



ISSN 1674-6929

CN 44-1656/R

邮发代号: 46-283

分子诊断与治疗杂志

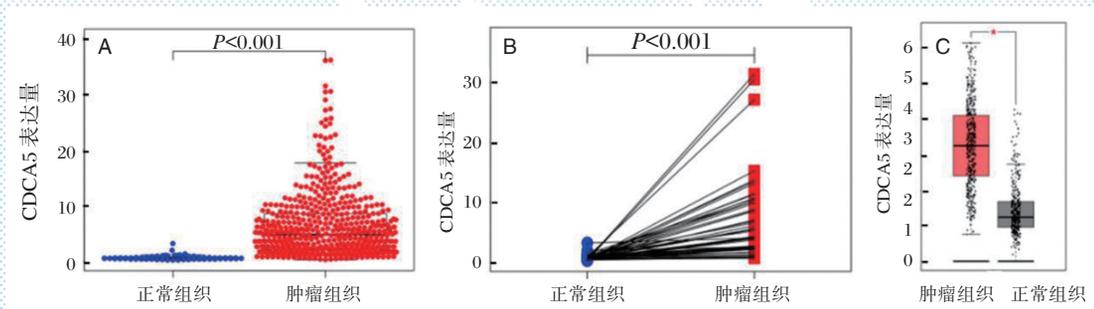
FENZI ZHENDUAN YU ZHILIAO ZAZHI

2020年12月 第12卷 第12期 总第76期

JOURNAL OF

MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Volume 12 Number 12 December 2020



注: A 图为肺腺癌和正常肺组织中 *CDCA5* 的表达差异比较; B 图为 57 对配对的癌组织和癌旁组织中 *CDCA5* 的表达差异比较; C 图为 *CDCA5* 的表达分析。

图(P1618) *CDCA5* 在肺腺癌组织和正常肺组织样本中的表达差异分析

Figure(P1618) Differential analysis of *CDCA5* expression in lung adenocarcinoma and normal lung tissue samples

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 692204

12 >



黄鸿新



黄鸿新,男,1963年10月13日出生。1980~1984年就读于华南师范大学化学系化学专业。1984~2004年于西江大学(现肇庆学院)从事教学、科研及管理工作。2004年至今于广东省医疗器械质量监督检验所(简称广东医械所)从事质量体系、医疗器械标准、检测及监督抽验工作。

现任广东省医疗器械质量监督检验所二级调研员、副教授,全国消毒技术与设备标准化技术委员会主任委员,全国测量、控制和实验室电器设备安全标准化技术委员会医用设备分技术委员会副主任委员,第九届国家药品标准物质委员会医疗器械(体外诊断试剂)分委员会委员。

多年从事实验室质量管理体系管理、医疗器械质量监督抽验及医疗器械标准化工作,负责多项医疗器械国家标准、行业标准的起草。主持编写了广东医械所的质量手册、程序文件、作业指导书及质量记录表格等质量文件,是CNAS实验室认可评审员;2009年至今,参加广东省医疗器械产品注册技术审评工作,并依据ISO 13485-2003医疗器械质量管理体系用于法规的要求,对多家医疗器械生产厂家进行质量体系考核工作;熟悉并掌握医疗器械检验技术,发表漏电流测量、库尔特计数仪测微粒等多篇论文;负责实验室的评审及能力拓展工作,多次通过CNAS、国家计量认证、SFDA、TÜV PS的评审,目前广东医械所经CNAS认可的承检项目1174项,经SFDA认可的承检项目1179项,位列全国前茅。

作为医疗器械质量评价专家,承担多次国家、省医疗器械监督抽验检测和评价工作。迅速并有力地处理了人工心肺机体外循环管道、一次性使用血液灌流器等重大不良事件;2011年,在全国率先实施了体外循环及血液处理设备类医疗器械的抽验、现场检验及现场调研的“三位一体”工作,是新形势下医疗器械评价体系的创新探索,受到上级部门的高度肯定。

分管广东医械所归口的体外循环、消毒技术与设备、齿科设备等三大标准化技术委员会的标准化工作。2006年以来,共承担并发布国家标准37项,行业标准165项,其中YY 0503-2005《环氧乙烷灭菌器》标准项目获“中国标准创新贡献奖”三等奖殊荣。

近年来承担及参与起草医疗器械国家及行业标准12项。承担及参与国家、省、市科研项目6项,获发明及实用新型专利4件,发表论文5篇,主编及参编著作5部。

分子诊断与治疗杂志

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

月刊 2020 年 12 月 第 12 卷 第 12 期 总第 76 期 Bimonthly Volume 12 Number 12 December 2020

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

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

地址 广州市天河区天河北路 179 号祥龙大厦 11 楼 (510620)
电话 (020) 32290789-206, 32290789-201
电子邮箱 jmdt@vip.163.com
刊号 ISSN 1674-6929
CN 44-1656/R
邮发代号 46-283
发行单位 广东省报刊发行局
发行范围 国内外公开发售
广告发布登记通知书 440100190057
印刷 天意有福科技股份有限公司
出版日期 2020 年 12 月 18 日
定价 RMB 15.00 元

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

Add 11 Fl., Xianglong Building, 179# Tian he bei Lu, Guangzhou, China 510620
Tel (020) 32290789-206, 32290789-201
E-mail jmdt@vip.163.com
CSSN ISSN 1674-6929
CN 44-1656/R
Printing TianYi Yofus Technology Co., Ltd.
Publish Date 2020.12.18
Price RMB 15.00



扫码订阅《分子诊断与治疗杂志》



中国科技核心期刊

(中国科技论文统计源期刊)

收录证书

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

分子诊断与治疗杂志

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

特颁发此证书。

中国科学院技术信息研究所

Institute of Scientific and Technical Information of China

北京复兴路 15 号 100038

www.istic.ac.cn

2019年11月



分子诊断与治疗杂志

月刊 2020年12月 第12卷 第12期

目次

述评

我国25-羟基维生素D检测方法及其研究进展 潘晓芳 吴静标 黄燕虹 等(1591)

论著

人细小病毒B19核酸检测试剂国家参考品的建立 麻婷婷 许四宏 周海卫(1596)

耳聋基因突变检测试剂盒行业标准的建立 张娟丽 曲守方 孙楠 等(1600)

二代测序技术在急性髓系白血病患者预后中的应用价值 牛晓娜 葛菲 郭宏岗 等(1604)

彩色多普勒超声检查在椎动脉型颈椎病综合治疗中的疗效分析
..... 王充强 巩凤超 王晶 等(1608)

β -珠蛋白基因CAP位点下游+43_+40(-AAAC)突变的临床特征分析
..... 王继成 杜丽 姚翠泽 等(1612)

基于TCGA数据集分析CDCA5在肺腺癌中的临床意义与分子机制
..... 王萍 黄奔 范维 等(1616)

miR-766-3p调控肺癌细胞增殖、迁移、侵袭的分子机制 郭喜喜 王振华 胡红军 等(1621)

肠道菌群紊乱在大鼠非酒精性脂肪肝中的作用机制 耿妍 鲁晓岚 耿燕 等(1626)

Xpert MTB/RIF检测结核分枝杆菌和利福平耐药的临床应用
..... 张建平 李红燕 王大望 等(1631)

巨细胞病毒性疾病患儿尿HCMV-DNA水平、并发症及更昔洛韦治疗后转归分析
..... 赵代艳 苏爱芳 郭长根(1635)

不同类型过敏性结膜炎患儿TSLP、TGF- β 1及ECP表达及临床意义 江灵(1639)

PCT、凝血因子联合CRP检测在肝硬化并发SBP中的诊断及预后评估价值 王惠(1643)

COPD性高血压患者肾素-血管紧张素-醛固酮水平的临床研究
..... 任芳 郝同琴 牛丽丹 等(1648)

血清Hcy、hs-CRP在急性脑梗死患者的表达及与病情程度的相关性
..... 孙媛媛 余其贵 谢军(1652)

APRI和FIB4在慢性丙型肝炎肝纤维化诊断中的应用
..... 叶向阳 邱荣仙 何雄志 等(1657)

呼出气冷凝液、血清和组织中miRNA34a检测对非小细胞肺癌患者的价值探讨
..... 陶国华 孙革革 陈金亮 等(1661)

动脉瘤性蛛网膜下腔出血患者外周血miR-210与TLR4表达的相关性及临床意义
..... 陈明 张清秀 魏秀娥(1665)

162例CRE感染的分布特点及降低细菌感染措施评价研究 张雁 梁家花 张峰(1670)

VEGF-C与Gas6在胆管癌中的表达及临床意义 朱宇 吴涯昆 龚程等(1674)

原发性高血压患者血清D-D水平预测并发左室肥厚研究 王春燕 任海霞 齐跃(1678)

CK-MB、CRP、ALB以及D-二聚体水平对于缺血性肠病患者的价值研究
..... 袁燕文 许哲 黄妙兴等(1682)

GPC-1、miRNA-9及Caspase-3在肺腺癌中的表达及与病情和预后生存的相关性
..... 智雅婧 冯铁虹 那顺孟和等(1686)

剖宫产后产褥感染血清AT-III、TAC及PCT水平变化及与预后
..... 李小芝 唐连敏 付翠芳等(1691)

冠心病心力衰竭患者血清HCY水平、心电图QRS波时限与心功能的相关性分析
..... 王正飞 杨龙 兰占占(1695)

ProADM、sRAGE、HMGB-1对ICU感染患者病情严重程度及预后的评估价值
..... 吴瑶 时小妍 杨丽坤等(1700)

Th17/Treg联合PCT值对乳腺癌患者术后化疗医院感染的预测价值分析
..... 付晶 尚春迎 刘丽(1704)

ALB、CD64及BCL-2在重症肺炎中的表达及与病情严重程度、预后的关系研究
..... 刘瑞莹 李群 杨帅等(1708)

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
..... 付慧清 王新颜 吴洁清等(1713)

血VEGF、SDF-1、MMP-9和HMGB1水平与烟雾病患者颅内出血的关系
..... 徐梦怡 徐静 张倩倩(1717)

AT-III活性和NT-proBNP检测联合GRACE评分对NSTE-ACS患者远期预后的评估价值
..... 王丽显 柴博兰 杨颖博等(1722)

白内障患者NOS、DPP及TFAR19蛋白的表达及临床意义 张红振 王二丽 朱乐如(1727)

早期血液灌流在急性百草枯中毒患者中的应用效果观察 焦文明 高永霞 胡德亮(1732)

食管癌患者血清MIP-3 α 、CA125、Stathmin表达与预后的相关性
..... 李敏 刘秀芬 陆靖雯(1736)

伤寒沙门氏菌质粒DNA参考物质的研制
..... 努色热提·阿布都沙拉木 袁慕云 林晓峰等(1740)

外周血Blimp1、IFN- γ 、IL-10水平与重症肺结核的相关性分析
..... 黄健 李明瑛 牛文一等(1745)

血清CXCL12、SDF-1 α 、CXCR4水平与颅脑损伤患者预后的相关性
..... 李文彬 郑祥德 吴昌徽等(1749)

综 述

病毒性肝炎血清标志物检测方法新进展 李轶春(1753)

讲 座

结核分枝杆菌耐药基因突变检测试剂相关问题探讨 刘容枝 方丽 徐超(1757)

专家风采

黄鸿新 (封二)

实验室巡礼

广东省医疗器械质量监督检验所 (封三)

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Monthly Volume 12 Number 12 December 2020

CONTENTS

COMMENTS

Determination Methods and Research Progress of 25-hydroxyvitamin D in China

PAN Xiaofang, WU Jingbiao, HUANG Yanhong, ZHU Xiuxia, HUANG Hongxin (1591)

ORIGINAL ARTICLES

Establishment of national reference material for human parvovirus B19 nucleic acid detection reagent

MA Tingting, XU Sihong, ZHOU Haiwei (1596)

The Validation of Industry Standard for deafness gene mutations testing kit

ZHANG Juanli, QU Shoufang, SUN Nan, ZHANG Wenxin, SUN Jing, YU Ting, HUANG Jie (1600)

The value of next-generation sequencing technology in prognosis of patients with acute myeloid leukemia

NIU Xiaona, GE Fei, GUO Honggang, CHEN Xiangli, GUO Jianmin (1604)

Analysis of the effect of color Doppler ultrasound in the comprehensive treatment of vertebral artery type cervical spondylopathy

WANG Chongqiang, GONG Fengchao, WANG Jing, LV Chunju, HU Dali, XIA Liping (1608)

Hematological analysis of +43_+40(-AAAC) mutation in the 5'UTR of β -globin gene

WANG Jicheng, DU Li, YAO Cui zhe, QIN Danqing, GUO Hao (1612)

Analysis of clinical significance and molecular mechanism of *CDCA5* in lung adenocarcinoma based on TCGA data set

WANG Ping, HUANG Ben, FAN Wei, LIU Ji acui, CHENG Qingyuan, DUAN Yiping, CHEN Liangyue, MA Tiantian, YU Mingxia (1616)

The molecular mechanism of miR-766-3p inhibiting lung cancer cell proliferation, migration and invasion

GUO Xixi, WANG Zhenhua, HU Hongjun, ZHANG Liguo (1621)

Mechanism of intestinal flora disturbance in nonalcoholic fatty liver disease in rats

GENG yan, LU Xiaolan, GENG yan, SHI Haitao (1626)

Clinical application of Xpert MTB/RIF in detecting Mycobacterium tuberculosis and rifampicin resistance

ZHANG Jianping, LI Hongyan, WANG Dawang, LIU Shali, MA Yanxia (1631)

Analysis of urine HCMV-DNA level, complications and outcome after ganciclovir treatment in children with human cytomegalovirus diseases

ZHAO Daiyan, SU Aifang, GUO Changgen (1635)

Expression and clinical significance of TSLP, TGF- β 1 and ECP in children with different types of allergic conjunctivitis

JIANG Ling (1639)

Value of serum PCT, coagulation factors and CRP detection in the diagnosis and prognosis assessment of liver cirrhosis complicated with spontaneous bacterial peritonitis

WANG Hui (1643)

Clinical study on the renin-angiotensin-aldosterone system in patients with COPD induced hypertension

REN Fang, HAO Tongqin, NIU Lidan, ZHANG Jiangbo (1648)

Correlation between the expression of serum Hcy and hs-CRP in patients with acute cerebral infarction and its severity

SUN Yuanyuan, YU Qigui, XIE Jun (1652)

Application of APRI and FIB4 in the diagnosis of liver fibrosis in chronic hepatitis C

YE Xiangyang, QIU Rongxian, HE Xiong zhi, HU Zhenting, ZHENG Fengfeng, HUANG Xiaogang, HUANG Qinghua, LIN Guoxian (1657)

The value of detection of miRNA34a in exhaled air condensate , serum and tissues in patients with non-small cell lung cancer	
<i>TAO Guohua , SUN Pingping , CHEN Jinliang , CHEN Jianrong</i>	(1661)
Correlation of miR-210 and TLR4 expression in peripheral blood of patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage and its clinical significance	
<i>CHEN Ming , ZHANG Qingxiu , WEI Xiue</i>	(1665)
The distribution characteristics of 162 cases of CRE infection and evaluation of measures to reduce bacterial infection	
<i>ZHANG Yan , LIANG Jiahua , ZHANG Feng</i>	(1670)
Expression and clinical significance of VEGF-C and Gas6 in cholangiocarcinoma	
<i>ZHU Yu , WU Yakun , GONG Cheng , PANG Wu , TIAN Yinsheng</i>	(1674)
Significance of serum D-D expression in patients with essential hypertension and prediction of concurrent left ventricular hypertrophy	
<i>WANG Chunyan , REN Haixia , QI Yue</i>	(1678)
The value of CK-MB, CRP, ALB, and D-dimer levels in patients with ischemic bowel disease	
<i>YUAN Yanwen , XU Zhe , HUANG Miaoxing , CHEN Mengjun</i>	(1682)
The expression of GPC-1 , miRNA-9 and Caspase-3 in lung adenocarcinoma and its correlation with the condition and prognostic survival	
<i>ZHI Yajing , FENG Tiehong , NA Shun menghe , ZHENG Ti</i>	(1686)
Changes of serum AT-III , TAC and PCT and prognosis of puerperal infection after cesarean section	
<i>LI Xiaozhi , TANG Lianmin , FU Cuijiang , XUE Yun , YAO Liyun</i>	(1691)
Correlation between HCY level, QRS time limit of ECG and cardiac function in patients with coronary heart disease and heart failure	
<i>WANG Zhengfei , YANG Long , LAN Zhanzhan , ZHANG Dongdong , LIU Chunming</i>	(1695)
Evaluation value of ProADM, sRAGE and HMGB-1 for disease severity and prognosis of infection patients in ICU	
<i>WU Yao , SHI Xiaoyan , YANG Likun , ZHOU Nan , GAO Ya , ZHOU Zhaozhao , ZHAO Li</i>	(1700)
Predictive value analysis of Th17/Treg combined with PCT for nosocomial infection of breast cancer patients undergoing postoperative chemotherapy	
<i>FU Jing , SHANG Chunying , LIU Li</i>	(1704)
The expression of ALB, CD64 and BCL-2 in severe pneumonia and their relationship with the severity and prognosis	
<i>LIU Ruiying , LI Qun , YANG Shuai , TANG Huixing , GAO Qian</i>	(1708)
The levels of HbA1c and 25-OH-D3 in patients with type 2 diabetes mellitus and the correlation between T lymphocyte subsets and insulin secretion	
<i>FU Huiqing , WANG Xinyan , WU Jieqing , LI Yan , LI Qing , LIU Yingchun</i>	(1713)
Relationship between serum VEGF, SDF-1, MMP-9 and HMGB1 levels and intracranial hemorrhage in MMD patients	
<i>XU Mengyi , XU Jing , ZHANG Qianqian</i>	(1717)
The value of AT-III activity, NT-proBNP detection combined with GRACE score in evaluating the long-term prognosis of NSTEMI-ACS patients	
<i>WANG Lixian , CHAI Bolan , YANG Yingbo , WANG Xiaowei , ZHANG Dongqin</i>	(1722)
Expression and clinical significance of NOS, DPP and TFAR19 in patients with cataract	
<i>ZHANG Hongzhen , WANG Erli , ZHU Leru</i>	(1727)
Application effect of early hemoperfusion in patients with acute paraquat poisoning	
<i>JIAO Wenming , GAO Yongxia , HU Deliang</i>	(1732)
Correlation between expressions of serum MIP-3 α , CA125 and stathmin and prognosis in patients with esophageal cancer	
<i>LI Min , LIU Xiufen , LU Jingwen</i>	(1736)
Preparation of plasmid DNA reference material for <i>Salmonella typhi</i>	
<i>NUSERETI Abudushalamu , YUAN Muiyun , LIN Xiaofeng , XU Longyan , CHEN Yao</i>	(1740)
Correlation analysis of peripheral blood Blimp1 , IFN- γ and IL-10 levels and severe pulmonary tuberculosis	
<i>HUANG Jian , LI Mingying , NIU Wenyi , SUN Bing , HAN Wei , CUI Xiuqin</i>	(1745)
Correlation between serum CXCL12, SDF-1 α , CXCR4 levels and prognosis in patients with craniocerebral injury	
<i>LI Wenbin , ZHENG Xiangde , WU Changhui , ZHOU Wenlai , CHENG Qiong , DONG Heng</i>	(1749)

REVIEWS

New progress in detection methods of viral hepatitis serum markers	
<i>LI Yichun</i>	(1753)

我国25-羟基维生素D检测方法及其研究进展

潘晓芳 吴静标 黄燕虹 朱秀霞 黄鸿新*

[摘要] 维生素D属于脂溶性维生素的一种,主要包括维生素D₂和维生素D₃,它们在人体肝脏中转化为25-羟基维生素D₂和25-羟基维生素D₃,总称为25-羟基维生素D。25-羟基维生素D是维生素D的主要循环形式,也是衡量维生素D营养状态的最佳指标。25-羟基维生素D是人体必须的脂溶性维生素,不仅影响钙磷代谢,而且具有广泛的生理作用,是维持人体健康、细胞生长和发育的必不可少的物质,与很多疾病的发生密切相关,因此检测25-羟基维生素D水平对维生素D的个体化补充具有重要的意义,可以有效预防维生素D不足或者缺乏。本文综述了我国25-羟基维生素D的检测方法和原理及其研究进展,并分析了各个检测方法的优点和不足,以期对临床诊断提供参考依据。

[关键词] 25-羟基维生素D; 25-OH VD; 液相色谱-串联质谱法; 化学发光法

Determination Methods and Research Progress of 25-hydroxyvitamin D in China

PAN Xiaofang, WU Jingbiao, HUANG Yanhong, ZHU Xiuxia, HUANG Hongxi*

(Division IV of General Laboratory, Guangdong Medical Devices Quality Surveillance and Test Institute, Guangzhou, Guangdong, China, 510663)

[ABSTRACT] Vitamin D is a kind of fat-soluble vitamins, mainly including vitamin D₂ and vitamin D₃, converted into 25-hydroxyvitamin D₂ and 25-hydroxyvitamin D₃ in the human liver, collectively known as 25-hydroxyvitamin D, which is the main circulation form of vitamin D, do also the best indicator to measure the nutritional status of vitamin D. 25-Hydroxyvitamin D is an essential fat-soluble vitamin for the human body. It not only affects calcium and phosphorus metabolism, but also has a wide range of physiological effects. It is an essential substance for maintaining human health, cell growth and development, and is closely related to the occurrence of many diseases. Therefore, the detection of 25-hydroxyvitamin D levels is of great significance to individualized vitamin D supplementation, and can effectively prevent vitamin D deficiency or insufficiency. This paper summarized the determination methods, principles and research progress of 25-hydroxyvitamin D in China, to provide the basis for clinical diagnosis.

[KEY WORDS] 25-hydroxyvitamin D; 25-OH VD; Liquid chromatography-tandem mass spectrometry; Chemiluminescence Immunoassay

维生素D是人体必需的一类脂溶性类固醇衍生物,经两次羟基化后与细胞内维生素D受体(Vitamin D receptor, VDR)特异性结合后,发挥其生理作用。维生素D缺乏会引起骨骼系统、肌肉系统、心血管系统、免疫系统、神经系统、糖代谢、

细胞增殖分化、内分泌系统、肿瘤等相关疾病。血清25-羟基维生素D(25-hydroxyvitamin D, 25-OH VD)浓度被认为是测定全面维生素D状态的最可靠指标^[1-3],因而可用于测定患者是否出现维生素D缺乏。《维生素D及其类似物临床应用共识》指

基金项目:广州市科创伟项目(201802010048)

作者单位:广东省医疗器械质量监督检验所综合检验四室,广东,广州 510663

*通信作者:黄鸿新, E-mail: 1653865109@qq.com

出:血清 25-OH VD 水平检测已被公认为反映维生素 D 状态的最合理指标^[2]。全球范围内有很多人 25-OH VD 缺乏,因此定期检测 25-OH VD 水平确保其充足对疾病预防意义重大^[4-6]。本文综述了液相色谱-串联质谱法、化学发光分析法、酶联免疫法、克隆酶供体免疫测定法、免疫层析法、胶乳免疫比浊法共 6 种检测 25-OH VD 的方法,并对各个方法的优点和不足进行分析,以期临床选择 25-OH VD 的检验方法提供指导。

1 我国 25-OH VD 检测试剂盒注册情况

《体外诊断试剂注册管理办法》将 25-OH VD 检测试剂盒分为第二类^[7]。截止 2020 年 11 月 30 日,检索国家药品监督管理局(以下简称国家局)国产医疗器械数据库发现,目前国内 25-OH VD 检测试剂盒涉及的方法学主要包括液相色谱-串联质谱法、化学发光分析法、酶联免疫法、克隆酶供体免疫测定法、免疫层析法、胶乳免疫比浊法。

2 25-OH VD 检测试剂盒检测方法及其原理

2.1 液相色谱-串联质谱法(Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry, LC-MS/MS)

LC-MS/MS 的原理是利用被检测物质 25-OH VD₂/D₃ 与背景干扰物如基质中的其他内源性物质在流动相和固定相中分配系数的不同进行分离。待测样本经过色谱柱分离后流出,进入质谱离子源离子化,形成不同质荷比的气相带电离子。在电场的作用下,带电离子进入 Q1 四极杆质量分析器,目标母离子被特定电场选择出来,通过 Q1 四极杆,进入 Q2 碰撞池,在碰撞气体(氩气)和一定碰撞电压的作用下,目标母离子被打碎成若干子离子。这些子离子进入 Q3 四极杆质量分析器后,在特定电场作用下,只有目标子离子被选择出来,能通过 Q3 四极杆,进入检测器中进行检测。整个扫描过程中目标分析物离子经过两次选择后,特异性和灵敏度可大大提高,最后得到对称性良好的色谱峰。通过色谱峰的时间和峰面积等信息可以对物质进行定性或定量处理。采用内标法定量时,由于样品中掺入了同位素标记的 25-OH VD₂/D₃,能够很好地消除基质效应,其分析准确度优于外标法。另外,LC-MS/MS 法能够有效区分 25-OH VD₂/D₃,比免疫法灵敏度更高,是临床检测维生素 D 的金标准^[2, 8-10]。

研究表明,LC-MS/MS 法测定干血点、血浆、血清样本中的 25-OH VD₂/D₃,具有灵敏度高、分析快速、准确性好、仪器稳定等特点^[11-12]。郑仁锦等^[13]利用乙腈提取、饱和硫酸锌沉淀蛋白、然后用正己烷萃取的方法建立了超高效液相色谱-串联质谱法-同位素标记快速测定血清 25-OH VD₃ 的方法,该方法用于美国国家标准与技术研究院 NIST972a 质控样品及实际样品中 25-OH VD 的测定,获得了满意的结果。广州金域医学检验中心有限公司联合广州医科大学金域检验学院通过引入自动化取样平台、前处理平台、更换色谱柱、将单通道液相改为多通道液相系统等措施将 LC-MS/MS 法检测 25-OH VD 过程中样本取样环节检测效率提升了 21%,样本前处理环节检测效率提升了 74%,以及液相分离环节检测效率提升了 63%^[14]。

为了促进维生素 D 标准化工作,2010 年维生素 D 标准化计划(The Vitamin D Standardization Program, VDSP)启动,VDSP 通过建立参考测量体系给美国国家标准和技术研究院(The National Institute of Standards and Technology, NIST)提供标准参考物质(Standard Reference Materials, SRM),从而促进全球包括商业化和自建方法在内的实验室 25-OH VD 检测方法的标准化^[15-16]。NIST 和比利时根特大学建立了同位素 LC-MS/MS 法定量测定血清中 25-OH VD₂、25-OH VD₃ 的参考方法,得到了检验医学溯源性联合委员会(The Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine, JCTLM)的认可^[17-19]。但是 LC-MS/MS 法仪器昂贵,安装条件严格,需要较大场地方可满足要求;样本前处理复杂,检测通量比较低,比较难适应临床大批量样本的需求;手工操作比较复杂,操作人员需要经过比较专业的培训,难以推广;尽管被公认为检测 25-OH VD 的金标准,LC-MS/MS 法仍然易受 3-epi-25OH-D₃ 和 3-epi-25OH-D₂ 等异构体的交叉影响,尤其对婴幼儿的检测易出现假阳性^[20-23]。另外,由于色谱和质谱条件等未标准化,不同实验室之间的处理方法和色谱条件等不同,对同一个体也会产生不同的临床评价。

截至 2020 年 11 月 30 日,国内已经取得注册证的 LC-MS/MS 法测定 25-OH VD₂/D₃ 的试剂盒厂家有广州可力质谱医疗器械有限公司、广州丰华生物工程有限公司、上海复星长征医学科学有

限公司等10家公司。根据查询数据可知,以上厂家都是2019和2020年获得的注册证,各家在色谱和质谱条件上也各有差异,因此要将LC-MS/MS法标准化,国内亟需解决25-OH VD国家标准品的制备工作。

2.2 免疫法

已注册的产品设计原理主要为竞争法。

2.2.1 化学发光分析法(Chemiluminescence Immunoassay, ECLIA)

涉及的检测试剂盒按其发光机理具体可分为直接化学发光法、酶促化学发光法、电化学发光法^[24]。

张旋等^[25]对雅培全自动化学发光免疫分析仪测定25-OH VD的检测性能进行验证和评估,与LC-MS/MS法的检测结果比较表明,雅培全自动化学发光免疫分析仪可以满足临床检测的要求。邢晏等^[26]利用电化学发光技术验证血清25-OH VD试剂盒的性能指标,结果表明ECLIA检测25-OH VD具有检测周期短、灵敏度和自动化程度高、成本低等优点。卜玲等^[27]建立了一种25-OH VD磁微粒化学发光免疫分析法,通过检测抗体-抗原衍生物-磁珠的复合物的光信号来测定样本中25-OH VD的浓度,实验结果表明此方法具有省时、快速、稳定性和重复性好等优点,能够克服ELISA法结果受反应时间、温度、加样等因素的影响。目前,化学发光分析法虽然灵敏度高,但是其检测成本较高,且需要特定的化学发光仪,导致其在25-OH VD的临床检测中应用范围较小。

2.2.2 酶联免疫法(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA)

ELISA一般采用竞争法原理对样本中的25-OH VD进行定量检测。该法在临床上虽然还保有一定的使用量,但因操作繁琐,已很少有公司再继续开发。

ELISA和化学发光法检测结果间的相对标准偏差随着25-OH VD浓度的升高而减小^[28]。武姗姗^[29]应用SPSS软件比较LC-MS/MS、ECLIA以及ELISA两两方法测定血清25-OH VD结果的相关性和一致性,结果显示25-OH VD₂含量极低时,三种方法测定血清25-OH VD呈高度正相关,LC-MS/MS和ELISA之间的结果一致性良好。

截至2020年11月30日,目前国内已经拿到注册证的酶联免疫法检测25-OH VD或25-OH

VD₃的试剂盒有广州菲康生物技术有限公司、北京正旦国际科技有限责任公司等6家公司。

2.2.3 克隆酶供体免疫测定法(Cloned Enzyme Donor Immunoassay, CDEIA)

CDEIA又叫酶供体竞争法,基于 β -半乳糖苷酶 α -互补性原理,利用DNA重组技术制备酶受体(Enzyme Acceptor, EA)和酶供体(Enzyme Donor, ED)两个片段的 β -半乳糖苷酶。EA和ED只有在合适条件下结合在才具有酶活性,利用EA和ED特性建立的均相酶免测定称为CDEIA。CDEIA同样采用竞争法原理进行检测,ED标记的25-OH VD抗原与其特异性抗体结合后由于空间位阻不能再与EA结合形成具有活性的 β -半乳糖苷酶。反应平衡后,剩余的ED标记25-OH VD抗原与EA结合形成具有活性的酶,加入底物测定酶活力,酶活力的大小与样本总25-OH VD抗原标本含量成正比,通过特定波长的吸光度变化值,可以得出25-OH VD的浓度。

上海复星长征医学科学有限公司的“25-羟基维生素D测定试剂盒(克隆酶供体免疫测定法)”是国内首个在全自动生化仪上用于检测血清样本中25-OH VD的试剂盒,比市场同类产品有一定优势,操作简便,其检测结果与英国Immunodiagnostic Systems Limited公司生产的试剂检测结果的相关性良好,各项分析性能完全能够达到指标要求,可为临床诊断提供科学依据^[30]。

2.2.4 荧光免疫层析法(Fluorescence Immuno-chromatography Assay, FICA)

荧光免疫层析技术多采用竞争法原理设计,将预处理后含有待测组分的样本与荧光物标记的25-OH VD单克隆抗体结合,形成荧光物-抗体-抗原的复合物。在层析作用下,该复合物沿着硝酸纤维素膜向前层析至检测区(T区),与T区包被的25-OH VD-BSA修饰抗原竞争结合。游离的荧光标记抗体层析至质控区(C区),与C区包被的二抗结合结合,形成质控区的荧光条带。在激发光源的作用下,荧光物质发射特定波长的荧光信号,荧光免疫分析仪俘获荧光信号。由于样本中的25-OH VD与T区的修饰抗原呈竞争关系呈竞争关系,因而T区荧光强度与样本中的25-OH VD浓度成反比,荧光免疫分析仪通过信号转化及设定的定标曲线自动转化为定量数值,计算出样本中25-OH VD的浓度。

沈骏^[31]利用量子点具有激发光谱宽,发射峰窄而对称,抗光漂白能力强等特点,建立了量子点荧光微球免疫层析法检测 25-OH VD 的方法,结果表明方法精密度高、准确性良好。

普通荧光免疫层析法反应时间短,检测成本较低,对检测人员的要求不高,方便其在基层医院广泛推广,但是存在灵敏度低、重复性差等问题。基于此普菲特益斯生物科技(北京)有限公司研发了一种高灵敏检测 25-OH VD 的时间分辨荧光免疫层析检测试剂,该方法试剂盒既有普通荧光免疫层析法的优点,又可以解决灵敏度低等问题。但缺点依然是只能检测总 25-OH VD^[32]。

2.2.5 胶乳免疫比浊法(Latex Immunoturbidimetry)

胶乳免疫比浊法主要利用抗体标记的胶乳微球与抗原反应形成交联网络结构,它会引发特定波长的吸光度发生改变,吸光度的变化与血清样本中的 25-OH VD 的含量成正比。

深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司的“25-羟基维生素 D(25-OH VD)测定试剂盒(胶乳免疫比浊法)”利用胶乳免疫比浊法测定人血清中 25-OH VD 的含量。该方法与普通临床生化检测的使用方法相似,但由于反应成分较多,目前市面上多使用三试剂的形式,如迈瑞、美康等。该方法适用于全自动生化分析仪,实现自动化操作,血清样本无需进一步前处理步骤即可检测,出结果时间短,一般在 10 分钟内可测出浓度。该方法参与反应的成分较多,且是生物活性物质,如底物、酶、抗体等,由于涉及抗体和酶的相互作用,抗体和酶等关键原材料筛选对于方法的建立至关重要,另一方面,各成分之间的比例协调对方法的线性、灵敏度有很大影响。因此该方法的原材料筛选及配方开发都有较大的难度。同时,由于相关的酶、抗体要求较高,原料本身的获取不易,而进入生产端的检验难度也相应提高,因此也加大了该方法的研发及制造成本。目前胶乳免疫比浊法相关的检测试剂盒厂家比较少,查询数据显示目前有 13 家企业获得注册证。

3 结论

综上所述,相比于 LC-MS/MS 法,免疫法检测样本用量少、检测设备相对便宜、仪器操作简单,适用于在中层和基层医院开展。但是与 LC-MS/

MS 法相比,免疫法易存在以下问题:①基质效应和交叉反应,容易使检测结果偏高;②检测结果为总 25-OH VD,易低估 25-OH VD₂ 的水平,导致总 25-OH VD 检测结果偏低;③无法区分 25-OH VD₂ 和 25-OH VD₃,导致免疫法特异性差。即便是 LC-MS/MS 也面临 5-OH VD 与结合蛋白彻底分离,的问题。众方法中特别是 ELISA 检测时间较长,人工操作繁琐,因此不适合单样本检测。总之,目前无论哪种免疫法的试剂盒在检测精确性上都无法与 LC-MS/MS 25-OH VD 检测试剂盒媲美。

尽管 25-OH VD₂ 和 25-OH VD₃ 的结构差异小,但是由于二者的活性和治疗效果有一定的差异,因此分别检测 25-OH VD₂ 和 25-OH VD₃ 并对二者活性和功能单独进行评价,是正确评估维生素 D 水平和维生素 D 补充疗法疗效的必然选择。所以 LC-MS/MS 的普及和方法标准化将是未来发展趋势之一。

实际中开展检验项目时,应综合考虑费用、空间、耗时等问题,每个单位都可以根据自身需求选择不同的检测方法,然而实现所有方法一致性和可比性的最佳途径仍然是制定标准化和规范性的参考测量程序与国家标准品。

参考文献

- [1] Lips P. Relative value of 25(OH)D and 1,25(OH)₂D measurements[J]. J Bone Miner Res, 2007, 22(11):1668-1671.
- [2] 夏维波,章振林,林华,等. 维生素 D 及其类似物临床应用共识[J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志, 2018, 11(1):1-19.
- [3] 廖祥鹏,张增利,张红红,等. 维生素 D 与成年人骨骼健康应用指南(2014 年标准版)[J]. 中国骨质疏松杂志, 2014, 20(9):1011-1030.
- [4] 程群. 维生素 D 缺乏现状与骨质疏松症关系的认识[J]. 诊断学理论与实践, 2012, 11(1):5-10.
- [5] Bischoff-Ferrari HA, Willett WC, Wong JB, et al. Prevention of Nonvertebral Fractures With Oral Vitamin D and Dose Dependency: A Meta-analysis of Randomized Controlled Trials[J]. Arch Intern Med, 2009, 169(6):551-561.
- [6] Bischoff-Ferrari HA, Shao A, Dawson-Hughes B, et al. Benefit-risk assessment of vitamin D supplementation[J]. Osteoporos Int, 2010, 21(7):1121-1132.
- [7] 国家食品药品监督管理总局. 国家食品药品监督管理总局令第 30 号 体外诊断试剂注册管理办法[S]. 2017:3.
- [8] 李水军. 维生素 D 代谢及 25-羟基维生素 D 测定方法研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(24):3028-3030.

- [9] van den Ouweland, Johannes MW. Analysis of vitamin D metabolites by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Trends Analyt Chem. part B, 2016, 84:117-130.
- [10] Garg U. 25-Hydroxyvitamin D Testing: Immunoassays Versus Tandem Mass Spectrometry [J]. Clin Lab Med, 2018, 38(3):439-453.
- [11] 韩吉春,王小臣,李广林,等.液相色谱-串联质谱法检测干血点样本中25-羟基维生素D2和25-羟基维生素D3[J].分析化学,2017,45(3):448-454.
- [12] 郭守东,崔华东,桑慧,等.液相串联质谱法检测糖尿病患者血浆25-羟基维生素D3[J].泰山医学院学报,2014,35(3):161-164.
- [13] 郑仁锦,华永有,林守二,等.同位素标记-超高效液相色谱-串联质谱法快速测定血清25-羟基维生素D3[J].现代医药卫生,2019,35(16):2438-2440.
- [14] 赵蓓蓓,沙小花,董衡,等.液相色谱串联质谱法检测血清25-羟基维生素D项目检测效率的提升[A].2018年中国质谱学术大会(CMSC 2018)论文集[C].中国质谱学会(中国物理学会质谱分会)、中国化学会质谱分析专业委员会、中国仪器仪表学会分析仪器分会质谱仪器专业委员会:中国质谱学会,2018:322.
- [15] National Institute of Health (Office of Dietary Supplements). Vitamin D Standardization Program (VDSP) [EB/OL]. 2020.
- [16] Lise NB, Jens RH, Svend HH, et al. An evaluation of total 25-hydroxyvitamin D assay standardization: Where are we today? [J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2019, 190:224-233.
- [17] Tai SSC, Bedner M, Phinney KW. Development of a candidate reference measurement procedure for the determination of 25-hydroxyvitamin D3 and 25-hydroxyvitamin D2 in human serum using isotope-dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Anal Chem, 2010, 82(5):1942-1948.
- [18] Stepman HCM, Vanderroost A, Van Uytanghe K, et al. Candidate reference measurement procedures for serum 25-hydroxyvitamin D3 and 25-hydroxyvitamin D2 by using isotope-dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Clin Chem, 2011, 57(3):441-448.
- [19] Mineva EM, Sternberg MR, Pfeiffer CM, et al. Quality specifications and their daily application to evaluate the accuracy of reference measurements for serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D3 and 25-hydroxyvitamin D2 [J]. Clin Chim Acta, 2018, 487:241-249.
- [20] Mohamed A, Marta KŁ, Kornel P, et al. Measurement of plasma 25-hydroxyvitamin D2, 25-hydroxyvitamin D3 and 3-epi-25-hydroxyvitamin D3 in population of patients with cardiovascular disease by UPLC-MS/MS method [J]. J Chromatogr B, 2020, 1159:122350.
- [21] Emma AH, Natalie ZH, Scott GD, et al. Development and application of a LC-MS/MS assay for simultaneous analysis of 25-hydroxyvitamin-D and 3-epi-25-hydroxyvitamin-D metabolites in canine serum [J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2020, 199:105598.
- [22] Cai ZL, Zhang QX, Xia ZQ, et al. Determination of serum 25-hydroxyvitamin D status among population in southern China by a high accuracy LC-MS/MS method traced to reference measurement procedure [J]. Nutr Metab, 2020, 17:8.
- [23] Mitchell GS, Ann MG, Ian RR, et al. Vitamin D: The More We Know, the Less We Know [J]. Clin Chem, 2015, 61(3):462-465.
- [24] 曾伟杰,谢洁,龚晓云,等.25-羟基维生素D检测方法研究进展[J].食品安全质量检测学报,2019,10(11):3419-3429.
- [25] 张旋,赵志敏,阳红梅.自动化学发光免疫分析仪检测血清25-羟基维生素D的性能评价[J].国际检验医学杂志,2017,38(6):846-848.
- [26] 邢晏,冯长焕,杜利君.电化学发光技术检测血清25羟基维生素D的性能验证及分析[J].宜宾学院学报,2019,19(6):121-124.
- [27] 卜玲,姚孝明,张誉严,等.总25-羟基维生素D磁微粒化学发光免疫分析法的建立及性能评价[J].临床检验杂志,2020,38(8):587-591.
- [28] 云春风,陈竟,杨春,等.酶联免疫法和化学发光法检测25-羟基维生素D的一致性[J].卫生研究,2015,44(3):435-439.
- [29] 武姗姗.液相色谱-质谱法,酶联免疫法和电化学发光法测定血清25-羟基维生素D方法学比较[D].石家庄:河北医科大学,2016.
- [30] 桂香.克隆酶供体免疫测定法检测25-羟基维生素D试剂盒的检测意义与性能评价[J].华夏医学,2017,30(4):86-91.
- [31] 沈骏.量子点荧光微球免疫层析试纸条定量检测乙肝表面抗原和25羟基维生素D[D].南昌:南昌大学,2016.
- [32] 魏照征.一种高灵敏检测25羟基维生素D的时间分辨荧光免疫层析检测试剂及其制备方法[P].北京:CN107656076A,2018.

人细小病毒 B19 核酸检测试剂国家参考品的建立

麻婷婷 许四宏 周海卫*

[摘要] **目的** 建立人细小病毒 B19 核酸检测试剂国家参考品并制定质量标准。**方法** 收集并筛选人细小病毒核酸阳性和阴性血浆样本,建立人细小病毒 B19 核酸检测试剂国家参考品,溯源至世界卫生组织第三代人细小病毒 B19 核酸国际标准品,并对参考品稳定性和均匀性进行考核。**结果** 建立的国家参考品包括阳性参考品 8 份、阴性参考品 10 份、精密度参考品 2 份和最低检出限参考品 2 份。经溯源标定,最低检出限参考品 L1 与 L2 的浓度分别为 2.4×10^3 IU/mL 与 2.4×10^2 IU/mL;参考品均匀性符合要求,室温(25℃)放置 24 h、反复冻融 3 次均未影响参考品的稳定性。国家参考品的质量标准为阳性符合率 8/8,阴性符合率 10/10,精密度要求两个浓度水平的 Ct 值或定量值变异系数均不高于 5.0%,最低检出限要求浓度为 2.4×10^3 IU/mL 的 L1 应为人细小病毒 B19 核酸阳性,浓度为 2.4×10^2 IU/mL 的 L2 可为阳性或阴性。**结论** 建立了人细小病毒 B19 核酸检测试剂国家参考品,可用于企业试剂研发的质量控制及评价。

[关键词] 人细小病毒 B19; 核酸检测; 参考品; 质量评价

Establishment of national reference material for human parvovirus B19 nucleic acid detection reagent

MA Tingting, XU Sihong, ZHOU Haiwei*

(Division II of Diagnostic for Infectious Diseases, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing, China, 100050)

[ABSTRACT] **Objective** To develop a national reference panel for human parvovirus B19 nucleic acid detection reagent and establish the quality standard. **Methods** The positive and negative plasma samples were collected and screened to establish a national reference panel for human parvovirus B19 nucleic acid detection, which was traced to the WHO Third-Generation International standard for B19 nucleic acid detection. The stability and homogeneity of the reference panel were evaluated. **Results** The national reference panel is composed of 8 positive, 10 negative, 2 precision and 2 lower detection limit samples. The concentrations of the lower detection limit samples L1 and L2 were 2.4×10^3 IU/mL and 2.4×10^2 IU/mL, respectively. The homogeneity of the reference panel meets the requirements, and the stability of the reference panel was not affected by the room temperature (25℃) for 24 hours and repeated freezing and thawing three times. The quality standard of the national reference panel is that the positive coincidence rate is 8/8, and the negative coincidence rate is 10/10. The precision requires that the Ct value or the quantitative value variation coefficient of the two concentration levels is not higher than 5.0%. The minimum detection limit requires that L1 with a concentration of 2.4×10^3 IU/mL should be positive for human parvovirus B19 nucleic acid, and L2 with a concentration of 2.4×10^2 IU/mL can be positive or negative. **Conclusion** A national reference panel for human parvovirus B19 nucleic acid detection reagents has been established, which can be used for the quality control and evaluation of enterprise reagent research and development.

[KEY WORDS] Human parvovirus B19; Nucleic acid detection kit; Reference panel; Quality assessment

基金项目:国家科技重大专项(2018ZX10102001)

作者单位:中国食品药品检定研究院传染病诊断试剂二室,北京 100050

*通信作者:周海卫, E-mail:zhouhaiwei@nifdc.org.cn

人细小病毒 B19 (human parvovirus B19, B19V) 属于细小病毒亚科,红病毒属^[1]。成年后多达 40%~60% 的人被 B19V 感染,老年约 90% 的人呈抗体阳性^[2]。B19V 传播全年发生,但可能在冬季后期至夏季初见顶^[3]。B19V 的唯一传染源为患者,主要通过呼吸道传播(飞沫、气溶胶)、血液制品污染和垂直传播^[4]。B19V 在世界范围内有 1 型、2 型和 3 型,其中 1 型可分为 1a 和 1b 型,3 型可以分为 3a 和 3b 型。1a 型是目前在我国流行的主要型别,同时有少量 1b 型和 3 型存在^[5]。目前国内 B19V 核酸检测已有多家公司的产品研发成功,由于该类产品均无系统的质量评价和统一的质量标准,使得这些产品均未在我国获批上市。因此,建立人细小病毒 B19 核酸检测试剂国家参考品,用于企业试剂研发的质量控制及评价已刻不容缓。为规范和提高国内此类产品的质量,本实验研制了人细小病毒 B19 核酸检测试剂国家参考品,并制定了其质量标准。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 参考品原料来源

血浆样本由兰州生物制品研究所、武汉生物制

品研究所、深圳市卫光生物制品股份有限公司及首都医科大学附属北京地坛医院提供。

1.1.2 国际标准品

世界卫生组织(world health organization, WHO)国际参考品(3rd WHO International Standard for Parvovirus B19 for Nucleic Acid Amplification Techniques, NIBSC code: 12/208),标示浓度为 1 410 000 IU/mL。WHO 国际参考品(Parvovirus B19 DNA Nucleic Acid Amplification Technology (NAT) based assays Genotype Panel, NIBSC code: 09/110),该参考品包含 B19 病毒 1 型、2 型和 3a 型,标示浓度分别为 5.98 log₁₀ IU/mL、5.94 log₁₀ IU/mL 和 5.97 log₁₀ IU/mL。

1.1.3 检测试剂

初筛使用上海科华生物工程股份有限公司的人细小病毒 B19 核酸检测试剂盒(PCR-荧光探针法),确认使用 In-house 巢式 PCR 扩增及测序方法,引物序列见表 1^[6]。巢式 PCR 第一轮反应条件为:第一步 94℃ 热启动 2 min;第二步 94℃ 20 s, 55℃ 30 s, 72℃ 45 s, 40 个循环;第三步 72℃ 7 min。第二轮反应条件将循环过程中退火温度升至 58℃。

表 1 人细小病毒 B19 核酸检测试剂国家参考品 PCR 扩增及测序引物^[6]

Table 1 PCR amplification and sequencing primers of reference panel for Human Parvovirus B19 nucleic acid detection kits^[6]

目的	引物名称	引物类别	引物序列
鉴定引物(鉴定)	PVB-1F	第一轮上游	5'-CACTATGAAAAC TGGGCAATAAAC-3'
	PVB-1R	第一轮下游	5'-AATGATTCTCCTGA ACTGGTCC-3'
	PVB-2F	第二轮上游	5'-ATAAACTACACTTTT GATTTCCCTG-3'
	PVB-2R	第二轮下游	5'-TCTCCTGA ACTGGTCCCG-3'
扩增及测序引物(分型)	PVB-1F	第一轮上游	5'-CACTATGAAAAC TGGGCAATAAAC-3'
	PVB-2F	第二轮上游	5'-ATAAACTACACTTTT GATTTCCCTG-3'
	B19SR	第一、二轮下游	5'-CCAGGCTTGTGTAA GTCCTTC-3'

协作标定使用试剂包括苏州华益美生物科技有限公司、中山大学达安基因股份有限公司、上海之江生物科技股份有限公司和罗氏诊断产品上海有限公司共 4 家企业的产品。稳定性研究使用试剂为上海科华生物工程股份有限公司的人细小病毒 B19 核酸检测试剂盒(PCR-荧光探针法)。均匀性研究使用罗氏诊断产品上海有限公司的 cobas®TaqScreen DPX Test(甲肝和人细小病毒 B19 检测试剂盒)检测。

1.2 试验方法

1.2.1 参考品制备

筛选及确认后的原料样本经离心、过滤、稀

及分包装后组成参考品,分别编号为 8 份阳性参考品 PC01~PC08, 10 份阴性参考品 NC01~NC10, 1 份高浓度样本经阴性稀释液稀释后得到精密度参考品(CV1、CV2)、以及 1 份高浓度样本经稀释得到最低检出限参考品(L1、L2)。

1.2.2 溯源标定

将 WHO 第三代人细小病毒 B19 核酸国际标准品(NIBSC 编号 12/208)进行梯度稀释后作为标准品,使用 6 家企业的产品对精密度和最低检出限参考品进行溯源标定和赋值。

1.2.3 稳定性及均匀性考核

本参考品为定性使用。选择参考品中精密度

以及浓度较低的阳性参考品 PC04~PC08, 分别经室温(25℃)放置 24 h 及反复冻融 3 次等处理后使用定性检测试剂盒进行检测, 以考核其短期稳定性。

选择精密度参考品 CV1 和 CV2 进行均匀性研究。分别随机抽取 10 支 CV1 和 CV2 样本, 使用定性试剂盒进行检测, 每支样本重复检测 2 次。

1.2.4 统计分析

使用 SPSS 16.0 软件进行统计分析。计量资料采用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 组间采用 *t* 检验, 多组间采用 *F* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 参考品的组成

收集的样本经 PCR 扩增初筛、确认和定值后确定了参考品的组成。见表 2。

表 2 人细小病毒 B19 核酸检测试剂国家参考品组成

参考品类型	参考品编号	样本类型	浓度(IU/mL)
阳性	PC01	血浆	-
	PC02	血浆	-
	PC03	血浆	-
	PC04	血浆	-
	PC05	血浆	-
	PC06	血浆	-
	PC07	血浆	-
	PC08	血浆	-
阴性	NC01	血浆	-
	NC02	血浆	-
	NC03	血浆	-
	NC03	血浆	-
	NC04	血浆	-
	NC06	血浆	-
	NC07	血浆	-
	NC08	血浆	-
	NC09	血浆	-
	NC10	血浆	-
精密度	CV1	血浆	1.5×10 ⁶
	CV2	血浆	1.5×10 ⁴
	CV0	血浆	-
最低检出限	L1	血浆	2.4×10 ³
	L2	血浆	2.4×10 ²

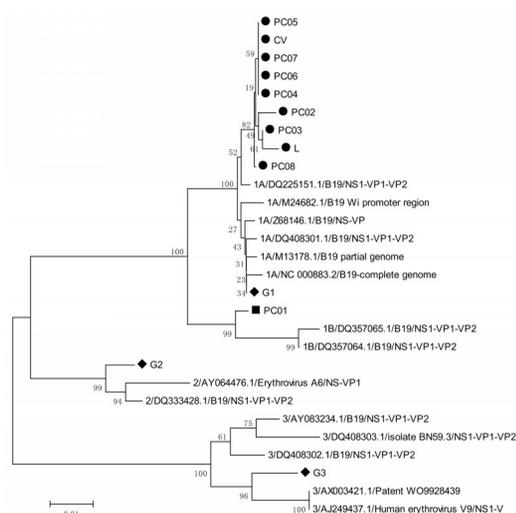
注:“-”为未进行相应项目检测。

2.2 基因分型结果

对参考品中的阳性参考品进行基因分型, 除 PC01 属于 1b 型以外, 其余阳性均属于 1a 型, 见图 1。

2.3 协作标定结果及质量标准

精密度参考品 CV1 和 CV2 的标定结果分别为



注: G1、G2 和 G3 分别为购自 NIBSC 的人细小病毒 B19 基因型参考品, 编号 09/110。

图 1 人细小病毒 B19 核酸检测试剂国家参考品原料样本基因进化分析结果

Figure 1 Phylogenetic tree of reference panel for Human Parvovirus B19 nucleic acid detection kits

中强阳性和弱阳性样本(Ct 值及定量值数据未展示)。4 种检测试剂对参考品进行标定。见表 3。

表 3 人细小病毒 B19 核酸检测试剂国家参考品协作标定

参考品类型	参考品编号	不同企业试剂盒结果			
		A	B	C	D
阳性符合率	PC01~PC08	8/8	8/8	8/8	8/8
阴性符合率	NC01~NC10	10/10	10/10	10/10	10/10
精密度	CV1	(+)	(+)	(+)	(+)
	CV2	(+)	(+)	(+)	(+)
最低检出限	L1	(+)	(+)	(+)	(+)
	L2	可疑	(+)	可疑	(+)

注: (+) 为检测结果阳性, (-) 为检测结果阴性。

参考美国食品和药物管理局(food and drug administration, FDA)血液筛查标准(10⁴ IU/mL)及协作标定结果制定本参考品质量标准^[7]: 阳性参考品符合率 8/8; 阴性参考品符合率 10/10; 精密性变异系数≤5.0%; 最低检出限参考品 L1 应为阳性, L2 可为阳性或阴性。

2.4 稳定性和均匀性

使用配对 T 检验对不同处理后检测的 Ct 值与-70℃保存条件下进行比较, 室温 25℃放置 1 天处理的 *P* 值为 0.175, 反复冻融 3 次处理的 *P* 值为 0.174, 表明 2 种不同处理均不影响本参考品的稳定性。稳定性考察结果见表 4。

表4 人细小病毒B19核酸检测试剂国家参考品短期稳定性考察结果

参考品 编号	Ct 值			F 值	P 值
	-70℃对照	室温 24 h	冻融 3 次		
PC04	30.6	31.3	31.2	-	-
PC05	32.1	32.2	31.9	-	-
PC06	31.6	32.0	32.0	-	-
PC07	27.2	28.7	28.6	-	-
PC08	27.8	30.5	29.6	-	-
CV1	23.0	23.0	22.7	0.330	0.574
CV2	29.2	29.7	30.9	0.029	0.867

注：“-”为未进行相应项目分析。

使用单因素方差分析对精密度参考品 CV1 和 CV2 的均匀性检测结果进行统计检验后显示, CV1 和 CV2 的 *P* 值分别为 0.574 (*F* 值=0.330) 和 0.867 (*F* 值=0.029), 表明均匀性符合要求。

3 讨论

国际已有上市的 B19V 核酸检测商用试剂盒 (Qiagen 公司 artus[®] Parvo B19 LC PCR Kit 和 Roche 公司 cobas[®] TaqScreen DPX Test)^[8]。FDA 对 B19V 核酸检测试剂要求必须涵盖目前已知的所有基因型, 同时需要对检测方法进行方法学验证包含特异性、精密度、最低检出限等性能指标, 欧洲药品管理局 (European medicines agency, EMA) 也有类似的标准^[9]。WHO 已建立了第三代人细小病毒 B19 核酸国际标准品和第一代人细小病毒 B19 核酸分型国际参考品 (NIBSC 编号分别为 12/208 和 09/110)^[10]。目前我国还没有 B19V 核酸诊断试剂的行业标准、审评指导原则和标准物质, 还没有上市的 B19V 核酸检测试剂。为对国内此类产品进行系统的质量评价并建立统一的质量标准, 本研究研制了人细小病毒 B19 核酸检测试剂定性用国家参考品 (编号为 370005-201601)。

本课题组对最低检出限和精密度参考品使用多家试剂进行定值, 并已将其溯源至 WHO 的第三代人细小病毒 B19 核酸国际标准品 (NIBSC 编码 12/208)。B19V 能明确引起输血者感染的最低病毒载量还没有明确, 大多数实验结果显示, 病毒滴度为 10^5 IU/mL 时一般不会发生感染^[11-12]。因此美国 FDA、欧洲药典和国际血浆蛋白治疗协会先后将混合血浆 B19V DNA 含量不超过 10^4 IU/mL 作为核酸检测筛查的标准^[7, 13-14]。

本研究将最低检出限参考品 L1 和 L2 浓度分别设定为 2.4×10^3 和 2.4×10^2 IU/mL, 并要求 L1 应为阳性, L2 可为阳性或阴性, 该标准既满足上述各机构 B19 核酸检测筛查标准又能对试剂进行灵敏度评估并体现试剂间性能差异。同时为保证样本在运输、保存和使用过程中的稳定性, 对参考品的稳定性进行了考查, 结果本研究中的冻融及室温处理方式不会影响本参考品的稳定性。其均匀性评估结果显示参考品的均匀性也能够满足使用需要。

另外, 为满足国内企业研发试剂溯源需求, 本课题组还研制了人细小病毒 B19 核酸检测试剂国家标准品 (编号为 370023-201601), 并同样将其量值溯源至 WHO 的第三代人细小病毒 B19 核酸国际标准品, 企业可用于研发试剂及质量控制时的量值溯源、性能评估及质量控制等。本参考品及上述标准品的研制确定了我国 B19V 核酸检测试剂的最低质量要求, 能够为企业研发相关试剂建立统一的质量标准。

参考文献

- [1] Qiu J, Söderlund-Venermo M, Young NS. Human Parvoviruses[J]. Clin Microbiol Rev, 2017, 30(1):43-113.
- [2] Ganaie SS, Qiu J. Recent Advances in Replication and Infection of Human Parvovirus B19[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2018, 8:166.
- [3] 何天文, 黄滨梅, 王逾男, 等. 广东地区育龄妇女人细小病毒 B19 感染筛查结果分析[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2016, 8(4):265-267, 271.
- [4] 卢洪洲, 梁晓峰. 新发传染病[M]. 北京. 第3版. 北京: 人民卫生出版社, 2018, 198-203.
- [5] Jia J, Ma Y, Zhao X, et al. Existence of various human parvovirus B19 genotypes in Chinese plasma pools: genotype 1, genotype 3, putative intergenotypic recombinant variants and new genotypes[J]. Virol J, 2016, 13(1):155.
- [6] Corcoran C, Hardie D, Yeats J, et al. Genetic variants of human parvovirus B19 in South Africa: cocirculation of three genotypes and identification of a novel subtype of genotype 1 [J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(1):137-142.
- [7] FDA. Guidance for Industry: Nucleic Acid Testing (NAT) to Reduce the Possible Risk of Human Parvovirus B19 Transmission by Plasma-Derived Products[S]. 2009.
- [8] 贾俊婷, 马玉媛, 向思龙, 等. 人细小病毒 B19 检测技术[J]. 临床输血与检验, 2015, 17(5):472-477.
- [9] Hamid KM, Yusuf I, Onoja BA, et al. Knowledge, attitude and practice of medical laboratory practitioners in the fight against Ebola virus disease[J]. J Virus Erad, 2018, 4(1):1-5.

(下转第 1603 页)

耳聋基因突变检测试剂盒行业标准的建立

张娟丽¹ 曲守方² 孙楠² 张文新² 孙晶² 于婷^{2*} 黄杰^{2*}

[摘要] **目的** 建立耳聋基因突变检测试剂盒行业标准。**方法** 选择8个厂家生产的10种耳聋基因突变检测试剂盒,按照拟定的行业标准,检测耳聋基因突变检测国家参考品和企业参考品,对外观、检测限、准确性、特异性和重复性项目进行验证。**结果** 全部试剂盒外观和重复性均满足要求。准确性项目中,除已知突变外,厂家C还检出国家参考品P19的299M杂合突变、国家参考品P9、P16的1555突变,不满足要求。特异性项目中,厂家C检出国家参考品P14存在1555突变,不满足要求;检测限项目中,根据实验结果、会议讨论及网上征求意见,确定了不同原理试剂盒的检测限指标。**结论** 大部分验证结果均能满足拟定行标中的要求,表明行业标准各指标具有一定的合理性,可操作性强。耳聋基因突变检测试剂盒行业标准的建立将有助于提升这类试剂盒质量,同时将为生产检验流通等领域的监管提供依据。

[关键词] 耳聋基因突变; 试剂盒; 行业标准

The Validation of Industry Standard for deafness gene mutations testing kit

ZHANG Juanli¹, QU Shoufang², SUN Nan², ZHANG Wenxin², SUN Jing², YU Ting^{2*}, HUANG Jie^{2*}

(1. Medical Instrument Testing Institute of Henan, Zhengzhou, Henan, China, 450003; 2. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing, China, 100050)

[ABSTRACT] **Objective** To validate the industry standard for deafness gene mutation testing kit. **Methods** Ten kinds of deafness gene mutation detection kits produced by 8 manufacturers were selected. According to the proposed industry standards, national reference materials for detection of deafness gene mutations and enterprise reference materials were detected, and the appearance, detection limit, accuracy, specificity and repeatability were verified. **Results** The appearance and repeatability of all kits meet the requirements. For accuracy item, in addition to known mutations, manufacturer C also detected 299M heterozygous mutation of national reference P19 and 1555 mutation of national reference P9 and p16. For specificity item, manufacturer C detected 1555 mutation in national reference P14, which did not meet the requirements. For detection limit item, according to the experimental results, meeting discussions and online opinions, the detection limit indexes of different principal kits were determined. **Conclusion** Most of the verification results can meet the requirements of the proposed industry standard, indicating that the various indicators of the industry standard have a certain degree of rationality and strong operability. The establishment of industry standards for deafness gene mutation detection kits will help improve the quality of these kits, and will provide a basis for supervision in production, inspection, and circulation.

[KEY WORDS] Deafness gene mutations; Kit; Industry standard

基金项目:国家重点研发计划项目(2016YFC1000300)

作者单位:1. 河南省医疗器械检验所,河南,郑州 450003

2. 中国食品药品检定研究院,北京 100050

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

注:张娟丽和曲守方共为第一作者

耳聋是一种普遍高发的听力障碍性疾病,病因复杂。环境因素、遗传因素均可导致耳聋的发生,其中至少有50%的学语前耳聋是由遗传因素导致的。大多数遗传性耳聋是由几个较为常见的热点突变引起的^[1-2],其中中国人群常见耳聋突变主要包括 *GJB2*、*GJB3*、*SLC26A4* 以及线粒体的 *12S rRNA* 基因突变^[3-5]。目前有多种耳聋基因突检测试剂盒,方法包括芯片法、荧光PCR法、飞行时间质谱法、测序法等。由于各试剂盒的检测原理、检测的突变位点及数量存在一定差异,需要对这类试剂盒的性能指标进行统一尺度的评价,来保障临床样本检测结果的准确性。建立耳聋基因突变检测试剂盒的行业标准就势在必行。中国食品药品检定研究院(以下简称本院)已完成荧光PCR法、微阵列芯片法、测序法等多个耳聋基因检测试剂盒的注册检验,具有丰富的检验经验,并且在2017年研制完成耳聋基因突变检测国家参考品^[6],为该类试剂盒的注册检验提供了可靠的参考品,该参考品已经在全国范围内使用了近2年。本院联合1家省级医疗器械检测机构及7家企业开展了建立耳聋基因突变检测试剂盒行业标准的工作,现将该行业标准的验证情况作一简要汇报。

1 材料与方法

1.1 试剂盒

十五项遗传性耳聋相关基因检测试剂盒(微阵列芯片法),北京博奥生物有限公司生产;九项耳聋基因检测试剂盒(生物芯片法),北京博晖创新生物技术股份有限公司生产;耳聋易感基因检测试剂盒(PCR+导流杂交法),潮州凯普生物化学有限公司生产;先天性耳聋基因检测试剂盒(荧光PCR法)、药物性耳聋基因检测试剂盒(荧光PCR法)和PDS基因检测试剂盒(荧光PCR法),济南英盛生物技术有限公司生产;四项耳聋基因检测试剂盒(ARMS-PCR法),中生北控生物科技股份有限公司生产;二十项遗传性耳聋基因突变检测试剂盒(飞行时间质谱法),广州市达瑞生物技术股份有限公司生产;耳聋基因突变检测试剂盒(联合探针锚定聚合测序法),华大生物科技(武汉)有限公司;遗传性耳聋基因检测试剂盒(测序法),广州市金圻睿生物科技有限责任公司。

1.2 参考品

耳聋基因突变检测国家参考品:批号:360013-

201701,包含20个阳性参考品(P1-P20)和3个阴性参考品(N01~N03)。除P19和P20为DNA样本外,其余参考品均为干血片。重复性参考品由各试剂厂家自行提供。

1.3 主要检测仪器

10K-B微阵列芯片扫描仪(北京博奥生物有限公司)、核酸芯片检测仪(北京博晖创新生物技术股份有限公司)、HB 2012A导流杂交仪(潮州凯普生物化学有限公司)、ABI 7300荧光PCR仪(美国ABI公司)、Bio-Rad S1000PCR仪(美国Bio-Rad公司)、DR MassARRAY飞行时间质谱检测系统(广州市达瑞生物技术股份有限公司)、BGISEQ-500基因测序仪(华大生物科技(武汉)有限公司)、Bio-electronSeq 4000基因测序仪(东莞博奥木华基因科技有限公司)。

1.4 行业标准中各技术指标及验证方法

在充分调研并分析各试剂质量标准的前提下,结合临床应用情况,按照GB/T1.1 2009的要求,制定了耳聋基因突变检测试剂盒行业标准,内容包括前言、范围、规范性引用文件、要求、试验方法、标签和使用说明书以及包装、运输、贮存7个条款。其中“要求”和“试验方法”是核心内容,要求中包含外观、检测限、准确性、特异性和重复性。

1.4.1 外观

在自然光下目视检查。制造商应根据自己产品的包装特点规定适当的外观要求。一般应有试剂盒各组分组成、性状;内外包装、标签清晰等的要求。

1.4.2 检测限

应包括试剂盒检测范围内的全部基因型别。按照说明书中的操作方法,取国家阳性参考品中未包含的试剂盒检测范围内突变位点的企业检测限参考品,以及取试剂盒检测范围内的国家阳性参考品稀释至试剂盒声称浓度后,各检测1次;或取企业检测限参考品,各检测1次,均要求检出相应的基因型别。

1.4.3 准确性

应包括试剂盒检测范围内的全部基因型别。按照说明书中的操作方法,取国家阳性参考品中未包含的试剂盒检测范围内突变位点的企业阳性参考品,以及取试剂盒检测范围内的国家阳性参考品,各检测1次;或取企业阳性参考品,各检测1次,均要求检出相应的基因型别。

1.4.4 特异性

按照说明书中的操作方法,取国家阴性参考品和试剂盒检测范围外的国家阳性参考品,各检测1次;或取企业阴性参考品,各检测1次,结果均应为阴性或野生型。

1.4.5 重复性

根据试剂盒检测范围内的基因种类及突变类型来确定重复性参考品,每种基因至少选择1个突变位点/类型。按照说明书中的操作方法,取企业重复性参考品,重复检测10次,结果应一致且应检出相应的基因型别。

2 结果

2.1 外观

全部试剂盒外观均符合要求。

2.2 检测限

将试剂盒检测范围内国家阳性参考品稀释至1 ng/ μ L,大部分厂家的试剂均可检出,仅厂家E在检测1 ng/ μ L浓度的国家参考品时,在1494反应体系检出P4、P6、P16、P19、N03异常,P12突变,而未能检出P20突变;在SLC反应体系检出P4、P15、N01异常,P12突变,而未能检出P11的IVS7-2突变;在GJB反应体系检出P4、P15、N01异常,多个国家参考品检出235delC突变;以上考虑为样本浓度低于试剂盒声称检测限所导致的结果异常,后按照试剂盒的检出限稀释样本至5 ng/ μ L时,均可检出。

根据以上检测结果以及网上征求意见和多次会议讨论,最终确定检测限指标如下:对于芯片法,检测限应不高于20 ng/反应或2 ng/ μ L;对于质谱法,检测限应不高于5 ng/反应或1 ng/ μ L;对于荧光PCR法,检测限应不高于10 ng/反应或2 ng/ μ L,若PCR扩增后采用化学显色或者电泳-凝胶成像等方法对结果进行判读的试剂盒,检测限应不高于15 ng/反应或1 ng/ μ L;本行标中未涉及到其他原理试剂盒的检测限可参考以上进行设定;并且检测结果可仅满足总反应量或者浓度两个指标之一;对于mtDNA 12S rRNA突变百分比的检测限暂不做要求,企业可根据临床样本实际突变百分比,进行系列稀释,自行确认试剂盒的突变百分比检测限。

2.3 准确性

大部分厂家结果符合要求。除已知突变外,厂家C还检出国家参考品P19的299M杂合突变,国家参考品P9、P16的1555突变,不满足要求。

2.4 特异性

大部分厂家结果符合要求。厂家C检出国家阳性参考品P14(突变位点为试剂盒检测范围外,作为阴性参考品使用)存在1555突变,不满足要求。

2.5 重复性

检测企业重复性参考品,结果均符合要求。由于存在多种检测方法的试剂盒,虽均为定性产品,但是部分试剂盒可以产出用于计算变异系数的数据,因此,最终确定的要求也有所不同,要求:①对于质谱法、芯片法等检测原理的试剂盒,以及PCR扩增后采用化学显色或者电泳-凝胶成像等方法对结果进行判读的试剂盒,重复性参考品的检测结果应一致且型别准确;②对于荧光PCR法检测试剂盒,重复性参考品的检测结果应型别准确,且相应检测通道Ct值(或Tm值或关键性判读指标)的变异系数(CV%)应不大于5.0%。

3 讨论

运用分子诊断技术检测耳聋基因突变位点的检测方法较多,除传统的限制性片段长度多态性法以外,还有:①一代测序技术,Sanger测序目前仍为基因检测的金标准,但成本高、耗时长、对操作人员要求高;②基因芯片技术,具有自动化、高通量、微型化,结果判读方便,但对样本DNA质量要求高,且可检测的突变位点有限;③基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术,具有准确高效、检测位点多等特点,但该技术对样品纯度要求更高、仪器昂贵、对人员技术要求高;④下一代测序(NGS)技术,通过大量数据和生物信息学分析手段来判定,具有通量更高、速度更快等优点。此外,还有高分辨率熔解曲线技术、侵染检测技术、多色探针熔解曲线分析技术等,上述方法各有优劣^[7-11]。目前已有多家企业根据自己的技术优势及实际情况,研发了多种耳聋基因突变检测试剂,主要为测序法、芯片法、质谱法、PCR法。国内已上市销售的耳聋基因突变检测试剂盒有9个,尚有多家企业正在进行相关工作。这些试剂在临床上已得到了广泛的应用,超过60万新生儿受益。然而各类试剂盒因检测原理、检测位点和检测能力范围不同,存在一定技术水平差异,2019年之前并无这类试剂盒的行业标准或国家标准,客观上无法进行统一尺度的评价,所以本院开展了耳聋基因突变检测试剂盒行业标准的申报。

本次行标起草单位及验证单位覆盖了国内耳聋基因突变检测试剂盒的主流厂家,方法也全面覆盖,其优势在于意见来源广泛且验证数据充分,使确定的各指标更加严谨、更具可操作性。在检测限项目中,由于各方法原理本身的限制,个别试剂在样本浓度为 $1\text{ ng}/\mu\text{L}$ 的条件下,难以正确检出突变位点,此时可考虑适当提高检测限浓度,但并不直接提高至该检测试剂盒声称的检测限。这样做的目的是,既不违背现有试剂盒的客观检测水平,同时可促进企业改进方法,提高检出率。在准确性和特异性项目中,个别试剂出现了假阴性和假阳性的结果。出现以上情况,企业应积极查找原因,解决问题。这也是建立行业标准的意义所在。要指出的是,在制定过程中,有以下几个讨论热点问题:①适用范围:由于测序法与PCR或者芯片法等方法的检测原理存在一定差异,有其特征性的性能指标,如建库失败率,测序深度、测序质量评价等,不完全适用本行业标准的应用范围,故经讨论,去掉适用范围中的基于测序原理的耳聋基因突变检测试剂盒;②检测限项目中:a.对于线粒体异质性的确认受限于目前的检测技术,以及临床阳性样本的难以获得性,不列为评价指标。b.对于其他位点的突变,因各检测方法原理不同,分别确定检测限指标,并通过实验来确认;c.干血片提取后的DNA含量一般较低,质量较差,各试剂检测原理及上样量不同,如果按提取总量制定检测限指标,并不能客观地评估试剂盒的检测能力,最终选择总反应量或浓度来评价试剂盒的检测限;不再对重复性参考品的性质描述为强/中阳性和弱阳性,改为根据突变基因种类设置重复性参考品。

综上所述,该行业标准正式发布以后,与耳聋基因突变检测国家参考品配合使用,将有助于促进各厂家改进检测能力,提高试剂质量,有效提高耳聋患儿的检出率,实现优生优育。同时,将为该类产品的研制、检测检验及上市后的监管工作提供必要的技术指导和依据。

参考文献

- [1] 杨慧波,虞闰六,缪勤,等.新生儿耳聋基因检测结果分析[J].昆明医科大学学报,2020,41(7):144-148.
 - [2] 刘清明,田野,於娟娟,等.新生儿听力与耳聋基因联合筛查随访研究[J].听力学及言语疾病杂志,2019,27(1):20-24.
 - [3] Wen C, Wang S, Zhao X, et al. Mutation analysis of the SLC26A4 gene in three Chinese families [J]. Bioscience Trends, 2019, 13(5): 441-447.
 - [4] 孙诗雨,牛琳媛,田进军,等.胶东地区非综合征型耳聋患者GJB2、SLC26A4、GJB3和12S rRNA基因的突变分析[J].中华医学遗传学杂志,2019,36(5):433-438.
 - [5] 戴显宁,陈茜,王倩,等.186例耳聋患者线粒体DNA 12S rRNA基因筛查及家系分析[J].浙江医学,2020,42(6):550-553.
 - [6] 于婷,孙楠,曲守方,等.耳聋基因突变检测国家参考品的研制[J].分子诊断与治疗杂志,2020,12(1):6-10,15.
 - [7] Choi SY, Kim YE, Ahm DB, et al. Construction of a DNA chip for screening of genetic hearing hearing loss [J]. Clin Exp Otorhinolaryngl, 2009, 2(1): 44-47.
 - [8] Jang KS, Kim YH. Rapid and robust MALDI-TOF MS techniques for microbial identification: a brief overview of their diverse applications[J]. J Microbiol, 2018, 56(4):209-216.
 - [9] 任淑敏,孔祥东,史惠蓉,等.高通量测序技术在耳聋基因诊断中的应用[J].中华医学遗传学杂志,2019,36(4):301-305.
 - [10] 王格.实时荧光PCR的探针熔解曲线分析与质谱分析应用于耳聋基因诊断的对比研究[J].医药前沿,2019,9(27):28-30.
 - [11] 高颖婷,丁海涛,肖伟利,等.遗传性耳聋基因检测技术应用进展[J].内蒙古医学杂志,2020,52(2):146-149.
-
- (上接第1599页)
- [10] Baylis SA, Ma L, Padley DJ, et al. Collaborative Study Group. Collaborative study to establish a World Health Organization International genotype panel for parvovirus B19 DNA nucleic acid amplification technology (NAT)-based assays[J]. Vox Sang, 2012, 102(3):204-211.
 - [11] Satake M, Hoshi Y, Taira R, et al. Symptomatic parvovirus B19 infection caused by blood component transfusion [J]. Transfusion, 2011, 51(9):1887-1895.
 - [12] Kleinman SH, Glynn SA, Lee TH, et al. A linked donor-reipient study to evaluate parvovirus B19 transmission by blood component transfusion [J]. Blood, 2009, 114(17):3677-3683.
 - [13] Council of Europe. European Pharmacopoeia. Strasbourg. Sixth Edition [M]. Strasbourg: Council of Europe Publishing, 2008, 1646.
 - [14] Plasma Protein Therapeutics Association. Annapolis. QSEAL NAT Testing Standard (Version 2.0)[S]. Annapolis (MD): Plasma Protein Therapeutics Association, 2013.

二代测序技术在急性髓系白血病患者预后中的应用价值

牛晓娜 葛菲 郭宏岗 陈香丽 郭建民*

[摘要] **目的** 探究二代测序(NGS)技术在急性髓系白血病(AML)患者预后中的应用价值。**方法** 选取本院2016年1月至2018年6月298例AML患者,采用NGS技术检测基因突变谱,统计AML患者基因突变频率、分布情况,根据细胞遗传学及分子生物学分为预后良好组、预后中等组、预后不良组,比较3组临床资料、基因突变情况,分析基因突变与预后的关系,并采用Kaplan-Meier曲线进行生存分析。**结果** 突变频率最高的前5个基因分别为*NPM1*、*FLT3-ITD*、*CEBPA*、*DNMT3A*、*TET2*。预后不良组基因突变频率>预后中等组>预后良好组,差异有统计学意义($P<0.05$)。伴基因突变*FLT3-ITD*、*DNMT3A*、*TET2*突变阳性与预后不良呈显著相关($P<0.05$),*CEBPA*突变阳性与预后不良无关。伴基因突变的AML患者中位无病生存期短于不伴基因突变的AML患者,差异有统计学意义($P<0.05$)。*FLT3-ITD*、*DNMT3A*、*TET2*突变阳性的AML患者中位无病生存期短于*FLT3-ITD*、*DNMT3A*、*TET2*突变阴性的AML患者,而*NPM1*突变阳性的AML患者中位无病生存期长于*NPM1*突变阴性的AML患者,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 不同预后AML患者基因突变频率存在差异,伴基因突变及*FLT3-ITD*、*DNMT3A*、*TET2*突变阳性者生存期短,预后差,而*NPM1*突变阳性者与之相反。

[关键词] 急性髓系白血病;二代测序技术;基因;突变;预后

The value of next-generation sequencing technology in prognosis of patients with acute myeloid leukemia

NIU Xiaona, GE Fei, GUO Honggang, CHEN Xiangli, GUO Jianmin*

(Department of Hematology, Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou, Henan, China, 450000)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the application value of next-generation sequencing (NGS) technology in the prognosis of patients with acute myeloid leukemia (AML). **Methods** A total of 298 AML patients in our hospital from January 2016 to June 2018 were selected. NGS technology was used to detect gene mutation spectrum, and the frequency and distribution of gene mutations in AML patients were counted. According to cytogenetics and molecular biology, they were divided into the good prognosis group, the medium prognosis group and the poor prognosis group. The clinical data and gene mutation status of the three groups were compared. The relationship between gene mutation and prognosis was analyzed. Kaplan-Meier curve was used for survival analysis. **Results** The top 5 genes with the highest mutation frequency were *NPM1*, *FLT3-ITD*, *CEBPA*, *DNMT3A*, *TET2*. The gene mutation frequency in the poor prognosis group>the medium prognosis group>the good prognosis group, the difference was statistically significant ($P<0.05$). Concomitant gene mutations, *FLT3-ITD*, *DNMT3A*, and *TET2* positive were still significantly related to the poor prognosis ($P<0.05$), and positive *CEBPA* mutation was not related to the poor prognosis. The median disease-free survival of AML patients with gene mutations was shorter than that of AML patients without gene mutations,

基金项目:国家自然科学基金(81300417)

作者单位:河南省人民医院血液科,河南,郑州 450000

*通信作者:郭建民, E-mail: 540708325@qq.com

and the difference was statistically significant ($P<0.05$). The median disease-free survival of AML patients with positive mutations in *FLT3-ITD*, *DNMT3A*, and *TET2* was shorter than that in AML patients with negative mutations in *NPM1*, *FLT3-ITD*, *DNMT3A*, and *TET2*, while the median disease-free survival of AML patients with mutation-positive was longer than that of AML patients with *NPM1* mutation-negative, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** There are differences in the frequency of gene mutations in AML patients with different prognosis. The concomitant gene mutations, *FLT3-ITD*, *DNMT3A*, and *TET2* mutations have a short survival time and a poor prognosis, while those with *NPM1* mutations are the opposite.

[KEY WORDS] Acute myeloid leukemia; Next-generation sequencing technology; Gene; Mutation; Prognosis; Survival status

急性髓系白血病 (Acute myeloid leukemia, AML) 是成人中最常见急性白血病类型, 以中老年人居多。AML 发病过程中, 每个群体不同时间段里经历不同的遗传学改变, 致使染色体核型、基因突变类型及临床特征有很大异质性, 而这些异质性是预后差异的基础^[1-2]。现阶段, 临床已将 AML 患者分子生物学层面纳入危险度分层系统, 分为预后良好、预后中等、预后不良。随着高通量基因测序技术的发展, 国内外学者研究了 AML 相关基因突变及其在疾病发生中的机制, 并已明确了一些特殊类型的突变或融合基因用于指导治疗方案的制定^[3-4]。本研究尝试分析二代测序 (Next-generation sequencing, NGS) 技术下 AML 患者基因突变情况, 并探讨具体基因突变类型对预后及生存状况的影响。报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取本院 2016 年 1 月至 2018 年 6 月确诊的 298 例 AML 患者作为研究对象, 男 186 例, 女 112 例, 年龄 ≥ 45 岁 120 例, 年龄 < 45 岁 178 例。纳入标准: ①均符合 AML 诊断标准^[5]; ②经骨髓和外周血细胞形态学检查、流式免疫分型、骨髓活检、染色体核型分析等检查确诊; ③患者知情同意。排除标准: 治疗相关性白血病、MDS 或 MPN 转化白血病等继发白血病患者。研究经本院医学伦理委员会审批同意。

1.2 方法

1.2.1 检测方法

抽取患者骨髓液 4~6 mL, EDTA 抗凝, 分离并收集骨髓单个核细胞, 柱式抽提试剂盒提取 DNA, 采用 AML/MDS-NGS 芯片 (上海源奇生物医药科技有限公司) 进行基因突变检测, 涵盖 *ASXL1*、*NPM1*、*FLT3*、*KIT*、*DNMT3A*、*CEBPA*、*IDH*、*EZH2*、*TET2*、*RUNX1*、*TP53*、*SF3B1*、*PHF6*、*SRSF2*、*RAS*、*U2AF1*、

JAK 等基因的热点突变区域, 测序深度 3 000 ×。

1.2.2 治疗方法

年龄 ≤ 60 岁者, 予 IA3+7 方案 (去甲氧柔红霉素 8~12 mg/m² × 3 d + 阿糖胞苷 100 mg/m² × 7 d) 诱导化疗; 年龄 > 60 岁者, 予 DA3+7 方案或 CAG (阿克拉霉素 10~14 mg/m² × 4 d + 阿糖胞苷 10 mg/m², 2 次/d × 14 d + 集落刺激因子 300 μg/d) 等预激方案诱导化疗。完全缓解 (CR) 后进入巩固阶段, 予中、大剂量阿糖胞苷单药至少 4 个疗程。

1.3 观察指标

① AML 基因突变频率及分布情况。② 根据《成人急性髓系白血病 (非急性早幼粒细胞白血病) 中国诊疗指南 (2017 年版)》^[6] 中预后危险度分级分为预后良好组、预后中等组、预后不良组, 对比 3 组临床资料、基因突变频率、主要基因突变类型。③ 基因突变与预后的关系。④ 伴或不伴基因突变对无病生存期、总生存期的影响。⑤ 不同基因突变类型对中位无病生存期的影响。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 22.0 统计软件进行数据分析; 计数资料以 $n(\%)$ 表示, 采用 χ^2 检验; 符合正态分布的计量资料采用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 组间比较用独立样本 t 检验。预后影响因素分析应用 Logistic 回归分析; Kaplan-Meier 生存曲线分析伴基因突变、*NPM1*、*FLT3-ITD*、*DNMT3A*、*TET2* 突变阳性与患者生存期的关系, 采用 Log-Rank 检验; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 AML 基因突变频率及分布情况

298 例 AML 患者中位突变数目为两个 (0~6), 其中 256 例可检测到基因突变, 占 85.91%; ≥ 3 种基因突变 71 例, 占 23.83%。突变率最高的前 5 个基因分别为 *NPM1*、*FLT3-ITD*、*CEBPA*、*DNMT3A*、*TET2*。见图 1。

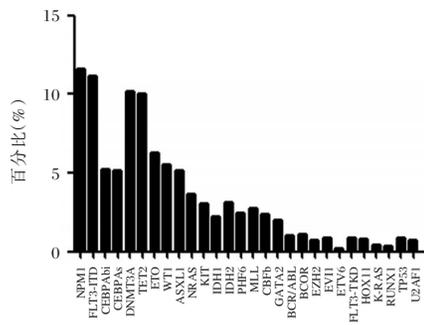


图1 AML 基因突变频率及分布情况

Figure 1 Frequency and distribution of AML gene mutations

2.2 3组临床资料、基因突变频率

3组初诊骨髓原始细胞、附加染色体异常、伴基因突变、*NPM1*、*FLT3-ITD*、*CEBPA*、*DNMT3A*、*TET2*突变阳性比例比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表1。

2.3 基因突变与预后不良的关系

将初诊骨髓原始细胞、附加染色体异常等其他因素控制后,伴基因突变、*FLT3-ITD*、*DNMT3A*、*TET2*突变阳性仍与预后不良显著相关($P < 0.05$);*CEBPA*突变阳性与预后不良无关。见表2。

表1 3组临床资料、基因突变频率、主要基因突变类型比较 [n(%)]

Table 1 Comparison of clinical data, gene mutation frequency, and main gene mutation types of the three groups [n(%)]

资料		预后良好组(n=58)	预后中等组(n=178)	预后不良组(n=62)	χ^2 值	P值
年龄(岁)	≥45	22(37.93)	72(40.45)	26(41.94)	0.206	0.902
	<45	36(62.07)	106(59.55)	36(58.06)		
性别	男	36(62.07)	111(62.36)	39(62.90)	0.010	0.995
	女	22(37.93)	67(37.64)	23(37.10)		
初诊骨髓原始细胞(%)	≥45	5(8.62)	21(11.80)	17(27.42)	11.056	0.004
	<45	53(91.38)	157(88.20)	45(72.58)		
附加染色体异常	是	15(25.86)	60(33.71)	30(48.39)	7.115	0.029
	否	43(74.14)	118(66.29)	32(51.61)		
基因突变	伴	47(81.03)	149(83.71)	60(96.77)	7.896	0.019
	不伴	11(18.97)	29(16.29)	2(3.23)		
<i>NPM1</i> 突变	阳性	19(32.76)	15(8.43)	0(0.00)	21.190	<0.001
	阴性	39(67.25)	163(91.57)	62(100.00)		
<i>CEBPA</i> 突变	阳性	1(1.72)	6(3.37)	24(38.71)	18.301	<0.001
	阴性	57(98.28)	172(96.63)	38(61.29)		
<i>FLT3-ITD</i> 突变	阳性	0(0.00)	7(3.93)	26(41.94)	19.071	<0.001
	阴性	58(100.00)	171(96.07)	36(58.06)		
<i>DNMT3A</i> 突变	阳性	1(1.72)	8(4.49)	21(33.87)	19.617	<0.001
	阴性	57(98.28)	170(95.51)	41(66.13)		
<i>TET2</i> 突变	阳性	0(0.00)	7(3.93)	23(37.10)	20.107	<0.001
	阴性	58(100.00)	171(96.07)	39(62.90)		

表2 基因突变与预后不良的关系

Table 2 Relationship between gene mutation and poor prognosis

自变量	β 值	S.E.值	β 值 (标准化)	t值	P值
常量	10.378	1.052	-	8.045	<0.001
伴基因突变	0.711	0.026	0.752	11.144	<0.001
<i>NPM1</i> 突变	-0.673	0.031	-0.706	8.127	<0.001
<i>CEBPA</i> 突变	0.317	0.045	0.359	1.591	>0.05
<i>FLT3-ITD</i> 突变	0.749	0.022	0.801	12.417	<0.001
<i>DNMT3A</i> 突变	0.726	0.034	0.783	11.893	<0.001
<i>TET2</i> 突变	0.681	0.029	0.714	9.006	<0.001

2.4 基因突变对无病生存期、总生存期的影响

随访两年,脱落8例。伴基因突变的AML患者中位无病生存期11.87个月短于不伴基因突变的AML患者15.07个月($\chi^2=5.168, P=0.023$)。见图2。

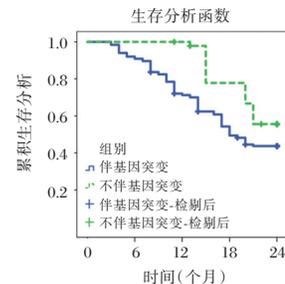


图2 基因突变对中位无病生存期的影响

Figure 2 The effect of gene mutations on median disease-free survival

2.5 不同基因突变类型对中位无病生存期的影响

Kaplan-Meier 曲线分析,*NPM1*突变阳性的AML患者中位生存期14.71个月长于阴性患者

11.63个月, *FLT3-ITD*、*DNMT3A*、*TET2* 突变阳性的 AML 患者中位无病生存期 11.06 个月、11.24 个月、11.32 个月短于 *FLT3-ITD*、*DNMT3A*、*TET2* 突变阴

性的 AML 患者 15.73 个月、14.86 个月、14.19 个月, 差异有统计学意义 ($\chi^2=5.223, 6.277, 5.341, 7.552, P=0.022, 0.012, 0.021, 0.006$)。见图 3。

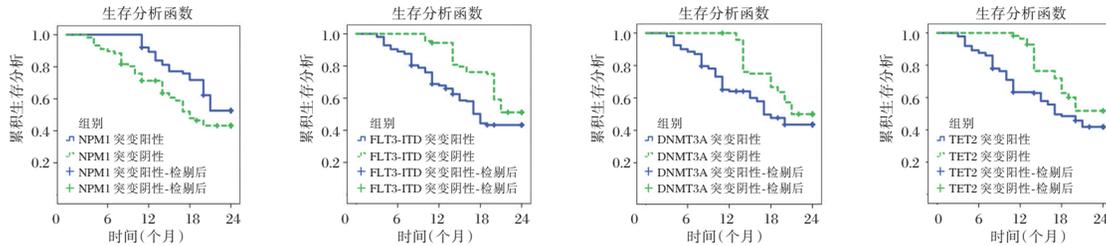


图3 不同基因突变类型对中位无病生存期的影响

Figure 3 The effect of different gene mutation types on median disease-free survival

3 讨论

NGS 技术在大型综合基因组分析的应用极大提高了临床对 AML 发生、发展机制的认识, 重现性基因突变的不断发现打开了相关机制研究的思路。2016 年 WHO 对 AML 分类再次做了更新^[7], *NPM1*、*CEBPA*、*RUNX1* 等突变均已被纳入 AML 诊断参考, 为 AML 做进一步的精细分层。

现阶段, 采用 NGS 技术探索 AML 患者基因突变谱的大样本数据有限, 美国癌症基因组研究网络报道病例数为 200 例, 欧洲多中心数据共纳入 1 540 例患者, 国内多个研究中心, 包括苏州大学附属第一医院、上海 7 家综合性医院等^[8-11]也发表了各自数据。虽然各中心检测的目标基因略有不同, 但都基本覆盖了 *NPM1*、*FLT3*、*IDH*、*DNMT3A*、*TET2*、*TP53*、*RUNX1*、*RAS*、*WT1*、*CEBPA* 等 AML 常见基因。本研究与美国多中心数据 22% 相近, 高于上海 7 家综合性医院报道的数据 13%。从基因突变结果看, AML 伴 *NPM1* 突变患者占 11.62%, 与国内其他中心数据相似, 但明显低于美国人群(27%)与欧洲人群(28%)。产生差异的原因尚不明确, 是否与患者种族、生活方式、生活环境等有关还期待更多数据支持。伴 *DNMT3A* 突变的患者占 10.15%, 苏医一附院 6%, 上海 7 家综合性医院 9%, 均低于美国数据(26%)。研究证实, *DNMT3A* 突变与诊断时的高白细胞、老年和不良预后有关^[12]。上海 7 家综合性医院对入组患者进行年龄分层后发现, 50 岁以上患者 *DNMT3A* 突变频率是 50 岁以下患者的 3 倍以上。苏医一附院患者中位年龄 42 岁, 而美国患者中位年龄 55 岁。故推测各中心患者中位年龄可能是数据差异的原因之一。

NPM1 突变在成人 AML 中的中位年龄偏高, 血小板、白细胞数目较高, 且与 CD34 和 CD117 低表达相关^[13]。研究显示, *NPM1* 突变预示化疗后易达到 CR^[14]。本研究发现, *NPM1* 突变阳性者预后好。 *FLT3-ITD* 突变的 AML 患者外周血骨髓原始细胞比例、白细胞数较高, CR 率和总生存率偏低, 复发率偏高^[15]。本研究发现, *FLT3-ITD* 基因突变是预后不良因素。 *DNMT3A* 基因贯穿造血干细胞自我更新、分化和抑癌基因失活、原癌基因激活的过程, 该基因突变在 AML 发病机制中起着举足轻重的作用。Meta 分析显示, *DNMT3A* 基因突变是 AML 患者第一疗程缓解率和总体生存率的危险因素^[16]。本研究结果提示, *DNMT3A* 突变阳性提示预后不良。目前, *TET2* 基因突变在评估疾病预后方面尚无统一结论。本研究数据显示, *TET2* 突变阳性者生存期短, 与李佳佳等^[17]研究一致, 但 *TET2* 基因突变易发生在年龄偏大的患者中, 而年龄不同治疗方案不一, 故预后可能受到年龄及治疗方案影响, 可能导致数据偏移, 仍需扩大样本数排除影响因素进行进一步分析。

综上所述, 不同预后 AML 患者基因突变频率存在差异, 伴基因突变及 *FLT3-ITD*、*DNMT3A*、*TET2* 突变阳性者生存期短, 预后差, 而 *NPM1* 突变阳性者与之相反。

参考文献

- [1] 王舒, 张赞翔, 睦铮旋, 等. 正常核型急性髓细胞白血病中 *CEBPA* 基因伴随突变模式分析[J]. 诊断学理论与实践, 2017, 16(5): 498-503.
- [2] 娄典, 王文清, 李国辉, 等. 二代测序技术监测急性髓系白血病患者骨髓微小残留病的临床意义[J]. 白血病·淋巴瘤, 2019, 28(10): 577-581. (下转第 1611 页)

彩色多普勒超声检查在椎动脉型颈椎病综合治疗中的疗效分析

王充强¹ 巩凤超² 王晶¹ 吕春菊¹ 胡大力¹ 夏利平^{1*}

[摘要] 目的 分析彩色多普勒超声检查在椎动脉型颈椎病(CSA)患者不同治疗手段疗效的分析。方法 选取本院收治的CSA患者80例作为本次研究对象,将其随机分为实验组(40例)与对照组(40例)。比较分析两组患者治疗前、后椎动脉血流参数情况以及临床治疗的有效率。结果 实验组与对照组对于收缩期峰值流速(PSV)、舒张末期流速(EDV)及阻力指数(RI)均有所改善,且实验组临床治疗有效率优于对照组,差异具有统计学意义($\chi^2=5.000$, $P<0.05$)。结论 多普勒超声检查在椎动脉型颈椎病患者综合治疗过程中具有较高的临床应用价值,能够清楚反映综合治疗的临床疗效。

[关键词] 多普勒超声检查;椎动脉型颈椎病;综合治疗效果

Analysis of the effect of color Doppler ultrasound in the comprehensive treatment of vertebral artery type cervical spondylopathy

WANG Chongqiang¹, GONG Fengchao², WANG Jing¹, LV Chunju¹, HU Dali¹, XIA Liping^{1*}

(1. Department of Ultrasound, the Second Affiliated Hospital of Shandong First Medical University, Taian, Shandong, China, 271000; 2. Department of Neurology, the Second Affiliated Hospital of Shandong First Medical University, Taian, Shandong, China, 271000)

[ABSTRACT] Objective To analyze the effect of Doppler ultrasonography on the treatment of patients with vertebral artery type cervical spondylopathy (CSA). Methods Eighty patients with vertebral artery type cervical spondylopathy admitted to our hospital were selected as the subjects of this study and randomly divided into the experimental group (40 cases) and the control group (40 cases). The parameters of vertebral artery blood flow before and after treatment in two groups and the effectiveness of clinical treatment were compared and analyzed. Results The experimental group and the control group have improved peak systolic flow rate (PSV), end-diastolic flow rate (EDV) and resistance index (RI), and the clinical treatment efficiency of the experimental group is better than the control group, the difference is statistically significant ($\chi^2=5.00$, $P<0.05$). Conclusion Doppler ultrasound has high clinical application value in the comprehensive treatment of patients with cervical spondylosis of vertebral artery type, and can clearly reflect the clinical efficacy of comprehensive treatment.

[KEY WORDS] Doppler ultrasonography; Cervical spondylopathy of vertebral artery type; Comprehensive treatment effect

椎动脉型颈椎病是临床工作中较为常见的一种疾病,主要好发于中老年群体^[1-2]。在人们生活方式以及生活习惯改变的影响下,椎动脉型颈椎

病(Cervical Spondylotic Arteriopath, CSA)发病人群逐渐向年轻化发展,对人们的生活健康具有重要的影响。彩色多普勒超声检查能够准确、快速

基金项目:泰安市科技发展计划项目(2018NS0111)

作者单位:1. 山东第一医科大学第二附属医院超声科,山东,泰安 271000

2. 山东第一医科大学第二附属医院神经内科,山东,泰安 271000

*通信作者:夏利平, E-mail:2559969197@qq.com

地反映椎动脉血流参数情况,是当前临床首要诊断方式之一^[3]。本文将分析彩色多普勒超声检查在椎动脉型颈椎病患者综合治疗过程中的疗效评估方面的价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料

在本院收治的 CSA 患者中选择 80 例作为本次研究对象,接受治疗时间在 2018 年 7 月至 2019 年 7 月期间,随机将其分为实验组(40 例)与对照组(40 例),分组方法采用数字随机分法。本次研究已获得患者及其家属的知情,排除存在恶性肿瘤患者、精神疾病患者以及认知障碍无法配合治疗的患者。其中实验组中男女患者人数分别为 19 例与 21 例,患者年龄为 19~81 岁之间,平均为(48.32±5.04)岁;病程时间在 15~21 年之间,平均为(3.08±0.47)年。对照组中男女患者人数分别为 17 例与 23 例,患者年龄为 20~79 岁之间,平均为(48.12±5.71)岁;病程时间在 15~20 年之间,平均为(3.16±0.39)年。两组一般资料比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

1.2 仪器与方法

采用日本佳能(Canon)公司 Toshiba Aplio500 彩色多普勒超声诊断仪,探头频率 7.5~13.0 MHz。患者取平卧位,在患者颈部放置软枕,并将患者头放置于略向后仰、偏向检查的对侧状态,暴露患者颈部。观察患者椎动脉起始段以及椎间段血管的走向以及血流的方向,同时也要观察患者椎动脉内膜是否存在斑块,并在椎动脉最狭窄部分进行内径、收缩期峰值流速(Peak Systolic Velocity, PSV)、舒张末期流速(End Diastolic Velocity, EDV)以及阻力指数(Resistance Index, RI)的测量。由 2 名具有主治医师及以上资质的超声医师采用盲法分析图像,若两者意见不统一时协商达成一致。

对照组患者接受推拿按摩治疗方法,每天进行 1 次,连续治疗五天为一个疗程,一个疗程结束后休息两天,连续治疗五个疗程。实验组患者在对照组治疗方法基础上应用动态牵引治疗以及药物治疗,其中动态牵引治疗每次治疗时间为 15~20 min,每天进行 1 次,连续治疗五天为一个疗程,一个疗程结束后休息两天,连续治疗五个疗程。药物治疗使用氯唑沙宗(国药准字 H37022310),药物使用方式为口服,每次服用剂量为 2 片,每天服用 3 次,连续治疗十天为一个疗程^[4]。

1.3 观察指标

比较观察两组患者治疗前后椎动脉血流参数情况以及临床治疗有效率。椎动脉型颈椎病超声诊断标准为,椎动脉内径小于 2.80 mm, PSV 低于 35.00 cm/s, EDV 低于 10.00 cm/s, RI 超过 0.70。临床治疗有效率的评定参考患者的临床症状以及彩色多普勒超声检查结果,其中患者临床症状以及体征无明显改善,椎动脉超声检查结果显示患者血流参数无显著改善,为治疗无效;患者临床症状以及体征具有一定的好转,椎动脉超声检查结果显示患者仰卧位时血流参数正常,旋颈时血流参数为(\pm),为治疗显效;患者临床症状以及体征基本消失,椎动脉超声检查结果显示仰卧位、旋颈时椎动脉血流参数均正常,为治疗有效^[5]。

1.4 统计学方法

采用统计学软件 SPSS 23.0 进行数据分析。组间年龄比较使用独立样本 t 检验,组间计数资料比较使用 χ^2 检验或 Fish 确切概率法。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 对比两组患者接受治疗前后右椎动脉血流参数情况

在 80 例椎动脉型颈椎病患者中,有 72 例患者椎动脉内径小于 2.80 mm;有 77 例患者 PSV 低于 35.00 cm/s,有 72 例患者 EDV 低于 10.00 cm/s,有 69 例患者 RI 超过 0.70。两组患者治疗后右椎动脉血流参数情况均明显优于治疗前,实验组患者接受治疗后右椎动脉血流参数情况明显优于对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

2.2 对比两组患者接受治疗前后左椎动脉血流参数情况

两组患者治疗后左椎动脉血流参数情况均明显优于治疗前,研究患者接受治疗后左椎动脉血流参数情况明显优于对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。见表 2。

2.3 对比两组临床治疗有效率

实验组临床治疗有效率与对照组对比,差异具有统计学意义($P<0.05$)。见表 3。

3 讨论

目前临床尚未将 CSA 的发病机制阐述清楚,主要认为是颈椎间盘突出或颈椎退变引起的失稳

表1 两组患者接受治疗前后右椎动脉血流参数比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of the blood flow parameters of the right vertebral artery before and after treatment in the two groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Vs(cm/s)		Vd(cm/s)		RI	
		治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
实验组	40	30.11±1.92	32.57±1.27	7.82±2.41	16.23±1.47	0.74±0.07	0.61±0.03
对照组	40	31.11±2.67	35.21±1.06	7.91±2.46	11.27±1.36	0.75±0.08	0.68±0.04
t值		1.923	10.093	0.165	15.664	0.595	8.854
P值		0.058	0.000	0.869	0.000	0.553	0.000

表2 两组患者接受治疗前后左椎动脉血流参数比较 ($\bar{x} \pm s$)

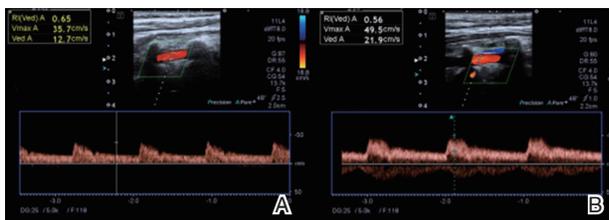
Table 2 Comparison of the blood flow parameters of the left vertebral artery between the two groups before and after treatment ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Vs(cm/s)		Vd(cm/s)		RI	
		治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
实验组	40	34.12±2.89	45.27±3.12	10.72±2.49	20.13±3.51	0.69±0.08	0.55±0.04
对照组	40	33.11±1.83	36.26±2.41	9.91±2.47	12.77±1.67	0.72±0.07	0.64±0.05
t值		1.867	14.454	1.460	11.975	1.784	8.889
P值		0.065	0.000	0.148	0.000	0.078	0.000

表3 两组临床治疗有效率比较 [n(%)]

Table 3 Comparison of the effectiveness of clinical treatment between the two groups [n(%)]

组别	n	无效	显效	有效	有效率
实验组	40	1(2.50)	8(20.00)	31(77.50)	39(97.50)
对照组	40	7(17.50)	15(37.50)	18(45.00)	33(82.50)
χ^2 值					5.000
P值					0.025



注: A. 患者经过实验组治疗前血流频谱(PSV:36 cm/s, EDV:13 cm/s, RI:0.65); B. 患者经过实验组治疗后血流频谱(PSV:50 cm/s, EDV:22 cm/s, RI:0.56)。

图1 同一患者经过实验组治前、后血流频谱变化

Figure 1 Blood flow spectrum of the same patient before and after treatment in the experimental group

以及骨质退行性变化,从而导致颈椎出现肥大性增生、刺激椎动脉周围的交感神经,继而导致椎动脉发生反射性收缩,导致椎动脉管腔发生变化,影响供血量^[6-7]。椎-基底动脉系统构成了大脑半球的后循环系统,是由走行于双侧椎间隙的椎动脉及其汇合形成的基底动脉组成,供给丘脑、脑干及小脑部分^[8]。当椎-基底动脉系统缺血时累及包括前庭、小脑等感觉神经元,从而产生眩晕症状^[9]椎动脉弯曲者常由颈椎间盘退行性变引起,导致椎动

脉血流量不同程度减少。椎动脉轻度的弯曲一般无明显临床症状,如椎动脉明显扭曲可出现眩晕、头痛等椎动脉供血不足表现,尤其在改变头部位置或突然转颈时发生一过性脑供血不足^[10]。

椎动脉血管造影是诊断 CSA 的“金标准”,但因其有创性、费用较高,不适用于常规检查。彩色多普勒超声检查可以将患者椎动脉内膜结构、血管畸形、局部狭窄以及血管钙化等情况清楚的显示出来,同时也可以通过结合射频形态来观察患者椎动脉是否存在供血不足的情况^[11]。本研究结果显示:患者接受治疗后超声检查结果同临床症状的改善症状具有一致性,表明彩色多普勒超声检查能够有效的量化 CSA 患者治疗期间的疗效。同时彩色超声多普勒检查不会为患者带来创伤以及疼痛感,临床费用不高,且操作方法简单,能够对患者进行反复性、动态性观察。是目前临床工作中唯一一种不具有创伤性的动脉血流速度检测方法,同时也是验证 CSA 临床治疗效果的重要方式之一^[12]。

推拿牵引能够发挥舒筋活络、解痉止痛及整复错位的效果,对于理顺椎间隙的结构关系、缓解椎-基底动脉系统血管痉挛与压迫、改善后循环缺血情况,恢复颈椎椎间关节正常排列及椎动脉的正常走行具有积极的影响^[13]。王琳^[14]等研究表明通过观察椎动脉型颈椎病治疗前后血流变化及临床症状的改善以确定 CSA 不同病变部位的最佳牵引角度,以制定个体化治疗方案^[10, 15-16]。

本次研究结果也同时表明:推拿按摩、动态牵引法配合药物的综合治疗方式在 CSA 患者治疗中

的临床效果更为显著,能够明显改善患者的临床症状,改善患者后循环血流灌注压力。本研究结论需经颅多普勒超声等动态资料的进一步支持,从而发现 CSA 与后循环急性梗死、一过性眩晕等颅内病变的相关性研究;虽然彩色多普勒超声检查优点较多,但依然有其局限性。检查过程中对于检查医师的手法和经验要求较高,特别是椎动脉血流的显示与取样点角度的选择对测量参数都存在较大的影响。

综上所述,彩色多普勒超声检查能够清楚反映椎动脉型颈椎病患者综合治疗的临床疗效,从而合理、有效的指导临床用药与治疗。

参考文献

[1] 张喆,熊健. 针刺椎枕肌与常规针刺法治疗椎动脉型颈椎病的临床效果比较[J]. 解放军医药杂志, 2019, 31(11):105-108.

[2] 徐德永, 栾红梅. 椎动脉型颈椎病的发病因素与检查方法的探索[J]. 临床放射学杂志, 1998, 17(6):371-372.

[3] 占欢腾, 吴春玉, 洪冰. 中医综合疗法治疗椎动脉型颈椎病的效果[J]. 中国老年学杂志, 2019, 39(10):2394-2397.

[4] 吴黎莉, 周可, 宗文凯, 等. 复方氯唑沙宗片在健康人体的生物等效性[J]. 中国新药与临床杂志, 2011, 30(12):937-941.

[5] 陆志强. 超声引导下星状神经节阻滞对交感型颈椎病临床效果研究. 中国疼痛医学杂志, 2019, 25(6): 465-468.

[6] 欧阳琴, 马臻. 丛刺电针治疗椎动脉型颈椎病的疗效分

析. 湖北中医药大学学报, 2019, 21(3): 101-103.

[7] 魏楠. 针灸推拿与中药联合应用对椎动脉型颈椎病患者血流动力学的影响[J]. 中国老年学杂志, 2016, 36(3):693-694.

[8] 李鑫, 谭莉, 万芳超, 等. 椎动脉型颈椎病与椎动脉 V2 段狭窄性病变的相关性[J]. 临床神经外科杂志, 2018, 15(5): 346-348,353.

[9] 李剑峰, 唐福宇. 颈椎病性眩晕发病机制新进展[J]. 颈腰痛杂志, 2020, 41(1):112-114.

[10] 刘婷婷, 黄涛, 钟子辉, 等. 215 例椎动脉型颈椎病患者颅外椎动脉结构及血流动力学的变化[J]. 广东医学院学报, 2015, 33(4):425-427.

[11] 马瑞杰, 胡文彬, 王明珠等. 脑型肝豆状核变性合并椎动脉型颈椎病患者脑彩超监测情况研究. 中医临床杂志. 2018. 30(5): 885-889.

[12] McNally JS, Hinckley PJ, Sakata A, et al. Magnetic Resonance Imaging and Clinical Factors Associated With Ischemic Stroke in Patients Suspected of Cervical Artery Dissection [J]. Stroke, 2018, 49(10):2337-2344.

[13] 邢京禹. 针灸联合推拿手法治疗椎动脉型颈椎病临床研究[J]. 中西医结合研究, 2020, 12(01):5-8.

[14] 王琳, 孙月芳, 陈宪福, 等. 彩色多普勒和经颅多普勒对椎动脉型颈椎病牵引治疗效果的评价[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(17):3094-3098.

[15] 王琳, 孙微. 多普勒超声对椎动脉型颈椎病治疗疗效研究[J]. 辽宁中医杂志, 2011, 38(6):1147-1148.

[16] 王燕飞, 吕玉玲. 针灸结合微创埋线对椎动脉型颈椎病患者动脉血流的影响及其临床疗效分析[J]. 世界中西医结合杂志, 2019, 14(10):1419-1422.

(上接第 1607 页)

[3] Shapiro RM, DDH K. Next-generation sequencing-based minimal residual disease monitoring in patients receiving allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndrome [J]. Curr Opin Hematol, 2018, 25(6):425-432.

[4] Bullinger L, Döhner K, Döhner H. Genomics of Acute Myeloid Leukemia Diagnosis and Pathways [J]. J Clin Oncol, 2017, 35(9):934-946.

[5] 中华医学会血液学分会白血病淋巴瘤学组. 成人急性髓系白血病(非急性早幼粒细胞白血病)中国诊疗指南(2017年版)[J]. 中华血液学杂志, 2017, 38(3):177-182.

[6] 中华医学会血液学分会白血病淋巴瘤学组. 成人急性髓系白血病(非急性早幼粒细胞白血病)中国诊疗指南(2017年版)[J]. 中华血液学杂志, 2017, 38(3):177-182.

[7] 黄赛, 冯聪, 李艳, 等. t(8;21)白血病的发病机制及二代测序技术在白血病中的应用进展[J]. 解放军医学杂志, 2017, 42(5):472-476.

[8] Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, et al. Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia [J]. N Engl J Med, 2016, 374(23):2209-2221.

[9] Ley TJ, Miller C, Ding L, et al. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia [J]. N Engl J Med, 2013, 368(22):2059-2074.

[10] Yin J, Xie X, Zhang F, et al. Low frequency of mutations in Chinese with acute myeloid leukemia: Different disease or different aetiology [J]. Leuk Res, 2015, 39(6):646-648.

[11] 赵初娴, 王健民, 李军民, 等. 应用二代测序技术分析急性髓系白血病患者基因突变及其对预后的影响[J]. 中华医学杂志, 2019, 99(40):3145-3151.

[12] 杨莹, 石晓东, 戴钰俊, 等. 雷帕霉素抑制 DNMT3A 突变相关急性髓系白血病的发展[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2018, 38(9):1039-1044.

[13] 罗丽卿, 彭振翼, 司秀文, 等. 急性髓细胞白血病 IDH 基因突变临床特征及预后意义[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2017, 24(21):1530-1533.

[14] 焦扬. NPM1 突变阳性与阴性初治原发 AML 临床特点分析[J]. 中华检验医学杂志, 2017, 40(12):975-978.

[15] 李敬东, 韩效林, 杨翠, 等. FLT3-ITD-mt 和 FLT3-ITD-wt 初治原发 AML 患者外周血象和 DNMT3A 基因突变的临床特征对比[J]. 中国实验血液学杂志, 2019, 27(6):1820-1824.

[16] 章梁君, 曹悦. DNMT3A 基因突变对急性髓系白血病预后影响的 Meta 分析[J]. 检验医学与临床, 2019, 16(10):1393-1397.

[17] 李佳佳, 朱俊锋, 周黎黎, 等. 成人正常核型原发急性髓系白血病中 TET2 突变情况及临床意义[J]. 山东医药, 2017, 57(45):16-19.

β-珠蛋白基因 CAP 位点下游+43_+40(-AAAC)突变的临床特征分析

王继成 杜丽 姚翠泽 秦丹卿 郭浩*

[摘要] 目的 通过分析β-珠蛋白基因5'UTR+43_+40(-AAAC)突变的携带者以及复合其他地中海贫血突变患者的相关血液学特征来评估此突变的遗传效应。方法 应用血红蛋白电泳和血常规检测对所有采集的外周血标本进行血液学指标分析,使用PCR-流式荧光杂交法和Sanger测序进行珠蛋白基因突变检测,对相关血液学参数进行统计分析。结果 共发现39例β-珠蛋白基因5'UTR+43_+40(-AAAC)突变病例,其中有8例患β-地中海贫血,9例患α-地中海贫血,1例同时合并α和β-地中海贫血。统计分析结果表明,20例有此突变的杂合子无贫血症状,除一孕妇病例外,MCV、MCH等血液学参数都正常。当合并其他地中海贫血突变时,也未改变相关血液学参数的水平。结论 5'UTR+43_+40(-AAAC)突变可能是一种多态性,并不具有显著的生物学功能。

[关键词] 5'UTR突变;β-地中海贫血;临床特征;多态性

Hematological analysis of +43_+40 (-AAAC) mutation in the 5'UTR of β-globin gene

WANG Jicheng, DU Li, YAO Cuizhe, QIN Danqing, GUO Hao*

(Medical Genetics Center, Key Laboratory of Metabolic and Genetic Disease in Women and Children, Guangdong Women and Children Hospital, Guangzhou, Guangdong, China, 511442)

[ABSTRACT] **Objective** To estimate genetic effect of +43_+40 (-AAAC) mutation in the 5'UTR of β-globin gene by analyzed the hematology characteristics of carriers of this mutation and patients combined with other thalassemia mutations. **Methods** Hemoglobin electrophoresis and blood routine test were performed to analyze the hematological indexes of all peripheral blood samples, PCR- Flow fluorescent hybridization and Sanger sequencing were used to detect globin gene mutations, and the important hematology parameters were statistically analyzed. **Results** 39 cases of +43_+40 (-AAAC) in the 5'UTR of β-globin gene were found. Among them, 8 cases suffered from β-thalassemia, 9 cases suffered from α-thalassemia, and 1 case had both α and β-thalassemia. The results of statistical analysis showed that 20 heterozygotes with this mutation had no symptoms of anemia. Except for a pregnant case, the hematological parameters such as MCV and MCH were normal. When other thalassemia mutations were combined, the level of related hematological parameters was not changed. **Conclusion** The 5'UTR+43_+40(-AAAC) mutation may be a polymorphism and does not have significant biological functions.

[KEY WORDS] 5'UTR mutation; β-thalassemia; Clinical characteristics; Polymorphism

地中海贫血(简称地贫)是一组常见于我国南方地区的遗传性溶血性疾病,主要分为α-地贫和β-地贫两类。β-地贫是由于β-珠蛋白基因(he-

moglobin subunit beta, *HBB*)上编码区或非编码区序列上的突变而引起β-珠蛋白肽链合成减少或缺失。与缺失型多见的α-地贫不同,β-珠蛋白基

基金项目:广东省医学科学技术研究基金项目(B2019150)

作者单位:广东省妇幼保健院医学遗传中心/广东省妇幼代谢与遗传病重点实验室,广东,广州511442

*通信作者:郭浩, E-mail: 13631311268@163.com

因点突变是导致 β -地贫的主要原因。目前临床上多使用液相芯片技术或聚合酶链反应结合反向斑点杂交的方法(PCR-RDB)检测中国人最常见的17种 β -珠蛋白基因突变^[1-3],其中就包括HBB: 5'UTR+43_+40(-AAAC),这种突变通常又被称为CAP突变。1991年首次报道了中国人有此突变会导致 β -地贫^[4],但此后多项研究通过描述携带此突变的几个病例或几个家系的病例的临床表现,认为CAP突变可能只是一种多态性,并不具有明显的生物学效应^[5-6]。然而对于CAP突变的遗传效应的认识,需要分析更多的杂合子以及复合其他地贫病例的血液学表现,才更具代表性。因此本研究收集CAP突变病例,并对相关血液学参数进行了统计分析,报告如下。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取2015年至2019年就诊或送检于广东省妇幼保健院医学遗传中心,经珠蛋白基因检测确诊为HBB: 5'UTR+43_+40(-AAAC)突变的39例患者。所有病例均为广东籍,年龄为(0.5~40)岁,男女比例为15:24。对于合并其他 β -珠蛋白基因突变的病例,通过对其家系的遗传分析来排除两种突变发生在同一条染色体的情况。排除标准:①红细胞结果明显异常提示有其他少见的珠蛋白基因突变可能的病例;②通过血清铁蛋白检测提示为缺铁性贫血的病例。

1.2 研究方法

1.2.1 红细胞参数分析

收集患者的外周血,用全自动血细胞分析仪(日本希森美康株式会社,型号:SYSMEX XS-1000i)对外周血进行包括血红蛋白量Hb及MCV、MCH等红细胞参数分析。采用全自动毛细管电泳仪(法国Sebia公司, Capillary 2 Flex Piercing)完成血红蛋白组分的分析。

1.2.2 珠蛋白基因诊断

采用QIAmp DNA Blood Mini Kit试剂盒(QIAGEN公司)提取外周血基因组DNA。应用PCR-流式荧光杂交法检测3种常见的缺失型(--^{SEA}、- $\alpha^{3.7}$ 、- $\alpha^{4.2}$)和3种点突变型 α -地贫(CS、QS、WS)及17种 β -地贫突变,地中海贫血(α/β 型)基因检测试剂盒由中山大学达安基因股份有限公司提供。使用Sanger测序法对常规基因检测

显示阳性的病例进行进一步确定。

1.3 统计学分析

采用SPSS 20.0统计软件对数据进行统计分析,计量资料采用($\bar{x} \pm s$)表示,计数资料采用(%)表示。CAP突变合并 β -地贫组病例的参数与文献报道的 β^0 -地贫杂合子病例的参数的比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 20例 β -珠蛋白基因CAP突变的杂合子病例的血液学参数

20例CAP突变的杂合子均无贫血症状,Hb平均值为(139.05 ± 19.36)g/L。除病例10外,MCV、MCH等血液学指标均在正常范围内,其平均值分别为MCV:(88.68 ± 3.94)fL和MCH:(29.69 ± 1.72)pg。HbA₂的比值为(2.63 ± 0.20)%。见表1。

2.2 9例 β -珠蛋白基因CAP突变复合 β 地贫病例的血液学参数

与 β^0 -地贫杂合子相似,CAP突变复合 β^0 -地贫时依然只有轻度的小细胞低色素性贫血的表现(Hb:89-139 g/L),MCV、MCH和HbA₂的水平与文献报道^[7]的 β^0 -地贫杂合子(MCV: 64.98 ± 3.89 fL, MCH: 20.30 ± 1.23 pg, HbA₂: 5.56 ± 0.89)相比,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表2。

2.3 10例 β -珠蛋白基因CAP突变合并 α 地贫病例的血液学参数

当CAP突变合并 α -地贫时,其血液学参数的数值与单纯的 α^+ 或 α^0 -地贫相比也无明显的差异。见表3。

3 讨论

β -珠蛋白基因5'UTR的范围包括转录起始位点和翻译起始密码子之间约50bp大小的区域,其间已发现了多种变异,已被HbVar数据库收录的包括+43_+40(-AAAC)、CAP+1(A>C)、+10(-T)、+20(C>T)、+22(G>A)、+33(C>G)、+45(G>C)等7种突变^[8]。临床上通常使用红细胞参数分析结合血红蛋白电泳来筛查地贫,对于MCV<82 fL或MCH<27 pg及Hb A₂>3.5%的病例考虑是 β -地贫的可能后再进行珠蛋白基因检测来进一步确诊。而 β -珠蛋白基因5'UTR区域的突变杂合子多无血液学指标的明显异常,所以涵盖在5'UTR区域的+43_+40(-AAAC)突变就不容易被

表1 20例β-珠蛋白基因CAP突变的杂合子病例的血液学参数

Table 1 Hematological parameters of 20 cases of Heterozygote CAP mutation of HBB

例号	性别	年龄(岁)	β珠蛋白基因型	α珠蛋白基因型	Hb(g/L)	MCV(fL)	MCH(pg)	Hb A ₂ (%)	Hb F(%)	Hb A(%)
1	男	40	β ^{CAP} /β ^N	αα/αα	153	94.0	31.0	2.7	/	97.3
2	女	25	β ^{CAP} /β ^N	αα/αα	124	86.5	27.9	2.5	/	97.5
3	女	27	β ^{CAP} /β ^N	αα/αα	143	90.4	29.5	2.4	/	97.6
4	女	31	β ^{CAP} /β ^N	αα/αα	115	88.7	29.4	2.9	/	97.1
5	男	35	β ^{CAP} /β ^N	αα/αα	164	87.6	30.1	2.4	/	97.6
6	男	26	β ^{CAP} /β ^N	αα/αα	169	85.3	30.8	2.3	/	97.7
7	女	26	β ^{CAP} /β ^N	αα/αα	128	87.7	29.5	2.7	/	97.3
8	男	29	β ^{CAP} /β ^N	αα/αα	145	91.2	30.8	2.8	/	97.2
9	女	28	β ^{CAP} /β ^N	αα/αα	129	83.9	29.3	2.8	0.1	97.1
10	女	29	β ^{CAP} /β ^N	αα/αα	115	81.1	25.5	2.1	/	97.9
11	女	30	β ^{CAP} /β ^N	αα/αα	136	89.6	31.2	2.8	0.7	96.5
12	男	28	β ^{CAP} /β ^N	αα/αα	135	88.0	29.1	2.7	/	97.3
13	女	22	β ^{CAP} /β ^N	αα/αα	111	89.2	29.6	2.7	/	97.3
14	女	35	β ^{CAP} /β ^N	αα/αα	127	86.6	27.0	2.7	/	97.3
15	男	28	β ^{CAP} /β ^N	αα/αα	170	93.4	31.5	2.9	/	97.1
16	女	25	β ^{CAP} /β ^N	αα/αα	124	88.8	30.6	2.5	/	97.5
17	女	24	β ^{CAP} /β ^N	αα/αα	118	92.0	29.7	2.6	/	97.4
18	男	32	β ^{CAP} /β ^N	αα/αα	159	85.3	29.2	2.6	/	97.4
19	男	23	β ^{CAP} /β ^N	αα/αα	153	98.6	33.6	2.7	/	97.3
20	男	28	β ^{CAP} /β ^N	αα/αα	163	85.6	28.5	2.7	/	97.3

表2 9例β-珠蛋白基因CAP突变复合β-地贫病例的血液学参数

Table 2 Hematological parameters of 9 cases of CAP mutation combined with β-thalassemia

例号	性别	年龄(岁)	β珠蛋白基因型	α珠蛋白基因型	Hb(g/L)	MCV(fL)	MCH(pg)	Hb A ₂ (%)	Hb F(%)	Hb A(%)
1	女	27	β ^{CAP} /β ^{IVS-II-654}	αα/αα	89	67.6	21.9	4.1	/	95.9
2	男	22	β ^{CAP} /β ^{CD17}	-α ^{3.7} /αα	139	65.5	20.0	5.7	0.3	94.0
3	男	5	β ^{CAP} /β ^{CD17}	αα/αα	109	56.4	17.6	6.3	/	93.7
4	女	25	β ^{CAP} /β ^{CD41-42}	αα/αα	102	61.3	20.4	5.5	2.0	92.5
5	女	28	β ^{CAP} /β ^{CD41-42}	αα/αα	100	64.8	20.4	5.6	1.1	93.3
6	女	35	β ^{CAP} /β ^{CD41-42}	αα/αα	101	61.0	19.5	5.9	0.9	93.2
7	女	25	β ^{CAP} /β ^{CD41-42}	αα/αα	110	64.0	19.4	6.0	1.4	92.6
8	女	33	β ^{CAP} /β ^{CD41-42}	αα/αα	106	65.0	23.2	5.8	/	94.2
9	男	6	β ^{CAP} /β ^{CD41-42}	αα/αα	113	60.2	22.3	5.6	/	94.4

表3 10例β-珠蛋白基因CAP突变合并α-地贫病例的血液学参数

Table 3 Hematological parameters of 10 cases of CAP mutation combined with α-thalassemia

例号	性别	年龄(岁)	β珠蛋白基因型	α珠蛋白基因型	Hb(g/L)	MCV(fL)	MCH(pg)	Hb A ₂ (%)	Hb F(%)	Hb A(%)
1	女	21	β ^{CAP} /β ^N	-- ^{SEA} /αα	117	63.8	21.3	2.5	/	97.5
2	女	27	β ^{CAP} /β ^N	-- ^{SEA} /αα	100	66.2	21.6	2.3	/	97.7
3	女	24	β ^{CAP} /β ^N	-- ^{SEA} /αα	121	69.1	21.1	2.2	/	97.8
4	女	37	β ^{CAP} /β ^N	-- ^{SEA} /αα	95	68.9	21.1	2.3	/	97.7
6	男	0.5	β ^{CAP} /β ^N	-- ^{SEA} /αα	104	61.0	19.8	2.5	1.0	96.5
7	男	28	β ^{CAP} /β ^N	-- ^{SEA} /αα	148	75.3	22.8	2.5	/	97.5
8	女	32	β ^{CAP} /β ^N	-α ^{3.7} /αα	132	86.6	27.6	2.4	/	97.6
9	女	32	β ^{CAP} /β ^N	-α ^{4.2} /αα	123	79.7	26.4	2.5	/	97.5
10	男	10	β ^{CAP} /β ^N	-- ^{SEA} /-α ^{3.7}	91	52.6	15.8	1.0	0.9	98.1

发现。因此,收集多例此突变的病例,可对其血液学参数进行统计分析提供可能。

国外已有在体外从转录水平对这些突变的生物学效应进行研究的报道,并且认为β-珠蛋白

基因5'UTR区域的突变多数只是沉默的突变,并不具有显著的遗传效应^[9-10]。这与本研究结果相互验证。中间型β-地贫的基因缺陷主要为β⁺/β⁰和β⁺/β⁺两种。这种类型的β-地贫的贫血程度和

相关的血液学指标有很大的差异,可有轻度到中重度的贫血^[11]。HbVar 数据库收录的几种 β -珠蛋白基因 5'UTR 区域的突变多数显示为 β^+ -地贫,当其合并其他 β^0 -地贫突变时,应该表现为中间型 β -地贫。另外,由于 α -地贫的贫血程度与 α/β -珠蛋白肽链比例失衡的程度成正相关^[12],所以当 α -地贫合并 β -地贫时,其贫血情况应该会有改善。所以从 CAP 突变杂合子以及复合 α -地贫或 β -地贫时的血液学表现来看,此突变很可能只是一种多态性改变。至于本突变的首例报道的患儿因重型地贫而死亡,推测可能当时由于检测水平的限制,患儿携带的另一种少见的 β -地贫突变没有被发现,从而误判 CAP 突变是一种致病突变。

我国的南方省份是地贫的高发区,其中临床上常规检测的 17 种 β -珠蛋白基因突变占我国南方地区全部 β -珠蛋白基因突变类型的 95% 以上^[13-14]。但是对于 CAP 突变这种没有遗传效应的突变,可考虑排除在常规地贫检测范围内,从而纳入其他的热点突变。由于没有理想的治疗方法,婚前、孕前和产前筛查是预防中重型地贫患儿出生的最有效措施。临床上,通常先对夫妻双方同时进行血常规检测和血红蛋白电泳分析,若任一方红细胞参数和血红蛋白组分有异常,夫妻双方同时进行地贫基因检测^[15-16]。如果夫妻双方分别被诊断为 β^0 -地贫和 CAP 突变杂合子,这时准确认识和了解 CAP 突变的遗传效应,对产前诊断以及遗传咨询可以提供重要的参考。

本研究通过对 CAP 突变病例的血液学特征的分析判断 CAP 突变是一个没有遗传效应的多态性位点。临床检验实践中,当发现一个新的突变类型时,查找复合其他位点的突变、运用分子学方法预测突变的意义以及通过临床病例的分析总结,可初步判断此突变的生物学效应。

参考文献

[1] Bang-Ce Y, Hongqiong L, Zhuanfong Z, et al. Simultaneous detection of alpha-thalassemia and beta-thalassemia by oligonucleotide microarray [J]. *Haematologica*, 2004, 89 (8): 1010-1012.

[2] Winichagoon P, Saechan V, Sripanich R, et al. Prenatal diagnosis of beta-thalassaemia by reverse dot-blot hybridization [J]. *Prenat Diagn*, 1999, 19(5): 428-435.

[3] 曾赤佳,刘建雷,庄锡伟,等. PCR 结合导流杂交技术在育龄妇女 α 和 β 地中海贫血诊断中的应用 [J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2014, 6(2): 93-96.

[4] Huang SZ, Xu YH, Zeng FY, et al. A novel beta-thalassaemia mutation: deletion of 4 bp (-AAAC) in the 5' transcriptional sequence [J]. *Br J Haematol*, 1991, 78(1): 125-126.

[5] Li DZ, Liao C, Li J, et al. The 4-bp deletion (-AAAC) in the 5' untranslated region of the beta-globin gene: a simple polymorphism? [J]. *Ann Hematol*, 2009, 88(7): 709-710.

[6] 吴维青,蔡筠,金晴,等. β 珠蛋白基因非翻译区+(43-40)(-AAAC)4bp 缺失遗传学效应探讨 [J]. *中国优生与遗传杂志*, 2009, 17(9): 26-27+34.

[7] 徐湘民. 地中海贫血预防控制操作指南 [M]. 人民军医出版社, 2011: 42-44.

[8] Giardine B, Borg J, Viennas E, et al. Updates of the HbVar database of human hemoglobin variants and thalassemia mutations [J]. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42: D1063-D1069.

[9] Sgourou A, Routledge S, Antoniou M, et al. Thalassaemia mutations within the 5'UTR of the human beta-globin gene disrupt transcription [J]. *Br J Haematol*, 2004, 124(6): 828-835.

[10] Francès V, Morlé F, Godet J. Functional analysis of the 4 bp deletion identified in the 5' untranslated region of one of the beta-globin genes from a Chinese beta-thalassaemic heterozygote [J]. *Br J Haematol*, 1993, 84(1): 163-165.

[11] Chen W, Zhang X, Shang X, et al. The molecular basis of beta-thalassemia intermedia in southern China: genotypic heterogeneity and phenotypic diversity [J]. *BMC Med Genet*, 2010, 11(1): 1-10.

[12] Galanello R, Origa R. Beta-thalassemia [J]. *Orphanet J Rare Dis*, 2010, 5: 11.

[13] Jiang F, Chen GL, Li J, et al. Pre gestational thalassemia screening in Mainland China: The first two years of a preventive program [J]. *Hemoglobin*, 2017, 41(4-6): 248-253.

[14] Yin A, Li B, Luo M, et al. The prevalence and molecular spectrum of α - and β -globin gene mutations in 14,332 families of Guangdong Province, China [J]. *Plos One*, 2014, 9(2): e89855.

[15] Cousens NE, Gaff CL, Metcalfe SA, et al. Carrier screening for beta - thalassaemia: a review of international practice [J]. *Eur J Hum Genet*, 2010, 18(10): 1077-1083.

[16] 肖奇志,李恋湘,谢建红,等. 地中海贫血产前遗传筛查流程简化的风险评估 [J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2016, 8(5): 336-340.

基于TCGA数据集分析CDCA5在肺腺癌中的临床意义与分子机制

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

[摘要] **目的** 研究细胞分裂周期相关蛋白5 (CDCA5) 在肺腺癌中的表达、临床意义和分子作用机制。**方法** 在癌症基因组图谱(TCGA)数据库中下载肺腺癌RNA测序数据和患者的临床资料,使用R 3.6.1软件提取并分析CDCA5在肺腺癌组织和正常肺组织中的表达量,探究CDCA5表达与患者临床病理特征的联系。结合患者的生存资料,利用cox回归分析CDCA5在肺腺癌患者中的预后作用。使用基因集富集分析(GSEA)探索CDCA5在肺腺癌中的分子作用机制。**结果** 在TCGA肺腺癌数据集(TCGA-LUAD)中,CDCA5在肺腺癌组织中的表达水平显著高于正常肺组织,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。高表达的CDCA5与肺腺癌患者的TNM分期($P=0.003$)和淋巴结浸润($P=0.016$)显著相关。多因素cox回归分析显示,CDCA5可以作为肺腺癌的独立预后指标($HR=1.28, 95\%CI: 1.06\sim 1.54, P=0.010$)。GSEA分析结果表明,高表达的CDCA5主要参与细胞周期、DNA复制、错配修复、同源重组、RNA降解以及P53信号通路等。**结论** CDCA5在肺腺癌组织中表达明显上调,并且与肺腺癌患者的恶性进展特征相关,CDCA5可作为预测肺腺癌预后的新型分子标志物。

[关键词] CDCA5; TCGA; 肺腺癌; 预后因子; GSEA

Analysis of clinical significance and molecular mechanism of CDCA5 in lung adenocarcinoma based on TCGA data set

WANG Ping¹, HUANG Ben², FAN Wei¹, LIU Jiacui², CHENG Qingyuan², DUAN Yiping², CHEN Liangyue², MA Tiantian², YU Mingxia^{2*}

(1. Department of Pathology, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan, Hubei, China, 430071;

2. Gene Diagnosis Center, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan, Hubei, China, 430071)

[ABSTRACT] **Objective** To analyze the expression, clinical significance and molecular mechanism of cell division cycle associated protein 5 (CDCA5) in lung adenocarcinoma. **Methods** The Cancer Genome Atlas (TCGA) database was used to download the RNA sequencing data and clinical data of lung adenocarcinoma patients. R 3.6.1 software was used to extract and analyze the expression of CDCA5 in lung adenocarcinoma tissues and normal lung tissues. The correlation between CDCA5 expression and the clinicopathological characteristics of the patients was explored. With the survival data of patients, cox regression was conducted to analyze the prognostic effect of CDCA5 in lung adenocarcinoma patients. Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) was performed to explore the molecular mechanism of CDCA5 in lung adenocarcinoma. **Results** In the TCGA lung adenocarcinoma dataset (TCGA-LUAD), the expression level of CDCA5 in lung adenocarcinoma tissue was significantly higher than that in normal lung tissue, and the

基金项目:国家自然科学基金(81472033、30901308);湖北省卫生健康科研基金资助(WJ2019M203);

武汉大学中南医院科技创新培育基金(cxy2018031)

作者单位:1. 武汉大学中南医院病理科,湖北,武汉 430071

2. 武汉大学中南医院基因诊断中心,湖北,武汉 430071

*通信作者:喻明霞, E-mail: dewrosy520@163.com

difference was statistically significant ($P < 0.05$). Highly expressed *CDCA5* was significantly related to the TNM staging ($P = 0.003$) and lymph node infiltration ($P = 0.016$) of patients with lung adenocarcinoma. Multivariate cox regression analysis showed that *CDCA5* can be used as an independent prognostic indicator of lung adenocarcinoma (HR=1.28, 95% CI: 1.06~1.54, $P = 0.010$). GSEA analysis results show that the highly expressed *CDCA5* is mainly involved in cell cycle, DNA replication, mismatch repair, homologous recombination, RNA degradation and P53 signaling pathway. **Conclusion** The expression of *CDCA5* in lung adenocarcinoma tissues is significantly up-regulated, and is related to the characteristics of malignant progression in patients with lung adenocarcinoma. *CDCA5* can be used as a new molecular marker for predicting the prognosis of lung adenocarcinoma.

[KEY WORDS] *CDCA5*; TCGA; Lung adenocarcinoma; Prognosis factor; GSEA

肺癌是常见的恶性肿瘤之一,研究表明,超过半数的肺癌患者在中晚期才被确诊^[1]。肺癌主要包括两种组织性类型:小细胞肺癌和非小细胞肺癌,其中肺腺癌是非小细胞肺癌中诊断最多的组织学亚型^[2]。尽管在研究发病机制和治疗方法方面取得了一定的进展,肺腺癌仍然是最具侵袭性和最迅速致命的类型,其5年生存率低于20%^[3]。细胞分裂周期相关5 (cell division cycle associated 5, *CDCA5*)是在细胞分裂周期中姐妹染色单体结合和分离所必需的主要调节因子^[4]。*CDCA5*保证了减数分裂细胞和有丝分裂细胞中染色体的精确分离,在DNA修复中起着重要的作用^[5]。研究发现,*CDCA5*与肿瘤的发生发展密切相关。*CDCA5*被证实实在乳腺癌、胃癌、结直肠癌等癌症中异常表达,且与癌症患者的预后相关^[6-8]。然而,关于*CDCA5*在肺腺癌中的表达、临床意义、预后以及分子机制目前尚无研究报道。因此,本研究通过数据挖掘癌症基因组图谱(the Cancer Genome Atlas, TCGA)数据库,分析*CDCA5*在肺腺癌中的表达,探究*CDCA5*在肺腺癌中的表达与患者临床病理特征的联系,结合患者的生存资料分析其预后价值,探索其在肺腺癌中的分子作用机制。

1 材料与方法

1.1 数据资料的下载与处理

在TCGA数据库(<https://portal.gdc.cancer.gov/>)上下载535例肺腺癌样本和59例正常肺组织样本RNA测序数据(HTSeq-FPKM, level 3)。使用R 3.6.1软件将基因表达数据归一化处理,再进行log2转化用于后续分析。利用R 3.6.1软件提取肺腺癌样本和正常肺组织样本中*CDCA5* mRNA的表达量用于分析比较表达水平差异。此外,在TCGA数据库中下载肺腺癌患者的临床资料,包括患者

的年龄、性别、生存时间、生存状态、T分期、N分期、M分期、stage分期。删除生存时间缺失和上述任何一项临床特征不明确的患者数据。

1.2 *CDCA5*表达与患者临床特征和预后的相关性分析

根据*CDCA5*在肺腺癌患者中表达水平的中位值,将肺腺癌患者划分为高表达组和低表达组。使用IBM SPSS Statistics 25.0统计软件分析*CDCA5*表达与患者的年龄、性别、T分期、N分期、M分期、stage分期的联系。使用GEPIA在线数据库(<http://gepia.cancer-pku.cn/>)和OncoLnc在线数据库(<http://www.oncolnc.org/>)分析*CDCA5*与患者总体生存率(overall survival, OS)的关系,使用Kaplan Meier-plotter在线数据库(<https://kmplot.com/analysis/>)分析*CDCA5*与患者总体生存率(overall survival, OS)和进展后生存率(post progression survival, PPS)的关系。根据TCGA-LUAD数据集中肺腺癌患者的生存数据,结合*CDCA5*的表达量,使用单因素和多因素cox回归分析*CDCA5*在肺腺癌患者中的预后价值。

1.3 基因富集分析

使用GSEA 4.0.2软件进行基因富集分析。以MsigDB (Molecular Signature Database)数据库中的c2.cp.kegg.v7.0.symbols.gmt数据集作为功能基因集。采用缺省加权富集统计的方法,随机组合次数设1 000次。以 $P < 0.05$ 和错误发现率(false discovery rate, FDR)小于0.05的基因集作为显著富集的基因集。

1.4 统计学分析

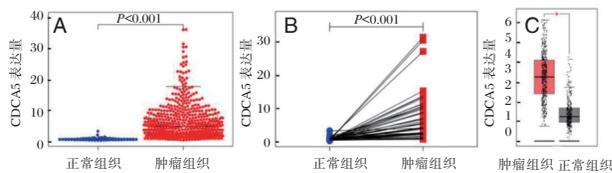
使用Mann-Whitney U检验分析*CDCA5*在肺腺癌样本和肺正常组织样本中的表达差异;使用卡方检验分析*CDCA5*表达与患者临床特征的相关性;生存分析使用log rank检验;cox比例风险回

归模型用于评价 *CDCA5* 的预后意义。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 *CDCA5* 在肺腺癌组织中表达显著上调

在 TCGA-LUAD 数据集中,肺腺癌组织的 *CDCA5* 表达水平显著高于正常组织,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$) (图 1A)。在 57 对配对的肺腺癌组织和癌旁组织中分析发现, *CDCA5* 在肺腺癌组织中显著上调,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$) (图 1B)。在 GEPIA 数据库中,共有 483 例肺腺癌组织样本、347 例正常肺组织样本,结果也显示 *CDCA5* 在肺腺癌组织中显著上调表达 ($P < 0.05$)。图 1C。



注:A 图为肺腺癌和正常肺组织中 *CDCA5* 的表达差异比较; B 图为 57 对配对的癌组织和癌旁组织中 *CDCA5* 的表达差异比较; C 图为 *CDCA5* 的表达分析。

图 1 *CDCA5* 在肺腺癌组织和正常肺组织样本中的表达差异分析

Figure 1 Differential analysis of *CDCA5* expression in lung adenocarcinoma and normal lung tissue samples

2.2 *CDCA5* 与肺腺癌患者临床病理特征的联系

相关性分析显示 *CDCA5* 在肺腺癌患者中的表达与 Stage 分期 ($P = 0.003$) 和淋巴结浸润 ($P = 0.016$) 有关。见表 1。

表 1 *CDCA5* 表达与患者临床特征的相关性分析 [$n(\%)$]

Table 1 Correlation analysis of clinical characteristics between *CDCA5* expression and patients [$n(\%)$]

变量	分类	低表达	高表达	χ^2 值	P 值
年龄(岁)	≤60	46(42.20)	63(57.80)	3.936	0.047
	>60	121(53.78)	104(46.22)		
性别	男	73(44.51)	91(55.49)	3.881	0.049
	女	94(55.29)	76(44.71)		
Stage 分期	I+II	138(54.55)	115(45.45)	8.622	0.003
	III+IV	29(35.80)	52(64.20)		
T 分期	T ₁ +T ₂	147(50.87)	142(49.13)	0.642	0.423
	T ₃ +T ₄	20(44.44)	25(55.56)		
M 分期	M ₀	160(51.12)	153(48.88)	2.490	0.115
	M ₁	7(33.33)	14(66.67)		
N 分期	N ₀ +N ₁	149(52.84)	133(47.16)	5.831	0.016
	N ₂ +N ₃	18(34.62)	34(65.38)		

2.3 *CDCA5* 高表达提示患者预后不良

在 GEPIA 数据库中, *CDCA5* 的表达水平与患者的总体生存率相关,高表达提示预后不良 ($P = 0.006$) (图 2A); OncoLnc 数据库分析结果显示 *CDCA5* 的表达也与患者的总体生存率相关 ($P = 0.003$) (图 2B); Kaplan Meier-plotter 数据库分析结果表明高表达的 *CDCA5* 与肺腺癌患者的总体生存率 ($HR = 2.04, 95\% CI: 1.72 \sim 2.42, P < 0.05$) (图 2C) 和进展后生存率 ($HR = 1.67, 95\% CI: 1.08 \sim 2.58, P = 0.020$) 正相关(图 2D)。

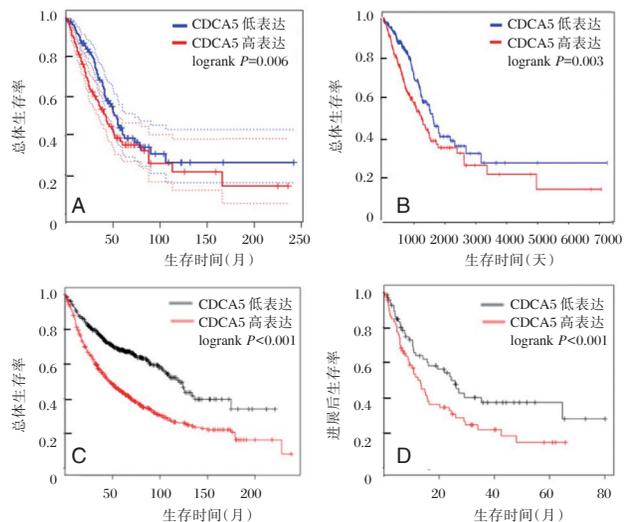


图 2 *CDCA5* 与肺腺癌患者预后的相关性分析

Figure 2 Prognosis analysis between *CDCA5* expression and lung adenocarcinoma

在 TCGA-LUAD 数据集中,单因素 cox 回归分析结果显示, Stage 分期、T 分期、N 分期和 *CDCA5* 均可以作为肺腺癌潜在的预后因素 ($P < 0.001$)。而多因素 cox 回归分析结果提示,只有 Stage 分期 ($HR = 1.90, 95\% CI: 1.18 \sim 3.04, P = 0.010$) 和 *CDCA5* 表达 ($HR = 1.28, 95\% CI: 1.06 \sim 1.54, P = 0.010$) 可以作为肺腺癌的独立预后因素。见表 2。

表 2 单因素和多因素 cox 回归分析

Table 2 Univariate and multivariate cox regression analysis

因素	单因素 cox 回归分析			多因素 cox 回归分析		
	HR 值	95%CI	P 值	HR 值	95%CI	P 值
年龄	1.00	0.98~1.02	0.990	1.01	0.99~1.03	0.270
性别	0.98	0.69~1.41	0.930	0.88	0.61~1.27	0.480
Stage 分期	1.64	1.39~1.93	<0.001	1.90	1.18~3.04	0.010
T 分期	1.59	1.28~1.97	<0.001	1.19	0.94~1.51	0.160
M 分期	1.70	0.93~3.09	0.080	0.43	0.12~1.48	0.180
N 分期	1.77	1.45~2.17	<0.001	0.96	0.64~1.44	0.850
<i>CDCA5</i>	1.38	1.16~1.65	<0.001	1.28	1.06~1.54	0.010

2.4 GSEA 富集分析结果

GSEA 分析结果显示, *CDCA5* 主要参与了 22 条信号途径 ($P < 0.05$, $FDR < 0.05$)。其中包括了细胞周期、DNA 复制、错配修复、同源重复、RNA 降解和 P53 信号通路等和致癌相关的途径。见表 3、图 4。

表 3 GSEA 富集分析结果

Table 3 Results of GSEA enrichment analysis

基因集	富集分数	标准化富集分数	P 值	FDR
细胞周期	0.740	2.470	<0.001	0.000
剪接体	0.700	2.300	<0.001	0.000
卵母细胞减数分裂	0.550	2.180	<0.001	0.001
嘧啶代谢	0.570	2.150	<0.001	0.001
乙醛酸和二羧酸代谢	0.790	2.140	<0.001	0.002
DNA 复制	0.870	2.130	<0.001	0.001
碱基切除修复	0.720	2.130	<0.001	0.001
孕酮介导的卵母细胞成熟	0.540	2.110	<0.001	0.002
错配修复	0.810	2.070	<0.001	0.003
同源重组	0.780	2.070	<0.001	0.003
核苷酸切除修复	0.660	2.060	<0.001	0.003
蛋白酶体	0.800	2.050	<0.001	0.003
叶酸—碳库	0.730	2.020	<0.001	0.004
N-聚糖生物合成	0.560	1.980	<0.001	0.007
RNA 降解	0.610	1.970	<0.001	0.007
氨酰氨的生物合成	0.660	1.960	<0.001	0.008
致病性大肠杆菌感染	0.560	1.960	<0.001	0.008
嘌呤代谢	0.440	1.940	<0.001	0.010
半胱氨酸和蛋氨酸代谢	0.570	1.930	<0.001	0.010
P53 信号通路	0.490	1.890	<0.001	0.015
基底转录因子	0.590	1.860	0.004	0.019
戊糖磷酸途径	0.610	1.830	0.006	0.026

3 讨论

细胞分裂周期相关 (cell division cycle-associated, CDCA) 蛋白家族由 8 个成员组成 (CDCA1-8)。其中 *CDCA5* 基因位于染色体 11q13.1, 它在间期细胞的细胞核中表达, 在有丝分裂中从染色质中分散, 并与内聚蛋白复合物相互作用^[4, 9-11]。在培养的细胞中, 敲除 *CDCA5* 会导致有丝分裂停滞和姐妹染色单体粘聚失败^[12]。*CDCA5* 是姐妹染色单体粘聚和分离的主要调节因子, 主要作用是稳定姐妹染色单体, 调节有丝分裂, 维持基因组的完整性和稳定性^[4]。研究表明, 细胞分裂过程中的障碍会导致癌症的发生^[13-14], 因此 *CDCA5* 在肿瘤的发生发展中的作用也受到了研究者的关注^[15-17]。然而, 目前对 *CDCA5* 在肺腺癌中的研究鲜有报道。

Phan 等研究者^[6] 通过利用生物信息学分析发现, *CDCA5* 在乳腺癌组织中异常表达, 高表达 *CDCA5* 的患者 3 年生存率低于 50%。在肝细胞癌组织中, *CDCA5* mRNA 和蛋白表达也明显均高于正常组织, 且与患者的组织学分级、肿瘤大小和 TNM 分期等显著相关^[15-18]; Kaplan-Meier 生存分析显示, *CDCA5* 表达升高的患者的总体生存率较短^[19]。机制分析表明, *CDCA5* 可以通过 AKT 通路促进肝细胞癌细胞增殖, 从而促进了肿瘤发

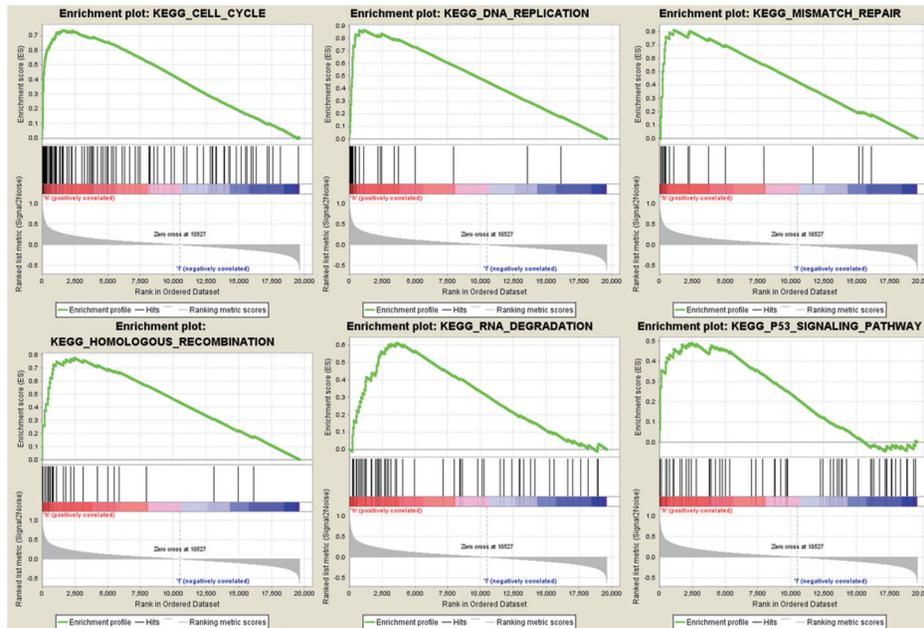


图 4 *CDCA5* 基因高表达样本相关富集基因集

Figure 4 High expression of *CDCA5* gene in samples correlated with enrichment of gene sets

生^[20]。在胃癌中, *CDCA5*可以通过影响 *Cyclin E1* 的表达而影响细胞周期, 在胃癌的进展中起到关键作用^[7]。*CDCA5*还可以通过激活 ERK 信号通路促进结直肠癌进展^[8]。高表达的 *CDCA5*也与上尿路和膀胱尿路上皮癌患者的疾病特异性生存 (disease free survival, DSS) 和无转移生存 (metastatic free survival, MeFS) 显著相关^[5]。这些研究结果都表明了 *CDCA5* 在肿瘤中扮演了重要的角色, 可作为人类肿瘤的新型分子标志物。

本研究利用 GESA 分析发现, *CDCA5* 在肺腺癌中参与多种分子途径, 因此沉默 *CDCA5* 的表达, 阻断 *CDCA5* 介导的致癌途径或许也可成为肺腺癌的治疗策略。

综上所述, *CDCA5* 在肺腺癌中异常表达上调, 并与肺腺癌患者的恶性进展相关, 高表达的 *CDCA5* 提示患者预后不良。*CDCA5* 可以作为肺腺癌的独立预后因素, 并且有望成为肺腺癌治疗的分子策略。

参考文献

- [1] 刘小云, 吴小延, 邵琼, 等. 基于分子标签二代测序技术的非小细胞肺癌驱动基因变异分析[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2019, 11(06): 468-473.
- [2] Devarakonda S, Morgensztern D, Govindan R. Genomic alterations in lung adenocarcinoma [J]. The Lancet Oncol, 2015, 16(7): e342-351.
- [3] Denisenko TV, Budkevich IN, Zhivotovsky B. Cell death-based treatment of lung adenocarcinoma [J]. Cell Death Dis, 2018, 9(2): 117.
- [4] Zhang N, Pati D. Sororin is a master regulator of sister chromatid cohesion and separation [J]. Cell Cycle (Georgetown, Tex), 2012, 11(11): 2073-2083.
- [5] Chang IW, Lin VC, He HL, et al. CDCA5 overexpression is an indicator of poor prognosis in patients with urothelial carcinomas of the upper urinary tract and urinary bladder [J]. Am J Transl Res. 2015, 7(4): 710-722.
- [6] Phan NN, Wang CY, Li KL, et al. Distinct expression of CDCA3, CDCA5, and CDCA8 leads to shorter relapse free survival in breast cancer patient [J]. Oncotarget, 2018, 9(6): 6977-6992.
- [7] Zhang Z, Shen M, Zhou G. Upregulation of CDCA5 promotes gastric cancer malignant progression via influencing cyclin E1 [J]. Biochem Biophysical Res Commun. 2018, 496(2): 482-489.
- [8] Shen A, Liu L, Chen H, Qi F, et al. Cell division cycle associated 5 promotes colorectal cancer progression by activating the ERK signaling pathway [J]. Oncogenesis, 2019, 8(3): 19.
- [9] Nishiyama T, Sykora MM, Huis in't VPJ, et al. Aurora B and Cdk1 mediate Wapl activation and release of acetylated cohesin from chromosomes by phosphorylating Sororin [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2013, 110(33): 13404-13409.
- [10] Nishiyama T, Ladurner R, Schmitz J, et al. Sororin mediates sister chromatid cohesion by antagonizing Wapl [J]. Cell, 2010, 143(5): 737-749.
- [11] Ladurner R, Kreidl E, Ivanov MP, et al. Sororin actively maintains sister chromatid cohesion [J]. EMBO J, 2016, 35(6): 635-653.
- [12] Rankin S, Ayad NG, Kirschner MW. Sororin, a substrate of the anaphase-promoting complex, is required for sister chromatid cohesion in vertebrates [J]. Mol Cell, 2005, 18(2): 185-200.
- [13] Preston-Martin S, Pike MC, Ross RK, et al. Increased cell division as a cause of human cancer [J]. Cancer Res, 1990, 50(23): 7415-7421.
- [14] Vader G, Lens SM. The Aurora kinase family in cell division and cancer [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2008, 1786(1): 60-72.
- [15] Tian Y, Wu J, Chagas C, et al. CDCA5 overexpression is an Indicator of poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma (HCC) [J]. BMC Cancer, 2018, 18(1): 1187.
- [16] Xu T, Ma M, Dai J, et al. Gene expression screening identifies CDCA5 as a potential therapeutic target in acral melanoma [J]. Human Pathol, 2018, 75: 137-145.
- [17] 顾朝辉, 于顺利, 田凤艳, 等. 细胞分裂周期相关蛋白 5 在膀胱癌组织的表达及其临床意义 [J]. 中华实验外科杂志, 2019, 9(9): 1672-1674.
- [18] 田云鸿, 杜毅超, 何云洪, 等. CDCA5 对肝癌患者预后的影响及机制研究 [J]. 西部医学, 2019, 31(7): 1014-1020.
- [19] Wang J, Xia C, Pu M, et al. Silencing of CDCA5 inhibits cancer progression and serves as a prognostic biomarker for hepatocellular carcinoma [J]. Oncol Rep, 2018, 40(4): 1875-1884.
- [20] Chen H, Chen J, Zhao L, et al. CDCA5, Transcribed by E2F1, promotes oncogenesis by enhancing cell proliferation and inhibiting apoptosis via the AKT pathway in hepatocellular carcinoma [J]. J Cancer, 2019, 10(8): 1846-1854.

miR-766-3p 调控肺癌细胞增殖、迁移、侵袭的分子机制

郭喜喜* 王振华 胡红军 张立国

[摘要] **目的** 探讨微小RNA(miR-766-3p)对肺癌细胞增殖、迁移、侵袭的影响及其作用机制。**方法** 采用qRT-PCR与免疫组化分别检测肺癌组织及癌旁组织中miR-766-3p、KIFC1的表达。体外培养肺癌细胞A549,利用脂质体试剂Lipofectamine2000将miR-766-3p mimics、si-KIFC1转染至A549细胞,MTT检测细胞活力;Transwell小室实验检测细胞迁移及侵袭能力;双荧光素酶报告实验验证miR-766-3p与KIFC1的靶向关系。**结果** miR-766-3p在肺癌组织中的表达水平显著低于癌旁正常组织,差异有统计学意义($P<0.05$),KIFC1的表达水平显著升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。miR-766-3p过表达与抑制KIFC1的表达后,细胞活力显著降低,迁移与侵袭细胞数显著减少,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** miR-766-3p可通过降低肺癌细胞中KIFC1的蛋白水平从而抑制细胞增殖、迁移及侵袭能力。

[关键词] miR-766-3p; KIFC1; 肺癌; 增殖; 迁移; 侵袭

The molecular mechanism of miR-766-3p inhibiting lung cancer cell proliferation, migration and invasion

GUO Xixi*, WANG Zhenhua, HU Hongjun, ZHANG Ligu

(Department of Thoracic Oncology, Xinxiang Central Hospital, Xinxiang, Henan, China, 453000)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the effect of microRNA (miR-766-3p) on proliferation, migration and invasion of lung cancer cells and its mechanism. **Methods** Real-time quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) and Western blot were used to detect the expression of miR-766-3p and kinesin 1 (KIFC1) in lung cancer tissues and adjacent tissues. The lung cancer cell A549 was cultured in vitro, and miR-766-3p mimics, KIFC1 small interfering RNA (si-KIFC1) and their respective negative controls were transfected into A549 cells respectively using liposome reagent Lipofectamine 2000. MTT was used to detect cells vitality. The Transwell chamber assay detects cell migration and invasion. The dual luciferase reporter assay validated the targeting relationship between miR-766-3p and KIFC1. **Results** The expression level of miR-766-3p in lung cancer tissues was significantly lower than that in adjacent normal tissues ($P<0.05$), and the expression level of KIFC1 was significantly increased ($P<0.05$). After miR-766-3p overexpression and inhibition of KIFC1 expression, compared with the negative control group, the cell viability was significantly decreased, the number of migration and invasion cells was significantly decreased ($P<0.05$). **Conclusion** miR-766-3p inhibits cell proliferation, migration and invasion by reducing the protein level of KIFC1 in lung cancer cells.

[KEY WORDS] miR-766-3p; KIFC1; Lung cancer; Proliferation; Migration; Invasion

肺癌是临床常见恶性肿瘤之一,调查研究显示,肺癌发病率与死亡率逐年上升,其中非小细胞肺癌是肺癌的主要病理类型,由于肺癌早期诊断准确率较低导致大部分患者确诊时已处于中晚

期^[1-2]。因而寻找早期诊断肺癌的分子标志物具有重要意义。miRNA在肺癌组织及细胞系中异常表达,并可影响肿瘤发生发展进程^[3-4]。miR-766-3p在肝癌、肾癌中低表达,上调miR-766-3p的表达可

基金项目:2015年国家自然科学基金项目(81503414)

作者单位:河南省新乡市中心医院胸瘤二科,河南,新乡 453000

*通信作者:郭喜喜, E-mail: guoxixi85@163.com

抑制肿瘤进展^[5-6]。TargetScan 预测显示 KIFC1 可能是 miR-766-3p 的靶基因,研究表明 KIFC1 在肺癌组织中上调表达,并可参与肺癌发生过程^[7]。但 miR-766-3p 是否可通过调控 KIFC1 的表达从而参与肺癌发生发展过程尚未可知。本研究主要通过上调 miR-766-3p 的表达分析其对肺癌细胞增殖、迁移及侵袭的影响,探究其对 KIFC1 的调控作用。

1 材料与方法

1.1 一般资料

收集 2017 年 10 月至 2018 年 10 月本院收治的 25 例肺癌患者为研究对象,所有患者均经病理证实为肺癌,其中男 15 例,女 10 例,年龄为 56~70 岁,平均年龄为 (63.38±6.15) 岁,所有患者均接受手术治疗,术前均未接受放疗或化疗,于术中切除肺癌组织及癌旁组织 (>5 cm) 标本,置于液氮中保存,术后转移至 -80℃ 超低温冰箱保存。本研究经本院伦理委员会批准,所有患者知情且签署同意书。

1.2 材料与试剂

肺癌细胞 A549 购自美国 ATCC 细胞库。miR-766-3p mimics、miR-NC、anti-miR-766-3p、anti-miR-NC、si-KIFC1、si-NC 购自广州锐博生物科技有限公司; Trizol、反转录试剂盒、SYBR Green 试剂盒购自日本 TaKaRa 公司; MTT 购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司; Transwell 小室购自美国 Corning 公司; Mgtigel 基质胶购自美国 BD 公司; 双荧光素酶报告基因载体购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 兔抗人 CyclinD1、MMP-2、P21、E-cadherin 抗体购自美国 CST 公司; 兔抗人 KIFC1 抗体购自上海允麦生物科技有限公司; HRP 标记的山羊抗兔二抗购自武汉博士德生物工程技术有限公司。

1.3 方法

1.3.1 细胞转染及实验分组

A549 细胞接种于 24 孔板,分别将 miR-NC、miR-766-3p mimics、si-NC、si-KIFC1、anti-miR-NC、anti-miR-766-3p、miR-766-3p mimics 与 pcDNA3.1、miR-766-3p mimics 与 pcDNA3.1-KIFC1 转染至 A549 细胞,分别记作 miR-NC 组、miR-766-3p 组、si-NC 组、si-KIFC1 组、anti-miR-NC 组、anti-miR-766-3p 组、miR-766-3p+pcDNA3.1 组、miR-766-3p+

pcDNA3.1-KIFC1 组。

1.3.2 qRT-PCR 检测细胞中 miR-766-3p 的表达水平

采用 Trizol 法提取肺癌组织、癌旁组织及 A549 细胞总 RNA,参照反转录试剂盒合成 cDNA,以 cDNA 为模板,参照 SYBR Green 试剂盒配置 qRT-PCR 反应体系,计算 miR-766-3p 相对表达量。

1.3.3 肺癌组织中 KIFC1 蛋白阳性表达

制备肺癌组织石蜡切片,在不同浓度乙醇中脱水后放置在柠檬酸盐溶液中 20 min, PBS 清洗后,滴加 3% 过氧化氢溶液室温下反应 25 min, PBS 清洗后,滴加山羊血清反应 15 min,加入稀释后的 KIFC1 一抗,放置 4℃ 冰箱中过夜, PBS 清洗,加入二抗辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG,室温下反应 2 h,加入 DAB 显色液进行显色反应,苏木素复染,在不同浓度的乙醇中进行脱水处理,滴加二甲苯,中性树脂进行封片,置于显微镜下进行观察。

1.3.4 MTT 检测细胞增殖

收集各组对数生长期 A549 细胞 (3×10^4 个/mL) 接种于 96 孔板 (100 μ L/孔),分别于转染 24、48、72 h 时每孔中加入 20 μ L MTT 溶液,室温孵育 4 h,弃上清,每孔加入 150 μ L DMSO,匀速振荡 10 min,应用酶标仪检测各孔光密度值 (OD 490 nm)。

1.3.5 Transwell 实验检测细胞迁移与侵袭

细胞迁移实验:取对数生长期 A549 细胞 (5×10^4 个/mL) 加入上室 (200 μ L/孔),下室加入 DMEM 培养液 (600 μ L/孔),培养 24 h,多聚甲醛固定 10 min,0.1% 结晶紫染液染色 10 min,观察迁移细胞数。细胞侵袭实验:预冷培养液稀释 Matrigel 基质胶后加入上室 (40 μ L/孔),孵育 5 h,后续步骤同细胞迁移实验。

1.3.6 双荧光素酶报告基因检测

TargetScan 预测显示 KIFC1 的 3'UTR 区存在 miR-766-3p 的结合位点,构建含有结合位点的野生型载体 WT-KIFC1,构建含有突变位点的突变型载体 MUT-KIFC1,取对数生长期 A549 细胞,WT-KIFC1、MUT-KIFC1 分别与 miR-766-3p mimics、miR-NC 共转染至 A549 细胞,参照 Lipofectamine2000 试剂说明书进行转染,根据双荧光素酶报告基因检测试剂盒检测荧光素酶活性。

1.3.7 Western blot 检测 Cyclin D1、MMP-2、P21、E-cadherin 蛋白表达

取各组 A549 细胞,加入蛋白裂解液提取细胞总蛋白,采用 BCA 法测定蛋白浓度,经 SDS-PAGE 分离蛋白(30 μg 蛋白上样量),转膜,封闭 2 h,孵育一抗稀释液(1:1 000),4℃孵育过夜,孵育二抗稀释液(1:2 000),室温孵育 1 h,显影,定影,应用 ImageJ 软件分析各条带灰度值。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 21.0 统计学软件分析数据,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示且均符合正态分布,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,两两比较采用 *LSD-t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-766-3p、KIFC1 在癌旁组织和肺癌组织中的表达

与癌旁组织相比,肺癌组织中 miR-766-3p 的表达水平[(1.05±0.10)vs(0.24±0.02)]显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),KIFC1 蛋白表达量显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 1。

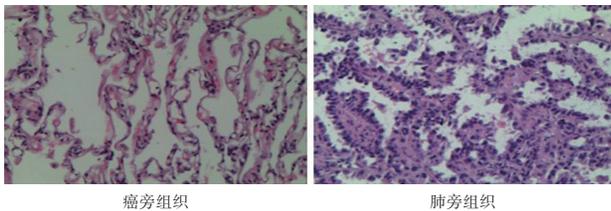


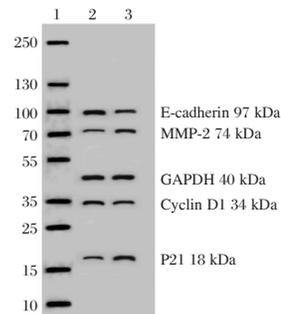
图 1 肺癌和癌旁组织的病理图(HE,×200)

Figure 1 Pathological features of lung cancer and normal tissues (HE, ×200)

2.2 过表达 miR-766-3p 对细胞 A549 增殖、迁移、侵袭的影响

与 miR-NC 组比较,miR-766-3p 组 A549 细胞活力及 Cyclin D1、MMP-2 蛋白表达量显著降

低,迁移与侵袭细胞数显著减少,差异有统计学意义($P < 0.05$),P21、E-cadherin 蛋白表达量显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 2、表 1、表 2。



注:1. Maker; 2. miR-NC; 3. miR-766-3p。

图 2 过表达 miR-766-3p 对细胞 A549 增殖、迁移、侵袭蛋白表达的影响

Figure 2 Effects of miR-766-3p overexpression on proliferation, migration and invasion protein expression of A549 cells

表 2 过表达 miR-766-3p 对细胞 A549 迁移、侵袭的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effects of overexpression of miR-766-3p on migration and invasion of A549 cells ($\bar{x} \pm s$)

分组	n	E-cadherin	MMP-2	迁移细胞数	侵袭细胞数
miR-NC	9	0.23±0.02	0.85±0.08	150±15.2	139±14.1
miR-766-3p	9	0.82±0.08 ^a	0.32±0.03 ^a	66±6.83 ^a	58±6.21 ^a
<i>t</i> 值		21.464	18.610	15.122	15.772
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000	0.000

注:与 mir-nc 组比较,^a $P < 0.05$ 。

2.3 miR-766-3p 靶向、调控 KIFC1

TargetScan 预测显示 KIFC1 的 3' UTR 含有 miR-766-3p 的互补序列,见图 3。miR-766-3p 过表达可降低 WT- KIFC1 的荧光素酶活性($P < 0.05$),而对 MUT- KIFC1 荧光素酶活性无明显影响($P > 0.05$)。miR-766-3p 过表达可降低 KIFC1 蛋白水平($P < 0.05$),抑制 miR-766-3p 表达可提高 KIFC1 蛋白水平($P < 0.05$)。

表 1 过表达 miR-766-3p 对细胞 A549 增殖的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effects of overexpression of miR-766-3p on proliferation of A549 cells ($\bar{x} \pm s$)

分组	n	miR-766-3p	Cyclin D1	P21	细胞活性(490 nm)		
					24 h	48 h	72 h
miR-NC	9	0.22±0.02	0.74±0.07	0.15±0.01	0.46±0.04	0.78±0.08	1.03±0.10
miR-766-3p	9	0.81±0.08 ^a	0.24±0.02 ^a	0.63±0.06 ^a	0.27±0.03 ^a	0.38±0.04 ^a	0.47±0.05 ^a
<i>t</i> 值		21.464	20.604	23.674	11.400	13.416	15.026
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注:与 miR-NC 组比较,^a $P < 0.05$ 。

```

WT-KIFC1 3'UTR 5' AGGGGUGGGAGGGUUGCUGGAGG 3'
                    ||| |||
miR-766-3p      3'  CGACUCCGACACCCCGACCUCA 5'
MUT-KIFC1 3'UTR 5' AGGGGUGGGAGGGUAGACCGAG 3'
    
```

图3 miR-766-3p和KIFC1的互补序列
Figure 3 miR-766-3p targets and regulated KIFC1

2.4 抑制 KIFC1 对细胞 A549 增殖、迁移、侵袭的影响

与 si-NC 组比较, si-KIFC1 组 A549 细胞活力及 Cyclin D1、MMP-2 蛋白表达量显著降低 ($P < 0.05$), 迁移与侵袭细胞数显著减少 ($P < 0.05$), P21、E-cadherin 蛋白表达量显著升高 ($P < 0.05$), 见表 3、表 4。

表 3 抑制 KIFC1 对细胞 A549 增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$)
Table 3 Effects of KIFC1 inhibition on proliferation of A549 cells ($\bar{x} \pm s$)

分组	n	KIFC1	Cyclin D1	P21	细胞活性 (490 nm)		
					24 h	48 h	72 h
si-NC	9	0.85±0.08	0.72±0.07	0.13±0.01	0.47±0.04	0.79±0.08	1.05±0.10
si-KIFC1	9	0.40±0.04 ^a	0.31±0.03 ^a	0.50±0.05 ^a	0.32±0.03 ^a	0.43±0.04 ^a	0.56±0.05 ^a
t 值		15.094	16.151	21.769	9.000	12.075	13.148
P 值		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注:与 si-NC 组比较, ^a $P < 0.05$ 。

表 4 抑制 KIFC1 对细胞 A549 迁移、侵袭的影响 ($\bar{x} \pm s$)
Table 4 Effects of KIFC1 inhibition on migration and invasion of A549 cells ($\bar{x} \pm s$)

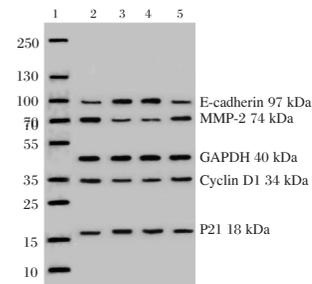
分组	n	E-cadherin	MMP-2	迁移细胞数	侵袭细胞数
siNC	9	0.22±0.02	0.84±0.08	152±15.2	142±14.1
si-KIFC1	9	0.68±0.07 ^a	0.45±0.04 ^a	76±7.63 ^a	69±7.11 ^a
t 值		18.956	13.081	13.406	13.869
P 值		0.000	0.000	0.000	0.000

2.5 过表达 KIFC1 能逆转 miR-766-3p 对细胞 A549 增殖、迁移、侵袭的抑制作用

相较于 miR-766-3p+pcDNA3.1 组, miR-766-3p+pcDNA3.1-KIFC1 组细胞活力及 Cyclin D1、MMP-2 蛋白表达量显著升高 ($P < 0.05$), 迁移与侵袭细胞数显著增加 ($P < 0.05$), P21、E-cadherin 蛋白表达量显著降低 ($P < 0.05$), 见图 4、表 5、表 6。

3 讨论

本研究结果显示肺癌组织中 miR-766-3p 的表达水平显著低于癌旁正常组织, 提示 miR-766-3p



注: 1. Maker; 2. miR-NC; 3. miR-766-3p; 4. miR-766-3p+pcDNA3.1; 5. miR-766-3p+pcDNA3.1-KIFC1。

图 4 过表达 KIFC1 能逆转 miR-766-3p 对细胞 A549 增殖、迁移、侵袭蛋白表达的作用

Figure 4 Overexpression of KIFC1 can reverse the effect of miR-766-3p on proliferation, migration and invasion protein expression of A549 cells

在肺癌发生及发展过程中可能发挥重要调控作用。研究表明 miR-766-3p 在肝细胞癌细胞中呈低表达, 并可通过靶向 Wnt3a 表达而抑制肝细胞癌进展^[8]。研究表明 miR-766-3p 低表达可能参与结肠癌发生过程^[9]。相关报道指出 miR-766-3p 表达

表 5 过表达 KIFC1 能逆转 miR-766-3p 对细胞 A549 增殖的抑制作用 ($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Overexpression of KIFC1 can reverse the inhibitory effect of miR-766-3p on A549 cell proliferation ($\bar{x} \pm s$)

分组	n	KIFC1	Cyclin D1	P21	细胞活性 (490 nm)		
					24 h	48 h	72 h
miR-NC	9	0.82±0.08	0.73±0.07	0.14±0.01	0.47±0.04	0.78±0.08	1.05±0.10
miR-766-3p	9	0.38±0.04 ^a	0.23±0.02 ^a	0.61±0.06 ^a	0.26±0.03 ^a	0.36±0.04 ^a	0.48±0.05 ^a
miR-766-3p+pcDNA3.1	9	0.36±0.04	0.24±0.02	0.62±0.06	0.28±0.03	0.35±0.04	0.47±0.05
miR-766-3p+pcDNA3.1-KIFC1	9	0.67±0.07 ^b	0.58±0.06 ^b	0.20±0.02 ^b	0.38±0.04 ^b	0.65±0.06 ^b	0.89±0.09 ^b
F 值		125.855	242.194	311.494	67.860	125.546	133.961
P 值		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注:与 miR-NC 组比较, ^a $P < 0.05$;与 miR-766-3p+pcDNA3.1 组比较, ^b $P < 0.05$ 。

表6 过表达 KIFC1 能逆转 miR-766-3p 对细胞 A549 迁移、侵袭的抑制作用 ($\bar{x} \pm s$)

Table 6 Overexpression of KIFC1 can reverse the inhibitory effect of miR-766-3p on migration and invasion of A549 cells

分组	n	E-cadherin	MMP-2	迁移细胞数	侵袭细胞数
miR-NC	9	0.21±0.02	0.84±0.08	152±15.2	139±14.1
miR-766-3p	9	0.82±0.08 ^a	0.33±0.03 ^a	65±6.83 ^a	59±6.21 ^a
miR-766-3p+pcDNA3.1	9	0.84±0.08	0.31±0.03	66±6.81	57±6.05
miR-766-3p+pcDNA3.1- KIFC1	9	0.28±0.03 ^b	0.70±0.07 ^b	121±12.3 ^b	114±11.6 ^b
F 值		293.511	194.657	139.399	147.064
P 值		0.000	0.000	0.000	0.000

注:与 miR-NC 组比较,^aP<0.05;与 miR-766-3p+pcDNA3.1 组比较,^bP<0.05。

量降低可能与非小细胞肺癌紫杉醇耐药性有关^[10]。本研究结果显示,miR-766-3p 过表达可显著降低肺癌细胞活力,减少迁移及侵袭细胞数,提示 miR-766-3p 过表达可能抑制肺癌细胞增殖、迁移及侵袭。为进一步验证 miR-766-3p 过表达对肺癌细胞增殖、迁移及侵袭的影响,本研究采用 Western blot 法检测增殖、迁移及侵袭相关蛋白表达,结果显示 miR-766-3p 过表达可明显抑制 Cyclin D1 的表达,并可促进 P21 的表达。同时研究表明 E-cadherin 表达水平降低可促进上皮-间质转化(EMT)进而促进肿瘤细胞迁移及侵袭^[11]。下调 MMP-2 的表达可抑制肺癌细胞迁移及侵袭能力^[12]。本研究结果显示,miR-766-3p 过表达可促进 E-cadherin 的表达,而抑制 MMP-2 的表达,提示 miR-766-3p 过表达能够抑制肺癌细胞增殖、迁移及侵袭。本研究从体外细胞实验证实 miR-766-3p 过表达可减弱肺癌细胞增殖、迁移及侵袭能力。

为进一步探究 miR-766-3p 调控肺癌细胞生物学行为的分子机制,本研究通过双荧光素酶报告实验证实 KIFC1 是 miR-766-3p 的靶基因。研究表明 KIFC1 可通过调节 HMGA1 的表达从而促进肝细胞癌发生发展^[13]。研究表明驱动蛋白 KIFC1 可通过激活 Akt/GSK3β 信号传导及促进 EMT 转化从而促进膀胱癌细胞增殖及转移^[14]。相关报道指出 miR-135a 可通过靶向抑制 KIFC1 的表达从而抑制胃癌发生发展^[15]。本研究结果显示,肺癌组织中 KIFC1 的表达水平升高,提示 KIFC1 在肺癌发生及发展过程中可能发挥癌基因作用。本研究进一步分析显示,抑制 KIFC1 的表达可明显降低肺癌细胞活力,并可减少肺癌细胞迁移及侵袭细胞数,提示抑制 KIFC1 的表达可减弱肺癌细胞增殖、迁移及侵袭能力。同时,本

研究将 miR-766-3p 过表达与 KIFC1 过表达共同处理肺癌细胞,结果显示,肺癌细胞活力明显增强,迁移及侵袭细胞数目明显增多,并可促进 Cyclin D1、MMP-2 的表达,而抑制 P21、E-cadherin 的表达,提示 KIFC1 过表达能逆转 miR-766-3p 过表达对肺癌细胞增殖、迁移、侵袭的抑制作用。本研究从体外细胞实验证实 miR-766-3p 过表达可通过抑制 KIFC1 的表达从而降低肺癌细胞增殖、迁移及侵袭能力。

综上所述,miR-766-3p 可抑制肺癌细胞增殖、迁移及侵袭,其主要通过负向调控靶基因 KIFC1 的表达而发挥作用,可为肺癌的基因治疗提供潜在靶点。

参考文献

- [1] 郑秋青,毛伟敏,谢发君. EML4-ALK 融合基因-非小细胞肺癌治疗的新靶点[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2015, 7(1): 50-54.
- [2] 梁委军,覃世逆,袁天柱,等. 蛋白质组学在肺癌相关标志物挖掘中的应用[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2017, 9(4): 289-292.
- [3] 张增强,叶永康,李牧,等. 微小 RNA-224 对前列腺癌细胞生物学行为的影响[J]. 中华生物医学工程杂志, 2016, 20(1): 7-11.
- [4] 唐夏莉,焦德敏,陈君,等. miRNA-126 对肺癌 A549 细胞的增殖、迁移、侵袭及 EGFR/AKT/mTOR 信号通路的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2016, 32(3): 458-463.
- [5] Liu L, Qi X, Gui Y, et al. Overexpression of circ_0021093 circular RNA forecasts an unfavorable prognosis and facilitates cell progression by targeting the miR-766-3p/MTA3 pathway in hepatocellular carcinoma [J]. Gene, 2019, 714(5): 143992-144004.
- [6] Chen C, Xue S, Zhang J, et al. DNA-methylation-mediated repression of miR-766-3p promotes cell proliferation via targeting SF2 expression in renal cell carcinoma [J]. Int J Cancer, 2017, 141(9): 1867-1878. (下转第 1630 页)

肠道菌群紊乱在大鼠非酒精性脂肪肝中的作用机制

耿妍¹ 鲁晓岚^{2*} 耿燕³ 史海涛²

[摘要] 目的 探讨肠道菌群紊乱在大鼠非酒精性脂肪肝(NAFLD)中的作用机制。方法 将30只大鼠随机分为2组:对照组(NC组)(普通饲料, $n=6$)、模型组(高脂饲料, $n=24$)。模型组经高脂饮食喂养至12周,取肝脏组织,根据肝脏病理分为单纯性肥胖组(SO组)($n=12$)与NAFLD组($n=12$)。取大鼠血清,生化仪测定谷丙转氨酶(ALT)、血清谷草转氨酶(AST)、甘油三酯(TC)、胆固醇(TG);采用动态比浊法测定血清内毒素(ET)水平;收集肠道粪便采用RT-PCR分析肠道菌群改变;取肝脏及末端回肠行苏木精伊红(HE)染色观察组织病理。结果 SO组及NAFLD组大肠杆菌属计数、TC、TG、ET均显著高于NC组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。SO组乳酸杆菌、双歧杆菌属计数均显著低于NC组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。NAFLD组大肠杆菌属计数、ET均显著高于SO组,双歧杆菌属计数显著低于SO组,差异均具有统计学意义($P<0.05$)。大肠杆菌属与ET、肝脏脂肪变性程度均呈正相关($P<0.05$),乳酸杆菌属、双歧杆菌属数量与ET、肝脏脂肪变程度均呈负相关($P<0.05$)。结论 单纯性肥胖时肠道菌群紊乱、肠道屏障的损伤可能是促使内毒素升高、进展为NAFLD的始动因素。

[关键词] 肠道菌群; 内毒素; 非酒精性脂肪肝; 单纯性肥胖

Mechanism of intestinal flora disturbance in nonalcoholic fatty liver disease in rats

GENG yan¹, LU Xiaolan^{2*}, GENG yan³, SHI Haitao²

(1. Department of Pediatrics, the Second Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shanxi, China, 710000; 2. Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shanxi, China, 710000; 3. Clinical Laboratory, the Second Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shanxi, China, 710000)

[ABSTRACT] Objective To explore the promotion of intestinal endotoxemia induced by intestinal flora disturbance on the conversion of simple obesity into NAFLD. Methods Thirty rats were randomly divided into 2 groups, the control group (normal diet, $n=6$), and the model group (high fat diet $n=24$). After model establishment by high-fat diet, the model group was divided into simple obesity group ($n=12$) and NAFLD ($n=12$) group according to liver pathology. The rat serum was taken, ALT, AST, TG and TC were measured by biochemical analyzer. The serum endotoxin level was determined by kinetic turbidimetric method. Intestinal flora changes were analyzed by RT-PCR. Liver and terminal ileum were taken for HE staining to observe histopathology. Results Compared with the normal control group, Escherichia coli, TC, TG and ET in the simple obesity group and the NAFLD group were significantly increased, with statistically significant differences ($P<0.05$), and the number of Lactobacillus and Bifidobacterium were significantly decreased, with statistically significant differences ($P<0.05$), the counts of bifidobacteria was significantly lower than that in

基金项目:陕西省科技攻关科研基金 [2007-k14-02(15)]

作者单位:1. 西安交通大学第二附属医院小儿内科,陕西,西安 710000

2. 西安交通大学第二附属医院消化内科,陕西,西安 710000

3. 西安交通大学第二附属医院检验科,陕西,西安 710000

*通信作者:鲁晓岚, E-mail: xiaolan_lu@163.com

simple obesity group, with statistically significant differences ($P<0.05$), Escherichia coli was positively correlated with ET and liver steatosis ($P<0.05$), and the number of lactobacillus and bifidobacterium were negatively correlated with ET and liver steatosis ($P<0.05$). **Conclusion** The disturbance of intestinal flora and the damage of intestinal barrier in the simple obesity may be the initiating factors which promoting the rise of endotoxin and progress to NAFLD.

[KEY WORDS] Intestinal flora; Endotoxin; NAFLD; Simple obesity

非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)是指除酒精和其他明确肝损伤因素外所致的,以弥漫性肝细胞大泡性脂肪变为主要特征的临床病理综合征^[1]。随着“全球肥胖”的流行,NAFLD在中国及欧美发达国家的患病率逐年升高,该病目前已被公认为是成人及儿童慢性肝脏疾病的首要病因^[2]。NAFLD作为一种复杂的疾病,病理生理机制尚未完全阐明,其发生发展的主要危险因素包括肥胖、胰岛素抵抗、2型糖尿病、高脂血症等^[3]。因此,探究单纯性肥胖引起NAFLD的发病机制,对于了解从单纯性肥胖(Simple Obesity, SO)进展为NAFLD这一过程至关重要。近年来,多项研究发现肠道菌群作为一个新的环境因素在肥胖和NAFLD的发生中发挥重要作用^[4-5]。目前肠道菌群在肥胖转化为NAFLD的作用及机制研究较少,本研究将探讨肠道菌群在肥胖及NAFLD的作用,以期对肥胖及NAFLD的防治提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

SD 雄性大鼠[动物合格证号: skkk (shaan) 2018-001]购自西安交通大学医学院动物实验中心。内毒素检测试剂盒购自北京金山川科技发展有限公司。粪便总DNA提取试剂盒购自北京艾德莱试剂有限公司。实时定量PCR反应试剂盒购自日本 TaKaRa 公司。ELISA 试剂盒购自上海源叶生物科技有限公司。全自动生化分析仪购自日本 OLYMPUS 公司。

1.2 实验动物

8周龄雄性SD大鼠30只(SPF级),平均体重160g左右,分笼饲养于西安交通大学医学院动物实验中心(动物实验条件符合二级标准)。高脂饲料配方:10%猪油、2%胆固醇、5%蔗糖、0.5%猪胆盐、82.5%基础饲料;普通饲料购自西安交通大学医学院动物实验中心。

1.3 实验方法

1.3.1 实验分组

将30只大鼠随机分为对照组(NC组)(普通饲料, $n=6$)、模型组(高脂饲料, $n=24$)。分别给予普通饲料及高脂饲料喂养8周。于8周末处死所有大鼠,行肝脏苏木精伊红(Hematoxylin and Eosin, HE)染色,光镜下观察筛选模型组中发生脂肪变的为NAFLD组($n=12$),未发生脂肪变的为SO组($n=12$)。

1.3.2 血清生化指标检测

全自动生化分析仪检测血清:胆固醇(Total cholesterol, TC)、甘油三酯(Triglyceride, TG)、谷丙转氨酶(Alanine transaminase, ALT)、谷草转氨酶(Aspartate Aminotransferase, AST)。

1.3.3 动态比浊法测定血清内毒素

按照内毒素检测试剂盒的说明书操作。

1.3.4 肝脏组织及回肠粘膜HE染色

分别取各组大鼠肝脏及回肠组织(距回盲瓣7~17cm),置于4%的多聚甲醛溶液中,常规制成石蜡切片,行HE染色。

1.3.5 肠道粪便中乳酸杆菌属、大肠杆菌属、双歧杆菌属的测定

严格按照北京艾德莱试剂粪便总DNA提取试剂盒及日本 TaKaRa 公司荧光实时PCR反应试剂盒操作。以DNA为模板,PCR扩增大肠杆菌属,乳酸杆菌属,双歧杆菌属,标准品为内参。引物见表1^[6]。

表1 相关引物信息

Table 1 Related primer information

基因	引物序列(5'-3')
大肠杆菌属	F: CATTGACGTTACCCGCAAGAAGC R: CTCTACGAGACTCAAGCTTGC
乳酸杆菌属	F: GGAAACAGATGCTAATACCG R: CACCGCTACACATGGAG
双歧杆菌属	F: CTCCTGGAAACGGGTGG R: GGTGTTCTCCCGATATCTACA

1.4 统计学方法

采用SPSS 22.0软件进行数据分析。计量资料

以($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,差异有统计学意义者两组间比较采用LDL-*t*检验。粪便细菌定量结果数据以log¹⁰表示。采用Pearson相关分析和Spearman秩相关分析自变量和因变量之间的相关性。以*P*<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠一般状况、体重及饮食变化

实验过程中,各组大鼠均无死亡。喂养至第8周时,NC组大鼠皮毛光泽,反应灵敏。SO组及NAFLD组大鼠皮毛暗淡无光泽,活动减少,精神

萎靡,进食量较多。喂养至第4、8周时模型组大鼠体重明显高于NC组大鼠,差异具有统计学意义(*P*<0.05),而SO组与NAFLD组体重比较差异无统计学意义(*P*>0.05)。见表2。

2.2 肝脏病理变化

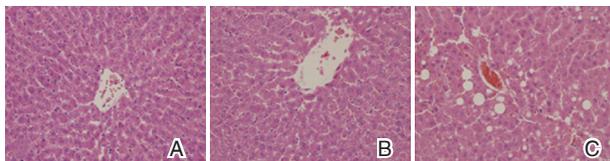
光镜下可见NC组大鼠肝细胞呈条索状排列,围绕中央静脉呈放射状,核圆、大、居中。SO组大鼠肝细胞排列整齐,无脂滴及炎症细胞浸润。NAFLD组大鼠肝细胞排列整齐,可见散在小泡性脂滴浸润,无明显炎症细胞及坏死。见图1。

表2 各组大鼠体重变化($\bar{x} \pm s, g$)

Table 2 Weight change in each group ($\bar{x} \pm s, g$)

分组	0 w 体重	2 w 体重	4 w 体重	8 w 体重
NC组	241.75±11.56	345.25±12.84	392.25±16.93	451.75±13.25
SO组	246.90±12.30	387.95±22.32	454.95±24.84 ^a	508.77±26.29 ^a
NAFLD组	245.51±13.54	397.83±16.92	463.21±11.85 ^a	514.75±16.23 ^a
<i>F</i> 值	44.352	46.368	48.305	50.023
<i>P</i> 值	0.912	0.819	0.033	0.025

注:与NC组比较,^a*P*<0.05。



注:A:NC组;B:SO组;C:NAFLD组。

图1 各组大鼠肝脏病理改变(HE,×400)

Figure 1 Pathological changes of liver of rats in each group (HE,×400)

2.3 各组大鼠血清转氨酶、内毒素、血脂比较

SO组及NAFLD组大鼠血清ET、TG水平显著高于NC组,差异具有统计学意义(*P*<0.05)。SO组TC水平显著高于NC组,差异具有统计学意义(*P*<0.05)。NAFLD组ET水平显著高于SO组,差异具有统计学意义(*P*<0.05)。3组间ALT、AST水平比较差异无统计学意义(*P*>0.05)。NAFLD组与余两组TC水平比较差异无统计学意义(*P*>

0.05),NAFLD与SO组TG水平比较差异无统计学意义(*P*>0.05)。见表3。

2.4 各组大鼠肠道菌群的变化

模型组肠道粪便大肠杆菌属数量显著高于NC组,差异具有统计学意义(*P*<0.05)。NAFLD组大肠杆菌属数量显著高于SO组,差异具有统计学意义(*P*<0.05)。模型组双歧杆菌属、乳酸杆菌属数量显著低于NC组,差异具有统计学意义(*P*<0.05)。NAFLD组双歧杆菌属数量显著低于SO组,差异具有统计学意义(*P*<0.05)。SO组与NAFLD组乳酸杆菌数量相比较差异无统计学意义(*P*>0.05)。见表4。

2.5 肠道病理改变

光镜下可见NC组小肠粘膜表面微绒毛排列整齐,结构清晰。SO组小肠上皮细胞肿胀,细胞游离面微绒毛短小,排列紊乱,黏膜层可见少许炎性细

表3 三组大鼠血清转氨酶、内毒素、血脂的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of serum transaminase and endotoxin of 3 group ($\bar{x} \pm s$)

分组	ALT(IU/L)	AST(IU/L)	ET(pg/mL)	TC	TG
NC组	48.50±12.39	146.67±16.77	4.21±1.80	1.44±0.45	1.14±0.54
SO组	48.33±13.45	154.67±12.37	10.95±4.79 ^a	2.07±0.48 ^a	2.04±0.33 ^a
NAFLD	50.58±12.63	156.75±13.19	15.43±4.64 ^{ab}	1.85±0.44	2.34±0.49 ^a
<i>F</i> 值	1.012	0.534	26.321	0.931	1.021
<i>P</i> 值	1.351	1.026	0.001	0.005	0.002

注:与NC组比较,^a*P*<0.05,与SO组比较,^b*P*<0.05。

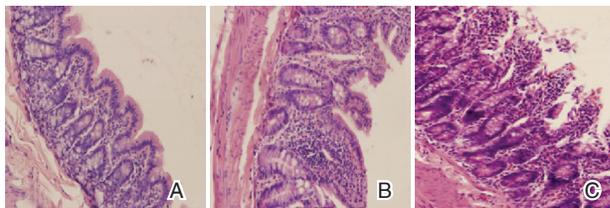
表4 各组大鼠肠道菌群结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 The results of intestinal flora in rats were compared ($\bar{x} \pm s$)

分组	大肠杆菌属	双歧杆菌属	乳酸杆菌属
NC组	8.41±0.96	9.23±0.65	8.38±0.72
SO组	8.99±0.49 ^a	8.65±0.33 ^a	7.76±0.47 ^a
NAFLD组	9.54±0.69 ^{ab}	8.36±0.57 ^{ab}	7.33±0.49 ^a
F值	15.362	19.821	18.365
P值	0.000	0.000	0.021

注:与NC组比较,^a $P < 0.05$,与SO组比较,^b $P < 0.05$ 。

胞浸润,伴灶性糜烂。NAFLD组小肠粘膜上皮细胞肿胀,结构明显紊乱,细胞游离面微绒毛短小,黏膜层可见大量炎性细胞浸润,伴灶性糜烂。见图2。



注:A:NC组;B:SO组;C:NAFLD组。

图2 各组大鼠小肠粘膜病理改变 (HE, ×400)

Figure 2 Pathological changes of small intestinal mucosa of rats in each group (HE, ×400)

2.6 肠道菌群与内毒素、转氨酶的相关性分析

Pearson 相关分析及 Spearman 秩相关分析表明,大肠杆菌与 ET、肝脏脂肪变程度均呈正相关 ($P < 0.05$),乳酸杆菌、双歧杆菌与 ET、肝脏脂肪变均呈负相关 ($P < 0.05$)。见表5。

3 讨论

肥胖是导致 NAFLD 的重要危险因素,有研究表明在重度肥胖人群中 NAFLD 的发病率可达 90%^[7]。从肥胖到 NAFLD 的发生发展有多种机制参与,其中肠道菌群的构成紊乱可能是重要的组成部分。本研究通过高脂饮食的饲养诱导大鼠肥胖模型,观察到高脂饮食可以诱发大鼠肠道菌群紊乱以及 NAFLD 的出现。

陈杏云等^[8]通过高脂饲料喂养小鼠 8 周后,发现小鼠肠道菌群结构发生了明显变化,这与本研究结果一致。分析高脂饮食对于肠道菌群构成影响的机制,已有的研究表明,高脂饲料可以使肠道中作为菌群养料来源的碳水化合物的生成减少,同时高脂饮食代谢的部分产物可以破坏肠道菌群所在的微环境,从而影响肠道菌群的组成平衡,导致机体肠道菌群的紊乱^[9]。

肠道菌群可以通过多种机制影响肥胖。首先,肠道菌群可以影响机体的能量平衡。Bäckhed 等^[10]的研究发现肥胖小鼠的肠道菌群酵解碳水化合物的能力增强,因此为宿主提供的能量增多,促进肥胖。其次,肠道菌群失调可破坏肠道上皮屏障,增加肠道的通透性,使得血清内毒素含量增多,这种肠源性内毒素水平的升高可以导致慢性炎症的形成,进而导致肥胖^[11]。

肠道菌群紊乱既可以通过促进肥胖间接地影响 NAFLD,也可以通过多种通路直接促进 NAFLD。例如,针对 NAFLD 的研究表明肠道菌群通过改变肠道对胆碱和胆汁酸的代谢,产生丙酸、丁酸等短链脂肪酸及禁食诱导脂肪因子等,从而影响 NAFLD 的发病^[12]。另一方面,前述的血清内毒素可经由门静脉进入肝脏,诱导肝细胞产生肿瘤坏死因子、白细胞介素-1、白细胞介素-6 等炎性细胞因子,促进 NAFLD 的发病^[13-14]。本研究发现 NC 组到 SO 组,再到 NAFLD 组,大肠杆菌属计数显著增加,而优势菌显著减少,肠道粘膜结构由轻到重均有破坏,肠源性内毒素水平逐渐增高,这与之前研究是一致的^[15]。行相关性检验发现,大鼠肠道菌群失调与内毒素及脂肪肝病程度呈正相关。研究结果提示肠道菌群紊乱在脂肪蓄积及从 SO 向 NAFLD 进展过程中均发挥重要作用。

从治疗的角度来说,有研究显示双歧杆菌可改善肠道屏障功能并降低血清内毒素水平,从而减缓 NAFLD 的进展^[16]。另外,对肥胖患者采取饮食干预能够使产生内毒素的肠道菌种类比例明显下降^[17]。

表5 肠道菌群与内毒素、肝脂肪变程度的相关性分析

Table 5 Correlation analysis of intestinal flora with endotoxin and liver fat change

参数	大肠杆菌属 /内毒素	大肠杆菌属 /肝脂肪变程度	乳酸杆菌属 /内毒素	乳酸杆菌属 /肝脂肪变程度	双歧杆菌属 /内毒素	双歧杆菌属 /脂肪变程度
r 值	0.600	0.410	-0.461	-0.420	-0.562	-0.560
P 值	0.000	0.021	0.010	0.020	0.000	0.000

综上所述,肠道菌群可通过多种途径和机制影响 NAFLD 的发病。通过优化肠道菌群构成,针对 NAFLD 的靶向治疗在动物模型中获得一定疗效,但迄今为止相关的临床研究不足。随着现代生物技术的进步,调节肠道菌群或可成为治疗 NAFLD 的新方式。

参考文献

- [1] Rinella M, Charlton M. The globalization of nonalcoholic fatty liver disease: prevalence and impact on world health[J]. *Hepatology*, 2016, 64(1):19-22.
- [2] 涂宏飞, 费素娟. 肠道微生态与非酒精性脂肪性肝病[J]. *肝脏*, 2018, 23(4):347-349.
- [3] Hu HM, Lin AZ, Kong MW, et al. Intestinal microbiome and NAFLD: molecular insights and therapeutic perspectives [J]. *Gastroenterol*, 2020, 55(2):142-158.
- [4] Gérard P. Gut microbiota and obesity [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2016, 73(1):147-162.
- [5] Marica M, Miriam L, Paola D, et al. The Role of Probiotics in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A New Insight into Therapeutic Strategies[J]. *Nutrients*, 2019, 11(11):2642.
- [6] Matsuki T, Watanabe K, Fujimoto J, et al. Use of 16S rRNA gene-targeted group-specific primers for real-time PCR analysis of predominant bacteria in human feces[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70:7220-7228.
- [7] Fazel Y, Koenig AB, Sayiner M, et al. Epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease[J]. *Metabolism*, 2016, 65:1017-1025.
- [8] 陈杏云, 曾本华, 胡新中. 高脂饮食对菌群人源化小鼠肠道菌群结构的影响[J]. *食品科学*, 2013, 34(17):278-282.
- [9] Jacques D, Jean-P. Nonalcoholic fatty liver disease: Roles of the gut and the liver and metabolic modulation by some dietary factors and especially long-chain n-3 PUFA[J]. *Mol Nutr Food Res*, 2016, 60:147-159.
- [10] Bäckhed F, Ding H, Wang T, et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(44):15718-15723.
- [11] Cani PD, Amar J, Iglesias MA, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance [J]. *Diabetes*, 2007, 56(7):1761-1772.
- [12] Schoeler M, Caesar R. Dietary lipids gut microbiota and lipid metabolism [J]. *Rev Endocr Metab Disord*, 2019, 20(4):461-472.
- [13] 唐立. 中国肠道微生态研究的实践[J]. *胃肠病学和肝病学杂志*, 2019, 28(3):241-244.
- [14] Valerio N, Lorenza P, Antonella M, et al. Bifidobacteria and lactobacilli in the gut microbiome of children with non-alcoholic fatty liver disease: which strains act as health players? [J]. *Arch Med Sci*, 2018, 14(1):81-87.
- [15] 张黎雯, 任明星, 薛国昌, 等. 肠道菌群失调对肥胖儿童非酒精性脂肪肝发生的影响[J]. *肝脏*, 2020, 25(7):755-758.
- [16] Liang YJ, Lin CL, Zhang YP, et al. Probiotic mixture of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* alleviates systemic adiposity and inflammation in non-alcoholic fatty liver disease rats through Gpr109a and the commensal metabolite butyrate [J]. *Inflammopharmacology*, 2018, 26(4):1051-1055.
- [17] Fei N, Zhao L. An opportunistic pathogen isolated from the gut of an obese human causes obesity in germfree mice [J]. *ISME J*, 2013, 7(4):880-884.
- [7] Liu Y, Zhan P, Zhou Z, et al. The overexpression of KIFC1 was associated with the proliferation and prognosis of non-small cell lung cancer[J]. *J Thorac Dis*, 2016, 8(10):2911-2923.
- [8] You Y, Que K, Zhou Y, et al. MicroRNA-766-3p Inhibits Tumour Progression by Targeting Wnt3a in Hepatocellular Carcinoma[J]. *Mol Cells*, 2018, 41(9):830-841.
- [9] Yan W, Yang W, Liu Z, et al. Characterization of microRNA expression in primary human colon adenocarcinoma cells (SW480) and their lymph node metastatic derivatives (SW620)[J]. *Onco Targets Ther*, 2018, 11(1):4701-4709.
- [10] Cai Y, Jia R, Xiong H, et al. Integrative gene expression profiling reveals that dysregulated triple microRNAs confer paclitaxel resistance in non-small cell lung cancer via co-targeting MAPT[J]. *Cancer Manag Res*, 2019, 11(2):7391-7404.
- [11] 王向辉, 黄江平, 崔丰和, 等. 微小RNA-138-5p 抑制肺癌细胞增殖、迁移和侵袭能力的机制研究[J]. *中国病理生理杂志*, 2017, 33(9):1631-1636.
- [12] 郭天利, 李宏健, 庞慧, 等. 三氧化二砷联合白藜芦醇对肺癌细胞侵袭、迁移的影响及机制[J]. *中国老年学杂志*, 2018, 38(12):161-163.
- [13] Teng K, Wei S, Zhang C, et al. KIFC1 is activated by TCF4 and promotes hepatocellular carcinoma pathogenesis by regulating HMGA1 transcriptional activity [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1):329-339.
- [14] Xiao KH, Teng K, Ye YL, et al. Kinesin family member C1 accelerates bladder cancer cell proliferation and induces epithelial-mesenchymal transition via Akt/GSK3 β signaling [J]. *Cancer Sci*, 2019, 110(9):2822-2833.
- [15] Zhang C, Chen X, Chen X, et al. miR-135a acts as a tumor suppressor in gastric cancer in part by targeting KIFC1 [J]. *Onco Targets Ther*, 2016, 9(1):3555-63.

(上接第 1625 页)

Xpert MTB/RIF 检测结核分枝杆菌和利福平耐药的临床应用

张建平¹ 李红燕^{2*} 王大望³ 刘莎莉¹ 马艳侠^{4*}

【摘要】目的 分析 Xpert MTB/RIF 方法检测结核分枝杆菌和利福平耐药的临床应用。方法 收集 2018 年 1 月至 2018 年 9 月在本院传染病院住院的临床诊断肺结核病患者 116 例,痰标本分别采用直接涂片抗酸染色(Z-N 法)、结核杆菌 MGIT 液体培养、Xpert MTB/RIF 方法进行检测。比较三种方法的阳性率,其灵敏度、特异度、阳性预测值、阴性预测值、Youden 指数;对 75 例 Xpert MTB/RIF *rpoB* 基因进行基因突变检测分析。**结果** Z-N 法阳性率 15.5%、液体培养阳性率 62.1%、Xpert MTB 阳性率 64.7%,三种检测方法阳性率比较,差异有统计学意义($\chi^2=74.360, P<0.05$);以临床确诊为诊断标准,Xpert 法灵敏度 90.3%,特异度 77.3%,阳性预测值 86.7%,阴性预测值 82.9%,Youden 指数 0.676,符合率 85.3%;Xpert MTB 与 Z-N 法结果差异有统计学意义($\chi^2=57.000, P<0.05$)。Xpert 法同 Z-N 法的阳性符合率 100%,阴性符合率 41.8%,总符合率 50.9%;Xpert MTB/RIF *rpoB* 基因突变检测结果与 MGIT 利福平药敏试验表型结果符合率 88.0% (66/75)。**结论** Xpert MTB/RIF 能同时检测出结核分枝杆菌及是否对利福平耐药,对肺结核及肺外结核病的早期诊断具有重要意义,是痰涂片镜检及培养检查方法的有效补充。

【关键词】 Xpert MTB/RIF 检测;结核分枝杆菌;利福平;耐药

Clinical application of Xpert MTB/RIF in detecting *Mycobacterium tuberculosis* and rifampicin resistance

ZHANG Jianping¹, LI Hongyan^{2*}, WANG Dawang³, LIU Shali¹, MA Yanxia^{4*}

(1. Department of Clinical Laboratory, the Eastern Suburb Branch of Xianyang Central Hospital, Xianyang, Shanxi, China, 712000; 2. Department of Clinical Laboratory, Baoji Center for Disease Control and Prevention, Baoji, Shanxi, China, 721006; 3. Academy of Medical Technology of Shanxi University of Chinese Medicine, Xianyang, Shanxi, China, 712000; 4. Department of Clinical Laboratory, the Affiliated Hospital of Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Xianyang, Shanxi, China, 712000)

【ABSTRACT】 Objective To analyze the clinical application of Xpert MTB/RIF method to detect *Mycobacterium tuberculosis* and rifampicin resistance. **Methods** A total of 116 patients with clinically diagnosed pulmonary tuberculosis who were hospitalized in the Infectious Department of Xianyang Central Hospital from January 2018 to September 2018. Sputum samples were detected by direct smear acid-fast staining (Z-N method), *Mycobacterium tuberculosis* MGIT liquid culture and Xpert MTB/RIF methods. The positive rate of the three methods, their sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value, Youden index. The mutation of Xpert MTB/RIF *rpoB* gene was detected in 75 cases. **Result** The positive rates of Z-N, liquid

作者单位:1. 陕西省咸阳市中心医院东部分院医学检验科,陕西,咸阳 712000

2. 陕西省宝鸡市疾病预防控制中心检验科,陕西,宝鸡 721006

3. 陕西中医药大学医学技术学院,陕西,咸阳 712000

4. 陕西中医药大学附属医院检验科,陕西,咸阳 712000

*通信作者:马艳侠, E-mail:zhmzhch81763@163.com; 李红燕, E-mail:435628624@qq.com

注:张建平与李红燕为共同第一作者。

culture and Xpert MTB were 15.5%, 62.1% and 64.7%, respectively. The difference among the three methods was statistically significant ($\chi^2=74.360$, $P<0.05$). Taking clinical diagnosis as the criteria, the sensitivity of Xpert method was 90.3%, the specificity was 77.3%, the positive predictive value was 86.7%, the negative value was 82.9%, the Youden index was 0.676, and the coincidence rate was 85.3%. The results between Xpert MTB and Z-N method is statistically significant ($\chi^2=57.000$, $P<0.05$). The positive coincidence rate of Xpert and Z-N method was 100%, the negative coincidence rate was 41.8%, the total coincidence rate was 50.9%. The coincidence rate between the results of Xpert MTB/RIF *rpoB* gene mutation and the phenotype of MGIT rifampin susceptibility test was 88.0% (66/75). **Conclusion** Xpert MTB/RIF can simultaneously detect *Mycobacterium tuberculosis* and whether it is resistant to rifampicin. It is of great significance for the early diagnosis of tuberculosis and extrapulmonary tuberculosis, and it is a powerful supplement to sputum smear microscopy and culture examination methods.

[KEY WORD] Xpert MTB/RIF; *Mycobacterium tuberculosis*; Rifampin; Drug resistance

结核分枝杆菌复合群 (*M.tuberculosis* complex, MTB) 共包括人型、牛型、非洲型和田鼠型, 对大多数抗结核药物的自然耐受性相近, 临床上结核病的病原菌多为人型结核分枝杆菌和牛分枝杆菌。结核病是一种严重危害人民健康的慢性传染病, 我国是结核病高负荷国家, 耐药情况严重, 在结核病防控工作中结核菌检查对于发现传染源、确定诊断和化疗方案、考核疗效、评价防治效果具有重要意义^[1]。结核菌的实验室检验技术涵盖病原学检测、免疫学检测、分子生物学检测及生物化学检测。包括痰涂片镜检、结核分枝杆菌培养、结核抗体、 γ -干扰素释放试验/T-Spot, 分枝杆菌核酸检测 (TB-NTM-PCR) 等^[2]。痰涂片镜检阳性率低, 传统的罗氏培养法及药敏试验检出结果时间长, 不能满足临床需要, 而肺外标本采用传统方法诊断较为困难, 涂阴培阴的结核患者占 73.6%, 因此迫切需要能快速、准确检测结核分枝杆菌及其耐药性的诊断技术。近年来随着分子生物学技术的发展, 分枝杆菌核酸 PCR、实时荧光 RNA 恒温扩增检测 (SAT)、Xpert 结核分枝杆菌/利福平快速分子鉴定 (*Mycobacterium tuberculosis/Rifampicin*, MTB/RIF)、线性探针、基因芯片等新的检验方法也不断应用于临床^[3]。本研究对肺结核患者的痰标本分别采用直接涂片抗酸染色 (Z-N 法)、结核杆菌 MGIT 液体培养、Xpert MTB/RIF 方法进行检测, 现分析报告如下。

1 对象与方法

1.1 研究对象

选取 2018 年 1 月至 2018 年 9 月在本院传染病院住院的确诊肺结核病患者 116 例, 纳入标准: 参照 WS 288-2017 肺结核诊断标准^[4], 依据临床表现、

胸部影像学及实验室检查。其中结核杆菌 MGIT 液体培养阳性 72 例, 男 51 例, 女 21 例, 年龄 16~90 岁, 平均年龄 50.6 岁, 男女性别比 2.43:1。培养阴性 44 例, 男 31 例, 女 13 例, 年龄 21~88 岁, 平均年龄 49.5 岁, 男女性别比 2.38:1。排除标准: 影像学及实验室检查均排除非结核分枝杆菌肺病及其它肺部疾病。实验采用研究对象的痰标本, 研究经过医院伦理委员会同意, 免于签署患者知情同意书。

1.2 标本采集

收集 3 份痰标本 (当日即时痰、夜间痰和次日晨痰)。患者用清水漱口后, 深吸气 2~3 次, 每次用力呼出, 从肺部深处咳出第 2、3 口痰液收集于样本容器, 拧紧盒盖送检。对当日不能检测的痰标本置于 4℃ 冰箱保存, 不超过 12 h, 要求标本量一般 3~5 mL, 标本采集前均未使用抗结核药物治疗^[4]。

1.3 仪器与试剂

采用全自动医用 PCR 分析系统 (美国 Cepheid 公司, 型号: GeneXpert)、全自动分枝杆菌培养监测仪 (美国 BD 公司, 型号: BACTEC MGIT™320)、生物显微镜 (德国 Leica 公司, 型号: MD1000)。Xpert MTB/RIF 检测试剂盒 (美国 Cepheid 公司)、BBL™ MGIT™ 培养管 (美国 BD 公司)、分枝杆菌联合药敏试剂盒 (美国 BD 公司)、抗酸染色试剂盒 (珠海贝索公司)。

1.4 检测方法

1.4.1 直接涂片抗酸染色

对 3 份痰标本采用萋尼染色法 (Z-N 法), 参照 WS 288-2017 肺结核诊断、《中国结核病防治规划。痰涂片镜检标准化操作及质量保证手册》进行标准化操作及质量控制, 涂片阳性结果定义为至少两份标本判断为阳性^[4-5]。

1.4.2 MGIT 液体培养

对3份混合痰标本用2% N-乙酰-L-半胱氨酸-NaOH 进行处理,将处理后的标本接种于含营养添加剂及抑制剂的MGIT 液体培养管,放入BACTEC MGITTM320 仪器自动检测,通过分析荧光强度判断是否有结核MTB 生长,一般快速7~14 d 培养阳性,培养周期设定42 d。

1.4.3 MGIT 联合药敏试验

使用MGIT 阳性1天的悬浮培养液,按照药敏试剂盒接种程序操作,4~13 d 内通过分离菌株在含药培养管和生长对照管的对比确定药物敏感性结果。

1.4.4 Xpert MTB/RIF 技术

取1 mL 混合痰标本加入2 mL 样本处理液,按照操作规程将处理后的样本加入检测盒,置于GeneXpert 检测模块自动检测。该技术采用巢式实时荧光定量PCR,针对结核分枝杆菌 *rpoB* 基因81 bp 利福平耐药核心区(rifampin resistance determining region, RRDR)设计引物、探针,检测其是否突变。

1.5 统计学分析

采用SPSS 20.0 统计分析,计数资料以 $n(\%)$ 表示,组间比较采用 Pearson 卡方检验,采用 McNemar 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3种检测方法阳性率比较

3种检测方法阳性率比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表1。

表1 3种检测方法阳性率比较 [$n(\%)$]

方法	<i>n</i>	阳性)	阴性)
MGIT 液体培养	116	72(62.1)	44(37.9)
Z-N 法	116	18(15.5)	98(84.5)
Xpert MTB	116	75(64.7)	41(35.3)
χ^2 值		74.360	
<i>P</i> 值		0.000	

2.2 MGIT 液体培养与 Xpert MTB 结果比较

MGIT 液体培养与 Xpert MTB 结果比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。以临床确诊为诊断标准,Xpert 法灵敏度90.3%,特异度77.3%,阳性预测值86.7%,阴性预测值82.9%,Youden 指数0.676,总符合率85.3%。见表2。

表2 MGIT 液体培养与 Xpert MTB 结果比较 [$n(\%)$]

项目	MGIT 液体培养	
	阳性	阴性)
Xpert MTB	65(90.3)	10(22.7)
	7(9.7)	34(77.3)
χ^2 值	0.240	
<i>P</i> 值	0.629	

注:MGIT 液体培养与 Z-N 法相比,^a $P<0.05$;MGIT 液体培养与 Xpert MTB 法相比,^b $P<0.05$ 。

2.3 Xpert MTB 与 Z-N 法结果比较

Xpert MTB 与 Z-N 法结果比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表3。

表3 Xpert MTB 与 Z-N 法结果比较 [$n(\%)$]

项目	Z-N 法	
	阳性	阴性)
Xpert MTB	18(100.0)	57(58.2)
	0(0.0)	41(41.8)
χ^2 值	57.000	
<i>P</i> 值	0.000	

2.4 Xpert MTB/RIF *rpoB* 基因检测结果

75 例 Xpert MTB/RIF *rpoB* 基因检测结果分析,66 例 Xpert MTB/RIF *rpoB* 基因未检出突变,即未检测到 RIF 耐药,与 MGIT 联合药敏试验利福平敏感结果一致,9 例 Xpert MTB/RIF *rpoB* 基因突变被检出,为 RIF 耐药,而药敏试验为利福平敏感,总符合率88.0%(66/75)。见表4。

表4 Xpert 利福平 *rpoB* 基因检测结果 [$n(\%)$]

项目	MGIT 联合药敏试验	
	敏感	耐药)
Xpert <i>rpoB</i>	66(88.0)	0(0.0)
基因突变	9(12.0)	0(0.0)
总符合率	88.0%	

3 讨论

结核杆菌耐药表型及耐药基因型关系的确立,为基于利福平耐药基因 *rpoB* 突变为靶点的诊断奠定了基础^[6]。Xpert MTB/RIF 以5条引物探针选择性覆盖结核分枝杆菌特有的序列 *rpoB* 基因81 bp 上 RRDR,第6条探针用做内部质量控制,以检测标本是否含有结核分枝杆菌复合群(MTB)以

及利福平是否耐药^[7]。

WHO推荐 Xpert MTB/RIF 对成人疑似多重耐药结核或 HIV 相关肺结核初筛诊断, Xpert MTB/RIF 检测结核分枝杆菌灵敏度高^[8]。据报道,抗酸染色法通常需 5 000 CFU/mL 才能得到阳性结果,而 Xpert MTB/RIF 方法的检测限(LoD)为 131 CFU/mL,尤其在 MTB DNA 低拷贝时,抗酸染色法往往是阴性结果。本研究显示,痰直接涂片抗酸染色法的阳性率远远低于 Xpert MTB 与 MGIT 液体培养阳性率,而 Xpert MTB 与 MGIT 液体培养阳性率接近。直接痰涂片阳性率低,容易漏检,也和未采用浓缩集菌法涂片、荧光染色镜检以及工作人员的涂片质量和阅片技能有一定关系^[9]。

国外有报道, Xpert MTB/RIF 试验在痰涂片阳性的标本中,其敏感性接近 100%,本文的研究结果与其一致^[10]。文献报道,传统罗氏培养阳性率为 44.5%,培养时间约 6~8 周, MGIT 液体培养阳性率为 62.1%, 7~14 天培养阳性,较罗氏培养阳性率提高,且培养时间缩短,但对生物安全级别要求高,在基层难以开展^[11]。而 Xpert MTB/RIF 方法整个流程仅需 2 h,手工只需处理样本即上机自动检测。本文研究结果表明 Xpert MTB/RIF 检测具有同液体培养及药敏试验接近的临床应用价值,提示可以用 Xpert MTB/RIF 对疑似耐药结核进行初筛^[12]。

除了痰标本外, Xpert MTB/RIF 还可以检测灌洗液、胸腹水、引流液、脑脊液标本,据研究报道,阳性率依次为灌洗液 65.9%、痰样本 53.9%、胸水 16.4%,特异性均较高^[13]。 Xpert MTB/RIF 检出 rpoB 阳性基因型耐药高于药敏试验表型耐药结果,大多数原因是标本中存在异质性利福平耐药,与某些基因位点突变的低水平耐药相关,也可能存在 Xpert MTB/RIF 检测的假耐药,可能与沉默子突变或 Xpert MTB/RIF 检测系统判读错误有关,对不一致菌株应进行 rpoB 耐药基因核心区间测序^[14]。另外, Xpert MTB/RIF 系统不能区分是否活性结核分枝杆菌,不能被用于监测治疗或复发^[15]。综上, Xpert MTB/RIF 是一种结核病快速诊断的新方法,具有快速、简便、准确、对生物安全要求不高等特点,可以在基层开展,能同时检测出结核分枝杆菌及是否对利福平耐药,对肺结核及肺外结核

病的早期诊断具有重要意义,是痰涂片镜检及培养检查方法的有力补充。

参考文献

- [1] 何贵清,李涛,施伎蝉,等. 利福平耐药结核分枝杆菌实时荧光定量核酸扩增检测技术在 214 例诊断肺结核患者中的临床应用评价[J]. 中华传染病杂志, 2016, 34(6): 349-353.
- [2] 赵冰,欧喜超,夏辉,等. Xpert Mtb/RIF 检测技术在结核病诊断中的应用评价[J]. 中国防痨杂志, 2014, 36(6): 462-466.
- [3] 陈瑶,吴英松. 基因芯片技术对结核分枝杆菌耐药性检测的临床应用[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2017, 9(2): 108-111.
- [4] 国家卫生计生委. WS 288-2017,肺结核诊断[S]. 北京:中国标准出版社, 2018.
- [5] 中国疾病预防控制中心. 中国结核病防治规划 痰涂片镜检质量保证手册[M]//中国结核病防治规划, 痰涂片镜检质量保证手册. 北京:中国协和医科大学出版社, 2004.
- [6] 邹远妩,刘尚武,朱蕾,等. Xpert MTB/RIF 检测结核分枝杆菌及其耐药性在结核病辅助诊断中的临床价值[J]. 临床肺科杂志, 2015, 20(3): 568-570.
- [7] 刘家云,郝晓柯. 感染病原体新型分子检测技术 GeneXpert [J]. 中华检验医学杂志, 2014, 37(11): 820-823.
- [8] 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. 分子诊断与治疗杂志, 2019, 11(3): 229-232+237.
- [9] 黄芳,党丽云,孙惠平,等. 三种分子生物学诊断技术对结核病诊断价值的比较[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2015, 38(9): 680-685.
- [10] Grandjean P, Herz KT. Trace elements as paradigms of developmental neurotoxicants: Lead, methylmercury and arsenic [J]. J Trace Elem Med Biol, 2015, 31: 130-134.
- [11] 徐礼锋,余旭良,张峰,等. 液体 MGIT 培养联合 Xpert MTB/RIF 快速检测结核分枝杆菌及其耐药性的研究[J]. 中华检验医学杂志, 2016, 39(4): 272-276.
- [12] 周洪经,郭明日,冯爽,等. Xpert MTB/RIF 在快速诊断肺结核及利福平耐药中的临床应用[J]. 国际检验医学杂志, 2016, 37(18): 2568-2570.
- [13] 董国伟,李修远,杨本善,等. 北京两家综合医院呼吸科住院患者结核分枝杆菌检出率分析[J]. 中国防痨杂志, 2016, 38(7): 549-554.
- [14] 刘涛,杨翌翔,刘军,等. Xpert MTB/RIF 检测技术诊断结核病及其耐药的研究[J]. 检验医学与临床, 2017, 14(13): 1898-1900.
- [15] 李静,林日文,张灿强. Xpert MTB/RIF 检测痰标本结核分枝杆菌与利福平耐受性的临床应用研究[J]. 国际检验医学杂志, 2017, 38(4): 480-482.

巨细胞病毒性疾病患儿尿HCMV-DNA水平、并发症及更昔洛韦治疗后转归分析

赵代艳* 苏爱芳 郭长根

[摘要] 目的 观察人巨细胞病毒(HCMV)性疾病患儿尿HCMV-DNA水平、并发症,并分析更昔洛韦治疗后转归情况。方法 将2017年1月至2019年9月本院收治的70例HCMV感染性疾病患儿(观察组)作为研究对象,另选择35例健康幼儿作为对照,均进行尿HCMV-DNA水平检测,记录HCMV感染性疾病患儿并发症发生情况。观察组均给予更昔洛韦治疗,对比治疗前后患儿尿HCMV-DNA水平、HCMV-DNA阳性率及肝功能指标[总胆红素(TBIL)、直接胆红素(DBIL)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、碱性磷酸酶(ALP)]。结果 观察组尿HCMV-DNA水平及HCMV-DNA阳性率均显著高于对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$);HCMV感染性疾病患儿并发症可见贫血(34.29%)、肺炎(24.29%)、畸形(8.57%)、视网膜炎(7.14%)、脑炎(7.14%)。治疗后,HCMV感染性疾病患儿尿HCMV-DNA水平及HCMV-DNA阳性率均较治疗前显著降低,差异具有统计学意义($P<0.05$);治疗后,HCMV感染性疾病患儿TBIL、DBIL、ALT和AST水平均较治疗前显著降低,差异具有统计学意义($P<0.05$)。结论 HCMV感染性疾病患儿尿HCMV-DNA水平较高,且容易发生贫血、肺炎等并发症,经更昔洛韦治疗后,患儿尿HCMV-DNA水平显著降低,肝功能也明显改善。

[关键词] 巨细胞病毒; HCMV-DNA; 更昔洛韦; 肝功能

Analysis of urine HCMV - DNA level, complications and outcome after ganciclovir treatment in children with human cytomegalovirus diseases

ZHAO Daiyan*, SU Aifang, GUO Changgen

(Department of Pediatrics, the Second People's Hospital of Luohe, Luohe, Henan, China, 462000)

[ABSTRACT] Objective To observe the urine HCMV-DNA level and complications in children with human cytomegalovirus (HCMV) diseases and analyze the outcomes after ganciclovir treatment. Methods Seventy children with HCMV diseases (observation group) who were admitted to the hospital from January 2017 to September 2019 were enrolled as the research objects. Another 35 healthy children were enrolled as control group. All were tested for urine HCMV-DNA level. The occurrence of complications in children with HCMV diseases was recorded. The observation group was treated with ganciclovir. The level of urine HCMV-DNA, positive rate of HCMV-DNA and liver function indexes [total bilirubin (TBIL), direct bilirubin (DBIL), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP)] before and after treatment were compared. Results The level of urine HCMV-DNA and the positive rate of HCMV-DNA in observation group were significantly higher than those in control group, with statistically significant differences ($P<0.05$). The complications in children with HCMV diseases included anemia (34.29%), pneumonia (24.29%), malformations (8.57%), retinitis (7.14%) and encephalitis (7.14%). After treatment, level of urine HCMV-DNA and positive rate of HCMV-DNA were significantly decreased, with statistically significant differences ($P<0.05$).

基金项目:河南省科技攻关计划(201903125)

作者单位:河南省漯河市第二人民医院儿科,河南,漯河 462000

*通信作者:赵代艳, E-mail:lhzydy@163.com

levels of TBIL, DBIL, ALT and AST were significantly decreased, with statistically significant differences ($P<0.05$). **Conclusion** The level of urine HCMV-DNA is relatively higher in children with HCMV diseases, who are prone to complications such as anemia and pneumonia. After ganciclovir treatment, level of urine HCMV-DNA is significantly decreased, and liver function is also significantly improved.

[KEY WORDS] Cytomegalovirus; HCMV-DNA; Ganciclovir; Liver function

人巨细胞病毒(human cytomegalovirus, HCMV)是最大动物病毒之一,属于 β 疱疹病毒亚科,因其进入细胞后会导致细胞增大而得名。HCMV在人群中感染广泛,且多呈隐性感染,潜伏部位多为唾液腺、乳腺、肾脏等^[1],能够随着唾液、乳汁、尿液等排出。多数免疫正常个体HCMV感染无症状,但是对于免疫抑制个体及婴幼儿,一旦发生感染则可出现明显病症,尤其是新生儿,后期可出现智力低下、感觉神经性耳聋等后遗症^[2-3]。因HCMV感染对婴幼儿健康危害较大,可引起多种并发症,需及早诊治以改善患儿预后^[4]。HCMV为DNA病毒临床可通过检测HCMV-DNA以诊治HCMV感染。基于以上所述,本研究拟观察HCMV感染性疾病患儿尿HCMV-DNA水平和并发症,并分析更昔洛韦治疗后转归情况,以期对HCMV感染性疾病患儿的临床诊治提供依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2017年1月至2019年9月本院收治的70例HCMV感染性疾病患儿为研究对象,患儿均符合HCMV感染诊断标准^[5],可见黄疸、发热、腹泻、肝脾肿大等症状,排除合并先天染色体疾病、合并非HCMV感染性疾病、合并缺血性脑病、胆红素脑病等脑疾病。70例患儿中男39例,女31例;年龄为1~12个月,平均年龄(4.87±1.59)个月;产期:早产儿4例,足月儿66例;生产方式:顺产34例,剖宫产36例;喂养方式:母乳喂养及混合喂养45例,人工喂养25例。另选择35例健康幼儿作为对照,其中男20例,女15例;年龄为1~12个月,平均年龄(4.95±1.61)个月;产期:早产儿1例,足月儿34例;生产方式:顺产19例,剖宫产16例;喂养方式:母乳喂养及混合喂养24例,人工喂养11例。两组一般资料比较差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。本研究获得本院医学伦理委员会批准,受检者家属均知情了解并签署了知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 HCMV-DNA检测

采集两组儿童新鲜尿液2 mL,于-20℃环境中保存待用。以12 000 r/min速率将尿液在TGL-16B高速台式离心机(上海安亭科学仪器厂)上离心5 min,除去上清液后通过Ficoll密度梯度离心法获取PBMC,加入DNA裂解液混匀振荡10 min,在100℃环境中静置10 min,充分裂解后再次以12 000 r/min速率离心5 min,取上清液5 μ L作为反应模板,进行PCR扩增(Mastercycler PCR扩增仪由德国Eppendorf公司提供)。扩增引物序列:上游5'-TGGGCATCGACTGACGAGCA-3',下游5'-TTTAGCAGTCTGCATAGCCT-3'。向HCMV-PCR反应管中加入经过处理的5 μ L反应模板,离心1 min;将反应管加入定量PCR仪器孔样品反应槽内,按对应顺序设置阴性质控品、阳性定量质控参考品(梯度 $10^3\sim 10^4$ copies/mL)及待检测标本,并设置样品名称、标记荧光基因种类及循环条件,扩增条件:93℃ 2 min;预变性:93℃ 50 s,55℃ 60 s,循环数10个;93℃ 30 s,55℃ 45 s,循环数30个,进行PCR扩增,依据标准曲线分析HCMV-DNA拷贝数,HCMV-DNA试剂盒购自中山大学达安基因股份有限公司,HCMV-DNA $>2.0 \log_{10}$ copies/L为阳性。

1.2.2 治疗

HCMV感染性疾病患儿均予以护肝利胆、降酶及氧疗等基础治疗,入院检查后予以更昔洛韦(山东凤凰制药股份有限公司,国药准字H20051937)静脉滴注,诱导期使用剂量:每次5 mg/kg加入5%葡萄糖溶液中静滴,2次/d,治疗2周;之后进行维持治疗,每次5 mg/kg加入5%葡萄糖溶液中静滴,1次/d,治疗2周。

1.2.3 肝功能指标检测

分别于治疗前、治疗后抽取患儿股静脉血1~2 mL,离心后分离血清,检测肝功能指标,包括总胆红素(total bilirubin, TBIL)、直接胆红素(direct bilirubin, DBIL)、丙氨酸氨基转移酶(alanine ami-

notransferase, ALT)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP),检测仪器为德国罗氏公司cobas 8000全自动生化分析仪。

1.3 统计学分析

运用SPSS 18.0软件进行统计分析,计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 描述,LSD-t检验行行两组间比较;计数资料用 $n(\%)$ 表示, χ^2 检验;以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 观察组与对照组尿HCMV-DNA水平及HCMV-DNA阳性率比较

观察组尿HCMV-DNA水平及HCMV-DNA阳性率均显著高于对照组,差异具有统计学意义($P < 0.05$),见表1。

表1 观察组与对照组尿HCMV-DNA水平及HCMV-DNA阳性率比较 $(\bar{x} \pm s)$

Table 1 Comparison of urine HCMV-DNA level and HCMV-DNA positive rate between the observation group and control group $(\bar{x} \pm s)$

组别	<i>n</i>	尿HCMV-DNA水平 (log ₁₀ copies/L)	尿HCMV-DNA 阳性率(%)
观察组	70	2.45 ± 0.38	43(61.43)
对照组	35	1.01 ± 0.27	0(0.00)
<i>t</i> / χ^2 值		20.013	33.915
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001

2.2 HCMV感染性疾病患儿并发症发生情况

HCMV感染性疾病患儿并发症可见贫血、肺炎、畸形、视网膜炎、脑炎,见表2。

表2 HCMV感染性疾病患儿并发症发生情况

Table 2 Complications in children with HCMV infection

并发症	<i>n</i>	百分比(%)
贫血	24	34.29
肺炎	17	24.29
畸形	6	8.57
视网膜炎	5	7.14
脑炎	5	7.14

2.3 HCMV感染性疾病患儿治疗前后尿HCMV-DNA水平及HCMV-DNA阳性率比较

治疗后,HCMV感染性疾病患儿尿HCMV-DNA水平及HCMV-DNA阳性率均较治疗前显著降低,差异具有统计学意义(P 均 < 0.05),见表3。

表3 HCMV感染性疾病患儿治疗前后尿HCMV-DNA水平及HCMV-DNA阳性率比较

Table 3 Comparison of urine HCMV-DNA level and HCMV-DNA positive rate of children with HCMV infectious diseases before and after treatment

组别	<i>n</i>	尿HCMV-DNA水平 (log ₁₀ copies/L)	尿HCMV-DNA 阳性率(%)
治疗前	70	2.45 ± 0.38	43(61.43)
治疗后	70	1.37 ± 0.28	5(7.14)
<i>t</i> / χ^2 值		19.015	45.779
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001

2.4 HCMV感染性疾病患儿治疗前后肝功能指标比较

治疗后,HCMV感染性疾病患儿TBIL、DBIL、ALT和ALP水平均较治疗前显著降低,差异具有统计学意义(P 均 < 0.05),见表4。

表4 HCMV感染性疾病患儿治疗前后肝功能指标比较 $(\bar{x} \pm s)$

Table 4 Comparison of liver function indexes of children with HCMV infection before and after treatment $(\bar{x} \pm s)$

组别	<i>n</i>	TBIL(μ mol/L)	DBIL(μ mol/L)	ALT(U/L)	ALP(U/L)
治疗前	70	200.75 ± 41.23	51.42 ± 10.09	318.65 ± 52.76	513.29 ± 81.45
治疗后	70	67.80 ± 15.76	12.37 ± 2.95	68.43 ± 17.14	385.46 ± 57.30
<i>t</i> 值		25.201	31.079	37.738	10.739
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

3 讨论

HCMV存在明显种属特异性,在人类中传播较广。我国为HCMV感染高发区,相关资料显示,国内HCMV平均感染率可高达90%^[6]。HCMV能够通过飞沫、尿液等体液传播,其进入人体造成原发性感染后会潜伏于组织内,形成终身感染,多数情况下不会出现明显症状,但当隐性感染者免疫

功能下降时,体内HCMV也随之活跃而导致出现症状表现,成为显性感染^[7-8]。对于胎儿和婴幼儿而言,母体感染HCMV后会经胎盘、产道、乳汁等途径将病毒传至其体内而导致其感染病毒,而HCMV感染会累及多个脏器,如心、肝、肺、肾等,引起多种并发症,危害大。因此,及早发现和早期治疗,对降低疾病造成的损害、改善患儿预后具有重要意义。

荧光定量 PCR 扩增技术对 HCMV-DNA 的定量检测在 HCMV 感染早期诊断中有重要价值,可降低肝、肺、肾等器官并发症发生率,提高临床诊断准确率,减少误诊和漏诊^[9]。本次研究对 HCMV 感染性疾病患儿进行尿 HCMV-DNA 检测,并以健康婴幼儿为对照,结果显示,观察组尿 HCMV-DNA 水平及 HCMV-DNA 阳性率均显著高于对照组,表明 HCMV 感染性疾病患儿尿 HCMV-DNA 表达水平较高,在诊断婴幼儿 HCMV 感染中具有一定价值。吴德等^[10]进行动物实验研究,结果显示 HCMV 先天性感染仔鼠可见明显空间学习记忆功能障碍。王泽民^[11]研究指出,小儿 HCMV 感染是其血液系统受累的中医病因学基础之一,能够导致患儿骨髓造血功能异常,可引发相关性血液系统疾病。本次研究对 HCMV 感染性疾病患儿并发症进行观察统计,显示其并发症可见贫血、肺炎、畸形、视网膜炎、脑炎,所占比例依次为 34.29%、24.29%、8.57%、7.14%、7.14%,可见 HCMV 感染能够引起血液系统、肺、脑等组织器官病变,且并发症发生率较高。

目前临床治疗 HCMV 感染性疾病包括基础对症治疗和抗感染治疗,更昔洛韦是抗病毒药物,能够抑制疱疹病毒 DNA 合成复制,具体作用机制为竞争性抑制脱氧鸟苷三价磷酸盐和 DNA 聚合酶结合,抑制病毒 DNA 合成;同时丙氧鸟苷三价磷酸盐能够和病毒 DNA 结合,终止病毒 DNA 链延长,继而抑制病毒复制^[12-13]。更昔洛韦在单纯疱疹病毒和 HCMV 所导致的感染中具有较好治疗效果,张佳佳等^[14]研究显示,更昔洛韦治疗人类疱疹病毒 4 型感染患儿显效率为 60%,可以明显缩短患儿住院时间,安全有效。本次研究对 HCMV 感染性疾病患儿予以更昔洛韦治疗,结果显示治疗后 HCMV 感染性疾病患儿尿 HCMV-DNA 水平及 HCMV-DNA 阳性率均较治疗前显著降低,提示更昔洛韦可以明显抑制 HCMV-DNA 复制,可控制 HCMV 感染。肝功能损害是 HCMV 感染重要表现之一,结果中治疗后 HCMV 感染性疾病患儿 TBIL、DBIL、ALT 和 ALP 水平均较治疗前显著降低,与李娟等人^[15]研究结果相符,表明更昔洛韦可通过抑制 HCMV-DNA 复制减轻肝损伤,使肝功能得到恢复。

综上所述, HCMV 感染性疾病患儿尿 HCMV-DNA 水平较高,容易发生多种并发症,如贫血、肺炎、视网膜炎等,对 HCMV 感染性疾病患儿予以更昔洛韦治疗,不但能够有效降低其尿 HCMV-DNA 水平,且可以较好改善患儿肝功能。

参考文献

- [1] 胡海峰, 吴燕. 巨细胞病毒感染的治疗研究进展[J]. 微生物学免疫学进展, 2015, 43(1):64-68.
- [2] 王晗, 李廷栋, 郭小怡. 巨细胞病毒实验室检测方法研究进展及其用于新生儿筛查的可行性[J]. 临床儿科杂志, 2018, 36(3):221-226.
- [3] 银益飞, 齐莹. 先天性巨细胞病毒感染筛查与临床干预指南[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2019, 35(4):417-423.
- [4] 翁玉英, 倪琛, 林秀凤, 等. 不同标本巨细胞病毒检测在诊断小儿人巨细胞病毒感染中的应用[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2014, 6(06):410-414.
- [5] 中华医学会儿科学分会感染学组, 全国儿科临床病毒感染协作组. 《中华儿科杂志》编辑委员会. 儿童巨细胞病毒性疾病的诊断和防治的建议[J]. 中华儿科杂志, 2012, 50(4):290-292.
- [6] 刘玲玲, 刘香花, 徐培淇. 实时荧光定量 PCR 检测儿童人巨细胞病毒感染的临床意义[J]. 中国卫生检验杂志, 2017, 27(10):1415-1417.
- [7] 钟峰, 赵俊, 张业婷, 等. 定量检测 HCMV pp67 mRNA 快速诊断人巨细胞病毒活动性感染[J]. 安徽医科大学学报, 2016, 51(3):324-328.
- [8] 王雪亮, 蒋玲丽, 鲍芸, 等. 上海地区人巨细胞病毒核酸检测的室内质量评价分析[J]. 中华检验医学杂志, 2016, 39(3):231-233.
- [9] 鱼丽娟, 张琳, 曹三成. 婴幼儿血、尿 HCMV-DNA 检测在 HCMV 感染诊断治疗中的应用[J]. 检验医学与临床, 2016, 13(6):831-833.
- [10] 吴德, 潘娜娜, 王莉莉, 等. 人巨细胞病毒先天性感染大鼠海马空间学习记忆功能受损[J]. 中华围产医学杂志, 2015, 18(1):30-34.
- [11] 王泽民. 小儿巨细胞病毒(HCMV)感染对患儿造血系统的影响观察[J]. 内蒙古医科大学学报, 2015, 37(S2):17-19.
- [12] 付双莉, 王丽丽, 史冬梅, 等. 更昔洛韦综合治疗婴儿期巨细胞病毒感染对听力恢复的影响[J]. 中华医院感染学杂志, 2015, 25(3):577-579.
- [13] 王金范. 脾氨肽联合更昔洛韦治疗小儿巨细胞病毒感染的 T 淋巴细胞亚群及 CMV-DNA 载量影响[J]. 现代免疫学, 2018, 38(2):124-128.
- [14] 张佳佳, 胡赤军. 更昔洛韦治疗人类疱疹病毒 4 型感染患儿的效果[J]. 中国妇幼保健, 2017, 32(5):991-994.
- [15] 李娟. 更昔洛韦治疗婴儿人巨细胞病毒感染的预后评估指标的探讨[J]. 天津医药, 2014, 42(9):940-942.

不同类型过敏性结膜炎患儿 TSLP、TGF- β 1 及 ECP 表达及临床意义

江灵*

[摘要] 目的 探讨胸腺基质淋巴细胞生成素(TSLP)、转化生长因子 β 1(TGF- β 1)及嗜酸性粒细胞阳离子蛋白(ECP)在不同类型过敏性结膜炎患儿机体表达及临床意义。**方法** 选取2018年1月至2020年1月由本院眼科收治的过敏性结膜炎儿童患者104例,根据过敏性结膜炎分型不同分为季节性过敏性结膜炎组(SAC组)35例、常年性过敏性结膜炎组(PAC组)34例和春季角结膜炎组(VKC组)35例,另外选健康儿童32例为正常对照组。分别采用liquichip液相芯片技术和ELISA法检测受试者泪液和血清中TSLP、TGF- β 1和ECP表达;Real-time PCR检测受试者结膜上皮细胞TSLP、TGF- β 1和ECP mRNA的表达;患者治疗后再次行泪液和血清细胞因子检测,分析比较治疗前后细胞因子水平变化。**结果** 4组受试者的一般临床资料比较,差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。3个过敏性结膜炎组结膜上皮细胞、泪液和血清中TSLP和ECP水平明显高于正常对照组,TGF- β 1水平明显低于正常对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。VKC组TSLP和ECP水平明显高于SAC和PAC组,差异有统计学意义($P<0.05$),TGF- β 1水平较其他两组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。治疗后各组TSLP和ECP明显降低,TGF- β 1明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$),均趋向于正常对照组水平。**结论** 不同类型过敏性结膜炎患儿TSLP、TGF- β 1和ECP的表达差异为研究发病的具体机制提供新思路。

[关键词] 过敏性结膜炎;眼部炎症;胸腺基质淋巴细胞生成素;转化生长因子 β 1;嗜酸性粒细胞阳离子蛋白

Expression and clinical significance of TSLP, TGF- β 1 and ECP in children with different types of allergic conjunctivitis

JIANG Ling*

(Department of Ophthalmology, Wuhan Red Cross Hospital, Wuhan, Hubei, China, 430000)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the expression and clinical significance of thymic stromal lymphopoietin (TSLP), transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) and eosinophil cationic protein (ECP) in children with different types of allergic conjunctivitis. **Methods** 104 children with allergic conjunctivitis admitted to our ophthalmology department from January 2018 to January 2020 were selected. According to different types of allergic conjunctivitis, they were divided into the seasonal allergic conjunctivitis group (SAC group, 35 cases), the perennial allergic conjunctivitis group (PAC group, 34 cases) and the vernal keratoconjunctivitis group (VKC group, 35 cases). In addition, 20 healthy children of similar age were selected as the normal control group. Using liquid chip technology and ELISA method to detect TSLP, TGF- β 1 and ECP expression in the tears and serum of the subjects; Real-time PCR to detect the expression of TSLP, TGF- β 1 and ECP mRNA in the conjunctival epithelial cells of the subjects; allergy Patients with conjunctivitis were tested for tears and serum cytokines again after treatment, and the changes in cytokine levels before and after treatment were analyzed and compared. **Results** The general clinical data of the four groups of subjects were not statistically different

作者单位:武汉市红十字会医院眼科,湖北,武汉 430000

*通信作者:江灵, E-mail:gangxie264@163.com

and were comparable ($P>0.05$). The levels of TSLP and ECP in conjunctival epithelial cells, tears, and serum of subjects with allergic conjunctivitis were significantly higher than those in the normal control group, and TGF- β 1 levels were significantly lower than those in the normal control group, the difference was statistically significant ($P<0.05$). The levels of TSLP and ECP in the VKC group were significantly higher than those in the other two groups, the difference was statistically significant ($P<0.05$), and the levels of TGF- β 1 were not significantly different from those in the other two groups ($P>0.05$). After treatment, TSLP and ECP of each group were significantly reduced, and TGF- β 1 was significantly increased, the difference was statistically significant ($P<0.05$), and they all tended to the level of the normal control group. **Conclusion** The expression differences of TSLP, TGF- β 1 and ECP in children with different types of allergic conjunctivitis provide new ideas for studying the specific mechanisms of pathogenesis.

[KEY WORDS] Allergic conjunctivitis; Ocular inflammation; Thymic stromal lymphopoietin; Transforming growth factor β 1; Eosinophil cationic protein

过敏性结膜炎 (Allergic conjunctivitis, AC) 是由结膜 (也包括角膜) 组织对外界变应原产生的过敏反应, 主要由 I 型和 IV 型超敏反应介导。当变应原首次接触机体, 机体接受刺激产生以 IgE 为主的抗体^[1]。当变应原再次接触后, 已致敏的肥大细胞表面 IgE 与变应原结合, 引起肥大细胞脱颗粒并释放大量介质。除了肥大细胞, 嗜酸性粒细胞、T 淋巴细胞等多种血液和免疫细胞参与 AC 的发病过程。常见的 AC 有三种不同类型: 季节性过敏性结膜炎 (seasonal allergic conjunctivitis, SAC)、常年性过敏性结膜炎 (perennial allergic conjunctivitis, PAC) 和春季角结膜炎 (vernal keratoconjunctivitis, VKC)。胸腺基质淋巴细胞生成素 (thymic stromal lymphopoietin, TSLP) 是一种上皮细胞分泌的细胞因子, 在超敏反应局部表达增加^[2]。人转化生长因子 β 1 (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1) 一种是激素样多肽, 在炎症、细胞增殖、免疫调节等方面起重要作用^[3]。嗜酸性粒细胞阳离子蛋白 (eosinophil cationic protein, ECP) 是嗜酸性粒细胞分泌的毒性颗粒蛋白, 在炎症和过敏性疾病的致病过程中发挥重要功能^[4]。目前临床上 AC 的实验室检查主要以泪液 IgE 定量分析、结膜分泌物涂片和刮片检查为主, 但均存在敏感性和特异性不高的问题。因此, 寻找新的可替代的评价分子尤为重要。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2018 年 1 月至 2020 年 1 月由本院眼科收治的诊断过敏性结膜炎儿童患者 60 例, 根据过敏性结膜炎分型不同分为 3 组: 季节性过敏性结膜

炎组 (SAC 组) 19 例、常年性过敏性结膜炎组 (PAC 组) 18 例和春季角结膜炎组 (VKC 组) 23 例。另外选择年龄相似的健康儿童 20 例作为正常对照组。本研究经院伦理委员会审批通过, 所有受试者及其监护人均知情并签署知情同意书。

纳入标准: ①符合上述过敏性结膜炎诊断标准^[1]; ②年龄未满 14 周岁。排除标准: ①有荨麻疹、湿疹、类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮等全身变态反应性疾病史者; ②有其他角膜、结膜、巩膜疾病史者; ③有隐形眼镜配戴史者; ④眼部有手术病史者; ⑤近半年眼部有用药史者。

1.2 研究方法

1.2.1 泪液中细胞因子的检测

受试患者取坐位, 微仰头并向鼻上注视, 研究者使用 10 μ L 医用一次性自吸式微量吸管在下眼睑侧睑缘处采集泪液, 双眼各取 5 μ L, 共计 10 μ L。EP 管分装储存在 -80°C 低温冰箱中, 待全部样本采集完毕后行进一步分析。泪液中 TSLP、TGF- β 1 及 ECP 细胞因子的测定采用 liquichip 液相芯片技术, 检测操作由天津生物芯片技术有限责任公司完成。

1.2.2 血清中细胞因子的检测

受试患者空腹抽取外周静脉血 5 mL 于肝素抗凝管内, 室温静置 1 h 后以 3 000 r/min 转速离心 5 min, 取上清液分装至 EP 管并储存在 -80°C 低温冰箱中, 待全部样本采集完毕后行进一步分析。血清 TSLP、TGF- β 1 及 ECP 细胞因子的检测采用双抗体夹心酶联免疫吸附试验 (ELISA) 技术, TSLP 和 TGF- β 1 检测试剂盒购自武汉云克隆科技股份有限公司, ECP 检测试剂盒由上海西唐生物科技有限公司。

1.2.3 实时荧光定量PCR检测结膜上皮细胞中细胞因子表达

受试者双眼用盐酸丙美卡因滴眼液(比利时爱尔康公司,进口药品注册证号:H20090082)点滴2次行眼表面麻醉,每次间隔3 min。无菌显微镊夹取已消毒的硝酸纤维膜轻敷于受试者眼侧、球结膜上下部10 s后,迅速转移至盛有350 μL 1%的β-巯基乙醇RLT缓冲液的洁净EP管中,双眼样本采集后合并于-80℃低温冰箱中储存,待全部样本采集完毕后行进一步分析。待样本收集完整后,根据试剂盒步骤要求提取结膜上皮细胞总RNA,转录成cDNA,行实时荧光定量PCR。检测以β-actin为内参,采用2^{-ΔΔCt}法分析TSLP、TGF-β1及ECP mRNA相对表达量。反应条件:95℃预变性5 min;95℃变性10 s,58℃退火30 s,72℃延伸45 s,40个循环;72℃充分延伸5 min。

1.3 治疗方法

采用0.1%盐酸奥洛他定滴眼液(5 mL:5 mg, Alcon公司,进口药品注册证号:H20130954)对三组不同型别的过敏性结膜炎的60例患者进行治疗,1~2 d/12 h,局部点眼,连续使用两周,如两周仍有症状,继续治疗至症状完全消失。停药3日后测定泪液和血清中TSLP、TGF-β1及ECP的水平并与治疗前的数据进行比较。

1.4 统计学方法

采用SPSS 22.0统计软件进行数据分析。计

量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,多组间差异采用方差分析,两组间比较采用t检验。计数资料用n(%)表示,采用χ²检验。以P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组受试者一般资料

所有组别受试者年龄、性别比例、平均病程、严重程度等一般资料比较,差异无统计学意义(P>0.05),具有可比性。见表1。

表1 不同组别一般资料比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of general information in different groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	年龄	男/女	平均病程(月)	轻/中/重
SAC组	19	6.5±1.6	9/10	5.24±1.9	4/9/6
PAC组	18	6.7±2.5	10/8	5.36±1.7	4/10/4
VKC组	23	7.3±2.2	11/12	5.71±2.4	6/12/5
正常对照组	20	7.0±1.9	11/9	-	-
χ ² /F值		0.59	0.47	0.30	1.23
P值		0.62	0.93	0.74	0.87

2.2 各组受试者泪液和血清中TSLP、TGF-β1和ECP水平

三种类型过敏性结膜炎组受试者泪液和血清中TSLP和ECP水平明显高于正常对照组,TGF-β1水平明显低于正常对照组,差异有统计学意义(P<0.05)。VKC组泪液TSLP,血清TSLP和ECP水平明显高于其他两组,PAC组泪液ECP水平明显高于其他两组,差异有统计学意义(P<0.05)。见表2。

表2 各组受试者泪液和血清中TSLP、TGF-β1和ECP水平的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of TSLP, TGF-β1 and ECP levels in tears and serum of subjects in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	泪液			血清		
		TSLP(pg/mL)	TGF-β1(pg/mL)	ECP(ng/mL)	TSLP(pg/mL)	TGF-β1(pg/mL)	ECP(ng/mL)
SAC组	19	27.74±5.28	22.11±5.91	31.28±4.96	17.93±2.34	12.57±5.45	15.24±2.64
PAC组	18	33.25±8.12	23.34±6.19	42.45±8.75	19.41±2.75	12.24±5.19	14.73±3.21
VKC组	23	46.32±7.20	21.64±5.52	33.36±6.48	24.12±3.01	10.21±4.73	18.53±3.86
正常对照组	20	7.32±2.57	48.59±7.42	3.65±1.31	4.24±1.54	25.36±5.42	3.13±1.24
F值		146.03	87.91	154.42	243.54	46.09	107.93
P值		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

2.3 各组受试者结膜上皮细胞中TSLP、TGF-β1和ECP mRNA表达水平

4组受试者结膜上皮细胞中TSLP、TGF-β1和ECP mRNA表达水平比较,差异具有统计学意义(P<0.05)。与正常对照组比较,SAC组、PAC组和VKC组结膜上皮细胞中TSLP和ECP mRNA表达明显增加,TGF-β1表达水平明显降低,差异有统计学意义(P<0.05)。VKC组TSLP和ECP mRNA

表达水平明显高于SAC组和PAC组,TGF-β1 mRNA表达水平明显低于另两组,差异均具有统计学意义(P<0.05),见表3。

2.4 治疗前后泪液和血清中TSLP、TGF-β1及ECP水平变化

60例不同组别过敏性结膜炎患者治疗前后对泪液和血清中TSLP、TGF-β1及ECP水平进行比较,结果如图1所示。治疗后的泪液和血清中

TSLP 和 ECP 水平较治疗前明显减低, TGF-β1 水平较治疗前明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

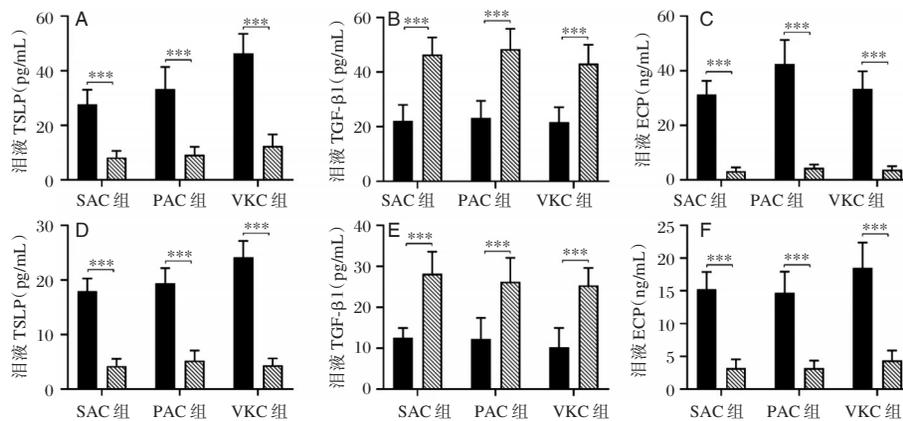
表3 各组受试者结膜上皮细胞中 TSLP、TGF-β1 和 ECP mRNA 表达水平的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TSLP	TGF-β1	ECP
SAC 组	19	3.60±1.54	0.68±0.20	3.19±1.08
PAC 组	18	2.57±0.68	0.65±0.19	3.42±1.27
VKC 组	23	7.21±2.87	0.47±0.13	6.89±3.13
正常对照组	20	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
F 值		49.42	45.53	37.04
P 值		<0.05	<0.05	<0.05

3 讨论

过敏性结膜炎(AC)是一种常见的眼科眼表疾病,全球约有五分之一的人曾患 AC^[5]。有报道显示,美国有 40% 人群有 AC 病史,但就医人数仅有 10%^[6]。大约 15%~20% 的日本人曾罹患 AC,我国目前缺乏 AC 的大样本流行病学数据,但又研究显示有 10% 以上的人罹患此病^[5]。在 AC 分型方面,我国以 SAC、PAC 和 VKC 尤为常见,其中 SAC 和 PAC 占有 AC 患者的 74%^[5, 7]。

胸腺基质淋巴细胞生成素(TSLP)是近年来才被逐渐认识的免疫活性细胞因子,主要由肺、皮肤



注: A、B、C 为治疗前泪液 TSLP、TGF-β1、ECP 水平变化; D、E、F 为治疗的泪液。

图1 不同类型过敏性结膜炎患儿治疗前后泪液和血清中 TSLP、TGF-β1 及 ECP 水平变化

Figure 1 Changes of TSLP, TGF-β1 and ECP levels in tears and serum of children with different types of allergic conjunctivitis before and after treatment

上皮细胞,成纤维细胞,肥大细胞等多种类型细胞分泌产生^[8]。TSLP 功能与 IL-17 类似,在免疫细胞的增殖、分化、成熟、活化等过程中发挥重要作用,尤其是对树突状细胞(DC)的成熟、活化发挥调控功能^[9]。活化的 DC 介导 CD4⁺ naive T 细胞向 Th2 细胞转化,分泌过敏性细胞因子 IL-4、IL-5 和 TNF-α,下调 IL-10 和 IFN-γ 的合成,这些细胞因子共同促进 IgE 合成和嗜酸性粒细胞的增殖来启动过敏反应^[10-11]。嗜酸性粒细胞阳离子蛋白(ECP)是嗜酸性粒细胞的标志性蛋白分子,ECP 的表达水平可反映嗜酸性粒细胞活化情况,ECP 可介导肥大细胞释放介质,介导过敏性疾病的发生,在过敏性鼻炎、过敏性哮喘、过敏性咳嗽中均有报道^[4, 12]。人转化生长因子 β1(TGF-β1)主要是由具有负调控功能的免疫细胞 Treg 细胞合成分泌的一种细胞因子,其主要功能是发挥免疫抑制功能^[13]。TGF-β1 可促进 Treg 细

胞的活化增殖,诱导 CD4⁺CD25⁻ naive T 细胞向 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞(Treg)转化,TGF-β1 也是维持 Treg 细胞免疫抑制功能的关键因子^[14]。

liquichip 液相芯片技术是综合激光技术、荧光微球技术、流式细胞术、免疫化学技术和数字信号处理技术而成的新型蛋白分子检测技术^[15]。结果提示在 AC 发病过程中 Treg 细胞的功能受到抑制,TSLP 和 ECP 的表达与疾病严重程度正相关。因此,上述细胞因子有作为 AC 辅助诊断标志物的潜力,但需要更大样本和更深入机制研究的支持。

综上所述,通过 TSLP、TGF-β1 和 ECP 与过敏性结膜炎及其严重程度,病情进展康复之间的相关性,为深入了解 TSLP、TGF-β1 和 ECP 在过敏性结膜炎发病中的具体机制提供新思路,也表明了 TSLP、TGF-β1 和 ECP 成为过敏性结膜炎新型辅助诊断标志物的潜力。(下转第 1647 页)

PCT、凝血因子联合CRP检测在肝硬化并发SBP中的诊断及预后评估价值

王惠*

【摘要】目的 分析血清降钙素原(PCT)、凝血因子联合C-反应蛋白(CRP)检测在肝硬化并发自发性细菌性腹膜炎(SBP)中的诊断及预后评估价值。方法 选取104例肝硬化患者作为研究对象。肝硬化并发SBP者64例(研究组),肝硬化未并发SBP者40例(对照组),比较两组PCT、凝血因子(Ⅱ、Ⅴ、Ⅶ、Ⅷ、Ⅸ、Ⅹ)、CRP水平及其诊断肝硬化并发SBP的敏感性、特异性。并分析影响其预后死亡的危险因素及PCT、凝血因子、CRP对肝硬化并发SBP患者短期预后的预测价值。结果 研究组PCT、CRP、凝血因子Ⅷ水平均显著高于对照组($P<0.05$);凝血因子Ⅱ、Ⅴ、Ⅶ、Ⅸ、Ⅹ水平均明显低于对照组($P<0.05$),且PCT+凝血因子+CRP联合诊断的敏感性、特异性高于单独的PCT、凝血因子、CRP检测($P<0.05$);回归分析发现,APACHEⅡ评分、pH值、 PaCO_2 及 PaO_2 值是导致无创机械通气治疗失败的独立危险因素($P<0.05$)。ROC曲线分析结果示,各指标曲线下面积以联合检测的预测价值最佳。结论 PCT、CRP及凝血因子联合检测在诊断肝硬化并发SBP患者中具有较高的敏感性、特异性,且基于PCT、CRP及凝血因子Ⅴ、Ⅸ的预测指数模型可很好的预测肝硬化并发SBP患者的短期生存率。

【关键词】肝硬化并发自发性细菌性腹膜炎;血清降钙素原;凝血因子;C-反应蛋白

Value of serum PCT, coagulation factors and CRP detection in the diagnosis and prognosis assessment of liver cirrhosis complicated with spontaneous bacterial peritonitis

WANG Hui*

(Department of Hepatology, the Third Hospital of Qinhuangdao, Qinhuangdao, Hebei, China, 066000)

【ABSTRACT】 Objective To analyze the value of serum procalcitonin (PCT), coagulation factors and C-reactive protein (CRP) detection in the diagnosis and prognosis assessment of liver cirrhosis complicated with spontaneous bacterial peritonitis (SBP). **Methods** 104 patients with liver cirrhosis were selected as the research objects. 64 patients with cirrhosis and SBP were included in the study group, and 40 patients with cirrhosis without SBP were included in the control group. The levels of PCT, coagulation factors (Ⅱ, Ⅴ, Ⅶ, Ⅷ, Ⅸ, Ⅹ) and CRP and their sensitivity and specificity in the diagnosis of liver cirrhosis complicated by SBP were measured and compared between the two groups. The risk factors that affect the prognosis of death and the predictive value of PCT, coagulation factors, and CRP for the short-term prognosis of patients with liver cirrhosis and SBP were analyzed. **Results** The levels of PCT, CRP, and coagulation factor Ⅷ in the study group were significantly higher than those in the control group ($P<0.05$). The levels of coagulation factors Ⅱ, Ⅴ, Ⅶ, Ⅸ, and Ⅹ were significantly lower than those in the control group ($P<0.05$), and the sensitivity and specificity of the combined diagnosis of PCT + coagulation factor of + CRP were higher than that of PCT, coagulation fac-

基金项目:秦皇岛市科技计划项目(201602A179)

作者单位:秦皇岛市第三医院肝病科,河北,秦皇岛 066000

*通信作者:王惠, E-mail: qishier513973625@163.com

tors, and CRP alone ($P<0.05$). Regression analysis found that APACHE II score, pH value, PaCO₂ and PaO₂ values were independent risk factors for the failure of non-invasive mechanical ventilation ($P<0.05$). The ROC curve analysis results showed that the area under the curve of combined detection has the best predictive value.

Conclusion The combined detection of PCT, CRP and coagulation factors has higher sensitivity and specificity in the diagnosis of patients with liver cirrhosis complicated by SBP, and the predictive index model based on PCT, CRP and coagulation factors V, IX can well predict the short-term survival rate of patients with liver cirrhosis complicated by SBP.

[KEY WORDS] Liver cirrhosis complicated with spontaneous bacterial peritonitis; Serum procalcitonin; Coagulation factor; C-reactive protein

肝硬化是一种由不同病因引起的慢性进行性弥漫性肝病,临床上早期无明显症状,进展缓慢,晚期出现多种严重并发症^[1]。自发性细菌性腹膜炎(spontaneous bacterial peritonitis, SBP)是指由非腹腔内脏穿孔或损伤引起的腹膜炎;同时也是肝硬化失代偿期患者最常见的并发症之一,病情凶险,且具有较高的发病率与病死率^[2-3]。早期诊断、及时治疗 SBP 可显著提高患者的生存率。血清降钙素原(procalcitonin, PCT)、C-反应蛋白(C-reactive protein, CRP)及凝血因子与晚期肝病 SBP 的发生、发展密切相关^[4]。三者被作为监测机体感染、评估病情严重程度的重要指标。但目前有关 PCT、凝血因子及 CRP 联合检测诊断肝硬化并发 SBP 的报道较少见^[5]。本组就 PCT、凝血因子联合 CRP 检测在肝硬化并发自发性细菌性腹膜炎中的诊断及预后评估价值进行了分析。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取本院 2019 年 1 月至 2020 年 5 月收治的 104 例肝硬化患者作为研究对象。纳入标准:①均符合《慢性乙型肝炎防治指南》中肝硬化失代偿临床诊断标准^[6], SBP 的诊断标准依据 2010 年欧洲肝病学会肝硬化腹水、SBP 指南^[7];②临床各方面资料完整;③未合并其他严重恶性疾病;④无既往手术史。排除标准:①入院时即有消化道大出血、肝癌、其他部位感染等疾病;②继发性腹膜炎患者;③妊娠期或哺乳期孕妇;④就诊前进行抗生素治疗。

根据患者是否合并 SBP 进行分组:其中肝硬化并发 SBP 者 64 例(研究组),男性 51 例,女性 13 例,平均年龄(60.36±3.77)岁。肝硬化未并发 SBP 者 40 例(对照组),男性 27 例,女性患者 13 例,平均年龄(61.06±4.26)岁。两组一般资料比较

差异无统计学意义($P>0.05$)。本研究经医院伦理委员会批准,受试者签署知情同意书。

1.2 方法

空腹抽取 3~5 mL 外周静脉血。CRP 采用免疫比浊法检测,检测仪器:日本松下 BD730 型全自动分析仪及其配套试剂盒。PCT 采用酶联荧光分析法检测,检测仪器:瑞典雷度公司 CDE68 型全自动分析仪及其配套试剂盒。凝血因子采用法国 STAGO 公司的全自动凝血分析仪及配套试剂进行检测。具体操作严格按照说明书执行。

1.3 观察指标

①比较两组患者的 PCT、凝血因子(II、V、VII、VIII、IX、X)、CRP 水平;②分析 PCT、凝血因子、CRP 及三者联合检测诊断肝硬化并发 SBP 的敏感性、特异性;③随访记录患者 3 月后预后死亡与生存情况,并分析影响其预后死亡的危险因素;④分析 PCT、凝血因子、CRP 对肝硬化并发 SBP 患者短期预后的预测价值。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 18.0 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。采用二分类 Logistic 逐步回归进行多因素分析。应用受试者工作特征(ROC)曲线评价建立的预测指数模型及各独立预测因子对于肝硬化并发 SBP 患者短期预后的预测能力,根据 ROC 曲线的敏感度和特异度决定各预测因子的最佳临界值。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者 PCT、凝血因子、CRP 水平比较

研究组 PCT、CRP、凝血因子 VIII 水平均显著高于对照组($P<0.05$);凝血因子 II、V、VII、IX、X 水平均明显低于对照组($P<0.05$)。见表 1。

表1 两组患者PCT、凝血因子、CRP水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of PCT, coagulation factor and CRP levels between the two groups ($\bar{x} \pm s$)

因子	对照组(40)	研究组(64)	t值	P值
PCT(ng/mL)	0.12±0.06	1.40±0.92	8.772	0.001
CRP(mg/L)	5.56±2.23	14.22±6.18	8.510	0.001
凝血因子II(%)	86.01±8.91	31.45±6.53	35.952	0.001
凝血因子V(%)	77.45±5.19	33.65±7.87	31.186	0.001
凝血因子VII(%)	89.32±7.66	32.21±10.69	29.379	0.001
凝血因子VIII(%)	119.56±22.09	190.32±10.65	21.915	0.001
凝血因子IX(%)	109.32±10.65	55.56±11.29	24.049	0.001
凝血因子X(%)	86.56±12.21	30.32±10.67	24.729	0.001

2.2 PCT、凝血因子、CRP及三者联合检测诊断肝硬化并发SBP价值分析

PCT、凝血因子、CRP检测诊断肝硬化并发SBP的敏感性、特异性比较差异无统计学意义($P > 0.05$),但PCT+凝血因子+CRP联合诊断的敏感性、特异性高于单独的PCT、凝血因子、CRP检测($P < 0.05$)。见表2。

2.3 影响肝硬化并发SBP患者预后死亡因素的单因素分析

对患者进行3个月随访,发现死亡15例(23.44%),存活49例(76.56%)。存活组患者PCT、CRP、凝血因子VIII水平均显著低于死亡组($P < 0.05$);凝血因子II、V、VII、IX、X水平均明显高于死亡组($P < 0.05$)。见表3。

2.4 影响肝硬化并发SBP患者预后死亡因素的多因素分析

经非条件多因素logistic回归模型分析,APACHE II评分、pH值、PaCO₂及PaO₂值是导致无

表2 PCT、凝血因子、CRP及三者联合检测诊断肝硬化并发SBP价值分析 [$n(\%)$]

Table 2 Value analysis of PCT, coagulation factor, CRP and the three combined detection and diagnosis of cirrhosis complicated with SBP [$n(\%)$]

检测方法	临床诊断		敏感性(%)	特异性(%)
	阳性	阴性		
PCT	50(78.13)	10(25.00)	78.13	75.00
	14(21.88)	30(75.00)		
凝血因子	46(71.88)	11(27.50)	71.88	72.50
	18(28.13)	29(72.50)		
CRP	44(68.75)	11(27.50)	68.75	72.50
	20(31.25)	29(72.50)		
三者联合	60(93.75)	2(5.00)	93.75	95.00
	4(6.25)	38(95.00)		
χ^2 值	-	-	6.465	6.275
P^a 值	-	-	0.011	0.012
χ^2 值	-	-	10.758	7.440
P^b 值	-	-	0.001	0.006
χ^2 值	-	-	13.128	7.440
P^c 值	-	-	0.001	0.006

注: P^a 为三者联合与单一PCT比较, P^b 为三者联合与单一凝血因子比较, P^c 为三者联合与单一CRP比较, $P < 0.05$ 。

创机械通气治疗失败的独立危险因素($P < 0.05$)。见表4。

2.5 各预测因子对肝硬化并发SBP患者短期预后的预测价值

采用ROC曲线分析PCT、凝血因子IX、V、CRP及四者联合检测对肝硬化并发SBP患者预后的预测价值,各指标曲线下面积分别为0.754、0.769、0.724、0.665及0.845,其中以联合检测的预测价值最佳。见图1。

表3 影响肝硬化并发SBP患者预后死亡因素的单因素分析 [$n(\%)$, ($\bar{x} \pm s$)]

Table 3 Single factor analysis of prognostic death factors in patients with cirrhosis complicated by SBP [$n(\%)$, ($\bar{x} \pm s$)]

因素	死亡组(n=15)	存活组(n=49)	t/ χ^2 值	P值	
性别	男(51)	10(66.67)	3.588	0.058	
	女(13)	5(33.33)			6(12.24)
平均年龄(岁)	58.39±10.95	56.86±8.84	0.554	0.582	
病因	乙型肝炎肝硬化	12(80.00)	0.399	0.819	
	酒精性肝炎肝硬化	2(13.33)			7(14.29)
	自身免疫性肝病	1(6.67)			6(12.24)
PCT(ng/mL)	2.14±0.14	0.68±0.06	58.258	0.001	
CRP(mg/L)	16.14±2.34	6.08±0.35	29.547	0.001	
凝血因子II(%)	29.45±8.75	88.02±10.93	18.944	0.001	
凝血因子V(%)	32.78±9.99	90.56±7.39	24.322	0.001	
凝血因子VII(%)	31.34±12.89	92.44±9.88	19.471	0.001	
凝血因子VIII(%)	188.45±12.87	118.78±24.29	10.621	0.001	
凝血因子IX(%)	54.78±13.49	111.56±12.87	14.787	0.001	
凝血因子X(%)	29.45±10.77	88.78±14.34	14.767	0.001	

表4 影响肝硬化并发SBP患者预后死亡的多因素分析

Table 4 Multi-factor analysis of prognostic death of patients with cirrhosis complicated by SBP

变量	回归系数	标准误	Wald/ χ^2 值	OR	95%CI值	P值
PCT	0.567	0.203	8.585	1.763	1.184~2.624	<0.001
CRP	0.561	0.228	10.114	1.752	1.121~2.740	<0.001
凝血因子IX	0.595	0.301	12.007	1.813	1.005~3.271	<0.001
凝血因子V	0.513	0.214	7.376	1.670	1.098~2.541	<0.001

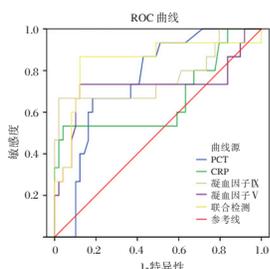


图1 各预测因子对肝硬化并发SBP患者短期预后ROC分析

Figure 1 ROC analysis of short-term prognosis of patients with cirrhosis complicated by SBP by various predictors

3 讨论

SBP是在无全身或腹腔内局部感染源的情况下,发生于腹腔的急性、亚急性细菌性感染,是肝硬化患者常见的并发症之一^[8-9]。腹水培养、PMN的计数是目前临床上诊断SBP的主要手段^[10]。但上述方法假阴性率较高,且腹水培养需一定周期,一旦出现假阴性,易导致患者错过最佳的治疗时间,因此寻找敏感性较高的指标具有重要意义。近年来国内外有关报道SBP的新诊断方法越来越多,其中以血清PCT、CRP的进展较为显著^[11-12]。

PCT是反应全身炎症活跃程度的一种蛋白质。在细菌感染时,其水平较病毒感染或其他炎症疾病时升高明显,可用来鉴别诊断细菌性感染和炎症的急性参数。CRP为机体一种急性时相反应蛋白,因可与肺炎链球菌的荚膜C-多糖发生反应得名,CRP是机体非特异性免疫机制的一部分,在感染、炎症、创伤、梗死以及结缔组织病均可出现升高。而且凝血因子是评估肝功能状态最为敏感的指标,肝脏能合成除组织因子和Ca²⁺以外的所有凝血因子和纤溶因子^[13]。黄浩等^[14]研究指出,PCT、CRP水平上升可作为肝硬化并发SBP的重要诊断指标。Alexopoulou等^[15]研究则显示肝脏合成的凝血因子II、V、VII、IX、X、XI及XII的活性测定可用于综合评价肝病患者的肝功能受损

的程度,尤其是在肝硬化患者,对病情观察中具有重要的临床价值。本组研究也证实了PCT、CRP及凝血因子诊断SBP的价值。Osman等^[16]研究显示,血清PCT诊断细菌性感染性疾病的敏感性、特异性显著优于其他实验室指标,与血清CRP、凝血因子联合检测则有助于提高SBP的诊断敏感性与特异性。本组研究结果亦显示,三者联合检测的价值更高,可有效弥补单一诊断的不足。

此外,国内外不少学者对SBP预后因素进行过研究,但结果各不相同,原因可能是所选取病例不同、未考虑非疾病因素,如实验误差、统计学方法等。黎秋芬等^[17]报道以年龄、低钠血症、MELD评分评估SBP患者预后,该方式较为科学,但MELD评分计算繁琐,且易受非肝病因素的影响。本组研究通过对预后具有预测意义的指标PCT、CRP及凝血因子II、V、VII、IX、X的筛选相关性最佳因子,以PCT、CRP评估感染的严重程度,以凝血因子为主评估肝病的严重程度,均不易受外界因素影响,与疾病密切相关,结果稳定。通过单、多因素分析结果显示,凝血因子V、凝血因子IX在预测SBP患者预后中具有较高价值,ROC曲线面积0.769、0.724。但进一步分析发现,PCT、CRP、凝血因子V及凝血因子IX四者联合检测ROC曲线面积为0.845,预测价值更高。

综上所述,PCT、CRP及凝血因子联合检测在诊断肝硬化并发SBP患者中具有较高的敏感性、特异性,且基于PCT、CRP及凝血因子V、IX的预测指数模型可很好的预测肝硬化并发SBP患者的短期生存率。

参考文献

[1] 陆兴热,陈凤羽,刘孝文,等.肝病患者的AFP、TP、ALB、SOD检测的临床价值[J].分子诊断与治疗杂志,2017,9(1):37-40.
 [2] 杨仁国,徐开菊,黄仁刚,等.降钙素原检测在肝硬化并发自发性腹膜炎的诊断价值[J].检验医学与临床,2018,18(1):1-3.

- [3] 何兴兵, 李强, 刘世祥. 生长抑素联合埃索美拉唑治疗肝硬化合并上消化道出血临床观察[J]. 解放军医药杂志, 2019, 31(4):96-99, 103.
- [4] 华鹏, 崔翔, 周荣赛, 等. 奥曲肽联合普萘洛尔治疗肝硬化上消化道出血患者效果及对炎性指标水平和门, 脾静脉血流影响[J]. 临床误诊误治, 2020, 33(5):44-48.
- [5] 石薇, 陈永顺. MIP-1 α , RANTES在肝癌患者外周血中的表达及临床意义[J]. 医学分子生物学杂志, 2018, 15(4):223-226.
- [6] Pavlova A, Parks JM, Oyelere AK, et al. Towards a Rational Design of Macrolide Antibiotics in Order to Combat Bacterial Resistance[J]. Biophysical J, 2017, 112(3):323.
- [7] Dam G, Vilstrup H, Watson H, et al. Proton pump inhibitors as a risk factor for hepatic encephalopathy and spontaneous bacterial peritonitis in patients with cirrhosis with ascites [J]. Hepatology, 2016, 64:(10):548.
- [8] Oey RC, De MRA, Erler NS, et al. Microbiology and antibiotic susceptibility patterns in spontaneous bacterial peritonitis: A study of two Dutch cohorts at a 10-year interval [J]. United Eur Gastroenterol J, 2018, 6(4):614.
- [9] Sofjan AK, Musgrove RJ, Beyda ND, et al. Prevalence and predictors of spontaneous bacterial peritonitis due to ceftriaxone-resistant organisms at a large tertiary center in the United States[J]. J Global Antl Res, 2018, 15(6):41-47.
- [10] Yun-Cheng H, Ming-Hsun L, Kuei-Chuan L, et al. Use of prokinetic agents or antibiotics is associated with the occurrence of spontaneous bacterial peritonitis in cirrhotic patients [J]. J Chin Med Associat, 2018, 81(8):1606.
- [11] Wang Y, Zhang Q. Analysis of Risk Factors for Patients with Liver Cirrhosis Complicated with Spontaneous Bacterial Peritonitis[J]. Iranian J Public Health, 2018, 47(12):1883-1890.
- [12] 刘亚楠, 卢文宁, 苑文雯, 等. 检测腹水降钙素原和白介素6对自发性腹膜炎的诊断价值[J]. 肝脏, 2018, 23(11):42-44.
- [13] Mai M, Stengel S, Al-Herwi E, et al. Genetic variants of TRAF6 modulate peritoneal immunity and the risk of spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis: A combined prospective-retrospective study[J]. Rep, 2017, 7(1):4914.
- [14] 黄浩. C反应蛋白和降钙素原在肝硬化腹水自发性细菌性腹膜炎中的诊断价值[J]. 现代消化及介入诊疗, 2019, 24(1):65-68.
- [15] Alexopoulou A, Vasilieva L, Agiasotelli D, et al. Extensively drug-resistant bacteria are an independent predictive factor of mortality in 130 patients with spontaneous bacterial peritonitis or spontaneous bacteremia [J]. World J Gastroenterol, 2016, 22(15):4049-4056.
- [16] Osman A, Rodrigues DM, Mayur B, et al. Su1570 - Low Incidence of Spontaneous Bacterial Peritonitis in Asymptomatic Outpatients with Cirrhosis Undergoing Paracentesis: A Systematic Review and Meta - Analysis [J]. Gastroenterology, 2018, 154(6):1181.
- [17] 黎秋芬, 方祎, 王曲僵, 等. PCT、CRP、腹水乳铁蛋白及LBP联合检测在自发性细菌性腹膜炎患者诊断中的临床价值[J]. 标记免疫分析与临床, 2019, 26(3):477-480.

(上接第1642页)

参考文献

- [1] 史伟云, 洪佳旭. 我国过敏性结膜炎诊断和治疗专家共识(2018年)[J]. 中华眼科杂志, 2018, 54(6):409-414.
- [2] Soumelis V, Reche PA, Kanzler H, et al. Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP[J]. Nat Immunol, 2002, 3(7):673-680.
- [3] 王云, 徐达良, 董扬, 等. 福辛普利联合缬沙坦治疗 IgA 肾病患者的疗效及其对尿 TGF- β 1 水平的影响[J]. 安徽医学, 2015, 36(4):406-409.
- [4] 买智涛, 姜明明, 万善志. FeNO 联合血清 ECP、IgE 检测对支气管哮喘的临床诊断价值[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(5):625-628+633.
- [5] 李莹, 张潇, 吕岚, 等. 过敏性结膜炎的流行病学及奥洛他定滴眼液开放性多中心治疗的初步效果[J]. 眼科, 2008(3):166-170.
- [6] Bielory BP, O'Brien TP, Bielory L. Management of seasonal allergic conjunctivitis: guide to therapy[J]. Acta Ophthalmol, 2012, 90(5):399-407.
- [7] 中华医学会眼科学分会角膜病学组. 我国过敏性结膜炎诊断和治疗专家共识(2018年)[J]. 中华眼科杂志, 2018, 54(6):409-414.
- [8] Allakhverdi Z, Comeau MR, Jessup HK, et al. Thymic stromal lymphopoietin is released by human epithelial cells in response to microbes, trauma, or inflammation and potently activates mast cells[J]. J Exp Med, 2007, 204(2):253-258.
- [9] Liu S, Verma M, Michalec L, et al. Steroid resistance of airway type 2 innate lymphoid cells from patients with severe asthma: The role of thymic stromal lymphopoietin [J]. J Allergy Clin Immunol, 2018, 141(1):257-268.e6.
- [10] Hirose K, Iwata A, Tamachi T, Nakajima H. Allergic airway inflammation: key players beyond the Th2 cell pathway [J]. Immunol Rev, 2017, 278(1):145-161.
- [11] Kubo M. Innate and adaptive type 2 immunity in lung allergic inflammation [J]. Immunol Rev, 2017, 278(1):162-172.
- [12] Park SC, Kim JH, Lee KH, et al. Association of serum eosinophilia and total immunoglobulin E concentration with the risk of allergic symptoms and allergic sensitization, respectively: A 2-year follow-up study [J]. Int J Pediatr Otorhinolaryngol, 2016, 86:167-171.
- [13] 荆结线, 乔丽娟, 郭爱芝, 等. 卵巢癌患者外周血 CD4⁺CD25^{hi}CD127^{lo}调节性 T 细胞格局变化及临床意义[J]. 中国免疫学杂志, 2012, 28(1):49-53.
- [14] Kuramitz H. Magnetic microbead-based electrochemical immunoassays [J]. Anal Bioanal Chem, 2009, 394(1):61-69.
- [15] 张文新, 林卫萍, 孙楠, 等. 液相芯片技术检测地中海贫血国家参考品[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(6):705-709.

COPD性高血压患者肾素-血管紧张素-醛固酮水平的临床研究

任芳* 郝同琴 牛丽丹 张江波

[摘要] **目的** 探讨慢性阻塞性肺病(COPD)性高血压患者肾素-血管紧张素-醛固酮(RAAS)水平及其与高血压的关系。**方法** 选取2018年3月至2019年9月期间于本院收治的COPD性高血压患者80例作为研究组,另收集同期收治于本院的COPD未伴发高血压患者80例,以及在本院进行健康体检的人群35例作为对照,分别划分为COPD组和健康组,比较三组一般资料情况,并测定和比较三组血浆肾素活性(PRA)、血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)、醛固酮(ALD)水平,分析PRA、AngⅡ和ALD水平与高血压之间的关系。**结果** 研究组的收缩压、舒张压、脑卒中发生率、合并冠心病和高脂血症的占比均明显高于COPD组和健康组,差异均有统计学意义($P < 0.05$);研究组PRA、AngⅡ和ALD水平>COPD组>健康组,差异均有统计学意义($P < 0.05$);不同病情COPD患者血压、RAAS系统水平存在明显差异,差异有统计学意义($P < 0.05$);相关性分析结果显示,血浆PRA、AngⅡ和ALD水平分别与收缩压、舒张压呈明显正相关性,差异均有统计学意义($P < 0.05$);且三指标水平之间互为正相关关系($P < 0.05$)。**结论** COPD性高血压患者体内存在RAAS过度激活,并与患者血压存在明显正相关性。

[关键词] 慢性阻塞性肺病;高血压;肾素;血管紧张素;醛固酮

Clinical study on the renin - angiotensin - aldosterone system in patients with COPD induced hypertension

REN Fang*, HAO Tongqin, NIU Lidan, ZHANG Jiangbo

(Department of Emergency, the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical College, Xinxiang, Henan, China, 453000)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) in patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and hypertension and its relationship with COPD induced hypertension. **Methods** A total of 80 patients with COPD induced hypertension admitted to the hospital from March 2018 to September 2019 were selected and included in the study group. Another 80 patients with COPD and without hypertension admitted to the hospital during the same period were selected and included in the COPD group. 35 healthy people were selected and included in the healthy group. The general data of the three groups were compared. The plasma renin activity (PRA), angiotensin Ⅱ (AngⅡ) and aldosterone (ALD) levels in the 3 groups were determined and compared. The relationship between PRA, AngⅡ and ALD levels and hypertension was analyzed. **Results** The systolic blood pressure, diastolic blood pressure, incidence rate of stroke, proportions of patients with coronary heart disease and hyperlipidemia in the study group were significantly higher than those in COPD group and the healthy group ($P < 0.05$). The levels of PRA, AngⅡ and ALD were the highest in study group, followed by the COPD group and the healthy group ($P < 0.05$). There were significant differences in blood pressure and RAAS system among COPD patients with different conditions ($P < 0.05$). Correlation analysis showed that the plasma PRA, AngⅡ And ALD levels were significantly positively

基金项目:河南省医学科技攻关计划项目(201304030)

作者单位:新乡医学院第一附属医院急诊科,河南,新乡 453000

*通信作者:任芳, E-mail:zhaxunyang287065@163.com

correlated with systolic blood pressure and diastolic blood pressure ($P<0.05$). In addition, the three indexes were positively correlated with each other ($P<0.05$). Conclusion There is over-activation of RAAS in patients with COPD induced hypertension, which is significantly positively correlated with blood pressure.

[KEY WORDS] Chronic obstructive pulmonary disease; Hypertension; Renin; Angiotensin; Aldosterone

慢性阻塞性肺病(chronic obstructive pulmonary diseases, COPD)是临床常见且多发的呼吸系统疾病,主要以持续的气流受限为主要特征,并伴随广泛肺外效应,是一种具有较高复发率和致死率的气道受阻且不完全可逆的肺部异常性炎症疾病^[1]。COPD患者由于肺通气功能障碍、肺血管内皮功能障碍、呼吸系统炎症反应等多种因素,可导致伴发高血压疾病,表现为血压升高、心功能障碍、头晕、恶心等^[2]。COPD性高血压在临床上比较少见,多发于老年人群,伴发高血压后无疑增加了COPD疾病治疗的难度,还容易引起心脑血管疾病、慢性肾衰竭等严重并发症的发生,严重影响患者的身体健康和^{生活质量}^[3]。肾素-血管紧张素-醛固酮系统(renin-angiotensin-aldosterone system, RAAS)是由一系列激素及相应的酶组成,能通过控制血容量和外周阻力对人体血压、水和电解质平衡进行调节,并维持机体内环境的恒定^[4-5],其水平与高血压的发生具有紧密的联系。目前国内关于COPD性高血压患者肾素-血管紧张素-醛固酮水平的研究鲜有见报道,基于此,本研究对COPD性高血压患者的肾素-血管紧张素-醛固酮水平水平进行检测,尝试探讨其与高血压之间的相关性,以期临床诊断提供一些理论参考,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取2018年3月至2019年9月期间于本院收治的COPD性高血压患者80例作为研究对象,作为研究组,其中男性39例,女性41例,平均年龄(65.93 ± 6.44)岁;COPD病情为轻度20例,中度35例,重度25例;急性加重期24例,稳定期56例。同时收集本院的COPD未伴发高血压患者80例,其中男性42例,女性38例,平均年龄(66.49 ± 5.93)岁;COPD病情为轻度23例,中度31例,重度26例;急性加重期29例,稳定期51例;以及在本院进行健康体检的人群35例作为对照,男性16例,女性19例,平均年龄(65.70 ± 6.52)岁。三组性别、年龄等比较

差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。

纳入标准:①患者均具有咳嗽、咳痰、呼吸困难等症状,经实验室检查、影像学检查,符合COPD的诊断标准^[6];②符合2005年我国高血压的诊断标准^[7]:收缩压 ≥ 140 mmHg(1 mmHg=0.133 kpa),舒张压 ≥ 90 mmHg;③年龄35岁以上,且病历资料完整、具备血浆检测标本者。排除标准:①精神异常、沟通障碍患者;②存在严重性肝肾疾病、恶性肿瘤、严重出血性疾病患者;③内分泌性高血压、继发性高血压、颅内并所致高血压患者;④妊娠及哺乳期妇女;⑤近两周内未服用血管紧张素转换酶抑制剂等影响。本研究通过医学伦理委员会审批,所有患者均签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 一般资料收集

现场测量患者的体重、身高、COPD病程、收缩压、舒张压,是否发生脑卒中以及合并冠心病、糖尿病、高脂血症情况等一般资料,记录患者。

1.2.2 血浆肾素、血管紧张素Ⅱ、醛固酮水平检测

分别于清晨卧位采集三组肘静脉血5 mL,经冰水浴中冷却、2 500 r/min离心后,分离血浆,放入 -20°C 冻存待测。采用放射免疫法对三组患者的肾素活性(plasma renin activity, PRA)、血管紧张素Ⅱ(angiotensin Ⅱ, Ang Ⅱ)、血醛固酮(aldosterone, ALD)进行测定,试剂盒均购自北京北方生物技术研究所,并严格按试剂盒操作方式进行实验操作。普通饮食,卧位的PRA参考值为0.07~1.51 ng/mL/h, Ang Ⅱ参考值为19~115 pg/mL, ALD的参考值为60~174 pg/mL。

1.3 统计学处理

采用SPSS 22.0软件进行数据分析,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,两组间采用独立样本 t 检验,多组间采用方差分析,多组数据的组间比较采用LSD- t 检验进行多重比较;PRA、Ang Ⅱ、ALD之间的相关性分析采用Pearson进行相关分析,多因素影响分析采用多元线性回归分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3组患者一般情况比较

3组在体重、身高方面的差异无统计学意义 ($P>0.05$), 研究组和 COPD 组患者在 COPD 病程、合并糖尿病方面的差异无统计学意义

($P>0.05$), COPD 组和健康组在收缩压和舒张压方面比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。研究组的收缩压、舒张压、脑卒中发生率、合并冠心病和高脂血症的占比均明显高于 COPD 组和健康组, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$), 见表 1。

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

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

变量	研究组($n=80$)	COPD 组($n=80$)	健康组($n=35$)	$\chi^2/t/F$ 值	P 值
体重(kg)	64.79±7.51	63.91±6.70	62.83±7.15	0.959	0.385
身高(cm)	164.25±5.98	162.48±6.71	163.57±6.15	1.625	0.200
COPD 病程(年)	5.25±1.27	5.16±1.84	/	0.360	0.719
收缩压(mmHg)	146.54±18.22 ^{ab}	113.83±10.07	115.49±9.85	125.320	<0.001
舒张压(mmHg)	93.65±8.21 ^{ab}	71.36±7.84	73.14±6.91	182.112	<0.001
脑卒中	12(15.00) ^{ab}	2(2.50)	0(0.00)	7.828	0.005
糖尿病	19(23.75) ^a	16(20.00) ^a	0(0.00)	0.329	0.566
冠心病	24(30.00) ^{ab}	11(13.75) ^a	0(0.00)	6.181	0.013
高脂血症	45(56.25) ^{ab}	19(23.75) ^a	0(0.00)	17.604	<0.001

注:与健康组比较,^a $P<0.05$;与 COPD 组比较,^b $P<0.05$ 。

2.2 3组患者 PRA、Ang II 和 ALD 水平比较

研究组 PRA、Ang II 和 ALD 水平均明显高于 COPD 组和健康组, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), 3 组 PRA、Ang II 和 ALD 水平比较, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), 见表 2。

2.3 研究组中不同 COPD 患者血压情况与 PRA、Ang II 和 ALD 水平比较

研究组中不同病情 COPD 患者血压、RAAS 系统水平比较差异有统计学意义 ($P<0.05$); 其中重度组收缩压、舒张压、PRA、Ang II 和 ALD 水平均明显高于轻度组和中度组, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), COPD 急性加重期患者血压、RAAS 系统水平明显高于稳定期患者 ($P<0.05$)。见表 3、表 4。

2.4 PRA、Ang II 和 ALD 水平与高血压之间的关系

相关性分析结果显示, 血浆 PRA、Ang II 和 ALD 水平分别与收缩压、舒张压、呈正相关性, 差异

表 2 3组患者 PRA、Ang II 和 ALD 水平比较 ($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Comparison of PRA, Ang II and ALD levels among the three groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	PRA (ng/mL/h)	Ang II (pg/mL)	ALD (pg/mL)
研究组	80	4.16±1.46 ^{ab}	128.37±20.31 ^{ab}	214.41±23.08 ^{ab}
COPD 组	80	1.67±0.39 ^a	113.81±18.45 ^a	183.59±22.15 ^a
健康组	35	0.55±0.06	51.61±10.12	68.29±12.45
F 值		217.290	224.313	589.350
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

注:与健康组比较,^a $P<0.05$;与 COPD 组比较,^b $P<0.05$ 。

有统计学意义 ($P<0.05$); 且三指标水平之间互为正相关关系, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), 见表 5。

3 讨论

高血压是一种常见的慢性疾病, 据调查显示, 我国高血压的患病人数易超过 2 亿人, 其发病率在

表 3 研究组中不同病情程度 COPD 患者的血压及 PRA、Ang II 和 ALD 水平比较 ($\bar{x}\pm s$)

Table 3 Comparison of blood pressure, PRA, Ang II and ALD levels among COPD patients with different severity in study group ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	收缩压(mmHg)	舒张压(mmHg)	PRA (ng/mL/h)	Ang II (pg/mL)	ALD (pg/mL)
轻度	20	129.21±10.38	82.89±9.47	2.54±0.77	120.27±14.61	195.82±16.04
中度	35	132.45±14.31	85.63±11.82	2.97±0.81	123.16±18.45	199.44±19.25
重度	25	159.74±8.62 ^{ab}	110.86±8.49 ^{ab}	6.96±1.22 ^{ab}	141.61±15.32 ^{ab}	248.69±13.46 ^{ab}
F 值		50.165	56.063	165.484	12.028	77.782
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

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

表4 研究组中不同时期 COPD 患者患者的血压及 PRA、Ang II 和 ALD 水平比较

Table 4 Comparison of blood pressure, PRA, Ang II and ALD levels among COPD patients during different periods in study group ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	收缩压(mmHg)	舒张压(mmHg)	PRA(ng/mL/h)	AngII(pg/mL)	ALD(pg/mL)
急性加重期	26	162.47±11.51	109.84±8.51	6.87±1.78	138.59±19.13	196.13±19.45
稳定期	54	138.64±13.32	85.78±8.28	2.84±0.86	123.43±12.69	237.48±18.61
t值		7.819	12.065	13.702	4.218	9.174
P值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

表5 PRA、Ang II 和 ALD 水平与收缩压、舒张压之间的相关性

Table 5 Correlation between PRA, Ang II, ALD levels and systolic blood pressure, diastolic blood pressure

条目	PRA		Ang II		ALD	
	r值	P值	r值	P值	r值	P值
收缩压	1.087	0.004	0.929	0.001	0.725	0.029
舒张压	0.913	0.003	0.822	0.007	0.851	0.013
PRA	/	/	0.653	0.035	0.639	0.041
Ang II	/	/	/	/	0.718	0.001
ALD	0.597	0.001	/	/	/	/

我国呈现为逐年增加的趋势^[8]。高血压的发生与生活方式、饮食等因素明显相关,患者可表现为头晕、头痛、血压升高等症状,若不能得到较好的控制,极易引发心脑血管疾病的发生以及脑卒中等并发症,不利于患者的身体健康^[9]。COPD亦是一种多发的慢性疾病,具有较高的病死率,且发病后极易伴发各种并发症。研究表明,RAAS系统的激活是COPD患者伴发高血压的发病原因之一,患者血浆Ang II水平升高还是各种心血管疾病的独立危险因素^[10]。本研究探讨COPD性高血压患者的RAAS系统水平,及其与高血压的相关性,对于进一步探讨RAAS系统水平与COPD性高血压发病机制与疾病发生发展的关系具有重要的指导意义。

本研究结果与国内学者蒋灵霓等^[11]的研究结果较为一致。有学者在研究报告中指出,在COPD前期,即慢性支气管炎阶段患者出现肺通气功能障碍时,其血浆PRA和Ang II水平处于高水平,特别是Ang II水平升高最为显著^[12]。Ang II能通过直接收缩小动脉使血压升高,并能通过参与血管壁的氧化应激、炎症反应等过程,引起血管内皮功能障碍,减少血管扩张因子的生成,引起肺血管过度收缩,导致血管重构和高血压的形成^[13]。高血压发生后,由于血管长期处于高压状态,可导致心脏、肾脏、脑等重要部位发生病理异常,引发冠心

病等心脑血管疾病,这可能是本研究的研究组患者合并冠心病、高脂血症比例较高的主要原因。

大量研究证实,RAAS能在生理条件下发挥重要的正常血压调节作用,当机体受到病理因素影响后,能够增加RAAS活性,进而引发高血压^[14]。RAAS系统对机体血管功能、血压、水盐代谢的调节发挥着重要作用,直接参与高血压的发病机制。研究表明,COPD患者与原发性和心血管疾病的发生有关,COPD患者的肺功能越差,患者伴发高血压的几率越高^[15]。国外研究指出,COPD患者中有50%以上的患者可伴发高血压,其高血压的伴发率明显高于同龄健康人群^[16]。COPD患者发病后,其RAAS系统被激活,球旁细胞释放大量的PRA,引起Ang II活性增高,全身小动脉管壁收缩产生高血压。由此可见COPD患者RAAS系统水平与高血压发生的明显相关性,同时,可以看出PRA、Ang II和ALD三者之间存在互相的促进作用,存在明显正相关关系。COPD性高血压患者血浆PRA、Ang II和ALD水平不仅与高血压的关系密切,还可能成为COPD性高血压发生发展过程中的重要标志物,对于早期发现和预防COPD性高血压具有一定的指导作用。

综上所述,COPD性高血压患者体内存在RAAS过度激活,表现为RAAS系统处于较高水平,并与患者血压存在明显正相关性,RAAS水平的检测对于COPD性高血压的发生和发展及患者病情的评估具有一定的指导价值。

参考文献

[1] 刁鑫,兀威,张进召. 吸烟对慢性阻塞性肺疾病患者CD8+T细胞的影响[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2018, 10(6):41-45.
 [2] 樊彩妮,赵海鹰,田丹丹,等. 不同年龄原发性高血压患者血压变异性与血浆肾素、血管紧张素、醛固酮水平的相关性[J]. 中华高血压杂志, 2019, 27(12):1172-1178.
 [3] 袁会玲,张晓华,田勇,等. 依普沙坦对中青年高血压患者肾素-血管紧张素-醛固酮系统的影响[J]. 海南医学院学报, 2019, 25(23):1776-1779. (下转第1656页)

血清 Hcy、hs-CRP 在急性脑梗死患者的表达及与病情程度的相关性

孙媛媛 余其贵 谢军*

【摘要】目的 探究急性脑梗死(ACI)患者血清同型半胱氨酸(Hcy)、超敏反应蛋白(hs-CRP)表达水平与病情严重程度的相关性。**方法** 选取110例ACI患者,分为轻度组($n=39$)、中度组($n=46$)和重度组($n=25$),另选取50例健康志愿者作为对照组,对比各组研究对象临床基本资料、血生化指标,并比较各组ACI患者梗死病灶面积、颈动脉狭窄程度及预后mRS评分;观察不同梗死病灶面积、不同颈动脉狭窄程度、神经功能缺损程度评分(NDS)及预后评分(mRS)患者血清Hcy、hs-CRP水平,受试者工作特征曲线(ROC)分析Hcy、hs-CRP对于ACI的诊断价值。**结果** 各组性别构成、年龄、吸烟史、身体质量指数(BMI)比较,差异无统计学意义($P>0.05$);各组血糖、总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、凝血酶原时间(PT)、凝血酶时间(TT)、纤维蛋白原(FIB)、活化部分凝血酶时间(APTT)、Hcy、hs-CRP比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。随着ACI患者梗死病灶面积、颈动脉狭窄、NDS及mRS评分增加血清Hcy、hs-CRP水平明显升高,差异具有统计学意义($P<0.05$)。Hcy、hs-CRP与TC、TG、LDL-C、PT、TT、FIB、APTT、梗死病灶面积、颈动脉狭窄、NIHSS评分、NDS评分及mRS评分存在显著正相关性($P<0.05$)。血清Hcy、hs-CRP及二者联合诊断ACI的曲线下面积(AUC)分别为0.801、0.899、0.928,联合诊断更具显著价值。**结论** 急性脑梗死患者血清Hcy、hs-CRP与机体高血脂、高凝血状态、神经功能缺损存在密切关系,Hcy、hs-CRP对于急性脑梗死患者病情严重程度辅助评估具有显著价值。

【关键词】 急性脑梗死;同型半胱氨酸;超敏反应蛋白

Correlation between the expression of serum Hcy and hs-CRP in patients with acute cerebral infarction and its severity

SUN Yuanyuan, YU Qigui, XIE Jun*

(Hefei Hospital Affiliated to Anhui Medical University/Hefei Second People's Hospital, Department of General Medicine Hefei, Hefei, Anhui, China, 230011)

【ABSTRACT】 Objective To investigate the correlation between the expression levels of serum homocysteine (Hcy) and hypersensitivity protein (hs-CRP) in patients with acute cerebral infarction (ACI) and the severity of the disease. **Methods** 110 patients with ACI were selected and divided into the mild group ($n=39$), the moderate group ($n=46$) and the severe group ($n=25$), another 50 healthy volunteers were selected as the control group. The basic clinical data and blood biochemical indexes of each group were compared, and the area of infarct lesions, carotid artery stenosis and prognostic mRS scores of ACI patients in each group were compared. The serum Hcy and hs-CRP levels of patients with different infarct area, different carotid artery stenosis degree, neurological deficit score (NDS) and different prognosis mRS score were compared, and the receiver operating characteristic curve (ROC) analyzed Hcy and hs-CRP for the diagnostic value of ACI.

基金项目:安徽省公益性技术应用研究联动计划项目(1704f0804042)

作者单位:安徽医科大学附属合肥医院/合肥市第二人民医院全科医学科,合肥,安徽 230011

*通信作者:谢军, E-mail:meiluxiankexing@163.com

Results There was no statistically significant difference in gender composition, age, smoking history, and body mass index (BMI) among the groups ($P>0.05$). Blood glucose, total cholesterol (TC), triglycerides (TG), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), prothrombin time (PT), thrombin time (TT), fibrinogen (FIB), activated partial thrombin time (APTT), Hcy, hs-CRP in each group were compared, the difference was statistically significant ($P<0.05$). With the increase of infarct size, carotid artery stenosis, NDS and mRS scores in ACI patients, the serum Hcy and hs-CRP levels increased significantly, the difference was statistically significant ($P<0.05$). There was a significant positive correlation between Hcy, hs-CRP and TC, TG, LDL-C, PT, TT, FIB, APTT, infarct size, carotid stenosis, NIHSS score, NDS score, and mRS score ($P<0.05$). The areas under the curve (AUC) of serum Hcy, hs-CRP and the combined diagnosis of ACI were 0.801, 0.899, 0.928, respectively, and combined diagnosis is more significant. **Conclusion** Serum Hcy and hs-CRP in patients with acute cerebral infarction are closely related to the body's hyperlipidemia, hypercoagulability, and neurological deficits. Hcy and hs-CRP are of great value in the auxiliary evaluation of the severity of acute cerebral infarction.

[KEY WORDS] Acute cerebral infarction; Homocysteine; Hypersensitivity protein

急性脑梗死(Acute cerebral infarction, ACI)的发病机制较为复杂,伴有多种细胞因子水平的改变,从而影响神经元细胞活性,引发炎症反应、氧化应激损伤及血栓形成等,加剧脑组织病变^[1]。研究认为^[2],动脉粥样硬化是心脑血管疾病的主要病因。动脉粥样硬化的发生与血管炎症反应存在密切关系,血管炎症反应的主要表现为超敏C反应蛋白(Hypersensitive C-reactive protein, hs-CRP)等急性时相蛋白水平异常升高,并加重白细胞活性,促进炎症反应发展。hs-CRP是反应炎症发展的精确、敏感指标,并有研究证实hs-CRP对于心脑血管疾病具有较高的预测价值^[3]。同型半胱氨酸(Homocysteine, Hcy)是动脉粥样硬化的独立危险因素,其参与了动脉粥样硬化血栓形成^[4]。本研究血清Hcy、hs-CRP在急性脑梗死患者的表达及与病情程度的相关性进行了探究,具体如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2017年10月至2019年10月本院收治的110例ACI患者,纳入标准:①均经CT、MRI等影像学检查确诊,符合《中国急性缺血性脑卒中诊治指南2014》^[5]中的诊断标准;②发病至入院时间 <24 h;③所有患者及家属均对本研究内容知情并自愿签署知情同意书。排除标准:①合并肝、肾、心功能不全及其他严重疾病者;②既往存在脑血管疾病史者;③脑梗死合并出血者;④近期有脑部外科手术史或创伤史者。所有患者均由专门负责医师采用美国国立卫生研究院脑卒中量表(Na-

tional Institutes of Health Stroke Scale, NIHSS)评分评估神经功能损伤程度^[6],总分0~33分,为轻度组(≤ 5 分)39例,中度组(6~13分)46例、重度组(≥ 14 分)25例,另选取来本院体检中心体检的50例健康志愿者作为对照组。各组研究对象性别、年龄、身体质量指数(BMI)比较,差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。本研究获得本院伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 试剂和仪器

采用彩色多普勒超声诊断仪(PHILIPS公司,型号:IU-22型)、全自动生化分析仪(日立公司,型号:7180)、全自动血液分析仪(日本希森美康公司,型号:SYSMEX-2100)、全自动凝血仪(美国BECKMAN COULTER公司,型号:ACL ADVANCE)、酶标仪(美国BIO-RAD公司,型号:Model 450型)。血生化检测及凝血功能试剂由仪器公司配套提供,酶联免疫吸附法(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒购自武汉博士德生物工程公司。

1.2.2 疾病严重程度判断

所有患者入院后统计性别、年龄、吸烟史、身高、体重等基线资料,颈动脉狭窄程度评估采用彩色多普勒超声诊断仪行颈动脉检查,并根据颈动脉狭窄率^[7]分为 $\leq 50\%$ 组($n=69$)及 $>50\%$ 组($n=41$)。脑梗死面积根据Pullicitto公式^[8]进行计算分为小梗死灶组(<5 cm², $n=35$)、中梗死灶组(5~10 cm², $n=48$)和大梗死灶组(>10 cm², $n=27$)。NDS评分^[9]对所有患者神经功能缺损情况进行评估,并分为轻型(0~15分, $n=36$)、中型(16~30分, $n=40$)

和重型(31~45分, $n=34$)。采用 mRS 评分^[10]评估患者预后,总分 0~5 分,评分越高表示患者预后越差,其中 mRS ≤ 2 分($n=65$)为预后良好, >2 分($n=45$)为预后不良者。

1.2.3 生化指标检测

所有受试者均入院后 12 h 内抽取 5 mL 空腹静脉血,检测血糖、总胆固醇(Total cholesterol, TC)、甘油三酯(Triglyceride, TG)、高密度脂蛋白胆固醇(High density lipoprotein cholesterol, HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(Low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)指标,并检查凝血功能指标凝血酶原时间(Prothrombin time, PT)、凝血酶时间(Thrombin time, TT)、纤维蛋白原(Fibrinogen, FIB)、活化部分凝血酶时间(Activated partial thrombin time, APTT)指标。采用 ELISA 法检测 hsCRP、Hcy 水平。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 20.0 统计学软件进行数据分析,计数资料以 $n(\%)$ 表示,组间比较采用卡方检验;计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,组间两两比较采用 t 检验,多组及以上比较采用单因素方差分析;Spearman 相关分析 Hcy、hs-CRP 与临床各指标的相关性;受试者工作特征曲线分析 Hcy、hs-CRP 对于 ACI 的诊断价值。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同病情程度 ACI 患者临床各指标比较

各组性别构成、年龄、吸烟史、BMI 比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);各组血糖、TC、TG、LDL-C、PT、TT、FIB、APTT、Hcy、hs-CRP、HDL-C 比较差异有统计学意义($P < 0.05$),各组 ACI 患者血糖、LDL-C、HDL-C 比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

2.2 不同梗死病灶面积、颈动脉狭窄及预后 mRS 评分血清 Hcy、hs-CRP 水平比较

随着 ACI 患者梗死病灶面积、颈动脉狭窄程度、NDS 及 mRS 评分增加血清 Hcy、hs-CRP 水平明显升高,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

2.3 血清 Hcy、hs-CRP 与 ACI 患者临床各指标的相关性

Hcy、hs-CRP 与 TC、TG、LDL-C、PT、TT、FIB、APTT、梗死病灶面积、颈动脉狭窄程度、NHSS 评分、NDS 评分及 mRS 评分呈正相关($P < 0.05$)。见表 3。

2.4 血清 Hcy、hs-CRP 诊断 ACI 的 ROC 曲线

血清 Hcy、hs-CRP 及二者联合诊断 ACI 的曲线下面积(AUC)分别为 0.801、0.899、0.928,联合诊断更具显著价值。见表 4 和图 1。

表 1 不同病情程度 ACI 患者临床各指标比较 [$n(\%)$, $(\bar{x} \pm s)$]

Table 1 Comparison of clinical indicators of ACI patients with different disease degrees [$n(\%)$, $(\bar{x} \pm s)$]

指标	对照组($n=50$)	轻度组($n=39$)	中度组($n=46$)	重度组($n=25$)	F/χ^2 值	P 值
性别(男/女)	29/21	23/16	27/19	14/11	0.064	0.996
年龄(岁)	61.2 \pm 3.7	61.4 \pm 4.1	61.5 \pm 4.2	61.1 \pm 4.3	0.645	0.521
BMI(kg/m^2)	23.4 \pm 2.2	23.4 \pm 2.0	23.1 \pm 2.4	24.0 \pm 2.7	1.241	0.218
吸烟史(%)	11(22.0)	9(23.1)	11(23.9)	7(28.0)	0.344	0.952
血糖(mmol/L)	5.3 \pm 1.3	8.1 \pm 1.5	8.1 \pm 1.6	8.2 \pm 1.8 ^a	10.666	0.000
TC(mmol/L)	3.8 \pm 0.6	4.4 \pm 0.8 ^a	4.8 \pm 0.7 ^{ab}	5.3 \pm 1.0 ^{abc}	9.753	0.000
TG(mmol/L)	1.1 \pm 0.3	1.4 \pm 0.3 ^a	1.7 \pm 0.4 ^{ab}	1.9 \pm 0.4 ^{abc}	11.342	0.000
HDL-C(mmol/L)	1.4 \pm 0.3	1.0 \pm 0.4	1.1 \pm 0.4	1.0 \pm 0.4 ^a	7.874	0.000
LDL-C(mmol/L)	2.6 \pm 0.7	3.4 \pm 0.6	3.5 \pm 0.6	3.5 \pm 0.7 ^a	7.355	0.000
PT(s)	12.8 \pm 1.1	16.1 \pm 1.6 ^a	18.9 \pm 1.8 ^{ab}	20.8 \pm 1.5 ^{abc}	11.711	0.000
TT(s)	12.2 \pm 1.5	15.9 \pm 1.5 ^a	18.6 \pm 1.4 ^{ab}	20.9 \pm 1.6 ^{abc}	11.850	0.000
FIB(g/L)	2.6 \pm 0.4	3.1 \pm 0.4 ^a	3.3 \pm 0.5 ^{ab}	3.9 \pm 0.6 ^{abc}	9.851	0.000
APTT(s)	35.6 \pm 3.9	42.1 \pm 3.3 ^a	45.4 \pm 3.5 ^{ab}	48.9 \pm 3.9 ^{abc}	9.130	0.000
Hcy($\mu\text{mol}/\text{L}$)	4.1 \pm 0.8	15.1 \pm 1.4 ^a	21.2 \pm 2.6 ^{ab}	27.7 \pm 3.0 ^{abc}	27.518	0.000
hs-CRP(mg/L)	5.0 \pm 0.9	13.6 \pm 1.8 ^a	19.6 \pm 2.3 ^{ab}	28.1 \pm 3.3 ^{abc}	24.339	0.000
梗死病灶面积(cm^3)	-	2.8 \pm 0.6	5.3 \pm 1.3	10.6 \pm 1.9	17.820	0.000
颈动脉狭窄(分)	-	2.3 \pm 0.5	2.0 \pm 0.5	1.6 \pm 0.4	11.715	0.000
NHSS(分)	-	3.9 \pm 0.8	12.6 \pm 1.3	16.8 \pm 2.2	27.710	0.000
NDS(分)	-	9.4 \pm 1.3	25.3 \pm 3.1	39.8 \pm 3.7	32.647	0.000
mRS(分)	-	1.2 \pm 0.3	1.5 \pm 0.4	2.1 \pm 0.7	8.697	0.000

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与轻度组比较,^b $P < 0.05$;与中度组比较,^c $P < 0.05$ 。

表2 不同梗死病灶面积、颈动脉狭窄及预后 mRS 评分血清 Hcy、hs-CRP 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of serum Hcy and hs-CRP levels of different infarct lesion areas, carotid artery stenosis and prognosis mRS score ($\bar{x} \pm s$)

项目	Hcy ($\mu\text{mol/L}$)	F/t 值	P 值	hs-CRP (mg/L)	F/t 值	P 值
梗死病灶面积 (cm^2)	<5	14.3±1.8		12.2±1.2		
	5~10	22.1±2.7	10.588	22.5±2.5	14.152	0.000
	>10	31.3±3.0		34.1±3.1		
颈动脉狭窄 (%)	>50	35.1±3.6	44.086	33.2±3.0	51.162	0.000
	≤50	13.7±1.4		11.6±1.4		
		13.8±1.5		12.3±1.2		
NDS (分)	16~30	22.6±2.5	11.634	22.1±2.0	13.457	0.000
	31~45	32.6±3.9		33.6±3.4		
		11.5±1.3	57.506	10.7±1.4	59.154	0.000
mRS (分)	≤2	11.5±1.3		10.7±1.4		
	>2	36.9±3.2		35.3±2.9		

表3 血清 Hcy、hs-CRP 与 ACI 患者临床各指标的相关性

Table 3 Correlation between serum Hcy, hs-CRP and clinical indicators of ACI patients

指标	Hcy		hs-CRP	
	r 值	P 值	r 值	P 值
TC	0.413	0.000	0.513	0.000
TG	0.588	0.000	0.515	0.000
HDL-C	0.483	0.000	0.420	0.000
LDL-C	0.534	0.000	0.481	0.000
PT	0.470	0.000	0.421	0.000
TT	0.419	0.000	0.418	0.000
FIB	0.483	0.000	0.464	0.000
APTT	0.447	0.000	0.446	0.000
梗死病灶面积	0.590	0.000	0.514	0.000
颈动脉狭窄程度	0.524	0.000	0.536	0.000
NHSS	0.564	0.000	0.569	0.000
NDS	0.506	0.000	0.527	0.000
mRS	0.498	0.000	0.556	0.000

3 讨论

PT、TT、FIB、APTT 为凝血功能检测的常用指标,反映了血小板功能及机体凝血情况,而血脂异常与粥样动脉硬化和 ACI 的发生发展关系密切。本研究中,急脑梗死患者凝血功能和血脂水平与患者 NIHSS 评分存在密切关系,且不同严重程度 ACI 患者存在明显差异。提示,随着急性脑梗死患者动脉粥样硬化发展,高血脂症风险增加,血液黏度进一步升高,促进了血栓的形成。

研究显示,心脑血管疾病程度和并发症与血浆

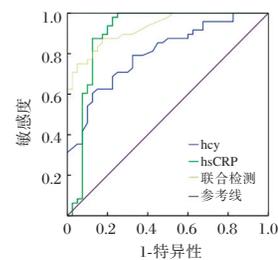


图1 Hcy、hs-CRP 及二者联合诊断 ACI 的 ROC 曲线
Figure 1 ROC curve of Hcy, hs-CRP and their combined diagnosis of ACI

Hcy 水平升高存在正相关性^[11]。Hcy 影响急性脑梗死发生发展的主要机制为其可加重血管内皮细胞毒性损伤,促进氧化应激反应过程并激活炎症感染反应;研究还证实^[12],Hcy 可影响脂质生理代谢过程。有研究表明^[13],高 Hcy 血症成为心脑血管疾病的新的独立危险因素;Hcy 可促进炎症细胞因子表达,炎症因子激增促进血栓形成,导致脑梗死的发生,是急性脑梗死的独立危险因素,这与本研究结果相似。

近年来,血清炎症因子与脑梗死的相关性逐渐受到人们关注。炎症反应可促进血栓形成,加剧动脉粥样硬化反应,导致脑梗死。hs-CRP 为肝细胞分泌的急性非特异性反应蛋白,hs-CRP 在机体受到炎症、创伤等损害时其水平快速升高,是反应炎症水平的稳定生化指标^[14-15]。本研究中 hs-CRP 在急性脑梗死患者中水平明显升高,并表现出与患者病情存在密切关系。由于随着急性脑梗死病情发展,

表4 血清 Hcy、hs-CRP 诊断 ACI 的价值分析

Table 4 Analysis of the value of serum Hcy and hs-CRP in diagnosis of ACI

指标	截断值	AUC	敏感度 (%)	特异度 (%)	约登指数	95%CI	P 值
Hcy	21.3 $\mu\text{mol/L}$	0.801	73.3	71.5	0.448	0.711-0.892	0.000
hs-CRP	19.9 mg/L	0.899	79.1	73.3	0.524	0.818-0.980	0.000
联合检测	-	0.928	81.2	79.7	0.609	0.879-0.978	0.000

梗死病灶面积明显扩大,颈动脉狭窄程度加重,脑组织缺氧缺血程度加重,神经功能缺损程度也随之升高,斑块性质更加不稳定,因而炎症反应更加剧烈。而高Hcy水平同样可激活炎症细胞因子表达,导致hs-CRP水平升高。相关性分析结果显示,hs-CRP与Hcy表现一致。但本研究中未考虑其他炎症因子水平的影响,可能对研究结果造成一定的影响;Hcy、hs-CRP诊断ACI的敏感度、特异度有待提高,因而二者更适合作为ACI诊断的辅助指标。

综上所述,急性脑梗死患者血清Hcy、hs-CRP与机体高血脂、高凝血状态、神经功能缺损存在密切关系,Hcy、hs-CRP对于急性脑梗死患者病情严重程度辅助评估具有显著价值。

参考文献

- [1] 栗静,田婷,石正洪,等.急性缺血性卒中患者颈动脉易损性斑块的临床分布特点及危险因素分析[J].解放军医学杂志,2016,41(9):740-745.
- [2] 马慧,杨丽亚,张欢,等.初发急性脑梗死患者颈动脉粥样硬化斑块性质及其与病情的关系[J].山东医药,2016,56(11):67-69.
- [3] Huang XL. Association of Serum Levels of Adipocyte Fatty Acid-Binding Protein and High-Sensitivity C Reactive Protein with Severity of Acute Ischemic Stroke [J]. Cell Biochem Biophys, 2015,72(2):359-361.
- [4] Xie JC, Lin YY, Liu XH, et al. Homocysteine is Associated with Exaggerated Morning Blood Pressure Surge in Patients with Acute Ischemic Stroke [J]. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2018,27(10):2650-2656.
- [5] 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.
- [6] Odderson IR. The National Institutes of Health Stroke Scale and Its Importance in Acute Stroke Management [J]. Phys Med Rehabil Clin N Am, 1999,10(4):787-800.
- [7] Gasecki AP, Ferguson GG, Eliasziw M, et al. Early endarterectomy for severe carotid artery stenosis after a nondisabling stroke: Results from the North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial[J]. Mosby, 1994,20(2):288-295.
- [8] Pullicino P, Nelson RF, Kendall BE, et al. Small deep infarcts diagnosed on computed tomography [J]. Neurology, 1980,30(10):1090-1096.
- [9] 盛莉.脑卒中患者临床神经功能缺损程度评分标准[J].中国乡村医药,1995,2(1):45.
- [10] Springer New York. Modified Rankin Scale [J]. Encycl Clin Neuro, 2011,40(3):438.
- [11] 张韶斌,陈斯亮,罗莞超,等.脑卒中患者血清可溶性CD14、同型半胱氨酸和7项血脂结果分析[J].分子诊断与治疗杂志,2017,9(2):100-103.
- [12] Cloonan L, Fitzpatrick KM, Kanakis AS, et al. Metabolic determinants of white matter hyperintensity burden in patients with ischemic stroke[J]. Atherosclerosis, 2015,240(1):149-153.
- [13] 孙原,崔凡凡,李冬梅,等.急性脑梗死患者 ox-LDL、hs-CRP、Hcy、FIB 表达水平及其与颈动脉狭窄的关系[J].中国老年学杂志,2020,40(2):250-254.
- [14] 赖永坤,吕伟标,李锦荣,等.冠心病患者超敏C反应蛋白及平均血小板体积的预测价值[J].热带医学杂志,2016,16(03):336-339.
- [15] Teng L, Meng R. Long Non-Coding RNA MALAT1 Promotes Acute Cerebral Infarction Through miRNAs-Mediated hs-CRP Regulation[J]. J Mol Neurosci, 2019,69(3):494-504.
- [4] 李天.肾素-血管紧张素-醛固酮系统基因多态性与原发性高血压的研究进展[J].中西医结合心血管病电子杂志,2019,7(5):15-17.
- [5] 袁会玲,张晓华,杨洪霞,等.血浆肾素-血管紧张素-醛固酮系统活性与原发性高血压患者靶器官损害的相关性[J].中国老年学杂志,2018,38(24):5889-5892.
- [6] 崔华,魏致民,蔡建芳,等.2000~2010年间4960例慢性阻塞性肺病住院患者合并高血压和糖/脂代谢紊乱情况调查[J].南方医科大学学报,2011,31(9):1498-1503.
- [7] 陈海荣,潘碧云,李名兰,等.高血压患者血浆肾素-血管紧张素-醛固酮系统活性水平与降压效果的关系[J].临床心血管病杂志,2017,33(9):875-879.
- [8] Yi Z, Du Y. Acupuncture combined with medication for morning blood pressure of essential hypertension [J]. Chin Acupunct Moxibust, 2018,38(4):340-343.
- [9] 梁莉红,谭振华,莫燕芳.肾素-血管紧张素-醛固酮系统指标联合检测诊断原发性高血压的临床意义[J].实验与检验医学,2018,36(4):591-593.
- [10] 周春红,高向阳,胡薇.原发性高血压病患者肾素-血管紧张素-醛固酮系统活性的影响因素分析[J].中国社区医师,2018,34(2):113-115.
- [11] 蒋灵霓,顾永林,张雷,等.肾性高血压患者肾素、血管紧张素及醛固酮测定的临床价值[J].国际检验医学杂志,2018,39(7):878-880.
- [12] 金卫东,李艳茹,陈娟.肥胖高血压患者血清瘦素与肾素-血管紧张素-醛固酮系统的相关性研究[J].中国心血管杂志,2017,22(2):98-102.
- [13] 陆霓虹,杜映荣,杨蕤,等.慢性阻塞性肺疾病合并原发性高血压患者的临床多因素分析[J].中国医学创新,2014,11(22):67-69.
- [14] 黄红,李燕,周燕,等.老年高血压患者血管紧张素转换酶和醛固酮合酶基因多态性与肾素血管紧张素醛固酮的关系[J].中华老年心脑血管病杂志,2020,22(1):15-19.
- [15] 黄杰辉.苯磺酸左旋氨氯地平治疗 COPD 伴发的高血压病疗效观察[J].中国现代药物应用,2017,11(13):142-143.
- [16] He Q, Li H, Rui Y, et al. Pentraxin 3 Gene Polymorphisms and Pulmonary Aspergillosis in Chronic Obstructive Pulmonary Disease Patients[J]. Clin Inf Dis, 2018,66(2):261-267.

(上接第1651页)

APRI和FIB4在慢性丙型肝炎肝纤维化诊断中的应用

叶向阳 邱荣仙 何雄志 胡震霆 郑锋锋 黄晓刚 黄庆华 林国贤*

[摘要] 目的 探讨血清学诊断指标[天门冬氨酸氨基转移酶与血小板比值指数(APRI)、基于4因子的肝纤维化指数(FIB4)]在诊断慢性丙型肝炎(CHC)肝纤维化程度中的应用价值。方法 选取接受肝组织病理检查的CHC患者317例,根据肝纤维化分期S0、S1、S2、S3、S4期,分成5组,检测ALT、AST、PLT水平;根据 $(AST/40 \mu/L) \times 100/PLT(10^9/L)$ 和 $(\text{年龄} \times AST)/(PLT \times ALT \text{的平方根})$ 公式分别计算APRI和FIB4值,分析其与肝纤维化程度的相关性。结果 APRI值在肝纤维化S0、S1、S2、S3、S4期中位数(四分位间距)分别为0.34(0.49)、0.47(0.66)、0.56(0.61)、0.68(0.80)、0.93(1.45)($P < 0.05$);FIB4值在S0、S1、S2、S3、S4期中位数(四分位间距)分别为1.58(1.10)、1.58(1.74)、2.15(1.65)、2.99(2.51)、3.56(4.09)($P < 0.05$)。Spearman相关性分析显示APRI和FIB4与肝纤维化分期显著相关($P < 0.05$)。结论 APRI和FIB4在诊断CHC患者肝纤维化程度中具有较高预测价值。

[关键词] 慢性丙型肝炎;天门冬氨酸氨基转移酶与血小板比值指数;基于4因子的肝纤维化指数;血小板计数;肝纤维化

Application of APRI and FIB4 in the diagnosis of liver fibrosis in chronic hepatitis C

YE Xiangyang, QIU Rongxian, HE Xiongzi, HU Zhenting, ZHENG Fengfeng, HUANG Xiaogang, HUANG Qinghua, LIN Guoxian

(Department of Infectious Disease, the Affiliated Hospital of Putian College, Putian, Fujian, China, 351100)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the diagnostic value of the aspartate aminotransferase-platelet ratio index (APRI) and fibrosis index based on 4 factor (FIB4) in the chronic hepatitis C (CHC) patients with liver fibrosis. **Methods** A total of 317 patients with CHC who underwent liver pathological examination were selected and divided into 5 groups according to liver fibrosis stages S0, S1, S2, S3, and S4. Then the levels of ALT, AST and PLT were detected and calculated APRI and FIB4 values, according to the formulas: $(AST/40 \mu/L) \times 100/PLT(10^9/L)$ and $(\text{age} \times AST)/(PLT \times ALT \text{ square root})$, respectively. The correlation between the APRI and FIB4 values and the degree of liver fibrosis were analyzed. **Results** Statistical analysis showed that the median (interquartile range) APRI values of S0, S1, S2, S3, and S4 in liver fibrosis were 0.34 (0.49), 0.47 (0.66), 0.56 (0.61), 0.68 (0.80), and 0.93 (1.45), respectively ($P < 0.05$). The median (interquartile range) values of FIB4 in S0, S1, S2, S3, and S4 were 1.58 (1.10), 1.58 (1.74), 2.15 (1.65), 2.99 (2.51), and 3.56 (4.09), respectively ($P < 0.05$). Spearman correlation analysis showed that APRI and FIB4 were significantly related to liver fibrosis stages ($P < 0.05$). **Conclusion** APRI and FIB4 have high predictive value in the diagnosis of liver fibrosis stages in patients with CHC.

[KEY WORDS] Chronic hepatitis C; Aspartate aminotransferase-platelet ratio index; Fibrosis index based on 4 factor; Platelet count; Liver fibrosis

基金项目:莆田市科技计划项目(2018S3F001)

作者单位:莆田学院附属医院感染性疾病科,福建,莆田 351100

*通信作者:林国贤, E-mail:lingx609@163.com

慢性丙型肝炎(Chronic Hepatitis C, CHC)是由丙型肝炎病毒(HCV)引起以肝脏局部慢性炎症损伤为主的全身性、慢性感染性疾病^[1]。我国是慢性丙型肝炎高发的国家,感染丙肝病毒后可引起肝硬化、肝功能衰竭,甚至发展为肝癌^[2]。肝纤维化是CHC发展为肝硬化的病理过程,因此及时准确地评估肝纤维化程度对慢性丙型肝炎患者的病情预测,治疗方案的选择及预后有重要的意义。肝脏穿刺活体组织检查被认为是肝脏纤维化诊断的“金标准”,但因其有创伤性,成本高,难以动态的监测患者病情变化,存在取样误差等局限性,极大的限制了其临床应用。因此,寻找一种无创、可重复性高的常规诊断丙型肝炎肝纤维化的检查方法十分重要。目前已建立了多种用于肝纤维化无创诊断的模型,其中,天门冬氨酸氨基转移酶与血小板比值指数(aspartate aminotransferase-platelet ratio index, APRI)和基于4因子的肝纤维化指数(fibrosis index based on 4 factor, FIB4)因简单快捷、易行计算、价格便宜被广泛用于临床^[3-4]。本研究分析APRI和FIB4与CHC患者肝纤维化分期的关系,探讨APRI和FIB4在肝纤维化诊断中的应用价值。

1 材料与方法

1.1 一般资料

选取2010年1月至2015月期间本院收治的317例慢性丙型肝炎患者进行研究。慢性丙型肝炎的诊断符合2000年西安会议修订的《病毒性肝炎防治方案》^[5]。所有患者均无抗病毒和抗肝纤维化治疗史,排除合并甲、乙、丁、戊型肝炎病毒、人类免疫缺陷病毒(HIV)感染;排除患有酒精性肝炎、药物性肝炎、脂肪肝、Wilson病、自身免疫性肝炎、抗胰蛋白酶缺乏症、系统性红斑狼疮(SLE)及肝癌等疾病。本研究通过莆田学院附属医院伦理委员会审核同意,所有患者签署知情同意书。

1.2 实验室检查

入选患者均于肝穿活检前后2周内抽取8 mL静脉血,HCV抗体采用HCV ELISA试剂盒(型号BF10092,品牌BioFront),HCV RNA采用实时荧光定量PCR(型号CG-02/05,品牌HEAL FORCE)法检测;肝功能采用cobas-c702全自动生化分析仪进行检测,血常规采用sysmex XN-3000进行检测,记录患者的丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)和血小板计数(PLT)情况。将

ALT、AST、PLT检测结果的峰值纳入分析。并进一步计算APRI和FIB4指数:APRI计算公式:(AST/ULN)×100/PLT(10⁹/L),ULN为正常值按上限40 μ/L计算。FIB4计算公式:(年龄×AST)/(PLT×ALT的平方根)。

1.3 肝穿活检病理检查

入选患者肝穿活检前进行常规彩超(GE, LOGIQ E9)定位。检测患者肝脏有无胆囊、血管畸形、进针角度及深度。采用肝穿活检针(16G)穿刺活检,活检肝组织长度≥1.0 cm或含完整汇管区3个以上。标本应用南京军区福州总医院常规病理固定盒固定,由南京军区福州总医院病理科进行常规石蜡包埋、切片、HE及网状纤维染色。光学显微镜镜下观察后交由病理医师阅片,按照《病毒性肝炎防治方案》的组织病理学诊断标准对肝纤维化程度进行分期。肝组织纤维化程度分S0, S1, S2, S3和S4期,S0:无纤维化;S1:汇管区纤维化,局部窦周及小叶内纤维化;S2:汇管区周围纤维化,纤维隔形成,小叶结构保留;S3:纤维间隔伴小叶结构紊乱,无肝硬化;S4:早期肝硬化。

1.4 统计学处理

采用SPSS 11.5软件进行统计学分析。符合正态分布的计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用F检验,非正态分布计量资料以中位数(四分位间距)[M(IQR)]表示,组间比较采用秩和检验和 χ^2 检验。两个变量相关分析应用Spearman相关分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 受试者特征

317例慢性HCV患者一般情况。见表1。

表1 受试者一般特征($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Patients aseline characteristics ($\bar{x} \pm s$)

项目	检测值	极大值	极小值
年龄(岁)	52.18±10.01	81	19
ALT(U/L)	99.51±190.96	1906	7
AST(U/L)	79.99±171.09	2304	4
PLT(10 ⁹ /L)	174.37±61.91	372	2

2.2 受试者纤维化程度与年龄、ALT、AST和PLT的关系

S不同分期的PLT数值比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),S分期越高ALT中位数值、平均秩次(\bar{R})越大。差异有统计学意义($P < 0.05$),对S不

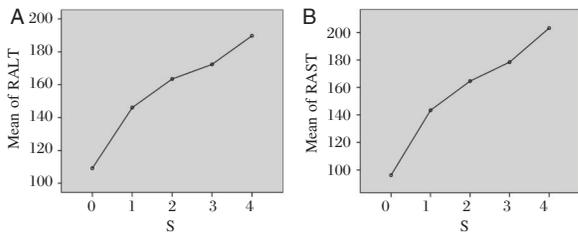
同分期的AST水平进行比较,发现S不同分期的AST水平存在显著性差异($P<0.05$),且随着S分期的升高AST中位数值和 \bar{R} 逐渐增加。见表2。

表2 比较不同程度肝纤维化患者PLT、ALT和AST的水平

Table 2 Comparison the level of PLT, ALT and AST in different degrees of liver fibrosis

项目	n	PLT (10 ⁹ /L)	ALT (U/L)	\bar{R}	AST (U/L)	\bar{R}
0	59	178.18±49.99	29.00(66.80)	109.19	25.60(32.50)	96.19
1	99	189.27±63.61	49.50(66.50)	146.09	39.65(47.00)	143.41
2	78	171.14±60.11	50.00(74.05)	163.47	47.00(56.50)	164.61
3	48	161.54±66.91	64.00(81.15)	172.36	53.00(33.20)	178.41
4	33	149.18±63.50	80.25(58.75)	189.75	66.50(55.78)	203.15
F/ χ^2 值		3.26	23.24		39.60	
P值		0.012	<0.0001		<0.0001	

Spearman 相关分析显示肝纤维化程度与PLT呈负相关($r=-0.240, P<0.05$),与年龄($r=0.174, P=0.05$)、ALT($r=0.272, P<0.05$)、AST($r=0.350, P<0.05$)呈正相关。S不同分期ALT的 \bar{R} 分布显示,随着肝纤维化程度的加重,ALT水平升高($P<0.05$),见图1A。S不同分期AST的 \bar{R} 分布显示,随着肝纤维化程度的加重,AST水平升高($P<0.05$),见图1B。



注:A为ALT的 \bar{R} 分布;B为AST的 \bar{R} 分布。

图1 不同程度肝纤维化患者ALT和AST水平的 \bar{R} 分布
Figure 1 The average rank \bar{R} distribution of ALT and AST in different degree of liver fibrosis

2.3 APRI和FIB4在肝纤维化诊断中的应用价值

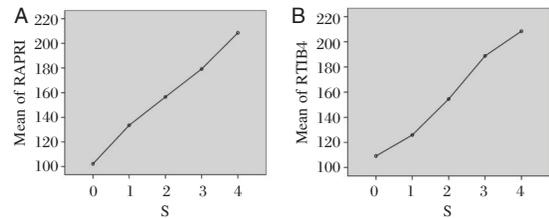
S不同分期的APRI指数比较,差异有统计学意义($P<0.05$),随着S分期的升高APRI中位数值和 \bar{R} 逐渐增大。对不同S分期FIB4指数进行比较,结果显示S不同分期的FIB4指数比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。尤其在S1-S4期,随着S分期的升高FIB4中位数值和 \bar{R} 逐渐增加。见表3。

S不同分期的APRI的 \bar{R} 分布显示,随着肝纤维化程度的加重,APRI指数升高($P<0.05$),见图2A。S不同分期的FIB4的 \bar{R} 分布显示,随着肝纤维化程度的加重,FIB4指数升高($P<0.05$),见图2B。

表3 比较不同程度肝纤维化患者APRI和FIB4的水平

Table 3 Comparison the level of APRI and FIB4 in different degrees of liver fibrosis

S	n	APRI (U/L)		FIB4 (U/L)	
		[M(IQR)]	\bar{R}	[M(IQR)]	\bar{R}
0	59	0.34(0.49)	102.16	1.58(1.10)	109.18
1	99	0.47(0.66)	133.50	1.58(1.74)	125.89
2	78	0.56(0.61)	156.49	2.15(1.65)	154.48
3	48	0.68(0.80)	179.19	2.99(2.51)	188.77
4	33	0.93(1.45)	208.52	3.56(4.09)	208.45
χ^2		40.25		43.52	
P值		<0.05		<0.05	



注:A为APRI的 \bar{R} 分布;B为FIB4的 \bar{R} 分布。

图2 不同程度肝纤维化患者APRI和FIB4水平的 \bar{R} 分布
Figure 2 The average rank \bar{R} distribution of ALT and AST in different degree of liver fibrosis

3 讨论

近年来,肝纤维化无创诊断方法逐渐成为研究热点,其中无创诊断数学模型的研究尤为突出,如HMC-CU、Actitest/Fibrotest、D4FS等^[6-8]。但是,多数模型中涉及的参数为非常规临床实验室检查项目,在一定程度上限制了临床应用。APRI和FIB4的参数均为基础和常规的检查项目,操作简便。研究表明,APRI和FIB4作为一种无创诊断数学模型,在肝纤维化诊断方面具有优势^[9-12]。本研究通过分析不同肝纤维化分期患者FIB4和APRI值,探讨APRI和FIB4在CHC肝纤维化诊断中的应用。

ALT、AST直接反应肝脏炎症水平,波动较大,与肝脏纤维化无明显相关^[13]。在本研究中,通过 Spearman 相关性分析,发现 ALT 和 AST 水平与肝纤维化严重程度呈弱相关。但是,当 ALT、AST 明显升高时,可显著影响 APRI 和 FIB4 评分值。故当 ALT、AST 显著升高时,仍强烈建议慢性丙型肝炎患者进行肝活检。此外,研究结果提示 PLT $<150\times 10^9/L$,应高度警惕早期肝硬化发生。ALT、AST 和 PLT 水平与 CHC 肝纤维化程度显著相关,提示与之为基础计算的 APRI 和 FIB4 值对诊断纤维化程度具有应用价值。

本研究结果显示 APRI 值随肝纤维化分期的升高而明显增加,尤其是当 APRI 值达到或高于 S1 期的中位水平 0.47 U/L 时,预示出现了肝脏纤维化发生的危险性。《慢性丙型肝炎防治指南》(2019 年版)中指出,成人中 APRI 值 >2 ,预示患者已经发生肝硬化^[14],该值超过了本研究 S4 期的中位数值 0.93 U/L。APRI 在预测肝炎相关纤维化方面具有较高的敏感性与特异性,且与肝纤维化分期具有较好的一致性^[10],但是,APRI 值以波动较大的 ALT 和 AST 水平为计算基础,这可能是本研究与其它研究结果存在差异的原因。既往研究结果表明,APRI 预测肝纤维化的准确性要低于 FIB4^[10]。FIB4 指数评价系统能够使 70% 以上的患者最终避免肝活检^[15]。本研究也显示,FIB4 值随肝纤维化分期的提高而显著增加,尤其是当 FIB4 值达到或高于 S2 期的中位水平 $M=2.15$ U/L,预示着肝脏纤维化发生的危险性。FIB4 对于慢乙肝肝纤维化患者的诊断具有良好的预测价值,这与以往丙肝患者的报道相类似,但在最优界值仍存在一定差异,可能与两种慢性肝炎病毒学特征、发病机制及机体免疫机制不同有关^[11,15]。

综上所述,APRI 和 FIB4 值与 CHC 患者肝纤维化分期相关,尤其是,当 APRI 值 ≥ 0.47 U/L, FIB4 值 ≥ 2.15 U/L 时,应警惕肝纤维化发生。APRI 和 FIB4 值对肝纤维化分期的诊断具有一定的临床参考价值,对临床 CHC 患者制定适当的治疗方案有一定的指导意义。

参考文献

[1] Mauss S, Pol S, Buti M, et al. Late presentation of chronic viral hepatitis for medical care: a consensus definition [J]. BMC Med, 2017, 15(1): 92.
 [2] Debes JD, Janssen HL, Boonstra A. Hepatitis C treatment and liver cancer recurrence: cause for concern [J]. Lancet Gastroenterol Hepatol, 2017, 2(2): 78-80.

[3] Liu CJ, Tseng TC, Yang WT, et al. Profile and value of FIB-4 in patients with dual chronic hepatitis C and B [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2019, 34(2): 410-417.
 [4] Cheng CH, Chu CY, Chen HL, et al. Subgroup analysis of the predictive ability of aspartate aminotransferase to platelet ratio index (APRI) and fibrosis-4 (FIB-4) for assessing hepatic fibrosis among patients with chronic hepatitis C [J]. J Microbiol Immunol Infect, 2020, 53(4): 542-549.
 [5] 中华医学会传染病与寄生虫病学分会, 肝病学会. 病毒性肝炎防治方案 [J]. 中华肝病杂志, 2000, 5(4): 257-263.
 [6] Abdelaziz AO, Nabil MM, Omran DA, et al. Hepatocellular Carcinoma Multidisciplinary Clinic-Cairo University (HMC-CU) score: A new simple score for diagnosis of HCC [J]. Arab J Gastroenterol, 2020, 21(2): 102-105.
 [7] Zarski JP, David-Tchouda S, Trocme C, et al. Non-invasive fibrosis tests to predict complications in compensated post-hepatitis C cirrhosis [J]. Clin Res Hepatol Gastroenterol, 2020, 44(4): 524-531.
 [8] Da BL, Surana P, Kleiner DE, et al. The Delta-4 fibrosis score (D4FS): A novel fibrosis score in chronic hepatitis D [J]. Antiviral Res, 2020, 174: 104691. .
 [9] Cheng CH, Chu CY, Chen HL, et al. Subgroup analysis of the predictive ability of aspartate aminotransferase to platelet ratio index (APRI) and fibrosis-4 (FIB-4) for assessing hepatic fibrosis among patients with chronic hepatitis C [J]. J Microbiol Immunol Infect, 2020, 53(4): 542-549.
 [10] Udompap P, Sukonrut K, Suvannareg V, et al. Prospective comparison of transient elastography, point shear wave elastography, APRI and FIB-4 for staging liver fibrosis in chronic viral hepatitis [J]. J Viral Hepat, 2020, 27(4): 437-448.
 [11] Papadopoulos N, Vasileiadi S, Papavdi M, et al. Liver fibrosis staging with combination of APRI and FIB-4 scoring systems in chronic hepatitis C as an alternative to transient elastography [J]. Ann Gastroenterol, 2019, 32(5): 498-503.
 [12] Ragazzo TG, Paranagua-Vezozzo D, Lima FR, et al. Accuracy of transient elastography-FibroScan®, acoustic radiation force impulse (ARFI) imaging, the enhanced liver fibrosis (ELF) test, APRI, and the FIB-4 index compared with liver biopsy in patients with chronic hepatitis C [J]. Clinics (Sao Paulo), 2017, 72(9): 516-525.
 [13] Gawrieh S, Wilson LA, Cummings OW, et al. Histologic Findings of Advanced Fibrosis and Cirrhosis in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease Who Have Normal Aminotransferase Levels [J]. Am J Gastroenterol, 2019, 114(10): 1626-1635.
 [14] 中华医学会肝病学会, 中华医学会感染病学分会. 丙型肝炎防治指南(2019 年版) [J]. 中华临床感染病杂志, 2019, 13(1): 1-18.
 [15] Li X, Xu H, Gao P. Fibrosis Index Based on 4 Factors (FIB-4) Predicts Liver Cirrhosis and Hepatocellular Carcinoma in Chronic Hepatitis C Virus (HCV) Patients [J]. Med Sci Monit, 2019, 25: 7243-7250.

呼出气冷凝液、血清和组织中 miRNA34a 检测对非小细胞肺癌患者的价值探讨

陶国华¹ 孙芊芊² 陈金亮² 陈建荣^{2*}

[摘要] **目的** 探讨呼出气冷凝液、血清和组织中 miRNA34a 表达水平检测对非小细胞肺癌患者的应用价值。**方法** 应用实时定量聚合酶链反应(RQ-PCR)技术检测 50 例病理证实为 NSCLC 患者的 EBC、血清及其中 30 例手术患者癌组织、癌旁组织和 50 例健康人群的血清及 EBC 标本中 miRNA34a 的相对表达水平,用化学发光法检测血清癌胚抗原(CEA)和细胞角蛋白 19 的可溶性片段(CYFRA21-1)。**结果** NSCLC 患者癌组织、血清及 EBC 中 miRNA34a 的相对表达量均低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。晚期(Ⅲ~Ⅳ期)NSCLC 患者癌组织、血清和 EBC 中 miRNA34a 的表达量低于早期(Ⅰ~Ⅱ期)患者,差异有统计学意义($P<0.05$)。EBC 中 miRNA34a 在诊断 NSCLC 的在灵敏度和特异度分别为:72%、78%,与血清 CEA 和 CYFRA21-1 联合应用,诊断 NSCLC 的在灵敏度和特异度分别为:78.3%、82.1%。**结论** EBC 中 miRNA34a 的表达量与非小细胞肺癌患者的 TNM 分期有关。EBC 中 miRNA34a 与血清 CEA 和 CYFRA21-1 联合应用可提高 NSCLC 诊断的灵敏度和特异度。

[关键词] 非小细胞肺癌;呼出气冷凝液;miRNA34a

The value of detection of miRNA34a in exhaled air condensate, serum and tissues in patients with non-small cell lung cancer

TAO Guohua¹, SUN Pingping², CHEN Jinliang², CHEN Jianrong²

(1. Clinical Laboratory, The First People's Hospital of Nantong, Nantong, Jiangsu, China, 226001;

2. Pneumology Department, The First People's Hospital of Nantong, Nantong, Jiangsu, China, 226001)

[ABSTRACT] **Objective** To compare the expression level of miRNA34a in exhale condensate (EBC), serum and tissues of patients with non-small cell lung cancer (NSCLC). To evaluate the value of EBC miRNA34a in the diagnosis of NSCLC. **Methods** Real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) technology was used to detect the EBC and serum of 50 patients with NSCLC confirmed by pathology and 30 patients with cancerous tissues and adjacent tissues from surgery and 50 healthy people. The relative expression level of miRNA34a in serum and EBC specimens was measured and analysis. Chemiluminescence was used to detect serum carcinoembryonic antigen (CEA) and soluble fragments of cytokeratin 19 (CYFRA21-1). **Results** The relative expression of miRNA34a in cancer tissue, serum and EBC in NSCLC patients was lower than that in the control group ($P<0.05$). The expression of miRNA34a in cancer tissue, serum and EBC in advanced (stage Ⅲ-Ⅳ) non-small cell lung cancer was lower than that in early (stage Ⅰ-Ⅱ) lung cancer ($P<0.05$). The sensitivity and specificity of miRNA34a in the diagnosis of NSCLC in EBC were 72% and 82%, respectively. The sensitivity and specificity of miRNA34a, CEA and CYFRA21-1 in the diagnosis of NSCLC were 78.3% and 82.1%, respectively. **Conclusion** The expression level of miRNA34a in EBC is related to the

基金项目:江苏省卫生厅面上科研课题(H201454)

作者单位:1. 江苏省南通市第一人民医院检验科,江苏,南通 226001

2. 江苏省南通市第一人民医院呼吸科,江苏,南通 226001

*通信作者:陈建荣, E-mail:ntycejr@126.com

TNM stage of non-small cell lung cancer patients. The combined application of miRNA34a in EBC with serum CEA and CYFRA21-1 can improve the sensitivity and specificity of NSCLC diagnosis.

[KEY WORDS] Non-small cell lung cancer; Exhaled breath condensate; miRNA34a

肺癌是人类危害最大的恶性肿瘤,其发病率和死亡率在世界上高居榜首。2019年国家癌症中心报告:2015年数据统计结果肺癌位居我国恶性肿瘤发病首位,占城市和农村恶性肿瘤死亡第一位^[1]。肺癌根据病理类型可分为非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)和小细胞肺癌(small cell lung cancer, SCLC)两大类,肺癌中80%~85%是非小细胞肺癌^[2-3]。微小核糖核酸(MicroRNA, miRNA)是一类非编码小分子RNA, miRNA 作为一类重要的参与基因表达调控的分子,代表了一种新的基因表达调控模式,它在细胞中调节约30%的蛋白编码基因,在致病过程中起着重要作用^[4]。迄今为止,活检是肺癌患者诊断参考标准。不幸的是组织活检是一个有限制的过程,如难以进入不同的肿瘤部位,具有侵袭性和患者依从性低等缺陷^[5]。呼出气冷凝液(exhaled breath condensates, EBC)是一种检测呼吸道生化成分的新技术。EBC来自几乎所有的呼吸细胞类型,包括结构细胞和免疫细胞。EBC作为呼吸道气道内衬液体含有多种生物分子,如DNA, RNA, 蛋白质, 代谢物和挥发性化合物。它作为一种新的非侵入性采集的样品,正逐渐受重视。目前为止,对于肿瘤组织和血液中miRNAs的研究报道较多,而EBC中的相关研究较少。本研究将探讨NSCLC患者EBC中miRNA34a的相对表达水平和血清中CEA、CYFRA21-1的含量,其表达量与临床的相关性,并评价其在NSCLC中的应用价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2016年6月至2017年12月在本院呼吸科和胸外科接受治疗并经病理证实为非小细胞肺癌的50例患者为研究对象,男性27例,女性23例,年龄42~83岁。纳入标准:①所有患者均符合《原发性肺癌诊疗规范(2018年版)》NSCLC诊断标准^[6];②所有患者手术前均未进行过放疗、化疗、免疫治疗及靶向治疗③所有患者知情同意本研究并签署知情同意书。排除标准:①存在手术禁忌症者;②除NSCLC外存在其他恶性肿瘤者;③存

在原发性肝肾、功能障碍者;④临床病例资料不完整或缺乏准确性者。对照组为到本院体检的健康人群50例,其中男性28例,女性22例,年龄34~78岁,纳入标准:①无家族肿瘤史;②无脑心肝肾和消化系统等重要脏器疾病。③体检者知情同意本研究并签署知情同意书。排除标准:①存在肺部结节者;②有高血压、糖尿病史者。肺癌组和对照组在年龄、性别及吸烟史方面比较差异无统计学意义($P>0.05$)。见表1。

表1 两组一般资料比较($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Comparison of general data between 2 groups ($\bar{x}\pm s$)

资料	NSCLC组 (n=50)	对照组 (n=50)	t/ χ^2 值	P值
年龄(岁)	63.46±10.96	62.36±7.57	0.584	0.551
性别(男/女)	27/23	28/22	0.199	0.837
吸烟史(有/无)	18/32	15/35	1.489	0.236

1.2 主要仪器和试剂

采用miRNA提取分离试剂盒(批号:R6529)、增强型miRNA cDNA第一链合成试剂盒(批号:R6519)、增强型miRNA荧光定量检测试剂盒(批号R6510),试剂均购于北京天根生化科技有限公司。使用的主要仪器有荧光定量PCR仪(ABI, StepOne Plus)、微量分光光度计OneDrop 1000+(松下电器中国有限公司上海分公司)、EcoScreen冷凝器和Master Screen简易冷凝器(德国EricJaeger Company)。德国罗氏602全自动化学发光分析仪。

1.3 方法

1.3.1 标本采集

使用真空管采集各研究对象静脉全血5 mL, 1 000×g离心10 min,分离血清样本($\geq 500 \mu\text{L}$),使用无核酸酶(RNase)离心管进行分离,置于-70℃保存备用。NSCLC患者在入院的第一天行外周血标本采集。对照组则在体检期间进行外周血标本采集。抽取患者和健康人群术前静脉血5 mL于促凝管内,1 000×g离心5 min后取上清放入无RNase离心管,保存于-70℃冰箱备用。用EcoScreen冷凝器或者Master Screen简易冷凝器预冷15 min,嘱受试者漱口、戴鼻夹,经咬嘴平静呼

吸 20 min 后取出收集管,待标本融化后可得到 2~4 mL 液体即 EBC,随即放入无 RNase 的离心管中,保存于 -70℃ 冰箱备用。

1.3.2 总 RNA 的提取

采用北京天根生化科技有限公司生产的组织、血液 miRNA 提取分离试剂盒对组织、血液和 EBC 样本进行 RNA 的提取。

1.3.3 RNA 含量和纯度测定

按照微量分光光度计 OneDrop 1000+操作手册,对提取的 miRNAs 进行浓度及纯度进行测定。RNA 样品浓度采用郎伯比尔定律进行计算,采用 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值评价 RNA 样品纯度。

1.3.4 参照基因的选择

本研究选择在组织细胞中稳定表达、且应用最多的 U6 作为 NSCLC 患者组织中的参照基因,选 cel-miR-39 作为血清和 EBC 中目的基因检测时的参照基因。反应体系: cDNA 2 μL, miRNA 荧光定量检测试剂 10 μL, 引物终浓度 200 mM, 反应体积为 20 μL。反应条件: 预变性: 94℃, 2 min, 94℃, 20 s; 64℃, 34 s, 40 个循环。引物序列见表 2。

表 2 miRNA34a 和参照基因引物序列

基因	引物序列
miRNA34a 上游引物	5'-TGGCAGTGCTTAGCTGGTTG-3'
下游引物	5'-GCGAGCACAGAATTAATACGAC-3'
U6 上游引物	5'-CTCGCTTCGGCAGCACAT-3'
下游引物	5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'
cel-miR-39 上游引物	5'-GGCCTCACCGGTGTAAATCAG-3'
下游引物	5'-AGTGCAGGGTCCGAGGTAT-3'

1.3.5 CEA、CYFRA21-1 的检测

采用化学发光法,按照罗氏 602 全自动化学发光分析仪测定试剂盒说明书检测,CEA 参考范围: <5 μg/L。CYFRA211 参考范围: <3.5 μg/L。

1.4 统计学处理

采用 SPSS Statistics 20.0 软件进行数据统计处理。计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示,计量资料先做正态性检验 (K-S 检验),若数据符合正态分布,组间比较

采用 *t* 检验;若不符合正态分布,采用两独立样本的非参数检验 (Mann-Whitney 法)。计数资料用 *n* (%) 表示,两组比较采用 χ^2 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 组织、血清和 EBC 中 miRNA34a 的表达水平情况

肺癌组织中 miRNA34a 的相对表达水平低于癌旁组织,差异有统计学意义 (*P* < 0.05)。非小细胞肺癌组血清和 EBC 中 miRNA34a 的相对表达水平均低于健康对照组,差异有统计学意义 (*P* < 0.05)。见表 3。

表 3 组织、血清和 EBC 中 miRNA34a 的表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

样本类型	<i>n</i>	miRNA34a 相对表达水平		<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
		NSCLC 组	健康对照组		
肺癌组织	30	0.898±0.957		5.312	0.00
癌旁组织	30	1.527±1.282			
血清	50	0.795±1.179	1.477±1.262	6.496	0.00
EBC	50	0.724±1.157	1.355±1.042	6.222	0.00

2.2 不同病理类型和不同 TNM 分期 miRNA34a 表达水平

III~IV 期 NSCLC 患者组织、血清、EBC 中 miRNA34a 表达水平均低于 I~II 期患者,差异有统计学意义 (*P* < 0.05); 鳞癌患者 EBC 和血清中 miRNA34a 相对表达量虽低于腺癌患者,差异无统计学意义 (*P* > 0.05)。见表 4。

2.3 两组血清 miR34a、CEA、CYFRA21-1 水平比较

K-S 检验结果显示,各组的 miRNA34a、CEA、CYFRA21-1 的数据均呈偏态分布 (*P* < 0.05)。Mann-Whitney U 检验结果显示,与对照组比较,NSCLC 组的血清 miRNA34a 表达水平明显降低,差异有统计学意义 (*P* < 0.05),而 CEA、CYFRA21-1 水平明显升高,差异有统计学意义 (*P* < 0.05)。见表 5。

表 4 不同病理类型和不同 TNM 分期 miRNA34a 表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

项目	<i>n</i>	miRNA34a 相对表达水平		<i>t</i> 值	<i>P</i> 值	miRNA34a 相对表达水平		<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
		腺癌 (<i>n</i> =24)	鳞癌 (<i>n</i> =6)			I~II 期 (<i>n</i> =20)	III~IV 期 (<i>n</i> =10)		
组织	30	0.502±0.421	0.998±1.032	1.958	0.021	1.247±1.001	0.201±0.156	6.324	0.000
血清	50	0.969±1.351	0.865±1.346	1.465	0.149	1.437±1.525	0.330±0.487	8.721	0.000
EBC	50	0.424±0.554	0.422±0.497	1.462	0.150	1.223±1.600	0.362±0.407	10.574	0.000

表5 两组的血清 miRNA34a、CEA、CYFRA211 含量比较 [M(P25, P75)]

Table 5 Content of miRNA34a, CEA and CYFRA21-1 in serum between 2 groups [M(P25, P75)]

参数	对照组 (n=50)	NSCLC 组 (n=50)	Z 值	P 值
miRNA34a	1.8(0.9, 4.3)	0.7(0.2, 1.9)	-3.058	0.010
CEA	2.3(0.5, 4.7)	12.5(5.1, 20.2)	-8.593	0.000
CYFRA21-1	1.6(0.2, 3.4)	6.7(3.3, 11.4)	-10.058	0.000

2.4 EBC miRNA34a、CYFRA21-1 和 CEA 诊断肺癌的敏感性和特异性

EBC miRNA34a、CYFRA21-1 和 CEA 三者联合诊断敏感度和特异度均高于单一诊断值, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 6。

表6 EBC miRNA34a、CYFRA21-1 和 CEA 诊断肺癌敏感度、特异度

Table 6 Sensitivity and specificity of EBC miRNA34a, CYFRA21-1 and CEA in diagnosis of lung cancer

指标	诊断 分界点	敏感度		特异度	
		均值	95%CI	均值	95%CI
EBC miRNA34a	0.68	72.0	68.1~82.7	78.0	71.2~86.3
CYFRA21-1(μg/L)	3.50	66.8	50.2~74.1	76.6	69.5~86.1
CEA(μg/L)	5.00	63.6	51.2~76.3	73.6	63.6~84.1
联合检测		78.3	65.3~86.7	82.1	77.2~90.3

3 讨论

2016年世界卫生组织公布的全球死亡病因统计分析结果, 其中气管癌、支气管癌和肺癌排名第6^[7]。2019年国家癌症中心报告肺癌位居我国恶性肿瘤发病首位, 在城市和农村均占恶性肿瘤死亡第一位^[1]。有研究表明对于早期非小细胞肺癌患者中位生存期远远长于晚期患者, 因此提高早期非小细胞肺癌患者的检出率至关重要。

miRNA 是一类非编码小分子 RNA, 在基因表达中发挥“交通警察”的作用, 调控基因表达^[2]。Hu^[4]等人研究发现有 14 种 miRNA 在非小细胞肺癌中显著失调, miRNA 在转录后水平负调控基因表达。miRNA34a 是 miRNA34 家族的一员, 是一类高度保守的 miRNA, miRNA34 家族与多种疾病相关。miRNA34a 有多个作用位点, 与细胞的生长、肿瘤的转移都有关系^[4-5]。研究表明, miRNA34 在多种肿瘤中, 如肺癌、大肠癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、尿路上皮癌和肾癌中都会有不同程度的表达下降。Kasinski^[8]等人在小鼠肺癌模型中

发现 p53 基因和 miRNA34a 基因的相关性, 并由此推断 miRNA34a 在肺癌发生中发挥预防剂和静止剂的作用。miRNA34a 属于抑癌基因, 可通过与癌基因 (如 c-myc、BCL-2、E2F3、Cyclin D1 及 Cyclin E2 等) 相结合, 促进肿瘤细胞周期停滞于 G1 期, 抑制肿瘤细胞增殖, 促进肿瘤细胞凋亡。有研究认为, miRNA-34a 不仅是治疗 NSCLC 的有前途的分子靶点, 而且还是一种有用的、新的 NSCLC 的预后标志物^[9]。本研究结果显示 NSCLC 患者癌组织中 miRNA34a 表达与 TNM 分期相关, 与其它学者的研究结果相一致^[10]。单一的肿瘤标志物检测没有足够的灵敏度和特异性, 因此, 需要敏感、特异的标志物组合来提高肿瘤诊断的敏感性和特异性^[11]。本研究对 EBC 中 miRNA34a、血清 CEA 和 CYFRA21-1 对 NSCLC 诊断价值进行了分析, 联合检测可有效提高其诊断的敏感性和特异性。由于本研究样本量较小, 在将其应用于临床作为筛查试验之前, 还需要进行大规模的多中心临床研究来验证其有效性。

总之, 随着对非小细胞肺癌分子生物学研究的深入, 基于肿瘤标志物的诊断及预后研究将会有越来越多的发现, EBC 中的 miRNA34a 检测对 NSCLC 的诊断价值值得进一步深入研究。

参考文献

- [1] 郑荣寿, 孙可欣, 张思维, 等. 2015年中国恶性肿瘤流行情况分析[J]. 中华肿瘤杂志, 2019, 41(1): 19-28
- [2] Ettinger DS, Wood DE, Akerley W, et al. Non-Small Cell Lung Cancer, Version 6.2015 [J]. J Natl Compr Canc Netw, 2015, 13(5): 515-524.
- [3] 龚新华, 杨通, 刘文丹, 等. 趋化因子受体 CXCR4 在非小细胞肺癌中的表达和临床意义[J]. 热带医学杂志, 2016, 16(7): 829-831+956.
- [4] 欧志英, 夏慧敏. MicroRNA 在肿瘤分子诊断中的应用[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2013, 5(1): 1-6.
- [5] Xie W, Wang L, Sheng H, et al. Metformin Induces Growth Inhibition and Cell Cycle Arrest by Upregulating MicroRNA34a in Renal Cancer Cells [J]. Med Sci Monit, 2017, 23: 29-37.
- [6] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 原发性肺癌诊疗规范(2018年版) [S/OL]. [2018-12-25]. <http://www.nhc.gov.cn/ewebeditor/uploadfile/2019/01/20190109113347102.docx>.
- [7] 宋昕. WHO 公布全球十大死亡原因 [J]. 中华灾害救援医学, 2018, 6(11): 661.
- [8] Kasinski AL, Slack FJ. miRNA-34 Prevents Cancer Initiation and Progression in a Therapeutically Resistant K-ras and p53-induced Mouse Model of Lung Adenocarcinoma [J]. Cancer Res, 2012, 72(21): 5576-5587.

(下转第 1669 页)

动脉瘤性蛛网膜下腔出血患者外周血 miR-210 与 TLR4 表达的相关性及临床意义

陈明¹ 张清秀² 魏秀娥^{2*}

[摘要] 目的 研究动脉瘤性蛛网膜下腔出血(aSAH)患者外周血 miR-210 与 Toll 样受体 4 (TLR4)表达的相关性及临床意义。方法 选择2015年6月至2019年6月期间在本院进行手术治疗的55例aSAH患者作为aSAH组、70例健康志愿者作为对照组,检测外周血 miR-210、TLR4 的表达水平及血清白介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、基质金属蛋白酶-9(MMP9)的含量,评估aSAH患者的脑血管痉挛(CVS)及预后。结果 aSAH患者外周血 miR-210 的表达水平低于对照组,外周血 TLR4 的表达水平及血清中 IL-6、TNF- α 、MMP9 的含量高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。miR-210 与 TLR4、IL-6、TNF- α 、MMP9 呈负相关($P < 0.05$),TLR4 与 IL-6、TNF- α 、MMP9 呈正相关($P < 0.05$)。aSAH 组中 CVS 患者外周血 miR-210 的表达水平低于非 CVS 患者($P < 0.05$)、TLR4 的表达水平高于非 CVS 患者($P < 0.05$),预后不良患者外周血 miR-210 的表达水平低于预后良好患者、TLR4 的表达水平高于预后良好患者($P < 0.05$);经 ROC 曲线分析,miR-210、TLR4 对 aSAH 患者 CVS 及预后具有预测价值。结论 aSAH 患者外周血 miR-210 低表达、TLR4 高表达与炎症反应激活、CVS 及预后不良有关,miR-210/TLR4 轴在 aSAH 的发病中起重要作用。

[关键词] 动脉瘤性蛛网膜下腔出血;脑血管痉挛;预后;miR-210;Toll 样受体 4

Correlation of miR-210 and TLR4 expression in peripheral blood of patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage and its clinical significance

CHEN Ming¹, ZHANG Qingxiu², WEI Xiue^{2*}

(1. Department of Neurology, Huaian Hospital, Xuzhou Medical University, Huaian, Jiangsu, China, 223002; 2. Department of Neurology, the Second Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University, Xuzhou, Jiangsu, China, 221006)

[ABSTRACT] **Objective** To study the correlation between the expression of miR-210 and toll like receptor 4 (TLR4) in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage (aSAH) and its clinical significance. **Methods** 55 patients with aSAH underwent surgical treatment in our hospital from June 2015 to June 2019 were selected as the aSAH group and 70 healthy volunteers as the control group. The expression levels of miR-210 and TLR4 in peripheral blood and serum levels of interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and matrix metalloproteinase-9 (MMP9) were detected. The cerebral vasospasm (CVS) and prognosis of aSAH patients were evaluated. **Result** The expression level of miR-210 in aSAH patients was lower than that in the control group, the expression level of TLR4 in peripheral blood and the contents of IL-6, TNF- α and MMP9 in serum were higher than those in the control group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). miR-210 was negatively correlated with TLR4, IL-6, TNF- α and MMP9 ($P < 0.05$), and TLR4 was positively corre-

基金项目:徐州市科学技术项目(X20190435)

作者单位:1. 徐州医科大学附属淮安医院神经内科,江苏,淮安 223002

2. 徐州医科大学第二附属医院神经内科,江苏,徐州 221006

*通信作者:魏秀娥, E-mail: dai1994430@163.com

lated with IL-6, TNF- α and MMP9 ($P<0.05$). In the aSAH group, the expression level of miR-210 in CVS patients was lower than that in non-CVS patients ($P<0.05$), and the expression level of TLR4 was higher than that in non-CVS patients ($P<0.05$), the expression level of miR-210 in peripheral blood of patients with poor prognosis was lower than that of patients with good prognosis ($P<0.05$), and the expression level of TLR4 was higher than that of patients with good prognosis ($P<0.05$). ROC curve analysis showed that miR-210 and TLR4 had predictive value for CVS and prognosis of aSAH patients. **Conclusion** Low expression of miR-210 and high expression of TLR4 in peripheral blood of aSAH patients are related to inflammatory response, CVS and poor prognosis. miR-210 / TLR4 axis plays an important role in the pathogenesis of aSAH.

[KEY WORDS] Aneurysmal subarachnoid hemorrhage; Cerebral vasospasm; Prognosis; miR-210; Toll like receptor 4

动脉瘤性蛛网膜下腔出血 (aneurysmal subarachnoid hemorrhage, aSAH) 是临床常见的脑血管意外, 致残率高、危害大。脑血管痉挛 (cerebral vasospasm, CVS) 是 aSAH 常见的并发症, 表现为颅内动脉收缩并造成脑组织缺血, 是造成 aSAH 迟发性神经功能损害及预后不良的主要原因。炎症反应是目前已知与 aSAH 及 CVS 发病机制密切相关的环节, 有基础研究报道, 抑制炎症反应能够改善 SAH 大鼠的 CVS^[1]; 临床研究报道, 全身炎症反应指数对 aSAH 患者发生 CVS 具有预测价值^[2-3]。但是, aSAH 及 CVS 发病过程中炎症反应的调控机制尚不十分清楚。微小 RNA (microRNA, miR) 是一族在转录后水平调节基因表达的非编码 RNA, 具有广泛的生物学作用, 在神经系统中发挥保护或损伤作用。miR-210 是一种具有神经保护作用的 miR, 王立新的动物实验发现过表达 miR-210 能够改善 SAH 大鼠的 CVS, 同时抑制 Toll 样受体 4 (Toll like receptor 4, TLR4) 的表达并减少多种炎症细胞因子的释放^[4]。但 miR-210/TLR4 周在 SAH 及 CVS 发病中的变化并未见报道。将检测了外周血中 miR-210 及 TLR4 的表达水平并分析其临床意义。

1 对象与方法

1.1 研究对象

选择 2015 年 6 月至 2019 年 6 月期间本院收治的 55 例 aSAH 患者作为研究组, 其中男性 31 例、女性 24 例, 年龄 (51.92 \pm 10.77) 岁; 另取同期体检的 70 例健康志愿者作为对照组, 其中男性 39 例、女性 31 例, 年龄 (48.12 \pm 12.24) 岁。所有患者及家属均知情并同意。两组间一般资料的比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

纳入标准: ①发病后 24 h 内入院; ②符合 aSAH

的诊断标准^[5]; ③发病后 3d 内进行早期手术; ④留取外周血用于 miR-210 及 TLR4 的检测; ⑤临床资料完整。排除标准: ①既往有脑梗死、脑出血、脑外伤病史; ②合并其他神经系统疾病或精神性疾病; ③术前存在 CVS; ④住院期间死亡。本实验经医院伦理委员会批准。

1.2 外周血 miR-210 及 TLR4 表达的检测

取 aSAH 患者入院当天的外周血样本及对照组志愿者体检当天的外周血样本, 采用北京天根公司的试剂盒进行 miR-497 表达的检测。首先采用全血 RNA 提取试剂盒提取 RNA。用 miR 荧光定量 PCR 检测试剂盒检测 miR-210 的表达水平; 采用荧光定量 PCR 检测试剂盒检测 TLR4 的表达水平。

1.3 血清炎症细胞因子含量的检测

取 aSAH 患者入院当天的血清样本及对照组志愿者体检当天的血清样本, 采用酶联免疫吸附法试剂盒 (上海酶联公司) 检测白介素-6 (IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、基质金属蛋白酶-9 (MMP9) 的含量。按照试剂盒说明书进行操作。

1.4 aSAH 患者 CVS 及预后的评估

参照指南^[5]进行 CVS 及预后评估。aSAH 患者术后第 7 天时或出现新发局灶性神经功能缺损症状时, 进行经颅多普勒超声检查, 大脑中动脉血流速度 ≥ 120 cm/s 认为发生 CVS。术后 6 个月时采用改了 Rankin 量表 (mRS) 评估神经功能, mRS 评分 0~2 分为预后良好、3~6 分为预后不良。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 20.0 软件进行数据分析, 计量资料 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间比较采用 t 检验, 相关性采用 Pearson 检验分析, 采用 ROC 曲线分析 miR-210 及 TLR4 预测预后及 CVS 的价值。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组外周血 miR-210 及 TLR4 表达的比较

aSAH 组患者外周血中 miR-210 的表达水平低于对照组, TLR4 的表达水平高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 两组外周血 miR-210 及 TLR4 表达的比较 ($\bar{x} \pm s$)
Table 1 Comparison of miR-210 and TLR4 expression in peripheral blood between 2 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	miR-210	TLR4
aSAH 组	55	0.79±0.25	1.33±0.38
对照组	70	1.00±0.28	1.00±0.25
t 值		4.361	5.837
P 值		0.000	0.000

2.2 aSAH 组患者外周血 miR-210 与 TLR4 的相关性

aSAH 组患者外周血 miR-210 的表达水平与 TLR4 的表达水平具有负相关关系, 差异有统计学意义 ($r = -0.469, P < 0.05$)。见图 1。

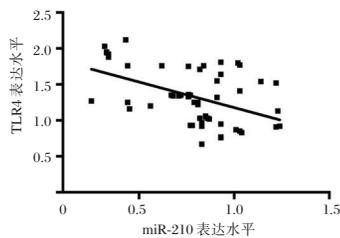


图 1 aSAH 组患者外周血 miR-210 与 TLR4 的相关性
Figure 1 Correlation between miR-210 and TLR4 in aSAH group

2.3 两组血清炎症因子含量的比较

aSAH 组患者血清中 IL-6、TNF- α 、MMP9 的含量高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 两组血清 IL-6、TNF- α 、MMP9 含量的比较 ($\bar{x} \pm s$)
Table 2 Comparison of serum IL-6, TNF- α and MMP9 between two groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	IL-6 (pg/mL)	TNF- α (ng/mL)	MMP9 (ng/mL)
aSAH 组	55	47.69±12.59	8.39±1.94	18.82±3.65
对照组	70	36.51±9.24	6.44±1.52	13.04±2.26
t 值		5.724	6.303	10.867
P 值		0.000	0.000	0.000

2.4 aSAH 组患者外周血 miR-210、TLR4 与血清炎症因子的相关性

aSAH 组患者外周血 miR-210 的表达水平与血

清中 IL-6、TNF- α 、MMP9 的含量具有负相关关系 ($P < 0.05$), 外周血 TLR4 的表达水平与血清中 IL-6、TNF- α 、MMP9 的含量正相关关系, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 aSAH 组患者外周血 miR-210、TLR4 与血清炎症因子的相关性

Table 3 Correlation between miR-210, TLR4 and serum inflammatory factors in aSAH group

指标	miR-210		TLR4	
	r 值	P 值	r 值	P 值
IL-6	-0.372	0.005	0.472	0.000
TNF- α	-0.418	0.001	0.423	0.001
MMP9	-0.347	0.009	0.395	0.003

2.5 aSAH 组中 CVS 与非 CVS 患者外周血 miR-210 及 TLR4 表达的比较

aSAH 组中 CVS 患者外周血中 miR-210 的表达水平低于非 CVS 患者, TLR4 的表达水平高于非 CVS 患者, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 4。

表 4 aSAH 组中 CVS 与非 CVS 患者外周血 miR-210 及 TLR4 表达的比较

Table 4 Comparison of miR-210 and TLR4 expression in peripheral blood between CVS and non CVS patients in aSAH group

CVS 情况	n	miR-210	TLR4
CVS 患者	18	0.64±0.27	1.53±0.40
非 CVS 患者	37	0.86±0.21	1.23±0.33
t 值		3.315	2.949
P 值		0.002	0.005

2.6 外周血 miR-210、TLR4 预测 aSAH 患者 CVS 的 ROC 曲线分析

外周血 miR-210、TLR4 预测 aSAH 患者 CVS 的 ROC 曲线下面积分别为 0.723 (95% CI: 0.564~0.992, $P = 0.008$)、0.722 (95% CI: 0.569~0.874, $P = 0.008$), 根据约登指数最大确定最佳截断值分别为 0.74、1.26。见图 2。

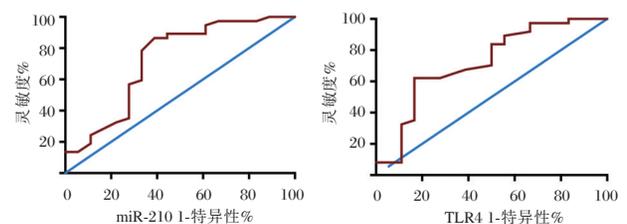


图 2 miR-210、TLR4 预测 aSAH 患者 CVS 的 ROC 曲线
Figure 2 ROC curve of miR-210, TLR4 predicting CVS in aSAH patients

2.7 aSAH组中预后良好与预后不良患者外周血 miR-210 及 TLR4 表达的比较

aSAH组中预后不良患者外周血中 miR-210 的表达水平低于预后良好患者, TLR4 的表达水平高于预后良好患者, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 5。

表 5 aSAH 组中预后良好与预后不良患者外周血 miR-210 及 TLR4 表达的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Comparison of miR-210 and TLR4 expression in peripheral blood between patients with good prognosis and poor prognosis in aSAH group ($\bar{x} \pm s$)

CVS 情况	n	miR-210	TLR4
CVS 患者	20	0.64±0.27	1.58±0.37
非 CVS 患者	35	0.87±0.20	1.19±0.30
t 值		3.605	4.257
P 值		0.001	0.000

2.8 外周血 miR-210、TLR4 预测 aSAH 患者预后的 ROC 曲线分析

外周血 miR-210、TLR4 预测 aSAH 患者预后的 ROC 曲线下面积分别为 0.741 (95% CI: 0.588~0.894, $P=0.003$)、0.789 (95% CI: 0.659~0.918, $P=0.001$), 根据约登指数最大确定最佳截断值分别为 0.77、1.26。见图 3。

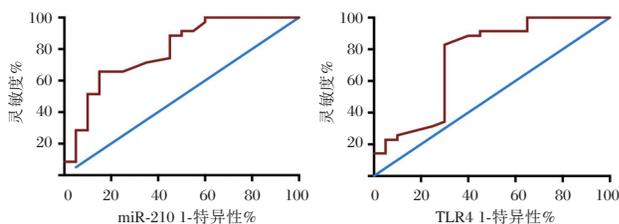


图 3 miR-210、TLR4 预测 aSAH 患者预后的 ROC 曲线

Figure 4 ROC curve of miR-210、TLR4 predicting prognosis of patients with aSAH

3 讨论

aSAH 的致残率高, CVS 是造成 aSAH 患者神经功能损害并致残的常见并发症。CVS 的临床表现是颅内动脉收缩造成受累脑组织供血减少、出现缺血缺氧性神经功能损害, 进而影响 aSAH 的预后^[6-7]。因此, 早期评估 aSAH 病情、预测可能发生 CVS 的高危人群并尽早进行干预, 有助于预防 CVS、改善预后。但目前 aSAH 及 CVS 的发病机制尚不十分清楚, 阐明相关发病机制不仅能够为寻找新的病情评估标志物提供参考, 还能为发现新的治疗手段提供靶点。

炎症反应在 aSAH 及 CVS 发病中的作用受到越来越多关注, 炎症反应的激活一方面加重脑水肿、促进神经元氧化应激及凋亡并造成神经功能损害, 另一方面诱导脑血管发生痉挛并加重神经功能损害^[8-9]。TLR4 通路是体内参与炎症反应调控的重要信号通路, 多项基础研究证实 TLR4 介导的炎症反应与 aSAH 神经功能损害、CVS 发生均密切相关^[10-11]。miR-210 在中枢神经系统中发挥保护作用^[12-13]。国内一项基础研究发现, 过表达 miR-210 用于 SAH 大鼠的治疗能够减轻神经损害、改善 CVS 并抑制 TLR4 的表达^[4], 表明 miR-210 靶向 TLR4 可能参与 aSAH 及 CVS 的发病。本研究结果发现: aSAH 患者外周血中 miR-210 的表达水平降低、TLR4 的表达增加且具有负相关关系, miR-210 低表达可能削弱其抑制 TLR4 表达的作用并造成 TLR4 表达增加, 进而参与 aSAH 的发病。

TLR4 是调控炎症反应的重要信号通路, 发生激活后通过 NF- κ B 途径启动下游 IL-6、TNF- α 、MMP9 等炎症基因的表达, 引起 IL-6、TNF- α 、MMP9 大量释放^[14]。已有研究报道^[15-16], aSAH 患者血清中 IL-6、TNF- α 、MMP9 的含量异常增加, 本研究的分析结果与其一致, 及 aSAH 患者血清中 IL-6、TNF- α 、MMP9 的含量高于对照组。本实验结果表明 miR-210/TLR4 轴参与 aSAH 发病过程中炎症反应的调控, miR-210 靶向 TLR4 并抑制炎症反应。

国内多项炎症反应与 aSAH 及 CVS 相关的临床研究证实, 炎症反应指数对 aSAH 的预后及 CVS 均具有预测价值^[1, 17]; 王立新的动物实验则证实了 miR-210 对 SAH 大鼠 TLR4 表达及 CVS 的抑制作用。本研究已经证实 aSAH 患者 miR-210/TLR4 轴发生改变且与炎症反应的激活存在相关性, 为了进一步阐明 miR-210/TLR4 轴在 aSAH 发病中的作用, 本研究对 aSAH 患者 CVS 及预后进行了评估, 55 例 aSAH 患者中发生 CVS 18 例、预后不良 20 例, CVS 发生率和预后不良发生率分别为 32.73%、36.36%, 相应的发生率与国内已有研究相似。在此基础上分析 miR-210、TLR4 表达与 CVS、预后的关系可知: 发生 CVS 及预后不良患者外周血中 miR-210 的表达降低、TLR4 的表达增加, 经 ROC 曲线分析证实 miR-210、TLR4 对 CVS 和预后具有预测价值。

综上所述, aSAH 发病过程中 miR-210 表达降低、TLR4 表达增加与炎症反应的激活、CVS 及预后不良的发生有关, miR-210/TLR4 可能在 aSAH 发病中起重要作用, 未来 miR-210、TLR4 有望成为评估 aSAH 病情及预后的标志物, 过表达 miR-210 并抑制 TLR4 介导的炎症反应则有望成为治疗 aSAH、改善预后的新靶点。

参考文献

- [1] 张振, 张恒柱, 李育平, 等. 全身炎症反应指数与动脉瘤性蛛网膜下腔出血术后症状性脑血管痉挛的关系及Nomogram预测模型的建立[J]. 实用临床医药杂志, 2020, 24(10): 36-40.
- [2] Wanderer S, Anderegg L, Mrosek J, et al. The Role of Losartan as a Potential Neuroregenerative Pharmacological Agent after Aneurysmal Subarachnoid Haemorrhage [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(18):6496.
- [3] Turan N, Miller BA, Huie JR, et al. Effect of Progesterone on Cerebral Vasospasm and Neurobehavioral Outcomes in a Rodent Model of Subarachnoid Hemorrhage [J]. *World Neurosurg*, 2018, 110:e150-e159.
- [4] 王新立, 霍晓川, 曹志韬, 等. miR-210 对大鼠蛛网膜下腔出血后迟发型血管痉挛的防治作用[J]. 中山大学学报(医学科学版), 2015, 36(6): 846-851.
- [5] 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, 中华医学会神经病学分会神经血管介入协作组. 中国蛛网膜下腔出血诊治指南 2019[J]. *中华神经科杂志*, 2019, 52(12): 1006-1021.
- [6] Voellger B, Rupa R, Arndt C, et al. Outcome after Interdisciplinary Treatment for Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage-A Single Center Experience [J]. *Medicina (Kaunas)*, 2019, 55(11):724.
- [7] Ehrlich G, Kirschning T, Wenz H, et al. Outcome of Oral and Intra-arterial Nimodipine Administration After Aneurysmal Subarachnoid Haemorrhage - A Single-centre Study [J]. *In Vivo*, 2019, 33(6):1967-1975.
- [8] Khey KMW, Huard A, Mahmoud SH. Inflammatory Pathways Following Subarachnoid Hemorrhage [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2020, 40(5):675-693.
- [9] Geraghty JR, Davis JL, Testai FD. Neuroinflammation and Microvascular Dysfunction After Experimental Subarachnoid Hemorrhage: Emerging Components of Early Brain Injury Related to Outcome [J]. *Neurocrit Care*, 2019, 31(2):373-389.
- [10] Karimy JK, Reeves BC, Kahle KT. Targeting TLR4-dependent inflammation in post-hemorrhagic brain injury [J]. *Exp Opin Ther Targets*, 2020, 24(6):525-533.
- [11] Suzuki H, Fujimoto M, Kawakita F, et al. Toll-Like Receptor 4 and Tenascin-C Signaling in Cerebral Vasospasm and Brain Injuries After Subarachnoid Hemorrhage [J]. *Acta Neurochir Suppl*, 2020, 127:91-96.
- [12] Balachandran AA, Larcher LM, Chen S, et al. Therapeutically Significant MicroRNAs in Primary and Metastatic Brain Malignancies [J]. *Cancers (Basel)*, 2020, 12(9):2534.
- [13] Hui X, Al-Ward H, Shaher F, et al. The Role of miR-210 in the Biological System: A Current Overview [J]. *Hum Hered*, 2020, 9:1-7.
- [14] Karimy JK, Reeves BC, Kahle KT. Targeting TLR4-dependent inflammation in post-hemorrhagic brain injury [J]. *Exp Opin Ther Targets*, 2020, 24(6):525-533.
- [15] Bach A, Conzen C, Schubert GA, et al. Acute changes of pro-inflammatory markers and corticosterone in experimental subarachnoid haemorrhage: A prerequisite for severity assessment [J]. *PLoS One*, 2019, 14(7):e0220467.
- [16] Wang L, Gao Z. Expression of MMP-9 and IL-6 in patients with subarachnoid hemorrhage and the clinical significance [J]. *Exp Ther Med*, 2018, 15(2):1510-1514.
- [17] 张鹏, 李育平, 王晓东, 等. 结合炎症反应指数的Nomogram模型对aSAH患者预后预测的价值[J]. *临床神经外科杂志*, 2020, 17(2): 216-220.

(上接第 1664 页)

- [9] Li YL, Liu XM, Zhang CY, et al. MicroRNA-34a/EGFR axis plays pivotal roles in lung tumorigenesis. *Oncogenesis*, 2017 (6):e372.
- [10] 田敬华, 杨金玲, 秦杰, 等. miR-34 启动子甲基化在胃癌发病过程中的作用研究 [J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2019, 11(1):17-21.
- [11] 李自生, 王永生, 秦文燕等. 血清 CEA、CYFRA21-1、NSE、CA724 联合检测对肺癌的诊断价值 [J]. *蚌埠医学院学报*, 2014, 39(4):535-537.

162例CRE感染的分布特点及降低细菌感染措施评价研究

张雁¹ 梁家花² 张峰^{3*}

[摘要] 目的 研究全院碳青霉烯类耐药肠杆菌科细菌(CRE)感染的分布特点及降低细菌感染措施评价研究。方法 选取2018年1月至2019年12月于本院住院并接受抗菌药物治疗患者162例,分析患者一般资料,检测结果和干预结果,以是否进行MDT干预分为观察组($n=80$)和对照组($n=82$)。观察分析两组CRE科室分布情况、细菌标本来源、细菌种类分布情况,比较两组送检率、医院感染率、CRE感染发生率和检出率及各项防控措施落实依从率。结果 两组CRE感染科室分布均以呼吸内科为主,检测标本来源均以痰液为主,病原菌均以肺炎克雷伯菌为主,观察组送检率(100.00%)显著高于对照组(95.12%),差异具有统计学意义($P<0.05$)。观察组医院感染比例(10.02%)低于对照组(10.51%),观察组CRE感染发生率(8.77%)低于对照组(10.00%),观察组CRE感染检出率(33.05%)低于对照组(41.12%),差异无统计学意义($P>0.05$),观察组的各项防控措施实施依从率显著优于对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。结论 全院碳青霉烯类耐药肠杆菌科细菌感染主要分布在呼吸内科,采用MDT对细菌感染防控进行干预,可以提高患者标本送检率和各项防控措施实施的依从率,降低医院感染率和CRE感染率。

[关键词] 碳青霉烯类; 耐药; 肠杆菌科细菌; 多学科协作模式

The distribution characteristics of 162 cases of CRE infection and evaluation of measures to reduce bacterial infection

ZHANG Yan¹, LIANG Jiahua², ZHANG Feng^{3*}

(1. Department of Inspection, Mental Health Center, Rizhao, Shandong, China, 267800; 2. Department of Laboratory Medicine, Juxian People's Hospital, Rizhao, Shandong, China, 267800; 3. Department of Clinical Laboratory, Rizhao City Hospital of Traditional Chinese Medicine, Rizhao, Shandong, China, 267800)

[ABSTRACT] Objective To explore the distribution of Carbapenem-resistant Enterobacterales (CRE) in our hospital and to evaluate the application effect of the measures to reduce these bacterial infection. Method We retrospectively analyzed 162 cases who had Carbapenem-resistant Enterobacterales infection from January, 2018 to December, 2019. The MDT intervention was divided into the control group ($n=82$) and the observation group ($n=80$). To observe and analyze the distribution of CRE departments, the origin of bacterial specimens and the distribution of bacterial species in the two groups, and to compare the examination rate, nosocomial infection rate, detection rate and detection rate of CRE infection and compliance rate of various prevention and control measures. Results The distribution of CRE infection departments in both groups was mainly respiratory medicine, sputum was the main source, Klebsiella pneumoniae was the main pathogen, the rate of examination in the observation group (100.00%) was significantly higher than that in the control group (95.12%), the difference was statistically significant ($P<0.05$), hospital infection rate (10.02%) in the observa-

作者单位:1. 日照市精神卫生中心检验科, 山东, 日照 276800

2. 莒县人民医院检验科, 山东, 日照 276800

3. 日照市中医医院检验科, 山东, 日照 276800

*通信作者:张峰, E-mail:980794904@qq.com

tion group was significantly lower than that in the control group (10.51%), CRE infection rate (8.77%) in the observation group was lower than that in the control group (10.00%). The detection rate of CRE infection in the observation group (8.77%) was lower than that in the control group (10.00%), and the detection rate of CRE infection in the observation group (33.05%) was lower than that in the control group (41.12), but the difference was not statistically significant ($P>0.05$). The compliance rate of various prevention and control measures in the observation group was significantly better than that in the control group, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** The carbapenem-resistant Enterobacteriaceae bacterial infections in the whole hospital are mainly distributed in the Department of Respiratory Medicine. The use of MDT to intervene in the prevention and control of bacterial infections can increase the rate of patient specimen submission and the compliance rate of various prevention and control measures, and reduce the hospital infection rate and CRE infection rate.

[KEY WORDS] Carbapenems; Drug resistance; Enterobacteriaceae; Multidisciplinary collaboration model

碳青霉烯类是抗菌谱最广、抗菌活性最强的抗生素种类,在临床上治疗严重细菌感染的主要抗菌药物之一^[1-2]。肠杆菌科细菌是革兰阴性杆菌,其细菌分布范围广,培养繁殖迅速,感染可造成血液系统、泌尿系统、呼吸系统等器官组织的疾病。肠杆菌科细菌包括埃希菌属、沙门菌属、志贺菌属等,其中大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌是较为常见的感染病原菌^[3-4]。目前,碳青霉烯类耐药肠杆菌科细菌(Carbapenem-resistant Enterobacter, CRE)感染已被美国疾病预防控制中心(United States Center for Disease Control, CDC)视为威胁全球健康的重要因素。碳青霉烯酶可由染色体、质粒或转座子介导,其可以将亚胺培南、美罗培南或厄他培南水解,介导细菌耐药并促进耐药基因在各种菌属之间进行传播,进而引发碳青霉烯类耐药性^[5-6]。临床降低 CRE 感染对患者健康保障至关重要,研究表明,多学科协作模式(Multidisciplinary cooperation, MDT)是一种新型医学服务模式,其可以利用小组协作模式和现代化决策模式代替医院传统管理模式,提高院内医疗资源整合配置效率和管理质量^[7]。本研究筛查统计全院碳青霉烯类耐药肠杆菌科细菌的分布情况和观察分析 MDT 模式对于降低细菌感染的应用效果。具体如下。

1 一般资料与方法

1.1 一般资料

选取本院 2018 年 1 月至 2019 年 12 月于本院住院并接受抗菌药物治疗患者 162 例,探究 MDT 对防控 CRE 的干预效果,以是否进行 MDT 干预进行分组,2018 年 1 月至 2018 年 12 月为接受 MDT 干预前为对照组,共 82 例,以同期为接受 MDT 干预后为观察组,共 80 例,研究经医院伦理委员会批

准,分析患者一般资料、实验室鉴定和药敏结果及干预结果。纳入标准:①医院感染的诊断标准参照 2001 年发布的《医院感染诊断标准(试行)》^[8];②CRE 诊断标准参照美国疾病预防控制中心 2015 年更新的 CRE 预防指南^[9];③对本次研究知情并自愿签订知情同意书者。排除标准:①孕妇及哺乳期妇女;②精神疾病患者;③严重肝肾功能不全者。

1.2 方法

由医院感染管理科组建 MDT 组,于 2019 年 1 月至 2019 年 12 月进行系统化科学防控 CRE,该组由本院院长担任组长,参与科室包括医院感染科管理科、护理部、临床检验中心、药学部、后勤保障部和其他临床科室,所有人员按照规定执行防控措施。

医院感染管理科:通过每天各科室多重耐药菌上报情况和医院感染监控系统动态监测全院 CRE 检出和发生情况;临床检验中心:将每日细菌耐药检测结果通过医院监测平台上报至医院感染管理科及临床各个科室;药学部:统计每个月各个科室使用抗生素的种类及药量,根据科室抗生素使用情况,给出合理建议调整用药比例;护理部:对科室卫生环境及消毒消杀,防护隔离等情况进行监督,保证护理人员在与患者接触时做好无菌处理和隔离;各个临床科室:监测使用抗生素患者病历,发现问题及时采集标本送检,注意用药种类及剂量,避免抗生素过度使用。后勤保障部:检查科室内环境的清洁消毒质量、医疗废物的回收规范情况,统计各个科室医疗耗材的使用情况。

1.3 观察指标

两组 CRE 感染科室分布情况、细菌标本来源、细菌种类分布情况和两组送检率,微生物检验样本送检率。根据《医院感染管理质量控制指标

(2015年版)》^[10]中耐药菌感染发现率和检出率标准进行分析评价。实施MDT前后各项防控措施落实依从情况。实验室检查方法:采用全自动快速微生物质谱检测系统VITEK MS及配套试剂盒(法国生物梅里埃公司)进行细菌鉴定。

1.4 统计学方法

采用SPSS 23.0软件进行数据统计分析,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。计量资料中频数小于1的数据采用Fisher's检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组一般资比较

两组在性别、平均年龄、危重度评分和住院时间比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性,观察组送检率明显高于对照组,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见表1。

表1 两组一般资料比较 [n(%), ($\bar{x} \pm s$)]

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

一般资料		观察组 (n=80)	对照组 (n=82)	t/ χ^2 值	P值
性别	男	38(47.5)	42(51.2)	0.658	0.413
	女	42(52.5)	40(48.8)	0.547	0.642
平均年龄(岁)		59.33±16.11	56.81±16.55	0.751	0.346
危重度评分(分)		3.68±0.22	3.83±0.26	0.948	0.345
住院时间(d)		14.23±21.91	15.02±23.88	0.845	0.254
送检率(%)		80(100.00)	78(95.12)	14.517	0.001

2.2 两组CRE感染科室分布情况、细菌标本来源和细菌种类分布情况及构成比比较

两组CRE感染科室分布情况、细菌标本来源和细菌种类分布情况比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表2。

2.3 医院感染发生率、CRE感染发现率及检出率、肠杆菌科细菌株数比较

2019年医院感染比例、感染发现率、检出率都低于2018年,差异无统计学意义($P > 0.05$),2019年肠杆菌科细菌总株数、碳青霉烯类抗菌药物合理使用率与2018年比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表3。

2.4 两组各项防控措施落实依从率比较

观察组单间隔离率、专业化护理、物表清除率、手卫生依从性、医疗物品专用依从率明显高于对照组,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见表4。

表2 CRE感染科室分布情况、细菌标本来源及细菌种类分布情况及构成比 [n(%)]

Table 2 CRE Distribution of infection departments, origin of bacterial specimens, distribution of bacterial species and composition ratio [n(%)]

指标		对照组 (n=82)	观察组 (n=80)	χ^2 值	P值
科室分布	呼吸内科	29(37.18)	25(35.71)	0.584	0.124
	重症监护室	19(24.36)	17(24.29)	0.364	0.314
	泌尿外科	10(12.82)	11(15.71)	0.581	0.245
	血液科	8(10.26)	7(10.00)	0.942	0.168
	急诊科	6(7.69)	6(8.57)	0.451	0.157
	肿瘤科	6(7.69)	4(5.71)	0.548	0.784
	其他	4(4.88)	5(6.25)	0.524	0.361
标本来源	痰液	54(69.23)	45(64.29)	0.348	0.458
	中段尿液	12(15.38)	11(15.71)	0.947	0.278
	分泌物	5(6.41)	4(5.71)	0.341	0.239
	静脉血	4(5.13)	5(7.14)	0.315	0.257
	脓液	2(2.56)	3(4.29)	0.215	0.234
	胸腹水	1(1.28)	2(2.86)	0.165	0.344
	其他	4(4.88)	3(3.75)	0.479	0.237
病原菌	肺炎克雷伯菌	40(51.28)	35(54.29)	0.648	0.655
	大肠埃希菌	15(19.23)	14(20.00)	0.682	0.144
	产气肠杆菌	10(12.82)	9(12.86)	0.937	0.354
	阴沟肠杆菌	8(10.26)	7(10.00)	0.451	0.316
	产酸克雷伯菌	5(6.41)	5(7.14)	0.347	0.644
	其他	3(3.66)	4(5.00)	0.459	0.258

表3 医院感染发生率、CRE感染发现率和肠杆菌科细菌株数比较 [n(%)]

Table 3 Comparison of nosocomial infection incidence, CRE infection detection rate and number of enterobacteriaceae bacteria [n(%)]

检查结果	2019年	2018年	χ^2 值	P值
医院感染(例)	80(10.02)	82(10.51)	0.102	0.750
CRE发现(例)	70(8.77)	78(10.00)	0.7	0.403
肠杆菌科细菌(株)	120	124	0.254	0.214
碳青霉烯类抗菌药物合理使用率(%)	90.42	68.69	2.96	0.208

3 讨论

目前CRE在医疗机构内的快速扩散和流行,已经成为各个地区严重公共卫生问题。有研究表明,肺炎克雷伯菌对碳青霉烯类抗生素的耐药率在2015年至2016年从3.00%上升至6.10%,临床上加强对CRE感染的防控至关重要^[11]。肠杆菌科细菌产生耐药性的主要原因是由于严重感染患者长期服用碳青霉烯类药物,导致细菌产生碳青霉烯酶^[12]。本次研究结果显示,本院CRE感染患者主要分布在呼吸内科,这是由于呼吸内科患者大部分患有呼吸系统感染,部分患者需要长期使用

表4 两组各项防控措施落实依从率比较 [n(%)]

Table 4 Comparison of compliance rates of various prevention and control measures between the two groups [n(%)]

防控措施	观察组(n=80)		对照组(n=82)		χ ² 值	P值
	应执行	实际执行	应执行	实际执行		
单间隔离率	30	25(83.33)	32	13(40.63)	14.657	0.027
专组化护理	78	70(89.74)	80	55(68.75)	13.458	0.019
物表清除率	80	75(93.75)	82	62(75.61)	12.957	0.025
手卫生依从性	80	80(100.00)	82	75(91.46)	10.688	0.034
医疗用品专用	56	45(80.36)	58	32(55.17)	11.258	0.012

抗生素治疗,加上患者长期卧床缺乏锻炼,机体免疫力下降,机体感染加重又增加了抗生素的使用剂量,如此恶性循环导致了肠杆菌科细菌耐药性不断增强。两组感染主要肠杆菌科细菌为肺炎克雷伯菌,该细菌也是医院肠杆菌科细菌感染常见的致病菌,当患者机体的免疫力下降时,存在于上呼吸道的肺炎克雷伯菌会通过呼吸道进入肺部,从而引起肺部病变,加重感染。

为预防CRE感染和进一步扩散,本院采取MDT方案提高防控措施落实的质量。普通流行情况下,主要预防CRE菌株的流行传播,对于CRE流行严重区域,需要采取更加强有力的防控措施^[13]。于本院住院治疗患者,医院感染管理科要了解其中是否存在严重传染或细菌感染疾病患者,对其实施密切监控防止疾病的传播流行^[14]。在重点科室设置单独隔离房间,或者将感染同类微生物患者集中到同一房间;临床用药要更加规范合理,避免抗生素滥用引起细菌广泛耐药,临床可采用新型药物或联合用药提高治疗的效果和安全性。本次研究结果说明实施MDT可以有效减少感染人群,防止感染扩散。本次研究结果与邹琪等^[15]研究结果类似。

综上所述,本院CRE感染患者主要分布于呼吸内科,标本来源主要为痰液,感染细菌主要为肺炎克雷伯菌,同时采取MDT对全院细菌感染防控工作干预,可以提高患者标本送检率和防控措施实施落实的依从率,提高防控质量,降低医院感染率、CRE发现率和检出率,有效减少感染人群,值得临床推广应用。

参考文献

[1] Karaiskos I, Galani I, Souli M, Giamarellou H. Novel β-lactam-β-lactamase inhibitor combinations: expectations for the treatment of carbapenem-resistant Gram-negative pathogens [J]. *Exp Opin Drug Met Tox*, 2019, 15(2): 133-149.

[2] 伊怀文,侯高林,王刚. 综合监护室患者多重耐药菌感染现状及其耐药性分析[J]. *华南预防医学*, 2017, 43(4): 356-358.

[3] 姚兴伟,林英,杨琦,等. 248株碳青霉烯类耐药肠杆菌科细菌临床特点及耐药性分析[J]. *中国实验诊断学*, 2020, 24(2): 320-322.

[4] Zatsarinaya EA, Efremova ES, AS Gas'kova, et al. Evaluation of antibiotic resistance of Enterobacteriaceae bacteria isolated from water objects of the north-west of the Murmansk region[J]. *IOP Conf Ser Ear Env Sci*, 2019, 263(1): 120-125.

[5] Zhou SD, Liu CL, Yang RS, et al. Resistance genes of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in a hospital [J]. *Chin J Inf Cont*, 2019, 49(55): 456-459.

[6] 谭坪海,陈利达,郭鹏豪,等. 耐亚胺培南鲍曼不动杆菌的耐药机制研究和同源性分析[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2019, 11(3): 182-188.

[7] 梁艳芳,赖晓全,王坚苗,等. 多学科协作模式在多重耐药菌感染管理中的应用研究[J]. *中国社会医学杂志*, 2019, 36(4): 402-406.

[8] 薄天慧,陈勇,韩黎,等. 中美医院感染诊断标准在某医院感染现患率调查中应用对比分析[J]. *中国消毒学杂志*, 2019, 36(5): 374-376.

[9] Igbinsola O, Dogho P, Osadiaye N. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: A retrospective review of treatment and outcomes in a long-term acute care hospital [J]. *Am J Infect Control*, 2020, 48(1): 7-12.

[10] 郑小君,刘晗静,章娜,等. 依照JCI评审标准控制多重耐药菌医院感染的效果研究[J]. *护理管理杂志*, 2019, 19(3): 212-215.

[11] 欧阳娜,童德军,王敏,等. 2009-2018年10075株肺炎克雷伯菌临床分布及其耐药变迁[J]. *中国感染控制杂志*, 2019, 18(6): 546-551.

[12] Protonotariou E, Meletis G, Kachrimanidou M, et al. In vitro activity of ceftazidime/avibactam against KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece: A single-centre study [J]. *J Glob Antim Res*, 2020, 20(44): 82-83.

[13] 苏珊珊,张吉生,王英,等. 耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌对喹诺酮类耐药机制的研究[J]. *中国感染控制杂志*, 2019, 18(2): 99-104.

[14] Sandiumenge A, Ramírez-Estrada S, Mazo C, et al. Donor referral from outside the intensive care unit: A multidisciplinary cooperation model using communication apps and redefining referral criteria [J]. *Med Int*, 2020, 44(3): 142-149.

[15] 邹琪,蔡虹,张新超,等. 碳青霉烯类抗菌药物管理的有效性和安全性探索[J]. *中华医院管理杂志*, 2019, 35(5): 398-401.

VEGF-C 与 Gas6 在胆管癌中的表达及临床意义

朱宇 吴涯昆 龚程 庞武 田银生*

【摘要】目的 探究血管内皮生长因子C(VEGF-C)与生长停滞特异性基因6(Gas6)在胆管癌中的表达及临床意义。方法 选取本院2016年5月至2019年8月122例胆管癌患者作为研究对象,检测对比癌组织、癌旁正常组织中VEGF-C、Gas6阳性表达率,分析VEGF-C、Gas6与临床特征相关性。统计胆管癌患者1年生存率,采用Kaplan-Meier曲线进行生存分析。结果 癌组织中VEGF-C、Gas6阳性表达率高于癌旁正常组织,差异有统计学意义($P<0.05$)。VEGF-C与动静脉受侵、淋巴结转移、临床分期、Gas6呈正相关,差异有统计学意义($P<0.05$)。Gas6与动静脉受侵、淋巴结转移、临床分期、VEGF-C呈正相关,差异有统计学意义($P<0.05$)。将年龄、性别、肿瘤部位、肿瘤直径、组织学分级、病理类型等因素控制后,VEGF-C、Gas6仍与动静脉受侵、淋巴结转移、临床分期显著相关($P<0.05$);随访1年,失访8例。114例胆管癌患者1年生存率为65.79%(75/114)。Kaplan-Meier曲线分析,VEGF-C、Gas6阳性表达患者1年生存率低于阴性表达患者,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 VEGF-C、Gas6联合检测有助于为临床评估病情、预测生存状况提供参考依据。

【关键词】 胆管癌;血管内皮生长因子C;生长停滞特异性基因6;临床特征;生存分析

Expression and clinical significance of VEGF-C and Gas6 in cholangiocarcinoma

ZHU Yu, WU Yakun, GONG Cheng, PANG Wu, TIAN Yinsheng*

(Department of Hepatobiliary Surgery, Suining Central Hospital, Suining, Sichuan, China, 629000)

【ABSTRACT】 Objective To explore the expression and clinical significance of vascular endothelial growth factor C (VEGF-C) and growth arrest specific gene 6 (Gas6) in cholangiocarcinoma. Methods 122 patients with cholangiocarcinoma from May 2016 to August 2019 in our hospital were selected as the research objects. The positive expression rates of VEGF-C and Gas6 in cancer tissues and normal tissues adjacent to cancer were detected, and the correlation between VEGF-C and Gas6 and clinical features was analyzed. The 1-year survival rate of patients with cholangiocarcinoma was counted, and Kaplan-Meier curve was used for survival analysis. Results The positive expression rate of VEGF-C and Gas6 in cancer tissues was higher than that in normal tissues adjacent to cancer, the difference was statistically significant ($P<0.05$); VEGF-C was positively correlated with arteriovenous invasion, lymph node metastasis, clinical stage, and Gas6, the difference was statistically significant ($P<0.05$); Gas6 was positively correlated with arteriovenous invasion, lymph node metastasis, clinical stage, and VEGF-C, the difference was statistically significant ($P<0.05$). After controlling for factors such as age, gender, tumor site, tumor diameter, histological grade, and pathological type, VEGF-C and Gas6 were still significantly associated with arteriovenous invasion, lymph node metastasis, and clinical stage, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). Followed up for 1 year, 8 cases were lost to follow-up. The 1-year survival rate of 114 patients with cholangiocarcinoma was 65.79% (75/114); Kaplan-Meier curve analysis showed that the 1-year survival rate of patients with positive expression of VEGF-C and Gas6 was lower than that of patients with negative expression, the difference was statistically significant ($P<0.05$). Conclusion The positive expression rate of VEGF-C and Gas6 Combined detection is helpful for

基金项目:四川省卫生和计划生育委员会课题(17ZD020)

作者单位:四川省遂宁市中心医院肝胆外科,四川,遂宁 629000

*通信作者:田银生, E-mail: tys13882513696@163.com

clinical evaluation of the disease and prediction of survival and provide a reference basis.

[KEY WORDS] Cholangiocarcinoma; Vascular endothelial growth factor C; Growth arrest specific gene 6; Clinical features; Survival analysis

胆管癌属于临床常见恶性肿瘤,因解剖组织结构关系复杂、缺乏特异性肿瘤标志物导致早期诊断困难,随着病情进展,易发生纵向跳跃式转移与横向浸润转移,对预后产生严重不利影响^[1-2]。因此,探索影响胆管癌肿瘤细胞侵袭、转移的病理因子意义重大。血管内皮生长因子C(Vascular endothelial growth factor C, C)是一种血管生长因子,参与血管生成过程,能加快细胞侵袭、转移,促使病情恶化^[3]。生长停滞特异性基因6(Growth arrest specific gene 6, Gas6)是生长停滞特异性基因家族重要成员,也是维生素K依赖性生长促进因子,能结合相应配体,通过特定信号通路参与肿瘤血管生成、分化、转移、凋亡等过程^[4]。既往虽有研究分析两者在胆管癌中的相关机制,但关于两者之间关系及对生存状况的影响尚未见报道。为此,本研究尝试分析VEGF-C与Gas6在胆管癌中的表达及临床意义,旨在为临床提供数据支持。报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取本院2016年5月至2019年8月122例胆管癌患者作为研究对象,其中男82例,女40例,平均(57.74±6.21)岁,肿瘤直径2.0~5.0 cm,平均(3.72±0.36)cm,肿瘤部位:中下段胆管50例,肝门及肝内胆管72例,临床分期:I期15例,II期36例,III期40例,IV期31例,动静脉受侵39例,未受侵83例,淋巴结转移78例,未转移44例。本研究经本院伦理委员会审批通过。

纳入标准:①均经手术病理检查证实为胆管癌;②临床分期I~IV期;③术前均未接受放化疗等相关抗肿瘤治疗;④临床资料完整;⑤患者及家属均知情本研究,签订知情承诺书。排除标准:①合并其他肿瘤者;②伴有感染性、炎症性疾病者;③血液系统异常者;④属于复治或肿瘤复发患者;⑤术前接受抗肿瘤治疗者。

1.2 方法

1.2.1 VEGF-C、Gas6检测方法

采用免疫组织化学法检测癌组织、癌旁正常组织(距癌组织切缘0.5 cm左右,经病理检查证实为

非癌组织)中VEGF-C、Gas6表达情况,将石蜡包埋组织采用组织切片机连续切开(厚度为4 μm),对石蜡切片行脱蜡、水化处理,高温修复5 min,过氧化氢溶液(3%)室温孵育,共10 min;PBS冲洗5 min,滴加山羊血清,室温放置30 min,滴加兔抗人VEGF-C、Gas6多抗,湿盒内4℃过夜。PBS冲洗,滴加二抗,于常温条件下反应15 min,DAB显色,苏木素复染,脱水,二甲苯透明,封固。采用PBS替代一抗作为阴性对照组,已知阳性片作为阳性对照。

1.2.2 VEGF-C、Gas6结果判读

Gas6在胞浆及胞核中可见棕黄色颗粒为阳性,VEGF-C在胞浆中可见棕黄色颗粒为阳性。由2名经验丰富的病理医师共同阅片。采用半定量积分判定阅片结果。采用H-Score评分系统判定结果,阳性细胞计数与染色强度2项积分相乘,<4分判定为阴性,≥4分为阳性。

1.3 统计学方法

使用SPSS 22.0软件进行数据分析,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,用t检验,计数资料以n(%)表示,用 χ^2 检验,Kaplan-Meier曲线进行生存分析,采用Log-rank检验,P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组血清VEGF-C、Gas6阳性表达率比较

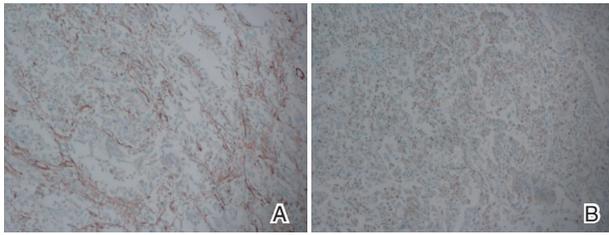
癌组织中VEGF-C、Gas6阳性表达率高于癌旁正常组织,差异有统计学意义(P<0.05),见表1。VEGF-C、Gas6免疫组化。见图1。

表1 两组血清VEGF-C、Gas6阳性表达率比较[n(%)]
Table 1 Comparison of Positive expression rates of VEGF-C and Gas6 of 2 groups [n(%)]

组别	n	VEGF-C	Gas6
癌组织	122	101(82.79)	88(72.13)
癌旁正常组织	122	12(9.84)	36(29.51)
χ^2 值		130.563	44.340
P值		<0.001	<0.001

2.2 VEGF-C与胆管癌临床特征相关性

VEGF-C与动静脉受侵、淋巴结转移、临床分期、Gas6呈正相关,差异有统计学意义(P<0.05),见表2。



注:A为VEGF-C、Gas6免疫组化图;B为Gas6免疫组化图。

图1 VEGF-C、Gas6免疫组化图

Figure 1 immunohistochemistry of VEGF-C

2.3 Gas6与胆管癌临床特征相关性

Gas6与动静脉受侵、淋巴结转移、临床分期、VEGF-C呈正相关,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表3。

2.4 多元线性逐步回归分析

将年龄、性别、肿瘤部位、肿瘤直径、组织学分级、病理类型等因素控制后,VEGF-C、Gas6仍与动静脉受侵、淋巴结转移、临床分期显著相关,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表4。

2.5 胆管癌患者1年生存率

随访1年,失访8例。114例胆管癌患者1年生存率为65.79%(75/114)。

2.6 生存分析

Kaplan-Meier曲线分析,VEGF-C、Gas6阳性表达患者1年生存率低于阴性表达患者($\chi^2=3.933$ 、6.341, $P=0.012$ 、0.041),见图4。

表2 VEGF-C与胆管癌临床特征相关性 [$n(\%)$]

Table 2 Correlation between VEGF-C and clinical features of cholangiocarcinoma [$n(\%)$]

临床特征	<i>n</i>	阳性(<i>n</i> =101)	阴性(<i>n</i> =21)	χ^2 值	<i>P</i> 值	<i>r</i> 值
年龄(岁)	≤60	65	53(52.48)	12(57.14)	0.152	0.697
	>60	57	48(47.52)	9(42.86)		
性别	男	82	66(65.35)	16(76.19)	0.928	0.336
	女	40	35(34.65)	5(23.81)		
肿瘤部位	中下段胆管	50	40(39.60)	10(47.62)	0.462	0.497
	肝门及肝内胆管	72	61(60.40)	11(52.38)		
肿瘤直径(cm)	≤3	42	34(33.66)	8(38.10)	0.151	0.697
	>3	80	67(66.34)	13(61.90)		
动静脉受侵	是	39	37(36.63)	2(9.52)	5.875	0.015
	否	83	64(63.37)	19(90.48)		
临床分期	Ⅲ~Ⅳ期	71	68(67.33)	3(14.29)	20.105	<0.001
	Ⅰ~Ⅱ期	51	33(32.67)	18(85.71)		
淋巴结转移	是	78	73(72.28)	5(23.81)	17.712	<0.001
	否	44	28(27.72)	16(76.19)		
Gas6	阳性	88	83(82.18)	5(23.81)	29.645	<0.001
	阴性	34	18(17.82)	16(76.19)		

表3 Gas6与胆管癌临床特征相关性 [$n(\%)$]

Table 3 Correlation between Gas6 and clinical features of cholangiocarcinoma [$n(\%)$]

临床特征	<i>n</i>	阳性(<i>n</i> =88)	阴性(<i>n</i> =34)	χ^2 值	<i>r</i> 值	<i>P</i> 值
年龄(岁)	≤60	57	40(45.45)	17(50.00)	0.204	0.041
	>60	65	48(54.55)	17(50.00)		
性别	男	82	60(68.18)	22(64.71)	0.135	0.033
	女	40	28(31.82)	12(35.29)		
肿瘤部位	中下段胆管	50	35(39.77)	15(44.12)	0.191	0.040
	肝门及肝内胆管	72	53(60.23)	19(55.88)		
肿瘤直径(cm)	≤3	42	30(34.09)	12(35.29)	0.016	0.011
	>3	80	58(65.91)	22(64.71)		
动静脉受侵	是	39	34(38.64)	5(14.71)	6.458	0.230
	否	83	54(61.36)	29(85.29)		
临床分期	Ⅲ~Ⅳ期	71	63(71.59)	8(23.53)	23.286	0.437
	Ⅰ~Ⅱ期	51	25(28.41)	26(76.47)		
淋巴结转移	是	78	72(81.82)	6(17.65)	43.798	<0.001
	否	44	16(18.18)	28(82.35)		
Gas6	阳性	101	83(94.32)	18(52.94)	29.465	0.491
	阴性	21	5(5.68)	16(47.06)		

表4 多元线性逐步回归分析
Table 4 Multiple linear stepwise regression analysis

因变量	自变量	β	SE	β (标准化)	t 值	P 值
动静脉受侵	常量	13.279	1.246	-	11.005	<0.001
	VEGF-C	0.659	0.057	0.722	9.452	<0.001
	Gas6	0.718	0.032	0.806	8.613	<0.001
淋巴结转移	常量	11.150	1.407	-	10.724	<0.001
	VEGF-C	0.547	0.044	0.591	10.105	<0.001
	Gas6	0.493	0.030	0.553	9.484	<0.001
临床分期	常量	10.887	1.031	-	13.289	<0.001
	VEGF-C	0.803	0.040	0.827	12.770	<0.001
	Gas6	0.761	0.055	0.801	11.013	<0.001

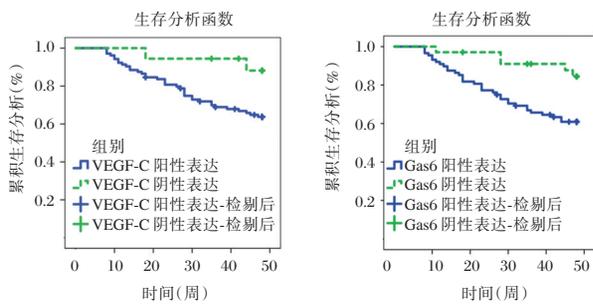


图4 生存曲线
Figure 4 Survival curve

3 讨论

胆管癌是发生于肝外胆道至肝门区、胆管下端的恶性肿瘤,相关数据统计显示,其多见于50~70岁群体,男性多于女性,发病呈现逐渐升高趋势,占肝内外胆道中的60%左右,且5年生存率较低,防治形势较为严峻^[5-6]。故临床需通过探索相关因子改变为寻找新型治疗途径提供依据,以强化疗效,延长生存期。

VEGF-C是血管内皮生长因子之一,在多种恶性肿瘤血管形成中发挥重要作用,与肿瘤发生、发展关系密切^[7]。冯瑶瑶等^[8]报道显示,VEGF-C通过结合特异性受体诱导淋巴管内皮细胞及血管生成参与宫颈癌侵袭转移过程。在此基础上,本研究发现,VEGF-C在胆管癌中呈高表达状态,对肿瘤侵袭、转移产生重要影响,与戚诚等^[9]研究结果相符。分析原因,VEGF-C可结合并激活血管内皮生长因子受体(VEGFR)-3,经由磷脂酰肌醇3激酶(P13K)/蛋白激酶B(Akt)、丝裂原细胞外激酶(MEK)/细胞外信号调节激酶(ERK)等信号通路途径,刺激、加快淋巴管内皮细胞有丝分裂及增生,从而引发淋巴结转移^[10]。且VEGF-C促进肿

瘤新生血管形成过程中,随着肿瘤细胞不断增殖,侵袭周围动静脉。可见下调VEGF-C表达可能是控制胆管癌肿瘤侵袭、转移的重要环节。

Gas6属于多功能域构架蛋白,在人体多种组织器官中广泛表达,相关研究指出,Gas6可通过结合TAM家族成员Axl,发挥调节细胞黏附、增殖、凋亡等多种功能^[11]。既往有文献显示,Gas6在卵巢癌、肺腺癌、口腔鳞癌等恶性肿瘤中呈现高表达趋势^[12]。王子伟等^[13]观点认为,Gas6可作为反映胆管癌恶性程度的指标之一。本研究结果证实,Gas6在胆管癌中不仅呈高表达状态,还与病理改变关系密切。主要是由于Gas6可通过信号转导与转录激活因子1(STAT1)、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)、P13K/Akt等多种信号途径,影响肿瘤细胞血管形成、增殖、迁移及凋亡^[14]。同时,Gas6表达水平越高,肿瘤细胞侵袭、转移可能性越大,不断促进疾病恶化,从而提高预后不良风险,缩短生存期。故Gas6有望成为肿瘤标志物,为临床诊治胆管癌提供新方向。

综上所述,VEGF-C与Gas6在胆管癌组织中表达密切相关,均与动静脉受侵、淋巴结转移、临床分期显著相关,联合检测有助于为临床评估病情、预测生存状况提供参考依据。但本研究受样本量及检测方法的限制,仍需进一步明确VEGF-C与Gas6在胆管癌中的协同作用机制。

参考文献

[1] Kobayashi S, Terashima T, Shiba S, et al. Multicenter retrospective analysis of systemic chemotherapy for unresectable combined hepatocellular and cholangiocarcinoma [J]. Cancer Sci, 2018, 109(8):2549-2557.
[2] 雷正清,司安锋,杨平华,等.肝内胆管癌肝切除术后“教科书式结局”影响因素分析及预测模型建立[J].中国实用外科杂志, 2019, 39(10):1071-1076. (下转第1681页)

原发性高血压患者血清D-D水平预测并发左室肥厚研究

王春燕* 任海霞 齐跃

[摘要] **目的** 研究原发性高血压患者血清D-D水平对左室肥厚的预测价值。**方法** 将2018年6月至2020年6月在本院治疗的原发性高血压患者190例与健康体检者90例作为研究对象,对其一般资料进行统计、测定并比较两组血清D-D等含量,对研究组进行降压治疗1年后,按LVMMI(左室心肌质量指数)将其分为(左室肥厚)消退组和(左室肥厚)未消退组,再次比较两组血清D-D等含量。**结果** 两组一般资料比较差异无统计学意义($P>0.05$),研究组收缩压、舒张压、LVMMI高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),研究组D-D、Fib、PAI-1和t-PA均高于对照组,消退组D-D、Fib、PAI-1和t-PA低于未消退组,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 原发性高血压患者血清D-D明显升高,且可作为预测左室肥厚的有意义指标,可以为临床治疗提供准确的数据,具有无损害、方便、快捷等优点。

[关键词] 原发性高血压; D-D; 左室肥厚

Significance of serum D-D expression in patients with essential hypertension and prediction of concurrent left ventricular hypertrophy

WANG Chunyan*, REN Haixia, QI Yue

(The 984 Hospital of the joint logistics support force of the Chinese people's Liberation Army, Beijing, China, 100094)

[ABSTRACT] **Objective** To study the significance of serum D-D level in patients with essential hypertension and the predictive value of left ventricular hypertrophy. **Methods** 190 patients with essential hypertension and 90 healthy people in our hospital from June 2018 to June 2020 were selected as the research objects, Their general data were statistically analyzed, and the expression levels of D-D in the two groups were measured and compared. After one year of antihypertensive treatment. According to LVMMI, LVMMI was divided into regression group and non-regression group. **Results** There was no significant difference in general data between the study group and the control group ($P>0.05$), but the systolic blood pressure, diastolic blood pressure and LVMMI in the study group were higher than those in the control group ($P<0.05$), D-D, FIB, PAI-1 and t-PA in the study group were higher than those in the control group, and the D-D, FIB, PAI-1 and t-PA in the regression group were lower than those in the non-regression group ($P<0.05$). **Conclusion** The serum D-D level in patients with essential hypertension is significantly increased, which can be used as a meaningful indicator to predict left ventricular hypertrophy, and can provide accurate data for clinical treatment, with the advantages of no damage, convenience and rapidity.

[KEY WORDS] Essential hypertension; D-D; Left ventricular hypertrophy

基金项目:北京市科技计划项目(J2018225)

作者单位:中国人民解放军联勤保障部队第九八四医院心肾内科,北京 100094

*通信作者:王春艳, E-mail:yuemu3269104@163.com

原发性高血压在临床上属于常见病之一,近年来发病率呈上升趋势,左心室肥厚是原发性高血压的常见并发症,涉及心肌细胞、内皮细胞、平滑肌细胞及间质细胞与基质的病理变化,容易患各种并发症,所以大部分高血压患者都伴有不同程度的心脏、大脑、肾脏等器质性病变,然后全身出现临床症状^[1-3]。临床上在治疗高血压的时候,同时也要加强预防左心室肥厚等疾病。及时准确的进行诊断,对治疗与预后有着非常重要的意义。现将在本院治疗的原发性高血压患者与健康体检者作为研究对象,测定D-D等表达量并将其指标作为预测并发左室肥厚进行研究,报道如下:

1 方法

1.1 一般资料

选择2018年6月至2020年6月在本院确诊的原发性高血压患者190例作为研究组,男102例,女88例;平均年龄(54.5±6.7)岁;平均身高(164.2±4.6)cm;平均体重(64±6.9)kg。同时选择2018年6月至2020年6月本院健康体检者90例作为对照组,男56例,女34例,平均年龄(56.7±6.1)岁;平均身高(166.6±7.1)cm;平均体重(62±6.2)kg。两组年龄、性别、身高、体重等指标比较,差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。本研究经伦理委员会许可。

纳入标准:①诊断标准均符合2005年《中国高血压防治指南》标准^[4],即患者在没有使用降压药时的收缩压在140 mmHg以上,舒张压在90 mmHg以上;②正在使用降压药进行治疗,即使其收缩压低于140 mmHg、舒张压低于90 mmHg,仍诊断为高血压患者。③患者及家属均知情并同意参加此项研究,均签署知情同意书并自愿配合参与研究。排除标准:①冠心病及心脏瓣膜疾病患者,患者的左室射血分数低于50%者;②糖尿病及甲状腺功能疾病患者;③贫血及低血钾患者;④肝、肾等重要脏器损害的患者;⑤具有肥厚型及扩张型心肌病和其他具有明确病因的心肌病患者。

1.2 方法

统计所有病例一般资料,早晨空腹采集静脉血2 mL加入1/10体积0.109 mol/L枸橼酸钠抗凝管中,3 000 r/min离心10 min,收集上清液(血浆),测定Fib、D-D、t-PA、PAI-1水平。Fib和D-D采用SYSMEX公司CA7000血凝分析仪及配套试剂测

定,2 h内检测完毕;t-PA、PAI-1采用上海太阳生物公司相应ELISA试剂盒检测,6 h内检测完毕,方法按照说明书标准。正常范围:Fib(2~4)g/L,D-D(0~500)ng/mL,t-PA(1~12)ng/mL,PAI-1(5~45)ng/mL。心脏超声检查使用仪器为彩色多普勒超声心动图机,左房扩大的诊断依据为左房前后径在35 mm以上;左室扩大的诊断依据男性和女性分别在5.5 cm,5.0 cm以上;左室心肌质量(left ventricular myocardial mass, LVMM)的计算公式为:LVMM(g)=1.04[(LVEDD+IVST+LVPWT)³-LVEDD³]-13.6。左室舒张末内径(left ventricular end-diastolic dimension, LVEDD),左室舒张末期室间隔厚度(interventricular septum thickness, IVST),左室舒张末期后壁度(Left Ventricular Posterior Wall Thickness, LvPwT)。体表面积(body Surface Area, BSA)的计算公式为:BSA(m²)=0.006 1×身高(cm)+0.012 8×体质量(kg)-0.152 9。左室心肌质量指数(left ventricular myocardial mass index, LVMMI)的计算公式为:LVMMI(g/m²)=LVMM/BSA,左室肥厚的诊断依据为LVMMI在125 g/m²以上^[5]。

1.3 治疗方法

对研究组治疗时使用的基础药物为ACEI或血管紧张素II受体阻滞剂(ARB),同时和其他降压的药物联合使用,治疗的目的是患者的收缩压降至140 mmHg以下、舒张压降至90 mmHg以下。使用药物对患者进行降压治疗1年后,对其进行心电图及24 h动态心电图及心脏超声等检查,观察各项指标,按照血压是否达到正常标准,将达到正常标准患者纳入为(高血压)消退组,为达到正常标准且依旧高血压纳入为(高血压)未消退组。

1.4 观察指标

同时比较两组观察两组D-D,Fib,PAI-1和t-PA指标。并对分析消退组和未消退组患者的D-D,Fib,PAI-1和t-PA情况。

1.5 统计学分析

应用SPSS 22.0软件进行统计分析,计量采用($\bar{x}\pm s$)表示,两组间差异比较采用 t 检验;计数资料用 $n(\%)$ 表示,比较采用 χ^2 检验;相关性分析采用Spearman相关性分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组一般资料的比较

两组一般在性别、年龄、体重等一般资料比较

差异无统计学意义($P>0.05$),有可比性。研究组收缩压、舒张压、LVMMI 高于对照组,差异有统计

表1 两组一般资料比较($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Comparison of general data between the 2 groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	性别(男/女)	年龄(岁)	体重(kg)	收缩压(mmHg)	舒张压(mmHg)	LVMMI(g/m ²)
研究组	190	102/88	54.5±6.7	64±6.9	171±4.6	94±12	139.4±22.3
对照组	90	56/34	56.7±6.1	62±6.1	123±6.7	75±6	114.8±8.5
χ^2/t 值		32	3.74	21.4	9.4	44.2	23.2
<i>P</i> 值		0.74	0.47	0.56	0.012	0.032	0.015

2.2 两组 D-D, Fib, PAI-1 和 t-PA 比较

研究组 D-D, Fib, PAI-1 和 t-PA 均高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表2。

表2 两组血清 D-D, Fib, PAI-1 和 t-PA 比较($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Comparison of serum D-D, FIB, PAI-1 and t-PA between the two groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	D-D (ng/mL)	Fib (g/L)	PAI-1 (ng/mL)	t-PA (ng/mL)
研究组	190	547±78.2	5.9±1.1	49.7±9.6	16.4±3.36
对照组	90	118±18.4	3.5±0.58	34.3±6.2	5.6±0.45
<i>t</i> 值		1.55	12.35	17.53	33.75
<i>P</i> 值		0.004	0.023	0.036	0.003

2.3 研究组血清 D-D 水平与 LVMMI 相关性分析

将研究组 190 例患者血清 D-D 水平与 LVMMI 进行 Spearman 相关性分析,原发性高血压患者血清 D-D 水平与 LVMMI 呈正相关($r=0.663, P<0.01$)。

2.4 两组 D-D, Fib, PAI-1 和 t-PA 比较

消退组的 D-D, Fib, PAI-1 和 t-PA 低于未消退组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表3。

表3 消退组与未消退组 D-D, Fib, PAI-1 和 t-PA 比较($\bar{x}\pm s$)

Table 3 Comparison of D-D, FIB, PAI-1 and t-PA between regression group and non regression group ($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	D-D (ng/mL)	Fib (g/L)	PAI-1 (ng/mL)	t-PA (ng/mL)
消退组	116	264±35.6	3.5±0.8	37.4±10.6	9.6±2.3
未消退组	74	522±69.5	4.9±1.1	46.1±7.4	13.6±2.67
<i>t</i> 值		34.3	36.2	3.6	9.7
<i>P</i> 值		0.023	0.005	0.014	0.043

3 讨论

高血压患者中 90% 以上为原发性高血压,原发性高血压的发病机制复杂,是由多种因素协同作用而引起的慢性疾病,多数患者发病过程隐匿,病情进展缓慢,但并发症多^[6]。高血压发生左心室

学意义($P<0.05$)。见表1。

肥厚的几率达 20%~60%,有研究发现部分患者左心室肥厚先于高血压出现。崔雪莲等^[7]研究发现,血压越高,左心室重构程度越严重。其机制是动脉壁弹力纤维减少并且胶原纤维增加,从而导致血管顺应性及弹性降低。本研究从原发性高血压入手,分析 D-D, Fib, PAI-1 和 t-PA 等指标的含量,探讨表达意义,研究 D-D 在原发性高血压并发左心室肥厚中的预测价值。

高血压患者容易出现左室肥厚的症状,在多种心血管事件的发生中,此症状是其发生的一个重要独立危险因素^[8]。如果患者没有采用正确、有效的治疗方案,血压控制不佳将会使患者的左室扩大进一步加重。本研究结果表明 D-D 参与左室肥厚的病理过程。D-D 是纤维蛋白单体经活化因子交联后再经纤溶酶水解产生的一种特异性降解产物,其生成或增高反映了凝血和纤溶系统的双重激活,正常情况下,外周血中凝血、抗凝血、纤溶、血小板等系统的功能处于一种相互制约的动态平衡中^[9-12]。在高血压时,由于血液的高剪切应力、血液淤滞、血管内皮的损伤、硬化等因素的作用,刺激和诱发各系统的功能发生异常变化。D-D 在此过程中可作为体内血栓形成的重要指标之一。D-D 是由纤溶酶作用于交联纤维蛋白产生的小分子二聚体,交联纤维蛋白多聚体降解的产物,纤维蛋白降解产物 D-D 的水平升高,说明存在继发性纤溶过程,而先生成凝血酶,后又有纤溶系活化;并且也反映在血栓形成的局部纤溶酶活性或水平超过血浆中纤溶酶活性或浓度^[13-14]。Fib、t-PA 和 PAI.1 水平升高也充分支持了左室肥厚的病理过程, Fib 在凝血的最后阶段,可使血液凝固, PAI 可结合到内皮细胞表面,防止过度纤溶。tPA 将纤溶酶原精氨酸 561 缬氨酸 562 处的肽键裂解,形成具有活性的纤溶酶,起到溶解血栓的作用。因此,由于抗凝作用减弱、血小板黏附与聚集以及

纤溶活性下降造成原发性高血压并发左室肥厚。

综上所述,在临床上应重视对原发性高血压患者的血栓前状态的研究,在选用降压药物治疗的同时,应当努力保护其内皮功能,适当采用抗血小板活化,抗凝,降低患者血液黏稠度等综合治疗措施,以降低其心脑血管并发症的发生。

参考文献

- [1] 杨志家,白彦芳,王绍伟,等.原发性高血压伴左心室肥厚患者血清硫脑脂与QT间期离散度和NT-proBNP水平的相关性研究[J].现代中西医结合杂志,2020,29(16):1761-1764.
- [2] 刘晓雨,贾国伟,孙荣国,等.高血压合并心功能不全对患者Cyp、GDF-15、IL-18水平影响研究[J].分子诊断与治疗杂志,2020,12(5):592-595+620.
- [3] Liu Y, Li F, Sun H, et al. Combined prognostic significance of D-dimer level and platelet count in acute ischemic stroke [J]. *Thromb Res*, 2020, 194.
- [4] 中国高血压防治指南(2018年修订版)[J].中国心血管杂志,2019,24(1):24-56.
- [5] Long X, Huang M, Hu H. Revascularization may accelerate renal dysfunction in hypertensive patients with moderate atherosclerotic stenosis of renal arteries [J]. *Med Hypotheses*, 2020, 144.
- [6] 王丽娜,葛君琍,郭苗.老年原发性高血压患者血清同型半胱氨酸、胱抑素C水平与血压类型的关系研究[J].中国卫生检验杂志,2019,29(17):2100-2103.
- [7] Jing W, Peng R, Zhu M, et al. Differential Expression and Diagnostic Significance of Pre-Albumin, Fibrinogen Combined with D-Dimer in AFP-Negative Hepatocellular Carcinoma[J]. *Pathol Oncol Res*, 2020, 26(3):1669-1676.
- [8] Mehra A, Suri V, Kumari S, et al. Association of mild cognitive impairment and metabolic syndrome in patients with hypertension[J]. *Asian J Psychiatr*, 2020, 53:102185.
- [9] Nachand D, Huang S, Bullen J, et al. Assessment of ventilation-perfusion scans in patients with chronic thromboembolic pulmonary hypertension before and after surgery and correlation with clinical parameters [J]. *Clin Imaging*, 2020, 66:147-152.
- [10] 吴少南,张霜,王光磊.原发性高血压患者血清Hcy水平与血管损害的相关性探讨[J].中国实用医药,2019,14(23):34-35.
- [11] Hermida RC, Smolensky MH, Mojón A, et al. New perspectives on the definition, diagnosis, and treatment of true arterial hypertension[J]. *Exp opin pharmacother*, 2020.
- [12] Nakwan N, Jain S, Kumar K, et al. An Asian multicenter retrospective study on persistent pulmonary hypertension of the newborn: incidence, etiology, diagnosis, treatment and outcome [J]. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2020, 33(12):2032-2037.
- [13] Al-Omary MS, Sugito S, Boyle A J, et al. Pulmonary Hypertension Due to Left Heart Disease: Diagnosis, Pathophysiology, and Therapy[J]. *Hypertension*, 2020.
- [14] Bieber AK, Pehrson LJ, Vento S, et al. The Psychosocial Impact of a Diagnosis of Hypertension in Pediatric Patients [J]. *Kidney IntRep*, 2020, 5(2):228-230.
- [3] 常亚伟,李赛,琚绍坦.血管内皮生长因子基因936C/T位点多态性与急性心肌梗死的关系[J].分子诊断与治疗杂志,2020,12(2):151-155.
- [4] 姜涛,刘洪臣.生长停滞特异性基因6在肿瘤研究中的进展[J].中华老年口腔医学杂志,2017,15(2):121-124.
- [5] Umetsu S, Wakiya T, Ishido K, et al. Effect of sarcopenia on the outcomes after pancreaticoduodenectomy for distal cholangiocarcinoma[J]. *Anz J Surg*, 2018, 88(9):E654-E658.
- [6] 王垒,林自国,杨田,等.淋巴结清扫在肝内胆管癌根治术中临床价值的多中心回顾性研究[J].中华消化外科杂志,2020,19(01):72-80.
- [7] 彭武君.肺鳞癌患者手术前后血清VEGF-C、IL-6及MMP-2水平变化及其临床意义[J].标记免疫分析与临床,2019,26(3):140-143.
- [8] 冯瑶瑶,冯继红,周航.VEGF-A、VEGF-C在宫颈鳞癌侵袭转移中的作用机制研究进展[J].山东医药,2018,58(3):104-107.
- [9] 戚诚,赵晓东,刘三光,等.血管内皮生长因子C和细胞周期蛋白D1在胆管癌组织的表达及其意义[J].中华实验外科杂志,2016,33(5):1330-1332.
- [10] Liu D, Li L, Zhang XX, et al. Correction: SIX1 Promotes Tumor Lymphangiogenesis by Coordinating TGFβ Signals That Increase Expression of VEGF-C [J]. *Cancer Res*, 2019, 79(7):1715-1715.
- [11] 陈秋莉,徐元宏,李涛.TAM受体信号转导通路与肿瘤发生发展关系研究进展[J].中国免疫学杂志,2016,32(12):1874-1877.
- [12] Hirschi KM, Chapman S, Hall P, et al. Gas6 protein induces invasion and reduces inflammatory cytokines in Oral Squamous Carcinoma Cells[J]. *J Oral Pathol Med*, 2018, 47(8):748-754.
- [13] 王子伟,吴娟,冯浩.生长停滞特异性基因6和基质金属蛋白酶9在胆管癌组织中的表达及意义[J].河北医科大学学报,2019,40(1):52-55.
- [14] 陈立婷,卢萍,孙宇辉.Gas6/Axl信号通路与肿瘤关系的研究进展[J].现代肿瘤医学,2016,24(19):3165-3168.

(上接第1677页)

CK-MB、CRP、ALB 以及 D-二聚体水平对于缺血性肠病患者的价值研究

袁燕文* 许哲 黄妙兴 陈孟君

[摘要] 目的 探讨肌酸激酶同工酶(CK-MB)、C反应蛋白(CRP)、白蛋白(ALB)和D-二聚体(D-D)水平对缺血性肠病(ICBD)患者的价值研究。方法 选取2016年2月至2020年5月于本院收治的疑似ICBD患者86例,作为研究组,再选取同时段于本院行体检的健康志愿者40例,作为对照组。观察分析研究组患者入院后第1、7、14 d两组血清D-D、CK-MB、CRP、ALB水平及其对ICBD的诊断与预后预测价值。结果 研究组患者入院后第1、7、14 d血清D-D、CK-MB、CRP、ALB水平差异明显高于对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。联合检测对ICBD预后预测的特异性(69.13%)、敏感度(88.57%)、阳性预测值(89.58%)、阴性预测值(83.02%)。结论 血清D-D、CK-MB、CRP和ALB水平对ICBD的早期诊断及预后预测具有较高参考价值,可以协助临床早期诊断治疗,改善预后。

[关键词] 肌酸激酶同工酶; C反应蛋白; 白蛋白; D-二聚体, 缺血性肠病

The value of CK - MB, CRP, ALB, and D - dimer levels in patients with ischemic bowel disease

YUAN Yanwen*, XU Zhe, HUANG Miaoxing, CHEN Mengjun

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

[ABSTRACT] Objective To investigate the value of creatine kinase isoenzyme (CK-MB), C-reactive protein (CRP), albumin (ALB) and D-dimer (D-D) levels in patients with ischemic bowel disease (ICBD). Methods 86 suspected ICBD patients admitted to our hospital from February 2016 to May 2020 were selected as the study group, and 40 healthy volunteers who underwent physical examination in our hospital at the same time were selected as the control group. The serum LEVELS of D-D, CK-MB, CRP and ALB in the study group on day 1, 7 and 14 after admission and their diagnostic and prognostic value for ICBD were observed and analyzed. Results The serum D-D, CK-MB, CRP, ALB levels of d1, 7 and 14 in the study group were significantly higher than those in the control group ($P<0.05$). The specificity (69.13%), sensitivity (88.57%), positive predictive value (89.58%) and negative predictive value (83.02%) of the combined test were significantly higher than those in the control group ($P<0.05$). Conclusion The serum levels of D-D, CK-MB, CRP and ALB have high reference value for the early diagnosis and prognosis prediction of ICBD, which can assist the early clinical diagnosis and treatment and improve the prognosis.

[KEY WORDS] Creatine kinase isoenzyme; C-reactive protein; Albumin; D-dimer, Ischemic bowel disease

缺血性肠病(Ischemic bowel disease, ICBD)是指由肠壁缺血、缺氧引起,最终导致肠道梗死的疾病^[1-2]。其临床主要表现为腹痛、便血等症状,大多数患者ICBD主要由血管病变或灌注异常等引

起。目前临床中ICBD的发病率虽然不高,但其发病时无特殊症状和体征,临床容易误诊、漏诊。若患者出现肠系膜血管阻塞性疾病,其病死率可高达70%~90%,严重威胁患者生命健康^[3]。故临床

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:袁燕文, E-mail: dhz363387227@163.com

对 I CBD 进行及时准确诊断至关重要。既往研究发现肌酸激酶同工酶 (Creatine kinase isoenzyme-MB, CK-MB)、C 反应蛋白 (C-reactive protein, CRP)、白蛋白 (Albumin, ALB) 和 D-二聚体水平 (D-dimer, D-D) 与 I CBD 的诊断及预后有一定关系^[4-5]。其中 CK-MB 在各种肌肉萎缩及心肌梗塞等病变诊断中具有较高特异性,其与 I CBD 的关系也具有一定探讨意义。CRP 是机体产生炎症时水平急剧上升的急性蛋白,其可以反应出病变部位炎症反应程度。ALB 主要由肝脏合成,当机体发生急性出血时可见其水平异常降低。D-D 是检测是诊断人体血栓性疾病的重要指标,近年来有研究显示, D-D 水平可以作为诊断 I CBD 的指标之一^[6-7]。本次研究观察分析 CK-MB、CRP、ALB 以及 D-D 对 I CBD 患者的价值。具体如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2016 年 2 月至 2020 年 5 月于本院收治的疑似 I CBD 患者 86 例,作为研究组,研究经医院伦理委员会批准。其中男性患者 45 例,女性 41 例,年龄 42~75 岁,平均年龄 (62.12±6.22) 岁。再选取同时段于本院行体检的健康志愿者 40 例,作为对照组,其中男 24 例,女 16 例,年龄 24~67 岁,平均年龄 (42.31±10.88) 岁。两组人群性别、年龄等一般资料比较,差异无统计学意义 ($P>0.05$),具有可比性。

纳入标准:①患者突发剧烈腹痛,伴有呕吐、腹泻、便血等消化道症状;②研究组患者均伴有糖尿病、低蛋白血症等缺血性肠病高危因素;③患者及家属对本次研究知情并自愿签订知情同意书;④年龄 20~80 岁之间。排除标准:①临床资料不完整者;②中途退出或意识障碍无法配合者;③对本次研究不耐受者;④合并有严重心肝肾等重要器官器病变者。

1.2 方法

健康志愿者于体检时抽取清晨空腹静脉血 5 mL,患者于疼痛发作 24 h 内抽取肘静脉血 5 mL,均置于抗凝管中,静置至分层,再将其置于离心机中,以 3 000 r/min 的速度离心 10 min 后,取上层血清, -80℃ 冷藏待测。所有操作均由检验人员严格按照使用仪器及配套试剂盒说明书完成。用速率法检测血清 CK-MB 水平,采用强生 VITROS 5600 全自动生化免疫分析仪检测,配套试剂盒 (奥森多临床诊断 (美国) 股份有限公司);用溴甲酚绿法

测定血清 ALB 水平,采用 BECKMAN COULTER AU Chemistry Systems AU5831 分析仪及其配套试剂盒 (贝克曼库尔特实验系统 (苏州) 有限公司);用免疫荧光干式定量法检测 CRP 水平,采用 BODITECH A5000 全自动干式荧光免疫分析仪及其配套试剂盒 (巴迪泰 (广西) 生物科技有限公司);用免疫比浊法检测血浆 D-二聚体 D-D 水平,采用 STAGO STA-R EVOL 全自动凝血分析仪及其配套试剂盒 (思塔高诊断技术 (天津) 有限公司)。所有患者入院第二天行影像学检查,确诊 I CBD^[8]。

1.3 观察指标

观察研究组患者入院后第 1、7、14 d 两组人群血清 D-D 水平,当 $D-D \geq 400 \mu\text{g/L}$ 时,为阳性, $D-D < 400 \mu\text{g/L}$ 时为阴性。分析 D-D 检测对早期诊断 I CBD 的价值。灵敏度 = 检出阳性例数 / 总确诊阳性例数 $\times 100\%$, 特异度 = 检出阴性例数 / 总确诊阴性例数 $\times 100\%$ 。观察分析两组人群血清 CK-MB、CRP 和 ALB 水平,研究组患者血清 CK-MB、CRP 水平的灵敏度、特异度和准确度及 ALB 对 I CBD 预后预测价值。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 22.0 统计学软件进行数据分析,其中计数资料用 $n(\%)$ 表示,采用 χ^2 检验,计量资料用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,组间比较采用 t 检验,采用受试者工作特征曲线 (receiver operator characteristic curve, ROC) 分析判断 I CBD 预后价值,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 研究组患者入院后第 1、7、14 d 与对照组血清 D-D 水平比较

研究组患者入院后第 1、7、14 d 血清 D-D 水平显著高于对照组,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$),研究组患者入院 14 d 后血清 D-D 水平显著低于入院第 1、7 d 后,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 研究组患者入院后第 1、7、14 d 与对照组血清 D-D 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 comparison of serum D-dimer levels between control on the 1st, 7th and 14th day after admission in the study group ($\bar{x} \pm s$)

时间	研究组 ($n=70$)	对照组 ($n=40$)	t 值	P 值
第 1 d	5470.13±875.31	314.21±60.15	8.641	0.041
第 7 d	3671.24±545.31	314.21±60.15	6.582	0.035
第 14 d	1566.68±477.08 ^{a,b}	314.21±60.15	4.587	0.018

注:与第 1 天比较,^a $P < 0.05$;与第 7 天比较,^b $P < 0.05$ 。

2.2 血清D-D检测对早期诊断ICBD的价值

血清D-D水平对诊断ICBD的灵敏度为92.86%(65/70),特异度为81.25%(13/16)。见表2。

表2 血清D-D检测对早期诊断ICBD的价值($\bar{x}\pm s$)

D-D 检测结果	D-D 水平 ($\mu\text{g/L}$)	肠系膜下动脉造影确诊结果	
		阳性	阴性
阳性	5470.13±875.31	65	3
阴性	321.14±66.18	5	13
合计		70	16

2.3 两组人群血清CK-MB、CRP和ALB水平比较

研究组患者血清CK-MB和CRP水平显著高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),研究组患者血清ALB水平显著低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表3。

表3 两组人群血清CK-MB、CRP和ALB水平比较($\bar{x}\pm s$)

血清指标	时间	研究组 ($n=70$)	对照组 ($n=40$)	t 值	P 值
CK-MB(U/L)	第1 d	50.97±20.19	5.24±2.07	6.841	0.042
	第7 d	49.97±20.19	5.96±2.36	7.852	0.035
	第14 d	53.97±20.19	5.01±2.51	8.645	0.023
CRP(mg/L)	第1 d	6.37±2.21	4.09±1.87	5.369	0.028
	第7 d	6.65±2.69	4.27±1.36	7.452	0.064
	第14 d	6.16±2.56	4.22±1.91	6.035	0.004
ALB(g/L)	第1 d	30.32±3.69	35.16±3.68	5.217	0.029
	第7 d	30.42±4.14	37.32±3.51	6.354	0.018
	第14 d	31.00±4.00	37.00±3.00	5.311	0.010

2.4 研究组患者血清CK-MB和CRP水平对ICBD预测诊断

血清CK-MB水平对ICBD诊断的特异度显著高于CRP,差异有统计学意义($P<0.05$),血清CPR水平对ICBD诊断的灵敏度和准确度明显高于CK-MB,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表4。

2.5 血清ALB、CK-MB、CRP、D-D水平对ICBD预后预测价值

表5 血清ALB水平对ICBD预后预测价值

Table 5 the value of serum ALB level in predicting the prognosis of ICBD

血清指标	最佳截断点	特异性(%)	灵敏度(%)	AUC	95%CI	阳性预测值(%)	阴性预测值(%)	P 值
ALB	34(g/L)	61.71	87.89	0.834	0.769~0.899	87.14	75.24	0.015
CK-MB	25.00(U/L)	23.24	45.28	0.712	0.605~0.819	72.91	64.46	0.013
CRP	3.544(mg/L)	22.17	51.24	0.727	0.642~0.812	80.35	70.26	0.011
D-D	0.78($\mu\text{g/L}$)	34.23	61.50	0.736	0.666~0.805	80.00	73.25	0.024
联合检测	-	69.13	88.57	0.876	0.828~0.924	89.58	83.02	0.010

血清ALB对ICBD预后预测的特异性、敏感度、阳性预测值、阴性预测值显著高于CK-MB、CRP、D-D,联合检测特异性、敏感度、阳性预测值、阴性预测值显著高于CK-MB、CRP、D-D、ALB,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表5。

表4 研究组患者血清CK-MB和CRP水平对ICBD预测

Table 4 the serum CK-MB and CRP levels of the patients in the study group predicted the diagnosis of ICBD

预测结果(%)	CK-MB(U/L)	CRP(mg/L)	P 值
灵敏度	79.46	83.57	0.012
特异度	45.46	39.38	0.031
准确度	68.88	69.82	0.005

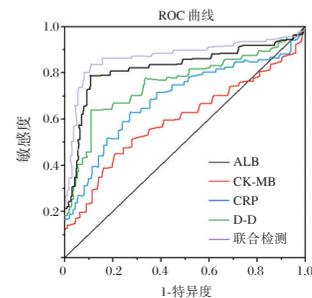


图1 血清ALB、CK-MB、CRP、D-D水平及联合检测的ROC曲线

Figure 1 Serum ALB, CK-MB, CRP, D-D level and ROC curve of combined detection

3 结论

ICBD的主要发病人群是中老年人,其患者往往伴有高血压、糖尿病、心功能不全等疾病,并且该病病情发展迅速,早期若不能及时发现并治疗,待患者出现明显腹部体征时,患者缺血肠道可能已出现不可逆性肠坏死或局部缺血坏死穿孔等情况,危及其生命^[9-10]。一般情况下,人体胃肠道血流量占心排血量的10%,其血流量仅在运动或餐后会发生一定变化,而急性ICBD的主要发病原因是肠道血管或肠管发生病变,导致局部血流量不足,从而引起肠道缺血缺氧坏死^[11-12]。临床上早期ICBD虽无特异性症状和体征,但大多患者可出现

腹痛伴便血、呕吐、腹胀、腹泻等症状,并在24 h内行隐血试验,可显示为阳性。目前临床诊断ICBD的主要方式有实验室检查,如检测肠脂肪酸结合蛋白、D-乳酸和白细胞介素等水平;结肠镜检查可以明确患者病变部位及病变程度,但易引发肠粘膜急性损伤;影像学检查可以准确诊断患者疾病发展情况,是目前ICBD诊断的金标准。为早期对疾病进行及时有效诊断及治疗,本研究对疑似ICBD患者血清D-D、CK-MB、CRP和ALB水平进行测定,分析其对ICBD诊断及预后的预测价值。

D-D是一种纤溶标志物,是由纤维蛋白单体经活化因子交联后再经水解形成的产物。在ICBD的诊断中,D-D可以作为重要参考指标之一。临床采用单一指标进行检测易出现漏诊、误诊现象,因此联合其他指标进行检测对ICBD诊断至关重要。有研究表明,CK-MB水平会随着ICBD患者缺血程度加重而逐渐升高^[13-14]。CRP在组织损伤后48~72 h,其水平达到高峰,能够反应局部损伤程度。ALB是血液中含量较为丰富的一种蛋白质,对人体正常生理状态维持具有重要作用。ALB可以通过与体内相关物质结合运输内源性和外源性物质。除此之外,其还可以维持血浆胶体渗透压和酸碱平衡等。有研究表明,血清ALB水平低与缺血性心脏病、心力衰竭等疾病有关,是冠状动脉疾病、心力衰竭等病的独立预后因子^[15-16]。而心力衰竭、冠心病等是ICBD的危险因素。因此ALB与ICBD存在一定关系。本次研究结果说明CK-MB和CRP对ICBD患者的诊断各具优势,有较高参考价值。分析血清ALB、CK-MB、CRP、D-D水平对ICBD预后预测价值,结果显示血清ALB对ICBD预后预测的特异性、敏感度、阳性和阴性预测值均处于较高水平,联合检测的特异性、敏感度更高。目前临床与本次类似研究较少,结果有待进一步验证。

综上所述,检测患者血清D-D、CK-MB、CRP和ALB水平对ICBD的早期诊断及预后预测具有较高参考价值,可为临床早期诊断治疗提供数据支持。

参考文献

[1] 许海尘,周逸婵,丁清清,等. 老年人急性缺血性肠病早期诊断的临床分析[J]. 江苏医药, 2018, 44(10): 1201-1202.

[2] Zhao L, Xiong Q, Stary CM, et al. Bidirectional gut-brain-microbiota axis as a potential link between inflammatory bowel disease and ischemic stroke [J]. *J Neuroinflammation*, 2018, 15(1): 339-340.

[3] 钟春荣,符传艺,张捷君,等. 缺血性肠病患者临床特征及预后危险因素分析[J]. *临床军医杂志*, 2020, 48(8): 977-978.

[4] Chen P, Li Y, Li L, et al. Circulating microRNA146b-5p is superior to C-reactive protein as a novel biomarker for monitoring inflammatory bowel disease [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2019, 49(6): 733-743.

[5] Chen YH, Wang L, Feng SY, et al. The Relationship between C-Reactive Protein/Albumin Ratio and Disease Activity in Patients with Inflammatory Bowel Disease [J]. *Gastroenterol Res Pract*, 2020, 14(2): 35-39.

[6] Minordi LM, Larosa L, Papa A, et al. Assessment of Crohn's Disease Activity: Magnetic Resonance Enterography in Comparison with Clinical and Endoscopic Evaluations [J]. *J Gastrointest Liver Dis*, 2019, 28(45): 213-224.

[7] 王丽娜,柯岩美,宋吉慧,等. 肠系膜CTA的影像学表现联合血浆D-二聚体水平变化对缺血性肠病严重程度的诊断价值[J]. *现代消化及介入诊疗*, 2019, 24(4): 430-433.

[8] 缺血性肠病诊治中国专家建议(2011)写作组,中华医学会老年医学分会,《中华老年医学杂志》编辑委员会. 老年人缺血性肠病诊治中国专家建议(2011)[J]. *中华老年医学杂志*, 2011, 30(1): 1-6.

[9] Akanbi O, Adejumo AC, Saleem N, et al. Sick cell disease is associated with higher mortality among patients hospitalized with ischemic bowel disease [J]. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2018, 30(9): 1027-1032.

[10] 武霞霞,保志军. 老年人缺血性肠病的诊治进展[J]. *国际消化病杂志*, 2019, 39(5): 321-324.

[11] Le Gall G, Kirchgessner J, Bejaoui M, et al. Clinical activity is an independent risk factor of ischemic heart and cerebrovascular arterial disease in patients with inflammatory bowel disease [J]. *PLoS One*, 2018, 13(8): 45-48.

[12] Adejumo AC, Akanbi O, Pani L. Among inpatients, ischemic bowel disease predisposes to *Clostridium difficile* infection with concomitant higher mortality and worse outcomes [J]. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2019, 31(1): 109-115.

[13] 肖丹丹,张勇,陈秀红,等. AMI患者发病后血浆UCA1, CK-MB, cTnI变化及其诊断价值分析[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2020, 012(001): 103-107.

[14] Wan B, Pan X, Ma J, et al. Umbilical cord blood troponin I, myoglobin and CK-MB in neonatal hypoxic ischemic encephalopathy and the clinical significance [J]. *Exp Ther Med*, 2020, 19(1): 545-550.

[15] Prener SB, Kumar A, Zhao L, et al. Effect of Serum Albumin Levels in Patients With Heart Failure With Preserved Ejection Fraction (from the TOPCAT Trial) [J]. *Am J Cardiol*, 2020, 125(4): 575-582.

[16] Kocatürk M, Kocatürk Ö. Assessment of relationship between C-reactive protein to albumin ratio and 90-day mortality in patients with acute ischaemic stroke [J]. *Neurol Neurochir Pol*, 2019, 53(3): 205-211.

GPC-1、miRNA-9及Caspase-3在肺腺癌中的表达及与病情和预后生存的相关性

智雅婧 冯铁虹 那顺孟和 郑妮*

[摘要] **目的** 探讨磷脂酰肌醇蛋白多糖-1(GPC-1)、微小RNA-9(miRNA-9)及天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)在肺腺癌中的表达及与病情、预后生存的相关性。**方法** 2015年8月至2017年8月本院收治的肺腺癌患者的临床资料进行整理、分析(76份肺腺癌组织标本及76份癌旁正常组织标本),采用免疫组化染色法对比肺腺癌组织及癌旁正常组织中GPC-1、miRNA-9及Caspase-3表达情况。**结果** 肺腺癌组织中GPC-1阳性表达率、Caspase-3阴性表达率、miRNA-9高表达率明显高于癌旁正常组织($P<0.05$)。GPC-1、miRNA-9及Caspase-3表达情况与肺腺癌患者年龄、性别、分化程度、肿瘤直径、血管侵犯无关($P>0.05$);与TNM分期、淋巴结转移有关($P<0.05$)。76例肺腺癌患者3年生存率为35.53%(49/76),GPC-1阳性表达、miRNA-9高表达、Caspase-3阴性表达的肺腺癌患者死亡率更高($P<0.05$)。生存分析显示GPC-1(表达阴性)、miRNA-9(低表达)、Caspase-3(阳性表达)者生存期较长,Keplan-meier生存曲线明显不同($P<0.05$)。临床分期(Ⅲ~Ⅵ期)、有淋巴结转移、GPC-1表达(阳性)、miRNA-9(高表达)及Caspase-3表达(阴性)为影响肺腺癌患者预后生存的独立危险因素($P<0.05$)。**结论** GPC-1、miRNA-9、Caspase-3异常表达与肺腺癌患者病情进展密切相关,且不利于患者预后。

[关键词] GPC-1;miRNA-9;Caspase-3;肺腺癌中;病情;预后生存

The expression of GPC-1, miRNA-9 and Caspase-3 in lung adenocarcinoma and its correlation with the condition and prognostic survival

ZHI Yajing, FENG Tiehong, NA Shun menghe, ZHENG Ti*

(Inner Mongolia Medical University, Huhhot, Inner Mongolia, China, 010000)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the expression of Glypicans-1 (GPC-1), microRNA-9 (miRNA-9) and Cysteiny Aspartate-Specific Proteinases-3 (Caspase-3) in lung adenocarcinoma and its correlation with the condition and prognostic survival. **Methods** The clinical data of patients with lung adenocarcinoma admitted to our hospital from August 2015 to August 2017 were sorted and analyzed (76 specimens of lung adenocarcinoma tissue and 76 specimens of normal tissue adjacent to cancer). Immunohistochemical staining was used to compare the expression of GPC-1, miRNA-9 and Caspase-3 in lung adenocarcinoma tissue and normal tissues adjacent to the cancer. **Results** The positive expression rate of GPC-1, the negative expression rate of Caspase-3 and high expression rate of miRNA-9 in lung adenocarcinoma tissue were significantly higher than those in normal tissues adjacent to cancer. The expression of GPC-1, miRNA-9 and Caspase-3 was not related to the age, gender, degree of differentiation, tumor diameter, and vascular invasion in patients with lung adenocarcinoma ($P>0.05$), it was related to TNM staging and lymph node metastasis ($P<0.05$). The 3-year survival rate of 76 patients with lung adenocarcinoma was 35.53% (49/76), and the mortality of patients with lung adenocarcinoma and GPC-1 positive expression, high miRNA expression, and Caspase-3 negative expression was

基金项目:内蒙古自治区自然科学基金项目(2016MS1259)

作者单位:内蒙古医科大学,内蒙古自治区,呼和浩特010000

*通信作者:郑妮, E-mail: candy_zt94@sina.com

higher ($P<0.05$). Survival analysis showed that patients with GPC-1 (expression negative), miRNA-9 (low expression), and Caspase-3 (positive expression) had longer survival times, and Kaplan-meier survival curves were significantly different ($P<0.05$). Clinical staging (stage III ~ VI), lymph node metastasis, GPC-1 expression (positive), miRNA (high expression) and Caspase-3 expression (negative) were independent risk factors affecting the prognosis of patients with lung adenocarcinoma ($P<0.05$). **Conclusion** Abnormal expressions of GPC-1, miRNA, and Caspase-3 are closely related to the disease progression of patients with lung adenocarcinoma and are not conducive to the prognosis of patients.

[KEY WORDS] GPC-1; miRNA-9; Caspase-3; Lung adenocarcinoma; Disease condition; Prognostic survival

肺腺癌恶性程度高,是临床临床诊治困难的疾病之一。目前肺腺癌的发生及病程中相关分子机制的认识尚不够深入,因此寻找新的生物标志物对提高肺腺癌的诊断率,对改善患者预后意义重大。磷脂酰肌醇蛋白聚糖(glypicans, GPC)是一类由蛋白质、糖和脂质组成的复杂的复合物,有学者研究报道其与恶性肿瘤的发生、发展存在密切联系^[1]。随着较多学者对微小RNA(microRNA, miRNA)的探究的,发现miRNA-9在肿瘤的发生及发展中发挥重要作用^[2]。有学者发现天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶(Cysteiny Aspartate-specific Proteinases, Caspase)是细胞凋亡的中心环节,目前在哺乳动物中已发现14种亚型^[3]。本研究旨在探讨GPC-1、miRNA-9及Caspase-3在肺腺癌中的表达及与病情、预后生存的相关性,现研究报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

2015年8月至2017年8月本院收治的76份肺腺癌患者标本为观察组,其中男39例,女37;平均年龄(60.51 ± 3.57)岁;根据TNM分期,可分为I期~II期33例,III~VI期43例。选取上述患者远离3cm的肺腺癌的癌旁正常组织76份标本作为对照组。所有患者知情同意。整理并分析其临床资料。两组一般资料比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。本实验经医院伦理委员会批准同意。

纳入标准:①均经术后病理检查及术前影像检查确诊为肺腺癌^[4];②纳入研究前未接受过放、化疗等辅助治疗;③年龄在51~78岁之间。排除标准:①合并其他恶性肿瘤及重要器官严重疾病者;②因精神障碍无法配合治疗者;③阿尔兹海默症者。

1.2 GPC-1、Caspase-3检测方法

免疫组化法:标本经常规石蜡切片、脱水,加入酒精、自来水冲洗、显色、复染、脱水中性树胶封固。在显微镜下观察GPC-1、Caspase-3,检测过程严格按照说明进行,检测完成后由2位高年资医师采用双盲法阅片。

1.3 miRNA-9检测方法

取出组织标本置于新的EP管家1 mL Trizol裂解液。离心、取上清留取2 μ L用于RNA质量检测,其余RNA溶液放置 -80°C 冰箱备用。总RNA特异的茎环引物反转录按照反转录试剂盒说明书配置。采用逆转录-聚合酶链反应提取两组组织中的RNA,miRNA-9序列:5'-GTTATCTAGCTGTAT-GAGTGCC-3'。样品做3个平行孔,取其均数。相对表达量以 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 计算^[5]。 $\Delta\Delta\text{Ct}=(\text{Ct}_{\text{目的基因}}-\text{Ct}_{\text{管家基因}})_{\text{实验组}}-(\text{Ct}_{\text{目的基因}}-\text{Ct}_{\text{管家基因}})_{\text{对照组}}$ 。

1.4 试剂选择

兔抗人GPC-1多克隆抗体由北京博奥森生物技术公司提供;Caspase-3鼠抗人单克隆抗体采购自美国Neo Markers公司;miR-9mimics及所用引物购自中国广州锐博生物科技有限公司。

1.5 结果判定

GPC-1、Caspase-3阳性判断标准^[6]:肿瘤细胞胞质或细胞核中出现棕黄色或棕褐色颗粒。阳性细胞占比:0分(无阳性); $<30.00\%$ (1分); $\geq 30.00\%$ (2分)。染色强度评分:0分(无色)、1分(淡黄色)、2分(棕黄色)、3分(棕褐色)。阳性细胞 $<26\%$ 为1分,阳性细胞占比 $26\%\sim 50\%$ 为2分,阳性细胞占比 $51\%\sim 75\%$ 为3分,阳性细胞 $>75\%$ 为4分;根据两者相乘结果进行评判:小于3分(-)、3分(+)、4分(++)、5分(+++)。阳性率=阳性例数/总例数 $\times 100\%$ 。miRNA-9正常范围值:2.35~4.62 ng/mL^[7]。

1.6 随访

本研究随访(患者自行来院复查)从患者术后开始,直至患者死亡或本研究的随访结束,为期3年,截止于2020年8月。患者的随访时间分布在1至36个月,平均随访时间为(20.10±2.64)个月。

1.7 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;绘制ROC曲线,Kaplan-Meier生存分析GPC-1、miRNA-9及Cas-

pase-3表达对患者预后生存的影响,以tarone方法进行检验;影响患者预后的相关因素采用Logistic回归分析;以P<0.05为差异具有统计学意义。

2 结果

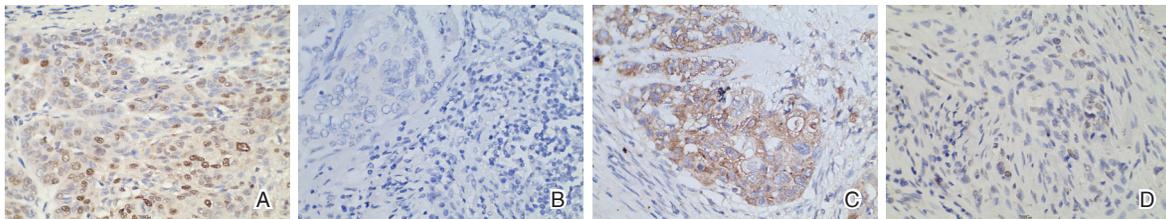
2.1 GPC-1、miRNA-9及Caspase-3在不同组织中的表达

肺腺癌组织中GPC-1、Caspase-3阳性表达及miRNA-9高表达率高于癌旁正常组织(P<0.05)。见表1,图1。

表1 GPC-1、miRNA-9及Caspase-3在不同组织中的表达 [n(%)]

Table 1 expression of GPC-1, miRNA-9 and Caspase-3 in different tissues [n(%)]

组别	n	GPC-1		miRNA-9		Caspase-3	
		阴性	阳性	高表达	低表达	阴性	阳性
肺腺癌组织	76	26(26.32)	50(65.79)	60(78.95)	16(21.05)	37(48.68)	39(51.32)
癌旁正常组织	76	76(100.00)	0(0.00)	19(25.00)	57(75.00)	12(26.32)	64(84.21)
χ^2 值		74.510		44.306		16.536	
P值		0.001		0.001		0.001	



注:A为肺腺癌组织Caspase-3阳性表达;B为肺腺癌组织Caspase-3阴性表达;C为肺腺癌组织GPC-1阳性表达;D为肺腺癌组织GPC-1阴性表达。

图1 免疫组化染色图(x500)

Figure 1 immunohistochemical staining (x500)

2.2 肺腺癌组织中GPC-1、miRNA-9及Caspase-3表达与患者病情进展的关系

GPC-1、miRNA-9及Caspase-3表达情况与肺

腺癌患者年龄、性别、分化程度、肿瘤直径、血管侵犯无关(P>0.05)。见表2。

表2 肺腺癌组织中GPC-1、miRNA-9、Caspase-3表达与患者病情进展的关系

Table 2 Relationship between the expression of GPC-1, miRNA-9, Caspase-3 in lung adenocarcinoma and the progression of patients

病理参数	n	GPC-1(n=76)		χ^2 值	P值	miRNA-9(n=76)		χ^2 值	P值	Caspase-3(n=76)		χ^2 值	P值	
		阳性(n=50)	阴性(n=26)			高表达(n=60)	低表达(n=16)			阳性(n=39)	阴性(n=37)			
年龄(岁)	≥65	40	26	14	0.023	0.878	32	8	0.056	0.812	20	20	0.059	0.809
	<65	36	24	12			28	8			19	17		
性别(例)	男	39	27	12	0.422	0.516	30	9	0.198	0.657	19	20	0.216	0.642
	女	37	23	14			30	7			20	17		
TNM分期	I~II期	33	13	20	18.055	0.001	20	13	11.805	0.001	26	7	17.620	0.001
	III~VI期	43	37	6			40	3			13	30		
淋巴结转移	是	35	28	7	5.821	0.016	32	3	6.081	0.014	10	25	13.434	0.001
	无	41	22	19			28	13			29	12		
分化程度	高分化	20	10	10	3.007	0.083	14	6	1.307	0.253	9	11	0.433	0.510
	中-低分化	56	40	16			46	10			30	26		
肿瘤直径(cm)	≥2或3	31	20	11	0.038	0.846	26	5	0.764	0.382	16	15	0.054	0.815
	<2或3	45	30	15			34	11			23	22		
血管侵犯	有	33	23	10	0.396	0.529	24	9	1.358	0.244	17	16	0.001	0.976
	无	43	27	16			36	7			22	21		

2.3 肺腺癌患者不同GPC-1、miRNA-9及Caspase-3表达的预后情况

纳入的76例肺腺癌患者3年生存率为35.53%(49/76),GPC-1阳性表达、miRNA高表达、Caspase-3阴性表达的肺腺癌患者死亡率更高($P<0.05$)。见表3。

表3 肺腺癌患者不同 GPC-1、miRNA-9 及 Caspase-3 表达的预后情况 [n(%)]

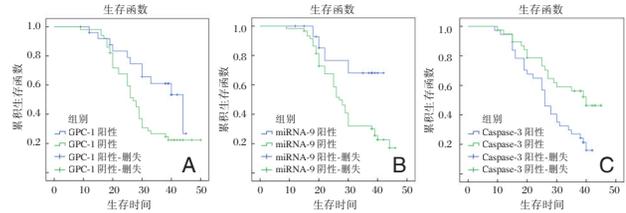
指标	不同表达	n	生存 (n=27)	死亡 (n=49)	χ^2 值	P值
GPC-1	阴性	26	15(19.74)	11(14.47)	8.477	0.004
	阳性	50	12(15.79)	38(50.00)		
Caspase-3	阴性	37	7(9.21)	30(39.47)	8.682	0.003
	阳性	39	20(26.32)	19(25.00)		
miRNA	高表达	60	15(19.74)	45(59.21)	1.787	0.001
	低表达	16	12(15.79)	4(5.26)		

2.4 GPC-1、miRNA-9及Caspase-3表达与肺腺癌患者预后的关系

GPC-1表达阴性及表达阳性中位生存时间分别为(36.01±2.26)个月、(30.22±1.71)个月;miRNA-9高表达及低表达中位生存时间分别为(29.69±1.40)个月、(35.86±2.63)个月;Caspase-3表达阴性及表达阳性中位生存时间分别为(27.42±1.66)个月、(34.51±1.96)个月。生存分析显示 GPC-1(表达阴性)、miRNA-9(低表达)、Caspase-3(阳性表达)者生存期较长,Keplan-meier生存曲线明显不同($P<0.05$)。见图2。

2.5 影响肺腺癌患者预后生存的单因素和多因素分析

临床分期(Ⅲ~Ⅵ期)、有淋巴结转移、GPC-1表



注:A为GPC-1阳性及阴性表达患者生存时间比较;B为miRNA-9高表达及低表达患者生存时间比较;C为Caspase-3阳性及阴性表达患者生存时间比较。

图2 生存曲线

Figure 2 survival curve

达(阳性)、miRNA(高表达)及Caspase-3表达(阴性)为影响肺腺癌患者预后生存的独立危险因素($P<0.05$)。见表4。

3 讨论

肺腺癌早期无典型症状,且尚无特异且敏感的标志物,绝大多数的患者无法及时确诊,因此耽误最佳治疗时机,即使患者得到手术根治,也需要面临高复发率和转移率的风险。如何提高肺腺癌的早期诊断率,改善预后为当前肺腺癌治疗亟待解决的难题。

国外研究发现^[8],GPC-1、Caspase-3在肺腺癌组织中阳性表达率有较大差异,本研究发现在肺腺癌组织中 GPC-1 阳性表达率、Caspase-3 阴性表达率、miRNA-9 高表达率均明显高于癌旁正常组织。考虑与纳入样本量不同有关,免疫组化抗原修复方式也存在差异,可能会导致研究结果存在一定偏差。

相关研究指出^[9],GPC-1与肺腺癌相关,GPC-1阳性表达与肺腺癌淋巴结的侵袭和转移有关,其在肺腺癌发生过程中起到一定作用。本研究证实

表4 影响肺腺癌患者预后生存的单因素和多因素分析

Table 4 univariate and multivariate analysis of prognostic factors in patients with lung adenocarcinoma

变量	单因素分析			多因素分析		
	OR	95%CI	P值	OR	95%CI	P值
年龄(≥65岁 vs <65)	1.656	0.410~1.624	0.830	-	-	-
性别(男 vs 女)	1.568	0.567~1.598	0.705	-	-	-
TNM(Ⅰ~Ⅱ期 vs Ⅲ~Ⅵ期)	1.798	1.517~1.94	0.028	1.258	1.467~1.339	<0.001
淋巴结转移(是 vs 否)	1.628	1.385~1.756	0.001	1.368	1.231~1.992	<0.001
分化程度(高分化 vs 中-低分化)	1.627	0.527~1.857	0.511	-	-	-
肿瘤直径(≥3 cm vs <3 cm)	1.524	0.485~1.685	0.254	-	-	-
血管侵犯(有 vs 无)	1.438	0.524~1.135	0.984	-	-	-
GPC-1(阳性表达 vs 阴性表达)	1.268	1.235~1.456	0.019	1.354	1.372~1.698	<0.001
miRNA(高表达 vs 低表达)	1.358	1.342~1.568	0.001	1.647	1.247~1.654	<0.001
Caspase-3(阴性表达 vs 阳性表达)	1.425	1.458~1.687	0.023	1.221	1.247~1.657	<0.001

GPC-1、miRNA-9 及 Caspase-3 的表达与 TNM 分期、淋巴结转移有关。

GPC-1 在生长发育和癌变过程中起关键作用, Xue F^[10]等学者研究指出, GPC-1 在非癌组织中无表达或表达量极低, 但在癌组织中呈高表达状态。Szychowski KA^[11]等指出, GPC-1 在肝癌、胰腺癌等恶性疾病中阳性表达率较高。miRNA-9 是一种古老的小分子 RNA, 有较多研究发现其在乳腺癌、胃癌等肿瘤中呈异常表达, 且参与了肿瘤的生长及转移, 而由于肿瘤类型和下游作用靶点的不同 miRNA-9 可作为促癌基因也可作为抑癌基因^[12-13]。本研究发现 miRNA-9 高表达中位生存时间明显短于 miRNA-9 低表达者, 提示其在肺腺癌中作为促癌基因发挥作用, 促进了癌细胞的增值和扩散。Caspase-3 以低活性酶原形式广泛存在于细胞中, TNM 分期 III~VI 的的肺腺癌患者 Caspase-3 表达下调, 可见 Caspase-3 表达降低可能与参与肿瘤发生、发展的过程^[14-15]。

本研究中肺腺癌患者 3 年生存率为仅 35.53%, 生存分析显示, 生存分析显示 GPC-1 (表达阴性)、miRNA-9 (低表达)、Caspase-3 (阳性表达) 者生存期较长, 提示: GPC-1、miRNA-9 及 Caspase-3 的异常表达与肺腺癌患者预后相关。经非条件多因素 Logistic 回归模型进一步分析, 再次肯定 GPC-1、miRNA、Caspase-3 这三者在肺腺癌发生、发展及预后评估中的价值。但由于本研究研究年限较短, 且纳入样本量较少, 研究结果难免存在偏倚, GPC-1、miRNA、Caspase-3 这三者联合检测是否有望成为更敏感且准确的指标仍有待研究。

综上所述, GPC-1、miRNA、Caspase-3 异常表达与肺腺癌患者病情进展密切相关, 且不利于患者预后。提示临床工作者可通过加强监测这三项指标, 以了解肺腺癌患者疾病进展情况, 以评估患者预后。

参考文献

[1] 安晓颖, 李晓霞, 陈宁, 等. BAP1, Ki-67 表达与老年肺腺癌患者肿瘤侵袭及预后的关系[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(5):123-127.
[2] 黄秋萍, 袁欢, 王宜林, 等. miRNA 对自然杀伤细胞生长发育及功能的调控作用[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2019,

11(1):63-67.
[3] Yeh MC, Tse BWC, Fletcher NL, et al. Targeted beta therapy of prostate cancer with 177Lu-labelled Miltuximab antibody against glypican-1 (GPC-1)[J]. Ejnmmi Res, 2020, 10(1):657-789.
[4] Jennifer S, Gatermann Sören G, Daniel H, et al. GPC-1, a novel class A carbapenemase detected in a clinical Pseudomonas aeruginosa isolate[J]. J Ant Chem, 2020, 15(4):4-8.
[5] Campbell DH, Lund ME, Nocon AL, et al. Detection of glypican-1 (GPC-1) expression in urine cell sediments in prostate cancer[J]. PLoS ONE, 2018, 13(4):19-6017.
[6] Na, Zhao, Baoyan, et al. NIR-triggered high-efficient photodynamic and chemo-cascade therapy using caspase-3 responsive functionalized upconversion nanoparticles[J]. Biomaterials, 2017, 18(22):654-45.
[7] Anaokar S, Kodali R, Jonik B, et al. The glycerophosphocholine acyltransferase Gpc1 is part of a phosphatidylcholine (PC)-remodeling pathway that alters PC species in yeast[J]. J Biol Chem, 2019, 29(30):68-78.
[8] Qiu W, Zhang H, Chen X, et al. A GPC1-targeted and gemcitabine - loaded biocompatible nanoplatfor for pancreatic cancer multimodal imaging and therapy [J]. Nanomedicine, 2019, 14(17):2339-2353.
[9] Chen S, Wang M, Yang H, et al. LncRNA TUG1 sponges microRNA -9 to promote neurons apoptosis by up-regulated Bcl2l11 under ischemia [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 485(1):16-17.
[10] Xue F, Liang Y, Li Z, et al. MicroRNA-9 enhances sensitivity to cetuximab in epithelial phenotype hepatocellular carcinoma cells through regulation of the eukaryotic translation initiation factor 5A-2[J]. Oncol Letters, 2018, 15(1):813-820.
[11] Szychowski KA, Wnuk A, Rzemieniec J, et al. Triclosan- Evoked Neurotoxicity Involves NMDAR Subunits with the Specific Role of GluN2A in Caspase-3-Dependent Apoptosis [J]. Molr Neurobiol, 2018, 13(22):65-78.
[12] Fornari F, Pollutri D, Patrizi C, et al. In Hepatocellular Carcinoma miR-221 Modulates Sorafenib Resistance through Inhibition of Caspase-3-Mediated Apoptosis. [J]. Clin Cancer Res, 2017, 23(14):39-53.
[13] Yao P, Ni Y, Liu C. Long Non-Coding RNA 691 Regulated PTEN/PI3K/AKT Signaling Pathway in Osteosarcoma Through miRNA-9-5p[J]. Onco Targ Therap, 2020, 13(22):4597-4606.
[14] Wang Y, Gao W, Shi X, et al. Chemotherapy drugs induce pyroptosis through caspase-3 cleavage of a gasdermin[J]. Nature, 2017, 547(76):99-147.
[15] Xuan Pu, Sarah J. Storr, Yimin Zhang, et al. Caspase-3 and caspase-8 expression in breast cancer: caspase-3 is associated with survival[J]. Apoptosis, 2017, 13(20):587-456.

剖宫产后产褥感染血清 AT-Ⅲ、TAC 及 PCT 水平变化及与预后

李小芝^{1*} 唐连敏¹ 付翠芳¹ 薛云² 姚莉芸¹

[摘要] **目的** 探究剖宫产后产褥感染血清抗凝血酶原Ⅲ(AT-Ⅲ)、总抗氧化能力(TAC)及降钙素原(PCT)水平变化及与预后的关系。**方法** 选择本院224例剖宫产后产褥感染产妇(观察组)临床资料,并纳入32例同期剖宫产后未发生产褥感染产妇作为对照组。比较两组产后1、3 d血清AT-Ⅲ、TAC、PCT水平变化情况;根据观察组临床疗效分为治疗无效者(预后不良组)、治疗有效组(预后良好组),比较两组产后1 d血清AT-Ⅲ、TAC、PCT水平差异,使用受试者工作特征曲线(ROC曲线)评估产后1 d血清AT-Ⅲ、TAC、PCT及其联合检测对剖宫产后产褥感染不良预后的预测价值。**结果** 产后3 d时,观察组血清AT-Ⅲ、TAC均较产后1 d降低,血清PCT则较产后1 d升高,差异有统计学意义($P<0.05$);对照组血清AT-Ⅲ、TAC均较产后1 d升高,血清PCT较产后1 d降低,差异有统计学意义($P<0.05$);且产后1、3 d时,观察组血清AT-Ⅲ、TAC均低于对照组,血清PCT则高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。两组年龄、孕周、分娩史及感染部位比较,差异均无统计学意义($P>0.05$);预后不良组产后1 d血清AT-Ⅲ、TAC均低于预后良好组,血清PCT则高于预后良好组,差异有统计学意义($P<0.05$)。经ROC曲线分析,发现产后1 d血清AT-Ⅲ、TAC、PCT水平对剖宫产后产褥感染不良预后均具有较高预测价值($AUC=0.827、0.903、0.906, P<0.05$),其cut-off值分别为70.545%、6.810 kU/L、2.055 $\mu\text{g/mL}$,且3项联合检测预测价值最高($AUC=0.979, P<0.05$)。**结论** 剖宫产后产褥感染能引起机体炎症反应及凝血功能障碍增强,抗氧化能力降低,产后早期监测血清AT-Ⅲ、TAC、PCT水平对产褥感染预后状况预测有利。

[关键词] 剖宫产;产褥感染;AT-Ⅲ;TAC;PCT;预后

Changes of serum AT-Ⅲ, TAC and PCT and prognosis of puerperal infection after cesarean section

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

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

[ABSTRACT] **Objective** To explore the changes of serum antithrombin Ⅲ (AT-Ⅲ), total antioxidant capacity (TAC) and procalcitonin (PCT) levels in puerperal infection after cesarean section and their relationship with prognosis. **Methods** The clinical data of 224 cases of puerperae with puerperal infection after cesarean section (observation group) in our hospital were retrospectively analyzed, and 32 cases of puerperae without puerperal infection after cesarean section at the same time period were included as the control group. The changes of serum AT-Ⅲ, TAC and PCT levels were compared between the two groups at 1d and 3d after delivery. According to the clinical efficacy in the observation group, they were divided into the ineffective treatment group (poor prognosis group) and the effective treatment group (good prognosis group). Differences in AT-Ⅲ, TAC and PCT levels were compared between the two groups at 1d after delivery. Receiver operating

基金项目:邢台市科技支撑计划项目(2018ZC115)

作者单位:1. 邢台市第三医院产科,河北,邢台 054000

2. 邢台市第三医院检验科,河北,邢台 054000

*通信作者:李小芝, E-mail: zangzhuyu3284095@163.com

characteristic curve (ROC curve) was used to evaluate the predictive value of serum AT-Ⅲ, TAC and PCT at 1d after delivery and combination of the three on poor prognosis of puerperal infection after cesarean infection.

Results At 3d after delivery, the serum AT-Ⅲ and TAC in the observation group were decreased compared with those at 1d after delivery while the serum PCT was increased compared with that at 1d after delivery ($P<0.05$). The serum AT-Ⅲ and TAC in the control group were increased compared with those at 1d after delivery while the serum PCT was decreased compared with that at 1d after delivery ($P<0.05$). And at 1d and 3d after delivery, the serum AT-Ⅲ and TAC in the observation group were lower than those in the control group while the serum PCT was higher than that in the control group ($P<0.05$). There were no statistically significant differences in the age, gestational week, delivery history and infection sites between the two groups ($P>0.05$). The serum AT-Ⅲ and TAC in the poor prognosis group at 1d after delivery were lower than those in the good prognosis group while the serum PCT was higher than that in the good prognosis group ($P<0.05$). ROC curve analysis found that the levels of serum AT-Ⅲ, TAC and PCT at 1d after delivery had a high predictive value on the poor prognosis of puerperal infection after cesarean section (AUC=0.827, 0.903, 0.906, $P<0.05$), and the cut-off values were 70.545%, 6.810 kU/L and 2.055 $\mu\text{g/mL}$, and the combination of the three had the highest predictive value (AUC=0.979, $P<0.05$). **Conclusion** Puerperal infection after cesarean section can cause the body's inflammatory response and blood coagulation dysfunction to increase, and the antioxidant capacity is reduced. Early postpartum monitoring of serum AT-Ⅲ, TAC, PCT levels is beneficial to predict the prognosis of puerperal infection.

[KEY WORDS] Cesarean section; Puerperal infection; AT-Ⅲ; TAC; PCT; Prognosis

产褥感染为产妇产后常见并发症,产妇在分娩期间免疫功能降低,剖宫产创伤又能进一步影响机体免疫功能,使产妇易受致病菌侵袭,产褥感染风险增加^[1]。产褥感染不仅能引起体温升高、寒战等症状,还能诱发败血症、脓毒血症,威胁产妇生命健康^[2]。故尽早发现产褥感染、及时防治,对产妇预后非常重要。降钙素原(procalcitonin, PCT)作为评估感染的常用指标,在感染性疾病诊疗中发挥重要作用^[3]。另外,凝血及氧化应激相关指标在诊断感染中占据重要地位,抗凝血酶原Ⅲ(antithrombin Ⅲ, AT-Ⅲ)、总抗氧化能力(total antioxidant capacity, TAC)也是近年研究的热点指标^[4-5]。基于此,本研究将评估产褥感染后血清AT-Ⅲ、TAC、PCT变化情况及其与预后的关系,为产褥感染诊疗提供新思路,报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2017年4月至2019年6月本院224例剖宫产后产褥感染产妇(观察组)临床资料,平均年龄(28.89 ± 5.26)岁;孕周37~41(38.46 ± 1.08)周;初产妇104例,经产妇120例。并纳入32例同期剖宫产后未发生产褥感染产妇作为对照组。对照组年龄平均(28.15 ± 5.04)岁;孕周37~41(38.25 ± 1.02)周;初产妇17例,经产妇15例。两组产妇基线资料比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。

纳入标准:符合《妇产科学(第8版)》中产褥感染诊断标准^[6];足月、单胎分娩;获得患者知情同意;临床资料完整。排除标准:合并其他感染性疾病;合并免疫系统疾病;剖宫产前1周免疫抑制剂使用史;伴恶性肿瘤;合并严重心、肝、肾等重要器官功能障碍。本研究符合《赫尔辛基宣言》,且经本院医学伦理委员会审批。

1.2 方法

所有产妇均在产后1、3d时采集空腹外周静脉血,采用全自动血凝分析仪(日本希思美康公司,型号:CA1500)检测血清AT-Ⅲ水平,使用酶联免疫吸附法(试剂盒由北京北方生物技术研究所生产)检测血清TAC水平,采用电化学发光法(试剂盒由德国罗氏公司生产)检测血清PCT水平。产褥感染产妇均采用控制感染、营养支持、纠正贫血等对症治疗措施,切口有脓液者行切口引流治疗,并使用生理盐水及甲硝唑混合溶液反复冲洗腹部创口。

1.3 产褥感染疗效标准^[7]

治愈:治疗3d内腹部不适、发热等症状消失,临床检验显示病原菌清除;有效:治疗3d内腹部不适、发热等症状明显缓解,临床检验显示病原菌清除;无效:治疗3d后症状无改善,临床检验显示病原菌未清除;治愈及有效均视为治疗有效。

1.4 统计学方法

应用SPSS 21.0软件进行统计学分析;计量资料以($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用独立样本 t 检验,组

内比较采用配对样本 *t* 检验;计数资料以 *n*(%)表示,采用 χ^2 检验或 Fisher 精确检验;产后 1 d 血清 AT-III、TAC、PCT 及其联合检测对剖宫产后产褥感染不良预后的预测价值使用受试者工作特征曲线 (the receiver operating characteristic curve, ROC 曲线) 评估,计算曲线下面积 (AUC);以 *P*<0.05 为有统计学意义。

2 结果

2.1 观察组与对照组产后 1 d、3 d 血清 AT-III、TAC、PCT 水平比较

产后 3 d 时,观察组血清 AT-III、TAC 均较产

后 1 d 降低,血清 PCT 则较产后 1 d 升高,差异有统计学意义 (*P*<0.05);对照组血清 AT-III、TAC 均较产后 1 d 升高,血清 PCT 较产后 1 d 降低,差异有统计学意义 (*P*<0.05);且产后 1、3 d 时,观察组血清 AT-III、TAC 均低于对照组,血清 PCT 则高于对照组,差异有统计学意义 (*P*<0.05)。见表 1。

2.2 观察组预后不同产妇基线资料比较

224 例观察组产妇治疗无效 25 例 (11.16%), 纳入预后不良组;治疗有效 199 例 (88.84%), 纳入预后良好组;两组年龄、孕周、分娩史及感染部位比较,差异均无统计学意义 (*P*>0.05)。见表 2。

表 1 两组产后血清 AT-III、TAC、PCT 水平变化情况比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of changes of serum AT-III, TAC and PCT between the two groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	AT-III (%)		TAC (kU/L)		PCT (μg/mL)	
		产后 1 d	产后 3 d	产后 1 d	产后 3 d	产后 1 d	产后 3 d
观察组	224	70.45±5.47	62.28±4.97 ^a	7.60±0.90	6.27±0.95 ^a	1.83±0.59	2.97±0.68 ^a
对照组	32	74.21±5.22	77.19±4.39 ^a	8.26±0.84	10.33±0.79 ^a	1.08±0.31	0.62±0.21 ^a
<i>t</i> 值		3.657	16.092	3.911	23.052	7.045	19.388
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与本组产后 1 d 比较, ^a*P*<0.05。

表 2 观察组预后不同产妇基线资料比较 [*n*(%), ($\bar{x} \pm s$)]

Table 2 Comparison of baseline data of pregnant women with different prognosis in observation group [*n*(%), ($\bar{x} \pm s$)]

组别	<i>n</i>	年龄 (岁)	孕周 (周)	分娩史		感染部位				
				初产	经产	子宫 内膜炎	子宫 切口感染	盆腔腹 膜炎	输卵管 宫颈炎	其他
预后不良组	25	29.74±4.25	38.29±1.02	9(36.00)	16(64.00)	7(28.00)	6(24.00)	5(20.00)	4(16.00)	3(12.00)
预后良好组	199	28.46±4.95	38.55±1.04	95(47.74)	104(52.26)	67(33.67)	57(28.64)	39(19.60)	24(12.06)	12(6.03)
<i>t</i> / χ^2 值		1.236	1.181		1.231			1.846		
<i>P</i> 值		0.218	0.239		0.267			0.783		

2.3 观察组预后不同产妇产后 1 d 血清 AT-III、TAC、PCT 水平比较

预后不良组产后 1 d 血清 AT-III、TAC 均低于预后良好组,血清 PCT 则高于预后良好组,差异有统计学意义 (*P*<0.05)。见表 3。

表 3 两组产后 1 d 血清 AT-III、TAC、PCT 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of levels of serum AT-III, TAC and PCT between the two groups at 1 d after delivery ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	AT-III (%)	TAC (kU/L)	PCT (μg/mL)
预后不良组	25	64.43±4.84	6.45±0.58	2.71±0.61
预后良好组	199	71.20±5.07	7.75±0.82	1.72±0.48
<i>t</i> 值		6.314	7.699	9.387
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001

2.4 产后 1 d 血清 AT-III、TAC、PCT 及其联合检测对剖宫产后产褥感染不良预后的预测价值分析

经 ROC 曲线分析,产后 1 d 血清 AT-III、TAC、PCT 水平对剖宫产后产褥感染不良预后具有较高,其 3 项联合检测预测价值比单一检测均高最高 (AUC=0.979, *P*<0.05)。见表 4、图 1。

3 讨论

感染引起的炎症反应可刺激凝血系统活化,凝血功能障碍又能促进炎症反应增强,二者形成恶性循环,增加疾病进程^[8]。临床研究还发现,感染的发生发展与氧化应激密切相关,感染能诱导机体氧化应激蛋白水平升高,增强氧化应激反应,而氧化应激又能增强炎症反应及应激创伤,促使

表4 产后1 d血清AT-Ⅲ、TAC、PCT及其联合检测对剖宫产后产褥感染不良预后的预测价值分析

Table 4 Analysis of predictive value of serum AT-Ⅲ, TAC and PCT at 1 d after delivery and combined detection on poor prognosis of puerperal infection after cesarean section

指标	cut-off 值	灵敏度(%)	特异度(%)	约登指数	AUC	95%CI
AT-Ⅲ	70.545 %	100.00	57.29	0.573	0.827	0.756~0.897
TAC	6.810 kU/L	84.00	91.46	0.755	0.903	0.843~0.962
PCT	2.055 μg/mL	92.00	74.87	0.669	0.906	0.850~0.962
联合	-	96.00	90.36	0.864	0.979	0.962~0.998

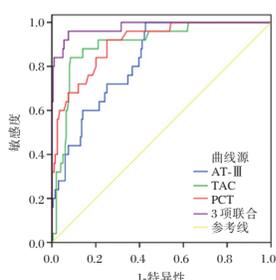


图1 产后1 d血清AT-Ⅲ、TAC、PCT及其联合检测预测剖宫产后产褥感染不良预后的ROC曲线

Figure 1 ROC curves of serum AT-Ⅲ, TAC and PCT at 1 d after delivery and combined detection in predicting the poor prognosis of puerperal infection after cesarean section

感染进展^[9]。故凝血功能与氧化应激指标在感染性疾病诊疗中具有一定作用。

AT-Ⅲ为多功能丝氨酸蛋白酶抑制物,临床常用于评估凝血功能异常情况,感染时,凝血因子大量消耗,可引起AT-Ⅲ下降^[10]。机体抗氧化防御物质协同发挥抗氧化作用,TAC是衡量抗氧化应激能力的敏感指标,感染时,氧化应激反应增强,抗氧化能力降低,使TAC降低^[11]。PCT在诊断炎症及感染性疾病中较为常用,可反映机体炎症反应活跃程度,在脓毒血症等感染性疾病中显著升高^[12]。本研究结果提示,产妇剖宫产后随着产褥感染的发生,炎症反应逐渐增加,凝血功能障碍及氧化应激反应加剧,与方春燕等学者^[13]研究结果一致。另外未合并产褥感染者,剖宫产术后凝血功能及氧化应激反应均随术后时间的增加而改善,炎症水平则降低。考虑该结果与产褥感染是影响剖宫产术后恢复的重要因素,未合并产褥感染产妇,凝血系统及氧化应激平衡在术后能较快恢复有关^[14]。且产后1、3 d时,观察组血清AT-Ⅲ、TAC均低于对照组,血清PCT则高于对照组。这也提示,在产后早期,产褥感染产妇即出现血清学变化,为临床尽早诊断提供条件。

据文献报道,感染性疾病出现发热等症状前,血清学改变已经发生,且早期感染严重,预后不良风险更高^[15]。故血清学指标在预测感染预后中占据重要地位。本研究中,预后不良组产后1 d血清AT-Ⅲ、TAC均低于预后良好组,血清PCT则高于预后良好组。推测该结果由以下几个因素作用引起:①血清AT-Ⅲ较低者,体内凝血因子被大量消耗,凝血障碍严重,即感染更严重,使产妇预后不良^[16];②血清TAC水平低也表示抗氧化能力低,机体处于较强的氧化应激状态,感染较为严重,预后较差^[17];③血清PCT水平越高者,炎症水平越高,感染更为严重,预后不良风险较高^[18]。不仅如此,产后1 d血清AT-Ⅲ、TAC、PCT水平对剖宫产后产褥感染不良预后均具有较高预测价值。也证实,产后早期监测血清AT-Ⅲ、TAC、PCT水平对产褥感染诊断及预后评估均有利。且上述指标联合预测剖宫产后产褥感染不良预后的价值较高,其灵敏度、特异度高达96.00%、90.36%。也说明,临床可联合监测产后1 d血清AT-Ⅲ、TAC、PCT水平,辅助预测产褥感染不良预后,以及及时采取干预措施。然而,本研究为回顾性研究,且样本量有限,血清AT-Ⅲ、TAC、PCT在产褥感染中的应用价值还需后续扩大样本量的多中心研究的论证。

综上所述,发生产褥感染后,剖宫产产妇血清AT-Ⅲ、TAC水平降低,PCT水平升高,且产后早期血清AT-Ⅲ、TAC、PCT对预测产褥感染产妇预后状况有积极意义。

参考文献

- [1] Chen Y, Han X, Guo P, et al. Bacteremia Caused by Gardnerella Vaginalis in a Cesarean Section Patient[J]. Clin Lab, 2018, 64(3): 379-382.
- [2] Bellizzi S, Bassat Q, Ali MM, et al. Effect of Puerperal Infections on Early Neonatal Mortality: A Secondary Analysis of Six Demographic and Health Surveys[J]. Plos One, 2017, 12(1): 1-9.

冠心病心力衰竭患者血清HCY水平、心电图QRS波时限与心功能的相关性分析

王正飞 杨龙 兰占占 张东东 刘春明*

[摘要] **目的** 分析冠心病心力衰竭患者血清同型半胱氨酸(HCY)水平、心电图QRS波时限与心功能的相关性。**方法** 选取2015年4月至2018年4月本院收治的101例冠心病患者临床资料,按照是否伴心力衰竭分为A组($n=51$)、B组($n=50$)。按照美国纽约心脏病学会对A组进行心功能分级,另分为三个亚组(Ⅱ级组:17例;Ⅲ级组:19例;Ⅳ级组:15例)。同时纳入同期健康体检结果正常者52例作为对照组。收集所有研究对象一般资料。比较A、B组血清HCY水平和QRS波时限差异,采用Pearson相关分析分别观察冠心病心力衰竭患者血浆HCY水平和QRS波时限与心功能分级的关系。**结果** 3组血清HCY水平、血浆BNP水平、LVEDD、QRS波时限比较结果:A组>B组>对照组;LVEF:A组<B组<对照组,差异均具有统计学意义($P<0.05$)。3组血清HCY水平、血浆BNP水平、LVEDD、QRS波时限比较结果:Ⅳ级组>Ⅲ级组>Ⅱ级组;LVEF比较结果:Ⅳ级组<Ⅲ级组<Ⅱ级组,差异均具有统计学意义($P<0.05$)。冠心病心力衰竭患者HCY水平与血浆BNP浓度、LVEDD值呈正相关,与LVEF值呈负相关($P<0.05$)。冠心病心力衰竭患者QRS波时限与血浆BNP浓度、LVEDD值及血清HCY水平呈正相关,与LVEF值呈负相关($P<0.05$)。**结论** HCY水平及QRS波时限在冠心病心力衰竭患者中异常增高,且与患者心功能具有显著相关性,两者结合可作为对评价冠心病心力衰竭患者心功能损害程度的有效指标,值得临床推广。

[关键词] 冠心病心力衰竭;血清HCY水平;心电图QRS波时限;心功能

Correlation between HCY level, QRS time limit of ECG and cardiac function in patients with coronary heart disease and heart failure

WANG Zhengfei, YANG Long, LAN Zhanzhan, ZHANG Dongdong, LIU Chunming*

(Department of Cardiac Surgery, Zhengzhou 7th People's Hospital, Zhengzhou, Henan, China, 450016)

[ABSTRACT] **Objective** To analyze the correlation between serum homocysteine (HCY) level, QRS time limit of ECG and cardiac function in patients with coronary heart disease and heart failure. **Methods** The clinical data of 101 patients with coronary heart disease admitted to our hospital from April 2015 to April 2018 were analyzed. They were divided into group A ($n=51$) and group B ($n=50$) according to whether they were accompanied by heart failure. Based on the standards of the New York Society of Cardiology, the cardiac function was graded and divided into three subgroups (Ⅱ group: 17 cases; Ⅲ group: 19 cases; Ⅳ group: 15 cases). At the same time, 52 patients with normal results in physical examination in this hospital during the same period were included as the control group. The general data of all the subjects were collected. The differences in serum HCY levels and QRS duration between groups A and B were compared. Pearson correlation analysis was used to observe the correlation between the plasma HCY level and QRS time limit and the cardiac function classification in patients with coronary heart disease and heart failure. **Results** The comparison of serum HCY levels, plasma BNP levels, LVEDD and QRS wave time limits in the three groups was as follows: group A > group B >

基金项目:河南省医学科技攻关计划(201702157)

作者单位:郑州市第七人民医院心脏外科,河南,郑州 450016

*通信作者:刘春明, E-mail:cheng49247057032@163.com

the control group; LVEF levels are as follows: group A < group B < the control group, the differences were statistically significant ($P < 0.05$). The comparison of serum HCY levels, plasma BNP levels, LVEDD, QRS wave time limits among the three groups were as follows: Grade IV group > Grade III group > Grade II group. The LVEF levels were as follows: Grade IV group < Grade III group < Grade II group, the difference is statistically significant ($P < 0.05$). HCY levels in patients with coronary heart disease and heart failure were positively correlated with plasma BNP concentrations and LVEDD values, and negatively correlated with LVEF values ($P < 0.05$). QRS wave duration in patients with coronary heart disease and heart failure was positively correlated with plasma BNP concentration, LVEDD value and serum HCY level, and negatively correlated with LVEF value ($P < 0.05$). **Conclusions** HCY level and QRS wave duration abnormally increased in patients with coronary heart disease and heart failure and have a significant correlation with the patient's heart function. The combination of the two can be used as effective index to evaluate the degree of heart damage in patients with coronary heart disease and heart failure, and it is worthy of clinical promotion.

[KEY WORDS] Coronary heart disease and heart failure; Serum HCY level; ECG QRS time limit; Cardiac function

心力衰竭是指在适量静脉回流的情况下,由于心肌舒张或收缩功能障碍,心排血量不足以维持组织代谢需要而引起的以循环功能障碍为主的疾病^[1]。研究显示,心力衰竭病死率高,是近年来引起国民死亡的重要原因之一^[2]。冠心病(coronary heart disease, CHD)是冠状动脉血管发生粥样硬化病变而引起血管腔狭窄或阻塞,造成心肌缺血、缺氧或坏死而导致的心脏病,也是引起心力衰竭的重要病因^[3]。近年来,冠心病心力衰竭的诊断与鉴别一直是临床关注焦点。同型半胱氨酸(homocysteine, HCY)为蛋氨酸的中间代谢产物,是一种含硫氨基酸^[4]。由于HCY可参与心肌重塑,因此和心力衰竭的严重程度及长期预后有明显关系。此外,心电图QRS波时限表示心室除极综合时间,可反映左右心室除极功能,故常被作为冠心病心衰患者的入院常规检查之一,用于冠心病慢性心力衰竭患者病情的初步评价。本研究就冠心病心力衰竭患者血清Hcy水平、心电图QRS波时限与心功能的相关性进行分析,旨在为临床诊断与治疗提供思路,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2015年4月至2018年4月本院收治的101例冠心病患者临床资料,按照是否伴心力衰竭分为A、B组。其中A组51例,男30例,女21例,平均年龄(56.79 ± 6.93)岁。按照美国纽约心脏病学会对A组进行心功能分级^[5],另分为三个亚组:心功能II级组17例,男10例,女7例,平均年龄(59.71 ± 6.12)岁;心功能III级组19例,男12例,女7

例,平均年龄(59.83 ± 6.11)岁;心功能IV级组15例,男9例,女6例,平均年龄(59.68 ± 6.23)岁。B组50例,男28例,女22例;平均年龄(57.46 ± 6.87)岁。纳入同期于本院接受健康体检结果正常者52例作为对照组。其中男27例,女24例,平均年龄(56.73 ± 6.86)岁。各组间一般资料比较差异无统计学意义,具有可比性($P > 0.05$)。本研究经过医院伦理委员会批准,受试者签署知情同意书。

纳入标准:①符合世界卫生组织关于冠心病的诊断标准^[6];②A组患者还需满足心力衰竭诊断标准^[7];③排除急性心力衰竭、恶性心律失常、肺源性心脏病、先天性心脏病及其他心脏瓣膜病等;排除标准:①合并肝肾疾病;②合并严重感染及恶性肿瘤;③入组4周内有过急性心肌梗死者;④合并免疫系统、血液系统及甲状腺疾病。

1.2 方法

收集所有研究对象一般资料,记录其HCY水平、心电图QRS波时限、脑钠肽(brain natriuretic peptide, BNP)、左室舒张末期内径(left ventricular end-diastolic dimension, LEVDD)、左室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)水平。比较A、B组血清HCY水平和QRS波时限差异,分别观察冠心病心衰患者血浆HCY水平和QRS波时限与心功能分级的关系。

1.3 观察指标

1.3.1 HCY、BNP的检测

入院患者入院后次日清晨抽取空腹静脉血3 mL,体检者体检当日清晨抽取空腹静脉血3 mL,置于肝素锂抗凝管中,在低温离心机中离心

(3 000 r/min, 15 min)。取 400 μ L 血浆送检,采用自动化的荧光偏振免疫法得出 HCY 的含量,血浆 HCY 试剂盒购自美国 DPC 公司,仪器为美国 2000IMMULITE 全自动化学发光法仪,操作过程严格按照说明书进行。血浆 BNP 试剂盒购自奥地利 BIOMEDICA 公司,采用美国 Biosite 公司 Triage meter plus 诊断仪检测 BNP 水平。

1.3.2 心电图 QRS 波时限的检测

所有研究对象入院后即进行常规心电图检查,均采用第一次行标准 12 导联心电图。测量标准:走纸速度为 25 mm/s,心电图振幅为 10 mm/mv,采用最早 QRS 波气垫至最晚 QRS 波终点距作为 QRS 波时限,连续测量三次,取均值。

1.3.3 LVEDD 与 LVEF 的测定

应用全数字彩色多普勒超声诊断仪, S4 胸探

头,融合频率 2~4 MHz,由本院同一医师完成所有研究对象的 LVEDD 与 LVEF 测定。

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,多组间比较行 F 检验;计数资料以 % 表示,行 χ^2 检验;相关性采用 Pearson 相关分析; $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 3 组血清 HCY、QRS 波时限、血浆 BNP、LVEDD 及 LVEF 水平比较

3 组血清 HCY 水平、血浆 BNP 水平、LVEDD、QRS 波时限比较结果: A 组 > B 组 > 对照组; LVEF: A 组 < B 组 < 对照组,差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 A、B 及对对照组血清 HCY、QRS 波时限、血浆 BNP、LVEDD 及 LVEF 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of serum HCY, QRS duration, BNP, LVEDD and LVEF levels in A, B and the control group ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	HCY (μ mol/L)	QRS 波时限 (ms)	BNP (pg/mL)	LVEDD (mm)	LVEF (%)
A 组	52	21.36 \pm 5.36	125.67 \pm 18.53	805.39 \pm 327.1	58.79 \pm 2.33	47.46 \pm 5.58
B 组	50	17.98 \pm 5.13	95.41 \pm 13.98	145.61 \pm 53.69	50.41 \pm 2.51	61.49 \pm 8.64
对照组	52	10.75 \pm 2.47	75.36 \pm 12.14	41.22 \pm 10.36	47.53 \pm 2.07	69.71 \pm 4.59
<i>F</i> 值		72.40	141.36	234.18	324.46	151.66
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

2.2 不同心功能等级患者血清 HCY、QRS 波时限、血浆 BNP、LVEDD 及 LVEF 水平比较

3 组血清 HCY 水平、血浆 BNP 水平、LVEDD、

QRS 波时限比较结果: IV 级组 > III 级组 > II 级组; LVEF 比较结果: IV 级组 < III 级组 < II 级组,差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 不同心功能等级患者血清 HCY、QRS 波时限、血浆 BNP、LVEDD 及 LVEF 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of serum HCY, QRS duration, BNP, LVEDD and LVEF levels in patients with different cardiac function levels ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	HCY (μ mol/L)	QRS 波时限 (ms)	BNP (pg/mL)	LVEDD (mm)	LVEF (%)
II 级组	17	14.59 \pm 5.86	103.26 \pm 18.97	385.64 \pm 132.16	51.31 \pm 1.69	54.61 \pm 11.74
III 级组	19	20.41 \pm 5.37	125.60 \pm 18.54	601.23 \pm 153.49	55.97 \pm 1.37	46.89 \pm 12.31
IV 级组	15	25.38 \pm 4.11	139.76 \pm 19.48	1434.51 \pm 194.46	63.31 \pm 1.95	42.41 \pm 10.65
<i>F</i> 值		17.19	15.22	188.34	35.64	4.54
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.016

2.3 冠心病心力衰竭患者血清 HCY 水平与血浆 BNP、LVEDD 及 LVEF 水平相关性分析

冠心病心力衰竭患者 HCY 水平与血浆 BNP 浓度 ($r=0.761, P=0.018$)、LVEDD 值 ($r=0.534, P=0.006$) 呈正相关,与 LVEF 值呈负相关 ($r=-0.467, P < 0.001$)。见图 1。

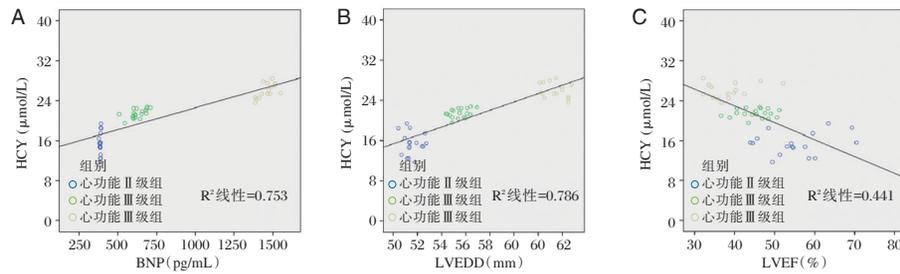
2.4 冠心病心力衰竭患者 QRS 波时限与血浆 BNP、LVEDD 及 LVEF 水平比较

冠心病心力衰竭患者 QRS 波时限与血浆 BNP 浓

度 ($r=0.561, P=0.016$)、LVEDD ($r=0.796, P=0.023$) 值及血清 HCY ($r=0.561, P < 0.001$) 水平呈正相关,与 LVEF 值呈负相关 ($r=-0.594, P < 0.001$)。见图 2。

3 讨论

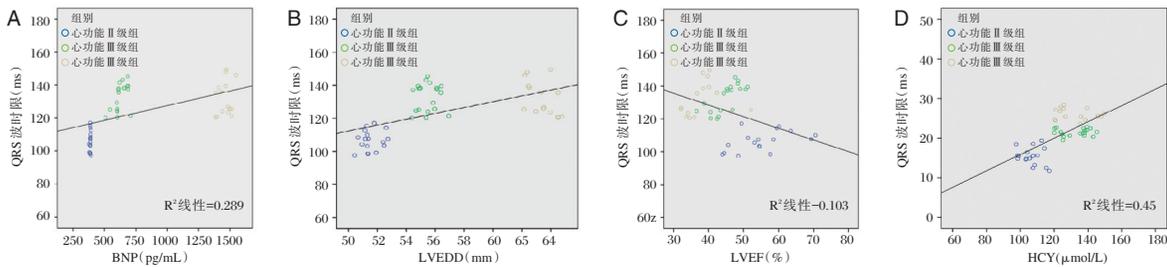
HCY 为一种含硫肌酸,是蛋氨酸的中间代谢产物,其在人体内代谢的主要途径包括转硫化途径、再甲基化途径以及直接释放至细胞外液等^[8]。HCY 是诊断心血管疾病的重要辅助性氨基酸,大



注:A-C分别为冠心病心力衰竭患者血清HCY水平与血浆BNP浓度、LVEDD值及LVEF值相关性散点分析图。

图1 冠心病心力衰竭患者血浆BNP、LVEDD及LVEF水平相关性分析

Figure 1 Correlation analysis of plasma BNP, LVEDD and LVEF levels in patients with coronary heart disease and heart failure



注:A-D分别为冠心病心力衰竭患者QRS波时限与血浆BNP浓度、LVEDD值、LVEF值以及血清HCY相关性散点分析图。

图2 冠心病心力衰竭患者QRS波时限与血浆BNP、LVEDD及LVEF相关性分析

Figure 2 Correlation between QRS duration and plasma BNP, LVEDD and LVEF in patients with coronary heart disease and heart failure

量研究发现,在动脉粥样硬化的发病机制中HCY是一种独立危险因素,并且高HCY血症与慢性心理衰竭有一定的关系^[9]。杨朝娣等^[10]在2017年的研究中发现,冠心病合并心力衰竭患者HCY水平检测在疗效观察中有一定的作用。类似的,宋春丽等^[11]研究提出,将Hcy纳入预测老年无胸痛症状冠心病慢性心衰患者近期心血管事件发生率的模型,能显著提高预测的灵敏度,有助于指导临床,具有可行性。此外,Michaela等^[12]研究亦证实了HCY与心血管系统疾病之间的独立关联性。本研究结果说明血浆HCY水平可能和心衰有关,可能是心衰的独立危险因素之一。同时结果说明血浆HCY水平随着心衰的严重程度的加重而逐渐升高,可能参与到冠心病心衰的发病机制。

常规心电图是诊断心血管疾病最简单、经济且无创的检查手段,利用对心肌机械运动产生电学反映,可对心力衰竭患者病情作出初步诊断^[13]。心电图检查中,QRS波时限是一个简便而实用的临床指标。正常情况下,心脏点激动形成与窦房结,经前、中、后3条结间束传至房室结后,通过希氏束,沿着左右束支及其分支传至普肯野纤维,到达心室肌细胞,同时使左、右心室迅速进行去极化和复极。

而QRS波群正代表左右心室除极而产生的电位变化,左心结构和功能的改变均可引起QRS波时限延长^[14]。本研究结果显示,在冠心病心力衰竭患者中,QRS波时限较无心力衰竭的冠心病患者及正常健康人群明显延长,且随着心功能等级的增加而升高。这与Vehmeijer等^[15]人研究结果相似,说明QRS波时限的变化程度可有效的对冠心病心衰患者的心脏结构和功能损害程度进行评价。本研究结果提示利用QRS波时限对冠心病心衰患者的心脏结构和功能损害程度进行评价。

此外,Jörg等^[16]动物实验结果显示,HCY可导致左心功能心肌重构,ARS波时限延长,使左室收缩功能受损,证实高HCY与QRS波时限延长间有显著相关性。本研究结果提示以HCY和QRS波时限均与冠心病心力衰竭的发生、发展密切相关。且两者均作为心内科临床诊断中的常见指标,可共同作为评价冠心病心衰的心功能恶化程度,进而提高冠心病心力衰竭的诊断的特异性和敏感性。

综上所述,HCY水平及QRS波时限在冠心病心力衰竭患者中异常增高,且与患者心功能具有显著相关性,两者结合可作为对评价冠心病心力衰竭患者心功能损害程度的有效指标,值得临床推广。

参考文献

[1] 戴艺,刘丽,欧燕,等.冠心病心绞痛患者经冠心舒通胶囊治疗后 Hcy、FIB 和 CRP 的变化[J].分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(07):948-951.

[2] 丁绍祥,张乐,高云涛,等.左心室射血分数与心电图 QRS 波时程比值对老年心力衰竭患者心功能的评估[J].中华老年心脑血管病杂志, 2019, 21(8):801-803.

[3] 项冉,邵梦娇,商鲁翔,等.希氏束起搏对心力衰竭合并宽 QRS 波患者心脏再同步化治疗效果的荟萃分析[J].中华心力衰竭和心肌病杂志, 2020, 4(2):104-113.

[4] 刘玉梅,邓本强. RFC-1 基因多态性与急性脑梗塞的相关性研究[J].医学分子生物学杂志, 2017, 14(2):91-95.

[5] Ma SC, Cao JC, Zhang HP, et al. Aberrant promoter methylation of multiple genes in VSMC proliferation induced by Hcy [J]. Mol Med Rep, 2017, 16(5):7775-7783.

[6] 黄凯,李昭,李南,等.老年复杂冠状动脉病变患者碎裂 QRS 波与冠状动脉病变的相关性研究[J].中华老年医学杂志, 2018, 37(3):250-254.

[7] Liu Z, Li G, Wang Y, et al. A novel fluorescent probe for imaging the process of HOCl oxidation and Cys/Hcy reduction in living cells[J]. RSC Advances, 2018, 8(17):9519-9523.

[8] 韩宏伟,苏晞,杨新玮,等.永久希氏束起搏在心力衰竭患者中的应用[J].中华心律失常学杂志, 2018, 22(2):111-116.

[9] Zhang H, Xu L, Li W, et al. A lysosome-targetable fluorescent probe for the simultaneous sensing of Cys/Hcy and GSH from different emission channels[J]. RSC Advances, 2019, 9(14):7955-7960.

[10] 杨朝娣,王素青,习广燕.3种指标在冠心病合并心力衰竭诊治中的应用及相关性研究[J].国际检验医学杂志, 2017, 38(18):2526-2528.

[11] 宋春丽,默瑞兴. Hcy, BNP 纳入老年冠心病慢性心衰无胸痛症状患者心血管事件预测模型的可行性分析[J].河北医药, 2019, 41(10):1469-1472, 1477.

[12] Michaela K, Carmela M, Giuseppe P, et al. Plasma Homocysteine and Cardiovascular Organ Damage in a Population with a High Prevalence of Risk Factors [J]. J Clin Endocrinol Met, 2017, 31(8):8-15.

[13] 石亚君,孙玉发,郗玲,等.碎裂 QRS 波对冠心病患者预后的预测价值[J].中华医学杂志, 2017, 97(1):3-6.

[14] Colorimetric and NIR Fluorescence Probe with Multiple Binding Sites for Distinguishing Detection of Cys/Hcy and GSH in Vivo [J]. Analytical Chem, 2019, 91(2):1472-1478.

[15] Vehmeijer JT, Zeliha K, Bokma J P, et al. Sudden cardiac death in adults with congenital heart disease: does QRS-complex fragmentation discriminate in structurally abnormal hearts? [J]. Europace, 2017, 46(1):1156-1160.

[16] Jörg Täubel, Ferber G, Fox G, et al. Thorough QT study of the effect of intravenous amisulpride on QTc interval in Caucasian and Japanese healthy subjects [J]. British J Clin Pharmacol, 2017, 83(53):612-618.

(上接第 1694 页)

[3] Halvorson K, Shah S, Fehnel C, et al. Procalcitonin is a Poor Predictor of Non- Infectious Fever in the Neurocritical Care Unit [J]. Neur Care, 2017, 27(2):237-241.

[4] Wu R, Kong Y, Yin J, et al. Antithrombin III is a Novel Predictor for Contrast Induced Nephropathy After Coronary Angiography [J]. Kid Blood Pressure Res, 2018, 43(1):170-180.

[5] Huyut Z, Şekeroğlu MR, Balahoroğlu R, et al. Characteristics of resveratrol and serotonin on antioxidant capacity and susceptibility to oxidation of red blood cells in stored human blood in a time-dependent manner [J]. J Int Med Res, 2017, 46(1):272-283.

[6] 谢幸,苟文丽. 妇产科学 [M]. 第 8 版. 北京:人民卫生出版社, 2013:226-227.

[7] 王秀芹. 头孢哌酮舒巴坦治疗剖宫产后产褥感染的有效性以及对患者体内炎性因子水平的影响 [J]. 中国性科学, 2018, 27(8):110-112.

[8] 薛宏怡,鲍舟君,竺枫,等. 轻症和重症发热伴血小板减少综合征的血常规和凝血功能差异研究 [J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2019, 33(3):287-290.

[9] 张家杰,叶山亮,喻玮. 细菌对抗菌药物产生氧化应激的研究进展 [J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2019, 39(2):157-160.

[10] Fidan S, Erkut M, Cosar AM, et al. Higher Thrombin-Antithrombin III Complex Levels May Indicate Severe Acute Pancreatitis [J]. Dig Dis, 2018, 36(3):244-251.

[11] Vatannejad A, Tavilani H, Sadeghi MR, et al. Evaluation of ROS-TAC Score and DNA Damage in Fertile Normozoospermic and Infertile Asthenozoospermic Males [J]. Urol J, 2017, 14(1):2973-2978.

[12] Levine AR, Tran M, Shepherd J, et al. Utility of initial procalcitonin values to predict urinary tract infection [J]. Am J Emergency Med, 2018, 36(11):1993-1997.

[13] 方春燕,梁天会,赵菊美,等. 血清 AT-III 与 TAC 和 UU 及 Mh 与产褥感染的相关性 [J]. 中华医院感染学杂志, 2019, 29(5):756-758, 762.

[14] 陈双东,赵富清,刘清秀. 剖宫产术后发生产褥感染的影响因素分析 [J]. 中国妇幼健康研究, 2018, 29(5):550-553.

[15] 卢玉香,周筠. 广东省潮州地区献血者乙肝感染血清学和分子生物学特征 [J]. 分子诊断与治疗杂志, 2018, 10(1):34-37, 55.

[16] 魏捷,刘艳红,姜洁,等. 119 例脓毒症凝血、抗凝和纤溶功能的临床研究 [J]. 中华急诊医学杂志, 2018, 27(8):905-911.

[17] Sanchez-Espinosa MP, Atienza M, Cantero JL. Sleep mediates the association between homocysteine and oxidative status in mild cognitive impairment [J]. Sci Rep, 2017, 7(1):7719-7727.

[18] Li X, Wang X, Li S, et al. Diagnostic Value of Procalcitonin on Early Postoperative Infection After Pediatric Cardiac Surgery [J]. Pediat Crit Care Med, 2017, 18(5):420-428.

ProADM、sRAGE、HMGB-1对ICU感染患者病情严重程度及预后的评估价值

吴瑶 时小妍 杨丽坤 周南 高雅 周朝朝 赵丽*

[摘要] **目的** 探讨三种新型肾上腺髓质素前体(ProADM)、可溶性糖基化终末产物受体(sRAGE)、高迁移率族蛋白B-1(HMGB-1)炎症标志物水平对重症监护室(ICU)感染患者病情严重程度及预后的评估价值。**方法** 选取2018年1月至2019年12月本院ICU收治的86例感染患者为研究对象,根据脓毒症定义的标准将其分为脓毒症组55例、脓毒性休克组31例;另选取40例同期本院健康体检者作为对照组。收集三组临床一般资料,于入院24h内采用酶联免疫吸附法检测ProADM、sRAGE、HMGB-1水平。评估研究组患者急性生理学及慢性健康状况评分系统(APACHE II)评分、序贯器官功能障碍评分(SOFA),并随访1个月,记录随访结果(死亡或存活)。采用Pearson相关性分析ProADM、sRAGE、HMGB-1与APACHE II、SOFA评分及预后的相关性。**结果** 三组的ProADM、sRAGE、HMGB-1指标比较差异具有统计学意义($P<0.05$);经两两比较发现,脓毒症组及脓毒性休克组的ProADM、sRAGE、HMGB-1指标显著高于对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$);且脓毒性休克组的各指标显著高于脓毒症组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。脓毒性休克组的APACHE II、SOFA评分均显著高于脓毒症组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。随访结果显示,有36例患者死亡,50例患者存活,死亡率为41.86%,死亡组患者的ProADM、sRAGE、HMGB-1指标显著高于存活组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。Pearson相关性分析结果显示,ProADM、sRAGE、HMGB-1指标与APACHE II、SOFA评分及预后均呈正相关关系($P<0.05$)。**结论** ICU脓毒症患者ProADM、sRAGE、HMGB-1水平高于健康人,且与患者感染严重程度及预后情况密切相关。

[关键词] 肾上腺髓质素前体;可溶性糖基化终末产物受体;高迁移率族蛋白B-1

Evaluation value of ProADM, sRAGE and HMGB-1 for disease severity and prognosis of infection patients in ICU

WU Yao, SHI Xiaoyan, YANG Likun, ZHOU Nan, GAO Ya, ZHOU Zhaozhao, ZHAO Li*

(Department of Emergency, the Second Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shanxi, China, 710004)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the evaluation value of levels of three inflammation markers [pro-adrenomedullin (ProADM), soluble receptor for advanced glycation endproducts (sRAGE), high mobility group box-1 (HMGB-1)] for disease severity and prognosis of infection patients in intensive care unit (ICU). **Methods** A total of 86 infection patients who were admitted to ICU in the hospital from January 2018 to December 2019 were enrolled as the study group. According to defined criteria of sepsis, they were divided into the sepsis group (55 cases) and the septic shock group (31 cases). Another 40 healthy people who underwent physical examination during the same period were enrolled as the control group. The general clinical data were collected. Within 24 h after admission, levels of ProADM, sRAGE and HMGB-1 were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. The scores of acute physiology and chronic health evaluation II (APACHE II) and

基金项目:陕西省重点研发计划项目(2018SF-018)

作者单位:西安交通大学第二附属医院急诊科,陕西,西安 710004

*通信作者:赵丽, E-mail: 10835497@qq.com

sequential organ failure assessment (SOFA) in study group were assessed. They were followed up for 1 month. And their follow-up results (death or survival) were recorded. The correlation between ProADM, sRAGE, HMGB-1 and APACHE II, SOFA scores, prognosis was analyzed by Pearson correlation analysis. **Results** The differences were statistically significant among the control group, the sepsis group and the septic shock group ($P<0.05$). After pairwise comparison, ProADM, sRAGE and HMGB-1 in the sepsis group and the septic shock group were significantly higher than those in the control group, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). And the above indexes in the septic shock group were significantly higher than those in the sepsis group, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). The scores of APACHE II and SOFA in the septic shock group were significantly higher than those in the sepsis group, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). Follow-up results showed that there were 36 patients died and 50 patients survived, and the mortality was 41.86%. ProADM, sRAGE and HMGB-1 in the death group were significantly higher than those in the survival group, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). The results of Pearson correlation analysis showed that ProADM, sRAGE and HMGB-1 were positively correlated with APACHE II, SOFA scores and prognosis, and the correlation coefficient was statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** The levels of ProADM, sRAGE and HMGB-1 in sepsis patients in ICU are higher than those in healthy people, which are closely related to the severity of infection and prognosis.

[KEY WORDS] Pro-adrenomedullin; Soluble receptor for advanced glycation end product; High mobility group box-1

感染在重症监护室(Intensive Care Unit, ICU)中十分常见,ICU患者常因手术、多发创伤、严重基础疾病等原因,导致其机体正常的生理功能被破坏,引发免疫失调,易进展为脓毒症^[1-2]。脓毒症病情凶险且病死率高,若未能在疾病早期及时有效地控制处理,可能会造成病情进一步加重、恶化,造成脓毒性休克、多器官功能障碍综合征等,直接威胁患者生命安全^[3]。目前临床多通过白细胞计数、降钙素原等实验室指标来监测感染患者的病情,但其对于病情的预警价值有限,近年来已有越来越多的学者尝试寻找更为有效的血清标志物。文献报道,肾上腺髓质素前体(proadrenomedullin, ProADM)、可溶性糖基化终末产物受体(soluble receptor for advanced glycation end products, sRAGE)及高迁移率族蛋白B-1(human high-mobility group box-1, HMGB-1)在社区获得性肺炎、脓毒症等感染性疾病患者的水平出现明显异常,可能与患者预后密切相关^[4-6]。为进一步探讨ICU感染患者ProADM、sRAGE、HMGB-1三种新型炎症标志物的表达水平及其潜在价值,本研究观察感染患者及健康人员的ProADM、sRAGE、HMGB-1水平,分析了其与病情严重程度及预后的相关性,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2018年1月至2019年12月本院ICU收治

的86例感染患者为研究组。其中男52例,女34例;平均年龄(68.34 ± 9.12)岁;肺部感染44例,尿路感染18例,血流感染13例,腹腔感染6例,其他5例。根据脓毒症定义的标准将研究组患者分为脓毒症组、脓毒性休克组2个亚组。脓毒症组55例,其中男33例,女22例;平均年龄(67.95 ± 9.63)岁;脓毒性休克组31例,其中男19例,女12例;平均年龄(70.31 ± 4.82)岁。另选取40例同期本院健康体检者作为对照组,其中男26例,女14例;平均年龄(69.03 ± 9.82)岁。三组在性别、年龄等方面比较差异无统计学意义($P>0.05$),均衡可比。本研究经医院伦理委员会批准,受试者及家属签署知情同意书。

纳入标准:①符合2016年《脓毒症和脓毒性休克国际治疗指南》^[7]中脓毒症及脓毒性休克的相关诊断标准;②年龄不低于18周岁;③均自愿参与本次研究。排除标准:①器官移植术后者;②合并自身免疫系统疾病、艾滋病或血液系统疾病者;③合并恶性肿瘤、慢性器官衰竭或障碍者;④精神疾病者;⑤妊娠期或哺乳期妇女。

1.2 方法

所有受试者入院后24h内收集性别、年龄等临床一般资料,采集外周静脉血,静脉血标本应用干燥管抽取,每次3mL,管中加入柠檬酸钠抗凝剂,混合15min后离心($3\ 000\ \text{r/min}$)20min分离血浆,保存于 -80°C 冰箱待检。采用酶联免疫吸附法测定ProADM、sRAGE、HMGB-1水平,ProADM试

剂盒(JL19129)购自上海江莱生物科技有限公司; sRAGE 试剂盒(SBJ-H1620)、HMGB-1 试剂盒(YS02111B)购自上海彩佑实业有限公司。

入院 24 h 内由研究组成员评估研究组患者急性生理学及慢性健康状况评分系统(Acute Physiology and Chronic Health Evaluation System II, APACHE II)评分^[8]、序贯器官功能障碍评分(Sequential Organ Failure Assessment, SOFA)^[9]。APACHE II 包括3部分:急性生理评分、年龄评分及慢性健康评分,总分0~71分,分值越高提示病情越危重。SOFA 包括呼吸、凝血、循环、神经、肝、肾脏系统方面,总分24分,分值越高提示预后越差。

1.3 随访

对研究组患者随访1个月,随访方式为电话、邮件或复诊等,记录随访结果(死亡或存活)。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析。计数资料以 *n*(%)表示。采用 Pearson 相关性分析 ProADM、sRAGE、HMGB-1 与 APACHE II、SOFA 评分及预后的相关性。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 三组 ProADM、sRAGE、HMGB-1 指标对比

三组的 ProADM、sRAGE、HMGB-1 指标比较结果:脓毒性休克组>脓毒症组>对照组差异具有统计学意义(*P* < 0.05)。见表1。

表1 3组 ProADM、sRAGE、HMGB-1 指标对比($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of ProADM, sRAGE and HMGB-1 among the 3 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	ProADM (ng/L)	sRAGE (pg/mL)	HMGB-1 (ng/mL)
对照组	40	44.92±7.83	583.94±103.65	3.18±0.96
脓毒症组	55	68.58±9.26	1194.16±403.06	9.94±2.59
脓毒性休克组	31	86.37±12.21	1646.81±439.75	13.156±3.06
<i>F</i> 值		165.683	83.645	173.632
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001

2.2 不同病情程度脓毒症患者的 APACHE II、SOFA 评分对比

脓毒性休克组的 APACHE II、SOFA 评分均显著高于脓毒症组,差异具有统计学意义(*P* < 0.05)。见表2。

表2 不同病情程度脓毒症患者的实验室指标对比($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of laboratory indexes among sepsis patients with different severity ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	APACHE II 评分	SOFA 评分
脓毒症组	55	12.19±2.43	6.92±1.16
脓毒性休克组	31	21.62±4.03	11.11±1.83
<i>t</i> 值		13.554	12.995
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001

2.3 不同预后情况脓毒症患者的实验室指标对比

对研究组患者随访1个月,所有患者均获随访。结果显示,死亡组患者的 ProADM、sRAGE、HMGB-1 指标显著高于存活组,差异具有统计学意义(*P* < 0.05)。见表3。

表3 不同预后脓毒症患者的实验室指标对比($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of laboratory indexes among sepsis patients with different prognosis ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	ProADM (ng/mL)	sRAGE (pg/mL)	HMGB-1 (ng/mL)
存活组	50	66.76±8.38	1097.52±332.17	9.31±2.43
死亡组	36	86.42±10.56	1718.175±387.77	13.58±2.27
<i>t</i> 值		9.619	7.967	8.261
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001

2.4 ProADM、sRAGE、HMGB-1 与 APACHE II、SOFA 评分及预后的相关性

采用 Pearson 相关性分析 ProADM、sRAGE、HMGB-1 与 APACHE II、SOFA 评分及预后的相关性(变量赋值:存活=0,死亡=1),结果显示 ProADM、sRAGE、HMGB-1 指标与 APACHE II、SOFA 评分及预后均呈正相关关系(*P* < 0.05)。见表4。

3 讨论

肾上腺髓质素(adrenomedullin, ADM)是一种具有广泛生物学作用的肽类激素,能调节免疫代谢和血管活性,发挥抗感染的作用^[10]。ProADM 则是体内合成 ADM 过程中衍生的另一种肽类,可作为反映 ADM 水平的一项敏感指标,其水平与脓毒症等疾病密切相关^[11]。李燕等^[12]报道,脓毒症患者的 ProADM 水平显著高于一般感染患者及健康人员。APACHE II、SOFA 评分系统是目前国内外较为认可的关于危重症患者病情严重程度和预测预后的评价体系,本研究提示 ProADM 可能对于预测疾病严重程度及预后至关重要,可作为新的检测指标用于脓毒症患者的识别诊断中。脓毒症

表4 ProADM、sRAGE、HMGB-1与APACHE II、SOFA评分及预后的相关性

Table 4 Correlation between ProADM, sRAGE, HMGB-1 and APACHE II, SOFA scores, prognosis

项目	APACHE II 评分		SOFA 评分		预后	
	r 值	P 值	r 值	P 值	r 值	P 值
ProADM	0.640 2	<0.001	0.630 8	<0.001	0.720 0	<0.001
sRAGE	0.465 4	<0.001	0.470 3	<0.001	0.651 5	<0.001
HMGB-1	0.495 4	<0.001	0.505 4	<0.001	0.665 7	<0.001

的发生主要是因为机体对感染性因素的反应,在ICU感染患者发生脓毒症时,机体受到细菌内毒素及促炎因子的影响,大量表达合成ProADM,随着感染程度的加重,其水平进一步提升,加之机体机能受损,ProADM经由肾脏及肺脏的清除减少,导致血液中ProADM水平异常升高。

糖基化终末产物受体(receptor for advanced glycation end products, RAGE)是一种广泛参与肺炎等多种疾病病理过程的新型模式识别受体,存在于多种细胞的表面,能激活MAPK等细胞信号转导途径,诱导氧化应激并激活NF-κβ,产生大量炎性因子,参与炎症反应^[13-14]。sRAGE则是通过酶切完整的RAGE而得到,能反应机体RAGE水平。本研究结果提示病情程度越重的患者其体内sRAGE水平更高,sRAGE是潜在地评估脓毒症患者病情严重程度及预后的有效指标之一。研究显示,sRAGE与感染关系密切,是促进炎性反应的活性递质,在感染患者中,能激活多条炎症信号通路,增强组织的炎症反应及免疫应答,进一步加重病情,这可能是sRAGE水平随患者病情加重而上升的重要原因之一^[15]。

HMGB-1是一种染色体结合蛋白,分布于细胞核中,受内毒素等刺激可分泌至细胞外,在血浆中维持状态较长,并在炎症过程中扮演着重要角色^[16]。崔文娟等^[17]研究显示,脓毒症合并急性肾损伤患者中HMGB-1水平显著提升,本研究在脓毒症患者中发现了类似结论,健康人员、脓毒症组和脓毒性休克组患者的HMGB-1水平依次增高。同时,本研究发现HMGB-1水平与脓毒症患者的APACHE II、SOFA评分均呈正相关关系,进一步证实了HMGB-1可作为衡量脓毒症患者疾病严重程度及预后的重要指标。

此外,本研究对86例脓毒症患者进行了为期1个月的随访,结果证实了ProADM、sRAGE、HMGB-1水平对于预测患者预后可能有积极意义,上述各指标水平越高,其预后情况可能越差。

综上所述,三种新型ProADM、sRAGE、HMGB-1炎症标志物水平在ICU脓毒症患者体内的水平高于健康人,且与ICU脓毒症患者感染严重程度及预后情况密切相关,有助于辅助诊断和指导治疗,值得进一步研究探索。

参考文献

- [1] 宋麦芬,张羽,郭玉红,等. Sepsis3.0对ICU脓毒症患者诊断及预后评估的验证[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2017, 24(1):6-9.
- [2] 刘蕾蕾,华玮,居培红,等. 脓毒症患者血清中白细胞介素-6和降钙素原表达及其临床意义[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2019, 11(6):527-530.
- [3] 魏锋,洪志敏,董海涛,等. ICU重度脓毒症的流行病学特点及预后影响因素的分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2018, 28(10):1469-1471, 1484.
- [4] 熊梦然,陈雷,王丽纯,等. 肾上腺髓质素前体(pro-ADM)对脓毒症的早期诊断作用[J]. 中华生物医学工程杂志, 2019, 25(2):229-232.
- [5] 张晓蒙,苏秦,朝鲁门其其格,等. 肺炎合并脓毒症患者血清可溶性晚期糖基化终末产物受体及维生素D的检测[J]. 江苏大学学报(医学版), 2018, 28(2):176-179.
- [6] 黄小平,李双杰. HMGB1在病毒感染相关性疾病中的研究进展[J]. 国际儿科学杂志, 2018, 45(3):159-162.
- [7] Rhodes A, Evans LE, Alhazzani W, et al. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock[J]. Critical Care Med, 2017, 45(3):486-552.
- [8] Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, et al. APACHE II: a severity of disease classification system [J]. Critical Care Med, 1985, 13(10):818-829.
- [9] 曾理,胡祖鹏. SOFA评分的临床意义及其在临床研究中的应用[J]. 中国临床医学, 2001, 8(1):84-85.
- [10] 符家传,殷宗宝. 可溶性髓系细胞表达触发受体-1和肾上腺髓质素前体在脓毒症患者中的诊断意义[J]. 实用医学杂志, 2019, 35(6):76-78, 83.
- [11] 王来,朱孟莎,王芳,等. 血清前肾上腺髓质素浓度预测不同程度脓毒症的准确性[J]. 中华麻醉学杂志, 2018, 38(5):595-597.
- [12] 李燕,卢彩兰,刘鸿,等. 前肾上腺髓质素在脓毒症早期诊断中的价值[J]. 中华危重病急救医学, 2015, 27(9):739-742.

(下转第1707页)

Th17/Treg 联合 PCT 值对乳腺癌患者术后化疗医院感染的预测价值分析

付晶* 尚春迎 刘丽

【摘要】 目的 探究辅助性 T 细胞 17(Th17)/调节性 T 细胞(Treg)联合血清降钙素原(PCT)在乳腺癌患者术后化疗医院感染预测中的价值。方法 选取 2017 年 6 月至 2019 年 6 月在本院行乳腺癌根治术治疗,并在术后接受化疗的乳腺癌患者 152 例,收集患者的一般临床资料和血清学检测资料。根据术后化疗后是否发生医院感染将患者分为感染组($n=31$)和非感染组($n=121$),比较两组患者的 Th17/Treg 和血清 PCT 水平变化,采用受试者工作特征曲线(ROC)分析 Th17/Treg 和血清 PCT 对乳腺癌患者术后化疗医院感染的预测价值。结果 感染组患者的 Th17、Th17/Treg 和 PCT 水平高于非感染组,Treg 水平低于非感染组,差异均具有统计学意义($P<0.05$);ROC 曲线分析结果显示,Th17/Treg、PCT 和 Th17/Treg 联合 PCT 的 AUC 值分别为 0.838、0.780 和 0.863,对乳腺癌患者术后化疗发生医院感染的预测均具有统计学意义($P<0.05$),且 Th17/Treg 联合 PCT 预测价值高于单一指标。结论 乳腺癌患者术后化疗发生医院感染的患者,其 Th17/Treg 和 PCT 水平高于非感染患者,Th17/Treg 联合 PCT 对判断乳腺癌患者术后化疗发生医院感染具有较高的预测价值。

【关键词】 乳腺癌;乳腺癌根治术;化疗;辅助性 T 细胞 17;调节性 T 细胞;降钙素原

Predictive value analysis of Th17/Treg combined with PCT for nosocomial infection of breast cancer patients undergoing postoperative chemotherapy

FU Jing*, SHANG Chunying, LIU Li

(Department of Oncology, Liaoyang Central Hospital, Liaoyang, Liaoning, China, 111000)

【ABSTRACT】 Objective To explore the predictive value of helper T cells 17 (Th17)/regulatory T cells (Treg) combined with serum procalcitonin (PCT) in nosocomial infection of patients with breast cancer undergoing postoperative chemotherapy. Methods A total of 152 breast cancer patients who underwent radical mastectomy and postoperative chemotherapy in the hospital from June 2017 to June 2019 were enrolled. The clinical data and serological examination data were collected. According to presence or absence of nosocomial infection after postoperative chemotherapy, patients were divided into the infection group ($n=31$) and non-infection group ($n=121$). The changes in Th17/Treg and serum PCT levels were compared between the two groups. The predictive value of Th17/Treg and serum PCT for nosocomial infection was analyzed using the receiver operating characteristics (ROC) curves. Results The number of Th17, Th17/Treg ratio, and PCT value in the infection group were higher than those in the non-infection group, while Treg cells were less than those in the non-infection group ($P<0.05$). The results of ROC curve analysis showed that the AUC values of Th17/Treg, PCT, and Th17/Treg combined with PCT for predicting nosocomial infection were 0.838, 0.780 and 0.863, respectively ($P<0.05$). The predictive value of Th17/Treg combined with PCT is the best. Conclusion After postoperative chemotherapy, the ratio of Th17/Treg and PCT level in breast cancer patients

基金项目:辽宁省科学技术计划项目(2018241049)

作者单位:辽阳市中心医院肿瘤科,辽宁,辽阳 111000

*通信作者:付晶, E-mail:xi97936553987@163.com

with nosocomial infection are higher than those without nosocomial infection. The ratio of Th17/Treg combined with PCT has a higher predictive value for nosocomial infection in breast cancer patients undergoing postoperative chemotherapy.

[KEY WORDS] Breast cancer; Radical mastectomy; Chemotherapy; Helper T cell 17; Regulatory T cell; Procalcitonin

乳腺癌是一种以乳房肿块、乳头溢液和腋窝淋巴结肿大等为临床特征的常见恶性肿瘤,发病率在世界范围内居高不下,位居女性恶性肿瘤的首位^[1]。当前,乳腺癌的治疗以手术治疗为主,并在术后采用化疗进行辅助治疗^[2]。研究发现,由于手术应激反应,乳腺癌患者免疫力下降,且在术后化疗过程中一系列化疗药物的使用易导致患者皮肤、呼吸道受损,增加了患者发生医院感染的几率,进而影响其生存质量^[3]。因此,在患者手术治疗后,判断其是否发生感染并采取积极有效的抗感染治疗对提高患者的生存质量具有重要意义。辅助性T细胞17(helper T cell 17, Th17)和调节性T细胞(regulatory T cell, Treg)在乳腺癌的发生发展具有重要作用,参与了机体的免疫调节过程^[4];血清降钙素原(procalcitonin, PCT)是评估机体感染严重程度的主要指标之一,在重症感染情况下,PCT水平会发生明显变化^[5]。当前,有关乳腺癌患者术后化疗发生医院感染的研究主要集中在病原菌种类分析、影响因素等方面,有关预测乳腺癌患者术后化疗发生医院感染的研究较少。本研究将探讨了Th17/Treg、PCT及Th17/Treg联合PCT在乳腺癌患者术后化疗医院感染预测中的价值,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2017年6月至2019年6月本院收治的乳腺癌患者152例,根据术后化疗后是否发生医院感染将患者分为感染组($n=31$)和非感染组($n=121$)。纳入标准:①患者年龄 ≥ 18 岁;②临床病理检查均符合乳腺癌的相关诊断标准^[6];③患者无手术禁忌证,均行乳腺癌根治术治疗,并在术后接受化疗;④感染患者为术后化疗期间发生感染,临床检查符合《医院感染诊断标准》^[7]的相关规定。⑤患者及家属签署知情同意书,自愿参与。排除标准:①经检查存在恶性肿瘤患者;②存在严重认知功能障碍,难以配合治疗患者;③存

在严重心、肝、肾等重要脏器功能障碍患者。两组患者的临床基线资料比较差异无统计学意义($P>0.05$),见表1。本研究经医院伦理委员会批准。

表1 两组患者临床基线资料比较 [$n(\%)$, ($\bar{x} \pm s$)]

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

项目	感染组 ($n=31$)	非感染组 ($n=121$)	t/χ^2 值	P值
年龄(岁)	47.85 \pm 6.48	45.74 \pm 7.21	1.483	0.140
BMI(kg/m ²)	25.37 \pm 2.17	25.63 \pm 2.05	0.623	0.535
肿瘤最大径(cm)	4.53 \pm 0.75	4.62 \pm 0.61	0.698	0.486
手术时间(min)	116.87 \pm 25.31	118.42 \pm 21.63	0.346	0.732
TNM分期(例)			0.700	0.403
I期	11(35.48)	53(43.80)		
II期	20(64.52)	68(56.20)		
病变部位(例)			0.053	0.818
左侧	18(58.06)	73(60.33)		
右侧	13(41.94)	48(39.67)		

1.2 研究方法

比较两组患者外周血Th17、Treg、Th17/Treg及血清PCT水平,采用受试者工作特征曲线(receiver operating characteristics, ROC)分析Th17/Treg和血清PCT对乳腺癌患者术后化疗发生医院感染的预测价值。

1.2.1 外周血Th17及Treg细胞检测

取患者晨空腹静脉血3 mL,抗凝后于1 500 r/min离心15 min,分离得到外周血单个核细胞悬液,置于24孔细胞培养板,选择RPMI-1640培养基(10%胎牛血清、豆蔻酰佛波醇乙酯、离子霉素和莫能菌素等)孵育4 h。加入20 μ L抗人CD4单抗,室温避光孵育20 min;加入20 μ L的IL-17单抗和2 mL染色缓冲液,室温孵育15 min;离心后加入1 mL染色固定液,使用流式细胞仪进行检测。

1.2.2 血清PCT水平检测

采用双抗体夹心法检测两组患者的血清PCT水平。取患者晨空腹静脉血3 mL,1 500 r/min离心15 min后分离血清,低温保藏待测;试剂盒购于

上海晶抗生物工程有限公司。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 20.0 统计软件进行统计学分析。计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,行 t 检验;计数资料以 n (%) 表示,行 χ^2 检验;绘制 ROC 曲线分析 Th17/Treg、PCT 及二者联合对乳腺癌患者术后化疗发生医院感染的预测价值,曲线下面积(AUC)比较采用 Z 检验; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者外周血 Th17、Treg、Th17/Treg 及血清 PCT 水平比较

感染组患者的 Th17、Th17/Treg 和 PCT 水平高于非感染组,Treg 水平低于非感染组,差异均具有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。

表 2 两组患者外周血 Th17、Treg、Th17/Treg 及血清 PCT 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Th17 (%)	Treg (%)	Th17/Treg	PCT (ng/mL)
感染组	31	1.75±0.52	0.68±0.25	2.57±1.33	5.78±1.13
非感染组	121	1.42±0.41	0.97±0.32	1.46±1.15	0.94±0.25
t 值		3.775	4.688	4.641	43.509
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

2.2 外周血 Th17/Treg 及血清 PCT 水平对乳腺癌患者术后化疗医院感染的预测价值

ROC 曲线分析 Th17/Treg、PCT 及 Th17/Treg+PCT 其预测价值。Th17/Treg、PCT 和 Th17/Treg+PCT 的 AUC 值分别为 0.838、0.780 和 0.863,对乳腺癌患者术后化疗发生医院感染的预测均具有统计学意义($P < 0.05$)。各指标的最佳阈值、约登指数、敏感度和特异度值。见表 3、图 1。

表 3 外周血 Th17/Treg 及血清 PCT 水平对乳腺癌患者术后化疗医院感染的预测价值 ($\bar{x} \pm s$)

指标	AUC	最佳阈值	约登指数	敏感度	特异度	P 值
Th17/Treg	0.838	2.08	0.692	87.54	69.23	<0.05
PCT	0.780	5.31	0.519	84.62	67.31	<0.05
Th17/Treg+PCT	0.863	-	0.695	92.30	76.90	<0.05

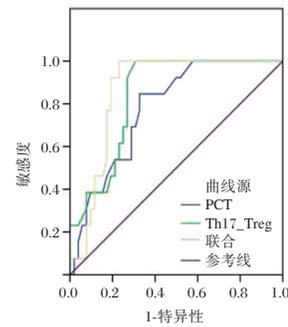


图 1 Th17/Treg、PCT 及 Th17/Treg+PCT 预测乳腺癌患者术后化疗发生医院感染的 ROC 曲线

Figure 1 ROC curve of Th17/Treg, PCT and Th17/Treg+PCT in predicting nosocomial infection in breast cancer patients undergoing postoperative chemotherapy

3 讨论

乳腺癌术后医院感染是导致患者病情恶化、生存质量下降的直接原因,也是导致患者在治疗过程中死亡的主要原因之一,在乳腺癌患者中的发生率高达 30%,是临床亟待解决的重难点问题^[8]。Th17 是由初始 T 细胞在转化生长因子 B (transforming growth factor-B, TGF-B) 和白细胞介素 6 (interleukin, IL-6) 共同诱导下分化而成的,Treg 则直接由初始 T 细胞在 TGF-B 的诱导下转化形成,具有调节免疫应答强度、减轻机体损伤等作用^[9-10]。研究发现,Th17 和 Treg 在分化上相互关联,但功能上相互拮抗,二者存在一定的平衡,当平衡被打破时,对肿瘤的发生发展起到重要作用^[11]。近年来也有研究发现 Th17/Treg 具有抗炎作用^[12]。PCT 是一种感染性生物标记物,被广泛用于术后感染诊断中,具有快速、高敏感度和特异度等特点,通过监测其水平可指导术后感染患者的治疗^[13]。

Th17 具有促炎性反应的作用,可诱导活化 T 细胞释放多种促炎递质,引起炎症细胞浸润;Treg 可抑制过强的免疫反应,维持机体免疫稳定^[14]。当患者的细胞免疫受到抑制,Th17 细胞大量分泌促炎因子,而 Treg 细胞减少,抑制作用减弱时,会加重患者的感染程度。金燕芬等^[15]研究了 Th17/Treg 细胞平衡在老年感染性肺炎患者中的作用,发现重症肺炎患者的 Th17/Treg 水平明显高于轻症患者与非感染者,认为 Th17/Treg 细胞失衡是加重患者感染严重程度的可能因素。但也有研究发现,Th17 细胞在细菌感染中具有一定的防御作

用,其水平出现上升的变化,这可能与Th17细胞在不同程度的细菌感染中表达水平不一样有关,也可能与患者自身免疫紊乱有关^[16]。研究发现,在正常生理状态下,PCT表达水平较低,当发生细菌感染后,其数值会迅速上升,且PCT的水平与感染程度呈正相关,与感染的进展与消退关系密切^[17]。

研究结果提示Th17/Treg、PCT水平能较好地反映乳腺癌患者术后化疗发生医院感染的情况,且Th17/Treg联合PCT预测价值高于单一指标。因此,临床可根据患者的Th17/Treg、PCT水平对乳腺癌患者术后化疗发生医院感染进行预测。

综上所述,乳腺癌患者术后化疗发生医院感染的患者,其Th17/Treg和PCT水平高于非感染患者,Th17/Treg联合PCT对判断乳腺癌患者术后化疗发生医院感染具有较高的预测价值。由于条件限制,本研究仍存在样本数量有限、观察时间点有限等不足,有待后续扩大样本量,对研究结果进行验证。

参考文献

- [1] Liu X, Yang Y, Feng X, et al. Early versus late distant metastasis and adjuvant chemotherapy alone versus both radiotherapy and chemotherapy in molecular apocrine breast cancer [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(31):48905-48917.
- [2] 郭文利,黄建棋,陆建菊.乳腺癌根治术后早期化疗对患者临床预后的影响[J].*中国普通外科杂志*, 2017, 26(5):666-670.
- [3] 高梅娟,张丽杰,于春梅,等.乳腺癌术后化疗感染率及危险因素分析[J].*中国预防医学杂志*, 2017, 18(6):462-464.
- [4] Marshall EA, Ng KW, Kung SH, et al. Emerging roles of Thelper17 and regulatory T cells in lung cancer progression and metastasis[J]. *Mol Cancer*, 2016, 15(1):67-69.
- [5] 廖荣叶,孙守萍,曹志. PCT、sICAM-1、sVCAM-1在慢性肾小球肾炎合并细菌感染中的应用价值[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2020, 12(5):629-633.
- [6] 中国抗癌协会乳腺癌专业委员会.中国抗癌协会乳腺癌诊治指南与规范(2015版)[J].*中国癌症杂志*, 2015, 191(9):62-124.
- [7] 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.
- [8] Yang C, Wang X, Zhang G, et al. Assessment of the use of latissimus dorsi restoration during modified radical mastectomy in breast cancer patients [J]. *Mol Clin Oncol*, 2017, 7(6):1089-1092.
- [9] Diller ML, Kudchadkar RR, Delman KA, et al. Balancing Inflammation: The Link between Th17 and Regulatory T Cells [J]. *Med Inf*, 2016, 18(16):1-8.
- [10] 刘宇宏,樊华,刘超,等.乳腺癌患者新辅助治疗前后调节性T细胞/辅助T细胞17的表达[J].*肿瘤研究与临床*, 2017, 29(6):417-419.
- [11] Liu X, Hu H, Fan H, et al. The role of STAT3 and AhR in the differentiation of CD4+T cells into Th17 and Treg cells [J]. *Medicine*, 2017, 96(17):e6615.
- [12] 马华怡,李远眺,韦怡怡,等. CD4+FoxP3+调节性T细胞在肺部真菌感染中抑制Th2细胞的免疫效应[J].*中国老年学杂志*, 2018, 38(2):265-268.
- [13] Charlene R, Boerboom D, Marilène P. Expression of the Hippo signalling effectors YAP and TAZ in canine mammary gland hyperplasia and malignant transformation of mammary tumours[J]. *Vet Comp Oncol*, 2018, 16(3):630-635.
- [14] 李学刚,刘兵雄.消癌平联合新辅助化疗对乳腺癌患者促增殖分子表达及免疫功能的影响[J].*海南医学院学报*, 2017, 23(22):3096-3099.
- [15] 金燕芬,白松,杨红菊,等.多重耐药菌老年肺炎患者Th与Treg细胞及其细胞因子的表达[J].*中华医院感染学杂志*, 2019, 15(8):1159-1164.
- [16] Gao M, Liu LX, Wu FL, et al. The Changes of Th17/Treg and Related Cytokines: IL-17, IL-23, IL-10, and TGF-β in Respiratory Syncytial Virus Bronchiolitis Rat Model [J]. *J Allergy Asthma Imm*, 2017, 16(5):386.
- [17] 邱海南.血清hs-CRP和PCT水平检测对新生儿败血症的早期诊断及疗效判断价值[J].*热带医学杂志*, 2015, (1):1353-1355.

(上接第1703页)

- [13] 赖世超.可溶性晚期糖基化终末产物受体在小儿脓毒症病情及预后评估中的价值[J].*成都医学院学报*, 2017, 12(4):457-460.
- [14] 李维春,谢瑞玉,张克昌.血浆可溶性晚期糖基化终末产物受体与肺表面活性蛋白A在新生儿急性呼吸窘迫综合征中的表达[J].*蚌埠医学院学报*, 2019, 44(4):92-94.
- [15] 雷艳梅,周潇,马建国,等.降钙素原联合肾上腺髓质素前体中段肽在脓毒症诊断中的应用[J].*广东医学*, 2017, 38(9):1383-1385.
- [16] 张毅,沈锋.内镜介入治疗急性化脓性胆管炎对HMGB1、sTREM-1和hs-CRP的影响[J].*现代中西医结合杂志*, 2016, 25(4):357-359.
- [17] 崔文娟,李亚红,胡国鑫,等.脓毒症合并急性肾损伤患者外周血TLR4、HMGB1、MFG-E8表达水平及临床意义[J].*实用医学杂志*, 2019, 35(7):110-113, 117.

ALB、CD64 及 BCL-2 在重症肺炎中的表达及与病情严重程度、预后的关系研究

刘瑞莹* 李群 杨帅 唐惠星 高倩

[摘要] **目的** 探讨血清白蛋白(ALB)、中性粒细胞 CD64(CD 64)及 B 细胞淋巴瘤/白血病-2(BCL-2)在重症肺炎中的表达及与病情严重程度、预后的关系研究。**方法** 选取2016年1月至2018年1月本院收治的52例重症肺炎患者及52例普通肺炎患者,分别设为重症肺炎组及普通肺炎组。对比ALB、CD64及BCL-2在两组中的表达情况,探讨上述指标与患者病情程度的关系,以Logistic回归模型分析影响患者预后的危险因素。**结果** 重症肺炎患者ALB水平低于普通肺炎者,重症肺炎患者CD64及BCL-2阳性表达率均高于普通肺炎者,差异均具有统计学意义($P<0.05$)。ALB ≤ 30 g/L、CD64及BCL-24阳性者SOFA、SOFA评分低于ALB >30 g/L、CD64及BCL-24阴性者,差异具有统计学意义($P<0.05$)。ALB ≤ 30 g/L及 >30 g/L平均生存期分别为(22.55 \pm 1.33)个月、(26.75 \pm 1.45)个月;CD64阳性及阴性平均生存期分别为(18.29 \pm 1.39)个月、(22.79 \pm 1.19)个月;BCL-2阳性及阴性平均生存期分别为(21.43 \pm 1.34)个月、(27.29 \pm 1.47)个月;生存分析显示ALB >30 g/L者生存期较长,CD64及BCL-2阴性者生存期较长($P<0.05$)。随访期间,52例重症肺炎患者共死亡23例(44.20%),存活29例(55.77%)。SOFA及CPIS评分 >6 分、CD64(阳性)、BCL-24(阳性)、ALB(≤ 30 g/L)是影响重症肺炎患者预后生存的独立危险因素($P<0.05$)。**结论** 重症肺炎患者体内ALB呈阴性,CD64及BCL-2呈阳性,上述因子与患者预后生存存在相关性,表达异常将加重患者病情发展,不利于预后。

[关键词] 血清白蛋白;中性粒细胞CD64;BCL-2;重症肺炎

The expression of ALB, CD64 and BCL - 2 in severe pneumonia and their relationship with the severity and prognosis

LIU Ruiying*, LI Qun, YANG Shuai, TANG Huixing, GAO Qian

(Emergency Ward of Beijing Shijitan Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing, China, 100038)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the expression of Serum albumin (ALB), Cluster of differentiation 64 (CD64), and B Cell Leukemia 2 (BCL-2) in severe pneumonia and their relationship with the severity of the disease and prognosis. **Methods** The clinical data of 52 patients with severe pneumonia and 52 patients with common pneumonia admitted to this hospital from January 2016 to January 2018 were selected. They were divided into the severe pneumonia group and the common pneumonia group. The expression of ALB, CD64 and BCL-2 in the two groups was compared, the relationship between the above indicators and the severity of the patient's condition was explored, and the logistic regression model was used to analyze the risk factors affecting the prognosis of the patients. **Results** ALB levels in patients with severe pneumonia were lower than those in patients with common pneumonia, and the positive expression rates of CD64 and BCL-2 in patients with severe pneumonia were higher than those in patients with common pneumonia, and the differences were statistically

基金项目:北京市自然科学基金资助项目(2017067)

作者单位:首都医科大学附属北京世纪坛医院急诊病房,北京 100038

*通信作者:刘瑞莹, E-mail:zhongqu32149880365@163.com

significant ($P<0.05$). The SOFA and SOFA scores of patients with $ALB\leq 30$ g/L and positive CD64 and BCL-24 were lower than those with $ALB>30$ g/L and negative CD64 and BCL-24, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). The average survival time of patients with $ALB\leq 30$ g/L or >30 g/L was (22.55 ± 1.33) months and (26.75 ± 1.45) months, respectively. The average survival time of patients with positive or negative CD64 was (18.29 ± 1.39) months and (22.79 ± 1.19) months, respectively. The average survival time of patients with positive or negative BCL-2 was (21.43 ± 1.34) months and (27.29 ± 1.47) months, respectively. Survival analysis showed that those with $ALB>30$ g/L had a longer survival time, and those with negative CD64 and BCL-2 had a longer survival time ($P<0.05$). During the follow-up, in 52 severe pneumonia patients, 23 died (44.20%) and 29 survived (55.77%). SOFA and CPIS score >6 , CD64 (positive), BCL-24 (positive), ALB (≤ 30 g/L) were independent risk factors that affect the prognosis of patients with severe pneumonia ($P<0.05$).

Conclusion Patients with severe pneumonia have negative ALB, and positive CD64 and BCL-2. The above factors are related to the prognosis and survival of patients. Abnormal expression will aggravate the development of the patient's condition and is not conducive to the prognosis.

[KEY WORDS] Serum albumin; Cluster of differentiation 64; BCL-2; Severe pneumonia

重症肺炎为临床事件的危急重症,病情严重者可诱发多种器官衰竭,危及生命。近年来,随着感染的高危宿主增多,细菌耐药性增加导致细菌耐药或者多药耐药现象日益严重,尽管不断有学者研究出现新的抗菌药物,但重症肺炎仍是临床中诊治困难的疾病,且大多患者预后差^[1-2]。相关研究表明血清白蛋白(serum albumin, ALB)与非感染性疾病的预后存在密切联系,也有学者报道重症肺炎疾病严重程度及预后与ALB有关,但缺乏明确证据^[3]。中性粒细胞CD64(cluster of differentiation 64, CD64)是临床公认的细菌感染性重要标志物,对多种感染性疾病的诊断有重要价值^[4]。B细胞淋巴瘤/白血病-2(B cell leukemia 2, BCL-2)可拮抗凋亡细胞的表达,抑制细胞凋亡,可保护患者支气管内皮的完整性,并通过抑制巨噬细胞浸润,减轻支气管平滑肌炎性反应,但BCL-2表达与重症肺炎患者预后关系的研究不足^[5]。本研究将探讨ALB、CD64及BCL-2的表达重症肺炎患者病情严重程度及预后的关系,给临床检测患者病情、促进患者预后提供参考。现报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2016年1月至2018年1月本院收治的52例重症肺炎患者及52例普通肺炎患者,设为重症肺炎组及普通肺炎组。重症肺炎组男25例,女27例;平均年龄(53.59 ± 3.12)岁;合并糖尿病及高血压的患者32例,合并支气管哮喘11例,合并慢性阻塞性肺疾病9例。普通肺炎组男

27例,女25例;平均年龄(53.66 ± 3.20)岁;合并糖尿病及高血压的患者29例,合并支气管哮喘12例,合并慢性阻塞性肺疾病11例。两组性别、年龄的一般资料比较差异无统计学意义($P>0.05$)。本研究经本院医学伦理委员会批准,受试者签署知情同意书。

纳入标准:①所有患者均符合《中国成人社区获得性肺炎诊断及治疗指南》^[6]中关于普通肺炎及重症肺炎的相关诊断标准;②纳入研究前未进行其他治疗;③临床资料、影像资料完整;④年龄在32~79岁之间。两组排除标准:①合并其他恶性肿瘤、器官衰竭等严重患者;②入院24 h内死亡或自动出院的患者;③妊娠期、哺乳期妇女,精神疾病者,合并血液系统疾病及腹腔、泌尿生殖系统、神经中枢系统感染者;④无法进行胸部影像学检查者。

1.2 方法

1.2.1 检测方法

所有对象均在医生协助下完善相关检查,于次日清晨空腹抽取静脉血5 mL自然凝固后以3 000 rpm离心10 min,取血清。采用强生Vitros350全自动干式化学分析仪,以酶联免疫吸附法测定血清中ALB水平。采用免疫组化染色,将两组患者肺部组织标本经常规石蜡切片、脱水,测定BCL-2及CD64水平,小鼠抗人荧光色素标记的单克隆抗体CD64、BCL-2由美国Beckman Coulter提供,DBA显色剂由北京中杉金色桥生物技术公司提供,抗体免疫组织化学试剂盒由上海嵘威达实业有限公司提供。ALB正常范围值:35~51 g/L^[7]。

1.2.2 染色强度评分标准

BCL-2、CD64 染色强度评分标准^[8]: 棕黄色, 则判断为阳性。检查结果无阳性细胞, 则为阴性(-), 阳性细胞不足 50%, 则判定为阳性(+), 阳性细胞数量超过 50%, 则为强阳性(++)。阳性率 = 阳性例数/总例数 × 100%。

1.2.3 肺部感染严重程度评定标准

按照临床肺部感染评分 (Clinical Pulmonary Infection Score, CPIS)^[9] 及序贯器官衰竭评分 (Sequential Organ Failure Assessment Score, SOFA)^[10] 标准对两患者进行评分, 记录两组患者得分情况。CPIS 评分: 总分为 0~12 分, 评分 ≤ 6 分可停用抗生素, 评分越低代表患者肺部感染程度越轻。SOFA 评分: 总分 0~24 分, 总分评分越高代表患者预后越差。

1.2.4 随访

以电话随访或门诊复查的方式对重症肺炎患者进行为期 2 年的随访, 随访截止时间 2020 年 1

月或死亡。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析, 计量资料采用 $(\bar{x} \pm s)$ 描述, 行 *t* 检验; 计数资料通过 *n*(%) 描述, 采用 χ^2 检验; 绘制 ROC 曲线, Kaplan-Meier 生存分析 ALB、CD64、BCL-2 表达对重症肺炎患者预后生存的影响, 使用 tarone 法进行检验; 影响患者预后的相关因素采用非条件单因素和多因素 Logistic 回归分析; *P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

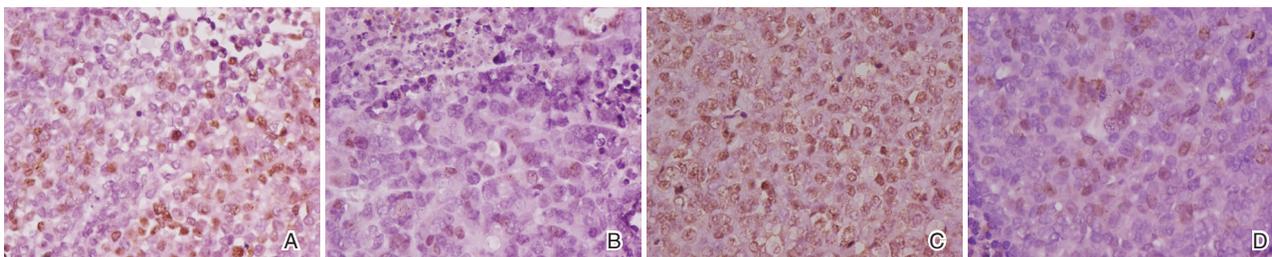
2.1 对比 ALB、CD64 及 BCL-2 在两组患者中的表达情况

重症肺炎患者 ALB 水平低于普通肺炎者, 重症肺炎患者 CD64 及 BCL-2 阳性表达率显著高于普通肺炎者, 差异均具有统计学意义 (*P* < 0.05)。见表 1、图 1。

表 1 ALB、CD64 及 BCL-2 在两组患者中的表达情况 [*n*(%), ($\bar{x} \pm s$)]

Table 1 the expression of ALB, CD64 and Bcl-2 in the two groups [*n*(%), ($\bar{x} \pm s$)]

组别	<i>n</i>	ALB(g/L)	CD64		BCL-2	
			阳性	阴性	阳性	阴性
重症肺炎组	52	20.74±5.74	38(73.08)	14(26.92)	35(67.31)	17(32.69)
普通肺炎组	52	28.87±4.58	20(38.46)	32(61.54)	22(42.31)	30(57.69)
<i>t</i> / χ^2 值	-	7.984		12.630		6.561
<i>P</i> 值	-	0.001		0.001		0.010



注: A 为 BCL-2 阳性表达; B 为 BCL-2 阴性表达; C 为 CD64 阳性表达; D 为 CD64 阴性表达。

图 1 重症肺炎组 BCL-2、CD64 免疫组化染色图 (SP, ×300)

Figure 1 BCL-2 and CD64 immunohistochemical staining image of severe pneumonia group (SP, ×300)

2.2 不同 ALB、CD64 及 BCL-2 水平与重症肺炎患者 SOFA、CPIS 评分的关系

ALB ≤ 30 g/L、CD64 及 BCL-24 阳性者 SOFA、SOFA 评分低于 ALB > 30 g/L、CD64 及 BCL-24 阴性者, 差异具有统计学意义 (*P* < 0.05)。见表 2。

2.3 ALB、CD64 及 BCL-2 表达与重症肺炎患者预后的相关性

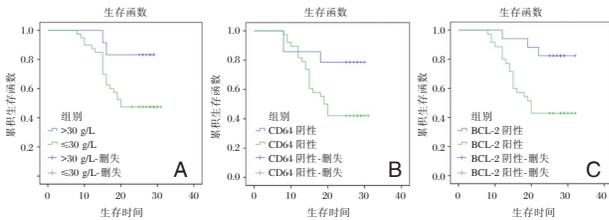
ALB ≤ 30 g/L 及 > 30 g/L 平均生存期分别为

(22.55 ± 1.33) 个月、(26.75 ± 1.45) 个月; CD64 阳性及阴性平均生存期分别为 (18.29 ± 1.39) 个月、(22.79 ± 1.19) 个月; BCL-2 阳性及阴性平均生存期分别为 (21.43 ± 1.34) 个月、(27.29 ± 1.47) 个月。生存分析显示 ALB > 30 g/L 者生存期较长, CD64 及 BCL-2 阴性者生存期较长, Kaplan-meier 生存曲线差异有统计学意义 (*P* < 0.05)。见图 2。

表2 不同ALB、CD64及BCL-2水平与重症肺炎患者SOFA、CPIS评分的关系($\bar{x} \pm s$)

Table 2 The relationship between different levels of ALB, CD64 and Bcl-2 and SOFA and CPIS scores in patients with severe pneumonia ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	SOFA 评分	CPIS 评分	
ALB(g/L)	≤30	40	5.41±0.74	6.79±1.12
	>30	12	6.55±0.85	7.64±1.25
t 值	-	-	4.524	2.246
P 值	-	-	0.001	0.029
CD64(%)	阳性	38	6.12±1.13	7.27±1.39
	阴性	14	5.29±0.89	6.41±1.20
t 值	-	-	2.475	2.048
P 值	-	-	0.017	0.046
BCL-24(%)	阳性	35	6.34±1.36	7.33±1.38
	阴性	17	5.47±1.12	6.41±1.25
t 值	-	-	2.4307	2.349
P 值	-	-	0.025	0.023



注:A为ALB≤30g/L及>30g/L生存时间比较;B为CD64阳性及阴性生存时间比较;C为BCL-24阳性及阴性生存时间比较。

图2 重症肺炎患者预后生存曲线

Figure 2 Survival curve of patients with severe pneumonia

2.4 52例重症肺炎患者两年生存率

随访期间,52例重症肺炎患者共死亡23例,存活29例,死亡率为44.20%,存活率为55.77%。

2.5 影响重症肺炎患者预后生存的因素分析

SOFA及CPIS评分>6分、CD64(阳性)、BCL-24(阳性)、ALB(≤30g/L)是影响重症肺炎患者预后

生存的独立危险因素($P<0.05$)。见表3。

3 讨论

重症肺炎是由细菌、病毒或其他非典型病原体引起的肺实质炎症,严重威胁我国居民的生命安全。对肺炎进行早期的诊断和治疗对改善患者预后具有重要意义,目前临床多依据影像学表现来诊断肺炎^[11-12]。相关研究指出,ALB与慢性阻塞性肺疾病急性加重期患者预后密切相关,但相关感染源分层分析未明确^[13]。既往研究表明,正常生理情况下,CD64在中性粒细胞表面呈低水平表达,而机体受到炎症感染时,多种炎症因子受到刺激,使CD64表达迅速升高^[14]。本研究重点探讨ALB、CD64、BCL-2表达与重症肺炎患者疾病严重程度与预后的相关性。

本研究结果显示,重症肺炎患者ALB水平低于普通肺炎者,重症肺炎患者CD64及BCL-2阳性表达率均高于普通肺炎者,这一研究结果与既往文献报道结果一致^[15]。分析其原因:ALB在肝脏中合成,对促进患者机体代谢,运输营养起着重要作用,重症肺炎患者血清ALB降低考虑与患者感染程度严重及营养消耗过度有关。因此重症肺炎患者体内CD64及BCL-2表达量显著上升,这与Hiwa等学者^[16]研究报道结果一致。

SOFA及SOFA评分为临床常用的评估患者各器官功能及肺部感染程度的指标。国外研究指出,BCL-24可促进促炎质生成,抑制抗炎介质表达,从而促进感染性疾病的发生,加重感染性疾病病情严重程度^[17]。本研究结果提示ALB、CD64及BCL-2水平异常会影响患者疾病严重程度。

表3 影响重症肺炎患者预后生存的单因素和多因素分析

Table 3 Univariate and multivariate analysis of prognosis and survival in patients with severe pneumonia

变量	单因素分析			多因素分析		
	OR 值	95% CI	P 值	OR 值	95%CI	P 值
年龄(≥65岁 vs <65)	1.125	0.157~1.258	0.824	-	-	-
性别(男 vs 女)	1.247	0.247~1.336	0.647	-	-	-
合并糖尿病或高血压	1.367	0.118~1.149	0.269	-	-	-
合并支气管哮喘	1.458	0.158~1.232	0.547	-	-	-
合并慢性阻塞性肺部疾病	1.357	0.247~1.368	0.519	-	-	-
SOFA 评分(>6分 vs ≤6分)	1.365	1.257~1.885	0.035	1.357	1.281~1.687	0.015
CPIS 评分(>6分 vs ≤6分)	1.357	1.147~1.778	0.029	1.157	1.157~1.698	0.005
CD64(阳性 vs 阴性)	1.257	1.123~1.657	0.015	1.325	1.364~1.864	0.020
BCL-24(阳性 vs 阴性)	1.458	1.235~1.657	0.016	1.287	1.258~1.968	0.013
ALB(≤30g/L vs >30g/L)	1.654	1.347~1.685	0.005	1.269	1.147~1.881	0.007

生存分析提示 ALB、CD64 及 BCL-2 与重症肺炎患者预后存在密切联系。随访结果显示,52 例重症肺炎患者共死亡 23 例(44.20%),重症肺炎患者 2 年生存率为 55.77%。本研究通过非条件多因素 Logistic 回归模型进一步分析,得出 SOFA 及 CPIS 评分>6 分、CD64(阳性)、BCL-24(阳性)、ALB(≤ 30 g/L)影响重症肺炎患者预后生存的独立危险因素。亦说明患者感染加重时,可通过消耗 ALB 水平调节免疫功能,而 ALB 水平下降也提示患者脏器负担加重,制约吞噬细胞的活性,加重患者感染程度;CD64、BCL-24 水平上调会加重患者感染,这也是疾病严重程度越高患者 CD64、BCL-24 水平越高的原因^[18]。

综上所述,重症肺炎患者体内 ALB 呈阴性、CD64 及 BCL-2 呈阳性,上述指标表达异常会加重患者病情发展;OFA 及 CPIS 评分>6 分、CD64(阳性)、BCL-24(阳性)、ALB(≤ 30 g/L)影响重症肺炎患者预后生存的独立危险因素。但本研究中纳入样本量较少,研究结果难免出现偏倚,后续将扩大样本量,进一步深入研究 ALB、CD64、BCL-24 的表达与重症肺炎患者疾病严重程度与预后的关系,为临床诊治症状肺炎提供新方向。

参考文献

- [1] 万礼, 牟江. 血清胆碱酯酶与重症肺炎患者病情程度、应激性高血糖相关性及其重症肺炎预后影响因素分析[J]. 临床误诊误治, 2018, 31(8):77-81.
- [2] 白驹. 高龄重症肺炎患者血清过氧化物及过氧化水平及其临床意义[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2017, 8(3):87-127.
- [3] Kawasaki T, Shime N, Straney L, et al. Paediatric sequential organ failure assessment score (pSOFA): a plea for the world-wide collaboration for consensus [J]. Int Care Med, 2018, 31(9):26-32.
- [4] Chen C, Yan M, Hu C, et al. Diagnostic efficacy of serum procalcitonin, C-reactive protein concentration and clinical pulmonary infection score in Ventilator-Associated Pneumonia [J]. Médec sci, 2018, 3(4):26-32.
- [5] 李媛媛, 张强, 马岚, 等. 不同营养方式对重症肺炎患者的预后价值分析[J]. 解放军医药杂志, 2019, 31(8):49-52.
- [6] 中华医学会呼吸病学分会感染学组. 中国成人医院获得性肺炎与呼吸机相关性肺炎诊断和治疗指南(2018年版)[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2018, 41(4):255-280.
- [7] Mizgerd JP. Pathogenesis of severe pneumonia: advances and knowledge gaps [J]. Curr Opin Pulmonary Med, 2017, 23(3):193-253.
- [8] Tuti T, Agweyu A, Mwaniki P, et al. An exploration of mortality risk factors in non-severe pneumonia in children using clinical data from Kenya [J]. BMC Med, 2017, 15(1):21-22.
- [9] 文玉玲, 吴世栋. 米非司酮对子宫内膜异位症患者 SOCS-3、Bcl-2、Bax、caspase-3 水平的影响 [J]. 医学分子生物学杂志, 2018, 15(5):348-351.
- [10] Jonnalagadda S, Oswaldo R, Estrella B, et al. Etiology of severe pneumonia in Ecuadorian children [J]. Plos One, 2017, 12(2):171-687.
- [11] Chahin A, Opal SM. Severe Pneumonia Caused by Legionella pneumophila: Differential Diagnosis and Therapeutic Considerations [J]. Inf Dis Clin North Am, 2017, 31(1):111-121.
- [12] Tuti T, Agweyu A, Mwaniki P, et al. An exploration of mortality risk factors in non-severe pneumonia in children using clinical data from Kenya [J]. BMC Med, 2017, 15(1):212-453.
- [13] Heikens GT, Manary MJ, Trehan I. African Children with Severe Pneumonia Remain at High Risk for Death Even After Discharge [J]. Paediatric Perinatal Epidemiol, 2017, 31(3):243-244.
- [14] Ohta R, Shimabukuro A. Rural physicians' scope of practice on remote islands: A case report of severe pneumonia that required overnight artificial airway management [J]. J Rural Med, 2017, 12(1):53-55.
- [15] Nagarajan V. A Man with Acute Severe Pneumonia: Case Discussion from the University of Louisville Hospital [J]. University Louisville J Res Inf, 2019, 20(15):98-483.
- [16] Hiwa N, Désirée S, Herbert H, et al. Detection of Shigella sonnei in a respiratory specimen in a patient with subacute atypical pneumonia [J]. Infection, 2017, 12(20):687-125.
- [17] Henz K, Al-Zeebeby A, Basoglu M, et al. Selective BH3-mimetics targeting BCL-2, BCL-XL or MCL-1 induce severe mitochondrial perturbations [J]. Biolog Chem, 2018, 400(2):181-185.
- [18] You ML, Chen YJ, Chong QY, et al. Trefoil factor 3 mediation of oncogenicity and chemoresistance in hepatocellular carcinoma is AKT-BCL-2 dependent [J]. Oncotarget, 2017, 8(24):39323-39344.

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

付慧清¹ 王新颜¹ 吴洁清² 李燕¹ 李清¹ 刘迎春^{3*}

[摘要] 目的 分析2型糖尿病(T2DM)患者糖化血红蛋白(HbA1c)、25-羟维生素D3(25-OH-D3)水平及T淋巴细胞亚群与胰岛素分泌的相关性。方法 选取2019年5月至2020年5月本院收治的92例T2DM患者(观察组)及同期于本院体检正常者60例(对照组),收集所有研究对象一般资料,记录其HbA1c、25-OH-D3、T淋巴细胞亚群(CD4+、CD8+、CD4+/CD8+)水平及空腹血糖(FBG)、空腹胰岛素(FINS)、胰岛β细胞功能指数(HOMA-β)、胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)、胰岛素第一分泌时相峰值倍数情况,并采用葡萄糖负荷后30 min的净增胰岛素与净增葡萄糖比值($\Delta I_{30}/\Delta G_{30}$)来直面评估早相胰岛素分泌功能,比较两组组体质量指数(BMI)、血清HbA1c、25-OH-D3、T淋巴细胞亚群水平及胰岛分泌相关指标差异,采用Pearson相关分析分别观察T2DM患者血清Hb、25-OH-D3、T淋巴细胞亚群和胰岛分泌的关系。结果 观察组HbA1c、CD8+水平显著高于对照组,而25-OH-D3水平、CD4+及CD4+/CD8+值显著低于对照组($P<0.05$);观察组FBG、FINS、HOMA-β、HOMA-IR胰岛素第一分泌时相峰值倍数(PR)显著高于对照组,而 $\Delta I_{30}/\Delta IG_{30}$ 显著低于对照组($P<0.05$);T2DM患者血清HbA1c水平与FBG呈正相关,与FINS、HOMA-β、PR及 $\Delta I_{30}/\Delta IG_{30}$ 呈负相关($P<0.05$);T2DM患者血清25-OH-D3水平与FINS、HOMA-β、PR及 $\Delta I_{30}/\Delta IG_{30}$ 呈正相关,与FBG及HOMA-IR呈负相关($P<0.05$);T2DM患者CD8+、CD4+/CD8+与FBG、FINS、HOMA-β、HOMA-IR及PR均无显著相关性($P>0.05$);而CD4+与FBG、HOMA-IR呈负相关,而与FINS、HOMA-β、PR及 $\Delta I_{30}/\Delta IG_{30}$ 呈正相关($P<0.05$)。结论 HbA1c、CD8+水平在T2DM患者中表达上升,而25-OH-D3、CD4+及CD4+/CD8+表达下降,且与胰岛素分泌具有密切相关性,联合三者检测有利于评估T2DM患者胰岛分泌功能。

[关键词] 2型糖尿病;血红蛋白;25-羟维生素D3;T淋巴细胞亚群;胰岛素分泌

The levels of HbA1c and 25-OH-D3 in patients with type 2 diabetes mellitus and the correlation between T lymphocyte subsets and insulin secretion

FU Huiqing¹, WANG Xinyan¹, WU Jieqing², LI Yan¹, LI Qing¹, LIU Yingchun^{3*}

(1. Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical College, Xinxiang, Henan, China, 453100; 2. Department of Oncology, the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical College, Xinxiang, Henan, China, 453100; 3. College of Nursing, the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical College, Xinxiang, Henan, China, 453100)

[ABSTRACT] Objective To analyze the levels of Haemoglobin A1c (HbA1c) and 25-hydroxy vitamin D3 (25-OH-D3) in patients with type 2 diabetes mellitus (T2DM) and analyze the correlation between T lymphocyte subsets and insulin secretion. Methods The clinical data of 92 T2DM patients (observation group) admitted to this hospital from August 2019 to May 2020 and 60 patients with normal physical examina-

基金项目:河南省科技发展计划项目(192102311215)

作者单位:1.新乡医学院第一附属医院内分泌科,河南,新乡 453100

2.新乡医学院第一附属医院肿瘤内科,河南,新乡 453100

3.新乡医学院第一附属医院护理学院,河南,新乡 453100

*通信作者:刘迎春, E-mail:1416769042@qq.com

tion in this hospital (control group) during the same period were selected, and general data of all research subjects were collected. HbA1c, 25-OH-D3, T lymphocyte subsets (CD4+, CD8+, CD4+/CD8+) levels and fasting blood glucose (FBG), fasting insulin (FINS), islet β cell function index (HOMA- β), the insulin resistance index (HOMA-IR), and the peak multiples of the first secretion phase of insulin are recorded. The ratio of net increase insulin to net increase glucose (Δ I30/ Δ G30) at 30 min after glucose load was used to directly assess the insulin secretion function at early phase. The differences in body mass index (BMI), serum HbA1c, 25-OH-D3, T lymphocyte subgroup levels, and related indexes of islet secretion between the control group and the observation group were compared. Pearson correlation analysis was used to observe the relationship between serum Hb, 25-OH-D3, T lymphocyte subsets and islet secretion in T2DM patients. **Results** The HbA1c and CD8+ levels of the observation group were significantly higher than those of the control group, while the 25-OH-D3 levels, CD4+ and CD4+/CD8+ values were significantly lower than those of the control group ($P<0.05$). The values of FBG, FINS, HOMA- β , HOMA-IR and the peak ratio of the first secretion phase of insulin (referred to as peak ratio, PR) in the observation group were significantly higher than those in the control group, while Δ I30/ Δ IG30 were significantly lower than those in the control group ($P<0.05$). Serum HbA1c levels in T2DM patients were positively correlated with FBG, and negatively correlated with FINS, HOMA- β , PR and Δ I30/ Δ IG30 ($P<0.05$). Serum 25-OH-D3 levels in T2DM patients were positively correlated with FINS, HOMA- β , PR and Δ I30/ Δ IG30, and negatively correlated with FBG and HOMA-IR ($P<0.05$). There is no significant correlation between CD8+, CD4+/CD8+ and FBG, FINS, HOMA- β , HOMA-IR and PR in T2DM patients ($P>0.05$). CD4+ was negatively correlated with FBG and HOMA-IR, but positively correlated with FINS, HOMA- β , PR and Δ I30/ Δ IG30 ($P<0.05$). **Conclusion** The expression of HbA1c and CD8+ is increased in T2DM patients, while the expression of 25-OH-D3, CD4+ and CD4+/CD8+ is decreased, and is closely related to insulin secretion. The combined detection of the three is helpful to evaluate the pancreatic secretion function of T2DM patients.

[KEY WORDS] Type 2 diabetes mellitus; Hemoglobin; 25-hydroxyvitamin D3; T lymphocyte subsets; Insulin secretion

糖化血红蛋白(haemoglobin A1c, HbA1c)与糖尿病并发症密切相关, HbA1c的控制水平直接影响到糖尿病患者的长期预后^[1]。随着研究的不断深入, 有不少国内外研究报道, 细胞免疫异常与T2DM的发病、进展有着密切联系, 而活性维生素D有类激素作用, 参与免疫应答、细胞增殖等多种生理过程, 其与糖尿病的相互影响越来越受到重视^[2-3]。但关于细胞免疫与血糖水平及胰岛分泌功能关系的报道较少^[4]。本文分析T2DM患者HbA1c、25-羟维生素D3(25-hydroxyl vitamin D3, 25-OH-D3)水平及T淋巴细胞亚群与胰岛素分泌的相关性, 具体报告内容如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2019年5月至2020年5月本院收治的92例T2DM患者(观察组)临床资料, 其中男50例, 女42例, 年龄41~74岁, 平均(55.90 \pm 3.21)岁, 糖尿病病程为1.5~26年, 平均病程为(7.18 \pm 1.19)年。纳入标

准: ①符合世界卫生组织中关于T2DM诊断标准^[5]: 空腹血糖(fasting blood glucose, FBG)均 >7.0 mmol·L⁻¹, 葡萄糖耐量试验(glucose tolerance test, GTT)中予以口服葡萄糖75 g 2 h后血糖 ≥ 11.1 mmol·L⁻¹; ②T2DM患者入院后均可完成所有实验检查及配合完成所有治疗; ③临床资料完整且准确者。排除标准: ①合并糖尿病酮症酸中毒、糖尿病肾病及其他严重并发症者; ②近期服用维生素D类药物者, 接受日光暴晒者; ③合并恶性肿瘤者; ④合并免疫系统、血液系统及甲状腺疾病。

同时纳入同期于本院接受健康体检结果正常者60例作为对照组。其中男32例, 女28例, 年龄40~73岁, 平均(55.29 \pm 3.16)岁。两组在性别、年龄等方面比较差异无统计学意义($P>0.05$), 均衡可比。本研究经医院伦理委员会批准, 受试者及家属签署知情同意书。

1.2 方法

收集所有研究对象一般资料, 记录其HbA1c、25-OH-D3、T淋巴细胞亚群(CD4+、CD8+、CD4+/

表4 T2DM患者血清HbA1c和胰岛分泌的相关性分析

Table 4 Correlation Analysis of serum HbA1c and islet secretion in T2DM patients

变量	r值	P值
FBG	0.426	0.018
FINS	-0.467	0.012
HOMA-β	-0.498	0.009
HOMA-IR	0.024	0.261
PR	-0.459	0.013
ΔI ₃₀ /ΔIG ₃₀	-0.419	0.028

HOMA-β、PR及ΔI₃₀/ΔIG₃₀呈正相关,与FBG及HOMA-IR呈负相关(P<0.05)。见表5。

表5 T2DM患者血清25-OH-D3和胰岛分泌相关性

Table 5 Correlation Analysis of serum 25-OH-D3 and islet secretion in T2DM patients

变量	r值	P值
FBG	-0.329	0.029
FINS	0.369	0.022
HOMA-β	0.510	0.002
HOMA-IR	-0.318	0.034
PR	0.428	0.014
ΔI ₃₀ /ΔIG ₃₀	0.467	0.008

2.6 T2DM患者T淋巴细胞亚群和胰岛分泌的相关性分析

T2DM患者CD8+、CD4+/CD8+与FBG、FINS、HOMA-β、HOMA-IR及PR均无显著相关性(P>0.05);而CD4+与FBG、HOMA-IR呈负相关,而与FINS、HOMA-β、PR及ΔI₃₀/ΔIG₃₀呈正相关(P<0.05)。见表6。

表6 T2DM患者T淋巴细胞亚群和胰岛分泌的相关性

Table 6 correlation analysis of T lymphocyte subsets and islet secretion in T2DM patients

变量	CD4+		CD8+		CD4+/CD8+	
	r值	P值	r值	P值	r值	P值
FBG	-0.397	0.037	0.019	0.571	0.127	0.561
FINS	0.298	0.043	-0.021	0.508	-0.197	0.502
HOMA-β	0.365	0.026	-0.033	0.419	-0.048	0.379
HOMA-IR	-0.419	0.009	0.103	0.219	0.276	0.167
PR	0.399	0.015	-0.187	0.201	-0.218	0.196
ΔI ₃₀ /ΔIG ₃₀	0.517	0.001	-0.031	0.209	0.056	0.198

3 讨论

本组数据显示,HbA1c水平与FBG呈正相关,与FINS、HOMA-β、PR及ΔI₃₀/ΔIG₃₀呈负相关,提示,在T2DM患者中,HbA1c水平的表达与胰岛分泌功能具有密切联系。相关文献提出,HbA1c水

平越高提示患者近期血糖水平控制不佳^[6]。而HbA1c与FINS、HOMA-β、PR及ΔI₃₀/ΔIG₃₀呈负相关,与HOMA-IR无相关性,提示随着HbA1c水平的升高,患者胰岛β细胞功能已受损,分泌功能出现下降,考虑机制可能为长期高血糖导致一系列氧化应激反应的发生。故动态监测T2DM患者HbA1c水平有利于评估患者近期血糖控制及预防。

曾有国外动物实验研究结果显示,机体维生素D水平过于缺乏对胰岛素的分泌存在不良影响,从而导致胰岛素分泌不足,增加T2DM发生风险^[7]。本组数据结果显示,FINS、HOMA-β、HOMA-IR及PR是反映胰岛素分泌的良好指标,而ΔI₃₀/ΔIG₃₀值大小可直接反映胰岛功能好坏。经Pearson相关分析提示25-OH-D3水平的缺乏与胰岛分泌功能的相关性。曾有生物学研究证实,25-OH-D可与胰腺维生素D受体结合,然后激活β细胞中L型钙离子通道,使得胰岛素释放,胰岛素受体底物酪氨酸磷酸化,从而启动胰岛素信号的传导,达到胰岛素分泌控制血糖效果^[8]。故当机体出现25-OH-D3缺乏时,可能是导致T2DM患者胰岛分泌功能减弱下降的主要原因,从而引发血糖升高等现象。

近年来,不少国内外研究报道在T2DM患者中存在免疫异常^[9]。相关研究报道显示,在内循环中,CD4+、CD4+/CD8+值的降低是免疫缺陷的重要指征^[10],而本研究结果符合上述研究理论。除此之外,本组Pearson相关分析提示机体免疫缺陷的产生与胰岛分泌功能密切相关。曾有相关报道表明,自身免疫性胰岛炎与T2DM患者胰岛β细胞凋亡及胰岛分泌缺陷有着密切联系,而胰岛炎的发生可能是机体固有免疫系统激活的结果,在免疫系统的激活中,T淋巴细胞亚群的失衡扮演着重要角色^[11]。李蓉等^[12]报道,当血糖升高时,淋巴细胞数量下降,且长期高血糖会导致免疫缺陷的产生和T淋巴细胞亚群紊乱,从而加重胰岛β细胞凋亡和胰岛分泌功能的障碍。故高血糖、细胞免疫异常及胰岛分泌缺陷在T2DM中呈现恶性循环,相互影响,但是具体详细机制还有待加大样本含量和延长研究时间进一步深入研究。

综上所述,HbA1c、CD8+在T2DM患者中表达上升,而25-OH-D3、CD4+及CD4+/CD8+值表达下降,且随着HbA1c的升高、CD4+的下降及25-OH-D3的缺乏,胰岛素敏感性下降,胰岛分泌功能减弱,故联合三者检测有利于评估 (下转第1721页)

血 VEGF、SDF-1、MMP-9 和 HMGB1 水平与烟雾病患者颅内出血的关系

徐梦怡* 徐静 张倩倩

[摘要] 目的 分析血管内皮生长因子(VEGF)、基质衍生因子-1(SDF-1)、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)和高迁移率族蛋白1(HMGB1)水平与烟雾病(MMD)患者颅内出血的关系。方法 选取2017年2月至2020年2月本院收治的90例MMD患者为研究对象,根据有无出血分为出血组($n=50$)和无出血组($n=40$),并选取同期于本院进行体检的40例健康者作为对照组,根据超声检查结果将颅内出血患者分为轻度颅内出血组($n=32$)和重度颅内出血组($n=18$),检测血清 VEGF、SDF-1、MMP-9 和 HMGB1 水平,并分析 VEGF、SDF-1、MMP-9 水平与 HMGB1 的相关性。结果 出血组血清 VEGF、SDF-1、MMP-9 和 HMGB1 水平均高于无出血组和对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$),无出血组血清 VEGF、SDF-1、MMP-9 和 HMGB1 水平均高于对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$);重度颅内出血组血清 VEGF、SDF-1、MMP-9 和 HMGB1 水平均高于轻度颅内出血组,差异具有统计学意义($P<0.05$);ROC 曲线分析显示,VEGF、SDF-1、MMP-9 和 HMGB1 水平联合检测 MMD 的敏感度、阳性预测值及阴性预测值均高于单独检测($P<0.05$);Spearman 相关分析显示,血清 VEGF-C、SDF-1、MMP-9 水平与 HMGB1 呈正相关性($P<0.05$)。结论 血清 VEGF、SDF-1、MMP-9 和 HMGB1 水平与 MMD 发生、发展密切相关,可能是引起颅内出血的重要机制。

[关键词] 烟雾病; 颅内出血; 血管内皮生长因子; 趋化因子-1; 基质金属蛋白酶-9; 高迁移率族蛋白1

Relationship between serum VEGF, SDF-1, MMP-9 and HMGB1 levels and intracranial hemorrhage in MMD patients

XU Mengyi*, XU Jing, ZHANG Qianqian

(Department of Neurology, Nanjing Hospital Affiliated to Nanjing Medical University (Nanjing First Hospital), Nanjing, Jiangsu, China, 210006)

[ABSTRACT] Objective To analyze the relationship between vascular endothelial growth factor (VEGF), stromal derived factor-1 (SDF-1), matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and high mobility group protein 1 (HMGB1) levels and intracranial hemorrhage in patients with moyamoya disease (MMD). Methods 90 cases of MMD patients admitted to our hospital from February 2017 to February 2020 were selected as the research object, according to the presence of hemorrhage were divided into bleeding group ($n=50$) and no hemorrhage group ($n=40$), and in the same period in our hospital for medical examination of 40 cases of healthy subjects as the control group, at the same time, according to the results of ultrasound to intracranial hemorrhage patients were divided into the mild group ($n=32$) and the intracerebral haemorrhage severe intracranial hemorrhage group ($n=18$), detection of serum VEGF, SDF-1, MMP-9 and HMGB1 level, The correlation between VEGF, SDF-1 and MMP-9 levels and HMGB1 was analyzed. Results The serum levels of VEGF, SDF-1, MMP-9 and HMGB1 in the bleeding group were all higher than those in the non-bleeding group and the

基金项目:江苏省卫生厅项目(H201541)

作者单位:南京医科大学附属南京医院(南京市第一医院)神经内科,江苏,南京 210006

*通信作者:徐梦怡, E-mail:beihai78143253@163.com

control group, The difference was statistically significant ($P<0.05$). The serum levels of VEGF, SDF-1, MMP-9 and HMGB1 in the non-bleeding group were all higher than those in the control group. The difference was statistically significant ($P<0.05$). The serum levels of VEGF, SDF-1, MMP-9 and HMGB1 in the severe intracranial hemorrhage group were all higher than those in the mild intracranial hemorrhage group. The difference was statistically significant ($P<0.05$). ROC curve analysis showed that the sensitivity, positive predictive value and negative predictive value of MMD detected by VEGF, SDF-1, MMP-9 and HMGB1 levels were all higher than those detected by single test ($P<0.05$). Spearman correlation analysis showed that serum VEGF, SDF-1 and MMP-9 levels were positively correlated with HMGB1 ($P<0.05$). Conclusion Serum levels of VEGF, SDF-1, MMP-9 and HMGB1 are closely related to the occurrence and development of MMD, and may be an important mechanism causing intracranial hemorrhage.

[KEY WORDS] Moyamoya disease; Intracranial hemorrhage; Vascular endothelial growth factor; Chemokine-1; Matrix metalloproteinase-9; High mobility group 1

烟雾病(moyamoya disease, MMD)是以双侧颈内动脉及主要侧支内膜缓慢增厚,动脉管腔逐渐狭窄致闭塞,并伴有狭窄异常血管网形成为特征的脑底异常血管网病^[1]。临床表现为短暂性脑缺血发作、脑梗死及自发性颅内出血,可导致颅内出血。随着我国MMD发病率逐渐升高,MMD患者颅内出血也随之升高,严重危及患者生命安全,故早期评估患者病情并给予积极治疗对改善患者预后至关重要^[2]。基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)属于基质金属蛋白酶超家族成员中明胶酶一种,可降解多种细胞外基质成份,在受损血管和炎性细胞中呈高表达^[3]。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是一种糖蛋白,可促进MMP表达和新生血管形成,保护和营养神经^[4]。基质细胞衍生因子-1(stromal cell-derived factor 1, SDF-1)是近年来新发现的炎症趋化因子,可促进细胞增殖、迁移、分化及损伤血管内皮的修复^[5]。而高迁移率蛋白-1(high mobility group protein, HMGB1)是一种参与集体炎性反应的蛋白,与脑出血后疾病进展具有一定的相关性^[6]。近年来研究表明,血清VEGF、SDF-1、MMP-9和HMGB1水平与MMD发生发展密切相关^[7]。本研究分析血清VEGF、SDF-1、MMP-9和HMGB1水平与MMD患者颅内出血的关系,旨在为临床诊断和治疗提供参考,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2017年2月至2020年2月本院收治的90例MMD患者为研究对象,纳入标准:①均符合MMD诊断标准,并经影像学证实为双侧颈内动脉

或大动脉或大脑中动脉起始部分狭窄或闭塞,且伴有脑底部异常血管网形成^[8];②年龄:18~60岁;排除标准:①严重肝肾功能不全者;②合并自身免疫系统疾病及恶性肿瘤者;③动脉粥样硬化及其他各种继发因素所致的血管闭塞或狭窄;④并发急性炎症、脑膜炎及脑放疗术后者。根据有无出血分为出血组($n=50$)和无出血组($n=40$),并根据超声检查结果将颅内出血患者分为轻度颅内出血组($n=32$)和重度颅内出血组($n=18$),同时选取同期于本院进行体检的40例健康者作为对照组。本研究经过本院医学伦理委员会批准,受试者签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 临床资料

记录两组性别、年龄、病程、高血压、糖尿病及吸烟史。

1.2.2 血清VEGF、SDF-1、MMP-9和HMGB1水平测定

取患者晨起空腹静脉血5 mL,保存于EDTA抗凝管中,在3 000 r/min下离心10 min,进行离心沉淀细胞,分离上清液后置于-80℃冰箱保存,采用酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)法测定血清VEGF、SDF-1、MMP-9和HMGB1水平。

1.3 观察指标

①对比出血组、无出血组及对照组的性别、年龄、病程、高血压、糖尿病、吸烟史及血清VEGF、SDF-1、MMP-9和HMGB1水平;②对比轻度颅内出血组和重度颅内出血组血清VEGF、SDF-1、MMP-9和HMGB1水平;③分析血清VEGF、SDF-1、MMP-9与HMGB1的相关性。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 20.0 软件进行数据分析, 计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 两组间比较行 t 检验, 呈正态分布各变量间相关性采用 Spearman 相关分析, 以相关系数 r 表示两资料间的相关性, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3组临床资料比较

出血组、无出血组及对照组的性别、年龄、病程、高血压、糖尿病及吸烟史比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 3组临床资料比较 [$n(\%)$, $\bar{x} \pm s$]

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

组别	n	男/女	年龄	病程	高血压	糖尿病	吸烟史
出血组	50	30/20	37.65±6.04	12.53±2.84	8(16.00)	4(8.00)	13(26.00)
无出血组	40	24/16	35.98±5.88	13.17±2.87	7(17.50)	5(12.50)	12(30.00)
对照组	40	23/17	36.29±5.94	-	5(12.50)	3(7.50)	10(25.00)
$F/t/\chi^2$ 值		0.072	1.021	1.057	0.408	0.744	0.289
P 值		0.965	0.363	0.297	0.816	0.689	0.865

2.2 3组血清 VEGF、SDF-1、MMP-9 和 HMGB1 水平比较

3组血清 VEGF、SDF-1、MMP-9 和 HMGB1 水平比较结果: 出血组 > 无出血 > 对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。

2.3 轻度颅内出血组和重度颅内出血组血清 VEGF、SDF-1、MMP-9 和 HMGB1 水平比较

重度颅内出血组血清 VEGF、SDF-1、MMP-9 和 HMGB1 水平均高于轻度颅内出血组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 2 血清 VEGF、SDF-1、MMP-9 和 HMGB1 水比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of serum VEGF, SDF-1, MMP-9 and HMGB1 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	VEGF (pg/mL)	SDF-1 (pg/mL)	MMP-9 (ng/mL)	HMGB1 (ng/mL)
出血组	50	414.58±22.39 ^{ab}	217.56±22.48 ^{ab}	563.28±30.44 ^{ab}	20.14±3.10 ^{ab}
无出血组	40	324.79±16.23 ^b	118.95±16.04 ^b	414.20±25.69 ^b	11.27±2.55 ^b
对照组	40	63.37±8.26	67.79±8.11	251.14±20.35	3.85±1.06
F 值		4850.845	895.540	1577.160	493.461
P 值		0.000	0.000	0.000	0.000

注: 与无出血组比较, ^a $P < 0.05$; 与对照组比较, ^b $P < 0.05$ 。

表 3 轻度颅内出血组和重度颅内出血组血清 VEGF、SDF-1、MMP-9 和 HMGB1 水平 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Serum VEGF, SDF-1, MMP-9 and HMGB1 levels in the mild and severe intracranial hemorrhage groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	VEGF (pg/mL)	SDF-1 (pg/mL)	MMP-9 (ng/mL)	HMGB1 (ng/mL)
重度颅内出血组	18	408.26±20.39	204.11±19.85	554.37±26.08	13.96±3.78
轻度颅内出血组	32	384.50±15.96	175.24±15.08	490.22±17.95	10.21±2.44
t 值		4.567	5.790	10.276	4.265
P 值		0.000	0.000	0.000	0.000

2.4 血清 VEGF、SDF-1、MMP-9 和 HMGB1 水平对 MMD 预测效能参数及 ROC 曲线分析

ROC 曲线分析显示, VEGF、SDF-1、MMP-9 和 HMGB1 水平联合检测 MMD 的敏感度、阳性预测值及阴性预测值均高于单独检测差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 4 和图 1。

2.5 血清 VEGF、SDF-1、MMP-9 与 HMGB1 的相关性

Spearman 相关分析显示, 血清 VEGF-C ($r = 0.381, P = 0.012$)、SDF-1 ($r = 0.377, P = 0.010$)、MMP-9

水平 ($r = 0.358, P = 0.002$) 与 HMGB1 呈正相关性。见图 2。

3 讨论

近年来, MMD 颅内出血发病率逐渐呈上升趋势, 且其致残率和死亡率较高, 严重威胁患者生命安全。多数研究表明, MMD 是一种多基因遗传性疾病, 且炎症、免疫反应、细胞因子分泌异常及内皮细胞改变与 MMD 发生、发展密切相关^[9-10]。

表4 血 VEGF、SDF-1、MMP-9 和 HMGB1 水平对 MMD 预测效能参数

Table 4 Blood VEGF, SDF-1, MMP-9 and HMGB1 levels on MMD predictive performance parameters

指标	AUC	95%CI	敏感度(%)	特异度(%)	阳性预测值(%)	阴性预测值(%)
VEGF	0.753	0.619~0.888	84.76	67.00	82.33	80.15
SDF-1	0.682	0.533~0.830	80.63	64.28	78.26	75.82
MMP-9	0.597	0.437~0.756	74.56	57.82	72.55	68.54
HMGB1	0.640	0.482~0.798	77.45	60.46	77.85	75.76
VEGF+SDF-1+MMP-9+HMGB1	0.868	0.760~0.997	95.68	81.23	85.86	83.27

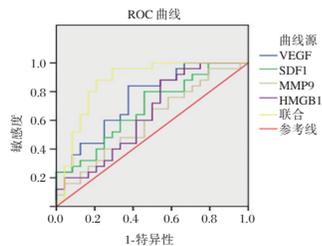
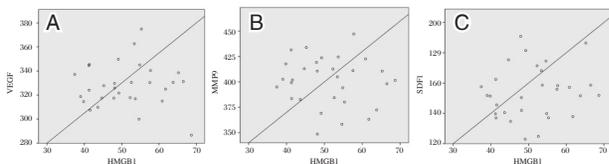


图1 血 VEGF、SDF-1、MMP-9 和 HMGB1 水平 ROC 曲线

Figure 1 Analysis of blood VEGF, SDF-1, MMP-9 and HMGB1 levels on ROC curves



注:图 A-C 分别为血清 VEGF、MMP-9 以及 SDF-1 水平与 HMGB1 的相关性图示。

图2 血清 VEGF、MMP-9、SDF-1 与 HMGB1 的相关性

Figure 2 Correlation between serum VEGF, MMP-9, SDF-1 level and HMGB1z

MMD 颅内出血可导致血肿发生并损伤脑组织,其机制包括 MMP 激活、细胞因子和血管活性物质释放等。同时研究表明,血清 VEGF、MMP-9 水平与 MMD 颅内出血发生发展密切相关^[11]。

MMP 是锌钙依赖性蛋白酶,可调节细胞外基质降解和重塑。MMP-9 是 MMP 重要一员,是 92kD 的胶原酶,可降解细胞外基质多种成分,在正常脑组织内呈低表达,因其是构成血脑屏障的主要成分,可保持血脑屏障的完整性,水解 IV、V 型胶原和细胞外基质成分可以导致血管壁损伤^[12]。VEGF 是具有生物活性的糖蛋白,是由血管内皮生长因子释放引起的,能够特异性促进内皮细胞增殖,并参与血管生长及增加血管通透性,故在炎症和缺血等生理病理中具有重要作用。VEGF 能够刺激轴突生长并改善神经细胞存活,保护神经系统;并可直接与中枢神经系统的神经元及胶质细胞促进增殖和突触生长;可通过促进内皮细胞增

生诱导新生血管形成,从而改善微循环;同时可增加血管通透性,在病理状态下可破坏血脑屏障,在正常情况下,VEGF 在中枢神经中表达不高,在应激反应条件下可诱导 VEGF 呈高表达^[13-14]。SDF-1 是趋化蛋白,对内皮祖细胞的动员和脑缺血后局部血管新生、骨髓源性和神经干祖细胞向损伤灶的募集过程中具有重要作用,同时与受体 CXCR-4 结合形成 SDF-1/CXCR-4 生物轴,并通过激活信号通路表达于内皮细胞并诱导新生血管生成^[15]。HMGB1 是非组蛋白染色体结合蛋白,主要存在于真核细胞生物内,可参与细胞分化增殖及迁移和炎症反应,度病情掌握和治疗具有重要意义^[16]。

相关研究显示,MMD 患者血清 TIMP、MMP-9 水平高于健康者^[17]。而本研究也证实了这一观点说明血清 VEGF、SDF-1、MMP-9 和 HMGB1 水平参与 MMD 颅内出血患者的发生发展,可作为判断病情进展的有效指标。分析其原因可能为:血清 VEGF、SDF-1、MMP-9 和 HMGB1 水平过度降解血管内皮外基质,使血脑屏障开放并增加渗透性,促进中性粒细胞迁移加重炎症反应,从而破坏血管完整性,致使血管壁薄弱,最终破裂出血。ROC 曲线分析进一步证实了,VEGF、SDF-1、MMP-9 和 HMGB1 水平对 MMD 的检出率较高。与其他研究不同的是,本研究为进一步分析不同程度颅内出血患者血清 VEGF、SDF-1、MMP-9 和 HMGB1 水平,结果提示血清 VEGF、SDF-1、MMP-9 和 HMGB1 水平可判断颅内出血的严重程度,有利于为临床诊断提供参考。Spearman 相关分析提示 HMGB1 水平随 VEGF-C、SDF-1、MMP-9 水平上高。本研究存在以下几点不:样本量较少,且纳入范围较小,将在下一步研究扩大样本量并扩大范围。

综上所述,血清 VEGF、SDF-1、MMP-9 和 HMGB1 水平是 MMD 发生、发展的潜在因素,在异常血管形成中具有重要作用,且血清 VEGF-C、SDF-1、MMP-9 水平与 HMGB1 呈正相关性,其水平呈高表达是引起 MMD 颅内出血的重要机制。

参考文献

[1] 洋双军, 张玉, 侯勇, 等. 不同血管重建手术治疗成人烟雾病的疗效分析[J]. 中华医学杂志, 2019, 99(13):998-1002.

[2] 杨学丽, 严兴丽. 缺血型和出血型成年烟雾病患者 MMP 与 VEGF 的表达水平差异及其与病情程度的关系[J]. 卒中与神经疾病, 2018, 25(3):57-60.

[3] 董鑫, 姚晓峰, 刘小雷, 等. HMGB1、MMP-9、CRP 对蛛网膜下腔出血患者脑血管痉挛诊断价值及预后的影响[J]. 立体定向和功能神经外科杂志, 2017, 30(4):213-217.

[4] 李黎明, 梁利, 潘云, 等. 稳定期慢性阻塞性肺疾病患者血清 SDF-1、CXCR4 表达及与肺功能和 CAT 评分的关系[J]. 中国医师杂志, 2019, 21(5):743-745.

[5] 李黎明, 梁利, 潘云, 等. 稳定期慢性阻塞性肺疾病患者血清 SDF-1、CXCR4 表达及与肺功能和 CAT 评分的关系[J]. 中国医师杂志, 2019, 21(5):743-745.

[6] 王京娥, 陈燕, 高山, 等. IGF-1、HMGB-1、GSM 和 MIF 水平在高血压脑出血中的意义[J]. 河北医药, 2016, 38(18):2733-2736.

[7] 朱莹莹, 汪青松, 刘学春, 等. 112 例烟雾病患者的临床表现和影像学特征分析[J]. 安徽医药, 2017, 21(12):2176-2179.

[8] 暴向阳, 朱兵, 刘毅, 等. 流式微球阵列法检测烟雾病患者血清血管生成因子和炎性细胞因子水平[J]. 国际脑血管病杂志, 2016, 24(2):108-113.

[9] 程道宾, 张皆德, 吕芳, 等. 烟雾病的遗传学和病理生理学机制[J]. 国际脑血管病杂志, 2014, 22(6):463.

[10] 陈祥, 徐运. 烟雾病与免疫炎症[J]. 国际脑血管病杂志, 2016, 24(2):146-149.

[11] 刘文华, 朱武生, 黄显军, 等. 成年型烟雾病患者血管内皮生长因子和基质金属蛋白酶-9 血清水平与 Suzuki 分级的关系[J]. 中华神经科杂志, 2012, 45(6):404-408.

[12] Naderi M, Younesi MR, Dorgalaleh A, et al. Association between Expression of MMP-2 and MMP-9 Genes and Pathogenesis of Intracranial Hemorrhage in Severe Coagulation Factor XIII Deficiency [J]. Hematology (Amsterdam, Netherlands), 2015, 12(1):2015.

[13] Paradowska-Gorycka A, Pawlik A, Romanowska-Prochnicka K, et al. Relationship between VEGF Gene Polymorphisms and Serum VEGF Protein Levels in Patients with Rheumatoid Arthritis[J]. Plos One, 2016, 11(8):e0160769.

[14] Vural F, Vural B, Emek D, et al. Perifollicular blood flow and its relationship with endometrial vascularity, follicular fluid EG-VEGF, IGF-1, and inhibin-a levels and IVF outcomes[J]. J Ass Rep Genet, 2016, 33(10):1355-1362.

[15] Sheng ZQ, Li YF, Zheng KL, et al. The relationship between number and function of EPCs and concentration of VEGF165 and SDF-1 in coronary artery spasm[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018, 22(9):2767.

[16] 章陈晨, 早期强化降压治疗对急性脑出血患者血清高迁移率蛋白-1 及 C 反应蛋白水平的影响[J]. 临床和实验医学杂志, 2015, 40(11):906-908.

[17] 张皆德, 程道宾, 吕芳, 等. 烟雾病患者血清基质金属蛋白酶-9 和组织基质金属蛋白酶抑制剂-1 的表达以及与颅内出血的关系[J]. 临床神经病学杂志, 2013, 26(4):248-250.

(上接第 1716 页)

T2DM 患者胰岛分泌功能, 在临床治疗上具有一定指导意义。

参考文献

[1] 付鹏, 营在道, 苗婷, 等. 血清 S-100β 和 hs-CRP 水平与老年 2 型糖尿病患者认知功能的相关性研究[J]. 解放军医药杂志, 2018, 30(9):37-40.

[2] 鲁莉, 魏素敏. 2 型糖尿病患者自我管理行为与血糖控制水平的相关性研究[J]. 保健医学研究与实践, 2016, 13(4):67-68.

[3] Min X, Xia HH, Qin LI, et al. Relationship Between Changes of Bone Mineral Density and Serum Levels of 25-hydroxyvitamin D3 in Patients with Rheumatoid Arthritis [J]. Labeled Imm Clin Med, 2018, 22(8):498-499.

[4] 张秀萍, 钟诚. 血清同型半胱氨酸、糖化血红蛋白和尿酸与 2 型糖尿病合并冠心病患者冠状动脉病变的相关性分析[J]. 解放军医药杂志, 2018, 30(3):35-38.

[5] Sha HU, Qian LI, Laboratory C. Serum levels of 25-hydroxyvitamin D3 in patients with diabetic nephropathy [J]. chin J health laborat technol, 2019, 23(7):225-226.

[6] Chiu MC, Bro ET, Yin HL, et al. Serum 25-hydroxyvitamin D3 levels and flares of systemic lupus erythematosus: a longi-

tudinal cohort analysis[J]. Clinical Rheumatology, 2018, 37(9):1-8.

[7] Lu HF, Fan Z, Yu H, et al. Level of 25-hydroxyvitamin D3 and its relation with blood lipid in patients with idiopathic membranous nephropathy[J]. Guangxi Med J, 2019, 22(14):176-177.

[8] Jinmei Z, Siyin LI, Jing Y, et al. Relationship between serum 25-(OH)D3 level and bone mineral density in patients with rheumatoid arthritis [J]. china med herald, 2019, 16(34):137-139.

[9] 童国相, 王莎, 高国应, 等. 肥胖患者血清 Apelin 水平与血糖、血脂和胰岛素抵抗的相关性分析[J]. 临床误诊误治, 2019, 32(24):87-88.

[10] 杨志宏, 张小妮, 王小娟, 等. 血清 25(OH)D3、超敏 C 反应蛋白水平与老年 2 型糖尿病合并骨质疏松的相关性分析[J]. 标记免疫分析与临床, 2019, 26(3):148-151.

[11] Da XX, Xiao Z, Guang FG, et al. Analysis of thyroid hormone and 25-hydroxyvitamin D levels in patients with idiopathic membranous nephropathy [J]. Guangdong Med J, 2019, 31(12):197-198.

[12] 李蓉, 刘倩. 2 型糖尿病和细胞免疫[J]. 中国免疫学杂志, 2010, 26(5):475-475.

AT-Ⅲ活性和NT-proBNP检测联合GRACE评分对NSTE-ACS患者远期预后的评估价值

王丽显^{1*} 柴博兰¹ 杨颖博¹ 王晓伟² 张冬芹³

【摘要】目的 分析抗凝血酶(AT-Ⅲ)、N末端脑钠肽前体(NT-proBNP)检测联合全球急性冠状动脉事件注册(GRACE)评分对非ST段抬高急性冠状动脉综合征(NSTE-ACS)患者远期预后的评估价值。方法 选取2017年1月至2018年1月本院收治的94例NSTE-ACS患者作为NSTE-ACS组,计算所有NSTE-ACS患者GRACE评分,分为三个亚组[低危组($n=39$)、中危组($n=34$)和高危组($n=21$)]。选取同期因疑似冠心病而住院,并经冠状动脉造影证实血管狭窄直径 $<50\%$ 、血流正常且临床资料完整的60例非冠心病者为对照组;比较NSTE-ACS组与对照组AT-Ⅲ活性、NT-proBNP水平差异,采用ROC曲线分析AT-Ⅲ活性、NT-proBNP水平、GRACE评分及三者联合对NSTE-ACS患者预后不良的预测价值,采用Logistic回归分析影响NSTE-ACS患者预后不良的危险因素。**结果** NSTE-ACS组AT-Ⅲ活性低于对照组,LgNT-proBNP水平高于对照组,差异均具有统计学意义($P<0.05$)。NSTE-ACS三个亚组AT-Ⅲ活性比较:低危组 $>$ 中危组 $>$ 高危组,NT-proBNP水平比较:低危组 $<$ 中危组 $<$ 高危组,差异均具有统计学意义($P<0.05$)。截至随访结束,94例NSTE-ACS患者共26例出现MACE,68例未出现MACE,预后不良率为27.66%,分别将其分为MACE组及无MACE组。MACE组、无MACE组年龄、低密度脂蛋白胆固醇、左心室射血分数、AT-Ⅲ活性、LgNT-proBNP水平、GRACE评分及吸烟之间比较差异具有统计学意义($P<0.05$)。左心室射血分数、AT-Ⅲ活性、LgNT-proBNP水平、GRACE评分为影响NSTE-ACS患者出现预后不良的多因素($P<0.05$)。各指标曲线下面积以联合检测最大。**结论** AT-Ⅲ活性、LgNT-proBNP水平、GRACE评分为影响NSTE-ACS患者出现MACE的独立危险因素,联合检测三指标可作为预测患者预后并发MACE的有效手段。

【关键词】 AT-Ⅲ活性; NT-proBNP; GRACE评分; 非ST段抬高急性冠脉综合征; 远期预后

The value of AT-Ⅲ activity, NT-proBNP detection combined with GRACE score in evaluating the long-term prognosis of NSTE-ACS patients

WANG Lixian^{1*}, CHAI Bolan¹, YANG Yingbo¹, WANG Xiaowei², ZHANG Dongqin³

(1. Department of General Medicine, Baoding First Central Hospital, Baoding, Hebei, China, 071028;
2. Department of Internal Medicine-Cardiovascular, Baoding First Central Hospital, Baoding, Hebei, China, 071028; 3. Department of Geriatrics, Baoding First Central Hospital, Baoding, Hebei, China, 071028)

【ABSTRACT】 Objective To analyze evaluation value of antithrombin (Antithrombin-Ⅲ, AT-Ⅲ), N-terminal pro-brain natriuretic peptide (N-terminal pro-brain natriuretic peptide, NT-proBNP) detection combined with the global registry of acute coronary events (GRACE) scores for the long-term prognosis of patients with no-ST-segment alevation acute coronary syndrome (NSTE-ACS). Methods The clinical data of 100

基金项目:保定市科技计划项目(18ZF327)

作者单位:1. 保定市第一中心医院全科医疗一科,河北,保定 071028

2. 保定市第一中心医院心血管内五科,河北,保定 071028

3. 保定市第一中心医院老年病科,河北,保定 071028

*通信作者:王丽显, E-mail:251146759@qq.com

NSTE-ACS patients admitted to our hospital from January 2015 to January 2018 were selected. In the end, 94 patients who met all the inclusion and exclusion criteria were regarded as the NSTE-ACS group, and the GRACS scores of all NSTE-ACS patients were calculated and they were divided into three subgroups [low-risk group ($n=39$), intermediate-risk group ($n=34$) and high-risk group ($n=21$)]. 60 patients with suspected coronary heart disease who were hospitalized for suspected coronary heart disease and confirmed by coronary angiography as the control group were 60 patients with normal blood flow and complete clinical data. The difference in AT-Ⅲ activity and NT-proBNP level between the NSTE-ACS group and the control group was compared, and the ROC curve was used to analyze the AT-Ⅲ activity, NT-proBNP level, GRACE score and the predictive value of the combination of the them for the poor prognosis of NSTE-ACS patients. Logistic regression analysis was used to analyze the risk factors affecting the poor prognosis of NSTE-ACS patients. **Results** The activity of AT-Ⅲ in the NSTE-ACS group was lower than that in the control group, and the level of LgNT-proBNP was higher than that in the control group, differences were statistically significant ($P<0.05$). Comparison of AT-Ⅲ activity in the three subgroups of NSTE-ACS: low-risk group>medium-risk group>high-risk group, NT-proBNP level comparison: low-risk group<medium-risk group<high-risk group, the differences were statistically significant ($P<0.05$). As of the end of the follow-up, a total of 26 cases of 94 NSTE-ACS patients had MACE, 68 cases had no MACE, and the prognosis rate was 27.66%. They were divided into MACE group and MACE-free group. There were statistically significant differences in age, low-density lipoprotein cholesterol, left ventricular ejection fraction, AT-Ⅲ activity, LgNT-proBNP level, GRACE score and smoking between MACE group and MACE-free group ($P<0.05$). Left ventricular ejection fraction, AT-Ⅲ activity, LgNT-proBNP level, GRACE score are the multiple factors that affect the poor prognosis of NSTE-ACS patients ($P<0.05$). The area under the curve of the joint test index is the largest. **Conclusion** The AT-Ⅲ activity and LgNT-proBNP level of NSTE-ACS patients are different from those of patients without coronary heart disease. AT-Ⅲ activity, LgNT-proBNP level and GRACE score are independent risk factors that affect MACE in patients with NSTE-ACS. Combined detection of the three indicators can be used as an effective means to predict the prognostic concurrent MACE of patients.

[KEY WORDS] AT-Ⅲ activity; NT-proBNP; GRACE score; No-ST-segment elevation acute coronary syndrome; Long-term prognosis

非ST段抬高性急性冠状动脉综合征(no-ST-segment elevation acute coronary syndrome, NSTE-ACS)包括不稳定型心绞痛和急性非ST段抬高性心肌梗死,近年来有研究发现,全球急性冠状动脉事件注册(global registry of acute coronary events, GRACE)评分依据临床病理的危险因素进行评分,可有效预测患者治疗期间及之后6个月、1年内主要心血管不良事件(major Adverse cardiovascular events, MACE)发生风险^[1-3]。然而,随着临床实践的开展,发现GRACE评分结果缺乏真实性,故寻求新的危险因子提高GRACE评分对患者预后的准确性成为临床关注重点^[4-5]。近年来,N末端脑钠肽前体(N-terminal pro-brain natriuretic peptide, NT-proBNP)、抗凝血酶(antithrombin-Ⅲ, AT-Ⅲ)与NSTE-ACS的关系也引起临床关注^[6]。本文就AT-Ⅲ活性、NT-proBNP检测联合GRACE评分对NSTE-ACS患者远期预后的评估价值进行探究,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2017年1月至2018年1月本院收治的94例NSTE-ACS患者作为NSTE-ACS组。纳入标准:①符合中华医学会NSTE-ACS诊断标准^[7];②临床资料完整且真实者;排除标准:①既往有心肌梗死、经皮冠状动脉介入治疗或冠状动脉旁路移植术史者;②入院前长期口服他汀类药物者;③未经控制的恶性心律失常者;④甲状腺或肾上腺功能紊乱者;⑤合并急性慢性感染性疾病及恶性肿瘤患者;⑥合并严重肝肾疾病者;⑦合并肺栓塞、下肢静脉血栓等血栓性疾病者。计算所有NSTE-ACS患者GRACS评分,分为低危组($n=39$)、中危组($n=34$)和高危组($n=21$)。

选取同期因疑似冠心病而住院,并经冠状动脉造影证实血管狭窄直径<50%、血流正常且临床资料完整的60例非冠心病者为对照组。NSTE-

ACS组与对照组性别、年龄等一般资料比较差异无统计学意义,具有可比性($P>0.05$)。本研究经医院伦理委员会批准,受试者签署知情同意书。

1.2 研究方法

1.2.1 AT-III活性测定

均于入院后次日抽取所有研究对象空腹静脉血5 mL,离心(3 000 r/min, 15 min)分离血浆,使用日本Sysmex公司生产的Sysmex CA1500自动血凝仪进行检测。

1.2.2 NT-proBNP水平测定

均于入院后次日取所有研究对象空腹静脉血3 mL,离心(3 000 r/min, 10 min)取血清,使用美国罗氏公司Co-bas6000 E601全自动免疫发光分析仪进行检测。并将NT-proBNP转化为符合正态分布的血浆N末端脑钠肽前体的对数值lgNT-proBNP。

1.2.3 GRACE评分计算方法

根据患者年龄、入院时心率、收缩压、肌酐、Killip分级、院前有无心脏骤停、心电图有无ST段偏移及心肌标志物是否增高等8项指标,利用GRACE评分表对入选的NSTE-ACS患者进行风险评估,其评分结果由GRACE评分计算器算出,根据评分结果分为低危患者: ≤ 108 分、中危患者:109~140分、高危患者: >140 分。

1.2.4 其他相关检测指标测定

甘油三酯、高密度脂蛋白胆固醇、总胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇、左心室射血分数等指标与上述指标同时测定。

1.3 随访及预后

随访时间为2年,截止至2020年1月31日。所有研究对象均需完成门诊和电话随访,并调查其第二次住院资料。随访中,如患者有典型胸痛症状或缺血证据,立刻行CAG检查。NSTE-ACS患者预后良好是指在观察终点(12个月)未发生MACE;NSTE-ACS患者预后不良是指在观察期间发生MACE^[8]。

1.4 统计学方法

采用SPSS 18.0软件进行统计分析,计数资料以 $n(\%)$ 表示,两组间比较行 t 检验,多组间比较行 F 检验;计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,行 χ^2 检验;采用ROC曲线分析AT-III活性、NT-proBNP水平、GRACE评分及三者联合对NSTE-ACS患者预后不良的预测价值,采用Logistic回归分析影响NSTE-ACS患者预后不良的危险因素, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 2组患者AT-III活性、LgNT-proBNP水平比较
NSTE-ACS组AT-III活性低于对照组,LgNT-proBNP水平高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表1。

表1 2组患者AT-III活性、LgNT-proBNP水平比较($\bar{x} \pm s$)
Table 1 Comparison of at-III activity and lgnt proBNP level between the 2 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	AT-III (%)	LgNT-proBNP
NSTE-ACS组	94	90.37±13.41	2.83±0.56
对照组	60	96.87±13.85	1.65±0.44
<i>t</i> 值	-	2.896	13.819
<i>P</i> 值	-	0.004	<0.001

2.2 3组AT-III活性、LgNT-proBNP水平比较

三组AT-III活性比较:低危组>中危组>高危组,NT-proBNP水平比较:低危组<中危组<高危组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表2。

表2 3组AT-III活性、LgNT-proBNP水平比较($\bar{x} \pm s$)
Table 2 Comparison of at-III activity and lgnt proBNP level in 3 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	AT-III (%)	LgNT-proBNP
低危组	39	92.31±12.79	1.66±0.73
中危组	34	87.83±11.59	1.88±0.87
高危组	21	84.49±10.26	2.29±0.76
<i>F</i> 值	-	3.21	4.34
<i>P</i> 值	-	0.045	0.016

2.3 94例NSTE-ACS患者预后情况

截至随访结束,94例NSTE-ACS患者共26例出现MACE,预后不良率为27.66%。

2.4 影响NSTE-ACS患者出现预后不良的单因素分析

MACE组与无MACE组年龄、低密度脂蛋白胆固醇、左心室射血分数、AT-III活性、LgNT-proBNP水平、GRACE评分及吸烟之间比较差异具有统计学意义($P<0.05$)。见表3。

2.5 影响NSTE-ACS患者出现预后不良的多因素分析

左心室射血分数、AT-III活性、LgNT-proBNP水平、GRACE评分为影响NSTE-ACS患者出现预后不良的多因素($P<0.05$)。见表4。

2.6 AT-III活性、LgNT-proBNP水平、GRACE评分及三者联合对NSTE-ACS患者预后不良的预测价值

AT-III活性、LgNT-proBNP水平、GRACE评分及三者联合曲线下面积分别为0.883、0.900、0.831、0.997,各指标曲线下面积以联合检测最大。见图1。

表3 影响 NSTEMI-ACS 患者出现预后不良的单因素分析 [n(%), $\bar{x} \pm s$]

Table 3 Univariate analysis of poor prognosis in NSTEMI-ACS patients [n(%), $\bar{x} \pm s$]

因素		MACE组(n=26)	无MACE组(n=68)	χ^2/t 值	P值
性别	男	16(61.54)	40(58.82)	0.058	0.810
	女	10(38.46)	28(41.18)		
年龄(岁)	<60	23(88.46)	27(39.71)	17.957	<0.001
	≥60	3(11.54)	41(60.29)		
BMI(kg/m ²)	>24	12(46.15)	31(45.59)	0.002	0.961
	≤24	14(53.85)	37(54.41)		
高血压病史	有	13(50.00)	36(52.94)	0.065	0.798
	无	13(50.00)	32(47.06)		
糖尿病病史	有	11(42.31)	29(42.65)	0.040	0.841
	无	15(57.69)	36(52.94)		
甘油三酯(mmol/L)		1.64±0.71	1.71±0.69	0.437	0.664
高密度脂蛋白胆固醇(mmol/L)		2.45±0.69	2.37±0.65	0.525	0.601
低密度脂蛋白胆固醇(mmol/L)		1.09±0.53	1.41±0.65	2.240	0.028
总胆固醇(mmol/L)		4.63±1.18	4.71±1.15	0.300	0.765
左心室射血分数(%)		56.47±13.96	63.81±12.58	2.454	0.016
AT-III(%)		86.97±11.59	93.67±12.83	2.324	0.022
LgNT-proBNP		2.17±0.57	1.45±0.39	6.999	<0.001
GRACE评分(分)		145.96±32.36	111.15±27.38	5.239	<0.001
吸烟	是	24(92.31)	27(39.71)	20.969	<0.001
	否	2(7.69)	41(60.29)		

表4 影响 NSTEMI-ACS 患者出现预后不良的多因素分析

Table 4 Multivariate analysis of poor prognosis in NSTEMI-ACS patients

影响因素	回归系数	标准误	Wald χ^2	OR	95%CI	P值
年龄(≥60岁 vs <60岁)	0.794	0.674	4.596	2.21	0.59~8.29	0.489
低密度脂蛋白胆固醇(>3.37 mmol/L vs 2.07~3.37 mmol/L)	0.896	0.973	4.416	2.45	0.36~16.50	0.564
左心室射血分数(<50% vs 50%~70%)	0.734	0.155	4.268	2.08	1.54~2.82	<0.001
AT-III活性(正常 vs 异常降低)	0.812	0.158	4.165	2.25	1.65~3.07	<0.001
LgNT-proBNP水平(正常 vs 异常升高)	0.881	0.135	4.269	2.41	1.85~3.14	<0.001
GRACE评分(正常 vs 异常降低)	0.867	0.148	4.378	2.38	1.78~3.18	<0.001
吸烟(是 vs 否)	0.753	0.894	4.324	2.12	0.37~12.25	0.451

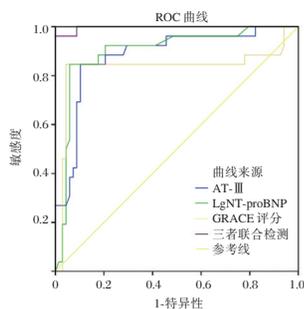


图1 AT-III活性、LgNT-proBNP水平、GRACE评分及三者联合对 NSTEMI-ACS 患者预后不良的预测价值
Figure 1 The predictive value of at-III activity, lgnt proBNP level, grace score and their combination on poor prognosis of NSTEMI-ACS patients

3 讨论

NSTEMI-ACS 作为一种复杂的多因素疾病,是获得性和遗传性的危险因素均参与的疾病^[9-10]。自

Framingham 心脏研究首次提出心血管疾病的危险因素,各种 ACS 危险评分系统相继出现,其中就包含 GRACE 评分系统^[11-12]。研究显示,GRACE 评分可准确预测 ACS 患者院内及远期发生 MACE 的几率,对预测远期死亡率也有一定价值^[13]。

NSTEMI-ACS 常由动脉粥样硬化斑块破裂、血小板粘附聚集、凝血因子激活和血栓形成引起的冠状动脉不完全阻塞所致^[14]。正常情况下,凝血和纤溶系统处于动态平衡状态,对体内血液经常保持液体状态与管道畅通起着重要的作用^[15]。当机体处于高凝状态时,血栓形成的几率大大增加。而 AT-III 则是人体血浆生理性抑制物中重要的抗凝物,即可抑制凝血酶,又可抑制其他凝血因子的活性,从而发挥抗凝作用。Kolluri 等^[16]研究发现 NSTEMI-ACS 患者体内 AT-III 活性较非冠心病人群偏低,且在中高危人群 AT-III 活性下降更为明显,这与本研究结

果相似,说明随着冠状动脉病变加重,机体内 AT-III 消耗越多。

BNP 是由心肌细胞合成的具有生物学活性的天然激素,故血浆 NT-proBNP 主要来源为心肌细胞。研究发现,NT-proBNP 不仅具有排钠、利尿、舒张血管的作用,还可拮抗肾素-血管紧张素-醛固酮系统和交感神经系统,在 ACS 病程中发挥重要作用^[17-18]。此外,近年来研究发现,NT-proBNP 对于患者心脏 MACE 事件的预测价值与现有各种风险模型指标相似,例如:年龄、心率、心电图是否有 ST 段压低、心肌酶是否升高等。本研究发现,这与本研究结果相似,证明了其与 NT-proBNP 患者病情发展关系密切。

Logistic 回归分析结果显示发现 AT-III 活性、LgNT-proBNP 水平、GRACE 评分对 NSTEMI-ACS 患者发生 MACE 具有良好的预测价值;而 ROC 曲线分析则进一步提示联合检测三指标可作为预测患者预后并发 MACE 的有效手段。

综上,NSTEMI-ACS 患者 AT-III 活性、LgNT-proBNP 水平异于非冠心病人群;AT-III 活性、LgNT-proBNP 水平、GRACE 评分为影响 NSTEMI-ACS 患者出现 MACE 的独立危险因素,联合检测三指标可作为预测患者预后并发 MACE 的有效手段。

参考文献

- [1] 李凡, 马臻, 王建辉, 等. 高血压对急性 ST 段抬高型心肌梗死经皮冠状动脉介入近期预后的影响[J]. 解放军医药杂志, 2017, 29(11):47-49.
- [2] Yanjun Z, Huarong W, Fuli L I, et al. The predictive significance of LVEF and NT-proBNP in early prognosis assess of Untypical NSTEMI-ACS [J]. J Pract Medic, 2017, 31 (34) : 1651-1654.
- [3] Farhan S, Clare RM, Jarai R, et al. Fasting glucose, NT-proBNP, treatment with eptifibatide, and outcomes in non-ST-segment elevation acute coronary syndromes: An analysis from EARLY ACS[J]. Int J Cardiol, 2017, 23(32):264-270.
- [4] Xu TD, Chen C, Li DY, et al. Predictive significance of antithrombin III and fibrinogen in patients with non-ST segment-elevation acute coronary syndrome[J]. China J Modern Med, 2018, 35(16):1754-1759.
- [5] Rupperecht HJ, Geeren M, Geeren M, et al. Akutes Koronarsyndrom ohne ST-Hebung (NSTEMI-ACS) [Acute coronary syndrome without ST-elevation (NSTEMI-ACS)]. Herz, 2019, 44(1):10-15.
- [5] Rupperecht HJ, Geeren M, Geeren M, et al. [Acute coronary syndrome without ST-elevation (NSTEMI-ACS)] [J]. Herz, 2019, 44(1):10-16.
- [6] Boukerche F, Aoumeur H, Laredj N, et al. Prognostic value of the SYNTAX and residual SYNTAX Scores in NSTEMI-ACS [J]. Archives Cardiovascular Dis Supplements, 2020, 31 (34):1467-1469.
- [7] Huynh K. Clopidogrel is a favourable alternative to ticagrelor in older patients with NSTEMI-ACS [J]. Nature Rev Cardiol, 2020, 17(7):384.
- [8] 颜文婷, 徐海燕, 魏忠诚. 老年冠心病患者血清 VEGF、NT-proBNP、cTnT 与冠状动脉病变程度的相关性[J]. 医学分子生物学杂志, 2017, 14(2):96-99.
- [9] 宋威, 张智菲. 伴低三碘甲状腺原氨酸综合征急性心肌梗死患者临床特征及急性心肌梗死预后影响因素分析[J]. 临床误诊误治, 2017, 30(8):60-64.
- [10] 吴威, 衣欣, 蒙奕兵, 等. 膜联蛋白 A1, sd-LDL, Angptl2 与冠心病及对冠状动脉粥样硬化病变程度的诊断价值 [J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(1):84-88, 98.
- [11] Yang Q, Wang Y, Liu J, et al. Invasive Management Strategies and Antithrombotic Treatments in Patients With Non-ST-Segment-Elevation Acute Coronary Syndrome in China: Findings From the Improving CCC Project [J]. J Am Coll Cardiol, 2017, 69(11):135-137.
- [12] Fang JX, Siu CW, Tse HF, et al. USE OF A CHECKLIST TO IMPROVE COMPLIANCE TO TREATMENT GUIDELINES AND PATIENT OUTCOMES IN NSTEMI-ACS [J]. J Am Coll Cardiol, 2019, 73(9):226-228.
- [13] Gangnus T, Suessenbach FK, Makowski N, et al. P37 Reference ranges of blood NT-proBNP in paediatric heart failure and healthy controls: compilation of literature data [J]. Archives Dis in Childhood, 2019, 104(6):32-38.
- [14] George T, Ari GC, Rajaratnam S. Evaluation of NT-ProBNP as a marker of the volume status of neurosurgical patients developing hyponatremia and natriuresis: A pilot study [J]. Neuro Ind, 2018, 79(6):456-458.
- [15] Lemor A, Hernandez G, Blumer V, et al. RATES OF RE-ADMISSION HAVE DECREASED FOR STE - ACS AND NSTEMI-ACS WHO UNDERWENT PCI FROM 2010 TO 2014 [J]. J Am Coll Cardiol, 2018, 71(11):1160-1163.
- [16] Kolluri N, Rosenbaum A, Schmidt T, et al. Troponin-T, NT-proBNP, and Serum Creatinine at Presentation Predict Outcomes in Patients with Cardiac Sarcoidosis [J]. J Card Failure, 2019, 25(8):S22-S23.
- [17] Boehmer JP, Nair DG, Wen G, et al. HeartLogic Performs as Well as NT-proBNP to Rule out Acute Heart Failure at Point of Care [J]. J Card Failure, 2019, 25(8):17-18.
- [18] Park SJ, Cho EJ, Ahn J, et al. Additive prognostic values of NT-proBNP and exercise stress echocardiography in asymptomatic patients with degenerative mitral regurgitation and preserved left ventricular ejection fraction [J]. Int J Cardiol, 2017, 236(46):387-392.

白内障患者NOS、DPP及TFAR19蛋白的表达及临床意义

张红振¹ 王二丽² 朱乐如^{3*}

[摘要] **目的** 分析白内障患者一氧化氮合酶(NOS)、二肽基肽酶(DPP)及凋亡相关蛋白19(TFAR19)的表达及临床意义。**方法** 选取2017年5月至2018年5月本院收治的64例白内障患者作为观察组,以患者病变周围巩膜正常组织为对照组。对比观察组与对照组NOS水平及DPP、TFAR19表达情况,分析NOS、DPP、TFAR19的表达与白内障患者临床特征的关系,采用Logistic回归模型分析影响患者术后视力预后的独立危险因素。**结果** 观察组NOS水平高于对照组,DPP及TFAR19阳性表达率显著高于对照组,差异均具有统计学意义($P<0.05$)。NOS、DPP及TFAR19的表达与白内障患者年龄呈显著正相关($P<0.05$),与患者性别、不同类型、合并糖尿病、合并高血压之间无显著相关性($P>0.05$)。性别、不同类型、合并高血压为非影响白内障患者术后视力预后的单因素($P>0.05$);年龄、合并糖尿病、NOS、DPP、TFAR19为影响患者术后矫正视力预后的单因素($P<0.05$)。选取有条件的单因素经非条件多因素Logistic回归模型进一步分析,得出:年龄(≥ 65 岁)、NOS表达(高水平)、DPP表达(阳性)、TFAR19表达(阳性)影响白内障患者术后视力预后的独立危险因素($P<0.05$)。**结论** NOS、DPP、TFAR19在白内障患者中呈高表达,NOS、DPP、TFAR19的表达与患者年龄之间有密切联系,上述指标表达过高会影响患者手术矫正视力预后。

[关键词] 白内障;一氧化氮合酶;二肽基肽酶;TFAR19蛋白

Expression and clinical significance of NOS, DPP and TFAR19 in patients with cataract

ZHANG Hongzhen¹, WANG Erli², ZHU Leru^{3*}

(1. Department of Ophthalmology, the First People's Hospital of Aksu, Aksu, Xinjiang, China, 843000;
2. Department of Ophthalmology, People's Hospital of Zepu County, Kashgar, Xinjiang, China, 844800;
3. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou, Zhejiang, China, 325000)

[ABSTRACT] **Objective** To analyze the expression and clinical significance of nitric oxide synthase (NOS), dipeptidyl peptidase (DPP) and Apoptosis-associated protein 19 (TFAR19) in patients with cataract. **Methods** 64 patients with cataracts admitted to our hospital from May 2017 to May 2018 were selected as the observation group, and the normal sclera tissue around the disease was selected as the control group. The NOS level and the expression of DPP and TFAR19 between the observation group and the control group were compared, and the relationship between the expression of NOS, DPP, and TFAR19 and the clinical characteristics of cataract patients was analyzed. Logistic regression model was used to analyze the independent risk factors that

基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金资助项目(2017x215)

作者单位:1. 新疆阿克苏地区第一人民医院眼科,新疆,阿克苏 843000

2. 新疆泽普县人民医院眼科,新疆,喀什 844800

3. 浙江省温州医科大学附属第一医院眼科,浙江,温州 325000

*通信作者:朱乐如, E-mail:chuangze628797@163.com

affect the prognosis of postoperative visual acuity of patients. **Results** The NOS level of the observation group was higher than that of the healthy group, and the positive expression rate of DPP and TFAR19 was significantly higher than that of the control group ($P<0.05$). The expression of NOS, DPP and TFAR19 was closely related to the age of patients with cataract ($P<0.05$), and was no significant correlation with the gender, different types, combined diabetes, and high blood pressure ($P>0.05$). Gender, different types, and combined hypertension are not the single factors that affect the prognosis of postoperative vision in patients with cataract ($P>0.05$). Age, combined diabetes, NOS, DPP, and TFAR19 are the single factors affecting the prognosis of patients with postoperative corrected vision ($P<0.05$). The conditional single factor was selected and further analyzed by the unconditional multivariate logistic regression model, and it showed that age (≥ 65 years), NOS expression (high level), DPP expression (positive), TFAR19 expression (positive) affects are independent risk factors that affect the prognosis of postoperative vision in patients with cataract ($P<0.05$). **Conclusion** NOS, DPP, and TFAR19 are highly expressed in patients with cataract. The expression of NOS, DPP, and TFAR19 is closely related to the patient's age. Excessive expression of the above indicators will affect the prognosis of corrected visual acuity after surgery of patients.

[KEY WORDS] Cataract; Nitric oxide synthase; Dipeptidyl peptidase; TFAR19 protein

白内障为世界致盲疾病之首,随着我国人口老龄化加剧,白内障患病率逐年升高。如何防治白内障,保护白内障患者视力成为眼科医生研究的热点。既往研究表明,自由基氧化损伤会加重晶状体氧化损伤程度,但其对白内障患者影响的相关研究结果尚未完善^[1-2]。二肽基肽酶(DIPEPTIDYL peptidase, DPP)在细胞死亡及蛋白降解中发挥重要作用,有学者研究指出先天性白内障大鼠晶状体中DPP的表达会明显高于正常对照组大鼠,且晶状体浑浊程度更高^[3]。凋亡相关蛋白19(apoptosis-associated protein19, TFAR19)已被较多学者证实与细胞凋亡关系密切,但其与白内障发病机制之间的关系鲜有报道^[4-5]。本研究将深入探讨白内障患者外周血中NOS、DPP及TFAR19蛋白的表达情况及临床意义,为临床诊治白内障提供理论依据。现研究报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2017年5月至2018年5月本院收治的64例白内障患者的临床资料进行整理、分析。纳入标准:①均为初次确诊为白内障的患者,年龄在52~78岁之间;②纳入研究之前未进行白内障摘除术或其他药物治疗;③均在入院后行白内障囊外摘除术。排除标准:①合并青光眼、高度近视、眼外伤等其他眼部疾病者;②代谢性白内障、过熟期白内障患者;③糖尿病病程长达5年的患者;④精神障碍无法配合治疗者。

根据纳入排除标准,本研究最终纳入符合标准的64例白内障患者设为观察组。其中男38例,女26例;平均年龄(60.41 ± 2.58)岁;皮质性白内障26例,核性白内障20例,后囊下性白内障18例,健康组中男34例,女30例,平均年龄(60.21 ± 2.47)岁。另选上述患者除去病变部位外的正常组织为对照组。本研究经本院医学伦理委员会批准,患者知情并签署同意书。

1.2 方法

两组均于入院或次日清晨空腹抽取静脉血4 mL,4℃保存,自然凝固后以3 000 r/min离心10 min,分离血清标本,-20℃冰箱保存备用。以酶联免疫吸附法检测血清中NOS水平。试剂盒由上海莱食物科技有限公司提供,检测仪器为美国产的ELX808酶标仪。

以免疫组化化学SP染色测定DPP、TFAR19蛋白水平,兔抗人多克隆抗体DPP及TFAR19由美国Beckman Coulter公司提供。将摘除眼球后极部巩膜组织常规石蜡切片,梯度水化,抑制内源性过氧化物酶修复,4℃室温孵育过夜,PBS洗涤,滴加辣根过氧化物酶标记物,PBS洗涤,DAB显色,苏木精复染,乙醇脱水,二甲苯透明,中性树脂胶封固。显微镜下观察DPP、TFAR19。

1.3 判断标准

DPP及TFAR19蛋白阳性判断标准^[6]:肿瘤细胞胞质或细胞核中出现棕黄色或棕褐色颗粒。阳性细胞占比:0分(无阳性,无色);小于30.00%(1分,淡黄色);大于等于30.00%(2分,棕黄色),3分

(棕褐色)。阳性细胞所占百分比小于26%为1分,阳性细胞所占百分比26%~50%为2分,阳性细胞所占百分比51%~75%为3分,阳性细胞壁大于75%为4分;根据两者相乘结果进行评判:小于3分(-)、3分(+)、4分(++)、5分(+++)。阳性率=阳性例数/总例数×100%。

1.4 观察指标

①对比观察组与对照组血清 NOS 水平及 DPP、TFAR19 蛋白表达情况,并分析白内障组 NOS、DPP、TFAR19 的表达与患者临床特征之间的关系。②观察患者术后视力恢复情况,以术后3个月视力结果为标准,依据视功能问卷(visual function, VF)^[7]评估患者术后视力恢复情况。该问卷包括主观视觉、周边视野、视觉适应、立体视觉4个指征,依据患者主观感觉从无困难到严重困难分为4

级,得分1~4分,总分0~100分。视力正常或接近正常:VF评分大于等于60分;视力损伤:VF评分在60分以下。

1.5 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;影响患者视力预后的相关因素采用非条件单因素和多因素 Logistic 回归分析;以 *P*<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

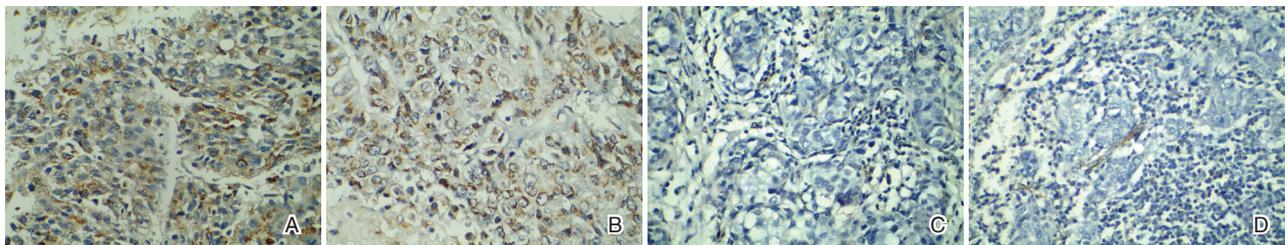
2.1 NOS、DPP 及 TFAR19 在两组中的表达情况比较

观察组 NOS 水平、DPP 及 TFAR19 阳性表达率明显高于对照组,差异有统计学意义(*P*<0.05)。见表1、图1。

表1 NOS、DPP 及 TFAR19 在两组中的表达情况 [(*n*)%, ($\bar{x} \pm s$)]

Table 1 Comparison the expressions of NOS, DPP and TFAR19 in the two groups [(*n*)%, ($\bar{x} \pm s$)]

组别	<i>n</i>	NOS(ng/mL)	DPP		TFAR19	
			阳性	阴性	阳性	阴性
观察组	64	1.58±0.30	46(71.88)	18(28.12)	40(62.50)	24(37.50)
对照组	64	1.23±0.22	14(21.87)	50(78.13)	18(28.12)	46(71.88)
<i>t</i> / χ^2 值		7.526		32.125		15.259
<i>P</i> 值		0.001		0.001		0.001



注:A:观察组 TFAR19 阳性表达;B:观察组 DPP 阳性表达;C:观察组 TFAR19 阴性表达;D:观察组 DPP 阴性表达。

图1 免疫组化染色图(SP,×500)

Figure 1 Immunohistochemical staining (SP,×500)

2.2 NOS、DPP 及 TFAR19 表达与白内障患者临床特征的相关性

NOS、DPP 及 TFAR19 的表达与白内障患者年龄呈显著正相关(*P*<0.05),与患者性别、不同类型、

合并糖尿病、合并高血压之间无显著相关性(*P*>0.05)。见表2。

2.3 影响白内障患者术后矫正视力预后的单因素分析

通过分析影响白内障患者术后矫正视力预

表2 NOS、DPP 及 TFAR19 表达与白内障患者临床特征的相关性

Table 2 Correlation between expression of NOS, DPP and TFAR19 and clinical features of cataract patients

影响因素	回归系数	标准误	Wald/ χ^2	RR	95%CI	<i>P</i> 值
年龄(≥65岁 vs <65岁)	1.238	0.578	9.567	3.449	1.111~107	0.028
合并糖尿病(是 vs 否)	0.987	0.757	4.120	2.683	0.609~11.831	0.667
NOS 表达(高水平 vs 低水平)	1.149	0.453	10.257	3.155	1.9998~4.983	0.010
DPP 表达(阳性 vs 阴性)	1.201	0.439	10.685	3.643	1.406~7.857	0.005
TFAR19 表达(阳性 vs 阴性)	1.230	0.561	9.104	3.421	1.139~10.273	0.034

后的单因素,发现:性别、不同类型、合并高血压为非影响白内障患者术后视力预后的单因素($P>0.05$);年龄、合并糖尿病、NOS、DPP、TFAR19为影响患者术后矫正视力预后的单因素($P<0.05$)。见表3。

表3 影响白内障患者术后矫正视力预后的单因素分析
Table 3 univariate analysis on the prognosis of postoperative corrected visual acuity in cataract patients

因素	n	视力正常或		χ^2 值	P值
		接近正常 (n=30)	视力 损伤 (n=34)		
性别	男	38	16	0.855	0.355
	女	23	14		
年龄	≥ 65	34	10	8.883	0.003
	< 65	30	20		
不同类型	皮质性	26	10	3.439	0.064
	核性	20	11		
	后囊下性	18	9		
合并糖尿病	是	36	10	12.051	0.001
	否	28	20		
合并高血压	是	30	14	0.001	0.975
	否	34	16		
NOS表达	高水平	44	12	21.726	0.001
	低水平	20	18		
DPP表达	阳性	46	16	9.604	0.002
	阴性	18	14		
TFAR19表达	阳性	40	6	19.078	0.001
	阴性	24	18		

2.4 影响白内障患者术后视力预后的多因素分析

选取有条件的单因素经非条件多因素 Logistic 回归模型进一步分析,得出:年龄(≥ 65 岁)、NOS表达(高水平)、DPP表达(阳性)、TFAR19表达(阳性)影响白内障患者术后视力预后的独立危险因素($P<0.05$)。见表4。

表4 影响白内障患者术后视力预后的多因素分析

Table 4 multivariate analysis of visual acuity prognosis in cataract patients

病理参数	n	NOS				DPP				TFAR19				
		高水平 (n=44)	低水平 (n=20)	χ^2 值	P值	阳性 (n=46)	阴性 (n=18)	χ^2 值	P值	阳性 (n=40)	阴性 (n=24)	χ^2 值	P值	
年龄(岁)	≥ 65	34	30	4	12.818	0.001	30	4	9.604	0.002	30	4	20.497	0.001
	< 65	30	14	16			16	14			10	20		
性别(例)	男	38	26	12	0.005	0.945	28	10	0.151	0.697	24	14	0.017	0.895
	女	26	18	8			18	8			16	10		
不同类型	皮质性	26	16	10	1.939	0.164	14	12	0.051	0.822	14	12	1.399	0.237
	核性	20	14	6			18	2			12	8		
	后囊下性	18	14	4			14	4			14	4		
合并糖尿病	是	36	24	12	0.166	0.683	28	8	1.418	0.234	20	18	2.386	0.122
	否	28	20	8			18	10			20	8		
合并高血压	是	30	22	8	0.552	0.457	20	10	0.022	0.883	18	12	0.151	0.698
	否	34	22	12			26	8			22	12		

3 讨论

白内障为老化、遗传、环境等因素引起的晶状体代谢紊乱,晶状体蛋白变形而变浑浊,严重影响患者的视力,该病的发生及发展的确切机制至今尚未明确。相关研究结果表明,白内障的发生与晶状体氧化损伤之间联系密切,其中以自由基对晶状体的损伤最为严重^[8]。但由于直接检测患者机体内的自由基较为困难,NOS为促进自由基合成的限速酶,临床多采用检测NOS来间接反映自由基含量^[9]。本研究采用酶联免疫吸附法测定血清中NOS,并使用免疫组化化学染色的方法检测DPP、TFAR19,分析其与患者临床特征及术后视力预后之间的关系。

有学者研究报道NOS在眼部脉络膜、睫状体、视网膜等各个组织均有表达,但正常生理情况下呈低表达状态^[10]。本研究结果显示,观察组NOS水平高于对照组,DPP及TFAR19阳性表达率明显高于对照组,这一研究结果与既往文献报道结果相似^[11]。既往文献报道,白内障患者晶状体中的NOS表达会高于无眼部疾病者^[12]。NOS参与正常生理状态下自由基的合成,在机体处于病理状态时,可受内毒素、白细胞介素-1等介质刺激,产生大量一氧化氮合酶,生成过量的自由基并发挥细胞毒效应^[13]。本研究结果进一步证实,白内障患者NOS的过度表达与白内障病变相关。DPP是定位于囊泡系统的细胞内容酶体蛋白酶,早期有学者报道,从猪、大鼠等动物的晶状体中检测出DPP^[14]。Herman等^[15]指出,DPP存在于啮齿动物的晶状体中。XU等^[16]采用免疫组化染色法,检测

到DPP存在有睫状体无色素上皮细胞、晶状体上皮细胞、晶状体纤维层等结构中,由此推测DPP的表达与白内障的发生有关。TFAR19是最早由北京大学发现的一种与细胞凋亡关系密切的蛋白质,存在于人体50多种组织,是参与细胞凋亡和抑制细胞生长过程的重要蛋白质。

本研究通过分析NOS、DPP、TFAR19与患者临床特征的关系,发现年龄与白内障患者上述指标的表达有显著相关性。考虑为年纪越大的患者机体老化程度加速及局部营养障碍严重,会加大白内障的发生几率,从而刺激NOS、DPP、TFAR19表达。但由于本研究已排除合并糖尿病病程长达五年的患者,因此在本研究中合并糖尿病仅为影响白内障患者手术矫正视力预后的单因素而非独立危险因素,代谢性疾病对白内障患者术后视力预后的影响还有待进一步深入研究。

综上所述,NOS、DPP、TFAR19在白内障患者中呈高表达,NOS、DPP、TFAR19表达与患者年龄有密切联系,上述指标表达过高会影响患者手术矫正视力预后。但由于本研究纳入样本量较少,且未进行其前瞻性研究,实验结果难免存在偏倚,相关指标的表达与白内障发生、进展及预后的关系尚需进一步研究。

参考文献

- [1] 张凌,崔光淑,郭启煜,等.临床较少见的真性糖尿病性白内障一例报告[J].临床误诊误治,2017,30(12):34-36.
- [2] 高玉敬,张爽,洪云,等.手法小切口白内障摘除手术治疗白内障的效果及对泪膜功能和视神经纤维层的影响[J].解放军医药杂志,2019,31(10):7-12.
- [3] Ellen HK, Luis JH, Namita B, et al. Cataracts induced by neodymium-yttrium-aluminium-garnet laser lysis of vitreous floaters[J]. British J Ophthalmol, 2017, 101(6):709-711.
- [4] Soon-Phaik C, Melissa HYW, Aliza J. Management of Severely Subluxated Cataracts Using Femtosecond Laser-Assisted Cataract Surgery[J]. Am J Ophthalmol Int J Ophthalmol, 2017, 173:7-15.
- [5] Jiaox X, Khan SY, Irum B, et al. Missense Mutations in CRYAB Are Liable for Recessive Congenital Cataracts [J]. Plos One, 2017, 12(1):e0171403.
- [6] Long E, Lin H, Liu Z, et al. An artificial intelligence platform for the multihospital collaborative management of congenital cataracts[J]. Nature Biom Engineering, 2017, 1(2):24.
- [7] Jingyan L, Yunji L, Shirui H, et al. Clinical and genetic characteristics of Chinese patients with familial or sporadic pediatric cataract[J]. Orphanet J Rare Dis, 2018, 13(1):94.
- [8] Yoshikawa T, Obayashi K, Miyata K, et al. Cataracts and Subclinical Carotid Atherosclerosis in Older Adults -A Cross-Sectional Study of the HEIJO-KYO Cohort [J]. Circulat J, 2019, 83(10):2044-2048
- [9] Maddirala Y, Tobwala S, Karacal H, et al. Prevention and reversal of selenite-induced cataracts by N-acetylcysteine amide in Wistar rats[J]. BMC Ophthalmol, 2017, 17(1):54.
- [10] Gimbel HV, Leclair BM, Jabo B, et al. Incidence of Implantable Collamer Lens - induced Cataract [J]. Canadian J Ophthalmol, 2018, 53(5):518-522.
- [11] Kazi GQ, Phillips CI, Lambie AT, et al. Hypocalcaemic cataract as a presenting symptom of renal insufficiency[J]. Postgraduate med J, 1984, 35(6):166-167.
- [12] Anand D, Agrawal SA, Slavotinek A, et al. Mutation update of transcription factor genes FOXE3, HSF4, MAF, and PITX3 causing cataracts and other developmental ocular defects[J]. Human Mutat, 2018, 39(4):471-494.
- [13] Zhu Y, Chen X, Chen P, et al. Lens capsule-related complications of femtosecond laser-assisted capsulotomy versus manual capsulorhexis for white cataracts[J]. J Cataract Refractive Surgery, 2019, 45(3):337-342.
- [14] Blanco S, Hernández R, Franchelli G, et al. Melatonin influences NO/NOS pathway and reduces oxidative and nitrosative stress in a model of hypoxic-ischemic brain damage[J]. Nitric Oxide, 2017, 62:32-43.
- [15] Herman BC, Clough MP, Olson JK. Pedagogical Reflections by Secondary Science Teachers at Different NOS Implementation Levels[J]. Res ence Educat, 2017, 47(1):161-184.
- [16] 许亚辉,吴佳佳,严志祎,等.逍遥散对慢性应激抑郁大鼠海马一氧化氮合酶表达的影响[J].中华中医药杂志, 2019, 23(19):587.

早期血液灌流在急性百草枯中毒患者中的应用效果观察

焦文明 高永霞* 胡德亮

[摘要] **目的** 探究早期血液灌流对急性百草枯中毒患者血清肌酐(CREA)、尿酸(UA)、总胆红素(TBIL)及血清炎症因子水平的影响。**方法** 2015年7月至2020年7月本院收治急性百草枯中毒患者102例,非同期队列研究法分为对照组(采用综合救治方案治疗)、观察组(于对照组基础上联合早期血液灌流治疗)各51例。比较两组疗效,观察治疗前后肝肾功能指标[血清肌酐(CREA)、总胆红素(TBIL)、血清尿酸(UA)]、血清炎症因子[降钙素原(PCT)、超敏C反应蛋白(hsCRP)]变化,随访两组7d病死率及治疗前后序贯器官衰竭评分(SOFA)。**结果** 观察组治疗后总有效率明显高于对照组($P<0.05$)。与同组治疗前比较,治疗后两组CREA、UA、TBIL、PCT、hsCRP明显降低,且观察组低于对照组($P<0.05$)。观察组7d病死率明显于对照组($P<0.05$),治疗后第2、3、4天观察组SOFA评分明显低于对照组($P<0.05$)。**结论** 早期血液灌流可有效提高急性百草枯中毒患者的临床治疗效果,对减轻肝肾功能损害和炎症因子水平、降低短期病死率和改善预后等方面有明显作用,或可作为急性百草枯中毒患者有效救治手段。

[关键词] 急性百草枯中毒;早期血液灌流;CREA;UA;TBIL;炎症因子

Application effect of early hemoperfusion in patients with acute paraquat poisoning

JIAO Wenming, GAO Yongxia*, HU Deliang

(Emergency ICU, The First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University/ Jiangsu Province Hospital, Nanjing, Jiangsu, China, 210029)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the effects of early hemoperfusion on serum levels of creatinine (CREA), uric acid (UA), total bilirubin (TBIL) and inflammatory factors in patients with acute paraquat poisoning. **Methods** Between July 2015 and July 2020, 102 patients with acute paraquat poisoning were selected and divided into the control group (comprehensive treatment plan) and the observation group (early hemoperfusion based on the treatment of control group) by random number table method, 51 cases in each group. Therapeutic effects of the two groups were compared. Liver and kidney function indexes (CREA, TBIL, UA) and serum inflammatory factors [Procalcitonin (PCT), high sensitivity C-reactive protein (hsCRP)] in both groups were observed before and after treatment. The 7-day mortality rates and sequential organ failure assessment (SOFA) scores of the two groups were recorded. **Results** The total response rate in the observation group was significantly higher than that in the control group ($P<0.05$). After treatment, CREA, UA, TBIL, PCT and hsCRP in both groups were significantly reduced, which were significantly lower in the observation group than in the control group ($P<0.05$). The 7-day mortality rate in the observation group was significantly lower than that in the control group ($P<0.05$), and the SOFA scores were significantly lower than those of the control group on

基金项目:江苏省自然科学基金(BK2018517)

作者单位:南京医科大学第一附属医院江苏省人民医院急诊ICU,江苏,南京 210029

*通信作者:高永霞, E-mail:1821806943@qq.com

the 2nd, 3rd and 4th day after treatment ($P<0.05$). **Conclusion** Early hemoperfusion can effectively improve the clinical effects of treatment for patients with acute paraquat poisoning. It has a significant effect on reducing liver and kidney damage and inflammatory factor levels, reducing short-term mortality and improving prognosis. It is expected to be an effective treatment for patients with acute paraquat poisoning.

[KEY WORDS] Acute paraquat poisoning; Early hemoperfusion; CREA; UA; TBIL; Inflammatory factor

百草枯为全球范围内第二大类除草剂,其可于短期内致使患者多脏器功能障碍,多脏器损害伴微循环障碍是引发患者早期死亡的重要因素^[1]。百草枯中毒病死率在45%~90%,口服患者病死率>90%^[2]。急性百草枯中毒患者病情凶险、进展快速,目前尚无特效解毒剂^[3]。急性百草枯中毒患者常涉及肝肾功能损害和炎症反应,血清肌酐(creatinine, CREA)、尿酸(uric acid, UA)、总胆红素(total bilirubin, TBIL)为临床常见肝肾功能指标;降钙素原(procalcitonin, PCT)、超敏C反应蛋白(high sensitivity C-reactive protein, hsCRP)是导致机体损伤的重要炎性介质。血液灌流可吸附并清除体内农药已在国内达成共识^[4]。研究显示,血液灌流可降低急性百草枯中毒患者的病死率并改善患者预后^[5]。但关于早期血液灌流对急性百草枯中毒患者CREA、UA、TBIL及血清炎症因子水平的影响尚无统一定论,为此本文展开临床对照性研究,结果报告如下:

1 资料与方法

1.1 一般资料

2015年7月至2020年7月医院收治急性百草枯中毒患者102例。纳入标准:有患者本人或其他知情者证实百草枯口服病史,服毒至入院时间<12h;患者家属签署书面知情同意书;排除标准:妊娠期或哺乳期妇女;合并重要脏器功能障碍;伴其他物质中毒;合并恶性肿瘤;严重精神疾病;合并代谢性疾病;文盲。随机数字表法分为对照组、观察组各51例。对照组男23例、女28例,平均(39.24±4.06)岁,服毒至入院时间平均(4.16±1.34)h,百草枯口服剂量10~45平均(22.20±2.87)mL;观察组男24例、女27例,平均年龄(39.68±4.08)岁,服毒至入院时间2~9h,平均(4.121±1.38)h,百草枯口服剂量10~42 mL,平均(22.69±2.99)mL;两组一般资料比较差异无统计学意义($P>0.05$)。本研究征得本院医学伦理委员会批准。

1.2 研究方法

1.2.1 对照组

接受综合救治方案治疗,包含洗胃、导泻和补液利尿、抗感染、维持电解质酸碱平衡、维生素C及对症支持治疗等。

1.2.2 观察组

在对照组基础上联合早期血液灌流治疗,一次性树脂血液灌流器(型号为HA-330,珠海健帆生物科技股份有限公司)行血液灌流治疗。开机进入自检模式,选血液灌流模式,管路安装后,与原连续性静脉-静脉血液透析滤过模式相同,将灌流器内原液丢弃、连接灌流器动静脉端,将废液短管连接至静脉端,打开夹子,置换液管连接在滤器前端,与连续性静脉-静脉血液透析滤过模式保持一致,将静脉端连接Y形管与预充液相连,置换液绿色端则连接一袋置换液,废液端连接废液袋,而后选择抗凝模式,选择无抗凝模式,手动推肝素,进入预冲模式,9 min预冲模式后、再按预冲模式,按血液回路按键反复预冲,按要求预冲完毕。预冲顺序:管路连接后500 mL 5%葡萄糖溶液预冲管路;3 000 mL 0.9%氯化钠+100 mg 肝素钠预冲管路,流速设置为150 mL/min;500 mL 0.9%氯化钠、100 mg 肝素钠预冲管路,流速设置为100 mL/min;连接管路动、静脉端,闭路循环18 min,流速设置为50 mL/min,经中心静脉置管为患者注射0.6 mL(6 000 U)低分子肝素钙(首次、第2次、第3次、第4次分别注射6 000、4 000、2 000、0 U);500 mL 0.9%氯化钠溶液冲洗管路后,连接血液灌流器和中心静脉插管,血流速度由150 mL/min递增,血流速度上限200 mL/min,灌流时间120 min/次,前两天2次/天,第三天开始1次/天,共进行7次。

1.3 分析指标

1.3.1 疗效评估^[6]

显效:临床症状、体征消失,X线胸片检查(肺部无渗出影,密度均匀,无肺实变影,无肺纤维化),血气分析患者血氧饱和度正常,实验室检查患者血液生化指标正常。有效:临床症状有所改善,但仍伴随

轻微呼吸道症状, X线胸片检查存在肺间质变化, 血氧饱和度基本正常, 生化指标无异常。无效: 未达显效、有效标准, 或病情加重或死亡。

1.3.2 两组肝肾功能指标比较

治疗前后采集两组患者肘部静脉血, 离心分离血清, AU5800型全自动生化仪(美国贝克曼库尔特公司)检测 CREA、TBIL, 磷钨酸还原法检测 UA。

1.3.3 血清炎症因子水平比较

治疗前、治疗结束后采集患者肘部静脉血, 常规离心分离血清后全自动生化分析仪检测 PCT、hsCRP 表达水平。

1.3.4 随访预后比较

治疗后通过电话或上门形式随访两组 7 d 病死率、序贯器官衰竭评分(sequential organ failure assessment, SOFA)^[7], SOFA 评分评分越高预示预后越差, 在治疗前、治疗后 2、3、4 天进行评分。

1.4 统计学处理

SPSS 20.0 统计软件进行统计分析, 计数资料

采取 $n(\%)$ 表示, 行 χ^2 检验, 计量资料采用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 行 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组疗效比较

观察组治疗后总有效率高于对照组差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 两组疗效比较 [$n(\%)$]

组别	n	显效	有效	无效	总有效
观察组	51	18(35.29)	24(47.06)	9(17.65)	42(82.35)
对照组	51	11(21.57)	22(43.34)	18(35.29)	33(64.71)
χ^2 值	-				4.080
P 值	-				0.043

2.2 两组肝肾功能指标比较

与同组治疗前比较, 治疗后两组 CREA、UA、TBIL 明显降低, 且观察组低于对照组 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 两组肝肾功能指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of liver and kidney function indexes in 2 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	CREA ($\mu\text{mol/L}$)		UA ($\mu\text{mol/L}$)		TBIL ($\mu\text{mol/L}$)	
		治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
观察组	51	342.34±34.21	201.05±19.10	382.29±108.24	181.01±19.13	18.53±2.27	10.06±1.02
对照组	51	342.29±33.92	271.64±21.11	381.90±110.25	201.88±21.19	18.50±2.26	14.94±1.20
t 值		0.007	17.708	0.018	5.221	0.067	22.128
P 值		0.994	<0.001	0.986	<0.001	0.947	<0.001

2.3 血清炎症因子水平

治疗后两组 PCT、hsCRP 较治疗前降低, 且治疗后观察组低于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 3。

2.4 随访预后

观察组 7 d 病死率低于对照组, 治疗后第 2、3、4 天观察组 SOFA 评分低于对照组差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 4。

表 3 血清炎症因子水平 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Levels of serum inflammatory factors ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	PCT ($\mu\text{g/L}$)		hsCRP (mg/L)	
		治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
观察组	51	3.23±0.46	1.05±0.20	20.41±2.61	6.51±1.01
对照组	51	3.20±0.50	2.16±0.30	19.99±2.74	11.46±1.28
t 值		0.315	21.986	0.793	21.681
P 值		0.753	<0.001	0.430	<0.001

表 4 随访预后 [$n(\%), (\bar{x} \pm s)$]

Table 4 Follow-up prognosis [$n(\%), (\bar{x} \pm s)$]

组别	n	7 d 病死率	SOFA 评分(分)			
			入院时	治疗后第 2 天	治疗后第 3 天	治疗后第 4 天
观察组	51	18(35.29)	0.89±0.19	3.21±1.32	7.64±1.76	10.64±2.62
对照组	51	28(54.90)	0.90±0.20	4.32±1.44	10.68±1.64	13.64±2.79
χ^2/t 值	-	3.960	0.259	4.058	9.025	5.598
P 值	-	0.047	0.796	<0.001	<0.001	<0.001

3 讨论

肝脏和肾脏功能损伤的出现是判断急性百草

枯中毒患者病情程度的可靠指标, 肝肾损伤不仅会增加多器官功能损伤的发生率, 且与肺间质纤维化形成密切相关, CREA、UA、TBIL 为临床常见

肝肾功能标志物^[8]。研究证实百草枯中毒后早期组织损伤存在炎症反应,PCT、hsCRP为临床常见炎症标志物,血清PCT、hsCRP升高预示机体炎症反应加剧,而炎症反应存在会刺激肺成纤维细胞增殖、胶原合成及细胞外基质沉积,在肺纤维化中起重要作用,引起多器官功能衰竭^[9-10]。急性百草枯中毒一旦救治不及时将引发多器官功能障碍综合征,导致高病死率^[11]。早期血液灌流是目前可快速降低血液毒物浓度的一种有效方法,研究发现早期血液灌流可有效改善急性百草枯中毒患者预后^[12]。

本结果显示观察组总有效率明显高于对照组,表明早期血液灌流可有效提高急性百草枯中毒患者的临床疗效,与刘晓伟等^[13]学者认为的早期血流灌注可有效提高急性百草枯中毒患者临床治疗效果的结论大体上相符。百草枯进入人体10~15 h后将不同程度蓄积于肺及其他组织中,一旦进入器官组织将增加治疗难度。血液灌流对百草枯中毒患者有效清除率约为60%,国内外学者一致认为急性百草枯中毒后应尽快施行血液灌流,对提高患者临床治疗效果有积极意义^[14-15]。本研究还显示治疗后观察组CREA、UA、TBIL、PCT、hsCRP较对照组明显低,初步证实了早期血液灌流治疗可有效保护急性百草枯中毒患者肝肾功能,同时有效减轻机体炎症反应,对防止多器官功能损害有益,与朱保月^[16]、吴燕生等学者^[17]报告血液灌流可有效减轻急性百草枯中毒患者肝肾功能损害、减轻炎症反应程度的观点相符。早期血液灌流治疗可及时清除尚未与血浆蛋白结合百草枯毒液,避免其在肺内蓄积而产生自由基,在减轻机体炎症反应程度同时降低患者病死率。早期血液灌流治疗原理:借助于广谱解毒效应的血液灌流器将体内有害代谢物或外源性毒物彻底清除而达到解毒的目的,早期血液灌流对降低机体百草枯血药浓度和减少百草枯进入肺泡及有效减轻肺损伤有积极意义,对降低患者短期病死率至为重要^[18]。

综上所述,早期血液灌流在急性百草枯中毒患者有明确应用效果,对提高患者临床疗效和改善预后具有积极意义,与其有效清除百草枯浓度、减轻肝肾功能损害和机体炎症反应有关。但本研究样本量小且随访时间短,未来还需进一步开展大样本量多中心的研究。

参考文献

[1] 武小娟,李彦国,孟舰,等.早期血糖和离子水平对急性

- 百草枯中毒患者的预后评估[J].现代预防医学,2018,45(1):115-118.
- [2] Elenga N, Merlin C, Remi LG, et al. Clinical features and prognosis of paraquat poisoning in French Guiana: A review of 62 cases[J]. *Medicine*, 2018, 97(15):962-963.
- [3] 王鸾,蔡雪,赵敏.急性百草枯中毒死亡危险因素分析[J].中国医科大学学报,2018,47(3):237-239,243.
- [4] 张台平,陈南西,田学隆.基于ARM的血液灌流系统的设计研究[J].分子诊断与治疗杂志,2007,3(3):62-65.
- [5] 兰超,吕青,裴辉,等.血液灌流联合连续静-静脉血液滤过对急性百草枯中毒疗效的Meta分析[J].中华危重病急救医学,2018,30(8):783-789.
- [6] 薛维亮,张玲.老年重度有机磷农药中毒患者血液灌流临床疗效及对血清CHE、DA、TGF- β 1及TNF- α 水平的影响[J].中国老年学,2019,39(2):351-354.
- [7] 甘君英,许和平,吴开芳,等.序贯器官衰竭评分对急诊危重患者30 d病死率的预测价值研究[J].中国急救医学,2019,21(1):17-19.
- [8] He F, Zhou A, Feng S, et al. Mesenchymal stem cell therapy for paraquat poisoning: A systematic review and meta-analysis of preclinical studies[J]. *Plos One*, 2018, 13(3):194-198.
- [9] 王东,王莉华,庞晓璐,等.血液灌流联合血液滤过对百草枯中毒患者血清TNF- α 、TGF- β 1的影响[J].中国老年学杂志,2013,33(22):5545-5547.
- [10] 高珣,李敬,王维展,等.持续血液灌流对急性百草枯中毒患者血浆炎症及氧化应激损伤指标的影响[J].中国现代医学杂志,2018,32(2):79-83.
- [11] Li C, Hu D, Xue W, et al. Treatment Outcome of Combined Continuous Venovenous Hemofiltration and Hemoperfusion in Acute Paraquat Poisoning: A Prospective Controlled Trial[J]. *Critical Care Med*, 2018, 46(1):100-107.
- [12] Yen TH, Wang IK, Hsu CW, et al. Hemoperfusion for paraquat poisoning[J]. *Kidney international*, 2018,94(6):1239.
- [13] 刘晓伟,刘盛业,刘志.早期血液灌流救治急性百草枯中毒患者临床疗效分析[J].中华急诊医学杂志,2012,21(11):1205-1209.
- [14] 林莎莎,喻文.连续性静脉-静脉血液滤过联合血液灌流对急性百草枯中毒患者的疗效:一项前瞻性研究[J].中华危重病急救医学,2018,30(3):223-223.
- [15] Sun L, Yan P, Zhang Y, et al. Effect of activated charcoal hemoperfusion on renal function in patients with paraquat poisoning[J]. *Exp therapeutic med*, 2018, 15(3):2688-2692.
- [16] 朱保月,苏晓阳,王岩,等.连续血液灌流对急性百草枯中毒患者血清白介素-18水平及预后的影响[J].实用医学杂志,2018,14(2):231-234.
- [17] 吴燕生,郁毅刚.百草枯中毒患者入院72 h血液灌流方式选择对血清相关毒素清除情况的影响[J].医学临床研究,2017,34(9):1843-1845.
- [18] 王亚辉,吴彦其,沈锋,等.血液灌流联合连续性静脉-静脉血液滤过救治百草枯中毒临床疗效的Meta分析[J].中华危重病急救医学,2019,31(2):214-220.

食管癌患者血清 MIP-3 α 、CA125、Stathmin 表达与预后的相关性

李敏 刘秀芬* 陆靖雯

[摘要] **目的** 探讨食管癌患者血清巨噬细胞炎性蛋白-3 α (MIP-3 α)、糖类抗原 125(CA125)、Stathmin 表达与病理特征及预后的相关性。**方法** 选取2015年1月至2017年3月本院收治的食管癌患者102例(食管癌组),纳入健康体检者102例为对照组。采集入组患者和健康体检者清晨空腹状态下的肘静脉血5 mL,用酶联免疫吸附法检测血清 MIP-3 α 、CA125、Stathmin 水平。根据临床病理特征对102例食管癌患者进行分组,比较组间血清 MIP-3 α 、CA125、Stathmin 水平差异性。102例患者均获得随访,随访截止时间为2020年3月,记录患者生存情况,采取受试者工作曲线(ROC)和曲线下面积(AUC)分析血清 MIP-3 α 、CA125、Stathmin 对预后的预测价值,分析血清指标之间的相关性。**结果** 食管癌组血清 MIP-3 α 、CA125、Stathmin 水平均高于对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。食管癌患者血清 MIP-3 α 、CA125、Stathmin 表达与肿瘤最大径、临床分期、分化程度、浸润程度、局部淋巴结转移具有显著的关联性($P<0.05$)。102例患者3年生存率为39.22%(40/102)。死亡组血清 MIP-3 α 、CA125、Stathmin 水平均高于存活组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。3项指标联合检测的 AUC 值为0.974,明显高于单一指标检测($P<0.05$);血清 MIP-3 α 、CA125、Stathmin 两两之间均呈显著正相关($r=0.428, 0.479, 0.449, P<0.05$)。**结论** 食管癌患者血清 MIP-3 α 、CA125、Stathmin 呈高表达,且与肿瘤最大径、临床分期、分化程度、浸润程度、局部淋巴结转移具有显著的关联性,可用于评估病情进展情况,对患者预后判断也有较高的应用价值。

[关键词] 食管癌;巨噬细胞炎性蛋白-3 α ;糖类抗原 125; Stathmin

Correlation between expressions of serum MIP-3 α , CA125 and stathmin and prognosis in patients with esophageal cancer

LI Min, LIU Xiufen*, LU Jingwen

(Department of Pathology, South Hospital of Shanghai Sixth People's Hospital, Shanghai, China, 201499)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the correlation between the expressions of serum macrophage inflammatory protein-3 α (MIP-3 α), carbohydrate antigen 125 (CA125) and stathmin and pathological characteristics and prognosis in patients with esophageal cancer. **Methods** A total of 102 patients with esophageal cancer (esophageal cancer group) admitted to this hospital between January 2015 and March 2017 were selected. 102 healthy subjects with physical examination were included as the control group. 5 mL of cubital venous blood were collected from the enrolled patients and healthy subjects in the early morning on an empty stomach, and the levels of serum MIP-3 α , CA125, and stathmin were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. According to clinicopathological characteristics, 102 patients with esophageal cancer were grouped. The levels of serum MIP-3 α , CA125, and stathmin were compared between the groups. All 102 patients were followed up. The deadline for follow-up was March 2020. The survival status of the patients was recorded. The receiver operating characteristic curve (ROC) and area under the curve (AUC) were used to analyze the predictive value of

基金项目:上海市卫生和计划生育委员会科研课题(201640513)

作者单位:上海市第六人民医院南院病理科,上海 201499

*通信作者:刘秀芬, E-mail:lee15min@163.com

serum MIP-3 α , CA125, and stathmin on prognosis, and the correlation among serum indicators was analyzed.

Results The levels of serum MIP-3 α , CA125, and stathmin in the esophageal cancer group were higher than those in the control group ($P<0.05$). The expression of serum MIP-3 α , CA125, and stathmin in patients with esophageal cancer were significantly correlated with the maximum tumor diameter, clinical stage, differentiation degree, invasion degree, and local lymph node metastasis ($P<0.05$). The 3-year survival rate of 102 patients was 39.22% (40/102). The AUC value of combined detection of the three indicators was 0.974, which was significantly higher than that of single indicator detection ($P<0.05$). Serum MIP-3 α , CA125, and stathmin were significantly positively correlated with each other ($r=0.428, 0.479, 0.449, P<0.05$). **Conclusion** Serum MIP-3 α , CA125, and stathmin are highly expressed in patients with esophageal cancer, and they are significantly related to the tumor's maximum diameter, clinical stage, degree of differentiation, degree of invasion, and local lymph node metastasis, which can be used to assess the progression of the disease and judge the prognosis of patients.

[KEY WORDS] Esophageal cancer; Macrophage inflammatory protein-3 α ; Carbohydrate antigen 125; Stathmin

食管癌在我国是一种较为常见的消化道恶性肿瘤,流行病学调查表明,该疾病多发于经济欠发达、居住条件差的地区,与饮食、卫生、环境等因素存在一定的关联性^[1]。早期食管癌经手术治疗后5年生存率可达70%,中晚期患者5年生存率则不到20%^[2]。现代研究认为,食管癌发病机制较为复杂,在疾病形成过程中,某些生物活性物质存在异常表达情况,可作为检测肿瘤的标志物应用于临床。糖类抗原125(carbohydrate antigen 125, CA125)是一种应用十分广泛的肿瘤相关抗原,对消化道肿瘤是很好的检测指标^[3]。巨噬细胞炎性蛋白-3 α (macrophage inflammatory protein-3 α , MIP-3 α)作为一种趋化性细胞因子,其表达水平与肿瘤进展、局部炎性细胞浸润等密切相关^[4]。Stathmin是近年来研究较多的一种微管解聚蛋白,对细胞周期变化起到关键作用,在恶性肿瘤中过度表达。本研究对血清MIP-3 α 、CA125、Stathmin水平进行检测,分析其与病理特征、预后的相关性,旨在探讨上述血清指标在食管癌患者治疗中的应用价值,现报道如下。

1 资料和方法

1.1 一般资料

选取2015年1月至2017年3月本院收治的食管癌患者102例(食管癌组),其中男71例,女31例,平均(58.62 \pm 13.47)岁。纳入标准:①均经病理检查确诊为食管癌^[5];②均为初诊,入组前未接受手术、放化疗或其他生物治疗;③均接受标准的食管癌根治术治疗;④有完整的临床、病理及随访资料。排除标准:①已出现远处转移者;②合并严重心、

脑、肾、肝疾病者;③合并全身免疫系统疾病者;④妊娠或哺乳期妇女;⑤临床资料不全或未完成随访者。选取同期健康体检者102例为对照组,其中男66例,女36例,平均(60.31 \pm 14.27)岁。两组性别、年龄比较差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。本研究经本院医学伦理委员会批准,受试者签署知情同意书。

1.2 样本采集及检测方法

采集入组患者和健康体检者清晨空腹状态下的肘静脉血5 mL,以3 000 r/min的速度离心10 min,取上层血清保存待检。用酶联免疫吸附法检测血清MIP-3 α 、CA125、Stathmin水平,试剂盒分别购自上海广锐生物科技有限公司、上海将来实业股份有限公司、上海研生实业有限公司,严格遵照说明书进行操作。

1.3 评价指标

①比较食管癌组与对照组血清MIP-3 α 、CA125、Stathmin水平。②比较两组血清MIP-3 α 、CA125、Stathmin水平差异性。③随访方式为电话或微信随访、门诊随访,随访截止时间为2020年3月,记录患者生存情况,比较死亡组与存活组血清MIP-3 α 、CA125、Stathmin水平差异性,分析上述指标对预后的预测价值以及指标之间的相关性。

1.4 统计学处理

采用SPSS 22.0软件进行统计分析。计数资料以 $n(\%)$ 表示,组间比较采用 χ^2 检验;符合正态分布的计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用独立样本 t 检验,多组间比较采取单因素方差分析;采取受试者工作曲线(ROC)和曲线下面积(AUC)分析血清MIP-3 α 、CA125、Stathmin对预后

的预测价值;血清指标之间的相关性分析采取 Pearson 相关。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组血清 MIP-3 α 、CA125、Stathmin 水平比较
食管癌组血清 MIP-3 α 、CA125、Stathmin 水平均高于对照组,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 两组血清 MIP-3 α 、CA125、Stathmin 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)
Table 1 Comparison of levels of serum MIP-3, CA125 and Stathmin between 2 group ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	MIP-3 α (ng/L)	CA125 (U/mL)	Stathmin (ng/mL)
食管癌组	102	32.43 \pm 6.60	42.90 \pm 12.06	15.35 \pm 4.43
对照组	102	10.05 \pm 3.57	15.31 \pm 4.15	6.28 \pm 1.89
<i>t</i> 值		30.122	21.848	19.019
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001

表 2 血清 MIP-3 α 、CA125、Stathmin 表达与临床病理特征的关系 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Correlation between expressions of serum MIP-3, CA125 and Stathmin and clinicopathological characteristics ($\bar{x} \pm s$)

临床病理特征	<i>n</i>	MIP-3 α (ng/L)	<i>F</i> 值	<i>P</i> 值	CA125 (U/mL)	<i>F</i> 值	<i>P</i> 值	Stathmin (ng/mL)	<i>F</i> 值	<i>P</i> 值	
性别	男	71	32.87 \pm 6.44	0.975	0.334	43.25 \pm 12.23	0.449	0.655	15.23 \pm 4.25	0.374	0.710
	女	31	31.44 \pm 6.96			42.09 \pm 11.81			15.61 \pm 4.87		
年龄(岁)	<55	25	33.05 \pm 5.21	0.620	0.538	44.91 \pm 13.82	0.872	0.389	15.49 \pm 4.56	0.179	0.859
	\geq 55	77	32.23 \pm 7.01			42.24 \pm 11.45			15.30 \pm 4.41		
肿瘤最大径(cm)	<5	45	30.96 \pm 5.72	2.084	0.040	39.43 \pm 12.66	2.612	0.011	13.69 \pm 4.28	3.525	0.001
	\geq 5	57	33.59 \pm 7.05			45.63 \pm 10.91			16.65 \pm 4.13		
病理类型	鳞癌	81	32.29 \pm 6.96	0.490	0.627	42.42 \pm 11.75	0.723	0.476	15.30 \pm 4.43	0.196	0.846
	腺癌	21	32.96 \pm 5.10			44.73 \pm 13.33			15.52 \pm 4.52		
临床分期	I、II 期	63	30.97 \pm 6.57	3.008	0.003	40.24 \pm 11.94	2.985	0.004	13.83 \pm 4.09	4.925	0.000
	III 期	39	34.79 \pm 6.01			47.19 \pm 11.09			17.79 \pm 3.85		
分化程度	低分化	32	34.61 \pm 6.03	7.006	0.001	47.81 \pm 11.24	8.618	0.000	16.62 \pm 3.42	9.266	0.000
	中分化	39	33.35 \pm 6.19			44.44 \pm 12.60			16.40 \pm 4.31		
	高分化	31	29.02 \pm 6.51			36.30 \pm 9.22			12.70 \pm 4.46		
肿瘤部位	上段	29	33.01 \pm 6.48	0.351	0.705	42.35 \pm 12.08	0.097	0.908	15.56 \pm 4.86	0.048	0.953
	中段	33	32.74 \pm 7.03			43.64 \pm 11.81			15.29 \pm 4.98		
	下段	40	31.76 \pm 6.60			42.68 \pm 12.51			15.24 \pm 3.65		
浸润程度	肌层内	66	34.14 \pm 5.94	3.645	0.001	45.70 \pm 11.76	3.398	0.001	16.19 \pm 4.28	2.680	0.009
	肌层外	36	29.29 \pm 6.68			37.76 \pm 11.00			13.80 \pm 4.32		
局部淋巴结转移	有	62	34.92 \pm 5.70	5.275	0.000	48.16 \pm 10.57	6.688	0.000	17.36 \pm 3.48	6.762	0.000
	无	40	28.67 \pm 6.07			34.73 \pm 9.45			12.22 \pm 3.92		

表 3 死亡组与存活组血清 MIP-3 α 、CA125、Stathmin 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of levels of serum MIP-3, CA125 and Stathmin between death group and survival group ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	MIP-3 α (ng/L)	CA125 (U/mL)	Stathmin (ng/mL)
死亡组	62	35.59 \pm 5.63	49.20 \pm 10.08	17.77 \pm 3.55
存活组	40	27.54 \pm 4.77	33.13 \pm 7.52	11.59 \pm 2.69
<i>t</i> 值		7.474	8.638	9.409
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001

2.2 血清 MIP-3 α 、CA125、Stathmin 表达与临床病理特征的关系

食管癌患者血清 MIP-3 α 、CA125、Stathmin 表达与肿瘤最大径、临床分期、分化程度、浸润程度、局部淋巴结转移具有显著的关联性($P < 0.05$)。见表 2。

2.3 死亡组与存活组血清 MIP-3 α 、CA125、Stathmin 水平比较

102 例患者 3 年生存率为 39.22% (40/102), 死亡组血清 MIP-3 α 、CA125、Stathmin 水平均高于存活组,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见表 3。

2.4 食管癌患者血清 MIP-3 α 、CA125、Stathmin 对预后的预测价值分析

食管癌患者血清 MIP-3 α 、CA125、Stathmin 指

标联合检测的敏感度、特异度、约登指数、AUC 值,明显高于单一指标检测($P < 0.05$),见表 4、图 1。

2.5 食管癌患者血清 MIP-3 α 、CA125、Stathmin 水平的相关性分析

食管癌患者血清 MIP-3 α 与 CA125 呈显著正相关($r = 0.428, P < 0.05$),MIP-3 α 与 Stathmin 水平呈显著正相关($r = 0.479, P < 0.05$),CA125 与 Stathmin 水平呈显著正相关($r = 0.449, P < 0.05$)。

表4 食管癌患者血清 MIP-3 α 、CA125、Stathmin 对预后的预测价值分析

Table 4 Predictive value of serum MIP-3, CA125 and Stathmin on prognosis of patients with esophageal cancer

指标	截断值	AUC	敏感度(%)	特异度(%)	约登指数	95%CI
MIP-3 α	31.31	0.870	79.03	80.00	0.5903	0.789~0.929
CA125	42.44	0.896	79.03	87.50	0.6653	0.820~0.948
Stathmin	14.64	0.905	83.87	90.00	0.7387	0.831~0.954
联合检测	-	0.974	96.77	92.50	0.8927	0.922~0.995

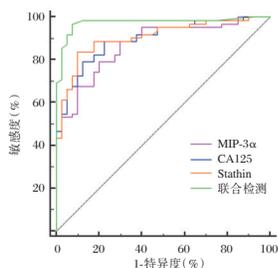


图1 食管癌患者血清 MIP-3 α 、CA125、Stathmin 预测预后的 ROC 曲线

Figure 1 ROC curves of serum MIP-3, CA125 and Stathmin in predicting prognosis of patients with esophageal cancer

3 讨论

食管癌在全球范围内属于发病率高的消化道恶性肿瘤之一,临床上对于该疾病的治疗已有较大的进步,有效改善了患者的短期预后,提高其生活质量。血清肿瘤标志物在临床检测较为方便,可在一定程度上应用于食管癌的预后评估。

CA125 是重要的卵巢癌相关抗原之一,在癌变的卵巢上皮细胞表达,可释放至细胞间质,是诊断卵巢生殖细胞肿瘤和预后评估的重要标志物^[6-7]。也有研究报道称,CA125 含有大量糖基,在晚期消化道肿瘤患者中表达显著升高,肿瘤切除或体积缩小后其表达水平也显著下降^[8]。马雪芹等学者^[9]的研究表明,食管癌患者 CA125 表达水平显著升高,CA125 不仅对食管癌有较好的诊断价值,也是影响患者预后的独立因素之一。MIP-3 α 是由 *CCL20* 基因编码的趋化性细胞因子,可诱导白细胞移动至炎症反应部位,通过淋巴组织调节白细胞通量,参与机体局部炎症细胞浸润,也可通过不同的跨膜信号转导通路激活与细胞运动、侵袭、转移有关的基因,其表达水平与恶性肿瘤进展、转移或侵袭能力及预后密切相关^[10-11]。王菀菀等学者^[12]的报道,肺癌患者血清 MIP-3 α 的表达水平明显升高,也证实了该指标与恶性肿瘤疾病的关联性。Stathmin 是由 149 个氨基酸组

成的微管解聚蛋白,通过磷酸化调节自身活性影响细胞内微管系统的动力平衡影响细胞增殖,Stathmin 磷酸化导致活性降低,促进微管蛋白聚合,去磷酸化则促进微管蛋白解聚^[13-14]。季语祝等学者^[15]的研究发现,食管癌患者血清 Stathmin 含量显著高于健康人群,说明该血清指标与食管癌有关。本研究结果表明三项指标均与食管癌的发生存在一定关联性。

本研究认为血清 MIP-3 α 、CA125、Stathmin 表达水平与病情严重程度有关,对患者预后有一定的预测作用,因此对患者进行 3 年的随访,发现 3 年生存率为 39.22%,死亡组患者入院时上述指标明显高于存活组。经 ROC 曲线分析证实了上述血清指标对预后的预测价值。进一步分析发现联合检测预测预后的 AUC 值明显高于单一检测,因此临床上可通过联合多项指标检测提高对预后预测的准确性。

综上所述,食管癌患者血清 MIP-3 α 、CA125、Stathmin 呈高表达,且与肿瘤最大径、临床分期、分化程度、浸润程度、局部淋巴结转移具有显著的关联性,不仅有助于评估病情进展情况,也可用于预后判断,具有较高的临床应用价值。

参考文献

- [1] 付江萍,蓝柳,胡芳,等.食管癌组织中 PD-L1、Vim、Zeb1 的表达与放疗敏感性的关系分析[J].分子诊断与治疗杂志,2020,12(8):1090-1094.
- [2] 石红兵,邓海峰,陈陆俊,等.链接蛋白-4 在食管癌组织的表达及临床意义[J].中华实验外科杂志,2019,36(9):1546-1550.
- [3] Gu Z, He Y, Zhang Y, et al. Postprandial increase in serum CA125 as a surrogate biomarker for early diagnosis of ovarian cancer[J]. J Transl Med, 2018, 16(1): 114.
- [4] 刘文洪,罗光华,赵衡. MRI 参数与巨噬细胞炎症蛋白 3 α 和鼻咽癌病理特征的关系[J].中国现代医学杂志,2018,28(27):116-119.
- [5] 中国抗癌协会食管癌专业委员会.食管癌规范化诊治指南.第2版[M].中国协和医科大学出版社,2013.(下转第 1744 页)

伤寒沙门氏菌质粒 DNA 参考物质的研制

努色热提·阿布都沙拉木¹ 袁慕云² 林晓峰¹ 许龙岩^{2*} 陈瑶^{1*}

[摘要] **目的** 制备包含伤寒沙门氏菌的三种检测靶标序列 *se*、*st*、*aceA* 的质粒 DNA 参考品。**方法** 设计一种质粒 DNA 包含目前用于沙门氏菌检测和分型常用的 *se*、*st*、*aceA* 的质粒 (pDNA *Salmonella*), 对其序列的稳定性、均一性和量值可追溯性进行评价, 并验证其与沙门氏菌基因组 DNA 参考品在实时定量 PCR 应用中的可比性。**结果** 经多个实验室定值后, pDNA *Salmonella* 最终定值结果为 30.08 μg/mL pDNA。 *Salmonella* 均一性、稳定性良好, 可在 -20℃ 长期保存, 并且在实时定量 PCR 应用中与基因组参考品具有可比性。**结论** pDNA *Salmonella* 具有良好的序列准确性和可追溯性, 这项研究重点是证明了快速合成的质粒作为鉴定伤寒沙门氏菌 qPCR 参考品的可行性。

[关键词] 质粒 DNA 标准物质; 实时荧光 PCR; 伤寒沙门氏菌

Preparation of plasmid DNA reference material for *Salmonella typhi*

NUSERETI Abudushalamu¹, YUAN Muyun², LIN Xiaofeng¹, XU Longyan^{2*}, CHEN Yao^{1*}

(1. School of Labotary and Biotechnology, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong, China, 510515; 2. Guangzhou Customs Technology Center, Guangzhou, Guangdong, China, 510623)

[ABSTRACT] **Objective** To prepare plasmid DNA reference materials containing the three target sequences *se*, *st*, *aceA* of *Salmonella typhi*. **Method** A DNA fragment containing three target sequences (*se*, *st*, *aceA*) commonly used for *Salmonella* detection and typing was cloned into PUC57 plasmid to construct plasmid reference material named pDNA *Salmonella*. This plasmid reference material was co-determined in quantity and evaluated with the stability and homogeneity. The substitution of the *Salmonella* genomic DNA reference was verified using real-time quantitative PCR applications. **Results** The fixed value of the pDNA *Salmonella* was 30.08 μg/mL determined by multiple laboratories. The pDNA *Salmonella* is uniform and stable. It can be stored at -20℃ for more than 1 year, comparable to genomic references. **Conclusion** pDNA *Salmonella* has good sequence accuracy and quantity traceability. This study demonstrates the feasibility of rapid synthesis of plasmids as qPCR reference material for identification of *Salmonella*.

[KEY WORDS] *Salmonella*; Synthetic plasmid standard; Real-time PCR

沙门菌 (*Salmonella*, Sa) 属于肠杆菌科, 在世界各国细菌性食物中毒病例中, 其引起的食物中毒常居榜首或第二位^[1-2]。沙门氏菌的血清型有超过 2 500 中, 肠炎沙门菌 (*Salmonella enteritidis*, SE) 和鼠伤寒沙门菌 (*Salmonella typhimurium*, ST) 感染占到人类 Sa 感染患者的 75% 以上^[3-4]。因此, 快速鉴定并确定沙门氏菌的型别, 对食品安全具有重要的意义。

目前沙门氏菌的检测方法在快速发展中, 聚合酶链式反应 (PCR) 等核酸检测技术的发展在一定程度上克服了传统检测方法耗时长、操作复杂、特异性差等缺点。但是目前用于 PCR 的核酸检测参考品十分缺乏。要同时进行沙门氏菌的鉴定和型别分析, 往往要使用多个基因组参考品才能完成, 而基因组参考品中检测靶基因的量值, 又难于

基金项目: 广东省科技计划项目 (2017A040405043)

作者单位: 1. 南方医科大学检验与生物技术学院抗体工程研究所, 广东, 广州 510515

2. 广州海关技术中心, 广东, 广州 510623

*通信作者: 陈瑶, E-mail: yaoc@i.smu.edu.cn; 许龙岩, E-mail: xuly@iqtc.cn

确定和溯源^[4-5],也无法就不同实验室的检验结果进行对比和评价。为此,本实验拟制备含可用于鉴定和鉴别沙门氏菌型别的基因片段的质粒 DNA 参考样品,为沙门氏菌核酸检测提供可溯源的有效参考物质,有效解决病原菌核酸检测能力快速发展与标准物质缺乏的矛盾。

1 材料与方法

1.1 实验材料与仪器

菌株来源为沙门氏菌标准菌株(CMCC50071),鼠伤寒沙门菌标准菌株(ATCC14028),肠炎沙门菌标准菌株(ATCC13076)(来自中国普通微生物菌种保藏管理中心广州海关技术中心)。全基因人工合成等(上海吉玛生物工程有限公司);引物合成、DNA 测序(华大基因科技股份有限公司)。

1.2 片段设计和克隆

通过人工合成的方法将沙门氏菌 *aceA* 基因(GenBank: U43344.1), SE 特异性序列 *se* (GenBank: AF370707.1), ST 特异性序列 *st* (GenBank: CP001363.1)以 1:1 的比例串联在一起(单个基因的核酸序列可从 <https://www.ncbi.nlm.nih> 下载,基因之间以不相关的基因片段 *aagtcg* 隔开),并克隆到 pUC57 中以形成重组质粒 pDNA *Salmonella*,并进行扩增纯化后用于进一步实验。

1.3 质粒纯度测定

使用琼脂糖凝胶电泳法和紫外分光光度分析法(UV 法)判定质粒纯度。取 10 μL 酶切液上样,用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳,观察条带是否清晰且单一以判断核酸纯度。取 1 μL 样品通过 UV 法测出样品在 260 nm、280 nm 波段的紫外光下的吸光度值(A₂₆₀、A₂₈₀),纯 DNA 的 A₂₆₀/A₂₈₀ 应为大于 1.8,小于 2.0 的值。

1.4 均匀性检测

取样按照《JJG1006-1994 一级标准物质技术规范》进行使用紫外法(UV 法)(最小采样量为 1 μL)分析 pDNA 的瓶间均匀度和瓶内均匀度。

随机选择 10 管 pDNA,并从每管样品的上层,中层和下层提取 1 μL 测试样品,根据方差分析(F-测试)瓶内均匀性。随机选择 10 管 pDNA,并用 UV 重复测量每管中提取的 1 μL 样品 3 次,取平均值。通过方差分析(F 检验法)分析测量结果并进行判断瓶间均匀性。并根据 ISO 指南 35 使用该数据评估 pDNA 分装导致的均匀性对不确定度的贡献。

1.5 稳定性考察

选择最常见的保藏方法-20 $^{\circ}\text{C}$ 低温保存作为稳定性考察的指标,每月随机抽取 3 瓶对质粒 DNA 参考物质的浓度进行测定,为期一年,并根据 ISO 指南 35 使用该数据评估长时间保存的稳定性并评估稳定性对核酸参考物质不确定度的贡献。

1.6 定值

pDNA 采用 8 家实验室协同定值的方法进行标准值的确定,汇总全部原始数据后经统计检验确认各组数据无离群值、各组数据等精度、每组数据的平均值之间不存在显著性差异后,取 8 家实验室检测结果的平均值为各质粒 DNA 标准物质的标准值,并进行定值过程引入的不确定度。

1.7 不确定度评估

根据对 pDNA 均匀性、长期稳定性、定值结果这三方面来源的不确定度最终计算出标准物质的标准不确定度及扩展相对不确定度。在计算扩展不确定度的时候,将标准不确定度乘以包含因子(k=2)。

1.8 qPCR 实验

根据沙门氏菌基因组大小 3.29 Mbp, pDNA 大小 5 179 bp,按照以下公式估算基因组 DNA 和重组质粒 DNA 的拷贝数。

$$\text{copies}/\mu\text{L} = \frac{6.02 \times 10^{23}(\text{copies}/\text{mol}) \times \text{DNA mass concentration}(\text{g}/\mu\text{L})}{660 \times (\text{DNA size bp})(\text{g}/\text{mol})}$$

定量后,使用 pDNA 和 gDNA 分别制备 10 倍稀释系列,制备 2×10^6 、 2×10^5 、 2×10^4 、 2×10^3 、 2×10^2 和 2×10^1 copies/mL 稀释的样品用于建立 qPCR 标准曲线。qPCR 每个反应均含 10 pM 引物。PCR 方案如下:分别在 94 $^{\circ}\text{C}$ 下 10 min 和 94 $^{\circ}\text{C}$ 下 15 s,在 58 $^{\circ}\text{C}$ 下 45 s 进行 40 个循环。引物序列和扩增子大小如表 1。

分别将质粒参考品(pDNA)和基因组 DNA(gDNA)稀释成 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 和 10^1 copies/mL 用作参考样品,并一式三份进行 qPCR 检验,以估计 qPCR 检测的扩增效率(e)和斜率(K)。以 10^1 拷贝为检测样本进行 10 次 qPCR 检测,以估计检测下线(Limit of detection, LOD)来评估 qPCR 的检测范围。通过统计分析标准曲线的扩增效率(e)和斜率(K),以评估 pDNA 对 gDNA 的可替换性。

1.9 数据分析统计分析

使用 SPSS 12.0 和 Graphpad 5.0 软件进行统计分析。均匀性测试使用单因素方差分析。稳定性

表1 三种沙门氏菌检测所需的引物序列和来源
Table 1 Sequence and source of Primers for *salmonella*

靶标	引物序列	扩增子大小	来源
肠伤寒特异性序列(<i>se</i>)	Forward: TCATTCTGACCTCTAAGCCG Reverse: TCTGGTACTTACGATGACAACTTC	141 bp	GenBank: AF370707.1
鼠伤寒特异性序列(<i>st</i>)	Forward: ATTTCTGGATATGGTACTGAGGC Reverse: AAATGAGTTGCTTTACGCTGC	123 bp	GenBank: CP001363.1
<i>aceA</i>	Forward: TCACCGAAAGACCAACAGAAG Reverse: GAACTCGCTGAAATGAGCAG	122 bp	GenBank: U43344.1

分析使用单向线性回归分析来计算斜率 b_1 , 当 $|b_1| < t_{0.95, n-2} \cdot S(b_1)$ 时将认定未观察到不稳定性 [$(n-2)$ 是自由度), 而 $S(b_1)$ 是斜率的不确定性]。使用配对 t 检验分析 pDNA 与 gDNA 的适用性结果。当 $P < 0.05$ 具有统计意义。

2 结果

2.1 质粒标准品

测序结果提示成功合成了含有基因的 DNA 片段, 并将其插入克隆载体和 pUC57 中, 形成了重组质粒 pDNA (图 1)。pDNA 提取纯化后, 经酶切鉴定和测序证实, 重组质粒中插入片段的序列准确度为 100%, 符合预期 (图 2)。鉴定后的质粒通过紫外法测定其 A_{260}/A_{280} 的比值为 1.926 ± 0.436 , 比值在 1.8-2.0 间, 且 A_{260}/A_{230} 的比值大于 2.0。

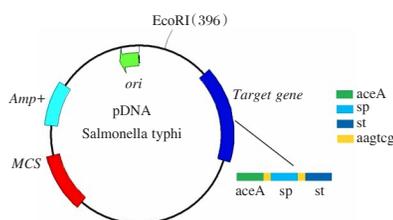
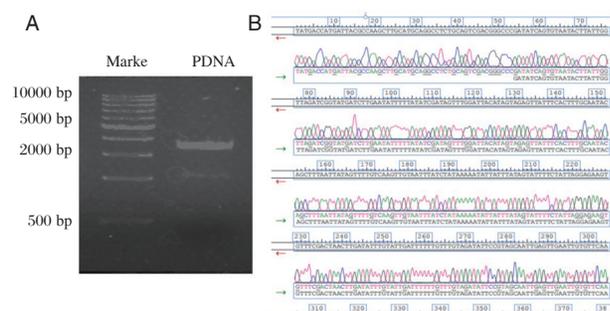


图1 pDNA Salmonella 质粒构建示意图

Figure 1 Map of plasmid reference material pDNA Salmonella



注: A 为重组质粒 pDNA 酶切鉴定图和; B 为重组质粒 pDNA 的测序图。

图2 pDNA Salmonella 质粒鉴定图

Figure 2 Identification of pDNA Salmonella

2.2 均匀性检验

均匀性检测结果显示, 在 95% 置信水平下, pDNA 的性质值在瓶内和瓶内均质性上差异无统计学意义。见表 2。

表2 鼠肠炎伤寒沙门氏菌核酸标准样品均匀性评价结果

Table 2 Statistic results of homogenous test of pDNA

<i>Salmonella</i>				
	Q_1	Q_2	F 值	$F_{0.05}$ 值
瓶内	15.699	10.713	3.256	$F_{0.05(2,20)}$ 3.49
瓶间	3.273	1.788 3	1.214	$F_{0.05(9,20)}$ 2.39

根据以下公式计算质粒 DNA 的瓶间不均匀性引起的不确定度 (u_b):

$$U_b = \sqrt{(Q_1/v_1 - Q_2/v_2)/n}$$

其中: Q_1 为组间差方和, Q_2 为组内差方和, v_1 为组间自由度, v_2 为组内自由度, n 为组内测量次数。

根据上述公式计算得出, pDNA 瓶间不均匀性引起的不确定度结果为: $0.586 \mu\text{g/mL}$ 。

2.3 稳定性检验

pDNA 在 -20°C 低温保存条件下用经验模型线性回归模型进行稳定性评价的结果, 结果表明稳定性线性模型中的斜率 $|\beta_1| < t_{0.95, n-2} \cdot S(\beta_1)$, 表明 pDNA 具有良好的稳定性。根据以下公式计算质粒 DNA 在 12 个月内的长期稳定性引起的不确定度 (u_s)。见表 3。

表3 pDNA 长期稳定性的统计结果

Table 3 Statistic results of short-term stability of pDNA

<i>Salmonella</i>				
	β_1	β_0	S	$t_{0.95, n-2} \cdot S$
	(斜率)	(截距)	(β_1)	(β_1)
Formula for long-term stability (长期稳定性公式)	0.126	31.274	0.101	0.183

$$u_s = S_{\beta_1} \times N$$

其中: β_1 是稳定性线性模型中的斜率, $S(\beta_1)$ 是斜率的标准偏差, N 是稳定性评估的总时间, $N=12$ 个月

最终经过计算得出pDNA在长期保存12个月所引起的不确定度为:1.616 μg/mL。

2.4 定值结果

pDNA的参考值由8个实验室共同确定,并通过统计检查证实,每组数据均没有异常值和显著差异,并得出总的平均值 \bar{x} =30.08 μg/mL作为标准值;进而根据以下公式计算定值过程带来的不确定度:

$$u_q = \frac{s}{\sqrt{p}}$$

其中:s为总平均值的标准偏差1.016 μg/mL,p为实验室数目。

因此得出由定值产生的不确定度结果为:

0.359 2 μg/mL

2.5 不确定度分析

质粒DNA参考材料的不确定度成分为:均质性(u_h)、有效期内变异性引起的不确定度(u_s)、定量过程引入的不确定度(u_q),因此根据以下公式计算标准不确定度:

$$U_{crm} = \sqrt{(u_h)^2 + (u_s)^2 + (u_q)^2}$$

结果为:1.796 6 μg/mL。计算扩展不确定度时,应将标准不确定度乘以包含因子(k=2)。所以,扩展相对不确定度计按以下公式计算:

$$U = U_{crm} * k$$

最终计算得到扩展不确定度(U)为3.5932 μg/mL(k=2)。图3。

2.6 荧光定量PCR(qPCR)标准曲线的建立

使用所制备的pDNA作为参照标准以建立qPCR标准曲线,各标准曲线的相关参数。见表4、图3。

表4 沙门氏菌pDNA建立的标准曲线数据

Table 4 Data for the standard curve established by pDNA

Salmonella						
Target gene	Standard Curve	R ²	Amplification efficiency (%)	LOD (copy/mL)	LOQ (copy/mL)	
aceA	y=40.504-3.747x	0.996	84.875	844	10 ¹	10 ¹
se	y=40.633-3.43x	1.000	95.679	436	10 ¹	10 ¹
st	y=40.21-3.274x	0.965	102.03	972	10 ²	10 ²

表5 副溶血弧菌pDNA和基因组DNA标准品代替性研究

Table 5 Substitution of pDNA Salmonella and genomic DNA reference material

Target	Amplification efficiency (e)				Slope (K) (n=3)			
	Pdna	gDNA	t 值	P 值	Pdna	gDNA	t 值	P 值
aceA	0.994 2	1.000 2	1.122 8	0.312 5	-3.728 5	-3.743 7	0.698 4	0.516 1
se	1.000 4	1.003 1	0.246 8	0.814 9	-3.436 7	-3.463 7	0.784 3	0.468 4
st	0.964 1	0.963 3	0.116 6	0.911 7	-3.286 4	-3.278 5	0.362 1	0.732 1

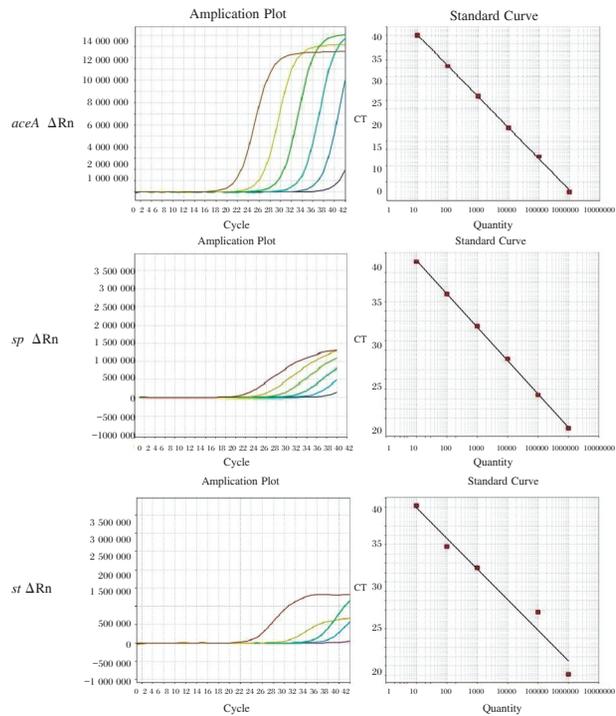


图3 沙门氏菌pDNA建立的aceA, st, se基因的标准曲线
Figure 3 Standard curve of aceA, st, se sequence established by pDNA Salmonella

2.7 pDNA和基因组DNA标准品的替代研究

此研究中使用了以梯度稀释的伤寒沙门菌基因组DNA(gDNA)和pDNA参考材料为模板绘制标准曲线,并统计分析标准曲线的扩增效率和斜率(t检验)。在95%置信度下,基因组DNA建立的标准曲线与pDNA建立的标准曲线之间,差异无统计学意义(P>0.05)。见表5。

3 讨论

为了能够提供为多个检测靶标进行定性定量参考的参考品,本研究针对沙门菌的aceA基因、肠炎沙门菌特异序列st、鼠伤寒沙门菌的特异性序列se,通过人工合成方法制备了质粒核酸检测参考品。pDNA Salmonella的制备解决了需要鉴别沙门氏菌的型别的时候,需要使用多种基因组

核酸参考品的问题,通过一次荧光 PCR 扩增就可以确认检测样本是否受到沙门菌以及哪一种沙门菌的污染。在提供有保障的序列和量值溯源的同时,大大简化了操作的繁琐性^[4-7]。实验结果表明,pDNA *Salmonella* 不仅具有序列和量值的可溯源性,还具有良好的稳定性及均一性,符合《一级标准物质技术规范》要求^[8-10]。本文进一步根据欧盟核酸参考品 Yieldgard MON 810 的研究方法^[11-13]证明了 pDNA *Salmonella* 替换基因组 DNA 的可行性,提示在制备方法和安全性上具有巨大优势的人工合成质粒 DNA 参考品有望替代基因组参考品应用于沙门氏菌的核酸检验。

本研究为人工合成质粒作为病原菌核酸检测参考品的应用提供了实践基础。下一步工作,我们将进一步验证此方法是否也可更广泛的用于食品中其他危险病原体的检测,例如 *Ecoli O157*, 副溶血性弧菌和霍乱弧菌等,并希望通过提供优质的可溯源性参考品有效提高病原体测试实验室相关项目的检测水平并确保其可比性,从而提高应对大规模突发公共安全事件的能力储备。

参考文献

- [1] 李杰,丁承超,翟续昭,等.沙门氏菌检测技术研究进展[J].微生物学杂志,2017,37(4):126-132.
- [2] 韩晗,韦晓婷,魏鑫,等.沙门氏菌对食品的污染及其导致的食源性疾病.[J]江苏农业科学,2016,45(5):15-20.
- [3] 于婷,孙楠,曲守方,等.耳聋突变基因检测国家参考品的研制[J].分子诊断与治疗杂志,2020,12(1):6-10.
- [4] 周海卫,沈舒,石大伟,等.甲/乙型流感病毒核酸检测试剂参考品的建立[J].中国生物制品杂志,2015,28(7):701-706.
- [5] 徐文波,向秀华,冯磊,等.玉溪地区不同民族女性人乳头瘤病毒感染状况及基因型分布[J].检验医学,2019,34(5):472-473.
- [6] 袁慕云,许龙岩,柯碧霞,等.实时荧光 PCR 技术在沙门菌种间鉴别中的应用[J].中国卫生检验杂志,2017,27(16):2291-2294.
- [7] 许龙岩,袁慕云,孙薇,等.基于 TaqMan 探针四重荧光 PCR 检测甲型、乙型、丙型副伤寒和伤寒沙门菌[J].卫生研究,2017,46(2):298-302.
- [8] 於颖,顾其芳,陈敏,等.肉制品中沙门菌实时荧光定量聚合酶链反应标准质粒的构建[J].上海预防医学,2017,29(4):273-276+280.
- [9] 袁慕云,许龙岩,刘二龙,等.基于 TaqMan 探针双重荧光 PCR 检测食品中肠道沙门氏菌和肠炎沙门氏菌[J].现代食品科技,2017,33(1):248-252.
- [10] 许丽,梁文,李妍,等.一种质粒 DNA 标准物质的定值数据统计及不确定度评定[J].中国测试,2014,40(z1):9-13.
- [11] 肖维威,张宝,赵卫,等.用于筛查转基因作物成分的质粒标准分子的研制[J].生命科学研究,2019,23(3):192-199.
- [12] Xu L, Chen H, Canales M, et al. Use of synthesized double-stranded gene fragments as qPCR standards for the quantification of antibiotic resistance genes [J]. J Microbiol Methods, 164: 105670.
- [13] Ballari RV, Martin A, Gowda LR. A calibrator plasmid for quantitative analysis of insect resistant maize (Yieldgard MON 810) [J]. Food Chem, 2019, 140(1-2): 382-389.
- [6] Duzgun O, Sarici IS. Preoperative CA125 value predicts Glisson capsule involvement in patients with peritoneal carcinomatosis undergoing cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy [J]. Biomark Med, 2019, 13(5): 359-369.
- [7] Lycke M, Kristjansdottir B, Sundfeldt K. A multicenter clinical trial validating the performance of HE4, CA125, risk of ovarian malignancy algorithm and risk of malignancy index [J]. Gynecol Oncol, 2018, 151(1): 159-165.
- [8] 贺靳贤,陈琪峰,陈彪.食管癌患者血清中多项肿瘤标志物测定的临床意义[J].中国卫生检验杂志,2018,28(12): 1490-1492.
- [9] 马雪芹,王学红,马臻棋,等.CEA,CA125,CA19-9对食管癌诊断的临床意义[J].实用癌症杂志,2019,34(5):700-703.
- [10] 张国玉.血清 LBP、25-(OH)D 及 MIP-3 α 水平在诊断原发性胆汁性肝硬化中的临床意义[J].陕西医学杂志,2017,46(12):1659-1661.
- [11] Park JH, Noh Y, Kim SS, et al. Time-Course Changes and New Expressions of MIP-3 α and Its Receptor, CCR6, in the Gerbil Hippocampal CA1 Area Following Transient Global Cerebral Ischemia[J]. Neurochem Res, 2018, 43(11):2102-2110.
- [12] 王菀菀,钟春生,孙俊宁,等.肺癌患者血清中 21 种细胞因子的表达水平及其临床意义[J].中国肿瘤生物治疗杂志,2017,24(6):650-655.
- [13] Ma HL, Jin SF, Ju WT, et al. Stathmin is overexpressed and regulated by mutant p53 in oral squamous cell carcinoma [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2017, 36(1):109.
- [14] Yurong L, Biaoxue R, Wei L, et al. Stathmin overexpression is associated with growth, invasion and metastasis of lung adenocarcinoma [J]. Oncotarget, 2017, 8(16):26000-26012.
- [15] 季语祝,陈曦,谢刚,等.食管癌组织中 CyclinB1/CDK1 复合物表达量与血清及病灶中标志分子含量的相关性[J].海南医学院学报,2017,23(19):2716-2719.

(上接第 1739 页)

外周血 Blimp1、IFN- γ 、IL-10 水平与重症肺结核的相关性分析

黄健¹ 李明瑛² 牛文一² 孙冰¹ 韩伟¹ 崔秀琴^{1*}

【摘要】 目的 研究外周血 B 淋巴细胞诱导成熟蛋白 1(Blimp1)、 γ -干扰素(IFN- γ)、白细胞介素-10(IL-10)水平与重症肺结核(PTB)患者预后的相关性。**方法** 收集本院 2018 年 1 月至 2019 年 3 月结核内科收治的重症肺结核患者 92 例作为研究对象,另选择同期来本院体检的 42 例正常健康人作为对照组。所有研究对象均采集空腹外周血标本,检测其单个核细胞 Blimp1、IFN- γ 、IL-10 水平,分析上述因子与重症肺结核患者临床病理参数和预后的相关性。**结果** 研究组患者 Blimp1、IFN- γ 、IL-10 水平显著高于对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$);急性生理与慢性健康(APACHE- II)评分 ≥ 21 分、多器官功能障碍评分(MODS) ≥ 5 分和预后差的患者 Blimp1、IFN- γ 、IL-10 水平显著高于 APACHE- II 评分 < 21 分、MODS 评分 < 5 分和预后良好患者,差异具有统计学意义($P<0.05$);单因素以及多因素 Cox 回归分析均证实高 Blimp1、高 IFN- γ 、高 IL-10、APACHE- II 评分 ≥ 21 分和 MODS 评分 ≥ 5 分均是导致重症肺结核患者预后不良的独立危险因素($P<0.05$)。**结论** 重症 PTB 患者外周血单个核细胞 Blimp1、IFN- γ 、IL-10 水平呈高表达状态,且其高表达与预后密切相关。

【关键词】 B 淋巴细胞诱导成熟蛋白 1; γ -干扰素; 白细胞介素-10; 重症肺结核

Correlation analysis of peripheral blood Blimp1, IFN- γ and IL-10 levels and severe pulmonary tuberculosis

HUANG Jian¹, LI Mingying², NIU Wenyi², SUN Bing¹, HAN Wei¹, CUI Xiuqin^{1*}

(1. The Second Ward, Department of Internal Medicine - Tuberculosis, the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical College; Key Laboratory of Tuberculosis in Xinxiang City, Xinxiang, Henan, China, 453100;

2. The Fourth Ward, Department of Internal Medicine - Tuberculosis, the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical College; Key Laboratory of Tuberculosis in Xinxiang City, Xinxiang, Henan, China, 453100)

【ABSTRACT】 **Objective** To investigate the correlation between peripheral blood B lymphocyte induced maturation protein-1 (Blimp1), interferon-gamma (IFN- γ) and interleukin-10 (IL-10) levels and the prognosis of patients with severe pulmonary tuberculosis (PTB). **Methods** A total of 92 patients with severe pulmonary PTB who were admitted to Tuberculosis Internal Medicine in the hospital between January 2018 and March 2019 were recruited as the research subjects, and 42 normal healthy people who came to the hospital for physical examination during the same period were selected as the control group. The fasting peripheral blood samples of all subjects were collected to detect Blimp1, IFN- γ and IL-10 levels in mononuclear cells. The correlations between above-mentioned factors and clinical pathological parameters and prognosis of patients with severe pulmonary PTB were analyzed. **Results** The Blimp1, IFN- γ and IL-10 levels in the study group were significantly higher than those in the control group, with statistically significant differences ($P<0.05$). The

基金项目:河南省医学科技攻关计划项目(2018020314)

作者单位:1. 新乡医学院第一附属医院结核内科二病区;新乡市结核病学重点实验室,河南,新乡 453100

2. 新乡医学院第一附属医院结核内科四病区;新乡市结核病学重点实验室,河南,新乡 453100

*通信作者:崔秀琴, E-mail: cuixiuqin4402973@126.com

Blimp1, IFN- γ and IL-10 levels in patients with acute physiology and chronic health evaluation II (APACHE II) scores ≥ 21 points, MODS score ≥ 5 points and poor prognosis were significantly higher than those in patients with APACHE II score < 21 points, MODS score < 5 points and good prognosis, with statistically significant differences ($P < 0.05$). Univariate and multivariate Cox regression analyses confirmed that high Blimp1, high IFN- γ , high IL-10, APACHE-II score ≥ 21 points and MODS score ≥ 5 points were independent risk factors leading to poor prognosis of patients with severe pulmonary PTB ($P < 0.05$). **Conclusion** The Blimp1, IFN- γ and IL-10 levels in peripheral blood mononuclear cells are elevated in patients with severe PTB, and their high expression is closely related to the prognosis.

[KEY WORDS] B lymphocyte induced maturation protein-1; Interferon gamma; Interleukin-10; Severe pulmonary tuberculosis

肺结核(Pulmonary tuberculosis, PTB)是由结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, MTB)引起的一种临床常见呼吸系统疾病,占全身结核病的80%~90%^[1]。研究表明PTB的发生不仅会对患者肺部造成严重感染,若未及时治疗,发展为重症PTB,还会导致患者因多器官衰竭而死亡^[2]。虽通过外科手术、药物治疗等可在一定程度上提高重症PTB患者的生存率,但仍有部分患者因多重耐药结核菌、PTB认知度不够等因素导致疾病的复发或者治疗失败^[3]。因此,了解影响PTB进展与预后的主要影响因素对于临床治疗方案的调整以及预后的改善十分关键。近年来发现细胞免疫作用的降低可使巨噬细胞的抗菌活性降低,减弱结核病的免疫应答,进而加速疾病的发展^[4]。其中 γ -干扰素(Interferon-gamma, IFN- γ)、白细胞介素-10(Interleukin-10, IL-10)是抗结核免疫重要细胞因子,在PTB感染的控制中具有重要作用^[5-6],而B淋巴细胞诱导成熟蛋白1(B lymphocyte induced maturation protein-1, Blimp1)可通过调控T细胞的增殖分化进而直接参与PTB的发生发展^[7]。但目前关于上述三种因子与重症PTB预后相关性的研究在国内鲜少报道,基于此,本研究将对外周血单个核细胞Blimp1、IFN- γ 、IL-10水平与重症肺结核患者预后的相关性进行探讨,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集本院2018年1月至2019年3月结核内科收治的92例重症肺结核患者的临床资料,作为研究组。纳入标准:①符合肺结核诊断标准^[8],且胸部影像学检查提示肺部病变面积超过2个肺野,出现空洞或痰结核菌阳性,或合并严重并发症;②重症监护时间在24 h以上;③病例及随访

资料完整;④采血前1个月内未应用免疫抑制剂或糖皮质激素治疗。排除标准:①收治后24 h内死亡者;②合并恶性肿瘤以及传染性疾病者;③肺部伴有其他疾病者;④长期应用免疫抑制剂者;⑤合并严重精神疾病者。其中男48例,女44例;平均(51.98 \pm 5.36)岁;急性生理与慢性健康评分(Acute physiology and chronic health evaluation-II, APACHE-II)^[9]为16~25分,平均(21.83 \pm 3.34)分;多器官功能障碍评分(Multiple organ dysfunction score, MODS)^[10]为2~5分,平均(3.32 \pm 1.15)分。另选择同期来本院进行检查的42例健康人作为对照组,其X线胸片、结核菌素试验均未见异常情况,且排除传染性疾病和糖尿病等影响免疫功能的疾病。其中男22例,女20例;平均(50.94 \pm 5.72)岁。两组研究对象性别、年龄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,受试者知情并签署知情同意书。

1.2 方法

研究组患者于入院次日清晨采集空腹外周静脉血2 mL,对照组于体检当日采集空腹外周静脉血2 mL。经离心分离后,取上层清液。采用反转录聚合酶链式反应(Reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)法检测外周血Blimp1水平,试剂盒由上海联迈生物工程有限公司提供。采用酶联免疫吸附法(Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)法检测血清IFN- γ 、IL-10水平,试剂盒由上海一研生物科技有限公司提供。收集所有研究组患者临床资料,包括性别、年龄、APACHE-II、MODS评分等资料,比较不同临床特点患者外周血Blimp1、IFN- γ 、IL-10水平;研究组患者均进行1年电话、复诊、微信等随访调查,以肺结核复发或者患者死亡作为预后差,其余为预后良好,比较两组患者上述因子水平。

1.3 统计学分析

使用 SPSS 20.0 软件进行统计分析。计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,行 *t* 检验;采用 Cox 风险回归模型筛选影响 PTB 预后的危险因素, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 入院时两组 Blimp1、IFN- γ 、IL-10 水平比较

研究组患者 Blimp1、IFN- γ 、IL-10 水平显著高于对照组,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 研究组患者 Blimp1、IFN- γ 、IL-10 水平与临床各参数的关系

研究组不同性别、年龄患者 Blimp1、IFN- γ 、IL-10 水平比较差异无统计学意义($P > 0.05$), APACHE- II 评分 ≥ 21 分、MODS 评分 ≥ 5 分和预后差的患者 Blimp1、IFN- γ 、IL-10 水平显著高于 APACHE- II 评

表 1 入院时研究组和对照组 Blimp1、IFN- γ 、IL-10 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of blimp 1, IFN- γ and IL-10 levels between study group and control group at admission ($\bar{x} \pm s$)

分组	Blimp1 (相对比值)	IFN- γ (pg/mL)	IL-10 (pg/mL)
研究组	5.16 \pm 1.21	113.53 \pm 15.38	143.95 \pm 31.69
对照组	1.51 \pm 0.62	68.41 \pm 6.15	65.33 \pm 14.74
<i>t</i> 值	18.449	18.325	15.316
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000

分 < 21 分、MODS 评分 < 5 分和预后良好患者,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

2.3 重症肺结核患者预后影响因素 Cox 回归分析

单因素以及多因素 Cox 回归分析均证实高 Blimp1、高 IFN- γ 、高 IL-10、APACHE- II 评分 ≥ 21 分和 MODS 评分 ≥ 5 分均是导致重症肺结核患者预后不良的独立危险因素($P < 0.05$)。见表 3。

表 2 研究组患者 Blimp1、IFN- γ 、IL-10 水平与临床各参数的关系 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Relationship between blimp 1, IFN - γ , IL-10 levels and clinical parameters in Study Group ($\bar{x} \pm s$)

资料	<i>n</i>	Blimp1(相对比值)	IFN- γ (pg/mL)	IL-10(pg/mL)	
性别	男	48	5.24 \pm 1.28	114.28 \pm 16.49	146.26 \pm 35.28
	女	44	5.08 \pm 1.17	112.67 \pm 14.28	140.78 \pm 28.47
年龄	< 50 岁	57	4.98 \pm 1.53	111.89 \pm 20.62	141.74 \pm 34.08
	≥ 50 岁	35	5.35 \pm 1.02	115.38 \pm 10.58	145.29 \pm 27.49
APACHE- II 评分	< 21 分	64	4.78 \pm 1.14 ^a	108.48 \pm 19.27 ^a	139.18 \pm 36.33 ^a
	≥ 21 分	28	5.93 \pm 1.42	128.04 \pm 11.37	153.86 \pm 28.79
MODS 评分	< 5 分	67	4.68 \pm 1.39 ^b	107.98 \pm 18.33 ^b	138.48 \pm 35.51 ^b
	≥ 5 分	25	6.24 \pm 1.07	130.28 \pm 12.40	152.69 \pm 29.43
预后	良好	70	4.63 \pm 1.32 ^c	104.39 \pm 17.71 ^c	135.64 \pm 34.42 ^c
	差	22	6.97 \pm 1.12	133.36 \pm 10.05	161.92 \pm 29.16

注:与 APACHE- II 评分 ≥ 21 分组比较,^a $P < 0.05$;与 MODS 评分 ≥ 5 分组比较,^b $P < 0.05$;与预后差组比较,^c $P < 0.05$ 。

表 3 重症肺结核患者预后影响因素 Cox 回归分析

Table 3 Cox regression analysis of prognostic factors in patients with severe pulmonary tuberculosis

因素	单因素			多因素		
	HR	95%CI	<i>P</i> 值	HR	95%CI	<i>P</i> 值
高 Blimp1	2.543	1.027~6.983	0.038	2.842	1.397~9.547	0.030
高 IFN- γ	2.902	1.246~9.894	0.025	3.013	0.346~10.146	0.018
高 IL-10	4.815	1.395~16.178	0.009	7.204	1.698~7.457	0.001
APACHE- II 评分 ≥ 21 分	3.622		0.033	4.102	1.424~12.462	0.026
MODS 评分 ≥ 5 分	3.875	1.324~11.134	0.025	4.703	1.839~15.287	0.015

3 讨论

人体对结核的免疫主要是细胞免疫,近年来体液免疫在结核免疫中的作用也受到进一步关注,现阶段临床已发现较多的调控机体免疫过程的转录因子。Blimp1 作为浆细胞的主要调控因子,国内有研究表明其高表达水平可加剧疾病的

发生发展^[11]。临床研究表明 PTB 的发生、发展除与细菌数量和毒性大小有关外,还与机体细胞免疫强弱有关,患者肺部感染病原菌后,常伴有免疫功能紊乱现象,从而导致细胞因子水平异常^[12]。其中 IFN- γ 是一种巨噬细胞活化因子,主要来自于活化 T 细胞、自然杀伤细胞和 NK 细胞,既往研究表明该因子具有抗病毒、免疫调节与抗肿瘤特

性^[13]。而 IL-10 是一种免疫调节性细胞因子,可对机体炎症反应产生抑制作用,同时可调控免疫细胞的增殖分化,有研究显示该因子水平的高表达可作为 PTB 的辅助诊断指标^[14]。现阶段国内研究多注重于研究上述因子对于 PTB 的诊断意义,而对于其与重症 PTB 患者预后相关性的研究较为少见。

本研究提示重症 PTB 患者外周血 Blimp1、IFN- γ 、IL-10 水平呈明显高表达。国内袁春晖等人^[15]研究表明 PTB 患者 Blimp1、IFN- γ 、IL-10 水平显著高于健康人,国外 Abebe 等人^[16]研究也表明 IFN- γ 、IL-10 水平是临床 TB 的标志物,均与本文研究结果相一致。Dorhoi 等人^[14]研究表明结核病的发展与细胞免疫、体液免疫的共同作用有关,机体在感染 MTB 后,全身炎症反应会迅速被激活,且重症 PTB 患者体内炎症反应更为活跃,引起 IL-10 水平的大量升高;Blimp1 作为调控体液免疫的重要因子,通过促进浆细胞的分化发挥以达到抗感染作用,故会引起 Blimp1 水平的高表达。此外 MTB 感染后,机体为防止结核杆菌的感染会分泌 IFN- γ 来抑制 MTB 的增殖,从而导致患者体内 IFN- γ 呈高表达状态。

此外,本研究对重症 PTB 患者上述因子水平与临床参数的关系进行比较分析,结果表明外周血 Blimp1、IFN- γ 、IL-10 水平与患者疾病发生、发展以及预后存在一定的联系。进一步分析影响重症 PTB 患者不良预后的因素,结果发现高 Blimp1、高 IFN- γ 、高 IL-10、APACHE- II 评分 ≥ 21 分和 MODS 评分 ≥ 5 分均是导致重症肺结核患者预后不良的独立危险因素,提示高 Blimp1、高 IFN- γ 、高 IL-10 与重症 PTB 患者不良预后密切相关。章敏等人^[17]研究也表明外周血 IFN- γ 和 IL-10 水平的异常表达对于重症 PTB 患者的死亡预后具有一定的预测价值,与本研究结果相类似。此外,IFN- γ 和 Blimp1 的共同作用会破坏外周血 T 细胞亚群的紊乱,从而破坏外周免疫耐受性,有利于 MTB 的扩散,促进疾病进展,导致不良预后。但目前国内对于 IFN- γ 和 Blimp1 水平的高表达对重症 PTB 预后影响的研究尚未见报道,其具体作用机制仍有待于进一步研究。

综上所述,重症 PTB 患者外周血单个核细胞 Blimp1、IFN- γ 、IL-10 水平呈高表达状态,且其高表达与预后密切相关。

参考文献

- [1] 吴清芳,吕德良,管红云,等. 2007-2016年深圳市肺结核病流行特征[J]. 热带医学杂志, 2018, 18(1):86-89.
- [2] Ravimohan S, Kornfeld H, Weissman D, et al. Tuberculosis and lung damage: from epidemiology to pathophysiology [J]. Eur Respir Rev, 2018, 27(147):170077.
- [3] 丁冬云,武广红. 250例中青年肺结核患者再住院原因分析[J]. 临床肺科杂志, 2015, 20(9):63-65.
- [4] 毛冬婷,罗燕芬,曹开源,等. 结核感染中 PD-1 调节 CD8⁺T 细胞免疫应答的研究[J]. 热带医学杂志, 2015, 15(5):587-591.
- [5] 盛宇超,袁立,孟旭,等. 糖尿病并发肺结核患者血清 γ -干扰素与白细胞介素-10 水平的研究[J]. 中国防痨杂志, 2017, 39(11):1199-1203.
- [6] 王甲甲,唐义斌,张玲英,等. γ -干扰素释放实验在结核病诊断中的应用价值分析[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2018, 10(2):115-119, 137.
- [7] 刘艳华,王若,程小星. 活动性结核患者单核细胞中 B 淋巴细胞诱导成熟蛋白 1 的 mRNA 水平降低[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2015, 31(7):89-92.
- [8] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 肺结核诊断 [J]. 传染病信息, 2017, 30(6):309-320.
- [9] 叶舟,陶玲,范兆普,等. 改良急性生理学及慢性健康状况评分系统 II 评分在急诊危重患者中的建立和应用[J]. 中华危重病急救医学, 2008, 20(8):476-478.
- [10] 王超,苏强,张淑文,等. 多器官功能障碍综合征病情严重程度评分及预后评估系统在预测住院病死率中的作用 [J]. 中华创伤杂志, 2006, 22(8):574-578.
- [11] 袁月. 转录因子 B 淋巴细胞诱导成熟蛋白-1 在免疫细胞中的研究进展 [J]. 国际输血及血液学杂志, 2015, 38(6):546-549.
- [12] 李勤静,焦伟伟,申阿东. 耐药结核病发病机制的研究进展 [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2015, 38(9):691-694.
- [13] 唐洁,陈策,查成,等. 基于结核杆菌耐热抗原小分子多肽刺激人外周血 T 细胞产生 TNF- α 和 IFN- γ 鉴别肺结核和潜伏性结核感染 [J]. 南方医科大学学报, 2017, 37(11):1442-1447.
- [14] Dorhoi A, Kaufmann SH. Pathology and immune reactivity: understanding multidimensionality in pulmonary tuberculosis [J]. Semin Immunopathol, 2016, 38(2):153-166.
- [15] 袁春晖. T 细胞斑点试验联合转录因子 Blimp1、IFN- γ 、IL-10 在肺结核病患者诊断中的检测意义 [D]. 2019.
- [16] Abebe F, Belay M, Legesse M, et al. Association of ESAT-6/CFP-10-induced IFN- γ , TNF- α and IL-10 with clinical tuberculosis: evidence from cohorts of pulmonary tuberculosis patients, household contacts and community controls in an endemic setting [J]. Clin Exp Immunol, 2017, 189(2):241-249.
- [17] 章敏. 外周血 IFN- γ 、IL-10 水平及红细胞免疫功能对重症肺结核患者死亡预后的预测价值 [J]. 标记免疫分析与临床, 2020, 27(7):1161-1165.

血清 CXCL12、SDF-1 α 、CXCR4 水平与颅脑损伤患者预后的相关性

李文彬* 郑祥德 吴昌徽 周文来 程琼 董恒

[摘要] 目的 探究颅脑损伤患者血清趋化因子配体 12(CXCL12)、基质细胞衍生因子-1 α (SDF-1 α)、趋化生长因子受体 4(CXCR4)水平与预后之间相关性。方法 选取本院2016年7月至2018年7月收治113例颅脑损伤患者以及113例同期体检健康者为对象,分别作为脑损伤组以及健康组,所有研究参与者均测定血清 CXCL12、SDF-1 α 、CXCR4 水平,两组均在相同时间点接受 mRS 评分评估。比较两组血清指标水平与 mRS 评分,血清指标与 mRS 评分相关性,比较不同预后患者血清指标水平,分析血清指标对预后诊断价值。结果 脑损伤组 CXCL12、SDF-1 α 、CXCR4 水平以及 mRS 评分高于健康组,差异有统计学意义($P<0.05$);血清 CXCL12、SDF-1 α 、CXCR4 与 mRS 评分正相关($r=0.346, 0.627, 0.561; P<0.05$);113 例患者中 mRS 评分处于 0~2 分范围者有 86 例,处于 3~6 分范围者有 27 例,分别纳入预后良好组和预后不良组,预后良好组血清 CXCL12、SDF-1 α 、CXCR4 水平显著低于预后不良组($P<0.05$);ROC 曲线显示,SDF-1 α 指标 AUC、敏感度、特异度分别为 0.789、84.89%、68.83%,CXCR4 指标 AUC、敏感度、特异度分别为 0.712、81.22%、59.72%。结论 颅脑损伤血清 CXCL12、SDF-1 α 、CXCR4 水平与预后关系密切,可用于预测患者预后情况。

[关键词] 颅脑损伤; CXCL12; SDF-1 α ; CXCR4; 预后相关性

Correlation between serum CXCL12, SDF-1 α , CXCR4 levels and prognosis in patients with craniocerebral injury

LI Wenbin*, ZHENG Xiangde, WU Changhui, ZHOU Wenlai, CHENG Qiong, DONG Heng
(Intensive Care Unit, Dazhou Central Hospital, Dazhou, Sichuan, China, 635000)

[ABSTRACT] Objective To explore correlation between serum CXC chemokine ligand 12 (CXCL12), stromal cell-derived factor-1 α (SDF-1 α), CXC chemokine receptor 4 (CXCR4) levels and prognosis in patients with craniocerebral injury. Methods A total of 113 patients with craniocerebral injury who were admitted to the hospital from July 2016 to July 2018 and 113 healthy people who underwent physical examination in the same period were enrolled as objects. They were included into craniocerebral injury group and healthy group, respectively. All were tested for levels of serum CXCL12, SDF-1 α and CXCR4. Both groups underwent assessment by mRS score at the same time point. The levels of serum indexes, mRS score and correlation between serum indexes and mRS score were compared between the two groups. The levels of serum indexes were compared among patients with different prognosis. The diagnostic value of serum indexes for prognosis was analyzed. Results The levels of CXCL12, SDF-1 α and CXCR4, and mRS score in craniocerebral injury group were higher than those in healthy group ($P<0.05$). Serum CXCL12, SDF-1 α and CXCR4 were positively correlated with mRS score ($r=0.346, 0.627, 0.561. P<0.05$). Of the 113 patients, there were 86 cases with mRS score within 0-2 points and 27 cases within 3-6 points, respectively. And they were included in good prognosis group and poor prognosis group, respectively. The levels of serum CXCL12, SDF-

基金项目:四川省卫生和计划生育委员会科研课题(17ZD031)

作者单位:达州市中心医院重症医学科,四川,达州 635000

*通信作者:李文彬, E-mail:liwb1985@163.com

1 α and CXCR4 in good prognosis group were significantly lower than those in poor prognosis group ($P < 0.05$). ROC curve showed that the AUC, sensitivity and specificity of CXCL12, SDF-1 α and CXCR4 were (0.867, 84.80%, 88.52%), (0.789, 84.89%, 68.83%) and (0.712, 81.22%, 59.72%), respectively. Conclusion The levels of serum CXCL12, SDF-1 α and CXCR4 in craniocerebral injury patients are closely related to prognosis, which can be applied to predict their prognosis.

[KEY WORDS] Craniocerebral injury; CXCL12; SDF-1 α ; CXCR4; Prognosis correlation

颅脑损伤较易引发神经中枢高热、昏迷、颅内压过高以及瘫痪等问题,患者病情进展迅速,患病后残疾以及死亡率高^[1]。研究显示,颅脑损伤包括血管损伤、脑组织损伤以及由此所致炎症造成脑损伤情况,颅脑损伤病灶附近细胞凋亡、血氧缺乏半暗带、脑组织水肿等均与血管以及脑组织损伤所致炎症有关^[2]。神经炎症是颅脑损伤炎症重要部分,其可长期在患者颅脑发挥作用诱使患者神经功能损伤。趋化因子是介导神经炎症相关重要因子之一,血清趋化因子配体 12(CXC Chemokine ligand 12, CXCL12)是趋化因子家族重要组成部分,可以发挥促进神经递质分泌、诱导脑神经细胞增殖作用,在脑组织损伤疾病进程中发挥重要作用^[3]。CXCL12 又被称为基质细胞衍生因子-1 α (Stromal cell derived factor-1 α SDF-1),SDF-1 α 为其亚型,由于其趋化活性可以与内皮祖细胞表面趋化生长因子受体 4(CXC chemokine receptor 4,CXCR4)受体进行特异性结合,可以调控脑组织损伤时内皮祖细胞迁移以及归巢过程^[4]。已有研究显示脑损伤神经功能改善主要与损伤病灶新生血管形成以及微血管结构关系密切,而这一过程主要由内皮祖细胞介导^[5]。本研究对我院近期颅脑损伤以及同期体检健康者血清 CXCL12、SDF-1 α 、CXCR4 以及随访结果进行分析,明确上述血清指标与患者预后之间关系。

1 资料和方法

1.1 一般资料

选择本院 2016 年 7 月至 2018 年 7 月收治 113 例颅脑损伤患者以及 113 例同期体检健康者为对象,分别作为脑损伤组以及健康组,纳入标准:①患者存在颅脑损伤,损伤后 1d 内到本院接受治疗,健康组无任何脑组织损伤疾病;②病情有影像检查如磁共振成像(Magnetic resonance imaging, MRI)、计算机断层扫描(Computed tomography, CT)检查证实;③所有患者及家属均已签署知情同意书,同时本实验已获得医院伦理会批准。排除

标准:①机体重要脏器功能障碍;②脑卒中以及脑出血史;③并发甲状腺疾病、感染疾病、糖尿病等疾病者;④入院前已经接受治疗患者;⑤中途退出研究者。脑损伤组男 66 例,女 47 例;年龄 15~82 岁,平均(51.35 \pm 5.78)岁。健康组男 62 例,女 51 例;年龄 19~88 岁,平均(51.66 \pm 5.91)岁,两组之间一般资料对比显示差异无统计学意义($P > 0.05$)。

1.2 方法

1.2.1 血清指标测定

脑损伤患者在入院第二天清晨、健康者在接受体检当日清晨收集肘静脉血离心后获得上清液进行后续测定,CXCL12、SDF-1 α 、CXCR4 分别采用酶联免疫吸附法测定。

1.2.2 mRS 评分评估

脑损伤患者在患者出院后 6 个月复查时进行改良 Rankin 评分(modified Rankin score, mRS)评估,健康者则是在体检后 6 个月通过随访进行 mRS 评估,脑损伤患者依据 mRS 评估结果判定预后情况,将 mRS 评分在 0-2 分和 3~6 分范围患者分别判定为预后良好组以及预后不佳组。

1.3 观察指标

比较两组血清指标水平与 mRS 评分,血清指标与 mRS 评分相关性,比较不同预后患者血清指标水平,分析血清指标对预后诊断价值。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 20.0 软件进行分析,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较用 t 检验,血清指标与 mRS 评分相关性采用 Pearson 相关性分析,血清指标对预后诊断价值采用 ROC 曲线分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组血清指标水平与 mRS 评分比较

脑损伤组 CXCL12、SDF-1 α 、CXCR4 水平以及 mRS 评分高于健康组,差异具有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

表1 两组血清指标水平与mRS评分比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Levels of serum indexes and mRS scores in the 2 groups ($\bar{x} \pm s$)

分组	n	CXCL12($\mu\text{g/mL}$)	SDF-1 α (pm/mL)	CXCR4($\mu\text{g/L}$)	mRS评分(分)
脑损伤组	113	3.96 \pm 1.15	1952.64 \pm 403.87	11.83 \pm 2.57	2.89 \pm 0.90
健康组	113	1.03 \pm 0.41	1265.34 \pm 315.22	0.84 \pm 0.12	0.51 \pm 0.08
t值	-	25.511	14.261	45.408	28.004
P值	-	0.000	0.000	0.000	0.000

2.2 血清指标与mRS评分相关性分析

血清CXCL12、SDF-1 α 、CXCR4与mRS评分正相关($r=0.346, 0.627, 0.561; P<0.05$)。

2.3 不同预后患者血清指标水平比较

预后良好组血清CXCL12、SDF-1 α 、CXCR4水平显著低于预后不良组,差异具有统计学意义($P<0.05$),见表2。

表2 不同预后患者血清指标水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Levels of serum indexes in patients with different prognosis ($\bar{x} \pm s$)

分组	n	CXCL12($\mu\text{g/mL}$)	SDF-1 α (pm/mL)	CXCR4($\mu\text{g/L}$)
预后良好组	86	3.67 \pm 1.22	891.84 \pm 164.77	11.83 \pm 1.57
预后不良组	27	4.83 \pm 1.32	1251.22 \pm 413.76	13.84 \pm 1.96
t值	-	6.860	8.578	8.508
P值	-	0.000	0.000	0.000

2.4 血清指标对预后诊断价值分析

血清指标CXCL12、SDF-1 α 、CXCR4最佳截断值分别为3.89 $\mu\text{g/mL}$ 、1267.53 pm/mL、11.82 $\mu\text{g/L}$, CXCL12指标AUC、敏感度、特异度分别为0.867、84.80%、88.52%, SDF-1 α 指标AUC、敏感度、特异度分别为0.789、84.89%、68.83%, CXCR4指标AUC、敏感度、特异度分别为0.712、81.22%、59.72%。见图1。

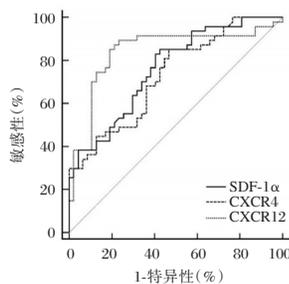


图1 ROC曲线

Figure 1 ROC curves

3 讨论

颅脑损伤患者常因为脑组织损伤导致颅脑出

现血氧不足以及水肿等症,其后较易出现各种并发症,导致此病死亡率极高,患者预后情况不佳。选取合适指标评估患者预后情况一直是临床研究者探究重点问题^[6]。CXCL12、CXCR4、SDF-1 α 为CXC趋化因子家族有关成员,CXCL12亦被称为SDF-1,其与CXCR4组成耦连分子对细胞具有重要调节作用,而SDF-1 α 作为SDF-1亚型可与CXCR4特异性结合,三者对脑损伤患者神经系统功能损伤以及修复中均发挥重要作用^[7-8]。

CXCL12主要存在于脑内皮细胞,经由介导造血祖细胞作用诱导损伤缺血病灶新生血管形成,组织损伤时,血小板被激活,CXCL12水平增加,通过诱导骨髓源性祖细胞和神经前体细胞参与炎症反应,诱使损伤血管以及组织修复^[9],所以脑损伤组CXCL12水平显著高于健康组。脑损伤动物实验显示,脑损伤病灶中CXCL12表达量上升,与CXCR4结合,影响损伤位置细胞行为,并参与炎症反应,这些炎症反应作用与病灶,加重脑组织损伤,这种作用与CXCL12水平成正比^[10],提示CXCL12水平越高,脑组织损伤越严重,患者预后越差,所以CXCL12水平与mRS评分正相关,ROC曲线分析得知,CXCL12指标AUC、敏感度、特异度分别为0.867、84.80%、88.52%,提示CXCL12对脑损伤患者预后情况诊断价值较高。

SDF-1 α 可以由机体星形胶质细胞、神经元细胞分泌,其同样具有趋化因子独有趋化活性,可以作用于内皮祖细胞表面,与分布于其上CXCR4特异性结合^[11]。但是另有研究认为SDF-1 α 对于神经组织修复作用主要经由与CXCR4结合抑制内皮祖细胞凋亡,同时诱导其增殖以及归巢,而内皮祖细胞在患者神经组织修复中发挥重要作用^[12]。吴芳等^[13]研究显示颅脑损伤患者SDF-1 α 水平可以有效反映患者脑损伤严重程度,水平低者脑损伤轻,预后情况较好,与本研究中SDF-1 α 水平与mRS评分相关性结果相似。ROC曲线显示,血清指标SDF-1 α 指标AUC、敏感度、特异度分别为

0.789、84.89%、68.83%，显示其可用于判断脑损伤患者预后。

CXCR4 作为 CXCL12 受体，与其组成 SDF-1/CXCR4 轴，在机体脑组织损伤发生时促进内皮祖细胞归巢至病灶区，诱导损伤部位血管新生，促进脑损伤后神经功能重建以及组织修复，所以脑组织损伤后其水平上升^[14]，这与本研究中脑损伤患者与健康者 CXCR4 水平基本一致。本研究中 SDF-1 α 水平与 mRS 评分正相关，同时比较不同预后患者 CXCR4 水平可知，预后良好组血清 CXCR4 水平显著低于预后不良组，分析原因可能是因为 CXCR4 周可以经由介导 CD34+ 对内皮祖细胞分化作用达到改善损伤器官功能、诱导血氧缺乏组织再生、减少损伤病灶面积作用，而脑组织损伤病灶面积不仅与患者功能恢复情况关系密切，还可以患者生存时间有关，显示 CXCR4 与患者预后关系密切^[15]。ROC 曲线同样显示 CXCR4 指标可用于评估脑损伤患者预后情况。

颅脑损伤患者血清 CXCL12、CXCR4、SDF-1 α 水平异常上升，且这种状态越严重，患者神经功能损伤越重，患者预后越差，可见三者与患者预后情况关系密切，可用于预测患者预后。

参考文献

- [1] 武晓灵, 喻莉, 龙鼎. suPAR 及 D-二聚体对创伤性颅脑损伤患者病情严重程度及预后的判断价值[J]. 实用医学杂志, 2017, 33(2):234-237.
- [2] 王文宏, 孔君, 林小祥, 等. b FGF 对颅脑损伤大鼠脑水肿、神经功能损伤及自噬相关蛋白表达的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2019, 35(2):136-141.
- [3] Lüke F, Blazquez R, Yamaci RF, et al. Isolated metastasis of an EGFR-L858R-mutated NSCLC of the meninges: the potential impact of CXCL12/CXCR4 axis in EGFRmut NSCLC in diagnosis, follow-up and treatment[J]. Oncotarget, 2018, 9(27):18844-18857.
- [4] Yamauchi Y, Safi S, Orschiéd L, et al. Low-dose photon irradiation induces invasiveness through the SDF-1 α /CXCR4 pathway in malignant mesothelioma cells [J]. Oncotarget, 2017, 8(40):68001-68011.
- [5] Lin Y, Luo L L, Sun J, et al. Relationship of Circulating CXCR4(+) EPC with Prognosis of Mild Traumatic Brain Injury Patients[J]. Aging Dis, 2017, 8(1):115-127.
- [6] Jiang W W, Wang Q H, Liao Y J, et al. Effects of dexmedetomidine on TNF- α and interleukin-2 in serum of rats with severe craniocerebral injury [J]. BMC Anesthesiol, 2017, 17(1):130-134.
- [7] Cheng Y, Qu J, Che X, et al. CXCL12/SDF-1 α induces migration via SRC-mediated CXCR4-EGFR cross-talk in gastric cancer cells[J]. Oncol Lett, 2017, 14(2):2103-2110.
- [8] Ma J C, Sun X W, Su H F, et al. Fibroblast-derived CXCL12/SDF-1 α promotes CXCL6 secretion and co-operatively enhances metastatic potential through the PI3K/Akt/m TOR pathway in colon cancer[J]. World J Gastroenterol, 2017, 23(28):141-152.
- [9] 曹晓雨, 刘庆新, 李莎, 等. 趋化因子 CXCL12 和可溶性血管细胞黏附因子 1 对短暂性脑缺血发作后短期缺血性脑卒中发生风险的预测价值研究[J]. 中国全科医学, 2018, 21(9):1053-1059.
- [10] 涂小丽, 吴延庆. 趋化因子 CXCL12/趋化因子受体 CXCR7 轴与心血管疾病的相关性[J]. 重庆医科大学学报, 2015, 40(4):481-484.
- [11] 马建华, 李鑫, 戴宜武. 脐血源神经干细胞在 SDF-1/CXCR4 趋化下对脑出血大鼠神经损伤恢复的作用[J]. 中华神经医学杂志, 2019, 18(4):344-350.
- [12] 张勇, 田仲兰, 何改平. 血清 CXCL12 和 IL-33 在急性缺血性脑卒中预后评估中的价值[J]. 中国免疫学杂志, 2017, 33(10):1539-1542.
- [13] 吴芳. 急性缺血性脑卒中老年患者血清脂肪型脂肪酸结合蛋白和趋化因子 CXCL12 水平及临床意义[J]. 中国老年学杂志, 2018, 38(18):14-16.
- [14] Gravina, Giovanni Luca, Mancini, Andrea, Marampon, Francesco, et al. The brain-penetrating CXCR4 antagonist, PRX177561, increases the antitumor effects of bevacizumab and sunitinib in preclinical models of human glioblastoma[J]. J Hematol Oncol, 10(1):5-20.
- [15] 朱炜楷, 沈会, 张朋新, 等. 电针对脑缺血再灌注大鼠脑缺血皮层区基质细胞衍生因子-1 α 表达的影响[J]. 针刺研究, 2019, 44(9):649-652+667.

病毒性肝炎血清标志物检测方法新进展

李轶春

[摘要] 病毒性肝炎以肝炎病毒为病原体,已明确5种肝炎病毒,分别为甲型肝炎病毒(HAV)、乙型肝炎病毒(HBV)、丙型肝炎病毒(HCV)、丁型肝炎病毒(HDV)、戊型肝炎病毒(HEV),其中HBV是双链DNA病毒,其他均是单链RNA病毒。当前,我国的病毒性肝炎具有较高发病率,较为突出的是HAV、HBV、HCV。本文介绍了HAV、HBV、HCV等3种病毒性肝炎血清标志物检测技术,以期给临床准确分型病毒性肝炎提供客观依据,在病毒性肝炎防治过程中发挥作用。

[关键词] 病毒性肝炎;血清;标志物

New progress in detection methods of viral hepatitis serum markers

LI Yichun

Beihai Hospital of Traditional Chinese Medicine Laboratory, Guangxi, 536000

[ABSTRACT] Viral hepatitis uses hepatitis virus as the pathogen. Five types of hepatitis viruses have been identified, namely hepatitis A virus (HAV), hepatitis B virus (HBV), and hepatitis C virus (hepatitis C virus (HCV), hepatitis D virus (HDV), hepatitis E virus (hepatitis E Virus, HEV). Among them, HBV is a double-stranded DNA virus, and the others are single-stranded RNA viruses. At present, my country's viral hepatitis has a high incidence, and the more prominent ones are HAV, HBV and HCV. At present, China has a high incidence of viral hepatitis, the more prominent are HAV, HBV, HCV. This article introduces the detection techniques of three viral hepatitis serum markers, including HAV, HBV, and HCV, in order to provide an objective basis for clinically accurate classification of viral hepatitis and play a role in the prevention and treatment of viral hepatitis.

[KEY WORDS] Viral hepatitis; Serum; Markers

病毒性肝炎是指由病毒引起的肝脏炎症,根据病原学分类将其分为甲型肝炎病毒(hepatitis A virus, HAV)、乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)、丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)、丁型肝炎病毒(hepatitis D virus, HDV)、戊型肝炎病毒(hepatitis E Virus, HEV)。病毒性肝炎大流行对生命、社区和卫生系统将会造成重大损失。据估计,全球每年有140万人死于急性感染以及与肝炎相关的肝癌和肝硬化,其中,大约47%是由HBV引起的,48%是由HCV引起的,其余是由HAV和HEV引起的^[1]。HBV感染是导致中国人群发生肝

癌的主要危险因素,目前,仍有930万慢性HBV感染者^[2],与HBV相关的肝癌患者约占所有肝癌患者的80%^[3-4]。预计到2030年全球将慢性肝炎感染率从目前的600~1000万例降低到90万例,将慢性肝炎年死亡率从140万例降低到50万例以下^[5]。此外,病毒性肝炎也是导致艾滋病毒感染死亡的一个日益严重的原因,同时感染艾滋病毒及HCV人数约达290万,260万人感染了HBV^[6]。病毒性肝炎是一项国际公共卫生挑战,因此,提高病毒性肝炎的诊断率,找到灵敏度高、特异性强的检测指标,对降低病毒性肝炎的发病

作者单位:北海市中医医院检验科,广西,北海 536000

通信作者:李轶春, E-mail: 782383597@qq.com

率、癌变率、致残致死率至关重要。在这篇综述中,笔者将总结目前关于病毒性肝炎的血清标志物及检测方法,旨在为临床筛查提供思路,以期早发现、早预防,早诊断、早治疗。

1 酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)

ELISA 是在免疫酶技术(immunoenzymatic techniques)的基础上发展起来的一种新型的免疫测定技术,具有灵敏、特异、简单、快速、稳定及易于自动化操作等特点。ELISA 过程包括抗原吸附在固相载体上(即包被),加待测抗体,加相应酶标记抗体,生成抗原-待测抗体-酶标记抗体的复合物,与该酶的底物反应生成有色产物。检测者采用分光光度计的光吸收计算抗体的量,并将待测抗体的定量与有色产生成正比。

2 时间分辨荧光免疫技术(Time-Resolved Fluoroimmunoassay, TRFIA)

TRFIA 是运用三价稀土离子及其螯合剂作为示踪物代替荧光物质、同位素或酶标记蛋白质、多肽、激素、抗体、核酸探针或生物活性细胞,当反应体系发生后用 TRF 仪器测定最后产物中荧光强度。根据荧光强度或相对荧光强度比值来判断反应体系被分析物的浓度达到定量分析之目的。通过利用镧系元素荧光物理特性,荧光激发后在固定时间段检测特异性荧光,而在此时间之前,非特异性荧光已完全衰减为 0,从而提高了检测的灵敏度,缩短了急性乙肝检测的“窗口期”。TRFIA 具有零本底、灵敏度高、线性范围宽、试剂有效期长、标准曲线稳定性好、易于自动化等特点。

3 电化学发光免疫分析法(Electro-Chemiluminescence Immunoassay, ECLIA)

ECLIA 主要在电极表面由电化学引发的特异性化学发光反应,是采用电化学发光剂三联吡啶钉标记 Ab 通过 Ag-Ab 反应和磁珠分离技术,根据三联吡啶钉在电极上发出的光强度对待测的 Ag 或 Ab 进行定量/定性,是继 TRFIA 之后的新一代标记免疫测定技术,是电化学发光和免疫测定相结合的产物,具有敏感度高、特异性强、重复性好、测定范围宽、试剂稳定、无毒害无污染、有效期长、操作简单、耗时短、易于自动化等特点。

4 化学发光微粒子免疫分析法(Chemiluminescent microparticle immunoassay, CMIA)

CMIA 分为小分子抗原物质的测定采用竞争法和大分子的抗原物质测定采用双抗体夹心法,主要包括两种反应过程:(1)竞争反应:用过量的包被磁颗粒的抗体,与待测的抗原和定量的标记吖啶酯抗原同时加入反应杯温育,其免疫反应的结合形式有两种,一是标记抗原与抗体结合成复合物;二是测定抗原与抗体的结合形式;(2)双抗体夹心法:标记抗体与被测抗原同时与包被抗体结合成一种反应形式,即包被抗体-测定抗原-发光抗体的复合物。

5 荧光定量聚合酶链反应(fluorescence quantitative polymerase chain reaction, FQPCR)

FQPCR 包括探针类和染料类两种,探针类是利用与靶序列特异杂交的探针来指导扩增产物的增加,其具有特异性好、灵敏度高、线性关系好、线性范围宽、操作简单、安全、自动化程度高、防污染、速度快、高通量等特点。染料类主要原理为当荧光共振能量转移,外来的光源激发供体荧光染料发出荧光,当其发射波长与受体荧光染料的吸收波长部分重叠,且两者的距离很近时,受体荧光染料吸收供体荧光传递的能量而激发出另一波长的荧光,同时将供体荧光淬灭。

6 免疫学方法检测技术在临床中的应用

黄旭华等人^[7]分别以 ELISA、胶体金法行免疫学检验 HAV,分析检验结果,研究结果显示,采用 ELISA 检测 HAV 的诊断准确率较高。邹锦群等人^[8]在 2017 年丰城市 300 人 5 种传染病抗体水平监测分析研究中采用 ELISA 检测 HAV 抗体,结果显示 HAV Ab 被检出的阳性率较高,侧面印证了 ELISA 用于检测 HAV 的临床可行性。黄妮姣等人^[9]分别用 ECLIA 和 ELISA 检测 HAV 抗体 IGM,以临床诊断为标准,比较并分析了阳性符合率,研究结果显示,ECLIA 检测 HAV-IgM 的敏感度为 62.5%、特异性为 100.0%、阳性检出率为 4.3%,ELISA 检测的敏感度为 100.0%、特异性为 71.3%、阳性检出率为 33.6%,通过结果可以看出,ECLIA 和 ELISA 两种检测方法对于检测 HAV 的一致性很低,但二者各有优势,ELISA 检测 HAV 的敏感度高,ECLIA 检测 HAV 的特异性强。此外,王峰蕾等

人^[10]参照美国临床和实验室标准化协会的 EP15-A2 文件和中国合格评定国家认可委员会的 CNAL-CL39 相关文献,对全自动酶联免疫分析仪测定 HAV-IgM 的精密度、检出限、正确度以及试剂盒的临界值进行验证,结果显示,阳性结果符合率为 100%,提示全自动酶联免疫分析仪检测方法更标准、规范,结果更客观。以上学者的研究均证实了 ELISA 检测法在 HAV 筛查中的广泛应用及特异性、敏感性。

焦阳等人^[11]探讨分别采用 ECLIA 和 ELISA 两种不同免疫检验方法检测 HBV 感染血清学标志物的临床对比情况,结果发现,ECLIA 检测 HBV 较 ELISA 检测的准确率高,但在阳性检出率的对比上差别不大。赵超芬^[12]对比用 ECLIA、ELISA 及 TRFIA 检测 HBV 标志物在诊断 HBV 中的应用价值,结果发现,使用 CLIA 法检测 HBsAg、HBsAb、HBeAg 的阳性检出率均为最高,使用 ELISA 法检测 HBeAb 的阳性检出率最高,使用 TRFIA 法检测 HBcAb 的阳性检出率最高,使用 TRFIA 法诊断 HBV 的灵敏度和特异度均高于用 ELISA 法,可以推测三种检测方法各有优势,临床中可根据患者的个体差异,选择不同的检测方法。王红翠等人^[13]探讨了化学发光法及 ELISA 法两种不同检测技术应用于乙型肝炎病毒核心抗体阳性率筛查中的临床价值及检测意义,结果发现化学发光法检测的阳性率更高,结果更准确,数据更客观真实,具有预测作用。上述结果表明 ECLIA 和 ELISA、CLIA 等检测方法在临床筛查 HBV 各有优势,应根据临床实际选择单独检测或联合检测。

薛海玲等人^[14]比较 CMIA 法、ELISA 法在 HCV 检测中的应用效果,结果发现,CMIA 法检测 HCV-Ab 阳性率为 100%,ELISA 法检测 HCV-Ab 阳性率为 76.32%,CMIA 法检测 HCV-Ab 的灵敏度高于 ELISA 法,CMIA 法与 ELISA 法检测 HCV-Ab 阳性一致率为 72.32%,总一致率为 92.21%,得出结论为 CMIA 法测定 HCV-Ab 的精密度、灵敏度、特异度、阳性预测值均较高。吴小文^[15]搜集 120 例 HCV 患者血清标本,分别采用 ELISA、ECLIA、荧光定量 PCR 法进行检测,观察并分析三种检验方法的检验结果,检测结果显示,采用 ELISA 检测 HCV 的阳性率为 73.33%,采用 ECLIA 检测 HCV 的阳性率为 75.00%,采用荧光定量 PCR 法检测 HCV 的阳性率为 90.83%,检测准确率均较高,但

仅有采用荧光定量 PCR 法检测 HCV 具有统计学意义。上述研究结果可以推测采用荧光定量 PCR 法检测 HCV 结果最佳。

近年来,病毒性肝炎血清标志物检测方法不断发展、更新。神经生长因子(Neural growth factor, NGF)含有两种非共价结合单体,每个单体都有四个带有极性氨基酸序列的环区和两条 β 链。在肝脏微环境中,NGF 在受损肝细胞中表达,参与对肝损伤的控制过程,主要是通过 p75NTR 对纤维化细胞发挥凋亡作用,并上调胆汁淤积性肝组织中的肝保护成分。Pereira^[16]的研究发现具有与正调节、结构保守和因子生理学相关的多态性变异的患者表现出与病毒载量和肝酶相反的行为,表明 NGF 和 p75NTR 在炎症和纤维化的不同阶段相互作用。Sun^[17]的研究发现循环蛋白有助于诊断与鉴别 HBV 及肝衰竭,评估肝功能异常和预测肝病结果,发现 HNF-1 α 和 HNF-4 α 两种肝核因子与肝功能相关,富含组氨酸的糖蛋白(histidine-rich glycoprotein, HRG)可反映机体免疫功能的强弱,为临床制定诊断方案及治疗策略提供数据。基于超声的弹性成像和血清指标已被单独验证为慢性病毒性肝炎肝纤维化分期的无创方法,Udompap^[18]以 HBV 或 HCV 单感染患者为研究对象,旨在比较病毒性肝炎患者瞬时弹性成像(transient elastography, TE)、剪切波弹性成像(shear wave elastography, SWE)、天冬氨酸转氨酶血小板指数和纤维化-4 指数(Fibrosis - 4, FIB4)与肝纤维化分期的准确性,结果发现,使用 M 或 XL 探针的超声心动图是一种极好的弹性成像技术,可无创地预测 HBV 或 HCV 患者的肝纤维化程度,特别是晚期纤维化和肝硬化患者。SWE 点可以作为排除晚期纤维化和肝硬化的辅助超声工具。虽然 FIB4 的诊断准确性低于某些弹性成像技术,但在医疗技术有限的情况下,FIB4 在临床上可用于排除肝硬化。Khodjaeva^[19]对 6589 例病毒性肝硬化患者进行 HBV 单次感染、HCV 感染和高密度脂蛋白重叠感染乙型肝炎表面抗原阳性肝硬化的流行病学调查,发现超过 80% 的 HBV 表面抗原阳性肝硬化患者存在高密度脂蛋白双重感染,高密度脂蛋白似乎是晚期病毒性肝病和青少年肝硬化的主要原因。循环自耗蛋白(Autotaxin, ATX)在肝病患者中升高,特别是在 HCV 病毒和丙型肝炎病毒/艾滋病感染的环境中,血浆 ATX 水平部分归因于纤维

化肝病继发的肝脏清除受损。Kostadinova^[20]发现血浆 ATX 与 HCV 和丙型肝炎病毒/艾滋病感染期间的系统免疫激活参数有关,在开始无干扰素直接作用抗病毒丙型肝炎病毒治疗的几个月内,ATX 水平部分正常化,这与非纤维化肝病导致 ATX 水平升高或丙型肝炎病毒介导的肝细胞活化一致。ATX、溶血磷脂酸和全身免疫激活参数之间的关系与丙型肝炎病毒感染、肝细胞癌等相关,认为 ATX 水平通常与 ATX 酶活性产物溶血磷脂酸的水平相关,是一种通过溶血磷脂酸受体传递信号的脂质介质;ATX-LPA 轴与丙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒/艾滋病感染环境中的系统性免疫激活相关;在慢性病毒感染期间,非纤维化和可逆成分导致 ATX 水平升高。Joanna^[21]对 138 例慢性丙型肝炎患者进行了戊聚糖 3(Pentosan 3, PTX3)与炎症活性和纤维化的生化和组织学参数的相关性研究,目的是探究 PTX3 检测 HCV 患者的临床显著纤维化的准确性,证实了 PTX3 作为显著纤维化的单一标志。

7 小结与展望

不同的免疫学检测技术适用于不同的病毒性肝炎分型,为了实现 2030 年彻底将病毒性肝炎这一疾病彻底根除的终极目标,临床医师、科研专家还需更加努力,不断提高检测技术水平,不断更新检测设备及试剂盒,规范检测流程。

参考文献

- [1] Bosh KA, Coyle JR, Hansen V, et al. HIV and viral hepatitis coinfection analysis using surveillance data from 15 US states and two cities[J]. *Epidemiol Inf*, 2018, 146(7):920-930.
- [2] Liu X, Baecker A, Wu M, et al. Family history of liver cancer may modify the association between HBV infection and liver cancer in a Chinese population[J]. *Liver Int*, 2019, 39(8):1490-1503.
- [3] Levin B. World Cancer Report 2014[J]. World Health Organization, 2015.
- [4] Lyu X, Liu K, Chen Y, et al. Analysis of Risk Factors Associated with the Development of Hepatocellular Carcinoma in Chronic HBV-Infected Chinese: A Meta-Analysis[J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2016, 13(6):604.
- [5] Cox A L, El-Sayed M H, Kao J H, et al. Progress towards elimination goals for viral hepatitis[J]. *Nature Rev Gastroenterol Hepatol*, 2020, 17(9):533-542.
- [6] Behzad, Dehghani, Ali, et al. Knowledge and Awareness Regarding Hepatitis B, Hepatitis C, and Human Immunodeficiency Viruses Among College Students: A Report From Iran[J]. *Int quarterly community health education*, 2020, 41(1):15-23.
- [7] 黄旭华. 感染性疾病甲肝、戊肝的免疫学检验[J]. *临床检验杂志(电子版)*, 2018, 7(4):731.
- [8] 邹锦群, 张华林, 周红明, 等. 2017 年丰城市 300 人 5 种传染病抗体水平监测分析[J]. *实验与检验医学*, 2020, 38(3):582-584, 606.
- [9] 黄妩姣, 薛元霞, 杨佩桦, 等. 电化学发光免疫分析和酶联免疫吸附试验检测甲型肝炎病毒 IgM 抗体的比较[J]. *现代医院*, 2016, 16(3):383-385.
- [10] 王峰蕾, 吴晓燕, 王志成. 全自动酶联免疫分析仪检测甲型肝炎病毒 IgM 抗体的性能验证[J]. *诊断学理论与实践*, 2020, 19(1):84-87.
- [11] 焦阳, 李靖. 化学发光免疫分析法与酶联免疫吸附测定法对 HBV 感染者血清乙肝标志物的检测效果比较[J]. *河南医学研究*, 2020, 29(17):3225-3226.
- [12] 赵超芬. 用三种免疫检验法检测乙型肝炎标志物在诊断乙型肝炎中的价值[J]. *当代医药论坛*, 2020, 18(7):183-184.
- [13] 王红翠, 林健聪, 吴英松, 等. 不同方法学测定乙型肝炎病毒核心抗体的阳性率及其定量检测意义的研究[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2018, 10(2):103-107, 114.
- [14] 薛海玲, 曾昭伟, 孙兰菊, 等. 化学发光微粒子免疫分析法、酶联免疫吸附法在丙肝病毒抗体检测中的应用对比观察[J]. *山东医药*, 2019, 59(21):46-50.
- [15] 吴小文. 不同检验方法用于丙型肝炎检验的临床对比分析[J]. *临床医学工程*, 2018, 25(1):69-70.
- [16] Pereira LMS, da Silva GAE, da Silva CSRS, et al. NGF (-198C>T, Ala35Val) and p75NTR (Ser205Leu) gene mutations are associated with liver function in different histopathological profiles of the patients with chronic viral hepatitis in the Brazilian Amazon[J]. *Mol Med*, 2020, 26(1):12.
- [17] Sun Z, Liu X, Wu D, et al. Circulating proteomic panels for diagnosis and risk stratification of acute-on-chronic liver failure in patients with viral hepatitis B[J]. *Theranostics*, 2019, 9(4):1200-1214.
- [18] Udombap P, Sukonrut K, Suvannarerg V, et al. Prospective comparison of transient elastography, point shear wave elastography, APRI and FIB-4 for staging liver fibrosis in chronic viral hepatitis[J]. *J Viral Hepatitis*, 2020, 27(4):437-448.
- [19] Khodjaeva M, Ibadullaeva N, Khikmatullaeva A, et al. The medical impact of hepatitis D virus infection in Uzbekistan[J]. *Liver Int*, 2019, 39(11):2077-2081.
- [20] Kostadinova L, Shive CL, Anthony DD. Elevated Autotaxin and LPA Levels during Chronic Viral Hepatitis and Hepatocellular Carcinoma Associate with Systemic Immune Activation[J]. *Cancers*, 2019, 11:1867.
- [21] Joanna, Gorka-Dynysiewicz, Monika, et al. Pentraxin 3 Detects Clinically Significant Fibrosis in Patients with Chronic Viral Hepatitis C[J]. *BioMed Res Int*, 2019, 2019:2639248.

结核分枝杆菌耐药基因突变检测试剂相关问题探讨

刘容枝* 方丽 徐超

世界卫生组织(world health organization, WHO)2017年全球结核病报告显示,中国结核病例的例数位居世界第三,并且是世界三大耐药结核病高发国家之一。耐药结核病指由耐药结核分枝杆菌引起的结核病。传统药敏试验是确诊耐药结核病的唯一方法,但其周期长,容易延误治疗。基于分子生物学方法的结核分枝杆菌耐药基因突变检测试剂(以下简称基因药敏试验)可快速检测结核分枝杆菌基因组中与特定耐药相关的基因突变,较快确定患者对某种特定结核药物的耐药性^[1-3]。

笔者长期从事结核分枝杆菌耐药基因突变检测试剂的技术审评工作。在本文中,笔者将总结分析该类试剂的临床应用价值和注册情况,同时对该类试剂设计研发时应重点关注的产品设计、主要原材料选择和性能评估等技术问题进行探讨,以期对生产企业进行相关试剂的注册申报进行技术指导。

1 该类试剂的临床使用场景

在临床实践中,临床机构使用该类试剂对来自确诊结核患者的临床样本培养物进行检测。如从临床样本培养物中检出结核分枝杆菌基因组中与某种结核药物耐药相关的基因突变,则提示提供该临床样本的结核病患者可能对该结核药物耐药,该结核病患者为对某种结核药物耐药的耐药结核病患者。

与传统药敏试验相比,基因药敏试验敏感性更高,操作更简单可行,且能更快获得结果。因此,基因药敏试验一经问世,即获得许多临床使用单位的青睐。目前临床可用的基因药敏试验试剂

多为一线结核药物耐药检测试剂。随着我国耐药结核病例的急剧增多,二线结核药物耐药结核病例也频见报道,临床急需二线结核药物基因药敏试验检测试剂^[4-5]。

2 该类试剂的注册情况

该类试剂采用分子生物学方法定性检测临床样本培养物中结核分枝杆菌基因组中与特定耐药相关的基因突变,用于耐药结核病的辅助诊断,便于临床医生合理选择结核药物。截至目前,经国家药品监督管理局批准的国产基因药敏试验试剂有9个,进口基因药敏试验试剂有3个,用于耐药性检测的药物类型主要为结核患者一线药物,包括利福平、异烟肼、链霉素和佛喹诺酮等。方法学主要包括线性杂交酶显色法、熔解曲线法、基因芯片法和一代测序法等。

3 该类试剂设计研发时应重点关注的技术问题

3.1 质控

为避免临床使用时假阴性和假阳性结果对患者的危害,应对该类试剂的检测过程进行有效质控。因此,该类试剂应设立内标、阴性对照和阳性对照,以对样本核酸分离纯化、配液及加样、试剂及仪器性能、扩增反应抑制物(管内抑制)、交叉污染和靶核酸降解等进行合理质控,避免出现假阴性或假阳性结果。内标、阴性对照和阳性对照均应参与样本核酸的平行提取纯化。

3.2 主要原材料研究

对于该类试剂而言,主要原材料主要为引物、探针、反应液和聚合酶。该类试剂一般可同时检

作者单位:国家药品监督管理局医疗器械技术审评中心,北京 100081

*通信作者:刘容枝, E-mail:liurz@cmde.org.cn

测多个基因突变位点。因此,产品设计时需设计多对引物和探针。如多对引物和探针存在于一个反应体系,则应在设计开发时着重验证不同引物探针对彼此的干扰。鉴于一般引物探针为外购,应提交对引物探针供应商的选择依据及研究数据。对于自制聚合酶,其生产工艺必须相对稳定,生产企业应建立稳定的自制聚合酶的工艺流程及质量标准。

3.3 企业参考品

企业参考品对该类试剂的质量控制至关重要。企业应建立科学合理的阳性参考品、阴性参考品、精密性参考品和最低检出限参考品。阳性参考品、最低检测限参考品和精密度参考品,应包括试剂声称的全部基因突变类型,且各参考品的突变类型需经过金标准方法或已上市同类分型试剂的确认。常见突变类型的上述参考品至少有1~2种突变类型采用菌株,其他突变类型的上述参考品可以采用含有突变的核酸。阴性参考品可采用经确认靶序列未发生突变的结核分枝杆菌菌株或试剂声称的其他无关突变类型的核酸等。

4 分析性能评估

分析性能评估资料是注册申报资料的重要技术文件。该类试剂的分析性能评估资料需要着重考虑最低检测限、分析特异性和配套核酸提取试剂的提取效率等。

扩增反应终体系中的突变序列百分率和总核酸浓度两个因素对最低检测限的影响较大,终体系中突变序列的百分率越高、所含的核酸量越多,则越容易检出。而终体系中的这两个因素是由临床样本中的结核分枝杆菌耐药菌与野生菌的含量和相对比例决定的。因此,在进行最低检出限研究时,应考虑100%耐药比例下,耐药菌株/突变核酸的最低检测浓度;同时,应考虑不同菌株/核酸浓度、各种耐药比例的最低检测限。

还应特别考虑申报产品的分析特异性,关注野生型序列是否会检出突变阳性,以及申报产品声称的全部突变类型间是否存在交叉。另外,还需对核酸序列具有同源性、易引起相同或相似临床症状、采样部位正常寄生或易并发的其他病原体进行交叉反应的验证。

另外,还需特别注意干扰物质对申报产品检测性能的影响。应考虑内源性干扰和外源性干扰。内源性干扰主要考虑临床样本中可能含有的物质对申报产品检测性能的影响,一般采用不含待检野生/突变靶标的相应临床样本进行试验。而外源性干扰则主要考虑外源性药物带来的干扰,包括异烟肼、利福平、抗生素和鼻腔喷雾剂或滴鼻剂等常见药物的干扰等。

鉴于核酸提取效率对申报产品的后续检测具有重要影响,生产企业还需考虑不同样本前处理方法和核酸提取纯化方法对申报产品检测性能的影响。如某种样本类型可采用几种方法进行样本前处理或采用几种方法进行核酸提取纯化,生产企业应提交适用的样本前处理方法或核酸提取纯化方法与后续试验配合进行的性能试验,以证明不同的样本前处理方法或核酸提取纯化方法不影响检测结果。

5 结论与展望

本文总结了结核分枝杆菌耐药基因突变检测试剂的临床应用价值和注册情况,并对该类试剂设计研发时应重点关注的产品设计、主要原材料选择和性能评估等技术问题进行探讨,以期对生产企业进行相关试剂的注册申报进行技术指导。生产企业应关注方法学本身的特点,不断优化原材料与体系设置,不断提高产品性能,确保产品满足临床使用需求。

参考文献

- [1] 马爱静,赵雁林. 耐药结核病的流行和监测现状[J]. 中国抗生素杂志, 2018, 43(5): 502-506.
- [2] 聂文娟,初乃惠. WHO 2014年版《耐药结核病规划管理指南伙伴手册》系列解读之七(耐多药与广泛耐药结核病的治疗)[J]. 中国防痨杂志, 2015, 37(7): 800-802.
- [3] 陆伟,傅衍勇. 我国耐药结核病控制的现状与展望[J]. 结核病与肺部健康杂志, 2016, 4(5): 259-261.
- [4] 施伎蝉,何贵清,宁洪叶,等. 结核分枝杆菌耐药基因芯片检测在复治肺结核患者中的应用价值[J]. 浙江医学, 2020, 21(42): 2283-2287+2304.
- [5] 郭志平,陈晓红,吴国兰,等. 基因芯片技术检测初治涂阴肺结核患者肺泡灌洗液的意义[J]. 临床合理用药杂志, 2019, 9(12): 119-120.

《分子诊断与治疗杂志》2020年第12卷总目次

述 评

- 原发性肝癌的分子诊断标记物研究进展,王凯,高帅(1):1
环状 RNA 在急性髓系白血病中的研究进展,张蕾,查显丰,温旺荣(2):123
CircRNA 在妇科肿瘤中的研究进展,郝辰璐,李智,陈彦竹,等(3):259
长链非编码 RNA GAS5 在动脉粥样硬化及相关疾病发生发展中的作用,韦贵将,杨峻,韦叶生(4):401
GNA13 在多种恶性肿瘤中的研究进展,朱伟力,马继伟,周赫,等(5):547
乙型肝炎病毒血清学标志物检测技术的发展历程,张学东,卢建华,王梦寒,等(6):693
冠心病风险评估模型构建的进展,吴孟娜,牟士艳,叶丹,等(7):839
髓系肿瘤胚系易患因素研究进展,聂代静,王芳,周晓苏,等(8):987
甲状腺髓样癌分子标志物研究现状,陈艳峰,张诠(9):1133
基因编辑及其在疾病治疗中的应用研究进展,华亮,朱冰(10):1281
Angio-OCT 在眼底疾病综合诊疗过程中的应用进展,钟莉婷,向武,钟燕凤,等(11):1429
我国 25-羟维生素 D 检测方法及其研究进展,潘晓芳,黄燕虹,朱秀霞,等(12):1591

COVID-19 专栏

- 新型冠状病毒实验室诊断技术进展,席婧媛,于广鑫,钱相君,等(3):265
新型冠状病毒 SARS-CoV-2 基因检测及其影像学对照,雷松菁,王刚平,周刚,等(3):270
2 种国产新型冠状病毒核酸检测试剂检测结果的比较与分析丁晓燕,柯志意,朱秀云,等(3):275
基于实时荧光 RT-PCR 的新型冠状病毒的不同标本类型核酸检测,周刚,李超,郑国栋,等(4):406
两种灭活方法对 2019 新型冠状病毒咽拭子标本病毒核酸检测结果的影响,姜蕾,张丽媛,刘大宁(4):410
15 例新型冠状病毒肺炎患者(COVID-19)的临床表现和 CT 影像学特征分析,陈少金,王晓霞,王立程,等(4):414
不同核酸提取试剂盒在新型冠状病毒核酸检测中的比较研究,马雯,张伟宏,马璞龙,等(5):552
1 例新冠肺炎合并常见呼吸道病原体共感染病例研究,黄永杰,李晓童,王桂珍,等(5):557
儿童新型冠状病毒肺炎 1 例临床检验结果启示,王仁峰,孙鹏,郝贵亮,等(5):561
新型冠状病毒肺炎患者实验室检测指标与免疫学特征分析,董艳迎,李妙羨,朱建宏,等(6):697
新型冠状病毒数字 PCR 检测方法建立,李彤,荆福祥,李宏志,等(7):843
新型冠状病毒实时荧光 RT-PCR 检测的性能验证,何吕芬,李沙,利振坤,等(7):848

论 著

- 耳聋基因突变检测国家参考品的研制,于婷,孙楠,曲守方,等(1):6
广州市地区 7 234 例新生儿耳聋基因突变分析,李玛,叶燕绸,何国伟,等(1):11
自贡地区 HBV 基因 BCP 区 1762/1764 及前 C 区 1896 位点突变与 HBV 相关性肝癌的相关性研究,邱顺华,张德文,刘勇(1):16
基于 Taqman 荧光 ARMS-PCR 技术检测 CYP3A5 基因多态性方法的建立,朱小亚,黄志文,蒋析文(1):22
贝赫切特综合征患者肠道菌群微生物宏基因组学分析,刘秀梅,张成伟,刘森(1):27
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,李小娟,曹劝省,汪砚雨(1):31
MG 患者外周血单个核细胞 TNIP1 蛋白、血清 AGR、血浆 PDGF 的变化与其病情程度的关系,刘新华,邓建中,范仲鹏(1):35
TGF- β 1、MMP-3 及 Collagen III 在 POP 患者子宫主韧带组织中的表达及意义,张凯,薛惠,张雪芹(1):39
一种国产血液核酸检测系统的性能验证研究,郑旭焱(1):44

- 携带 NDM-1 基因合并膜孔蛋白 OmpK36 缺失肺炎克雷伯菌耐药性分析,涂海健,黄亚雨,陈淑娟,等(1):49
脂蛋白相关磷酸酶 A2 和炎性蛋白在诊断脑梗死后血管性痴呆及判断预后中的应用,贾东佩,朱凤俊,任应国(1):55
非梗阻性无精子症患者 X 染色体连锁的 TEX11 基因多态性研究,罗招云,李绪杰,林芬,等(1):59
血常规参数、血浆 D-二聚体在败血症诊断及预后应用,徐玉秀,张成伟,鹿勇(1):64
mFOLFOX6 化疗联合射频消融治疗原发性肝癌的疗效及机制研究,符白玉,林怡,徐琪,等(1):69
miR-219a-5p 对皮肤鳞状细胞癌细胞凋亡的影响及机制,林永丽,杨灿,李艳(1):74
肺癌癌组织中 M2-PK 和 ENO1 的表达水平及其生存期的预测价值,范华颖,张家艳,方怡,等(1):79
膜联蛋白 A1、sd-LDL、Angptl2 与冠心病及对冠状动脉粥样硬化病变程度的诊断价值,吴威,衣欣,蒙奕兵,等(1):84
应用 QF-PCR 和 CNV-seq 以及染色体核型分析检测羊水的染色体畸变及结果分析,乔金平,胡文君,陈薇,等(1):89
血清 HMGB1、IGF-1、ficolin-3 在重症颅脑损伤患者中的表达及预后价值,洪明,赵蕾蕾,陈国金(1):93
血尿酸酶、CRP、Card9 蛋白在 AP 患者中的变化及其意义,王长起,李凯,索胜利(1):99
AMI 患者发病后血浆 UCA1、CK-MB、cTnI 变化及其诊断价值分析,肖丹丹,张勇,陈秀红,等(1):103
急性髓细胞白血病患儿 miR-126 表达水平与预后的关系研究,容蓉,班奕,周肖滢,等(1):108
一株红霉素耐药百日咳鲍特菌的完整基因组分析,于丹,栗东芳,袁林,等(1):113
一株红霉素耐药百日咳鲍特菌的完整基因组分析,于丹,栗东芳,袁林,等(2):133
WGA、RDB 结合 STR 单体型分析在 β -地中海贫血胚胎植入前遗传学诊断中的应用,李伍高,严提珍,李哲涛,等(2):138
甲基化荧光定量 PCR 快速检测自闭症男童中脆性 X 综合症的临床应用,陈剑虹,黄淑君,马健,等(2):142
海南地区 571 例男性感染 HPV 的基因型分布特点研究,吕家庆,胡俊杰,符生苗,等(2):146
血管内皮生长因子基因 936C/T 位点多态性与急性心肌梗死的关系,常亚伟,李赛,琚绍坦(2):151
重症高血压脑出血并发应激性胃溃疡影响因素及 GAS、MTL、SS、CCK-8、VIP 水平变化意义,尹宏,陈庆春,苏艳蓉,等(2):156
婴幼儿特异性皮炎血清 TlgE、sIgE 与病情的相关性研究,阮富旺,杨万勇,张志斌,等(2):161
血管癌样纤维组织细胞瘤病理诊断 2 例并文献复习,王芳,相龙全,王海庆,等(2):166
Taq DNA 聚合酶 5'-3'外切活性对荧光定量 PCR 的影响,蒋析文,刘霏珊,陈巍(2):170
miR-374a-3p 靶向 Syk 对 ox-LDL 诱导内皮细胞损伤及炎症反应的影响,冯自波,祝友鹏,张静(2):175
女性宫颈 HPV 感染与阴道局部 Th17 细胞免疫功能及血清因子的关系研究,王小花,俞岩,王茹(2):181
中晚期子宫颈鳞癌同步放化疗前后血清 E-cadherin、VEGF、nm23-H1 变化及预测价值,李改玲,任芳,冯巍(2):185
血清 CA153、CEA、SF、CT 及 Hcy 联合检测对乳腺癌的临床诊断价值,徐书星,霍庆赞,张明远,等(2):190
GAP-43 蛋白表达与小鼠心力衰竭发病相关性分析,王娜,陈玉善,刘蕾,等(2):195

- 血清 miR-200c 表达与 2 型糖尿病患者白蛋白尿短期进展的相关性研究,庄莘,杨锦,郑蛟,等(2):199
- 预后营养指数对胶质瘤患者预后的影响,徐日(2):203
- 缺血性脑卒中患者单个核细胞 TLR3、IRF-3、IFN- γ mRNA 表达及临床意义,李邦林,贾汉伟,李清,等(2):207
- 血清 hs-CRP、TGF- β 和 TLR4 水平对儿童急性细菌性肺炎的临床诊断价值,杨德彬,冯日昇,王玲玲,等(2):212
- TACE 联合射频消融对中期肝癌患者血清 GP73、AFP、AFP-L3 的影响,孟令武,李月圆,李志彬,等(2):217
- 合并 MS 冠心病患者细胞因子表达及临床意义,谢瑾,李红,罗浩(2):221
- PCOS 患者 GDF-9、BMP-15、BAX 表达特点及其与卵巢储备功能的相关性,程瑶瑶,李建辉,王淳,等(2):225
- 血清 NT-proBNP、D-二聚体、ST2 水平与 COPD 合并呼吸衰竭患者预后的相关性分析,孙彩玲,张华钊,孙淑红(2):229
- 子宫内膜异位症患者血清 TIMP-1、MCP-1、MMP-9 水平及与不孕的关系,顾晓荔,吴新华,姬梦鸽,等(2):234
- 抗苗勒管激素的单克隆抗体制备与鉴定,苏晓菱,李丽莹,李苗苗,等(2):239
- 冠心病患者冠状动脉 CT 特征与血清脂蛋白(a)、脂联素、PTX3 的相关性研究,周鹏,王烁,任艳玲(2):244
- 地中海贫血基因检测试剂盒抽验质量分析,张文新,于婷,孙楠,等(3):279
- 一种 PCR 检测耐甲氧西林金黄色葡萄球菌株新方法的建立,邢楣,符琳琳(3):283
- 血清 VEGF、pro-ADM 水平与老年呼吸机相关性肺炎病情严重程度及预后的关系,袁娟,白义春(3):287
- TB-DNA 和 IGRAs 对川西高原地区肺结核诊断的适用性分析,苟甜甜,向章朋,柳梦君,等(3):292
- 老年血液透析患者血清 hs-CRP、Fetuin-A 水平与心脏瓣膜钙化和血管钙化的关系,张曼,张京慧,温小军(3):296
- 尿酸和胰岛功能与 2 型糖尿病患者血液流变学相关性分析,杜金红,王中正,郭亚娜(3):300
- 重症 COPD 患者 IL-33/ST2 比值与血气指标、氧化应激反应程度的相关性分析,尹晶,陈文涛,郁毅刚(3):305
- miR-26b-3p 靶向调控 TRA2B 表达抑制神经胶质瘤细胞的增殖和转移,隋锐,张烨,姚冰,等(3):309
- β 溶血性链球菌根霉的鉴定及系统发育树构建,贾琴妹,满宝华(3):314
- 敲低 lncRNA DILC 对胶质瘤细胞体外生物学特性的影响,刘泉,王新军,王建业,等(3):319
- 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,路春梅,赵云刚,杨旭,等(3):323
- IGF-IR 与前列腺癌发生发展及预后的关系,冯国亮,张建伟,徐泉泉,等(3):327
- miR-421 靶向 PDCC4 促进前列腺癌 DU145 细胞增殖的实验研究,李作为,郭航,邓超,等(3):332
- 血清 IL-1 β 、IL-10、IFN- γ 在乳腺肿瘤定性诊断中价值及与预后相关性研究,郭琪,姚昶,郭宇飞(3):336
- CD3+ HLA-DR 细胞与早发性卵巢功能不全患者免疫紊乱及卵巢功能的关系,郭蜜甜,张继,王素梅(3):340
- RA 患者免疫功能失衡与疾病活动情况的关系研究,孟庆防(3):345
- CysC、Hcy、MPV、NT-proBNP 对 STEMI 术后再次狭窄的影响,邹延新,李妮妮,张月华(3):349
- 血清 β -HCG、P 及阴道超声评估在未破裂宫外孕诊断中的应用,颜雪萍,田圆,吴青京(3):353
- 狼疮性肾炎血清 MMP9、IFN- γ 与 HMGB1、TLR4 mRNA 的临床意义,鲁冰,任东升,陶雅非,等(3):358
- 膜性肾病患者 Angptl4、CTLA-4 及维生素 D 检测与凝血功能的相关性,贾利敏,赵翠,魏迪,等(3):362
- 血清 BUN、D-D、Lac、sCHE 水平对重症肺炎生存预测价值,张健昌,赖燕波,李盘石,等(3):366
- 热休克蛋白 A2、IGFBP-2 在胰腺癌患者的表达及与临床病理特征相关性,于洋,薛莹,仓顺东(3):371
- 氧化修饰高密度脂蛋白对大鼠颗粒细胞激素分泌的影响及相关机制,马金平,李红娟,李艳敏(3):376
- 结肠癌血清 IGF-1 水平及肿瘤组织中 VEGF-C、VEGFR-3 表达与淋巴结转移的相关性研究,杨秀成,于琼,巩林强,等(3):381
- 云南省婴儿期不同民族高非结合性胆红素血症 UGT1A1 基因多态性研究,奎莉越,王明英,周百灵,等(3):386
- 高灵敏度 HCV RNA 检测在术前筛查中的应用,何宇婷,陈雪芳,陈培松,等(4):419
- 乙醛脱氢酶 2 基因 Glu504Lys 多态性在汉族 2 型糖尿病人群中的分布特点,安宏亮,江海燕,张劲丰,等(4):423
- 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶基因突变永生性淋巴细胞系的建立,贾峥,张艳艳,孙楠,等(4):428
- 脓毒症患者循环 miR-21、miR-155 变化与炎症细胞因子和心功能障碍的相关性,贾启明,张涛,贺娜娜,等(4):433
- 快速检测洋葱伯克霍尔德菌巢式荧光定量 PCR 法建立,林雨英,邓穗燕,郭旭光(4):437
- 56 $^{\circ}$ C 加热灭活对流感病毒核酸检测结果影响的初步研究,周百灵,杨光能,陈俊伶,等(4):441
- 2 型糖尿病患者颈动脉中层内膜厚度与 hs-CRP、UAER 的相关性,谢军,孙媛媛,余其贵(4):445
- 血清中 OPG、TNF- α 和脂联素对妊娠期糖尿病的诊断分析,温洁,刘萍,郭蕊(4):450
- 类风湿关节炎炎发医院感染因素及 CRP、sCD14-ST 预测价值,孟庆防,郭冬芳,党箴,等(4):454
- 17 β -雌二醇对 rBMSCs 肝祖细胞定向分化及 Wnt 信号通路的调控作用,曾令锋,黄俊宇,熊瑶,等(4):459
- 成年 OSAHS 患者血清 MIF 水平与病情严重程度的相关性以及对并发脑梗死的预测价值,黄一苇,张昊,李灵真(4):464
- 急性呼吸窘迫综合征患者血清 PCT、NT-proBNP 水平变化及意义,杨慧亮,李颖,巴晓彤(4):469
- 人附睾蛋白 4 和趋化因子配体 9 在狼疮性肾炎诊断及预后的应用价值,魏华,张彩凤,王佳丽(4):473
- 宫颈鳞癌组织中 Survivin 的表达及其与患者临床病理特征的关系,额尔德木图,贾玉玲,秦晓玲,等(4):478
- 退行性心脏病膜病患者血清 LP(a)、OPN、IRF-4 表达及其临床意义,王俊华,崔勤涛,韩培立,等(4):483
- 血清 LBP、HSP70、DcR3 水平预测急性呼吸窘迫综合征患者疾病转归的价值,马玲玲,杨秋伟,孔汴躲(4):487
- 小儿重症肺炎不同病原抗原及抗体 IgM 抗体检测特点及流行趋势分析,陶珊(4):492
- SAA、sTREM-1、CRP/PAB 在 SP 患者全麻术后肺部感染的意义,孙媛,王欣,王莉(4):497
- 血清 TSP-1、PDGF 预测脑出血短期预后的临床价值,高阳阳,李骥腾(4):502
- 剖宫产产妇术后感染患者血清 TNF- α 、PCT、IL-1 β 水平的变化及其意义,仵晓峰,王冉,李宛玲(4):507
- 血清 β -hCG 和孕酮表达与妊娠剧吐患者甲状腺功能和胃动素相关性,李凤,鲁海峰,崔冰漪,等(4):511
- CysC、 α 1-MG 及 β 2-MG 在慢性阻塞性肺疾病患者的检测价值及与缺氧所致肾损伤的相关性,李海燕(4):516
- 老年 AML 患者在经地西他滨治疗中 COX-2、VEGF 及 p53 蛋白的表达及与预后关系,王战芳,张芳芳,杨海,等(4):520
- 外周血 CD40、CD40L 表达及血清 BAFF 水平对 ITP 患者疗效的预测价值,尹凤雷,尹娟,赵芳,等(4):525
- 乳头状肾细胞癌实性型 1 例报道并文献复习,王芳,相龙全,李倩,等(4):529
- 老年 COPD 伴严重呼吸衰竭患者血清 Cys C、VEGF、IL-17、ACTA 水平变化,曹婷婷,万俊,冯永海,等(4):533
- 利用荧光 PCR-毛细管电泳法评价微卫星不稳定性检测国家参考品,张文新,黄传峰,孙楠,等(5):565
- Prader-Willi 综合征及 Angelman 综合征的遗传学分析方案及广东的临床实践,汪安石,刘畅,王继成,等(5):570
- NLR、血清 CHE、Ang-1 与 ACI 患者病情变化的关系,陶珍,崔连奇,赵磊,等(5):575
- LA16c-313D11.11 与 miR-205-5p 在子宫内膜癌中的表达及意义,韩雪松,丁雪,赵鹏,等(5):579
- 结核感染致胸壁肿物的病原检测方法的比较研究,曾定科,赵健(5):583
- 益赛普联合柳氮磺吡啶治疗强直性脊柱炎疗效及 miR-29a、miR-146a 的变化,张诺,郭明蔚,陈桂武,等(5):587

- 高血压合并心功能不全对患者 CypP、GDF-15、IL-18 水平影响研究, 刘晓雨, 贾国伟, 孙荣国, 等(5):592
- miR-182-5p 调节细胞自噬促进胃癌细胞的增殖、迁移和侵袭, 相绿竹, 王晔, 陈文, 等(5):596
- miR-148a-3p 靶向 DLL4 基因影响婴幼儿血管瘤内皮细胞增殖和凋亡, 李海燕, 李凡(5):601
- 滑膜组织 Galectin-3、BMP-2 蛋白在骨关节炎患者中的表达及临床价值, 赵丽莉, 高宇, 梁焱, 等(5):606
- 大剂量红景天注射液治疗冠心病合并心力衰竭疗效及对患者血清 HCY、Gal-3、NT-proBNP 水平的影响, 张志亮, 张鑫, 高卫芳, 等(5):611
- 血清 EGFL7、MTA1 表达与鼻咽癌患者临床特征及预后的关系, 冯睡, 尹金淑, 谢洪, 等(5):616
- RDW、CHE 及 TEG 参数与重症肺炎机械通气治疗患者病情的关系, 卢仁辉, 刘培杰, 杜莎莎, 等(5):621
- FeNO 联合血清 ECP、IgE 检测对支气管哮喘的临床诊断价值, 买智涛, 姜明明, 万善志(5):625
- PCT、sICAM-1、sVCAM-1 在慢性肾小球肾炎合并细菌感染中的应用价值, 廖荣叶, 孙守萍, 曹志(5):629
- 溶栓治疗肺血栓栓塞症疗效及对凝血功能及 NF- κ B、ET-1 的影响, 郎哲, 何志红, 毕文森, 等(5):634
- FGF18 与骨性关节炎患者血清炎症细胞因子、脂肪细胞因子及骨关节炎严重程度的相关性, 胡彦彬, 王振东, 赵强, 等(5):639
- NLR、PLR 在甲状腺良性结节及自身免疫性甲状腺炎诊断中的应用价值, 洪文斌, 胡竑(5):643
- miR-223 和 miR-192 在重症肺炎患儿血清中的表达意义, 孙卉芳, 孙永发, 王丹凤(5):647
- 吞咽造影定量分析对卒中后吞咽障碍及功能的评估价值, 贺媛, 代欣, 梁雅慧, 等(5):651
- miR-93-5p 对心脏成纤维细胞纤维化的影响, 张伟峰, 雷素扬, 赵俊涛(5):656
- BAP1、Ki-67 表达与老年肺腺癌患者肿瘤侵袭及预后的关系, 安晓颖, 李晓霞, 陈宁, 等(5):661
- ICAM-1 含量对外循环心脏手术后急性肾损伤的预测价值, 李翠玲, 张红, 韩小虎(5):666
- 新生儿先天性甲状腺功能低下症筛查结果及流行病学特征分析, 许静, 王惠珍, 简亚娟(5):670
- PLGF、IL-6 与妊娠期高血压病情程度及母婴结局的相关性, 程惠, 周曙光(5):674
- HCY 与 2 型糖尿病合并冠心病患者心率变异性及心律失常的相关性研究, 刘松年, 伍星, 荆凌华(5):678
- AGR、补体 C3、C4 在 SLE 合并脑血管病中检测价值, 罗寰, 阮海玲, 陈苗苗, 等(5):683
- 非小细胞肺癌患者 ALK、ROS1 及 BRAF-V600E 基因突变与临床特征的相关性, 李华芳(6):701
- 液相芯片技术检测地中海贫血国家参考品, 张文新, 林卫萍, 孙楠, 等(6):705
- 中重度开放性颅脑损伤患者 CRP、D-D 与压力相关参数关系及预测预后价值, 孔羽, 罗永刚, 常天颖, 等(6):710
- 血清 Tenascin C 及 CADILLAC 危险评分与急诊急性心肌梗死相关性研究, 涂胜, 王莹, 刘飞, 等(6):715
- 307 例非缺失型 α -地贫的基因型及血液学特征分析, 洗嘉嘉, 何健淳, 王燕超, 等(6):720
- DNA 结合抑制因子 2、Rab5 基因在子宫内膜异位症患者中的表达及其意义, 陈豫中, 赖威, 张国安, 等(6):724
- miR-499、miR-16、肌红蛋白与常规心肌损伤标志物的关系及在急性心肌梗死早期诊断中的价值, 李刚, 朱春凯, 郑培明(6):728
- HBV 相关 ACLF 患者免疫功能及 IL-10 和 IL-32 与预后的相关性, 王少渊, 任旭, 李世红, 等(6):733
- 胞二磷胆碱联合血管通注射液治疗 ACI 患者疗效及其对血清 TLR4/NF- κ B 信号通路水平的作用, 肖淑红, 刘建浩, 王波海(6):737
- HBP、ADA、CHE 鉴别急性细菌性脑膜炎病原菌的价值及其与病情的关联性, 徐雪勤, 马永磊, 杨喜勇(6):741
- sTRAIL、PCT、ALB 在重症肝病合并感染患者外周血中的表达及临床意义, 徐萍, 伍廷平, 夏红, 等(6):746
- AAG、CD64 指数和 IL-10 对肺癌术后并发感染的预测价值及与转归情况关联性, 姜淮, 刘金, 张道忠, 等(6):751
- 血清 MMP-9 和 LCN-2 水平在乳腺癌患者中表达意义及相关性分析, 赵凌云(6):756
- circNT5E 通过调控 miR-506-3p 表达对结肠癌细胞迁移、侵袭和凋亡的影响, 孟凡迪, 徐勤鸿, 杨刚华, 等(6):760
- EOS-CRSwNP 与 Neu-CRSwNP 鼻粘膜组织 IL-13、血清 tIgE、外周血 EO% 和临床评分的比较及相关性研究, 马艳丽, 陈付华, 麻宁, 等(6):765
- 自发性早产的高危因素及血清 TLR2、MCP-1、TNF- α 水平的预测价值, 于哲, 张洛英, 潘大欢, 等(6):769
- 急性冠脉综合征患者 UA、NLRP3 水平与冠脉 SYNTAX 评分、斑块稳定性的相关性研究, 郑耐心, 唐国栋, 田正凤(6):773
- IFN- γ 、IL-6、sIL-2R 在初治型肺结核患者血清中的变化意义研究, 张信鸽, 刘新, 赵丹晖(6):777
- Fibroscan 弹性值与肝纤维化标志物在肝硬化患者中的关系及预后预测价值分析, 张文利, 董家琪, 周柱玉, 等(6):781
- 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, 孟兆伟, 王洪涛, 管唯唯(6):786
- IMT 联合血清 Lp-PLA2 在诊断动脉粥样硬化脑梗死与预测斑块稳定性的价值, 何丹青, 邱文倩, 牛居辉(6):790
- 中枢神经系统感染患儿血清 MMP-9、AQP4、PC 水平变化及其对 ICNS 的诊断价值, 赵芳丽, 杨媛洁, 陈相宏, 等(6):794
- 复发性流产孕妇血清 25(OH)D 水平与炎症因子、自身免疫抗体及 T 淋巴细胞亚群分布的相关性分析, 郝月兰, 刘辉, 吕明云, 等(6):799
- 宫颈癌患者组织 β -catenin、Wnt1 表达及与新辅助化疗疗效的关系, 谭建媛, 阳莉, 罗安莉(6):803
- miR-26a 靶向 ADAM10 对类风湿关节炎滑膜成纤维细胞增殖及迁移的影响, 于守杰, 张振春, 厉彦山, 等(6):808
- miRNA-193b、Lp-PLA2、miR-146a 与阿尔茨海默病严重程度的关系及预测疗效的价值, 尚晓峰, 冉秀荣, 李虹(6):813
- β 2-MG、Hcy、Cys-C 检测在 2 型糖尿病视网膜病变诊断中的价值, 陈斌, 齐晓玲, 徐礼五, 等(6):818
- 下调 miR-9 对 LPS 诱导的大鼠心肌细胞炎症因子分泌的影响和机制, 李媛莉, 赵继波, 张三明(6):822
- SLE 及 LN 患者血清 CIq 的表达水平及意义, 张明娇, 吴勇(6):827
- 恩必普治疗对 ICVD 患者血液流变学、血清 chemerin 和 Hcy 水平的影响, 王丽轩, 洪震, 张乐国, 等(6):831
- EDA 基因外显子缺失所致外胚层发育不良家系的基因型研究及产前诊断, 丁珂珂, 余丽华, 曾玉坤, 等(7):852
- 子宫颈癌血清 HPV-E7、CD105、YKL-40 水平表达与病理特征及预后的相关性分析, 肖虹, 潘晓蕾, 赵丽颖, 等(7):856
- 不同基因型 HCV 感染患者重叠 HBV 或 HIV 感染的病毒学特征, 彭亚柏, 朱秀云, 刘赛云, 等(7):861
- 下调 lncRNA HCG18 靶向调控 miR-34a 影响口腔鳞癌 SCC4 细胞增殖、侵袭以及迁移的分子机制, 丁延晶, 王立新, 邱静怡, 等(7):864
- 心外科 ICU 患者术后感染血清降钙素原、PSGL-1、sICAM-1 与心肌肌钙蛋白 I 的变化及意义, 赵俊娅, 王珂, 乔博, 等(7):869
- 外周血与骨髓组织髓系来源抑制细胞在多发骨髓瘤患者诊断中的价值比较, 张睿婷, 方雯, 周雅莹, 等(7):874
- 体液免疫功能、血清 sIL-6R 水平和血沉的检测在儿童 CA-MPP 病情变化和疗效评估中的应用, 陈建州, 吴云刚, 张辉(7):878
- 宫颈癌患者血清 E-cad、IFN- γ 、TGF- β 表达意义及对预后的影响, 李晓茵, 吴雪薇, 卢智健, 等(7):882
- LASPI、GSTA3 在鼻咽癌组织中的表达及与复发、转移的关系, 杜伟一, 陈淑莲, 李国强(7):887
- let-7d-5p 调控 HPV16 阳性宫颈癌细胞侵袭、迁移及凋亡的分子机制, 张鹏飞, 周保成, 周哲, 等(7):892
- RNAi 下调 CCT8 抑制非小细胞肺癌 A549 细胞转移潜能, 朱迎伟, 褚旭, 邱家勇, 等(7):897
- 血清 TK1、VEGF 和 AFP 检测对原发性肝癌诊断及预后评估的价值, 胡燕红, 顾艳红, 王新梅(7):901
- 血清和尿素水平与 PCOS 患者糖代谢相关指标水平的关系研究, 张先锋, 肖丹, 郭佳(7):905
- GnRH- α 联合 LNG-IUS 对子宫内膜异位症患者血清 ENA-78 及 MCP-1 水平的影响, 马雪莲, 李海燕(7):910
- miR-155-5p 靶向 FNDC3B 基因通过 NF- κ B 信号通路调控骨关节炎软骨细胞增殖和凋亡, 谢进, 舒莉莉, 苏虔, 等(7):914

- 胃癌患者 TNS1 蛋白、PDK-1 蛋白阳性表达意义及与临床病理特征、预后的相关性,李伟伟,杨庆辉,蔡卫梅(7):919
- IL-8、IL-6、hs-CRP 在缺血性脑血管病手术前后表达变化及临床价值,任英巧,李占增,伍淑玲,等(7):923
- 大脑后动脉瘤破裂危险多因素及其治疗结果分析,陈解南,周新卫,彭冬红,等(7):928
- EMT 不孕患者血清 AcrAb、Sp17Ab 水平,唐媛,刘小娟,刘秀丽,等(7):932
- 血清 PTX-3、CTRP9、MIF 水平与缺血性脑卒中患者神经功能及短期预后的关系,袁大华,杜朴,王玉凯(7):935
- Lp-PLA2、Hcy 及 S100 β 对缺血性脑卒中后 VD 的预测价值研究,韩玉华,周俐红,李艳丽(7):940
- TCT、HR-HPV 配合阴道镜下宫颈活检在宫颈癌临床诊断中的价值,杨东斌(7):944
- 冠心病心绞痛患者经冠心舒通胶囊治疗后 Hcy、FIB 和 CRP 的变化,戴艺,刘丽,欧燕,等(7):948
- RDW、DD 联合抗 CCP 抗体检测对 RA 诊断及病情活动的价值分析,杨波,徐磊,贾伟,等(7):952
- 血清 E2、PINP 水平对绝经后骨质疏松性腰椎骨折风险的预测价值,方兵,程翰林,虞红林,等(7):956
- 体外诊断试剂创新产品临床试验对比方法选择及案例解析,徐超,方丽,李冉(7):960
- PCT、CRP 在肺炎支原体肺炎患儿中的表达及与 MP-IgM 抗体的关系,纵雪峰,种丽芳,刘道路,等(7):964
- miR-142-5p 对癫痫发作后神经元损伤的作用机制,赵利,李海燕(7):968
- 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,张文新,于婷,孙楠,等(8):991
- 采用二代测序对 Marfan 综合征家系进行植入前遗传学诊断,何天文,卢建,陈创奇,等(8):995
- 胃癌根治术预后相关因素的研究,李立新,蔡翠芳,李文祥,等(8):1001
- E6 流式细胞仪检测 CD34+ 细胞百分比和绝对计数方法的建立,付笑迎,张小玲,刘梦桐,等(8):1005
- 急性淋巴细胞白血病患者血清 TK1 及 E-cadherin 蛋白表达水平及意义,邢东文,张余转,林坚,等(8):1010
- 非小细胞肺癌患者癌组织及血清中 circRNA 的表达水平及临床意义,杨桃权,张千仕,范习刚,等(8):1014
- CK-MB、cTnI、冠脉造影及心电图联合诊断急性心肌梗死价值研究,常琳,常佩云,刘娟(8):1018
- miR-126、miR-96 与急性心肌梗死患者血小板活化及近期预后相关性,刘汉毅,杜小杰,王金墙,等(8):1022
- RDW 对高血压并发房颤的诊断预测,裴存新,胡剑平,余林,等(8):1026
- 颈动脉粥样硬化患者中血清 Lp-PLA2、CD147 的表达及意义,谭红,朱红霞,张可帅(8):1030
- hs-CRP、NF- κ B、VCAM-1 与缺血性脑血管病病情及预后关系,李占增,任英巧,伍淑玲,等(8):1034
- 前白蛋白和降钙素原在新生儿高胆红素血症中的表达及与心肌酶谱的相关性,汪灵芝,贾文婷,张苗苗(8):1039
- 孕妇血清抑制素 A 联合胎盘生长因子在孕早期唐氏综合征产前筛查中的预测价值,黄雪珍,陈倩岚,蔡锦梅,等(8):1044
- 鼻咽癌组织中 SATB1 表达与化疗耐药及预后的关系分析,杨和强,刘文峰,胡玥(8):1047
- 脐血 TGF- β 1、Treg 细胞数量水平对早产儿支气管肺发育不良的预测价值,林晴晴,谭卉晗,吴永芳,等(8):1052
- 轴突生长抑制因子 A、核因子- κ B p65 对急性高血压脑出血患者病情及预后的评估,尹艳霞,尚文俊,郭华,等(8):1056
- CCL18、MIF mRNA、HIF-1 α 在人脑胶质瘤中的表达及预后评估价值,吕超,孙慧渊,闫俊飞(8):1060
- CRP、PCT 联合肺部感染评分在 ICU 肺部感染诊断及预后中的应用价值,黄杨,张磊,郭伟(8):1064
- 肺炎支原体感染合并川崎病患儿血清 IL-6、IL-8 及 IL-10 水平与冠状动脉损伤的相关性,郭璇,宋瑶,阿不来提·阿不都哈尔(8):1069
- 血清 PAPP-A、free β -hCG 及 PLGF 联合检测在孕早期唐氏综合征筛查诊断中的应用价值,贾广珠,王恒会,王丽等(8):1073
- Th1/Th2 及相关细胞因子 IFN- γ 、IL-10 在无痛分娩中的变化及意义,张海艳,王占晖,刘钦文(8):1077
- 血浆 CD64、PCT 及 hs-CRP 水平在急性白血病化疗后合并细菌感染预后评估,李萨萨,杨友卫,武琳琳,等(8):1082
- 星形细胞瘤组织 EGFR、VEGF 表达及其与病理分级的相关性研究,张弛,袁健,彭刚,等(8):1086
- 食管癌组织中 PD-L1、Vim、Zeb1 的表达与放疗敏感性的关系分析,付江萍,蓝柳,胡芳,等(8):1090
- 硫酸特布他林联合布地奈德雾化对支气管肺炎患儿临床治疗效果分析,韩梅,宋华,张伟,等(8):1095
- 重症 MPP 患儿 D-D、CRP、PAF 及血小板参数测定的临床意义,赵娜,郑华月,乔瑞君(8):1099
- miR-182-5p 通过 HOXB7 基因调控膀胱癌细胞的增殖和侵袭迁移,肖飞,辛士永,邵长帅,等(8):1103
- 血清 CYR61、IGF-1 水平对胫骨平台骨折术后愈合延迟的预测价值,郑海亮,刘晶(8):1108
- 婴儿型炎症性肠病 1 例并文献分析,杨志,王玲,孙子发,等(8):1112
- 呼出一氧化氮与支气管哮喘患者外周嗜酸性粒细胞相关性及其联合检测价值,江银玲,杨万春,沈欣(8):1115
- 急性脑梗死合并医院获得性肺炎患者的病原菌分布变迁情况及耐药性分析,田敬华,杨品娜,高翔,等(8):1119
- 关节液 AD-1、SDF-1、sICAM-1 对人工肱骨头置换术后感染的诊断价值及与术后康复的关系,徐兵,汪华清,黄强开,等(8):1124
- 人类白细胞抗原 B5801/5701/1502 核酸检测国家参考品的建立,胡泽斌,孙彬裕,高飞,等(9):1137
- 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,肖永平,李庆科,王兴昌,等(9):1142
- 佛山市 9 236 例孕产妇 301 型地中海贫血基因检测结果分析,杨发达,高维鸿,梁丽莹,等(9):1147
- 肾病综合征患者血清 IgG、IgM、IgA 水平变化及临床意义,杨全,赵蓉苑,李跃昌,等(9):1152
- 血清 Anti-CCP 抗体、RF 和 hs-CRP 检测对 RA 的诊断价值分析,卜文君,邵从军,胡恒贵(9):1155
- 血清 miR-370-5p、tPSA、fPSA 联合检测对前列腺癌的诊断价值,王金乐,张蓉,宋梦,等(9):1159
- 弥漫大 B 细胞淋巴瘤患者 PD-L1/PD-L2 表达水平与临床病理及预后的关系,禹环,符丽梅(9):1163
- IL-6、肿瘤坏死因子 α 及 CRP 对下肢创伤患者合并感染的预测价值分析,吴俊学,李毓灵,陈路(9):1167
- 高频超声、血清 TPO-Ab 对不同性质甲状腺结节诊断的价值分析,马纯华,黄物,郑丹慧(9):1171
- ACE 基因 rs4344 多态性及环境因素与海口市汉族人群脑梗死关联研究,侯丹,余丹,杨国帅,等(9):1175
- 肺癌患者手术前后血清 Lp-PLA2、CYfra21-1、VEGF-C 变化及临床意义,茹玉航,王林,宋焕(9):1179
- 单核细胞高密度脂蛋白比值、血清尿酸水平与冠心病患者冠脉狭窄程度的相关性,郎勇,冉迅,屈模英(9):1184
- 慢性自发性荨麻疹患者斑贴试验结果分析,张振东,范苗静,王伟,等(9):1187
- 血清胎盘生长因子水平与子痫前期胎儿生长受限的关联性,万雪花,马爱娟(9):1192
- L-选择素、降钙素原、波状蛋白在脓毒症患者中表达及意义,胡仕静,潘爱军,梅清(9):1195
- 绿色环保型血清补体抑制剂聚天冬氨酸(钠)在免疫检测试剂中的应用,陈立勇,刘仁源,张瑜(9):1200
- 血清 TLR2、TLR4 水平与 2 型糖尿病患者肾功能及炎症状态的关系分析,华燕,武金文,刘欣(9):1204
- 肝癌切除术前患者血清 sP-selectin、sICAM-1 水平变化及其临床意义,肖贵奇,王铮,杨勤玲,等(9):1208
- 调节性 B 细胞和转铁蛋白受体 1 在子宫内腺癌中的表达及其临床价值分析,蒋莹,戴军霞(9):1213
- 彩色多普勒超声联合血清 CA15-3、CYFRA21-1、miR-20b-5p 在早期乳腺癌诊断中的应用,吴强,谭蜀川,向伦祥,等(9):1217
- 胃癌患者手术前后血清 VEGF、MMP-2、MMP-9 水平变化及其临床意义,董磊,夏猛,尚康兴,等(9):1221
- 血清 CYfra21-1、LDH、NSE 水平检测在肺癌患者辅助诊断中的应用,王宇琛,章春芝,王大伟,等(9):1226

- 血清 HbA1c、INS 在 T2DM 并发高尿酸血症的表达意义及相关性,吴斌,许婧(9):1230
- 乳腺癌组织中 LAPTM4B、dCTP 焦磷酸酶的表达水平及临床意义,李辉,潘武,黄有成(9):1234
- H 型高血压患者血清 Hcy、Cyst-C 与血管内皮功能的相关性,罗婉丽,赵秋平,刘荣梅,等(9):1238
- 多模态超声对于乳腺癌不同 BI-RADS 分类诊断的价值及与分子分型的关系,任少杰,姜菊,吕洪兵(9):1242
- TPG 对 HaCaT 细胞增殖、凋亡、细胞周期及 miR-320/RASA1 表达的影响,陈怡,朱颜俊,玉树(9):1246
- miR-155、miR-26a 对 T2DM 患者脂代谢、血管并发症的影响,严宇,操炎庆,程锦(9):1251
- 强直性脊柱炎患者检测 HLA-B27、ASO 及免疫球蛋白表达的临床意义,陆锡平,王科,张庆祥,等(9):1256
- 乳腺癌组织中 VWCE、MEKK3 的表达水平与临床病理、预后的关系分析,李远平,刘勋,祝琴(9):1260
- 乳腺癌中 lncRNA ITGA9-AS1 表达与病理特征及新辅助化疗疗效的关系,孙少甫,潘亚军,荣春(9):1264
- Hp 感染对强直性脊柱炎患者 α 1-AG、CRP、ESR 水平及胃肠道功能的影响,刘永华,季爱玉(9):1268
- FDC 联合左氧氟沙星治疗复治涂阳肺结核的疗效分析,魏华生,潘虹池,冉梅,等(9):1272
- 人类白细胞抗原 B27 核酸检测国家参考品的建立,胡泽斌,高飞,孙楠等(10):1285
- 早孕期流产胚胎组织 MLPA 检测结果及与年龄和孕周的关系分析,陈杏园,罗世强,王秋华,等(10):1289
- 1 例基因 KIF1A 错义突变致常染色体显性智力障碍 9 型病例报道,沈茹,蒋鸿超,吴建敏,等(10):1294
- 血 CTCs、cfDNA 检测在乳腺癌中的应用,常立伟,杨东炜,刘东辰(10):1298
- 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,王娜,王英,万里新,等(10):1303
- 慢性乙型肝炎患者外周血中 sFGL2 检测的临床意义,洪晓绿,潘小平,徐沛演,等(10):1307
- 羊水穿刺在产前筛查无创高风险病例中染色体异常的产前诊断价值,刘慧,方慧琴,陈薇,等(10):1311
- 脓毒症患者 Th1/Th2 细胞失衡与疾病严重程度、肺损伤的关系,陈丽君,王佳,张文静(10):1315
- 肺癌患者血清 miRNA-4534 水平和病理分期与预后的关系,杨寿艳,邓彬兵,孟雄,等(10):1319
- 血清钙离子、ALP 及 CYFRA21-1 对肺癌早期骨转移的预测价值,赵车冬,徐倩,马婧,等(10):1323
- β -arrestin2、RBP4 及 FGF-21 在 2 型糖尿病患者中的表达及与糖脂代谢的关系研究,李刚,籍胤玺,冯延冰,等(10):1328
- 外周血 miR-23b-3p 表达水平对重症肺炎患儿病情及预后的评估价值,吴英,刘成桂(10):1332
- PCOS 患者 IL-17A、Betatrophin、可溶性 CD68 表达水平及与卵巢功能的关系,席彦东,沈自旺,白虹(10):1336
- OSAHS 患者 ADMA、25 羟维生素 D 和 BMI 变化及其与疾病严重程度相关性研究,谭晓纯,尹凤先(10):1341
- hrHPV E6/E7 mRNA 载量水平与宫颈癌前病变的相关性分析,郭晨辉,徐小晶,孔薇,等(10):1345
- 血清 25-羟基维生素 D、IL-17 水平与糖尿病视网膜病变的关系分析,孙晓菲,范慧洁,田勇(10):1349
- 血清 CTRP1、尿酸水平在冠心病临床诊断中的应用价值,王正飞,杨龙,兰占占,等(10):1353
- ASF1B 对子宫内腺癌细胞恶性行为的影响及相关机制,白驹,斗泽加(10):1357
- CD56 表达与甲状腺乳头状癌临床病理特征的关系及对远处转移的预测价值,许超,盛以泉,葛丽卫,等(10):1363
- HIF-1 α 、VEGF 及 TIMP 与心脏瓣膜置换术后并发压力性损伤的相关性研究,申荣华,谢静,刘燕,等(10):1367
- SD/CRL 比值联合血 β -HCG、E2 水平对 IVF/ICSI-ET 早期流产的预测价值,芦爱华,赵永新,李洁,等(10):1371
- 下调 miR-4262 抑制肺癌细胞 A549 转移潜能的机制,朱丽,龚波(10):1375
- 先天性甲状腺功能减低症患儿 IGF-1、IGFBP-3 及 Hcy 水平变化及临床意义,唐容华,李琴,陈晓蓉,等(10):1380
- CD64 结合血常规在重症患者感染性发热与非感染性发热诊断及鉴别诊断中的应用,杜向阳,张文英,闫琳(10):1384
- 血清 AT-III、Lp-PLA2 水平与急性冠脉综合征患者冠脉狭窄程度的关系分析,李燕平,李雪,王珍(10):1388
- 盐酸羟考酮负调控 lncRNA LINC01857 抑制宫颈癌细胞 Siha 增殖、迁移及侵袭,张秀双,徐铭军,车向明,等(10):1392
- 基于血清 NAG、NGAL、LFABP 的风险评分模型对老年重度乙肝患者肝肾综合症的预测价值,杨鑫,刘小静,陈云茹,等(10):1397
- miRNA-320a、hTcf-4、 β -catenin 在肝癌组织的表达及临床意义,祁蕙燕,郭剑,程燕莉(10):1401
- 胱抑素 C 和肾积液 CT 值在尿路结石梗阻性肾积脓患者中的临床意义,郭亮,徐鹏程,胡恒龙(10):1406
- 北京市海淀区女性人乳头瘤病毒感染结果分析,王海滨,张冬青,赵娟(10):1411
- 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,胡超勇,邹华伟,高鹏芝(10):1415
- miR-22-3p 对 IL-1 β 诱导软骨细胞损伤的影响及其机制研究,李巍,冯胜华,赵景明(10):1419
- 胎儿染色体非整倍体(T21、T18、T13)检测试剂盒(探针杂交法)的评价,张文新,于婷,贾峥,等(11):1434
- 湖北汉族人群 ALK、EGFR 和 ROS1 基因多态性与非小细胞肺癌易感性相关分析,沈智俊,刘世国(11):1439
- 深圳龙华地区 β -地中海贫血基因型与红细胞参数分析,刘运洪,崔晓阳,魏晓珠,等(11):1443
- TCZ 治疗对 sJIA 患儿外周血 Th17/Treg、炎症指标的影响,王娟娟,何孝亮,陈雨青(11):1448
- 小儿视网膜母细胞瘤 VEGF、Cyclin D1 及 E-Cadherin 表达及与组织病理特征的关系,汪岭,马雪莲,王启明(11):1452
- CML、Asprosin 与 2 型糖尿病患者颈动脉粥样硬化的关系,刘书苑,陈小敏(11):1457
- 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,吴鲲鹏,韦程,何同(11):1461
- 乳腺癌患者外周血 miR-34a 表达变化的临床意义,王庆月,张晨辉,陈钰(11):1466
- 腹型肥胖者外周血 miR-21 表达与代谢紊乱及糖尿病发病风险的关系,万红,燕树勋,王娟,等(11):1470
- 副溶血性弧菌质粒 DNA 参考物质的研制,林晓峰,努热提·阿布都沙拉木,袁睿云,等(11):1474
- 直肠癌患者 BRMS1mRNA、PTNmRNA 的表达及临床意义,马欢,焦英华,李曙光,等(11):1479
- 宫颈病变与 Treg 转录因子表达及细胞因子水平的关系,梅琳琳,王雅莉,田晓娜,等(11):1484
- 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,文采,肖明娜,朴善英(11):1488
- 急性心肌梗死患者术前 A/G、NT-proBNP 在 PCI 术后预后中的评估价值分析,张佩雯,吴胜福,陈文君(11):1493
- 血清凋亡分子 caspase-3、P53 与突发性耳聋病情及治疗效果的相关性,王智超,乐海桂(11):1497
- RDW 在 COPD 患者并发不同程度肺动脉高压的表达及相关性,梁彩妮,廖永城,邱宇,等(11):1501
- N-Osrteoc、 β -Crosslaps、TPINP 在鼻咽癌放疗后骨转移中诊断及预后中的价值,王林,纪东,许全一(11):1505
- 急性脑梗死患者血清 Caspase-3 含量与早期神经功能恶化的相关性研究,揣兰香,邢效如,孙志,等(11):1510
- 硫酸镁联合盐酸利托君治疗未足月早产胎膜早破的临床价值分析,刘婧,刘妮英,蒋依伶(11):1514
- 肝癌患者手术前后血清 AFP、 γ -GT、ApoA1 水平变化及临床意义,黄庆国,汤鸿,李鹏泽,等(11):1518
- OSAHS 患者相关炎症因子的表达与动脉粥样硬化的相关性分析,班健,罗雁,韦圳原(11):1522
- 大面积脑梗死患者外周血 Th1、Th2、Th17、Treg 细胞水平变化及意义,刘磊,董海,何仲春,等(11):1527
- 血清 IL-6、sICAM-1 在新生儿肺炎细菌性感染鉴别诊断及疗效评价中的应用,刘珍,陈丹,魏莹亚,等(11):1531

创伤性四肢骨折患者血清 FIB、FDP、D-D 和 TAT 水平与血栓形成的关系,田丰,杨家赵,徐玮,等(11):1535

血清 KL-6、LDH 水平对结缔组织病合并间质性肺炎患者病情及预后的评估价值,崔艳香,刘晓莉,周丽萍(11):1539

甲状腺癌细针穿刺组织中 CEACAM1 表达量及其与肿瘤恶性程度的相关性,徐显昌,周宁,陈志刚(11):1544

血清 BSP、SOST 及 Ca^{2+} 水平与维持性血液透析患者腹主动脉钙化的关系,司江涛,崔文军,安乾,等(11):1548

GSP、ACA 及 APCR 在胫骨平台骨折患者近期预后中的预测价值,李德欣,李涛,张伟涛,(11):1552

结直肠癌 TRDMT-1、CEACAM-1 的表达及与肿瘤生物学特性的相关性,冯婧,赵凯,周鑫(11):1556

CRSwNP 患者 YKL-40、TLR4 基因表达及嗜酸性粒细胞水平与复发的相关性,董春花,张英,岳光浩(11):1561

系统性红斑狼疮患者外周血 CD3- CD16+ CD56+ NK 细胞水平变化的临床意义,仲华,王朝辉,林志强,等(11):1565

CIP2A、VCAM-1 及 TRF1 在脑胶质瘤中的表达及临床意义,董留建,王树凯,冯书彬,等(11):1570

血清 IFN、MMP-9、IL-6 水平与自发性早产的相关性分析,陈婷,郭晓静,白婧(11):1574

美托洛尔治疗扩张型心肌病慢性心力衰竭的临床价值分析,周政,刘高俊,刘超(11):1578

PCI 术后肺部感染患者血清 miR-146a、Galectin-3 表达及与抗感染疗效的关系,林强,魏天龙,罗练,等(11):1582

人细小病毒 B19 核酸检测试剂国家参考品的建立,麻婷婷,许四宏,周海卫(12):1596

耳聋基因突变检测试剂盒行业标准的建立,张娟丽,曲守方,孙楠,等(12):1600

二代测序技术在急性髓系白血病患者预后中的应用价值,牛晓娜,葛菲,郭宏岗,等(12):1604

彩色多普勒超声检查在推动脉型颈椎病综合治疗中的疗效分析,王克强,巩凤超,王晶,等(12):1608

β -珠蛋白基因 CAP 位点下游+43、+40(-AAAC)突变的临床特征分析,王继成,杜丽,姚泽泽,等(12):1612

基于 TCGA 数据集分析 CDCA5 在肺腺癌中的临床意义与分子机制,王萍,黄奔,范维,柳家翠,等(12):1616

miR-766-3p 调控肺癌细胞增殖、迁移、侵袭的分子机制,郭喜喜,王振华,胡红军,等(12):1621

肠道菌群紊乱在大鼠非酒精性脂肪肝中的作用机制,耿妍,鲁晓岚,耿燕,等(12):1626

Xpert MTB/RIF 检测结核分枝杆菌和利福平耐药药的临床应用,张建平,李红燕,王大望,等(12):1631

巨细胞病毒性疾病患儿尿 HCMV-DNA 水平、并发症及更昔洛韦治疗后转归分析,赵代艳,苏爱芳,郭长根(12):1635

不同类型过敏性结膜炎患儿 TSLP、TGF- β 1 及 ECP 表达及临床意义,江灵(12):1639

PCT、凝血因子联合 CRP 检测在肝硬化并发 SBP 中的诊断及预后评估价值,王惠(12):1643

COPD 性高血压患者肾素-血管紧张素-醛固酮水平的临床研究,任芳,郝同琴,牛丽丹,等(12):1648

血清 Hcy、hs-CRP 在急性脑梗死患者的表达及与病情程度的相关性,孙媛媛,余其贵,谢军(12):1652

APRI 和 FIB4 在慢性丙型肝炎肝纤维化诊断中的应用,叶向阳,邱荣仙,何雄志,等(12):1657

呼出气冷凝液、血清和组织中 miRNA34a 检测对非小细胞肺癌患者的价值探讨,陶国华,孙莘莘,陈金亮,等(12):1661

动脉瘤性蛛网膜下腔出血患者外周血 miR-210 与 TLR4 表达的相关性及临床意义,陈明,张清秀,魏秀娥(12):1665

162 例 CRE 感染的分布特点及降低细菌感染措施评价研究,张雁,梁家花,张峰(12):1670

VEGF-C 与 Gas6 在胆管癌中的表达及临床意义,朱宇,吴涯昆,龚程,等(12):1674

原发性高血压患者血清 D-D 水平预测并发左室肥厚研究,王春燕,任海霞,齐跃(12):1678

CK-MB、CRP、ALB 以及 D-二聚体水平对于缺血性肠病患者的价值研究,袁燕文,许哲,黄妙兴,等(12):1682

GPC-1、miRNA-9 及 Caspase-3 在肺腺癌中的表达及与病情、预后生存的相关性研究,智雅婧,冯铁虹,那顺孟和,等(12):1686

剖宫产后产褥感染血清 AT-III、TAC 及 PCT 水平变化及与预后,李小芝,唐连敏,付翠芳,等(12):1691

冠心病心力衰竭患者血清 Hcy 水平、心电图 QRS 波时限与心功能的相关性分析,王正飞,杨龙,兰占占(12):1695

ProADM、sRAGE、HMGB-1 对 ICU 感染患者病情严重程度及预后的评估价值,吴瑶,时小妍,杨雨坤,等(12):1700

Th17/Treg 联合 PCT 值对乳腺癌患者术后化疗医院感染的预测价值分析,付晶,尚春迎,刘丽(12):1704

ALB、CD64 及 BCL-2 在重症肺炎中的表达及与病情严重程度、预后的关系研究,刘瑞莹,李群,杨帅,等(12):1708

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,付慧清,王新颜,吴洁清,等(12):1713

血 VEGF、SDF-1、MMP-9 和 HMGB1 水平与烟雾病患者颅内出血的关系,徐梦怡,徐静,张倩倩(12):1717

AT-III 活性和 NT-proBNP 检测联合 GRACE 评分对 NSTE-ACS 患者远期预后的评估价值,王丽显,柴博兰,杨颖博,等(12):1722

白内障患者 NOS、DPP 及 TFAR19 蛋白的表达及临床意义,张红振,王二丽,朱乐如(12):1727

早期血液灌流在急性百草枯中毒患者中的应用效果观察,焦文明,高永霞,胡德亮(12):1732

食管癌患者血清 MIP-3 α 、CA125、Stathmin 表达与预后的相关性,李敏,刘秀芬,陆靖雯(12):1736

伤寒沙门氏菌质粒 DNA 参考物质的研制,努色热提·阿布都沙拉木,袁慕云,林晓峰,等(12):1740

外周血 Blimp1、IFN- γ 、IL-10 水平与重症肺结核的相关性分析,黄健,李明瑛,牛文一,等(12):1745

血清 CXCL12、SDF-1 α 、CXCR4 水平与颅脑损伤患者预后的相关性,李文彬,郑祥德,吴昌徽,等(12):1749

综述

MALDI-TOF MS 在药物基因组学检测中的应用及展望,曹书娟,刘彬,朱安娜(1):123

基于 Cell-SELEX 的核酸适配体在肿瘤诊治中的应用,田彩平,杨碎珍,袁红霞,等(1):128

原发性胆汁性胆管炎易感基因多态性的研究现状,高琪,张华(1):134

ATM 蛋白激酶促细胞增殖作用研究进展,唐石伏,吴婉君,阳建伶,等(2):249

基于 Cell-SELEX 的核酸适配体在肿瘤诊治中的应用,田彩平,廖世奇,孙敬阳,等(2):253

血清 HBeAg 定量检测技术新进展,陈秀丽,张学东,戴二黑(3):391

肿瘤微环境中外泌体在肿瘤发生发展中作用及机制,杨硕,杨清玲,陈昌杰(3):396

14-3-3 ζ 蛋白在乳腺癌发生发展中的作用研究进展,董正远,杨清玲,陈昌杰(4):538

儿童髓母细胞瘤分子分型与治疗进展,李秋,王晓江,朱剑栋,等(4):542

瞬时感受器电位香草酸受体 1 抑制剂在神经病理性疼痛中的研究进展,盛树悦,田映红,张兴梅(5):688

单细胞转录组测序技术在类风湿性关节炎的研究进展,李琼,陈宇婷,接力刚,等(6):835

非编码 RNA 在类风湿性关节炎中的研究进展,陈宇婷,李琼,隋础阳,等(7):974

生长因子在肺动脉高压发病中的作用研究进展,李凯泽,刘广雁,陈建英(7):978

基于高通量测序的伴随诊断试剂临床评价方法及运用,高宇,吕允凤(7):982

宫颈病变流行病学分析及宫颈冷冻治疗新进展,曹欢,刘冰,王晓丹(8):1129

恶性肿瘤中 Hedgehog 信号通路的表观遗传调控研究进展,高倩雯,刘陶文(9):1276

瞬时感受器电位香草酸受体 1 抑制剂在神经病理性疼痛中的研究进展,盛树悦,田映红,张兴梅(10):1424

EB 病毒实验室检测技术研究进展,麻婷婷,许四宏,周海卫(11):1587

病毒性肝炎血清标志物检测方法新进展,李轶春(12):1753

结核分枝杆菌耐药基因突变检测试剂相关问题探讨,刘容枝,方丽,徐超(12):1757

广东省医疗器械质量监督检验所

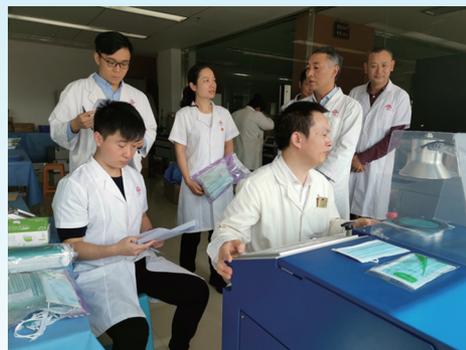
广东省医疗器械质量监督检验所(广东医械所)是广东省市场监督管理局属下的药品监督管理局直属参公管理事业单位,加挂国家药品监督管理局广州医疗器械质量监督检验中心和广东省医疗器械质量监督检验所包装材料容器检验中心的牌子。具有独立法人资格,是迄今华南地区唯一的国家级医疗器械检验机构,同时履行广东省质量监督医疗器械检验站与广东省质量监督药品包装产品检验站的职责。

目前广东医械所除本部外还下设4个分实验室,检验场所占地面积共5万平方米。总部与4个实验室相互联系,形成了覆盖粤港澳大湾区乃至全省的检验网络。全所在岗人员326人,其中博士9人、硕士68人,正高职称1人、副高职称34人,在岗党员152人,设立了科普专职人员2人、兼职人员62人,平均年龄34岁,是一支具备专业素养和科普能力的年轻队伍。广东医械所拥有检验设备4700多台套,价值2.7亿元。

广东医械所通过中国合格评定国家认可委员会的实验室认可、中国国家认证认可监督管理委员会的资质认定、广东省市场监督管理局的产品质量检验机构资格授权和检验检测机构计量认证,还通过了德国TUV PS、美国UL实验室认证,是国家药品监督管理局指定的国家级医疗器械质量检验机构,依法承担医疗器械产品检验和国家、省、市地区的质量监督检验。同时,还是广东省科技成果检测鉴定机构之一,也是广东省指定国产非特殊用途化妆品的备案检验机构之一。广东医械所按CNAS-CL01:2018《检测和校准实验室能力认可准则》(ISO/IEC17025:2017)以及《检验检测机构资质认定能力评价 检验检测机构通用要求》(RB/T 214-2017)的要求建立了完善的质量管理体系,承检能力覆盖各种包装材料、容器、机械、化学、物理、医用电子、电气安全、医用材料、生物性能、电磁兼容、超声、光学等多个领域。

广东医械所下设包装材料容器检验中心,是华南地区最大、能力最强的包装材料检验机构,依法承担食品、保健食品、化妆品、药品、医疗器械等包装材料容器产品检验和洁净室(区)的检验、药品包装材料与药品相容性的检验,国产非特殊用途化妆品的备案检验以及包装材料容器产品和洁净室(区)标准的制修订、科研、技术审评等工作。

此外,广东医械所还是全国消毒技术与设备标准化技术委员会、全国医用体外循环设备标准化技术委员会、全国口腔材料和器械设备标准化技术委员会齿科设备与器械分技术委员会秘书处所在单位,负责组织对消毒技术与设备、医用体外循环设备、齿科设备和器械三大归口医疗器械标准的制修订、转化、验证和宣贯培训。同时,也是中国医药质量管理协会医疗器械质量管理工作委员会、广东省医疗仪器设备标准化技术委员会、广东省药学会药用包装材料专业委员会的秘书处所在单位。



杂志简介：

《分子诊断与治疗杂志》于 2009 年 5 月创刊，是由中山大学主管，《中国家庭医生》杂志社有限公司主办，中山大学达安基因股份有限公司承办的面向国内外公开发行的分子医学权威性刊物，也是我国第一份以分子诊断与治疗学科为主要内容的分子医学专业学术期刊。本刊以传播分子医学理念、报道分子医学前沿、倡导分子医学创新、促进分子医学进步为办刊宗旨。主要刊登我国医学分子诊断和分子治疗相关领域中的基础理论研究、临床实践和技术方法的最新研究成果以及国内分子医学新技术、新理论和新进展等方面的文章。目前有编委及审稿专家 80 余人。在编委会和审稿专家及编辑部的共同努力下，于 2016 年被收录为“中国科技核心期刊”（中国科技论文统计源期刊）。

目前有“述评”、“论著”、“综述”、“前沿进展”、“专家笔谈”、“讲座”、“动态”和“专栏”等栏目。涵盖基因诊断、免疫诊断、核酸分子诊断、蛋白分子诊断、信号分子诊断、分子影像诊断、诊断仪器应用、基因治疗、核酸分子治疗、蛋白分子治疗等内容。

