和迁移能力均明显增加, 见图 2C。

2.3 hsa_circ_0006220 与 miR-203a-3p 之间的关系

hsa_circ_0006220 来源于 TADA2A 的第 6 个外显子, 具有多个 miR-302 家族, miR-203a-3p, miR

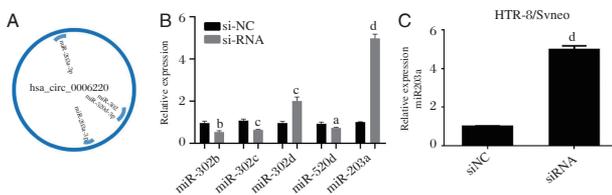


注: A为转染 si-NC 和 siRNA 后 hsa_circ_0006220 的表达,与 si-NC 比较, $^bP < 0.01$; B为转染 si-NC 和 siRNA 后 MTS 检测 HTR-8/Svneo 的增殖,与 si-NC 比较, $^aP < 0.05$; C为转染 si-NC 和 siRNA 后 transwell 检测 HTR-8/Svneo 迁移水平(结晶紫染色, $\times 200$)

图2 siRNA 干扰 hsa_circ_0006220 表达后对滋养细胞 HTR-8/Svneo 增殖和迁移的影响

Figure 2 Effects of siRNA interference with hsa_circ_0006220 expression on proliferation and migration of trophoblast cells HTR-8/SVneo

-520d-3p 等结合位点,见图 3A。研究通过 siRNA 来沉默 hsa_circ_0006220,对 miR-302b, miR-302c, miR-302d, miR-520d 和 miR-203a 进行 qRT-PCR 定量后发现,沉默 hsa_circ_0006220 后,miR-203a 表达显著提高。见图 3B、图 3C 和表 2。



注: A为 hsa_circ_0006220 相关的 miRNA 结合位点; B为转染 si-NC 和 siRNA 后 miRNA 的表达,与 si-NC 比较, $^aP < 0.05$ (miR-520d), $^bP < 0.05$ (miR-302b), $^cP < 0.05$ (miR-302c, miR-302d), $^dP < 0.05$ (miR-203a); C为转染 si-NC 和 siRNA 后 miR203a 的表达,与 si-NC 比较, $^dP < 0.05$ 。

图3 hsa_circ_0006220 与 miR-203a-3p 的关系以及它们在滋养细胞 HTR-8/Svneo 中的表达

Figure 3 The relationship between hsa_circ_0006220 and miR-203a-3p and their expression in trophoblast cells HTR-8/SVneo

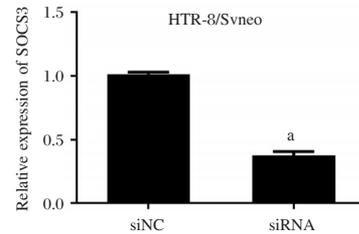
2.4 沉默 hsa_circ_0006220 对 SOCS3 基因表达的影响

沉默 hsa_circ_0006220 后 SOCS3 基因与对照组相比呈显著下降趋势。见图 4。

表2 两组之间 miRNA 表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of expression of miRNA between 2 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	miR-302b	miR-302c	miR-302d	miR-520d	miR-203a
si-NC	0.96±0.09	1.08±0.07	0.96±0.08	0.93±0.08	1.01±0.01
si-RNA	0.54±0.06	0.64±0.02	2.01±0.19	0.73±0.023	4.98±0.20
t 值	5.54	8.23	7.26	3.40	28.07
P 值	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00



注:与 si-NC 比较, $^aP < 0.05$ 。

图4 滋养细胞 HTR-8/Svneo 中转染 si-RNA 后对 SOCS3 基因表达的影响

Figure 4 After si-RNA transfection in trophoblast cells HTR-8/SVneo, the expression of SOCS3 gene decreased significantly

3 讨论

子痫前期是一种严重的妊娠并发症,未经治疗的子痫前期可能会导致孕产妇及胎儿的死亡^[13]。然而,子痫前期的风险因素只能检测出 30%可能患子痫前期的女性^[14]。目前已有证据表明非编码 RNA (noncoding RNAs, ncRNAs)与子痫前期之间具有相关关系^[15]。环状 RNA (Circular RNAs, circRNAs)作为一种 ncRNAs,已被证明可以作为其他 RNA 转录的潜在调控因子,如 microRNAs (miRNAs)。MiRNAs 影响从发育途径到肿瘤发生的几乎所有细胞过程。事实上,miRNA 能够调控大多数人类蛋白的表达^[16]。环状 RNA 在生物发育机制中起着非常关键的作用,主要包括调节 miRNA、内源性 RNA 表达,及作为不同疾病诊断生物标志物^[17]。

在 PE 胎盘中,ceRNA 谱分析有助于发现相关的生物调控过程或途径,这对 PE 发病机制的探索非常有利^[18]。环状 RNA 作为一种竞争性内源性 RNA,是一种相对于其他类型的 RNA 样本量更大、特异性更高,稳定性更高的 RNA。因此,环状 RNA 被认为是不同疾病的潜在生物标志物之一。最近的报道表明,环状 RNA 可调节 PE 进展^[19],并发现系列 circRNA 在子痫前期的胎盘中呈现高表

达趋势,可能是通过激活 miRNA 海绵来参与子痫前期发病机制。

miRNA 是一类由内源基因编码的长度约为 22 个核苷酸的非编码单链 RNA 分子,它们在转录后调节靶 mRNA 的表达,参与了细胞代谢、信号转导、细胞粘附、细胞运动、细胞分化和凋亡^[20]。本研究通过进一步分析 hsa_circ_0006220 结合的 miRNA,结果证实 hsa_circ_0006220 与 miR-203a-3p 的结合能力最强,这与 hsa_circ_0006220 可通过靶向 miR-203a-3p/SOCS3 轴来抑制乳腺癌细胞的迁移和侵袭的机制非常相似^[10]。Xiao 等也报道 ER α 相关的 circ-SMG1 通过 72/miR-141-3p/gelsolin 轴抑制肝癌细胞侵袭^[11]等。本研究结果说明 hsa_circ_0006220 是抑制滋养细胞侵袭和迁移的关键因素。因此滋养细胞的迁移和侵袭与肿瘤细胞迁移和侵袭的内在分子机理存在相似性,都是通过 circRNA 吸引 miRNA,从而导致细胞迁移和侵袭的减弱。

本研究结果发现,沉默 hsa_circ_0006220 后 SOCS3 基因表达也显著降低,再次证实 hsa_circ_0006220 靶向的基因是 SOCS3。SOCS3 基因是许多细胞因子如白细胞介素、干扰素、肿瘤坏死因子等信号通路的负反馈调节因子,参与人体免疫、炎症、脂质代谢及肿瘤的发生与转移等。

综上所述,circRNA hsa_circ_0006220 在子痫前期胎盘组织中表达升高,在滋养细胞中沉默后,细胞迁移和侵袭能力明显增强,能够作为 miR-203a-3p 的分子海绵,从而恢复 SOCS3 基因的表达。circRNA hsa_circ_0006220 可能为未来子痫前期的临床诊断和治疗提供新的分子靶点。

参考文献

- [1] Hypertension in pregnancy. Report of the American College of Obstetricians and Gynecologists' Task Force on Hypertension in Pregnancy [J]. *Obstet Gynecol*, 2013, 122(5): 1122-1131.
- [2] GBD 2015 Mortality and Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015 [J]. *Lancet*, 2016, 388(10053): 1459-544.
- [3] Huppertz B. Placental origins of preeclampsia: challenging the current hypothesis [J]. *Hypertension*, 2008, 51(4): 970-975.
- [4] Ji L, Brkić J, Liu M, et al. Placental trophoblast cell differentiation: physiological regulation and pathological relevance to preeclampsia [J]. *Mol Aspects Med*, 2013, 34(5): 981-1023.
- [5] Goldman-Wohl D, Yagel S. Regulation of trophoblast invasion: from normal implantation to pre-eclampsia [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2002, 187(1-2): 233-238.
- [6] Sun YY, Lu M, Xi XW, et al. Regulation of epithelial-mesenchymal transition by homeobox gene DLX4 in JEG-3 trophoblast cells: a role in preeclampsia [J]. *Rep Sci*, 2011, 18(11): 1138-1145.
- [7] Kristensen LS, Andersen MS, Stagsted LVW, et al. The biogenesis, biology and characterization of circular RNAs [J]. *Nat Rev Genet*, 2019, 20(11): 675-691.
- [8] Guo JU, Agarwal V, Guo H, et al. Expanded identification and characterization of mammalian circular RNAs [J]. *Genome Biol*, 2014, 15(7): 409.
- [9] Hansen TB, Jensen TI, Clausen BH, et al. Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges [J]. *Nature*, 2013, 495(7441): 384-388.
- [10] Xu JZ, Shao CC, Wang XJ, et al. circTADA2As suppress breast cancer progression and metastasis via targeting miR-203a-3p/SOCS3 axis [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10: 175.
- [11] Xiao Y, Liu G, Sun Y, et al. Targeting the estrogen receptor alpha (ER α)-mediated circ-SMG1.72/miR-141-3p/Gelsolin signaling to better suppress the HCC cell invasion [J]. *Oncogene*, 2020, 39(12): 2493-2508.
- [12] 谢幸. 妇产科学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2018:83.
- [13] 邱光银, 唐佳, 张铁环, 等. 子痫前期孕妇血清及胎盘组织中 GRP78、P53 表达及与疾病相关性[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2021, 13(2): 271-275.
- [14] 王娜, 王英, 万里新, 等. 子痫前期患者血清 VEGF、IL-18、MCP-1 水平及与血液流变学指标关系[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2020, 12(10): 1303-1306.
- [15] Ji L, Brkić J, Liu M, et al. Placental trophoblast cell differentiation: Physiological regulation and pathological relevance to preeclampsia [J]. *Mol Aspects Med*, 2014, 34(5):981-1023.
- [16] Bartel DP. MicroRNAs [J]. *Cell*, 2004, 116(2):281-297.
- [17] Liu KS, Pan F, Mao XD, et al. Biological functions of circular RNAs and their roles in occurrence of reproduction and gynecological diseases [J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(1): 1-15.
- [18] Hu X, Ao J, Li X, et al. Competing endogenous RNA expression profiling in pre-eclampsia identifies hsa_circ_0036877 as a potential novel blood biomarker for early pre-eclampsia [J]. *Clin Epigenet*, 2018, 10: 48.
- [19] Jiang M, Lash GE, Zhao X, et al. CircRNA-0004904, CircRNA-0001855, and PAPP-A: Potential Novel Biomarkers for the Prediction of Preeclampsia [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 46(6): 2576-2586.
- [20] Li ZH, Xiong QY, Xu L, et al. miR-29a regulated ER-positive breast cancer cell growth and invasion and is involved in the insulin signaling pathway [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(20): 32566-32575.

IL-17A、sICAM-1 及 sE-选择素与 RA 患者疾病活动度及疗效的关系

任占芬^{1*} 郑学军¹ 罗寰¹ 方晓¹ 李红燕¹ 赵春桃²

[摘要] **目的** 分析类风湿性关节炎(RA)患者白细胞介素 17A(IL-17A)、可溶性细胞间粘附分子-1(sICAM-1)以及可溶性 E 选择素(sE-选择素)水平变化与疾病活动程度、治疗疗效的关系。**方法** 选取 2017 年 3 月至 2018 年 12 月本院收治的 110 例 RA 患者设为研究组,根据 RA 患者病情活动度评价表(DAS28)分为低活动度 36 例,中活动度 48 例,高活动度 26 例。另选取同期于本院进行健康检查的 65 例正常人群作为对照组。比较不同人群 IL-17A、sICAM-1、sE-选择素及 D-二聚体(D-D)水平,并分析 IL-17A、sICAM-1、sE-选择素及 D-D 水平与疾病活动程度的相关性,采用 Logistic 回归分析影响 RA 患者疗效的相关危险因素。**结果** 研究组患者 IL-17A、sICAM-1、sE-选择素及 D-D 水平均明显高于对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。不同疾病活动度患者 IL-17A、sICAM-1、sE-选择素及 D-D 水平:重活动度组>中活动度组>低活动度组,各组间比较差异具有统计学意义($P<0.05$)。IL-17A、sICAM-1、sE-选择素及 D-D 水平与 RA 患者疾病活动程度呈正相关($P<0.05$),与类风湿因子水平无明显相关性($P>0.05$)。logistic 回归分析结果显示:IL-17A(高水平)、sICAM-1(高水平)、sE-选择素(高水平)、D-D(高水平)为影响 RA 患者疗效的独立危险因素($P<0.05$)。**结论** IL-17A、sICAM-1、sE-选择素及 D-D 在 RA 患者中显著上升,其异常表达与患者疾病活动度和治疗疗效密切相关,可作为预测患者疗效的有效指标。

[关键词] RA; IL-17A; sICAM-1; sE-选择素; 疾病活动度; 疗效

The relationship between the levels of IL - 17A, sICAM - 1 and sE - selectin and disease activity and efficacy in RA patients

REN Zhanfen^{1*}, ZHENG Xuejun¹, LUO Huan¹, FANG Xiao¹, Li Hongyan¹, ZHAO Chuntao²

(1. Department of Rheumatology and Immunology, the First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou, Hebei, China, 075000; 2. Department of Ultrasound, the First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou, Hebei, China, 075000)

[ABSTRACT] **Objective** To analyze the relationship between changes in the levels of interleukin-17A (IL-17A), soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1) and soluble E-selectin (sE-selectin) and disease activity and efficacy in patients with rheumatoid arthritis (RA). **Methods** The 110 RA patients admitted to this hospital from March 2017 to December 2018 were selected as the study group. According to the disease activity score 28 (DAS28), they were divided into 36 cases with low disease activity, 48 cases with moderate disease activity, and 26 cases with high disease activity. In addition, 65 normal people who underwent a health check in this hospital during the same period were selected as the control group. The levels of IL-17A, sICAM-1, sE-selectin and D-Dimer (D-D) in different people were compared, and the correlation between the levels of IL-17A, sICAM-1, sE-selectin and D-D and the disease activity was analyzed, and the logistic regression analysis was used to analyze the related risk factors affecting the curative effect of RA patients. **Results** The levels of IL-17A, sICAM-1, sE-selectin and D-D in the study group were significantly higher

基金项目:河北省医学科学研究课题计划(20170931)

作者单位:1. 河北北方学院附属第一医院风湿免疫科,河北,张家口 075000

2. 河北北方学院附属第一医院超声科,河北,张家口 075000

*通信作者:任占芬, E-mail: hu032458dong8281@163.com

than those in the control group, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). The levels of IL-17A, sICAM-1, sE-selectin and D-D in patients with different degrees of disease activity were as follows: heavy activity group > medium activity group > low activity group, the differences between the groups were statistically significant ($P<0.05$). The degrees of disease activity of RA patients were positively correlated with the levels of IL-17A, sICAM-1, sE-selectin and D-D ($P<0.05$). There was no significant correlation with levels of rheumatoid factors ($P>0.05$). The logistic regression analysis showed that IL-17A (high level), sICAM-1 (high level), sE-selectin (high level) and D-D (high level) were independent risk factors affecting the efficacy of RA patients ($P<0.05$). **Conclusion** IL-17A, sICAM-1, sE-selectin and D-D significantly increased in RA patients, and their abnormal expressions are closely related to the disease activity of patients and can be used as effective indicators for predict the efficacy of patients.

[KEY WORDS] RA; IL-17A; sICAM-1; sE-selectin; Disease activity; Curative effect

类风湿性关节炎(Rheumatoid arthritis, RA)是一种常见的慢性的、以持续性滑膜炎和血管炎为基本病理特征的全身性自身免疫性疾病;主要表现为受累关节疼痛、肿胀以及功能障碍^[1]。该疾病早期病情隐匿,诊断较困难,故寻求能为RA诊断、病情监测和预测疗效提供可靠依据的分子标记物成为国内外学者关注的焦点^[2]。可溶性细胞间粘附分子-1(Soluble Intercellular adhesion molecule-1, sICAM-1)与可溶性E选择素(Soluble e-选择素, sE-选择素)均是介导粘附反应重要的粘附分子,主要介导血液流动状态下白细胞与血管内皮细胞的局部粘附,从而促进机体的炎症反应^[3]。近年来有研究发现,白细胞介素17A(Interleukin-17A, IL-17A)在RA的发病中起着关键的作用^[4]。本研究就RA患者IL-17A、sICAM-1及sE-选择素水平变化与疾病活动程度、治疗疗效的关系进行分析,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2017年3月至2018年12月本院收治的110例RA患者,其中男28例,女82例,年龄平均(55.21±5.37)岁,平均病程(5.71±2.08)年;根据RA患者病情活动度评价表^[5](Disease activity score 28, DAS28)分为:低活动度36例(2.6<DAS28≤3.2),中活动度48例(3.2<DAS28≤5.1),高活动度26例(DAS28>5.1)。纳入标准:①研究组均符合RA的相关诊断标准^[5]并结合实验室检查以及影像学检查明确诊断;②临床资料完整且真实;③所有患者入院前1个月均未接受相关治疗。排除标准:①存在重要脏器或内分泌、血液系统病变者;②存在精神疾患、意识障碍等依从性差的情况;③既往有相关药物过敏史。

另选取同期于本院进行健康检查的正常人群作为对照组,共65例,其中男29例,女36例,平均年龄(55.72±5.51)岁。两组在性别、年龄等一般资料比较差异无统计学意义($P>0.05$)。本研究均经一伦理委员会批准,患者均签署知情同意书。

1.2 治疗方法

研究组患者入院后,予甲氨蝶呤片(湖南正清制药集团股份有限公司生产,国药准字H19983205;2.5 mg)口服,5 mg/次,1次/周;美洛昔康片(湖南明瑞制药有限公司生产;国药准字H20010436;7.5 mg)口服,15 mg/次/天。治疗6个月,在治疗过程中患者如出现胃部症状时可常规予胃部黏膜剂等进行对症治疗。

1.3 检测方法

取所有受试者清晨空腹静脉全血5 mL,采用未加抗凝剂的标准采样管进行采集,离心(3 000 r/min, 10 min)取血清后分别存放在聚丙烯EP管中,在-80℃冰柜中待检。采用酶联免疫法检测两组的IL-17A、sICAM-1以及sE-选择素等因子的表达水平,试剂盒均购自上海一研生物科技有限公司;使用血凝仪器(Sysmex CS5100)检测两组的D-二聚体(D-Dimer, D-D)的表达水平;检测严格按照仪器操作规程及试剂说明书进行检测。

1.4 疗效判定

疗效标准^[6]:①晨僵时长不超过15 min;②未见疲乏感;③关节处未见压痛感;④关节处疼痛消退;⑤关节处未出现软组织肿胀情况;⑥红细胞沉降率(Equivalent Series Resistance, ESR):男性≤20 mm/h;女性≤30 mm/h。临床控制:符合以上6项标准;显效:符合以上任意5项标准;好转:符合以上任意3~4项标准;无效:符合项目低于3项。总有效率=100%-无效率。IL-17A^[4]、sICAM-1^[3]、

sE-选择素^[3]、D-D^[7]判断标准:当IL-17A>32 pg/mL、sICAM-1>640 μg/L、sE-选择素>14 μg/L、D-D>0.7 ng/L时即为高水平,反之即为低水平。

1.5 统计学分析

采用SPSS 22.0软件进行分析,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,采用t/F检验;计数资料以n(%)表示,采用 χ^2 检验;Pearson直线相关分析疾病活动度与RA患者IL-17A、sICAM-1、sE-选择素及D-D水平的相关性;影响RA治疗疗效的相关因素采用多元Logistic回归分析,以P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组IL-17A、sICAM-1、sE-选择素及D-D水平比较

研究组IL-17A、sICAM-1、sE-选择素及D-D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IL-17A、sICAM-1、sE-选择素及D-D水平比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of the levels of IL-17A, sICAM-1, Se selectin and D-D between 2 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	IL-17A (pg/mL)	sICAM-1 (μg/L)	sE-选择素 (μg/L)	D-D (ng/L)
研究组	110	41.32±17.59	1436.58±335.24	25.36±15.22	3.25±1.67
对照组	65	22.10±9.45	426.30±212.68	9.78±4.10	0.40±0.22
t值		8.136	21.826	8.073	17.675
P值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

2.2 不同疾病活动度患者IL-17A、sICAM-1、sE-选择素及D-D水平比较

不同疾病活动度患者IL-17A、sICAM-1、sE-选

表2 不同疾病活动度患者IL-17A、sICAM-1、sE-选择素及D-D水平比较($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of the levels of IL-17A, sICAM-1, Se selectin and D-D in patients with different disease activity ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	IL-17A (pg/mL)	sICAM-1 (μg/L)	sE-选择素 (μg/L)	D-D (ng/L)
低活动度组	36	31.38±11.47	843.36±246.37	18.52±8.78	2.68±1.05
中活动度组	48	40.39±15.26 ^a	1367.49±289.56 ^a	24.33±13.68 ^a	3.16±1.37 ^a
重活动度组	26	50.67±19.55 ^{ab}	1943.58±365.27 ^{ab}	30.28±17.24 ^{ab}	4.31±1.69 ^{ab}
对照组	65	22.10±9.45 ^{abc}	426.30±212.68 ^{abc}	9.78±4.10 ^{abc}	0.40±0.22 ^{abc}
F值	-	34.30	240.62	29.01	107.28
P值	-	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与低活动度组比较,^aP<0.05;与中活动度组比较,^bP<0.05;与重活动度组比较,^cP<0.05。

表4 RA患者治疗疗效[n(%)]

Table 4 curative effect of RA [n(%)]

组别	IL-17A		sICAM-1		sE-选择素		D-D	
	高水平	低水平	高水平	低水平	高水平	低水平	高水平	低水平
有效组(n=86)	31(36.05)	55(63.95)	29(33.72)	57(66.28)	26(30.23)	60(69.77)	30(34.88)	56(65.12)
无效组(n=24)	17(70.83)	7(29.17)	18(75.00)	6(25.00)	20(83.33)	4(16.67)	16(66.67)	8(33.33)
χ^2 值	9.232		13.065		21.745		7.790	
P值	0.002		<0.001		<0.001		0.005	

择素及D-D水平比较:重活动度组>中活动度组>低活动度组,差异有统计学意义(P<0.05)。见表2。

2.3 IL-17A、sICAM-1、sE-选择素及D-D水平与RA疾病活动度及类风湿因子的关系

IL-17A、sICAM-1、sE-选择素及D-D水平与RA患者疾病活动程度呈正相关(P<0.05),与类风湿因子水平无明显相关性(P>0.05)。见表3。

表3 IL-17A、sICAM-1、sE-选择素及D-D水平与RA疾病活动度的关系

Table 3 the relationship between the levels of IL-17A, sICAM-1, Se selectin and D-D and the disease activity of RA

变量	sdLDL-C		IMA		UACR		D-D	
	r值	P值	r值	P值	r值	P值	r值	P值
疾病活动度	0.935	<0.001	0.924	<0.001	0.918	<0.001	0.913	<0.001
类风湿因子	0.136	0.248	0.215	0.173	0.324	0.170	0.509	0.091

2.4 110例RA患者治疗疗效情况

110例患者治疗有效率为78.18%,无效率为21.82%。按照治疗疗效,将研究组患者分为有效组(n=86)和无效组(n=24)。IL-17A、sICAM-1、sE-选择素及D-D高水平患者较低水平患者治疗无效率更高,差异有统计学意义(P<0.05)。见表4。

2.5 影响RA患者治疗疗效的相关因素研究

IL-17A(高水平)、sICAM-1(高水平)、sE-选择素(高水平)及D-D(高水平)为影响RA患者疗效的独立危险因素(P<0.05)。见表5。

3 讨论

目前,临床评估RA疾病活动度内容主要包括

表5 影响RA患者治疗疗效的相关因素研究

Table 5 study on related factors influencing therapeutic effect of patients with RA

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)	1.524	0.524~1.534	0.539			
性别(男 vs 女)	1.487	0.546~1.547	0.630			
高血压(有 vs 无)	1.578	1.385~1.756	0.032	1.368	0.231~1.992	0.458
糖尿病(有 vs 无)	1.624	1.527~1.857	0.021	1.571	0.885~2.791	0.320
吸烟(有 vs 无)	1.356	0.425~1.789	0.358	-	-	-
类风湿因子(低水平 vs 高水平)	1.578	1.385~1.756	0.030	1.531	0.862~2.719	0.633
IL-17A(低水平 vs 高水平)	3.120	1.235~1.456	0.016	1.354	1.372~1.698	0.020
sICAM-1(低水平 vs 高水平)	1.475	1.342~1.568	0.005	1.647	1.247~1.654	<0.001
sE-选择素(低水平 vs 高水平)	1.524	1.458~1.687	0.010	1.221	1.247~1.657	<0.001
D-D(低水平 vs 高水平)	2.067	1.164~3.670	0.021	1.992	1.121~3.537	<0.001

临床症状、血清学分子指标、关节功能以及影像学资料等,其中血清学指标具有简单快捷、准确性高等优势,是指导RA临床诊治的重要手段^[8]。

细胞粘附分子(Cell adhesion molecule, CAM)是一种信息交流的可溶性递质,已有多个研究证实,细胞粘附分子在RA的发生、发展中起着关键的作用^[9]。本研究结果显示,RA患者血清sICAM-1及sE-选择素水平明显高于对照组人群。多因素Logistic回归分析结果显示:sICAM-1及sE-选择素高表达水平是影响RA患者疗效的独立危险因素,可作为预测患者疗效的有效指标。分析sICAM-1及sE-选择素高表达水平的原因:循环中的白细胞通过sICAM-1及sE-选择素等细胞粘附分子的介导,与关节囊内层滑膜血管内皮细胞结合,并移游至血管外,在滑膜聚集并滞留,从而导致滑膜局部出现炎症,当局部出现炎症反应后,肿瘤坏死因子- α (Tumor Necrosis Factor- α , TNF- α)、白介素(interleukin, IL)等炎性因子会随之增高,导致滑膜处的炎症反应进一步加重,使关节被破坏^[10]。而这些炎性因子可通过促进对应的内皮细胞表达sICAM-1及sE-选择素等细胞粘附分子来介导白细胞与血管内皮的局部粘附而使炎症持续加重,并形成恶性循环。

近年来凝血功能异常在RA的发病过程中发挥的作用已受到诸多学者的关注。D-D是一种纤维蛋白降解产物,其水平升高提示体内存在高凝状态^[7]。Vranic等^[11]研究发现RA患者体内D-D水平较健康体检者明显增高,且随着该疾病活动度的增高D-D水平呈上升趋势,其认为D-D可作为RA病情活动程度的评价指标,本研究结果亦证实了这一结论。Th17细胞是引发自身免疫性疾病的主要效应因子,IL-17A是Th细胞的标志性因子,具有强大的致炎作用;在机体出现炎症反应

后,IL-6等炎性因子会刺激THO细胞产生Th17细胞,从而使机体内IL-17A水平上调^[12]。本研究中,疾病活动度随IL-17A水平升高而加重,表明其在评估RA发生发展及治疗疗效中具有良好的辅助作用。DAS28评分为临床常用的评估患者疾病活动程度的量表,该量表评分越高代表患者病情及关节损害越严重^[13]。本研究显示,IL-17A、sICAM-1、sE-选择素及D-D水平越高,RA患者DAS28评分越高,表明以上指标可反映RA患者的疾病活动程度,可作为疾病活动程度的评估指标。

综上所述,IL-17A、sICAM-1、sE-选择素及D-D在RA患者中显著上升,与患者疾病活动度关系密切,是影响RA患者疗效的独立危险因素。临床可加强以上指标的检测,以了解RA患者疾病活动程度,从而指导选择有效的个体化治疗方案。

参考文献

- [1] Sun J, Tu P, Wang Y. sQUIZ your knowledge: Rheumatoid nodules in progressive rheumatoid arthritis [J]. Eur J Dermatol, 2019, 16(8):248-250.
- [2] 蔡辉, 张群燕, 郭郡浩, 等. RA患者外周血浆中TNF- α 、IL-1 β 及IL-10的表达及临床意义[J]. 中华中医药学刊, 2017, 35(3):9-11.
- [3] Littlejohn EA, Monrad SU. Early Diagnosis and Treatment of Rheumatoid Arthritis [J]. Prim Care, 2018, 45(2):237-255.
- [4] Darvishi B, Boroumandieh S, Majidzadeh - A K, et al. The role of activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM) in cancer progression, invasion, metastasis and recurrence: A novel cancer stem cell marker and tumor-specific prognostic marker [J]. Exp Mol Pathol, 2020, 115: 104443.
- [5] 李玉翠, 许珂, 张莉芸, 等. 2012年早期RA分类标准的国内多中心临床验证[J]. 中华风湿病学杂志, 2017, 21(12):807-811.
- [6] Nordlohne J, Vietinghoff SV. Interleukin 17A in atherosclerosis - Regulation and pathophysiologic effector function [J]. Cytokine, 2017, 122(13):1015-1017. (下转第1105页)

外周血 NLR、PLR 及胸水 ADA、LDH 在鉴别胸腔积液性质中的应用

雷震 王震 郭锋*

[摘要] 目的 探究外周血 NLR、PLR 及胸水 ADA、LDH 在不同性质胸腔积液中的表达及临床价值。方法 选取 2019 年 5 月至 2020 年 10 月本院收治的结核性胸腔积液组(TPE 组, 36 例)、细菌性胸腔积液组(BPE 组, 31 例)、恶性胸腔积液组(MPE 组, 33 例)共 100 例患者作为研究对象。比较 3 组患者生化因子水平。结果 3 组外周血 PLR 水平比较, 差异无统计学意义($P>0.05$)。TPE 组、MPE 组外周血 NLR 水平显著高于 BPE 组, 差异有统计学意义($P<0.05$)。TPE 组胸水 ADA 水平显著高于 BPE 组、MPE 组, 差异有统计学意义($P<0.05$)。BPE 组胸水 LDH 显著高于 TPE 组、MPE 组, 差异有统计学意义($P<0.05$)。外周血 NLR 与胸水 ADA、LDH 呈正相关($r=0.432, P<0.05$)。且联合鉴别 AUC 均高于各因子单独诊断效果($P<0.05$)。结论 外周血 NLR 及胸水 ADA、LDH 在不同性质胸腔积液中表达有所不同, 且可用于鉴别 MPE。

[关键词] NLR; PLR; ADA; LDH; 胸腔积液

Application of peripheral blood NLR, PLR, and pleural effusion ADA, LDH in differentiating the nature of pleural effusion

LEI Zhen, WANG Zhen, GUO Feng*

(Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Suzhou Hospital, Anhui Medical University, Suzhou, Anhui, China, 234000)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the clinical value of the expression of peripheral blood NLR, PLR, and pleural fluid ADA, LDH in different types of pleural effusion. **Methods** A total of 100 patients in the tuberculous pleural effusion group (TPE group, 36 cases), the bacterial pleural effusion group (BPE group, 31 cases), and the malignant pleural effusion group (MPE group, 33 cases) admitted to our hospital from May 2019 to October 2020 were selected as the research objects. Biochemical factor levels in 3 groups were compared. **Results** There was no significant difference in the PLR level among 3 groups ($P>0.05$), the NLR level in peripheral blood of the TPE group and the MPE group was significantly higher than that of the BPE group ($P<0.05$), the ADA level in pleural fluid of the TPE group was significantly higher than that of the BPE group and the MPE group ($P<0.05$), and the LDH in pleural fluid of the BPE group was significantly higher than that of the TPE group and the MPE group ($P<0.05$). Peripheral blood NLR was correlated with ADA and LDH of pleural fluid ($r=0.432, P<0.05$). The combined differential AUC was higher than that of each factor alone ($P<0.05$). **Conclusion** Peripheral blood NLR and pleural fluid ADA, LDH are expressed differently in different types of pleural effusion, and can be used to identify MPE.

[KEY WORDS] NLR; PLR; ADA; LDH; Pleural effusion

基金项目:安徽省医学会急诊临床研究项目(KY2018001)

作者单位:安徽医科大学附属宿州医院呼吸与危重症医学科,安徽,宿州 234000

*通信作者:郭锋, E-mail:964757588@qq.com

正常人胸膜腔内少量液体可在呼吸运动时起到润滑作用,虽然正常人中每天有大量胸水形成,但其滤过与吸收处于动态平衡。倘若发生全身或局部病变,则会破坏这种平衡,并导致胸膜腔内液体形成迅速而吸收缓慢,最终产生胸腔积液^[1-2]。因胸腔积液发病因素众多,不同类型的胸腔积液致病机理不同,其治疗方案不同,尤其是对于恶性胸腔积液患者而言,明确胸腔积液类型能帮助患者尽早接受治疗。国内外研究证实^[3-4],胸水腺苷脱氨酶(adenosine deaminase, ADA)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)有助于临床医师鉴别胸腔积液的性质,但其鉴别效果有限。近来有学者发现^[5],在不同病因胸腔积液患者中,其炎症性标志物也呈现不同的变化趋势,外周血中性粒细胞和淋巴细胞比值(ratio of neutrophils to lymphocytes, NLR)与血小板和淋巴细胞比值(ratio of platelet to lymphocytes, PLR)或可用于鉴别胸腔积液性质。基于此,本研究就外周血 NLR、PLR 及胸水 ADA、LDH 在胸腔积液不同性质患者中的表达及临床价值进行分析,以期提高临床对胸腔积液的鉴别效果。分析结果呈报如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2019年5月至2020年10月本院呼吸内科住院的100例胸腔积液患者作为研究对象,其中患者男55例、女45例,年龄18~79岁,最终确诊36例为TPE、31例为BPE、33例为MPE。诊断为MPE的33例患者中,原发病灶肺腺癌20例、小细胞肺癌4例、鳞癌3例、乳腺癌2例、其他4例。所有患者以最终出院结果分为结核性胸腔积液(*tuberculosis pleural effusion*, TPE)组、细菌性胸腔积液(*bacterial pleural effusion*, BPE)组以及恶性胸腔积液(*malignant pleural effusion*, MPE)组。

纳入标准:①临床资料完整;②所有患者均符合《实用内科学》^[6]中胸腔积液相关诊断标准,并经实验室、病理学、影像学等手段确诊;③均获取始段

胸水,且为渗出性胸腔积液;④年龄 ≥ 18 岁。④所有患者均知情同意。排除标准:①既往明确诊断为肺结核、肺癌等疾病;②非首次胸腔积液者;③合并肺不张、肺栓塞、阻塞性肺炎等其他肺部疾病;④检查前已接受胸腔内给药或其他局部治疗者;⑤不明原因所造成的胸腔积液;⑥合并血液系统疾病、免疫系统疾病;⑦使用糖皮质激素或激动剂者。本研究获医学伦理委员会批准。

1.2 方法

所有患者入院24 h内均收集外周血、始段胸腔积液:取血液标本上XE-2100全自动血液分析仪(Sysmex公司,日本)及配套试剂检测中性粒细胞(*neutrophils*, N)、淋巴细胞(*lymphocytes*, L)及血小板计数(*platelet count*, PLT),并计算NLR与PLR;获取胸腔积液标本于30 min内离心并收集上清液,于-80℃保存待用,取标本上AU1000全自动生化分析仪(OLYMPUS公司,日本)采用酶显色法检测ADA水平(试剂及质控物由Beckman公司提供),另取标本上AU1000全自动生化分析仪采用酶速率法检测LDH水平(试剂及质控物由Randox公司提供)。

1.3 统计学处理

采用统计软件SPSS 22.0处理数据,计数资料用 $n(\%)$ 表示,行 χ^2 检验;计量资料用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,多组间采用单因素方差分析、两组间比较采用 t 检验;相关性采用Pearson分析,鉴别价值行受试者工作特征曲线(ROC),以曲线下面积(AUC)。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组一般资料比较

3组患者性别、年龄、胸腔积液量、胸腔积液位置等一般资料比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。见表1。

2.2 各组外周血NLR、PLR水平比较

3组患者外周血NLR水平比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),PLR水平比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表2。

表1 3组患者一般资料比较 [$n(\%)$, $(\bar{x} \pm s)$]

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

分组	n	性别		年龄(岁)	胸腔积液量(mL)	胸腔积液位置	
		男	女			单侧	双侧
TPE组	36	23(63.89)	13(36.11)	53.29 \pm 8.20	525.39 \pm 114.22	29(80.56)	7(19.44)
BPE组	31	17(54.84)	14(45.16)	54.97 \pm 8.31	508.48 \pm 120.76	28(90.32)	3(9.68)
MPE组	33	15(45.45)	18(54.55)	54.01 \pm 8.37	533.98 \pm 124.29	28(84.85)	5(15.15)
χ^2/F 值		1.686		0.343	0.374	0.646	
P值		0.194		0.711	0.689	0.421	

表2 3组外周血NLR、PLR水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of NLR and PLR levels in peripheral blood of the 3 groups ($\bar{x} \pm s$)

分组	n	NLR	PLR
TPE组	36	4.22±2.55	205.60±140.59
BPE组	31	2.20±0.75 ^a	234.58±123.58
MPE组	33	3.83±1.89 ^b	241.38±106.52
F值		10.074	0.803
P值		0.000	0.451

注:与TPE组比较,^a $P < 0.05$;与BPE组比较,^b $P < 0.05$ 。

2.3 各组胸水ADA、LDH水平比较

3组患者胸水ADA、LDH水平比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。TPE组胸水ADA水平均显著高于BPE组、MPE组,差异有统计学意义($P < 0.05$),BPE组与MPE组胸水ADA比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);BPE组胸水LDH均显著高于TPE组、MPE组,差异有统计学意义($P < 0.05$),TPE组与MPE组胸水LDH比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表3。

表3 3组胸水ADA、LDH水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of ADA and LDH levels in pleural fluid of the three groups ($\bar{x} \pm s$)

分组	n	ADA(U/L)	LDH(U/L)
TPE组	36	45.88±8.27	307.27±73.4
BPE组	31	13.76±2.19 ^a	564.92±108.44 ^a
MPE组	33	14.13±2.40 ^a	313.85±74.08 ^b
F值		418.563	93.774
P值		0.000	0.000

注:与TPE组比较,^a $P < 0.05$;与BPE组比较,^b $P < 0.05$ 。

2.4 外周血NLR、PLR与胸水ADA、LDH相关性分析

Pearson分析结果显示,外周血NLR与胸水ADA水平呈正相关($r = 0.432, P = 0.000$),与胸水LDH呈负相关($r = -0.615, P = 0.000$);外周血PLR与胸水ADA、LDH均无相关性($P = 0.197、0.155$)。

2.5 生化指标对MPE的预测价值

ROC曲线结果显示,三项联合诊断AUC、特异度分别为0.995、0.955,且联合鉴别AUC显著高于外周血NLR及胸水ADA、LDH单独鉴别效果

($Z = 6.047、5.212、5.723, P = 0.000、0.000、0.000$)。见表4、图1。

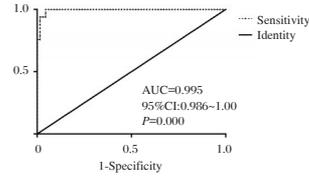


图1 ROC曲线

Figure 1 ROC curve

3 讨论

渗出性病因比较复杂,诊断相对困难,不同病因的处理方法也有所不同。TPE是一种由结核分枝杆菌(*mycobacterium tuberculosis, MTB*)及其代谢产物进入已致敏机体所引发的迟发型过敏反应^[7],巨噬细胞、中性粒细胞等均参与其中,但到后期则主要由T细胞介导。MPE通常是由肺癌、乳腺癌、淋巴瘤等恶性肿瘤侵犯或转移至胸膜,阻塞淋巴管而降低胸水重吸收能力^[8-9]。BPE主要继发于肺炎或肺脓肿,为病原菌感染胸膜后导致胸膜血管通透性增加、蛋白增加及胸腔内细胞的聚集进而导致胸腔积液的发生。不同类型的胸腔积液治疗方式有所不同。临床对于TPE的处理则在于尽快抽取积液的同时给予早期、规律、全程、适量及联合的化学治疗^[10]。研究表明^[11],胸腔积液细胞学首次采样敏感度低,连续三次送检敏感度才能够接近90%,这也就导致细胞学检查需要耗费更长的时间,极易延误治疗时机。因此,寻求可靠且临床可广泛开展的实验室指标以提高胸腔积液的鉴别效果,也是当前学者们关注的重点。

既往大量研究显示^[3-4],胸水ADA、LDH可用于鉴别胸水性质。本研究中三组患者ADA、LDH差异显著,且ROC曲线也显示胸水ADA、LDH可用于鉴别MPE,与既往研究一致^[12]。本研究中结果与既往研究类似^[13]。且已有研究显示^[14],胸腔积液患者外周血NLR、PLR与正常人差异显著。对于外周血PLR是否能够用于胸腔积液的鉴别,需要后续研

表4 3组胸水ADA、LDH水平比较 ($\bar{x} \pm s, U/L$)

Table 4 Comparison of ADA and LDH levels in pleural fluid of 3 groups ($\bar{x} \pm s, U/L$)

因子	AUC	标准错误	95%CI	最佳截断值	敏感度	特异度	约登指数	P值
NLR	0.643	0.058	0.529~0.758	2.745	0.697	0.597	0.294	0.020
ADA	0.737	0.049	0.641~0.832	18.945U/L	0.970	0.552	0.522	0.000
LDH	0.696	0.052	0.595~0.797	447.04U/L	1.000	0.418	0.418	0.002
联合	0.995	0.005	0.986~1.000	19.974	1.000	0.955	0.955	0.000

究。相关性分析结果显示,NLR与胸水 ADA、LDH均呈一定相关性,ROC曲线进一步表明,NLR可用于鉴别MPE,与韦文君等人^[15]研究一致。

本研究尝试分析外周血NLR、PLR及胸水ADA、LDH在鉴别不同性质胸腔积液中的应用价值,结果显示外周血PLR水平在不同类型的胸腔积液患者中并无显著变化,但外周血NLR及胸水ADA、LDH均显著变化且可用于鉴别MPE。受限于本研究为回顾性研究,未能获取患者临床症状、胸部CT表现、肝肾功能等相关资料,以帮助临床医师更好的鉴别不同性质的胸腔积液;此外,本研究仅分析渗出性胸腔积液、整体恶性胸腔积液患者外周血及胸水生化因子的变化水平,未分析漏出性胸腔积液、不同病因恶性胸腔积液中各生化因子的变化水平:这些都需要后续研究。但总体而言,临床医师可结合外周血NLR及胸水ADA、LDH水平以鉴别恶性胸腔积液。

参考文献

- [1] Xu T, Wang L, Zhou L, et al. Primary colorectal diffuse large B-cell lymphoma initially presenting with pleural effusion: report of one case and review of literature[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2020, 13(2):254-260.
- [2] Yoshida Y, Matsumoto I, Tanaka T, et al. Pancreatic neuroendocrine tumor with stenosis of the main pancreatic duct leading to pancreatic pleural effusion: a case report[J]. *Surgical Case Rep*, 2020, 6(1):222.
- [3] Chen W, Ko CF. Tuberculous pleural effusion and low pleural fluid adenosine deaminase level: a case report[J]. *Asian J Gerontol Geriatr*, 2021, 15(2):93-95.
- [4] 孙理想,赵后彤,伏晶. 腺苷脱氨酶,乳酸脱氢酶,癌胚抗原及糖类抗原 125联合检测对良恶性胸腔积液的鉴别诊断价值[J]. *临床和实验医学杂志*, 2020, 19(21):63-67.
- [5] 程婉莹,许戟,段丽敏,等. 继发性噬血细胞性淋巴组织细胞增多症伴发胸腔积液的临床意义[J]. *中华血液学杂志*, 2019, 40(12):1040-1043.
- [6] 张敦华,陈灏珠. *实用内科学(下册)*[M]. 11版. 北京:人民卫生出版社,2001:1646-1648.
- [7] Shaw JA, Diacon AH, Koegelenberg CFN. Tuberculous pleural effusion[J]. *Respirology*, 2019, 24(10):962-971.
- [8] Ramesh S, Hazarika B, Sarma J, et al. Etiology and prognostic evaluation of malignant pleural effusion[J]. *Int J Community Med Public Health*, 2020, 7(4):1405.
- [9] Raimundo S, Loureiro AI, Vieira F, et al. LENT Score: Predicting the Survival of Malignant Pleural Effusion-A Prospective Study of Three Years[J]. *Arch Bronconeumol*, 2020, 56(7):465-466.
- [10] 翁绳凤,李宁,邢俊蓬,等. Xpert MTB/RIF检测结核分枝杆菌及利福平耐药性的应用价值研究[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2019, 11(3):229-232+237.
- [11] Gleeson LE, Lee Y CG. Predicting Patient Outcome in the Evolving Field of Malignant Pleural Effusion[J]. *J Bronchol Int Pulmonol*, 2020, 27(1):1-3.
- [12] Feng M, Sun F, Wang F, et al. The diagnostic effect of sequential detection of ADA screening and T-SPOT assay in pleural effusion patients[J]. *Artificial Cells*, 2019, 47(1):3272-3277.
- [13] 杨锐群,柯步举,江经正. 腺苷脱氨酶及其肿瘤标志物联合检测对胸腔积液良恶性的鉴别诊断价值[J]. *海南医学*, 2019, 30(18):32-35.
- [14] Pang C, Ma H, Qin J, et al. Pleural effusion as a substitute for tumor tissue in detecting EGFR/ALK mutations in non-small cell lung cancer: A systematic review and meta-analysis[J]. *Medicine*, 2019, 98(18):e15450.
- [15] 韦文君,孙青阳,张婴嫄,等. 恶性胸腔积液中性粒细胞和淋巴细胞比值变化及其临床价值[J]. *中国卫生检验杂志*, 2018, 28(16):1996-1997.

(上接第1101页)

- [7] 董亮,李学勇,刘炬. D-二聚体与RA疾病活动的相关性及其在发病机制中的作用[J]. *中国临床研究*, 2015, 28(11):56-58.
- [8] Yang WM, Zhang WH, Hou QY, et al. Two new inflammatory markers associated with disease activity score-28 in patients with rheumatoid arthritis: Albumin to fibrinogen ratio and C-reactive protein to albumin ratio[J]. *Int Immunopharmacol*, 2018, 62(10):293-298.
- [9] De Cock D, Hyrich K. Malignancy and rheumatoid arthritis: Epidemiology, risk factors and management[J]. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 2019, 36(9):425-428.
- [10] Wang Y, Lloyd KA, Melas I, et al. Rheumatoid arthritis patients display B-cell dysregulation already in the nave repertoire consistent with defects in B-cell tolerance[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1):19995-19997.
- [11] Vranic A, Pruner I, Veselinovic M, et al. Assessment of hemostatic disturbances in women with established rheumatoid arthritis[J]. *Clin Rheumatol*, 2019, 38(11):3005-3014.
- [12] Li Y, Yuan L, Jiang S, et al. Interleukin-35 stimulates tumor necrosis factor- α activated osteoblasts differentiation through Wnt/ β -catenin signaling pathway in rheumatoid arthritis[J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 75(14):105810-105813.
- [13] Udomsinprasert W, Jinawath A, Teerawattanapong N, et al. Interleukin-34 overexpression mediated through tumor necrosis factor- α reflects severity of synovitis in knee osteoarthritis[J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1):7987-7990.

TPOAb、TRAb、TGAb与妊娠期合并甲减患者甲状腺功能关系及预测妊娠结局价值

王力川 王舒婷* 李致蓉 罗欢

[摘要] **目的** 探讨甲状腺过氧化物酶抗体(TPOAb)、促甲状腺激素受体抗体(TRAb)、甲状腺球蛋白抗体(TGAb)与妊娠期合并甲减患者甲状腺功能关系及预测妊娠结局价值。**方法** 选取2016年1月至2021年1月本院96例妊娠期合并甲减患者作为观察组,另选取50例妊娠期健康孕妇作为对照组,分析TPOAb、TRAb、TGAb与甲状腺功能(TSH、FT3、FT4)关系,并评价TPOAb、TRAb、TGAb对妊娠结局的预测价值。**结果** 妊娠期合并甲减患者TPOAb、TRAb、TGAb与TSH、TT3、TT4水平呈正相关关系,与FT3、FT4水平呈负相关关系($P<0.05$);TPOAb、TRAb、TGAb为妊娠期合并甲减患者不良妊娠结局影响因素($P<0.05$);ROC曲线显示,TPOAb、TRAb、TGAb联合预测不良妊娠结局的AUC最大,为0.899,优于单一检测。**结论** TPOAb、TRAb、TGAb与妊娠期合并甲减患者甲状腺功能呈负相关,联合检测可有效预测妊娠结局,为及时采取有效、个体化治疗提供依据。

[关键词] 甲状腺过氧化物酶抗体;促甲状腺激素受体抗体;甲状腺球蛋白抗体;甲减;甲状腺功能;妊娠结局

The relationship between TPOAb, TRAb, TGAb and thyroid function in patients with hypothyroidism during pregnancy and the value of predicting pregnancy outcome

WANG Lichuan, WANG Shuting*, LI Meirong, LUO Huan

(Emergency Department, Maternal and Child Health Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning, Guangxi, China, 530000)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the relationship between thyroid peroxidase antibody (TPOAb), thyroid stimulating hormone receptor antibody (TRAb), thyroglobulin antibody (TGAb) and thyroid function in patients with hypothyroidism during pregnancy and the value of predicting pregnancy outcome. **Methods** From January 2016 to January 2021, 96 patients with hypothyroidism during pregnancy were selected as the observation group, and 50 healthy pregnant women during pregnancy were selected as the control group. The relationship between TPOAb, TRAb, TGAb and thyroid function (TSH, FT3, FT4) was analyzed. The predictive value of TPOAb, TRAb, and TGAb on pregnancy outcome was evaluated. **Results** TPOAb, TRAb, TGAb in pregnancy with hypothyroidism are positively correlated with TSH, TT3, and TT4 levels, and negatively correlated with FT3, FT4 levels ($P<0.05$). TPOAb, TRAb and TGAb are the factors affecting the adverse pregnancy outcome of patients with hypothyroidism during pregnancy ($P<0.05$). The ROC curve shows that the combination of TPOAb, TRAb, and TGAb has the largest AUC for predicting adverse pregnancy outcome, which is 0.899, better than a single test. **Conclusion** TPOAb, TRAb, and TGAb are negatively correlated with thyroid function in patients with hypothyroidism during pregnancy. Combined detection can effectively predict pregnancy outcome and provide a basis for timely effective and individualized treatment.

[KEY WORDS] Thyroid peroxidase antibody; Thyrotrophin receptor antibody; Thyroglobulin antibody; Hypothyroidism; Thyroid function; Pregnancy outcome

基金项目:广西壮族自治区卫生和计划生育委员会自筹经费科研课题(Z20180088)

作者单位:广西壮族自治区妇幼保健院急诊科,广西,南宁 530000

*通信作者:王舒婷, E-mail: wangst768@163.com

妊娠期合并甲减是妊娠期女性常见内分泌疾病,发病率约占妊娠期合并症的2.2%~5.6%,严重威胁母婴安全^[1]。目前,妊娠合并甲减发病机制及病因尚未明确,且尚缺乏早期预测妊娠结局的实验室指标。研究证实,妊娠期合并甲减患者甲状腺过氧化物酶抗体(Thyroid peroxidase Antibody, TPOAb)、促甲状腺激素受体抗体(Thyrotrophin receptor antibody, TRAb)、甲状腺球蛋白抗体(Thyroglobulin antibody, TGAb)呈过度表达状态,对妊娠期甲减评价和监测具有重要临床意义^[2-3]。本研究尝试分析TPOAb、TRAb、TGAb与妊娠期合并甲减患者甲状腺功能关系及预测妊娠结局价值。报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2016年1月至2021年1月本院96例妊娠期合并甲减患者作为观察组,年龄平均(29.25±4.87)岁,孕周平均(39.51±0.68)周,孕次平均(2.05±0.43)次,初产妇59例,经产妇37例。另选取50例妊娠期健康孕妇作为对照组,年龄平均(28.75±4.51)岁,孕周平均(39.35±0.64)周,孕次平均(1.96±0.47)次,初产妇31例,经产妇19例。

纳入标准:观察组均符合妊娠期合并甲减诊断标准^[4];均为单胎妊娠;既往无甲状腺相关疾病史;研究对象均知情同意。排除标准:伴有高血压、糖

尿病或危重症;近1个月内服用免疫抑制剂或糖皮质激素。两组基线资料比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。本研究经本院伦理委员会审批通过。

1.2 方法

抽取外周静脉血5 mL,离心(半径8 cm, 3 500 r/min, 9 min),取血清,采用化学发光微粒子免疫分析法检测TSH、FT3、FT4、TT3、TT4,德国拜尔公司试剂盒;采用电化学发光全自动免疫分析仪Roche Elecsys 2010及配套试剂检测TPOAb、TRAb、TGAb。所有检测均在治疗前进行。

1.3 统计学方法

采用统计学软件SPSS 22.0处理数据,计数资料以 $n(\%)$ 描述,行 χ^2 检验;计量资料以 $(\bar{x}\pm s)$ 描述,两组间比较用 t 检验;影响因素采用Logistic回归分析;双变量正态分布采用Pearson分析相关性;预测价值采用受试者工作特征(ROC)曲线,联合预测实施Logistic二元回归拟合,返回预测概率 $\text{logit}(p)$,将其作为独立检验变量。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组TPOAb、TRAb、TGAb及甲状腺功能指标水平比较

观察组TPOAb、TRAb、TGAb、TSH、TT3、TT4水平均高于对照组,FT3、FT4水平均低于对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表1。

表1 两组TPOAb、TRAb、TGAb及甲状腺功能指标水平比较($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Comparison of the levels of TPOAb, TRAb, TGAb and thyroid function indexes between 2 groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	TPOAb(IU/mL)	TRAb(IU/mL)	TGAb(IU/mL)	TSH(mIU/L)	FT3(pmol/L)	FT4(pmol/L)	TT3(mmol/L)	TT4(mmol/L)
观察组	96	144.12±47.14	40.39±11.07	83.18±10.94	11.38±1.25	0.76±0.22	6.53±1.78	8.25±0.74	179.31±20.62
对照组	50	75.25±10.37	12.58±2.84	12.17±2.65	1.78±0.26	1.18±0.54	10.86±2.74	4.59±0.63	149.58±15.03
<i>t</i> 值		10.187	17.441	45.143	53.621	6.650	11.520	29.788	9.017
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

2.2 TPOAb、TRAb、TGAb与甲状腺功能的关系

Pearson相关系数分析可知,妊娠期合并甲减患者TPOAb、TRAb、TGAb与TSH、TT3、TT4水平呈正相关关系,与FT3、FT4水平呈负相关关系($P<0.05$)。见表2。

2.3 妊娠不同时期甲减患者TPOAb、TRAb、TGAb、TSH、FT3、FT4、TT3、TT4水平

96例妊娠期合并甲减患者,30例处于早期妊娠(≤ 12 周末),35例处于中期妊娠(13周~27周末)、31例处于晚期妊娠(28周~妊娠)。妊娠不同时期甲减患者TPOAb、TRAb、TGAb、TSH、FT3、FT4、TT3、

表2 TPOAb、TRAb、TGAb与甲状腺功能的关系

Table 2 The relationship between TPOAb, TRAb, TGAb with hypothyroidism during pregnancy

指标	TSH	FT3	FT4	TT3	TT4
TPOAb <i>r</i> 值	0.823	-0.794	-0.825	0.796	0.754
<i>P</i> 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
TRAb <i>r</i> 值	0.894	-0.802	-0.857	0.816	0.809
<i>P</i> 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
TGAb <i>r</i> 值	0.871	-0.814	-0.881	0.835	0.826
<i>P</i> 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

TT4水平相比,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表3。

2.4 两组不良妊娠结局对比

观察组早产7例,产后出血3例,胎儿窘迫7例,

表3 妊娠不同时期甲减患者TPOAb、TRAb、TGAb、TSH、FT3、FT4、TT3、TT4水平对比 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of TPOAb, TRAb, TSH, FT3, FT4, TT3 and TT4 levels in hypothyroidism patients during different periods of pregnancy ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TPOAb(IU/mL)	TRAb(IU/mL)	TGAb(IU/mL)	TSH(mIU/L)	FT3(pmol/L)	FT4(pmol/L)	TT3(mmol/L)	TT4(mmol/L)
早期妊娠	30	106.20±31.85	26.57±10.05	71.09±10.87	9.75±0.94	0.91±0.31	8.05±1.62	6.48±0.91	159.36±18.64
中期妊娠	35	142.64±39.05	41.50±9.86	82.14±11.06	11.28±1.14	0.79±0.29	6.41±1.79	8.17±0.83	180.52±19.37
晚期妊娠	31	182.49±42.58	52.51±12.25	96.05±12.18	13.07±1.31	0.58±0.24	5.19±1.47	10.05±1.24	197.25±22.16
F值		30.457	44.725	36.925	64.634	48.384	23.351	96.737	27.194
P值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

新生儿窒息4例,其他4例,不良妊娠结局发生率26.04%(25/96);对照组早产2例,产后出血1例,胎儿窘迫1例,其他2例,不良妊娠结局发生率12.00%(6/50)。观察组不良妊娠结局发生率26.04%高于对照组12.00%,差异有统计学意义($\chi^2=3.876, P=0.049$)。

2.5 不同妊娠结局患者临床资料、TPOAb、TRAb、TGAb及甲状腺功能指标水平

妊娠期合并甲减不良妊娠结局患者年龄、产次、TPOAb、TRAb、TGAb及甲状腺功能指标水平与正常妊娠结局患者相比,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表4。

表4 不同妊娠结局患者各指标水平对比 [$n(\%), (\bar{x} \pm s)$]

Table 4 Comparison of clinical data, TPOAb, TRAb, TGAb and thyroid function index levels of patients with different pregnancy outcomes [$n(\%), (\bar{x} \pm s)$]

指标	不良妊娠 (n=25)	正常妊娠 (n=71)	t/ χ^2 值	P值
年龄				
≤30岁	8(32.00)	42(59.15)	5.463	0.019
>30岁	17(68.00)	29(40.85)		
BMI				
≤25 kg/m ²	15(60.00)	40(56.34)	0.101	0.750
>25 kg/m ²	10(40.00)	31(43.66)		
孕次				
≤5次	14(56.00)	41(57.75)	0.023	0.879
>5次	11(44.00)	30(42.25)		
产次				
≤3次	9(36.00)	45(63.38)	5.633	0.018
>3次	16(64.00)	26(36.62)		
TPOAb(IU/mL)	182.41±50.12	130.64±37.85	5.386	<0.001
TRAb(IU/mL)	47.86±13.14	37.76±9.27	4.178	<0.001
TGAb(IU/mL)	90.17±12.31	80.72±8.42	4.248	<0.001
TSH(mIU/L)	13.25±1.36	10.72±0.27	14.993	<0.001
FT3(pmol/L)	0.62±0.19	0.81±0.25	3.460	<0.001
FT4(pmol/L)	5.29±1.52	6.97±1.80	4.169	<0.001
TT3(mmol/L)	10.05±0.91	7.62±0.69	13.889	<0.001
TT4(mmol/L)	217.64±24.19	165.81±16.27	11.972	<0.001

2.6 妊娠期合并甲减患者不良妊娠结局影响因素分析

Logistic多因素回归分析,可知年龄、产次、TPOAb、TRAb、TGAb及甲状腺功能指标水平均为

妊娠期合并甲减患者不良妊娠结局影响因素($P<0.05$)。见表5。

表5 妊娠期合并甲减患者不良妊娠结局影响因素分析

Table 5 Analysis of factors affecting adverse pregnancy outcomes in patients with hypothyroidism during pregnancy

因素	β 值	S.E.	Wald χ^2	OR值	95%CI	P值
年龄	1.514	0.324	21.823	4.543	3.012~6.852	<0.05
产次	1.404	0.320	19.246	4.071	2.584~6.413	<0.05
TPOAb	1.625	0.324	25.154	5.078	2.967~8.692	<0.05
TRAb	1.573	0.319	24.318	4.822	3.581~6.492	<0.05
TGAb	1.769	0.321	30.374	5.866	4.125~8.341	<0.05
TSH	1.472	0.317	21.563	4.358	3.184~5.965	<0.05
FT3	-0.686	0.224	9.367	0.504	0.325~0.781	<0.05
FT4	-0.863	0.220	15.377	0.422	0.257~0.693	<0.05
TT3	1.427	0.351	16.539	4.168	2.258~7.694	<0.05
TT4	1.483	0.298	24.769	4.407	3.046~6.375	<0.05

注:赋值:年龄:≤30岁=1,>30岁=2;产次:≤3次=1,>3次=2;TPOAb、TRAb、TGAb及甲状腺功能指标:以平均值为界,≤平均值=1,>平均值=2。

2.7 TPOAb、TRAb、TGAb对妊娠期合并甲减患者不良妊娠结局的预测价值

绘制ROC曲线,显示TPOAb、TRAb、TGAb预测妊娠期合并甲减患者不良妊娠结局的AUC分别为0.792、0.725、0.805,联合预测AUC最大,为0.899。见图1。

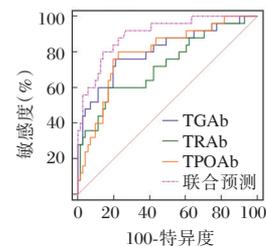


图1 ROC曲线

Figure 1 ROC curve

3 讨论

生理状况下,甲状腺过氧化物酶(Thyroid peroxidase, TPO)、甲状腺球蛋白(Thyroglobulin, Tg)作为甲状腺细胞内的正常分泌成分,在外周血检

出量很少或无法检测,而甲状腺系统病变时,甲状腺滤泡细胞结构损伤,TPO、Tg 释放入血,即TPOAb、TgAb^[5-6]。作为甲状腺自身免疫性抗体,TPOAb、TgAb 可通过激活细胞毒性作用并催化Tg 水解,破坏甲状腺细胞,导致甲状腺滤泡损伤,抑制甲状腺激素合成,导致甲状腺功能减退^[7]。TRAb 属细胞内破坏性抗体,其在体内占优势时,可导致甲减发生,是甲减诊断灵敏、特异和可靠标志性抗体^[8]。本研究数据显示,妊娠期合并甲减患者TPOAb、TRAb、TGAb 水平均高于妊娠期健康孕妇,与俞琳等^[9]研究一致,提示TPOAb、TRAb、TGAb 可用于临床评估、预测甲减。

研究指出,孕妇TSH 和血清人绒毛膜促性腺激素(hCG)中 α -亚基相同,高水平hCG 刺激TSH 受体,导致甲状腺激素分泌过量,抑制TSH 产生,进而降低FT3、FT4 水平,同时,孕妇雌激素分泌增多促使肝脏合成甲状腺结合球蛋白(TBG)增多,而TBG 特异性结合T3、T4,导致FT3、FT4 水平降低,进而导致甲减发生^[10]。研究证实,TSH、FT3、FT4、TT3、TT4 可特异性反应甲状腺功能状态,提示妊娠期甲减和甲状腺免疫功能异常^[11]。本研究Pearson 相关系数分析发现,妊娠期合并甲减患者TPOAb、TRAb、TGAb 与TSH、TT3、TT4 水平呈正相关关系,与FT3、FT4 水平呈负相关关系。本研究还发现,妊娠不同时期甲减患者TPOAb、TRAb、TGAb、TSH、FT3、FT4、TT3、TT4 水平存在明显差异。随妊娠进展,TT3、TT4 升高,考虑与雌激素升高导致甲状腺素结合蛋白增加有关;进一步提示TPOAb、TRAb、TGAb 对妊娠期合并甲减患者甲状腺功能评估具有重要价值。

本研究数据显示,妊娠期合并甲减患者不良妊娠结局发生率26.04%明显高于妊娠期健康孕妇12.00%,与既往研究^[12]一致。进一步Logistic 多因素回归分析可知,TPOAb、TRAb、TGAb 及甲状腺功能指标水平均为妊娠期合并甲减患者不良妊娠结局影响因素。高水平TPOAb、TRAb、TGAb 提示妊娠期合并甲减患者甲状腺功能低下,甲状腺自身免疫系统出现异常,甲状腺组织分泌的抗炎因子下降、促炎因子增多,如肿瘤坏死因子- α (TNF- α)增多可直接破坏胎盘毛细血管内皮的完整性,转化生长因子- β (TGF- β)降低使毛细血管内皮功能进一步恶化,并干扰血管滋养层细胞炎症反应,胎儿营养血管受到破坏,最终导致不良妊娠结局^[13]。

临床可同时检测TPOAb、TRAb、TGAb,为预测妊娠期合并甲减患者妊娠结局提供更全面、可靠的参考信息。

综上可知,TPOAb、TRAb、TGAb 可有效评价妊娠期合并甲减患者甲状腺功能及妊娠结局,为及时采取有效、个体化治疗提供依据。

参考文献

- [1] American Thyroid Association (ATA). 2017 Guidelines of the American thyroid association for the diagnosis and management of thyroid disease during pregnancy and the postpartum[J]. *Thyroid*, 2017,27(3):315-389.
- [2] 路春梅,赵云刚,杨旭,等. 孕晚期亚临床甲状腺功能异常对孕妇糖代谢及妊娠并发症的影响[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2020,12(3):323-326.
- [3] 郭雪晶,马梓汶,黄鹰,等. 妊娠期甲状腺功能减退与子痫前期发病的相关性探讨[J]. *中国医药导刊*, 2019,21(9):538-542.
- [4] 中华医学会内分泌学分会. 妊娠和产后甲状腺疾病诊治指南[J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2012,28(5):354-371.
- [5] Hamblin PS, Sheehan PM, Allan C, et al. Subclinical Hypothyroidism During Pregnancy: The Melbourne Public Hospitals Consensus: Subclinical Hypothyroidism and Pregnancy[J]. *Int Med J*, 2019,49(8):994-1000.
- [6] 班彦杰,许雅娟,孙宗宗,等. 妊娠期甲状腺功能减退症与自然流产关系研究[J]. *中国实用妇科与产科杂志*, 2020,36(6):552-554.
- [7] 尚敬,于璐,李全忠,等. 桥本甲状腺炎甲状腺功能减退患者血清1,25-二羟维生素D3 及白细胞介素-8 水平变化及意义[J]. *中华实用诊断与治疗杂志*, 2018,32(6):575-577.
- [8] 吴智梅,罗娟. 妊娠期甲状腺功能减退症患者TSH、FT4、TPOAb、TGAb 与妊娠结局的相关性[J]. *中国医师杂志*, 2017,19(11):1738-1741.
- [9] 俞琳,蒋艳敏,钱丽. TGAb、TRAb、TMAb 与TPOAb 联合检测在妊娠期甲减中的诊断作用[J]. *现代医学*, 2018,46(8):867-870.
- [10] Nomura R, Miyai K, Kuge R, et al. Free T3 to free T4 ratio less than 2.0 suggests low T3 syndrome rather than central hypothyroidism from the age of two to eighteen years[J]. *Endocr J*, 2017,64(2):213-219.
- [11] 王艳芳,尤丽,马俊莲,等. 妊娠期合并亚临床甲减患者的TSH、FT3、FT4 水平与血压变异性及妊娠结局相关性分析[J]. *中国计划生育学杂志*, 2019,27(2):226-229.
- [12] Maraka S, Ospina NM, O'Keefe DT, et al. Subclinical hypothyroidism in pregnancy: a systematic review and meta-analysis[J]. *Thyroid*, 2016,26(4):580-590.
- [13] 杜碧君,王晨虹. 细胞因子在妊娠期亚临床甲减患者不良妊娠结局中的作用[J]. *广州医药*, 2020,51(6):101-104.

降钙素原、CRP在腹腔镜胆总管探查术后腹腔感染的诊断价值

许威风 李洁 王军*

[摘要] 目的 研究降钙素原(PCT)、C反应蛋白(CRP)在腹腔镜胆总管探查术(LCBDE)后腹腔感染(IAI)中的诊断价值。方法 选取2017年1月至2020年12月本院行LCBDE患者146例,根据有无IAI分为IAI组($n=17$)与未发生IAI组($n=129$)。比较两组基线资料、手术前后血清PCT、CRP水平,分析IAI组术后血清PCT、CRP水平与感染可能性评分(IPS)、急性生理与慢性健康评分II(APACHE II)评分的相关性,探讨LCBDE术后IAI的影响因素,评价血清PCT、CRP对LCBDE术后IAI的诊断价值。结果 术后3、5、7 d血清PCT、CRP水平:IAI组>未发生IAI组,差异有统计学意义($P<0.05$);术后3、5、7 d血清PCT、CRP水平与LCBDE术后IAI患者IPS、APACHE II评分均呈正相关性($P<0.05$);术后3、5、7 d血清PCT、CRP是LCBDE术后IAI发生的重要影响因素($P<0.05$);术后3 d血清PCT+CRP诊断LCBDE术后IAI的曲线下面积(AUC)大于术后5、7 d。结论 LCBDE术后IAI患者血清PCT、CRP水平异常高表达,并与患者感染程度存在良好线性关系,联合检测上述血清指标水平,对临床诊治、抗菌药物合理应用、预后改善具有重要指导价值。

[关键词] 降钙素原; C反应蛋白; 腹腔镜胆总管探查术; 腹腔感染

Diagnostic value of procalcitonin and CRP in intra-abdominal infection after laparoscopic common bile duct exploration

XU Weifeng, LI Jie, WANG Jun*

(Department of Hepatobiliary and Pancreatic Diseases of General Surgery Department, Fuyang People's Hospital of Anhui, Fuyang, Anhui, China, 236000)

[ABSTRACT] **Objective** To study the expression of procalcitonin (PCT) and C-reactive protein (CRP) in intra-abdominal infection (IAI) after laparoscopic common bile duct exploration (LCBDE), and analyze the diagnostic value of dynamic monitoring of the above indicators for postoperative IAI, to provide evidence-based support for clinical diagnosis and treatment. **Methods** A total of 146 patients undergoing LCBDE in our hospital from January 2017 to December 2020 were selected and divided into the IAI group ($n=17$) and the non-IAI group ($n=129$) according to the presence or absence of IAI. The baseline data, serum PCT and CRP levels before and after surgery were compared between the two groups. The correlation between postoperative serum PCT and CRP levels in the IAI group and the infection probability score (IPS), acute physiology and chronic health evaluation II (APACHE II) score was analyzed. The influencing factors of IAI after LCBDE were discussed, and the diagnostic value of serum PCT and CRP for IAI after LCBDE was evaluated. **Results** Serum PCT and CRP levels at 3, 5, and 7 days after surgery: IAI group > non-IAI group ($P<0.05$). Serum PCT and CRP levels at 3, 5, and 7 days after LCBDE were positively correlated with IPS and APACHE II scores of IAI patients after LCBDE ($P<0.05$). Serum PCT and CRP at 3, 5, and 7 days after surgery were important factors influencing the occurrence of IAI after LCBDE ($P<0.05$). The area under the

基金项目:安徽省医学会急诊临床研究项目(ky2018035)

作者单位:安徽省阜阳市人民医院普外科肝胆胰病区,安徽,阜阳236000

*通信作者:王军, E-mail:191076795@qq.com

curve (AUC) of serum PCT+CRP in the diagnosis of IAI after LCBDE at 3 days after surgery was greater than that at 5 and 7 days after surgery. **Conclusion** The levels of serum PCT and CRP in IAI patients after LCBDE are abnormally high, and there is a good linear relationship with the patient's degree of infection. The combined detection of the above serum indicator levels has important guiding value for clinical diagnosis and treatment, rational application of antibacterial drugs, and improvement of prognosis.

[KEY WORDS] Procalcitonin; C-reactive protein; Laparoscopic common bile duct exploration; Intra-abdominal infection

腹腔镜胆总管探查术(laparoscopic common bile duct exploration, LCBDE)是治疗胆总管结石重要手段,具有创伤小、术后恢复时间短、并发症少等优势,但受引流不畅、胆瘘等因素影响,部分患者术后可能并发腹腔感染(intra-abdominal infection, IAI),若未予以及时有效干预,可引发全身炎症反应综合征,增加死亡风险^[1-2]。因此,探索早期诊断 LCBDE 术后 IAI 的敏感且特异的生物标记物具有重要临床价值。国内外研究均已证实^[3-4],降钙素原(Procalcitonin, PCT)、C反应蛋白(C-reactive protein, CRP)可有效反映机体感染情况及其感染严重程度,但关于上述指标动态监测对 LCBDE 术后 IAI 的诊断价值临床报道较少,有待进一步深入论证。基于此,本研究尝试探讨术后血清 PCT、CRP 水平在 LCBDE 术后 IAI 中的诊断价值。具体分析如下。

1 资料和方法

1.1 一般资料

选取 2017 年 1 月至 2020 年 12 月本院行 LCBDE 患者 146 例,其中女 74 例,男 72 例,年龄平均(65.04±7.39)岁;根据有无 IAI 分为 IAI 组($n=17$)与未发生 IAI 组($n=129$)。本院伦理委员会经审核评议同意本研究。

纳入标准:①IAI 组需满足以下任一项标准^[5]:白细胞计数 $>10\times 10^9/L$ 、发热(体温 $>38^{\circ}C$)、腹痛、腹胀伴有明显腹膜炎体征;术区腹腔引流液出现脓液或胆汁,且经细菌学培养呈阳性;经超声或 CT 检查证实腹腔内存在感染灶。②入组人员均签署知情同意书。排除标准:①合并心脑血管肾等重要脏器器质性病变者;②近 3 周内糖皮质激素、免疫抑制剂等药物使用史者;③既往有上腹部手术史者;④合并胆管癌或其他恶性肿瘤者;⑤合并肺部感染、上呼吸道感染和泌尿系感染等其他感染者;⑥伴有狂躁症、重度抑郁症或其他精神疾病者。

1.2 方法

基线资料收集:自制调查问卷,收集行 LCBDE 患者性别、年龄、体质量指数、疾病类型、基础疾病、胆总管直径、术后首次排气时间及 LCBDE 术后 IAI 患者感染可能性评分(infection probability score, IPS)^[6]、急性生理与慢性健康评分 II (acute physiology and chronic health evaluation II, APACHE II)^[7]评分。其中 IPS 评分包含心率(12分)、体温(2分)、白细胞计数(3分)、序贯性器官功能衰竭(2分)、呼吸频率(1分)、C反应蛋白(6分),IPS 评分 ≥ 13 分为重症感染,IPS 评分 <13 分为一般感染;APACHE II 评分 10 分将 IAI 分为轻中度或重度。

PCT、CRP 检测:所有研究对象均于术前、术后 3、5、7 d 空腹取外周静脉血 5 mL,静置 32 min 后 3 000 rpm 离心 12 min,取上清液, $-70^{\circ}C$ 低温保存。采用基蛋生物科技股份有限公司干式免疫荧光法试剂盒测定血清 PCT 水平;采用北京世纪沃德生物科技有限公司免疫比浊法试剂盒测定血清 CRP 水平。

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、两组间用 t 检验;计数资料用 $n(\%)$ 表示、 χ^2 检验;采用 Logistic 多因素回归分析 LCBDE 术后 IAI 的影响因素;采用 Pearson 相关系数模型分析血清 PCT、CRP 水平与 IPS、APACHE II 评分的相关性;采用受试者工作特征(ROC)曲线得到曲线下面积(AUC),检验术后 3、5、7 d 血清 PCT、CRP 水平单一及联合对 LCBDE 术后 IAI 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

两组性别、年龄、体质量指数、疾病类型、基础疾病、胆总管直径、术后首次排气时间比较,差异无统计学意义($P>0.05$);IAI 组手术时间长于未发生 IAI 组,术中失血量高于未发生 IAI 组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

表1 比较两组基线资料 [n(%), ($\bar{x} \pm s$)]

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

基线资料	IAI组 (n=17)	未发生IAI组 (n=129)	t/χ^2 值	P值
性别				
男	9(52.94)	63(48.84)	0.101	0.750
女	8(47.06)	66(51.16)		
年龄(岁)	65.49±19.81	64.98±20.45	0.097	0.923
体质指数(kg/m ²)	22.35±2.46	21.85±2.72	0.720	0.473
疾病类型				
胆总管上段结石	2(11.76)	12(9.30)	0.106	0.949
胆总管中段结石	8(47.06)	62(48.06)		
胆总管下段结石	7(41.18)	55(42.64)		
基础疾病				
高血压	6(35.29)	33(25.58)	0.313	0.576
糖尿病	4(23.53)	26(20.16)	0.000	0.997
冠心病	2(11.76)	11(8.53)	0.000	0.990
胆总管直径(mm)	6.49±1.67	5.83±2.05	1.272	0.206
手术时间(min)	95.39±15.19	84.26±11.65	3.567	0.001
术中失血量(mL)	114.27±28.61	75.88±19.83	7.089	<0.001
术后首次排气时间(d)	3.05±0.72	2.96±0.80	0.441	0.660
IPS评分	10.14±2.49			
APACHE II评分	8.26±1.52			

2.2 两组手术前后血清PCT、CRP水平

组间比较: IAI组术后3、5、7 d血清PCT、CRP水平高于未发生IAI组, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 不同时间点比较: 两组术后3、5、7 d血清PCT、CRP水平均较术前升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表2。

表2 比较两组手术前后血清PCT、CRP水平 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 the levels of serum PCT and CRP before and after operation were compared between 2 groups ($\bar{x} \pm s$)

指标	组别	n	术前	术后3 d	术后5 d	术后7 d
PCT(μg/L)	IAI组	17	0.20±0.10	5.48±1.81 ^a	2.33±0.87 ^a	0.84±0.30 ^a
	未发生IAI组	129	0.19±0.09	2.59±1.10 ^a	1.29±0.52 ^a	0.43±0.21 ^a
	<i>t</i> 值		0.425	9.335	7.076	7.164
<i>P</i> 值			0.671	<0.001	<0.001	<0.001
CRP(mg/L)	IAI组	17	20.50±2.04	112.96±28.97 ^a	60.49±15.11 ^a	38.65±12.49 ^a
	未发生IAI组	129	19.73±1.79	75.49±14.62 ^a	43.85±10.62 ^a	26.46±8.67 ^a
	<i>t</i> 值		1.640	8.629	5.754	5.150
<i>P</i> 值			0.103	<0.001	<0.001	<0.001

注: 与同组术前比较, ^a $P < 0.05$ 。

表4 LCBDE术后IAI的影响因素的Logistic回归方程分析

Table 4 logistic regression analysis of influencing factors of abdominal infection after LCBDE

影响因素	赋值	β 值	SE	Wald χ^2	OR值	95%CI	P值	
手术时间	≤85.56 min=0, >85.56 min=1	0.023	0.259	0.011	1.024	0.827~1.267	0.285	
术中失血量	≤80.35 mL=0, >80.35 mL=1	0.071	0.287	0.061	1.073	0.915~1.259	0.327	
术后3 d	PCT	≤2.93 μg/L=0, >2.93 μg/L=1	0.885	0.279	10.057	2.422	1.747~3.359	<0.001
	CRP	≤68.21 mg/L=0, >68.21 mg/L=1	0.819	0.296	7.657	2.268	1.565~3.288	<0.001
术后5 d	PCT	≤1.41 μg/L=0, >1.41 μg/L=1	0.746	0.288	6.705	2.108	1.629~2.728	<0.001
	CRP	≤45.79 mg/L=0, >45.79 mg/L=1	0.696	0.276	6.351	2.005	1.507~2.667	<0.001
术后7 d	PCT	≤0.48 μg/L=0, >0.48 μg/L=1	0.702	0.283	6.148	2.017	1.539~2.644	<0.001
	CRP	≤27.88 mg/L=0, >27.88 mg/L=1	0.652	0.264	6.109	1.920	1.426~2.586	<0.001

2.3 IAI组术后血清PCT、CRP水平与感染程度的相关性

经Pearson相关性分析可知, 术后3、5、7 d血清PCT、CRP水平与LCBDE术后IAI患者IPS、APACHE II评分均呈正相关性($P < 0.05$)。见表3。

表3 IAI组术后血清PCT、CRP水平与感染程度的相关性

Table 3 Correlation between postoperative serum PCT, CRP levels and infection degree in abdominal infection group

项目	术后3 d		术后5 d		术后7 d		
	PCT	CRP	PCT	CRP	PCT	CRP	
IPS评分	<i>r</i> 值	0.618	0.597	0.562	0.557	0.512	0.508
	<i>P</i> 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.001	0.001
APACHE II评分	<i>r</i> 值	0.584	0.571	0.549	0.538	0.504	0.497
	<i>P</i> 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.001	0.002

2.4 LCBDE术后IAI的影响因素

以LCBDE术后IAI为因变量, 0=未发生, 1=发生; 纳入手术时间、术中失血量、术后3、5、7 d血清PCT、CRP水平作为自变量, 采用非条件逐步回归分析, 结果显示, 术后3、5、7 d血清PCT、CRP是LCBDE术后IAI发生的重要影响因素($P < 0.05$)。见表4。

2.5 术后不同时间点血清PCT、CRP对LCBDE术后IAI的诊断价值

阳性样本: IAI组; 阴性样本: 未发生IAI组; 绘制术后不同时间点血清PCT、CRP诊断LCBDE术后IAI的ROC, 结果显示, 术后3 d血清PCT+CRP诊断LCBDE术后IAI的AUC大于术后5、7 d, 见表5、图1。

表5 ROC分析结果

Table 5 ROC analysis results

指标	AUC	95%CI	Z值	Cut-off值	敏感度(%)	特异度(%)	P值	
术后3 d	PCT	0.864	0.797~0.915	7.848	>4.50 $\mu\text{g/L}$	82.35	86.82	<0.001
	CRP	0.869	0.803~0.919	8.031	>96.69 mg/L	70.59	88.37	<0.001
	联合诊断	0.970	0.928~0.991	25.692	-	88.24	96.90	<0.001
术后5 d	PCT	0.829	0.757~0.886	5.809	>1.92 $\mu\text{g/L}$	70.59	84.50	<0.001
	CRP	0.792	0.717~0.855	4.216	>64.63 mg/L	58.82	93.02	<0.001
	联合诊断	0.922	0.865~0.960	11.648	-	76.47	97.67	<0.001
术后7 d	PCT	0.811	0.738~0.871	5.852	>0.69 $\mu\text{g/L}$	70.59	74.42	<0.001
	CRP	0.723	0.643~0.794	3.140	>33.30 mg/L	52.94	83.72	<0.001
	联合诊断	0.880	0.816~0.928	8.578	-	76.47	89.92	<0.001

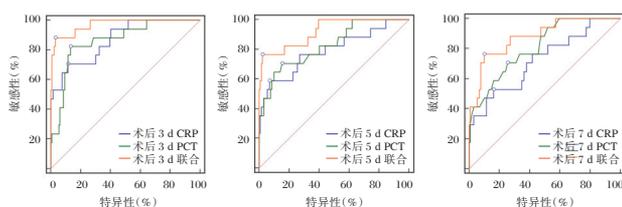


图1 ROC曲线

Figure 1 ROC curve

3 讨论

细菌培养是目前临床诊断IAI的金标准,特异度较高,但其检测时间较长,易延误抗菌药物最佳使用时间,影响治疗效果^[8]。因此,LCBDE术后IAI早期诊断对患者治疗方案选择、预后改善尤为重要。

PCT主要产生于甲状腺C细胞,是临床感染性疾病诊断重要指标,可评估全身炎症反应活跃程度^[9]。崔宇^[10]研究认为,当机体发生严重感染时,血清PCT水平显著上升,可有效鉴别诊断细菌性感染与病毒性感染。CRP作为主要炎症介质,对下游单核细胞或巨噬细胞具有激活作用,可诱导机体下游趋化因子富集,加重术后体内重要脏器损伤^[11]。本研究数据表明,LCBDE术后发生IAI患者术后3、5、7 d血清PCT、CRP水平均高于未发生IAI患者,结合冯玉源等^[12]、夏龙飞等^[13]研究考虑机制可能在于LCBDE术后IAI发生可促使细菌内毒素入血,增加血管通透性,激活炎症级联反应,从而刺激血清PCT、CRP大量表达。推测血清PCT、CRP水平可能在LCBDE术后IAI发生、发展过程中扮演着重要角色。IPS、APACHE II评分主要用于危重病情评估,可准确客观反映机体感染程度。2019年中国腹腔感染诊治指南推荐以APACHE II评分10分为界限将IAI分为轻中度或重度^[14]。本研究经Pearson相关性分析显示,术后

3、5、7 d血清PCT、CRP水平与LCBDE术后IAI患者IPS、APACHE II评分均存在正相关关系。李宇飞等^[15]报道也证实CRP有助于界定IAI危险层级,可作为评定严重IAI者病情严重程度的辅助参考指标。间接提示动态监测术后血清PCT、CRP水平可为临床评估LCBDE术后IAI感染程度提供循证支持。另外,本研究经Logistic多因素回归分析结果再次佐证了PCT、CRP在LCBDE术后IAI方面具有一定诊断价值。由此可见,早期联合检测血清PCT、CRP水平有望成为LCBDE术后IAI的辅助诊断手段,从而指导临床合理应用抗菌药物,改善预后。

综上可知,LCBDE术后IAI患者血清PCT、CRP水平异常高表达,并与患者感染程度存在良好线性关系,联合检测上述血清指标水平,对临床诊治、抗菌药物合理应用、预后改善具有重要指导价值。然而本研究样本量小,仅为单中心研究,未探讨血清PCT、CRP水平是否可识别LCBDE术后IAI病原菌类型,这也为今后大样本、多中心随机对照研究明确了方向。

参考文献

- [1] Bo X, Wang J, Nan L, et al. 3D laparoscopic common bile duct exploration versus 2D in choledocholithiasis patients: a propensity score analysis[J]. Surg Endosc, 2021, 35(2):819-825.
- [2] 崔宇,李波,陈进.血清降钙素原对肝胆手术后患者腹腔感染的预测效果分析[J].中华医院感染学杂志, 2019, 29(14):2154-2157.
- [3] Li F, Kong S, Xie K, et al. High ratio of C-reactive protein/procalcitonin predicts Mycoplasma pneumoniae infection among adults hospitalized with community acquired pneumonia[J]. Scand J Clin Lab Invest, 2021, 81(1):65-71.
- [4] 江玲,王运铎,赵晓慧,等.初始治疗无效肺炎患者肺部灌洗液病原菌构成及血清CRP、PCT研究[J].中华生物医学工程杂志, 2019, 25(6):781-785.

(下转第1117页)

动态监测 VEGF、HBP、NGAL 在肺癌手术前后水平变化及与预后的关系

李伟* 茹玉航 王林

[摘要] 目的 探讨动态监测 VEGF、HBP、NGAL 在肺癌手术前后水平变化及与预后的关系。方法 选取 2017 年 7 月至 2020 年 12 月本院 80 例肺癌患者作为研究对象,根据患者术后复发情况分组,未复发组($n=68$)、复发组($n=12$)。进行肺癌预后的 Cox 多因素分析,评价 VEGF、HBP、NGAL 水平对预后的预测价值,并对比不同水平 VEGF、HBP、NGAL 患者生存情况。结果 两组手术前后 VEGF、HBP、NGAL 均高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);两组术前 VEGF、HBP、NGAL 水平相比,差异无统计学意义($P>0.05$),术后复发组 VEGF、HBP、NGAL 水平均高于未复发组,差异有统计学意义($P<0.05$);术后 VEGF、HBP、NGAL 水平均为肺癌患者术后复发影响因素($P<0.05$);术后 VEGF、HBP、NGAL 水平联合对预后的预测 AUC 最大,具有良好预测效能。结论 动态监测 VEGF、HBP、NGAL 可有效预测肺癌患者术后预后情况,利于评估复发转移风险,开展针对性防治措施。

[关键词] 血管内皮生长因子; 肝素结合蛋白; 中性粒细胞明胶酶相关载脂蛋白; 动态监测; 肺癌

Dynamics of serum VEGF, HBP, NGAL levels in lung cancer patients before and after surgery and their relationship with prognosis

LI Wei*, RU Yuhang, WANG Lin

(Department of Thoracic Surgery, Bozhou People's Hospital, Bozhou, Anhui, China, 236800)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the dynamics of VEGF, HBP, NGAL levels before and after lung cancer surgery and their relationship with prognosis. **Methods** From July 2017 to December 2020, 80 patients with lung cancer in our hospital were selected as the research objects, and the patients were grouped according to their recurrence at 1 year after surgery, the non-recurring group ($n=68$) and the recurring group ($n=12$). The Cox multivariate analysis of the prognosis of lung cancer was performed to evaluate the prognostic value of VEGF, HBP, and NGAL levels, and to compare the survival of patients with different levels of VEGF, HBP, and NGAL. **Results** The preoperative VEGF, HBP, and NGAL levels were not significantly different between the two groups ($P>0.05$). The levels of VEGF, HBP, and NGAL in the postoperative recurrence group were higher than those in the non-recurrence group, and the postoperative VEGF, HBP, and NGAL levels were all factors affecting postoperative recurrence of lung cancer patients ($P<0.05$). The combination of VEGF, HBP, and NGAL levels after surgery has the largest prognostic AUC and has good predictive performance. **Conclusion** Dynamic monitoring of VEGF, HBP, and NGAL can effectively predict the postoperative prognosis of lung cancer patients, which is beneficial to assess the risk of recurrence and metastasis, and carry out targeted prevention and treatment measures.

[KEY WORDS] Vascular endothelial growth factor; Heparin-binding protein; Neutrophil gelatinase-associated lipocalin; Lung cancer

基金项目:安徽省医学会急诊临床研究项目(ky2018016)

作者单位:亳州市人民医院胸外科,安徽,亳州 236800

*通信作者:李伟, E-mail: oicq1687702021@163.com

全球癌症数据统计表明,肺癌在男性恶性肿瘤发病和死亡率占据第一位,在女性发病率、死亡率分别位居第三、第二位^[1]。外科手术是肺癌首选治疗方法,早期肺癌术后5年生存率达70%以上,而局部中晚期肺癌仅约20%^[2]。肺癌预后相关研究一直备受临床关注,随现代分子生物学发展,发现了多种与肺癌侵袭、转移相关的标志物,能否用于手术疗效及预后监测尚无明确定论。血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)是作用最强、特异性最高的促血管生长因子,在肺癌侵袭、转移中发挥重要作用^[3]。中性粒细胞明胶酶相关载脂蛋白(Neutrophil gelatinase-associated lipocalin, NGAL)参与炎症免疫应答、细胞分化与凋亡、肿瘤发生发展等过程,成为肺癌研究领域新的切入点^[4]。另研究证实,肝素结合蛋白(Heparin-binding protein, HBP)在多种肿瘤组织中表达上调,可作为独立预后因素^[5]。本研究尝试动态监测VEGF、HBP、NGAL在肺癌手术前后水平变化,并探究其与预后的关系。报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2017年7月至2020年12月本院80例肺癌患者作为研究对象,根据患者术后复发情况分组,未复发组($n=68$),其中男57例,女11例,年龄平均(59.75 ± 7.41)岁,临床分期:I期25例,II期33例,III期10例;复发组($n=12$),其中男8例,女4例,年龄平均(61.84 ± 6.43)岁,临床分期:II期6例,III期6例。

纳入标准:①均经病理学明确且首次诊断为进展期肺癌^[6];②预计生存时间 ≥ 6 个月;③采取手术治疗;④术前均未进行放化疗治疗;⑤患者及家属知情同意。排除标准:①合并其他恶性肿瘤;②术前有感染性疾病;③术后出现严重并发症;④合并重要脏器转移;⑤合并肝炎、糖尿病、冠心病、脑血管疾病、高血压等疾病。两组年龄、性别

差异无统计学意义($P>0.05$);本研究经本院伦理委员会审批通过。

1.2 方法

①术前及术后3d取空腹静脉血3mL,离心(半径8cm,3500r/min,9min),取血清,采用酶联免疫吸附试验(Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)测定VEGF、HBP、NGAL,均采用上海莱生物科技有限公司试剂盒。②Logistic多因素回归分析肺癌术后复发影响因素,受试者工作特征(Receiver operating characteristic curve, ROC)曲线分析VEGF、HBP、NGAL水平对预后(术后复发为预后差)的预测价值。

1.3 观察指标

①不同预后患者手术前后VEGF、HBP、NGAL水平。②预后Logistic多因素回归分析。③VEGF、HBP、NGAL水平对预后的预测价值。

1.4 统计学方法

采用统计学软件SPSS 22.0处理数据,计数资料以 $n(\%)$ 描述,计量资料以 $(\bar{x}\pm s)$ 描述,两组间比较用 t 检验;影响因素采用Logistic多因素回归分析;预测价值采用ROC曲线,获取AUC、置信区间、敏感度、特异度及cut-off值,联合预测实施Logistic二元回归拟合,返回预测概率 $\text{logit}(p)$,将其作为独立检验变量。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同预后患者手术前后VEGF、HBP、NGAL水平

两组术前VEGF、HBP、NGAL水平相比,差异无统计学意义($P>0.05$),术后复发组VEGF、HBP、NGAL水平均高于未复发组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表1。

2.2 预后Logistic多因素回归分析

以肺癌患者术后复发情况为因变量(未复发=0,复发=1),将表1中差异有统计学意义的因素作为自变量,纳入Logistic多因素回归模型,结果显

表1 不同预后患者手术前后VEGF、HBP、NGAL水平($\bar{x}\pm s$)

Table 1 The levels of VEGF, HBP, and NGAL in patients with different prognosis before and after surgery ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	VEGF(pg/mL)		t值	P值	HBP($\mu\text{g/L}$)		t值	P值	NGAL(ng/mL)		t值	P值
		术前	术后			术前	术后			术前	术后		
复发组	12	824.69 \pm 65.20	536.41 \pm 47.83	13.339	<0.001	75.69 \pm 13.41	49.31 \pm 8.82	6.150	<0.001	77.52 \pm 10.84	47.82 \pm 5.24	9.230	<0.001
未复发组	68	809.37 \pm 60.26	488.25 \pm 45.36	34.588	<0.001	70.12 \pm 15.43	32.87 \pm 5.94	18.303	<0.001	75.94 \pm 9.38	38.42 \pm 5.69	27.784	<0.001
t值		0.852	3.575			1.253	8.584			0.557	5.687		
P值		<0.001	<0.001			<0.001	<0.001			<0.001	<0.001		

示,术后 VEGF、HBP、NGAL 水平均为肺癌患者术后复发影响因素($P<0.05$)。见表2。

表2 术后 Logistic 多因素回归分析

Table 2 Logistic multivariate regression analysis of prognosis

因素	β 值	S.E. 值	Wald χ^2	OR 值	95%CI	P 值
VEGF	1.490	0.324	21.155	4.438	3.147~6.259	<0.05
HBP	1.358	0.320	18.010	3.889	2.983~5.069	<0.05
NGAL	1.627	0.314	26.843	5.088	3.567~7.257	<0.05

注:赋值:术后 VEGF、HBP、NGAL 水平:以平均数为界,<平均数=1, \geq 平均数=2。

表3 VEGF、HBP、NGAL 水平对预后的预测价值

Table 3 The prognostic value of VEGF, HBP and NGAL levels

指标	AUC	95%CI	Z 值	截断值	敏感度(%)	特异度(%)	P 值
术后 VEGF	0.764	0.656~0.852	4.764	>535.72 pg/mL	58.33	90.62	<0.001
术后 HBP	0.837	0.737~0.910	7.471	>42.35 μ g/L	83.33	78.00	<0.001
术后 NGAL	0.827	0.726~0.903	7.088	>42.17 ng/mL	79.17	75.59	<0.001
联合预测	0.924	0.83~0.972	13.927		85.42	87.50	<0.001

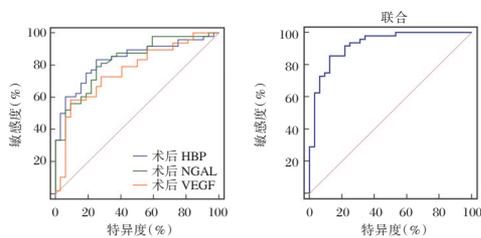


图1 ROC 曲线

Figure 1 ROC curve

NGAL,能否作为肿瘤标志物用于肺癌手术疗效及预后监测是一直困扰我们的问题。

血管生成是癌症转移和复发的主要原因,几乎所有实体瘤生长、转移均依赖于肿瘤血管生成^[7]。新生肿瘤血管不仅是癌细胞增殖的内部条件,也是癌细胞浸润和血行转移的第一路径。VEGF是作用最强的促血管生长因子,大量研究证实,VEGF可作为评估肺癌恶性程度及预后的参考指标^[8-9]。本研究结果提示 VEGF 可能与肺癌术后复发有关。VEGF 可诱导血管内皮细胞产生间质胶原酶、蛋白水解酶等促进血管生成,且可提高血管通透性,引起肿瘤间质水肿,利于肿瘤浸润及转移^[10]。因此,VEGF 与肺癌术后复发有关。

NGAL 是 lipocalin 家族成员之一,其氨基酸序列及 DNA 内含子和外显子的排列有着高度保守性,在免疫调节及维持细胞内环境稳定中发挥重要作用^[11]。目前,已发现 NGAL 与多种疾病有关,其对急性肾损伤、脓毒症有明确预测价值,也参与慢性阻塞

2.3 VEGF、HBP、NGAL 水平对预后的预测价值

绘制 ROC 曲线,术后 VEGF、HBP、NGAL 水平联合对预后的预测 AUC 最大,具有良好预测效能。见表3,图1。

3 讨论

肺癌恶性程度高,即使在早期行根治性手术,5年生存率仍较低。肿瘤侵袭、转移与肺癌预后有关。随现代分子生物学发展,发现多种与肺癌侵袭、转移相关的肿瘤标志物,如 VEGF、HBP、

性肺疾病、冠心病等发生发展^[12]。近年来,NGAL 与肿瘤的关系愈发受到重视,在食管癌、乳腺癌、膀胱癌、胃癌等恶性肿瘤中呈显著高表达^[13]。在肺癌中,研究证实,NGAL 在患者原位肿瘤、血清、胸腔积液均有明显高表达^[14-15]。本研究数据显示,肺癌术后复发患者 NGAL 高表达,为肺癌患者术后复发影响因素。

HBP 在凝血、细胞分化及肿瘤发生发展等过程中发挥重要调节作用。目前,关于 HBP 在肺癌中的研究鲜有报道。本研究探讨 HBP 与肺癌术后复发的关系,发现,HBP 为肺癌术后复发影响因素。抗凝药物肝素(HP)及其结构类似物硫酸乙酰肝素(HS)均为高度硫酸化糖胺聚糖家族成员,研究证实,HS/HP 通过糖链中大量精细寡糖片段与 HBP 相互作用,发挥抗肿瘤转移作用^[16]。此可能为 HBP 参与肺癌术后复发的关键机制,但临床尚无相关验证,有待进一步证实。ROC 曲线是兼顾灵敏度和特异性的诊断试验评价工具,而基于 Logistic 回归的 ROC 曲线可用于联合指标预测效能评价。本研究 ROC 曲线显示,结果提示临床可同时检测 VEGF、HBP、NGAL,为肺癌患者预后预测提供更全面、可靠的参考信息。因此,建议肺癌患者术后应定期检测 VEGF、HBP、NGAL,准确估计其复发转移的可能性,在复发转移前即得到及时治疗,以有效延长生存期。

综上可知,动态监测 VEGF、HBP、NGAL 可有效预测肺癌患者术后预后情况,利于评估复发转移

风险,开展针对性防治措施。本研究所选病例中复发率符合以往文献复发比例,但本研究存在一定不足,如样本量较小,还需临床多中心、多渠道取样,做进一步证实。

参考文献

- [1] 曾路情,夏苏建,彭锐豪,等. 2006-2016年中国人群肺癌影响因素的Meta分析[J]. 华南预防医学, 2018, 44(5): 431-435.
- [2] 高德军,李建亮,张世英. 长链非编码RNA浆细胞瘤变异位点1靶向微RNA-140-5p调控肺癌细胞增殖凋亡及自噬的分子机制[J]. 中华生物医学工程杂志, 2019, 25(1): 75-80.
- [3] 孙小迪,张丽媛,韩宜秀,等. 肺腺癌患者胸腔积液EGFR、ALK、VEGF蛋白表达与性别、年龄及吸烟的关系[J]. 山东医药, 2019, 59(22): 33-36.
- [4] Wang Y, Man J, Yan X, et al. Increased neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) promotes airway remodelling in chronic obstructive pulmonary disease [J]. Clin Sci (Lond), 2017, 131(11): 1147-1159.
- [5] 何鑫,游建,肖定,等. 维生素K2对人肝癌裸鼠移植瘤生长及肝癌衍生长因子表达的影响[J]. 中华实验外科杂志, 2019, 36(10): 1752-1754.
- [6] 中国肺癌防治联盟,中华医学会呼吸病学分会肺癌学组,中国医师协会呼吸医师分会肺癌工作委员会. 肺癌筛查与管理中国专家共识[J]. 国际呼吸杂志, 2019, 39(21): 1604-1615.
- [7] Lin R, Huang J, Wang L, et al. Bevacizumab and Near Infrared Probe Conjugated Iron Oxide Nanoparticles for Vascular Endothelial Growth Factor Targeted MR and Optical Imaging [J]. Biomater Sci, 2018, 6(6): 1517-1525.
- [8] 陶绍能,王莹莹,戴云海,等. 循环IGF-1、IGFBP-3和VEGF在非小细胞肺癌中的临床价值及相关性分析[J]. 重庆医学, 2019, 48(20): 3460-3463.
- [9] 杨全中,张煜,王亚娟,等. 淫羊藿苷激活CaMK II-JNK通路抑制人非小细胞肺癌A549细胞存活和转移特性[J]. 中国公共卫生, 2020, 36(7): 1014-1019.
- [10] 于伟玲,肖莎,谢宗宙,等. 缺氧诱导通路基因多态性与肺癌及临床特征的关联性研究[J]. 安徽医科大学学报, 2020, 55(1): 123-127.
- [11] Westhoff JH, Seibert FS, Waldherr S, et al. Urinary calprotectin, kidney injury molecule-1, and neutrophil gelatinase-associated lipocalin for the prediction of adverse outcome in pediatric acute kidney injury [J]. Eur J Pediatr, 2017, 176(6): 745-755.
- [12] 葛斌,刘艳,徐革,等. 建立NGAL诊断阈值有利于临床判断和发现急性肾功能损伤[J]. 基因组学与应用生物学, 2019, 38(3): 1434-1441.
- [13] Maier H, Aigner F. Upregulation of Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin in Colorectal Cancer Predicts Poor Patient Survival: Reply [J]. World J Surg, 2016, 40(4): 1023-1023.
- [14] 张乃丹,袁成良,刘利洪,等. 中性粒细胞明胶酶相关载脂蛋白和基质金属蛋白酶-9与肺腺癌预后的关系[J]. 中国老年学杂志, 2017, 37(8): 1935-1937.
- [15] 陈如杰,潘利伟,夏杰,等. 肺腺癌预后与中性粒细胞明胶酶相关载脂蛋白、基质金属蛋白酶-9的关系[J]. 中华实验外科杂志, 2017, 34(5): 875-877.
- [16] 邵萌. 长链肝素寡糖的合成及其与碱性成纤维细胞生长因子的相互作用研究[D]. 济南:山东大学, 2018.

(上接第1113页)

- [5] 中华人民共和国卫生部. 医院感染诊断标准(试行)[J]. 中华医学杂志, 2001, 81(5): 314-320.
- [6] 赵茜,郭慧,吕畅,等. 感染可能性评分及血清胆碱酯酶和淀粉样蛋白A与危重症感染患者生存情况的关系[J]. 中国医药, 2020, 15(12): 1891-1895.
- [7] Zou X, Li S, Fang M, et al. Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II Score as a Predictor of Hospital Mortality in Patients of Coronavirus Disease 2019 [J]. Crit Care Med, 2020, 48(8): e657-e665.
- [8] 刘豪,鄢超,施慧群,等. 腹腔感染患者分离细菌的分布及耐药性分析[J]. 中国实验诊断学, 2020, 24(3): 384-385.
- [9] 谢永祥,徐佳佳,杨旭. hs-CRP、WBC及PCT检测诊断儿童呼吸道感染[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2021, 13(1): 21-24.
- [10] 崔宇. 血浆降钙素原对肝胆管结石术后感染的预测效果分析[D]. 泸州:西南医科大学, 2019.
- [11] 何梅梅,朱义朗,尚晓娟,等. 炎症标志物与新型冠状病毒肺炎患者病情程度关系[J]. 华南预防医学, 2020, 46(3): 247-249+253.
- [12] 冯星源,陈谦,关义健. 降钙素原、超敏C-反应蛋白及D-二聚体在腹腔感染诊断和预后评估中的价值[J]. 河北医药, 2019, 41(5): 742-744+748.
- [13] 夏龙飞,刘玉君,张军民,等. 肠瘘患者术后腹腔感染对降钙素原与C反应蛋白和白细胞计数值影响研究[J]. 中国预防医学杂志, 2019, 20(5): 446-450.
- [14] 中华医学会外科学分会外科感染与重症医学学组,中国医师协会外科医师分会肠瘘外科医师专业委员会. 中国腹腔感染诊治指南(2019版)[J]. 中国实用外科杂志, 2020, 40(1): 1-16.
- [15] 李宇飞,吴勤祥,李琰,等. 严重腹腔感染患者血清炎症指标表达水平与病情的相关性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2019, 29(19): 2976-2981.

CD14、HIF-1 α 、CX3CL1与儿童急性牙髓炎易感性关系及诊断价值

白冰^{1*} 陈梅梅¹ 黄海燕²

[摘要] **目的** 探讨脂多糖信号受体(CD14)、缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)、趋化因子CX3C的配体1(CX3CL1)与儿童急性牙髓炎(AP)易感性的关系。**方法** 选取2018年1月至2020年12月本院收治的82例儿童AP患者(AP组)及40例健康儿童(对照组),比较两组基线资料、CD14、HIF-1 α 、CX3CL1,并比较不同CD14、HIF-1 α 、CX3CL1水平患者疼痛视觉模拟评分法(VAS)评分,分析CD14、HIF-1 α 、CX3CL1与VAS评分关系以及儿童AP易感性的相关影响因素,评价各指标诊断AP的价值。**结果** AP组中CD14、HIF-1 α 、CX3CL1水平高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);CD14、HIF-1 α 、CX3CL1高水平患者VAS评分高于低水平患者,差异有统计学意义($P<0.05$);CD14、HIF-1 α 、CX3CL1与VAS评分正相关($P<0.05$);CD14、HIF-1 α 、CX3CL1与儿童AP的易感性相关($P<0.05$);CD14、HIF-1 α 、CX3CL1联合诊断AP的曲线下面积(AUC)最大,为0.926。**结论** 血清CD14、HIF-1 α 、CX3CL1水平升高可能增加儿童AP易感性,并与疼痛程度存在良好线性关系,联合检测上述指标有助于儿童AP诊断。

[关键词] 脂多糖信号受体;缺氧诱导因子-1 α ;趋化因子CX3C的配体1;急性牙髓炎

The relationship between CD14, HIF-1 α , CX3CL1 and susceptibility to acute pulpitis in children and its diagnostic value

BAI Bing^{1*}, CHEN Meimei¹, HUANG Haiyan²

(1. Center of Stomatology, The First Affiliated Hospital, University of Science and Technology of China, Hefei, Anhui, China, 230001; 2. Stomatological Hospital of Tongji University, Shanghai, China, 200000)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the relationship between lipopolysaccharide signal receptor (CD14), hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α), chemokine C-X3-C motif ligand 1 (CX3CL1) and susceptibility to acute pulpitis (AP) in children and evaluate the diagnostic value of the single and combined indicators for children with acute pulpitis. **Methods** A total of 82 children with AP patients (AP group) and 40 healthy children (control group) treated in our hospital from January 2018 to December 2020 were selected. The baseline data, CD14, HIF-1 α , and CX3CL1 of the two groups were compared, and the visual analogue scale (VAS) scores of patients with different levels of CD14, HIF-1 α and CX3CL1 were compared. The relationship between CD14, HIF-1 α , CX3CL1 and VAS scores, as well as related influencing factors of AP susceptibility in children were analyzed, and the value of each index in the diagnosis of AP was evaluated. **Results** The levels of CD14, HIF-1 α , and CX3CL1 in the AP group were higher than those in the control group, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). The VAS scores of patients with high levels of CD14, HIF-1 α , and CX3CL1 were higher than those with low levels, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). CD14, HIF-1 α , CX3CL1 were positively correlated with VAS scores ($P<0.05$). CD14, HIF-1 α , CX3CL1

基金项目:安徽省自然科学基金项目(2008085MB50)

作者单位:1. 中国科学技术大学附属第一医院口腔医学中心,安徽,合肥 230001

2. 同济大学附属口腔医院,上海市 200000

*通信作者:白冰, E-mail:13866729369@163.com

were related to the susceptibility of children to AP ($P < 0.05$). The area under the curve (AUC) of CD14, HIF-1 α , and CX3CL1 in the combined diagnosis of AP was the largest, which was 0.926. **Conclusion** The elevated levels of serum CD14, HIF-1 α , and CX3CL1 may increase the susceptibility of children to AP and have a good linear relationship with the degree of pain. The combined detection of the above indicators can help improve the diagnostic value of AP in children.

[KEY WORDS] CD14; HIF-1 α ; CX3CL1; Acute pulpitis

急性牙髓炎(Acute pulpitis, AP)具有起病急骤、疼痛剧烈的特点,受乳牙纤维成分较小、血管分支较多、牙髓组织疏松等诸多因素影响,随病情迁延可引起进食与睡眠质量障碍,影响恒牙胚发育^[1-2]。研究认为^[3],炎症介质蓄积于毛细血管中,导致牙髓组织坏死可能是AP发生的重要原因。脂多糖信号受体(CD14)是单核细胞活化的标志,亦是一种重要促炎介质^[4];缺氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α)主要在缺氧条件下表达,可诱发炎症,反映牙髓损伤程度^[5];趋化因子CX3C的配体1(Chemokine C-X3-C motif ligand 1, CX3CL1)可能参与外周炎症及疼痛发生、发展过程中^[6],但三者联合对儿童AP的诊断价值临床缺乏相关循证支持。本研究尝试探讨血清CD14、HIF-1 α 、CX3CL1与儿童AP易感性关系及诊断价值,旨在为临床诊治提供一种有效途径。详情如下。

1 资料和方法

1.1 一般资料

选取2018年1月至2020年12月本院收治的82例儿童AP患者(AP组)及40例健康儿童(对照组)。纳入标准:①AP组均符合《口腔内科学》^[7]中相关诊断标准,并存在阵发性痛、温度刺激痛、夜间痛、放散痛等临床表现;经口腔检查存在明显深龋;②对照组无上述典型疼痛症状,经口腔检查未发现明显深龋;③两组研究对象监护人均签署知情同意书。排除标准:①合并严重自身免疫系统疾病者;②髓底严重破坏者;③牙根吸收超出根长

的1/2者;④严重营养不良者;⑤伴有神经系统体征、躯体畸形等者。本实验经伦理委员会批准。

1.2 方法

①CD14、HIF-1 α 、CX3CL1检测:于入院时空腹取外周静脉血4 mL,静置32 min后2 500 rpm离心10 min,取上清液,-70℃低温保存。采用上海江莱生物科技有限公司酶联免疫吸附法试剂盒测定血清CD14、HIF-1 α 、CX3CL1水平。②疼痛程度:采用疼痛视觉模拟评分法(visual analogue scale, VAS)^[8]进行评估,其中1~4分为轻度疼痛,5~7分为中度疼痛,8~10分为重度疼痛。

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、 χ^2 检验;采用Logistic多因素回归分析儿童AP易感性的相关影响因素;采用Pearson相关系数模型分析CD14、HIF-1 α 、CX3CL1与VAS评分相关性;采用受试者工作特征(Receiver operating characteristic curve, ROC)曲线得到曲线下面积(areas under the curve, AUC),检验CD14、HIF-1 α 、CX3CL1对儿童AP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、CD14、HIF-1 α 、CX3CL1比较

两组年龄、性别、体质量比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);AP组CD14、HIF-1 α 、CX3CL1高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表1。

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

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

组别	n	年龄(岁)	性别		CD14(mg/L)	HIF-1 α (pg/mL)	CX3CL1(ng/L)
			男	女			
AP组	82	10.18 \pm 1.53	45(54.88)	37(45.12)	4.98 \pm 1.55	456.89 \pm 103.35	52.15 \pm 17.18
对照组	40	10.35 \pm 1.17	24(60.00)	16(40.00)	1.70 \pm 0.52	345.17 \pm 92.26	24.35 \pm 7.73
t/χ^2 值		1.166		0.287	13.007	5.800	9.748
P 值		0.246		0.592	<0.001	<0.001	<0.001

2.2 不同CD14、HIF-1α、CX3CL1水平者VAS评分比较

以AP组CD14、HIF-1α、CX3CL1均值为分界,将患者分为CD14、HIF-1α、CX3CL1高水平与低水

平者,结果显示,CD14、HIF-1α、CX3CL1高水平者VAS评分高于低水平者,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表2。

表2 不同CD14、HIF-1α、CX3CL1水平者VAS评分比较($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of VAS scores in patients with different levels of CD14, HIF-1 α and cx3cl1 ($\bar{x} \pm s$)

	CD14		HIF-1α		CX3CL1	
	低水平(n=33)	高水平(n=49)	低水平(n=25)	高水平(n=57)	低水平(n=21)	高水平(n=61)
VAS评分(分)	6.05±1.81	7.94±1.26	7.13±1.39	8.14±1.05	6.56±1.27	8.32±1.12
t值	5.579		3.622		6.000	
P值	<0.001		0.001		<0.001	

2.3 CD14、HIF-1α、CX3CL1与VAS评分相关性

采用Pearson进行相关性分析,结果显示,CD14($r=0.769, P < 0.001$)、HIF-1α($r=0.684, P < 0.001$)、CX3CL1($r=0.709, P < 0.001$)与VAS评分呈正相关。见图1。

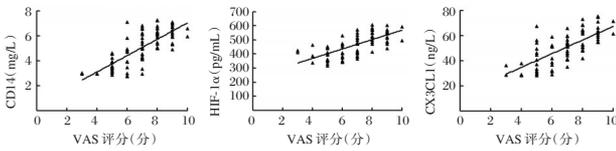


图1 CD14、HIF-1α、CX3CL1与VAS评分相关性

Figure 1 CD14, HIF-1 α, Correlation between cx3cl1 and VAS score

2.4 儿童AP易感性的相关影响因素

以是否发生AP为因变量(0=无,1=有),纳入CD14、HIF-1α、CX3CL1作为自变量(1=低水平,2=高水平),采用多因素Logistic回归方程分析,结果显示,CD14、HIF-1α、CX3CL1与儿童AP的易感性相关($P < 0.05$)。见表3。

表3 儿童AP易感性的Logistic回归方程分析

Table 3 logistic regression equation analysis of AP susceptibility in children

影响因素	β值	SE值	Wald χ ² 值	OR值	95%CI	P值
CD14	低水平			1.000		
	高水平	0.900	0.257	12.261	2.459	2.339~2.586
HIF-1α	低水平			1.000		
	高水平	0.940	0.274	11.767	2.560	1.156~5.668
CX3CL1	低水平			1.000		
	高水平	1.006	0.224	20.185	2.736	2.519~2.971

2.5 CD14、HIF-1α、CX3CL1的诊断价值

以AP组为阳性样本,以对照组为阴性样本,绘制各指标诊断AP的ROC曲线显示,CD14、HIF-1α、CX3CL1诊断儿童AP的AUC分别为0.860、0.757、

0.805($P < 0.05$);应用SPSS软件的联合应用ROC理论模式,建立各指标联合诊断的ROC模型,结果显示,CD14、HIF-1α、CX3CL1联合诊断儿童AP的AUC为0.926($P < 0.05$)。见表4、图2。

表4 ROC分析结果

Table 4 ROC analysis results

评价指标	AUC	95%CI	cut-off值	敏感度(%)	特异度(%)	P值
CD14	0.860	0.786~0.916	>3.39 mg/L	74.39	95.00	<0.001
HIF-1α	0.757	0.671~0.830	>447.18 pg/mL	59.76	85.00	<0.001
CX3CL1	0.805	0.723~0.871	>32.34 ng/L	76.83	72.50	<0.001
三者联合	0.926	0.865~0.966		80.49	97.50	<0.001

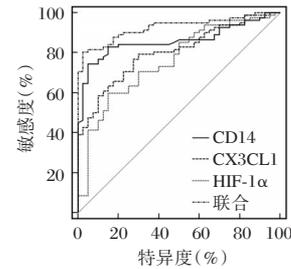


图2 CD14、HIF-1α、CX3CL1的诊断价值

Figure 2 CD14, HIF-1 α, Diagnostic value of cx3cl1

3 讨论

据报道^[9],细菌感染可能是牙髓病发生、发展的重要因素,而脂多糖是诱发牙髓组织感染的主要细菌毒力因子。CD14是革兰阴性菌细胞壁主要致病成分脂多糖的结合受体,具有高亲和性,与脂多糖结合可刺激炎症级联反应,参与细胞损伤、炎症因子释放进程。本研究结果显示,血清CD14水平在AP患儿中过度表达,结合王晓敏等^[10]研究考虑机制可能在于CD14过度表达,可引起脂多糖对牙髓成纤维细胞的直接毒性,促使牙髓成纤维细胞大量释放肿瘤坏死因子-α、白细胞介素等

炎症因子,从而导致 AP 发生、发展。HIF-1 α 是检测组织缺氧程度的重要指标,相关研究表明^[11-12],在炎症反应过程中,可作为重要炎症因子,在相关基因表达调控中起着重要作用。本研究中 AP 患儿血清 HIF-1 α 水平显著升高,这可能归因于牙髓炎症可增加牙髓内压力,降低氧代谢,加重牙髓组织低氧情况,促进局部牙髓形成缺氧环境,从而刺激 HIF-1 α 表达,直接参与调控炎症微环境,最终形成恶性循环。CX3CL1 是一种 CX3CL 趋化因子,主要存在于中枢神经系统小胶质细胞及周围神经巨噬细胞中,可诱导白细胞黏附,趋化 B 细胞、T 细胞等,调控炎症进程^[13]。本研究发现,AP 患儿血清 CX3CL1 水平明显高于健康儿童,这可能是由于 CX3CL1 表达升高利用 T 细胞、嗜酸性粒细胞及单核细胞上表达受体,可促进肥大细胞活化,刺激白细胞介素等促炎因子释放,提高炎症介质含量,最终导致牙髓组织受损,引起 AP。由此推测下调血清 CD14、HIF-1 α 、CX3CL1 表达有望成为阻断儿童 AP 发生、发展的潜在靶点。

另有学者指出^[14-15],牙髓内炎症细胞浸润、组织液渗出及组织破坏是造成 AP 疼痛的主要因素。VAS 评分是目前广泛应用的评估机体疼痛程度的重要指标。本研究经 Pearson 线性相关性分析结果推测血清 CD14、HIF-1 α 、CX3CL1 有助于评估儿童 AP 疼痛程度。进一步经 Logistic 多因素回归分析,血清 CD14、HIF-1 α 、CX3CL1 升高可能会上调儿童 AP 的易感性,再次佐证了血清 CD14、HIF-1 α 、CX3CL1 在儿童 AP 诊断方面具有一定作用。本研究通过绘制联合 ROC 曲线发现,血清 CD14、HIF-1 α 、CX3CL1 联合诊断儿童 AP 的 AUC 值优于上述指标单一诊断,特异度可达 97.50%。提示共同检测血清 CD14、HIF-1 α 、CX3CL1 有望为临床儿童 AP 提供一种新的诊断手段,指导临床拟定个性化治疗方案。

综上所述,血清 CD14、HIF-1 α 、CX3CL1 水平升高可能增加儿童 AP 易感性,并与疼痛程度存在良好的线性关系,联合检测上述指标有助于提高儿童 AP 诊断价值。但受年龄限制本研究纳入样本量较少,研究结果可能存在一定偏倚,今后需扩大样本量进一步深入分析。

参考文献

- [1] 刘亚蕊,徐冬雪,罗苑慈,等.笑气舒适化诊疗模式在儿童乳牙急性牙髓炎中的应用[J].广州医科大学学报,2020,48(5):50-52,82.
- [2] 何晓玲,陈丹,颜志玲,等.成都市低龄儿童乳牙患龋及龋易感性调查[J].华南预防医学,2020,46(1):34-37.
- [3] 马旭.丁香油水门汀联合一次根管治疗急性牙髓炎的疗效及对患儿血清炎症介质的影响[J].中国药物经济学,2021,16(2):38-41.
- [4] Ciesielska A, Matyjek M, Kwiatkowska K. TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling[J]. Cell Mol Life Sci, 2021, 78(4):1233-1261.
- [5] Karatas O, Balci Yuce H, Tulu F, et al. Evaluation of apoptosis and hypoxia-related factors in gingival tissues of smoker and non-smoker periodontitis patients[J]. J Periodontal Res, 2020, 55(3):392-399.
- [6] Ostuni MA, Hermand P, Saindoy E, et al. CX3CL1 homo-oligomerization drives cell-to-cell adherence[J]. Sci Rep, 2020, 10(1):9069.
- [7] 郑艳.口腔内科学[M].2版.北京:人民卫生出版社,2009:149-150.
- [8] Elera-Fitzcarrald C, Vega K, Gamboa-Cárdenas RV, et al. Reliability of visual analog scale and numeric rating scale for the assessment of disease activity in systemic lupus erythematosus[J]. J Clin Rheumatol, 2020, 26(7S Suppl 2):S170-S173.
- [9] 董丽华.化脓性牙髓炎患者血清 TNF- α 、IL-8 及 CD14 水平的变化及意义[J].国际检验医学杂志,2018,39(15):1873-1875,1879.
- [10] 王晓敏,曹伟靖,杜莉,等.化脓性牙髓炎患者血清 CRP、IL-6、TNF- α 及 CD14 水平的变化及其临床意义[J].现代生物医学进展,2020,20(23):4593-4596.
- [11] 董幼溪,王文博,史坚,等.HIF-1 α 、G6PD 及 PDCD5 的表达及与患者临床特征的相关性分析[J].分子诊断与治疗杂志,2021,13(1):63-66,71.
- [12] 黄艳丽,王多姿,项国华.脑卒中患者血清 VILIP-1、HIF- α 、BDNF 水平与认知损害的关系[J].中华生物医学工程杂志,2019,25(6):777-780.
- [13] 林嘉旭,张汝弘,张健娜,等.不同正畸治疗措施对错颌畸形患者龈沟液趋化因子 CX3CL1、RANKL/OPG 水平的影响[J].上海口腔医学,2021,30(1):85-88.
- [14] 仇文栋.一次性根管治疗急性牙髓炎患者疗效观察及对患者炎症因子水平和生命质量影响[J].中国医师进修杂志,2020,43(8):712-715.
- [15] 谢冰,杨卫东,冯加飞,等.早期开髓减压引流术联合氢氧化钙治疗牙髓炎的疗效及对血清 TLR4、CX3CL1 的影响[J].武汉大学学报(医学版),2020,41(3):495-498.

KLF4、LDH联合P53预测DLBCL标准治疗反应性价值及意义

秦福丽* 郭志强 李小雨

[摘要] **目的** 探讨锌指样转录因子4(KLF4)、乳酸脱氢酶(LDH)、P53与弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)标准治疗反应性关系及联合预测价值。**方法** 选取2017年1月至2020年3月本院收治的62例DLBCL患者,根据治疗反应性分为缓解组($n=42$)、非缓解组($n=20$),比较两组基线资料、KLF4 mRNA、血清LDH水平、P53基因缺失率,采用Pearson分析KLF4 mRNA、LDH与国际预后指数(IPI)评分关系,采用多因素Logistic回归方程分析治疗反应性的相关影响因素,采用受试者工作特征曲线(ROC)及曲线下面积(AUC)分析各指标预测治疗反应性的价值。**结果** 缓解组Ann Arbor分期、IPI评分与非缓解组比较,差异有统计学意义($P<0.05$);缓解组KLF4 mRNA高于非缓解组,LDH、P53基因缺失率低于非缓解组,差异有统计学意义($P<0.05$);KLF4 mRNA与IPI评分呈负相关($r=-0.611, P<0.001$),LDH与IPI评分呈正相关($r=0.728, P<0.001$);将Ann Arbor分期、IPI评分控制后,KLF4 mRNA、LDH、P53基因缺失仍与治疗反应性相关($P<0.05$);KLF4 mRNA、LDH、P53基因预测缓解的AUC为0.829、0.832、0.614, KLF4 mRNA+LDH+P53基因预测缓解的AUC为0.962($P<0.05$)。**结论** KLF4 mRNA、LDH、P53基因缺失与DLBCL标准治疗反应性及预后有关,在缺乏有效手段时,可作为预测缓解的标志物为临床提供重要参考信息。

[关键词] KLF4; LDH; P53; DLBCL; 治疗反应性

The value and significance of the detection of KLF4, LDH combined with P53 in predicting the responsiveness of DLBCL to standard treatment

QIN Fuli*, GUO Zhiqiang, LI Xiaoyu

(Department of Hematology, Zhengzhou Central Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan, China, 450007)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the relationship between zinc finger-like transcription factor 4 (KLF4), lactate dehydrogenase (LDH), P53 and the standard treatment response of diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) and the combined predictive value. **Methods** A total of 62 patients with DLBCL admitted to our hospital from January 2017 to March 2020 were divided into remission group ($n=42$) and non-remission group ($n=20$) according to treatment response. The baseline data and KLF4 of 2 groups were compared. mRNA, serum LDH level, P53 gene deletion rate, Pearson analysis of the relationship between KLF4 mRNA, LDH and the International Prognostic Index (IPI) score, multivariate Logistic regression equation to analyze the relevant influencing factors of treatment response, and receiver operating characteristic curve (ROC) and area under the curve (AUC) analyze the value of each index in predicting treatment response. **Results** The Ann Arbor staging and IPI score of the remission group were compared with the non-remission group, and the difference was statistically significant ($P<0.05$); the KLF4 mRNA of the remission group was

基金项目:郑州大学校级教育教学改革研究与实践项目(2019ZZUJGLX353)

作者单位:郑州大学附属郑州中心医院血液内科,河南,郑州450007

*通信作者:秦福丽, E-mail: qflyyx@126.com

higher than that of the non-remission group, and the LDH and P53 gene deletion rate was lower than that of the non-remission group. Statistical significance ($P < 0.05$); *KLF4* mRNA was negatively correlated with IPI score ($r = -0.611$, $P < 0.001$), LDH was positively correlated with IPI score ($r = 0.728$, $P < 0.001$); Ann Arbor staging, IPI After scoring control, *KLF4* mRNA, LDH, and P53 gene deletions are still related to treatment response ($P < 0.05$); *KLF4* mRNA, LDH, and P53 genes predict remission AUC of 0.829, 0.832, 0.614, and *KLF4* mRNA + LDH + P53 gene prediction The remission AUC was 0.962 ($P < 0.05$). **Conclusion** *KLF4* mRNA, LDH, and P53 gene deletions are related to the responsiveness and prognosis of DLBCL standard treatments. In the absence of effective methods, they can be used as markers to predict remission and provide important clinical reference information.

[KEY WORDS] *KLF4*; LDH; P53; DLBCL; Treatment response

弥漫性大 B 细胞淋巴瘤 (Diffuse large B cell lymphoma, DLBCL) 占成人非霍奇金淋巴瘤的 30%~40%, 呈弥漫侵袭性生长^[1]。CHOP (硫酸长春新碱+环磷酰胺+盐酸表柔比星+地塞米松) 或 R-miniCHOP (减低剂量的 CHOP) 联合 CD20 单克隆抗体利妥昔单抗是治疗 DLBCL 标准方案, 但部分患者仍出现复发或预后不良, 呈现出不同的治疗反应性^[2]。锌指样转录因子 4 (Krüppel-like factor 4, *KLF4*) 是含锌指结构的转录因子家族一员, 在肾透明细胞癌中表达降低, 且低表达 *KLF4* 与大肠癌患者更差预后有关, 但与 DLBCL 治疗反应性关系尚未阐明^[3-4]。乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 分布于机体肾脏、骨骼等多种组织和器官, 在 DLBCL 患者中水平升高, 但是否可影响患者治疗反应性仍有待探讨^[5]。P53 是一种抑癌基因, 通过细胞凋亡、DNA 修复、诱导细胞周期阻滞及调控多种信号转导抑制肿瘤的发生发展, 但在 DLBCL 领域尚存在争议, 在 DLBCL 治疗反应性中扮演何种角色尚不明确^[6]。基于此本研究探讨 *KLF4*、LDH、P53 与 DLBCL 标准治疗反应性关系及联合预测价值, 报告如下。

1 对象和方法

1.1 研究对象

选取 2017 年 1 月至 2020 年 3 月本院收治的 62 例 DLBCL 患者, 根据治疗反应性分为缓解组 ($n = 42$)、非缓解组 ($n = 20$)。纳入标准: ①符合 DLBCL 诊断标准^[7]; ②无化疗禁忌症; ③首次确诊与治疗; ④免疫组化检查 CD20 阳性。排除标准: ①心肝肾功能严重不全者; ②活性性出血者; ③其他系统原发性恶性肿瘤者; ④伴有急性感染类疾病者; ⑤妊娠期、哺乳期者。本研究获医院伦理委员会审核通过, 患者及家属知情同意。

1.2 方法

1.2.1 资料收集

收集患者年龄、性别、体质量指数、饮酒史、吸烟史、Ann Arbor 分期、受累部位、细胞起源亚型、合并疾病、国际预后指数 (International Prognostic Index, IPI) 评分^[8], 其中 IPI 评分于治疗前评估, 0~5 分, 分值越高, 预后危险度越高。

1.2.2 检测方法

治疗前通过活检获取 DLBCL 标本, 采用实时荧光定量聚合酶链反应法检测 *KLF4* mRNA, *KLF4* mRNA 的上游引物 5'-GGCTGATGGGCAA GTTTGTG-3', 下游引物 5'-CAAGTGTGGGTG-GCTGTTCT-3', 以 β -actin 作为内参, 内参 β -actin 的上游引物序列: 5'-GAGCCTCGCCTTTGCC-GATCC-3', 下游引物序列: 5'-CGATGCCGTGCTC GATGGGG-3', Ct (Cycle threshold) 值是每个反应管内荧光信号达到设定的阈值时所经历的循环数, 收集 Ct 值后应用 $\Delta\Delta$ Ct 法检测基因的相对表达量, 试剂盒购于宝生物 (大连) 有限公司, 严格按照试剂盒说明书操作; 采用间期荧光原位杂交检测 P53 基因缺失率, 试剂盒购于上海岚派生物有限公司, P53 基因的 5' 和 3' 探针均为绿色荧光标记, 基因丢失时仅显示 1 个和 0 个绿色信号; 并于治疗前采集外周血 5 mL, 采用比色法检测血清 LDH, 试剂盒购于上海沪峥生物科技有限公司。

1.2.3 治疗方法及治疗反应性评估^[7]

<80 岁患者, 采用 CHOP 联合利妥昔单抗注射液, ≥ 80 岁者采用 R-miniCHOP 联合利妥昔单抗注射液, 21 周为 1 个治疗周期, 共治疗 6 个周期; 治疗后疗效分为完全缓解、部分缓解、病情稳定、疾病进展, 其中完全缓解、部分缓解纳入缓解组。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 22.0 处理数据, 计量资料符合正态

分布时以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,行 t 检验,计数资料用 $n(\%)$ 表示,行 χ^2 检验,采用 Pearson 分析 *KLF4* mRNA、LDH 与 IPI 评分关系,采用多因素 Logistic 回归方程分析治疗反应性的相关影响因素,采用受试者工作特征曲线(ROC)及 ROC 下面积(AUC)分析各指标预测治疗反应性的价值。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组基线资料比较

两组年龄、性别、体质量指数、饮酒史、吸烟史、受累部位、细胞起源亚型、合并疾病比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);缓解组 Ann Arbor 分期、IPI 评分与非缓解组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

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

Table 1 Comparison of baseline data between 2 groups

资料	缓解组 (n=42)	非缓解组 (n=20)	t/χ^2 值	P 值
年龄(岁)	61.15±11.24	63.58±10.29	0.817	0.417
性别(男/女)	24/18	9/11	0.802	0.370
体质量指数(kg/m ²)	24.25±1.57	23.99±1.66	0.599	0.552
饮酒史	35(83.33)	13(65.00)	1.662	0.197
吸烟史	20(47.62)	6(30.00)	1.727	0.189
Ann Arbor 分期				
I	9(21.43)	1(5.00)	3.856	<0.001
II	19(45.24)	2(10.00)		
III	11(26.19)	8(40.00)		
IV	3(7.14)	9(45.00)		
受累部位				
淋巴结内	26(61.90)	15(75.00)	1.037	0.309
淋巴结外	16(38.10)	5(25.00)		
细胞起源亚型				
生发中心 B 细胞样	9(21.43)	9(45.00)	3.654	0.056
非生发中心 B 细胞样	33(78.57)	11(55.00)		
合并疾病				
高脂血症	8(19.05)	3(15.00)	0.001	0.973
糖尿病	10(23.81)	3(15.00)	0.214	0.644
心脏病	1(2.38)	2(10.00)	0.454	0.500
高血压	6(14.29)	1(5.00)	0.424	0.515
IPI 评分(分)	1.40±0.42	2.61±0.59	9.271	<0.001

2.2 两组各指标比较

缓解组 *KLF4* mRNA 高于非缓解组,LDH、P53 基因缺失率低于非缓解组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 两组各指标比较 $[(\bar{x} \pm s), n(\%)]$

Table 2 Comparison of indicators between 2 groups

指标	缓解组(n=42)	非缓解组(n=20)	t/χ^2 值	P 值
<i>KLF4</i> mRNA	0.97±0.30	0.56±0.14	5.800	<0.001
LDH(U/L)	267.52±85.63	368.49±90.82	4.257	<0.001
P53 基因缺失率	18(42.86)	16(80.00)	7.547	0.006

2.3 *KLF4* mRNA、LDH 与 IPI 评分关系

采用 Pearson 进行相关性分析,结果显示,*KLF4* mRNA 与 IPI 评分呈负相关($r = -0.646, P < 0.001$),LDH 与 IPI 评分呈正相关($r = 0.623, P < 0.001$)。

2.4 治疗反应性的多因素 Logistic 回归方程分析

Logistic 回归方程分析显示,将 Ann Arbor 分期、IPI 评分控制后,*KLF4* mRNA、LDH、P53 基因缺失仍与治疗反应性相关($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 治疗反应性的多因素 Logistic 回归方程分析

Table 3 Multivariate Logistic regression equation analysis of treatment response

影响因素	β 值	SE 值	Wald χ^2	OR 值	95%CI	P 值
<i>KLF4</i> mRNA	-1.022	0.265	14.865	0.360	0.265~0.489	<0.001
LDH	0.911	0.260	12.290	2.488	1.268~4.882	<0.001
P53 基因缺失	1.516	0.362	17.529	4.552	3.516~5.894	<0.001

2.5 各指标预测治疗反应性的 ROC

以缓解组为阳性样本,以非缓解组为阴性样本,绘制各指标预测治疗反应性的 ROC,结果显示,*KLF4* mRNA+LDH+P53 基因预测缓解的 AUC 为 0.962,大于各单一指标。见表 4、图 1。

表 4 ROC 分析结果

Table 4 ROC curve results

指标	AUC	95%CI	cut-off 值	敏感度 (%)	特异度 (%)	P 值
<i>KLF4</i> mRNA	0.829	0.712~0.913	>0.85	61.90	95.00	<0.001
LDH	0.832	0.716~0.915	≤280.60 U/L	78.57	80.00	<0.001
P53 基因	0.614	0.482~0.735	1	42.86	80.00	<0.001
联合	0.962	0.880~0.994		88.10	95.00	<0.001

注:cut-off 值为 1 表示 P53 基因缺失阴性。

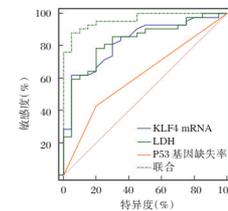


图 3 各指标预测治疗反应性的 ROC

Figure 3 ROC of each index predicting treatment response

3 讨论

KLF4 基因定位于 9q31,在巨噬细胞、血管内皮等机体多种组织和细胞中均有表达,参与细胞生长、增殖、凋亡等多个生命活动的调控^[9-10]。本研究结果显示,与缓解患者相比,非缓解患者 *KLF4* mRNA 较低,与 IPI 评分呈负相关,是治疗反应性的相关影响因素。林志美等^[11]报道,*KLF4*

mRNA 在 DLBCL 患者中水平降低,增加 *KLF4* mRNA 表达可抑制 DLBCL 细胞增殖和侵袭迁移,证实 *KLF4* mRNA 具有抑癌作用。高表达的 *KLF4* mRNA 能破坏新生血管形成,阻断肿瘤细胞血供,诱导肿瘤细胞凋亡,*KLF4* mRNA 高表达时,还能抑制磷脂酰肌醇激酶/蛋白激酶 B 通路的异常激活,从而对 DLBCL 发挥抑制作用^[12]。后续的 ROC 分析显示,当 *KLF4* mRNA>0.85 时,预测缓解的 AUC 为 0.829,能为临床提供量化的数据参考。

LDH 系糖酵解酶,分布于机体所有组织细胞的胞质内,被认为是 DLBCL 患者预后的相关影响因素,但对 DLBCL 标准治疗方案治疗反应性影响的报道较少^[13]。本研究结果表明 LDH 具有作为治疗反应性预测标志物的潜质。LDH 与肿瘤微环境、线粒体呼吸抑制等有关,当发生肿瘤时,即使在供氧充足调节下,肿瘤细胞糖酵解作用亦加强,以满足恶性增殖的需求,故伴有 LDH 升高,因此 LDH 常被用于肿瘤的诊断、疗效及预后的判断。本研究发现,LDH 水平越高,治疗反应性越差,这可能是 LDH 较高患者,肿瘤糖酵解作用较强,肿瘤细胞恶性增殖较明显造成的,可见临床上对 LDH 水平较高患者宜进行全面的评估,必要时联合其他方案或更换二线方案,以增加患者受益,促进病情转归。

P53 基因定位于 17p13.1,具有抑制肿瘤发生和进展的作用^[14]。研究^[15]发现,*P53* 基因突变与 DLBCL 发病密切相关。目前关于 *P53* 基因在恶性肿瘤领域表达情况存在较大争议,如丁欣等^[16]报道,*P53* 阳性患者总生存和无进展生存期缩短,呈现出更差的预后。造成这种差异的原因是 *P53* 阳性定义方法不同造成的,丁欣等将 *P53* 基因发生了突变定义为 *P53* 阳性,柴成国等将 *P53* 基因缺失定义为阳性,在此前提限定下,*P53* 基因突变与 *P53* 基因缺失从本质上讲,意义是相同的,因此认为研究结果是一致的。*P53* 基因能通过编码细胞周期调控蛋白,控制细胞分裂周期的启动,并能介导与启动损伤细胞的凋亡活动,起到减缓和监视细胞分裂作用,当 *P53* 基因突变或缺失时,对细胞周期控制功能和细胞凋亡活动的管理能力减弱或消失,故呈现出促癌作用。

综上,*KLF4* mRNA、LDH、*P53* 基因缺失与 DLBCL 标准治疗反应性及预后有关,在缺乏有效手段时,可作为预测缓解的标志物为临床提供重要参考信息。

参考文献

- [1] 王静,李馨筱,吴琳娜,等. 弥漫性大 B 细胞淋巴瘤组织 NF- κ B/p65、Bcl-2 和 Bax 表达及意义[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2019,11(1):33-38.
- [2] 程毅敏,庄衍,杭海芳,等. 探讨利妥昔单抗联合 CHOP 方案治疗弥漫大 B 细胞淋巴瘤的临床疗效[J]. 内科理论与实践, 2019,14(5):317-318.
- [3] Rong Z, Luo Z, Zhang J, et al. GINS complex subunit 4, a prognostic biomarker and reversely mediated by Krüppel-like factor 4, promotes the growth of colorectal cancer[J]. Cancer Sci, 2020,111(4):1203-1217.
- [4] 杨林,熊波,罗军,等. 肾透明细胞癌尿液中锌指蛋白转录因子 4 的表达及临床意义[J]. 重庆医科大学学报, 2019,44(2):209-212.
- [5] 李静,史颖红,刘庆荣. 弥漫性大 B 细胞淋巴瘤患者致癌转录因子 1 和 miR-224 表达与临床病理特征及预后的关系[J]. 中国慢性病预防与控制, 2019,27(10):776-779.
- [6] 陈文婷,林丽娥,刘丹,等. COX-2 抑制人急性髓系白血病 OCI-AML2 细胞株内 p53、TNF- α 的表达[J]. 热带医学杂志, 2020,20(7):882-886,906.
- [7] 中华医学会血液学分会,中国抗癌协会淋巴瘤专业委员会. 中国弥漫大 B 细胞淋巴瘤诊断与治疗指南(2013 年版)[J]. 中华血液学杂志, 2013,34(9):816-819.
- [8] 冯要须,苏丽萍. 国际预后指数修订国际预后指数改良国际预后指数及西班牙淋巴瘤组/自体骨髓移植国际预后指数对弥漫性大 B 细胞淋巴瘤的预后评估价值[J]. 中华肿瘤杂志, 2020,42(11):949-954.
- [9] 王栋,吴环立,司华,等. 人脑胶质瘤组织中锌指转录因子 4 的表达及其对肿瘤细胞活性的影响[J]. 肿瘤研究与临床, 2021,33(2):109-113.
- [10] He M, Huang TS, Li S, et al. Atheroprotective Flow Upregulates ITPR3 (Inositol 1, 4, 5-Trisphosphate Receptor 3) in Vascular Endothelium via KLF4 (Krüppel-Like Factor 4)-Mediated Histone Modifications[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2019,39(5):902-914.
- [11] 林志美,李建,饶进,等. *KLF4* 在弥漫性大 B 细胞淋巴瘤组织中的表达及其作用机制研究[J]. 中国免疫学杂志, 2020,36(4):445-450.
- [12] Boriushkin E, Zhang H, Becker M, et al. Kruppel-like factor 4 regulates developmental angiogenesis through disruption of the RBP-J-NICD-MAML complex in intron 3 of *Dll4*[J]. Angiogenesis, 2019,22(2):295-309.
- [13] 王静书,李俊杰,赵兵. 老年弥漫大 B 细胞淋巴瘤患者的临床特征及预后分析[J]. 新疆:新疆医科大学学报, 2019,42(12):1610-1614.
- [14] 李红艳,曲桂梅. 突变型 p53 在弥漫性大 B 细胞淋巴瘤中作用的研究进展[J]. 滨州医学院学报, 2020,43(5):395-398.
- [15] 吴晨阳,王潇飞,张爽,等. PD-L1、p53、C-myc 在弥漫性大 B 细胞性淋巴瘤中的表达及意义[J]. 诊断病理学杂志, 2020,27(6):408-412.
- [16] 丁欣,侯淑玲,李雅琴,等. *P53* 表达对双表达淋巴瘤患者预后影响的研究[J]. 中国实验血液学杂志, 2019,27(5):1504-1514.

吸烟相关 COPD 肺微生物群、Treg/Th17、炎症在发病中的作用机制

王辉¹ 叶彩虹² 马焕丽¹ 孙俊生³ 陈斯亮¹ 张韶斌^{1*}

[摘要] 目的 探讨吸烟相关慢性阻塞性肺疾病(COPD)肺微生物群、调节性T淋巴细胞(Treg)/辅助性T细胞17(Th17)、炎症之间关系及在发病中的作用机制。方法 选取本院COPD稳定期患者68例、肺功能正常者68例,根据是否吸烟将COPD稳定期患者分为吸烟COPD组($n=20$)、戒烟COPD组($n=29$)、不吸烟COPD组($n=19$);肺功能正常者分为吸烟肺功能正常组($n=16$)、戒烟肺功能正常组($n=18$)、不吸烟肺功能正常组($n=14$)。比较6组基线资料、外周血和肺泡灌洗液(BAL)中Treg/Th17、炎症因子、BAL中肺微生物群多样性,分析肺微生物群、Treg/Th17、炎症因子之间关系及与吸烟的相关性。结果 Chao指数、外周血和BAL中Treg/Th17、IL-10、IL-35指标在各组间比较,吸烟COPD组<戒烟COPD组<非吸烟COPD组<吸烟肺功能正常组<戒烟肺功能正常组<非吸烟肺功能正常组,Simpson指数在各组间比较,吸烟COPD组>戒烟COPD组>非吸烟COPD组>吸烟肺功能正常组>戒烟肺功能正常组>非吸烟肺功能正常组,差异有统计学意义($P<0.05$);吸烟与Chao指数、外周血和BAL中Treg/Th17、IL-10、IL-35呈负相关,与Simpson指数、外周血和BAL中IL-17、IL-6、IL-8呈正相关($P<0.05$);肺微生物群多样性、Treg/Th17、炎症之间存在良好线性相关性($P<0.05$)。结论 肺微生物群失衡、Treg/Th17紊乱、炎症之间相互影响可能在吸烟相关COPD发病机制中起着重要作用。

[关键词] 慢性阻塞性肺疾病;肺微生物群;调节性T淋巴细胞;辅助性T细胞17

Smoking-related COPD lung microecological flora, Treg/Th17, and the mechanism of inflammation in the pathogenesis

WANG Hui¹, YE Caihong², MA Huanli¹, SUN Junsheng³, CHEN Siliang¹, ZHANG Shaobin^{1*}

(1. Department of Clinical Laboratory, Shenzhen Longgang Central Hospital, Shenzhen, Guangdong, China, 518116; 2. Department of Clinical Laboratory, Shenzhen Mental Health Center (Shenzhen Kangning Hospital), Shenzhen, Guangdong, China, 518116; 3. Department of Respiratory Medicine, Shenzhen Longgang Central Hospital, Shenzhen, Guangdong, China, 518116)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the relationship between smoking-related chronic obstructive pulmonary disease (COPD) lung microbiota, regulatory T cell (Treg)/helper T cell 17 (Th17), and inflammation Relationship and mechanism of action in pathogenesis. **Methods** 68 patients with stable COPD and 68 patients with normal lung function were selected and divided into smoking COPD group ($n=20$), smoking cessation COPD group ($n=29$) and non = smoking COPD group ($n=19$) according to whether they smoked or not; The patients with normal lung function were divided into smoking group ($n=16$), smoking cessation group ($n=18$) and non = smoking group ($n=14$). Baseline data, Treg/Th17, inflammatory factors in peripheral blood and bronchoalveolar lavage fluid (BAL) and diversity of pulmonary microbiota in BAL were compared among the six groups. The relationship between pulmonary microbiota, Treg/Th17, inflammatory factors and smoking was analyzed. **Results** Chao index, Treg/Th17, IL=10, and IL=35 in peripheral blood and BAL were compared among the groups. Smoking COPD group <Smoking cessation COPD group <

基金项目:深圳市科技计划项目(JCYJ20180305125804992)

作者单位:1. 广东省深圳市龙岗中心医院检验科,广东,深圳 518116

2. 深圳市精神卫生中心(深圳市康宁医院)检验科,广东,深圳 518116

3. 广东省深圳市龙岗中心医院呼吸科,广东,深圳 518116

*通信作者:张韶斌, E-mail:13923856280@139.com

Non=smoking COPD group <Smoking pulmonary function normal group <Smoking cessation pulmonary function normal group <Non=smokers with normal lung function group, Simpson index is compared between each group, smoking COPD group> smoking cessation COPD group> non=smoking COPD group> smoking normal lung function group> smoking cessation normal lung function group>non=smoking normal lung function group, The difference was statistically significant ($P<0.05$); Smoking was negatively correlated with Chao index, Treg/Th17, IL=10 and IL=35 in peripheral blood and BAL, and positively correlated with Simpson index, IL=17, IL=6 and IL=8 in peripheral blood and BAL ($P<0.05$); There was a good linear correlation among pulmonary microbial diversity, Treg/Th17 and inflammation ($P<0.05$). **Conclusion** The imbalance of pulmonary microbiota, Treg/Th17 disorder, and inflammation may play an important role in the pathogenesis of smoking-related COPD.

[KEY WORDS] Chronic obstructive pulmonary disease; Lung microecological flora; Regulatory T lymphocytes; Helper T cells 17; Smoking

慢性阻塞性肺疾病(Chronic Obstructive Pulmonary Disease, COPD)是一种以持续性气流受限为特征的慢性气道炎症^[1],香烟烟雾是其原发病因之一^[2],但其在COPD发病中的具体作用机制仍需进一步研究。关于香烟烟雾暴露对下呼吸道菌群分布影响的小鼠实验表明^[3],香烟烟雾暴露可能通过加快致病菌生长速度,诱导下呼吸道菌群组成改变,引起宿主下呼吸道免疫反应,增加肺部疾病发生风险。另有学者指出^[4],吸烟可刺激支气管上皮细胞,募集中性粒细胞、巨噬细胞等天然免疫细胞,异常增殖辅助性T细胞Th17(T helper cells - 17, Th17),破坏调节性T淋巴细胞(Regulatory T cells, Treg)/Th17平衡,降低免疫抑制功能,加重肺部炎症反应。本研究尝试探讨吸烟相关COPD肺微生物群、Treg/Th17、炎症之间关系及在发病中的作用机制。

1 资料和方法

1.1 研究对象

选取2019年4月至2020年3月本院COPD稳定期患者68例,另选取同期肺功能正常者68例。根据是否吸烟将COPD稳定期患者分为吸烟COPD组($n=20$)、戒烟COPD组($n=29$)、不吸烟COPD组($n=19$);肺功能正常者分为吸烟肺功能正常组($n=22$)、戒烟肺功能正常组($n=26$)、不吸烟肺功能正常组($n=20$)。纳入标准:①COPD患者均符合COPD诊断标准^[5];②肺功能正常患者经肺功能仪检查未发现肺功能受限,且未合并其他器质性疾病;③吸烟状态定义^[6]:吸烟者为截至目前使用 ≥ 100 支香烟,且 ≥ 1 次/月,目前并未戒断;戒烟者即从前吸烟者截至目前使用 ≥ 100 支香烟,但目前已戒断 ≥ 12 个月;不吸烟者为截至目前从不使用或者使用 < 100 支,且目前不吸烟 ≥ 12 个月。排除标

准:①近6个月内有急性COPD发作史者;②合并支气管哮喘、支气管扩张及其他肺部疾病者;③被动吸烟者;④精神行为异常者。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。

1.2 仪器与方法

①所有研究对象均戒烟12h,清晨空腹抽取静脉血5mL,乙二胺四乙酸抗凝,4℃保存备用;采集肺泡灌洗液(Bronchoalveolar lavage, BAL)50mL,4℃保存备用。②BAL离心处理(500g,4℃离心,10min),qPCR法提取DNA,采用454焦磷酸法对细菌16sRNA进行测序,后采用Quantitative Insights into Microbial Ecology法分析16sRNA数据,获取肺微生物群多样性(Chao指数、Simpson指数)。③采用美国贝克曼库尔特公司DxFLEX型流式细胞仪检测外周血、BAL中Treg细胞与Th17细胞含量;室温条件下,2800r/min离心10min,采用瑞士帝肯公司SPARK 10M酶标仪以上海江莱生物科技有限公司酶联免疫吸附试验试剂盒(规格:96T)测定血清和BAL上清白细胞介素(Interleukin, IL)-17、IL-10、IL-35、IL-6及IL-8。

1.3 统计学方法

采用统计学软件SPSS 22.0进行数据处理;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;计数资料用 $n(\%)$ 表示,行 χ^2 检验;采用Spearman相关系数模型分析吸烟与肺微生物群、Treg/Th17、炎症因子的关系;采用Pearson相关系数模型分析肺微生物群、Treg/Th17、炎症因子之间相关性。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 6组基线资料比较

6组第1s用力呼气容积(forced expiratory vol-

ume in one second, FEV₁)占预计值百分比、FEV₁与用力肺活量比值(forced vital capacity, FVC)比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表1。

2.2 6组肺微生物群多样性、外周血、BAL中Treg/Th17、炎性因子比较

Chao指数、外周血和BAL中Treg/Th17、IL-10、

IL-35指标在各组间比较,吸烟COPD组<戒烟COPD组<非吸烟COPD组<吸烟肺功能正常组<戒烟肺功能正常组<非吸烟肺功能正常组,Simpson指数在各组间比较,吸烟COPD组>戒烟COPD组>非吸烟COPD组>吸烟肺功能正常组>戒烟肺功能正常组>非吸烟肺功能正常组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表2、表3。

表1 6组基线资料比较 [$n(\%)$, ($\bar{x} \pm s$)]

Table 1 Comparison of baseline data of 6 groups [$n(\%)$, ($\bar{x} \pm s$)]

组别	n	男性	年龄(岁)	肺功能	
				FEV ₁ 占预计值百分比(%)	FEV ₁ /FVC(%)
吸烟 COPD 组	20	12(60.00)	60.49±8.27	50.73±6.42 ^a	41.60±6.48 ^a
戒烟 COPD 组	29	15(51.72)	58.76±9.41	56.29±8.37 ^a	47.45±6.96 ^a
不吸烟 COPD 组	19	10(52.63)	57.35±10.64	60.36±5.29 ^a	53.49±7.37 ^a
吸烟肺功能正常组	22	8(36.36)	59.23±8.61	80.24±2.83 ^a	79.52±7.36 ^a
戒烟肺功能正常组	26	11(42.31)	58.57±7.62	82.45±3.39 ^a	80.46±6.23 ^a
不吸烟肺功能正常组	20	10(50.00)	57.19±9.84	83.49±5.38	82.09±8.21 ^a
F/ χ^2 值		3.024	0.366	149.503	155.373
P值		0.696	0.871	<0.001	<0.001

注:与不吸烟肺功能正常组比较,^a $P < 0.05$ 。

表2 6组肺微生物群多样性比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of the diversity of the microflora in the lung of 6 group ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Simpson 指数	Chao 指数
吸烟 COPD 组	20	3.86±0.83 ^a	94.49±30.89 ^a
戒烟 COPD 组	29	2.62±0.55 ^a	142.69±32.61 ^a
不吸烟 COPD 组	19	1.85±0.40 ^a	185.81±49.50 ^a
吸烟肺功能正常组	22	1.15±0.36 ^a	231.65±53.42 ^a
戒烟肺功能正常组	26	0.73±0.19 ^a	288.44±63.69 ^a
不吸烟肺功能正常组	20	0.35±0.10	357.49±92.58
F 值		170.553	63.135
P 值		<0.001	<0.001

注:与不吸烟肺功能正常组比较,^a $P < 0.05$ 。

表3 6组外周血、BAL中Treg/Th17、炎性因子比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of treg/th17 and inflammatory factors in peripheral blood and BAL of 6 groups ($\bar{x} \pm s$)

项目	组别	n	Treg/Th17	IL-17 (pg/mL)	IL-10 (pg/mL)	IL-35 (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)	IL-8 (pg/mL)
外周血	吸烟 COPD 组	20	0.35±0.12 ^a	12.51±0.22 ^a	5.68±0.25 ^a	5.37±0.36 ^a	20.36±2.04 ^a	42.61±4.43 ^a
	戒烟 COPD 组	29	0.57±0.19 ^a	11.38±0.29 ^a	7.66±0.59 ^a	6.99±0.45 ^a	18.58±1.82 ^a	37.57±6.38 ^a
	不吸烟 COPD 组	19	0.84±0.26 ^a	10.16±0.32 ^a	9.98±0.44 ^a	9.44±0.52 ^a	17.27±1.64 ^a	32.15±7.51 ^a
	吸烟肺功能正常组	22	1.14±0.32 ^a	9.73±0.25 ^a	11.32±0.77 ^a	11.82±0.96 ^a	13.39±1.39 ^a	26.49±5.88 ^a
	戒烟肺功能正常组	26	1.79±0.40 ^a	9.36±0.24 ^a	12.48±1.37 ^a	13.45±1.33 ^a	10.88±1.55 ^a	22.61±3.72 ^a
	不吸烟肺功能正常组	20	2.61±0.55	9.00±0.23	14.02±2.09	15.59±1.51	8.92±1.34	17.48±2.24
	F 值		139.604	571.500	174.249	365.527	167.806	68.642
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	
BAL	吸烟 COPD 组	20	0.40±0.10 ^a	13.64±0.76 ^a	5.84±0.30 ^a	5.62±0.40 ^a	20.16±2.39 ^a	45.17±6.02 ^a
	戒烟 COPD 组	29	0.73±0.15 ^a	12.40±0.59 ^a	8.01±0.72 ^a	7.28±0.59 ^a	18.72±2.01 ^a	40.25±7.03 ^a
	不吸烟 COPD 组	19	0.99±0.32 ^a	11.33±0.97 ^a	10.04±0.55 ^a	9.86±0.61 ^a	17.55±1.72 ^a	34.18±6.55 ^a
	吸烟肺功能正常组	22	1.47±0.51 ^a	10.14±0.62 ^a	11.46±0.94 ^a	12.15±1.02 ^a	13.89±2.01 ^a	28.21±6.02 ^a
	戒烟肺功能正常组	26	1.93±0.43 ^a	9.65±0.49 ^a	12.82±1.40 ^a	13.89±1.57 ^a	11.46±1.87 ^a	23.88±3.80 ^a
	不吸烟肺功能正常组	20	2.74±0.86	9.08±0.26	15.16±2.35	16.22±2.04	9.03±1.55	18.01±2.69
	F 值		76.975	164.434	162.394	255.455	111.794	72.670
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	

注:与不吸烟肺功能正常组比较,^a $P < 0.05$ 。

2.3 吸烟与肺微生物群、Treg/Th17、炎症因子的关系

吸烟与Chao指数、外周血和BAL中Treg/Th17、IL-10、IL-35呈负相关,与Simpson指数、外周血和BAL中IL-17、IL-6、IL-8呈正相关($P < 0.05$)。见表4。

2.4 肺微生物群、Treg/Th17、炎症因子之间相关性

Pearson相关性分析显示,肺微生物群多样性、Treg/Th17、炎症之间存在良好线性相关性($P < 0.05$)。见表5、6。

表4 吸烟与肺微生物群、Treg/Th17、炎症因子的关系

Table 4 Relationship between smoking and pulmonary microecological flora, Treg/Th17 and inflammatory factors

指标		吸烟	
		r 值	P 值
肺微生物群多样性	Chao 指数	-0.539	<0.001
	Simpson 指数	0.560	<0.001
外周血	Treg/Th17	-0.627	<0.001
	IL-17	0.574	<0.001
	IL-10	-0.529	<0.001
	IL-35	-0.517	<0.001
	IL-6	0.604	<0.001
	IL-8	0.592	<0.001
BAL	Treg/Th17	-0.638	<0.001
	IL-17	0.585	<0.001
	IL-10	-0.546	<0.001
	IL-35	-0.538	<0.001
	IL-6	0.613	<0.001
	IL-8	0.601	<0.001

表5 肺微生物群与 Treg/Th17、炎症因子之间相关性

Table 5 Correlation between lung microbiota and Treg / Th17, inflammatory factors

指标	Simpson 指数		Chao 指数		
	r 值	P 值	r 值	P 值	
外周血	Treg/Th17	-0.553	<0.001	0.492	0.002
	IL-17	0.514	<0.001	-0.501	0.001
	IL-10	-0.483	0.003	0.486	0.003
	IL-35	-0.504	0.001	0.478	0.005
	IL-6	0.492	0.002	-0.490	0.002
	IL-8	0.487	0.003	-0.488	0.003
BAL	Treg/Th17	-0.569	<0.001	0.514	<0.001
	IL-17	0.525	<0.001	-0.512	<0.001
	IL-10	-0.490	0.002	0.495	0.002
	IL-35	-0.510	<0.001	0.482	0.003
	IL-6	-0.503	0.001	-0.509	0.001
	IL-8	0.496	0.002	-0.499	0.002

表6 Treg/Th17 与炎症因子之间相关性

Table 6 Correlation between Treg/Th17 and inflammatory factors

指标	外周血 Treg/Th17		BAL Treg/Th17		
	r 值	P 值	r 值	P 值	
外周血	IL-17	-0.539	<0.001	-0.574	<0.001
	IL-10	0.462	0.007	0.475	0.005
	IL-35	0.449	0.010	0.453	0.008
	IL-6	-0.508	0.001	-0.521	<0.001
	IL-8	-0.492	0.002	-0.515	<0.001
BAL	IL-17	-0.584	<0.001	-0.601	<0.001
	IL-10	0.491	0.001	0.503	0.001
	IL-35	0.473	0.005	0.485	0.003
	IL-6	-0.538	<0.001	-0.540	<0.001
	IL-8	-0.524	<0.001	-0.533	<0.001

3 讨论

学者报道指出^[7],肺部菌群定植与 COPD 肺部

炎症反应、局部免疫应答等均存在一定联系。但吸烟对肺微生物群的影响及其在 COPD 发病机制中的作用鲜有报道。本研究结果显示,吸烟 COPD 患者 Simpson 指数升高,Chao 指数下降。Zhang 等^[8]研究亦发现,吸烟是影响肺微生物组变异的因素,可改变下呼吸道微生物多样性及群落结构,亦是炎症性肺疾病的重要病因。结合陈琳等^[9]观点认为上述结果可能是吸烟降低气道黏膜清除能力,微生物进入下呼吸道后定植于肺部,进一步损害黏膜纤毛清除功能,增加黏液生成量,引起肺部菌群紊乱,破坏肺部防御功能,加重气道上皮损伤,识别受体,引起宿主炎症免疫反应,最终形成恶性循环。

既往研究已证实^[10],Th17/Terg 紊乱在 COPD 发生、发展中扮演着重要角色。在 COPD 中,Th17 细胞可上调 IL-17、IL-浓度,诱导单核巨噬细胞、中性粒细胞大量聚集于肺部,提高弹性蛋白酶、金属蛋白酶等多种酶含量,加重肺组织损伤,诱发气道炎症,释放大量趋化因子与炎性介质,激发炎症级联反应,进一步加快 COPD 病情进展;Treg 可通过释放大量 IL-10、IL-35 等抗炎因子,抑制 Th17 细胞免疫活性的作用,避免过度免疫炎症反应所致组织损伤加重,发挥免疫调节作用^[11]。另有研究发现^[12],尼古丁作为香烟烟雾主要成分之一,可影响免疫监视功能,引起 T 细胞介导的免疫应答反应。同时有学者指出^[13],吸烟影响 COPD 患者肺功能康复原因可能与吸烟诱导炎性因子分泌、拮抗细胞免疫功能等因素有关。本研究结果与叶彩虹等^[14]研究结果相似,考虑机制可能在于香烟烟雾会释放尼古丁类、胺类等有害物质,导致 Th17 细胞异常增殖与活化,促使 IL-17、IL-6 水平升高,而气道炎性因子水平持续性增加,会引起气道过激炎症状态,加重气道上皮损伤,形成内源性抗原持续暴露,进而导致气道、肺组织靶向慢性炎症反应,增加 COPD 发生风险。由此推测,肺生态失调-肺免疫紊乱-炎症浸润可能是吸烟相关 COPD 的发病机制。

综上所述,肺微生物群失衡、Treg/Th17 紊乱、炎症之间相互影响可能在吸烟相关 COPD 发病机制中起着重要作用。但本研究存在一定局限性,如纳入样本量少、单中心研究,今后需扩大样本量,开展多中心研究,以进一步证实研究所得结果。

(下转第 1133 页)

7例遗传性凝血因子XI缺陷症患者基因型与临床表型分析

翁妙珊¹ 杨立业² 吴教仁¹ 章金灿¹ 袁炜嗣³ 庄丹³ 林芬^{2*}

[摘要] **目的** 分析7例遗传性凝血因子XI(FXI)缺陷症患者的基因突变类型与临床表型。**方法** 采用一期法检测患者FXI活性(FXI:C),免疫火箭电泳法检测FXI抗原(FXI:Ag)水平,并抽提患者外周血DNA,PCR扩增患者FXI基因所有的外显子及其侧翼序列,DNA直接测序进行基因分析。**结果** 在7例遗传性FXI缺陷症患者中共发现5种基因突变,包括3种无义突变(p.Lys327X、p.Tyr351X、p.Gln263X),1种移码突变(p.Leu424fsX10)和1种剪接位点突变(c.326-1G>A);除患者7为单杂合突变,FXI:C为56.7%,FXI:Ag59.2%,其余患者FXI:C和FXI:Ag均明显降低(<2%和<1%),基因型为纯合突变或复合杂合突变;患者临床出血表现轻重不一,患者1、2均有术后出血不止的表现,而患者5则无术后出血表现。**结论** 所发现的5种基因突变是导致7例遗传性FXI缺陷症患者的分子发病机制,其中p.Gln263X较常见,p.Lys327X为新发现的FXI基因突变类型,而FXI:C与患者的临床表型之间无明显相关性。

[关键词] 凝血因子XI;基因型;突变;临床表型

Analysis of genotype and clinical phenotype of 7 patients with hereditary factor XI deficiency

WENG Miaoshan¹, YANG Liye², WU Jiaoren¹, ZHANG Jincan¹, YUANWeisi³, ZHUANG Dan³, LIN Fen^{2*}

(1. Clinical laboratory, Chaozhou Central Hospital Affiliated to Southern Medical University, Chaozhou, Guangdong, China, 521000; 2. Central Laboratory, Chaozhou Central Hospital Affiliated to Southern Medical University, Chaozhou, Guangdong, China, 521000; Department of General Surgery I, Chaozhou Central Hospital Affiliated to Southern Medical University, Chaozhou, Guangdong, China, 521000)

[ABSTRACT] **Objective** To analyze the clinical phenotype and genotype of seven patients with hereditary coagulation factor XI (FXI) deficiency. **Methods** FXI activity (FXI: C) was measured by one-stage assay and the level of FXI antigen (FXI: Ag) was detected by immuno-rocket electrophoresis. The patient's peripheral blood DNA was extracted, and all exons and their flanking sequences of the FXI gene were amplified by PCR and followed by DNA sequencing. A total of 5 gene mutations were found in 7 patients with hereditary FXI deficiency, including 3 nonsense mutations (p.Lys327X, p.Tyr351X, p.Gln263X), 1 frameshift mutation (p.Leu424fsX10) and 1 splicing Site mutation (c.326 - 1G>A). Except for the patient 7 with a single heterozygous mutation (FXI: C 56.7%, FXI: Ag 59.2%), and the rest of patients had extremely low FXI: C and FXI: Ag (<2% and <1% respectively). The genotype of patients was homozygous or compound heterozygous mutation. The clinical bleeding of patients varies from severity to severity. Patients 1 and 2 have postoperative bleeding, while patient 5 has no postoperative bleeding. **Conclusion** The five gene variations found are the molecular pathogenesis of 7 patients with hereditary FXI deficiency. Among them, p.Gln263x is more common, p.Lys327x is the newly discovered FXI gene mutation type. There is no significant correlation between FXI:C and clinical phenotype.

[KEY WORDS] Coagulation factor XI deficiency; Genotype; mutation; Phenotype

基金项目:潮州市卫生健康局科研项目(2019042);潮州市科技计划项目(2019ZC18)

作者单位:1. 南方医科大学附属潮州中心医院检验科,广东,潮州 521000

2. 南方医科大学附属潮州中心医院中心实验室,广东,潮州 521000

3. 南方医科大学附属潮州中心医院普外一科,广东,潮州 521000

*通信作者:林芬, E-mail:26395868@qq.com

凝血因子 XI (coagulation factor XI, FXI), 又称为血浆凝血活酶前质, 属于丝氨酸蛋白酶原, 参与内源性凝血途径, 在正常止血过程中起重要作用^[1]。遗传性 FXI 缺陷症较为少见, 发生率约为 1/ (10⁵~10⁶), 是由 FXI 缺陷引起的。主要的临床表现为外伤或手术后出血时间延长, 较少出现自发性出血。FXI 突变基因的纯合子有出血倾向, 而杂合子一般无出血^[2]。本文就 7 例遗传性 FXI 缺陷症患者的基因型及临床表型进行分析, 以期为该类疾病的进一步研究提供参考。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取 2014 至 2020 年于本院就诊的 7 例遗传性凝血因子 FXI 缺陷症患者, 均为广东省潮州市人, 父母均无近亲结婚情况。所有患者已签署“凝血因子 XI 缺陷症家系的遗传性研究”家系调查知情告知书, 并经家系调查确诊为遗传性凝血因子 FXI 缺陷症。

患者 1: 男性, 61 岁, 2016 年 9 月因“混合痔”入住本院治疗, 患者自述因痔疮原因导致大便时有滴血症状, 本院对其采取了保守治疗, 未施行手术。2019 年 6 月患者再次入院行“痔疮手术”治疗, 手术选择局麻、外剥内扎术式、术前及术后输注新鲜冰冻血浆 (FFP) 以降低手术出血的风险。术中出血量少, 但术后患者出现两次大便后出血难止, 通过凡士林纱布局部的压迫止血, 及时输注 FFP 和氨甲环酸的抗纤溶治疗, 患者最终痊愈出院。

患者 2: 女性, 27 岁, 因“拔牙后出血难止”到本院门诊就诊, 患者自述平素月经量正常, 既往无自发出血病史, 未生育。

患者 3: 男性, 7 岁, 因“右侧腹股沟斜疝”入住本院治疗, 未施行手术。患者自述偶尔会有轻微的鼻出血症状, 但不严重, 平躺休息后出血可自行停止。

患者 4: 女性, 30 岁, 因“胃出血”入住本院治疗, 患者自述平素月经量正常, 两次顺产分娩出血量正常, 既往有慢性糜烂性胃炎和贫血病史。

患者 5: 男性, 64 岁, 因“右下颌部含牙脓肿”入住本院治疗, 本院对其采取保守治疗, 建议患者往上级医院手术诊治。患者随后于我省某医院进行了手术治疗, 据患者口述, 术中术后并未见明显出血, 而住院期间, 未进行任何血制品输注, 患者自述既往无自发出血病史。

患者 6: 男性, 50 岁, 因“痔疮”到本院门诊就诊, 未施行手术。患者自述既往无自发出血病史。

患者 7: 女性, 38 岁, 因“小腿脂肪瘤”到本院门诊就诊, 未施行手术。患者自述平素月经量正常, 已顺产生育 2 子, 既往无自发出血病史。

1.2 方法

1.2.1 凝血指标检测

采集患者外周血标本各两管, 0.109 mol/L 枸橼酸钠抗凝, 1 管用于表型检测; 另 1 管 -80℃ 冻存, 准备用于抽提 DNA, 进一步做基因检测。使用美国 ACL TOP700 全自动凝血仪对患者进行血浆凝血酶原时间 (prothrombin time, PT)、活化部分凝血活酶时间 (activated partial thromboplastin time, APTT)、APTT 纠正试验、凝血因子 VIII 活性 (FVIII:C)、凝血因子 IX 活性 (FIX:C)、凝血因子 XI 活性 (FXI:C) 和凝血因子 XII 活性 (FXII:C) 的检测, 配套试剂为美国 IL 公司产品。采用免疫火箭电泳法检测 FXI 抗原水平, Sheep Anti Human FXI Purified IgG 由加拿大 Cedarlane Laboratories Limited 公司提供。

1.2.2 基因分析方法

采用深圳亚能生物技术有限公司试剂盒, 提取基因组 DNA, 并用 PCR 法扩增 DNA。PCR 产物纯化后用 ABI3700 测序仪进行测序, 测得的结果通过网站 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> 进行序列比较, 获得患者 FXI 基因突变类型。

2 结果

2.1 凝血指标检测结果

除患者 7 的 APTT 轻度延长, FXI:C 及 FXI:Ag 轻度减低外, 其余患者的 APTT 均单独明显延长, FXI:C 均低于 2%, FXI:Ag 均低于 1%, 患者临床出血表现多样, 轻重不一; 其他凝血指标均未见明显异常。见表 1。

2.2 FXI 基因检测结果

共发现 5 种基因突变, 包括 3 种无义突变 (p.Lys327X、p.Tyr351X、p.Gln263X), 1 种移码突变 (p.Leu424fsX10) 和 1 种剪接位点突变 (c.326-1G>A); 患者 7 为单杂合突变, 同时还存在同义突变 p.249Thr>Thr, 患者 4 为纯合突变, 其余患者均为复合杂合突变。见表 1、图 1。

3 讨论

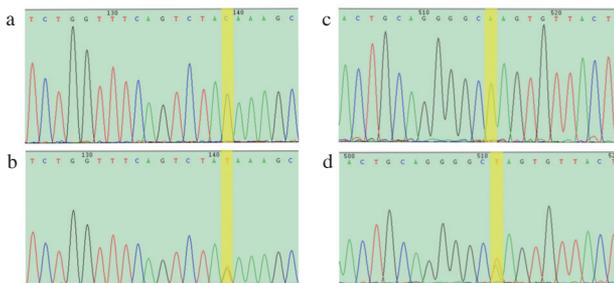
凝血因子 XI 在经典的凝血瀑布理论中作为内

表1 7例遗传性FXI缺陷症患者临床表型及基因型检测结果

Table 1 Clinical presentation and genotype results in 7 cases with factor XI deficiency

患者	实验室表型			出血表现	核苷酸改变	氨基酸改变	基因型
	APTT(s)	FXI:C(%)	FXI:Ag(%)				
1	86.0	1.7	<1	痔疮术后出血难止	c.1107C>A/c.841C>T	p.Tyr351X/p.Gln26X	复合杂合子
2	65.5	0.6	<1	拔牙后出血难止	c.841C>T/c.326-1G>A	p.Gln263X/ c.326-1G>A	复合杂合子
3	97.4	0.6	<1	偶有鼻出血	c.1107C>A/c.326-1G>A	p.Tyr351X/ c.326-1G>A	复合杂合子
4	71.3	0.7	<1	胃出血	c.841C>T/ c.841C>T	p.Gln263X/ p.Gln263X	纯合子
5	82.4	0.8	<1	无	c.1033A>T/ c.1325del T	p.Lys327X/p.Leu424CysfsX8	复合杂合子
6	101.3	0.6	<1	无	c.1107C>A /c.841C>T	p.Tyr351X/ p.Gln263X	复合杂合子
7	49.0	56.7	59.2	无	c.841C>T/c.801A>G	p.Gln263X/p.249Thr>Thr	杂合子

注: APTT 参考区间为: 20~40 s, FXI:C 参考区间为: 65~150%, FXI:Ag 参考区间为: 72.1~122.3%。



注: (a) c.841C>T 野生型; (b) c.841C>T 杂合突变; (c) c.1033A>T 野生型; (d) c.1033A>T 杂合突变。

图1 FXI 基因突变测序结果

Figure 1 Sequence results of factor FXI gene mutation

源性凝血途径中的凝血因子,起着重要的作用。修正后的瀑布学说,FXI在凝血起始阶段和凝血酶的放大途径中起桥接作用。FXI能够被凝血酶或活化的凝血因子XII通过不同的作用机制激活^[3-4],然后再活化IX,参与内源性凝血途径活化,且能够抑制纤维蛋白溶解,从而可以稳定已经形成的凝血块。

遗传性FXI缺陷症由Rosenthal等人于1953年首次报道,主要与FXI基因的突变有关,表现为常染色体不完全隐性遗传性出血性疾病。遗传性FXI缺陷症发病率存在种族差异,在犹太人和法国巴斯克地区发生率较高^[5]。编码FXI的基因位于第4号染色体长臂(4q35),含15个外显子和14个内含子。外显子1编码5'端非转录区,外显子2编码18个氨基酸的信号肽,外显子3~10编码成熟蛋白质位于氨基端4个AP结构域,外显子11~15编码羧基端结构域^[6]。截至2015年,FXI基因突变数据库(<http://factorxi.org>)共收录FXI基因突变220种,其中7个具有奠基者效应。

本研究在7例遗传性FXI缺陷症患者中发现5种基因突变,包括3种无义突变(p.Lys327X、p.Tyr351X、p.Gln263X),1种移码突变(p.Leu424fsX10)和1种剪接位点突变(c.326-1G>A),同时在患者7还发现

c.801A>G导致的同义突变p.249Thr>Thr,其中,p.Lys327X为新发现的FXI基因突变类型。除患者7为单杂合突变、患者2为纯合突变外,其余患者均为复合杂合突变。有5位患者均存在p.Gln263X,推测其可能为导致本地区FXI缺陷症的常见突变类型,Shao YY等^[7]的研究也提出p.Gln263X可能为中国人人群中遗传性FXI缺陷症的突变热点。另外,患者1与患者6的基因型完全一样,两者并无血缘关系,来自潮州两个不同的城镇。

本文作者曾对患者1、3、4、5的家系调查进行报道,并对其分子发病机制进行了分析^[8]。Gln263位于重链区AP3区域,Lys327及Tyr351位于重链区AP4区域,3种无义突变(p.Gln263X、p.Lys327X、p.Tyr351X)导致结构域的不完整性和截短型蛋白的不稳定性可能是患者FXI活性和抗原下降的原因。在外显子3'端与内含子5'端的高度保守的8个核苷酸与内含子3'端和外显子5'端的另外4个保守的核苷酸发生的突变,可能会影响mRNA的正确剪切^[9]。有2例患者均存在剪接位点突变(c.326-1G>A),即4号内含子与5号外显子交界处存在G>A杂合突变,导致内含子4不能被正确剪切,由于异常剪切的mRNA不能进入细胞浆,或是异常的剪切产物高度不稳定,可能是血浆FXI活性和抗原下降的原因。

凝血因子XI缺陷症患者一般无自发性出血,即使有出血症状,也多不严重,其出血常与创伤及手术相关,由于FXI:C的血浆水平与出血发生率及出血程度间无明显相关性,使该疾病的诊断和治疗存在多变性^[6]。FXI缺陷症患者的出血与基因突变类型关系不大,但是与损伤部位的纤维蛋白溶解活性有关。与损伤部位较低的纤溶活性(1.5%~40%)相比,较高的纤溶活性(49%~67%)会增加出血的风险^[10]。FXI缺陷症出血的症状还与所累及的组织有关。患者出血多发生于粘膜,如

鼻出血、血尿、月经过多等。如患者进行与粘膜表面相关的手术,如口腔、鼻腔和泌尿系统等部位的手术,则其发生出血的概率较高,且较严重^[11]。

目前实验室传统的检测方法还不能有效的预测 FXI 缺陷症患者的出血风险。研究表明,在富含血小板血浆中测量凝血酶的生成有可能成为预测 FXI 缺陷症患者出血风险的有效方法^[12]。新近的研究发现,相对于不易出血患者,易出血患者具有更低的纤维蛋白网络密度和血块稳定性,即是通过血浆蛋白的结构与稳定性分析能够区分出易出血患者^[13]。总之,遗传性 FXI 缺陷症患者 FXI 活性水平与患者的临床表型间并无明显相关性,因而需要个体化的治疗。

参考文献

- [1] Emsley J, McEwan PA, Gailani D. Structure and function of factor XI[J]. *Blood*, 2010, 115(13):2569-2577.
- [2] 彭黎明, 邓承祺. 现代血栓与止血的实验室检测及其应用[M]. 北京:人民卫生出版社, 2004:114-116.
- [3] Kravtsov DV, Matafonov A, Tucker EI, et al. Factor XI contributes to thrombin generation in the absence of Factor XII[J]. *Blood*, 2009, 114,(2):452-458.
- [4] Geng Y, Verhamme IM, Smith SB, et al. The dimeric structure of factor XI and zymogen activation[J]. *Blood*, 2013, 121,(19):3962-3969.
- [5] Souabni L, Meddeb N, Ajlani H, et al. Hemarthrosis revealing congenital factor XI deficiency[J]. *Joint Bone Spine*, 2008, 75(3):348-349.
- [6] 董雷鸣, 王学峰, 王鸿利. 凝血因子 XI 缺陷症的研究进展[J]. *诊断学理论与实践*, 2009, 8(4):431-434.
- [7] SHAO YY, CAO YN, LU YL, et al. Clinical manifestations and mutation spectrum of 57 subjects with congenital factor XI deficiency in China[J]. *Blood Cells Mol Dis*, 2016, 58:29-34.
- [8] LIN F, WENG MS, WU JR, et al. Gene Variants in Four Pedigrees With Hereditary Coagulation Factor XI Deficiency and One Novel Mutation Identification[J]. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 2020, 31(2):160-164.
- [9] 谢爽, 王鸿利, 王学峰, 等. 凝血因子 XI 基因内含子区受体位点突变导致的遗传性凝血因子 XI 缺陷症[J]. *中华血液学杂志*, 2005, 26(3):144-147.
- [10] Kravtsov DV, Wu W, Meijers JC, et al. Dominant factor XI deficiency caused by mutations in the factor XI catalytic domain[J]. *Blood*, 2004, 104(1):128-134.
- [11] Zivelin A, Bauduer F, Ducout L, et al. Factor XI deficiency in French Basques is caused predominantly by an ancestral Cys38Arg mutation in the factor XI gene[J]. *Blood*, 2002, 99(7):2448-2454.
- [12] Rugeri L, Quelin F, Chatard B, et al. Thrombin generation in patients with factor XI deficiency and clinical bleeding risk[J]. *Haemophilia*, 2010, 16(5):771-777.
- [13] Zucker M, Seligsohn U, Salomon O, et al. Abnormal plasma clot structure and stability distinguish bleeding riskin patients with severe factor XI deficiency[J]. *J Thromb Haemost*, 2014, 12(7):1121-1130.

(上接第 1129 页)

参考文献

- [1] 杜璐玲, 高晓红, 吴银婵, 等. 潮州地区稳定期慢性阻塞性肺病患者肺康复的临床研究[J]. *中华生物医学工程杂志*, 2019, 25(5):599-604.
- [2] Zha Z, Leng R, Xu W, et al. Prevalence and risk factors of chronic obstructive pulmonary disease in Anhui Province, China: a population-based survey[J]. *BMC Pulm Med*, 2019, 19(1):102.
- [3] 党如意, 赵晨阳, 樊兴, 等. 香烟烟雾暴露对正常小鼠下呼吸道菌群分布的影响[J]. *山东医药*, 2018, 58(20):9-12.
- [4] Cervilha DAB, Ito JT, Lourenço JD, et al. The Th17/Treg Cytokine Imbalance in Chronic Obstructive Pulmonary Disease Exacerbation in an Animal Model of Cigarette Smoke Exposure and Lipopolysaccharide Challenge Association[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1):1921.
- [5] 中华医学会呼吸病学分会慢性阻塞性肺疾病学组. 慢性阻塞性肺疾病诊治指南(2013年修订版)[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2013, 36(4):255-264.
- [6] 冯家华, 温泳涛, 谢衬梨, 等. 吸烟对慢性阻塞性肺病患者血清淋巴亚群的影响[J]. *临床医学*, 2019, 39(1):15-16.
- [7] 齐玉晶, 何志义. 气道微生态在慢性阻塞性肺疾病中的研究进展[J]. *中国实用内科杂志*, 2019, 39(8):728-730.
- [8] Zhang R, Chen L, Cao L, et al. Effects of smoking on the lower respiratory tract microbiome in mice[J]. *Respir Res*, 2018, 19(1):253.
- [9] 陈琳, 周红. 肺部微生态在慢性阻塞性肺疾病中的研究进展[J]. *国际呼吸杂志*, 2020, 40(2):137-140.
- [10] 金松, 吴小军. 慢性阻塞性肺病患者外周血 Th17 和 Treg 细胞的表达及意义[J]. *武汉大学学报(医学版)*, 2018, 39(6):961-965.
- [11] 姜敏, 徐丹, 田戈, 等. 慢性阻塞性肺病患者外周血中 Th17/Treg 和内皮微粒关系的研究[J]. *国际呼吸杂志*, 2018, 38(2):109-113.
- [12] 张喆, 胡晶红, 姚成芳, 等. 阿胶、黄明胶对被动吸烟小鼠肺脏 Th17/Treg 细胞亚群分化及相关细胞因子表达的影响差异[J]. *中国免疫学杂志*, 2019, 35(01):35-40.
- [13] 徐海峰, 孙异锋, 林欢. 吸烟对慢性阻塞性肺病患者相关免疫炎症反应及肺功能的影响[J]. *临床肺科杂志*, 2020, 25(1):58-61.
- [14] 叶彩虹, 王辉, 陈斯亮, 等. 吸烟对稳定期 COPD 患者 Th17/Treg 细胞表达的影响及其与血清炎症因子的相关性分析[J]. *中国实用医药*, 2020, 15(15):10-13.

急性脑梗死患者外周血 miR-497-5p 表达的变化及临床意义

王娜 刘敏 傅美丽*

[摘要] **目的** 研究急性脑梗死患者外周血 miR-497-5p 表达与炎症因子、氧化应激产物释放及 90 d 预后的关系。**方法** 选择 2018 年 4 月至 2020 年 4 月期间本院收治的 132 例急性脑梗死患者作为急性脑梗死组、体检的 106 例健康志愿者作为对照组,检测外周血 miR-497-5p 的表达水平及血清炎症因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、氧化应激产物 MDA、AOPP、8-OHdG 的含量,随访急性脑梗死患者 90 d 预后。**结果** 急性脑梗死组患者外周血 miR-497-5p 的表达水平高于对照组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);急性脑梗死组中 miR-497-5p 高表达患者的血清 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、MDA、AOPP、8-OHdG 的含量高于 miR-497-5p 低表达患者,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);急性脑梗死组中 90d 预后良好患者外周血中 miR-497-5p 的表达水平低于预后不良患者,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。且外周血 miR-497-5p 的表达水平对急性脑梗死患者的预后具有预测价值。**结论** 急性脑梗死患者外周血 miR-497-5p 的异常高表达与炎症因子、氧化应激产物释放增多及 90d 预后不良有关。

[关键词] 急性脑梗死; miR-497-5p; 炎症反应; 氧化应激

Changes and clinical significance of miR-497-5p expression in peripheral blood of patients with acute cerebral infarction

WANG Na, LIU Min, FU Meili*

(Department of Clinical Laboratory, Dong Hai County People's Hospital, Lianyungang, Jiangsu, China, 222300)

[ABSTRACT] **Objective** To study the relationship between the expression of miR-497-5p in peripheral blood of patients with acute cerebral infarction and the release of inflammatory factors, oxidative stress products and the prognosis of 90 days. **Methods** 132 cases of patients with acute cerebral infarction in our hospital from April 2018 to April 2020 were selected as the acute cerebral infarction group and 106 cases of healthy volunteers were selected as the control group. The expression level of miR-497-5p in peripheral blood and the contents of serum inflammatory factors IL-1 β , IL-6, TNF- α , oxidative stress products MDA, AOPP and 8-OHdG were detected. The prognosis of patients with acute cerebral infarction was followed up for 90 days. **Results** The expression level of miR-497-5p in peripheral blood of patients in the acute cerebral infarction group was higher than that in the control group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). the levels of serum IL-1 β , IL-6, TNF- α , MDA, AOPP and 8-OHdG in patients with high miR-497-5p expression in acute cerebral infarction group were higher than those in patients with low miR-497-5p expression, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). In the acute cerebral infarction group, the expression level of miR-497-5p in the peripheral blood of patients with good prognosis at the day of 90 was lower than that of patients with poor prognosis, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The expression level of miR-497-5p in peripheral blood had predictive value for the prognosis of patients with acute cerebral infarction. **Conclusion** The abnormally high expression of miR-497-5p in peripheral blood of patients with acute cerebral infarction is related to the increased release of inflammatory factors, oxidative stress products and poor prognosis at 90 days.

[KEY WORDS] Acute cerebral infarction; miR-497-5p; Inflammatory response; Oxidative stress

作者单位:东海县人民医院检验科,江苏,连云港 222300,

*通信作者:傅美丽, E-mail:17757863@qq.com

急性脑梗死(Acute cerebral infarction, ACI)是我国常见的心脑血管疾病之一,具有发病率高、致残率高、复发率高的特点。颅内动脉闭塞后脑组织发生缺血缺氧损害是急性脑梗死基本的病理生理特征,在缺血缺氧过程中炎症反应、氧化应激反应的激活会加重神经功能损害^[1-2]。近些年,越来越多的学者以炎症反应、氧化应激反应为切入点研究急性脑梗死的发病机制。微小RNA(microRNA, miR)是一组不具备转录功能的小分子RNA,广泛表达于全身多个组织且发挥多样的生物学作用。有动物实验发现,大鼠大脑中动脉闭塞后 miR-497-5p 的表达显著增加,抑制 miR-497-5p 能够减轻大脑中动脉闭塞小鼠神经功能的损害,同时也改善炎症反应和氧化应激反应^[3]。但 miR-497-5p 在急性脑梗死发病中与炎症反应、氧化应激及的关系尚缺乏足够的临床证据。因此,本研究将以急性脑梗死患者为对象,探究外周血 miR-497-5p 表达与炎症因子、氧化应激产物释放及 90 d 预后的关系,旨在阐明 miR-497-5p 在急性脑梗死发病中的作用及可能机制。

1 对象与方法

1.1 研究对象

选择 2018 年 4 月至 2020 年 4 月期间本院收治的急性脑梗死患者作为急性脑梗死组,入组标准:①符合指南中急性脑梗死的诊断标准^[4];②发病至入院时间<6 d,未接受过溶栓或介入治疗;③临床资料及样本完整。排除标准:①既往有脑梗死、心肌梗死、脑外伤病史;②合并恶性肿瘤、急慢性感染。另取同期体检的健康志愿者作为对照组。急性脑梗死组共 132 例,包括男性 78 例、女性 54 例,年龄平均(59.39±10.92)岁;对照组共 106 例,包括男性 67 例、女性 39 例,年龄平均(57.51±11.34)岁。两组间一般资料比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。本研究取得医院伦理委员会批准,取得研究对象知情同意。

1.2 研究方法

1.2.1 外周血 miR-497-5p 表达水平的检测

急性脑梗死组患者入院后 24 h 内取外周静脉血 1~3 mL,对照组志愿者体检时取外周静脉血 1~3 mL,采用试剂盒(北京天根生化公司、批号 DP433)提取外周血中的 miR,将 miR 反转录为相应的 cDNA 后进行荧光定量 PCR 反应,反应所用引物为目的基因 miR-497-5p 的特异性引物及内参

基因 U6 的特异性引物,在荧光定量 PCR 仪(美国 Bio-rad 公司,型号:CFX96)上完成 PCR 反应后得到反应曲线,根据曲线对应的循环阈值、以 U6 为内参计算 miR-497-5p 的表达水平。计算急性脑梗死组患者外周血 miR-497-5p 表达水平的中位数,表达水平 \geq 中位数为高表达、 $<$ 中位数为低表达。

1.2.2 血清炎症因子及氧化应激产物的检测

急性脑梗死组患者入院后 24 h 内取外周静脉血 3~5 mL,对照组志愿者体检时取外周静脉血 3~5 mL,静置 30 min 后 3 000 r/min 离心 10 min,分离上层血清后采用试剂盒(上海西唐公司)检测白介素(interleukin, IL)-1 β 、IL-6、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、丙二醛(Malondialdehyde, MDA)、晚期蛋白氧化产物(advanced oxidation protein products, AOPP)、8-羟基脱氧鸟苷酸(8-hydroxy-2 deoxyguanosine, 8-OHdG)的含量,按照试剂盒说明书进行操作。

1.2.3 90 d 预后的评估

急性脑梗死发病后第 90 d 时,采用门诊复查或电话回访的方式进行随访,根据改良 Rankin 量表(Modified Rankin Scale, mRS)评分评价预后,mRS 评分 >2 分为预后不良、mRS 评分 ≤ 2 分为预后良好。

1.2.4 观察指标

两组患者外周血 miR-497-5p 表达水平,血清 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、MDA、AOPP、8-OHdG 的含量,预后情况。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件及 Prism6.0 软件进行统计学分析;计量资料以下($\bar{x}\pm s$)表示,两组间比较采用 t 检验;miR-497-5p 预测预后采用 ROC 曲线分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 急性脑梗死组与对照组外周血 miR-497-5p 表达水平的比较

急性脑梗死组(1.30±0.42)患者外周血中 miR-497-5p 的表达水平高于与对照组(1.00±0.26),差异有统计学意义($t=6.430, P<0.05$)。

2.2 急性脑梗死组中 miR-497-5p 低表达与高表达患者血清炎症因子的比较

急性脑梗死组中 miR-497-5p 高表达患者的血清 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的含量与 miR-497-5p 低表达患者比较升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

表1 急性脑梗死组中 miR-497-5p 低表达与高表达患者血清炎症因子的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of serum inflammatory factors between patients with low and high expression of miR-497-5p in acute cerebral infarction group ($\bar{x} \pm s$)

miR-497-5p 表达	n	IL-1 β (ng/mL)	IL-6(pg/mL)	TNF- α (ng/mL)
高表达	66	2.15 \pm 0.62	5.87 \pm 1.04	22.93 \pm 7.68
低表达	66	1.77 \pm 0.45	4.95 \pm 0.83	19.47 \pm 5.23
t 值		4.030	5.617	3.025
P 值		0.000	0.000	0.003

2.3 急性脑梗死组中 miR-497-5p 低表达与高表达患者血清氧化应激产物的比较

急性脑梗死组中 miR-497-5p 高表达患者的血清 MDA、AOPP、8-OHdG 的含量与 miR-497-5p 低表达患者比较明显升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。

表2 急性脑梗死组中 miR-497-5p 低表达与高表达患者血清氧化应激产物的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of serum oxidative stress products between patients with low and high expression of miR-497-5p in acute cerebral infarction group ($\bar{x} \pm s$)

miR-497-5p 表达	n	MDA (μ mol/L)	AOPP (μ mol/L)	8-OHdG (ng/mL)
高表达	66	12.58 \pm 3.62	69.39 \pm 13.27	0.84 \pm 0.20
低表达	66	10.77 \pm 3.11	62.37 \pm 10.25	0.73 \pm 0.16
t 值		3.081	3.401	3.490
P 值		0.003	0.001	0.001

2.4 急性脑梗死组中 90 d 预后良好与预后不良患者 miR-497-5p 表达水平的比较

急性脑梗死组中 90 d 预后良好患者外周血中 miR-497-5p 的表达水平与预后不良患者比较明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 3。

表3 急性脑梗死组中 90 d 预后良好与预后不良患者 miR-497-5p 表达水平的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of miR-497-5p expression levels between patients with good and poor 90 day prognosis in acute cerebral infarction group ($\bar{x} \pm s$)

90 d 预后	n	miR-497-5p
预后良好	75	1.06 \pm 0.26
预后不良	57	1.61 \pm 0.40
t 值		9.551
P 值		0.000

2.5 miR-497-5p 预测急性脑梗死患者 90 d 预后的 ROC 曲线分析

外周血 miR-497-5p 表达水平预测急性脑梗死患者 90 d 预后的 ROC 曲线见图 1, AUC 为 0.893,

95% CI 为: 0.834~0.951。根据约登指数最大值确定外周血 miR-497-5p 表达水平预测急性脑梗死患者 90 d 预后的最佳截断值为 1.136, 该截断值预测预后的灵敏度为 86.67%、特异性为 80.70%。见图 1。

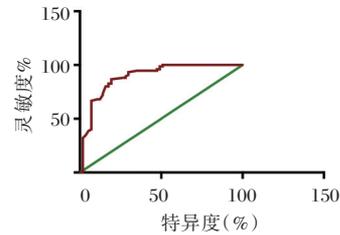


图1 miR-497-5p 预测急性脑梗死患者 90 d 预后的 ROC 曲线
Figure 1 ROC curve of miR-497-5p in predicting 90 day prognosis of patients with acute cerebral infarction

3 讨论

急性脑梗死的发病涉及复杂的病理生理机制, 颅内动脉血栓栓塞或血栓形成后脑组织发生缺血缺氧损害是基本的病理生理特征, 在缺血缺氧基础上发生的炎症反应和氧化应激反应是造成神经功能继发性损害的重要因素, 神经功能持续发生损害导致疾病的治疗难度增加、致残率升高^[5-7]。因此, 研究在急性脑梗死发病过程中炎症反应及氧化应激的关键调控分子不仅有助于发现疾病新的治疗靶点, 也有助于发现病情早期评估及预测的标志物。

本研究以 miR-497-5p 为切入点进行了急性脑梗死炎症反应、氧化应激反应及预后的评估。MiR-497-5p 是近些年受到越来越多关注的一种 miR。Chen X^[3]的动物实验证实, 大鼠中动脉闭塞大鼠的缺血脑组织中 miR-497-5p 的表达水平增加, 抑制 miR-497-5p 的表达具有神经保护作用; 闫海清^[8]的细胞实验证实, 缺氧复氧的神经元中 miR-497-5p 的表达水平增加, 抑制 miR-497-5p 的表达明显改善缺氧复氧诱导的神经元凋亡。以上动物及细胞实验提示缺血缺氧能够刺激 miR-497-5p 表达增加, 高表达的 miR-497-5p 又介导了神经损害。在此基础上, 本研究分析发现急性脑梗死患者外周血中 miR-497-5p 的表达水平高于对照组, 表明急性脑梗死发病过程中存在 miR-497-5p 的异常高表达, 与既往动物实验和细胞实验中关于 miR-497-5p 表达变化的报道一致。

MiR 虽然具备编码功能, 但能通过调控下游靶基因表达的方式发挥相应的生物学效应。在急

性脑梗死的发病过程中,多种 miR 靶向调控炎症反应和氧化应激反应^[9-10]。根据闫海清的细胞, miR-497-5p 在缺氧复氧的神经元中靶向抑制 AKT3 的表达,进而使炎症因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 及氧自由基释放增多,氧自由基可引起脂质、蛋白质、核酸发生过氧化并生成 MDA、AOPP、8-OHdG^[8]。已有研究报道,急性脑梗死患者血清中炎症因子及氧化应激产物的含量明显增加^[11-14]。本研究分析了 miR-497-5p 表达与炎症因子及氧化应激产物的关系,随着急性脑梗死患者外周血 miR-497-5p 表达水平的增加,血清中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、MDA、AOPP、8-OHdG 的含量也呈升高趋势,表明急性脑梗死发病过程中 miR-497-5p 的异常高表达对炎症反应及氧化应激反应具有促进作用。

炎症反应和氧化应激反应在急性脑梗死发生后的病情转归中起重要作用,多项研究证实炎症及氧化应激指标对急性脑梗死的预后具有评估价值^[15-18]。本研究已经证实急性脑梗死患者 miR-497-5p 与炎症反应、氧化应激反应的关系,进一步随访患者 90d 预后并分析其与 miR-497-5p 的关系可知:预后良好患者的外周血 miR-497-5p 表达水平低于预后不良患者且 miR-497-5p 对 90d 预后具有预测价值,表明急性脑梗死发病后 miR-497-5p 的异常高表达与预后不良有关。

综上所述,急性脑梗死患者外周血 miR-497-5p 的异常高表达与炎症因子、氧化应激产物释放增多及 90 d 预后不良有关,未来 miR-497-5p 有望成为研究急性脑梗死发病机制及治疗靶点的目标分子,也可作为急性脑梗死病情及预后评估的标志物。

参考文献

- [1] Moussaddy A, Demchuk AM, Hill MD. Thrombolytic therapies for ischemic stroke: Triumphs and future challenges [J]. *Neuropharmacology*, 2018, 134(Pt B): 272-279.
- [2] Sarkar S, Chakraborty D, Bhowmik A, et al. Cerebral ischemic stroke: cellular fate and therapeutic opportunities [J]. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2019, 1(24): 435-450.
- [3] Chen X, Lin S, Gu L, et al. Inhibition of miR-497 improves functional outcome after ischemic stroke by enhancing neuronal autophagy in young and aged rats [J]. *Neurochem Int*, 2019, 127:64-72.
- [4] 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.
- [5] Pawluk H, Woźniak A, Grześk G, et al. The Role of Selected Pro-Inflammatory Cytokines in Pathogenesis of Ischemic Stroke [J]. *Clin Interv Aging*, 2020, 23(15):469-484.
- [6] Zhao Y, Xu J, Sanggenon C. Ameliorates Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury by Inhibiting Inflammation and Oxidative Stress through Regulating RhoA-ROCK Signaling [J]. *Inflammation*, 2020, 43(4):1476-1487.
- [7] Qiu Y, Yin Q, Fei Y, et al. JLX001 Modulated the Inflammatory Reaction and Oxidative Stress in pMCAO Rats via Inhibiting the TLR2/4-NF-kappaB Signaling Pathway [J]. *Neurochem Res*, 2019, 44(8):1924-1938.
- [8] 闫海清, 岳学静, 贵永堃, 等. miR-497-5p 靶向 AKT3 对缺血/再灌注损伤诱导的神经细胞氧化应激和炎症反应的影响 [J]. *免疫学杂志*, 2019, 35(11):927-933.
- [9] Li WA, Efendizade A, Ding Y. The role of microRNA in neuronal inflammation and survival in the post ischemic brain: a review [J]. *Neurol Res*, 2017, 27:1-9.
- [10] Cao W, Zhang T, Wang L, et al. Diagnostic performance of circulating MicroRNAs in acute ischemic stroke: A protocol for systematic review and meta-analysis [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2020, 99(40):e22353.
- [11] 秦慧兵, 张保朝, 张小林, 等. 血清 MCP-1、HMGB1、APN、oxLDL 水平与老年脑梗死病情及颈动脉粥样硬化关系 [J]. *华南预防医学*, 2020, 46(1):72-75.
- [12] 刘磊, 董海, 何仲春, 等. 大面积脑梗死患者外周血 Th1、Th2、Th17、Treg 细胞水平变化及意义 [J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2020, 12(11):1527-1530.
- [13] Huang TF, Tang ZP, Wang S, et al. Decrease in Serum Levels of Adiponectin and Increase in 8-OHdG: a Culprit for Cognitive Impairment in the Elderly Patients with Type 2 Diabetes [J]. *Curr Mol Med*, 2019, 20(1):44-50.
- [14] Zhu H, Zhao T, Liu J. Role of Paraoxonase 1 Activity and Oxidative/Antioxidative Stress Markers in Patients with Acute Cerebral Infarction [J]. *Clin Lab*, 2018, 64(6):1049-1053.
- [15] Sun G, Yang Y, Chen Z, et al. Neutrophil to Lymphocyte Ratio Predicts Outcome of Stroke by Cervicocranial Arterial Dissection [J]. *Front Med (Lausanne)*, 2020, 27(7): 598055.
- [16] Chen Z, He Y, Su Y, et al. Association of inflammatory and platelet volume markers with clinical outcome in patients with anterior circulation ischaemic stroke after endovascular thrombectomy [J]. *Neurol Res*, 2021, 5:1-8.
- [17] Chung D, Lee KO, Choi JW, et al. Blood Neutrophil/Lymphocyte Ratio Is Associated With Cerebral Large-Artery Atherosclerosis but Not With Cerebral Small-Vessel Disease [J]. *Front Neurol*, 2020, 9(11):1022.
- [18] Aguiar de Sousa D, Pereira-Santos MC, Serra-Caetano A, et al. Blood biomarkers associated with inflammation predict poor prognosis in cerebral venous thrombosis: a multicenter prospective observational study [J]. *Eur J Neurol*, 2021, 28(1):202-208.

上消化道癌术前胃镜活检、CA199检测与ESD术后病理结果比较

张世栋^{1*} 王菲²

【摘要】目的 探讨上消化道癌术前胃镜活检、糖类抗原199(CA199)检测与内镜黏膜下剥离术(ESD)术后病理结果比较。**方法** 选取2016年1月至2019年1月本院收治的94例经胃镜活检确诊为上消化道早癌及癌前病变患者,均检测CA199水平,接受ESD治疗,观察病变部位及范围,并分析ESD治疗疗效,将ESD术后病理结果与术前胃镜活检结果进行比较。**结果** 食管病灶53例,以食管中段病灶检出率最高,为32.98%;胃部病灶41例,以贲门病灶检出率最高,为19.15%。术前胃镜活检炎症检出率高于术后病理检查,HGIN检出率低于术后病理检查,差异均有统计学意义($P<0.05$);以术后病理检查为标准,四者CA199水平比较:炎症<LGIN<HGIN<早癌,差异具有统计学意义($P<0.05$)。94例患者中,并发症总发生率为9.57%,1例发生急性术中出血、2例发生迟发性消化道出血、4例发热、2例出现胸腔积液,在予以对症治疗后,上述症状得以控制。有5例患者复发,复发率5.32%,其中3例患者行第2次ESD治疗,1例患者因病变区域瘢痕化严重,行手术治疗。**结论** ESD治疗上消化道早癌及癌前病变安全性及有效率高,可提高病理诊断准确率,早癌患者CA199水平最高,可帮助临床精确评估患者病情。

【关键词】 上消化道早癌;癌前病变;ESD

Comparison between preoperative gastroscopic biopsy of early upper gastrointestinal cancer, CA199 detection and the pathological results after ESD

ZHANG Shidong^{1*}, WANG Fei²

(1. Department of Digestive System, Anqing Municipal Hospital Affiliated to Anhui Medical University, Anqing, Anhui, China, 246003; 2. Department of Pathology, Anqing Municipal Hospital Affiliated to Anhui Medical University, Anqing, Anhui, China, 246003)

【ABSTRACT】 **Objective** To explore the comparison of pathological results after gastroscopy biopsy, carbohydrate antigen 199 (CA199) detection and endoscopic submucosal dissection (ESD) before upper gastrointestinal cancer surgery. **Methods** A total of 94 patients with early gastrointestinal cancer and precancerous lesions of the upper gastrointestinal tract diagnosed by gastroscopy and biopsy were selected from January 2016 to January 2019. They were treated with ESD. The location and scope of the lesions were observed, and the curative effect of ESD treatment was analyzed. The postoperative pathological results of ESD were compared with the results of the preoperative gastroscopic biopsy. **Results** There were 53 cases of esophageal lesions, with the highest detection rate of lesions in the middle part of the esophagus, which was 32.98%. Among 41 cases of gastric lesions, the detection rate of cardia lesions was the highest at 19.15%. The detection rate of inflammation in preoperative gastroscopy biopsy was higher than that in postoperative pathological examination, and the detection rate of HGIN was lower than that in postoperative pathological examination. The differences were statistically significant ($P<0.05$). Postoperative pathological examination as

基金项目:安徽省自然科学基金(1708085MH153)

作者单位:1. 安徽医科大学附属安庆市立医院消化内科,安徽,安庆 246003

2. 安徽医科大学附属安庆市立医院病理科,安徽,安庆 246003

*通信作者:张世栋, E-mail: zsd20212021@163.com

the standard, the CA199 levels of the four diseases were compared: inflammation < LGIN < HGIN < early cancer, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Among 94 patients, the overall incidence of complications was 9.57%. Acute intraoperative bleeding occurred in 1 case, delayed gastrointestinal bleeding in 2 cases, fever in 4 cases, and pleural effusion in 2 cases. After symptomatic treatment, the above symptoms were controlled. There were 5 patients who relapsed, with a recurrence rate of 5.32%. Among them, 3 patients received the second ESD treatment, and 1 patient received surgery because of severe scarring in the lesion area.

Conclusion ESD treatment of upper gastrointestinal early cancer and precancerous lesions is safe and effective and can improve the accuracy of pathological diagnosis. Early cancer patients have the highest CA199 level, which can help clinically accurately evaluate the patient's condition.

[KEY WORDS] Early upper gastrointestinal cancer; Precancerous lesions; ESD

随着内镜技术的飞速发展及应用,内镜黏膜下剥离术(Endoscopic submucosal dissection, ESD)对上消化道的早癌及癌前病变的诊断率逐渐提高。ESD可使早期病变得完整切除,同时具有创面小、安全性高、预后好等优点,逐渐被广大内外科医生及患者所青睐^[1]。相关文献报道,ESD治疗可以阻断上消化道恶性肿瘤发生、进展,因此经过ESD治疗的早癌患者5年生存率较高,接近90.00%,最大程度地延长了上消化道早癌患者的生存期^[2-3]。近年来,关于ESD治疗上消化道早癌及癌前病变的相关研究较多,有学者指出,术前胃镜活检结果及ESD术后病理结果常存在一定差异^[4-5]。本研究旨在探讨ESD治疗上消化道早癌及癌前病变的临床效果,并将ESD术后病理与糖类抗原199(Carbohydrate antigen-199、CA199)检测、术前胃镜活检结果进行比较。现将研究结果整理报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2016年1月至2019年1月本院收治的94例经胃镜活检确诊为上消化道早癌及癌前病变患者。其中男63例,女31例;平均年龄(48.65 ± 4.78)岁;平均病程(0.58 ± 0.22)年。本研究经医院医学伦理委员会批准通过,受试者均签署知情同意书。纳入标准:①均存在进食哽噎感或吞咽不利感、上腹胀痛、胸骨后及剑突下不适、反酸烧心等症状,电子胃肠镜及组织病理确诊为上消化道早癌或癌前病变^[6]。②口腔、食管、胃等部位无既往手术史、无神经系统疾病。③超声内镜检查提示病变位于黏膜层及黏膜下层浅层,固有肌层未受侵。④所有患者在入院1周内完成ESD治疗。排除标准:①术前未完善血常规、凝血功能等常规检查者,及检查结果提示异常者。②胸和腹部CT平扫加增

强检查提示,合并淋巴结转移者。③纳入研究前2周内,服用过阿司匹林、氯吡格雷等解热镇痛药物及抗凝剂,或影响激素水平药物的患者。④治疗依从性不佳者、阿尔兹海默症者。

1.2 方法

94例患者于入院48h内采取空腹静脉血3mL,以4000 r/min离心10 min,分离血清,以枸橼酸盐抗凝血标本,存储于-70℃的冰箱冷冻待测。采用酶联免疫吸附法检测CA199水平。试剂盒购自贝克曼库尔特商务(中国)有限公司,具体操作步骤参见试剂盒说明书。

1.3 观察指标

1.3.1 治疗疗效判定标准

整块切除为病灶在内镜下一次性整块切除,获得单块标本;完全切除为病灶整块切除且标本边缘和基底部均未见异型肿瘤细胞;治愈性切除为达到完全切除且无淋巴结转^[7]。

1.3.2 病理诊断标准

早癌及癌前病变分为^[8]:低级别上皮内瘤变(Low-grade intraepithelial neoplasia, LGIN):轻度、中度不典型增生;高级别上皮内瘤变(High grade intraepithelial neoplasia, HGIN):重度不典型增生和原位癌。

1.3.3 随访

对94例患者随访2年,随访截止时间2021年1月。要求所有患者术后定期复查胃镜,详细记录术后3、6、12及24个月复发情况。复发标准^[9]:治疗后的部位出现损害,通过病理检查确定是否出现复发。复发者予以外科手术切除,并在术后间隔3个月进行下一次随访。

1.3.4 并发症

详细观察并记录所有患者ESD治疗中及治疗后并发症发生情况。术后并发症包括:急性术中

出血、迟发性出血、发热、胸腔积液等^[10]。

1.4 统计学方法

采用SPSS 22.0软件进行统计分析,计量资料采用 $(\bar{x}\pm s)$ 表示,采用 t 检验;计数资料采用 $n(\%)$ 表示,采用 χ^2 检验;以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

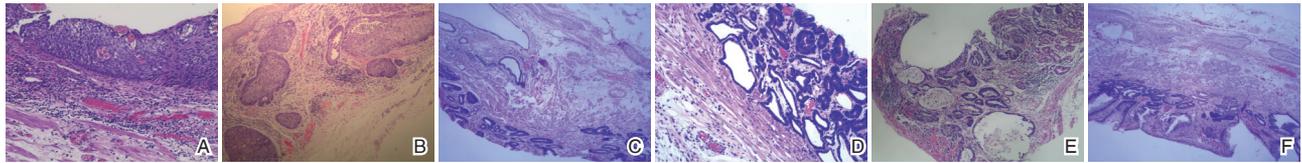
2.1 发病部位及病变范围

根据病变范围,可分为:食管病灶53例;其中食管上段9例(9.57%)、中段31例(32.98%)、下段13例(13.83%),共切除病灶59个,其中50例患者为单发病灶,3例患者为多发病灶。胃部病灶41例;其中贲门18例(19.15%)、胃体10例(10.64%)、

胃角6例(6.68%)、胃窦7例(7.45%),共切除病灶45个,其中有39例患者为单发病灶,2例患者为多发病灶。上述患者中,病变最大径为8.3 cm,范围0.6~8.3 cm。

2.2 术后病理结果

术后病理显示:HGIN 45例、LGIN 26例,早癌4例,炎症或腺瘤样改变19例。整块切除率100.00%(94/94),完整切除率95.74%(90/94),治愈性切除率95.74%(90/94)。59个食管病灶中,有2个病灶边缘或基底为阳性,病灶边缘/基底阳性率3.39%(2/59);45个胃部病灶中,有2个病灶边缘或基底为阳性,病灶边缘/基底阳性率4.44%(2/45)。见图1。



注:A为食管鳞状上皮HGIN;B为食管早期鳞状细胞癌;C为胃LGIN;D为胃高分化腺癌;E为胃HGIN;F为胃腺体LGIN。

图1 免疫组化染色图(SP, ×500)

Figure 1 immunohistochemical stain (SP, ×500)

2.3 术后病理及术前胃镜活检结果比较

术前胃镜活检炎症检出率高于术后病理检查, HGIN检出率低于术后病理检查,差异均有统计学意义($P<0.05$)。两种检查方式LGIN、早癌检出率比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表1。

表1 术后病理及术前胃镜活检结果比较 [$n(\%)$]

Table 1 Comparison of postoperative pathology and preoperative gastroscopy biopsy results [$n(\%)$]

不同检查	n	炎症	LGIN	HGIN	早癌
术前胃镜活检	94	20(21.28)	35(37.23)	38(40.43)	1(1.06)
术后病理	94	10(10.64)	26(27.66)	52(55.32)	6(6.38)
χ^2 值		3.966	1.966	4.178	3.710
P 值		0.046	0.161	0.041	0.054

2.4 CA199检测结果分析

以术后病理检查为标准:炎症、LGIN、HGIN、早癌患者CA199水平为 (10.25 ± 2.25) U/mL、 (15.6 ± 3.08) U/mL、 (25.41 ± 4.75) U/mL、 (47.52 ± 6.58) U/mL。四者CA199水平比较:炎症<LGIN<HGIN<早癌,差异具有统计学意义($P<0.05$)。

2.5 并发症发生率

94例患者中,并发症总发生率为9.57%(9/94)。有1例(1.06%)患者发生急性术中出血,在经电凝止血治疗后,出血得以控制;2例(2.13%)患者

迟发性消化道出血,急诊胃镜检查提示钛夹提前脱落,重新置入钛夹后症状控制;术后有4例(4.26%)患者发热,平均体温 38.37°C ,应用抗生素治疗后,体温下降,症状可控制;有2例(2.13%)患者出现胸腔积液,进行胸腔穿刺引流后病症得以缓解。

2.6 随访结果

随访截止时间2021年1月,随访结果显示:有5例患者复发,复发率5.32%,其中3例患者行第2次ESD治疗,有1例患者因病变区域瘢痕化严重,行手术治疗。

3 讨论

胃癌、食管癌等上消化道肿瘤是临床中常见的恶性肿瘤,发病率、致死率极高。既往学者统计,胃癌死亡率为148.7/10万,严重危害人类生命健康^[11]。早期的诊断、治疗可降低上消化道肿瘤的致死率,延长患者生存期。

近年来,ESD已成为治疗上消化道早期肿瘤或癌前病变的重要手段之一,因其为微创手术,且整体切除率高,因此在国内外认可度较高^[12]。根据本研究结果所示,对上消化道肿瘤患者进行ESD治疗时,需重点关注食管中段、贲门等部位病情变化情况。可见ESD治疗上消化道早癌及癌前

病变疗效可观。

国外学者研究发现,有20%左右的早期消化道肿瘤患者术前胃镜活检与ESD术后病理检查结果不相符^[13]。本研究结果与国外学者报道结果相符^[14]。分析导致差异发生的原因:术前活检仅取材病灶中的一小部分,且活检组织深度不理想,影响病灶性质的评估^[15]。ESD术后取得的标本能提供完整的病理,可获得准确的病理诊断资料,故能更好地评估病情。因此ESD术后标本更能准确判断患者病情,有利于为临床医师制定下一步诊疗计划提供方向。由此可知血清肿瘤标志物CA199用于消化道肿瘤的普查、诊断判断中,可反映患者病情变化,有助于临床动态监测患者病情。

既往文献报道,ESD治疗早期食管癌的整块切除率为78.65%~95.46%,复发率在3%左右^[16]。本研究纳入的94例患者中,食管病灶53例,胃部病灶41例,ESD治疗后并发症总发生率为9.57%,术后随访2年,复查胃镜,发现有5例患者复发,复发率为5.32%,这一研究结果与Imperiale等学者^[17]研究结果相一致。

Sandoval等^[18]学者报道,肿瘤病灶直径、术中剥离时间与患者术中出血风险呈正相关,肿瘤病灶直径越大,手术医师在术中剥离时间也会越长,从而增加并发出血的风险。提示手术人员需在ESD术前进行充分准备,严格遵循手术操作流程,最大程度规避患者发生急性术中出血、迟发性出血的风险。可见ESD治疗早期上消化道肿瘤安全性高。

综上所述,ESD作为一种新型治疗技术,在治疗上消化道早癌及癌前病变上凸显优势,其安全性及有效率高,可提高病理诊断准确率,早癌患者CA199水平最高,可帮助临床精确评估患者病情。

参考文献

- [1] Washington MK, Goldberg RM, Chang G J, et al. Diagnosis of Digestive System Tumours [J]. Intern J Cancer, 2020, 17(22):36-40.
- [2] Chukwugoziem NM, Abu OC, Yara D, et al. Challenges of Human Papillomavirus Infection and Associated Diseases in Low - Resource Countries [J]. Arch Pathol Laborat Med, 2018, 142(6):696-699.
- [3] Sftoiu A, Hassan C, Areia M, et al. Role of gastrointestinal endoscopy in the screening of digestive tract cancers in Europe: European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE) Position Statement [J]. Endoscopy, 2020, 52(4):74-78.
- [4] Lamarca A, Barriuso J, Chander A, et al. 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography (18FDG-PET) for patients with biliary tract cancer: systematic review and meta-analysis [J]. J Hepatol, 2019, 11(23):856-859.
- [5] 郑家焱, 许炎钦, 林旭, 等. 430例上消化道早期癌及癌前病变ESD术前活检与术后病理差异性分析 [J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2020, 29(9):72-76.
- [6] 徐瑞, 陈光勇. 消化道早癌规范化病理学诊断的相关问题 [J]. 中华内科杂志, 2020, 59(6):470-472.
- [7] Stepanov YM, Simonova OV, Mosiychuk LM. Modern endoscopic techniques of precancerous stomach conditions diagnostics: problems and possibilities [J]. GASTROENTEROLOGY, 2017, 51(1):64-72.
- [8] 北京医学会. 胃低级别上皮内瘤变规范化诊治专家共识 (2019,北京) [J]. 中华胃肠内镜电子杂志, 2019,6(2):49-56.
- [9] Le Bars P, Metamoros S, Montassier E, et al. The oral cavity microbiota: between health, oral disease and cancers of the aerodigestive tract [J]. Canad J Microb, 2017,28(3):603-607.
- [10] Shih IM, Wang Y, Wang TL. The Origin of Ovarian Cancer Species and Precancerous Landscape - ScienceDirect [J]. Am J Pathol, 2020,27(13):74-78.
- [11] 文采, 肖明娜, 朴善英. PG, MG7-Ag 联合 G-17 检测对胃癌前病变, 胃癌的诊断及鉴别诊断 [J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(11):68-72.
- [12] 袁媛, 周炳喜, 李亚其, 等. 内镜黏膜下剥离术治疗食管和胃早癌及癌前病变的价值以及术后病理差异分析 (附 337 例报告) [J]. 中国内镜杂志, 2018,23(8):108-112.
- [13] Shamim MZM, Sadatullah S, Shiblee M, et al. Detecting benign and pre-cancerous tongue lesions using deep convolutional neural networks for early signs of oral cancer [J]. Bas Clin Pharmacol Toxicol, 2019, 125(9):184-185.
- [14] Lario S, Quilez ME, Vilacasades M, et al. The Expression of mir-19b-3p and HIPK3 is Highly Correlated in Patients with Precancerous Lesions of Gastric Cancer [J]. Gastroenterology, 2017, 152(5):664-665.
- [15] Liu G, Sharma M, Tan N, et al. HIV-positive women have higher risk of HPV infection, precancerous lesions, and cervical cancer: a systematic review and meta-analysis [J]. Aids, 2018, 32(6):1-10.
- [16] Campbellthompson M, Lauwers GY, Reyher KK, et al. 17Beta-estradiol modulates gastroduodenal preneoplastic alterations in rats exposed to the carcinogen N-methyl-N'-nitro-nitrosoguanidine [J]. Endocrinology, 2018, 19(10):4886-4894.
- [17] Imperiale TF, Abhyankar PR, Stump TE, et al. Prevalence of Advanced, Precancerous Colorectal Neoplasms in Black and White Populations: A Systematic Review and Meta-analysis [J]. Gastroenterology, 2018, 155(23):44-49.
- [18] Sandoval M, Slavkovsky R, Bansil P, et al. Acceptability and safety of thermal ablation for the treatment of precancerous cervical lesions in Honduras [J]. Trop Med Int Health, 2019,27(33):88-93.

MMP-9、PBEF 及炎性因子预测重症急性胰腺炎肺损伤预后

朱丽娟^{1*} 薛乾隆¹ 林雪容¹ 韩树池²

[摘要] **目的** 探讨重症急性胰腺炎相关性肺损伤患者基质金属蛋白酶9(MMP-9)、前B细胞克隆增强因子(PBEF)及炎性因子白介素-8(IL-8)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的变化及对预后的预测价值。**方法** 选取2012年12月至2018年12月本院收治的88例重症胰腺炎患者为研究对象,其中合并急性肺损伤51例(观察组),未合并急性肺损伤37例(对照组)。比较2组MMP-9、PBEF、IL-8、TNF- α 水平;分析影响重症急性胰腺炎相关性肺损伤患者预后不良的相关危险因素;通过ROC曲线计算AUC,分析IL-8、TNF- α 、MMP-9、PBEF水平对重症急性胰腺炎相关性肺损伤患者预后不良的预测价值。**结果** 观察组IL-8、TNF- α 、MMP-9、PBEF水平均显著高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。IL-8(异常增高)、TNF- α (异常增高)、MMP-9(异常增高)、PBEF(异常增高)的重症急性胰腺炎相关性肺损伤患者死亡率明显高于正常表达的患者,差异有统计学意义($P<0.05$)。合并脏器衰竭、合并其他并发症IL-8(异常增高)、TNF- α (异常增高)、MMP-9(异常增高)、PBEF(异常增高)是影响重症急性胰腺炎相关性肺损伤患者预后死亡的相关危险因素($P<0.05$)。IL-8、TNF- α 、MMP-9、PBEF及四者联合检测AUC分别为:0.771、0.807、0.771、0.921,各指标AUC以联合检测最大。**结论** 临床工作者可通过加强联合IL-8、TNF- α 、MMP-9、PBEF检测,以评估重症急性胰腺炎相关性肺损伤患者预后。

[关键词] 重症急性胰腺炎;肺损伤;MMP-9;PBEF;炎性因子

MMP-9, PBEF and Inflammatory Factors Predict the Prognosis of Severe Acute Pancreatitis-related Lung injury

ZHU Lijuan^{1*}, XUE Qianlong¹, LIN Xuerong¹, HAN Shuchi²

(1. Department of Emergency ICU, the First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou, Hebei, China, 075000; 2. Department of Emergency, the First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou, Hebei, China, 075000)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the changes of matrix metalloprotein-9 (MMP-9), pre-B-cell colony-enhancing factor (PBEF) and inflammatory factors Interleukin-8 (IL-8) and Tumor necrosis factor- α (TNF- α) in patients with severe acute pancreatitis-related lung injury and its predictive value for prognosis. **Methods** A total of 88 patients with severe pancreatitis admitted to this hospital from December 2012 to December 2018 were selected as the research subjects, including 51 patients with acute lung injury (as the observation group) and 37 patients without acute lung injury (as the control group). The levels of MMP-9, PBEF, IL-8 and TNF- α in the two groups were compared. The related risk factors that affect the poor prognosis of patients with severe acute pancreatitis-related lung injury were analyzed. AUC was calculated by the ROC curve, and the predictive value of IL-8, TNF- α , MMP-9, PBEF levels for the poor prognosis of patients with severe acute pancreatitis-related lung injury was analyzed. **Results** The levels of IL-8, TNF- α , MMP-9 and PBEF

基金项目:河北省医学科学研究课题计划资助项目(20170815)

作者单位:1. 河北北方学院附属第一医院急诊ICU, 河北, 张家口 075000

2. 河北北方学院附属第一医院急诊科, 河北, 张家口 075000

*通信作者:朱丽娟, E-mail: xiao526965xia3324@163.com

in the observation group were significantly higher than those in the control group, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The mortality rate of patients with severe acute pancreatitis-related lung injury and IL-8 (abnormal increase), TNF- α (abnormal increase), MMP-9 (abnormal increase), and PBEF (abnormal increase) was significantly higher than that of patients with normal expression, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Complicated with organ failure, combined with other complications IL-8 (abnormal increase), TNF- α (abnormal increase), MMP-9 (abnormal increase), PBEF (abnormal increase) are affecting the prognosis of patients with severe acute pancreatitis-related lung injury. Related risk factors for death ($P < 0.05$). The AUC of IL-8, TNF- α , MMP-9, PBEF and the combined detection of the four were: 0.771, 0.807, 0.771, 0.921, respectively, and the maximum AUC of combined detection was the largest. **Conclusion** Clinicians can strengthen the combined detection of IL-8, TNF- α , MMP-9, and PBEF to assess the prognosis of patients with severe acute pancreatitis-related lung injury.

[KEY WORDS] Severe acute pancreatitis; Lung injury; MMP-9; PBEF; Inflammatory factor

重症急性胰腺炎是一种病情危急且并发症较多的严重疾病,常伴有多发器官衰竭,患者病死率较高,预后差。重症急性胰腺炎发展的早期阶段,患者肺部受到损伤,易诱发急性肺损伤,若不及时采取诊治措施,还会发展为急性呼吸窘迫综合征,该病为导致重症急性胰腺炎患者早期死亡的重要原因^[1]。有学者研究指出,选取特异性的生化指标,对提高重症急性胰腺炎患者发生早期相关性肺损伤诊断率,改善患者预后意义重大^[2]。基质金属蛋白酶9(Matrix metalloprotein-9, MMP-9)、炎性因子白介素-8(Interleukin-8, IL-8)、肿瘤坏死因子- α (Tumor necrosis factor, TNF- α)在诊断重症急性胰腺炎肺损伤的临床价值已得到临床肯定^[3]。前B细胞克隆增强因子(pre-B-cell colony-enhancing factor, PBEF)是一种具有促进B前体细胞成熟功能的细胞因子,调控B细胞的增殖、分化、凋亡,有学者研究认为PBEF对诊断急性肺损伤具有生物标志作用^[4]。本研究旨在探讨重症急性胰腺炎相关性肺损伤患者MMP-9、PBEF、IL-8和TNF- α 的变化及临床意义,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2012年12月至2018年12月本院收治的

88例重症胰腺炎患者作为研究对象。纳入标准:①均符合重症急性胰腺炎的诊断标准^[5];②病例资料完整;③影像学检查提示有重症急性胰腺炎特征性改变;④受试者或家属均签署知情同意书。排除标准:①复发胰腺炎者;②合并其他严重疾病或恶性肿瘤者;③妊娠期、哺乳期女性、精神障碍者;④纳入研究前服用过影响炎性因子、MMP-9、PBEF等指标水平的患者。其中51例合并急性肺损伤设为观察组,37例未合并急性肺损伤设为对照组。2组患者性别、年龄等一般资料比较差异无统计学意义($P > 0.05$),见表1。本研究经医院医学伦理委员会批准。

1.2 方法

所有患者于入院后24~48 h取肘静脉血约4~6 mL,抗凝后以3 000 r/min速度离心10 min。采用酶联免疫吸附法检测IL-8、TNF- α 、MMP-9、PBEF。仪器:流式细胞仪(美国Becton Dickinson公司,型号:FACS-ALOBUR);试剂:均由北京科瑞美科技有限公司提供。上述检测过程均严格按照说明进行。IL-8 ≥ 34.2 ng/mL视为异常增高^[6];TNF- $\alpha \geq 6.3$ ng/mL视为异常增高^[6];MMP-9 ≥ 118 ng/mL视为异常增高^[7];PBEF ≥ 5.5 ng/mL视为异常增高^[8]。

1.3 观察指标

①收集患者的病历资料,包括姓名、性别、年龄、病因、是否合并脏器衰竭及其他并发症。②对患者

表1 2组患者一般资料比较 [$n(\%)$, ($\bar{x} \pm s$)]

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

组别	n	性别		平均年龄(岁)	病因			
		男	女		胆源性	高脂血症性	酒精性	其他病理性
观察组	51	31(60.78)	20(39.22)	60.35 \pm 6.71	25(49.02)	14(27.45)	8(15.69)	4(7.84)
对照组	37	25(67.57)	12(32.43)	60.44 \pm 6.78	17(45.95)	10(27.03)	7(18.92)	3(8.11)
t/χ^2 值		0.426		0.062	0.177			
P值		0.514		0.951	0.981			

进行为期6个月的随访(方式:电话随访、门诊复查,随访截止时间:2019年6月),了解患者预后死亡情况。③采用多元Logistic回归分析影响重症急性胰腺炎相关性肺损伤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软件进行数据统计分析,计数资料用n(%)表示,采用 χ^2 检验;计量资料采用($\bar{x} \pm s$)表示,行t检验;采用多元Logistic回归分析影响患者预后不良的相关危险因素;分析IL-8、TNF- α 、MMP-9和PBEF水平对重症急性胰腺炎相关性肺损伤患者预后不良的预测价值;以P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组IL-8、TNF- α 、MMP-9、PBEF水平比较

观察组IL-8、TNF- α 、MMP-9和PBEF水平均高于对照组,差异有统计学意义(P<0.05)。见表2。

表2 两组IL-8、TNF- α 、MMP-9、PBEF水平比较($\bar{x} \pm s$, ng/mL)

组别	n	IL-8	TNF- α	MMP-9	PBEF
观察组	51	37.33 \pm 5.01	7.25 \pm 2.14	124.25 \pm 15.65	5.88 \pm 1.68
对照组	37	31.47 \pm 3.67	5.12 \pm 1.55	104.77 \pm 12.25	5.01 \pm 1.22
t值	-	6.033	5.150	6.297	2.678
χ^2 值	-	<0.001	<0.001	<0.001	0.009

2.2 重症急性胰腺炎相关性肺损伤患者预后情况

随访6个月,51例重症急性胰腺炎相关性肺损伤患者死亡25例(49.02%),生存26例

表3 重症急性胰腺炎相关性肺损伤患者预后情况 [n(%)]

Table 3 prognosis of patients with severe acute pancreatitis associated lung injury [n(%)]

组别	n	IL-8		TNF- α		MMP-9		PBEF	
		异常增高	正常表达	异常增高	正常表达	异常增高	正常表达	异常增高	正常表达
死亡	25	17(68.00)	8(32.00)	21(84.00)	4(16.00)	19(76.00)	6(24.00)	20(80.00)	5(20.00)
生存	26	6(23.08)	20(76.92)	11(42.31)	15(57.69)	12(46.15)	14(53.85)	13(50.00)	13(50.00)
χ^2 值		10.388		9.477		4.763		5.023	
P值		<0.001		0.002		0.029		0.025	

表4 影响重症急性胰腺炎相关性肺损伤患者预后死亡的相关危险因素

Table 4 risk factors influencing the prognosis and death of patients with severe acute pancreatitis associated lung injury

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)	1.257	0.354~1.365	0.359			
性别(男 vs 女)	1.334	0.135~1.652	0.644			
病因(胆源性 vs 高血脂症性/酒精性/其他病因性)	1.268	1.154~1.658	0.019	1.354	0.254~1.265	0.085
合并脏器衰竭(有 vs 无)	1.365	1.124~1.785	0.023	1.254	1.141~1.698	0.021
合并其他并发症(有 vs 无)	1.524	1.247~1.885	0.015	1.234	1.108~1.857	0.015
IL-8(异常增高 vs 正常)	1.325	1.103~1.708	0.016	1.524	1.258~1.865	0.017
TNF- α (异常增高 vs 正常)	1.365	1.257~1.778	0.022	1.365	1.123~1.758	0.008
MMP-9(异常增高 vs 正常)	1.421	1.210~1.852	0.004	1.547	1.278~1.854	0.011
PBEF(异常增高 vs 正常)	1.236	1.110~1.652	0.011	1.256	1.108~1.657	0.023

(50.98%)。IL-8(异常增高)、TNF- α (异常增高)、MMP-9(异常增高)、PBEF(异常增高)的重症急性胰腺炎相关性肺损伤患者死亡率明显高于正常表达的患者,差异有统计学意义(P<0.05)。见表3。

2.3 影响重症急性胰腺炎相关性肺损伤患者预后死亡的相关危险因素

合并脏器衰竭、合并其他并发症IL-8(异常增高)、TNF- α (异常增高)、MMP-9(异常增高)、PBEF(异常增高)是影响重症急性胰腺炎相关性肺损伤患者预后死亡的相关危险因素(P<0.05),见表4。

2.4 IL-8、TNF- α 、MMP-9、PBEF及四者联合对重症急性胰腺炎相关性肺损伤患者预后死亡的预测价值

IL-8、TNF- α 、MMP-9、PBEF及四者联合检测AUC分别为:0.771、0.807、0.771、0.921,各指标AUC以联合检测最大。见表5。

表5 IL-8、TNF- α 、MMP-9、PBEF及四者联合对重症急性胰腺炎相关性肺损伤患者预后死亡的预测价值

Table 5 the predictive value of IL-8, TNF- α , MMP-9, PBEF and their combination on prognosis and death in patients with severe acute pancreatitis associated lung injury

预测指标	最佳临界值	灵敏度(%)	特异度(%)	ACU	95%CI
IL-8	26.14	0.885	0.879	0.839	0.714~0.965
TNF- α	26.23	0.824	0.831	0.785	0.643~0.926
MMP-9	26.34	0.789	0.792	0.720	0.566~0.875
PBEF	26.34	0.764	0.783	0.696	0.541~0.851
四组者联合检测	26.58	0.924	0.934	0.932	0.837~1.000
预测指数模型	1.789	0.854	0.882	0.789	0.785~0.958

3 讨论

肺损伤是在重症急性胰腺炎患者中最为常见的并发症,病情凶险,治疗颇为棘手,重症急性胰腺炎患者一旦发生肺损伤,在早期时即可表现为呼吸频率加快,胸闷窘迫感明显,病情持续加重可出现急性呼吸窘迫综合征,是导致监护病房重症急性胰腺炎患者死亡的主要原因之一^[9]。

PBEF 又称为内脏脂肪素,在骨髓、肌肉、肝脏组织中呈高表达状态,具有降低血糖、促进脂肪代谢、延缓中性粒细胞凋亡等作用,其参与了机体免疫应答的过程^[10]。目前研究者们仍未阐明 PBEF 引起肺血管内皮细胞损伤的具体机制。有学者通过动物实验证实,高水平的 PBEF 可引起肺血管内皮细胞损伤^[6],说明 PBEF 可能通过肺血管内皮细胞中的激活氧化应激反应导致急性肺损伤,这与本研究结果一致。

国内外学者对重症急性胰腺炎相关性肺损伤的发病机制及治疗策略开展大量基础实验及临床研究,获得一些有意义的研究结果^[7]。IL-8 是一种趋化性细胞因子,临床常采用 IL-8 来预测评价炎症反应,已有较多研究证实 IL-8 在重症急性胰腺炎相关性肺损伤患者中呈异常增高状态^[8, 11-12]。Bawadekar 等学者^[13]研究指出, TNF- α 是最重要的炎症和免疫反应调节物,正常表达的 TNF- α 可提高白细胞对病原体吞噬能力,但 TNF- α 过量释放对机体具有强烈的毒性作用,不利于患者预后。包括发热、恶病质、低血压、弥散性血管内凝血、组织损伤和休克等局部或全身的表现与 TNF- α 密切相关。Mortadaza 等^[14]学者选取大鼠模型进行实验,发现存在重症急性胰腺炎相关性肺损伤的大鼠胰腺、肺脏均存在 MMP-9 高表达,提示 MMP-9 参与了重症急性胰腺炎相关性肺损伤的发病过程。这一研究结果与既往文献报道结果一致^[15]。可以推测在重症急性胰腺炎病理过程中, IL-8、TNF- α 、MMP-9、PBEF 表达量增加可能会加速肺微血管内皮细胞的凋亡,进而加重病情,不利于患者预后。

本研究进一步绘制 ROC 曲线,结果提示临床医师可通过联合 IL-8、TNF- α 、MMP-9、PBEF 检测,评估重症急性胰腺炎相关性肺损伤患者预后。

综上所述,重症急性胰腺炎相关性肺损伤患者血清 IL-8、TNF- α 、MMP-9、PBEF 水平呈异常增高状态, IL-8、TNF- α 、MMP-9、PBEF 异常增高的患者预后死亡风险大,临床工作者需重视四者联合检测,以

评估重症急性胰腺炎相关性肺损伤患者预后。

参考文献

- [1] 范龙鑫, 韩彦舟, 朱海宏, 等. 高原低氧环境下大鼠重症急性胰腺炎肺损伤中 MMP-9 表达的相关研究[J]. 中国医师杂志, 2019, 21(1):33-37.
- [2] Yamashita T, Horibe M, Sanui M, et al. Large Volume Fluid Resuscitation for Severe Acute Pancreatitis is Associated With Reduced Mortality: A Multicenter Retrospective Study [J]. J Clin Gastroent, 2018, 25(25):1-8.
- [3] 王长起, 李凯, 索胜利. 血尿酸酶, CRP, Card9 蛋白在 AP 患者中的变化及其意义[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(1):107-110.
- [4] 陆鹰, 郭小芙, 徐蓉. 热休克蛋白 27, 白细胞介素-37 与重症胰腺炎肺损伤的相关性研究[J]. 标记免疫分析与临床, 2020, 27(8):62-65.
- [5] 曹晓珑, 章厚芬. 肠内外营养支持治疗重症急性胰腺炎合并感染的临床效果[J]. 保健医学研究与实践, 2018, 15(5):49-51.
- [6] Satoshi I, Kazunao H, Hirokazu K, et al. Sal391 - Risk Factors for Walled-Off Necrosis Associated with Severe Acute Pancreatitis: A Multicenter Retrospective Observational Study [J]. Gastroenterology, 2018, 154(6):289-293.
- [7] 张红松, 冯芳, 付丽彬, 等. 不同炎症因子对重症急性胰腺炎的预测价值研究[J]. 中国全科医学, 2017, 25(9):66-70.
- [8] Dutta AK, Goel A, Kirubakaran R, et al. Nasogastric versus nasojejunal tube feeding for severe acute pancreatitis [J]. Cochrane Database system Rev, 2020, 3(2):23-28.
- [9] Zhang FH, Sun YH, Fan KL, et al. Protective effects of heme oxygenase-1 against severe acute pancreatitis via inhibition of tumor necrosis factor- α and augmentation of interleukin-10 [J]. BMC Gastroenterol, 2017, 17(1):100-108.
- [10] 韩魁, 王小智, 王金忠, 等. 早期腹腔微创穿刺引流在重症急性胰腺炎肺损伤中的保护作用[J]. 中国临床研究, 2018, 31(10):82-84.
- [11] Thompson JS, Schneider P, Kalled SL, et al. BAFF binds to the tumor necrosis factor receptor-like molecule B cell maturation antigen and is important for maintaining the peripheral B cell population [J]. J Exp Med, 2019, 19(1):129-135.
- [12] Hirota M, Shimosegawa T. Continuous regional arterial infusion of the protease inhibitor for severe acute pancreatitis [J]. Nippon Shokakibyo Gakkai Zasshi, 2020, 117(6):494-503.
- [13] Bawadekar M, Shim D, Johnson CJ, et al. Peptidylarginine deiminase 2 is required for tumor necrosis factor alpha-induced citrullination and arthritis, but not neutrophil extracellular trap formation [J]. J Autoimm, 2017, 15(15):39-45.
- [14] Mortadaza S, Sim JA, Neubrand VE, et al. A critical role of TRPM2 channel in A β 42-induced microglial activation and generation of tumor necrosis factor- α [J]. Glia, 2018, 66(6):562-569.
- [15] Govindaraj J, Govindaraj K, Jayesh SR, et al. A Review on Visfatin/Nicotinamide Phosphoribosyltransferase/Pre-B Cell Colony-Enhancing Factor [J]. Ind J Public Health Res Devel-opm, 2019, 10(11):2803-2810.

脑脊液乳酸、NF- κ B 及 BAFF 对颅内动脉瘤破裂出血术后转归的预测

李博* 蒋铭 张志国 张程文

[摘要] 目的 分析脑脊液乳酸、核因子 κ B(NF- κ B)及B细胞活化因子(BAFF)对预测颅内动脉瘤破裂出血患者术后转归的价值。方法 选取119例2017年2月至2020年2月在本院手术治疗的颅内动脉瘤破裂出血患者,术后随访3个月,采用改良Rankin量表(mRS)分为预后良好组、预后不良组。比较两组脑脊液乳酸、NF- κ B及BAFF表达情况,分析影响颅内动脉瘤破裂出血患者术后转归的独立危险因素。结果 预后不良组脑脊液乳酸低于预后良好组,BAFF水平及NF- κ B阳性率高于预后良好组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。非条件多因素logistic回归模型分析显示,年龄、Hunt-Hess分级、GCS评分、脑脊液乳酸、NF- κ B及BAFF表达是影响颅内动脉瘤破裂出血患者术后转归的危险因素($P < 0.05$)。结果 脑脊液乳酸、NF- κ B及BAFF与颅内动脉瘤破裂出血术后转归密切相关,可作为预测患者预后的潜在分子标志物。

[关键词] 脑脊液乳酸; NF- κ B; BAFF; 颅内动脉瘤破裂出血; 术后转归

The prediction of cerebrospinal fluid lactic acid, NF- κ B and BAFF on the postoperative outcome of intracranial aneurysm rupture and hemorrhage

LI Bo*, JIANG Ming, ZHANG Zhiguo, ZHANG Chengwen

(Department of Neurosurgery, People's Hospital of Kaizhou District, Chongqing, China, 405400)

[ABSTRACT] **Objective** To analyze the value of cerebrospinal fluid lactic acid, nuclear factor- κ B (NF- κ B) and B cell-activating factor of the TNF family (BAFF) levels in predicting the postoperative outcome of patients with rupture hemorrhage of intracranial aneurysm. **Methods** 119 patients with rupture hemorrhage of intracranial aneurysm surgically treated in this hospital from February 2017 to February 2020 were selected and were followed up for 3 months after the operation. The modified Rankin Scale (mRS) was used to divide the patients into a good prognosis group and a poor prognosis group. The expressions of cerebrospinal fluid lactic acid, NF- κ B and BAFF were compared between the two groups, and the independent risk factors affecting the postoperative outcome of patients with rupture hemorrhage of intracranial aneurysm were analyzed. **Results** The cerebrospinal fluid lactate acid in the poor prognosis group was lower than that in the good prognosis group, and the BAFF level and the positive rate of NF- κ B in the poor prognosis group were higher than those in the good prognosis group, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The analysis of unconditional multivariate logistic regression model showed that age, Hunt-Hess grade, GCS score, cerebrospinal fluid lactic acid, NF- κ B and BAFF expression were the risk factors that affect the postoperative outcome of patients with rupture hemorrhage of intracranial aneurysm ($P < 0.05$). **Conclusion** Cerebrospinal fluid lactic acid, NF- κ B and BAFF are closely related to the postoperative outcome of patients with rupture hemorrhage of intracranial aneurysm and can be used as potential molecular markers for predicting the prognosis of patients.

[KEY WORDS] Cerebrospinal fluid lactic acid; NF- κ B; BAFF; Rupture and hemorrhage of intracranial aneurysm; Postoperative outcome

基金项目:重庆市卫生和计生委医学科研项目(2017MSXM1032)

作者单位:重庆市开州区人民医院神经外科,重庆 405400

*通信作者:李博, E-mail:libo197958@163.com

颅内动脉瘤是因颅内动脉局限性异常扩大引发动脉瘤样病变而导致的脑血管疾病,调查研究显示,约85%的蛛网膜下腔出血是因颅内动脉瘤破裂所致^[1]。手术是目前临床治疗颅内动脉瘤破裂出血的首选有效方案。研究发现部分颅内动脉瘤破裂出血患者术后存在疾病复发、再出血等预后不良的风险^[2]。因此,及时评估颅内动脉瘤破裂出血术后转归情况,对改善患者预后具有重要意义。

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^[3]。核因子 κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)是细胞内重要的转录因子,可在第一时间对有害细胞的刺激做出反应,调控基因转录。B细胞活化因子(B cell-activating factor of the TNF family, BAFF)属于调控机体免疫应答的B淋巴细胞的一种共刺激因子。本研究就脑脊液乳酸、NF- κ B及BAFF检测对颅内动脉瘤破裂出血术后转归中的预测进行研究,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取119例2017年2月至2020年2月在本院进行手术治疗的颅内动脉瘤破裂出血患者,术后随访3个月。研究对象纳入指标:①均符合第四届全国脑血管病学术会议修订的颅内动脉瘤诊断标准^[4],均为单发;②均存在瘤体破裂出血表现;③临床资料完整者;④符合手术治疗指征者。排除指标:①存在其他系统病变或恶性肿瘤者;②存在严重心、肺、肝等器官功能不全患者;③凝血功能障碍者;④不能接受随访者。本研究经医院医学伦理委员会批准通过,受试者或其家属均签署知情同意书。

1.2 方法

脑脊液乳酸:采用GEM Premier 3000仪器检测患者术后0~72 h时脑脊液乳酸水平,计算术后72 h乳酸清除率,术后72 h乳酸清除率=(术后0~24 h脑脊液乳酸值-术后48~72 h脑脊液乳酸值)/术后0~24 h脑脊液乳酸值 \times 100%。以术后72 h乳酸清除率的10%为界限,清除率 \geq 10%为高清除率,清除率 $<$ 10为低清除率^[5]。

BAFF:于患者术后24 h内常规腰椎穿刺抽取脑脊液3 mL,离心(3 000 r/min, 10 min, $r=10$ cm),取上清液,使用酶联免疫吸附法(Enzyme Linked Immune Sorbent Assay, ELISA)法测定BAFF水平,

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,根据说明书步骤操作。异常增高:BAFF \geq 500 pg/mL,正常:BAFF $<$ 500 pg/mL^[6]。

NF- κ B:采用链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶免疫组化染色法检测,仪器为ELECSYS2010罗氏电化学发光分析仪。所有颅内动脉瘤标本组织于手术切除后即使用10%甲醛固定,组织切片后脱蜡、水化,具体方法严格按照试剂盒说明执行。每批切片染色均用已知的NF- κ B阳性表达的颅内动脉瘤组织切片当阳性对照,以磷酸盐缓冲液代替一抗作低表达对照。结合阳性细胞百分比和染色强度判定NF- κ B结果^[7]:阳性细胞百分比评分: $<$ 26%为1分,26%~50%为2分,51%~75%为3分, $>$ 75%为4分。染色情况判定:0分为无色,1分为淡黄色,2分为棕黄色,3分为棕褐色。两项评分之和 \leq 2分为阴性, \geq 3分为阳性。

1.3 观察指标

①采用改良Rankin量表(Modified Rankin Scale, mRS)评估患者预后情况^[8],mRS评分0~2分者归为预后良好组,mRS评分3~6分者归为预后不良组(包括死亡患者)。比较两组脑脊液乳酸、NF- κ B及BAFF表达情况。②分析影响颅内动脉瘤破裂出血患者术后转归的独立危险因素。

1.4 统计学方法

采用SPSS 22.0软件进行统计分析。计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,行 t 检验;计数资料采用 $n(\%)$ 描述,行 χ^2 检验;影响因素采用多元Logistic回归分析,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组基本资料比较

两组患者基本资料比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表1。

表1 两组患者基本资料比较 [$n(\%)$, $(\bar{x} \pm s)$]

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

组别	n	男/女	平均年龄(岁)	高血压病史	糖尿病史	吸烟史
预后不良组	33	12/21	49.73 \pm 7.24	19(57.58)	12(36.36)	11(33.33)
预后良好组	86	26/60	48.98 \pm 8.21	37(43.02)	19(22.09)	26(30.23)
t/χ^2 值	-	0.412	0.460	2.027	2.521	0.127
P 值	-	0.521	0.646	0.155	0.112	0.744

2.2 两组脑脊液乳酸、NF- κ B及BAFF表达情况

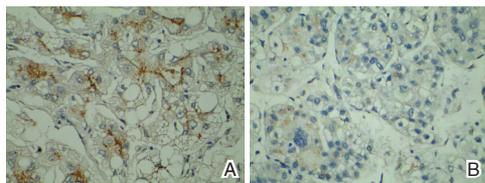
预后不良组脑脊液乳酸明显低于预后良好

组,BAFF水平及NF-κB阳性率均高于预后良好组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表2、图1。

表2 两组脑脊液乳酸、NF-κB及BAFF表达情况
[$n(\%)$, ($\bar{x}\pm s$)]

Table 2 the expression levels of cerebrospinal fluid lactic acid, NF-κB and BAFF in the two groups

组别	n	脑脊液乳酸 (%)	BAFF (pg/mL)	NF-κB	
				阳性	阴性
预后不良组	33	7.29±1.82	585.86±164.38	28(84.85)	5(15.15)
预后良好组	86	8.53±2.62	446.55±151.78	41(47.67)	45(52.33)
χ^2 值	-	2.495	4.380	13.528	
P值	-	0.014	<0.001	<0.001	



A: NF-κB在颅内动脉瘤中的阳性表达; B: NF-κB在颅内动脉瘤中的阴性表达。

图1 NF-κB免疫组化染色(SP, ×400)

Figure 1 NF-κB immunohistochemical staining (SP, ×400)

2.3 影响颅内动脉瘤破裂出血患者术后转归的单因素分析

患者性别、高血压史、糖尿病史、手术方式非影响影响颅内动脉瘤破裂出血术后转归的单因素($P>0.05$),年龄、Hunt-Hess分级、格拉斯哥昏迷量表(Glasgow Coma Scale, GCS)评分、脑脊液乳酸、NF-κB及BAFF表达为影响颅内动脉瘤破裂出血患者术后转归的单因素($P<0.05$)。见表3。

2.4 影响颅内动脉瘤破裂出血患者术后转归的多因素分析

非条件多因素 logistic 回归模型分析显示,年龄、Hunt-Hess 分级、GCS 评分、脑脊液乳酸、NF-κB 及 BAFF 表达是影响颅内动脉瘤破裂出血患者术后转归的危险因素($P<0.05$)。见表4。

表3 影响颅内动脉瘤破裂出血患者术后转归的单因素分析

Table 3 simple analysis on factors influencing the postoperative outcome of patients with rupture hemorrhage of intracranial aneurysm

变量	预后良好组 (n=86)	预后不良组 (n=33)	χ^2/t 值	P值
年龄(岁)				
<60岁	68(83.95)	13(16.05)	29.264	<0.001
≥60岁	18(47.37)	20(52.63)		
性别			0.412	0.521
男	26(68.42)	12(31.58)		
女	60(74.07)	21(25.93)		
Hunt-Hess 分级				
I~III级	71(98.65)	3(4.05)	54.740	<0.001
IV~V级	15(33.33)	30(66.67)		
GCS 评分				
3~8分	5(12.53)	27(84.38)	70.231	<0.001
9~12分	29(90.63)	3(9.38)		
13~15分	52(94.55)	3(5.45)		
糖尿病史				
有	19(61.29)	12(38.71)	2.521	0.112
无	67(76.14)	21(23.86)		
高血压病史				
有	37(66.07)	19(33.93)	2.027	0.155
无	49(77.78)	14(22.22)		
手术方式				
显微夹闭术	41(70.69)	17(29.31)	0.141	0.707
介入栓塞术	45(73.77)	16(26.23)		
脑脊液乳酸				
≥10%	19(44.19)	24(55.81)	26.495	<0.001
<10%	67(88.16)	9(11.84)		
NF-κB				
阳性	41(59.42)	28(40.58)	13.528	<0.001
阴性	45(90.00)	5(10.00)		
BAFF(pg/mL)	585.86±164.38	446.55±151.78	4.380	<0.001

3 讨论

研究统计,颅内动脉瘤破裂出血患者术后治疗后,预后不良的风险仍较高^[9]。积极寻找可在颅内动脉瘤破裂出血术后早期发现病情变化并判断预后的指标,对改善患者预后转归的临床意义重大。

颅内动脉瘤破裂出血患者的中枢神经系统损伤伴随着能量代谢改变,而能量代谢危机预示着患者不良预后的转归,乳酸作为神经损伤后能量

表4 影响颅内动脉瘤破裂出血患者术后转归的多因素分析

Table 4 multivariate analysis on factors influencing the postoperative outcome of patients with rupture hemorrhage of intracranial aneurysm

变量	回归系数	标准误	wald χ^2 值	OR	95%CI	P值
年龄(≥60岁 vs <60岁)	0.563	0.128	4.635	1.756	1.366~2.257	<0.001
Hunt-Hess 分级(IV~V级 vs I~III级)	0.623	0.233	5.244	1.865	1.181~2.944	<0.001
GCS 评分(3~8分 vs 9~12分或13~15分)	0.573	0.246	5.326	1.774	1.095~2.972	<0.001
脑脊液乳酸(≥10% vs <10%)	0.356	0.112	7.298	1.428	1.146~1.778	<0.001
NF-κB(阳性 vs 阴性)	0.789	0.316	8.269	2.201	1.185~4.089	<0.001
BAFF(异常增高 vs 正常)	0.773	0.248	7.734	2.166	1.332~3.522	<0.001

代谢危象和疾病发生发展的标志物越来越受到关注^[10]。目前国外许多学者已把乳酸作为动脉瘤性蛛网膜下腔出血的潜在损伤生物标志物进行研究,但研究结果仍存在争议^[11]。Ren等^[12]研究表明脑脊液乳酸与动脉瘤性蛛网膜下腔出血患者预后相关,但Uno等^[13]研究却认为脑脊液乳酸与动脉瘤性蛛网膜下腔出血患者预后无关。Razaghi等学者^[14]研究认为,中枢神经系统中的乳酸被排入脑脊液中,因此脑脊液乳酸检测在颅内动脉瘤破裂出血患者中的变化情况值得探讨。本研究结果显示,术后预后不良组脑脊液乳酸明显低于预后良好组,脑脊液乳酸<10%的患者预后不良的风险越高,这一研究结果与既往文献报道结果一致^[15],表明检测脑脊液乳酸对患者病情及预后评估有指导意义。

NF- κ B是近年来发现的重要转录因子之一,广泛存在于哺乳动物中,可与B淋巴细胞免疫球蛋白 κ 轻链基因的增强子 κ B序列特异性结合,活化的NF- κ B能够上调细胞间黏附因子的表达,参与肿瘤的发生、发展、侵袭及转移。Obuchowska等^[16]研究发现,NF- κ B在脑动脉瘤形成初期被激活,同时对下游基因的表达起上调作用,通过人为干预减少NF- κ B后,脑动脉瘤的发生率明显降低。本组研究结果提示NF- κ B可作为评估颅内动脉瘤破裂出血术后转归的重要指标之一。BAFF是一种促炎细胞因子,被认为是一种类似C反应蛋白的物质,可反映机体的炎症水平。目前许多研究表明BAFF与颅内动脉瘤破裂出血及病情进展有关^[17]。本组研究结果提示BAFF与颅内动脉瘤破裂出血术后转归存在一定相关性。BAFF水平的增高可加重颅内动脉瘤患者的炎性反应,继而加重颅内动脉管壁持续性损伤。BAFF异常升高的颅内动脉瘤破裂出血患者术后预后不良的风险大,提示BAFF在评估患者预后情况中具有重要的价值。

综上所述,脑脊液乳酸、NF- κ B及BAFF与颅内动脉瘤破裂出血术后转归密切相关,可作为预测患者预后的潜在分子标志物。

参考文献

- [1] 何龙,方文华,丁陈禹,等.脑脊液乳酸对成人脑出血开颅术后细菌性脑膜炎的诊断价值分析[J].中华神经医学杂志,2019,18(12):1241-1247.
- [2] 范文兵,周银锁.D-乳酸和降钙素原对细菌性脑膜炎的诊断价值[J].分子诊断与治疗杂志,2019,11(6):99-112.
- [3] 孟丽君,刘微丽.脑脊液C-反应蛋白和乳酸在开颅术后细菌性感染与无菌性脑膜炎中的鉴别价值[J].安徽医学,2018,39(11):97-100.
- [4] Abate M G, Moretto L, Licari I, et al. Osteopontin in the Cerebrospinal Fluid of Patients with Severe Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage[J]. Cells, 2019,8(7):695-699.
- [5] Beltran FR, Barrio I, Lorenzo V, et al. Valorization of poly (lactic acid) wastes via mechanical recycling: Improvement of the properties of the recycled polymer[J]. Waste Managem Res, 2019,37(2):135-141.
- [6] Mckel T, Basta F, Weinmann MJ, et al. B cell activating factor (BAFF): Structure, functions, autoimmunity and clinical implications in Systemic Lupus Erythematosus (SLE)[J]. Autoimm Rev, 2020,20(2):736-741.
- [7] Brunet MC, Simonyan D, Cottin SC, et al. Effect of aneurysm size on procedure-related rupture in patients with subarachnoid hemorrhage treated with coil occlusion[J]. Int Neurosurg: Adv Techn Case Managem, 2019,19(1):141-146.
- [8] 王旭阁,高刘民,药天乐,等.动脉瘤性蛛网膜下腔出血病人术后治疗转归与血清基质金属蛋白酶-9的相关性研究[J].中西医结合心脑血管病杂志,2019,17(15):2375-2378.
- [9] Brunet MC, Simonyan D, Cottin SC, et al. Effect of aneurysm size on procedure-related rupture in patients with subarachnoid hemorrhage treated with coil occlusion[J]. Int Neurosurg, 2019,19(21):98-101.
- [10] 陈宏武,林睿,黄杰浩,等.脑脊液乳酸与高血压脑出血破入脑室患者颅内压及预后的相关性[J].山西医药杂志,2019,48(6):674-676.
- [11] Sherif C, Krssak M. Evaluation of cerebral aneurysm wall thickness in experimental aneurysms: comparison of 3T-MR imaging with direct microscopic measurements[J]. Acta Neurochir, 2018,160(4):395-399.
- [12] Ren Y, Liu L, Sun H, et al. Microsurgical vs. endovascular treatments for blood-blister aneurysms of the internal carotid artery: a retrospective study of 83 patients in a single center[J]. World Neurosurg, 2017,45(1):36-38.
- [13] Uno J, Otsuji R, Ren N, et al. Ruptured Cerebral Aneurysm of Fenestrated A1 Segment of the Anterior Cerebral Artery: Case Report and Literature Review[J]. Jnet J Neuroend Ther Official J Japanese Soc Neuroend Ther, 2017,11(14):77-79.
- [14] Razaghi R, Biglari H, Karimi A. Risk of rupture of the cerebral aneurysm in relation to traumatic brain injury using a patient-specific fluid-structure interaction model[J]. Comp Methods Programs Biomed, 2019,47(2):44-47.
- [15] Antonio E, Junior O, Marcano R, et al. Chitosan modified poly (lactic acid) nanoparticles increased the ursolic acid oral bioavailability[J]. Int J Biol Macromol, 2021,172(24):133-142.
- [16] Obuchowska I, Turek G, Kochanowicz J, et al. Late ophthalmological manifestations in patients with subarachnoid hemorrhage and coiling of cerebral aneurysm[J]. Neurol I Neurochir Pol, 2017,31(15):1-9.
- [17] Joo C, Park E, Min JW, et al. Contrast Media-Induced Nephropathy in Patients with Unruptured Cerebral Aneurysm After Coiling Endovascular Treatment[J]. World Neurosurg, 2019,24(36):218-220.

CA72-4、CA19-9、CA125、CA50 医学参考值范围及其对胃癌早期诊断价值的研究

杨剑* 万成乐 金雷

[摘要] **目的** 评估糖类抗原(CA)72-4、CA19-9、CA125、CA50 医学参考值范围,判断上述指标对胃癌早期的诊断价值,以期为临床诊治提供循证支持。**方法** 选取2018年1月至2020年12月本院健康体检人群528例作为研究对象,检测血清CA72-4、CA19-9、CA125、CA50水平,采用百分位数法估计上述血清指标95%医学参考值范围。并选取同期经胃镜活检病理组织学确诊的82例胃癌患者作为胃癌组,39例胃良性病变患者作为良性病变组,从528例健康人群中随机抽取39例作为健康对照组,比较3组血清CA72-4、CA19-9、CA125、CA50水平,评价上述血清指标单一及联合诊断价值。**结果** 血清CA72-4、CA19-9、CA125、CA50水平95%医学参考值范围分别为 ≤ 6.75 U/mL、 ≤ 36.84 U/mL、 ≤ 34.98 U/mL、 ≤ 22.56 μ g/L;血清CA72-4、CA19-9、CA125、CA50水平组间比较:胃癌组>健康对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$);血清CA72-4、CA19-9联合诊断早期胃癌的曲线下面积(AUC)优于血清CA72-4、CA19-9、CA125、CA50单一诊断,敏感度为78.05%,特异度为82.05%。**结论** 通过对健康体检人群进行调查得出CA72-4、CA19-9、CA125、CA50医学参考值范围,并提示其在胃癌早期诊断中具有一定应用价值,可作为胃癌早期诊断的辅助指标。

[关键词] 糖类抗原72-4;糖类抗原19-9;CA125;CA50;医学参考值范围;胃癌

Study on the medical reference value ranges of CA72-4, CA19-9, CA125, CA50 and their value in early diagnosis of gastric cancer

YANG Jian, WAN Chengle, Jin Lei

(Department of Gastroenterology, Xinhua Hospital of Huainan Xinhua Medical Group, Huainan, Anhui, China, 232000)

[ABSTRACT] **Objective** To evaluate the medical reference value range of carbohydrate antigen (CA) 72-4, CA19-9, CA125, and CA50, and determine the value of the above indicators in the early diagnosis of gastric cancer (GC), to provide evidence-based support for clinical diagnosis and treatment. **Methods** 528 cases of healthy physical examination population from January 2018 to December 2020 in our hospital were selected as the research object. The serum CA72-4, CA19-9, CA125, CA50 levels were detected, and the percentile method was used to estimate 95% medical reference value range of the above serum indicators. In the same period, 82 GC patients diagnosed by gastroscopy and histopathology were selected as the GC group, and 39 cases were randomly selected from 528 healthy people as the healthy control group. The serum levels of CA72-4, CA19-9, CA125, and CA50 were compared between the 3 groups, and the single and combined diagnostic value of the above serum indicators were evaluated. **Results** The 95% medical reference value ranges of serum CA72-4, CA19-9, CA125, and CA50 levels were ≤ 6.75 U/mL, ≤ 36.84 U/mL, ≤ 34.98 U/mL, ≤ 22.56 μ g/L, respectively. The comparison of serum CA72-4, CA19-9, CA125, and CA50 levels between groups: GC group > healthy control group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The area under the curve (AUC) of the combined diagnosis of serum CA72-4 and CA19-9 for early GC was better than the single diagno-

基金项目:安徽省重点研究与开发计划项目(1804h08020233)

作者单位:安徽省淮南市新华医疗集团新华医院消化内科,安徽,淮南232000

*通信作者:杨剑, E-mail: yang95610821@163.com

sis of serum CA72-4, CA19-9, CA125, and CA50. The sensitivity was 78.05% and the specificity was 82.05%.

Conclusion The medical reference value range of CA72-4, CA19-9, CA125, and CA50 is determined through the investigation of the healthy population. The result indicates that it has certain application value in the early diagnosis of GC, and can be used as an auxiliary indicator for the early diagnosis of GC.

[KEY WORDS] Carbohydrate antigen 72-4; CA19-9; CA125; CA50; Range of medical reference values; Gastric cancer

胃癌是临床常见消化系统恶性肿瘤之一,流行病学调查显示,其发病人数在我国恶性肿瘤中位居第2位,仅次于肺癌,10年病死率高达85%~90%,但由于GC早期临床症状不具典型性,≥50%患者确诊时已处于中晚期,甚至出现远处转移,错过最佳手术时间^[1-3]。胃镜活检是临床诊断GC的金标准,但其属有创操作,部分患者耐受性较低,在临床常规筛查中受限。血清肿瘤标志物凭借操作方便、检测时间短、可重复性高、半衰期短、非侵入性等为GC早期诊断提供了一种新途径^[4-5]。糖类抗原(carbohydrate antigen, CA)72-4、CA19-9、CA125、CA50均为临床常见血清肿瘤标志物^[6-7],但关于其医学参考值范围报道较少基于此,本研究尝试分析健康体检人群血清CA72-4、CA19-9、CA125、CA50医学参考值范围,探讨上述血清指标对GC早期的诊断价值,旨在为临床早期诊治提供有效辅助手段。详情如下。

1 资料和方法

1.1 一般资料

选取2018年1月至2020年12月本院健康体检人群528例作为研究对象,并选取同期经胃镜活检病理组织学确诊的82例胃癌患者作为胃癌组,其中女27例,男55例,年龄平均(54.85±7.64)岁;体质指数平均(21.55±1.67)kg/m²;选取胃镜活检病理组织学确诊为良性病变者39例为良性病变组,其中女18例,男21例,年龄平均(55.31±7.43)岁,体质指数平均(21.95±1.86)kg/m²,从528例健康人群中随机抽取39例作为健康对照组。其中女15例,男24例,年龄平均(55.95±7.04)岁;体质指数平均(21.91±1.92)kg/m²。3组年龄、性别、体质指数等基线资料均衡可比($P>0.05$)。本院伦理委员会经审核评议同意本研究。

纳入标准:①胃癌组均符合《中国早期胃癌筛查及内镜诊治共识意见(2014年,长沙)》^[8]中胃癌相关诊断标准,并均经胃镜活检病理组织学检查确诊;②528例健康体检人群未存在健康体检表不完整或体检结果异常;③3组年龄均>20岁,并均签署知情同意书。

排除标准:①近期有放化疗治疗史者;②合并其他部位恶性肿瘤者;③合并盆腔炎、子宫腺肌症、肝硬化、自身免疫性疾病或其他对肿瘤标志物有影响疾病者;④合并精神分裂症、严重抑郁症或其他精神疾病者。

1.2 方法

血清肿瘤标志物水平:空腹取外周静脉血5 mL,室温静置。离心,分离血清部分,在2~8℃稳定12 h。采用深圳新产业生物医学工程股份有限公司Maglumi 4 000 Plus型全自动化学发光测定仪测定血清CA72-4、CA19-9、CA125、CA50水平。

1.3 统计学方法

采用统计学软件SPSS 22.0处理数据,计数资料以 $n(\%)$ 描述;计量资料不符合正态分布,以 $[M(P_{25}, P_{75})]$ 表示;资料不满足正态性,95%医学参考值范围计算方法采用百分位数法;绘制受试者工作特征(ROC)曲线得到曲线下面积(AUC),检验血清CA72-4、CA19-9、CA125、CA50水平对胃癌早期诊断价值。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血清CA72-4、CA19-9、CA125、CA50水平医学参考值范围

血清CA72-4水平95%医学参考值范围为≤6.75 U/mL;血清CA19-9水平95%医学参考值范围为≤36.84 U/mL;血清CA125水平95%医学参考值范围为≤34.98 U/mL;血清CA50水平95%医学参考值范围为≤22.56 μg/L。见表1~2。

2.2 两组血清CA72-4、CA19-9、CA125、CA50水平胃癌组血清CA72-4、CA19-9、CA125、CA50水平高于良性病变组、健康对照组,差异有统计意义($P<0.05$)。见表3,图1。

2.3 血清CA72-4、CA19-9、CA125、CA50对胃癌早期诊断价值

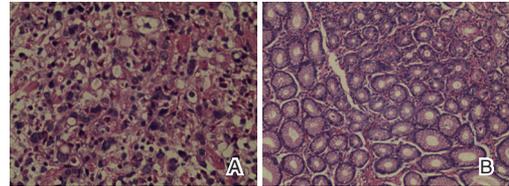
ROC曲线,结果显示,血清CA72-4、CA19-9联合诊断早期胃癌AUC为0.856,95%CI为0.781~0.913($P<0.001$),诊断敏感度为78.05%,特异度为82.05%。见表4,图2。

表1 血清CA72-4、CA19-9、CA125、CA50水平分布构成比
Table 1 Distribution proportion of serum CA72-4, CA19-9, CA125 and CA50 levels

指标	n	构成比	
血清 CA72-4 (U/mL)	0~	39.20	
	1.5~	31.82	
	3.0~	15.91	
	4.5~	4.36	
	6.0~	4.92	
	7.5~	1.52	
	9.0~	0.57	
	10.5~	0.19	
	12~	1.52	
	血清 CA19-9 (U/ml)	0~	13.26
		4~	26.52
		8~	25.95
12~		8.90	
16~		5.11	
20~		2.08	
24~		2.65	
28~		3.79	
32~		3.03	
36~		8.71	
血清 CA125 (U/ml)		0~	9.09
		3~	17.99
	6~	23.11	
	9~	6.25	
	12~	5.87	
	15~	3.41	
	18~	2.27	
	21~	2.84	
	24~	4.55	
	27~	4.73	
	30~	5.68	
	33~	11.36	
血清 CA50 (μg/L)	0~	12.88	
	4~	9.66	
	8~	14.77	
	12~	20.83	
	16~	29.92	
	20~	9.28	
	24~	1.70	
	28~	0.95	

表2 CA72-4、CA19-9、CA125、CA50的95%医学参考值范围
Table 2 95% medical reference ranges of CA72-4, CA19-9, CA125 and CA50

指标	M(P ₂₅ , P ₇₅)	95%医学参考值范围
CA72-4	2.29(1.28, 3.29)	≤6.75 U/mL
CA19-9	11.41(5.54, 16.27)	≤36.84 U/mL
CA125	15.95(5.16, 26.74)	≤34.98 U/mL
CA50	13.67(8.65, 18.69)	≤22.56 μg/L



注:A为胃癌中分化;B为中度胃炎。

图1 胃癌、胃良性病变组织病理图(SP, ×200)

Figure 1 the histopathology of gastric cancer and benign gastric lesions (SP, ×200)

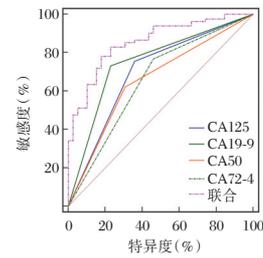


图2 ROC曲线

Figure 2 ROC curve

3 讨论

肿瘤标志物是由肿瘤细胞合成及肿瘤细胞与宿主相互作用产生的特异性物质,有助于指导早期恶性肿瘤诊断,间接反映肿瘤恶性程度、评估预

表3 3组血清CA72-4、CA19-9、CA125、CA50水平比较 [M(P₂₅, P₇₅)]

Table 3 Comparison of serum CA72-4, CA19-9, CA125 and CA50 levels between the 3 groups [M(P₂₅, P₇₅)]

组别	例数	CA72-4 (U/mL)	CA19-9 (U/mL)	CA125 (U/mL)	CA50 (μg/L)
胃癌组	82	8.27(3.86, 13.05)	91.38(10.83, 165.99)	105.22(12.46, 181.71)	55.74(7.61, 114.28)
良性病变组	39	5.35(2.58, 11.45)	63.92(8.65, 102.45)	76.69(8, 69, 127.88)	38.57(5.21, 93.75)
健康对照组	39	2.85(1.49, 6.18)	8.40(4.28, 25.37)	10.64(5.12, 36.11)	6.83(2.90, 18.44)
Z值		12.296	26.834	37.052	18.920
P值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

表4 血清CA72-4、CA19-9、CA125、CA50对胃癌早期诊断价值

Table 4 value of serum CA72-4, CA19-9, CA125 and CA50 in early diagnosis of gastric cancer

指标	AUC值	95%CI	Z值	cut-off值	敏感度(%)	特异度(%)	P值
CA72-4	0.653	0.561~0.738	3.282	阳性	76.83	53.85	0.001
CA19-9	0.750	0.664~0.825	5.947	阳性	73.17	76.92	<0.001
CA125	0.699	0.608~0.779	4.351	阳性	75.61	64.10	<0.001
CA50	0.657	0.565~0.741	3.407	阳性	62.20	69.23	0.001
CA72-4+CA19-9	0.856	0.781~0.913	10.217		78.05	82.05	<0.001

后^[9]。CA72-4是一种高分子量糖蛋白类抗原,主要在胃部、胰腺等器官广泛表达,学者Gong X等^[10]研究对200例胃癌患者随访可知,血清CA72-4在胃癌早期诊断、术后复发、转移和死亡风险评估中具有重要价值。CA19-9是一种低聚糖类抗原,与消化道肿瘤具有显著相关性^[11]。CA125水平在肿瘤细胞异常增殖过程中明显上调。CA50主要成分为唾液酸脂和唾液酸糖蛋白,与CA19-9存在一定交叉抗原性^[12],其水平在胰腺癌、结肠直肠癌等消化道恶性肿瘤发生时显著增加。本研究对胃癌患者、健康体检者血清肿瘤标志物进行比较,结果显示,前者血清CA72-4、CA19-9、CA125、CA50水平明显高于后者。国内学者刘红芬等^[13]研究也表明,血清CA72-4、CA19-9水平在胃癌患者中呈高表达,并与临床分期存在正相关关系。马逸婷等^[14]报道也证实了,血清CA724、CA125联合检测有助于提高病理学检查诊断胃癌价值。这可能是由于胃癌发生时,可促使糖基转化酶失活,或重新激活胚胎期转化酶,从而导致细胞表面糖类结构发生变化,抗原性质改变,主要表现为上述血清肿瘤标志物水平异常升高。说明血清CA72-4、CA19-9、CA125、CA50对胃癌早期诊断具有一定价值。

此外,本研究结果得出95%医学参考值范围,分别为 ≤ 6.75 U/mL、 ≤ 36.84 U/mL、 ≤ 34.98 U/mL、 ≤ 22.56 μ g/L,以期为临床应用提供一定参考。进一步以95%医学参考值范围为阳性判定标准,发现血清CA72-4、CA19-9、CA125、CA50水平单一诊断胃癌早期敏感度、特异度较低。基于既往对多项血清肿瘤标志物联合检测在肿瘤诊断、治疗过程中的作用基础^[15-16],由此推测联合检测血清肿瘤标志物有助于提高胃癌早期诊断效能,利于指导临床拟定个性化精准治疗,促进预后改善。

综上所述,通过对健康体检人群进行调查得出CA72-4、CA19-9、CA125、CA50医学参考值范围,并提示其在胃癌早期诊断中具有一定应用价值,可作为胃癌早期诊断的辅助指标。但本研究存在一定局限性,研究结果来源仅采集了一次的血液样本,未考虑相关检测指标的波动性,结果稳定性有待进一步验证。

参考文献

[1] Machlowska J, Baj J, Sitarz M, et al. Gastric Cancer: Epidemiology, Risk Factors, Classification, Genomic Characteris-

- tics and Treatment Strategies [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(11):4012.
- [2] 薛正和. 增强CT和经腹超声在胃癌诊断及分期中的临床价值比较[J]. *实用医学影像杂志*, 2020, 21(1):74-75.
- [3] 彭晓琳,李桂炼,林海波,等. 深圳市居民高发癌症高风险人群筛查情况分析[J]. *华南预防医学*, 2017, 43(4):344-346.
- [4] Miki Y, Yashiro M, Kuroda K, et al. Circulating CEA-positive and EpCAM-negative tumor cells might be a predictive biomarker for recurrence in patients with gastric cancer [J]. *Cancer Med*, 2021, 10(2):521-528.
- [5] 王宁,付立业,隋承光,等. 胃癌患者血清中IGF-1与CEA、CA125、CA199、CA724水平的相关性分析及在胃癌诊断中的意义[J]. *中国实验诊断学*, 2021, 25(2):194-197.
- [6] Wu T, Mo Y, Wu C. Prognostic values of CEA, CA19-9, and CA72-4 in patients with stages I - III colorectal cancer [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2020, 13(7):1608-1614.
- [7] Chen J, Wu L, Sun Y, et al. Diagnostic value and clinical significance of circulating miR-650 and CA211 in detecting of gastric carcinoma [J]. *Oncol Lett*, 2020, 20(5):254.
- [8] 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]. *中华消化杂志*, 2014, 34(7):433-448.
- [9] Huang C, Xiao L, Luo HL, et al. Preoperative neutrophil-to-lymphocyte ratio combined with serum CEA, CA19-9, CA125 and CA72-4 levels in the clinical pathological staging of gastric cancer-based on propensity score matching [J]. *J Biol Regul Homeost Agents*, 2020, 34(3):1111-1116.
- [10] Gong X, Zhang H. Diagnostic and prognostic values of anti-helicobacter pylori antibody combined with serum CA724, CA19-9, and CEA for young patients with early gastric cancer [J]. *J Clin Lab Anal*, 2020, 34(7):e23268.
- [11] 杜记涛,曹建,赵稳,等. 血清miR-135、miR-601、CA72-4及CA19-9的表达水平与胃癌诊断的相关性[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2021, 13(1):111-114.
- [12] Luang S, Teeravivrote K, Saentaweek W, et al. Carbohydrate Antigen 50: Values for Diagnosis and Prognostic Prediction of Intrahepatic Cholangiocarcinoma [J]. *Medicina (Kaunas)*, 2020, 56(11):616.
- [13] 刘红芬,王征,王莉,等. 肿瘤标志物对胃癌诊断和预后判断的价值以及与免疫炎症反应指标的相关性[J]. *河北医科大学学报*, 2019, 40(7):855-858.
- [14] 马逸婷,周新华,周向阳. 胃癌患者血清CEA、AFP、CA724、CA125的检测联合病理学检查的临床诊断效果[J]. *实用癌症杂志*, 2021, 36(2):312-315.
- [15] 于伟,赵娜. PG I、PG II、CEA、CA242、CA19-9和CA72-4在胃癌诊断中的应用价值[J]. *实用癌症杂志*, 2019, 34(12):2017-2019.
- [16] 张三,唐姗姗. 糖类抗原724癌胚抗原糖类抗原242糖类抗原199肿瘤标志物联合检验应用于胃癌诊断中的价值分析[J]. *实用医技杂志*, 2019, 26(11):1420-1422.

重症肺炎所致 ARDS 患者血清 cTnI、NT-proBNP 及 CRP 水平变化及临床意义

刘春¹ 邹勇^{2*} 郭燕¹ 陶琳¹ 王晓春³

[摘要] **目的** 探讨重症肺炎所致急性呼吸窘迫综合征(ARDS)患者血清心肌肌钙蛋白 I (cTnI)、氨基末端脑钠肽前体(NT-proBNP)及 C 反应蛋白(CRP)水平变化及临床意义。**方法** 2017 年 12 月-2019 年 12 月收治 102 例的重症肺炎所致 ARDS 患者设为观察组(轻度 35 例、中度 37 例、重度 30 例),选取同期在本院进行体检的 110 例健康者作为对照组。比较各组之间 cTnI、NT-proBNP、CRP 水平,对观察组患者随访 1 年,并比较不同 cTnI、NT-proBNP、CRP 表达的患者预后情况。绘制 ROC 曲线,分析三者单独及联合检测对重症肺炎所致 ARDS 患者预后不良的预测价值。**结果** 观察组 cTnI、NT-proBNP 及 CRP 水平均明显高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。cTnI、NT-proBNP、CRP 水平:轻度组<中度组<重度组,各组间比较差异有统计学意义($P<0.05$)。cTnI、NT-proBNP、CRP 异常增高的重症肺炎所致的 ARDS 患者死亡率明显高于 cTnI、NT-proBNP、CRP 正常表达的患者,差异有统计学意义($P<0.05$)。ROC 曲线分析结果显示,联合 cTnI、NT-proBNP、CRP 三者检测灵敏度、特异度最大,为 0.871、0.880。**结论** 临床可加强 cTnI、NT-proBNP、CRP 三者联合检测,以评估重症肺炎所致 ARDS 患者病情进展、预测预后。

[关键词] 重症肺炎; ARDS; cTnI; NT-proBNP; CRP

Changes and clinical significance of serum cTnI, NT-proBNP and CRP levels in patients with ARDS caused by severe pneumonia

LIU Chun¹, ZOU Yong^{2*}, GUO Yan¹, TAO Lin¹, WANG Xiaochun³

(1. Jiangdi First Aid Station of the Fifth Hospital of Wuhan, Wuhan, Hubei, China, 430050; 2. Wuhan Emergency Center, Wuhan, Hubei, China, 430020; 3. Emergency Department of the Fifth Hospital of Wuhan, Wuhan, Hubei, China, 430050)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the level changes and clinical significance of serum cardiac troponin I (cTnI), N-terminal pro-brain natriuretic peptide (NT-proBNP) and C-reactive protein (CRP) of patients with acute respiratory distress syndrome (ARDS) caused by severe pneumonia. **Methods** 102 patients with ARDS caused by severe pneumonia treated in this hospital from December 2017 to December 2019 were selected as the observation group (35 cases with mild ARDS, 37 cases with moderate ARDS, and 30 cases with severe ARDS). 110 healthy people who had physical examination in this hospital during the same period were selected as the control group. The levels of cTnI, NT-proBNP and CRP between the groups were compared. Patients in the observation group were followed up for 1 year, and the prognosis of patients with different expressions of cTnI, NT-proBNP and CRP were compared. The ROC curve was drawn to analyze the predictive value of the three separate and combined tests on the poor prognosis of ARDS patients caused by severe pneumonia. **Results** The cTnI, NT-proBNP and CRP levels in the observation group were significantly higher

基金项目:湖北省卫生计生委应用基础研究计划面上项目(WX17D15)

作者单位:1. 武汉市第五医院江堤急救站,湖北,武汉 430050

2. 武汉市急救中心,湖北,武汉 430020

3. 武汉市第五医院急救科,湖北,武汉 430050

*通信作者:邹勇, E-mail:83807973@qq.com

than those in the control group, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). The levels of cTnI, NT-proBNP and CRP: the mild group < the moderate group < the severe group, and the differences between the groups were statistically significant ($P<0.05$). The mortality of ARDS patients caused by severe pneumonia with abnormal increasing of cTnI, NT-proBNP and CRP was significantly higher than that of patients with normal expression of cTnI, NT-proBNP and CRP, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). The results of ROC curve analysis showed that the sensitivity and specificity of the combined detection of cTnI, NT-proBNP and CRP were the highest, which were 0.871 and 0.880. **Conclusion** Clinically, the combined detection of cTnI, NT-proBNP, and CRP can be strengthened to assess the disease progression and predict the prognosis of ARDS patients caused by severe pneumonia.

[KEY WORDS] Severe pneumonia; ARDS; cTnI; NT-proBNP; CRP

重症肺炎是肺炎患者中常见的危重症,主要表现为高热、呼吸困难、肺部啰音或痰鸣音,该病病情进展快,预后较差,病情严重者可诱发急性呼吸窘迫综合征(Acute respiratory distress syndrome, ARDS),危及生命^[1]。重症肺炎患者除了伴有明显的感染表现,还存在严重的炎性状态,会造成心肌损伤,心肌损伤越严重患者预后越差。重症肺炎合并 ARDS 患者病死率较高,而 ARDS 的发病机制十分复杂,涉及炎症效应、组织损伤等多方面^[2],目前临床医学尚未完全明确该病的发病机制。已有较多文献证实,重症肺炎合并 ARDS 患者免疫功能紊乱,血液中大量内毒素刺激内皮细胞等多种细胞,刺激炎性介质大量释放,因此血清 CRP 浓度较高^[3-4]。心肌肌钙蛋白 I (Cardiac Troponin, cTnI) 及氨基末端脑钠肽前体 (N-terminal pro-brain natriuretic peptide, NT-proBNP) 均是诊断心力衰竭的重要指标,在心血管疾病的诊断、筛选中具有较高的应用价值^[5]。本研究旨在探讨重症肺炎所致 ARDS 患者血清 cTnI、NT-proBNP、CRP 的表达情况,并分析三者联合检测对重症肺炎所致 ARDS 患者预后死亡的预测价值。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取本院 2017 年 12 月至 2019 年 12 月收治的 102 例重症肺炎所致 ARDS 患者作为观察组。纳入指标:①均符合重症肺炎所致 ARDS 的相关诊断标准^[6],正位 X 线胸片显示双肺均有斑片状阴影;②年龄 < 80 岁;③未合并肺部其他病变者;④临床资料无缺损或丢失;⑤患者均已签署知情同意书。排除标准:①非重症肺炎引起的 ARDS;②近 3 个月内有激素、免疫抑制剂等服用史;③并大面积肺栓塞、慢性阻塞性肺病、肺动脉高压、恶性肿瘤、免疫功能异常者;④伴有慢性基础病者、精神

疾病者。其中男 63 例,女 39 例;平均年龄(62.63 ± 5.77)岁,根据柏林定义 ARDS 诊断标准^[7]评估患者病情严重程度,轻度($200 \text{ mmHg} < \text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 300 \text{ mmHg}$) 35 例、中度($100 \text{ mmHg} < \text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 200 \text{ mmHg}$) 37 例、重度($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 100 \text{ mmHg}$) 30 例。另选取同期在本院进行体检的 110 例健康者作为对照组,其中男 54 例,女 56 例;平均年龄(62.51 ± 5.60)岁。两组一般资料比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。本研究经本院伦理委员会审核通过。

1.2 方法

抽取所有受检者 5 mL 外周静脉血(观察组于入院时、对照组为健康体检时),以 4 000 r/min 离心 10 min,分离血清,置于 -70°C 低温保存。按照厂家提供的实验流程用双抗体夹心酶联免疫吸附法检测血清 cTnI 水平,试剂盒购自上海蓝基生物有限公司。NT-proBNP 水平采用化学发光法检测,CRP 水平采用比浊法检测。NT-proBNP 检测仪器:罗氏电化学发光分析仪。CRP 检测仪器:贝克曼 Beckman AU5832 全自动生化分析仪。具体操作方法严格按照说明书进行。

1.3 观察指标

1.3.1 cTnI、NT-proBNP、CRP 检测

比较不同组别之间 cTnI、NT-proBNP、CRP 水平。cTnI: $>0.04 \text{ ng/mL}$ 视为异常增高^[8]。NT-proBNP: $4 \sim 20 \text{ ng/L}$, $>20 \text{ ng/L}$ 视为异常增高^[9]; CRP: $0 \sim 5 \text{ mg/L}$, $>5 \text{ mg/L}$ 视为异常增高^[10]。

1.3.2 随访

对观察组患者随访 1 年,随访方式:电话随访或门诊复查,随访截止时间:2020 年 12 月,了解患者预后死亡情况,并比较不同预后的患者 cTnI、NT-proBNP、CRP 水平。

1.3.3 ROC 曲线分析

绘制受试者工作特征曲线(receiver operating

characteristic curve, ROC), 计算 cTnI、NT-proBNP、CRP 及三者联合 ROC 曲线下面积 (Area under ROC curve, AUROC), 以分析三者单独及联合检测对重症肺炎所致 ARDS 患者预后不良的预测价值。

1.4 统计学方法

应用 SPSS 22.0 软件进行数据分析。计数资料以 $n(\%)$ 表示, 行 χ^2 检验; 计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 组间比较行 t 检验, 多组间比较行 F 检验; 绘制 ROC 曲线, 计算 cTnI、NT-proBNP、CRP 及三者联合 AUC, 以分析三者及三者联合对重症肺炎所致 ARDS 患者预后不良的预测价值; 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2组 cTnI、NT-proBNP 及 CRP 水平比较

观察组 cTnI、NT-proBNP 及 CRP 水平均明显高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 两组 cTnI、NT-proBNP 及 CRP 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)
Table 1 Comparison of cTnI, NT proBNP and CRP levels between 2 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	cTnI (ng/mL)	NT-proBNP (ng/L)	CRP (mg/L)
观察组	102	4.84±1.20	42.65±8.33	7.34±0.84
对照组	110	0.03±0.01	12.12±2.14	0.89±0.12
t 值		42.045	37.147	79.676
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

2.2 不同病情严重程度 ARDS 患者 cTnI、NT-proBNP 及 CRP 水平比较

cTnI、NT-proBNP、CRP 水平: 轻度组 < 中度组 < 重度组, 各组间比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 不同病情严重程度 ARDS 患者 cTnI、NT-proBNP 及 CRP 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	cTnI (ng/mL)	NT-proBNP (ng/L)	CRP (mg/L)
轻度组	35	3.20±1.04	32.87±5.69	5.89±0.63
中度组	37	4.56±1.33 ^a	39.66±6.35 ^a	7.73±0.89 ^a
重度组	30	5.37±1.58 ^{ab}	48.69±8.87 ^{ab}	8.61±1.10 ^{ab}
F 值		22.650	41.460	81.900
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

注: ^a与轻度组比较, ^b与中度组比较, $P < 0.05$ 。

2.3 不同 cTnI、NT-proBNP、CRP 表达的患者预后情况

102 例重症肺炎所致的 ARDS 患者在随访 1 年内死亡 38 例 (37.25%), 生存 64 例 (62.75%)。cTnI、

NT-proBNP、CRP 异常增高的重症肺炎所致的 ARDS 患者死亡率明显高于 cTnI、NT-proBNP、CRP 正常表达的患者, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 不同 cTnI、NT-proBNP、CRP 表达的患者预后情况 [$n(\%)$]

Table 3 prognosis of patients with different expression of cTnI, NT proBNP and CRP [$n(\%)$]

不同指标	死亡 ($n=38$)	生存 ($n=64$)	χ^2 值	P 值	
cTnI	异常增高	32 (84.21)	30 (46.88)	13.943	<0.001
	正常表达	6 (15.79)	34 (53.13)		
NT-proBNP	异常增高	29 (76.32)	29 (45.31)	9.343	0.002
	正常表达	9 (23.68)	35 (54.69)		
CRP	异常增高	33 (86.84)	33 (51.56)	12.995	<0.001
	正常表达	5 (13.16)	31 (48.44)		

2.4 cTnI、NT-proBNP、CRP 检测及三者联合检测对重症肺炎所致 ARDS 患者预后死亡的预测价值

ROC 曲线分析结果显示, 联合 cTnI、NT-proBNP、CRP 三者检测灵敏度、特异度最大, 为 0.871、0.880。见表 4、图 1。

表 4 cTnI、NT-proBNP、CRP 检测及三者联合检测对重症肺炎所致 ARDS 患者预后死亡的预测价值

Table 4 the predictive value of cTnI, NT proBNP, CRP and their combined detection in the prognosis of ARDS patients caused by severe pneumonia

预测指标	最佳临界值	灵敏度	特异度	AUC	95%CI
cTnI	25.58	0.845	0.861	0.756	0.599~0.892
NT-proBNP	25.42	0.834	0.885	0.893	0.796~0.990
CRP	25.89	0.895	0.925	0.825	0.701~0.949
三者联合检测	25.14	0.871	0.880	0.934	0.865~1.000
预测指数模型	1.666	0.891	0.935	0.854	0.854~0.958

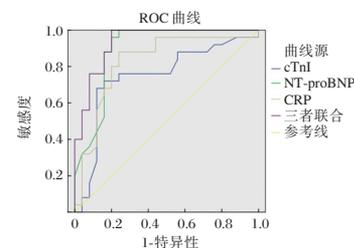


图 1 cTnI、NT-proBNP、CRP 检测及三者联合检测对重症肺炎所致 ARDS 患者预后死亡的预测价值

Figure 1 the predictive value of cTnI, NT proBNP, CRP and their combined detection in the prognosis of ARDS patients with severe pneumonia

3 讨论

肺炎是临床上的常见病及多发病, 特别是重

症肺炎,起病急、发展快,若不及时治疗,易并发ARDS,增大患者死亡风险。重症肺炎并发ARDS早期诊断困难,部分患者因此错过最佳治疗时机而造成难以挽回的后果。因此,临床急需一种准确、有效、便捷的诊断方法,以便于评估重症肺炎患者并发ARDS的风险,预测预后。

CRP是一种急性时相反应蛋白,为临床常用于检测炎症反应发生的重要标志物^[11]。当机体发生炎症、感染或损伤时,正常浓度的CRP可以激活补体和加强吞噬细胞的吞噬作用,并清除入侵机体的病原微生物,在免疫过程中具有重要的保护作用。既往研究表明,CRP浓度可在一定程度上反映重症肺炎合并ARDS患者病情变化情况,CRP可作为评估重症肺炎合并ARDS患者病情进展的重要指标之一^[12]。Seitz等^[13]研究指出,在急性呼吸衰竭患者中,CRP水平会随着患者病情稳定而逐渐下降。本研究结果提示CRP可作为评估重症肺炎所致ARDS患者预后情况的有效指标。

NT-proBNP属于心肌功能状态生物学标志物,主要在心肌细胞合成和分泌,在心室压力变化、心肌细胞牵拉等因素的作用下升高。近年来,有国外学者报道,NT-proBNP具有血半衰期长、水平较高、体外稳定性高等优点,在急性呼吸困难鉴别诊断、预后判断和指导治疗中的应用价值更大^[14]。分析重症肺炎所致ARDS患者NT-proBNP水平升高的原因:患者病情发展的过程中,引发严重缺氧,加速肺血管的收缩,易导致心肌细胞缺氧,同时增加了心输出量,引发患者心肌损伤,最终导致NT-proBNP水平升高^[15]。

cTnI是临床常用于检测心肌损伤的标志物。本研究中轻度、中度、重度组ARDS患者cTnI水平比较差异有统计学意义,重度组cTnI水平显著高于轻度组及中度组,提示重度组ARDS患者心肌损伤程度较其他组明显加重,这一研究结果与Bhattacharjee等学者^[16]研究结果相一致。绘制ROC曲线,进一步发现:三者联合检测灵敏度、特异度显著高于单一指标检测,提示在重症肺炎所致ARDS患者病程中可联合三者进行动态检测,并对患者进行抗炎治疗、营养心肌,以控制稳定患者病情。

综上所述,临床可加强cTnI、NT-proBNP、CRP三者联合检测,评估重症肺炎所致ARDS患者病情进展、预测预后。

参考文献

- [1] Chiumello D, Coppola S, Froio S. Prone position in ARDS: a simple maneuver still underused [J]. *Int Care Med*, 2018, 44(2):241.
- [2] 赵娜,郑华月,乔瑞君.重症MPP患儿D-D,CRP,PAF及血小板参数测定的临床意义[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2020, 12(8):121-124.
- [3] Williams AE, Ricardo J José, Mercer PF, et al. Evidence for chemokine synergy during neutrophil migration in ARDS [J]. *Thorax*, 2017, 15(23):78-83.
- [4] Grégoire Murielle, Fabrice U, Mathieu L, et al. Impaired efferocytosis and neutrophil extracellular traps clearance by macrophages in ARDS [J]. *Eur Res J*, 2018, 15(20):17-23.
- [5] Matthieu J, Raiko B, Bruno P, et al. Plasma sRAGE is independently associated with increased mortality in ARDS: a meta-analysis of individual patient data [J]. *Intensive Care Med*, 2018, 44(13):87-91.
- [6] Desprez K, Mcneil JB, Wang C, et al. Oxygenation saturation index predicts clinical outcomes in ARDS. [J]. *Chest*, 2017, 17(8):142-148.
- [7] Skuja L, Kajihara K, Smits K, et al. Luminescence and Raman Detection of Molecular Cl 2 and ClO Molecules in Amorphous SiO 2 Matrix [J]. *J Phys Chem C*, 2017, 121(9):87-92.
- [8] Vincent JL, Slutsky AS. We've never seen a patient with ARDS! [J]. *Intensive Care Med*, 2020, 46(12):46-52.
- [9] Kalyanaraman M, Mcqueen D, Morparia K, et al. ARDS in an ex-premature infant with bronchopulmonary dysplasia and COVID-19 [J]. *Pediatr Pulmonol*, 2020, 55(33):58-62.
- [10] Kreitmann L, Céline Monard, Dauwalder O, et al. Early bacterial co-infection in ARDS related to COVID-19 [J]. *Intensive Care Med*, 2020, 46(9):33-38.
- [11] 康孟杰,王薇,韩朝霞,等.糖尿病酮症酸中毒患者PCT、CRP、乳酸水平与感染关系[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2021, 13(3):487-490.
- [12] Moazed F, Hendrickson C, Conroy A, et al. Cigarette Smoking and ARDS After Blunt Trauma: The Influence of Changing Smoking Patterns and Resuscitation Practices [J]. *Chest*, 2020.
- [13] Seitz T, Hoepfer W, Weseslindtner L, et al. Successful management of the first reported case in Austria of COVID-19 with ARDS [J]. *Infection*, 2020, 48(4):14-20.
- [14] Jrn H, Aubin H, Sugimura Y, et al. Electrophysiological Stimulation of Whole Heart Constructs in an 8-Pole Electrical Field [J]. *Artificial Organs*, 2018, 42(12):391-405.
- [15] Luchner A, Von HS, Holubarsch C, et al. [Indications and Clinical Implications of the Use of the Cardiac Markers BNP and NT-proBNP]. [J]. *Deutsche Med Wochenschrift*, 2017, 142(5):346-352.
- [16] Bhattacharjee R, Kheirandish-Gozal L, Kaditis AG, et al. C-reactive Protein as a Potential Biomarker of Residual Obstructive Sleep Apnea Following Adenotonsillectomy in Children [J]. *J Hunan Normal Univers*, 2017, 39(2):354-359.

创伤性四肢骨折患者血液因子变化及其与术后血栓的关系

郑海亮 刘晶* 任志勇 宋君 毛清军

[摘要] 目的 探究创伤性四肢骨折患者血液中性粒细胞百分比(NET)、干扰素- γ (IFN- γ)、血管性血友病因子(vWF)水平与术后血栓形成的关系。方法 选取2020年3月至2021年1月本院收治的创伤性176例四肢骨折患者作为研究对象,分析术后血栓发生情况,根据术后是否形成血栓分为血栓组和无血栓组。分析患者血液NET、IFN- γ 、vWF水平与创伤性四肢骨折术后血栓形成的关系。结果 176例创伤性四肢骨折患者术后37例有血栓形成,术后血栓发生率为21.02%(37/176)。术后1d血栓组血液中D-D、CRP、NET、IFN- γ 、vWF水平均显著高于无血栓组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。血栓组年龄 ≥ 60 岁、首次下床活动时间 ≥ 7 d、糖尿病史分布和血液中D-D、CRP、NET、IFN- γ 、vWF水平均显著高于无血栓组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。年龄 ≥ 60 岁、首次下床活动时间 ≥ 7 d、糖尿病史、D-D、CRP、NET、IFN- γ 、vWF水平是创伤性四肢骨折患者术后血栓形成的高危因素($P<0.05$)。创伤性四肢骨折术后血栓患者NET、vWF水平与D-D呈明显正相关($P<0.05$),NET、IFN- γ 水平与CRP也呈明显正相关($P<0.05$)。结论 血液中D-D、CRP、NET、IFN- γ 、vWF水平相互作用,与创伤性四肢骨折患者术后血栓的形成密切相关。

[关键词] 创伤性四肢骨折; NET; IFN- γ ; vWF; 血栓

Changes of blood factors in patients with traumatic limb fractures and their relationship with postoperative thrombus

ZHENG Hailiang, LIU Jing*, REN Zhiyong, SONG Jun, MAO Qingjun

(Shan Dong Sunshine Union Hospital, Weifang, Shandong, China, 261042)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the relationship between blood neutrophil percentage (NET), interferon- γ (IFN- γ), von Willebrand factor (vWF) levels and postoperative thrombus in patients with traumatic limb fractures. **Methods** 176 patients with traumatic limb fractures admitted to the hospital between March 2020 and January 2021 were selected as the research subjects. The occurrence of postoperative thrombus was analyzed. According to the presence or absence of postoperative thrombus, the patients were divided into the thrombus group and the non-thrombus group. The relationship between blood NET, IFN- γ , vWF levels and postoperative thrombus was analyzed. **Results** Thirty-seven of 176 patients with traumatic limb fractures had thrombosis after operation, and the postoperative thrombosis rate was 21.02% (37/176). The blood levels of D-D, CRP, NET, IFN- γ , and vWF in the thrombus group were significantly higher than those in the non-thrombus group at 1 day after operation, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). The age of the thrombosis group was ≥ 60 years, the time to get out of bed for the first time ≥ 7 days, the history of diabetes, and the blood levels of DD, CRP, NET, IFN- γ , and vWF were significantly higher than those of the non-thrombosis group, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). Age ≥ 60 years old, first ambulation time ≥ 7 d, diabetes history, and the levels of blood D-D, CRP, NET, IFN- γ and vWF were high risk factors for postoperative thrombus in patients with traumatic limb fractures ($P<0.05$). NET and vWF levels were significantly positively correlated with D-D in patients with thrombus after operation for traumatic limb

基金项目:山东省医药卫生科技发展计划项目(2019WS167)

作者单位:山东阳光融和医院骨科中心,山东,潍坊 261042

*通信作者:刘晶, E-mail:liujing-suh@sinosig.com

fractures ($P<0.05$). Moreover, the levels of NET and IFN- γ were significantly positively correlated with CRP ($P<0.05$). **Conclusion** The levels of blood D-D, CRP, NET, IFN- γ and vWF interact closely with the formation of postoperative thrombus in patients with traumatic limb fractures.

[KEY WORDS] Traumatic limb fracture; NET; IFN- γ ; vWF; Thrombus

创伤性四肢骨折以关节疼痛、肿胀及功能障碍、肢体活动受限等症状常见^[1]。手术为创伤性四肢骨折患者主要选择,术后患者凝血因子异常引起血管内皮细胞受损,处于高凝状态,易形成血栓,血栓为创伤性四肢骨折术后常见并发症之一,是影响患者预后的重要因素^[2]。创伤性四肢骨折患者因机体应激功能障碍易出现凝血功能障碍而引起纤维蛋白溶解系统等紊乱,血管性血友病因子(Von Willebrand factor, vWF)可通过激活内源性凝血途径,致使下游凝血因子活化异常,在增加血栓性疾病风险中发挥重要作用^[3]。创伤性四肢骨折常伴有炎症反应,因机体生理病理出现紊乱,补体系统激活后易引起凝血功能异常,受创伤性因素影响,机体免疫功能被激活^[4]。中性粒细胞百分比(Neutrophil count, NET)为创伤后炎症反应的重要免疫细胞^[5],干扰素- γ (Interferon- γ , IFN- γ)是巨噬细胞活化的重要因子,在活化单核细胞和巨噬细胞及促进炎症细胞释放方面发挥积极作用^[6]。基于此本文将探究创伤性四肢骨折患NET、IFN- γ 、vWF水平与术后血栓形成的关系,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2020年3月至2021年1月本院收治的创伤性四肢骨折患者176例。纳入标准:①符合《实用骨科学》^[7]诊断标准;②患者及家属知晓本研究内容,签署知情同意书;③伤后48 h内入院;④资料完整;⑤近未服用抗凝及抗炎药物;⑥无手术禁忌症。排除标准:①重要脏器功能障碍;②存在心脑血管疾病史;③术前合并血栓;④存在恶性肿瘤史;⑤合并全身血液系统疾病或濒临死亡。男92例、女84例,年龄平均(49.27 \pm 5.19)岁,致伤原因:高处坠落伤24例、重物砸伤43例、交通事故109例。本次研究经本院医学伦理委员会批准同意。

1.2 研究方法

1.2.1 资料收集

采集患者一般资料,包含性别、年龄、体质量指数(Body mass index, BMI)、致伤原因、首次下床活动时间、糖尿病史、高血压史等。

1.2.2 血液指标检测

患者入院后24 h内(术前)、术后1 d常规采集肘部静脉血7 mL,置入抗凝剂EP管中,3 mL常规离心(1 000 r/min)5 min获取血清,另4 mL常规离心留取血浆低温保存待测。采用美国雅培i2000型全自动免疫分析仪(电化学发光法)检测血浆中IFN- γ 、vWF水平;采用散射比浊法检测血清DD和CRP水平,试剂盒由福建新大陆生物技术有限公司提供;采用法国ABX-OT18血细胞自动分析仪检测外周血中NET。

1.2.3 血栓形成判断^[8]

入组患者均于术后3个月均接受四肢血管彩色多普勒超声检查,血栓评估标准:静脉管腔无法压闭;管腔内呈低回声或无回声;血栓段静脉内无血流信号,或者偶探及少量血流信号;脉冲多普勒提示无血流。

1.3 统计学处理

采用SPSS 20.0软件进行统计分析,计数资料采用 $n(\%)$ 表示,行 χ^2 检验,计量资料采用($\bar{x}\pm s$)表示,行 t 检验。影响因素分析以二元Logistic回归分析,以Pearson参数进行相关性分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 176例创伤性四肢骨折患者术后血栓形成情况分析

176例创伤性四肢骨折患者术后37例有血栓形成,术后血栓发生率为21.02%(37/176),139例术后未发生血栓,占比为78.98%(139/176)。

2.2 手术前后两组血液中D-D、CRP、NET、IFN- γ 、vWF水平比较

术后1 d血栓组血液中D-D、CRP、NET、IFN- γ 、vWF水平均显著高于无血栓组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表1。

2.3 影响创伤性四肢骨折患者术后血栓形成的单因素分析

血栓组年龄 ≥ 60 岁、首次下床活动时间 ≥ 7 d、糖尿病史分布和血液中D-D、CRP、NET、IFN- γ 、vWF水平均显著高于无血栓组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表2。

表1 手术前后两组血液中D-D、CRP、NET、IFN- γ 、vWF水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of blood D-D, CRP, NET, IFN- γ and vWF levels between 2 groups before and after operation ($\bar{x} \pm s$)

指标	时间点	血栓组 (n=37)	无血栓组 (n=139)	t值	P值
D-D($\mu\text{g/L}$)	术前	294.31 \pm 29.21	296.08 \pm 30.07	0.320	0.749
	术后1 d	512.46 \pm 51.37 ^a	461.34 \pm 46.25 ^a	5.836	<0.001
CRP(mg/L)	术前	18.30 \pm 1.89	17.99 \pm 1.81	0.917	0.360
	术后1 d	29.31 \pm 2.87 ^a	21.52 \pm 2.26 ^a	17.554	<0.001
NET(%)	术前	80.21 \pm 8.14	79.64 \pm 8.09	0.380	0.704
	术后1 d	124.35 \pm 13.67 ^a	90.24 \pm 10.28 ^a	16.661	<0.001
IFN- γ ($\mu\text{g/L}$)	术前	5.81 \pm 0.61	5.79 \pm 0.59	0.182	0.856
	术后1 d	12.31 \pm 1.24 ^a	7.24 \pm 1.01 ^a	25.815	<0.001
vWF(U/mL)	术前	0.95 \pm 0.10	0.94 \pm 0.09	0.587	0.558
	术后1 d	1.64 \pm 0.21 ^a	1.12 \pm 0.16 ^a	16.386	<0.001

注:与同组术前比较,均^a $P < 0.05$ 。

表2 影响创伤性四肢骨折患者术后血栓形成的单因素分析 [$n(\%)$, ($\bar{x} \pm s$)]

Table 2 Single factor analysis of postoperative thrombus in patients with traumatic limb fractures [$n(\%)$, ($\bar{x} \pm s$)]

相关因素	n	血栓组 (n=37)	无血栓组 (n=139)	χ^2/t 值	P值
年龄(岁)	-			13.538	0.000
<60	142	22(59.46)	120(86.33)		
≥ 60	34	15(40.54)	19(13.67)		
性别	-			1.531	0.216
男	92	16(43.24)	76(54.68)		
女	84	21(56.76)	63(45.32)		
BMI(kg/m ²)	-			0.013	0.911
<24	108	23(62.16)	85(61.15)		
≥ 24	68	14(37.84)	54(38.85)		
致伤原因	-			0.001	0.999
高处坠落伤	24	5(13.51)	19(13.67)		
重物砸伤	43	9(24.32)	34(24.46)		
交通事故	109	23(62.16)	86(61.87)		
首次下床活动时间	-			15.627	0.000
<7 d	63	3(8.11)	60(82.01)		
≥ 7 d	113	34(91.89)	79(17.99)		
糖尿病史	-			5.545	0.019
是	51	14(37.84)	27(19.42)		
否	125	23(62.16)	112(80.58)		
高血压史	-			0.559	0.455
是	44	11(29.73)	33(23.74)		
否	132	26(70.27)	106(76.26)		
D-D($\mu\text{g/L}$)	176	512.46 \pm 51.37	461.34 \pm 46.25	5.836	<0.001
CRP(mg/L)	176	29.31 \pm 2.87	21.52 \pm 2.26	17.554	<0.001
NET(%)	176	124.35 \pm 13.67	90.24 \pm 10.28	16.661	<0.001
IFN- γ ($\mu\text{g/L}$)	176	12.31 \pm 1.24	7.24 \pm 1.01	25.815	<0.001
vWF(U/mL)	176	1.64 \pm 0.21	1.12 \pm 0.16	16.386	<0.001

2.4 创伤性四肢骨折患者术后血栓形成的二元 Logistic 回归分析

以创伤性四肢骨折患者术后血栓有无为因变量,单因素分析中有统计学意义指标为自变量进

行赋值(年龄: ≥ 60 岁=1、 < 60 岁=0;首次下床活动时间: ≥ 7 d=1、 < 7 d=0;糖尿病史:是=1、否=0;D-D、CRP、NET、IFN- γ 、vWF水平以实际值为准),经二元 Logistic 回归分析提示年龄 ≥ 60 岁、首次下床活动时间 ≥ 7 d、糖尿病史、D-D、CRP、NET、IFN- γ 、vWF水平是创伤性四肢骨折患者术后血栓形成的高危因素($P < 0.05$)。见表3。

表3 创伤性四肢骨折患者术后血栓形成的二元 Logistic 回归分析

Table 3 Binary Logistic regression analysis of postoperative thrombus in patients with traumatic limb fractures

变量	OR值	95%CI	P值
年龄	1.383	1.061~1.081	0.017
首次下床活动时间	1.533	1.124~2.089	0.007
糖尿病史	1.476	1.192~1.827	<0.001
D-D	1.587	1.247~2.020	<0.001
CRP	1.621	1.093~2.404	0.017
NET	1.533	1.144~2.052	0.004
IFN- γ	1.626	1.273~2.077	<0.001
vWF	1.654	1.192~2.294	0.003

2.5 创伤性四肢骨折术后血栓患者 NET、IFN- γ 、vWF 水平与 D-D、CRP 相关性分析

创伤性四肢骨折术后血栓患者 NET、vWF 水平与 D-D 呈明显正相关($P < 0.05$), NET、IFN- γ 水平与 CRP 也呈明显正相关($P < 0.05$)。见表4。

表4 创伤性四肢骨折术后血栓患者 NET、IFN- γ 、vWF 水平与 D-D、CRP 相关性分析

Table 4 Correlation analysis of NET, IFN- γ , vWF levels and D-D, CRP in patients with thrombus after traumatic limb fracture operation

指标	D-D		CRP	
	r值	P值	r值	P值
NET	0.397	<0.001	0.476	<0.001
IFN- γ	0.215	>0.05	0.507	<0.001
vWF	0.624	<0.001	0.195	>0.05

3 讨论

本研究显示术后血栓发生率21.02%,较董玉金等^[9]报道的创伤骨折深静脉血栓发生率11.99%的略高,较孙健平等^[10]报道多发伤患者围手术期深静脉血栓发生率42.08%低。分析原因可能是本研究对象为创伤性四肢骨折术后患者,静脉血栓的发生部位以四肢(尤其是下肢)为主,且四肢创伤骨折患者因外力所致深静脉内膜挫伤,容易启动外源性凝血途径导致血栓形成。另一方面术后因需长期卧床休息,深静脉血流速度慢,血液凝固

性增加,失血、手术操作及机体应激状态等,容易导致患者血液处于高凝状态,患者术后血栓发生风险较高^[11]。血栓形成后一旦处理不及时将进一步造成肺栓塞或远期下肢深静脉功能不全,甚至猝死^[12]。

本研究显示术后创伤性四肢骨折患者血液中D-D、CRP、NET、IFN- γ 、vWF呈明显高表达状态,还证实年龄 ≥ 60 岁、首次下床活动时间 ≥ 7 d、糖尿病史、D-D、CRP、NET、IFN- γ 、vWF水平是创伤性四肢骨折患者术后血栓形成的高危因素,与上述董玉金等报道的年龄、CRP、D-D等与创伤性骨折患者深静脉血栓形成密切相关,及黄松涛等^[13]报道的年龄是髌部骨折患者不良预后的影响因素的观点大体相符。但也有部分学者认为年龄对骨折患者术后血栓形成不存在明显影响,可能是因为不同研究中对年龄分段或研究对象来源存在差异。糖尿病史和首次下床活动时间 ≥ 7 d同样会明显增加创伤性四肢骨折患者术后血栓形成风险,与盛小燕等^[14]研究证实糖尿病是膝关节置换术后血栓事件的危险因素一致。高血糖易诱发血管内皮损伤,刺激机体炎症介质释放,术后创伤愈合进度慢,术后首次下床活动时间越长肢体血流更易淤滞,术后血栓风险更高。提示有必要将老年、有糖尿病的创伤性四肢骨折患者作为术后血栓形成的高危人群,同时建议创伤性四肢骨折患者术后应尽早开展活动锻炼。

本研究证实D-D、CRP、NET、IFN- γ 、vWF与创伤性四肢骨折患者术后血栓形成密切相关,分析原因可能是创伤性四肢骨折患者接受手术治疗后,机体凝血系统稳态被打破,术后患者应激反应和炎症反应被激活,导致凝血酶原形成凝血酶最后进入血液中,诱发血栓形成。D-D水平升高预示血液处于高凝状态^[15],而vWF则可通过影响血管内皮细胞功能,致使内皮细胞功能损伤,导致患者血栓形成风险增加。NET、IFN- γ 作为炎症标志物,文献报道两者与老年骨折术后患者预后存在关联性^[16]。本研究结果显示,NET、IFN- γ 与创伤性四肢骨折患者术后血栓形成密切相关,可能是因外伤应激下机体处于高凝血状态和炎症反应状态,术后血栓形成风险高。进一步研究显示患者NET、vWF水平与D-D呈明显正相关,NET、IFN- γ 水平与CRP也呈明显正相关,说明血液D-D、CRP、NET、IFN- γ 、vWF表达相互影响,共同参与创伤性四肢骨折患者术后血栓形成。

综上所述,本文初步证实创伤性四肢骨折患者术后D-D、CRP、NET、IFN- γ 、vWF与创伤性四肢

骨折患者血栓形成有关,围术期需加强创伤性四肢骨折患者术后血液相关指标的监测,对降低血栓形成风险有重要意义。

参考文献

- [1] 范新宇,王腾,刘华,等. Masquelet技术治疗枪弹伤所致四肢开放性骨折[J]. 中华创伤骨科杂志, 2020, 22(4):304-308.
- [2] Liang X, Xiao Y, Hui Z, et al. The efficacy of 3D printing-assisted surgery for traumatic fracture: a meta-analysis [J]. Postgrad Med J, 2019, 95(1126):414-419.
- [3] Siddiqui F, Hoppensteadt D, Bontekoe E, et al. Decreased Thrombin Generation Potential in Lymphoma Patients is associated with Increased D-dimer, CRP, vWF and TNF- α . Interrelationship between Thrombogenesis and Inflammation [J]. FASEB J, 2020, 34(1):26-28.
- [4] 陈定爽,王萧枫,张骏,等. 新伤续断汤结合针刺内麻点对四肢骨折治疗效果,四肢功能恢复以及免疫功能影响研究[J]. 中华中医药学刊, 2020, 38(12):209-212.
- [5] 陈聪,毋凡,覃茂鑫,等. 严重创伤后免疫炎症反应机制及相关临床干预研究进展[J]. 中华创伤杂志, 2019, 35(10):953-960.
- [6] Jo YG, Kim JC, Jin HM, et al. Natural Killer T Cells Are Numerically and Functionally Deficient in Patients with Trauma [J]. J Innate Immun, 2020, 12(4):1-11.
- [7] 胥少汀. 实用骨科学[M]. 第4版. 北京:人民军医出版社, 2012:224-228.
- [8] 曹玉净,吕秋霞,李扬. 创伤骨折下肢深静脉血栓形成及感染危险因素分析[J]. 中国病原生物学杂志, 2019, 153(9):110-113.
- [9] 董玉金,张铁慧,钟声,等. 创伤骨折患者深静脉血栓形成的危险因素分析[J]. 中华骨科杂志, 2015, 35(11):1077-1083.
- [10] 孙健平,王鹏飞,薛汉中,等. 多发伤患者围手术期深静脉血栓形成的发生及危险因素[J]. 中华创伤骨科杂志, 2019, 21(1):39-43.
- [11] Tsuneyuki U, Yusuke Y, Sugiura T, et al. Prediction of Portal Vein Thrombosis Following Hepatectomy for Perihilar Cholangiocarcinoma: Efficacy of Postoperative Portal Vein Diameter Ratio and Angle [J]. Anticancer Res, 2019, 39(9):5019-5026.
- [12] Chao J, Kui C, Bin T, et al. Crohn's Disease Complicated With Extensive Thrombosis of Limbs and Mesenteric Arteries: A Case Report and Literature Review [J]. Ann Vasc Surg, 2019, 32(15):37-39.
- [13] 黄松涛,陈文辉,龙治强. 老年髌部骨折患者入院时中性粒细胞/淋巴细胞比值与术后病死率的相关性分析[J]. 中国医师杂志, 2020, 22(11):1724-1727.
- [14] 盛小燕,秦钰莹,黎赛,等. 膝关节置换术后患者血栓性事件相关性因素分析[J]. 中国矫形外科杂志, 2020, 28(15):1354-1357.
- [15] 吴鲲鹏,韦程,何同. D-二聚体联合血栓弹力图对急性脑出血患者出血量及死亡风险的评估[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(11):41-45.
- [16] 徐荣良,刘林,许铁,等. 血常规参数对骨折术后深静脉血栓形成的预测价值[J]. 中华实验外科杂志, 2020, 37(2):363-365.

CRP、LDH、SF 预测小儿 MPP 并发全身炎症反应综合征效能

李锐* 周大权 纵雪峰

【摘要】目的 探讨C反应蛋白(CRP)、乳酸脱氢酶(LDH)、铁蛋白(SF)预测小儿肺炎支原体肺炎(MPP)并发全身炎症反应综合征(SIRS)的效能。方法 选取2017年1月至2020年10月本院MPP患儿102例,根据是否并发SIRS分为SIRS组、无SIRS组,比较两组治疗前、治疗1、2 d后CRP、LDH、SF表达水平,分析并发SIRS影响因素及各指标预测效能。结果 两组组间、不同时间点CRP、LDH、SF比较,差异有统计学意义($P<0.05$);SIRS组治疗1、2 d后CRP、LDH、SF较治疗前升高,差异有统计学意义($P<0.05$),无SIRS组治疗1、2 d后CRP、LDH、SF较治疗前降低,差异有统计学意义($P<0.05$);SIRS组治疗1、2 d后CRP、LDH、SF较无SIRS组升高,差异有统计学意义($P<0.05$);治疗1 d后、治疗2 d后CRP、LDH、SF升高均是并发SIRS影响因素($P<0.05$);治疗1 d后、治疗2 d后CRP、LDH、SF联合预测MPP并发SIRS效能高于单一检测($P<0.05$)。结论 动态检测MPP患儿CRP、LDH、SF水平能判断病情程度,且能预测SIRS的发生,准确把握MPP发生发展,有助于临床治疗方案的制定与调整。

【关键词】 C反应蛋白;脱氢酶;铁蛋白;肺乳酸炎支原体肺炎;全身炎症反应综合征

Efficacy of CRP, LDH and SF in predicting the systemic inflammatory response syndrome in children with MPP

LI Rui*, ZHOU Daquan, ZONG Xuefeng

(Department of Pediatrics, Suixi County Hospital of Anhui, Huaibei, Anhui, China, 235100)

【ABSTRACT】 **Objective** To investigate the efficacy of C-reactive protein (CRP), lactate dehydrogenase (LDH), and serum ferritin (SF) in predicting children with *Mycoplasma pneumoniae pneumonia* (MPP) complicated by systemic inflammatory response syndrome (SIRS). **Methods** From January 2017 to October 2020, 102 children with MPP in our hospital were selected and divided into the SIRS group and the non-SIRS group according to whether they were concurrent with SIRS. The CRP, LDH, and SF were compared between the two groups before treatment and after 1 and 2 days of treatment, and the influencing factors of concurrent SIRS and the predictive efficacy of each indicator were analyzed. **Results** CRP, LDH and SF were compared between the two groups at different time points, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). The CRP, LDH and SF in the SIRS group increased after 1, 2 days of treatment ($P<0.05$), The CRP, LDH and SF in the non-SIRS group decreased after 1, 2 days of treatment compared to before treatment ($P<0.05$). The CRP, LDH, and SF in the SIRS group were higher than those in the non-SIRS group after 1 and 2 days of treatment ($P<0.05$). The increase of CRP, LDH, and SF after 1 and 2 days of treatment are all influencing factors of SIRS ($P<0.05$). the combination of CRP, LDH, and SF is more effective in predicting MPP complicated by SIRS after 1 and 2 days of treatment than that of single detection ($P<0.05$). **Conclusion** Dynamic detection of CRP, LDH and SF levels in children with MPP can judge the severity of the disease, predict the occurrence of SIRS, accurately grasp the occurrence and development of MPP, and help the formulation and adjustment of clinical treatment plans.

【KEY WORDS】 C-reactive protein; Lactate dehydrogenase; Serum ferritin; *Mycoplasma pneumoniae pneumonia*; Systemic inflammatory response syndrome

基金项目:安徽省自然科学基金项目资助(1608085QH203)

作者单位:安徽省濉溪县医院儿科,安徽,淮北 235100

*通信作者:李锐, E-mail: lirui18256121199@163.com

肺炎支原体肺炎(Mycoplasma Pneumoniae Pneumonia, MPP)是儿科常见呼吸道感染性疾病,占儿童社区获得性肺炎的10%~40%,且近年来发生率呈逐渐升高趋势^[1];若治疗不及时会引发全身炎症反应综合征(Systemic Inflammatory Response Syndrome, SIRS),严重威胁患儿生命,引起临床普遍关注。国内外多个研究表明,MPP并发SIRS发生发展过程通常与理化指标变化密切相关,临床寻找快捷、灵敏实验室指标具有重要意义^[2-3]。C反应蛋白(C-Reactive Protein, CRP)是临床最常见的非特异性炎症因子指标,在多种细菌感染期间会急剧升高^[4]。乳酸脱氢酶(Lactate Dehydrogenase, LDH)普遍存在于各组织细胞,若发生破坏性损伤,则会释放至血液中,其水平明显升高^[5]。而铁蛋白(Serum Ferritin, SF)属于急性时相蛋白,参与细胞增殖代谢与免疫调控,在多种疾病中显著升高。目前国内关于MPP并发SIRS的病情诊断及预测研究尚少,基于此本研究首次探讨CRP、LDH、SF预测MPP并发SIRS的效能。现报告如下。

1 资料和方法

1.1 一般资料

选取2017年1月至2020年10月本院MPP患儿102例,均符合《儿童肺炎支原体肺炎诊治专家共识(2015年版)》中相关诊断标准^[6];均伴有发热、咳嗽等临床表现,X线胸片表现为点状或小斑片状浸润影、间质性改变或节段性实质浸润影;肺炎支原体抗体IgM或IgG呈现阳性。排除入院2d内并发SIRS患儿;入院时伴有病毒性或细菌性肺炎、支气管喘息、其他感染性疾病;肺结核、病毒性或衣原体肺炎;合并免疫系统、血液系统、内分泌系统疾病;由于其他疾病进行气管插管;使用药物或合并其他疾病会影响CRP、LDH、SF水平;合并心肝肾等重要脏器功能障碍。并根据治疗7d内是否并发SIRS分为SIRS组($n=15$)、无SIRS组($n=87$),儿童SIRS判定标准:a体温 $>38^{\circ}\text{C}$ 或 $<36^{\circ}\text{C}$;b心率大于各年龄组正常均值加2个标准差;c呼吸大于各年龄组正常值加2个标准差或二氧化碳分压 $<32\text{ mmHg}$;d外周血白细胞计数 $>12\times 10^9/\text{L}$ 或 $<4\times 10^9/\text{L}$,或杆状核细胞 >0.10 。所有患儿家属均知情同意。本实验经伦理委员会批准同意。

1.2 方法

①CRP、LDH、SF水平检测:均采集治疗前、治

疗1、2d后静脉血4 mL,置于抗凝管中,以3 000 r/min的速度离心10 min,离心半径为10 cm,分离得到血清,采用全自动生化分析仪(深圳市普康电子有限公司)进行测定,其中CRP采用散射比浊法测定,试剂盒购自深圳市希莱恒医用电子有限公司;LDH采用速率法测定,试剂盒购自广州阳普医疗科技股份有限公司;SF采用免疫层析法测定,试剂盒购自广州菲康生物技术有限公司。②治疗方案:均给予大环内酯类抗菌药物抗肺炎支原体治疗,并进行退热、平喘、止咳、水电解质平衡等对症治疗,若出现缺氧情况,需给予吸氧治疗。

病程判断标准^[6]:自初次确诊MPP至今。病情程度判断标准:若出现经大环内酯内抗生素 $>7\text{ d}$ 无效、合并明显气促、心动过速、呼吸困难、动脉血压下降,经影像学检查有大面积致密影且 $\geq 2/3$ 肺部或合并肺不张、胸腔积液、合并心力衰竭、低氧血症等症状则为重症,否则为轻症。

1.3 观察指标

①对比两组一般资料。②对比治疗前、治疗1d、2d后两组CRP、LDH、SF水平。③采用Logistic回归方程分析MPP患儿并发SIRS的影响因素。④采用受试者工作特征曲线(ROC)曲线分析治疗1、2d后CRP、LDH、SF预测小儿MPP并发SIRS的效能。

1.4 统计学方法

采用SPSS 22.0对数据进行分析,计数资料以 $n(\%)$ 表示,行 χ^2 检验;计量资料采用 $(\bar{x}\pm s)$ 表示,两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析;采用Logistic进行多因素回归分析;预测效能分析采用ROC曲线,获取曲线下面积(AUC),联合预测实施Logistic二元回归拟合,返回预测概率 $\text{logit}(p)$,将其作为独立检验变量,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组一般资料比较

两组年龄、性别、体质量指数、MPP病程、病情程度比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表1。

2.2 两组CRP、LDH、SF比较

两组组内比较:SIRS组治疗1、2d后CRP、LDH、SF较治疗前升高($P<0.05$),无SIRS组治疗1、2d后CRP、LDH、SF较治疗前降低,差异有统计学意义($P<0.05$);组间比较:两组治疗前各指标相似,

表1 两组一般资料 [n(%), ($\bar{x} \pm s$)]
Table 1 General information of the two groups [n(%), ($\bar{x} \pm s$)]

资料	SIRS组 (n=15)	无SIRS组 (n=87)	t/ χ^2 值	P值
年龄(岁)	5.26±2.12	5.14±2.07	0.207	0.837
性别	男	13(56.52)	0.289	0.591
	女	10(43.48)		
体质量指数(kg/m ²)	24.12±2.18	23.91±2.11	0.454	0.650
MPP病程(d)	9.75±3.21	10.12±3.14	0.420	0.675
病情程度	轻度	14(60.87)	0.436	0.509
	重度	9(39.13)		

差异无统计学意义(P>0.05), SIRS组治疗1、2 d后CRP、LDH、SF较无SIRS组升高, 差异有统计学意义(P<0.05)。见表2。

2.3 是否并发SIRS影响因素的Logistic回归方程分析

Logistic回归方程结果显示, 治疗1 d后CRP、LDH、SF高于均值者并发SIRS的风险, 治疗2 d后CRP、LDH、SF高于均值者并发SIRS的风险(P<0.05)。见表3。

表3 并发SIRS影响因素分析
Table 3 Analysis of influencing factors of concurrent SIRS

影响因素	β	SE	Wald χ^2	OR值	95%CI	P值
治疗1 d后						
CRP	0.429	0.114	14.139	1.535	1.305~1.806	<0.001
LDH	0.248	0.084	8.728	1.282	1.170~1.404	<0.001
SF	0.471	0.139	11.465	1.601	1.449~1.769	<0.001
治疗2 d后						
CRP	0.547	0.129	17.984	1.728	1.576~1.895	<0.001
LDH	0.365	0.105	12.092	1.441	1.286~1.614	<0.001
SF	0.726	0.185	15.399	2.067	1.779~2.401	<0.001

2.4 治疗1 d后各指标预测效能

治疗1 d后CRP、LDH、SF预测小儿MPP并发SIRS的AUC依次为0.726、0.798、0.689; Logistic二元回归拟合, 返回预测概率logit(p)分析各指标联合预测小儿MPP并发SIRS的ROC, 结果显示, 治疗1 d后各指标联合的AUC为0.889。见表4、图1。

表2 两组CRP、LDH、SF比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of CRP, LDH, SF between the two groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	CRP(mg/L)			LDH(U/L)			SF(μ g/L)		
	治疗前	治疗1 d后	治疗2 d后	治疗前	治疗1 d后	治疗2 d后	治疗前	治疗1 d后	治疗2 d后
SIRS组 (n=15)	38.97±12.24	45.68±13.27	52.28±18.39	307.18±76.39	342.56±80.96	369.18±97.22	224.51±68.59	264.84±60.05	281.15±62.37
无SIRS组 (n=87)	35.86±10.39	29.14±10.05	24.61±9.57	298.59±80.17	261.18±75.54	208.97±62.27	215.37±62.34	184.49±51.26	161.17±50.84
t值	1.043	5.602	8.813	0.386	3.814	8.397	0.517	5.466	8.158
P值	0.300	<0.001	<0.001	0.701	<0.001	<0.001	0.606	<0.001	<0.001

表4 治疗1 d后各指标预测效能的ROC分析结果

Table 4 ROC analysis results of the predictive efficacy of each index after 1 day of treatment

指标	AUC	95%CI	cut-off值	敏感度 (%)	特异度 (%)	P值
CRP	0.726	0.629~0.810	>39.4 mg/L	53.33	87.36	<0.001
LDH	0.798	0.707~0.871	>289.62 U/L	80.00	70.11	<0.001
SF	0.689	0.590~0.777	>220.09 μ g/L	73.33	58.62	<0.001
联合	0.889	0.812~0.943		86.67	81.61	<0.001

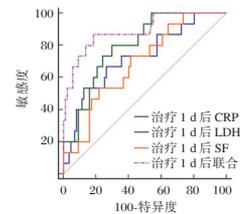


图1 治疗1 d后各指标预测效能

Figure 1 Predictive efficacy of each index after 1 day of treatment

2.5 治疗2 d后各指标预测效能

治疗2 d后CRP、LDH、SF各指标联合预测小儿MPP并发SIRS的ROC, 结果显示AUC为0.925。见表5、图2。

表5 治疗2 d后各指标预测效能的ROC分析结果

Table 5 ROC analysis results of the predictive efficacy of each index after 2 days of treatment

指标	AUC	95%CI	cut-off值	敏感度 (%)	特异度 (%)	P值
CRP	0.781	0.688~0.857	>43.74 mg/L	60.00	88.51	<0.001
LDH	0.831	0.744~0.898	>289.01 U/L	93.33	62.07	<0.001
SF	0.844	0.758~0.908	>235.31 μ g/L	80.00	79.31	<0.001
联合	0.925	0.855~0.968		93.33	87.36	<0.001

3 讨论

MP是儿童急性呼吸道感染的重要病原体, 广泛存在于全球范围, 可经直接接触与飞沫传播, 潜伏期为1~3周, 且每3~7年会出现地区周期性流行, 值得注意的是无呼吸道感染症状的儿童MP携

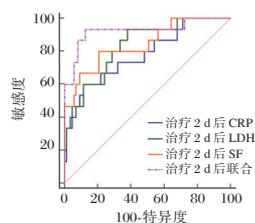


图2 治疗2 d后各指标预测效能

Figure 2 Predictive efficacy of each index after 2 days of treatment

带率为21.2%^[7-8]。若未进行积极干预治疗,极易发展为SIRS,因此,临床对于MPP合并SIRS的早期准确评估预测是遏制病情发展的关键。

相关研究指出,呼吸道感染MP后会直接侵入肺部组织,造成过度炎症反应,且MPP患儿肺组织在病原菌刺激下会大量释放多种细胞因子^[9]。本研究结果显示两组组间、不同时间点、组间·不同时间点CRP、LDH、SF比较有差异在感染性疾病鉴别诊断中,CRP水平受到高度重视,血清浓度发生绝对性升高,具有检测简单快速的优势,动态监测可评估病情程度及并发症发生^[10];且CRP是机体免疫系统中不可或缺部分,在多种感染性疾病中均会显著升高,若发热时间持续10 d,CRP水平>40 mg/L则可诊断为难治性MPP。宣爱丽等^[11]学者研究也表明,MPP患儿血清CRP水平会明显升高,可作为病情评估与早期诊断的重要指标。SIRS是机体在多种感染或非感染因素刺激下会产生失控的全身性炎症反应,对所有MPP患儿给予抗感染治疗后,合并SIRS患儿全身炎症性反应会持续性加重,而无SIRS患儿体温下降,病情好转,CRP呈明显降低趋势^[12],且随着治疗时间延长,变化趋势越明显,与病情程度具有明显相关性。

同时,既往研究提出LDH可作为早期预测重症与难治性MPP的重要指标^[13]。肺炎支原体感染后机体受到氧自由基刺激,往往会损害心肌功能,诱导其分泌一系列心肌酶,而心肌酶谱的重要检测指标是LDH,且MP本身毒素也会刺激心肌细胞^[14];心肌损伤后LDH并释放至血液中,促进其水平迅速升高,可作为病情严重程度及预后的可靠指标^[15]。本研究结果表明LDH水平与病情密切相关。另外,SF是目前临床一致认可的急性时相反应蛋白,能调节免疫系统,在细胞代谢增殖中发挥重要作用,对于外伤、感染、肿瘤等因素刺激下会短时间内急剧升高^[16]。给予MPP患儿相关对

症治疗方案后,未并发SIRS患儿炎症反应减轻,SF水平会显著下降,而炎症反应进一步加重发展为SIRS患儿其水平会呈现持续性升高状态,表明SF可能是MPP并发SIRS的重要影响因素。近年来研究趋向于多个生物标记物联合应用于临床检测,本研究为进一步探究CRP、LDH、SF价值,通过绘制ROC曲线进行分析,联合预测MPP并发SIRS效能高于单一检测,表明本研究中3个因子具有较高预测价值,且联合检测应用可进一步提升,为临床治疗提供参考依据。

综上所述,动态检测MPP患儿CRP、LDH、SF水平能判断病情程度,且能预测SIRS的发生,准确把握MPP发生发展,有助于临床治疗方案的制定与调整。

参考文献

- [1] 王鑫,宋真,白媛媛,等. 2013-2015年某医院儿童社区获得性肺炎病原菌分布及耐药特征[J]. 药物流行病学杂志, 2017, 26(3): 194-198.
- [2] Yan C, Xue G, Zhao H, et al. Molecular and clinical characteristics of severe Mycoplasma pneumoniae pneumonia in children[J]. *Pediatr Pulmonol*, 2019, 54(7): 1012-1021.
- [3] 常春霞. 难治性肺炎支原体肺炎患儿实验室指标及临床特点分析[J]. 中国妇幼保健, 2019, 34(5): 1085-1088.
- [4] 康孟杰,王薇,韩朝霞,等. 糖尿病酮症酸中毒患者PCT、CRP、乳酸水平与感染关系[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2021, 13(3): 487-490.
- [5] 李宁,陈言钊,周克英. 乳酸脱氢酶在儿童难治性肺炎支原体肺炎诊断和治疗中的意义[J]. 中国小儿急救医学, 2017, 24(4): 305-308.
- [6] 中华医学会儿科学分会呼吸学组,《中华实用儿科临床杂志》编辑委员会. 儿童肺炎支原体肺炎诊治专家共识(2015年版)[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2015, 30(17): 1304-1308.
- [7] Qu J, Yang C, Bao F, et al. Epidemiological characterization of respiratory tract infections caused by Mycoplasma pneumoniae during epidemic and post-epidemic periods in North China, from 2011 to 2016[J]. *BMC Infect Dis*, 2018, 18(1): 335.
- [8] 赵娜,郑华月,乔瑞君. 重症MPP患儿D-D、CRP、PAF及血小板参数测定的临床意义[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(8): 1099-1102.
- [9] 薛宝强,王廷智. 支原体肺炎患儿的机体炎症反应、Th1/Th2免疫应答评估及其与病原菌负荷的相关性[J]. 海南医学院学报, 2018, 24(3): 338-341.
- [10] Kim JH, Kwon JH, Lee JY, et al. Clinical features of Mycoplasma pneumoniae coinfection and need for its testing in influenza pneumonia patients[J]. *J Thorac Dis*, 2018, 10(11): 6118-6127.

(下转第1170页)

ROC曲线在河源市新生儿G6PD缺乏症筛查截断值中的应用

刘运华* 吴坤 刘晓燕

[摘要] **目的** 建立河源地区新生儿G6PD缺乏症筛查截断值。**方法** 取新生儿足跟血滤纸干血斑以荧光免疫分析法测定G6PD活性,取外周血以比值法进行验证,部分新生儿进行G6PD基因突变分析,应用MedCalc软件制作受试者工作特征曲线确定G6PD筛查截断值。**结果** 在男性中,筛查截断值为3.00 U/gHb、4.50 U/gHb和4.42 U/gHb时,灵敏度分别为96.38%、98.84%、98.84%,特异度分别为99.83%、99.61%和99.62%,约登指数分别为0.962、0.985和0.985,阳性似然比分别为566.94、253.44和260.11,阴性似然比分别为0.04、0.01、0.01。在女性中,筛查截断值为3.00 U/gHb、4.50 U/gHb和4.42 U/gHb时,灵敏度分别为62.69%、92.84%和92.84%,特异度分别为99.10%、93.72%和94.32%,约登指数分别为0.618、0.866和0.872,阳性似然比分别为69.66、14.78和16.34,阴性似然比分别为0.38、0.08和0.08。不同基因突变位点导致不同程度的G6PD活性下降,以3.00 U/gHb为截断值将会漏诊部分G6PD杂合突变女性新生儿。评估近五年河源辖区内分娩新生儿筛查情况,以4.50 U/gHb为截断值可避免漏诊4 078例可疑G6PD缺乏症者。**结论** 综合各评价指标,本实验室仍采用4.50 U/gHb作为G6PD缺乏症筛查截断值。新生儿G6PD缺乏症筛查截断值的建立,可为河源地区今后的筛查工作提供依据与参考。

[关键词] ROC曲线; 荧光免疫分析法; 截断值; 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏症; 基因突变

Application of ROC curve in the cut-off value of G6PD deficiency screening for newborns in Heyuan City

LIUYunhua*, WU Kun, LIU Xiaoyan

(Department of Medical Genetic Laboratory, Heyuan Maternal and Child Health Care Hospital, Heyuan, Guangdong, China, 517000)

[ABSTRACT] **Objective** To establish a screening cut-off value for neonatal glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency in Heyuan area. **Methods** Dried blood spots on neonatal heel blood filter paper were used to determine G6PD activity by fluorescence immunoassay. Peripheral blood was taken for verification by ratio method. Some neonates were subjected to G6PD gene mutation analysis, and MedCalc software was used to make receiver operating characteristic curve to determine the cut-off value of G6PD screening. **Results** In males, when the cut-off values were 3.00 U/gHb, 4.50 U/gHb, and 4.42 U/gHb, the sensitivities were 96.38%, 98.84%, and 98.84%, the specificities were 99.83%, 99.61%, and 99.62%, the Youden indices were 0.962, 0.985, and 0.985, the positive likelihood ratios were 566.94, 253.44, and 260.11, and the negative likelihood ratios were 0.04, 0.01, and 0.01, respectively. In females, when the cut-off values were 3.00 U/gHb, 4.50 U/gHb, and 4.42 U/gHb, the sensitivities were 62.69%, 92.84%, and 92.84%, the specificities were 99.10%, 93.72%, and 94.32%, the Youden indices were 0.618, 0.866 and 0.872, the positive likelihood ratios were 69.66, 14.78, and 16.34, and the negative likelihood ratios were 0.38, 0.08, and 0.08,

基金项目:广东省医学科研基金资助项目(A2017431)

作者单位:广东省河源市妇幼保健院医学遗传实验室,广东,河源 517000

*通信作者:刘运华, E-mail:lyh4531692@163.com

respectively. Different gene mutation sites lead to different degrees of decline in G6PD activity, and some female newborns with heterozygous G6PD mutations were missed by using 3.00 U/gHb as the cut-off value. The status of newborns screening in Heyuan City in the past five years was evaluated, the cut-off value of 4.50 U/gHb can avoid missed diagnosis of 4078 cases of suspected G6PD deficiency. **Conclusion** Based on the evaluation indexes, our laboratory still uses 4.50 U/gHb as the cut-off value for G6PD deficiency screening. The establishment of cut-off value for neonatal G6PD deficiency screening can provide a basis and reference for future screening work in Heyuan area.

[KEY WORDS] ROC Curve; Fluorescence Immunoassay; Cut-off; Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency; Gene mutation

大多数葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency, G6PD)缺乏症终生无症状,而感染等促发因素作用下或者在伯氨喹、拉布立酶等药物使用下,会导致严重急性溶血性贫血和黄疸^[1]。研究发现,新生儿黄疸患者中G6PD缺乏症的优势比(Odds Ratio)为8.01^[2],及早发现和治疗能够有效避免和减少输血治疗。

按《新生儿疾病筛查技术规范(2010年版)》^[3]和《新生儿疾病筛查管理办法》^[4]要求,用荧光免疫分析法测G6PD活性进行筛查。G6PD活性受基因调控,研究表明G6PD缺乏症有遗传异质性,发现200多种G6PD基因突变位点^[5]。G6PD的活性和稳定性与突变位点密切相关^[6]。因不同种族、地域G6PD基因突变频率不同及实验环境等多方面的差异,需建立实验室的截断值。用ROC曲线法建立河源地区新生儿G6PD缺乏症筛查截断值,为当地出生人群G6PD防控策略提供依据。

1 材料与方法

1.1 标本

标本均在家属同意条件下采集。检测2015年1月至2020年12月在辖区内分娩的新生儿干血斑,共213 261例,男性113 842例,女性99 419例。按《新生儿疾病筛查技术规范(2010年版)》^[3]要求,纳入标准:充分哺乳条件下,于分娩后3~7天(早产儿、极低体重儿等可延迟至20天)采血,至少3个血斑,且每个血斑直径大于8毫米,血滴自然渗透,滤纸正反面血斑一致,无污染。常温下平放晾干,应避免紫外线或阳光照射,信息完整。排除标准:血斑过小,血滴未渗透,有污染,溶血,信息不完整等。研究经医院伦理委员会批准同意开展。

1.2 试剂与仪器

G6PD测定试剂盒(荧光法,6199860,芬兰雷勃诊断试剂有限公司,960T/盒)、G6PD测定试剂

盒(比值法,20152400813,科方生物技术股份有限公司,A液:5 mL/盒,B液:5 mL/盒)、G6PD基因突变检测试剂盒(20071501,厦门致善生物科技股份有限公司,48T/盒)。Fluoroskan Ascent 荧光读数仪(Thermo,美国)、iEMS 恒温孵育振荡器(Thermo,美国)、ANI LabSystems Woodpecker 打孔仪(Thermo,美国)、日立7180全自动生化分析仪(HITACHI,日本)、核酸提取仪Lab-Aid 824(致善,中国)、实时荧光PCR仪CFX96(伯乐,美国)。

1.3 筛查方法

按说明书操作,以中、低值的质控品作为质量控制,每年参与并通过国家临床检验中心室间质量评价。结果判断:以说明书推荐的截断值(≤ 3.00 U/gHb)或暂行截断值(≤ 4.50 U/gHb),如G6PD活性 ≤ 3.00 或 4.50 U/gHb为筛查阳性;如G6PD活性 > 3.00 或 4.50 U/gHb为筛查阴性。按《新生儿疾病筛查管理办法》^[4]召回管理制度,非本院分娩的筛查阳性新生儿由采血单位召回验证。

1.4 验证方法

取枸橼酸抗凝血2 mL,以G6PD/6PGD比值法进行验证。验证结果判断:新生儿(年龄 ≤ 28 d),比值 > 1.1 ,判为阴性,1.05 \leq 比值 ≤ 1.10 为可疑阳性,建议复查,比值 < 1.05 ,判为阳性;非新生儿(年龄 > 28 d),比值 > 1.0 ,判为阴性,0.95 \leq 比值 ≤ 1.00 为可疑阳性,建议复查,比值 < 0.95 ,判为阳性。

1.5 G6PD基因突变检测

取EDTA抗凝血2 mL,用荧光PCR熔解曲线法测中国人群常见12种突变点:c.517T>C、c.392G>T、c.487G>A、c.592C>T、c.95A>G、c.871G>A、c.1004C>A、c.1024C>T、c.1360C>T、c.1376G>T、c.383T>C和c.1388G>A。

1.6 统计学分析

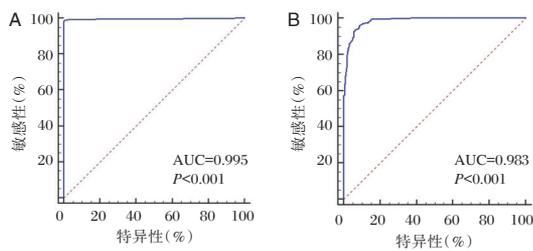
用SPSS 19.0软件进行分析;计数资料用 n (%)表示,用 χ^2 检验;计量资料用($\bar{x} \pm s$)表示,组间

比较用独立样本 *t* 检验; 筛查截断值用 ROC 曲线, 用 MedCalc 软件制作受试者工作特征曲线; $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 G6PD 缺乏症筛查截断值的建立

在男性和女性组中, G6PD 缺乏症分别占 21.00% (1548/7373)、25.04% (335/1338), ROC 曲线下面积分别为 0.995 (标准误为 0.001, 95% CI: 0.993~0.997, $U=367.727$, $P < 0.001$)、0.983 (标准误为 0.0002, 95% CI: 0.974~0.989, $U=174.302$, $P < 0.001$), 对应男、女性的截断值均为 4.42 U/gHb。见图 1。



注: A 为男性 G6PD 缺乏症筛查 ROC 曲线。B 为女性 G6PD 缺乏症筛查 ROC 曲线。

图 1 G6PD 活性 ROC 曲线

Figure 1 ROC Curve for G6PD Activity

2.2 不同 G6PD 截断值的相关指标评价

对说明书推荐的截断值 (3.00 U/gHb)、暂行截断值 (4.50 U/gHb)、ROC 曲线推荐的截断值 (4.42 U/gHb) 进行分析, 不同截断值在不同性别中的相关评价指标。见表 1、表 2。

2.3 部分新生儿 G6PD 基因突变情况

随机选取 14 名男性与 27 名女性新生儿行 G6PD 基因检测, 结果: 在男性组, 11 名未发现突变位点, 3 名半合子突变, 突变位点分别为 c.1376G>T、c.95A>G、c.871G>A。在女性组, 4 名未发现突变位点, 1 名双杂合子突变 (c.1024C>T 合并 c.1376G>T), 22 名杂合子突变: 突变位点依次为 9 例 c.1376G>T、6 例 c.1388G>A、2 例 c.95A>G、1 例 c.871G>A、1 例 c.392G>T、1 例 c.517T>C、1 例 c.519C>T、1 例 c.592C>T。选择女性新生儿的 G6PD 突变基因与 G6PD 活性和 G6PD/6PGD 比值均进行相关性分析, 21 例 G6PD 杂合突变新生儿 G6PD 活性大于 3.00 U/gHb, 其中 8 例 G6PD/6PGD 比值 < 1.05 为 G6PD 缺乏症者, 13 例 G6PD/6PGD 比值 ≥ 1.05 。见图 2。

2.4 不同截断值 G6PD 缺乏症筛查情况

截断值由 3.00 U/gHb 升至 4.50 U/gHb, 女性阳性率明显升高, 男性升高不明显, 见表 3。

表 1 男性新生儿不同 G6PD 截断值的相关指标评价

Table 1 Evaluation of relevant indicators of different G6PD cut-off values in male newborns

截断值 (U/gHb)	阳性预测值 (%)	阴性预测值 (%)	假阳性率 (%)	假阴性率 (%)	灵敏度 (%)	特异度 (%)	Youden 指数	阳性似然比	阴性似然比
3.00	99.33	99.05	0.17	3.62	96.38	99.83	0.962	566.94	0.04
4.50	98.52	99.69	0.39	1.16	98.84	99.61	0.985	253.44	0.01
4.42	98.58	99.69	0.38	1.16	98.84	99.62	0.985	260.11	0.01

表 2 女性新生儿不同 G6PD 截断值的相关指标评价

Table 2 Evaluation of relevant indicators of different G6PD cut-off values in female newborns

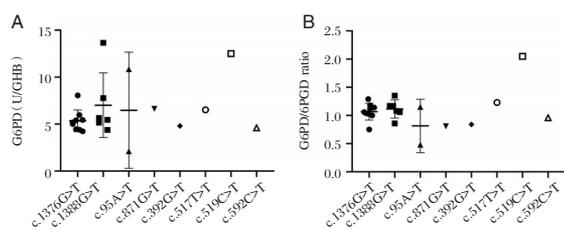
截断值 (U/gHb)	阳性预测值 (%)	阴性预测值 (%)	假阳性率 (%)	假阴性率 (%)	灵敏度 (%)	特异度 (%)	Youden 指数	阳性似然比	阴性似然比
3.00	95.89	88.83	0.90	37.31	62.69	99.10	0.618	69.66	0.38
4.50	83.16	97.51	6.28	7.16	92.84	93.72	0.866	14.78	0.08
4.42	84.51	97.53	5.68	7.16	92.84	94.32	0.872	16.34	0.08

表 3 不同截断值 G6PD 缺乏症筛查结果 [n(%)]

Table 3 Screening results for G6PD deficiency at different cut-off values [n(%)]

性别	截断值 3.00 U/gHb		截断值 4.50 U/gHb		χ^2 值	P 值
	阳性率	阴性率	阳性率	阴性率		
男性	10.75 (3 918/36 459)	89.25 (32 541/36 459)	11.63 (8 997/77 383)	88.37 (68 386/77 383)	1945.78 ^a	0.00
女性	2.22 (702/31 617)	97.78 (30 915/31 617)	6.52 (4 421/67 802)	93.48 (63 381/67 802)	1123.31 ^b	0.00
总体人群	6.79 (4 620/68 076)	93.21 (63456/68 076)	9.24 (13 418/145 185)	90.76 (131 767/145 185)		

注: a、b 分别是截断值为 3.00 U/gHb 与 4.50 U/gHb 时男女间差异的卡方值。



注: A 为 G6PD 酶活性和 G6PD 突变基因关系。B 为 G6PD/6PGD 比值与 G6PD 突变基因关系。

图2 41例新生儿 G6PD 突变基因分析

Figure 2 Analysis of G6PD mutation gene in 41 newborns

2.5 不同截断值 G6PD 缺乏症筛查阳性确诊情况

截断值为 3.00 U/gHb 时,本院标本筛查总阳性率为 6.66%(1 171/17 575),男性为 10.59%(1 019/9 625),女性为 1.91%(152/7950)。截断值为 4.50 U/gHb 时,本院标本筛查总阳性率为 8.89%(3 669/41 251),男性为 11.61%(2 587/22 285),女性为 5.70%(1 082/18 966)。截断值为 3.00 U/gHb 与 4.50 U/gHb 时确诊情况如表 4。由截断值为 3.00 U/gHb、4.50 U/gHb 时可推算河源新生儿 G6PD 缺乏症总体发生率分别为 6.57%、8.84%。

表4 不同截断值缺乏症初筛阳性新生儿确诊情况 [n(%)]

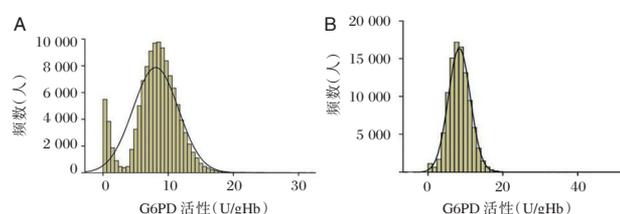
Table 4 Confirmation of newborns with positive primary screening for deficiency at different cut-off values [n(%)]

性别	截断值 3.00 U/gHb		截断值 4.50 U/gHb		χ^2 值	P 值
	符合率	不符合率	符合率	不符合率		
男性	99.25 (530/534)	0.75 (4/534)	98.3 (911/1 008)	1.69 (17/1 008)	11.46 ^a	0.00
女性	94.37 (67/71)	5.63 (4/71)	83.07 (265/319)	16.93 (54/319)	11.15 ^b	0.00
总体人群	98.68 (597/605)	1.32 (8/605)	94.65 (1 256/1 327)	5.35% (71/1 327)		

注:a、b 分别是截断值为 3.00 U/gHb 与 4.50 U/gHb 时男女之间差异的卡方值;总体发生率为筛查总阳性率乘确诊总符合率,即 6.66%*98.68%,8.89%*94.65%。

2.6 河源地区新生儿 G6PD 活性分布情况

113 842 例男性和 99 419 例女性新生儿 G6PD 活性均属正偏态性分布,见图 3。男性组,1%、5%、10%分位数值分别为 0.21 U/gHb、0.62 U/gHb、2.00 U/gHb,均值为 8.06 U/gHb,标准差为 3.49 U/gHb;女性组,1%、5%、10%分位数值分别为 1.02 U/gHb、4.01 U/gHb、4.91 U/gHb,均值为 8.34 U/gHb,标准差为 2.88 U/gHb。截断值由 3.00 U/gHb 升至 4.50 U/gHb 时,男女可分别新增 917、3 791 名可疑 G6PD 缺乏症。



注:A 为男性 G6PD 活性分布;B 为女性 G6PD 活性分布。

图3 新生儿 G6PD 活性分布

Figure 3 Distribution of G6PD activity in newborns

3 讨论

筛查截断值选择有三种方式,一是根据试剂盒截断值来判读结果^[7],二是参考 G6PD 缺乏症新生儿筛查诊断和治疗专家共识^[8],三是根据当地情况,建立截断值。尽管国内有将百分位数法作为

制定筛查截断值的研究,但其无法具体表达敏感度和特异度两者间的关系,仅适用于建立医学参考范围。ROC 曲线通过动态改变 G6PD 活性的截断值,获得对应灵敏度与特异度,较百分位数法更能展示任意截断值时对疾病的识别能力。ROC 曲线的截断值为 4.42 U/gHb,男性和女性 ROC 曲线下面积分别为 0.995、0.983。一般认为 ROC 曲线下面积大于 0.9 时诊断准确性较好。研究发现,以说明书推荐的 3.00 U/gHb 为截断值,可大大减少召回数量,减轻家长经济负担,但会大幅增加假阴性,让 G6PD 缺乏症新生儿错过最佳治疗时期,造成严重后果。综合各评价指标,实验室仍用 4.50 U/gHb 作为 G6PD 缺乏症筛查截断值。

为验证截断值的科学性,随机选取 14 名男性与 27 名女性新生儿行 G6PD 基因检测,研究发现,不同基因突变会导致不同水平的 G6PD 活性下降,与以往研究一致,女性杂合子 G6PD 活性范围波动较大^[9]。部分携带 G6PD 突变基因的女性,其 G6PD 活性为 3.00~4.50 U/gHb,按 3.00 U/gHb 作为截断值,将会漏诊。男性组未发现 G6PD 活性为 3.00~4.50 U/gHb 的半合子新生儿,其原因可能是标本量少。此外发现 c.1376G>T、c.1388G>A、c.95A>G 是 3 种主要基因突变类型,与全国其它地区一致^[10]。

河源地区出生人群 G6PD 缺乏症阳性率高于同为粤北地区的梅州市 5.18%^[11]、清远市 7.94%^[12]、韶关市 5.19%^[13], 结论同以往研究一致^[14-15]。男性 G6PD 缺乏症比女性更易受累, 主要临床表现一般在半合子男性和纯合子女性中被注意到^[16], 而一些杂合女性因临床表现轻而拒绝召回。

研究收集部分新生儿数据绘制 ROC 曲线, 建立的 G6PD 筛查截断值需在临床实践中不断进行验证, 定期重新评估。研究发现, 常规 G6PD 酶测定法易漏诊杂合子女性, 了解女性 G6PD 基因的杂合子状态将有助避免杂合子女性成为氧化应激食物和药物的受害者^[17]。近年来, 有研究人员设置不同 G6PD 活性的截断值, 以区分正常、杂合基因突变个体^[18], 丰富了常规 G6PD 酶测定法的意义。

建立河源地区 G6PD 筛查截断值, 有助于提高本地 G6PD 缺乏症检出率, 减少和预防 G6PD 缺乏引起的系列疾病发生。

参考文献

- [1] Belfield Kristen D, Tichy Eric M. Review and drug therapy implications of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency [J]. *Am J Health Syst Pharm*, 2018, 75(3): 97-104.
- [2] Olusanya BO, Osibanjo FB, Slusher TM. Risk factors for severe neonatal hyperbilirubinemia in low and middle-income countries: a systematic review and meta-analysis [J]. *PLoS One*, 2015, 10(2): 229-244.
- [3] 中华人民共和国卫生部. 新生儿疾病筛查技术规范(2010版)[J]. *上海预防医学*, 2011(6):6-6.
- [4] 中华人民共和国卫生部. 新生儿疾病筛查管理办法[J]. *中华儿科杂志*, 2009, 47(9):672-673.
- [5] Gómez-Manzo S, Marcial-Quino J, Vanoye-Carlo A, et al. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase: Update and Analysis of New Mutations around the World [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(12): 2069-2083.
- [6] Gómez-Manzo S, Terrón-Hernández J, De la Mora-De la Mora I, et al. The stability of G6PD is affected by mutations with different clinical phenotypes [J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(11): 21179-21201.
- [7] 尹利芳, 廖婷婷, 罗建军, 等. 龙岗区近 10 年 361851 例新生儿 G6PD 缺乏症筛查结果分析 [J]. *当代医学*, 2020, 26(13):44-45.
- [8] 中华预防医学会出生缺陷预防与控制专业委员会新生儿筛查学组, 中国医师协会医学遗传医师分会临床生化遗传专业委员会. 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏症新生儿筛查、诊断和治疗专家共识 [J]. *中华儿科杂志*, 2017, 55(6):411-414.
- [9] Chen Y, Xiu W, Dong Y, et al. Mutation of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in Chinese Han children in eastern Fujian [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2018, 97(30): e11553-558.
- [10] 刘秀莲, 王洁, 黄慈丹, 等. 海口地区新生儿 G6PD 基因突变分析 [J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2017, 9(3):165-167.
- [11] 黄烁丹, 邹婕, 吴维, 等. 梅州市 2012-2014 年新生儿四病筛查及干预结果 [J]. *热带医学杂志*, 2015, 15(12):1595-1597+1621.
- [12] 罗炼, 张丽仙, 吴文华. 2013-2017 年清远市新生儿筛查情况分析 [J]. *中国医药科学*, 2018, 8(22):187-189.
- [13] 陈亚军, 黄智勇. 韶关市 2004-2008 年新生儿疾病筛查结果分析 [J]. *中国初级卫生保健*, 2008, 22(12):33-34.
- [14] 吴立文, 钟义宝, 邓辉雨, 等. 河源市新生儿期遗传代谢缺陷病筛查及研究 [J]. *内蒙古医学杂志*, 2016, 48(10):1172-1174.
- [15] 詹小芬, 张芹, 周露, 等. 云南省西双版纳州傣族 G6PD 缺陷症发生率及突变谱研究 [J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2015, 7(2):83-86.
- [16] Luzzatto L, Arese P. Favism and Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency [J]. *N Engl J Med*, 2018, 378(1): 60-71.
- [17] Islam MT, Sarker SK, Talukder S, et al. High resolution melting curve analysis enables rapid and reliable detection of G6PD variants in heterozygous females [J]. *BMC Genet*, 2018, 19(1): 58-66.
- [18] Fu C, Luo S, Li Q. et al. Newborn screening of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in Guangxi, China: determination of optimal cutoff value to identify heterozygous female neonates [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 833-838.

(上接第 1165 页)

- [11] 宣爱丽, 夏群, 张阵, 等. 肺炎支原体肺炎患儿血清降钙素原和 C 反应蛋白水平变化的临床意义 [J]. *蚌埠医学院学报*, 2018, 43(4):488-490+493.
- [12] 王军锋. 血清 IL-6、IL-8、IL-10、TNF- α 检测结果对预防儿童肺炎支原体肺炎的临床意义 [J]. *华南预防医学*, 2017, 43(1):83-85.
- [13] 罗玲云, 邱基庆, 曹冰冰, 等. LDH、CRP 在重症及难治性肺炎支原体肺炎诊断中的临床应用价值 [J]. *临床医学工程*, 2018, 25(1):67-68.
- [14] 朱影, 王婧. 儿童难治性肺炎支原体肺炎高危因素 logistic 回归分析 [J]. *河北医学*, 2018, 24(5):760-763.
- [15] 王月平, 尹飞飞, 赵国厚, 等. IL-6、LDH、D-二聚体水平对恙虫病合并肺部感染患者的临床意义 [J]. *热带医学杂志*, 2020, 20(5):687-691.
- [16] 徐云云, 胡安群, 刘海燕. 5741 例血清铁蛋白增高病例的临床分析 [J]. *标记免疫分析与临床*, 2019, 26(1):102-106.

· 论 著 ·

氨甲环酸联合缩宫素对剖宫产术后 PLT、FIB 及 Hb 水平的影响

俞萍* 徐璨 杨志英 王佳佳

[摘要] **目的** 研究氨甲环酸联合缩宫素对剖宫产术后血小板计数(PLT)、纤维蛋白原(FIB)、血红蛋白(Hb)水平的影响。**方法** 收集2017年1月至2020年5月本院行剖宫产分娩的86例产妇的临床资料。根据不同预防出血方案,分为单一组($n=41$ 例,缩宫素)与联合组($n=45$ 例,氨甲环酸联合缩宫素),比较两组产后出血发生率、术后出血量、围手术期相关指标、外周血液指标、血液流变学指标及不良反应发生情况。**结果** 联合组剖宫产术后出血发生率(8.89%)显著低于单一组(26.83%),术后2 h、24 h出血量均显著低于单一组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。与单一组相比,联合组子宫收缩持续时间延长,子宫底下降速度加快,恶露持续时间缩短,差异有统计学意义($P<0.05$)。术后24 h两组 PLT、FIB 水平均较术前上升,Hb 水平均较治疗前下降,且联合组上述外周血液指标水平改善程度均显著优于单一组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。两组各时点高切全血黏度、低切全血黏度、血浆黏滞度及不良反应发生率比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 氨甲环酸联合缩宫素预防剖宫产术后出血效果良好,可改善产妇凝血功能,且不会导致血液流变学指标异常,安全性较高。

[关键词] 氨甲环酸;缩宫素;剖宫产;产后出血;凝血功能

Effect of tranexamic acid combined with oxytocin on PLT, FIB and Hb levels after cesarean section

YU Ping*, XU can, YANG Zhiying, WANG Jiajia

(Department of Obstetrics and Gynecology, Wuhu Fifth People's Hospital, Wuhu, Anhui, China, 241000)

[ABSTRACT] **Objective** To analyze the effect of tranexamic acid combined with oxytocin on platelet count (PLT), fibrinogen (FIB) and hemoglobin (Hb) levels after cesarean section. The clinical data of 86 parturients with cesarean section in our hospital from January 2017 to May 2020 were collected. According to different bleeding prevention programs, they were divided into a single group ($n=41$ cases, oxytocin) and a combined group ($n=45$ cases, tranexamic acid+oxytocin). The incidence of postpartum hemorrhage, postoperative blood loss, perioperative related indicators, peripheral blood indicators, hemorheology indicators and adverse reactions were compared between the two groups. **Results** The incidence of bleeding after cesarean section in the combined group (8.89%) was significantly lower than that in the single group (26.83%). The blood loss 2 h and 24 h after the operation was significantly lower than that of the single group, the differences were statistically significant ($P<0.05$). Compared with the single group, the duration of uterine contraction in the combined group was prolonged, and the descent rate of uterine fundus was accelerated, and the duration of lochia was shortened ($P<0.05$). At 24 hours after operation, the levels of PLT and FIB in the two groups increased compared with those before operation, and the Hb level decreased, and the improvement of the above-mentioned peripheral blood index levels in the combined group was significantly better than that in the single group, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). There was no significant difference in the whole blood high shear viscosity, the whole blood medium shear viscosity, the whole blood low shear viscosi-

基金项目:安徽省自然科学基金项目(1607085MH113)

作者单位:芜湖市第五人民医院妇产科,安徽,芜湖 241000

*通信作者:俞萍, E-mail: cushi17826@163.com

ty, plasma viscosity, and the incidence of adverse reactions between the two groups at each time point ($P > 0.05$). **Conclusion** Tranexamic acid combined with oxytocin has a good effect on preventing bleeding after cesarean section, can improve the coagulation function of the parturient, and will not cause abnormal hemorheological indicators, and has high safety.

[KEY WORDS] Tranexamic acid; Oxytocin; Cesarean section; Postpartum hemorrhage; Coagulation function

剖宫产术后出血是引发孕产妇死亡的首要原因,发病率约为2%~3%,尤其是孕妇存在前置胎盘、羊水过多、妊娠期高血压等高危妊娠因素情况时,剖宫产术后出血量将明显上升^[1-2]。若无法及时控制出血量会导致产妇出血、失血性休克,严重危害产妇生命。宫缩乏力是导致产妇产后出血的主要原因之一,故加强子宫收缩是预防产后出血的关键,可降低产后并发症发生率与死亡率。缩宫素是临床上防治产后出血的常用宫缩剂^[3]。但缩宫素半衰期较短,无法持续促进子宫收缩,药效消失后仍有出血的风险,且反复使用缩宫素可因缩宫素受体饱和而导致疗效欠佳。因此亟需寻找一种联合药物,更好地预防剖宫产术后出血发生^[4]。氨甲环酸是赖氨酸合成衍生物,在治疗多种出血性疾病中效果已得到认可^[5]。本研究通过探讨氨甲环酸联合缩宫素预防剖宫产术后出血的临床价值,旨在为预防剖宫产术后出血提供可靠意见。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2017年1月至2020年5月本院行剖宫产分娩的86例产妇作为研究对象。纳入标准:①所有孕妇均具有剖宫产指征^[6];②临床病例资料完整,无缺损或丢失;③单胎妊娠;④存在子宫收缩乏力的高风险因素。排除标准:①对本研究使用药物过敏者;②合并凝血功能障碍者;③有宫缩乏力或产后出血病史者;④合并心、肝、肾疾病者。根据不同预防出血方法分为单一组($n=41$ 例)与联合组($n=45$ 例)。两组基线资料比较差异无统计学意义($P > 0.05$),见表1。本研究经本院医学伦理委

员会批准通过,研究对象均签署知情同意书。

1.2 方法

两组产妇均在持续硬膜外麻醉下进行子宫下段横切口剖宫产术。胎儿娩出后,单一组给予缩宫素(上海上药第一生化药业有限公司,国药准字H31020863)20 U静脉滴注,同时宫体注射缩宫素20 U。联合组在对照组基础上给予氨甲环酸(成都倍特药业股份有限公司,国药准字H20030625)1 g+5%葡萄糖注射液10 mL静脉滴注。

1.3 观察指标

1.3.1 剖宫产后产妇出血情况

比较两组产后出血发生率、术后2、24 h出血量。出血量=[胎儿娩出后接血敷料湿重(g)-接血前敷料干重(g)]/1.0(血液比重g/mL)。产后出血产妇^[7]:胎儿娩出24 h内出血量>500 mL,剖宫产时>1 000 mL。

1.3.2 围手术期相关指标

比较两组子宫收缩持续时间、子宫底下降速度及恶露持续时间。

1.3.3 外周血液指标

比较两组术前、术后24 h凝血功能指标变化情况,包括血小板计数(Platelet count, PLT)、纤维蛋白原(Fibrinogen, FIB)及血红蛋白(Hemoglobin, Hb),上述指标均采用全自动血液分析仪检测。

1.3.4 血液流变学指标

比较两组术前、术后24 h血液流变学指标变化情况,包括切全血黏度、低切全血黏度和血浆黏滞度。上述指标均于清晨空腹抽取静脉血,肝素抗凝,恒温37℃下采用全自动血液流变学测定仪检测。参考范围^[8]:全血低切粘度5.84~10.09 mPa/s;全血高切粘度4.74~6.67 mPa/s;血浆黏滞度3.39~5.30 mPa/s。

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

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

组别	n	平均年龄 (岁)	体重指数 (kg/m ²)	孕周 (周)	孕次		高危因素			
					1次	≥2次	羊水过多	巨大儿	前置胎盘	妊娠期高血压
联合组	45	27.54±5.09	27.34±3.59	38.29±2.74	35(77.78)	10(22.22)	12(26.67)	17(37.78)	9(20.00)	7(15.56)
单一组	41	27.16±4.48	27.64±3.87	38.15±2.41	30(73.17)	11(26.83)	13(31.71)	18(43.90)	5(12.20)	5(12.20)
χ^2 值		0.366	0.373	0.251	0.247		1.362			
P值		0.715	0.710	0.803	0.619		0.715			

1.3.5 不良反应

比较两组治疗期间恶心呕吐、腹泻、胸闷等不良反应发生情况。

1.4 统计学方法

采用SPSS 22.0软件进行统计分析,计量资料采用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,行 t 检验;计数资料采用 $n(\%)$ 表示,行 χ^2 检验;以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组产后出血发生率、术后出血量比较

联合组剖宫产术后出血发生率低于单一组,术后2、24 h出血量低于单一组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表2。

表2 两组产后出血发生率、术后出血量比较
[$n(\%)$, ($\bar{x} \pm s$)]

Table 2 Comparison of incidence of postpartum hemorrhage and postoperative bleeding volume between 2 groups
[$n(\%)$, ($\bar{x} \pm s$)]

组别	n	产后出血	术后2 h出血量(mL)	术后24 h出血量(mL)
联合组	45	4(8.89)	235.11±56.28	324.09±72.14
单一组	41	11(26.83)	351.28±54.36	455.28±73.18
χ^2/t 值		4.795	9.717	8.365
P 值		0.029	<0.001	<0.001

表4 两组外周血液指标水平比较($\bar{x} \pm s$)

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

组别	n	PLT($\times 10^9/L$)		FIB(g/L)		Hb(g/L)	
		术前	术后24 h	术前	术后24 h	术前	术后24 h
联合组	45	213.37±30.25	261.45±45.42 ^a	2.28±1.02	5.31±0.39 ^a	115.36±22.31	91.45±19.21 ^a
单一组	41	211.64±34.62	230.47±37.44 ^a	2.32±1.03	3.89±0.31 ^a	113.28±21.64	107.22±19.74 ^a
t 值		0.247	3.432	0.181	18.571	0.438	3.753
P 值		0.805	0.001	0.857	<0.001	0.663	<0.001

注:^a与同组术前比较, $P < 0.05$ 。

表5 两组血液流变学指标变化情况比较($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Comparison of hemorheological indexes between 2 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	高切全血黏度(mPa/s)		低切全血黏度(mPa/s)		血浆黏滞度(mPa/s)	
		术前	术后24 h	术前	术后24 h	术前	术后24 h
联合组	45	4.71±0.64	4.66±0.85	12.21±1.87	11.54±1.42	1.38±0.14	1.35±0.16
单一组	41	4.64±0.78	5.01±1.14	11.67±1.89	12.18±1.64	1.45±0.21	1.41±0.25
t 值		1.631	1.623	1.331	1.939	1.834	1.498
P 值		0.107	0.108	0.187	0.056	0.070	0.138

生率比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表6。两组不良反应轻微,经对症处理后症状均消失或缓解。

3 讨论

多数进行剖宫产分娩的产妇存在前置胎盘、巨大儿等易发生宫缩乏力的高危因素;加上手术

2.2 两组围手术期相关指标比较

与单一组相比,联合组子宫收缩持续时间延长,子宫底下降速度加快,恶露持续时间缩短,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表3。

表3 两组围手术期相关指标比较($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of perioperative related indexes between 2 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	子宫收缩持续时间(h)	子宫底下降速度(cm/d)	恶露持续时间(d)
联合组	45	3.15±0.74	1.05±0.18	13.54±2.54
单一组	41	1.62±0.19	0.48±0.02	19.01±3.29
t 值		12.852	20.153	8.673
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

2.3 两组外周血液指标水平比较

术后24 h两组PLT、FIB水平均较术前上升,Hb水平均较治疗前下降,且联合组上述外周血液指标水平改善程度均显著优于单一组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表4。

2.4 两组血液流变学指标变化情况比较

两组患者术前、术后24 h高切全血黏度、低切全血黏度及血浆黏滞度在各时点比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。见表5。

2.5 两组不良反应发生情况比较

联合组并发症总发生率与单一组并发症总发

损伤,导致其产后出血发生率较阴道分娩产妇高,对产妇生命安全造成威胁。从生理分娩角度来看,子宫属于一个特殊器官,内含有丰富的纤溶酶激活物,妊娠期孕妇血液处于高凝状态,纤溶酶原激活物活性相对低下,在胎盘剥离娩出时,组织大量激活物质从剥离位置进入血液,抑制物活性快

表6 不良反应发生情况 [n(%)]

组别	n	面色潮红	恶心呕吐	胸闷	腹泻	合计
联合组	45	2(4.44)	3(6.67)	1(2.22)	2(4.44)	8(17.78)
单一组	41	3(7.32)	1(2.44)	1(2.44)	1(2.44)	6(14.63)
χ^2 值		0.323	0.865	0.004	0.256	0.156
P值		0.570	0.352	0.947	0.613	0.693

速下降,纤溶作用短时间内异常亢进,导致产后出血增加^[9]。因此探讨如何有效预防剖宫产术后出血具有重要临床意义。

缩宫素是临床上促进子宫收缩的常用药物,主要通过促进子宫收缩压迫肌层血管而发挥止血作用^[10]。但缩宫素半衰期较短,促子宫收缩效应无法持续发挥,止血效果不佳。因此临床上更倾向于联合治疗。氨甲环酸是一类高效抗纤溶药物,主要是通过抑制由纤溶酶介导的纤维蛋白分解,进而达到止血的目的,静脉给药后70%以原形由尿液排出,具有一定安全性,在预防产后出血中具有良好的作用^[11]。本研究结果与Nonaka等^[12]报道基本一致。说明氨甲环酸联合缩宫素可协同作用延长宫缩持续时间,止血效果显著由于单一缩宫素。

Fakharian等^[13]研究发现,血浆凝血因子、血小板活性增加是产后出血的重要诱因。本研究通过比较两组手术前后PLT、FIB及Hb水平发现,术后24h两组PLT、FIB水平均较术前上升,Hb水平均较治疗前下降,且联合组上述指标上升及下降程度均大于单一组。推测其原因可能是氨甲环酸可加快血小板聚集,解除凝血功能障碍,改善产妇血液微循环,增强子宫收缩,有助于胎盘剥离,减少出血,进而改善凝血功能状态^[14]。此外,剖宫产手术必然会引发手术性创伤,进而导致机体发生应激反应,尤其是炎性应激与疼痛刺激^[15]。血液流变学是与急性创伤和应激最密切的指标,故监测产妇术后血液流变学变化对观察产妇血栓发生风险非常必要^[16]。本研究中,两组高切全血黏度、中切全血黏度、低切全血黏度及血浆黏滞度在各时间均无显著变化,提示氨甲环酸、缩宫素均不会影响产妇的血液流变学。但Wu等^[17]报道指出,血液流变学指标在产妇发动临产后通常会异常上升,且对进行剖宫产术的产妇创伤性应激反应变化更为明显。本研究中两组产妇血液流变学指标均无明显变化,推测可能是在手术中麻醉的扩血管作用、术中补液及出血等多种因素共存情况下抵消了血液流变学变化带来的外周阻力增加。另外本研究还发现,氨甲环酸联合缩宫素并不会增加产妇

不良反应发生率,具有一定安全性。

综上所述,氨甲环酸联合缩宫素预防剖宫产术后出血效果良好,可改善产妇凝血功能,且不影响血液流变学指标水平,安全性较高。

参考文献

- [1] 杨发达,高维鸿,梁丽笙,等.佛山市9236例孕产妇301型地中海贫血基因检测结果分析[J].分子诊断与治疗杂志,2020,12(9):1147-1151.
- [2] Weisman O, Chetouani M, Saint-Georges C, et al. Dynamics of Non-verbal Vocalizations and Hormones during Father-Infant Interaction[J]. IEEE Transact Affect Comput, 2017, 7(4):337-345.
- [3] 包春燕,卢白玉,徐郁,等.卡前列素氨丁三醇联合卡贝缩宫素对剖宫产后出血患者NO、NOS、FIB、D-dimer及泌乳功能的影响[J].中国妇幼保健,2019,34(8):1764-1767.
- [4] 张丽武,黄春燕,李凯,等.卡前列素氨丁三醇注射液联合缩宫素对剖宫产出血患者FIB与D-二聚体的影响[J].现代生物医学进展,2019,19(2):168-171.
- [5] Patel N, Radeos M. Severe Delayed Postpartum Hemorrhage after Cesarean Section[J]. J Emerg Med, 2018, 55(3):7484-7486.
- [6] Pohlen J, Hinkson L, Wickmann U, et al. Pseudo aneurysm of the uterine artery with arteriovenous fistula after cesarean section: A rare but sinister cause of delayed postpartum hemorrhage[J]. J Clin Ultras, 2020, 104(5):1-5.
- [7] Butwick AJ, Walsh EM, Kuzniewicz M, et al. Patterns and predictors of severe postpartum anemia after Cesarean section [J]. Transfusion, 2017, 40(9):e124.
- [8] Ducloy - Bouthors AS, Jeanpierre E, Saidi I, et al. TRANexamic acid in hemorrhagic CESarean section (TRACES) randomized placebo controlled dose-ranging pharmacobiological ancillary trial: study protocol for a randomized controlled trial[J]. Trials, 2018, 19(1):149.
- [9] Cegolon L, Mastrangelo G, Maso G, et al. Understanding Factors Leading to Primary Cesarean Section and Vaginal Birth After Cesarean Delivery in the Friuli-Venezia Giulia Region (North-Eastern Italy), 2005-2015[J]. Sci Rep, 2020, 10(1):380.
- [10] Belachew J, Eurenus K, Mulic-Lutvica A, et al. Placental location, postpartum hemorrhage and retained placenta in women with a previous cesarean section delivery: a prospective cohort study [J]. Upsala J Med Sci, 2017, 122(3):4798-4799.
- [11] Hamm RF, Downes KL, Srinivas SK, et al. Using the Probability of Cesarean from a Validated Cesarean Prediction Calculator to Predict Labor Length and Morbidity[J]. Am J Perinatol, 2019, 36(6):561-566.
- [12] Nonaka Y, Yasuda S, Kumagai N, et al. Successful Cesarean Section Deliveries in a Patient with a History of Developmental Venous Anomaly-Induced Hemorrhage [J]. J Stroke Cerebrov Dis, 2019, 28(12):104461. (下转第1178页)

· 论 著 ·

PD-1、sTREM-1及NLR在创伤性胫骨平台骨折术后感染中的预测价值

罗富初¹ 包一涵¹ 姜南星¹ 何祖豪¹ 谢进^{2*} 罗显民¹

【摘要】目的 探讨程序性死亡因子1(PD-1)、可溶性髓系细胞触发受体-1(sTREM-1)及中性粒细胞淋巴细胞比值(NLR)在创伤性胫骨平台骨折术后感染中的预测价值。**方法** 选取2018年11月至2020年11月于本院手术的82例创伤性胫骨平台骨折患者,根据术后是否并发感染分为感染组($n=17$)和未感染组($n=65$)。比较两组PD-1、sTREM-1及NLR表达水平,分析影响创伤性胫骨平台骨折患者术后感染的危险因素。**结果** 感染组PD-1、sTREM-1及NLR表达水平均高于未感染组,差异有统计学意义($P<0.05$)。骨折类型、糖尿病、手术时间、骨筋膜室综合征、PD-1、sTREM-1及NLR表达水平是影响创伤性胫骨平台骨折患者术后感染的单因素($P<0.05$)。Logistic回归多因素模型分析显示:开放性骨折、有糖尿病、手术时间 >3 h、骨筋膜室综合征、PD-1、sTREM-1和NLR水平升高为影响创伤性胫骨平台骨折患者术后感染的危险因素($P<0.05$)。**结论** PD-1、sTREM-1及NLR水平在发生术后感染的创伤性胫骨平台骨折患者中异常升高,通过检测上述指标水平可评估患者术后感染风险。

【关键词】 PD-1; 创伤性胫骨平台骨折; sTREM-1; 术后感染; NLR

The value of PD-1, sTREM-1 and NLR in predicting postoperative infection of patients with traumatic tibial plateau fractures

LUO Fureng¹, BAO Yihan¹, JIANG Nanxing¹, HE Zuhao¹, XIE Jin^{2*}, LUO Xianmin¹

(1. Department of Emergency, Trauma Center, Guangxi International Zhuang Medical Hospital, Nanning, Guangxi, China, 530201; 2. Department of Orthopedics and Sports Medicine, Guangxi International Zhuang Medical Hospital, Nanning, Guangxi, China, 530201)

【ABSTRACT】Objective To explore the value of Mouse Programmed Death 1(PD-1), Soluble triggering receptor of myeloid cells (sTREM-1), and Neutrophil to Lymphocyte Ratio (NLR) in predicting postoperative infection of patients with traumatic tibial plateau fractures. **Methods** The 82 patients with traumatic tibial plateau fractures who had surgical treatment in this hospital from November 2018 to November 2020 were selected. According to whether they had complicated infection after surgery, they were divided into an infected group ($n=17$) and a non-infected group ($n=65$). The expression levels of PD-1, sTREM-1 and NLR were compared between the two groups. The risk factors affecting postoperative infection in patients with traumatic tibial plateau fractures were analyzed. **Results** The expression levels of PD-1, sTREM-1 and NLR in the infected group were higher than those in the non-infected group, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). Fracture type, diabetes, operation time, compartment syndrome, PD-1, sTREM-1 and NLR expression levels are the single factors affecting postoperative infection in patients with traumatic tibial plateau fractures ($P<0.05$). Logistic regression multivariate model analysis showed that open fractures, diabetes, operation time >3 h, compartment syndrome, the increasing of PD-1, sTREM-1 and NLR levels were the risk factors affecting postoperative infection in patients with traumatic tibial plateau fractures ($P<0.05$). **Conclusion** The

基金项目:广西自然科学基金(2018JJA10512)

作者单位:1. 广西国际壮医医院急诊急救联动中心、创伤中心,广西,南宁 530201

2. 广西国际壮医医院骨关节与运动医学科,广西,南宁 530201

*通信作者:谢进, E-mail: flr0776@163.com

levels of PD-1, sTREM-1, and NLR are abnormally increased in patients with traumatic tibial plateau fractures who have postoperative infection. The risk of postoperative infection can be assessed by detecting the levels of the above indicators.

[KEY WORDS] PD-1; Traumatic tibial plateau fracture; sTREM-1; Postoperative infection; NLR

胫骨平台指胫骨与股骨下端接触的平面,是膝关节的重要负荷结构。在膝关节受到外伤导致关节内骨折,或在高空坠落时受到压缩力作用时均可引起胫骨平台骨折^[1]。胫骨平台骨折除了会造成骨结构的破坏、软组织的损伤之外,部分患者还会出现相关的神经、血管等重要组织的损伤^[2]。及时有效的治疗是纠正膝关节功能的重要措施,而外科手术是胫骨平台骨折的首选治疗方案^[3]。然而,术后感染作为外科手术后最常见的并发症之一,不仅延长住院时间,而且极易导致畸形愈合、创伤后关节炎、膝关节僵硬及运动功能障碍,给患者的康复和预后造成极大影响^[4]。因此,及时发现胫骨平台骨折术后感染,并给予有效干预对改善患者预后具有重要意义。为此,本研究就程序性死亡因子1(Mouse Programmed Death 1, PD-1)、可溶性髓系细胞触发受体-1(Soluble triggering receptor of myeloid cells, sTREM-1)及中性粒细胞淋巴细胞比值(Neutrophil to lymphocyte ratio, NLR)在创伤性胫骨平台骨折术后感染中的预测价值进行分析,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2018年11月至2020年11月于本院接受手术治疗的82例创伤性胫骨平台骨折患者,根据术后是否并发感染分为感染组($n=17$)和未感染组($n=65$)。纳入标准:①所有患者均明确外伤史,均经影像学检查确诊为胫骨平台骨折^[5];②所有患者的临床资料均完整;③均对手术耐受并无手术禁忌症;④均自愿参加本次研究,并签署相关协议。排除标准:①合并全身多处骨折者;②伴随严重心、肝、肾功能不全患者;③合并其他恶性肿瘤或存在代谢紊乱或血液、免疫系统疾病;④存在精神疾病无法配合本研究或依从性差者;⑤术前合并感染性疾病者。两组性别、年龄、骨折Schatzker分型等一般资料比较差异无统计学意义($P>0.05$),见表1。本研究经医院医学伦理委员会批准通过。

1.2 检测方法

于术前清晨抽取患者空腹静脉血5 mL自然凝固后以3 000 rpm离心10 min,分离血清,取上清

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)	平均年龄 (岁)	Schatzker分型	
				I型~III型	IV型~VI型
感染组	17	10/7	42.83±5.41	5(29.41)	12(70.59)
未感染组	65	37/28	41.92±5.77	22(33.85)	43(66.15)
t/χ^2 值	-	0.020	0.586	0.120	
P值	-	0.888	0.560	0.729	

液。采用流式细胞技术检测T细胞表面PD-1的表达,检测仪器为FACS Calibur流式细胞仪,试剂盒购自美国BD公司。采用酶联免疫吸附法检测sTREM-1水平,检测仪器为美国Bio-Bsd全自动酶标仪,试剂盒购自南京建成生物工程研究所。采用日本希斯美康公司生产的型号SX-5001全自动血液分析仪检测中性粒细胞计数、淋巴细胞计数,并计算NLR水平。操作均严格按照说明书进行。参考范围^[6]:当PD-1>24%为升高;sTREM-1>10 pg/mL为升高;NLR>4为升高。

1.3 观察指标

①比较两组患者PD-1、sTREM-1及NLR表达水平;②影响创伤性胫骨平台骨折患者术后感染的单因素分析;③影响创伤性胫骨平台骨折患者术后感染的多因素分析。

1.4 统计学方法

采用SPSS 22.0软件进行统计分析,计量资料采用($\bar{x} \pm s$)表示,采用 t 检验;计数资料采用 $n(\%)$ 表示,采用 χ^2 检验;创伤性胫骨平台骨折患者术后感染的影响因素采用Logistic回归模型分析;以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者PD-1、sTREM-1及NLR表达水平比较

感染组PD-1、sTREM-1及NLR表达水平均高于未感染组,差异均有统计学意义($P<0.05$),见表2。

2.2 影响创伤性胫骨平台骨折患者术后感染的单因素分析

年龄、性别、吸烟史、高血压及Schatzker分型非影响创伤性胫骨平台骨折患者术后感染的单因素($P>0.05$),骨折类型、糖尿病、手术时间、骨筋膜

表2 两组患者PD-1、sTREM-1及NLR表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of the expression levels of PD-1, sTREM-1 and NLR before and 1 day after operation between the two groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	PD-1 (%)	sTREM-1 (pg/mL)	NLR
感染组	17	21.52±3.34	15.23±4.38	4.21±0.85
未感染组	65	19.43±2.37	8.12±1.23	2.85±0.77
t值	-	19.43±2.37	11.618	6.346
P值	-	0.004	<0.001	<0.001

室综合征、PD-1、sTREM-1及NLR表达水平是影响创伤性胫骨平台骨折患者术后感染的单因素($P < 0.05$)。见表3。

2.3 影响创伤性胫骨平台骨折患者术后感染的多因素分析

Logistic回归模型分析显示:开放性骨折、有糖尿病、手术时间>3 h、骨筋膜室综合征、PD-1、sTREM-1和NLR水平升高为影响创伤性胫骨平台骨折患者术后感染的危险因素($P < 0.05$)。见表4。

3 讨论

胫骨平台主要由松质骨构成,因其骨密度较低,致使其极易在撞击、跌倒、坠楼等意外伤害时发生塌陷性骨折^[7]。目前临床对于创伤性胫骨平台骨折的治疗仍以外科手术为主,而术后感染是影响患者恢复的重要影响因素^[8]。因此,有效预测影响患者术后感染的危险因素对患者的预后具有重要意义。

PD-1为机体内重要免疫抑制分子的一种,属于B7-CD28分子家族,主要作用在T细胞的表面,具有负向调节T细胞活性的功能,在恶性肿瘤、慢性病毒感染及严重创伤等患者体内呈高表达状态^[9]。Emilien等^[10]研究表明,对PD-1进行阻断可促使机体T细胞免疫功能恢复,提升机体抗感染能力,减少死亡率。现阶段已有针对机体PD-1的药物用于恶性肿瘤的治疗,提示PD-1对机体的免疫系统,特别是针对T细胞的免疫抑制作用十分明

表3 影响创伤性胫骨平台骨折患者术后感染的单因素分析 [$n(\%), (\bar{x} \pm s)$]

Table 3 single factor analysis of postoperative infection in patients with traumatic tibial plateau fracture [$n(\%), (\bar{x} \pm s)$]

因素	n	感染组 (n=17)	未感染组 (n=65)	χ^2/t 值	P值
年龄(岁)					
<50	49	9(18.37)	40(81.63)	0.414	0.520
≥50	33	8(24.24)	25(75.76)		
性别					
男	47	10(21.28)	37(78.72)	0.020	0.888
女	35	7(20.00)	28(80.00)		
吸烟史					
有	33	6(18.18)	27(81.82)	0.219	0.640
无	49	11(22.45)	38(77.55)		
糖尿病					
有	21	11(52.38)	10(47.62)	17.207	<0.001
无	61	6(9.84)	55(90.16)		
高血压					
有	11	2(18.18)	9(81.82)	0.050	0.823
无	71	15(21.13)	56(78.87)		
骨折类型					
开放性骨折	15	8(53.33)	7(46.67)	11.873	0.001
闭合性骨折	67	9(13.43)	58(86.57)		
Schatzker分型					
I型~III型	27	5(18.52)	22(81.48)	0.120	0.729
IV型~VI型	55	12(21.82)	43(78.18)		
手术时间(h)					
≥3	27	14(51.85)	13(48.15)	23.723	<0.001
<3	55	3(5.45)	52(94.55)		
骨筋膜室综合征					
是	17	10(58.82)	7(41.18)	18.936	<0.001
否	65	7(10.77)	58(89.23)		
PD-1 (%)		21.52±3.34	19.43±2.37	19.43±2.37	0.004
sTREM-1 (pg/mL)		15.23±4.38	8.12±1.23	11.618	<0.001
NLR		4.21±0.85	2.85±0.77	6.346	<0.001

确^[11]。本研究结果发现,与未感染组相比,感染组外周血T细胞PD-1明显上升,是影响患者术后感染的独立危险因素之一,表明PD-1可作为评估创伤性胫骨平台骨折患者术后感染的有效指标之一。

Millar等^[12]研究表明,sTREM-1在炎症的触发、介导以及扩大反应过程中起到关键作用。Henkelmann等^[13]研究表明,在机体发生感染时,细菌可刺激中性粒细胞产生sTREM-1释放于血液或体液

表4 影响创伤性胫骨平台骨折患者术后感染的多因素分析

Table 4 multivariate analysis of postoperative infection in patients with traumatic tibial plateau fracture

影响因素	回归系数	标准误	Wald χ^2 值	OR	95%CI	P值
骨折类型(开放性骨折 vs 闭合性骨折)	1.232	0.545	4.264	3.425	1.177~9.966	0.021
糖尿病(有 vs 无)	1.212	0.356	4.233	3.360	1.672~6.751	0.028
手术时间(≥3 h vs <3 h)	0.846	0.423	4.354	2.330	1.017~5.339	<0.001
骨筋膜室综合征(是 vs 否)	1.256	0.482	4.484	3.511	1.365~9.032	0.003
PD-1(升高 vs 正常)	0.895	0.225	4.035	2.447	1.575~3.804	<0.001
sTREM-1(升高 vs 正常)	0.579	0.214	4.841	1.784	1.173~2.714	<0.001
NLR(升高 vs 正常)	0.639	0.311	4.905	1.895	1.030~3.485	<0.001

中,致使sTREM-1在感染炎症性疾病中呈高表达状态。研究表明,sTREM-1在血浆中的水平变化可能是机体对炎症反应的自我保护机制之一^[14]。Chen等^[15]通过对sTREM-1进行阻断,发现阻断sTREM-1可有效缓解机体炎症程度。本研究中,感染组sTREM-1水平明显高于未感染组,是影响患者术后感染的独立危险因素之一提示sTREM-1参与创伤性胫骨平台骨折术后感染的发生与发展。

NLR是中性粒细胞和淋巴细胞比值,其中中性粒细胞是炎症反应的有效指标,而淋巴细胞作为免疫细胞的代表,在一定程度上用来反映机体免疫状态。Mohd等^[16]研究表明,检测NLR对监测及评估创伤性胫骨平台骨折术后感染具有重要意义。当机体遭受细菌侵袭时,NLR水平迅速上升,以抵抗机体感染,NLR可客观地反映机体感染状况。本研究结果提示检测NLR可作为评估创伤性胫骨平台骨折术后感染的重要预测指标。

综上所述,PD-1、sTREM-1及NLR的表达在发生术后感染的创伤性胫骨平台骨折患者中异常升高,是影响创伤性胫骨平台骨折患者术后感染的危险因素,通过检测上述指标水平可评估创伤性胫骨平台骨折患者术后感染风险。

参考文献

- [1] 王波,王斌. 创伤性胫骨平台骨折术后切口感染的病原菌分布与影响因素分析[J]. 海南医学, 2020,31(14):1811-1814.
- [2] 葛志强,杨洁,夏志勇,等. 胫骨平台骨折术后切口感染发生率及危险因素分析[J]. 中国骨与关节损伤杂志, 2020, 35(4):417-419.
- [3] 陈丹,陈爱民,张意,等. 35例原位肝移植术后感染患者的护理体会[J]. 保健医学研究与实践, 2019,16(1):73-75.
- [4] Kim SG, Kim JG, Jang K M, et al. Diagnostic Value of Synovial White Blood Cell Count and Serum C-Reactive Protein for Acute Periprosthetic Joint Infection After Knee Arthroplasty[J]. J Arthroplasty, 2017,32(12):235-239.
- [5] Mardanpour K, Rahbar M, Mardanpour S, et al. Risk factors for surgical site infections after open reduction and internal fixation of acetabulum fracture in the west of Iran[J]. Intern J Surgery Open, 2020,27(16):221-226.
- [6] Liu Y, Zhang Y, Liang X, et al. Relative Incidence of Proximal Fibula Fractures with Tibial Plateau Fractures: An Investigation of 354 Cases[J]. J Knee Surg, 2019,27(16):22-88.
- [7] Li KJ, Xia XF, Su M, et al. Predictive value of lymphocyte-to-monocyte ratio (LMR) and neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR) in patients with oesophageal cancer undergoing concurrent chemoradiotherapy[J]. BMC Cancer, 2019,19(24):158-163.
- [8] Chang HR, Yu YY, Ju LL, et al. Percutaneous Reduction and Internal Fixation for Monocondylar Fractures of Tibial Plateau: A Systematic Review[J]. Orthop Surg, 2018,10(2):135-142.
- [9] 张浩,陈楚鹰,何久盛,等. 老年股骨转子间骨折患者围手术期程序性死亡受体-1表达水平在判断术后感染中的作用[J]. 中华创伤骨科杂志, 2019,21(9):752-757.
- [10] Emilien L, Juan W, Caitlin C, et al. Targeting tumor-associated macrophages and granulocytic myeloid-derived suppressor cells augments PD-1 blockade in cholangiocarcinoma[J]. J Clin Invest, 2020,130(10):231-236.
- [11] 廖煜胜,黄鸣宇,彭伟清. CT与MRI对隐匿性胫骨平台骨折的诊断价值分析[J]. 临床医学工程, 2019,26(12):1633-1634.
- [12] Millar S, Arnold JB, Thewlis D, et al. A systematic literature review of tibial plateau fractures: What classifications are used and how reliable and useful are they? [J]. Injury, 2018,35(18):142-163.
- [13] Henkelmann R, Frosch KH, Mende M, et al. Risk factors for deep surgical site infection in patients with operatively treated tibial plateau fractures: A retrospective multicenter study [J]. J Orthop Trauma, 2020,18(11):185-196.
- [14] 孙媛,王欣,王莉. SAA,sTREM-1,CRP/PAB在SP患者全麻术后肺部感染的意义[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(4):105-109.
- [15] Chen HW, Bi Q, Wu LJ. Risk factors of traumatic knee osteoarthritis after arthroscopic surgery treated tibial plateau fractures[J]. Intern J Clin Exp Med, 2017,10(5):8192-8199.

(上接第1174页)

- [13] Fakharian E, Abedzadeh-Kalahroudi M, Atoof F. Effect of Tranexamic Acid on Prevention of Hemorrhagic Mass Growth in Patients with Traumatic Brain Injury [J]. World Neurosurg, 2018, 381(16):990.
- [14] Loïc Sentilhes, Winer N, Azria E, et al. Tranexamic Acid for the Prevention of Blood Loss After Vaginal Delivery [J]. Obstet Gynecol Survey, 2019, 74(1):10-11.
- [15] Lehmann S, Baghestan E, Per E. Børdahl, et al. Low risk pregnancies after a cesarean section: Determinants of trial of labor and its failure[J]. PLoS One, 2020, 15(1):e0226894.
- [16] Freeman SM, Palumbo M C, Lawrence RH, et al. Effect of age and autism spectrum disorder on oxytocin receptor density in the human basal forebrain and midbrain [J]. Translat Psychiatry, 2018, 8(1):144-146.
- [17] Wu X, Benov A, Darlington DN, et al. Effect of tranexamic acid administration on acute traumatic coagulopathy in rats with polytrauma and hemorrhage [J]. PLoS One, 2019, 14(10):e0223406.

· 论 著 ·

不同剂量阿托伐他汀对心肌梗死患者MMP-9、COX-2及CD40L水平的影响

王欢 熊辉* 曾莉娜 姚松 程丽清

[摘要] **目的** 分析不同剂量阿托伐他汀对心肌梗死患者基质金属蛋白酶9(MMP-9)、环氧化酶-2(COX-2)及细胞黏附因子40L型(CD40L)水平的影响。**方法** 选择2018年11月至2020年11月于本院接受治疗的90例急性心肌梗死患者,根据阿托伐他汀使用剂量的差异分为大剂量组(40 mg, $n=49$)和小剂量组(20 mg, $n=41$)。比较两组临床疗效,对比治疗前后MMP-9、COX-2及CD40L水平、血脂及炎症因子水平。**结果** 大剂量组有效率较小组高,差异具有统计学意义($P<0.05$)。大剂量组治疗后MMP-9、COX-2及CD40L水平均低于小剂量组, TG、CHOL及LDL-C水平均低于小剂量组, IL-6、CRP及TNF- α 水平均低于小剂量组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。两组不良反应发生率比较差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 经阿托伐他汀40 mg/d治疗的心肌梗死患者MMP-9、COX-2及CD40L水平显著降低,且血脂水平及炎症反应得到较大改善。

[关键词] 阿托伐他汀; 心肌梗死; MMP-9; COX-2; CD40L

Effect of different doses of atorvastatin on the levels of MMP-9, COX-2 and CD40L in patients with myocardial infarction

WANG Huan, XIONG Hui*, ZENG Lina, YAO Song, CHENG Liqing

(Department of Pharmacy, Wuhan Asia General Hospital, Wuhan, Hubei, China, 430000)

[ABSTRACT] **Objective** To analyze the effects of different doses of atorvastatin on the levels of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), cyclooxygenase-2 (COX-2) and cell adhesion factor 40L (CD40L) in patients with myocardial infarction. **Methods** Ninety patients with acute myocardial infarction who were treated in our hospital from November 2018 to November 2020 were selected. According to the difference in the dosage of atorvastatin, they were divided into high-dose group (40 mg, $n=49$) and low-dose group (20 mg, $n=41$). The clinical efficacy of the two groups were compared, and the levels of MMP-9, COX-2 and CD40L, blood lipids and inflammatory factors before and after treatment were compared. **Results** The effective rate of the high-dose group was higher than that of the low-dose group, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). After treatment, the levels of MMP-9, COX-2 and CD40L in the high-dose group were lower than those in the low-dose group, while the levels of TG, CHOL and LDL-C in the high-dose group were lower than those in the low-dose group, and the levels of IL-6, CRP and TNF- α in the high-dose group were lower than those in the low-dose group, the difference was statistically significant ($P<0.05$). There was no significant difference in the incidence of adverse reactions between the two groups ($P>0.05$). **Conclusion** MMP-9, COX-2 and CD40L levels in patients with myocardial infarction treated with atorvastatin 40 mg/d significantly reduced, and blood lipid levels and inflammation response greatly improved.

[KEY WORDS] Atorvastatin; Myocardial infarction; MMP-9; COX-2; CD40L

基金项目:湖北省卫生健康委员会基金资助(WJ2018M015)

作者单位:武汉亚心总医院药学部,湖北,武汉 430000

*通信作者:熊辉, E-mail:191871551@qq.com

心肌梗死是指心肌缺氧缺血而发生的坏死,属于急性冠状动脉综合征范畴^[1]。冠状动脉粥样硬化是引起本症的病理基础,临床经验指出,在急性心肌梗死的治疗中应重视调脂治疗^[2]。阿托伐他汀是临床常用的他汀类调脂药物,可有效减轻动脉粥样斑块炎症,防止斑块破裂。

基质金属蛋白酶9(matrix metalloprotein-9, MMP-9)能够对粥样硬化斑块内细胞外不同类型的胶原与明胶进行降解,近年来其在心肌梗死中的应用价值引起热议^[3]。研究表明,血管内皮细胞表达的环氧化酶-2(Cyclooxygenase-2, COX-2)在炎症反应中被大量诱导表达,导致炎症反应的放大和增强^[4]。细胞黏附因子40L型(cell adhesion factor 40L, CD40L)作为一种跨膜蛋白,可与B淋巴细胞、巨噬细胞、内皮细胞、血管平滑细胞相结合而产生一系列炎症反应^[5-6]。目前关于COX-2、CD40L与心肌梗死临床过程的关系研究甚少。本研究就MMP-9、COX-2及CD40L在心肌梗死患者治疗中的变化进行分析,探讨其临床意义。

1 资料与方法

1.1 基线资料

选取2018年11月至2020年11月于本院接受治疗的急性心肌梗死90例,纳入标准:①患者均满足急

性心肌梗死诊断标准^[7];②患者发病到入院时间小于12 h、血清心肌酶学标记物升高至2倍以上、心电图显示至少2个相邻的ST段抬高,胸前导联 ≥ 2 min,肢体导联ST段 ≥ 1 min,均持续胸痛 ≥ 30 min^[8];③入组前未接受过溶栓药物、调脂药或雌激素治疗;④临床资料完整,所有患者均签署知情同意书。排除标准:①合并全身免疫性疾病;②对本研究所用药物过敏者;③合并其他类型心脏疾病者;④损伤性心肌梗死。

在治疗期间患者可耐受完成所有治疗及本研究所用阿托伐他汀药物一天使用最大剂量不超过80 mg的基础上,根据阿托伐他汀的使用剂量分为大剂量组(40 mg)(n=49)和小剂量组(20 mg)(n=41),其中大剂量组男26例,女23例;平均年龄(58.54 \pm 1.40)岁;小剂量组男23例,女18例,平均年龄(58.63 \pm 1.52)岁;两组患者一般资料比较差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性,见表1。本研究已获得伦理委员会批准。

1.2 方法

所有研究对象在住院治疗期间均应用拜阿司匹林、低分子肝素、转换酶抑制剂、硝酸酯类及 β 受体阻滞剂等常规治疗,同时给予经皮冠状动脉介入治疗。术后,小剂量组给予阿托伐他汀(北京嘉林药业股份有限公司,国药准字H20093819)20 mg/d,大剂量组给予阿托伐他汀40 mg/d,治疗2 w。

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

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

组别	n	性别(例)		年龄(岁)	BMI(kg/m ²)	吸烟	
		男	女			是	否
大剂量组	49	26(53.06)	23(46.94)	58.54 \pm 1.40	23.89 \pm 5.47	26(53.06)	23(46.94)
小剂量组	41	23(56.10)	18(43.90)	58.63 \pm 1.52	23.94 \pm 5.51	20(48.78)	21(51.22)
t/χ^2 值		0.083		0.290	0.043	0.164	
P值		0.773		0.773	0.966	0.686	

1.3 MMP-9、COX-2及CD40L检测方法

分别采集所有患者入组次日及治疗7 d后空腹静脉血3 mL,常温下以3 000 r/min离心5 min后分离血清,并将其置于-70℃冰箱中贮存以待检测。采用酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测MMP-9、COX-2及CD40L水平,试剂盒购自美国ADL公司,所有操作步骤均严格按照试剂盒上说明书进行。

1.4 观察指标

1.4.1 临床疗效

评定标准^[8],显效:症状及体征基本消失,各项指标恢复正常;有效:症状和体征部分消失,各项

指标明显改善;无效:症状和体征未见好转甚至加重,各项指标均未见改善。总有效率=(显效+有效)/总例数 $\times 100\%$ 。

1.4.2 血脂和炎症因子

血脂指标包括甘油三酯(Triglyceride, TG)、总胆固醇(cholesterol, CHOL)及低密度脂蛋白胆固醇(Low density lipoprotein cholesterol, LDL-C),于入组次日及治疗7 d后抽取所有研究对象空腹静脉血,实验室静置30 min后离心去上清液,然后使用东芝TBA 120型全自动生化分析仪进行测定。炎症因子包括C反应蛋白(C-reactive protein, CRP)、白细胞介素6(interleukin-6, IL-6)以及肿瘤

坏死因子 α (Tumor necrosis factor α , TNF- α), 于入组次日及治疗7 d后抽取所有研究对象空腹静脉血, 抗凝、离心后取血浆, 使用美国Bio-source公司生产的试剂, 采用酶联免疫吸附法进行测定。

1.4.3 不良反应

包括胃肠道不适、头痛、头晕、皮疹、关节痛、失眠等。

1.5 统计学方法

采用SPSS 22.0软件进行统计分析, 计量资料采用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 行 t 检验; 计数资料采用 $n(\%)$ 表示, 行 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 临床疗效

大剂量组有效率高于小剂量组, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见表2。

2.2 MMP-9、COX-2及CD40L

两组治疗前MMP-9、COX-2及CD40L水平比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。治疗后大剂量组

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(%)
大剂量组	49	35(71.43)	12(24.49)	2(4.09)	95.92
小剂量组	41	26(63.41)	7(17.07)	8(19.51)	80.49
χ^2 值			5.381		
P 值			0.020		

MMP-9、COX-2及CD40L水平均低于小剂量组, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见表3。

2.3 血脂水平

治疗前两组TG、CHOL及LDL-C水平比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。治疗后大剂量组及小剂量组的TG、CHOL及LDL-C均得到改善, 且治疗后大剂量组TG、CHOL及LDL-C水平均低于对照组, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见表4。

2.4 炎性因子水平

治疗前2组间炎症因子水平比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。治疗后大剂量组IL-6、CRP及TNF- α 水平均低于小剂量组, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见表5。

表3 两组治疗前后MMP-9、COX-2及CD40L比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of MMP-9, COX-2 and CD40L between the two groups before and after treatment ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	MMP-9($\mu\text{g/mL}$)		COX-2(U/L)		CD40L(ng/mL)	
		治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
大剂量组	49	136.59 \pm 14.56	64.31 \pm 8.93 ^a	65.14 \pm 7.59	24.63 \pm 3.74 ^a	3.56 \pm 1.24	1.23 \pm 0.81 ^a
小剂量组	41	136.71 \pm 14.53	89.51 \pm 9.78 ^a	65.32 \pm 7.56	44.59 \pm 3.82 ^a	3.59 \pm 1.25	2.03 \pm 1.14 ^a
t 值		0.039	12.767	0.112	24.971	0.114	3.881
P 值		0.969	<0.001	0.911	<0.001	0.910	<0.001

注: 与同组治疗前比较, ^a $P < 0.05$ 。

表4 两组治疗前后血脂水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Comparison of blood lipid levels between the two groups before and after treatment ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TG(mmol/L)		CHOL(mmol/L)		LDL-C(mmol/L)	
		治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
大剂量组	49	2.41 \pm 0.56	1.16 \pm 0.35 ^a	5.39 \pm 0.63	3.52 \pm 0.46 ^a	3.76 \pm 0.35	2.13 \pm 0.15 ^a
小剂量组	41	2.49 \pm 0.53	1.87 \pm 0.49 ^a	5.41 \pm 0.69	4.61 \pm 0.42 ^a	3.81 \pm 0.39	2.96 \pm 0.24 ^a
t 值		0.692	7.997	0.144	11.644	0.641	19.997
P 值		0.491	<0.001	0.886	<0.001	0.523	<0.001

注: 与治疗前比, ^a $P < 0.05$ 。

表5 两组治疗前后炎性因子水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Comparison of inflammatory factor levels between the two groups before and after treatment ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	CRP(mg/L)		IL-6(ng/L)		TNF- α (mg/L)	
		治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
大剂量组	49	14.79 \pm 3.61	6.85 \pm 1.35 ^a	17.35 \pm 4.15	9.65 \pm 1.36 ^a	138.74 \pm 44.63	70.36 \pm 21.59 ^a
小剂量组	49	14.85 \pm 3.63	8.24 \pm 1.56 ^a	17.33 \pm 4.19	11.52 \pm 1.45 ^a	139.12 \pm 44.56	87.49 \pm 22.53 ^a
t 值		0.078	4.532	0.023	6.303	0.040	3.675
P 值		0.938	<0.001	0.982	<0.001	0.968	<0.001

注: 与治疗前比, ^a $P < 0.05$ 。

2.5 不良反应

研究组1例轻度胃肠不适,继续给药并对症处理后得到改善;两组不良反应发生率比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

3 讨论

心肌梗死的发生与动脉粥样硬化斑块的不稳定性及继发性的血栓密切相关,近年来动脉粥样硬化的炎症学说比较受重视,因此与心肌梗死相关的炎症标志物目前已成为国内外学者的研究热点^[9-10]。

基质金属蛋白酶在细胞外基质的合成与降解中占有重要位置,研究发现,MMP-9能够对粥样硬化斑块内细胞外不同类型的胶原与明胶进行降解^[11]。Fabiana等^[12]研究显示,急性心肌梗死患者MMP-9水平明显升高,认为急性冠状动脉综合征早期炎症活动较显著。CD40L作为肿瘤坏死因子超基因家族的一种,可刺激巨噬细胞、血管平滑肌细胞、血管内皮细胞产生基质金属蛋白酶及与动脉粥样硬化有关的生物活性物质^[13]。COX-2是环氧化酶存在的同工酶之一,主要存在于单核-巨噬细胞、滑膜细胞及内皮细胞中^[14]。正常生理状态下,COX-2仅微量表达,当细胞受到细菌内毒素、致炎因子的活化作用时,其才开始大量表达。因此,有学者认为COX-2活化与急性冠脉综合征(Acute coronary syndrome, ACS)炎症反应关系密切,不仅参与动脉粥样硬化的形成,而且可能在其发生、发展和转归过程中均具有重要的影响^[15]。

他汀类药物是目前最有效的降脂药物。本研究结果显示,治疗后大剂量组及小剂量组的TG、CHOL及LDL-C均得到改善。主要因为阿托伐他汀可通过抑制肝细胞合成胆固醇的限速酶羟甲基戊二酰辅酶A还原酶的活性,使CHOL合成受阻,降低血浆中CHOL浓度;并通过负反馈调节使肝细胞表面LDL-C受体数量增加、活性增强,从而能与更多LDL-C结合,并将其转运至外周组织,以此降低血浆中LDL-C浓度^[16]。此外,他汀类药物除具有降脂作用外,还具有直接的抗炎作用^[17]。本研究中,经治疗后所有患者炎症因子水平均显著降低,这主要与阿托伐他汀可通过抑制树突状细胞成熟,在动脉粥样硬化病变中发挥作用,以及增加患者免疫调节细胞,导致白细胞介素-10、转化生长因子 β 分泌增加,进而抑制免疫炎症有关。临床实践证实,采用他汀类药物进行强化治疗,可

有效减少急性缺血心肌再灌注后无复流面积,改善患者预后^[18]。本研究结果中,治疗后大剂量组MMP-9、COX-2、CD40L及血脂指标、炎症因子水平均低于小剂量组,且大剂量组临床疗效高于小剂量组,表明阿托伐他汀40 mg/d在调节血脂、改善炎症反应的作用优于阿托伐他汀20 mg/d,这与大剂量应用阿托伐他汀后可快速降低MMP-9、COX-2、CD40L活性,提高易损斑块稳定性有关。此外,大剂量阿托伐他汀使用并未增加患者不良反应,由此提示,在患者可耐受基础上,大剂量阿托伐他汀可能为急性心肌梗死临床治疗的更好选择。

综上所述,经阿托伐他汀40 mg/d治疗的心肌梗死患者MMP-9、COX-2及CD40L水平显著降低,且血脂水平及炎症反应得到较大改善,具有一定安全性,对于可耐受的急性心肌梗死患者在阿托伐他汀治疗上大剂量可能为较好的选择。

参考文献

- [1] 黄鹤,黄从新,唐艳红,等. 参松养心胶囊治疗心肌梗死后室性心律失常的疗效和机制研究:基本原理和设计方案[J]. 中华心律失常学杂志, 2018, 22(3):205-208.
- [2] 周音频,胡鑫渝,肖鹏,等. 不同血管紧张素转化酶抑制剂对急性心肌梗死患者冠状动脉介入术后肾功能影响的研究[J]. 中华保健医学杂志, 2020, 22(1):26-29.
- [3] 李小娟,曹劝省,汪砚雨. 急性心肌梗死PCI术后患者的血清NT-proBNP、ICTP、MMP-9水平及其临床意义研究[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(1):31-34+48.
- [4] Han Y, Mao X, Wang L, et al. Elevated sCD40L, MMP-9 and MMP-2 Is Associated with Carotid Plaque Vulnerability in Patients with Ischemic Cerebrovascular Disease [J]. World Neurosurgery, 2017, 105(56):5621-5623.
- [5] Wan Y, Yang FZ, Dang S, et al. Influence of VEGF, COX-2, and MMP-9 expression on the molybdenum-targeted X-ray in breast cancer[J]. Eur J Gynaecol Oncol, 2017, 38(1):45-48.
- [6] 赵文利,贾晓辉,张建红,等. 急性心肌梗死患者急诊冠脉介入治疗术后医院感染病原学分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2017, 27(8):1736-1738+1742.
- [7] Naqvi A, Ahmad M, Minhas MU, et al. Preparation and evaluation of pharmaceutical co-crystals for solubility enhancement of atorvastatin calcium[J]. Polymer Bulletin, 2020, 77(3):6589-6593.
- [8] 沈玉祥,曾定尹,赵普. 血管痉挛性心绞痛国际诊断标准要点评述[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2019, 33(11):7-9.
- [9] Kunte M, Desai K. The Protein Extract of Chlorella minutissima Inhibits The Expression of MMP-1, MMP-2 and MMP-9 in Cancer Cells through Upregulation of TIMP-3 and Down Regulation of c-Jun [J]. Cell J, 2018, 20(2):211-219.

(下转第1187页)

· 论 著 ·

2017年-2019年铜仁市城区手足口病流行病学分析

龙丽* 雷星 田松娅

【摘要】目的 分析2017年~2019年铜仁市城区手足口病流行病学规律及特征。方法 收集2017年1月到2019年12月的手足口病例资料和病原检测结果,分析手足口病的发病特征。结果 3年手足口病发病率比较:2017年最低(74.3%),2018年最高(90.6%),差异有统计学意义($P<0.05$)。病原学检测结果显示,2017年EV71阳性率最高(29.7%),2019年EV71阳性率最低(0.2%),差异有统计学意义($P<0.05$)。2017~2019年柯萨奇病毒A16型(CoxA16)阳性率比较,2017年最低(1.4%),2018年最高(12.4%),差异有统计学意义($P<0.05$)。2017~2019年柯萨奇病毒A6(CoxA6)阳性率比较,2017年最低(0%),2019年最高(36.8%),差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 手足口病全年均有发病,但发病分布呈现季节性,每年5~7月份发病率最高。通过对手足口病流行状况进行分析为制定本地手足口病防控策略提供依据。

关键词 手足口病; 肠道病毒; 流行病学

Epidemiological analysis of hand foot mouth disease in Tongren City from 2017 to 2019

LONG Li*, LEI Xing, TIAN Songya

(Department of laboratory, Tongren people's Hospital, Tongren, Guizhou, China, 554300)

【ABSTRACT】 Objective In order to provide the basis for formulating the prevention and control strategy of HFMD, retrospective analysis of the epidemic regularity and characteristics of hand foot mouth disease in Tongren City from 2017 to 2019. **Method** Data of HFMD cases and pathogen detection results from January 2017 to December 2019 were collected to analyze the characteristics of HFMD. **Result** The incidence rate of hand foot mouth disease was significant difference in 2017~2019 years ($P<0.05$), and the incidence rate (74.3%) was the lowest in 2017, and the incidence rate was 90.6% in 2018; The results of pathogen detection showed that there was significant difference in the positive rate of enterovirus 71 (EV71) from 2017 to 2019 ($P<0.05$), the positive rate of EV71 was the highest in 2017 (29.7%) and the lowest in 2019 (0.2%); There was significant difference in CoxA16 positive rate between 2017 and 2019 ($P<0.05$), the positive rate of CoxA16 was the lowest in 2017 (1.4%) and the highest in 2018 (12.4%); There was a significant difference in the positive rate of CoxA6 between 2017 and 2019 ($P<0.05$), the positive rate of CoxA6 was the lowest in 2017 (0%) and the highest in 2019 (36.8%). **Conclusion** Hand foot mouth disease occurs throughout the year, but the incidence is seasonal and the highest incidence rate is 5-7 months in a year. There are obvious differences in the types of HFMD infection in Tongren City from 2017 to 2019, EV71 was the main HFMD infection in 2017; CoxsackievirusA16 (CoxA16) was predominant in 2018; Coxsackievirus A6 (Coxa6) was the main pathogen in 2019. Through the analysis of the epidemic situation of hand, foot and mouth disease, it provides a basis for formulating the prevention and control strategy of hand, foot and mouth disease.

【KEY WORD】 Hand foot mouth disease; Enterovirus; Epidemiology

手足口病是由肠道病毒感染引起的传染病,引发手足口病的肠道病毒有20多种(型),其中以柯萨奇病毒A16型^[1-3](CoxsackievirusA16)和肠道

病毒71型^[4-6](Enterovirus 71)最为常见,且肠道病毒各型之间无交叉免疫力。EV71不仅能引起手足口病,而且可引起严重中枢神经系统并发症,

作者单位:铜仁市人民医院检验科,贵州,铜仁 554300

*通信作者:龙丽, E-mail:524847462@qq.com

如脑膜炎、脑炎、急性迟缓性瘫痪等。手足口病好发于春夏之交,多发生于5岁以下儿童,病人症状多数较轻微,一般预后良好,表现口痛、厌食、低热、手、足、口腔等部位出现小疱疹或小溃疡,多数患儿一周左右自愈,少数患儿可引起心肌炎、肺水肿、无菌性脑膜脑炎等并发症。个别重症患儿病情发展快,导致死亡。目前缺乏有效治疗药物,主要对症治疗。为进一步了解和掌握铜仁市近年来手足口病发病的规律和流行病学特征以及制定手足口病预防控制措施提供依据。报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2017至2019年来自铜仁市人民医院儿科发热门诊和儿科传染病房送检样本7351例,患儿年龄多集中在1~4岁,其中女童3013例,男童4338例。入选标准:手足口病诊断标准参照《手足口病诊疗指南(2018版)》^[7],在临床诊断的基础上,肠道病毒(EV、Cox A16、EV71、Cox A6等)特异性核酸检查阳性即可确诊。

1.2 试剂与仪器

肠道病毒核酸检测试剂盒由广州达安基因股份有限公司提供,可定性检测EV71型、Cox A16、Cox A6型^[8-9]及肠道病毒通用型等。核酸提取仪器为达安基因股份有限公司生产的Smart32核酸提取仪,检测仪器为安普医疗科技公司的AGS4800实时荧光PCR仪。

1.3 检测方法

1.3.1 标本的采集与处理

常规采集所有疑似手足口病患儿咽拭子进行手足口病肠道病毒核酸检测。核酸提取步骤参照中山大学达安生物技术有限公司的肠道病毒核酸检测试剂盒说明书,提取获得的RNA核酸立即进行扩增检测,暂时不能检测的临床标本需于-20℃保存,保存期不得>14 d。

1.3.2 扩增体系及条件

取聚合酶链反应(PCR)管,按照反应体系配置表依次加入PCR(RT-PCR)反应液A 17 μL、PCR(RT-PCR)反应液B 3 μL、待测标本RNA各5 μL,共计25 μL,同时设置阴性对照、阳性对照。扩增条件为:50℃ 15 min,1个循环;95℃ 15 min,1个循环;94℃ 15 s,55℃ 45 s,45个循环。根据试剂说明书进行判定。

1.4 统计方法

使用SPSS 21.0软件进行数据统计分析。计数资料用n(%)的形式表示,比较用 χ^2 检验或Fisher检验方法,两两比较采用Bonferroni方法, $P<0.05$ 表明差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肠道病毒通用型(EV)感染率分析

2017年-2019年共检出肠道病毒通用型感染病例3800例。由统计结果得出每年的5~7月份为手足口病的高发期2018年EV阳性检出率(66.1%)最高,2017-2019年的1至11月中EV阳性率比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。12月份EV阳性率比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表1、图1。

表1 EV阳性率比较结果[n(%)]

Table 1 Comparison of the positive rate of enterovirus [n(%)]

月份	年份			χ^2 值	P值
	2017年	2018年	2019年		
1	45(70.3) ^b	2(33.3) ^{ab}	4(28.6) ^a	10.422	0.005
2	25(61) ^a	2(100) ^a	7(17.5) ^b	18.780	0.000
3	22(27.5) ^b	8(61.5) ^c	7(10.3) ^a	18.026	0.000
4	86(37.1) ^a	294(75.8) ^b	43(33.6) ^a	121.640	0.000
5	149(30) ^a	788(82.4) ^c	189(50.3) ^b	404.563	0.000
6	475(35.8) ^a	311(63.0) ^b	234(58.5) ^b	137.997	0.000
7	188(56.8) ^b	165(50.2) ^{ab}	127(42.8) ^a	12.337	0.002
8	94(68.1) ^b	77(53.8) ^a	65(40.9) ^a	22.041	0.000
9	106(85.5) ^b	50(43.5) ^a	46(36.5) ^a	70.217	0.000
10	58(87.9) ^c	14(17.3) ^a	47(57.3) ^b	74.075	0.000
11	8(88.9) ^b	10(19.2) ^a	35(34.0) ^a	17.370	0.000
12	1(33.3)	5(15.2)	13(37.1)	4.520	0.087
总计	1257(43.2) ^a	1726(66.1) ^b	817(44.7) ^a	336.821	0.000

注:a、b、c字母表示不同年份间比较,字母相同表示不同年份之间比较差异无统计学意义,字母不同表示不同年份之间比较差异具有统计学意义($P<0.05$)。

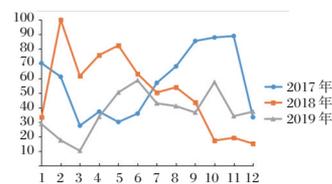


图1 EV阳性率比较折线图

Figure 1 Broken line chart of enterovirus positive rate comparison

2.2 EV71型感染率分析

2017年-2019年EV71型感染病例1075例,其中手足口重症患儿101例,其病原体主要为EV71感染所致。2017-2019年在3月~10月上EV71阳性率比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。1、2、11、12月

份 EV71 阳性率比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表2、图2。

表2 EV71 阳性率比较结果 [n(%)]

Table 2 Comparison of positive rate of enterovirus 71 [n(%)]

月份	年份			χ^2 值	P值
	2017年	2018年	2019年		
1	10(15.6)	1(16.7)	0(0)	2.547	0.278
2	5(12.2)	0(0)	0(0)	5.704	0.065
3	42(52.5) ^b	0(0) ^a	0(0) ^a	67.204	0.000
4	100(43.1) ^b	14(3.6) ^a	0(0) ^a	203.085	0.000
5	253(51) ^c	47(4.9) ^b	3(0.8) ^a	586.933	0.000
6	386(29.1) ^c	60(12.1) ^b	0(0) ^a	186.972	0.000
7	58(17.5) ^b	52(15.8) ^b	0(0) ^a	56.407	0.000
8	10(7.2) ^b	18(12.6) ^b	0(0) ^a	20.282	0.000
9	1(0.8) ^a	5(4.3) ^b	0(0) ^a	7.844	0.020
10	0(0) ^a	4(4.9) ^b	0(0) ^a	7.439	0.024
11	0(0)	3(5.8)	0(0)	5.653	0.052
12	0(0)	3(9.1)	0(0)	3.549	0.211
总计	865(29.7) ^c	207(7.9) ^b	3(0.2) ^a	930.990	0.000

注: a, b, c 字母表示不同年份间比较, 字母相同表示不同年份之间比较差异无统计学意义, 字母不同表示不同年份之间比较差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

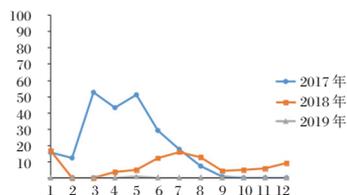


图2 EV71 阳性率比较折线图

Figure 2 Broken line chart of enterovirus 71 positive rate

2.3 CoxA16 感染率分析

2017 年 CoxA16 阳性率 1.4% 最低, 2018 年 CoxA16 阳性率 12.4% 最高, 形成一个小高峰, 2019 年又逐渐降低。2017-2019 年在 3 月~10 月上 CoxA16 阳性率比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 1、2、11、12 月 CoxA16 阳性率比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表3、图3。

2.4 CoxA6 阳性率分析

CoxA6 阳性率呈逐年增高的趋势, 2017 年 CoxA6 阳性率 (0%) 最低, 2019 年 CoxA6 阳性率 (36.8%) 最高。2017-2019 年在 1 月~11 月上 CA6 阳性率比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 12 月 CA6 阳性率比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表4、图4。

2.5 手足口各病原体 2017-2019 分布情况

手足口各病原体 2017-2019 年阳性率比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。2017 年最常见的感染病毒为 EV71 型和其它肠道病毒; 2018 年其它肠道

表3 CoxA16 阳性率比较结果 [n(%)]

Table 3 Comparison of positive rate of coxsackievirus a16 [n(%)]

月份	年份			χ^2 值	P值
	2017年	2018年	2019年		
1	1(1.6)	0(0)	0(0)	2.547	0.278
2	3(7.3)	0(0)	3(7.5)	5.704	0.065
3	1(1.3) ^a	0(0) ^a	4(5.9) ^b	67.204	0.000
4	4(1.7) ^a	5(1.3) ^a	14(10.9) ^b	203.085	0.000
5	6(1.2) ^a	80(8.4) ^b	37(9.8) ^b	586.933	0.000
6	19(1.4) ^a	86(17.4) ^c	14c(3.5) ^b	186.972	0.000
7	5(1.5) ^a	84(25.5) ^c	18c(6.1) ^b	56.407	0.000
8	1(0.7) ^a	31(21.7) ^b	4(2.5) ^a	20.282	0.000
9	0(0) ^a	13(11.3) ^b	4(3.2) ^a	7.844	0.020
10	0(0) ^a	11(13.6) ^b	0(0) ^a	7.439	0.024
11	0(0)	8(15.4)	1(1)	5.653	0.052
12	0(0)	5(15.2)	1(2.9)	3.549	0.211
总计	40(1.4) ^a	323(12.4) ^c	100(5.5) ^b	284.668	0.000

注: a, b, c 字母表示不同年份间比较, 字母相同表示不同年份之间比较差异无统计学意义, 字母不同表示不同年份之间比较差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

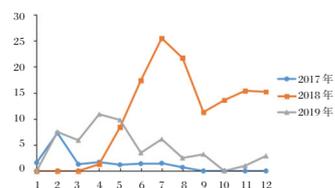


图3 CoxA16 阳性率比较折线图

Figure 3 Line chart of Cox a16 positive rate comparison

表4 CoxA6 阳性率比较结果 [n(%)]

Table 4 Comparison of positive rate of coxsackievirusA6 [n(%)]

月份	年份			χ^2 值	P值
	2017年	2018年	2019年		
1	0(0) ^a	0(0) ^{ab}	8(57.1) ^b	30.050	0.000
2	0(0) ^a	0(0) ^{ab}	12(30) ^b	16.349	0.000
3	0(0) ^a	0(0) ^a	30(44.1) ^b	50.425	0.000
4	0(0) ^a	0(0) ^a	51(39.8) ^b	265.107	0.000
5	0(0) ^a	0(0) ^a	112(29.8) ^b	460.740	0.000
6	0(0) ^a	0(0) ^a	124(31) ^b	597.891	0.000
7	0(0) ^a	0(0) ^a	119(40.1) ^b	301.997	0.000
8	0(0) ^a	0(0) ^a	65(40.9) ^b	134.786	0.000
9	0(0) ^a	33(28.7) ^b	62(49.2) ^c	79.216	0.000
10	0(0) ^a	46(56.8) ^b	25(30.5) ^c	54.845	0.000
11	0(0) ^a	22(42.3) ^b	53(51.5) ^b	9.190	0.010
12	0(0)	8(24.2)	11(31.4)	1.107	0.585
总计	0(0) ^a	109(4.2) ^b	672(36.8) ^c	1775.652	0.000

注: a, b, c 字母表示不同年份间比较, 字母相同表示不同年份之间比较差异无统计学意义, 字母不同表示不同年份之间比较差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

病毒阳性率 (66.1%) 最高, 其次为 CoxA16。2019 年则为其它肠道病毒和 CoxA6 阳性率最高。见表5图5。

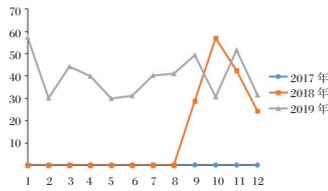


图4 CoxA6阳性率比较折线图

Figure 4 Broken line chart of positive rate of Cox A6

表5 不同年份病原构成比比较结果

Table 5 Comparison of pathogen composition in different years

变量	年份			χ^2 值	P值
	2017年	2018年	2019年		
EV	1257(43.2) ^a	1726(66.1) ^b	817(44.7) ^a	336.821	0.000
CA71	865(29.7) ^c	207(7.9) ^b	3(0.2) ^a	930.990	0.000
CA16	40(1.4) ^a	323(12.4) ^c	100(5.5) ^b	284.668	0.000
CA6	0(0) ^a	109(4.2) ^b	672(36.8) ^c	1775.652	0.000

注:a, b, c 字母表示不同年份间比较, 字母相同表示不同年份之间比较差异无统计学意义, 字母不同表示不同年份之间比较差异具有统计学意义($P < 0.05$)。



图5 不同年份病原构成比柱状图

Figure 5 Histogram of pathogen constituent ratio in different years

3 讨论

手足口病是一种儿童期急性传染病, 全球许多国家都发生过较大规模的手足口病流行, 目前手足口病已成为常见的儿童急性传染病^[10]。我国各地也报导过手足口病的流行情况^[11]手足口病多见于6岁以下儿童, 尤其以1~3岁婴幼儿为主^[12-13], 其传染源主要是患者及病毒携带者。手足口病传播主要通过消化道以及呼吸道, 病毒传染时具有聚集性感染的特点, 托幼机构以及儿童游乐场是手足口病常见的传播场所。手足口病的传染性极强且传染速度较快, 对儿童的身体健康构成极大的威胁, 重症病例甚至会导致患儿的死亡。

铜仁市2017~2019年手足口病的流行类型有极大的差异, 具有本地区的流行特征。EV71型从2017年~2019年检出阳性率呈现逐年下降的趋势。2017年最高为29.7%, 2019年最低为0.2%。

EV71逐年下降的原因可能为疾病预防控制部门在积极推广EV71型疫苗的接种有关。EV71疫苗^[14]的推广普及极大的减少了重症手足口病的发生。其它肠道病毒(EV)检测阳性构成比呈现出先升高后降低的趋势, 这可能与疫苗接种后疾病的病原体感染谱阳性了变化; 2018年CoxA16肠道病毒检测阳性患儿中构成比中占12.4%, 是主要流行病原体, 在其他两年阳性率均不足10%; CoxA6型肠道病毒从2017~2019呈逐年增长的趋势, 2017年最低阳性检出率为0, 2019年最高, 阳性检出率为36.8%。综合3年检测数据分析, 手足口病的主要感染型别呈现多样化的特点。从病原学检测结果看, 铜仁市流行的手足口病以其他肠道病毒为主, 其次是肠道病毒71型(EV71)、CoxA16型, 但是重症病例以肠道病毒71型(EV71)为主。2017年底我市开始推广EV71型手足口疫苗, 2018年我市EV71阳性率大幅下降, 2019年EV71阳性检出率降至个位数, 说明我市疾控部门大力推广手足口病疫苗接种对降低EV71型病毒感染和由EV71感染所致重症病例有积极的作用。

患儿和隐性感染儿童均为传染源, 主要是通过密切接触感染者的粪便、口腔分泌物、皮肤疱疹液中的病毒, 经粪-口途径或呼吸道(主要是口腔粘膜和鼻腔粘膜)传播。病毒传染性极强、隐性感染阳性比例大、传播速度快, 在短时间内可造成较大范围的流行。根据病原学检测结果分析病毒种类的发病特征, 针对手足口发病的季节性特点、结合高发年龄段儿童, 有针对性地开展预防控制措施。加强手足口病防控宣传, 提高家长对疾病特点及防控知识的知晓率; 积极推广疫苗接种, 增强儿童免疫力; 在托幼机构展开手足口病宣传培训, 提高幼儿教师对手足口病发病特点的了解, 做到早预警、早发现, 有效防控手足口病的流行与发展; 同时结合现有快速检测手段对手足口病病原学进行及时检测报告, 能够有效控制手足口病的大规模爆发流行。

参考文献

- [1] Tsan-Chi, Chen, Guang-Wu, Chen, Chao Agnes, Hsiung, Jyh-Yuan, Yang, Shin-Ru, Shih, Yiu-Kay, Lai, Jyh-Lyh, Juang. Combining multiplex reverse transcription-PCR and a diagnostic microarray to detect and differentiate enterovirus 71 and coxsackievirus A16[J]. Journal of clinical microbiology, 2006, 44(6): 2212-2219.

- [2] L Li, Y He, H Yang, et al. Genetic Characteristics of Human Enterovirus 71 and Coxsackievirus A16 Circulating from 1999 to 2004 in Shenzhen, People's Republic of China [J]. *Clin Microbiol*, 2005, 43(8): 3835-3839.
- [3] Bendig JW, O'Brien PS, Muir P. Serotype-specific detection of coxsackievirus A16 in clinical specimens by reverse transcription-nested PCR [J]. *Journal of clinical microbiology*, 2001, 39(10):3690-3692.
- [4] Tan EL, Yong LL, Quak SH, et al. Rapid detection of Enterovirus 71 by real-time TaqMan RT-PCR [J]. 2008, *Clin Virol*, 01:1-4.
- [5] Mong How, Ooi, Tom, Solomon, Yuwana, Podin, Anand, Mohan, Winnie, Akin, Mohd Apandi, Yusuf, Syvia, del Sel, Kamsiah Mohd, Kontol, Boon Fu, Lai, Daniela, Clear, Chae Hee, Chieng, Emma, Blake, David, Perera, See Chang, Wong, Jane, Cardosa. Evaluation of different clinical sample types in diagnosis of human enterovirus 71-associated hand-foot-and-mouth disease [J]. *Journal of clinical microbiology*, 2007, 45(6):1858-66.
- [6] Brown BA, Kilpatrick DR, Oberste MS, Pallansch MA. Serotype-specific identification of enterovirus 71 by PCR [J]. *Journal of clinical virology: the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 2000, 16(2):107-12.
- [7] 《手足口病诊疗指南(2018版)》编写专家委员会. 手足口病诊疗指南(2018年版) [J]. *中华传染病杂志*, 2018, 36(5):257-263.
- [8] Vuorinen T, Osterback R, Kuisma J, et al. Epididymitis caused by coxsackievirus A6 in association with hand, foot, and mouth disease [J]. *Clin Microbiol*, 2014, 52(12):4412-3.
- [9] Feder HM Jr, Bennett N, Modlin JF. Atypical hand, foot and mouth disease: a vesiculobullous eruption caused by Coxsackie virus A6 [J]. *Lancet Infect Dis*, 2014, 14(1):83-6.
- [10] 赵奇, 朱俊萍. 中国手足口病的流行状况及病原谱变化分析 [J]. *病毒学报*, 2015, 31(5):554-559.
- [11] 祝寒松, 陈思, 王明斋, 等. 厦门市 2013-2017 年手足口病发病与气象因素影响分析 [J]. *中华流行病学杂志*, 2019, 40(5):531-536.
- [12] 仲连发, 张志诚, 赵继军. 基于年龄结构的中国大陆手足口病流行特性的分析 [J]. *中华疾病控制杂志*, 2015, 19(7):651-654, 687.
- [13] 张钟, 嵇红, 洪镭, 等. 2011-2015 年南京市手足口病流行特征及病原学监测分析 [J]. *现代预防医学*, 2017, 44(7):1153-1156, 1170.
- [14] 中国生物工程杂志编辑部. 我国自主研发的肠道病毒 EV71 型灭活疫苗获批上市 [J]. *中国生物工程杂志*, 2015, 35(12):116.

(上接第 1182 页)

- [10] 胡超勇, 邹华伟, 高鹏芝. 急性心梗后心功能预后与血尿酸及肌酸肌酶同工酶水平的相关性 [J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2020, 12(10):143-146.
- [11] Halpern LR, Shealer ML, Cho R, et al. Influence of Intimate Partner Violence (IPV) Exposure on Cardiovascular and Salivary Biosensors: Is There a Relationship? [J]. *J Nation Med Associat*, 2017, 57(13):252-261.
- [12] Ludka FK, Dal-Cim T, Binder LB, et al. Atorvastatin and Fluoxetine Prevent Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction Evoked by Glutamate Toxicity in Hippocampal Slices [J]. *Mol Neurobiol*, 2017, 54(5):3149-3161.
- [13] Hausner H, Derving Karsb LJ, Holst AG, et al. Effect of Semaglutide on the Pharmacokinetics of Metformin, Warfarin, Atorvastatin and Digoxin in Healthy Subjects [J]. *Clin Pharmacokinetics*, 2017, 56(1):3895-3897.
- [14] 向勇, 周伟, 罗亮, 等. E-cadherin、COX-2 及 TRACP5b 与原发性骨巨细胞瘤患者复发的关系 [J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2021, 13(4):638-642.
- [15] Hu MB, Zhang JW, Gao JB, et al. Atorvastatin induces autophagy in MDA-MB-231 breast cancer cells [J]. *Ultrastructural Pathol*, 2018, 42(5):409-415.
- [16] Sophie N, Yee CS, Eric F, et al. Atorvastatin in Combination With Narrowband UV-B in Adult Patients With Active VitiligoA Randomized Clinical Trial [J]. *JAMA Dermatol*, 2018, 154(6):725-726.
- [17] Ran XZ, Ran X, Zong ZW, et al. Protective Effect of Atorvastatin on Radiation-induced Vascular Endothelial Cell Injury In Vitro [J]. *J Radiat Res*, 2018, 51(5):527-533.
- [18] Jokar M, Mirfeizi Z, Hashemzadeh K, et al. AB0811Hyaluronic acid intra-articular injection versus oral atorvastatin in the treatment of knee osteoarthritis [J]. *Ann Rheum Dis*, 2017, 76(Suppl 2):1341-1346.

BRCA1、DACH1 及 S100A4 在子宫内膜癌病情进展及治疗预后中的预测价值

潘月 郑振荣 张开红 刘雪琴 王敏*

[摘要] **目的** 探讨乳腺癌基因-1(BRCA1)、胞命运决定因子(DACH1)及 S100A4 在子宫内膜癌(EC)病情进展及治疗预后中的预测价值。**方法** 选取2016年3月至2018年9月收治的127例EC患者(127份EC组织)设为EC组,选取同期于本院进行手术治疗的133例子宫内膜非典型增生患者(133份子宫内膜非典型增生组织)设为对照组。比较2组BRCA1、DACH1及S100A4水平,分析三者与EC病理特征的关系。随访2年,记录患者预后情况。绘制ROC曲线,分析不同BRCA1、DACH1及S100A4表达对EC预后的预测价值。**结果** EC组BRCA1、DACH1阴性率以及S100A4阳性率显著高于对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。组织学分级为G1、FIGO分期为Ⅲ~Ⅳ期、有淋巴结转移的EC患者BRCA1、DACH1阴性率、S100A4阳性率更高($P<0.05$)。127例EC患者术后1年生存率为82.67%(105/127)。BRCA1及DACH1阴性表达、S100A4阳性表达死亡率显著高于BRCA1及DACH1阳性表达、S100A4阴性表达死亡率,差异均有统计学意义($P<0.05$)。ROC曲线显示:联合BRCA1、DACH1、S100A4检测灵敏度、特异度、AUC分别为89.65%、90.73%、0.962,各指标检测灵敏度、特异度、AUC以三者联合检测最大($P<0.05$)。**结论** BRCA1、DACH1及S100A4与EC发生、发展、预后关系密切,临床可通过联合三项指标检测评估EC患者病情,预测预后。

[关键词] BRCA1; DACH1; S100A4; 子宫内膜癌

The value of BRCA1, DACH1 and S100A4 in predicting the progression and prognosis of endometrial cancer

PAN Yue, ZHENG Zhenrong, ZHANG Kaihong, LIU Xueqin, WANG Min*

(Department of Obstetrics, Panzhihua Maternal and Child Health Hospital, Panzhihua, Sichuan, China, 617000)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the value of breast cancer gene - 1 (BRCA1), cell fate determination factor Dachshund (DACH1) and S100A4 in predicting the progression and prognosis of endometrial cancer (EC). **Methods** The 127 EC patients admitted to this hospital from March 2016 to September 2018 were selected as the EC group (127 EC tissues), and the 133 patients with endometrial atypical hyperplasia treated with surgery during the same period were as the control group (133 atypical hyperplasia tissues of the endometrium). The levels of BRCA1, DACH1 and S100A4 in the two groups were compared, and the relationship between the three levels and the pathological characteristics of EC was analyzed. The patients were followed up for 2 years, and the prognostic outcome of the patients was recorded. The ROC curve was drawn to analyze the value of BRCA1, DACH1 and S100A4 expressions in predicting the prognosis of patients with EC. **Results** The negative rates of BRCA1 and DACH1 and the positive rate of S100A4 in the EC group were significantly higher than those in the control group, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). The negative rates of BRCA1 and DACH1 and the positive rate of S100A4 in patients with histological grade at G1, FIGO stage at Ⅲ~Ⅳ and lymph node metastasis are higher than those of the positive expression

基金项目:四川省医学科研课题(A201704215)

作者单位:攀枝花市妇幼保健院产科,四川,攀枝花 617000

*通信作者:王敏, E-mail:panyuewawa@163.com

rates of BRCA1, DACH1 and negative expression rate of S100A4, the difference was statistically significant ($P<0.05$). The 1-year survival rate of 127 EC patients was 82.67% (105/127). The mortality of patients with negative expressions of BRCA1 and DACH1 and positive expression of S100A4 was higher than that of BRCA1 and DACH1 positive expressions and S100A4 negative expression, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). The ROC curve showed that the sensitivity, specificity, and AUC of the combined detection of BRCA1, DACH1, and S100A4 were 89.65%, 90.73%, and 0.962, respectively. The sensitivity, specificity and AUC of the combined detection were the largest ($P<0.05$). **Conclusion** BRCA1, DACH1, and S100A4 are closely related to the occurrence, development, and prognosis of EC. Clinically, the combined detection of the three indicators can be used to evaluate the condition of EC patients and predict the prognosis.

[KEY WORDS] BRCA1; DACH1; S100A4; Endometrial cancer

在女性生殖系统恶性肿瘤中,子宫内膜癌(Endometrial Cancer, EC)最为常见,临床治疗以手术为主,但对于晚期EC患者来说,术后5年生存率较差,仅为5%~15%^[1]。EC的确切发病原因尚未完全阐明,但有相关研究报道,EC的发生可能与内外源性雌激素刺激、体质因素、遗传因素等因素有关^[2]。乳腺癌基因-1 (breast cancer susceptibility gene 1, BRCA1)为抑癌基因,在乳腺癌、卵巢癌等恶性肿瘤中发挥负性调节作用^[3]。胞命运决定因子(Cell fate determination factor Dachshund, DACH1)是近年来新发现的乳腺癌抑制基因,与乳腺癌患者不良预后有着密切联系^[4]。S100A4蛋白是钙离子结合家族成员之一,参与细胞生长、分化、凋亡等多种细胞进程^[5]。有学者研究发现,S100A4在结直肠癌、乳腺癌、胃癌等恶性肿瘤的发生、发展中发挥重要作用^[6]。本研究重点分析BRCA1、DACH1及S100A4在EC病情进展及治疗预后中的预测价值。现研究报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集2016年3月至2018年9月收治的127例EC患者(127份EC组织)设为EC组。纳入标准:①符合手术指征,入院后进行经腹广泛或次广泛性全子宫切除+双附件切除+盆腔淋巴结清扫;②均经病理检查确诊为EC^[7];③治疗配合度佳,随访资料完整。排除标准:①精神障碍者、因语言障碍无法配合的作者;②合并其他妇科恶性肿瘤、其他系统恶性肿瘤者;③复发的EC患者;④术前接受过放疗治疗及激素治疗者。平均年龄(53.41±5.19)岁;根据国际妇产科联盟(International Federation of Gynaecology and Obstetrics, FIGO)分期^[8]: I~II期69例, III~IV期58例。选取同期于本院进行手术治疗的133例子宫内膜非典型增生患者(133份子

宫内膜不典型增生标本)设为对照组,平均年龄(53.25±5.07)岁。2组患者基线资料比较差异无统计学意义($P>0.05$)。本研究经医院医学伦理委员会批准通过,受试者或家属均签署知情同意书。

1.2 方法

采用S-P免疫组化染色。将EC组、对照组标本经常规石蜡切片、脱水。BRCA1、DACH1及S100A4兔多克隆抗体均采购自美国Epitomics公司。免疫组化染色结果判定^[8]:结合阳性细胞百分比和染色强度判定对结果进行判定。阳性细胞百分比为0计0分,≤10%计1分,>10%~25%计2分,>25%~50%计3分,>50%计4分;细胞质无染色计0分,淡黄色计1分,棕黄色计2分,棕褐色计3分;两项评分之和≤2分为阴性,≥3分为阳性。

1.3 随访

自127例EC患者出院后开始随访,随访方式以电话随访、患者自行来院复查为主,上门随访为辅。术后1年内随访12次,随访截止时间为2019年9月,平均随访时长(10.12±1.15)月。如患者死亡,终止随访。

1.4 统计学方法

采用SPSS 22.0软件进行统计分析,计量资料采用($\bar{x}\pm s$)表示,采用 t 检验;计数资料采用 $n(\%)$ 表示,采用 χ^2 检验;绘制ROC曲线,计算曲线下面积(AUC),以分析不同BRCA1、DACH1及S100A4表达对EC预后的预测价值;以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

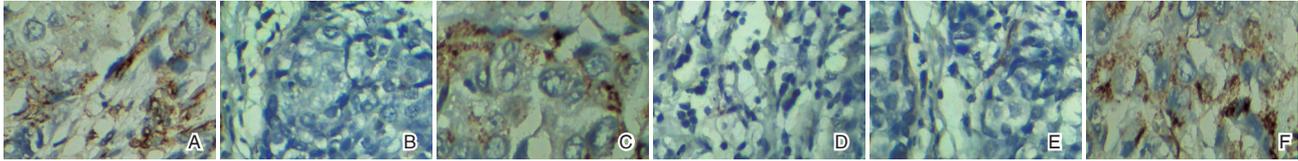
2 结果

2.1 不同组织中BRCA1、DACH1及S100A4表达情况

EC组BRCA1、DACH1阴性率以及S100A4阳性率显著高于对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表1、图1。

表1 不同组织中BRCA1、DACH1及S100A4表达情况 [n(%)]
Table 1 expression of BRCA1, Dach1 and S100A4 in different tissues [n(%)]

分组	n	BRCA1		DACH1		S100A4	
		阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性
EC组	127	59(46.46)	68(53.54)	45(35.43)	82(64.57)	88(69.29)	39(30.71)
对照组	133	118(88.72)	15(11.28)	127(95.49)	6(4.51)	23(17.29)	110(82.71)
χ^2 值		53.400		104.647		71.795	
P值		<0.001		<0.001		<0.001	



注: A、B为BRCA1在EC组织、子宫内膜非典型增生组织中的表达; C、D为DACH1在EC组织、子宫内膜非典型增生组织中的表达; E、F为S100A4在EC组织、子宫内膜非典型增生组织中的表达。

图1 BRCA1、DACH1及S100A4在EC组织及子宫内膜非典型增生中的免疫组化染色图(SP, ×500)

Figure 1 immunohistochemical staining of BRCA1, Dach1 and S100A4 in EC and endometrial atypical hyperplasia (SP, ×500)

2.2 BRCA1、DACH1及S100A4与EC患者病理特征的关系

组织学分级为G1、FIGO分期为Ⅲ~Ⅳ期、有淋巴结转移的EC患者BRCA1、DACH1阴性率、

S100A4阳性率更高($P<0.05$)。不同年龄、组织类型、肌层浸润深度、病理类型的EC患者BRCA1、DACH1、S100A4阳性表达率及阴性表达率比较差异无统计学意义($P>0.05$)。见表2。

表2 BRCA1、DACH1及S100A4与EC患者病理特征的关系 [n(%)]
Table 2 Relationship between BRCA1, Dach1, S100A4 and pathological features of EC patients [n(%)]

病理特征	n	BRCA1		χ^2 值	P值	DACH1		χ^2 值	P值	S100A4		χ^2 值	P值	
		阳性 (n=59)	阴性 (n=68)			阳性 (n=45)	阴性 (n=82)			阳性 (n=88)	阴性 (n=39)			
年龄	<50	71	35(59.32)	36(52.94)	0.522	0.470	26(57.78)	45(54.88)	0.099	0.753	51(57.95)	20(51.28)	0.488	0.485
	≥50	56	24(40.68)	32(47.06)			19(42.22)	37(45.12)			37(42.05)	19(48.72)		
组织类型	I型癌	58	29(49.15)	29(42.65)	0.539	0.463	20(44.44)	38(46.34)	0.042	0.837	41(46.59)	17(43.59)	0.098	0.754
	II型癌	69	30(50.85)	39(57.35)			25(55.56)	44(53.66)			47(53.41)	22(56.41)		
组织学分级	G1	54	13(22.03)	41(60.29)	18.921	<0.001	5(11.11)	49(59.76)	28.131	<0.001	24(27.27)	30(76.92)	27.257	<0.001
	G2+G3	73	46(77.97)	27(39.71)			40(88.89)	33(40.24)			64(72.73)	9(23.08)		
FIGO分期	I~II期	69	44(74.58)	25(36.76)	18.203	<0.001	38(84.44)	31(37.80)	25.472	<0.001	35(39.77)	34(87.18)	24.477	<0.001
	III~IV期	58	15(25.42)	43(63.24)			7(15.56)	51(62.20)			53(60.23)	5(12.82)		
淋巴结转移	有	55	12(20.34)	43(63.24)	23.676	<0.001	6(13.33)	49(59.76)	25.503	<0.001	51(57.95)	4(10.26)	25.041	<0.001
	无	72	47(79.66)	25(36.76)			39(86.67)	33(40.24)			37(42.05)	35(89.74)		
肌层浸润	≤1/2	53	20(33.90)	33(48.53)	2.781	0.095	21(46.67)	32(39.02)	0.698	0.404	35(39.77)	18(46.15)	0.453	0.501
	>1/2	74	39(66.10)	35(51.47)			24(53.33)	50(60.98)			53(60.23)	21(53.85)		
病理类型	腺癌	104	55(93.22)	49(72.06)			39(86.67)	65(79.27)			71(80.68)	33(84.62)		
	鳞腺癌	13	5(8.47)	8(11.76)	4.675	0.197	3(6.67)	10(12.20)	1.212	0.750	10(11.36)	3(7.69)	0.432	0.934
	透明细胞癌	7	2(3.39)	4(5.88)			2(4.44)	5(6.10)			5(5.68)	2(5.13)		
浆液性细胞癌	3	0(0.00)	3(100.00)	1(2.22)			2(2.44)	2(2.27)			1(2.56)			

2.3 BRCA1、DACH1及S100A4不同表达的患者预后情况

随访结果显示:127例EC患者术后1年生存率为82.67%(105/127)。BRCA1及DACH1阴性表达、S100A4阳性表达死亡率显著高于BRCA1及DACH1阳性表达、S100A4阴性表达死亡率,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见

表3。

2.4 BRCA1、DACH1及S100A4联合检测对EC患者预后的预测价

联合BRCA1、DACH1、S100A4检测灵敏度、特异度、AUC分别为89.65%、90.73%、0.962,各指标检测灵敏度、特异度、AUC以三者联合检测最大($P<0.05$)。见表4。

表3 BRCA1、DACH1及S100A4不同表达的患者预后情况 [n(%)]

Table 3 prognosis of patients with different expression of BRCA1, Dach1 and S100A4 [n(%)]

组别	n	BRCA1		DACH1		S100A4	
		阳性(n=59)	阴性(n=68)	阳性(n=45)	阴性(n=82)	阳性(n=88)	阴性(n=39)
生存	105	56(94.92)	49(72.06)	43(95.56)	62(75.61)	67(76.14)	38(97.44)
死亡	22	3(5.08)	19(27.94)	2(4.44)	20(24.39)	21(23.86)	1(2.56)
χ^2 值		11.523		8.071		8.560	
P值		<0.001		0.004		0.003	

表4 BRCA1、DACH1及S100A4联合检测对EC患者预后的预测价值

Table 4 the predictive value of combined detection of BRCA1, Dach1 and S100A4 in the prognosis of EC patients

预测指标	灵敏度 (%)	特异度 (%)	AUC	95%CI	P值
BRCA1	0.863	0.885	0.832	0.699~0.966	<0.001
DACH1	0.869	0.889	0.864	0.697~1.000	<0.001
S100A4	0.851	0.873	0.768	0.628~0.909	<0.001
三者联合检测	0.897	0.907	0.962	0.001~1.000	<0.001
预测指数模型	0.885	0.891	0.843	0.854~0.965	<0.001

3 讨论

EC是女性生殖系统最常见的恶性肿瘤之一,大多数早期EC患者在经过手术治疗后预后较好,但晚期EC患者因存在淋巴结转移后较差,术后复发率较高^[9]。EC的病因曾引起广泛深入的探索,但尚难得到肯定的结论。随着分子生物学的进展,有学者发现EC的发生可能与癌基因、抑癌基因等异常表达有关^[10]。

本研究中,EC组BRCA1、DACH1阴性率以及S100A4阳性率显著高于对照组,与既往研究结果相符^[11]。BRCA1于1990年首次被发现后,广大学者立即对BRCA1进行研究,发现BRCA1的结构、功能、突变与卵巢癌、乳腺癌等联系密切^[12]。以往文献分析了DACH1与乳腺组织、前列腺组织等多种恶性肿瘤的关系,发现DACH1与多种肿瘤相关信号传导途径耦联,并对肿瘤细胞生长、分化发挥重要作用^[13],但DACH1与EC病情进展的关系尚不清楚。S100A4蛋白被称为钙离子结合蛋白,主要存在于细胞内,能通过与其靶蛋白相结合发挥相应的生物学效应^[14]。既往研究发现,S100A4在多种肿瘤组织中均存在高表达,包括膀胱癌、胰腺癌等,并可作为有价值的肿瘤预后标志物^[15]。

国外学者发现,BRCA1作为基因组的看护者,可通过多种途径发挥抑制肿瘤生长、增殖、转移,并可修复DNA双链断裂,调节细胞周期,参与基因转录活化及抑制等,具有多种生物功能^[16]。刘

建捷等^[17]报道,S100A4可通过与细胞凋亡、增殖相关蛋白相互作用,调控细胞存活、凋亡、增殖、迁移等功能。本研究结果进一步证实BRCA1、DACH1、S100A4对肿瘤细胞异常增殖、恶性转化的过程发挥重要作用,三者可作为评估EC病情进展的主要生化指标。

随访结果表明,BRCA1、DACH1、S100A4在EC的发生、发展、浸润转移及预后中发挥着重要的作用,三者均可作为评估EC侵袭转移能力、评估预后的重要生物学指标。通过比较单一指标及联合三项指标检测,表明联合三项指标检测可评估提高评估EC患者病情的准确性,可有效预测EC患者预后情况。

综上所述,BRCA1、DACH1及S100A4与EC发生、发展、预后关系密切,临床可通过联合三项指标检测评估EC患者病情,预测预后。

参考文献

- [1] 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.
- [2] 唐雨欣,李吉杰,何伟,等.乳腺癌患者BRCA1启动子甲基化与生存时间关系的Meta分析[J].预防医学情报杂志,2018,34(10):59-63.
- [3] 韦煜,吴俊龙,顾伟杰,等.中国前列腺癌患者BRCA1/2及ATM基因的胚系突变研究[J].中国癌症杂志,2018,28(8):584-589.
- [4] Hassan M, Zahid S, Shahzadi S, et al. Mechanistic insight of DACH1 receptor in the development of carcinoma insurgence through MD simulation studies [J]. J Biomol Struct Dyn, 2020, 26(2):1-10.
- [5] 李丽春,陈瑶,付梅,等.沉默S100A4基因对乳腺癌上皮间质转换的影响[J].西南国防医药,2019,29(6):650-654.
- [6] 赵滢,高立红,王楠,等.S100A4基因沉默对人胃癌细胞中PI3K/AKT/mTOR信号通路及VEGF表达的影响[J].解剖科学进展,2018,24(4):354-356.
- [7] 张樵,孙晓莉,刘菲.子宫内膜癌术中冷冻切片病理检查的准确性[J].中国肿瘤临床与康复,2019,26(2):38-41.

(下转第1196页)

特异位点DNA甲基化常用检测技术及应用进展

姚燕丽 黄宇哲 韩芝斌 曹春玲 吴静标*

[摘要] DNA甲基化是表观遗传学的一种重要表现形式。具有相同序列的DNA片段,甲基化修饰会改变其遗传学特征,影响其生物学功能。DNA甲基化与疾病的发生、发展有密切联系。目前,循环肿瘤DNA(ctDNA)检测是众多肿瘤早筛技术中,被采用最多、进展最快的一种检测方法。因此,选择ctDNA甲基化检测方法作为辅助诊断技术,对癌症的早期诊断、预后评估、复发风险预测及临床疗效评价等具有非常重要的意义。本文将阐述特异位点DNA甲基化的常用检测技术及基因位点筛选方法的优缺点,对DNA甲基化的临床应用及国内国家药品监督管理局获证情况进行总结分析,以期对DNA甲基化产品目前存在的技术问题及未来发展趋势进行分析展望,促进DNA甲基化产品的合理应用。

[关键词] 癌症早筛; DNA甲基化检测; 位点筛选

Common detection techniques and application progress of DNA methylation at specific sites

YAO Yanli, HUANG Yuzhe, HAN Zhibin, CAO Chunling, WU Jingbiao*

(Guangdong Medical Devices Quality Surveillance and Test Institute, Zhongshan, Guangdong, China, 528437)

[ABSTRACT] DNA methylation is an important manifestation of epigenetics. DNA fragments with the same sequence will be modified by methylation to change their genetic characteristics and affect their biological functions. DNA methylation is closely related to the occurrence and development of diseases. At present, circulating tumor DNA (ctDNA) detection is one of the most widely used and advanced detection methods among many tumor early screening technologies. Therefore, the selection of ctDNA methylation detection method as an auxiliary diagnostic technique is of great significance in the early diagnosis, prognosis evaluation, recurrence risk prediction and clinical efficacy evaluation of cancer. This article expounds specific sites of DNA methylation detection technology and gene loci commonly used screening method, summarizes the current trend in the NMPA certification and clinical application of DNA methylation testing, in order to analyze the existing technical problems and future development trends of DNA methylation products, so as to promote the rational application of DNA methylation products.

[KEY WORD] Tumor early screening; DNA methylation detection; Site-mapping

DNA甲基化是表观遗传学领域研究的重点之一^[1]。DNA甲基化是指在DNA甲基转移酶(DNA methyltransferase, DNMT)的作用下,基因组DNA序列上CpG岛的二核苷酸5'端胞嘧啶转变为5'甲基胞嘧啶。DNA的异常甲基化通常发生在肿瘤的超早期,是肿瘤生长的“种子”因素^[2]。

CpG存在两种形式,一种为分散型的中高度重复序列;另一种为高度聚集,形成CpG岛^[3]。CpG岛中的CpG一般是非甲基化状态,其异常甲基化与肿瘤息息相关。甲基化一般都是连续发生的,即某一CpG位点发生甲基化,那么该位点上下游一定区域内的CpG也发生甲基化。研究表明,基因

基金项目:广州市科技计划项目(202008070001)

作者范围:广东省医疗器械质量监督检验所,广东,中山 528437

*通信作者:吴静标, E-mail: wujingbiao200@163.com

组启动子区甲基化,会改变重要遗传基因表达,是导致癌症发生的原因之一^[3]。随着癌症进程改变,甲基化也会动态改变。此外,不同肿瘤的甲基化图谱也存在明显的差异。综上,利用甲基化检测对肿瘤进行早期筛查具有很大应用潜力^[4]。循环肿瘤 DNA (circulating tumor DNA, ctDNA),属于血液循环游离 DNA (cell-free DNA, cfDNA) 的一种,作为近年来肿瘤领域检测的研究重点,在肿瘤无创前期早筛中具有重要应用价值。本文将综述甲基化的各检测技术,对 DNA 甲基化的临床应用情况进行总结,分析相关产品目前存在的技术难点及未来发展趋势。

1 特异位点甲基化检测方法

有效的甲基化基因检测手段是应用的关键。近年来,市面上出现了不少 DNA 甲基化的检测技术,发展已达十几种^[5-6],按照技术类型,分为甲基化特异性扩增技术[如甲基化特异性 PCR、甲基化特异性半巢式/巢式 PCR、甲基化敏感性限制性内切酶 (methylation-sensitive restriction Endonuclease, MS-RE)-PCR/Southern 法)、甲基化测序检测分析技术(如亚硫酸氢盐测序、简化表观亚硫酸氢盐测序、甲基化敏感性单核苷酸引物延伸 (methylation-sensitive single nucleotide primer extension, Ms-SnuPE)]、甲基化基因芯片及图谱检测技术[如甲基化特异性寡核苷酸芯片、限制性酶切基因扫描技术、甲基化敏感性单链构象分析 (methylation-specific single-strand conformation analysis, MS-SSCA)]、甲基化传感器检测分析技术(如基于 OsO₄ 氧化的电化学传感器、化学氧化裂解诱导的指数扩增反应、基于比例竞争型定量 PCR 的横向流动核酸生物传感器)^[7]、此外,磁珠和油包水微液滴结构的数字 PCR 技术 (BEAMing 技术)、纳米芯片技术也被应用到 DNA 甲基化的检测中。特异位点甲基化检测一般作为后期的技术验证手段。见表 1。

不同的特异性位点甲基化检测技术各有优劣势。总体而言,其检测覆盖范围可分为大、中、小三个程度^[5-6]:大范围的检测是全基因组甲基化测序技术,检测位点广泛但费时费钱;中等覆盖度的检测可用芯片捕获测序技术,对热点进行针对性检测,成本较低;小范围则用甲基化特异性 PCR 技术,可对多个热点甲基化状态快速、准确检测,无需测序,费用相对低。目前应用最多的是后

两种检测方法^[10-11]。中低覆盖程度检测都需针对热点区域,设计特异性探针或引物,检测靶标区域的甲基化状态。热点区域的筛选,即生物标记物 (biomarker) 筛选,又称为靶标区域或靶标位点的筛选。见表 2。

以上方法虽有一定应用性,但限制缺点较大。因此,研发新筛选方法,对 DNA 甲基化检测和基于甲基化检测的肿瘤早期筛查具有重要意义。

2 DNA 甲基化的临床应用

DNA 甲基化的临床应用领域包括非肿瘤与肿瘤疾病^[6-7]。非肿瘤甲基化检测主要用于炎症性疾病、代谢性疾病、感染性疾病、心血管疾病等^[12-15]。肿瘤甲基化检测主要用于肺癌、结肠癌、膀胱癌、乳腺癌等多种肿瘤的早期诊断和预后分析治疗等^[16-19]。肿瘤中普遍存在 DNA 异常甲基化,其特点是甲基化水平总体降低与局部升高。低甲基化可诱导原癌基因和转座子活化、基因印迹缺失以及染色体不稳定性增加,最终诱发肿瘤^[20]。某些抑癌基因发生高甲基化,导致基因沉默,抑制肿瘤能力下降。见表 3。

3 国家药品监督管理局产品获证情况汇总

目前,基于 DNA 甲基化位点的检测产品陆续面世,给疾病诊断筛查带来福音。通过查阅国家药品监督管理局,国内已获证产品见表 4。国内甲基化试剂盒转化商业产品集中在近几年,且获批的都为甲基化特异性 PCR 技术,主要原因还是该技术操作简便、特异性强、灵敏度高等特点。目前甲基化检测试剂盒检测样本类型多为 cfDNA,特别是 ctDNA,其检测方法具有早期、无创、快捷、灵敏度高等特点。基于血液样本中 ctDNA 的检测克服实体瘤组织样本的局限性,具有以下优点:①克服肿瘤组织取样的异质性;②可以识别肿瘤转移性;③可以重复活检,使肿瘤克隆演变得以追踪;④血液中 ctDNA 半衰期仅有 2 小时,实现实时监测肿瘤的变化。然而,血液 ctDNA 含量很低,其检测技术的灵敏度要求较高。

4 小结与展望

特异位点 DNA 甲基化检测手段发展至今,技术应用依然存在成本高、检测量低、引物或探针设计不一影响效果等问题,因此,优化提升 DNA 甲

表1 特异位点甲基化检测方法汇总

Table 1 Summary of methods for detecting DNA methylation at specific sites

方法	原理	PCR引物	精确性	检测范围	费用成本	其它
甲基化特异性 PCR (methylation-specific PCR, MS-PCR) ^[8,9]	重亚硫酸盐处理 DNA, 在甲基化的胞嘧啶状态不改变情况下, 使未甲基化的胞嘧啶转变为尿嘧啶, 再进行特异性 PCR 反应	两对	高	单一位点	低	1. 定性, 待测片段 DNA 的序列需已知 2. 当待测 DNA 中 5-甲基胞嘧啶分布极不均衡时, 检测复杂 3. 重亚硫酸盐处理不完全时易假阳性
亚硫酸氢盐修饰后测序 (Bisulfite sequencing PCR, BSP)	亚硫酸氢钠修饰处理基因组 DNA, 在不改变已甲基化的胞嘧啶前提下, 使全部未甲基化的胞嘧啶(C)被转化为尿嘧啶(U), 从而将甲基化的差异转变成碱基上的差异	一对	高	单一位点及总体 DNA 甲基化差异	较高	1. 定性定量均可 2. 操作繁琐耗时, 不易大批量操作 3. 引物避免含 CpG 位点, 扩增区域应包含尽量多的 CpG 位点, 包含的 CpG 位点越多则引物设计越好
甲基化敏感性高分辨率溶解曲线法 (Methylation-sensitive high-resolution melting, MS-HRM)	重亚硫酸盐处理 DNA 改变样品中的 GC 含量, 而后将这种 GC 含量差异转化成溶解曲线 Tm 值之间的差异	不需	高	可系列化分析整体片段甲基化水平	高	1. 重复性高, 操作简单, 适用于大量样本 2. 不受检测位点局限高度 3. 不能明确每个 CpG 位点甲基化情况
结合重亚硫酸盐的限制性内切酶法 (Combined bisulfite restriction analysis, CO-BRA)	重亚硫酸盐处理及 PCR 扩增, 根据目标 DNA 的甲基化状态, 使用限制性内切酶特异切割转化后 PCR 产物	一对	较低	单一特殊酶切位点	低	1. 快速定量, 所需样本量少 2. 需进行内部熔解温度校正减少样本差异
荧光定量法 (Methylight)	甲基特异性引物结合甲基特异性荧光的探测技术	一对引物及两端标荧光素探针	非常高	单一位点	高	1. 可重复、所需样本量少、不需要电泳、杂交, 减少污染和操作误差 2. 已应用于临床肿瘤早筛查
焦磷酸测序 (Pyrosequencing)	通过 4 种酶 (DNA 聚合酶、ATP 硫酸化酶、荧光素酶和三磷酸腺苷双磷酸酶) 催化的同一反应体系中的酶级联化学发光反应	不需	非常高	单一位点及总体甲基化差异	低	1. 引物要求高, 测序片段短, 适用已知短序列 (~100 bp) 分析 2. 测序速度快, 可直观进行单核苷酸多态性研究和临床检验

表2 甲基化 biomarker 筛选方法

Table 2 Screening methods of methylated biomarker

名称	方法	优缺点
对未知基因启动子进行引物探针设计	对文献查阅总结, 确定目标基因序列及启动子区域	盲筛、基因 CpG 位点不确定、无研究数据支持、待测样本的敏感性和特异性不可评估
少量样本结合数据库信息筛选	使用公开数据库 (TCGA 甲基化芯片数据等), 对比表达谱数据, 利用甲基化程度与基因表达呈负调控的关系, 结合少量样本的实测性能表现及目标基因相关文献汇总的结果	使用公开的大样本数据进行分析, 可精确到位点; 需通过阅读大量文献进行 biomarker 校正
以数据库信息为基础构建新算法模型	使用公开的数据库 (如 TCGA 甲基化芯片数据), 通过计算机分类器算法, 构建模型, 富集公开数据中最特异敏感的特征集	在已有样本中敏感性特异性较理想, 但数据量庞大, 易出现过拟合或欠拟合的现象, 且易出现 biomarker 假阳性

甲基化检测技术亟待解决。新技术如纳米芯片技术、免疫组化与数字 PCR 技术联合、微流控芯片与质谱联用或可应用到商用试剂盒检测中。稳定实现甲基化转化需要专业的数据分析人员对大数据进行分析, 选择出优质的靶标及成熟的核酸提取

纯化技术、超灵敏的 PCR 或测序检测平台。基于 ctDNA 的甲基化检测, 解决了重复取样活检、组织采样存在异质性问题。目前已实现转化的甲基化位点不多且特异性稍差, 为了获得更高质量的 ctDNA, 建立国际或者国家标准的 ctDNA 提纯分

表3 部分基因甲基化对应肿瘤应用

Table 3 Application of partial genes methylation in tumors

基因	基因沉默对肿瘤的意义	肿瘤类型
Adenomatous polyposis coli, APC	对细胞增殖、迁移、粘附、骨架重组及染色质稳定性失去调节作用 ^[21-22]	乳腺癌、肺癌、食管癌、结肠癌、胃癌、胰、肝癌
Breast cancer 1, BRCA1	与DNA修复与转录激活有关 ^[23]	乳腺癌、卵巢癌
Cyclin-dependent kinase 2A, CDKN2A/p16	周期素依赖性蛋白激酶抑制剂 ^[24]	胃肠道、头与颈部瘤、非霍奇金淋巴瘤、肺癌
Death-associated protein kinase 1, DAPK1	钙/钙调素-依赖的丝氨酸/苏氨酸磷酸化酶; 凋亡抑制	肺癌
E-cadherin	增强增殖、侵袭与转移 ^[25-26]	乳腺癌、甲状腺癌、胃癌
Estrogen receptor, ER	激素抵抗 ^[27]	乳腺癌、前列腺癌
Glutathione S-transferase Pi 1, GSTP1	失去对致癌物活性代谢产物的解毒作用	前列腺癌、乳腺癌、肾癌
Human Mut L homologue 1, hMLH1	缺损DNA错配修复, 基因点突变 ^[28-29]	结肠癌、胃癌、子宫内膜癌、卵巢癌
O-6 methylguanine-DNA methyltransferase, MGMT	p53-相关基因, 与DNA修复及耐药性有关	肺癌、脑瘤
P15	细胞的过度激活与增殖 ^[29]	非白血性白血病、淋巴瘤、鳞状细胞癌、肺癌
Ras association domain family member 1, RASSF1A	失去了对G1/S负调控抑制作用	肺癌、乳腺癌、卵巢癌、肾癌、鼻咽癌
Ras association domain family member 1, Rb	不能抑制DNA复制和细胞分裂必需的基因转录 ^[8]	成视网膜细胞瘤、少突神经胶质(细胞)瘤
Von Hippel-Lindau, VHL	错误的降解RNA结合蛋白质, 改变RNA稳定性	肾细胞癌

表4 国内NMPA获证情况

Table 4 Products registered in NMPA

产品名称	生产厂家	注册文号
Septin9 基因甲基化检测试剂盒(PCR 荧光探针法)	博尔诚(北京)科技有限公司	国械注准 20153401481
人类 SDC2 基因甲基化检测试剂盒(荧光 PCR 法)	广州市康立明生物科技有限责任公司	国械注准 20183400506
人 SHOX2、RASSF1A 基因甲基化 DNA 检测试剂盒(PCR 荧光法)	上海透景生命科技股份有限公司	国械注准 20173403354
人 septin9 基因甲基化检测试剂盒(荧光 PCR 法)	苏州为真生物科技有限公司	国械注准 20183400103
人类 MGMT 基因甲基化检测试剂盒(荧光 PCR 法)	基因科技(上海)股份有限公司	国械注准 20193400101
人 Septin9 基因甲基化 DNA 检测试剂盒(PCR 荧光法)	上海透景生命科技股份有限公司	国械注准 20193400316
RNF180/Septin9 基因甲基化检测试剂盒(PCR 荧光探针法)	博尔诚(北京)科技有限公司	国械注准 20203400447
人类 SDC2 基因甲基化检测试剂盒(PCR 荧光探针法)	广州市康立明生物科技有限责任公司	国械注准 20183400506
KRAS 基因突变及 BMP3/NDRG4 基因甲基化和便隐血联合检测试剂盒(PCR 荧光探针法-胶体金法)	杭州诺辉健康科技有限公司	国械注准 20203400845
人类 SDC2 基因甲基化检测试剂盒(荧光 PCR 法)	厦门艾德生物医药科技股份有限公司	国械注准 20213400007

离方法或者纳入细胞系,对检出限、背景干扰进行研究验证至关重要。另外,是要检测整个DNA甲基化水平还是位点特异性甲基化水平,或是全基因组水平分析还是位点特异性分析,是否需达到单核苷酸分辨率等问题,是选择不同甲基化检测技术时需考虑的核心问题,也是未来筛选、应用、验证DNA甲基化的研究方向,助力DNA甲基化产品研发的关键。

参考文献

- [1] 吴羽灵, 张朋军, 田亚平. 甲基化循环肿瘤DNA的检测及应用[J]. 标记免疫分析与临床, 2021, 28(1): 152-158.
- [2] 刘毅, 张少华, 吴一龙, 等. 中国临床肿瘤学进展[M]. 人民卫生出版社, 2017: 435-437.

- [3] Moghbeli M, Mosannen MH, Memar B, et al. Role of-MAML1 in targeted therapy against the esophageal cancer stem cells[J]. J Transl Med, 2019, 17: 126-138.
- [4] 廖雯俊. 血浆游离DNA在肝细胞肝癌中应用价值的探索研究[D]. 北京协和医学院, 2016.
- [5] 刘洋, 尹纯, 贾永峰, 等. 肿瘤液体活检的临床应用与挑战[J]. 临床检验杂志, 2019, 37(8): 561-563.
- [6] 姚月娟, 张波, 荆结线. 循环肿瘤DNA的检测及其临床意义[J]. 中华生物医学工程杂志, 2016, 22(2): 158-162.
- [7] 代雅琪, 张博洋, 朱丽叶, 等. DNA甲基化检测方法研究进展[J]. 农业生物技术学报, 2017, 25(1): 150-158.
- [8] 刘勇. ctDNA在肿瘤检测、筛查、预后和治疗中的应用进展[J]. 肿瘤防治研究, 2020, 47(8): 627-631.
- [9] 陈剑虹, 黄淑君, 马健, 等. 甲基化荧光定量PCR快速检测自闭症男童中脆性X综合征的临床应用[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(2): 142-145.

- [10] 范昭璇,赵亮,张学记. 循环肿瘤DNA的检测:从数字化到测序[J]. 化学进展, 2019, 31(10):1384-1395.
- [11] 黄瑾,梁涛波,许恒毅. 数字PCR在生物学检测中应用的研究进展[J]. 生命科学, 2021, 33(2):255-264.
- [12] Ventham NT, Kennedy NA, Adams AT, et al. Integrative epigenome-wide analysis demonstrates that DNA methylation may mediate genetic risk in inflammatory bowel disease [J]. Nat Commun, 2016, 7:13507.
- [13] Tourancheau A, Mead EA, Zhang XS, et al. Discovering multiple types of DNA methylation from bacteria and microbiome using nanopore sequencing [J]. Nat Methods, Epub ahead of print.
- [14] Grundberg E, Meduri E, Sandling JK, et al. Global analysis of DNA methylation variation in adipose tissue from twins reveals links to disease-associated variants in distal regulatory elements[J]. Am J Hum Genet, 2013, 93(5):876-90.
- [15] 张晓康,郑芳. 特定基因甲基化在动脉粥样硬化性心血管疾病中的研究进展[J]. 武汉大学学报(医学版), 2020, 41(3):508-512.
- [16] Liang W, Liu D, Li M, et al. Evaluating the diagnostic accuracy of a ctDNA methylation classifier for incidental lung nodules: protocol for a prospective, observational, and multi-center clinical trial of 10,560 cases [J]. Transl Lung Cancer Res, 2020, 9(5):2016-2026.
- [17] Chen J, Sun H, Tang W, et al. DNA methylation biomarkers in stool for early screening of colorectal cancer [J]. J Cancer, 2019, 10(21):5264-5271.
- [18] Negraes PD, Favaro FP, Camargo JL, et al. DNA methylation patterns in bladder cancer and washing cell sediments: a perspective for tumor recurrence detection [J]. BMC Cancer, 2008, 8:238.
- [19] Frederick ALM, Guo C, Meyer A, et al. The influence of obesity on folate status, DNA methylation and cancer-related gene expression in normal breast tissues from premenopausal women [J]. Epigenetics, 2021, 16(4):458-467.
- [20] Bilvayeh S, Rahimi Z, Yari K, et al. A systematic review and meta-analysis of the DNA methylation in colorectal cancer among Iranian population [J]. Gene Reports, 2021.
- [21] 董冰瑶,耿安琪,袁时芳,等. 循环肿瘤DNA在乳腺癌临床诊治中的研究进展[J]. 中国癌症防治杂志, 2020, 12(6):701-705.
- [22] 代毅聪,陈凤容,王昆华. DNA甲基化与胃肠道肿瘤研究进展[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2021, 28(2):161-166.
- [23] 陆媛媛,李力. 循环肿瘤DNA检测在卵巢癌诊治中的研究进展[J]. 实用妇产科杂志, 2020, 36(12):916-919.
- [24] 丁宇,乔贵宾. 液体活检在肺癌早期诊断中的应用[J]. 国际肿瘤学杂志, 2019, 46(9):548-552.
- [25] 郭鹏,周晓俊,徐露,等. 粪便DNA甲基化标志物检测在胃癌筛查中的应用[J]. 中华医学杂志, 2021, 101(11):808-812.
- [26] 林松荣,张磊,罗金现,等. DNA甲基化修饰在甲状腺癌中的研究进展[J]. 陕西医学杂志, 2021, 50(2):254-257.
- [27] 盖希,范凤凤,李占文. 循环肿瘤细胞检测在乳腺癌预后评估中的作用及与乳腺癌分子分型的关系[J]. 浙江医学, 2018, 40(2):202-205.
- [28] 闫新欣,张熙洋,席少枝,等. DNA甲基化标志物在结肠癌中的表达及其意义研究[J]. 中国全科医学, 2020, 23(S2):184-185.
- [29] 堵一乔,胡婷婷,王文慧,等. 结肠癌患者血浆SEPT9基因甲基化检测的研究[J]. 中华医学杂志, 2018, 41(5):395-398.

(上接第1191页)

- [8] Amann-Zalcenstein D, Tian L, Schreuder J, et al. A new lymphoid-primed progenitor marked by Dach1 downregulation identified with single cell multi-omics [J]. Nat Immunol, 2020, 21(12):1-11.
- [9] 隆曜先,王毛毛,蔡志福,等. 脂联素通过AMPK/mTOR/4EBP1通路对子宫内膜癌细胞迁移及侵袭的影响[J]. 中国癌症杂志, 2020, 30(1):31-37.
- [10] 苑文贺,史惠蓉. 子宫内膜复杂性不典型增生及早期子宫内膜癌患者保留生育功能的预后分析[J]. 中国计划生育和妇产科, 2018, 1(10):23-27.
- [11] Coignard J, Lush M, Beesley J, et al. A case-only study to identify genetic modifiers of breast cancer risk for BRCA1/BRCA2 mutation carriers [J]. Nature Commun, 2021, 12(1):45-49.
- [12] 王毅,王鹏,卜焯,等. BRCA1基因突变与乳腺癌易感性及其乳腺癌分型特征的关联分析[J]. 实用癌症杂志, 2019, 34(1):26-29.
- [13] Riggs MB, Lin N, Gorski JW, et al. Increased DACH1 mutation frequency in Kentucky endometrial cancer patients [J]. Gynecol Oncol, 2020, 159(11):261-262.
- [14] 谢顺明,王文晓,赵文武. miR-149-3p通过靶向S100A4抑制膀胱癌细胞的增殖、迁移和侵袭[J]. 现代肿瘤医学, 2019, 27(1):19-24.
- [15] 李丽春,陈瑶,付梅,等. 沉默S100A4基因对乳腺癌上皮间质转换的影响[J]. 西南国防医药, 2019, 29(6):650-654.
- [16] Blair AB, Groot VP, Gemenetzis G, et al. BRCA1/BRCA2 Germline Mutation Carriers and Sporadic Pancreatic Adenocarcinoma [J]. J Am Coll Surg, 2018, 226(4):630-637.
- [17] 刘捷捷,高华,许新才,等. 结肠癌中AGR2和S100A4的表达及临床意义[J]. 临床与实验病理学杂志, 2018, 34(4):86-89.

外泌体在肿瘤转移和耐药相关研究中的进展

魏欣宇¹ 王文锐¹ 杨清玲^{2*} 陈昌杰²

[摘要] 外泌体是一种由机体各种细胞分泌的细胞外囊泡,分布于多种体液中,参与机体的各种生理和病理活动,并发挥重要作用。本文介绍外泌体的结构和功能,综述外泌体在肿瘤微环境中诱导免疫反应、肿瘤转移及耐药的作用机制。通过对外泌体修饰的研究,本文展望外泌体更广阔的应用前景。

[关键词] 外泌体;肿瘤;转移;耐药;外泌体修饰

Advances in the relevant study of exosomes in tumor metastasis and drugresistance

WEI Xinyu¹, WANG Wenrui¹, YANG Qingling^{2*}, CHEN Changjie²

(1. Anhui Province Key Laboratory of Translational Cancer Research, Bengbu, Anhui, China, 233000; 2. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Bengbu Medical College, Bengbu, Anhui, China, 233000)

[ABSTRACT] Exosomes are extracellular vesicles secreted by different kind of cells, distributed in a variety of body fluids. Exosomes participate in various physiological and pathological activities of the body and play important roles. This article introduces the structure and function of exosomes, and reviews the mechanism of exosomes inducing immune response, tumor metastasis and drug resistance in the tumor microenvironment. In addition, the broader application prospects of exosomes are discussed through the study of exosomes modification.

[KEY WORDS] Exosomes; Tumor; Metastasis; Drug resistance; Exosome modification

外泌体(exosome)是一种具有脂质双分子层的盘状分泌膜泡,其直径在30~100 nm之间。外泌体来自各种类型的细胞,包括癌细胞,间充质干细胞和多泡小体的免疫细胞^[1],故外泌体可从各种体液中分离出来,包括血液,尿液,唾液,母乳,羊水,腹水,脑脊液,胆汁和精液等。外泌体通过内向膜出芽经历三个过程产生:细胞膜内陷,形成内体(endosome);内体膜内陷,形成多泡体(multivesicular bodies, MVB);多泡体与质膜融合后分泌到胞外成为外泌体^[2]。外泌体在受体细胞中的MVB处进行反向融合,随后释放其携带的重要信号分子,在细胞间实现信息的传递^[3],形成一种新的细胞-外泌体-细胞的信息传递模式,介导体内不同类型细胞之间的细胞间通讯。这些信号分子包含外泌体同源母细胞代谢物、蛋白质、脂类和丰富

的核酸分子(mRNA、tRNA、lncRNA、circRNA、microRNA等)以及外泌体中特定细胞成分的功能性、靶向性,机制驱动性积累^[4]。

1 外泌体在疾病进程中的作用

外泌体可参与细胞增殖、分化、血管生成和伤口愈合等许多生物学过程,也可通过癌基因或者肿瘤抑制因子在肿瘤细胞间的传递促进肿瘤的发生或抵消肿瘤的进展。已有许多研究证明在改善心功能和减轻心肌纤维化等方面,干细胞释放的外泌体显示出其潜在的细胞治疗和心脏修复能力^[5]。另外,外泌体促进血管生成,但在炎症条件下,单核细胞衍生的外泌体可诱导血管平滑肌细胞的凋亡,这是人类血管疾病的重要发生过程。外泌体还可调节基因表达和驱动免疫抑制或免疫

基金项目:安徽省教育厅自然科学重大项目(KJ2019ZD28);安徽省高校学科(专业)拔尖人才学术资助重点项目(gxbjZD2016069);安徽省学术与技术带头人后备人选资助项目(2017H110);2018年度高校学科(专业)拔尖人才学术资助项目(gxbjZD27)

作者单位:1. 癌症转化医学安徽省重点实验室,安徽,蚌埠 233000;

2. 蚌埠医学院生物化学与分子生物学教研室,安徽,蚌埠 233000

*通信作者:杨清玲, E-mail: yqlmimi@163.com

刺激反应等多种生物学过程,如肿瘤细胞来源的外泌体可通过同时诱导人肿瘤细胞和细胞毒性T淋巴细胞的凋亡来实现免疫逃避。在代谢性疾病中,肿瘤来源的外泌体作用于小鼠和人的脂肪细胞和肌肉细胞而加重机体恶病质,促进肿瘤及其他慢性疾病的进展^[6]。

2 外泌体在肿瘤微环境中的作用和机制

肿瘤微环境(TME)是肿瘤的发生、生长及转移与肿瘤细胞所处的内外环境,其组成成分包含肿瘤相关成纤维细胞(CAF)、内皮细胞、免疫和炎症细胞、骨髓源性细胞以及与肿瘤建立复杂交叉关系的细胞外基质^[7]。外泌体是肿瘤微环境中的重要组成部分。肿瘤来源外泌体包含的肿瘤抗原和热休克蛋白刺激免疫反应,包含的抑制分子配体如 Fas-L、转化生长因子 β (TGF- β)和前列腺素E2(PGE2)既可降低细胞毒性又能建立免疫抑制肿瘤微环境^[8]。肿瘤来源的外泌体 miRNA 在 TME 中诱导基质重编程,创造有利于肿瘤生长、转移、免疫逃逸和化疗耐药的微环境^[9]。在前列腺癌中,外泌体中携带的物质促进前列腺癌相关细胞的结缔组织增生,促进肿瘤转移^[10]。

2.1 外泌体在肿瘤转移中所起的作用和相应机制

肿瘤转移是癌症相关死亡的主要原因,许多研究已经确定了外泌体在肿瘤转移中的直接侵袭作用和通过促进转移,转化和建立转移前利基的特定效应促进转移的作用^[11]。肿瘤细胞来源的外泌体具有将转移潜能转移至受体细胞的能力,可为特定器官的细胞提供肿瘤转移前微环境^[12]。Chen^[13]等从唾液腺腺样囊性癌(SACC)患者血浆中分离出的外泌体中高表达 lncRNA MRPL23 反义 RNA 1(MRPL23-AS1),其与肺转移和总体生存相关。MRPL23-AS1 以“外泌体分泌”方式作用于肺微血管内皮细胞,增加了微血管的通透性,协助体内 SACC 癌细胞的肺转移。用脑转移细胞分泌的外泌体预处理脑微环境可以增强癌细胞的生长。脑转移患者的肿瘤组织和外泌体中 CEMIP 升高,CEMIP⁺外泌体被脑内皮细胞和小神经胶质细胞摄取后上调 Ptgs2, Tnf 和 Ccl/Cxcl 编码的促炎性细胞因子,诱导血管周围小生境中的内皮细胞和炎症,促进脑血管重塑和转移^[14]。在引发转移的结肠癌亚型中,上调的 circLONP2 调节 miR-17 的细胞内成熟,上调的成熟 miR-7 以外泌体的形式被

邻近细胞内化而引起转移起始能力在原发部位扩散并加速异种器官肿瘤转移的形成^[15]。另外,最近的研究^[16]表明,对放化疗杀伤的垂死肿瘤细胞分泌的大量外泌体进行 RNA-Seq 检测发现明显变化的 miRNAs,其中 miR-194-5p 通过调节细胞周期,阻止细胞从 G1 期进入 S 期并促进 DNA 损伤反应,增强 TRCs 的存活,进而调控 E2F3 的表达,增强肿瘤细胞再增殖和重新聚集。

2.2 外泌体与耐药诱导相关研究

Boelens 等^[17]发现间质细胞和乳腺癌细胞可通过分泌信号驱动化疗和放疗耐药,通过异型相互作用,外泌体从基质转移到乳腺癌细胞。外泌体中的 RNA(主要是非编码转录本和转座元件)刺激模式识别受体 RIG-I 激活 stat1 依赖的抗病毒信号,促进对 NOTCH3 的转录反应,并扩大治疗抵抗肿瘤起始细胞。研究^[18]证明在胃癌中,外泌体 miR-522 主要来自于肿瘤微环境中的 CAFs。顺铂和紫杉醇激活 USP7/hnRNPA1 轴促进 CAFs 中 miR-522 的分泌,进而降低 ALOX15 的表达,减少癌细胞中脂质 ros 的积累,最终降低化疗敏感性。在表皮生长因子受体 2 阳性(HER-2+)乳腺癌患者中,增强的 miR-567 可以被包装成外泌体,整合到受体细胞中,通过靶向 ATG5 抑制自噬和逆转曲妥单抗耐药^[19]。异质肿瘤可从外泌体中获得耐药表型。实验证明^[20],短暂暴露于化疗药物可以显著增加 Rab8 介导的耐药细胞释放含有 ABCB1 的细胞外囊泡,并通过 Rab5 的下调加速这些细胞外囊泡循环回到敏感肿瘤细胞的质膜上。细胞间 ABCB1 转移显著增强,敏感的癌细胞获得迅速但不可稳定持续存在的抗性,以逃避化疗药物的细胞毒性。研究发现放射治疗有助于改变外泌体的分泌动态,x 射线可以以剂量依赖的方式激活 MCF-7 细胞外泌体的生成和分泌,细胞通过改变活性氧和外泌体活性实现治疗反应^[21-22]。结直肠癌中,CAF 来源的外泌体可以激活转化生长因子 factor- β (TGF- β)信号通路,而 TGF-inhibitor 1 中和抗体可抑制这一作用,降低干细胞基因的克隆性和表达水平,CAF 分泌外泌体促进结直肠癌细胞的干性,从而增加辐射抗性^[23]。癌细胞的照射促进了 tet2 介导的 miR-378 启动子的去甲基化,miR-378a-3p 过表达及其在外泌体中的负载,诱导 NK 细胞颗粒酶 b(GZMB)分泌减少,GZMB 表达降低导致 NK 细胞毒性降低。故外泌体 miRNA-378a-3p 在

癌细胞中的过表达限制了自然杀伤细胞的细胞毒性,促进肿瘤进展^[24]。

2.3 外泌体诱导免疫作用

肿瘤来源的外泌体(TEX)参与肿瘤的免疫抑制过程。TEX将基因组DNA、mRNA和miRNAs等信息传递到免疫细胞,重新编码应答细胞的功能,直接或间接影响免疫细胞的发育、成熟和抗肿瘤活性^[25]。现已证明肿瘤和免疫细胞来源的外泌体携带肿瘤抗原并促进免疫,导致CD8⁺T细胞和CD4⁺T细胞活化,直接抑制肿瘤生长和对恶性肿瘤发展的抵抗^[26]。在TEM中,过表达的VEGF和激活的VEGFR以及磷脂酰丝氨酸由细胞和外泌体内膜到外膜的活化均可触发免疫抑制作用,如抑制免疫细胞Treg对NK、NKT、CD4⁺、CD8⁺等抗原提呈细胞的抑制作用^[27]。实验^[28]证明,乳腺肿瘤细胞中上调CD73表达的lncRNA SNHG16可由癌细胞分泌的外泌体传递到V δ 1 T细胞,SNHG16通过海绵化吸收miR-16-5p通过ceRNA作用,导致其靶基因SMAD5的失调,增强TGF-inhibitor 1/SMAD5通路,上调V δ 1 T细胞中CD73的表达,证实了乳腺癌细胞来源的外泌体SNHG16/miR-16-5p/SMAD5调控轴增强了TGF-cada1/SMAD5通路的激活,从而诱导了CD73的表达,增强T细胞功能。

3 外泌体修饰

关于外泌体在肿瘤发生和治疗方面已有诸多研究,外泌体用作诊断工具主要涉及使用可控外泌体,而不是利用天然外泌体的特性。外泌体的来源细胞的特性常被改造以产生具有特定生物学特点修饰的外泌体。在肿瘤微环境中,外泌体是程序性死亡配体1(PD-L1)进入受体细胞的转载体,远处的肿瘤细胞可以通过外泌体PD-L1对激活的T细胞进行远程攻击实现免疫逃逸^[29]。对T细胞进行修饰,效应CAR-T细胞分泌的CAR外泌体表面携带CAR,表达高水平的细胞毒性分子并抑制肿瘤生长,但不表达程序性细胞死亡蛋白1(PD1)并且重组PD-L1治疗不会降低CAR-T细胞外泌体的抗肿瘤作用。CAR外泌体比CAR-T细胞的治疗应用更安全^[30]。另外,外泌体还可以通过添加肿瘤靶标配体进行修饰或功能化,有研究为了对外泌体进行基因修饰,使用两种不同表面的单克隆抗体,开发了一个用于控制细胞免疫的外泌体平台:SMART-Exo。Shi X^[31]通过抗人CD3和抗人HER2抗体的基因展

示工程化外泌体,将SMART-Exo应用于表达人类表皮生长因子受体2(HER2)的乳腺癌,从而导致SMART-Exos双重靶向T细胞CD3和乳腺癌相关的HER2受体,通过重定向和激活细胞毒性T细胞使其攻击HER2⁺的乳腺癌细胞。设计的SMART-Exos在体外和体内均表现出高度有效的特异性抗肿瘤活性。最近还有研究^[32]提出用微流体超声处理方法,直接生成包含成像剂的外泌体膜(EM)、癌细胞膜(CCM)和脂质涂层聚乳酸-糖基乙酸(PLGA NP),由内体和质膜蛋白组成的肿瘤细胞来源的EM包被的PLGA NPs在体外和体内模型中均比大小和核壳结构相近的CCM-PLGA NPs具有精确的同型靶向性。这种方法明显提高了抗肿瘤的靶向性。实验^[33]证明基于工程外泌体的抗结肠癌药物5-FU和miR-21共传递系统能有效的促进细胞摄取并显著下调5-FU耐药细胞中miR-21的表达。

4 前景与展望

外泌体的生物学作用在疾病中的研究仍在进行,并且针对其实用价值和各种病理的诊断和治疗的研究数量已大幅增加。这种优势在于对疾病进行检测和监测时,外泌体携带物质的复杂性提供了一个多功能的诊断窗口。外泌体在向病变细胞运送功能性货物时的特征特性使其成为较好的治疗载体,无论是在基础水平还是应用水平^[34]。最近几年,科研人员一直都致力于探究外泌体的临床应用,包括外泌体作为生物标志物检测疾病的高效性和特异性、改造外泌体以提高其运载能力和外泌体在药物方面的应用。此外,外泌体作为细胞间的通讯媒介,其介导的核酸传递是一种很有前景的基因治疗策略^[35]。总之,外泌体有望在肿瘤研究中取得进一步的进展,实现其在肿瘤早期检测,诊断及治疗中的临床应用。

参考文献

- [1] Ageta H, Tsuchida K. Post-translational modification and protein sorting to small extracellular vesicles including exosomes by ubiquitin and UBLs[J]. Cell Mol Life Sci, 2019, 76(24): 4829-4848.
- [2] Colombo M, Raposo G, Théry C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles[J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2014, 30:255-289.
- [3] Joshi BS, de Beer MA, Giepmans BNG, et al. Endocytosis of extracellular vesicles and release of their cargo from endosomes[J]. ACS Nano, 2020, 14(4): 4444-4455.

- [4] Kalluri R, LeBleu VS. The biology, function, and biomedical applications of exosomes[J]. *Science*, 2020, 367(6478): eaau6977.
- [5] Dougherty JA, Mergaye M, Kumar N, et al. Potential role of exosomes in mending a broken heart: nanoshuttles propelling future clinical therapeutics forward[J]. *Stem Cells Int*, 2017, 2017: 5785436.
- [6] Chitti SV, Fonseka P, Mathivanan S. Emerging role of extracellular vesicles in mediating cancer cachexia [J]. *Biochem Soc Trans*, 2018, 46(5): 1129-1136.
- [7] Belli C, Trapani D, Viale G, et al. Targeting the microenvironment in solid tumors[J]. *Cancer Treat Rev*, 2018, 65:22-32.
- [8] Taghikhani A, Farzaneh F, Sharifzad F, et al. Engineered tumor-derived extracellular vesicles: potentials in cancer immunotherapy [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 221. Published 2020 Mar 6.
- [9] Tan S, Xia L, Yi P, et al. Exosomal miRNAs in tumor microenvironment [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2020, 39(1): 67. Published 2020 Apr 16.
- [10] Saber SH, Ali HEA, Gaballa R, et al. Exosomes are the driving force in preparing the soil for the metastatic seeds: lessons from the prostate cancer [J]. *Cells*, 2020, 9(3): 564. Published 2020 Feb 28.
- [11] Milane L, Singh A, Mattheolabakis G, Suresh M, Amiji MM. Exosome mediated communication within the tumor microenvironment[J]. *J Control Release*, 2015, 219:278-294.
- [12] Hoshino A, Costa-Silva B, Shen TL, et al. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis[J]. *Nature*, 2015, 527(7578): 329-335.
- [13] Chen CW, Fu M, Du ZH, et al. Long noncoding RNA MRPL23-AS1 promoted cystic carcinoma lung metastasis [J]. *Cancer Res*, 2020, 80(11): 2273-2285.
- [14] Rodrigues G, Hoshino A, Kenific CM, et al. Tumour exosomal CEMIP protein promotes cancer cell colonization in brain metastasis[J]. *Nat Cell Biol*, 2019, 21(11): 1403-1412.
- [15] Han K, Wang FW, Cao CH, et al. CircLONP2 enhances colorectal carcinoma invasion and metastasis through modulating the maturation and exosomal dissemination of microRNA-17[J]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1): 60.
- [16] Jiang MJ, Chen YY, Dai JJ, et al. Dying tumor cell-derived exosomal miR-194-5p potentiates survival and repopulation of tumor repopulating cells upon radiotherapy in pancreatic cancer[J]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1): 68.
- [17] Boelens MC, Wu TJ, Nabet BY, et al. Exosome transfer from stromal to breast cancer cells regulates therapy resistance pathways[J]. *Cell*, 2014, 159(3): 499-513.
- [18] Zhang H, Deng T, Liu R, et al. CAF secreted miR-522 suppresses ferroptosis and promotes acquired chemo-resistance in gastric cancer[J]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1): 43.
- [19] Han M, Hu J, Lu P, et al. Exosome-transmitted miR-567 reverses trastuzumab resistance by inhibiting ATG5 in breast cancer[J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(1): 43.
- [20] Wang X, Qiao D, Chen L, et al. Chemotherapeutic drugs stimulate the release and recycling of extracellular vesicles to assist cancer cells in developing an urgent chemoresistance [J]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1): 182.
- [21] Jabbari N, Nawaz M, Rezaie J. Ionizing radiation increases the activity of exosomal secretory pathway in MCF-7 human breast cancer cells: A possible way to communicate resistance against radiotherapy[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(15): 3649.
- [22] Jabbari N, Karimipour M, Khaksar M, et al. Tumor-derived extracellular vesicles: insights into bystander effects of exosomes after irradiation[J]. *Lasers Med Sci*, 2020, 35(3): 531-545.
- [23] Liu L, Zhang Z, Zhou L, et al. Cancer associated fibroblasts-derived exosomes contribute to radioresistance through promoting colorectal cancer stem cells phenotype [J]. *Exp Cell Res*, 2020, 391(2): 111956.
- [24] Briand J, Garnier D, Nadaradjane A, et al. Radiotherapy-induced overexpression of exosomal miRNA-378a-3p in cancer cells limits natural killer cells cytotoxicity [J]. *Epigenomics*, 2020, 12(5): 397-408.
- [25] Whiteside TL. Exosomes and tumor-mediated immune suppression[J]. *J Clin Invest*, 2016, 126(4): 1216-1223.
- [26] Greening DW, Gopal SK, Xu R, et al. Exosomes and their roles in immune regulation and cancer[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2015, 40: 72-81.
- [27] Vaupel P, Multhoff G. Hypoxia-/HIF-1 α -Driven factors of the tumor microenvironment impeding antitumor immune responses and promoting malignant progression [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2018, 1072: 171-175.
- [28] Ni C, Fang QQ, Chen WZ, et al. Breast cancer-derived exosomes transmit lncRNA SNHG16 to induce CD73+ $\gamma\delta$ 1 Treg cells[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2020, 5(1): 41.
- [29] Tang Y, Zhang P, Wang Y, et al. The biogenesis, biology, and clinical significance of exosomal PD-L1 in cancer [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 604.
- [30] Fu W, Lei C, Liu S, et al. CAR exosomes derived from effector CAR-T cells have potent antitumor effects and low toxicity[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 4355.
- [31] Shi X, Cheng Q, Hou T, et al. Genetically engineered cell-derived nanoparticles for targeted breast cancer immunotherapy[J]. *Mol Ther*, 2020, 28(2): 536-547.
- [32] Liu C, Zhang W, Li Y, et al. Microfluidic sonication to assemble exosome membrane-coated nanoparticles for immune evasion-mediated targeting [J]. *Nano Lett*, 2019, 19(11): 7836-7844.
- [33] Liang G, Zhu Y, Ali DJ, et al. Engineered exosomes for targeted co-delivery of miR-21 inhibitor and chemotherapeutics to reverse drug resistance in colon cancer [J]. *J Nanobiotechnology*, 2020, 18(1): 10. Published 2020 Jan 9.
- [34] Kalluri R, LeBleu VS. The biology, function, and biomedical applications of exosomes[J]. *Science*, 2020, 367(6478): eaau6977.
- [35] Sun W, Xing C, Zhao L, et al. Ultrasound assisted exosomal delivery of tissue responsive mRNA for enhanced efficacy and minimized off-target effects [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2020, 20: 558-567.

深圳市人民医院转化医学协同创新中心

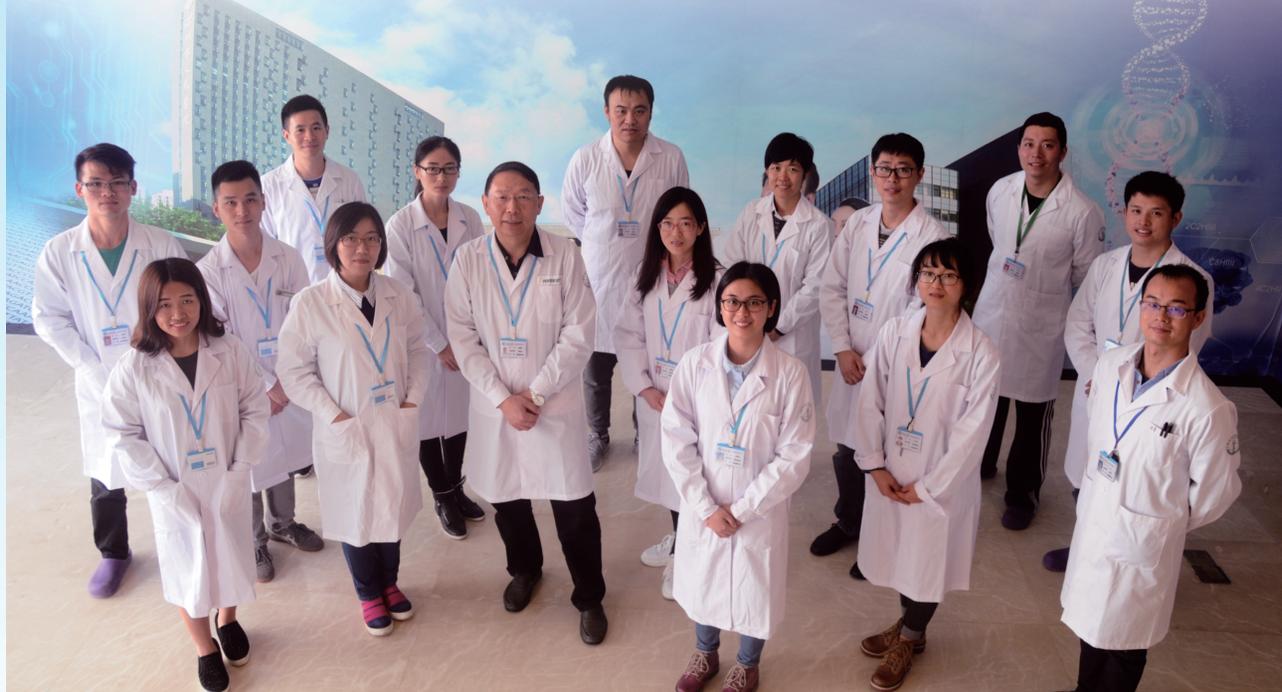
深圳市人民医院转化医学协同创新中心位于深圳市大鹏新区金业大道深圳国际生命科学产业园 A16 栋、A28 栋和 B11 栋。实验室面积 13 400 平方米,作为医院公共科研平台,具有分析测试中心、SPF 级动物房、生物安全二级防护实验室、生物样本库、GMP 实验室。现装备大型科研设备 500 多台,价值 1.2 亿元。入驻 21 个临床专业研究所(实验室)。建立全链条医学科研协同创新体系,旨在为大湾区生物医药产业、医院专职科研人员、研究生等提供全开放、共享技术服务平台,保障大湾区重大科研项目实施和科研成果转化。

中心研究团队近 20 年来主要从事干细胞与细胞治疗的研究与临床转化,已获批为国家干细胞临床研究备案机构,广东省干细胞与细胞治疗工程技术研究中心,深圳市干细胞研究与临床转化重点实验室,深圳市干细胞与细胞移植公共技术服务平台,深圳免疫细胞治疗公共服务平台。实验室现有工作人员 42 名,其中专职研究人员 39 名,学术带头人 5 名,固定人员 21 名,平台技术人员 6 名。

中心建立了技术先进、设备配套、管理规范、运行良好的干细胞与细胞制剂制备、质量控制和临床研究的体系,开展各类干细胞和免疫细胞的制备与质量评估,临床前安全性和有效性评估等研究工作。建立临床级间充质干细胞分离、纯化、储存技术方法,完成了脐带间充质干细胞注射液质量监控体系,建立了细胞制备追溯软件管理系统,可完成从细胞制备,到质量控制,到输注患者全流程的管理。建立了干细胞分化为肾小球类器官、干细胞高效定向分化、干细胞体内迁徙途径和示踪、抗肺癌肿瘤干细胞 DC 疫苗等核心技术。

2016 年深圳市人民医院在深圳市大鹏新区国际生命科学产业园组建医院公共科研平台转化医学协同创新中心,分批租用三栋实验楼 13 400 平方米,投资建设分析测试中心、SPF 级动物房、生物安全二级防护实验室、生物样本库、GMP 实验室。装备大型科研设备 500 多台,价值 1.2 亿元。组建了专职科研队伍,在站博士后达 100 人,有 21 个临床专业研究所(实验室)入驻。建立全链条医学科研协同创新体系,旨在为大湾区生物医药企业、医院专职科研人员、研究生等提供全方位共享开放技术服务平台。

由于良好的科研条件和人才队伍建设,医院学术影响力和创新能力大幅提升。2020 年医院发表 SCI 论文 483 篇,总影响因子 2 301 分,其中 IF 大于 10 分论文 46 篇;获得省部级科学技术奖 6 项;承担国家省市竞争性课题 143 项,获资助经费超 5 000 万元,其中国家自然科学基金等项目 34 项。获专利 39 项,其中发明专利授权 12 项。完成技术转移 8 项。医院在全国顶级医院排名 82 名,进入中国医院临床专科科技量值百强的有 10 个学科;进入复旦大学华南地区医院综合实力第 13 位,15 个学科进入华南地区专科声誉榜提名。



杂志简介：

《分子诊断与治疗杂志》于2009年5月创刊，是由中山大学主管，《中国家庭医生》杂志社有限公司主办，广州达安基因股份有限公司承办的面向国内外公开发行的分子医学权威性刊物，也是我国第一份以分子诊断与治疗学科为主要内容的分子医学专业学术期刊。本刊以传播分子医学理念、报道分子医学前沿、倡导分子医学创新、促进分子医学进步为办刊宗旨。主要刊登我国医学分子诊断和分子治疗相关领域中的基础理论研究、临床实践和技术方法的最新研究成果以及国内分子医学新技术、新理论和新进展等方面的文章。目前有编委及审稿专家80余人。在编委会和审稿专家及编辑部的共同努力下，于2016年被收录为“中国科技核心期刊”（中国科技论文统计源期刊）。

目前有“述评”、“论著”、“综述”、“前沿进展”、“专家笔谈”、“讲座”、“动态”和“专栏”等栏目。涵盖基因诊断、免疫诊断、核酸分子诊断、蛋白分子诊断、信号分子诊断、分子影像诊断、诊断仪器应用、基因治疗、核酸分子治疗、蛋白分子治疗等内容。

