



ISSN 1674-6929

CN 44-1656/R

邮发代号: 46-283

分子诊断与治疗杂志

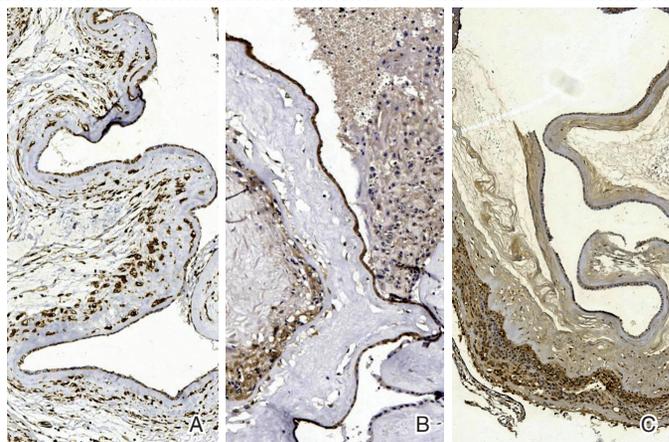
FENZI ZHENDUAN YU ZHILIAO ZAZHI

2021年6月 第13卷 第6期 总第82期

JOURNAL OF

MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Volume 13 Number 6 June 2021



注: A为PPROM患者羊膜上皮细胞 Vimentin 高表达; B为PPROM患者羊膜上皮细胞 MMP9 高表达; C为PPROM患者羊膜上皮细胞 TIMP1 低表达。

图(P859) Vimentin、MMP9、TIMP1 在胎膜早破患者胎盘羊膜上皮细胞中的表达 (SP, ×400)

Figure(P859) Expression of Vimentin, MMP9 and TIMP1 in placental amniotic epithelial cells of patients with premature rupture of membranes (SP, ×400)

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



分子诊断与治疗杂志

二〇二一年六月

第十三卷 第六期

中山大学

张荣信



张荣信,男,博士,教授,博士生导师。

现任广东药科大学生命科学与生物制药学院院长,教授,广东省生物技术候选药物研究重点实验室主任,广东省生物制药创新团队负责人。1999年获南开大学遗传学博士,先后任美国贝勒医学院博士后、讲师(2000~2006),香港大学医学院研究助理教授(2006~2009),天津医科大学基础医学研究中心PI、基础医学院免疫系教授、博士生导师,天津市特聘教授(2010~2018)等职。天津市五一劳动奖章获得者。

主要从事肿瘤免疫、自身免疫和传染病疫苗研究并做出卓有成效的贡献。在 *Signal Transduction & Target Therapy*, *Journal for Immunotherapy of Cancer*, *Cell Death & Differentiation*, *Autophagy*, *Cancer Research* 等期刊发表SCI收录论文70余篇,被引用2400多次,H指数28。主编英文专著《*The Epigenetics of Autoimmunity*》一书2018年由国际著名出版社Elsevier出版。任 *Frontiers in Oncology* 副主编, *Cancer Biology and Medicine*, *International Journal of Immunotherapy and Cancer Research*, 等杂志编委;中国抗癌协会纳米肿瘤学专业委员会委员,中国生物化学与分子生物学会脂质与脂蛋白专业委员会委员, Italian Ministry of Health 基金评审专家, National Science Center in Poland 基金评审专家,科技部国家重点研发计划项目二审专家,国家自然科学基金委优青、重大研究计划、面上等项目评审专家,教育部学位中心博士硕士毕业论文评审专家,澳大利亚 Griffith University 博士毕业论文评委,香港大学研究生毕业论文评委等国内外学术兼职。

分子诊断与治疗杂志

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

月刊 2021年6月 第13卷 第6期 总第82期 Bimonthly Volume 13 Number 6 June 2021

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

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

地址 广州市天河区天河北路179号祥龙大厦11楼(510620)
电话 (020) 32290789-206, 32290789-201
电子邮箱 jmdt@vip.163.com
刊号 ISSN 1674-6929
CN 44-1656/R
邮发代号 46-283
发行单位 广东省报刊发行局
发行范围 国内外公开发售
广告发布登记通知书 440100190057
印刷 天意有福科技股份有限公司
出版日期 2021年6月18日
定价 RMB 15.00元

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

Add 11 Fl., Xianglong Building, 179# Tian he bei Lu, Guangzhou, China 510620
Tel (020) 32290789-206, 32290789-201
E-mail jmdt@vip.163.com
CSSN ISSN 1674-6929
CN 44-1656/R
Printing TianYi Yofus Technology Co., Ltd.
Publish Date 2021.6.18
Price RMB 15.00



扫码订阅《分子诊断与治疗杂志》



中国科技核心期刊

(中国科技论文统计源期刊)

收录证书

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

分子诊断与治疗杂志

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

特颁发此证书。

中国科学技术信息研究所

Institute of Scientific and Technical Information of China

北京复兴路 15 号 100038 www.istic.ac.cn

2020年12月

证书编号: 2019-G556-0386
有效期至: 2021年12月



分子诊断与治疗杂志

月刊 2021年6月 第13卷 第6期

目次

述评

HDAC1(Rpd3)在疾病中的功能研究进展 吴文梅 李华琴 黄源 等(849)

论著

肺腺癌组织中 *EGFR*, *ROS1*, *ALK* mRNA 表达意义 何琼 吴龙波 王志华 等(853)

EMT 标志物在胎膜早破患者羊膜上皮细胞中的表达及意义 陈静宁 许静芸 罗晓薇 等(857)

CEP164 基因和 *CENPU* 基因多态性与精神分裂症的关联研究 汪昕 张旭 樊垚 等(861)

miR-19b-3p、MnSOD、NO/ET-1 与脑梗死后血管性痴呆预测效能 高华 杨嘉君 张新华(865)

鼻咽部透明细胞癌的免疫组化和分子检测诊断评价 刘杰文 陈紫桂 朱莎莎 等(869)

急性脑梗死患者外周血 miR-132、血清 Ang-1 相关性及其预后 马翠娟(873)

上皮性卵巢癌患者血清 HMGA2、IL-22、FOLR1 水平及与临床指标的相关性

..... 陈睿琦 刘晓云(877)

潮州市新生儿 G6PD 筛查和基因型鉴定分析 陈新瑶 梁雪雁 黄慧莹 等(881)

系统性红斑狼疮患者外周血 T 淋巴细胞亚群和亲环素 A 的表达及临床意义

..... 刘怡 谭静雅 卿红梅 等(885)

托珠单抗治疗 76 例新生儿坏死性小肠结肠炎的临床分析 林明静 冯琼 林虹 等(889)

NLR、PLR、RDW 检测在结直肠癌诊断、预后评估中的研究 陈万臣 辛莘 郭雅丽 等(893)

经皮椎间孔镜治疗对腰椎间盘突出症患者细胞因子水平的影响

..... 张强泽 元佳慧 谢学生 等(897)

急性 STEMI 患者血清 HIF-1 α 含量与病情及 PCI 后院内不良心血管事件关系

..... 丁小青 刘海峰 刘红伟 等(901)

血清 VEGF、hs-CRP、MMP 在急性脑梗死中的诊断价值及临床意义

..... 马明娟 王素娟 刘晓梅(905)

p16、Ki-67 检测在宫颈上皮内瘤变诊断及宫颈癌筛查中的价值 陈炜 周宁 廖茜 等(909)

Nupr1、HE4 及 AFP 表达与卵巢癌病理参数、预后生存的关系 陈燕萍 陈婧 洪丽玲 等(913)

CDK8、CXCL13 及 REG γ 在子宫内膜癌组织中的表达及临床意义

..... 哈斯图雅 钗丽干 崔山丹 等(917)

宁德市医院体检人群及住院患者 HTLV-I 感染情况分析 叶仁清 叶作东 傅芬蕊 等(921)

血清 miR-155、miR-302b、miR-208a 水平与 AMI 患者 PCI 术后 MACE 发生的关系

..... 孙大敬 王小虎 曹凌飞 等(925)

HPV 感染的 CIN 和宫颈癌患者血清 TGF- β 1、HPV16VLPs-IgG1 和 IgG2 抗体表达的临床意义

..... 陈娟 宋化雨 程瑶瑶 等(929)

动态监测降钙素原联合T细胞亚群PD-1表达水平对脓毒症预后的预测价值
 钟坚 李少洪 陈金成 等(933)

WBC、CRP/LYM%、PLT在病毒、呼吸道感染中诊断效能
 刘佳 孙成栋 张雪梅 等(938)

RLP76、Wip-1及Gal-9在子宫内膜癌的表达及与细胞凋亡的相关性
 王丽娜 史凤菊 娄艳辉(942)

miR-32-5p靶向FOXN3调控EMT通路影响子宫内膜癌细胞迁移和侵袭
 董艳 杜安飞 辛本勤 等(947)

HbA1c、25(OH)D、UA与AIS合并CMBs患者认知功能障碍的关系研究
 甄伟兰 袁丹 王英鹏 等(952)

CA153、CA199联合AFP检测在卵巢癌病情进展、化疗近期疗效的评估
 张佟 王文莉 叶红(956)

上尿路结石急诊术围术期NLR、CRP、KIM-1变化及对SIRS诊断价值
 杨永刚 李外兴 李喆 等(961)

klotho、MHR、Lp-PLA2诊断无症状脑梗死价值及临床意义 杨芳 张佳星 端木勤浩(965)

卵巢上皮性癌中VEGF、CD4⁺、CD8⁺及COX-2表达与TIDC相关性
 吴明燕 康雪芳 林月丽 等(969)

南京市1例暴露感染HIV病例的溯源调查 董潇潇 许文炯 乔梦凯 等(973)

EmAb、ACA及PDW联合检测在复发性流产临床诊断中的应用价值 韦志萍 林忠(977)

Galectin-9、NOX-1 mRNA在胆囊癌中表达变化及与癌细胞生物学行为指标的关系
 彭正 陈之强 杨琦(981)

不同时间窗阿替普酶静脉溶栓治疗急性脑梗死的疗效观察 刘汉臣 张琦 王杰斌(985)

TLR9 mRNA表达水平与SLE患者病情及疾病进展的相关性 刘志明 郜苗苗 邵丽丽 等(989)

VEGF、BCRP蛋白及血清LDH与晚期NSCLC一线化疗预后的关系
 孔佑虔 王小玉 宋爱英 等(994)

CRP/PA、LDH预测儿童细菌性脑膜炎预后的效能分析 梁森全 莫庆仪 梁桂明 等(998)

b-FGF、TGF-β1、microRNA-34a与慢性乙型肝炎肝纤维化程度的相关性
 李园园 苏峰 王艳 等(1002)

Ki/V、CRP/ALB、UA与腹膜透析钙磷代谢紊乱关系及预测颈动脉硬化价值
 徐可 刘敏 郭利芹 等(1006)

液相色谱-串联质谱法测定25-羟基维生素D 潘晓芳 黄燕虹 黄浩然 等(1010)

综 述

膀胱尿路上皮癌临床诊断及治疗的研究进展 冉灿 蔡翔 龚杨洋 等(1015)

CD74的免疫学功能及在系统性红斑狼疮中的研究进展 纪婷婷 袁超 黄琴(1019)

专家风采

张荣信 (封二)

实验室巡礼

广东药科大学生命科学与生物制药学院 (封三)

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Monthly Volume 13 Number 6 June 2021

CONTENTS

ORIGINAL ARTICLES

- Significance of *EGFR*, *ROS1* and *ALK* mRNA expression in lung adenocarcinoma
HE Qiong, *WU Longbo*, *WANG Zhihua*, *DU Jun*, *WANG Yuting* (853)
- Expression and significance of EMT markers in amniotic epithelial cells of patients with premature rupture of membranes
CHEN Jingning, *XU Jingyun*, *LUO Xiaowei*, *ZHANG Yuanxin*, *WU Shenggui*, *GONG Guoliang* (857)
- Association between *CEP164* gene and *CENPU* gene polymorphism and schizophrenia
WANG Xin, *ZHANG Xu*, *FAN Yao*, *WEI Lai*, *SHEN Chong*, *XUE Yong* (861)
- Predictive efficacy of miR-19b-3p, MnSOD, NO/ET-1 on vascular dementia after cerebral infarction
GAO Hua, *YANG Jiajun*, *ZHANG Xinhua* (865)
- Diagnostic evaluation of immunohistochemistry and molecular detection of clear cell carcinoma of the nasopharyngeal area
LIU Jiewen, *CHEN Zigui*, *ZHU Shasha*, *QI Fengjie* (869)
- Correlation and prognosis of peripheral blood miR-132 and serum Ang-1 in patients with acute cerebral infarction
MA Cuijuan (873)
- Serum HMGA2, IL-22, FOLR1 levels in patients with epithelial ovarian cancer and their correlation with clinical indicators
CHEN Ruiqi, *LIU Xiaoyun* (877)
- G6PD deficiency screening and genotyping analysis of newborns in Chaozhou, Guangdong Province
CHEN Xinyao, *LIANG Xueyan*, *HUANG Huiying*, *LIN Weiqi*, *DING Yanjia*, *WEI Huagui*, *WANG Junli*, *LIN Min* (881)
- Expression and clinical significance of peripheral blood T lymphocyte subsets and cyclophilin A in patients with systemic lupus erythematosus
LIU Yi, *TAN Jingya*, *QIN Hongmei*, *ZHOU Bin* (885)
- Clinical analysis of tocilizumab in the treatment of 76 cases of neonatal necrotizing enterocolitis
LIN Mingjing, *FENG Qiong*, *LIN Hong*, *LI Chunlei* (889)
- Application of NLR, PLR and RDW detection in diagnosis and prognosis evaluation of colorectal cancer
CHEN Wanchen, *XIN Xin*, *GUO Yali*, *YAO Yuxia*, *YING Dayu*, *SONG Li*, *XU Baohong* (893)
- Effect of percutaneous transforaminal endoscopic discectomy on cytokine levels of patients with lumbar intervertebral disc protrusion
ZHANG Qiangze, *QI Jiahui*, *XIE Xuesheng*, *QIN Fei*, *QI Qiang* (897)
- Relationship between serum HIF-1 α level in patients with acute STEMI and the condition or major adverse cardiovascular events in the hospital after PCI
DING Xiaoqing, *LIU Haifeng*, *LIU Hongwei*, *GU Lei* (901)
- The diagnostic value and clinical significance of serum VEGF, hs-CRP and MMP in acute cerebral infarction
MA Mingjuan, *WANG Sujuan*, *LIU Xiaomei* (905)
- The value of p16 and Ki-67 detection in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer screening
CHEN Wei, *ZHOU Ning*, *LIAO Qian*, *PENG Junchen* (909)
- Relationship between the expressions of Nupr1, HE4 and AFP and the pathological parameters, prognosis and survival of ovarian cancer
CHEN Yanping, *CHEN Jing*, *HONG Liling*, *CHEN Hui* (913)
- Aberrant expression and clinical significance of CDK8, CXCL13 and REG γ in endometrial carcinoma
HASITUYA, *CHAI Ligan*, *CUI Shandan*, *XIA Shuqin* (917)
- Analysis of HTLV-I infection status among the physical examination and hospitalized patients in ningde hospital
YE Renqing, *YE Zuodong*, *FU Fenrui*, *QI Yuying* (921)

Relationship between serum levels of miR-155, miR-302b and miR-208a and major adverse cardiovascular events in AMI patients after PCI	
<i>SUN Dajing, WANG Xiaohu, CAO Lingfei, QIN Mingming, LONG Huizhen</i>	(925)
Clinical significance of serum TGF- β 1, HPV16VLPs-IgG1 and IgG2 antibodies levels in patients with HIV-infected CIN and cervical cancer	
<i>CHEN Juan, SONG Huayu, CHENG Yaoyao, XIE Jia</i>	(929)
Dynamic monitoring of procalcitonin combined with PD-1 expression level of T cell subsets for predicting prognosis of sepsis	
<i>ZHONG Jian, LI Shaohong, CHEN Jincheng, CHEN Dan, ZHANG Wei, LI Xiaoyue</i>	(933)
Diagnostic efficacy of WBC, CRP/LYM%, PLT in viral and respiratory bacterial infections	
<i>LIU Jia, SUN Chengdong, ZHANG Xuemei, BAI Lu</i>	(938)
The expression of RLP76, <i>Wip-1</i> and Gal-9 in endometrial carcinoma and their correlation with apoptosis	
<i>WANG Lina, SHI Fengju, LOU Yanhui</i>	(942)
miR-32-5p targets FOXN3 to regulate the EMT pathway and affect the migration and invasion of endometrial cancer cells	
<i>DONG Yan, DU Anfei, XIN Benqin, CAO Jiawei</i>	(947)
Study on the relationship between the levels of HbA1c, 25(OH)D and UA and cognitive dysfunction in patients with acute ischemic stroke combined with cerebral microbleeds	
<i>ZHEN Weilan, YUAN Dan, WANG Yingpeng, WANG Haipeng, WANG Ying</i>	(952)
Evaluation of CA153 and CA199 combined with AFP detection in the progress of ovarian cancer and the short-term efficacy of chemotherapy	
<i>ZHANG Tong, WANG Wenli, YE Hong</i>	(956)
Changes of NLR, CRP, KIM-1 in the perioperative period of emergency surgery for upper urinary calculi and their diagnostic value for SIRS	
<i>YANG Yonggang, LI Waixing, LI Zhe, WU Xiaojun</i>	(961)
The value and clinical significance of klotho, MHR, Lp-PLA2 in the diagnosis of silent brain infarct	
<i>YANG Fang, ZHANG Jiaxing, DUAN Muqinhao</i>	(965)
Correlation between the expression of VEGF, CD4 ⁺ , CD8 ⁺ and COX-2 in epithelial ovarian cancer and tumor infiltrating dendritic cells	
<i>WU Mingyan, KANG Xuefang, LIN Yueli, LIN Yerong, ZHANG Lan, HUANG Liling, CHEN Hui</i>	(969)
Traceability investigation of a case of exposure and infection with HIV in Nanjing	
<i>DONG Xiaoxiao, XU Wenjiong, QIAO Mengkai, MAO Ziqing, ZHANG Hongying, WANG Yan, WU Yongmei</i>	(973)
Application value of combined detection of EmAb, ACA and PDW in clinical diagnosis of recurrent miscarriage	
<i>WEI Zhiping, LIN Zhong</i>	(977)
<i>Galectin-9</i> and <i>NOX-1</i> mRNA expression changes in gallbladder carcinoma and their relationship with the biological behavior of cancer cells	
<i>PENG Zheng, CHEN Zhiqiang, YANG Qi</i>	(981)
Curative effects of intravenous thrombolysis with alteplase in different time windows on acute cerebral infarction	
<i>LIU Hanchen, ZHANG Qi, WANG Jiebin</i>	(985)
Correlation between <i>TLR9</i> mRNA expression and SLE patients' condition and disease progression	
<i>LIU Zhiming, GAO Miaomiao, SHAO Lili, ZHU Cuimin, LIU Xiufen</i>	(989)
Relationship between the levels of VEGF, BCRP, serum LDH and the prognosis of advanced non-small cell lung cancer first-line chemotherapy	
<i>KONG Youqian, WANG Xiaoyu, SONG Aiyong, TANG Yin</i>	(994)
Analysis of the efficacy of CRP/PA and LDH in predicting the prognosis of children with bacterial meningitis	
<i>LIANG Senquan, MO Qingyi, LIANG Guiming, HUANG Xiaowen, GE Xiaoning</i>	(998)
Correlation between b-FGF, TGF- β 1, microRNA-34a and the degree of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis B	
<i>LI Yuanyuan, SU Feng, WANG Yan, LUAN Xinglong</i>	(1002)
The relationship between Kt/V, CRP/ALB, UA and peritoneal dialysis calcium and phosphorus metabolism disorder and its value in predicting carotid atherosclerosis	
<i>XU Ke, LIU Min, GUO Liqin, ZHANG Lingling</i>	(1006)
Determination of 25-hydroxyvitamin D by liquid chromatography-tandem mass spectrometry	
<i>PAN Xiaofang, HUANG Yanhong, HUANG Haoran, LI Haiming, CHEN Jianqi, WU Jingbiao</i>	(1010)

REVIEWS

Research progress on clinical diagnosis and treatment of urothelial carcinoma of bladder	
<i>RAN Can, CAI Xiang, GONG Yangyang, FENG Yougang</i>	(1015)
Immunological function of CD74 and its research progress in systemic lupus erythematosus	
<i>JI Tingting, YUAN Chao, HUANG Qin</i>	(1019)

HDAC1(Rpd3)在疾病中的功能研究进展

吴文梅¹ 李华琴² 黄源¹ 吴凤麟¹ 张荣信^{1*}

[摘要] 组蛋白乙酰化和去乙酰化在基因转录调控中起着重要的作用,由组蛋白乙酰转移酶(KAT)催化蛋白发生乙酰化,逆向反应由组蛋白去乙酰化酶(HDACs)所介导。HDAC1(Rpd3)属于Zn²⁺依赖的I类HDACs组蛋白去乙酰化酶家族成员之一,可以使蛋白发生去乙酰化、染色质缩合和抑制基因的转录。通过转录后与翻译后水平的修饰调控蛋白质的稳态,影响细胞衰老、炎症、自噬、凋亡和癌症等生命过程。本文主要对HDAC1(Rpd3)在疾病中的功能研究和HDACs抑制剂的诊断、治疗做了总结,以期为了了解HDAC1介导生物反应的机制提供新的视角,并为HDACs抑制剂治疗疾病提供重要的理论研究指导。

[关键词] HDAC1; 去乙酰化; 癌症; HDACs抑制剂

Research Progress on Function of HDAC1(Rpd3) in the Disease

WU Wenmei¹, LI Huaqin², HUANG Yuan¹, WU Fenling¹, ZHANG Rongxing^{1*}

(1. School of Biosciences and Biopharmaceutics, Guangdong Pharmaceutical University, Guangdong Province Key Laboratory for Biotechnology Drug Candidate, Guangzhou, Guangdong, China, 510006; 2. Guangzhou Xinhua University, Guangzhou, Guangdong, China, 510520)

[ABSTRACT] Histone acetylation and deacetylation are a critical process responsible for gene transcription regulation, which are catalyzed by histone acetyltransferases (HATs) and histone deacetylases (HDACs), respectively. Among class I HDACs, HDAC1 is implicated in controlling gene expression important for diverse cellular functions by post-transcription and post-translation modifications, such as Cell senescence, inflammation, autophagy, apoptosis and cancer and so on. Therefore, we summarized the functions of HDAC1(Rpd3) in the disease and diagnosis、treatment of HDACs inhibitors, understanding the biological significance of HDAC1 will not only provide new insight into the mechanisms of HDAC1 involved in mediating biological response, but also shed light on their potential as a therapeutic strategy to achieve clinical implications.

[KEY WORDS] HDAC1; Deacetylation; Cancer; HDACs inhibitors

蛋白质修饰是指蛋白质在生物合成后所发生的化学修饰,也称为翻译后修饰(posttranslational modification, PTM)。迄今为止,在真核生物和原核生物中已经发现200多种以上的PTM类型,主要修饰包括乙酰化、磷酸化、SUMO化、糖基化、泛素化、棕榈酰化、脂化等^[1-2]。乙酰化作为翻译后修饰方式之一,近几年在疾病中的功能研究取得了突破性进展。蛋白质的乙酰化修饰是指通过组蛋白乙酰基转移酶(Histone acetyltransferase, HATs)将乙酰基辅酶A转移到赖氨酸的ε-氨基侧链而产生的,这个

过程可以被组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylase, HDACs)逆转。HDAC1(Rpd3)作为组蛋白去乙酰化酶家族成员之一,通过催化底物组蛋白赖氨酸的去乙酰化,使染色质结构更为紧密,或者与其他染色质调节蛋白相互作用形成共抑制复合体,改变蛋白质的空间结构,进而参与调控基因表达、细胞分裂、细胞分化和细胞周期等生命过程^[3]。此外,HDAC1(Rpd3)还可介导非组蛋白底物赖氨酸位点的去乙酰化,在细胞信号通路中发挥着重要作用^[4]。本文主要总结HDAC1在疾病中的功能研究

基金项目:国家自然科学基金面上项目(81872320)

作者单位:1. 广东药科大学生命科学与生物制药学院/广东省生物技术候选药物研究重点实验室,广东,广州 510006

2. 广州新华学院,广州,广东 510520

*通信作者:张荣信, E-mail: rxzhang@gdpu.edu.cn

和HDACs抑制剂在诊断、治疗疾病中的应用情况。

1 组蛋白去乙酰化酶的分类和HDAC1的结构及生物学功能

根据组蛋白去乙酰化酶的作用机制不同,可分为Zn⁺依赖的HDACs(包括HDAC1、-2、-3、-8、-4、-5、-7、-9、-6、-10、-11)和NAD⁺依赖的Sirtuin家族组蛋白去乙酰化酶(包括SIRT1、-2、-3、-4、-5、-6、-7)(表1)^[3]。在人体中,现已发现18种Zn⁺依赖的HDACs,并根据其序列同源性和结构的不同共分为4类(I、II a、II b、IV),I类HDACs包括HDAC1、-2、-3和-8,其中HDAC1在酵母和鳞翅目昆虫中的同源蛋白为Rpd3;II a类HDACs包括HDAC4、-5、-7和-9;II b类HDACs包括HDAC6和-10;IV类HDACs只含HDAC11一个成员。其余的HDACs,包括了转录因子TCF1和LEF1。见表1。

表1 组蛋白去乙酰化酶的分类

Table 1 Classification of histone deacetylation

分类	家族
I	HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC8
II a	HDAC4, HDAC5, HDAC7, HDAC9
II b	HDAC6, HDAC10
IV	HDAC11
III	SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5, SIRT6, SIRT7
其他	TCF1, LEF1

HDAC1/Rpd3是Zn⁺依赖的HDACs家族中最大的一个亚家族,含有一个典型的组蛋白去乙酰化酶结构域,能够催化组蛋白或者非组蛋白底物发生去乙酰化。

2 HDAC1蛋白在疾病中的功能研究

2.1 HDAC1和炎症

炎症是指机体在受到化学物质、病原体等有害刺激或物理损伤时组织或细胞产生的即时反应^[5]。研究发现HDAC1在炎症发生的过程中是一个重要的炎症调节因子。如在类风湿性关节炎(Rheumatoid Arthritis, RA)的研究发现HDAC1参与了类风湿性关节炎的发病机制,RA是一种慢性T细胞介导的炎症性自身免疫性疾病,在细胞特异性缺失HDAC1(HDAC1-cko)的小鼠中研究发现HDAC1-cko小鼠对胶原诱导关节炎的发展具有抗性作用,能够使炎症细胞因子白细胞介素-17和白细胞介素-6显著降低,且白细胞介素-6处理的敲除HDAC1的CD4⁺T细胞显示趋化因子受体

CCR6上调受损,说明HDAC1在关节炎发病机制中起着关键作用,可成为治疗RA的靶点^[6]。在肝脏脂肪变性的发病机制中,转录因子核因子κB(nuclear factor κB, NF-κB)的P50亚基通过调节肝细胞中的HDAC1表达促进肝脏脂肪变性,而敲低HDAC1基因可抑制HepG2细胞的肝细胞脂肪变性^[7]。此外研究发现组蛋白去乙酰化酶HDAC1通过翻译后修饰如磷酸化、乙酰化修饰来参与炎症过程。在肠道上皮细胞研究发现,HDAC1能够诱导NF-κB的p65蛋白位点Ser536和C/EBPβ位点Ser105的磷酸化,参与的炎症信号传导^[8]。对动脉粥样硬化的研究发现,microRNA-34a能够降低HDAC1的蛋白表达,从而使H3K9乙酰化水平升高促进同型半胱氨酸引起动脉粥样硬化^[9]。以上研究说明对HDAC1基因的功能研究可为治疗炎症提供一个新的策略与手段。

2.2 HDAC1和自噬

细胞自噬是真核生物机体中高度保守存在的、由溶酶体/液泡参与的对胞内物质进行降解的生理过程,细胞自噬发生异常与血管钙化、糖尿病、肿瘤等一系列的疾病有关联^[10]。研究发现HDAC1可以使循环GMP-AMP合酶和赖氨酸去甲基化酶1A发生去乙酰化后促进自噬的发生进而调节血管钙化^[11-12]。在糖尿病视网膜病变中,过表达组蛋白人源全长重组蛋白HIST1H1C可上调HDAC1的表达,HDAC1使组蛋白H4K16发生去乙酰化,导致自噬相关蛋白上调,进而促进视网膜细胞自噬,为预防糖尿病视网膜病变提供一个新的治疗靶点^[13]。以上研究说明HDAC1蛋白参与调控细胞自噬的发生,进而参与生命过程的发生发展。

2.3 HDAC1和凋亡

细胞凋亡,又称为I型程序性细胞死亡,是需要多种Caspase蛋白或者凋亡诱导因子的参与,凋亡异常可以影响细胞周期、生长发育和导致各种疾病^[14]。在卵巢癌耐药细胞SKOV3/DDP中,对HDAC1进行siRNA干扰,可以降低表皮生长因子受体的mRNA表达水平,同时促进癌症细胞凋亡^[15]。在结肠癌细胞Caco2中,转染siRNA的HDAC1能够显著降低HDAC1的mRNA和蛋白水平,Bax、Cleaved caspase-3蛋白水平升高,细胞凋亡率明显升高,细胞内MMP-2、MMP-9蛋白水平表达下降,细胞侵袭和迁移数目明显减少^[16]。在癌症干细胞K562和SW579细胞中(慢性骨髓性白

血病细胞系),利用 CRISPR/Cas9 敲除 HDAC1 能够使组蛋白乙酰化水平和细胞周期阻滞增强,进而诱导细胞凋亡的发生,说明 HDAC1 在维持 K562 和 SW579 细胞存活中极为重要^[17-18]。了解 HDAC1 参与细胞凋亡调控疾病的发生,有助于提高对疾病的治疗和诊断。

2.4 HDAC1 和癌症

癌症,即恶性肿瘤,是一百多种相关疾病的统称。形成的主要原因是由于身体内的细胞发生变异后不断地增殖分裂,且不受身体的控制,最后形成肿瘤,恶性肿瘤会侵犯、破坏临近的组织和器官^[19]。在人类的癌症中,HDAC1 被认为与某些类型癌症的进展和预后干预有关。在卵巢癌细胞中,MiR-34a 通过调控 HDAC1 抑制卵巢癌细胞增殖和顺铂耐药性^[20]。在非小细胞肺癌中,敲低 HDAC1 可抑制细胞增殖,阻止细胞迁移,降低细胞侵袭,减少肿瘤血管生成,诱导细胞凋亡^[21]。在乳腺癌细胞中,HDAC1 通过上调白细胞介素-8 触发乳腺癌细胞的增殖和迁移^[22]。此外,在细胞应激过程中,HDAC1 能够使肿瘤抑制因子 p53 发生去乙酰化,降低细胞对应激的反应^[23]。在骨质疏松症中,HDAC1 使成骨细胞分化和矿化相关蛋白 GATA4 位点的 K313 发生去乙酰化,抑制 CCND2 转录,降低了细胞活力,增加了线粒体依赖性的细胞凋亡^[24]。除发挥乙酰化修饰功能外,HDAC1 能直接抑制缺氧诱导因子(Hypoxia inducible factor, HIF1 α)的泛素化,进而激活 HIF1 α /血管内皮生长因子 A(vascular endothelial growth factor A, VEGFA)信号通路,促进肿瘤血管生成,HDAC1/HIF1 α /VEGFA 信号通路可能为结直肠癌提供一个新的治疗靶点^[25]。以上研究说明 Rpd3/HDAC1 可作为癌症治疗的潜在候选位点。

3 HDACs 抑制剂在诊断和治疗中的应用情况

人类众多疾病中,特别是癌症,HDACs 的表达通常是异常的,组蛋白去乙酰化酶抑制剂(histone deacetylase inhibitors, HDACIs)可有效逆转肿瘤细胞的恶性表型,其不仅可以作用于靶向组蛋白,而且能够通过影响靶向非组蛋白的乙酰化水平来调节细胞周期阻滞、血管生成、免疫调节、自噬和凋亡等一系列生命过程,可成为治疗癌症的有效靶点,应用前景广泛^[26]。HDACs 作用的底物众多,目前已经鉴定到的包括转录因子(E2F、p53、c-Myc、NF- κ B)、

缺氧诱导因子 1 α 、雌激素受体、雄激素受体、自噬相关蛋白 3、分子伴侣蛋白 90、 α -微管蛋白、 β -连环蛋白、视网膜母细胞瘤蛋白等^[27]。由于 HDACs 底物的复杂性和不单一性,使得 HDACIs 在诊断治疗过程中缺乏特异性,会对细胞产生副作用。

到目前为止,已有超过 20 种 HDACIs 进入临床研究,根据其化学结构特征,可以将这些抑制剂可分为 4 大类,包括羟肟酸、苯甲酰胺、环肽和短链脂肪酸,如伏立司他(Vorinostat)和曲古抑菌素 A(trichostatin A, TSA)属于羟肟酸类,罗米地辛属于环肽类,其中探索最广泛的是羟肟酸类化合物^[28]。这些 HDACIs 不仅可以使组蛋白乙酰化水平增加,还可以作用于不同的底物和蛋白来调节生命过程。在小鼠和人肺癌细胞系和基因工程小鼠肺癌模型中研究发现,Vorinostat 通过减少了癌细胞生长、细胞周期蛋白 cyclin D1 和 cyclin E 的表达,增加了 p27 蛋白和组蛋白乙酰化的表达水平,从而促进细胞凋亡,抑制癌细胞生长^[29]。除参与细胞凋亡和细胞周期外,Vorinostat 也抑制人 CD14(+)单核细胞来源的树突状细胞的分化、成熟和吞噬作用,减少中枢神经系统炎症和脱髓鞘,改善自身免疫性脑脊髓炎^[30]。自噬也可作为 HDACIs 的一个未知靶点,如在心脏可塑性的研究发现,TSA 通过降低 HDAC1 和 HDAC2 的表达,抑制细胞自噬的发生,从而减弱负荷和激动剂诱导的肥厚生长^[31]。以上研究说明 HDACIs 具有广泛抑制 HDACs 的功能,通过多种途径参与疾病的治疗(图 1)。

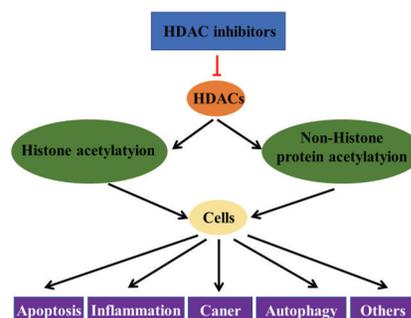


图 1 HDACs 抑制剂通过多种途径参与生命过程

Figure 1 Multiple pathways activated by HDACi

4 小结与展望

综上所述,HDAC1 蛋白作为组蛋白去乙酰化酶家族成员之一,是调控基因表达的关键酶。对于 HDAC1(Rpd3)的研究进展还有一些问题值得进一步阐明研究:①HDAC1 作为转录因子参考调控

炎症的发生,其下游的作用因子有哪些,这些基因与 HDAC1 启动子区翻译后修饰的关系;②HDAC1 参与调控哺乳动物细胞自噬和细胞凋亡的发生,是否存在关键的节点;③HDAC1 参与癌症的发生,其能否通过影响其他蛋白的乙酰化修饰来其能作为抗肿瘤治疗的靶蛋白有待深入探讨;④HDAC1 蛋白去乙酰化修饰与其他翻译后修饰之间是否存在相互影响等;⑤HDAC 特异性抑制剂的开发能否利用计算机建模工具,如对接和分子动力学模拟,提供目标酶和抑制剂之间的分子水平的相互作用,减少细胞毒性。对于研究 HDAC1 及其底物的去乙酰化修饰的功能研究和 HDACs 抑制剂的开发必将阐明其在各个信号通路中的生物学作用,同时也为相关疾病的预防、诊断、治疗奠定理论基础。

参考文献

- [1] 胡笏,郭燕婷,李艳梅.蛋白质翻译后修饰研究进展[J].科学通报,2005(11):1061-1072.
- [2] 谭永聪,王启军,赵国屏,等.原核生物的蛋白质翻译后修饰[J].生物化学与生物物理进展,2011,38(3):197-203.
- [3] Narita T, Weinert BT, Choudhary C. Functions and mechanisms of non-histone protein acetylation[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2019,20(3):156-174.
- [4] Choudhary C, Kumar C, Gnad F, et al. Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions[J]. Science, 2009,325(5942):834-840.
- [5] Weiss U. Inflammation[J]. Nature, 2008,454(7203):427.
- [6] Göschl L, Preglej T, Boucheron N, et al. Histone deacetylase 1 (HDAC1): A key player of T cell-mediated arthritis[J]. J Autoimmu, 2020,108:102379.
- [7] Guo Y, Zhang X, Zhao Z, et al. NF- κ B/HDAC1/SREBP1c pathway mediates the inflammation signal in progression of hepatic steatosis[J]. Acta Pharm Sin B, 2020,10(5):825-836.
- [8] Gonneaud A, Gagné JM, Turgeon N, et al. The histone deacetylase Hdac1 regulates inflammatory signalling in intestinal epithelial cells[J]. J Inflamm (Lond), 2014,11(1):43.
- [9] Li Y, Zhang K, Mao W. Inhibition of miR-34a prevents endothelial cell apoptosis by directly targeting HDAC1 in the setting of atherosclerosis[J]. Mol Med Rep, 2018,17(3):4645-4650.
- [10] Klionsky DJ, Abdel-Aziz AK, Abdelfatah S, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition)[J]. Autophagy, 2021,17(1):1-382.
- [11] Han T, Zhao H, Xie L, et al. Deacetylation of cGAS by HDAC1 regulates vascular calcification by promoting autophagy[J]. Life Sci, 2020, 22:118930.
- [12] Zhou J, Zhou H, Liu C, et al. HDAC1-mediated deacetylation of LSD1 regulates vascular calcification by promoting autophagy in chronic renal failure[J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(15):8636-8649.
- [13] Wang W, Wang Q, Wan D, et al. Histone HIST1H1C/H1.2 regulates autophagy in the development of diabetic retinopathy[J]. Autophagy, 2017,13(5):941-954.
- [14] Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, et al. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis[J]. Nature Rev Molecular Cell Biol, 2007,8(9):741-752.
- [15] 公培刚. shRNA 沉默 HDAC1 基因增强卵巢癌顺铂细胞 SKOV3/DDP 对顺铂的敏感性[D]. 吉林大学, 2014.
- [16] 李青云,肖鹏,司徒伟基,等. HDAC1 对结直肠癌细胞凋亡及侵袭能力的影响[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2018,27(7):781-785.
- [17] Chen SH, Chow JM, Hsieh YY, et al. HDAC1, 2 Knock-Out and HDACi Induced Cell Apoptosis in Imatinib - Resistant K562 Cells[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(9):2271.
- [18] Lin CL, Tsai ML, Lin CY, et al. HDAC1 and HDAC2 Double Knockout Triggers Cell Apoptosis in Advanced Thyroid Cancer[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(2):454.
- [19] Hausman DM. What Is Cancer?[J]. Perspect Biol Med, 2019, 62(4):778-784.
- [20] Cao LL, Song X, Pei L, et al. Histone deacetylase HDAC1 expression correlates with the progression and prognosis of lung cancer: A meta-analysis[J]. Medicine (Baltimore), 2017, 96(31): e7663.
- [21] Sun TY, Xie HJ, Li Z, et al. miR-34a regulates HDAC1 expression to affect the proliferation and apoptosis of hepatocellular carcinoma[J]. Am J Transl Res, 2017,9(1):103-114.
- [22] Zhang L, Bu L, Hu J, et al. HDAC1 knockdown inhibits invasion and induces apoptosis in non-small cell lung cancer cells[J]. Biol Chem, 2018, 399(6):603-610.
- [23] Tang Z, Ding S, Huang H, et al. HDAC1 triggers the proliferation and migration of breast cancer cells via upregulation of interleukin-8[J]. Biol Chem, 2017,398(12):1347-1356.
- [24] You W, Song L, Wang K. Acetylation of GATA4 on Lysine Residue K313 Promotes Osteoblastic Cells Growth [J]. Cell Physiol Biochem, 2018,46(1):269-278.
- [25] Mottamal M, Zheng S, Huang TL, et al. Histone deacetylase inhibitors in clinical studies as templates for new anticancer agents[J]. Molecules,2015, 20(3):3898-3941.
- [26] Dokmanovic M, Marks PA. Prospects: Histone deacetylase inhibitors[J]. J Cell Biochem, 2005,96:293-304.
- [27] Singh BN, Zhang G, Hwa YL, et al. Nonhistone protein acetylation as cancer therapy targets [J]. Exp Rev Ant Ther, 2010, 10:935-954.
- [28] Ma T, Galimberti F, Erkmen CP, et al. Comparing histone deacetylase inhibitor responses in genetically engineered mouse lung cancer models and a window of opportunity trial in patients with lung cancer[J]. Mol Cancer Ther, 2013, 12:1545-1555.
- [29] Silva G, Cardoso BA, Belo H, et al. Vorinostat induces apoptosis and differentiation in myeloid malignancies: genetic and molecular mechanisms[J]. PLoS One, 2013, 8(1):e53766.
- [30] Ge Z, Da Y, Xue Z, et al. Vorinostat, a histone deacetylase inhibitor, suppresses dendritic cell function and ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. Exp Neurol, 2013, 241:56-66.
- [31] Cao DJ, Wang ZV, Battiprolu PK, et al. Histone deacetylase (HDAC) inhibitors attenuate cardiac hypertrophy by suppressing autophagy[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011,108(10):4123-4128.

肺腺癌组织中 *EGFR*, *ROS1*, *ALK* mRNA 表达意义

何琼* 吴龙波 王志华 杜军 王钰婷

[摘要] 目的 探讨肺腺癌(LAC)组织中表皮生长因子受体(*EGFR*)基因突变、肉瘤致瘤因子-受体酪氨酸激酶(*ROS1*)、间变性淋巴瘤激酶(*ALK*)mRNA 表达意义。方法 选取本院经手术病理检查确诊的83例LAC患者,经手术病理采集癌组织与癌旁正常组织,比较不同组织及病理特征患者*EGFR*,*ROS1*,*ALK* mRNA 阳性表达率,分析LAC 1年生存率影响因素,评估上述指标与LAC 1年生存率的关系。结果 癌组织*EGFR*基因突变、*ROS1*、*ALK* mRNA 阳性表达率均高于癌旁正常组织,差异有统计学意义($P<0.05$)。不同临床分期、分化程度及淋巴结转移患者癌组织内*EGFR*基因突变、*ROS1*、*ALK* mRNA 阳性表达率比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。临床分期、分化程度、淋巴结转移、*EGFR*基因突变、*ROS1*、*ALK* mRNA 阳性表达是LAC患者1年病死率的影响因素($P<0.05$)。结论 LAC患者*EGFR*基因突变、*ROS1*、*ALK* mRNA 阳性表达人群具有不同病理特征,检测上述指标,可为分析临床病理特征、寻找靶向用药合适人群、改善预后提供科学指导。

[关键词] 肺腺癌;病理特征;肉瘤致瘤因子-受体酪氨酸激酶;间变性淋巴瘤激酶;表皮生长因子受体

Significance of *EGFR*, *ROS1* and *ALK* mRNA expression in lung adenocarcinoma

HE Qiong*, WU Longbo, WANG Zhihua, DU Jun, WANG Yuting

(Department of Pathology, People's Hospital of Lujiang County, Hefei, Anhi, China, 231500)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the significance of epidermal growth factor receptor (*EGFR*) gene mutation, c-ros oncogene 1, receptor tyrosine kinase (*ROS1*), and anaplastic lymphoma kinase (*ALK*) mRNA expression in lung adenocarcinoma (LAC) tissue. **Methods** A total of 83 LAC patients diagnosed by surgical pathological examination in our hospital were selected, and cancer tissues and adjacent normal tissues were collected by surgical pathology. The positive expression rates of *EGFR*, *ROS1* and *ALK* mRNA in patients with different tissues and pathological characteristics were compared. The factors affecting the 1-year survival rate of LAC were analyzed, and the relationship between the above indicators and the 1-year survival rate of LAC was evaluated. **Results** The positive expression rates of *EGFR* gene mutation and *ROS1* and *ALK* mRNA in cancer tissues were higher than those in the normal tissues adjacent to cancer, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). There were statistically significant differences in the positive expression rates of *EGFR* gene mutation, *ROS1* and *ALK* mRNA in cancer tissues of patients with different clinical stages, degree of differentiation and lymph node metastasis ($P<0.05$). Clinical stage, degree of differentiation, lymph node metastasis, *EGFR* gene mutation, *ROS1* and *ALK* mRNA positive expression were the influencing factors of the 1-year mortality of LAC patients ($P<0.05$). **Conclusion** LAC patients with *EGFR* gene mutations and *ROS1* and *ALK* mRNA positive expression populations have different pathological characteristics. The detection of the above indicators can provide scientific guidance for analyzing clinicopathological characteristics, finding suitable populations for targeted drugs, and improving prognosis.

[KEY WORDS] Lung adenocarcinoma; Pathological features; C-ros oncogene 1, Receptor tyrosine kinase; Anaplastic lymphoma kinase; Epidermal growth factor receptor

基金项目:2019年度安徽省自然科学基金项目(1908085MH262)

作者单位:安徽省庐江县人民医院病理科,安徽,合肥 231500

*通信作者:杜军, E-mail: hq72936@126.com

肺腺癌(Lung adenocarcinoma cells, LAC)是非小细胞肺癌常见亚型之一,发生率约占肺癌总人数的50.0%,多数患者确诊时已处于中晚期,丧失手术治疗最佳时机,疗效及生存率均较低^[1-2]。近年来,随分子生物学及肺癌驱动基因不断深入,以特定分子为靶点的靶向治疗成为临床研究热点。肉瘤致癌因子-受体酪氨酸激酶(c-ros oncogene 1, receptor tyrosine kinase, *ROS1*)异常表达可持续传递生长增殖信号,异常增殖癌细胞。间变性淋巴瘤激酶(anaplastic lymphoma kinase, *ALK*)属胰岛素受体家族,利用基因重排,可刺激下游信号通路表达,增加癌变风险^[3]。表皮生长因子受体(Epidermal growth factor receptor, *EGFR*)作为肺癌驱动基因,与EGF等配体结合,可诱导正常细胞恶性转化,提高癌细胞转移能力^[4]。基于此,本研究尝试分析LAC病理特征及*EGFR*基因突变、*ROS1*、*ALK* mRNA在LAC组织中的表达和临床意义。

1 资料和方法

1.1 一般资料

选取2016年7月至2020年1月安徽省庐江县人民医院经手术病理检查确诊的83例LAC患者,收集癌组织及癌旁正常组织标本,其中女46例,男37例,年龄平均(63.21±6.37)岁,吸烟23例。纳入标准:①均符合《2011 IASLC/ATS/ERS肺腺癌国际多学科分类》^[5]中相关标准,并均经手术病理检查证实为LAC;②预计生存期>6个月;③有足够质量与数量甲醛固定的石蜡包埋组织切片可供分析。排除标准:①近3个月内有放化疗治疗史者;②合并肝肾等其他重要脏器功能障碍者;③合并心源性休克、永久性心脏内传导紊乱等严重心脑血管疾病者;④伴有明显出血倾向者;⑤昏迷或精神行为异常者。本院伦理委员会经审核评议同意本研究,所有研究对象均签署知情同意书。

1.2 方法

取病理科手术切除的LAC癌组织及距癌边缘6 cm以内癌旁正常组织,常规石蜡包埋,切片(厚度约为8 μm),苏木精-伊红染色后,显微镜下对癌组织区域进行标记,常规二甲苯无水乙醇脱蜡水化。通过Quant Studio5实时荧光定量PCR仪以实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(real-time quantitative reverse transcriptase - polymerase chain reaction, RT-PCR)技术检测*EGFR*基因突变,严格按照

厦门艾德公司提供提供的试剂盒说明书操作。通过荧光原位杂交(fluorescence in situ hybridization, FISH)检测*ALK*、*ROS1*基因融合,严格按照武汉康录公司提供的试剂盒说明书操作。依据突变Ct值判定检测结果,标准如下^[6]:Ct值<26为阳性,26≤Ct值<29为弱阳性,Ct值≥29为阴性。

1.3 统计学方法

采用统计学软件SPSS 22.0处理数据;计数资料用n(%)表示,行 χ^2 检验;采用Cox回归分析LAC患者1年病死影响因素;卡普兰-迈耶曲线(Kaplan-Meier, K-M)分析*EGFR*基因突变、*ROS1*、*ALK* mRNA表达对LAC1年病死的影响,Log-Rank检验不同*EGFR*基因突变、*ROS1*、*ALK* mRNA表达LAC患者1年病死率差异性。以P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 癌组织与癌旁正常组织*EGFR*基因突变、*ROS1*、*ALK* mRNA比较

癌组织*EGFR*基因突变、*ROS1*、*ALK* mRNA阳性表达率均高于癌旁正常组织,差异有统计学意义(P<0.05)。见表1。

表1 癌组织与癌旁正常组织*EGFR*基因突变、*ROS1*、*ALK* mRNA比较[n(%)]

Table 1 Comparison of *EGFR* gene mutation, *ROS1* and *ALK* mRNA between cancer tissues and adjacent normal tissues [n(%)]

组别	n	<i>ROS1</i>	<i>ALK</i>	<i>EGFR</i>
癌组织	83	8(9.64)	11(13.25)	46(55.42)
癌旁正常组织	83	0(0.00)	0(0.00)	1(1.21)
t值		6.435	11.781	60.102
P值		0.001	<0.001	<0.001

2.2 不同病理特征患者*EGFR*基因突变、*ROS1*、*ALK* mRNA阳性表达

LAC患者癌组织内*EGFR*基因突变、*ROS1*、*ALK* mRNA阳性表达率在临床分期、分化程度及淋巴结转移方面比较,差异有统计学意义(P<0.05),在性别、年龄、吸烟史、病灶大小方面比较,差异无统计学意义(P>0.05)。见表2。

2.3 LAC患者1年病死情况

不同临床分期、分化程度、淋巴结转移情况、*EGFR*基因突变、*ROS1*、*ALK* mRNA表达患者1年病死率比较,差异有统计学意义(P<0.05)。见表3。

2.4 LAC患者1年病死情况Cox回归分析

纳入Cox回归分析,调整其他混杂因素后,临

表2 不同病理特征患者EGFR基因突变、ROS1、ALK mRNA比较 [n(%)]

Table 2 Comparison of EGFR gene mutation, ROS1 and ALK mRNA in patients with different pathological features [n(%)]

临床参数	例数	ROS1 mRNA (n=8)	χ^2 值	P值	ALK mRNA (n=11)	χ^2 值	P值	EGFR mRNA (n=46)	χ^2 值	P值	
性别	男	37	5(10.00)	0.059	0.808	7(14.00)	0.007	0.933	28(56.00)	0.017	0.896
	女	46	3(9.09)			4(12.12)			18(54.55)		
年龄	<60岁	21	3(8.11)	0.003	0.961	4(10.81)	0.069	0.793	21(56.76)	0.048	0.826
	≥60岁	62	5(10.87)			7(15.22)			25(54.35)		
吸烟史	无	60	6(10.00)	0.055	0.814	8(13.33)	0.107	0.744	32(53.33)	0.382	0.536
	有	23	2(8.70)			3(13.04)			14(60.87)		
临床分期	I+II	40	0(0.00)	6.238	0.013	2(5.00)	4.574	0.033	15(37.50)	10.038	0.002
	III+IV	43	8(18.60)			9(20.93)			31(72.09)		
分化程度	高、中分化	46	1(2.17)	4.819	0.028	2(4.35)	5.486	0.019	21(45.65)	3.987	0.046
	低分化	37	7(18.92)			9(24.32)			25(67.57)		
淋巴结转移	无	67	2(2.99)	13.925	<0.001	4(5.97)	12.917	<0.001	32(47.76)	8.256	0.004
	有	16	6(37.50)			7(43.75)			14(87.50)		
病灶大小	<3 cm	50	5(10.00)	0.083	0.774	7(14.00)	0.007	0.933	28(56.00)	0.000	0.987
	≥3 cm	33	3(9.09)			4(12.12)			18(54.55)		

注:高分化,贴壁生长;中分化,腺泡、乳头生长;低分化,实性,微乳头生长。

表3 LAC患者1年病死情况 [n(%)]

Table 3 One year mortality of LAC patients [n(%)]

临床参数	例数	1年病死率 (n=30)	χ^2 值	P值	
性别	男	37	19(38.00)	0.188	0.665
	女	46	11(33.33)		
年龄	<60岁	21	15(40.54)	0.559	0.455
	≥60岁	62	15(32.61)		
吸烟史	无	60	20(33.33)	0.741	0.389
	有	23	10(43.48)		
临床分期	I+II	40	8(20.00)	8.719	0.003
	III+IV	43	22(51.16)		
分化程度	高、中分化	46	10(21.74)	9.278	0.002
	低分化	37	20(54.05)		
淋巴结转移	无	67	15(22.388)	28.498	<0.001
	有	16	15(93.75)		
病灶大小	<3 cm	50	17(34.00)	0.251	0.617
	≥3 cm	33	13(39.39)		
ROS1 mRNA	阳性	8	7(87.50)	7.804	0.002
	阴性	75	23(30.67)		
ALK mRNA	阳性	11	9(81.82)	9.293	<0.002
	阴性	72	21(29.17)		
EGFR基因突变	阳性	46	24(52.17)	11.488	0.001
	阴性	37	6(16.22)		

床分期、分化程度、淋巴结转移及EGFR基因突变、ROS1、ALK mRNA表达均为LAC患者1年病死的危险因素(P<0.05)。见表4。

表4 LAC患者1年病死情况Cox回归分析

Table 4 Cox regression analysis of 1-year mortality of LAC patients

因素	β 值	S.E.值	Wald χ^2 值	HR	95%CI	P值
临床分期						
II期	1.420	0.328	18.735	4.136	2.785~6.142	<0.05
III期	1.589	0.325	23.913	4.900	3.125~7.684	<0.05
IV期	1.764	0.314	31.551	5.834	3.941~8.637	<0.05
分化程度						
中分化	-0.817	0.252	10.519	0.442	0.245~0.796	<0.05
高分化	-0.996	0.254	15.364	0.370	0.213~0.641	<0.05
淋巴结转移	1.584	0.314	25.769	4.874	2.941~8.076	<0.05
ROS1 mRNA	1.698	0.341	24.806	5.465	3.256~9.173	<0.05
ALK mRNA	1.693	0.352	23.142	5.438	2.851~10.371	<0.05
EGFR基因突变	1.668	0.369	20.424	5.299	3.025~9.284	<0.05

注:临床分期, I期=1, II期=2, III期=3, IV期=4;分化程度,低分化=1,中分化=2,高分化=3;淋巴结转移,无=0,有=1;EGFR基因突变、ROS1、ALK mRNA表达,阴性=0,阳性=1。

2.5 生存曲线

K-M曲线分析,EGFR基因突变、ROS1、ALK mRNA阳性表达患者1年病死率高于阴性表达患者,差异有统计学意义($\chi^2=28.557、23.340、12.793, P<0.05$)。见图1。

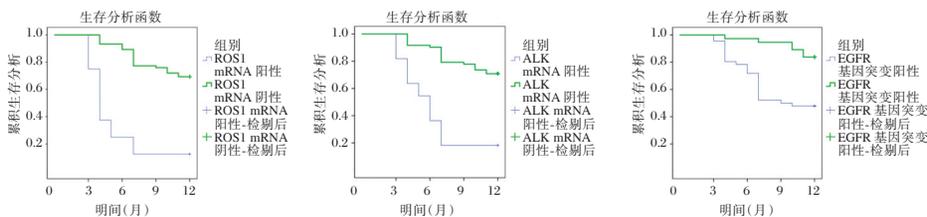


图1 生存曲线

Figure 1 Survival curve

3 讨论

*EGFR*为跨膜受体酪氨酸激酶,主要存在于基质细胞、表皮细胞及部分平滑肌细胞内,可通过磷酸化调控癌细胞增殖及生长相关信号传导。国外相关研究指出^[7],在亚裔人群不吸烟LAC患者中*EGFR*突变比例约达60.0%。国内学者白冬雨等^[8]研究也证实,*EGFR*突变在腺癌人群中发生频率较高。本研究结果提示*EGFR*基因突变可能参与LAC发生、发展。本研究还发现,随临床分期增加、分化程度下降、淋巴结转移,LAC患者出现*EGFR*基因突变现象,结合蒋萱等^[9]研究考虑可能为*EGFR*基因突变一方面可促使EGR-TKI结构域沉积,选择性刺激下游Janus激酶信号转导子与转录激活子和磷脂酰肌醇-3-激酶/丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶信号转导通路,增加*EGFR*表达,异常增殖癌细胞,抑制癌细胞凋亡;进一步经Cox回归分析表明*EGFR*基因突变可对LAC生存状况产生显著影响。建议临床根据*EGFR*基因突变选取适宜靶向药物治疗,以阻断癌细胞增殖,提高LAC患者生存率。

*ALK*现已被证实是肺癌形成与发展中至关重要的通路,相关报道指出,*ALK*阳性率约占非小细胞肺癌的3.0%~7.0%^[10]。*ROS1*属酪氨酸激酶胰岛素受体基因,代表一类新的非小细胞肺癌分子亚型,其发生频率相较于*EGFR*突变、*ALK*重排变异更低,约为1.0%~2.0%^[11]。本研究结果与刘光峨等^[12]研究结果相似。本研究还分别分析了*ROS1*、*ALK* mRNA在LAC不同病理特征中的表达,数据表明,*ROS1*、*ALK* mRNA阳性表达可能增加LAC患者临床分期,诱导癌组织分化,促使淋巴结转移,这可能与*ROS1*、*ALK* mRNA阳性表达激活多条下游信号传导通路、调控肿瘤细胞增殖与分化有关。由此可见,*ROS1*、*ALK* mRNA表达可能在LAC病理进展中发挥重要作用。但Zhang Q等^[13]观点认为,*ROS1*融合在年轻、永不吸烟的非小细胞肺癌患者中更为普遍,与本研究结果存在一定差异,可能与纳入样本量、选取年龄段、肺癌类型不同等因素有关。进一步经K-M曲线分析可知,*EGFR*、*ROS1*、*ALK* mRNA阳性表达LAC患者1年病死率均高于阴性表达患者,有力佐证了*EGFR*、*ROS1*、*ALK* mRNA可为临床评估LAC预后提供有效指标,建议临床对LAC组织进行*EGFR*、*ROS1*、*ALK* mRNA联合检测,进而为临床靶向用药提供更多选择。

综上所述,LAC患者*EGFR*基因突变、*ROS1*、*ALK* mRNA阳性表达人群具有不同病理特征,检测上述指标,可为分析临床病理特征、寻找靶向用药合适人群、改善预后提供科学指导。

参考文献

- [1] 付丹阳,张捷. 肺腺癌诊断的研究进展[J]. 中国实验诊断学, 2019,23(1):172-174.
- [2] Chen Z, Teng X, Zhang J, et al. Molecular features of lung adenocarcinoma in young patients[J]. BMC Cancer, 2019, 19(1):777.
- [3] 杨伟雄,胡创,程超. 影像学表现为磨玻璃病灶的肺腺癌患者术后行*EGFR*、*ALK*、*KRAS*及*ROS1*基因检测的价值[J]. 热带医学杂志, 2019, 19(12):1472-1476.
- [4] Jia Y, Li X, Jiang T, et al. *EGFR*-targeted therapy alters the tumor microenvironment in *EGFR*-driven lung tumors: Implications for combination therapies[J]. Int J Cancer, 2019, 145(5):1432-1444.
- [5] Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, et al. International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma[J]. J Thorac Oncol, 2011, 6(2):244-85.
- [6] 宗亮,孙清超,邓彦超,等. 不同病理分期肺腺癌*EGFR*、*ALK*基因状态与*EGFR*-TKI靶向治疗的关系[J]. 癌症进展, 2016, 14(09):882-884+888.
- [7] Fukuoka M, Wu YL, Thongprasert S, et al. Biomarker analyses and final overall survival results from a phase III, randomized, open-label, first-line study of gefitinib versus carboplatin/paclitaxel in clinically selected patients with advanced non-small-cell lung cancer in Asia (IPASS)[J]. J Clin Oncol, 2011, 29(21):2866-2874.
- [8] 白冬雨,张海萍,索文昊,等. 非小细胞肺癌患者中*EGFR*突变、*ALK*和*ROS1*融合基因表达变化及其临床病理学意义[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2019, 28(1):32-36.
- [9] 蒋萱,罗佳,张晓月,等. *EGFR*和ErbB2表达对肺腺癌纵隔淋巴结转移的预测作用[J]. 肿瘤预防与治疗, 2019, 32(9):816-822.
- [10] 李晓峰,张冠军,汪园园,等. 非小细胞肺癌*EGFR*、*ALK*和*ROS1*基因联合检测及突变共存分析[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2018, 10(6):378-384.
- [11] 乔秀丽,艾丹,梁洪陆,等. 山东地区非小细胞肺癌分子靶向治疗驱动基因表达情况及临床特征分析[J]. 中国肺癌杂志, 2017, 20(1):14-20.
- [12] 刘光峨,杨玲,李佩洁,等. 贵州黔北地区922例非小细胞肺癌*EGFR*、*ALK*、*ROS-1*基因突变状态及其临床病理特征分析[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2020, 27(21):1691-1697.
- [13] Zhang Q, Wu C, Ding W, et al. Prevalence of *ROS1* fusion in Chinese patients with non-small cell lung cancer[J]. Thorac Cancer, 2019, 10(1):47-53.

EMT标志物在胎膜早破患者羊膜上皮细胞中的表达及意义

陈静宁¹ 许静芸² 罗晓薇² 张元鑫³ 吴盛桂³ 宫国良^{3*}

[摘要] 目的 探讨上皮-间叶转化(EMT)标志物E-钙粘附蛋白(E-cadherin)、波形蛋白(Vimentin)、基质金属蛋白酶9(MMP9)、基质金属蛋白组织抑制因子1(TIMPI)在胎膜早破(PROM)患者胎盘羊膜上皮细胞中的表达意义。方法 221例胎膜早破患者分为足月胎膜早破(TPROM)和早产胎膜早破(PPROM)两组,其中TPROM 143例,PPROM 78例,匹配同一时间段内正常足月产51例为对照组,收集患者的基本临床信息;应用免疫组织化学技术对胎盘羊膜组织中EMT标志蛋白E-cadherin、Vimentin、MMP9、TIMPI进行检测。结果 与对照组比较,PPROM和TPROM组在孕、产次指标上,差异有统计学意义($P<0.05$)。年龄、白细胞计数、红细胞计数、血红蛋白值、血小板计数、凝血酶时间、白蛋白、球蛋白等指标在三组间比较,差异无统计学意义($P>0.05$);E-cadherin在各组间均出现阳性表达,以强表达为主,组间比较,差异无统计学意义($P>0.05$),而Vimentin、MMP9、TIMPI在各组间出现明显的差异性表达,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 EMT参与了PROM的发病过程,Vimentin、MMP9、TIMPI在羊膜上皮细胞中的表达可以作为发生EMT的标志物,在临床工作中,通过干预EMT这一病理过程,有望成为治疗胎膜早破的一个新思路。

[关键词] 上皮-间叶转化;免疫组织化学;胎盘;羊膜;胎膜早破

Expression and significance of EMT markers in amniotic epithelial cells of patients with premature rupture of membranes

CHEN Jingning¹, XU Jingyun², LUO Xiaowei², ZHANG Yuanxin³, WU Shenggui³, GONG Guoliang^{3*}

(1. Department of Gynecology and Obstetrics, Shantou Jinping Women and Children's Hospital, Shantou, Guangdong, China, 515044; 2. Department of Pathology, The First Affiliated Hospital of Shantou University Medical College, Shantou, Guangdong, China, 515044; 3. Department of Pathology, Chaonan Minsheng Hospital of Shantou, Shantou, Guangdong, China, 515044)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the expression of E-cadherin, vimentin, matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 1 (TIMPI). **Methods** Two hundred and seventy-two patients with PROM were divided into a full-term PROM (TPROM) group ($n=143$), and a preterm PROM (PPROM) group ($n=78$), fifty-one women with normal term delivery in the same period were selected as a control group. The basic clinical information of the patients was collected first, and then the EMT marker proteins E-cadherin, vimentin, MMP9 and TIMPI in the placental amniotic membrane tissue were detected by immunohistochemistry. **Results** Compared with the control group, the PPROM and TPROM groups had significant differences in pregnancy and birth order ($P<0.05$). There were no statistically significant differences in age, white blood cell count, red blood cell count, hemoglobin value, platelet count, thrombin time, albumin, and globulin among the three groups ($P>0.05$). E-cadherin was positively expressed in all

基金项目:2019年汕头市科技计划重点项目 汕府科[2019]106号

作者单位:1. 汕头市金平区妇幼保健院妇产科,广东,汕头 515044

2. 汕头大学医学院第一附属医院病理科,广东,汕头 515044

3. 汕头潮南民生医院病理科,广东,汕头 515044

*通信作者:宫国良, E-mail:blkgl@163.com

groups, mainly with strong expression, and the comparison between groups showed no statistical significance ($P > 0.05$). However, vimentin, MMP9, and TIMP1 were significantly differentially expressed in all groups, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** EMT is involved in the pathogenesis of PROM. The immunohistochemical method of detecting the expression of Vimentin, MMP9 and TIMP1 in amniotic epithelial cells can be used as markers for the occurrence of EMT. In clinical practice, intervention in the pathological process of EMT is expected to be a new idea for the treatment of premature rupture of membranes.

[KEY WORDS] Epithelial-mesenchymal transformation; Immunohistochemistry; Placenta; Amniotic membrane; Premature rupture of membranes

胎膜早破 (Premature rupture of membranes, PROM) 是最常见的产科疾病之一, 临床上分为早产 PROM (preterm premature rupture of membranes, PPRM) 和足月 PROM (Term premature rupture of membranes, TPRM)。PROM 是早产的主要原因, 会引起各种并发症, 其中不乏胎儿死亡等严重情况^[1-2]。对 PROM 的机制研究, 一直是临床热点, 尽管已经提出了各种潜在的机制, 但其确切的机制尚不清楚, 最新的研究表明上皮间质转化 (Epithelial-mesenchymal transition, EMT) 在胎膜早破的发生中有密切联系, EMT 参与了 PROM, 并且发挥了重要作用^[3-4]。在以往的研究中, 大多选用聚合酶链式反应或者蛋白质印迹等方法检测胎膜中 EMT 的标志物的表达情况^[5], 而对于胎盘羊膜上皮细胞中 EMT 的标志物的免疫组化检测研究且较少, 本文将探讨 EMT 标志物在 PROM 中的表达情况, 阐述 EMT 在胎膜早破中的作用机制, 旨在为 PROM 的预测、诊断及治疗及提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 一般材料

选取本院 2017 年 1 月 1 日至 2020 年 12 月 31 日产科因 PROM 而住院的患者, 经伦理委员会批准共收集 PROM 患者胎盘 221 例, 其中 TPRM 143 例, 年龄 (25.97 ± 4.48) 岁, 孕周 (39.13 ± 1.32) 周; PPRM 78 例, 年龄 (26.87 ± 5.52) 岁, 孕周 (33.31 ± 2.53) 周; 并收集同一时间段正常产胎盘 51 例作为对照组, 年龄 (26.12 ± 5.03) 岁, 孕周 (39.31 ± 1.41) 周。所有患者均同意将胎盘送至病理科检查及参与科学研究。纳入标准: PROM 纳入标准包括诊断为 PROM, 且妊娠大于 26 周的患者, 并有完整的病例信息记录。排除标准: 排除多胎妊娠、畸形、试管婴儿及妊娠期常见疾病, 如妊娠期糖尿病和先兆子痫, 以及明确的产妇及胎儿感染。

1.2 方法

1.2.1 患者的基本临床信息

收集的病例均以胎膜早破为第一诊断入院, 采集的临床数据均为入院后第一次记录或检查结果, 包括产妇年龄、孕产次、白细胞计数、中性粒细胞计数、单核细胞计数、红细胞计数、血小板计数、血红蛋白浓度、凝血酶原时间、总蛋白量、白蛋白量、球蛋白量、白/球比例信息。

1.2.2 免疫组织化学染色及评估

标本经 10% 中性缓冲福尔马林固定, 常规石蜡包埋、切片及染色。E-Cadherin 单克隆抗体 (克隆号: MX020, 稀释度 1:100)、Vimentin 单克隆抗体 (克隆号: MX034, 稀释度 1:100) 均购自中国福州迈新生物技术开发有限公司; MMP9 单克隆抗体 (克隆号: 56-2A4, 稀释度 1:300)、TIMP1 单克隆抗体 (克隆号: EPR18352, 稀释度 1:300) 均购自英国 Abcam 公司。免疫组织化学采用深圳达盟生物科技有限公司全自动免疫组化染色系统, 机器型号为 AS300。由胎膜破裂位置开始在欧林巴斯 B51 显微镜下观察, 由两位病理医生进行免疫组化评分。参考免疫反应评分 (IRS)^[6], 结果以染色强度 \times 阳性细胞百分比表示, 在染色强度和阳性细胞百分比的基础上进行评估免疫组化指标。其中 E-Cadherin、MMP9、TIMP1 基本所用的病例均出现不同程度的阳性表达, 因此分类上采用强表达和弱表达来表示, Vimentin 出现部分阴性表达病例, 采用强表达、弱表达、阴性三分类。由于部分病例出现羊膜上皮细胞脱落, 因此, 免疫组化只染色能够完整显示羊膜上皮细胞的病例。

1.3 统计分析

采用 SPSS 19.0 软件进行数据分析; 计数资料以 $n(\%)$ 表示, 行 χ^2 检验, 多组事后两两比较使用 FDR 校正 P 值; 计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示; 使用 Shapiro-Wilk 检验是否服从正态分布; 服从正态分布的, 使用 Levene 检验是否方差相等。方差相等的,

使用方差分析。当方差分析差异有统计学意义的,使用SNK检验事后两两比较;方差不相等的,或不服从正态分布的,使用Kruskal-Wallis检验。当Kruskal-Wallis检验差异有统计学意义的,使用Nemenyi检验进行事后两两比较。E-cadherin、vimentin、MMP9、TIMP1组间比较采用方差分析; $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

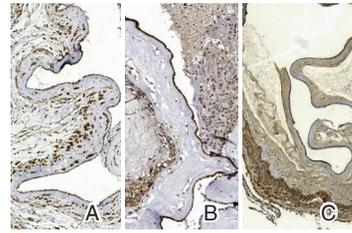
2 结果

2.1 3组基本资料比较

在孕、产次上比较,对照组>PPROM组>TPROM组,差异有统计学意义($P<0.05$)。3组间年龄、白细胞计数、红细胞计数、血红蛋白值、血小板计数、凝血酶时间、白蛋白、球蛋白指标比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表1。

2.2 EMT标志物在胎膜早破患者胎盘羊膜上皮细胞中的表达

E-cadherin在各组中均出现阳性表达,并且以强阳性为主,各组间比较,差异无统计学意义($P>0.05$);Vimentin在3组间比较,差异有统计学意义($P<0.05$);MMP9和TIMP1在各组间表达比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表2、图1。



注:A为PPROM患者羊膜上皮细胞Vimentin高表达;B为PPROM患者羊膜上皮细胞MMP9高表达;C为PPROM患者羊膜上皮细胞TIMP1低表达。

图1 Vimentin、MMP9、TIMP1在胎膜早破患者胎盘羊膜上皮细胞中的表达(SP,×400)

Figure 1 Expression of Vimentin, MMP9 and TIMP1 in placental amniotic epithelial cells of patients with premature rupture of membranes (SP,×400)

3 讨论

羊膜表面为上皮细胞,上皮细胞下为致密的胚外中胚层,含较多的肌纤维母细胞。肌纤维母细胞能够产生胶原纤维,因此保持足够数量的肌纤维母细胞是保障羊膜强度的关键因素。目前的研究认为,肌纤维母细胞的来源有以下几种方式:间质固有肌纤维母细胞活化;循环中来源于骨髓的纤维母细胞迁入;除了这两种主要来源外,上皮细胞可以通过EMT转化为肌纤维母细胞,参与组

表1 胎膜早破组与对照组基本资料比较 [M(Q1-Q3), ($\bar{x}\pm s$)]

Table 1 Comparison of basic data between premature rupture of membranes group and control group [M(Q1-Q3), ($\bar{x}\pm s$)]

项目	n	足月对照	n	PPROM组	n	TPROM组	统计量	P值
年龄	51	26.00(22.00~30.00)	78	26.00(23.25~30.00)	143	26.00(23.00~28.00)	1.319	0.517
白细胞	51	10.08(8.31~12.63)	78	10.55(9.28~13.73)	143	10.54(8.91~12.70)	2.515	0.284
中性粒	51	6.98(5.71~9.43)	78	7.33(6.04~9.96)	143	7.00(5.90~9.26)	1.674	0.433
单核细胞	51	0.64(0.54~0.86)	78	0.78(0.62~0.99)	143	0.70(0.52~0.90)	7.068	0.029
红细胞	51	4.03(3.68~4.16)	78	3.79(3.56~4.08)	143	3.88(3.61~4.12)	5.429	0.066
血红蛋白	51	112.76±16.21	78	109.85±12.44	143	109.10±16.38	1.075	0.343 ^a
血小板	51	212.00(178.50~250.50)	78	218.50(194.00~256.75)	143	230.50(172.50~271.75)	1.676	0.433
凝血酶原时间	50	9.50(9.12~9.80)	71	9.70(9.38~10.12)	130	9.60(9.20~10.00)	3.360	0.186
总蛋白	51	62.80(59.85~66.20)	73	61.60(58.90~65.30)	143	61.95(59.60~64.40)	1.793	0.408
白蛋白	51	33.20(31.65~35.10)	73	33.40(31.40~35.40)	143	33.10(31.50~34.70)	0.959	0.619
球蛋白	51	29.60(28.00~31.25)	73	28.10(26.00~30.40)	143	29.40(26.60~31.08)	3.909	0.142
白球比例	51	1.12(1.06~1.23)	73	1.17(1.05~1.34)	142	1.14(1.04~1.29)	3.069	0.216
孕次	51	2.00(1.00~3.00)	78	2.00(1.00~2.00)	143	1.00(1.00~2.00)	8.896	0.012
产次	51	2.00(1.00~2.00)	78	2.00(1.00~2.00)	143	1.00(1.00~2.00)	13.482	0.001

注:组间比较差异有统计学意义,^a $P<0.05$;b为方差分析得到P值,其他均为Kruskal-Wallis检验得到P值。

表2 EMT标志物在胎膜羊膜上皮细胞中的表达情况 [n(%)]

Table 2 Expression of EMT markers in placental amniotic epithelial cells [n(%)]

	E-cadherin		Vimentin		阴性	MMP9		TIMP1	
	强表达	弱表达	强表达	弱表达		强表达	弱表达	强表达	弱表达
PPROM组	47(92.2)	4(7.8)	30(58.8)	12(23.5)	9(17.7)	22(43.1)	29(56.9)	27(52.9)	24(47.1)
TPROM组	101(96.2)	4(3.8)	44(41.9)	26(24.8)	35(33.3)	39(37.1)	66(62.9)	68(64.8)	37(35.2)
足月对照组	37(94.9)	2(5.1)	4(10.3)	15(29.4)	20(60.3)	3(7.7)	36(92.3)	34(87.2)	5(12.8)
χ^2 值	1.148		23.177			14.520		11.767	
P值	0.563		0.000			0.001		0.003	

组织纤维化修复以补充肌纤维母细胞的数量,来维持生理功能的稳定,EMT是指上皮细胞在特定的条件下发生程序性转化,经过细胞骨架重塑,转变成具有迁移能力的间叶细胞的过程。EMT不仅存在胚胎发育过程中,同时还参与了组织再生、器官纤维化以及肿瘤浸润转移等过程,从组织的修复理论上来说,EMT参与胎膜早破的过程也是合理的^[7]。

大部分理论认为,PROM由多个因素引起,炎症、基质金属蛋白酶(MMPs)、细胞因子、细胞凋亡和氧化应激等均参与其中^[8-9],而EMT与PROM的关系研究是近几年才出现的,理论体系尚不十分完整。对于EMT的研究,首先是选取标志物,不同研究文献中选用的标志物大同小异^[10],本研究选用比较常见的、意义明确的EMT标志物,分别为:E-cadherin、Vimentin、MMP9、TIMP1。E-Cadherin是主要的EMT标志物,其减少或丢失是EMT的标志性改变。有关EMT和PROM的研究文献中,大多数都会选取该指标,但研究方法很少采用免疫组化法,本研究结果这体现出免疫组化的弊端,免疫组化是最好的定性指标,广泛应用于临床和科研中,但其没有精确定量的功能。因此,在免疫组化水平,E-Cadherin无法应用于EMT与PROM关系研究。研究中Vimentin、MMP9、TIMP1均出现差异性表达,针对于胎膜早破的EMT机制研究,这3个指标在免疫组化水平可以应用。Vimentin、MMP9、TIMP1均为常用的EMT标志物,其中以Vimentin意义最为突出,Vimentin是最典型的间叶细胞标志物,Vimentin在羊膜上皮细胞中出现阳性表达,代表着羊膜上皮细胞向间叶细胞转化这一EMT过程。MMP9和TIMP1在各组间表达比较,差异有统计学意义,本研究 and 文献报道结果一致^[11-12]。

有关PROM与EMT的研究并不多,最有代表性的是Haruta Mogami分别于2017年和2018年在同一期刊发表的两篇论著^[3-4],对EMT在胎膜早破中的作用进行了动物实验,研究发现,小破裂引起细胞因子的瞬时上调,而大破裂引起胎膜中促炎细胞因子的持续上调。来自羊膜的胎儿巨噬细胞被募集到破裂的羊膜中,其中巨噬细胞粘附分子被高度表达。招募的巨噬细胞释放IL-1 β 和TNF,促进EMT和上皮细胞迁移。该研究为EMT在PROM中的作用机制奠定了实验基础。Carla Janzen于2017年发表了题目为《The Role of Epithelial to Mesenchymal Transition in Human Amniotic Membrane Rupture》的论

著^[5],通过对人类胎膜和羊膜上皮细胞的研究,提出在PPROM的羊膜中,EMT作用增强,研究从免疫组化角度证实了这一理论。希望通过新的理论,能够提出针对EMT的治疗手段,达到预防和治疗胎膜早破这一产科常见疾病的目的。

综上所述,EMT参与了PROM的发病过程,免疫组化方法检测vimentin、MMP9、TIMP1在羊膜上皮细胞中的表达可以作为其发生EMT标志物,在临床工作中,通过干预EMT这一病理过程,有望成为治疗胎膜早破的一个新思路。

参考文献

- [1] 刘婧,刘妮英,蒋依伶. 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[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(11): 1514-1517.
- [2] Ilona H, Katerina K, Katarina I, et al. Expression profile of C19MC microRNAs in placental tissue of patients with preterm prelabor rupture of membranes and spontaneous preterm birth[J]. Mol Med Rep, 2017, 16(4): 3849-3862.
- [3] Mogami H, Hari Kishore A, Akgul Y, et al. Healing of Preterm Ruptured Fetal Membranes[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 13139.
- [4] Mogami H, Kishore AH, Word RA. Collagen Type 1 Accelerates Healing of Ruptured Fetal Membranes [J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 696.
- [5] Janzen C, Sen S, Lei MY, Gagliardi de Assumpcao M, et al. The Role of Epithelial to Mesenchymal Transition in Human Amniotic Membrane Rupture [J]. J Clin Endocr Metab, 2017, 102(4): 1261-1269.
- [6] Rajkumar T, Stamp GW, Pandha HS, et al. Expression of the type 1 tyrosine kinase growth factor receptors EGF receptor, c-erbB2 and c-erbB3 in bladder cancer [J]. J Pathol, 1996, 179(4): 381-385.
- [7] Arikat S, Novince RW, Mercer BM, et al. Separation of amnion from chorion is an integral event to the rupture of normal term fetal membranes and constitutes a significant component of the work required [J]. Am J Obstet Gynecol, 2006, 194(1): 211-217.
- [8] Dwamouliere A, Chaponnier C, Gabbiani G. Tissue repair, contraction, and the myofibroblast [J]. Wound Repair Regen, 2005, 13(1): 7-12.
- [9] Gomez-Lopez N, Laresgoiti-Servitje E, Olson DM, et al. The Role of Chemokines in Term and Premature Rupture of the Fetal Membranes: A Review [J]. Biol Reprod, 2010, 82(5): 809-814.
- [10] Strauss JF. Extracellular matrix dynamics and fetal membrane Rupture [J]. Reprod Sci, 2013, 20(2): 140-153.
- [11] Voulgari A, Pintzas A. Epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis: mechanisms, markers and strategies to overcome drug resistance in the clinic [J]. Biochim Biophys Acta, 2009, 1796(2): 75-90.
- [12] Kim MA, Lee HS, Lee HE, et al. Prognostic importance of epithelial-mesenchymal transition-related protein expression in gastric carcinoma [J]. Histopathology, 2009, 54(4): 442-451.

CEP164 基因和 CENPU 基因多态性与精神分裂症的关联研究

汪昕¹ 张旭¹ 樊焱² 魏来² 沈冲² 薛永^{1*}

[摘要] 目的 探讨 CEP164 基因 rs9163 位点和 CENPU 基因 rs13478 位点多态性与精神分裂症 (SZ) 发生风险的关联。方法 选择 2 555 例 SZ 患者和 2 139 例健康对照, 采用 Taqman 基因分型技术检测 CEP164 基因 rs9163 位点和 CENPU 基因 rs13478 位点多态性, Logistic 回归风险模型分析 CEP164 基因和 CENPU 基因变异与 SZ 的关联。结果 在调整性别和年龄后, rs9163 和与 rs13478 位点不同基因分型(相加模型、显性模型和隐性模型)与 SZ 的发生风险关联无统计学意义 ($P>0.05$)。分层分析表明, 无论是男性人群还是女性人群、患者有无家族史, rs9163 和与 rs13478 位点不同基因分型与 SZ 的发生风险关联均无统计学意义 ($P>0.05$)。结论 CEP164 基因 rs9163 位点和 CENPU 基因 rs13478 位点多态性与 SZ 发生风险无显著关联, 表明微小核糖核酸 (miRNA) 可能并非通过结合 rs9163 位点和 rs13478 位点参与 SZ 的发病机制。

[关键词] 精神分裂症; CEP164 基因; CENPU 基因; 单核苷酸多态性

Association between CEP164 gene and CENPU gene polymorphism and schizophrenia

WANG Xin¹, ZHANG Xu¹, FAN Yao², WEI Lai², SHEN Chong², XUE Yong^{1*}

(1. Clinical Laboratory, the Third People's Hospital of Huai'an, Huai'an, Jiangsu, China, 223001; 2. Department of Epidemiology and Health Statistics, School of Public Health, Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu, China, 210000)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the correlation between the polymorphism of rs9163 in CEP164 gene and rs13478 in CENPU gene and occurrence risk of schizophrenia (SZ). **Methods** 2555 SZ patients and 2 139 healthy controls were selected. The polymorphism of rs9163 in CEP164 gene and rs13478 in CENPU gene were detected by Taqman genotyping technique. Logistic regression risk model was used to analyze the association between CEP164 gene and CENPU gene variation and SZ. **Results** There was no significant correlation between rs9163 and rs13478 genotypes (additive model, dominant model and recessive model) and the risk of SZ after adjusting for gender and age ($P>0.05$). Stratification analysis showed that whether male or female population, whether the patient has a family history, rs9163 and rs13478 different genotypes were not significantly associated with the risk of SZ ($P>0.05$). **Conclusion** The polymorphism of rs9163 in CEP164 gene and rs13478 in CENPU gene were not significantly associated with the risk of SZ, indicating that miRNA may not be involved in the pathogenesis of SZ by binding rs9163 and rs13478.

[KEY WORDS] Schizophrenia; CEP164 gene; CENPU gene; Single nucleotide polymorphism

精神分裂症 (schizophrenia, SZ) 是一组发病机制复杂、原因未明的精神系统性疾病, 具有情感、意志、行为、感知等多种精神异常表现, 以精神表现与现实环境之间的不一致为主要特点^[1]。SZ 的

发生涉及遗传和环境因素的共同作用。全基因组关联研究 (genome-wide association study, GWAS) 发现了大量与 SZ 相关的单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP)。鉴于 CEP164 基

基金项目: 淮安市科技项目 (HAB201823)

作者单位: 1. 江苏省淮安市第三人民医院检验科, 江苏, 淮安 223001

2. 南京医科大学公共卫生学院流行病学与卫生统计学系, 江苏, 南京 210000

*通信作者: 薛永, E-mail: 247304103@qq.com

因和 *CENPU* 基因在 SZ 及其他精神疾病中的研究尚未见报道,本研究通过 TaqMan 基因分型技术检测 *CEP164* 基因 rs9163 位点和 *CENPU* 基因 rs13478 位点多态性,探讨 *CEP164* 基因和 *CENPU* 基因变异与 SZ 之间的关系,旨在从分子生物学角度探讨 *CEP164* 基因和 *CENPU* 基因在 SZ 人群中的遗传机制,初步探索 miRNA 在 SZ 发生中的下游相关分子机制,为临床诊断及治疗提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取淮安市第三人民医院 2009 年 8 月到 2018 年 8 月住院的 SZ 患者 2 555 例为病例组,其中男性 1 173 例,女性 1 382 例,平均年龄(34.72±13.08)岁。入选标准:符合《疾病和有关健康问题的国际统计分类》第 10 版(ICD-10)诊断标准^[2]。排除标准:脑器质性和躯体疾病所致精神障碍、精神活性物质所致精神障碍。患者病前无肥胖、糖尿病、高血压及内分泌疾病史,无相关遗传病史。同时选取同时期淮安市社区的健康人 2 139 例为对照组,男性 1 331 例,女性 808 例,平均年龄(44.07±8.50)岁。本研究经医院医学伦理委员会批准,所有受试者均知情同意并签署知情同意书。

1.2 研究方法

1.2.1 DNA 的提取

研究对象均在早晨空腹条件下,用 EDTA 抗凝采血管采集静脉血 5 mL。在 24 h 内对血样本进行 4 000 转离心 10 min,血浆分离至 1.5 mL 离心管中。剩余血样本留存放置于-80℃冰柜中保存。DNA 提取采用酚氯仿法。

1.2.2 SNP 位点的选择

应用生物信息学预测软件 PolymiRTS Database 3.0(2013)和 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)的 dbSNP 数据库,进一步筛选重复验证可能与 SZ 相关联的遗传位点进行的研究,最终选择 *CEP164* 基因 rs9163 位点和 *CENPU* 基因 rs13478 位点。

1.2.3 基因分型

应用美国 ABI 公司 Taqman-MGB 探针技术完成研究对象的基因分型。针对 rs9163 和 rs13478 两个 SNP 位点分别设计聚合酶链式反应(PCR)引物和 TaqMan 探针,进行实时荧光 PCR 扩增。PCR 扩增在 ABI 9700 PCR 仪上读取,实验结果通过分析软件 SDS 2.3 获得。整个 PCR 反应体系的体积

为 4.2 μL,具体包括 1.6 μL 的 Mix 预混液,正向引物和反向引物各 0.1 μL,两种探针各 0.1 μL,去离子水 1.2 μL,DNA 模板 1 μL。

PCR 反应程序为:50℃预反应 2 min,95℃预变 10 min;PCR 扩增 95℃变性 15 s,60℃退火延伸 1 min,45 个循环。rs9163 位点多态性 PCR 正向引物:5'-CCACAACGGCAGCATCTCCA-3',反向引物:5'-TCCTCTGGGACACTTTGGGT-3',TaqMan 探针序列为 5'-CAGGGCCAGGCAC-3'和 5'-CCAGGG CCGGGCA-3';rs13478 位点多态性 PCR 正向引物:AGGTAACAGCATGAGACTCGTCTT CCT-3',反向引物:TCTGGGAGCCGAAAGCCATC-3';TaqMan 探针序列为 5'-TAGACTGCTTCTTCTC-3'和 5'-TAGACTGCTTTTCTCATC-3'。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析。采用多元 Logistic 回归模型分析基因位点多态性与 SZ 的关联性,计算比值比(odds ratio, OR)及其 95%可信区间(confidence interval, CI),并校正年龄、性别协变量。健康对照组基因型进行 Hardy-Weinberg 平衡定律检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 *CEP164* 基因和 *CENPU* 基因多态性与 SZ 的关联分析

C 和 T 等位基因在健康对照组中的分布频率分别为 85.6% 和 14.4%(rs9163 位点),67.7% 和 32.3%(rs13478 位点),符合 Hardy-Weinberg 定律($P > 0.05$)。Logistic 回归分析显示,在调整性别和年龄后,rs9163 位点和与 rs13478 位点相加模型、显性模型和隐性模型与 SZ 的关联均无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

2.2 *CEP164* 基因和 *CENPU* 基因变异与 SZ 发生风险的性别分层分析

Logistic 回归分析显示,在调整年龄后,无论是男性还是女性人群中,rs9163 和与 rs13478 位点与 SZ 关联无统计学意义($P > 0.05$)。见表 2。

2.3 *CEP164* 基因和 *CENPU* 基因变异与 SZ 发生风险的家族史分层分析

根据 SZ 患者有无家族史为变量对研究对象分层,并调整年龄和性别,Logistic 回归分析显示,rs9163 和与 rs13478 位点多态性与 SZ 关联均无统计学意义($P > 0.05$)。见表 3。

表1 *CEP164* 基因和 *CENPU* 基因多态性与 SZ 发生风险的关联分析Table 1 Association analysis of *CEP164* gene and *CENPU* gene polymorphism with SZ risk

基因	位点	WT/HT/MT	病例组	对照组	遗传模型	OR 值	95%CI ^a	P 值
<i>CEP164</i>	rs9163	CC/CT/TT	1904/606/45	1559/545/35	相加	1.05	0.97~1.12	0.238
					显性	1.06	0.65~1.72	0.824
					隐性	1.09	0.94~1.26	0.235
<i>CENPU</i>	rs13478	CC/CT/TT	1155/1152/248	973/952/214	相加	0.97	0.91~1.04	0.340
					显性	1.02	0.83~1.26	0.849
					隐性	0.95	0.84~1.08	0.455

注: WT:野生型, HT:杂合型, MT:突变型, a:调整年龄和性别。

表2 性别分层分析 *CEP164* 基因和 *CENPU* 基因多态性与 SZ 的发生风险Table 2 Gender stratified analysis of *CEP164* gene and *CENPU* gene polymorphism and the risk of SZ

基因	位点	分层因素	WT/HT/MT	病例组	对照组	遗传模型	OR 值	95%CI ^a	P 值
<i>CEP164</i>	rs9163	男性	CC/CT/TT	853/300/20	957/35618	相加	1.05	0.95~1.16	0.361
						显性	0.87	0.42~1.78	0.670
						隐性	1.09	0.89~1.33	0.340
		女性	CC/CT/TT	1051/306/25	602/189/17	相加	1.05	0.94~1.16	0.422
						显性	1.26	0.65~2.42	0.494
						隐性	1.10	0.89~1.36	0.374
<i>CENPU</i>	rs13478	男性	CC/CT/TT	542/523/108	603/596/132	相加	1.00	0.91~1.10	0.964
						显性	1.07	0.79~1.44	0.681
						隐性	1.02	0.85~1.21	0.870
		女性	CC/CT/TT	613/629/140	370/356/82	相加	0.94	0.86~1.04	0.229
						显性	0.98	0.72~1.32	0.870
						隐性	0.89	0.74~1.07	0.231

注: WT:野生型, HT:杂合型, MT:突变型, a:调整年龄。

表3 家族史分层分析 *CEP164* 基因和 *CENPU* 基因多态性与 SZ 的发生风险Table 3 Stratified analysis of family history of *CEP164* gene and *CENPU* gene polymorphism and the risk of SZ

基因	位点	分层因素	WT/HT/MT	病例组	对照组	遗传模型	OR	95%CI ^a	P 值
<i>CEP164</i>	rs9163	无家族史	CC/CT/TT	1493/474/39	1559/545/35	相加	0.94	0.82~1.08	0.365
						显性	0.92	0.79~1.07	0.290
						隐性	1.05	0.63~1.73	0.862
		有家族史	CC/CT/TT	411/132/6	1559/545/35	相加	0.89	0.72~1.09	0.243
						显性	0.90	0.72~1.12	0.347
						隐性	0.58	0.24~1.43	0.236
<i>CENPU</i>	rs13478	无家族史	CC/CT/TT	905/897/204	973/952/214	相加	1.04	0.94~1.15	0.482
						显性	1.05	0.92~1.20	0.448
						隐性	1.03	0.83~1.29	0.788
		有家族史	CC/CT/TT	250/255/44	973/952/214	相加	0.98	0.84~1.14	0.765
						显性	1.04	0.85~1.26	0.715
						隐性	0.79	0.56~1.13	0.199

注: WT:野生型, HT:杂合型, MT:突变型, a:调整年龄和性别。

3 讨论

自2008年第1篇关于SZ GWAS分析的文章发表以来^[3],通过GWAS分析已发现许多与SZ相关的SNP^[4-6]。以SZ为焦点的GWAS发现也具有交叉表型意义。研究发现rs13107325 T等位基因与SZ、体重指数、高密度脂蛋白胆固醇、血压以及N端前脑钠素(N-terminal forebrain natriuretic hormone, NT-proBNP)相关^[7-12]。Verena等^[13]在染色

体15q25.1上的*CHRNA3/CHRNA5/CHRNA4*簇中发现了SZ与肺癌的共同突变位点,另外两个位点(6p22.1和11q12.1)在肺癌和SZ的相关组织类型中显示交叉表型关联和基因表达的下游多向效应。本研究尚未发现*CEP164*基因和*CENPU*基因位点多态性与SZ存在显著性关联,是否还有其他因素,如SZ患者的生活环境、身体活动水平、其他疾病等因素影响rs9163和rs13478位点多态性对SZ的发生风险有待深入探讨。

miRNA为一类长度约为18~25个核苷酸(nt)、具有高度保守性的非编码的微小RNA,通过与靶基因的3'非翻译区(3'Non-translation area, 3'UTR)结合,抑制靶基因的翻译过程或者降解靶基因 mRNA 而在基因转录后水平起到调控作用^[14]。研究表明,精神障碍性疾病的易感基因变异及相应的生物学功能的改变与 miRNA 表达量或者结构改变有关联^[15]。本研究前期实验表明 miR-328、miR-886-5p、miR1243、miR-663b、miR-1274a 可能参与SZ的发病机制。

位于靶基因 mRNA 3'UTR 区 miRNA 结合位点内的 SNP 将会影响 miRNA 与 mRNA 的结合,从而使 miRNA 对 mRNA 的调控过程受阻。近年来,人们已经发现若干个位于 miRNA 结合位点的 SNP 对 SZ 的发生发展具有影响。William 等^[16]发现 miR-616 与 *H3F3B* 转录本的结合会被位于 *H3F3B* 3'UTR 内的 rs1060120 的等位变异所改变,rs1060120 A 等位基因显著降低了荧光素酶的表达,表明 A 等位基因与 miR-616 的相互作用强于 G 等位基因,从而通过下游效应增加了 SZ 谱系诊断的风险。Hou 等^[17]通过对 GWAS SZ 相关变异位点的检索发现,位于 *FURIN* 基因 3'UTR 区 rs4702-G 可通过增加 miR-338-3p 的结合能力而参与 *FURIN* 的表达下调,而 *FURIN* 的表达量降低将导致成熟脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)的生成减少,后者的降低已经报道与 SZ 的发生相关。这些结果证实了位于 miRNA 结合位点的 SNP 可能改变 SZ 的表观遗传机制,从而增加 SZ 相关疾病的风险。本研究应用 miRNA 靶基因预测软件预测差异表达的 miRNA 结合区域有 2 个 SNP 位点,分别为 rs9163 位点和 rs13478 位点,这两位在 SZ 及其他精神疾病中的研究暂未见报道。本研究尚未发现这两位点多态性与 SZ 存在显著性关联,推测 miRNA 并非通过结合 rs9163 位点和 rs13478 位点调控 SZ 的发生,很有可能通过其他信号通路参与 SZ 的发生和发展。

现有的预测软件或网站只能从生物信息学方面预测位于 miRNA 结合位点的 SNP 对 miRNA 结合 mRNA 的影响,具体的功能还需要构建荧光报告载体验证。本研究初步表明了 *CEP164* 基因 rs9163 位点和 *CENPU* 基因 rs13478 位点变异与 SZ 的关系。为进一步探讨这两点与 SZ 的关系,后续实验将会检测 *CEP164* 基因和 *CENPU* 基因在 SZ 病例组和对照健康对照组中的表达,以及采用荧光素酶报告基因实验验证 *CEP164* 基因和 *CENPU* 基

因是否是 miRNA 的靶基因。

参考文献

- [1] Balter M. Schizophrenia's Unyielding Mysteries[J]. Sci Am, 2017, 316(5):54-61.
- [2] Janca A, Hiller W. ICD-10 checklists--a tool for clinicians' use of the ICD-10 classification of mental and behavioral disorders[J]. Compreh Psych, 1996, 37(3): 180-187.
- [3] Patrick FS, Danyu L, JungYing T, et al. Genomewide Association for Schizophrenia in the CATIE Study: Results of Stage 1[J]. Molec Psych, 2008, 13(6): 570-584.
- [4] Stephan R, Benjamin MN, Aiden C, et al. Biological Insights From 108 Schizophrenia-Associated Genetic Loci[J]. Nature, 2014, 511(7510): 421-427.
- [5] Pouget JG. The Emerging Immunogenetic Architecture of Schizophrenia[J]. Schizophr Bull, 2018, 44(5): 993-1004.
- [6] Antonio FP, Peter H, Andrew JP, et al. Common schizophrenia alleles are enriched in mutation-intolerant genes and in regions under strong background selection [J]. Nature Genet, 2018, 50(3): 381-389.
- [7] Goes FS, McGrath J, Avramopoulos D, et al. Genome-wide association study of schizophrenia in Ashkenazi Jews[J]. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet, 2015, 168(8):649-659.
- [8] Locke AE, Kahali B, Berndt SI, et al. Genetic studies of body mass index yield new insights for obesity biology [J]. Nature, 2015, 518(7538):197-206.
- [9] Felix JF, Bradfield JP, Monnereau C, et al. Genome-wide association analysis identifies three new susceptibility loci for childhood body mass index[J]. Hum Mol Genet, 2016, 25(2): 389-403.
- [10] Gabe H, Kevin M, Supak J, et al. A missense variant in SLC39A8 is associated with severe idiopathic scoliosis [J]. Nature Commun, 2018, 9(1): 4171.
- [11] Evangelos E, Helen RW, David MA, et al. Genetic analysis of over one million people identifies 535 new loci associated with blood pressure traits[J]. Nature Genet, 2018, 50(10): 1412-1425.
- [12] Perttu PS, Aki SH, Taru T, et al. Genome-Wide Association Study Implicates Atrial Natriuretic Peptide Rather Than B-Type Natriuretic Peptide in the Regulation of Blood Pressure in the General Population [J]. Circ Cardiovasc Genet, 2017, 10(6):e001713.
- [13] Verena Z, Erik GJ, Oleksandr F, et al. Identification of shared genetic variants between schizophrenia and lung cancer [J]. Sci Rep, 2018, 8: 674.
- [14] Kou XJ, Chen DD, Chen N. The Regulation of microRNAs in Alzheimer's Disease[J]. Front Neurol, 2020, 11: 288.
- [15] Verónica M, Julia YC, Lidia D, et al. The Role of MicroRNAs in Environmental Risk Factors, Noise-Induced Hearing Loss, and Mental Stress[J]. Antioxid Redox Signal, 2018, 28(9): 773-796.
- [16] William M, Michael PM, Marco A, et al. Validation of a microRNA target site polymorphism in H3F3B that is potentially associated with a broad schizophrenia phenotype [J]. Plos One, 2018, 13(3): e0194233.
- [17] Hou Y, Liang W, Zhang J, et al. Schizophrenia-associated rs4702 G allele-specific downregulation of *FURIN* expression by miR-338-3p reduces BDNF production [J]. Schizophr Res, 2018, 199: 176-180.

miR-19b-3p、MnSOD、NO/ET-1与脑梗死后血管性痴呆预测效能

高华^{1*} 杨嘉君¹ 张新华²

[摘要] 目的 探讨微小RNA-19b-3p(miR-19b-3p)、锰超氧化物歧化酶(MnSOD)、一氧化氮与内皮素-1比值(NO/ET-1)对脑梗死后血管性痴呆(VaD)的预测效能。方法 选取2017年5月至2020年6月本院收治的80例脑梗死患者,根据6个月内是否发生VaD分为VaD组($n=21$)、无VaD组($n=57$)。比较两组基线资料、治疗前和出院时miR-19b-3p、MnSOD、NO/ET-1、简易智力状态检查量表(MMSE)评分,采用Pearson及偏相关性分析miR-19b-3p、MnSOD、NO/ET-1与MMSE评分相关性,受试者工作特征曲线(ROC)分析miR-19b-3p、MnSOD、NO/ET-1预测VaD的价值。结果 80例脑梗死患者,随访6个月,失访2例,VaD发生率为26.92%(21/78);VaD组吸烟史、入院时NIHSS评分、糖尿病分布情况与无VaD组比较,差异有统计学意义($P<0.05$);出院时VaD组miR-19b-3p高于无VaD组,MnSOD、NO/ET-1、MMSE评分低于无VaD组,差异有统计学意义($P<0.05$);miR-19b-3p与MMSE呈负相关,MnSOD、NO/ET-1与MMSE评分呈正相关($P<0.05$);将吸烟史、入院时NIHSS评分、糖尿病因素控制后,miR-19b-3p、MnSOD、NO/ET-1仍与MMSE评分相关($P<0.05$);miR-19b-3p+MnSOD+NO/ET-1预测VaD的AUC为0.957,大于单一指标预测($P<0.05$)。结论 miR-19b-3p、MnSOD、NO/ET-1可作为临床评估脑梗死后VaD发生风险的非侵入性指标,有助于临床早期识别、干预,以改善患者预后。

[关键词] 微小RNA-19b-3p; 锰超氧化物歧化酶; 一氧化氮; 内皮素-1; 脑梗死; 血管性痴呆

Predictive efficacy of miR-19b-3p, MnSOD, NO/ET-1 on vascular dementia after cerebral infarction

GAO Hua^{1*}, YANG Jiajun¹, ZHANG Xinhua²

(1. Department of Neurology, Shanghai Sixth People's Hospital, Shanghai, China, 201306; 2. General Practice, Shanghai Sixth People's Hospital, Shanghai, China, 201306)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the predictive performance of microRNA-19b-3p (miR-19b-3p), manganese superoxide dismutase (MnSOD), nitric oxide/endothelin-1 (NO/ET-1) on vascular dementia (VaD) after cerebral infarction. **Methods** From May 2017 to June 2020, 80 patients with cerebral infarction in our hospital were selected and divided into the VaD group ($n=21$) and the non VaD group ($n=57$) according to whether VaD occurred within 6 months. The baseline data, miR-19b-3p, MnSOD, NO/ET-1, and Mini Mental State Examination Scale (MMSE) scores before treatment and at discharge were compared between the two groups. Pearson and partial correlation were used to analyze the correlation between miR-19b-3p, MnSOD, NO/ET-1 and MMSE score. Receiver operating characteristic curve (ROC) was used to analyze the value of miR-19b-3p, MnSOD, and NO/ET-1 in predicting VaD. **Results** Eighty patients with cerebral infarction were followed up for 6 months, and 2 cases were lost to follow-up. The incidence of VaD was 26.92% (21/78). The smoking history, NIHSS score at admission, and the distribution of diabetes in the VaD group were significantly different from those in the non VaD group ($P<0.05$). The miR-19b-3p in the VaD group was higher

基金项目:上海市卫生和计划生育委员会中医药科研基金(2014LP007B)

作者单位:1. 上海市第六人民医院神经内科,上海 201306

2. 上海市第六人民医院全科医学,上海 201306

*通信作者:高华, E-mail:gh20210312@163.com

than that in the non VaD group at discharge, and the scores of MnSOD, NO/ET-1 and MMSE were lower than those in the non VaD group ($P<0.05$). miR-19b-3p was negatively correlated with MMSE. MnSOD, and NO/ET-1 were positively correlated with MMSE score ($P<0.05$). After controlling for smoking history, NIHSS score at admission, and diabetes factors, miR-19b-3p, MnSOD, and NO/ET-1 were still correlated with MMSE score ($P<0.05$). The AUC of VaD predicted by miR-19b-3p+MnSOD+NO/ET-1 was 0.957, which was greater than that predicted by a single indicator ($P<0.05$). **Conclusion** miR-19b-3p, MnSOD, and NO/ET-1 can be used as non-invasive indicators for clinical evaluation of the risk of VaD after cerebral infarction, which is helpful for early clinical identification and intervention to improve the prognosis of patients.

[KEY WORDS] MicroRNA-19b-3p; Manganese superoxide dismutase; Nitric oxide; Endothelin-1; Cerebral infarction; Vascular dementia

脑梗死是中老年群体常见、多发脑血管疾病,且近年受饮食、生活方式改变及我国逐渐步入超级老龄化等因素影响,此疾病发病率逐年增加^[1]。尽管得益于当前较先进的医疗技术,脑梗死患者病死风险得到显著降低,但因脑供血供氧障碍及再灌注损伤,脑梗死后往往伴随一定程度神经损伤,有诱发血管性痴呆(Vascular dementia, VaD)的风险^[2]。相关研究已证实,多数脑梗死后 VaD 患者历经皮质下血管性轻度认知障碍至皮质下 VaD 的病理过程,且此过程中某些生化指标的变化常早于临床症状变化,或可为临床评价脑梗死后 VaD 风险提供参考^[3]。锰超氧化物歧化酶(Manganese superoxide dismutase, MnSOD)是重要自由基清除剂,在保护机体免受氧化损伤中发挥关键作用^[4];一氧化氮(Nitric oxide, NO)/内皮素-1(Endothelin-1, ET-1)是维持血管收缩功能的平衡系统,其比值失衡时可继发一系列应激反应^[5];微小 RNA-19b-3p(MicroRNA-19b-3p, miR-19b-3p)是具有调控基因表达作用的一种非编码小分子,能在血清中稳定存在,近年相继有研究显示,其异常表达与个体认知功能有关^[6]。本研究首次探讨 miR-19b-3p、MnSOD、NO/ET-1 对脑梗死后 VaD 的预测效能。现报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2017 年 5 月至 2020 年 6 月本院收治的 80 例脑梗死患者,根据 6 个月内是否发生 VaD 分为 VaD 组($n=21$)、无 VaD 组($n=57$)。纳入标准:符合脑梗死诊断标准^[7];VaD 组结合病史、临床特征及神经心理学检查等诊断确诊;患者家属知情同意。排除标准:有常年酗酒史;服用过影响认知功能药物者;中枢神经系统感染、头部外伤等其他病因所致痴呆者;有精神疾病者;脑梗死发病前已存

在痴呆症状者。本实验经医院伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 治疗方法

均采用注射用阿替普酶(Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co.KG,进口药批准文号 S20110051)静脉溶栓治疗,并予以改善脑循环、抗脑水肿、脑保护、降颅内压等治疗。

1.2.2 治疗前和出院时生化指标检测

miR-19b-3p 检测:采用抗凝真空管采集晨空腹肘静脉血 2 mL,采用实时荧光定量 PCR 技术测 miR-19b-3p 水平,试剂盒由上海一研生物科技有限公司提供;另采用非抗凝真空管采集晨空腹肘静脉血 2 mL,离心(半径 10 cm,转速 3 500 r/min,时间 15 min),采集上层血清,上海纪宁生物科技有限公司黄嘌呤氧化酶法试剂盒测 MnSOD 水平;苏州宇恒生物科技有限公司分光光度法试剂盒测 NO 水平,上海晶抗生物工程有限公司酶联免疫试剂盒测 ET-1 水平,计算 NO/ET-1。

1.2.3 简易智力状态检查量表(MMSE)评分^[8]

包括时间定向力、地点定向力、即刻回忆、注意力及计算力等,30分最高分,得分越高认知功能越高。

1.3 统计学处理

采用统计学软件 SPSS 22.0 处理数据,计数资料以 $n(\%)$ 描述,采用 χ^2 检验,计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 描述,两组间比较采用独立样本 t 检验;Pearson、偏相关性分析变量间关系;受试者工作特征曲线(ROC)分析预测效能。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 VaD 发生情况

80 例脑梗死患者,随访 6 个月,失访 2 例,获访 78 例患者中 21 例发生 VaD, VaD 发生率为 26.92% (21/78), 57 例未发生 VaD。

2.2 两组基线资料比较

两组年龄、性别、体质量指数、饮酒史、发病至入院时间、文化程度、总胆固醇异常、低密度脂蛋白异常、高密度脂蛋白异常、三酰甘油异常、冠心病、高血压分布情况比较,差异无统计学意义($P>0.05$);VaD组吸烟史、入院时NIHSS评分、糖尿病分布情况与无VaD组比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表1。

表1 两组基线资料对比 [$(\bar{x}\pm s), n(\%)$]

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

资料	VaD组 (n=21)	无VaD组 (n=57)	t/χ^2 值	P值
年龄(岁)	64.58±11.75	62.06±10.92	0.886	0.379
性别(男/女)	12/9	36/21	0.235	0.628
体质量指数(kg/m ²)	24.28±1.64	24.60±2.03	0.445	0.657
饮酒史	20(95.24)	52(91.23)	0.012	0.912
吸烟史	11(52.38)	10(17.54)	9.466	0.002
发病至入院时间(h)	3.25±0.71	3.06±0.86	0.904	0.369
入院时NIHSS评分(分)	8.69±2.45	5.43±1.60	6.860	<0.001
文化程度				
小学	6(28.57)	9(15.79)	1.049	0.294
初中	8(38.10)	24(42.11)		
高中	5(23.81)	16(28.07)		
大专及以上	2(9.52)	8(14.04)		
实验室检测指标				
总胆固醇异常	4(19.05)	14(24.56)	0.044	0.834
低密度脂蛋白异常	5(23.81)	17(29.82)	0.274	0.601
高密度脂蛋白异常	3(14.29)	5(8.77)	0.085	0.771
三酰甘油异常	6(28.57)	11(19.30)	0.326	0.568
既往史				
糖尿病	7(33.33)	4(7.02)	6.735	0.010
冠心病	2(9.52)	8(14.04)	0.022	0.883
高血压	3(14.29)	4(7.02)	0.302	0.583

2.3 两组 miR-19b-3p、MnSOD、NO/ET-1、MMSE 评分比较

治疗前两组 miR-19b-3p、MnSOD、NO/ET-1 比较,差异无统计学意义($P>0.05$);出院时 VaD 组 miR-19b-3p 高于无 VaD 组, MnSOD、NO/ET-1、MMSE 评分低于无 VaD 组($P<0.05$)。见表2。

表2 两组 miR-19b-3p、MnSOD、NO/ET-1、MMSE 评分比较 ($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Comparison of miR-19b-3p, MnSOD, NO/ET-1, MMSE scores between 2 groups ($\bar{x}\pm s$)

时间	组别	例数	miR-19b-3p	MnSOD(ng/mL)	NO/ET-1	MMSE 评分(分)
治疗前	VaD组	21	10.34±2.94	11.02±3.51	2.59±0.70	
	无VaD组	57	11.85±3.25	10.57±2.44	2.73±0.88	
	t值		1.865	0.638	0.658	
	P值		0.066	0.525	0.514	
出院时	VaD组	21	8.33±2.26	9.25±1.36	3.01±0.55	23.82±2.68
	无VaD组	57	6.54±1.90	12.61±2.59	4.74±0.62	26.40±2.15
	t值		3.504	5.649	11.251	4.392
	P值		0.001	<0.001	<0.001	<0.001

2.4 miR-19b-3p、MnSOD、NO/ET-1 与 MMSE 评分相关性

以出院时两组 miR-19b-3p、MnSOD、NO/ET-1、MMSE 评分作为源数据,应用 Pearson 进行相关性分析,结果显示,miR-19b-3p ($r=-0.617, P<0.001$)与 MMSE 呈负相关, MnSOD ($r=0.566, P<0.001$)和 NO/ET-1 ($r=0.624, P<0.001$)与 MMSE 评分呈正相关。

2.5 偏相关性分析

将吸烟史、入院时 NIHSS 评分、糖尿病因素控制后,出院时 miR-19b-3p、MnSOD、NO/ET-1 仍与 MMSE 评分相关($P<0.05$)。见表3。

表3 偏相关性分析

Table 3 Partial correlation analysis

影响因素	偏回归系数	标准误差	偏回归系数(标准化)	t值	P值
常量	6.335				
miR-19b-3p	-5.064	0.352	-4.897	-14.386	<0.001
MnSOD	4.912	0.464	4.855	10.586	<0.001
NO/ET-1	7.158	0.539	7.064	13.280	<0.001

2.6 miR-19b-3p、MnSOD、NO/ET-1 的预测效能

以 VaD 组作为阳性样本,以无 VaD 组作为阴性样本,绘制各指标预测 VaD 的 ROC,结果显示,出院时 miR-19b-3p、MnSOD、NO/ET-1 预测 VaD 的 AUC 分别为 0.745、0.801、0.867($P<0.05$);应用 Logistic 二元回归拟合分析各指标联合的 ROC,结果显示,miR-19b-3p+MnSOD+NO/ET-1 预测 VaD 的 AUC 为 0.957,大于单一指标预测($P<0.05$)。见表4、图1。

3 讨论

VaD 是脑梗死后常见并发症,有数据显示,其在脑梗死群体中发生率高达 40%^[9]。基于生化指标检测具有操作简单、费用低等优势,且能超早期预警,目前较多研究将其应用于疾病筛查、诊断及预后评估等层面。

表4 ROC分析结果

Table 4 ROC analysis results

指标	AUC	95%CI	截断值	敏感度(%)	特异度(%)	P值
miR-19b-3p	0.745	0.634~0.837	>8.39	52.38	91.23	<0.001
MnSOD	0.801	0.695~0.883	≤11.28 ng/mL	95.24	61.40	<0.001
NO/ET-1	0.867	0.771~0.933	≤4.10	90.48	73.68	<0.001
联合	0.957	0.886~0.990		95.24	87.72	<0.001

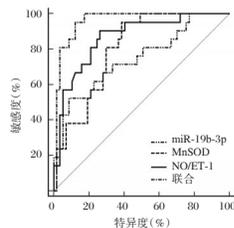


图1 miR-19b-3p、MnSOD、NO/ET-1 预测 VaD 的 ROC

Figure 1 The ROC of VaD predicted by miR-19b-3p, MnSOD, and NO/ET-1

MnSOD 为生物体内抗氧化酶重要成员之一,主要功能催化超氧阴离子自由基生成氧、过氧化氢,有抗氧化作用,能保护细胞不受自由基氧化损害。学者姚佳^[10]研究显示,MnSOD 模拟物可保护少突胶质细胞不被氧化损伤。本研究出院时 VaD 组 MnSOD 水平显著低于无 VaD 组,结合现有研究分析,MnSOD 在 VaD 发生发展中的变化机制可能是:一方面 MnSOD 作为抗氧化物质,当脑梗死患者脑局部高氧化应激时可加速 MnSOD 消耗,若机体未及时有效生成 MnSOD 可致脑神经氧化损伤加重,继而增加 VaD 发生风险;另一方面 MnSOD 对颅脑损伤小鼠模型多巴胺能神经元有保护功能,能促使神经元再生,而脑梗死患者 MnSOD 水平降低时不足以维持多巴胺能神经元保护及促神经元再生等相关生理功能,以致脑梗死后神经损伤无法及时修复而继发 VaD。

近年有研究表明,miRNA 表达与神经系统发育、神经功能关系密切,其中 miR-19b-3p 是近年新发现 miRNA 家族成员,在脑梗死患者中 miR-19b-3p 表达水平显著升高^[11-12]。本研究结果提示 miR-19b-3p 表达升高可能与 VaD 发生有关,但目前有关 miR-19b-3p 在脑梗死后 VaD 中的作用机理尚不清楚,需进一步以 miR-19b-3p 作为研究对象在动物实验、细胞水平上探究。

此外,近年随着对脑梗死后 VaD 认识深入,相继有研究提出,脑梗死后 VaD 与多病理生理过程有关,局部脑组织血氧供给状态亦是确保脑梗死康复效果的关节环节^[13-14]。NO 是舒血管物质,主要通过舒张血管而改善脑血氧供给;ET-1 是机体

中强缩血管物质,在机体氧化应激反应中可大量生成并通过诱导 Ca²⁺内流而造成细胞凋亡,同时能通过强化炎症反应及促花生四烯酸代谢而大量生成氧自由基,加重脑神经损伤,不难看出 NO、ET-1 拮抗状态,NO/ET-1 维持相对稳定时或稍高状态时可维持脑血氧供给及确保脑神经损伤后修复过程的血氧供给。有研究证实,NO/ET-1 降低与脑白质受损程度、脑皮质损伤累及范围具有密切关系^[15]。本研究发现认为 miR-19b-3p、MnSOD、NO/ET-1 或可为临床评价脑梗死后 VaD 发生发展风险提供参考。但还有研究指出,脑梗死后 VaD 发生除与病理生理特征有关外,还与患者日常生活习惯、合并疾病等有关,有吸烟史、伴糖尿病等均会增加 VaD 发生风险^[16]。本研究采用偏相关性分析校正吸烟史、入院时 NIHSS 评分、糖尿病因素结果客观说明 miR-19b-3p、MnSOD、NO/ET-1 与脑梗死后 VaD 发生关系密切,可为临床评价 VaD 发生风险提供参考。

综上所述,miR-19b-3p、MnSOD、NO/ET-1 可作为临床评估脑梗死后 VaD 发生风险的非侵入性指标,有助于临床早期识别并合理干预,以改善患者预后。

参考文献

- [1] 王旭生,张萍,曾皎,等. 豫北地区急性脑梗死患者卒中后抑郁危险因素分析[J]. 新乡医学院学报, 2020,37(5):484-488.
- [2] 韩玉华,周俐红,李艳丽. Lp-PLA2、Hcy 及 S100β 对缺血性脑卒中后 VD 的预测价值研究[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020,12(7):940-943.
- [3] 罗伏钢,陈梅芳,章隆,等. ApoE 基因多态性与脑梗死后血管性痴呆的关联性研究[J]. 中华全科医学, 2018,16(6):874-877.
- [4] Arend J, Kegler A, Caprara ALF, et al. MnSOD Ala16Val polymorphism in cognitive dysfunction in patients with epilepsy: A relationship with oxidative and inflammatory markers [J]. *Epilepsy Behav*, 2020,112(1):107346.
- [5] 张萌,李明,张莉,等. 补肾活血软坚方对大鼠冠脉微血管病变内皮损伤相关因子 NO、ET-1 的影响[J]. 泰山医学院学报, 2020,41(10):728-731.
- [6] 李丽,温霞. 急性腔隙性脑梗死患者血清 miR-19b-3p 水平与认知功能相关性研究[J]. 解放军医药杂志, 2019,31(4):70-73.

鼻咽部透明细胞癌的免疫组化和分子检测诊断评价

刘杰文* 陈紫桂 朱莎莎 齐凤杰

[摘要] **目的** 分析鼻咽部透明细胞癌的免疫组化诊断和分子检测诊断价值。**方法** 对2017年7月至2020年7月院内接受治疗30例鼻咽部透明细胞癌患者的临床资料进行回顾性分析,所有患者均经手术切除标本,常规石蜡包埋切片后经HE染色观察组织病理学特征,随后行免疫组化和分子检测诊断。**结果** 30例患者的肿瘤直径为1.9 cm~4.6 cm,平均直径为(3.40±0.83) cm,通过对组织的免疫组化检测结果分析,发现Ki-67检测的阳性率最低为6.67%,其次为GFAP和CK7,检测阳性率分别为13.33%和20.00%,其中以p63和CK5/6的阳性率最高分别为46.67%和53.33%,不同免疫组化检测的阳性率比较,差异无统计学意义($P>0.05$);30例患者经FISH分子检测后有26例表现为阳性,4例表现为阴性,阳性率为86.67%;FISH分子检测和联合检测的检出率分别为86.67%和100%,均明显高于单独免疫组化指标检测,差异有统计学意义($P<0.05$),但联合检测与FISH分子检测的检出率相比,差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 免疫组化和分子检测均可以应用于鼻咽部透明细胞癌的临床诊断中,但分子检测的检出率明显高于单独免疫组化检测,临床中可以通过免疫组化联合分子检测的方式对鼻咽部透明细胞癌进行诊断。

[关键词] 鼻咽部透明细胞癌;免疫组化;分子检测

Diagnostic evaluation of immunohistochemistry and molecular detection of clear cell carcinoma of the nasopharyngeal area

LIU Jiewen*, CHEN Zigui, ZHU Shasha, QI Fengjie

(Department of Pathology, Shenzhen Luohu District People's Hospital, Shenzhen, Guangdong, China, 518001)

[ABSTRACT] **Objective** To analyze the diagnostic value of immunohistochemistry and molecular detection for clear cell carcinoma of the nasopharynx. **Methods** The clinical data of 30 patients with clear cell carcinoma of the nasopharyngeal carcinoma treated in the hospital from July 2017 to July 2020 were analyzed. All patients were surgically removed specimens, and the tissues were observed by HE staining after routine paraffin-embedded sections, followed by immunohistochemistry and molecular testing. **Results** The tumor diameters of 30 patients ranged from 1.9 cm to 4.6 cm, and the average diameter was (3.40±0.83) cm. Based on the results of immunohistochemical detection of tissues we found that the positive rate of Ki-67 was the lowest at 6.67%, followed by GFAP and CK7, the positive rates were 13.33% and 20.00%, respectively. Among them, p63 and CK5/6 had the highest positive rates of 46.67% and 53.33%, respectively. There is no statistically significant difference in the positive rates of different immunohistochemical tests ($P>0.05$). After FISH molecular detection of 30 patients, 26 cases were positive, 4 cases were negative, and the positive rate was 86.67%. The FISH molecular detection and combination detection rates of the test were 86.67% and 100%, which were significantly higher than those of the immunohistochemical indicator test alone. The difference was statistically significant ($P<0.05$). However, there was no statistically significant difference in the detection rate

基金项目:广东省医学科学技术项目(A2019574)

作者单位:深圳市罗湖区人民医院病理科,广东,深圳 518001

*通信作者:刘杰文, E-mail:ang-521@163.com

between combined detection and FISH molecular detection ($P>0.05$). **Conclusion** Both immunohistochemistry and molecular detection can be used in the clinical diagnosis of nasopharyngeal clear cell carcinoma, but the detection rate of molecular detection is significantly higher than that of immunohistochemistry alone. In clinical practice, immunohistochemistry combined with molecular detection can be used to diagnose clear cell carcinoma of the nasopharynx.

[KEY WORDS] Nasopharyngeal clear cell carcinoma; Immunohistochemistry; Molecular detection

透明细胞癌作为临床中发病率相对较低的恶性肿瘤类型,临床中以肾透明细胞癌较为常见^[1]。近年来,有报道发现其在口腔涎腺部位的发生率相对较高,并于2005年正式被WHO头颈部肿瘤进行分类命名^[2]。鼻咽部透明细胞癌是指发生于鼻咽部的恶性肿瘤,在临床中的发生率相对较低,且在国内鲜有报道,这增加了其在临床中的诊疗难度^[3]。免疫组化诊断和分子检测作为近年来临床中常见的诊断方式,在许多恶性肿瘤疾病的诊断和早期筛查中发挥出了较好的临床应用效果^[4-5]。基于此,本研究将分析鼻咽部透明细胞癌的临床病理特征及免疫组化诊断或分子检测诊断价值,以期对鼻咽部透明细胞癌的早期鉴别和诊断提供临床依据,现将报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2017年7月至2020年7月于本院接受治疗30例鼻咽部透明细胞癌患者的临床资料进行分析,纳入标准:①符合2017年版《WHO头颈部肿瘤分类》^[6]中鼻咽部透明细胞癌的诊断标准;②入院时签署相关知情同意书;③病例资料完整。排除标准:①合并其他恶性肿瘤疾病者;②合并严重肾脏功能疾病者;③合并精神障碍者。其中包括男性18例,女性12例,平均年龄(52.30±12.11)岁,从肿瘤部位来看,有10例位于右侧口咽旁软腭后方,11例位于鼻咽顶后壁右侧,12例位于鼻咽顶后壁左侧;从肿瘤分期来看,包括I期12例,II期11例,III期7例。本研究经伦理委员会批准,且患者均自愿参与本研究。

1.2 方法

1.2.1 组织病理学特征

所有患者均手术切除标本,常规病理组织石蜡切片,使用苏木精-伊红(hematoxylin-eosin staining, HE)染色处理,观察患者的组织病理学表现。

1.2.2 免疫组化检测

采用EnVision两步法使用试剂盒(天津迈基生物科技有限公司,ME9200)进行免疫组化检测,

DAB染色后使用苏木精复染,使用光学显微镜观察结果。免疫组化切片阳性信号均表现为棕黄色颗粒状,p53、p63和Ki-67定位于细胞核,CK7和CK5/6定位于细胞质和细胞膜,GFAP定位于细胞质。根据阳性细胞所占百分比进行判定,其中:无着色为(-);阳性细胞率<25%为(+);阳性细胞率为25%~75%为(++);阳性细胞率>75%为(+++)^[7]。

1.2.3 FISH分子检测

事先准备好EWSR1检测探针试剂盒(德国ZytoVision公司,型号Z-2096-50),参照说明书对探针混合物的配比进行调整,将10 μL的探针混合物滴入玻片的杂交区域,加盖玻璃片后使用橡皮胶进行封边处理。在暗室中使用荧光显微镜(OLYMPUS公司)观察荧光杂交信号,判断FISH信号,同时使用FISH分析软件对图像进行分析,阴性:细胞核易位信号≤10%;阳性:细胞核易位信号>10%。

1.3 观察指标

①HE染色后针对患者的组织病理学特征进行分析,包括肿瘤大小以及病理学表现等;②统计各免疫组化指标的检测阳性率;③统计患者的FISH分子检测阳性率。

1.4 统计学方法

使用SPSS 20.0统计软件进行数据分析;计数资料以 $n(\%)$ 表示,行 χ^2 检验; $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 组织病理学特征

肿瘤直径为1.9 cm~4.6 cm,平均直径为(3.40±0.83) cm,患者的病理组织主要以灰白色和灰黄色为主,镜下组织学形态观察可见细胞呈片状和条索状分布(见图1),细胞核相对较小,多见于细胞周边或中央,并无核分裂或坏死,同时可见侵犯周围组织,间质伴有玻璃样变的纤维性间质。

2.2 免疫组化检测结果

Ki-67检测的阳性率最低为6.67%,其次为GFAP和CK7,检测阳性率分别为13.33%和20.00%,

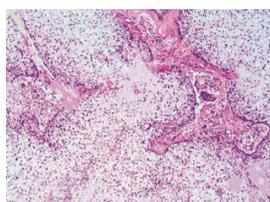


图1 HE染色组织病理学特征(HE, ×200)

Figure 1 Histopathological characteristics of HE staining (HE, ×200)

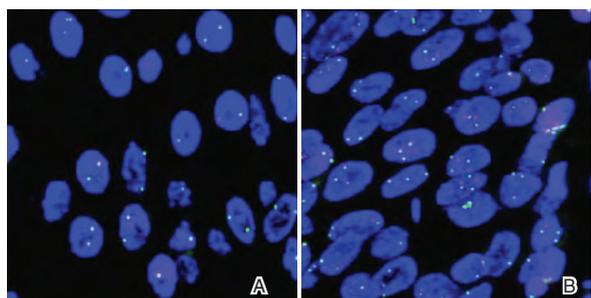
其他各指标的阳性率均达到了40%以上,其中以p63和CK5/6的阳性率最高分别为46.67%和53.33%,不同免疫组化检测的阳性率比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表1。

表1 免疫组化检测结果 [n(%)]

免疫组化指标	阴性(-)		阳性			阳性率
			+	++	+++	
p53	18(60.00)		8(26.67)	4(13.33)	0(0.00)	12(40.00)
p63	16(53.33)		10(33.33)	4(13.33)	0(0.00)	14(46.67)
CK5/6	14(46.67)		8(26.67)	6(20.00)	2(6.67)	16(53.33)
CK7	24(80.00)		4(13.33)	2(6.67)	0(0.00)	6(20.00)
GFAP	26(86.67)		4(13.33)	0(0.00)	0(0.00)	4(13.33)
Ki-67	28(93.33)		2(6.67)	0(0.00)	0(0.00)	2(6.67)
χ^2 值						18.452
P值						0.240

2.3 分子诊断结果

30例患者经FISH分子检测EWSR1基因表达后,发现有4例表现为阴性,26例表现为阳性(见图2),阳性率为86.67%。



注:A为阴性病例;B为阳性病例。

图2 FISH分子检测阴性病例(SP, ×200)

Figure 2 FISH molecular test negative cases (SP, ×200)

2.4 诊断价值比较

FISH分子检测和联合检测的检出率分别为86.87%和100%,均明显高于单独免疫组化指标检测,差异有统计学意义($P<0.05$),但联合检测与FISH分子检测的检出率比较,差异无统计学意义($P>0.05$),见表2。

表2 诊断价值比较 [n(%)]

检测方式	检出率
p53	12(40.00)
p63	14(46.67)
CK5/6	16(53.33)
CK7	6(20.00)
GFAP	4(13.33)
Ki-67	2(6.67)
FISH	26(86.67) ^a
联合检测	30(100.00) ^a
χ^2 值	48.034
P值	<0.001

注:与其他检测方式相比,^a $P<0.05$ 。

3 讨论

透明细胞癌在临床中的发生率相对较低,既往临床研究发现其可累及身体中的多个部位,常见部位包括口腔、舌等部位,对患者的日常生活质量产生了巨大的影响^[8]。然而,临床中发生于鼻咽部的透明细胞癌却相对较少,且临床中针对该方向的研究也相对较少,不利于对鼻咽部透明细胞癌患者进行早期诊断及治疗。Makiko等^[9]在对鼻咽部透明细胞癌患者的临床特点进行统计时,发现该病多见于中年群体,男女的发病比率并无明显差异。临床研究发现,鼻咽部透明细胞癌患者主要表现为鼻腔内流水性液体和耳鸣等,CT检查后可见明显的膨胀性肿块,并伴有边界不清的特点^[10-11]。有研究发现,由于鼻咽部透明细胞癌在临床中的发生率相对较低,因此应当做好与其他类似疾病的鉴别诊断,如鼻腔肾细胞样癌等^[12]。Ceballo等^[13]指出,针对鼻咽部透明细胞癌患者的治疗应当以局部切除治疗为主。但William等人^[14]认为鼻咽部透明细胞癌虽然属于低度恶性肿瘤,但仍有部分患者出现了淋巴结转移,因此建议在患者术后进行放化疗治疗,并做好定期复查,并密切监测患者是否存在淋巴结转移或复发。

本研究结果与本文的研究结果相似^[15]。本研究发现不同的免疫组化检测中,以p63和CK5/6的阳性率较高,而FISH分子检测后有13例表现为阳性,说明免疫组化和FISH分子检测均可以有效筛查鼻咽部透明细胞癌。徐霞等^[16]通过对两例鼻咽部透明细胞癌患者病例与分子遗传学分析,发现两例患者均表现为p63和CK5/6阳性,而GFAP结果为阴性,同时表现为EWSR1基因重排,与本文的研究结果相似。但由于该研究仅选取了两例患

者作为研究对象,因此未能对相关数据进行对比分析。为了进一步分析免疫组化和分子检测在鼻咽部透明细胞癌中的诊断价值,本次研究采用联合检测的方式分析了二者的联合检测效果,结果发现联合检测的检出率为100%,说明相较于单独免疫化学检测,单独分子检测的检出率相对较高,而通过免疫组化和分子检测的联合诊断,可以进一步提高临床诊断效果。

综上所述,免疫组化和分子检测均可以应用于鼻咽部透明细胞癌的临床诊断中,但分子检测的检出率明显高于单独免疫组化检测,临床中可以通过免疫组化联合分子检测的方式对鼻咽部透明细胞癌进行诊断。

参考文献

- [1] 杨保智,侯浩宇,杨浩,等.肾透明细胞癌增强CT表现与病理Fuhrman核分级的关系[J].医学影像学杂志,2018,28(1):102-105.
- [2] 倪皓,王小桐,夏秋媛,等.涎腺玻璃样变透明细胞癌临床病理学观察[J].中华病理学杂志,2016,45(8):577-578.
- [3] Fukuda A, Tagami Y, Takasawa A, et al. Nasopharyngeal hyalinizing clear cell carcinoma with EWSR1 rearrangements diagnosed by fluorescence in situ hybridization[J]. Auris Nasus Larynx, 2015, 42(5):412-415.
- [4] 曾玉梅,曹晓珊,杜娟,等.乳腺浸润性筛状癌与筛状结构导管原位癌的临床病理及免疫组化对比分析[J].分子诊断与治疗杂志,2017,9(4):261-266.
- [5] 成玉霞,赫淑倩,董贺,等.非特殊型浸润性乳腺癌HER-2检测方法的对比研究[J].分子诊断与治疗杂志,2016,8(5):308-315.
- [6] El-Naggar AK, Chan JKC, Grandis JR, et al. WHO pathology and genetic classification of tumors of head and neck tumors[M]. 4th, ed. Lyon: IARC Press, 2017, 1-347.
- [7] 刘勇,杨海玉.国际特设专家委员会建议:诊断免疫组化阳性对照标准化[J].临床与实验病理学杂志,2016,32(1):1-3.
- [8] Stenzel PJ, Schindeldecker M, Tagscherer KE, et al. Prognostic and Predictive Value of Tumor-infiltrating Leukocytes and of Immune Checkpoint Molecules PD1 and PDL1 in Clear Cell Renal Cell Carcinoma[J]. Transl Oncol, 2020, 13(2):336-345.
- [9] Makiko H, Naoki O, Shungaku Y, et al. A case of nasopharyngeal clear cell carcinoma diagnosed by molecular analysis[J]. Acta Oto-Laryngol Case Rep, 2018, 3(1):34-38.
- [10] AlAli Batool M, Alyousef Mohammed J, Kamel Ahmad S, et al. Primary paranasal sinus hyalinizing clear cell carcinoma: a case report[J]. Diagn Pathol, 2017, 12(1):70.
- [11] Zhao W, Yang L, Wang L, et al. Primary clear cell carcinoma of nasal cavity: report of six cases and review of literature[J]. Int J Clin Exp Med, 2014, 7(12):5469-5476.
- [12] Chen ZW, Wang ZM, Shi HQ, et al. Renal cell -like carcinoma of the nasal cavity: a case report and review of the literature[J]. Diagn Pathol, 2017, 12(1):75.
- [13] Ceballos Sáenz C, Argyris PP, Manivel JC, et al. Nasopharyngeal hyalinizing clear cell carcinoma: report of the histopathologic features of a case showing EWSR1 rearrangements by FISH and literature review[J]. Int J Surg Pathol, 2014, 22(7):667-672.
- [14] Newman WC, Williams L, Duvvuri U, et al. Hyalinizing Clear Cell Carcinoma with Biopsy-Proven Spinal Metastasis: Case Report and Review of Literature[J]. World Neurosurg, 2016, 90:699.
- [15] Ceballos Sáenz C, Argyris PP, Manivel JC, et al. Nasopharyngeal Hyalinizing Clear Cell Carcinoma[J]. Int J Surg Pathol, 2014, 22(7):667-672.
- [16] 徐霞,陈真伟,施红旗.鼻咽部透明细胞癌2例临床病理与分子遗传学观察[J].临床与实验病理学杂志,2019,35(7):835-837.

(上接第868页)

- [7] 中华医学会神经病学分会,中华医学会神经病学分会脑血管病学组.中国急性缺血性脑卒中诊治指南2018[J].中华神经科杂志,2018,51(9):666-682.
- [8] 裴芳,孟涛,张凯旋,等.简易智能状态检查量表和蒙特利尔认知评估量表在老年人认知功能障碍筛查中的比较[J].中国药物与临床,2020,20(11):1771-1774.
- [9] 李元英.老年脑梗死病人血清高迁移率族蛋白1、神经元特异性烯醇化酶水平与血管性痴呆的关系[J].中西医结合心脑血管病杂志,2019,17(23):3807-3810.
- [10] 姚佳.基于Mn_3O_4纳米酶活性氧物质清除活性及其活体抗炎效应的研究[D].南京:南京大学,2018.
- [11] Uwatoko H, Hama Y, Iwata IT, et al. Identification of plasma microRNA expression changes in multiple system atrophy and Parkinson's disease[J]. Mol Brain, 2019, 12(1):49.
- [12] 江钰,万智,吕光耀,等.急性脑梗死患者血清miR-151a-3p和miR-210的表达及其与炎性因子的关系[J].疑难病杂志,2018,17(10):1112-1116.
- [13] 秦慧兵,张保朝,张小林,等.血清MCP-1、HMGB1、APN、oxLDL水平与老年脑梗死病情及颈动脉粥样硬化关系[J].华南预防医学,2020,46(1):72-75.
- [14] 钟芳芳,严鸣光,郭建军,等.化橘红多糖对Aβ25~35致小鼠老年性痴呆模型的保护作用及机制研究[J].热带医学杂志,2019,19(12):1480-1484+1602.
- [15] 张雅敏,王建平,张毅,等.早期帕金森病脂质和内皮功能与认知功能和脑白质微结构改变的关系[J].中国神经免疫学和神经病学杂志,2018,25(3):176-180.
- [16] 卓晓贵,方兴.血管性痴呆中西医机制及相关危险因素研究概况[J].湖南中医杂志,2020,36(9):184-187.

急性脑梗死患者外周血 miR-132、血清 Ang-1 相关性 及预后

马翠娟

[摘要] 目的 研究急性脑梗死患者外周血 miR-132、血清血管生成素-1(Ang-1)的相关性及其与 90 d 预后的关系。方法 选择 2018 年 1 月至 2019 年 12 月期间在本院接受溶栓治疗的 80 例急性脑梗死患者作为实验组,同期体检的 80 例健康志愿者作为对照组。采用荧光定量 PCR 法检测外周血 miR-132 的表达水平,酶联免疫吸附法检测血清血管生成素-1(Ang-1)的含量。采用改良 Rankin 量表(mRS)评价急性脑梗死患者出院后 90d 的预后情况并分为 mRS \leq 2 分的预后良好患者、mRS $>$ 2 分的预后不良患者,采用 ROC 曲线分析 miR-132 表达水平和 Ang-1 水平对预后的预测价值,采用 logistics 回归分析预后的影响因素。**结果** 实验组患者外周血 miR-132 的表达水平及血清 Ang-1 的含量均低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。miR-132 与 Ang-1 呈正相关($r=0.502$, $P<0.05$);预后不良患者外周血 miR-132 的表达水平及血清 Ang-1 的含量均低于预后良好患者($P<0.05$);经 ROC 曲线分析,外周血 miR-132 对急性脑梗死患者的预后具有预测价值;经 logistics 回归分析,miR-132、Ang-1、入院时 NIHSS 评分是脑梗死组患者预后不良的影响因素。**结论** 急性脑梗死患者外周血 miR-132 表达降低与 Ang-1 生成减少有关,并且 miR-132 及 Ang-1 是 90d 预后的影响因素、对预后不良具有预测价值。

[关键词] 急性脑梗死; miR-132; 血管生成素-1; 预后; 预测

Correlation and prognosis of peripheral blood miR-132 and serum Ang-1 in patients with acute cerebral infarction

MA Cuijuan

(Department of Geriatrics, Henan Provincial Staff Hospital, Zhengzhou, Henan, China, 450000)

[ABSTRACT] **Objective** To study the correlation of miR-132 in peripheral blood and angiopoietin-1 (Ang-1) in serum and its relationship with 90d prognosis in patients with acute cerebral infarction. **Methods** 80 patients with acute cerebral infarction who received thrombolytic therapy in our hospital from January 2018 to December 2019 were selected as the acute cerebral infarction group, and 80 healthy volunteers were selected as the control group. The expression of miR-132 in peripheral blood was detected by fluorescence quantitative PCR, and the level of serum Ang-1 was detected by enzyme-linked immunosorbent assay. The modified Rankin Scale (mRS) was used to evaluate the prognosis of patients with acute cerebral infarction 90d after discharge. The patients were divided into good prognosis patients with mRS \leq 2 and poor prognosis patients with mRS $>$ 2. The predictive value of miR-132 on prognosis was analyzed by ROC curve, and the influencing factors of prognosis were analyzed by logistic regression. **Result** The expression level of miR-132 in peripheral blood and the level of Ang-1 in serum in the acute cerebral infarction group were lower than those in the control group ($P<0.05$), and there was a positive correlation between miR-132 and Ang-1. The expression level of miR-132 in peripheral blood and the level of Ang-1 in serum of patients with poor prognosis in the acute cerebral infarction group were lower than those in patients with good prognosis ($P<0.05$). ROC curve analysis showed

基金项目:郑州市技术研究与开发经费支出项目(141PPTGG453)

作者单位:河南省职工医院老年科 河南,郑州 450000

通信作者:马翠娟, E-mail: hanqia2008@163.com

that miR-132 in peripheral blood had predictive value for the prognosis of patients with acute cerebral infarction. Logistic regression analysis showed that miR-132, Ang-1 and NIHSS score were the influencing factors of prognosis in acute cerebral infarction patients. **Conclusion** The decreased expression of miR-132 in peripheral blood of patients with acute cerebral infarction correlates with the reduced production of Ang-1, and miR-132 and Ang1 are factors influencing the 90 day prognosis and have predictive value for poor prognosis.

[KEY WORDS] Acute cerebral infarction; mir-132; Angiopoietin-1; Prognosis; Prediction

急性脑梗死以脑部供血动脉血栓栓塞或血栓形成引起的血管腔堵塞、脑组织缺血缺氧为特征,具有致死率高、致残率高的特点^[1-2]。在临床实践中,早期判断急性脑梗死患者的预后情况、及时发现可能出现预后不良的患者并进行干预,对改善患者的预后具有积极意义。微小RNA(microRNA, miR)是近些年心脑血管疾病研究的热点,miR通过在转录后水平调节多种基因的表达来介导相应的生物学效应,受到miR调控的凋亡、自噬、炎症、血管新生等环节均与急性脑梗死的发生、预后密切相关。国内陈澎的动物实验研究发现,局灶性脑缺血大鼠脑组织中miR-132的表达减少,而过表达miR-132能够改善脑缺血大鼠的组织缺氧状态神经功能并增加血管生成素-1(Angiopoietin-1, Ang-1)表达、促进缺血脑组织血管新生^[3];另有一项国内的临床研究发现,血清Ang-1含量降低是急性脑梗死患者预后不良的可能影响因素^[4]。但miR-132在急性脑梗死发病过程中的变化及其对预后的预测价值尚不清楚。因此,本研究将观察外周血miR-132表达与血管新生分子Ang-1及90d预后的相关性。

1 对象与方法

1.1 对象

选择2018年1月至2019年12月期间在本院诊断为的80例急性脑梗死患者作为实验组,其中男性48例、女性32例,平均年龄(61.83±11.37)岁;另取同期体检的80例健康者作为对照组,其中男性45例、女性35例,平均年龄(59.37±12.42)岁。两组间一般资料的比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。所有患者及家属均知情同意。本研究经医院伦理委员会批准。

入组标准:①符合《中国急性缺血性脑卒中诊治指南2014》中急性脑梗死的诊断标准^[5];②起病时间<4.5h、接受溶栓治疗;③临床资料完整;④出院后90d进行门诊复诊。排除标准:①既往有脑卒中、心肌梗死等病史;②既往有颅脑外伤、脑肿瘤病史;③合并恶性肿瘤、精神性疾病。

1.2 外周血 miR-132 表达水平的检测

在血常规采血管内采集实验组患者入院后的外周血3mL及对照组受试者体检时的外周血3mL,采用北京博凌科为公司的试剂盒进行miR-132的检测。配置如下反应体系:cDNA样本1 μ L、PCR混合液10 μ L、10 μ mol/L上下游引物各0.4 μ L、去离子水补足至20 μ L,引物分别为目的基因miR-132的特异性引物及内参U6的特异性引物。在荧光定量PCR仪上按照94 $^{\circ}$ C预变性2~3min后94 $^{\circ}$ C15s、60 $^{\circ}$ C40s重复40个循环的程序完成PCR反应,生成反应的循环曲线及循环阈值(Ct),以U6为内参,计算miR-132的表达水平。

1.3 血清 Ang-1 含量的检测

采集实验组患者入院后的外周血5mL及对照组受试者体检时的外周血5mL,采用上海西唐公司生产的酶联免疫吸附法试剂盒进行检测,按照试剂盒说明书操作并检测血清中Ang-1的含量。

1.4 临床资料

收集实验组以下临床特征:性别、年龄、高血压病、冠心病、糖尿病、超敏C反应蛋白(High sensitivity C-reactive protein, hs-CRP)、同型半胱氨酸(Homocysteine, Hcy)、总胆固醇(Total cholesterol, TC)、低密度总蛋白胆固醇(Low density total protein cholesterol, LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(High density total protein cholesterol, HDL-C)、随机血糖、入院时NIHSS评分、发病到入院时间。

1.5 90 d 预后的随访及评估

急性脑梗死患者出院后90天时进行门诊复诊,参照《中国急性缺血性脑卒中诊治指南2014》^[5]采用改良Rankin量表(modified Rankin scale, mRS)对患者的神经功能进行评价并判断预后,mRS ≤ 2 分为预后良好、mRS > 2 分为预后不良。

1.6 统计学方法

采用SPSS 21.0进行数据统计,计量资料用($\bar{x}\pm s$)表示、两组间比较采用独立样本 t 检验,计数资料采用 $n(\%)$ 表示、用 χ^2 检验,miR-132及Ang-1对预后的预测价值采用ROC曲线分析,预后的影响因素采用

logistics 回归分析。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组 miR-132 表达水平及 Ang-1 含量的比较
与对照组比较,实验组外周血 miR-132 的表达水平、血清 Ang-1 的含量明显降低,差异有统计学意义(P<0.05)。见表 1。

表 1 两组 miR-132 表达及 Ang-1 含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of miR-132 expression and Ang-1 content between 2 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	miR-132	Ang-1 (ng/mL)
实验组	80	0.74±0.23	1.01±0.27
对照组	80	1.00±0.28	1.39±0.32
t 值		6.418	8.118
P 值		0.000	0.000

2.2 实验组 miR-132 表达及 Ang-1 含量的相关性
急性脑梗死组患者外周血 miR-132 表达水平血清 Ang-1 含量呈正相关($r=0.502, P<0.05$)。

2.3 不同预后患者 miR-132 表达及 Ang-1 含量的比较
与预后良好患者比较,预后不良患者外周血 miR-132 的表达水平、血清 Ang-1 的含量明显降低,差异有统计学意义(P<0.05)。见表 2。

表 2 不同预后患者 miR-132 及 Ang-1 的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of miR-132 expression and Ang-1 content in patients with different prognosis ($\bar{x} \pm s$)

预后情况	n	miR-132	Ang-1
预后良好组	46	1.12±0.28	0.78±0.25
预后不良组	34	0.85±0.16	0.68±0.18
t 值		5.042	2.041
P 值		0.000	0.045

2.4 miR-132 表达及 Ang-1 含量对急性脑梗死患者预后的预测价值

绘制 miR-132 表达及 Ang-1 含量预测急性脑梗死患者预后的 ROC 曲线,曲线下面积分别为 0.818 (95% CI: 0.726~0.910, P<0.001)、0.619 (95% CI: 0.496~0.742, P=0.070)。最佳截断值为 0.94,该截断值预测预后的灵敏度和特异性分别为 85.29%、69.57%。见图 1。

2.5 不同预后患者临床特征的比较

不同预后患者在性别、年龄、高血压病、冠心病、糖尿病、TC、LDL-C、HDL-C、随机血糖比较,差异无统计学意义(P>0.05);与预后良好患者比较,预后不良患者入院时 NIHSS 评分、Hcy、hs-CRP 水平明显升高,发病到入院时间明显延长,差异有统计学意义(P<0.05)。见表 3。

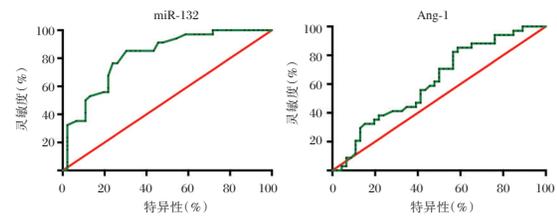


图 1 miR-132、Ang-1 表达预测急性脑梗死患者预后的 ROC 曲线

Figure 1 ROC curve of miR-132, Ang-1 expression in predicting prognosis of patients with acute cerebral infarction

表 3 不同预后患者临床特征的比较 [$n(\%)$, ($\bar{x} \pm s$)]

Table 3 Comparison of clinical characteristics of patients with different prognosis [$n(\%)$, ($\bar{x} \pm s$)]

因素	预后良好 患者(n=46)	预后不良 患者(n=34)	χ^2/t 值	P 值
性别(男/女)	27/19	21/13	0.077	0.782
年龄(岁)	60.27±12.09	62.44±10.84	0.803	0.425
高血压病	21(45.65)	18(52.94)	0.416	0.519
冠心病	2(4.35)	3(8.82)	0.668	0.414
糖尿病	12(26.09)	10(29.41)	0.108	0.742
发病到入院时间(h)	3.85±0.94	4.23±0.78	2.321	0.023
入院时 NIHSS 评分	4.51±0.93	7.97±1.42	13.157	0.000
TC(mmol/L)	3.94±0.94	4.21±1.05	1.208	0.231
LDLC(mmol/L)	2.74±0.71	3.03±0.82	1.691	0.095
HDL-C(mmol/L)	1.08±0.22	1.01±0.25	1.327	0.188
随机血糖(mmol/L)	6.93±1.32	7.61±1.94	1.866	0.066
Hcy(μ mol/L)	11.45±2.14	17.94±4.09	9.204	0.000
hs-CRP(mg/L)	6.67±1.05	10.77±2.46	10.140	0.000

2.6 急性脑梗死患者预后影响因素的 logistics 回归分析

以急性脑梗死患者预后情况作为因变量,以 2.3 和 2.5 中有统计学差异的因素作为自变量,在 Logistics 回归模型中进行分析可知:miR-132、Ang-1、入院时 NIHSS 评分是脑梗死组患者预后不良的影响因素。见表 4。

表 4 急性脑梗死患者预后影响因素的 logistics 回归分析

Table 4 Logistic regression analysis of prognostic factors in patients with acute cerebral infarction

因素	β 值	OR 值	95%CI	Wald χ^2	P 值
miR-132	-0.472	0.682	0.451~0.837	7.685	0.001
Ang-1	-0.289	0.751	0.547~0.914	5.584	0.007
发病到入院时间	0.109	1.103	0.717~3.282	0.755	0.348
入院时 NIHSS 评分	0.552	1.696	1.251~3.092	13.272	0.000
Hcy	0.418	1.330	0.737~2.585	1.848	0.185
hs-CRP	0.603	1.284	0.838~3.182	2.019	0.103

3 讨论

溶栓是临床上治疗急性脑梗死的有效手段之一,能够及时恢复缺血脑组织的血流灌注、减轻神

经功能缺血缺氧损害^[6-7]。在临床实践中,早期筛选可能出现预后不良的急性脑梗死患者并尽早开始进行干预,对促进神经功能重建、改善预后具有积极意义。

miR-132促进血管新生的效应涉及复杂的分子机制,国内陈澎^[3]的动物实验发现,过表达miR-132通过Ang-1/Tie-2途径促进缺血脑组织周围的血管新生。Ang-1是一类分泌型细胞因子,在血管内皮细胞增殖、成熟中起重要作用,与受体Tie-2结合后能够促进新生血管形成、成熟及重塑。国内闫薪^[4]的临床研究及本研究的检测均发现急性脑梗死患者血清Ang-1含量明显降低,同时闫薪的研究还证实Ang-1含量降低与急性脑梗死的病情加重有关。本研究结果提示在急性脑梗死的发病过程中,miR-132表达降低可能使Ang-1含量减少、削弱Ang-1介导的促血管新生效应,进而不利于血管新生对神经功能的修复和重建、影响患者的预后。

国内多项关于急性脑梗死患者预后的研究均以出院后90d作为评估预后的时间点,在翟萌萌^[8]、郭志良^[9]、闫薪如^[10]的临床研究中,急性脑梗死预后不良的发生率分别为36.48%、51.43%、41.41%。本研究对急性脑梗死患者的90d预后进行了随访,其中预后不良患者34例、发生率42.5%,与国内几项研究基本一致。本研究结果提示miR-132表达降低、Ang-1含量减少可能与急性脑梗死患者预后不良有关。进一步经ROC曲线分析miR-221、Ang-1对预后的预测价值发现:miR-132对急性脑梗死患者的90d预后具有预测价值,但Ang-1却不能直接预测90d预后,可能原因是miR-132不仅通过Ang-1发挥神经保护作用,还能通过促进VEGF途径、抑制细胞凋亡途径、减轻氧化应激等方式来减轻神经功能损害、改善患者预后^[11-13],但miR-132发挥神经保护作用的其他方式仍有待今后的研究来证实。

急性脑梗死患者预后的影响因素复杂,国内多项关于急性脑梗死预后影响因素的研究发现,入院时NIHSS评分增加、Ang-1减少与急性脑梗死预后不良的发生有关^[8-9]。本研究结果提示尽早进行溶栓、再通血管的重要性;miR-132、Ang-1与急性脑梗死患者预后不良相关的结果与miR-132、Ang-1介导的血管新生效应、神经保护效应吻合。

综上所述,急性脑梗死患者外周血miR-132表达降低、Ang-1含量减少且存在正相关;miR-132的低表达可能引起血管新生不足,并且miR-132是

90d预后的影响因素、对预后不良具有预测价值。但miR-132是否还通过其他机制影响急性脑梗死患者的预后需要今后进一步的研究来证实。此外,本研究未纳入未接受溶栓治疗的脑梗死患者,存在一定不足,在今后应纳入未接受溶栓治疗的脑梗死患者来探究miR-132、Ang-1对脑梗死预后的评估价值。

参考文献

- [1] Moussaddy A, Demchuk AM, Hill MD. Thrombolytic therapies for ischemic stroke: Triumphs and future challenges [J]. *Neuropharmacology*, 2018, 134(Pt B): 272-279.
- [2] Sarkar S, Chakraborty D, Bhowmik A, et al. Cerebral ischemic stroke: cellular fate and therapeutic opportunities [J]. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2019, 24: 435-450.
- [3] 陈澎, 陈传磊, 侯爱武, 等. miR-132表达上调对局灶性脑缺血大鼠皮层Ang-1/Tie2表达的影响[J]. *中华神经医学杂志*, 2017, 16(8): 772-776.
- [4] 陶珍, 崔连奇, 赵磊, 等. NLR、血清CHE、Ang-1与ACI患者病情变化的关系[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2020, 12(5): 575-578+586.
- [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] 王天栋, 任占军. 高压氧治疗脑梗死患者介入时机的选择及对中远期预后的影响[J]. *中华航海医学与高气压医学杂志*, 2020, 27(2): 180-183+204.
- [7] 佟建霞, 陈滢, 刘虹, 等. 经颅直流电刺激联合认知功能训练对脑梗死患者认知及日常生活活动能力的影响[J]. *按摩与康复医学*, 2019, 10(12): 17-19.
- [8] 翟萌萌, 王建平, 余列, 等. 中性粒细胞与淋巴细胞比值对急性脑梗死患者预后的预测价值[J]. *中国脑血管病杂志*, 2017, 14(2): 82-86.
- [9] 郭志良, 俞书红, 肖露露, 等. 溶栓后升高的中性粒细胞与淋巴细胞比值预测急性脑梗死患者功能预后[J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2018, 20(10): 1019-1022.
- [10] 闫薪如, 冯娟. 血清血管生成素1水平与急性脑梗死发病、病情严重程度及90d预后的关系[J]. *临床神经病学杂志*, 2016, 29(2): 113-116.
- [11] Zhang J, Xu H, Gong L, et al. MicroRNA-132 protects H9c2 cells against oxygen and glucose deprivation-evoked injury by targeting FOXO3A [J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(1): 176-184.
- [12] Zuo X, Lu J, Manaenko A, et al. MicroRNA-132 attenuates cerebral injury by protecting blood-brain barrier in MCAO mice [J]. *Exp Neurol*, 2019, 316: 12-19.
- [13] El Fatimy R, Li S, Chen Z, et al. MicroRNA-132 provides neuroprotection for tauopathies via multiple signaling pathways [J]. *Acta Neuropathol*, 2018, 136(4): 537-555.

上皮性卵巢癌患者血清 HMGA2、IL-22、FOLR1 水平及与临床指标的相关性

陈睿琦 刘晓云*

[摘要] 目的 探究上皮性卵巢癌(EOC)患者血清高迁移率族蛋白 A2(HMGA2)、白细胞介素-22(IL-22)、叶酸受体 1(FOLR1)水平与临床指标的相关性。方法 选取本院 2018 年 10 月至 2020 年 9 月收治的 60 例 EOC 患者作为 EOC 组,选择 60 例患者作为良性组,另选择同期健康体检者 60 例作为健康组,酶联免疫吸附试验检测各组研究对象血清 HMGA2、IL-22、FOLR1 水平,分析血清 HMGA2、IL-22、FOLR1 与 EOC 患者临床病理特征的关系,受试者工作特征曲线(ROC)分析 HMGA2、IL-22、FOLR1 诊断 EOC 的临床价值;根据研究期间患者复发情况分为复发组和未复发组,比较各组 HMGA2、IL-22、FOLR1 水平,Cox 回归分析血清 HMGA2、IL-22、FOLR1 水平是否为影响 EOC 患者复发率的危险因素。结果 3 组血清 HMGA2、IL-22、FOLR1 水平比较结果:EOC 患者>良性组>健康组,差异有统计学意义($P<0.05$)。不同 FIGO 分期、组织分化程度、病理类型、有无淋巴结转移、腹水 EOC 患者血清 HMGA2、FOLR1、IL-22 水平比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。血清 HMGA2、IL-22、FOLR1 联合诊断具有更好的灵敏度(95%)、特异度(96.7%)。复发组 EOC 患者血清 HMGA2、IL-22、FOLR1 水平明显高于未复发组,差异有统计学意义($P<0.05$),Cox 回归分析显示 HMGA2、IL-22、FOLR1 异常升高是导致 EOC 患者复发的危险因素。结论 血清 HMGA2、IL-22、FOLR1 水平异常升高与 EOC 发生发展、临床生物学行为及预后存在密切联系,可作为 EOC 诊断的有效指标。

[关键词] 上皮性卵巢癌;高迁移率族蛋白 A2;白细胞介素-22;叶酸受体 1

Serum HMGA2, IL-22, FOLR1 levels in patients with epithelial ovarian cancer and their correlation with clinical indicators

CHEN Ruiqi, LIU Xiaoyun*

(Department of Obstetrics and Gynecology, The Third Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi, Guizhou, China, 563000)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the correlation between serum high mobility group protein A2 (HMGA2), interleukin - 22 (IL - 22), folate receptor 1 (FOLR1) and clinical indicators in patients with epithelial ovarian cancer (EOC). **Methods** Sixty EOC patients admitted to the Third Affiliated Hospital of Zunyi Medical University from October 2018 to September 2020 were selected as the EOC group, 60 patients with benign ovarian tumors were selected as the benign group, and 60 patients with healthy physical examination during the same period were selected as the healthy group. The enzyme-linked immunosorbent assay was used to detect serum HMGA2, IL-22, and FOLR1 levels in each group of subjects, and analyze the relationship between serum HMGA2, IL-22, FOLR1 and clinicopathological characteristics of EOC patients, and the receiver operating characteristic curve (ROC) was drawn to analyze the clinical value of HMGA2, IL-22 and FOLR1 in the diagnosis of EOC. According to the death of patients during the study period, they were divided into death group and survival group. The levels of HMGA2, IL-22 and FOLR1 were compared between

基金项目:遵义市科学技术项目(2018JQ253)

作者单位:遵义医科大学第三附属医院妇产科,贵州,遵义 563000

*通信作者:刘晓云, E-mail:butian20053@163.com

the two groups. Cox regression analysis was used to analyze whether serum HMGA2, IL-22 and FOLR1 levels were risk factors affecting the survival rate of EOC patients. **Results** The serum HMGA2, IL-22, and FOLR1 levels in EOC patients were significantly higher than those in the benign group and the healthy group, and the serum HMGA2, IL-22, and FOLR1 levels in the benign group were higher than those in the healthy group, the difference was statistically significant ($P<0.05$). Comparison of serum HMGA2, FOLR1, and IL-22 levels in patients with different FIGO stage, degree of tissue differentiation, pathological type, lymph node metastasis, ascites EOC patients, the difference was statistically significant ($P<0.05$). There were statistically significant differences of IL-22 among patients with different FIGO stage, degree of tissue differentiation, lymph node metastasis, and EOC ascites ($P<0.05$). The serum HMGA2, IL-22, FOLR1, combined diagnosis has better sensitivity (95%), specificity (93.9%), and accuracy (96.7%). The serum HMGA2, IL-22, and FOLR1 levels of EOC patients in the recurrence group were significantly higher than those in the non-recurrence group ($P<0.05$). Cox regression analysis showed that abnormally elevated HMGA2, IL-22, and FOLR1 were risk factors for recurrence in EOC patients. **Conclusion** The abnormal increase of serum HMGA2, IL-22, FOLR1 levels is closely related to the occurrence and development of EOC, clinical biological behavior and prognosis, and can be used as effective indicators for EOC diagnosis.

[KEY WORDS] Epithelial ovarian cancer; High mobility group protein A2; Interleukin-22; Folate receptor 1

卵巢癌为女性生殖系统的常见恶性肿瘤,早期卵巢癌无明显症状,多数患者确诊时已处于中晚期,5年生存率较低,尤其是已经发生转移的晚期卵巢癌患者5年生存率低于30%^[1]。上皮性卵巢癌(epithelial ovarian cancer, EOC)为卵巢癌最常见的类型,寻找新的有效的生物标志物及治疗手段是改善EOC患者生存率的重要方式。高迁移率族蛋白A2(high mobility group protein A2, HMGA2)是近年来发现的与恶性肿瘤发生、浸润和转移存在密切联系的染色质非组蛋白,其在多种间质性上皮性恶性肿瘤组织中存在高表达^[2]。白细胞介素-22(interleukin-22, IL-22)为T辅助细胞22(T-helper cell 22, Th22)的效应细胞因子,在肿瘤免疫逃逸机制中存在关键作用,研究证实IL-22可促进结肠癌、乳腺癌等恶性肿瘤细胞增殖^[3-4]。叶酸受体1(folate receptor 1, FOLR1)蛋白为糖基化磷脂酰肌醇偶联糖蛋白,对于叶酸及其衍生物具有高度亲和力,其在正常组织中表达很低,但在特定上皮来源恶性肿瘤组织中呈高表达^[5]。本研究对EOC患者血清HMGA2、IL-22、FOLR1水平及与临床病理特征和预后生存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

选取本院2018年10月至2020年9月收治的60

例EOC患者作为EOC组,其中,EOC患者平均年龄(51.3±3.8)岁,FIGO分期I期10例、II期13例、III期28例、IV期9例;分化程度:低分化17例,中分化22例,高分化21例;组织分型:浆液性囊腺癌34例,非浆液性囊腺癌26例;淋巴结转移:有11例,无49例;腹水:有14例,无46例。选择60例卵巢良性肿瘤患者作为良性组,其中内功内膜异位症患者28例,宫颈癌前病变21例,盆腔炎性包块患者11例,均术后证实卵巢无任何病变,平均年龄(51.7±3.8)岁。另选择同期健康体检者60例作为健康组,平均年龄(51.5±4.4)岁,均自愿参与本研究,无卵巢疾病史,月经及内分泌功能正常。3组研究对象年龄比较差异无统计学意义($P>0.05$)。所有患者知情同意,本实验经医院伦理委员会同意批准。

纳入标准:①均符合卵巢肿瘤的相关诊断标准^[6],并经术后组织病理学检查确诊;②EOC患者未接受放射治疗、化学治疗等;③均为首发病例。排除标准:①预计生存期低于3个月者;②合并其他恶性肿瘤者;③合并重要脏器功能障碍、系统疾病者;④无法配合完成研究者。

1.2 方法

EOC患者及良性肿瘤患者入院次日清晨抽取5 mL空腹静脉血,健康体检者入院当日清晨抽取5 mL空腹静脉血,3 000 r/min离心15 min收取上清,-80℃保存待测。采用酶联免疫吸附试验检测血清HMGA2、IL-22、FOLR1水平,HMGA2、FOLR1

试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司,IL-22试剂盒购自美国R&D公司,680全自动酶标仪购自美国Bio-Rad公司。严格依照仪器及试剂盒说明书进行各项操作。所有患者均符合EOC手术相关指征,依照文献^[6]标准进行治疗,术后随访6个月~2年,统计复发情况,所有患者均采用门诊复诊的形式进行随访,所有患者均配合完成随访,复发患者根据患者实际情况给予对症治疗。

1.3 统计学分析

采用SPSS 19.0软件进行数据统计分析。计数资料以n(%)表示,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。受试者工作特征曲线(Receiver operating curve, ROC)及曲线下面积(Area under the curve, AUC)评估HMGA2、IL-22、FOLR1对于EOC的诊断价值;Cox回归模型分析HMGA2、IL-22、FOLR1是否为影响EOC患者生存率的危险因素。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组血清HMGA2、IL-22、FOLR1水平比较

血清HMGA2、IL-22、FOLR1水平比较结果:EOC组>良性组>健康组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表1。

表1 各组血清HMGA2、IL-22、FOLR1水平比较($\bar{x} \pm s$)
Table 1 Comparison of serum HMGA2, IL-22 and FOLR1 levels in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	HMGA2(mg/L)	IL-22(pg/mL)	FOLR1(pg/mL)
健康组	60	22.5±5.7	17.2±2.8	59.2±6.6
良性组	60	58.7±6.9	26.1±2.9	128.6±24.3
EOC组	60	253.7±58.3	39.2±5.3	562.8±77.1
F值		29.257	26.927	48.247
P值		0.000	0.000	0.000

2.2 EOC患者血清HMGA2、IL-22、FOLR1与临床病理特征的相关性分析

不同FIGO分期、组织分化程度、病理类型、有淋巴结转移、腹水EOC患者血清HMGA2、FOLR1、IL-22水平比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。不同年龄血清HMGA2、IL-22、FOLR1水平比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表2。

2.3 血清HMGA2、IL-22、FOLR1诊断EOC的ROC曲线

血清HMGA2、IL-22、FOLR1联合诊断比单独诊断具有更好的灵敏度、特异度及准确度。见表3、图1。

表2 EOC患者血清HMGA2、IL-22、FOLR1与临床病理特征的相关性分析($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Correlation analysis of serum HMGA2, IL-22, FOLR1 and clinicopathological characteristics in EOC patients ($\bar{x} \pm s$)

临床病理特征	n	HMGA2(mg/L)	IL-22(pg/mL)	FOLR1(pg/mL)
年龄				
<50	21	251.8±55.6	38.6±4.9	556.7±75.3
≥50	39	255.4±59.7	39.5±5.5	563.1±77.8
FIGO分期				
I~II	23	214.7±47.5	30.2±3.9	487.7±70.2
III~IV	37	263.2±66.0 ^a	44.1±5.3 ^a	581.3±79.5 ^a
病理类型				
浆液性囊腺癌	34	286.5±51.3	38.1±5.5	687.4±82.9
非浆液性囊腺癌	26	202.4±47.8 ^a	39.2±6.0	446.9±61.3 ^a
组织分化程度				
中低分化	39	214.2±46.2	35.2±4.9	426.4±58.6
高分化	21	280.0±61.8 ^a	47.2±5.3 ^a	697.7±76.1 ^a
淋巴结转移				
有	11	299.2±53.1	46.3±5.1	680.5±77.5
无	49	187.5±42.0 ^a	38.2±4.9 ^a	453.7±62.6 ^a
腹水				
有	14	262.5±52.8	43.5±5.0	586.5±77.1
无	46	209.7±44.4 ^a	31.8±5.4 ^a	492.5±73.9 ^a

注:同意临床病理特征内比较,^a $P < 0.05$ 。

表3 血清HMGA2、IL-22、FOLR1诊断EOC的临床价值(%)
Table 3 The clinical value of serum HMGA2, IL-22, FOLR1 in the diagnosis of EOC (%)

项目	灵敏度	特异度	阳性预测值	阴性预测值	准确度
HMGA2	83.3	86.7	86.7	81.7	86.8
IL-22	78.3	81.7	83.3	75.0	83.3
FOLR1	86.7	90.0	88.3	83.3	91.7
联合检测	95.0	93.3	95.2	91.7	96.7

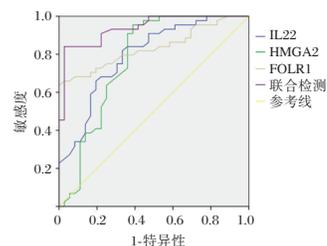


图1 HMGA2、IL-22、FOLR1诊断EOC的ROC曲线
Figure 1 ROC curve of HMGA2, IL-22, FOLR1 in the diagnosis of EOC

2.4 是否复发EOC患者血清HMGA2、IL-22、FOLR1水平比较

随访期间6例出现复发,复发率为10.0%。复发组EOC患者血清HMGA2、IL-22、FOLR1水平明显高于未复发组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表4。

表4 不同临床结局 EOC 患者血清 HMGA2、IL-22、FOLR1 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Comparison of serum HMGA2, IL-22 and FOLR1 levels in EOC patients with different clinical outcomes ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	HMGA2(mg/L)	IL-22(pg/mL)	FOLR1(pg/mL)
未复发组	54	227.4±53.1	37.5±4.7	546.9±77.8
复发组	6	292.6±61.5	55.3±5.9	1057.3±91.6
t 值		2.812	8.590	14.997
P 值		0.007	0.000	0.000

表5 影响 EOC 患者复发的 Cox 回归分析

Table 5 Cox regression analysis affecting the recurrence of EOC patients

因素	单因素				多因素			
	χ^2 值	HR	95%CI	P 值	χ^2 值	HR	95%CI	P 值
FIGO 分期	7.278	2.763	1.325~5.796	0.004	5.469	1.821	1.105~3.016	0.020
组织分化程度	8.273	2.489	1.33~4.628	0.003	2.140	0.537	0.239~1.236	0.148
淋巴结转移	10.123	0.237	0.098~0.574	0.002	7.196	0.013	0.001~0.285	0.008
HMGA2	50.002	1.163	1.118~1.218	0.000	65.502	1.583	1.417~1.763	0.001
IL-22	11.940	3.485	1.719~7.086	0.002	4.487	1.850	1.049~3.296	0.032
FOLR1	7.045	3.748	1.449~9.695	0.007	20.813	0.559	0.436~0.714	0.001

3 讨论

卵巢癌为恶性肿瘤,其与良性肿瘤相比,肿瘤细胞增殖旺盛,DNA 合成剧增。由于上皮性卵巢癌患者早期无特异性临床症状,多数确诊已处于中晚期,延误了最佳治疗时机,因此寻找高效的诊断方法为临床上关注的重点内容。

HMGA2 是高迁移率蛋白超家族的成员之一,其功能复杂,为胚胎发育早期高表达的蛋白,其在分化成熟的细胞中呈低表达,但在恶性增殖的肿瘤细胞中出现高表达,与肿瘤细胞恶性增殖分化存在密切关系。有研究指出^[7],卵巢癌组织中 HMGA2 表达为阳性,可作为卵巢癌诊断的潜在肿瘤标志物。本研究结果提示 HMGA2 与 EOC 的发生发展有关。近年来研究发现^[8],HMGA2 表达水平与恶性肿瘤发生、发展、侵袭、转移及预后存在密切关系,高表达 HMGA2 患者往往肿瘤恶性程度更高、侵袭能力更强、进展更快、容易发生转移和预后较差,这与本研究的结果相一致。研究认为^[9],CD4⁺T 细胞类型及其相关效应细胞因子参与了多种恶性肿瘤的发生发展。IL-22 为 Th22 细胞的效应因子,其为 IL-10 家族新成员,与 IL-10 一样参与了肿瘤免疫逃逸过程,二者在肿瘤、自身免疫性疾病、感染等发生发展过程中发挥不同程度的作用,IL-22 在肿瘤疾病中更具特异性。研究证实^[10-11],在结肠癌、胃癌患者中 IL-22 显著上调,并在晚期患者中明显高于早期患者。本研究结果提示,血清

2.5 影响 EOC 患者生存率的 Cox 回归分析

Cox 单因素回归分析显示,FIGO 分期、组织分化程度、有淋巴结转移、HMGA2、IL-22、FOLR1 异常升高是影响 EOC 患者复发的危险因素;Cox 多因素回归分析 FIGO 分期、有淋巴结转移、HMGA2、IL-22、FOLR1 异常升高是导致 EOC 患者复发的危险因素。见表 5。

IL-22 在 EOC 患者中存在异常高表达,并参与了 EOC 肿瘤的病因学过程。研究认为^[12],IL-22 可通过活化致癌转录因子 STAT3 诱导肿瘤发生和转移,这可能是其在 EOC 中发挥作用的主要机制。叶酸受体 α 为 FOLR1 基因编码并通过糖基磷脂酰肌醇偶联于细胞膜表面的单链糖蛋白,FOLR1 在多种恶性肿瘤细胞的侧膜和底膜上高表达^[13]。本研究中,EOC 患者血清 FOLR1 水平明显升高,其与 HMGA2 均与 EOC 患者临床病理特征存在相关性。本研究 ROC 分析结果提示,血清 HMGA2、IL-22、FOLR1 联合检测在 EOC 诊断中具有较好的临床价值,可作为 EOC 诊断的潜在分子标志物。

本研究中,分析 6 例复发 EOC 患者,其血清 HMGA2、IL-22、FOLR1 水平明显更高。提示,HMGA2、IL-22、FOLR1 异常升高与 EOC 患者不良预后相关。Cox 回归分析结果显示,HMGA2、IL-22、FOLR1 异常升高是导致 EOC 患者生存率降低的危险因素。研究指出,HMGA2 水平越高,卵巢癌患者预后越差^[14];赵航发现^[15],IL-22 与卵巢癌患者预后相关,其在正常人群中低表达,在卵巢癌患者中呈现高表达;梁振等报道显示^[16],FOLR1 与卵巢癌患者预后生存较差有关。因此,血清 HMGA2、IL-22、FOLR1 水平在一定程度上反映了 EOC 患者预后情况。

综上所述,血清 HMGA2、IL-22、FOLR1 水平异常升高与 EOC 发生发展、临床生物学行为及预后存在密切联系,可作为 EOC 诊断的有效指标。

(下转第 884 页)

潮州市新生儿G6PD筛查和基因型鉴定分析

陈新瑶¹ 梁雪雁¹ 黄慧莹¹ 林伟琦¹ 丁燕佳¹ 韦华贵² 王俊利² 林敏^{3*}

[摘要] 目的 了解潮州地区人群葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PD)缺乏症分子流行病学特征,为本地区G6PD缺乏症的防控提供依据。方法 采用荧光分析法筛查2012年1月—2019年12月期间34 813例潮州地区新生儿。随机抽取初筛酶活性缺乏男性样本420例,用聚合酶链反应-反向斑点杂交(PCR-RDB)芯片进行基因型鉴定。结果 潮州地区新生儿G6PD活性筛查阳性率为3.35%(1 167/34 813),男女筛查阳性率分别为4.75%(897/18 880)和1.69%(270/15 933)。男性新生儿筛查阳性率明显高于女性新生儿,差异具有统计学意义($P<0.05$)。在420例进行基因型鉴定的样本中,检出9种G6PD突变等位基因的样本占86.9%(365/420),其中最常见5种为c.1376 G>T(41.43%)、c.1388 G>A(24.52%)、c.95 A>G(6.96%)、c.1024C>T(5.24%)和c.1311C>T(4.76%)。所有的c.871 G>A均与c.1311C>T连锁。结论 初步了解了潮州人群G6PD缺乏症的分布特征,为本地区预防G6PD缺乏症的发生、指导临床、提高地区总人口素质及研究人群起源提供一定的依据。

[关键词] G6PD缺乏症;潮州;遗传突变

G6PD deficiency screening and genotyping analysis of newborns in Chaozhou, Guangdong Province

CHEN Xinyao¹, LIANG Xueyan¹, HUANG Huiying¹, LIN Weiqi¹, DING Yanjia¹, WEI Huagui², WANG Junli², LIN Min^{3*}

(1. Department of Medical Laboratory, Chaozhou People's Hospital Affiliated to Shantou University Medical College, Chaozhou, Guangdong, China, 521011; 2. School of Clinical Medicine, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise, Guangxi, China, 533000; 3. School of Food Engineering and Biotechnology, Hanshan Normal University, Chaozhou, Guangdong, China, 521011)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the molecular epidemiological character of glucose - 6 - phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency, and to provide evidence for prevention and control of G6PD deficiency in Chaozhou. **Methods** The fluorescence analysis method was used to screen 34 813 newborns in Chaozhou area from January 2012 to December 2019. A random sample of 420 men with enzyme activity deficiency was selected, and the polymerase chain reaction - reverse dot hybridization (PCR - RDB) chip was used for genotyping. **Results** The positive rate of neonatal G6PD activity screening in Chaozhou area was 3.35% (1 167/34 813), and the positive rates of male and female screening were 4.75% (897/18 880) and 1.69% (270/15 933), respectively. The positive rate of male newborn screening was significantly higher than that of female newborns, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). Among the 420 samples for genotyping, 9 types of G6PD mutant alleles were detected in 86.9% (365/420), and the most common 5 types were c.1376 G>T (41.43%), c.1388 G>A (24.52%), c.95 A>G (6.96%), c.1024C>T (5.24%) and c.1311C>T

基金项目:广东省医学科学技术研究基金项目(B2019232, A2019198);广西省自然科学基金重点项目(AB18221029; 2019JJD140052);广东省重点学科科研项目(2019-GDXK-0031)

作者单位:1.汕头大学医学院附属潮州市人民医院中心实验室,广东,潮州 521011

2.右江民族医学院检验学院,广西,百色 533000

3.韩山师范学院食品工程与生命科学院,广东,潮州 521011

*通信作者:林敏, E-mail: konfutea@hotmail.com

(4.76%)。All c.871 G>A are linked to c.1311C>T. **Conclusion** The preliminary understanding of the distribution characteristics of G6PD deficiency in Chaozhou population provides a basis for preventing the occurrence of G6PD deficiency in the region, guiding clinical practice, improving the overall population quality of the region, and studying the origin of the population.

[KEY WORDS] G6PD deficiency; Chaozhou; Genetic mutation

葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 (Glucose-6-phosphate dehydrogenase, G6PD) 缺乏症俗称蚕豆病,是由于红细胞膜的 G6PD 缺乏引起红细胞破坏并溶血的一种遗传性疾病^[1]。G6PD 基因位于染色体 Xq28 的片段,全长 18.5 Kb,包含 13 个外显子及 12 个内含子。绝大多数的 G6PD 缺乏症都是由于 G6PD 基因突变导致的,目前全球已经发现 400 余种突变。G6PD 缺乏症是最常见的红细胞遗传病之一,全球患病率约为 5%,呈明显的地域性和种族性分布^[2],主要分布在东南亚、印度次大陆、中东地区及地中海沿岸和非洲地区。我国患病率在 0.2%~44.8%之间,以两广、海南为高发区^[3-5]。G6PD 缺乏症是新生儿病理性黄疸的主要发病因素,据文献报道,患 G6PD 缺乏症的新生儿中约 50% 发生黄疸,其中 12% 会发展为核黄疸^[6],从而导致脑部损害,引起智力低下。为了解潮州地区人群 G6PD 缺乏症分子流行病学特征,为本地区 G6PD 缺乏症的防控提供依据,本研究总结了新生儿 G6PD 活性筛查数据,并对部分样本进行基因型鉴定,结果汇总如下。

1 资料与方法

1.1 病例来源

选取 2012 年 1 月至 2019 年 12 月本院出生的 34 813 份新生儿筛查样本,其中男性新生儿 18 880 例,女性新生儿 15 933 例。本项目已获得本院伦理委员会批准,所有受试者监护人均签订知情同意书。

1.2 G6PD 活性筛查

根据《广东省新生儿疾病筛查管理办法》的标准^[7],严格按照操作规程,对出生 72 h 以上的新生儿用里定血样标本采集卡采集足后跟血样制备血斑,自然干燥晾干后分别独立装进封口袋,送新生儿筛查实验室,并置 2~8℃ 冰箱保存,一周内完成 G6PD 活性筛查。剩余标本置 -70℃ 低温保存箱保存,备分子生物学检测。根据《新生儿疾病筛查技术规范》^[8],采用广州市丰华生物工程有限公司的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶荧光分析试剂盒,严格按照操作说明进行 G6PD 活性筛查。结果判定^[9]:以

G6PD 活性 2.6 U/gHb 为界限,小于该值判为 G6PD 酶缺乏或减少,即为初筛阳性标本。

1.3 DNA 提取

从所有样本中随机抽取酶学缺乏的 420 份男性样本进行分子生物学研究。实验过程如下:用欧歌重型打孔钳打下直径 3 mm 的纸片各 3 个,采用天根生物干血斑提取试剂盒制备 DNA, DNA 质量由美国芬兰 1510-05665 全波长酶标仪进行评价,在 260~280 nm 的波长测定,并将其调整到 10 ng/μL,保存于海尔 DW-86L486 医用低温(-70℃)保存箱中。

1.4 基因型鉴定

上述 DNA 采用广东凯普生物有限公司生产的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶基因检测试剂盒 (PCR-导流杂交法),可检测中国人群常见的 14 种 G6PD 基因突变类型:c.95A>G、c.392G>T、c.487G>A、c.493A>G、c.592C>T、c.871G>A、c.1004C>T、c.1024C>T、c.1311C>T、c.1360C>T、c.1376G>T、c.1381G>A、c.1387C>T、c.1388G>A。严格按照试剂说明进行操作及判读。

1.5 统计分析

采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析。计数资料采用 $n(\%)$ 表示,行 χ^2 检验;采用 χ^2 检验检测基因频率是否符合 Hardy-Weinberg 平衡定律, $P>0.05$ 为群体基因符合遗传平衡法则,样本数据来自同一孟德尔群体。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 潮州地区 G6PD 缺乏症酶学筛查与性别的关系

34 813 份新生儿筛查样本中共筛查出 G6PD 缺乏样本 1 167 份,总阳性率为 3.35%,男性检出率(4.75%)明显高于女性(1.69%),差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.2 潮州地区 G6PD 缺乏症突变谱

420 例男性酶缺乏标本中,检出 9 种 G6PD 突变等位基因的样本占 86.90%(365/420),其中最常见的 5 种为 c.1376 G>T、c.1388 G>A、c.95 A>G、c.1024C>T 和 c.1311C>T。所有的 c.871 G>A 均与 c.1311C>T 连锁。见表 1、图 1。

表1 潮州地区420例男性新生儿G6PD缺乏症基因突变型别

Table 1 Genotypes of G6PD deficiency in 420 male newborns in Chaozhou area

突变类型	氨基酸改变	WHO 分类	等位基因(n)	等位基因携带率(%)
c.1376G>T	p.Arg489Pro	Class II	174	41.43
c.1388 G>A	p.Arg493His	Class II	103	24.52
c.95A>G	p.His32Arg	Class III	29	6.90
c.1024C>T	p.Leu342Phe	Class III	22	5.24
c.1311C>T			6	1.43
c.871G>A/c.1311C>T	p.Val291Met	Class II	14	3.33
c.392G>T	p.Gly131Val	Class III	11	2.62
c.1360C>T	p.Arg454Cys	Class II	5	1.19
c.487G>A	p.Gly163Ser	Class III	1	0.24
总计			365	86.90

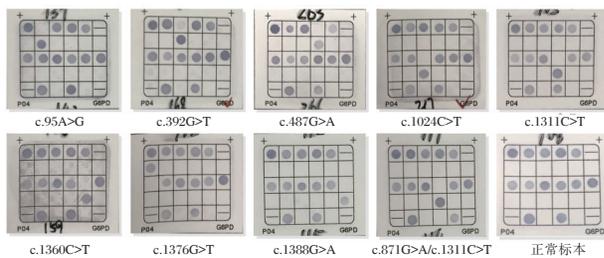


图1 G6PD斑点杂交图谱

Figure 1 Dot blot hybridization result of G6PD

2.3 G6PD 基因突变谱与酶活性的关系

分析上述男性新生儿 G6PD 活性与基因型的关系(c.487 G>A 样本太少,剔除),发现未检出突变的男性新生儿酶活性明显高于检出突变的样本,差异有统计学意义($P<0.05$)。携带 c.871G>A 连锁 c.1311C>T 突变的样本酶活性明显低于单一突变样本,差异有统计学意义($P<0.05$)。见图2。

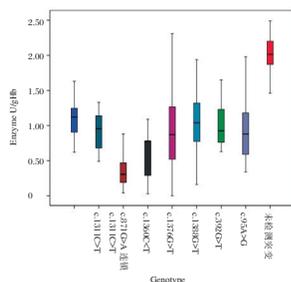


图2 基因突变谱与酶活性的关系

Figure 2 Relationship between gene mutation profile and enzyme activity

3 讨论

我国是 G6PD 缺乏症的高发区,研究表明,我国 G6PD 缺乏症的发生率与纬度呈现反相关:随着纬度的升高/北移,G6PD 缺乏症的发生率下降,呈现

“南高北低”的分布特点^[3,10]。文献报道,我国北纬 30°以北(长江以北)为低疟疾区,北纬 25°至 32°为中疟疾区,北纬 25°以南为高疟疾区^[11]。本研究潮州地区地处高疟区与中疟区的交界处,研究结果表明 G6PD 缺乏症的发生率明显低于更低纬度(高疟区)的崇左、惠州^[3,12],但高于位于中疟区的地区如福州、温州^[13-14],与此前报道的关于我国 G6PD 缺乏症的分布地域特点“疟疾正向选择假说”相一致^[11]。

G6PD 缺乏症为 X 连锁不完全显性遗传病,在男性群体中只存在正常或显著缺乏的两种半合子人群。因而,男性只要携带 G6PD 突变基因就会发病且表现为 G6PD 重度缺乏。女性有 2 条 X 染色体,X 染色体随机失活在女性群体中只有纯合子以及部分携带突变的杂合子表现出不同程度的酶缺乏。本研究中男、女 G6PD 缺乏症发生率分别为 4.75% 和 1.69%,符合 X 染色体连锁不完全显性遗传的规律。迄今为止,全球共报道 G6PD 基因突变类型约 220 多种^[15],其中在我国人群中发现 33 种突变,最常见突变类型为 c.1388G>A、c.1376G>T 和 c.95A>G^[11]。本研究结果与相关文献报道的中国人最常见的 3 种 G6PD 基因类型相符^[16]。有报道曾指出国内人群中的 c.1311C>T 基因型常复合其他突变类型,发生率在 5.1%~24%^[17]。本研究中 c.1311C>T 基因型的发生频率为 4.76%,其中 3.33% 以复合形式出现,与之前的研究结果相一致^[17-18]。值得关注的是,复合突变的标本 G6PD 活性均明显低于单一突变的标本,这与有关文献指出复合突变可降低 G6PD 活性的报道一致^[18]。

综上所述,潮州地区新生儿 G6PD 缺乏症发生率与本地区前期文献^[19]研究数据对比有明显上升趋势,本研究小组推测几个可能原因:各地区人群交流日益频繁而使本地区人口结构不断变化;本次研究样本数量及时间跨度大,更能客观反映潮州地区新生儿 G6PD 缺乏症发生率的情况。

G6PD 缺乏症目前尚无根治办法,仅能依据病情进行对症处理。因此,对新生儿进行 G6PD 活性筛查并且加快普及基因突变检测,既能精准发现突变位点,又可避免发生漏诊的情况。随着分子生物学诊断技术的发展以及成本的降低,基因检测有望成为潮州地区 G6PD 普查的一种新方法,从而积极而且有效地预防和控制诱因,对患儿早期治疗具有积极意义。

参考文献

- [1] Beutler E, Duparc S. G6PD Deficiency Working Group. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and antimalarial drug development[J]. *Am J Trop Med Hyg*, 2007, 77(4):779-789.
- [2] Howes RE, Battle KE, Satyagraha AW, et al. G6PD deficiency: global distribution, genetic variants and primaquine therapy[J]. *Adv Parasitol*. 2013, 81:133-201.
- [3] 李卫彬, 农雪凤, 卢珮, 等. 广西崇左地区新生儿 G6PD 缺乏症的筛查结果分析[J]. *中国优生与遗传杂志*, 2019, 27(3):334-335, 338.
- [4] 张志强, 赵雨香, 钟继生. 新生儿 G6PD 缺乏症筛查及基因突变类型鉴定[J]. *深圳中西医结合杂志*, 2020, 30(7):65-66.
- [5] 刘秀莲, 王洁, 黄慈丹, 等. 海口地区新生儿 G6PD 基因突变分析[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2017, 9(3):165-167, 177.
- [6] 韦永琼, 郭健玉. 成都市新生儿葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏症筛查分析[J]. *国际检验医学杂志*, 2013, 34(24):3366-3367.
- [7] 广东省卫生健康委关于新生儿疾病筛查的管理办法[J]. *广东省人民政府公报*, 2019, 5:19-22.
- [8] 卫生部. 关于《新生儿疾病筛查技术规范》新版(2010) [J]. *中国优生与遗传杂志*, 2011, 19(8):130.
- [9] 王维鹏, 邹琳, 王治国. 新生儿疾病筛查与产前诊断实验室管理[M]. 北京:人民卫生出版社, 2018:167.
- [10] 王洪芹, 魏明, 李文杰. 青岛地区新生儿 G6PD 缺乏症患者情况及基因突变类型研究[J]. *中国儿童保健杂志*, 2018, 26(11):1233-1236.
- [11] Zheng Y, Wang J, Liang X, et al. Epidemiology, evolutionary origin, and malaria-induced positive selection effects of G6PD-deficient alleles in Chinese populations[J]. *Mol Genet Genomic Med*, 2020, 8(12):e1540.
- [12] 张志强, 赵雨香, 钟继生. 新生儿 G6PD 缺乏症筛查及基因突变类型鉴定[J]. *深圳中西医结合杂志*, 2020, 30(7):65-66.
- [13] 刘凡, 严争, 陈俊, 等. 福州地区新生儿 G6PD 缺乏症与病理性黄疸关系的临床分析[J]. *福建医药杂志*, 2018, 40(6):39-41.
- [14] 朱丽丹, 丁红香, 倪莉, 等. 温州地区新生儿 G6PD 缺乏症基因突变分析[J]. *中国预防医学杂志*, 2018, 19(7):509-513.
- [15] Cunningham AD, Mochly-Rosen D. Structural analysis of clinically relevant pathogenic G6PD variants reveals the importance of tetramerization for G6PD activity[J]. *Matt*, 2017.
- [16] Liu Z, Yu C, Li Q, et al. Chinese newborn screening for the incidence of G6PD deficiency and variant of G6PD gene from 2013 to 2017[J]. *Hum Mutat*, 2020, 41(1):212-221.
- [17] 侯家兴, 黄志浩, 谢意文. G6PD 缺乏症基因型检测诊断与酶学诊断在应用中的比较分析[J]. *临床和实验医学杂志*, 2017, 16(14):1410-1413.
- [18] 刘秀莲, 王洁, 林燕, 等. 346 例海南黎族新生儿 G6PD 基因突变分析[J]. *基因组学与应用生物学*, 2019, 38(9):4224-4229.
- [19] 詹小芬, 杨辉, 杨惠钿, 等. 广东潮州地区新生儿葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏症基因突变分析[J]. *重庆医科大学学报*, 2014, 39(12):1749-1752.

(上接第 880 页)

参考文献

- [1] 尤娟. 卵巢癌患者血清 miR-21 及糖类抗原 125 水平变化及意义[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2019, 11(6):513-516.
- [2] 黄奔, 郑明选, 孙静芳, 等. HMGA2 在恶性肿瘤诊疗中的研究进展[J]. *现代肿瘤医学*, 2020, 28(20):3636-3640.
- [3] 江旭林, 范星, 汤俊, 等. 白细胞介素 22 对结肠癌细胞增殖、迁移、侵袭和上皮间质转化的影响及作用机制[J]. *安徽医药*, 2020, 24(11):2161-2165.
- [4] Zhang Y, Liu C, Gao J, et al. IL-22 promotes tumor growth of breast cancer cells in mice [J]. *Aging*, 2020, 12(13):13354-13364.
- [5] 张静, 黄普艳, 杜丽娟. 卵巢癌患者的 FOLR1、CA125 水平变化及其临床意义研究[J]. *实验与检验医学*, 2019, 37(3):361-363.
- [6] 佚名. 卵巢恶性肿瘤诊断与治疗指南(第四版)[J]. *中国实用妇科与产科杂志*, 2018, 34(7):739-749.
- [7] Gunel T, Dogan B, Gumusoglu E, et al. Regulation of HMGA2 and KRAS genes in epithelial ovarian cancer by miRNA hsa-let-7d-3p[J]. *J Cancer Res Ther*, 2019, 15(6):1321-1327.
- [8] 佟鑫, 苏丽娅. HMGA2 的生物学功能及在肿瘤中的作用机制[J]. *生命的化学*, 2020, 40(7):1149-1155.
- [9] Imai N, Tawara I, Yamane M, et al. CD4⁺T cells support polyfunctionality of cytotoxic CD8⁺T cells with memory potential in immunological control of tumor [J]. *Cancer Sci*, 2020, 111(6):1958-1968.
- [10] 蒋茂芹, 赖铭裕, 谢芳, 等. 胃癌组织中 IL-22BP、IL-22、STAT3 的表达变化及意义[J]. *山东医药*, 2017, 57(25):16-19.
- [11] 林林, 秦晓宁, 阮洪训, 等. 白介素-22 基因多态性与结肠癌相关性的研究[J]. *重庆医科大学学报*, 2019, 44(5):657-661.
- [12] 雷波, 玄秀云, 樊卫平, 等. Th22 细胞分泌 IL-22 激活 STAT3 通路促进人卵巢癌发展[J]. *免疫学杂志*, 2018, 34(6):492-498.
- [13] Wang Y, Li X, Qu P. Bioinformatics analysis of FOLR1 expression, functional enrichment, related signaling pathways and relationship with prognosis in ovarian cancer [J]. *Pteridines*, 2020, 31(1):46-54.
- [14] 黄平, 李彦英, 李玲玲, 等. ATIP3a-HMGA2-ERK 信号通路对卵巢上皮细胞癌顺铂耐药性的影响[J]. *河北医科大学学报*, 2018, 39(10):1179-1184.
- [15] 赵航. 上皮性卵巢癌患者血清白细胞介素-22 的变化及临床意义[J]. *医疗装备*, 2019, 32(3):55-57.
- [16] 梁振, 董郊, 李凤杰, 等. FOLR1 与 MSLN 蛋白在上皮性卵巢癌组织中的表达及临床意义[J]. *第三军医大学学报*, 2020, 42(2):133-140.

系统性红斑狼疮患者外周血 T 淋巴细胞亚群和亲环素 A 的表达及临床意义

刘怡¹ 谭静雅¹ 卿红梅¹ 周彬^{2*}

[摘要] **目的** 探讨系统性红斑狼疮患者外周血 T 淋巴细胞亚群和亲环素 A (CyP A) 的表达及临床意义。**方法** 选取本院 34 例健康体检者(对照组)及收治的 52 例系统性红斑狼疮患者(研究组)作为研究对象,后者根据其病情分为活动组和非活动组、狼疮性肾炎组和无狼疮性肾炎组,分别检测 86 例研究对象的外周血 T 淋巴细胞亚群(CD₃⁺、CD₄⁺、CD₈⁺)、CD₄⁺/CD₈⁺、CyP A 及抗 CyP A 自身抗体的表达情况并加以比较。**结果** 研究组患者 T 淋巴细胞亚群 CD₃⁺、CD₄⁺、CD₄⁺/CD₈⁺均低于对照组,CD₈⁺和 CyP A 高于对照组($P<0.05$)。在 52 例系统性红斑狼疮患者中,活动组、狼疮性肾炎组的 CD₃⁺、CD₄⁺、CD₄⁺/CD₈⁺均低于非活动组、无狼疮性肾炎组,CD₈⁺和 CyP A 高于非活动组、无狼疮性肾炎组($P<0.05$)。对照组抗 CyP A 抗体的阳性率为 2.94% (1/34),低于研究组 46.15% (24/52) ($P<0.05$),三类抗体 IgG、IgA、IgM 的阳性率分别为 36.54% (19/52)、19.23% (10/52)、13.46% (7/52)。抗 CyP A 抗体在出现皮肤黏膜损害、关节痛、发热、白细胞减少等临床表现的患者中的阳性率较高。**结论** 外周血 T 淋巴细胞亚群和 CyP A 的表达水平与系统性红斑狼疮的发生发展、病情程度有密切联系。

[关键词] 系统性红斑狼疮; T 淋巴细胞亚群; 亲环素 A; 狼疮性肾炎; CD₃⁺; CD₄⁺

Expression and clinical significance of peripheral blood T lymphocyte subsets and cyclophilin A in patients with systemic lupus erythematosus

LIU Yi¹, TAN Jingya¹, QIN Hongmei¹, ZHOU Bin^{2*}

(1. Department of Rheumatology and Immunology, Wenjiang District People's Hospital, Chengdu, Sichuan, China, 611130; 2. Department of Rheumatology and Immunology, Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu, Sichuan, China, 610072)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the expression and clinical significance of peripheral blood T lymphocyte subsets and cyclophilin A (CyP A) in patients with systemic lupus erythematosus. **Method** 34 people with healthy examination (control group) and 52 patients with systemic lupus erythematosus (study group) were enrolled. The latter were divided into active and inactive groups, lupus nephritis group and no-lupus nephritis group according to their condition of disease. The expressions of peripheral blood T lymphocyte subsets (CD₃⁺, CD₄⁺, CD₈⁺), CD₄⁺/CD₈⁺, CyP A and anti-CyP A autoantibodies in 86 subjects were detected and compared. **Results** The T lymphocyte subsets CD₃⁺, CD₄⁺ and CD₄⁺/CD₈⁺ in the study group were lower than those in the control group, while CD₈⁺ and CyP A were higher than those in the control group ($P<0.05$). In 52 patients with systemic lupus erythematosus, CD₃⁺, CD₄⁺, CD₄⁺/CD₈⁺ in the active group and lupus nephritis group were lower than those in the inactive group and no-lupus nephritis group, while CD₈⁺ and CyP A were higher than those in the inactive group and no-lupus nephritis group ($P<0.05$). The positive rate of anti-CyP A antibody in the control group was 2.94% (1/34), which was lower than that in the study group

基金项目:四川省卫生厅科研课题(121071)

作者单位:1.成都市温江区人民医院风湿免疫科,四川,成都 611130

2.四川省人民医院风湿免疫科,四川,成都 610072

*通信作者:周彬, E-mail:zhoubinspph@sina.com

(46.15% (24/52) ($P < 0.05$)). The positive rates of the three types of antibodies IgG, IgA and IgM were 36.54% (19/52), 19.23% (10/52) and 13.46% (7/52) respectively. Anti-CyP A antibodies had a higher positive rate in patients with clinical manifestations such as damage of skin mucous membrane, arthralgia, fever and leukopenia, etc. **Conclusion** The expression levels of peripheral blood T lymphocyte subsets and CyP A are closely related to the occurrence and development of systemic lupus erythematosus and to the degree of disease.

[KEY WORDS] Systemic lupus erythematosus; T lymphocyte subsets; Cyclophilin A; Lupus nephritis; CD3⁺; CD4⁺

系统性红斑狼疮是一种累及多脏器的自身免疫性炎症性结缔组织病,多发于青年女性^[1],病因、机制尚不明确,目前大部分学者认为与遗传、内分泌、感染、免疫异常等因素有关^[2-3]。本病发病机制为T淋巴细胞数量、功能降低、B细胞增生,产生大量自身抗体^[4],与抗原结合沉积在皮肤、关节、小血管、肾小球等部位^[5],从而导致一系列的临床症状。其中外周血T淋巴细胞亚群和亲环素A(Cyclophilin, CyP A)可介导发挥免疫抑制作用^[6],在本病发生发展过程中有不可忽视的作用。为此,本研究选取了2016年6月至2019年1月本院收治的系统性红斑狼疮患者52例及健康体检者34例,旨在探讨系统性红斑狼疮患者外周血T淋巴细胞亚群和亲环素A的表达及临床意义。现报道如下。

1 资料和方法

1.1 一般资料

选取2016年6月至2019年1月本院收治的系统性红斑狼疮患者52例作为观察组,健康体检者34例作为对照组,分别检测其外周血T淋巴细胞亚群和CyP A表达水平。其中对照组男3例,女31例,年龄19~47岁,平均年龄(33.95±5.71)岁;观察组男7例,女45例,年龄20~46,平均年龄(33.75±5.52)岁。后者根据系统性红斑狼疮疾病活动度评分(systemic lupus erythematosus' Disease activity score, SLEDAI)^[7]分为活动组($n=30$)和非活动组($n=22$),活动组男4例,女26例,平均年龄(32.81±5.49)岁,非活动组男3例,女19例,平均年龄(34.74±5.79)岁;根据是否有狼疮性肾炎分为狼疮性肾炎组($n=28$)和无狼疮性肾炎组($n=24$),狼疮性肾炎组男4例,女24例,平均年龄(33.06±5.61)岁,无狼疮性肾炎组男3例,女21例,平均年龄(34.69±5.37)岁。观察组与对照组、活动组与非活动组、狼疮性肾炎组与无狼疮性肾炎组分别在性别、年龄等方面的比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

1.2 纳入排除标准

纳入标准:①研究组临床症状、体征、实验室检查等均符合2012年系统性红斑狼疮国际临床协作组公布的诊断标准^[8],均为初发病例;②系统性红斑狼疮活动性判断参照Bombardier法^[9]计算,累计积分 > 9 的患者归为活动组, ≤ 9 的患者为非活动组;③狼疮性肾炎的患者排除原发性肾炎及其他继发性肾脏疾病;④无过敏史,妇女非哺乳期或妊娠期;⑤所有纳入研究者及(或)家属均签署知情同意书。排除标准:①合并慢性肾小球肾炎、肾病综合征等其他肾内科疾病患者;②合并其他重要脏器疾病、血液系统、免疫系统疾病患者;③长期应用免疫抑制剂或糖皮质激素患者。

1.3 指标检测方法

1.3.1 试剂/仪器

外周血T淋巴细胞亚群检测:试剂采用CD₃、CD₄、CD₈单克隆抗体(由天津中国医学科学院生物医学工程研究所提供),FAC-SCalibur型流式细胞仪进行检测。CyP A检测:试剂为兔抗CyP(由天津市血液研究所提供),DG-3022 A型酶联免疫检测仪检测。抗CyPA自身抗体检测:试剂为羊抗人过氧化物酶抗体(由北京中山生物技术有限公司提供)。

1.3.2 方法

外周血T淋巴细胞亚群检测:采集空腹静脉外周血标本6 mL,离心,血细胞稀释,调整细胞浓度为 2×10^7 悬液,取样50 μ L,加入异硫氰酸荧光素标记的CD₃、CD₄、CD₈单克隆抗体20 μ L,孵育30 min,用FITC-IgG1标记抗体作阴性对照^[10]。每个样本10 000个细胞,结果以阳性细胞的百分率表示。

CyP A检测:采集空腹静脉外周血标本6 mL,离心,取血浆标本6 mL,离心,取上清100 μ L,过夜加入稀释后的rhCyP A 100 μ L,加入酶标记兔抗CyP 100 μ L,37℃孵育1 h,避光显色20 min,采用酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immuno sor-

bent assay, ELISA)检测 450 nm 吸光度。

抗 CyPA 自身抗体检测:采用间接 ELISA 法,避光显色,读取 450 nm 吸光度,以正常对照组吸光度的平均值加 2 倍标准差为正常上限。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 18.0 软件进行统计分析,计量资料采用 $(\bar{x} \pm s)$ 描述,采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 研究组与对照组 T 淋巴细胞亚群指标和 CyP A 表达水平比较

研究组患者 T 淋巴细胞亚群 CD_3^+ 、 CD_4^+ 、 CD_4^+/CD_8^+ 均低于对照组, CD_8^+ 和 CyP A 高于对照组,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 活动组和非活动组 CD_3^+ 、 CD_4^+ 、 CD_8^+ 、 CD_4^+/CD_8^+ 和 CyP A 表达水平比较

活动组患者 T 淋巴细胞亚群 CD_3^+ 、 CD_4^+ 、 CD_4^+/CD_8^+ 均低于非活动组, CD_8^+ 和 CyP A 高于非活动组 ($P < 0.05$)。见表 2。

2.3 狼疮性肾炎组与无狼疮性肾炎组患者 T 淋巴细胞亚群指标和 CyP A 表达水平比较

狼疮性肾炎组患者 T 淋巴细胞亚群 CD_3^+ 、

CD_4^+ 、 CD_4^+/CD_8^+ 均低于对照组, CD_8^+ 和 CyP A 高于无狼疮性肾炎组 ($P < 0.05$)。见表 3。

2.4 抗 CyP A 抗体在系统性红斑狼疮患者中的表达

34 例健康体检者中有 1 例抗 CyP A 抗体阳性,阳性率为 2.94%, 52 例系统性红斑狼疮患者中有 24 例抗 CyP A 抗体阳性,阳性率为 46.15%,高于前者 ($P < 0.05$), 3 类抗体 IgG、IgA、IgM 的阳性率分别为 36.54% (19/52)、19.23% (10/52)、13.46% (7/52)。抗 CyP A 抗体在出现皮肤黏膜损害、关节痛、发热、白细胞减少等临床表现的患者中的阳性率较高。见表 4。

3 讨论

系统性红斑狼疮是一种以多系统损害且伴有多种自身抗体为特征的免疫性疾病,其临床表现复杂,病情迁延^[11-12],难以治愈,部分患者可自行缓解,或呈“一过性”发作后病症完全消失。大多数患者可出现不同程度的皮肤和粘膜损害,骨骼、心脏、呼吸系统、肾脏、神经系统、血液系统等受累,严重者可致充血性心力衰竭、肺栓塞等^[13]。本病病因至今尚未肯定,大部分学者认为与 T 细胞免疫功能异常及 CyPA 表达有密切联系^[14-15]。

表 1 两组 T 淋巴细胞亚群指标和 CyP A 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of T lymphocyte subsets and CyP A expression levels between 2 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	CD_3^+ (%)	CD_4^+ (%)	CD_8^+ (%)	CD_4^+/CD_8^+	CyP A ($\mu\text{g/L}$)
研究组	52	63.24±2.37	30.84±3.29	36.17±2.94	0.82±0.06	320.70±81.51
对照组	34	72.07±3.15	42.04±3.35	31.32±2.75	1.54±0.07	160.94±75.04
<i>t</i> 值		14.810	15.325	7.671	50.917	9.166
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

表 2 活动组和非活动组 CD_3^+ 、 CD_4^+ 、 CD_8^+ 、 CD_4^+/CD_8^+ 和 CyP A 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of CD_3^+ , CD_4^+ , CD_8^+ , CD_4^+/CD_8^+ and CyPA expression levels between active and inactive groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	CD_3^+ (%)	CD_4^+ (%)	CD_8^+ (%)	CD_4^+/CD_8^+	CyP A ($\mu\text{g/L}$)
活动组	30	60.96±2.21	27.95±3.09	39.35±3.14	0.70±0.07	398.62±82.80
非活动组	22	66.04±2.39	34.48±3.60	34.92±2.15	0.97±0.11	187.45±80.16
<i>t</i> 值		7.912	7.020	5.702	10.806	9.208
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

表 3 狼疮性肾炎组与无狼疮性肾炎组患者 T 淋巴细胞亚群指标和 CyP A 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of T lymphocyte subsets and CyP A expression levels between patients with lupus nephritis and those without lupus nephritis ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	CD_3^+ (%)	CD_4^+ (%)	CD_8^+ (%)	CD_4^+/CD_8^+	CyP A ($\mu\text{g/L}$)
狼疮性肾炎组	28	61.85±2.26	28.08±3.15	37.83±3.04	0.71±0.05	394.41±82.43
无狼疮性肾炎组	24	65.71±2.44	34.16±3.57	35.16±2.83	0.94±0.10	189.16±80.46
<i>t</i> 值		5.884	6.499	3.221	10.901	8.960
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	0.002	<0.001	<0.001

表4 研究组患者临床特征与抗 CyP A 抗体的关系
[n(%)]

Table 4 The relationship between clinical features and anti-CyP A antibodies in the study group [n(%)]

临床特征	n	抗 CyP A 自身抗体				总阳性率
		阴性	阳性			
			IgG	IgA	IgM	
皮肤黏膜损害	31	9	17	9	5	22(70.97)
脉管炎	10	7	0	2	1	3(30.00)
关节痛	17	3	7	6	4	14(82.35)
肾炎	28	14	15	7	6	14(50.00)
发热	12	2	5	3	2	10(83.33)
贫血	22	10	5	4	3	12(54.55)
白细胞减少	15	3	6	3	3	12(80.00)
血小板减少	19	9	5	4	1	10(52.63)

亲环素(Cyclophilin, CyP)即环孢素 A 结合蛋白^[16],是指一类与环孢素 A 有高亲和力、能与其结合的蛋白质,其最主要的一种即为 CyP A。CyP A 在生物界存在广泛,结构具有高度保守性,在细胞的生命过程中有重要作用。CyP A 对中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、单核细胞等炎性细胞有较强的趋化作用,介导环孢素 A 抑制免疫反应^[17],因而可作为炎症和免疫刺激反应的代表性因子,参与、推动自身免疫系统疾病、感染性疾病、心血管疾病、肿瘤等疾病的发生发展。研究发现,全身性红斑狼疮患者体内 CyP A 的表达水平显著升高,同时引起抗亲环素自身抗体的产生,而且与疾病的活动性有关^[18]。本组研究表明,系统性红斑狼疮的患者 CyP A 水平及其抗体阳性率(46.15%)高于正常体检者(2.94%),处于活动期或狼疮性肾炎的患者 CyP A 水平高于非活动期、无狼疮性肾炎的患者。由此表明,本研究结果与上述研究结论具有一致性,CyP A 与系统性红斑狼疮患者的发病和病情有相关性,可以通过检测患者外周血中 CyP A 的水平变化来监测患者病情变化,区别患者处于活动期或非活动期、有无狼疮性肾炎,从而指导临床治疗。

有研究表明,在系统性红斑狼疮的发生发展过程中,T淋巴细胞亚群的紊乱亦扮演着重要的角色,B 细胞的高度活化、过度增殖是以 T 细胞异常为基础且在其诱导下产生的^[19]。T 细胞亚群中的 CD₄⁺和 CD₈⁺T 细胞的相互制约及平衡具有调节机体免疫应答的重要作用^[20],其数量异常体现了 T 细胞免疫功能的异常。一项大样本研究纳入了 100 例高加索白种人系统性红斑狼疮患者,发现 CD₄⁺与系统性红斑狼疮呈负相关^[21]。Bengtsson

等^[22]发现即使系统性红斑狼疮处于缓解状态,T 细胞平衡亦未达到正常水平。在本组研究结果中,系统性红斑狼疮患者尤其是处于活动期、狼疮性肾炎患者 T 淋巴细胞亚群 CD₃⁺、CD₄⁺、CD₄⁺/CD₈⁺的表达水平均偏低,CD₈⁺较高,由此表明系统性红斑狼疮患者存在 T 淋巴细胞紊乱,尤其在狼疮性肾炎患者中表现明显。T 细胞功能紊乱可致免疫功能缺陷,在系统性红斑狼疮患者中表现为抵抗力低下,易出现呼吸道、泌尿道、消化道感染等并发症。

综上所述,系统性红斑狼疮患者活动期、出现狼疮性肾炎时其外周 T 淋巴细胞亚群 CD₃⁺、CD₄⁺、CD₄⁺/CD₈⁺的表达水平低于非活动期、无狼疮性肾炎的患者,CD₈⁺和 CyP A 高于非活动期、无狼疮性肾炎的患者,由此表明,外周 T 淋巴细胞亚群和 CyP A 的表达水平与系统性红斑狼疮的发生发展、病情程度及预后转归有密切联系。

参考文献

- [1] 荆孝忠,姜威,黄朔,等. 系统性红斑狼疮危象合并多发脑梗死 1 例报告[J]. 中风与神经疾病杂志, 2018, 35(5):77-78.
- [2] 刘莹,陈龙. 青蒿汤方联合泼尼松片治疗系统性红斑狼疮疗效观察[J]. 湖北中医杂志, 2018, 374(5):28-30.
- [3] 唐雪梅. 系统性红斑狼疮遗传学研究进展[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2016, 31(21):1601-1604.
- [4] Zhu QY, Dian ZJ, Zhou YG, et al. Changes of T lymphocyte subsets and immunoglobulin in peripheral blood of patients with ALL and N-ALL before and after treatment and their value for monitoring of disease and evaluation of prognosis[J]. J Exp Hematol, 2018, 26(1):136-140.
- [5] 万远芳,陶春蓉,龚娟,等. 肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体在皮肤红斑狼疮患者外周血单个核细胞、皮损组织与血清中表达的研究[J]. 临床皮肤科杂志, 2017, 46(3):174-178.
- [6] 高红红,陈剑. 亲环素 A 在恶性肿瘤中的研究进展[J]. 癌症进展, 2019, 17(2):137-139.
- [7] 王蒙,韩迪迪,王力宁,等. 系统性红斑狼疮两种评分系统对狼疮肾炎活动临床评价的比较[J]. 中华风湿病学杂志, 2016, 20(6):391-395.
- [8] 宋昇达,黄冬梅,崔洪岩,等. 三维超声在系统性红斑狼疮并肺动脉高压患者右心房功能评价中的应用[J]. 临床心血管病杂志, 2017, 28(5):448-451.
- [9] 刘亚新,任天丽,张霞. 羟氯喹联合小剂量阿司匹林及泼尼松对妊娠合并系统性红斑狼疮患者母婴结局及细胞因子的影响[J]. 中国妇幼保健, 2018, 33(5):1003-1006.
- [10] 陈婉乐,刘玉东,李雪兰,等. 早发性卵巢功能不全患者赠卵 IVF 获得妊娠在孕期合并系统性红斑狼疮:1 例报告并文献复习[J]. 南方医科大学学报, 2017, 37(12):1683-1687.

托珠单抗治疗 76 例新生儿坏死性小肠结肠炎的临床分析

林明静 冯琼 林虹 李春蕾*

【摘要】 **目的** 分析托珠单抗治疗新生儿坏死性小肠结肠炎的临床疗效。**方法** 本研究选取 2018 年 2 月至 2020 年 2 月期间内于本院接受治疗的 76 例新生儿坏死性小肠结肠炎患儿作为研究对象,分为治疗组和对照组,两组患儿均接受常规治疗,治疗组在常规治疗基础上联合托珠单抗治疗,对比两组患儿的临床疗效、胃肠道功能恢复情况及治疗前后的炎症因子水平。**结果** 治疗组的总有效率为 94.74%,明显优于对照组的 73.68%,差异有统计学意义($P<0.05$);治疗组的胃肠功能恢复情况明显优于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);两组患儿治疗前的各项炎症因子表达水平相比,差异无统计学意义($P>0.05$),两组患儿治疗后的各项炎症因子水平均低于治疗前,差异有统计学意义($P<0.05$),且治疗组的炎症因子水平明显低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 托珠单抗可以有效改善新生儿坏死性小肠结肠炎患儿的临床症状,缩短患儿的胃肠道功能恢复时间,降低患儿的炎症因子表达水平。其治疗坏死性小肠结肠炎的疗效确切,宜广泛应用和推广。

【关键词】 托珠单抗;新生儿坏死性小肠结肠炎;白细胞介素-6;炎症因子

Clinical analysis of tocilizumab in the treatment of 76 cases of neonatal necrotizing enterocolitis

LIN Mingjing, FENG Qiong, LIN Hong, LI Chunlei*

(Department of Neonatology, Hainan Provincial People's Hospital, Haikou, Hainan, China, 570311)

【ABSTRACT】 **Objective** To analyze the clinical efficacy of tocilizumab in the treatment of neonatal necrotizing enterocolitis. **Methods** In this study, 76 children with neonatal necrotizing enterocolitis who were treated in our hospital from February 2018 to February 2020 were selected as the research objects. They were divided into a treatment group and a control group. After receiving conventional treatment, the treatment group was combined with tocilizumab treatment based on conventional treatment. The clinical efficacy, gastrointestinal function recovery and inflammatory factor levels before and after treatment were compared between the two groups. **Results** The total effective rate of the treatment group was 94.74%, which was significantly better than 73.68% of the control group. The difference was statistically significant ($P<0.05$). The recovery of gastrointestinal function in the treatment group was significantly better than that in the control group, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). There was no significant difference in the expression levels of various inflammatory factors before treatment between the two groups of children ($P>0.05$), and the levels of various inflammatory factors after treatment in the two groups were lower than before treatment. The difference was statistically significant ($P<0.05$). The levels of inflammatory factors in the treatment group was significantly lower than those in the control group, the difference was statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** Tocilizumab can effectively improve the clinical symptoms of children with neonatal necrotizing enterocolitis, shorten the recovery time of gastrointestinal function, and reduce the expression of inflammatory factors in children. The curative effect of its treatment of necrotizing enterocolitis is definite, and it should be widely used and promoted.

【KEY WORDS】 Tocilizumab; Neonatal necrotizing enterocolitis; Interleukin-6; Inflammatory factor

基金项目:海口市重点科技计划项目(2014-068)

作者单位:海南省人民医院新生儿科,海南,海口 570311

*通信作者:李春蕾, E-mail: jidanhua_et@163.com

坏死性小肠结肠炎属于临床中常见的新生儿疾病,严重时会导致患儿出现肠穿孔,甚至诱发死亡,近年来在临床中的发病率相对较高,严重威胁患儿的身体健康^[1]。白细胞介素-6(Interleukin, IL-6)主要由机体的T细胞和单核细胞分泌,随着近年来炎症因子在各类疾病发生和进展研究的逐渐增多,有研究发现IL-6可以促进中性细胞的聚集和活化,可以反映出机体炎症和组织的损伤情况^[2]。托珠单抗(Tocilizumab, TCZ)是重组人源化抗IL-6受体单克隆抗体,2013年经批准在国内上市后,被广泛应用于类风湿关节炎当中,并发挥出了较好的临床疗效^[3]。最新研究发现,坏死性小肠结肠炎患儿的肠组织炎症细胞因子表达水平显著升高,而大量的炎性细胞因子也会增加肠上皮细胞的损伤,影响机体的肠粘膜防御机制,加重坏死性小肠结肠炎^[4]。然而,临床中却尚无针对托珠单抗治疗坏死性小肠结肠炎的临床研究。基于此,本研究针对托珠单抗在坏死性小肠结肠炎治疗中的应用效果进行了分析,以期对坏死性小肠结肠炎的临床治疗提供依据,现将报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

本研究选取了2018年2月至2020年2月期间内于本院接受治疗的76例新生儿坏死性小肠结肠炎患儿作为研究对象,利用抽样法分为治疗组和对照组。治疗组38例,男21例,女17例,胎龄平均(32.34±4.77)周,出生时体质量950~3 400 g,平均体质量(2250±483)g;对照组38例,男24例,女14例,胎龄平均(33.03±5.12)周,出生时平均体质量(2230±467)g。纳入标准:①经检查后均符合坏死性小肠结肠炎的诊断标准^[5];②患儿家属签署了知情同意书;③经伦理委员会批准;④无肠穿孔等其他并发症可接受常规保守治疗。排除标准:①对本次研究药物过敏者;②先天性心脏病患儿;③合并严重肺部疾病患儿;④合并代谢性疾病患儿;⑤经临床评估后须接受手术治疗或经保守治疗无效者。两组患儿基线资料均衡可比,差异无统计学意义($P>0.05$)。

1.2 方法

两组患儿经评估后均符合常规禁食治疗的指征,因此采用常规保守治疗:绝对禁食进行胃肠道减压,通过肠外营养支持的方式保证患儿体内水电解质平衡,密切观察患儿的症状变化,加强对患

儿的抗感染治疗。治疗组患儿在此基础上使用托珠单抗注射液(瑞士Roche Pharma公司,批准文号:S20171026)进行治疗,每次的治疗剂量为12 mg/kg,将药物溶于浓度为0.9%的氯化钠注射液100 mL内,采取静脉滴注的方式进行治疗,每次治疗间隔2周,连续治疗12周。

1.3 观察指标

①对比两组患儿的临床疗效,疗效判定标准参照《儿科疾病诊断与疗效标准》^[6],显效:患儿呕吐、腹胀等症状消失,粪便隐血试验检查结果为阴性,可进行母乳喂养;有效:患儿临床症状有明显改善,粪便隐血试验检查结果为阴性,但尚未进行母乳喂养;无效:患儿临床症状未改善。总有效率=显效率+有效率。②记录两组患儿的胃肠道功能恢复情况,包括腹泻缓解时间、腹胀缓解时间和排便缓解时间。③分别于治疗前后抽取患儿的空腹静脉血5 mL,离心15 min后取上清,放置于-20℃的条件下保存,使用酶联免疫吸附法对患儿的炎症因子表达水平进行检测,检测仪器为日本日立全自动生化分析仪,检测试剂盒均购进于美国Sigma公司,检测指标包括IL-6、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和C反应蛋白(CRP)。

1.4 统计学处理

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;计量资料以 $(\bar{x}\pm s)$ 表示,组间比较采用独立样本 t 检验,治疗前后比较采用配对 t 检验; $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患儿的疗效比较

治疗组的疗效明显优于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表1。

表1 两组患儿的疗效比较 [$n(\%)$]

Table 1 Comparison of curative effect between two groups of children [$n(\%)$]

组别	N值	临床疗效			总有效率
		显效	有效	无效	
治疗组	38	25(65.79)	11(28.95)	2(5.26)	36(94.74)
对照组	38	21(55.26)	7(18.42)	10(26.32)	28(73.68)
χ^2 值		0.881	1.165	6.333	6.333
P 值		0.348	0.280	0.012	0.012

2.2 两组患儿的胃肠功能恢复情况比较

治疗组的胃肠功能恢复情况明显优于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表2。

表2 两组患儿的胃肠功能恢复情况比较 ($\bar{x} \pm s$)Table 2 Comparison of the recovery of gastrointestinal function between 2 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	腹泻缓解时间(d)	腹胀缓解时间(d)	排便缓解时间(d)
治疗组	38	1.55±0.42	1.63±0.55	2.57±0.67
对照组	38	2.49±0.77	2.53±0.49	3.73±0.84
<i>t</i> 值		8.103	7.545	6.825
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001

2.3 两组患儿治疗前后炎症因子表达水平比较

两组患儿治疗前的各项炎症因子表达水平比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。两组患儿治疗后的各项炎症因子水平均低于治疗前,差异有统计学意义($P<0.05$),且治疗组的炎症因子水平明显低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表3。

3 讨论

坏死性小肠结肠炎是新生儿常见的疾病类型,多见于早产儿,由于早产儿的胃肠道功能和免疫功能均相对较差,因此胃肠道黏膜较易受损,受到感染后诱发坏死性小肠结肠炎^[6]。有研究发现新生儿病房中坏死性小肠结肠炎的发病率为5.6%,且近年来逐年上升^[7]。患儿早期主要表现为喂养不耐受或便血,但由于疾病进展速度较快,因此患儿的死亡率较高,重症患儿需要接受手术治疗,且患儿术后的并发症发生率较高^[8]。临床中,坏死性小肠结肠炎多见于30~31周的早产儿,有研究发现坏死性小肠结肠炎中早产儿的比例可达到90%以上^[9]。目前,临床中针对坏死性小肠结肠炎患儿的治疗根据病情的严重程度可分为药物治疗和手术治疗两种方案,其中有30%~50%的患儿仍以外科治疗为主,但外科治疗不仅存在较大的手术风险,患儿治疗后的并发症发生率也相对较高,不利于患儿的身体健康恢复^[10]。因此,临床中急需一种有效的坏死性小肠结肠炎治疗药物。

国内相关报道通过对坏死性小肠结肠炎患儿炎症因子指标的检测,发现患儿治疗前的IL-6表达水平显著升高,而接受治疗后IL-6表达水平也逐渐降低,说明IL-6的过表达与坏死性小肠结肠炎的发生和进展密切相关^[11]。IL-6是临床中常见的促炎因子,可以有效刺激T细胞淋巴的增殖,同时诱导B细胞的增殖分化,进而诱发机体出现免疫损伤,与多种疾病的发生密切相关^[12]。近年来有关坏死性小肠结肠炎的临床研究和动物研究均发现坏死性小肠结肠炎在发生时,体内的IL-6水平显著升高,提示IL-6与疾病的发生和进展密切相关^[13-14]。因此,通过阻断IL-6的作用也成为了目前治疗坏死性小肠结肠炎的新方法。托珠单抗作为一种新型生物制剂,可以有效实现与IL-6受体的结合,进而阻断IL-6及其受体复合物的形成,抑制机体的IL-6表达水平^[15-16]。然而,目前临床中尚无针对托珠单抗治疗坏死性小肠结肠炎的临床研究。

IL-6可以诱导其他炎症因子的产生和释放,托珠单抗作为一种抗IL-6受体抗体,其可以抑制患儿体内的IL-6表达水平,抑制了IL-6对其他炎症因子所产生的诱导作用,进而发挥出了较好的临床疗效。而通过对两组患儿治疗前后的炎症因子表达水平对比,治疗组的炎症因子表达水平相对较低,主要是因为托珠单抗可以选择性的与跨模型和可溶性IL-6受体相结合,竞争性的对IL-6和IL-6受体的结合产生抑制作用,通过对细胞内信号转导通路的阻断,减少患儿TNF- α 和CRP等炎症因子的生成^[17],进一步证实了托珠单抗可以有效应用于坏死性小肠结肠炎患儿的治疗中,且疗效确切。

综上所述,托珠单抗可以有效改善坏死性小肠结肠炎患儿的临床症状,缩短患儿的胃肠道功能恢复时间,降低患儿的炎症因子表达水平,治疗坏死性小肠结肠炎的疗效确切,宜广泛应用。

表3 两组患儿治疗前后炎症因子表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)Table 3 Comparison of the expression levels of inflammatory factors between the two groups of children before and after treatment ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	治疗前			治疗后		
		IL-6(ng/L)	TNF- α (ng/L)	CRP(mg/L)	IL-6(ng/L)	TNF- α (ng/L)	CRP(mg/L)
治疗组	38	15.58±2.57	93.55±12.39	21.13±3.98	6.03±1.15 ^a	56.83±8.51 ^a	3.32±0.85 ^a
对照组	38	15.31±2.34	94.21±15.57	21.46±4.29	10.44±2.34 ^a	72.34±10.17 ^a	8.47±2.44 ^a
<i>t</i> 值		0.587	0.724	0.663	6.729	22.356	8.314
<i>P</i> 值		0.562	0.475	0.512	<0.001	<0.001	<0.001

注:与治疗前相比,^a $P<0.05$ 。

参考文献

- [1] Zhang H, Wang Y, Li SX, et al. SOCS3 protects against neonatal necrotizing enterocolitis via suppressing NLRP3 and AIM2 inflammasome activation and p65 nuclear translocation [J]. *Mol Immunol*, 2020, 122:21-27.
- [2] 吴俊学,李毓灵,陈路. 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[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2020, 12(9):1167-1170.
- [3] 方钰,彭媛媛,李莎,等. 甲氨蝶呤联合托珠单抗对幼年特发性关节炎患儿免疫功能的影响及疗效分析[J]. *山西医药杂志*, 2020, 49(13):1644-1647.
- [4] 周丽,林振浪. 促红细胞生成素对新生儿坏死性小肠结肠炎的炎症干预研究[J]. *中华全科医学*, 2019, 17(8):1340-1343.
- [5] Hall NJ, Eaton S, Pierro A. Royal Australasia of Surgeons Guest Lecture. Necrotizing enterocolitis: prevention, treatment, and outcome[J]. *J Pediatr Surg*, 2013, 48(12):2359-2367.
- [6] 陈永红. 儿科疾病诊断与疗效标准[M]. 上海:上海中医药大学出版社, 2006.
- [7] Hansen ML, Jensen IV, Gregersen R, et al. Gastrointestinal sequelae and growth impairment at school age following necrotising enterocolitis in the newborn period [J]. *Acta Paediatr*, 2019, 108(10):1911-1917.
- [8] Gómez-Rodríguez G, Amador-Licona N, Daza-Benítez L, et al. Single strain versus multispecies probiotic on necrotizing enterocolitis and faecal IgA levels in very low birth weight preterm neonates; A randomized clinical trial [J]. *Pediatr Neonatol*, 2019, 60(5):564-569.
- [9] 孙景虎. 白细胞介素-6、白细胞介素-10在新生儿坏死性小肠结肠炎诊断的应用价值[J]. *福建医药杂志*, 2019, 41(5):51-54.
- [10] Wang KW, Tao GZ, Sylvester KG. Sylvester. Recent Advances in Prevention and Therapies for Clinical or Experimental Necrotizing Enterocolitis [J]. *Dig Dis Sci*, 2019, 64(11):3078-3085.
- [11] Robinson JR, Rellinger EJ, Hatch LD, et al. Surgical necrotizing enterocolitis [J]. *Semin Perinatol*, 2017, 41(1):70-79.
- [12] 罗厚忠,雷贤明,陈娟,等. 坏死肠道切除及肠道造瘘术治疗新生儿坏死性小肠结肠炎:附82例报告[J]. *中国普通外科杂志*, 2019, 28(4):507-511.
- [13] 郭璇,宋瑶,阿布拉提·阿不都哈尔. 肺炎支原体感染合并川崎病患儿血清IL-6、IL-8及IL-10水平与冠状动脉损伤的相关性[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2020, 12(8):1069-1072+1094.
- [14] 许白叶,王琦凡,庄婉珠,等. 输血相关性新生儿坏死性小肠结肠炎炎症因子水平分析[J]. *中国医师进修杂志*, 2017, 40(2):145-148.
- [15] Hirohata S, Abe A, Murasawa A, et al. Differential effects of IL-6 blockade tocilizumab and TNF inhibitors on angiogenesis in synovial tissues from patients with rheumatoid arthritis [J]. *Mod Rheumatol*, 2017, 27(5):766-772.
- [16] Nausheen A, Paolo C, Jane S, et al. Prophylactic Tocilizumab in Patients with Relapsed Refractory Lymphoma Treated with Anti CD19 Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy [J]. *Biol Blood Marrow Tr*, 2020, 26(3):S275-S276.
- [17] 陈兰芳,强孚勇,徐亮. 托珠单抗联合改善病情抗风湿药治疗中重度类风湿关节炎短期临床观察[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2018, 23(12):1386-1391.
- [11] 季兰岚,张卓莉. EULAR对患有系统性红斑狼疮伴或不伴抗磷脂综合征女性患者在计划生育、辅助生殖、妊娠及绝经期管理等方面的建议[J]. *中华临床免疫和变态反应杂志*, 2017, 11(2):192-194.
- [12] 刘树锋,张北平,王海,等. 106例系统性红斑狼疮患者T淋巴细胞亚群分析与疾病活动相关性研究[J]. *中外医学研究*, 2014, 18(18):45-46.
- [13] 张清,周惠琼,郭娟,等. 系统性红斑狼疮合并噬血细胞综合征、狼疮脑病、弥漫性肺泡出血及消化道出血一例救治体会[J]. *中华医学杂志*, 2018, 98(1):63-64.
- [14] 张缪佳,刘晓华,柯瑶,等. 系统性红斑狼疮患者亲环素A表达异常及其意义的初步探讨[J]. *中华风湿病学杂志*, 2005, 9(11):698-700.
- [15] 蔡茂文,张晶,周彬. 系统性红斑狼疮患者外周血T淋巴细胞亚群的临床分析[J]. *实用医院临床杂志*, 2013, 10(2):88-90.
- [16] 张缪佳,刘晓华,陈子庆,等. 系统性红斑狼疮患者血清抗亲环素A抗体检测的临床意义[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2003, 23(5):446-449.
- [17] Clowse MEB, Wallace DJ, Furie RA, et al. Efficacy and safety of epratuzumab in moderately to severely active systemic lupus erythematosus: results from two phase III randomized, double-blind, placebo-controlled trials [J]. *Arthr Rheumatol*, 2017, 69(2):362-375.
- [18] 梁军亮,侯俊丽,陈宏. 亲环素A mRNA在系统性红斑狼疮患者外周血中的表达[J]. *中国皮肤性病学期刊*, 2011, 25(3):196-198.
- [19] 夏江莉,刘永梅,陈学琴,等. 甲氨蝶呤联合硫酸羟氯喹与醋酸泼尼松对系统性红斑狼疮患者炎症反应、免疫功能及肝肾功能的影响[J]. *海南医学院学报*, 2017, 23(22):3081-3084.
- [20] 郝美华,景晓娜,梁赵云,等. 二甲双胍通过调节辅助性T细胞17和调节性T细胞平衡治疗系统性红斑狼疮的应用前景[J]. *中华风湿病学杂志*, 2018, 22(7):489-492.
- [21] Zhang F, Bae SC, Bass D, et al. A pivotal phase III, randomised, placebo-controlled study of belimumab in patients with systemic lupus erythematosus located in China, Japan and South Korea [J]. *Ann Rheum Dis*, 2018, 77(3):355-363.
- [22] Bengtsson AA, Rönnblom L. Systemic lupus erythematosus: still a challenge for physicians [J]. *J Int Med*, 2016, 281(1):52-64.

(上接第888页)

NLR、PLR、RDW 检测在结直肠癌诊断、预后评估中的研究

陈万臣 辛莘 郭雅丽 姚玉霞 郅大余 宋丽 徐宝宏*

[摘要] 目的 分析中性粒细胞计数与淋巴细胞计数比值(NLR)、血小板计数与淋巴细胞计数比值(PLR)及红细胞分布宽度(RDW)检测在结直肠癌诊断、预后评估中的应用。方法 收集本院2012年1月至2014年12月收治的120例结直肠癌患者设为结直肠癌组;另外收集行肠镜活检确诊为结直肠癌相关癌前病变者将其分为结直肠息肉组($n=25$)例、炎症性肠病组($n=28$)例;同时选取同期体检的132例正常者为正常对照组。比较NLR、PLR及RDW在各组间表达情况,计算不同检查对结直肠癌患者的诊断价值。记录结直肠癌患者在随访时间内预后生存情况,采用多元Logistic回归分析影响结直肠癌患者预后生存的危险因素。结果 结直肠癌组NLR、PLR及RDW水平明显高于结直肠息肉组、炎症性肠病组及正常对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。结直肠息肉组NLR、PLR及RDW水平与炎症性肠病组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。NLR、PLR及RDW三者联合(串联)的敏感性、准确性均高于任何指标单一检测,差异有统计学意义($P<0.05$)。Logistic回归模型分析显示:组织分型为低分化、TNM分期处于Ⅲ、Ⅳ期、有淋巴结转移、NLR、PLR及RDW水平异常升高表达为影响结直肠癌患者预后生存的危险因素($P<0.05$)。结论 NLR、PLR及RDW检测结直肠癌具有一定诊断价值,其水平变化与患者预后具有一定相关性,临床工作者加强对其指标检测,具有一定借鉴作用。

[关键词] NLR; PLR; RDW; 结直肠癌

Application of NLR, PLR and RDW detection in diagnosis and prognosis evaluation of colorectal cancer

CHEN Wanchen, XIN Xin, GUO Yali, YAO Yuxia, YING Dayu, SONG Li, XU Baohong*

(Department of Gastroenterology, Beijing Luhe hospital of Capital Medical University, Beijing, China, 101149)

[ABSTRACT] **Objective** To analyze the application of preoperative neutrophil to lymphocyte ratio (NLR), platelet to lymphocyte ratio (PLR) and red blood cell distribution width (RDW) detection in the diagnosis and prognosis evaluation of colorectal cancer. **Method** The 120 patients with colorectal cancer admitted to this hospital from January 2012 to December 2014 were collected as the colorectal cancer group. In addition, the patients who were diagnosed with colorectal cancer-related precancerous lesions by colonoscopy biopsy were divided into the colorectal polyp group ($n=25$), and the inflammatory bowel disease group ($n=28$). At the same time, 132 normal patients who received physical examination during the same period were selected as the normal control group. The expressions of NLR, PLR and RDW in each group were compared, and the values of different examinations in the diagnosis of colorectal cancer in patients were calculated. The prognostic survival of patients with colorectal cancer during the follow-up period was recorded, and multivariate logistic regression was used to analyze the risk factors that affect the prognosis survival of patients with colorectal

基金项目:北京市自然科学基金资助项目(7102179)

作者单位:首都医科大学附属北京潞河医院消化内科,北京 101149

*通信作者:徐宝宏, E-mail: bhxu22@ccmu.edu.cn

cancer. **Results** The levels of NLR, PLR and RDW in the colorectal cancer group were significantly higher than those in the colorectal polyp group, the inflammatory bowel disease group, and the normal control group. The differences were statistically significant ($P<0.05$). There were no significant differences in the NLR, PLR and RDW levels between the colorectal polyp group and the inflammatory bowel disease group ($P>0.05$). The sensitivity and accuracy of the combined detection of NLR, PLR and RDW levels (in series) were higher than those of any single detection, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). Logistic regression model analysis showed that poorly differentiated tissue classification, TNM staging in III and IV, lymph node metastasis, abnormal elevated levels of NLR, PLR and RDW are risk factors affecting the prognosis survival of patients with colorectal cancer ($P<0.05$). **Conclusion** The detection of NLR, PLR and RDW in colorectal cancer patients has a certain diagnostic value, and the level change in its level has a certain correlation with the patient's prognosis. Clinicians should strengthen the detection of those indicators, which can be used for reference.

[KEY WORDS] NLR; PLR; RDW; Colorectal cancer

结直肠癌是消化道常见的恶性肿瘤之一,目前结直肠癌发病率及死亡率显著升高,寻求有效的肿瘤标志物以提高该病诊断、疗效观察具有重要意义^[1]。近年来研究发现肿瘤相关炎性细胞可间接或直接作用于肿瘤,促进肿瘤血管的生成、细胞外基质的重塑及肿瘤转移^[2]。外周血中性粒细胞计数与淋巴细胞计数比值(Neutrophil to lymphocyte ratio, NLR)及血小板计数与淋巴细胞计数比值(Platelet to lymphocyte ratio, PLR)是观察全身炎症反应的指标,研究证实NLR、PLR与肿瘤侵袭、复发、转移、预后密切相关,对评估及检测机体抗肿瘤及促肿瘤的免疫反应具有重要作用^[3]。另相关学者已在多种恶性肿瘤患者中发现红细胞分布宽度(Red blood cell distribution width, RDW)存在异常^[4]。本研究就NLR、PLR及RDW检测在结直肠癌诊断、预后评估中的应用价值进行研究,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2012年1月至2014年12月本院收治的120例结直肠癌患者,将其设为结直肠癌组,男62例,女58例,年龄(65.82±5.54)岁。纳入标准:①所有患者均经病理学检查确诊,符合中国结直肠癌诊疗规范(2017年版)^[5]标准;②所有患者均未输血、在过去的2个月里无活动性出血、无出血素质、无甲状腺功能亢进或减退、无严重感染、无弥漫性血管内凝血、无肝素治疗。③2周内未服用抗炎药物、无吸烟及输血史、无急慢性感染、炎性反应、无血液病及自身免疫性疾病病史。④无发热病史。排除标准:①证明有维生素B12和叶酸缺乏者;②合并全身其他器官恶性肿瘤性疾病、心肺肝肾功能不全及应激反应者。

另外收集行肠镜活检确诊为结直肠癌相关癌前病变者将其分为结直肠息肉组($n=25$)、炎症性肠病组($n=28$),其中,结直肠息肉组男14例,女11例,年龄(65.21±5.64)岁;炎症性肠病组男16例,女12例,年龄(65.39±5.91)岁。同时选取132例同期本院接受健康体检且经癌胚抗原、CT、肠镜等检查显示结果正常者^[6]作为正常对照组。男性69例,女63例,年龄(65.16±5.49)岁。4组一般资料比较差异无统计学意义($P>0.05$)。所有研究对象均签署知情同意书,本研究已获得院伦理委员会批准。

1.2 检测方法

抽取所有研究对象空腹静脉血3 mL,受检者均禁食水12 h后采其静脉血,通过贝克曼库尔特LH-750全自动五分类血液分析仪检测RDW、外周血的白细胞计数、淋巴细胞计数、中性粒细胞计数和血小板计数,根据检测结果记录或计算同一时间点抽取的同一血液标本中中性粒细胞计数、血小板计数与淋巴细胞的比值分别得出NLR和PLR。严格按照说明书进行操作。

1.3 随访方法

根据患者纳入研究时间起,对患者通过电话、微信等方式进行为期6年随访,记录患者生存时间,截止于2020年12月。所有患者均统一随访时间。

1.4 诊断标准

NLR正常水平范围(1.51±0.90),当NLR水平超过2.41时即为异常升高。PLR正常水平范围(84.52±19.20),当NLR水平超过103.72时即为异常升高。RDW正常水平范围:(10.03±2.55)fL,当NLR水平超过12.58fL时即为异常升高。

1.5 统计学方法

采用SPSS 22.0软件进行统计分析,计数资料

以 $n(\%)$ 表示, 采用 χ^2 检验, 计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 组间采用 t 检验; 多组间行 F 检验; 采用多元 Logistic 回归分析影响结直肠癌患者预后生存的危险因素, 以 $P < 0.05$ 为差异具统计学意义。

2 结果

2.1 NLR、PLR 及 RDW 检测在各组的表达情况

结直肠癌组 NLR、PLR 及 RDW 水平明显高于结直肠息肉组、炎症性肠病组及正常对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结直肠息肉组 NLR、PLR 及 RDW 水平与炎症性肠病组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 NLR、PLR 及 RDW 检测在各组的表达情况比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	NLR	PLR	RDW (fL)
结直肠癌组	120	4.84±2.43 ^a	168.54±64.82 ^a	16.42±3.84 ^a
结直肠息肉组	25	2.68±1.96 ^{abc}	129.06±45.13 ^{abc}	14.77±3.01 ^{abc}
炎症性肠病组	28	2.71±1.84 ^{ab}	124.16±47.82 ^{ab}	14.62±3.05 ^{ab}
正常对照组	132	1.51±0.90 ^b	84.52±19.20 ^b	10.03±2.55 ^b
<i>F</i> 值		71.18	67.64	87.49
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001

注: 与对照组比较 ^a $P < 0.05$, 与结直肠癌组比较 ^b $P < 0.05$, 结直肠息肉组与炎症性肠病组比较 ^c $P > 0.05$ 。

2.2 NLR、PLR 及 RDW 单独及联合检测诊断结直肠癌患者的诊断价值

NLR、PLR 及 RDW 三者联合 (串联) 的敏感性、准确性均高于任何指标单一检测, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 NLR、PLR 及 RDW 单独及联合检测诊断结直肠癌患者的诊断价值 [$n(\%)$]

检查方法	病理诊断		敏感性 (%)	特异性 (%)	准确性 (%)
	良性	恶性			
NLR	37(69.81)	84(70.00)	70.00 ^a	69.81	69.94 ^a
PLR	41(77.35)	87(72.50)	72.50 ^a	77.35	73.98 ^a
RDW	39(73.58)	82(68.33)	68.33 ^a	73.58	69.94 ^a
NLR+PLR+RDW	45(84.90)	109(90.83)	90.83	84.90	89.01
χ^2 值			13.548	1.172	12.960
<i>P</i> 值			0.004	0.760	0.005

注: ^a与 NLR+PLR+RDW 比较, $P < 0.05$ 。

2.3 120 例结直肠癌患者预后情况

对 120 例结直肠癌患者进行 6 年随访显示, 生存率为 55.83% (67/120)。

2.4 分析影响结直肠癌患者预后生存的单因素

患者年龄、性别、部位、病理类型非影响患者

预后生存的相关危险因素 ($P > 0.05$), 组织分型、TNM 分期、淋巴结转移、NLR、PLR、RDW 表达为影响患者预后生存的相关危险因素 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 影响结直肠癌患者预后生存的单因素分析

Table 3 univariate analysis of prognostic factors in patients with colorectal cancer

变量	<i>n</i>	生存者	死亡者	χ^2/t 值	<i>P</i> 值
性别	男	62 36(53.73)	26(49.05)	0.259	0.611
	女	58 31(46.26)	27(50.94)		
年龄	<65	69 39(58.20)	30(56.60)	0.031	0.860
	≥65	51 28(41.79)	23(43.39)		
组织分型	低分化	21 2(2.98)	19(35.84)	22.137	<0.001
	高、中分化	99 65(97.01)	34(64.15)		
	直肠	37 21(31.34)	16(30.18)		
	升结肠	33 19(28.35)	14(26.41)		
部位	乙状结肠	23 12(17.91)	11(20.75)	2.434	0.657
	降结肠	11 6(8.95)	5(9.43)		
	其他	16 9(13.43)	7(13.20)		
	腺癌	116 65(97.01)	51(96.22)		
	其他(印戒细胞癌、管状腺癌、高级别上皮内肿瘤)	4 2(2.98)	2(3.77)		
TNM 分期	I、II	15 12(17.91)	3(5.66)	4.060	0.044
	III、IV	105 55(20.89)	50(94.33)		
淋巴结转移	是	53 4(5.97)	49(92.45)	89.751	<0.001
	否	67 63(94.02)	4(7.54)		
NLR		2.98±0.57	5.03±1.25	11.953	<0.001
PLR		106.26±2.54	182.33±34.67	17.918	<0.001
RDW (fL)		13.97±1.39	17.21±2.18	9.891	<0.001

2.5 分析影响结直肠癌患者预后生存的多因素

组织分型为低分化、TNM 分期处于 III、IV 期、有淋巴结转移、NLR、PLR 及 RDW 水平异常升高表达为影响结直肠癌患者预后生存的危险因素 ($P < 0.05$)。见表 4。

表 4 Logistic 多因素回归分析

Table 4 multivariate logistic regression analysis

影响因素	<i>B</i> 值	<i>SE</i>	Wald χ^2 值	OR 值	95%CI	<i>P</i> 值
组织分型: 低分化	0.915	0.205	21.344	2.49	1.67~3.73	<0.001
TNM 分期: III、IV	1.593	0.417	12.286	4.91	2.17~11.13	<0.001
有淋巴结转移	0.502	0.125	19.534	1.65	1.29~2.11	<0.001
NLR: 异常升高	0.418	0.122	14.726	1.51	1.19~1.92	<0.001
PLR: 异常升高	0.712	0.314	21.546	2.03	1.10~3.77	<0.001
RDW: 异常升高	0.725	0.145	19.415	2.06	1.55~2.74	<0.001

3 讨论

据我国国家癌症中心最新数据显示, 结直肠癌居我国恶性肿瘤发病率第三位, 死亡率第五位^[2], 故及时明确诊断并进行预后改善是目前临床

上的研究热点。

目前较多研究证实炎症指标如NLR、PLR等在多种实体肿瘤的预后中具有重要价值,被认为是可用于监测和评估全身炎症反应的可靠参数^[7]。本研究对结直肠癌术前进行检测NLR、PLR及RDW水平发现,联合检测的敏感性、准确性均高于单一检测,具体原因分析如下:NLR是中性粒细胞和淋巴细胞比值,其中中性粒细胞是炎症反应的有效指标,而淋巴细胞作为免疫细胞的代表,在一定程度上用来反映机体免疫状态;故检测NLR对监测及评估机体抗肿瘤及促肿瘤免疫之间的动态平衡具有重要意义^[8]。PLR是血小板计数与淋巴细胞计数比值,相关研究发现,血小板可分泌P选择素黏附因子,促使炎症及内皮细胞致密黏附;另外,血小板还可分泌血管内皮生长因子,诱导内皮细胞增殖、迁移,增加组织血管通透性,便于肿瘤细胞穿透机体血管发生侵袭、转移^[9-10]。RDW是反映外周血中红细胞体积异质性的参数,也就是反映红细胞大小是否均匀的指标。当机体出现炎症反应时,会损害网状内皮巨噬细胞功能,抑制红细胞生成素,影响红细胞存活^[11]。大量文献表示,单独检测NLR、PLR水平易受多种因素影响,特异性、灵敏性不强^[12]。因此,联合检测对诊断结直肠癌具有重要意义。

近年来,相关研究发现,RDW在食管鳞状细胞癌、肺癌、肾细胞癌及乳腺癌等多种实体癌中呈高表达状态,并且与实体瘤预后密切相关^[13]。Liu等^[14]研究指出,NLR、PLR与肿瘤存在一定相关性,NLR水平升高,机体的中性粒细胞数量增多,淋巴细胞数量变少,机体免疫失去平衡,肿瘤增殖、转移增加,预后不良性高。本研究结果说明NLR、PLR及RDW水平与结直肠癌患者联系密切。多因素Logistic回归分析显示,NLR、PLR及RDW水平是影响结直肠癌患者预后生存的独立危险因素。考虑其原因与肿瘤相关炎症反映及免疫应答有关,在肿瘤状态下,中性粒细胞呈N2型,通过分泌血管内皮生长因子、基质金属蛋白酶等抑制肿瘤细胞凋亡,促肿瘤血管产生,加速肿瘤进展;而淋巴细胞作为肿瘤免疫作用执行细胞,发挥特异性的细胞毒效应诱导靶细胞凋亡;此外,血小板聚集增加可通过免疫系统促进肿瘤生长,三者协同作用,共同参与肿瘤的进展^[15]。

综上所述,NLR、PLR及RDW检测结直肠癌具有一定诊断价值,其水平变化与患者预后具有一定

相关性,临床工作者加强对其指标检测,具有一定借鉴作用。

参考文献

- [1] 杨宜歆,滕青华,时磊. FOLFOX和FOLFIRI化疗方案治疗转移性结直肠癌的成本-效果分析[J]. 保健医学研究与实践, 2018, 15(6):42-46.
- [2] 邓嘉文,房静远. 锯齿状结直肠癌的癌变途径和临床特点[J]. 中华医学杂志, 2020, 100(34):2716-2720.
- [3] 洪文斌,胡竑麟. NLR、PLR在甲状腺良恶性结节及自身免疫性甲状腺炎诊断中的应用价值[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(05):643-646+655.
- [4] Ran Z, Ruihua S. Diagnostic Value of Peripheral Blood NLR and PLR in Gastrointestinal Pancreatic Neuroendocrine Neoplasm[J]. Can Res Prevent Treatm, 2019, 12(3):305-309.
- [5] 顾晋,汪建平,孙燕,等. 中国结直肠癌诊疗规范(2017年版)[J]. 中华外科杂志, 2018, 12(1):3-23.
- [6] 史祚秀,冯杰,刘洋,等. 结直肠癌患者血浆代谢物水平研究[J]. 中国现代医学杂志, 2020, 30(24):41-46.
- [7] 陈颖,贾静,林露,等. 结、直肠癌患者术前NLR、PLR及RDW值的比较分析[C]//中华医学会肿瘤学分会. 中国抗癌协会, 2014.
- [8] Lago NM, Marta CR, Vazquez EB, et al. The prognostic value of systemic inflammatory factors in BRAF (V600E) mutant metastatic colorectal cancer (mCRC) [J]. J Clin Oncol, 2019, 37(4):622-622.
- [9] 张彦斌,刘月,张辉,等. 结直肠癌肿瘤中心区和边缘区淋巴管生成的临床意义[J]. 中华普通外科杂志, 2020, 35(8):612-615.
- [10] Fang T, Wang Y, Yin X, et al. Diagnostic Sensitivity of NLR and PLR in Early Diagnosis of Gastric Cancer[J]. J Immun Res, 2020, 20(5):1-9.
- [11] Chen Q, Wu H, Guo X, et al. The Change of Systemic Immune-Inflammation Index Independently Predicts Survival of Colorectal Cancer Patients after Curative Resection [J]. Med Inflamm, 2020, 20(5):1-8.
- [12] Yang S, Wu C, Wang L, et al. Pretreatment inflammatory indexes as prognostic predictors for survival in osteosarcoma patients[J]. Intern J Clin Exp Pathol, 2020, 13(3):182-185.
- [13] Scialo F. Adiponectin is Associated with Neutrophils to Lymphocyte Ratio in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease [J]. COPD J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2020, 16(8):346-349.
- [14] Liu H C, Gao YL, Li DF, et al. Value of Xpert MTB/RIF Using Bronchoalveolar Lavage Fluid for the Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis: A Systematic Review and Meta-Analysis[J]. J Clin Microbiol, 2020, 15(3):372-378.
- [15] Flores CJ, Aguilar A, Mas L, et al. P2.16-24 Prognostic Value of RDW, NLR and CYFRA 21-1 in Overall Survival of Patients with Metastatic NSCLC [J]. J Thor Oncol, 2019, 14(10):875.

经皮椎间孔镜治疗对腰椎间盘突出症患者细胞因子水平的影响

张强泽* 亓佳慧 谢学生 秦飞 亓强

[摘要] **目的** 分析经皮椎间孔镜治疗对腰椎间盘突出症患者细胞因子水平的影响。**方法** 选取2017年12月至2020年10月本院收治的112例腰椎间盘突出症患者,根据医嘱中的手术方式不同分为对照组(传统椎板开窗术治疗)和实验组(经皮椎间孔镜治疗)各56例,另选取60例同期于本院接受健康体检人群作为健康组,比较不同人群间活性氧簇(ROS)、丙二醛(MDA)、髓过氧化物酶(MPO)等应激指标和血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素6(IL-6)以及白介素-1(IL-1)等炎性因子水平,并比较对照组和实验组术后临床疗效、应激指标、炎性因子水平及并发症情况。**结果** 健康组ROS、MDA、MPO等应激指标及TNF- α 、IL-1、IL-6等炎性因子水平均低于对照组和实验组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。术后两组ROS、MDA、MPO水平及TNF- α 、IL-1、IL-6水平较术前均有明显下降,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。对照组临床总疗效(87.50%)低于实验组临床总疗效(98.21%),差异有统计学意义($P < 0.05$)。对照组并发症率为10.71%,实验组并发症率为8.93%,比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 经皮椎间孔镜手术疗效佳,可降低腰椎间盘突出症患者的应激水平及炎症水平,且术后无严重并发症出现,安全性高,值得推广应用。

[关键词] 腰椎间盘突出症; ROS; MDA; MPO

Effect of percutaneous transforaminal endoscopic discectomy on cytokine levels of patients with lumbar intervertebral disc protrusion

ZHANG Qiangze*, QI Jiahui, XIE Xuesheng, QIN Fei, QI Qiang

(Department of Pain, Jinan People's Hospital, Shandong First Medical University, Jinan, Shandong, China, 271100)

[ABSTRACT] **Objective** To analyze the effect of percutaneous transforaminal endoscopic discectomy on the cytokine levels of patients with lumbar intervertebral disc protrusion. **Method** 112 patients with lumbar intervertebral disc protrusion treated in this hospital from December 2017 to October 2020 were selected. According to different surgical methods in the doctor's order, they were divided into the control group (traditional laminectomy treatment) and the experimental group (percutaneous transforaminal endoscopic discectomy), 56 cases in each group. In addition, 60 healthy people who had health examinations in this hospital during the same period were selected as the healthy group. The stress indicators [reactive oxygen species (ROS), malondialdehyde (MDA), myeloperoxidase (MPO)] and inflammatory factor levels [serum tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin 6 (IL-6) and interleukin-1 (IL-1)] between different groups were compared. The clinical efficacy, stress indicators, inflammatory factor levels and complications were compared between the control group and the experimental group. **Result** The levels of inflammatory factors such as TNF- α , IL-1, IL-6 and stress indicators such as ROS, MDA and MPO in the healthy group were lower than those in the control group and the experimental group, and the difference was statistically significant ($P <$

基金项目:山东省青年科学家基金(BS2017YY025)

作者单位:山东第一医科大学附属济南人民医院疼痛科,山东,济南 271100

*通信作者:张强泽, E-mail: yang751756hu1513@163.com

0.05). The levels of ROS, MDA, MPO and TNF- α , IL-1, and IL-6 in the 2 groups after surgery significantly decreased, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Among them, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The total clinical efficacy of the control group (87.50%) was lower than that (98.21%) in the experimental group, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The incidence of complications in the control group was 10.71% and that in the experimental group was 8.93%. There was no statistical difference in the incidence of complications between the two groups ($P > 0.05$). **Conclusion** Percutaneous transforaminal endoscopic discectomy has a good effect, can reduce the stress level and the levels of inflammatory factors in patients with lumbar intervertebral disc protrusion. And there are no serious complications after the operation, and the safety is high, and it is worthy of promotion and application.

[KEY WORDS] Lumbar intervertebral disc protrusion; ROS; MDA; MPO

腰椎间盘突出症是常见的脊柱退行性疾病,因腰椎间盘突出出现退行性改变或外力造成纤维环破裂和髓核脱出,刺激压迫神经组织导致患者出现疼痛等症状^[1-2]。多数患者刚开始为腰部疼痛,但随着疾病进展会出现行走困难等障碍^[3]。目前,临床上主要采取经皮椎间孔镜治疗,帮助患者恢复部分腰椎功能。据研究报道,腰椎间盘突出症患者发病同时机体内的细胞因子水平也产生了变化,其中氧化应激炎性因子在腰椎间盘突出等疾病发病中发挥着重要作用^[4]。本研究就经皮椎间孔镜治疗对腰椎间盘突出症患者细胞因子水平的影响进行分析,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2017年12月至2020年10月本院收治的112例腰椎间盘突出症患者。纳入标准:①经检查确诊为腰椎间盘突出症者^[5];②保守治疗无效者;③腰椎间盘高度 \geq 原高度50%,直腿抬高试验 $<30^\circ$ 者^[6]。排除标准:①有血液系统、恶性肿瘤者;②有其他腰椎疾病者;③有精神障碍者;④有感染、免疫性疾病者。根据医嘱中的手术方式不同分为对照组(传统椎板开窗术治疗)和实验组(经皮椎间孔镜治疗)各56例。对照组男38例,女18例;年龄平均 (40.36 ± 3.52) 岁。实验组男39例,女17例;年龄平均 (39.64 ± 3.21) 岁。另选取60例同期于本院接受健康体检的健康人群作为健康组,其中男40例,女20例;年龄平均 (41.32 ± 3.09) 岁。三组基线资料比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。本研究经医院伦理委员会批准通过,受试者均签署知情同意书。

1.2 方法

对照组采用传统椎板开窗术治疗,步骤如下:患者取俯卧位,将腹部垫空,使用气管插管进行全

身麻醉,在C臂X线机下定位病变腰椎间隙,手术常规消毒铺巾后,操作者在患者后路正中棘突旁一4~6 cm小切口,逐层切开背部组织,显露并观察椎板及病变椎间隙,取出残留髓核组织,常规放置脂肪块及引流管,逐层缝合伤口。

实验组采用经皮椎间孔镜治疗:患者同取俯卧位,腹部稍后突,常规手术消毒铺巾,在C臂X线机下透视定位穿刺点,进行局部麻醉后将5~15 mL亚甲蓝(生产厂家:济川药业集团有限公司;规格:2 mL;国药准字:H20083164)造影剂注入,围绕导针打开切口,保护出口神经根,将工作套管和椎间孔镜置入椎间孔中,观察椎间盘病变部位,使用髓核钳取出蓝染病变髓核,清除多余组织,观察有无神经根管狭窄等情况,采用射频热凝法止血,取出工作套管,缝合伤口。

术后两组患者均需接受抗感染、营养神经等对症支持治疗,对照组引流管在48 h后拔除。

1.3 观察指标

1.3.1 应激指标

采用钼酸铵法测定血清中活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)含量,采用硫代巴比妥酸法测定丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量,采用过氧化氢还原法测定髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)活性。

1.3.2 炎性因子

采用酶联免疫吸附试验测定^[7]血清肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白介素6(Interleukin-6, IL-6)以及白介素-1(Interleukin-1, IL-1),在患者入院第1天及术后1个月抽取其静脉血5 mL,3 000 r/min离心,10 min后分离血清,置于 -80°C 低温保存待检。所有试剂盒均由上海莱生物科技有限公司提供,相关操作严格按照试剂盒说明书进行。

1.3.3 疗效判定^[8]

各指标达到正常范围,直腿抬高试验>70%者为治愈;各指标基本恢复至正常范围,直腿抬高试验60%~70%者为显效;各指标较术前改善,直腿抬高试验50%~60%者为有效;各指标较前无变化,直腿抬高试验无改善者为无效。总有效率=(治愈+显效+有效)/总例数×100%。

并发症:包括感染、神经功能短暂性缺失、神经损伤、血管损伤等。

1.4 统计学方法

采用SPSS 22.0软件进行统计分析,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,采用*t*检验;计数资料以*n*(%)表示,采用 χ^2 检验;以*P*<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同人群间炎症因子及应激指标比较

健康组 TNF- α 、IL-1、IL-6 等炎症因子及 ROS、MDA、MPO 等应激指标均低于对照组和实验组,

差异均有统计学意义(*P*<0.05)。见表1。

2.2 两组患者应激指标比较

术前两组 ROS、MDA 及 MPO 比较差异无统计学意义(*P*>0.05)。术后两组 ROS、MDA 及 MPO 水平低于治疗前,差异均有统计学意义(*P*<0.05)。见表2。

2.3 两组患者炎症因子比较

术前两组患者 TNF- α 、IL-1、IL-6 等炎症因子的水平比较差异无统计学意义(*P*>0.05),术后两组 TNF- α 、IL-1、IL-6 等炎症因子的水平较术前明显下降,差异均有统计学意义(*P*<0.05),见表3。

2.4 临床疗效

对照组临床总有效率低于实验组临床总有效率,差异有统计学意义(*P*<0.05)。见表4。

2.5 并发症

对照组并发症率与实验组并发症率比较差异无统计学意义(*P*>0.05)。见表5。

表1 不同人群间炎症因子及应激指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of inflammatory factors and stress indexes among different populations ($\bar{x} \pm s$)

分组	<i>n</i>	炎症因子			应激指标		
		TNF- α (pg/mL)	IL-1(pg/mL)	IL-6(ng/mL)	ROS(μ mol/L)	MDA(μ mol/L)	MPO(ng/mL)
对照组	56	60.12±13.26 ^{ab}	78.59±9.07 ^{ab}	1.94±0.28 ^{ab}	646.42±9.85 ^{ab}	9.48±0.29 ^{ab}	4.59±0.27 ^{ab}
实验组	56	59.36±13.36 ^a	78.86±8.96 ^a	1.96±0.30 ^a	647.37±9.87 ^a	9.41±0.26 ^a	4.49±0.59 ^a
健康组	60	15.29±9.48	17.55±5.10	0.51±0.06	100.16±5.96	3.33±0.18	1.39±0.58
<i>F</i> 值	-	263.18	1179.54	1591.44	1775.48	2039.03	7692.32
<i>P</i> 值	-	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与健康组相比,^a*P*<0.05;与实验组相比,^b*P*<0.05。

表2 两组患者 ROS、MDA 及 MPO 比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of ROS, MDA and MPO between 2 groups before and after operation ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	ROS(μ mol/L)		MDA(μ mol/L)		MPO(ng/mL)	
		术前	术后	术前	术后	术前	术后
对照组	56	646.42±9.85	425.22±10.59 ^a	9.48±0.29	7.03±0.16 ^a	4.59±0.27	2.59±0.12 ^a
实验组	56	647.37±9.87	267.15±10.19 ^a	9.41±0.26	4.37±0.21 ^a	4.49±0.59	1.47±0.63 ^a
<i>t</i> 值	-	0.510	80.488	1.345	75.398	1.153	13.069
<i>P</i> 值	-	0.611	0.001	0.181	0.001	0.251	0.001

注:与同组术前相比,^a*P*<0.05。

表3 两组患者炎症因子比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of inflammatory factors between 2 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	TNF- α (pg/mL)		IL-1(pg/mL)		IL-6(ng/mL)	
		术前	术后	术前	术后	术前	术后
对照组	56	60.12±13.26	25.74±8.18 ^a	78.59±9.07	32.68±4.59 ^a	1.94±0.28	0.82±0.15 ^a
实验组	56	59.36±13.36	16.32±9.23 ^a	78.86±8.96	19.55±5.10 ^a	1.96±0.30	0.51±0.11 ^a
<i>t</i> 值	-	0.285	5.401	0.150	13.531	0.345	11.784
<i>P</i> 值	-	0.776	0.001	0.881	0.001	0.731	0.001

注:与同组术前相比,^a*P*<0.05。

表4 两组患者临床疗效情况比较 [n(%)]

Table 4 Comparison of clinical efficacy between 2 groups of patients [n(%)]

组别	n	治愈	显效	有效	无效	总有效率
对照组	56	26(46.43)	13(23.21)	10(17.86)	7(12.50)	49(87.50)
实验组	56	33(58.93)	18(32.14)	4(7.14)	1(1.79)	55(98.21)
χ^2 值	-	-	-	-	-	4.846
P值	-	-	-	-	-	0.028

表5 两组患者并发症比较 [n(%)]

Table 5 Comparison of complications between 2 groups [n(%)]

组别	n	感染	神经功能 短暂性缺失	神经 损伤	血管 损伤	并发症率
对照组	56	5(8.92)	1(1.79)	1(1.79)	1(1.79)	8(14.29)
实验组	56	3(5.36)	2(3.57)	1(1.79)	0(0.00)	6(10.71)
χ^2 值	-	-	-	-	-	0.327
P值	-	-	-	-	-	0.567

3 讨论

腰椎间盘突出是腰椎组织退行性病变而引起的疾病^[9-10]。腰椎是人体行动的核心支撑力,腰椎间盘突出导致的疼痛会严重影响到患者日常生活。

石化洋^[11]、齐文斌等学者^[12]研究报道,氧化应激反应参与了腰椎间盘突出患者病情发展的病理损伤过程,ROS、MDA及MPO属于中性粒细胞活化过程中脂质过氧化反应中的神经细胞毒性物质,在腰椎间盘突出发病时均会表现出不同程度的改变,可作为疾病进展及转归的观察指标。腰椎间盘突出患者的机体常由于受到环境刺激,导致氧化和抗氧化之间平衡失调,引起氧化应激状态,最终导致细胞和组织氧化损伤或死亡。经皮椎间孔镜治疗具有手术创伤小、安全性高等优点,还能降低患者术后的应激状态,在临床治疗中逐渐被广泛应用。经皮椎间孔镜作为微创手术,能够减轻神经根和硬膜囊的压力,降低手术创伤,有利于患者炎症因子水平的恢复^[13]。据国内外文献报道,手术创伤与应激反应程度呈现正相关性,其中ROS、MDA、MPO等物质均是典型的应激因子,手术的刺激和麻醉药物影响均会导致机体产生强烈的应激反应^[14]。国内研究指出,疾病的严重程度与炎症因子水平关系十分紧密,炎症因子水平越高,对中枢、免疫等重要系统产生的有害影响越大,导致患者机体对疾病的耐受能力下降,病情加重,难以痊愈^[15]。

本研究结果说明腰突患者发病时的炎症因子水平及应激指标均会出现不同程度上升。实验组

临床疗效高于对照组,表明经皮椎间孔镜治疗在提高腰椎间盘突出症治疗效果中作用更为显著,可降低患者应激反应。ROS、MDA、MPO水平的增高使机体处于应激状态,此时机体的分解代谢大于合成代谢,大量糖原分解释放进入血液,反应性刺激了中枢神经系统,进一步加重患者病情。而通过经皮椎间孔镜治疗,可以更为有效地缓解机体的全身应激反应,减少对细胞和组织的损害,帮助患者恢复腰椎功能及临床症状,加快全面康复,侧面反应ROS、MDA、MPO水平能够作为治疗有效性的重要指标之一。而手术创口越大,越不利于患者炎症因子水平的恢复,容易造成感染等一系列并发症,进一步突显出经皮椎间孔镜治疗的优势。

综上所述,经皮椎间孔镜治疗临床疗效佳,可降低腰椎间盘突出症患者的应激反应水平及炎症因子水平,且术后无严重并发症出现,安全性高,值得推广应用。

参考文献

- [1] 尹晶, 陈文涛, 郁毅刚. 重症 COPD 患者 IL33/ST2 比值与血气指标, 氧化应激反应程度的相关性分析[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(3):305-308.
- [2] 张瀚雷, 于珊珊, 李冬梅, 等. 胸腰筋膜平面阻滞对椎间孔镜手术患者炎症因子和应激反应的影响[J]. 中华实验外科杂志, 2020, 37(8):1538-1540.
- [3] 王齐超, 张生, 张永辉, 等. 经皮椎间孔镜 TESSYS 技术对腰椎间盘突出症患者应激反应及治疗效果的影响[J]. 颈腰痛杂志, 2018, 41(6):754-757.
- [4] 肖冰, 吉健友, 罗杰. 悬吊训练对运动员腰椎间盘突出症的疗效观察[J]. 保健医学研究与实践, 2019, 16(2):39-41.
- [5] 梁智林, 海涌, 杨晋才, 等. 经皮椎间孔镜治疗腰椎间盘突出症术后复发影响因素研究[J]. 中国骨与关节杂志, 2020, 16(2):170-174.
- [6] 郑义朋, 周医斋, 李克鹏, 等. 经皮椎间孔镜手术联合针刀治疗腰椎间盘突出症的效果[J]. 广西医学, 2019, 41(1):113-115.
- [7] 杨嘉, 曹宏强. 经皮椎间孔镜治疗单节段腰椎间盘突出症患者的效果观察[J]. 实用临床医药杂志, 2019, 23(11):198-199.
- [8] Eguchi Y, Oikawa Y, Suzuki M, et al. Diffusion tensor imaging of radiculopathy in patients with lumbar disc herniation: preliminary results[J]. Bone J, 2016, 98(3):387.
- [9] 陈胜乐, 米盼盼, 许雅芳, 等. 经皮椎间孔镜对腰椎间盘突出症患者血清炎症因子的影响[J]. 川北医学院学报, 2020, 35(5):89-91.
- [10] 任冬杰, 王羽丰, 林定坤, 等. 终板炎对经皮椎间孔镜治疗腰椎间盘突出症疗效的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2020, 23(4):74-78.

(下转第 904 页)

急性STEMI患者血清HIF-1 α 含量与病情及PCI后院内不良心血管事件关系

丁小青¹ 刘海峰¹ 刘红伟¹ 顾磊^{2*}

[摘要] 目的 研究急性ST段抬高型心肌梗死(STEMI)患者血清缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)含量与病情及经皮冠状动脉介入术(PCI)后院内不良心血管事件(MACE)的关系。方法 选择2018年7月至2020年7月期间在本院接受急诊PCI治疗的急性STEMI患者160例作为STEMI组、同期体检的健康志愿者110例作为对照组,检测血清HIF-1 α 含量;评估STEMI患者的病情及院内MACE,采用logistic回归模型分析MACE的影响因素,采用ROC曲线分析MACE的预测因素。结果 STEMI组患者的血清HIF-1 α 含量高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),STEMI组中HIF-1 α <中位数患者的LDH、CK-MB、cTnI、Gensini评分、Grace评分、院内MACE发生率高于HIF-1 α \geq 中位数患者,LVEF低于HIF-1 α \geq 中位数患者,差异有统计学意义($P<0.05$);LVEF、Grace评分、HIF-1 α 是院内MACE的影响因素($P<0.05$);血清HIF-1 α 含量是预测院内MACE的指标($P<0.05$)。结论 急性STEMI患者血清HIF-1 α 含量与病情加重及PCI后发生MACE有关,对院内MACE具有预测价值。

[关键词] 急性ST段抬高型心肌梗死;院内不良心血管事件;缺氧诱导因子-1 α

Relationship between serum HIF-1 α level in patients with acute STEMI and the condition of major adverse cardiovascular events in the hospital after PCI

DING Xiaoqing¹, LIU Haifeng¹, LIU Hongwei¹, GU Lei^{2*}

(1. Department of Cardiology, Guangrao County People's Hospital, Dongying, Shandong, China, 257300;

2. Department of Cardiovascular Medicine, Dongying People's Hospital, Dongying, Shandong, China, 257000)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the relationship between serum hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) level and the disease condition, major adverse cardiovascular events (MACE) after percutaneous coronary intervention (PCI) of patients with acute ST segment elevation myocardial infarction (STEMI). **Methods** Acute STEMI patients who received emergency PCI treatment in our hospital from July 2018 to July 2020 were selected as the STEMI group, and healthy volunteers who received physical examination at the same time were selected as the control group. The serum HIF-1 α level was detected. The disease condition and MACE in hospital of STEMI patients were evaluated. The influencing factors of MACE was analyzed by logistic regression model, and the predictive factors of MACE were analyzed by ROC curve. **Results** The level of serum HIF-1 α in the STEMI group was higher than that in the control group, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). In the STEMI group, the incidence of LDH, CK-MB, cTnI, Gensini score, Grace score, and MACE in patients with HIF-1 α < median was higher than that of patients with HIF-1 α \geq median, and LVEF was lower than HIF-1 α \geq median number of patients, the difference was statistically significant ($P<0.05$). LVEF, Grace score, HIF-1 α are the influencing factors of MACE in the hospital ($P<0.05$). The level of serum

基金项目:山东省医药卫生科技发展计划(2018WS465)

作者单位:1. 广饶县人民医院心血管内科,山东,东营 257300

2. 东营市人民医院心血管内科,山东,东营 257000

*通信作者:顾磊, E-mail: duanzhiy25435@163.com

HIF-1 α is an indicator for predicting MACE in the hospital ($P<0.05$). **Conclusion** The level of serum HIF-1 α in patients with acute STEMI is related to the aggravation of the disease and the occurrence of MACE after PCI, which has predictive value for MACE in the hospital.

[KEY WORDS] Acute ST segment elevation myocardial infarction; Major adverse cardiovascular events in Hospital; hypoxia induced factor-1 α

急性ST段抬高型心肌梗死(ST segment elevation myocardial infarction, STEMI)是冠心病最严重的类型,急诊经皮冠状动脉介入术(Percutaneous coronary intervention, PCI)是再通冠脉、恢复心肌血流的有效方法。但是,受到缺血再灌注损伤、无复流或慢血流等因素的影响,部分STEMI患者会发生PCI后院内不良心血管事件(Major adverse cardiovascular events, MACE),对PCI治疗效果及疾病预后均造成不利影响^[1-2]。因此,早期识别可能发生PCI后院内MACE的患者并进行干预对保证PCI疗效、改善疾病预后具有积极意义。缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)是一种对缺氧刺激十分敏感的转录因子,在STEMI的发病过程中HIF-1 α 大量表达并参与血管新生、侧枝循环建立等过程。已有研究报道,STEMI患者血清中HIF-1 α 的含量代偿性升高,HIF-1 α 较低的STEMI患者心功能更差^[3-4],但HIF-1 α 对PCI后院内MACE的评估价值尚不清楚。因此,本研究将以接受急诊PCI治疗的急性STEMI患者为对象,探究血清HIF-1 α 含量与病情及院内MACE的关系。

1 对象与方法

1.1 研究对象

选择2018年7月至2020年7月期间在本院接受急诊PCI治疗的160例急性STEMI患者作为STEMI组,其中男性98例、女性62例,年龄平均(57.62 \pm 10.29)岁。另取同期体检的健康志愿者作为对照组,共110例,男性67例、女性43例,年龄平均(55.49 \pm 11.23)岁。两组间一般资料的比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。所有患者家属知情并同意。本实验经医院伦理委员会同意批准。

入组标准:①符合急性STEMI的诊断标准^[5];②起病后12h内接受急诊PCI;③入院时留取血清样本;④临床资料完整;排除标准:①既往有心肌梗死、脑梗死、脑出血等病史;②合并恶性肿瘤、自身免疫性疾病、心肌病、心瓣膜病;③近期使用过激素、免疫制剂。

1.2 血清HIF-1 α 含量检测

入院时取STEMI组的外周静脉血3~5 mL,体检时取对照组的外周静脉血3~5 mL,离心分离血清后采用酶联免疫吸附法试剂盒(上海酶联公司)检测HIF-1 α 的含量,按照试剂盒说明书进行操作。根据检测结果计算HIF-1 α 含量的中位数,将STEMI患者分为HIF-1 α \geq 中位数与<中位数患者。

1.3 病情及MACE的评估

查阅STEMI组的病历资料,登记患者的乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)、磷酸肌酸激酶同工酶(creatine kinase isoenzyme, CK-MB)、心肌肌钙蛋白I(Cardiac troponin I, cTnI)、左心室射血分数(Left ventricular ejection fraction, LVEF)、发病至PCI时间、Gensini评分、Grace评分、院内MACE发生情况。LDH、CK-MB、cTnI采用电化学发光仪检测,LVEF采用心脏彩色多普勒超声进行检测,Gensini评分参照《急性ST段抬高型心肌梗死诊断和治疗指南》^[5]根据PCI术中冠脉造影情况从狭窄程度、病变部位进行评估,Grace评分参照《急性ST段抬高型心肌梗死诊断和治疗指南》^[5]根据年龄、心率、血压、血肌酐、Killip分级、合并已知心脏事件、心肌酶、ST段改变进行评估,MACE包括全因死亡、急性心力衰竭、再发心肌梗死、新发恶性心律失常。

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、两组间比较采用 t 检验,计数资料以 $n(\%)$ 表示、采用 χ^2 检验;MACE的影响因素采用多因素logistic回归分析,MACE的预测因素采用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HIF-1 α 含量的比较

与对照组血清HIF-1 α 含量(36.69 \pm 10.47)比较,STEMI患者的血清HIF-1 α 含量(45.61 \pm 17.34)明显增加,差异有统计学意义($t=4.823, P<0.05$)。

2.2 STEMI组中HIF-1 α ≥中位数与<中位数患者病情及院内MACE的比较

与STEMI组中HIF-1 α ≥中位数患者比较, HIF-1 α <中位数患者的LDH、CK-MB、cTnI、Gensini评分、Grace评分、院内MACE发生率明显增加, 差异有统计学意义($P<0.05$), LVEF明显降低, 差异有统计学意义($P<0.05$), 发病至PCI时间无关, 无统计学意义($P>0.05$)。见表1。

表1 STEMI组中HIF-1 α ≥中位数与<中位数患者病情及院内MACE的比较 [n(%), ($\bar{x}\pm s$)]

指标	HIF-1 α \geq 中位数 (n=80)	HIF-1 α <中位数 (n=80)	t/ χ^2 值	P值
LDH(U/L)	441.39 \pm 87.93	592.74 \pm 102.38	10.031	0.000
CK-MB(U/L)	31.38 \pm 8.58	26.57 \pm 7.71	3.730	0.001
cTnI(ng/mL)	2.21 \pm 0.65	1.57 \pm 0.34	7.804	0.000
LVEF(%)	52.38 \pm 9.93	47.82 \pm 7.72	3.243	0.001
发病至PCI时间(h)	6.59 \pm 1.12	6.74 \pm 1.27	0.792	0.430
Gensini评分(分)	54.58 \pm 9.29	68.71 \pm 10.34	9.092	0.000
Grace评分(分)	132.64 \pm 22.57	147.25 \pm 24.51	3.922	0.000
院内MACE	3(3.75)	22(27.50)	17.114	0.000

2.3 STEMI组院内MACE影响因素的logistic回归分析

以是否发生院内MACE为因变量, 以LDH、CK-MB、cTnI、LVEF、发病至PCI时间、Gensini评分、Grace评分、HIF-1 α 为自变量, 进行多因素logistic回归分析可知: LVEF、Grace评分、HIF-1 α 是院内MACE的影响因素($P<0.05$)。见表2。

表2 STEMI组院内MACE影响因素的logistic回归分析
Table 2 Logistic regression analysis of the factors influencing MACE in STEMI group

指标	β 值	OR值	95%CI	Wald χ^2	P值
LDH	0.374	1.083	0.893~1.755	0.744	0.352
CK-MB	0.225	1.067	0.923~1.448	1.225	0.213
cTnI	0.267	1.046	0.911~1.836	0.584	0.417
LVEF	-0.523	0.892	0.668~0.947	6.474	0.006
发病至PCI时间	0.309	1.101	0.932~2.115	1.385	0.185
Gensini评分	0.384	1.185	0.894~1.993	0.937	0.262
Grace评分	0.575	1.225	1.083~2.712	5.117	0.020
HIF-1 α	-0.612	0.873	0.616~0.947	6.118	0.010

2.4 HIF-1 α 预测院内MACE的ROC曲线分析

HIF-1 α 预测院内MACE的ROC曲线下面积为0.844, 对应的95%CI为0.758~0.930。根据约登指数最大值确定HIF-1 α 预测院内MACE的截断

值为55.21 ng/mL, 该截断值用于预测的灵敏度为72.00%、特异性为86.67%。见图1。

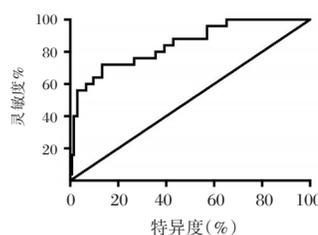


图1 HIF-1 α 预测院内MACE的ROC曲线

Figure 1 ROC curve of HIF-1 α in predicting MACE in hospital

3 讨论

心肌细胞缺血缺氧损害是急性STEMI主要的病理生理改变, 缺血缺氧刺激能够通过激活炎症、氧化应激、凋亡等方式引起细胞损害, 同时也能引起血管新生、抗氧化系统激活等代偿性反应^[6-8]。HIF-1 α 是对缺氧刺激十分敏感的转录因子, 在心肌细胞发生缺血缺氧损害的过程中表达增加, 进而通过促进血管新生及侧枝循环形成的方式起到保护作用, 是机体在STEMI发病过程中自身代偿的重要机制之一。已有临床研究^[3-4]、动物实验^[9]及细胞实验^[10]证实, STEMI发病过程、大鼠心肌缺血损伤过程、心肌细胞缺氧损害过程中HIF-1 α 表达增加。本研究结果表明在STEMI的发病过程中存在HIF-1 α 代偿性的增多, 增多的HIF-1 α 可能通过促进血管新生及侧枝循环形成的方式减轻心肌损害。

STEMI患者体内HIF-1 α 增多是机体自我保护的代偿机制, 代偿性增多的HIF-1 α 参与血管新生, 有利于侧枝循环建立、挽救濒死的心肌细胞。已有临床研究证实, STEMI患者血清中HIF-1 α 增多与心功能的改善有关^[3], 符合HIF-1 α 在心肌缺血缺氧损害过程中发挥保护作用的生物学特性。本研究结果表明STEMI发病后HIF-1 α 相对较低的患者病情更重, 可能原因是相对较低的HIF-1 α 提示HIF-1 α 代偿性增加不足, 削弱HIF-1 α 对缺血心肌的保护作用, 进而造成心肌损伤程度及冠脉病变程度的加重。

急诊PCI是目前治疗急性STEMI的有效手段, 再通冠脉的效果确切, 但部分患者会在PCI后发生院内MACE并直接影响近期预后。相关研究报道, STEMI患者PCI后院内MACE的发生率约10%~30%^[11-12], 本研究纳入的160例急性STEMI患者中共25例发生院内MACE、发生率15.63%, 与既往文献

的报道一致。多项关于 PCI 后 MACE 影响因素的研究证实, LVEF、Grace 评分等与 STEMI 病情相关的因素与 PCI 后 MACE 的发生有关^[13-15]。本研究已经证实血清 HIF-1 α 代偿性增加不足与 STEMI 病情加重有关, HIF-1 α 与 LVEF、Grace 评分等 MACE 的影响因素存在相关性。在此基础上分析 HIF-1 α 与 MACE 发生的关系可知: 血清 HIF-1 α 含量是 PCI 后院内 MACE 的影响因素且对 MACE 的发生具有预测价值, 表明 HIF-1 α 含量不仅对急性 STEMI 的病情具有评估价值, 还能预测 PCI 后院内 MACE 的发生。

综上所述, 急性 STEMI 患者血清 HIF-1 α 含量明显增加, HIF-1 α 增加不足与病情加重及 PCI 后发生 MACE 有关, 检测 HIF-1 α 含量对院内 MACE 具有预测价值。

参考文献

- [1] Dall'Ara G, Testa L, Tumscitz C, et al. No-Reflow Complicating Chronic Total Occlusion Coronary Revascularization [J]. *J Invas Card*, 2020, 32(2): 58-63.
- [2] 信鹏程, 张中伟, 牛思泉, 等. 血清 IGF-1 含量对 STEMI 患者急诊介入术后 MACE 的预测价值[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2021, 13(2): 309-312.
- [3] 郭营波, 马健, 蒋卫东. 血清 miR-155、HIF1 α 的表达与急性心肌梗死患者预后的关系[J]. *河北医药*, 2019, 41(14): 2150-2153.
- [4] Yu Q, Li L, Zhao N. Three-dimensional echocardiography in the diagnosis of myocardial infarction and its correlation with the expressions of serum HIF-1 α , HO-1 and VEGF[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(9): 2751-2756.
- [5] 中华医学会心血管病学分会 中华心血管病杂志编辑委员会. 急性 ST 段抬高型心肌梗死诊断和治疗指南[J]. *中华心血管病杂志*, 2015, 43(5): 380-393.
- [6] Lappegård J, Ellingsen TS, Hindberg K, et al. Impact of chronic inflammation, assessed by hs-CRP, on the association between red cell distribution width and arterial cardiovascular disease: The Tromsø Study [J]. *TH Open*, 2018, 2(2): e182-e189.
- [7] Nguyen MT, Fernando S, Schwarz N, et al. Inflammation as a Therapeutic Target in Atherosclerosis [J]. *J Clin Med*, 2019, 8(8): E1109.
- [8] Jin A, Zhang Q, Li S, et al. Downregulation of FOXO6 alleviates hypoxia-induced apoptosis and oxidative stress in cardiomyocytes by enhancing Nrf2 activation via upregulation of SIRT6 [J]. *J Bioenerg Biomembr*, 2020, 52(6): 409-419.
- [9] Rao Z, Shen D, Chen J, et al. Basic Fibroblast Growth Factor Attenuates Injury in Myocardial Infarction by Enhancing Hypoxia-Inducible Factor-1 Alpha Accumulation [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 7(11): 1193.
- [10] Datta Chaudhuri R, Banerjee D, et al. Severity and duration of hypoxic stress differentially regulates HIF-1 α -mediated cardiomyocyte apoptotic signaling milieu during myocardial infarction [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2020, 15(690): 108430.
- [11] Kumar D, Patra S, Pande A, et al. Long-term clinical outcomes of thrombus aspiration in STEMI patients undergoing primary percutaneous coronary intervention [J]. *Am J Cardiovasc Dis*, 2020, 10(2): 117-123.
- [12] Wu JW, Hu H, Li D, et al. In-hospital outcomes of delayed stenting in hemodynamically stable patients with ST-segment elevation myocardial infarction: the CCC (Care for Cardiovascular Disease in China) project [J]. *Cardiovasc Diagn Ther*, 2019, 9(5): 462-471.
- [13] 黄修献, 王圣, 李斌, 等. 老年冠心病患者介入术后院内心血管不良事件及其影响因素[J]. *中国老年学杂志*, 2019, 39(16): 3867-3870.
- [14] 陈鑫森, 黄钟, 李桂花. 中性粒细胞/淋巴细胞比值联合平均血小板体积对急性 STEMI 患者 PCI 术后发生院内主要不良心血管事件的预测价值[J]. *中国全科医学*, 2020, 23(9): 1117-1126.
- [15] 胡昌灿, 于海初, 孙桂霞, 等. 血小板/淋巴细胞比值联合 Grace 评分对非 ST 段抬高型急性冠状动脉综合征院内心血管事件的预测价值[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2019, 27(8): 700-707.

(上接第 900 页)

- [11] 石化洋. 经皮椎间孔镜与传统椎板开窗对腰椎间盘突出症疗效及其术后氧化应激的影响[J]. *颈腰痛杂志*, 2019, 40(1): 67-69.
- [12] 齐文斌, 朱彦海. 经皮椎间孔镜手术治疗腰椎间盘突出症的疗效观察及术后复发的相关因素分析[J]. *颈腰痛杂志*, 2019, 40(6): 776-780.
- [13] Zhang KH, Zhang WH, Xu BS, et al. CT-based Morphometric Analysis of Approach of Percutaneous Transforaminal Endoscopic Lumbar Interbody Fusion [J]. *Orthop Surg*, 2017, 41(7): 611-614.
- [14] Altinkaya N, Cekinmez M. Lumbar multifidus muscle changes in unilateral lumbar disc herniation using magnetic resonance imaging [J]. *Skeletal Radiol*, 2016, 45(1): 73.
- [15] Azimi P, Azhari S, Shahzadi S, et al. Outcome Measure of Pain in Patients with Lumbar Disc Herniation: Validation Study of the Iranian version of Pain Sensitivity Questionnaire [J]. *Asian Spine J*, 2016, 10(3): 480-487.

血清 VEGF、hs-CRP、MMP 在急性脑梗死中的诊断价值及临床意义

马明娟^{1*} 王素娟² 刘晓梅²

[摘要] **目的** 探究血清血管内皮生长因子(VEGF)、超敏C反应蛋白(hs-CRP)、基质金属蛋白酶(MMP)诊断急性脑梗死(ACI)的临床价值,并分析其水平变化的临床意义。**方法** 选取本院95例ACI患者作为研究组,95例健康体检者作为对照组,检测比较两组血清VEGF、hs-CRP、MMP-9水平,分析各指标临床应用价值。**结果** 研究组血清VEGF、hs-CRP、MMP-9水平高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);ACI患者NIHSS评分、梗死病灶直径与血清VEGF、hs-CRP、MMP-9水平呈正相关($P<0.05$);血清VEGF、hs-CRP、MMP-9诊断ACI的曲线下面积(AUC)均 >0.8 ,联合诊断的AUC为0.929,大于各指标单独诊断,联合的最佳诊断敏感度、特异度分别为82.15%、92.63%;治疗后血清VEGF、hs-CRP、MMP-9升高均为ACI预后不良的危险因素($P<0.05$)。**结论** 血清VEGF、hs-CRP、MMP-9在ACI诊断方面具有较高应用价值,且与患者预后显著相关。

[关键词] 急性脑梗死;血管内皮生长因子;超敏C反应蛋白;基质金属蛋白酶

The diagnostic value and clinical significance of serum VEGF, hs-CRP and MMP in acute cerebral infarction

MA Mingjuan^{1*}, WANG Sujuan², LIU Xiaomei²

(1. Department of Neurology, First People's Hospital of Luoyang, Henan Province, Luoyang, Henan, China, 471002; 2. Department of Neurology, Luoyang First People's Hospital of Henan Province, Luoyang, Henan, China, 471002)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the clinical value of serum vascular endothelial growth factor (VEGF), high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP) and matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) in the diagnosis of acute cerebral infarction (ACI), and analyze the clinical significance of changes in their levels. **Methods** 95 ACI patients in our hospital were selected as the research group, and 95 healthy subjects were selected as the control group. The levels of serum VEGF, hs-CRP and MMP-9 in the two groups were detected and compared, and the clinical application value of each indicator was analyzed. **Results** The levels of serum VEGF, hs-CRP and MMP-9 in the study group were higher than those in the control group ($P<0.05$). The NIHSS score and the diameter of infarct lesions in ACI patients were positively correlated with the serum VEGF, hs-CRP, and MMP-9 levels ($P<0.05$). The area under the curve (AUC) of serum VEGF, hs-CRP and MMP-9 in the diagnosis of ACI were all >0.8 . The AUC of the combined diagnosis was 0.929, which was greater than that of the individual diagnoses. The best sensitivity and specificity of the combined diagnosis were 82.15% and 92.63%, respectively. Elevated serum VEGF, hs-CRP, and MMP-9 after treatment were all risk factors for poor prognosis of ACI ($P<0.05$). **Conclusion** Serum VEGF, hs-CRP, and MMP-9 have high application value in the diagnosis of ACI and are significantly related to the prognosis of patients.

[KEY WORDS] Acute cerebral infarction; Vascular endothelial growth factor; High-sensitivity C-reactive protein; Matrix metalloproteinases

基金项目:河南省医学科技攻关计划项目(SBGJ2018055)

作者单位:1.河南省洛阳市第一人民医院神经内一科,河南,洛阳471002

2.河南省洛阳市第一人民医院神经内科,河南,洛阳471002

*通信作者:马明娟, E-mail:13271537660@163.com

急性脑梗死(Acute cerebral infarction, ACI)为临床最常见脑卒中类型,具有起病急、进展快的特点,且致残率较高,早期诊断、治疗是改善患者预后的关键环节^[1-2]。新近研究指出,血管内皮生长因子(Vascular epithelial growth factor, VEGF)与ACI发生后新血管生成过程密切相关,可发挥保护神经细胞、血管扩张、增加血管通透性等多种生物学活性^[3]。临床普遍认为,ACI的主要病因为动脉粥样硬化,而炎症反应在动脉粥样硬化的发生发展,炎症因子如超敏C反应蛋白(high-sensitivity C-reactive protein, hs-CRP)等水平升高可加重神经损伤^[4]。此外,炎症反应可诱导基质金属蛋白酶-9(Matrix metalloproteinase-9, MMP-9)的表达增加,从而促进脑血管关键蛋白成分的降解,加重脑组织损伤^[5-6]。但上述指标联合诊断ACI的作用尚无研究报道,基于此,本研究尝试探究血清VEGF、hs-CRP、MMP-9诊断ACI的临床价值,并分析其水平变化的临床意义。报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2019年10月至2020年10月本院95例ACI患者作为研究组,其中男55例,女40例,平均年龄(56.67 ± 5.54)岁;体质量指数(Body mass index, BMI)平均(23.87 ± 2.19) kg/m^2 。纳入标准:另选同期95例健康体检者作为对照组,其中男60例,女35例,平均年龄(54.83 ± 7.41)岁;BMI平均(23.40 ± 2.14) kg/m^2 。对比两组性别、年龄、BMI,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

纳入标准:①全身体检结果正常;②无沟通交流障碍;③无脑血管疾病史;④知晓本研究,已签署同意书。排除标准:①恶性肿瘤患者;②急慢性感染性疾病患者;③自身免疫系统疾病患者;④血液系统疾病患者;⑤严重肝肾功能障碍、心血管疾病患者;⑥药物依赖性患者。本实验经医院伦理委员会批准。

1.2 方法

实验室指标检测:采集研究组入院时(治疗前)和治疗后、对照组体检时外周静脉血5 mL,以3 500 r/min转速、8 cm半径离心处理5 min,分离血清,采用酶联免疫吸附法测定血清VEGF、hs-CRP、MMP-9水平,试剂盒购自北京百奥莱博科技有限公司。

病情评估方法:包括神经损伤程度、梗死病灶直径,神经损伤程度根据美国国立卫生研究院卒中量表(National Institute of Health stroke scale,

NIHSS)评估^[7]:分为轻度、中度、重度。参照Adama分型标准将ACI患者分为大梗死(梗死直径 >3.00 cm,累及2个脑解剖部位)、小梗死(梗死直径1.50~3.00 cm)、腔隙性梗死(梗死直径 <1.50 cm)^[8]。

研究组患者入院后均给予抗血小板聚集、吸氧、改善脑循环、神经营养剂、静脉溶栓、维持水电解质平衡等对症治疗,治疗后1个月统计预后情况,采用格拉斯哥预后量表(Glasgow outcome scale, GOS)^[9]评估预后,总分1~5分, ≥ 4 分为预后良好, ≤ 3 分为预后不良。

1.3 观察指标

①两组血清VEGF、hs-CRP、MMP-9水平。②研究组不同神经损伤程度、梗死病灶直径治疗前血清VEGF、hs-CRP、MMP-9水平,并分析治疗前血清VEGF、hs-CRP、MMP-9与ACI患者NIHSS评分、梗死病灶直径的相关性。③分析治疗前血清VEGF、hs-CRP、MMP-9诊断ACI的价值。④研究组不同预后患者临床资料,分析ACI预后的影响因素,临床资料包括性别、年龄、BMI、吸烟、饮酒、神经损伤程度、梗死病灶直径、治疗前、治疗后血清VEGF、hs-CRP、MMP-9水平。

1.4 统计学方法

数据处理采用SPSS 22.0软件,计数资料 $n(\%)$ 描述,采用 χ^2 检验。计量资料以($\bar{x} \pm s$)描述,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用独立样本 t 检验,相关性分析采用Pearson相关系数模型,通过Logistic进行多因素回归分析,诊断效能分析采用受试者工作特征(ROC)曲线,获取曲线下面积(AUC)、不同诊断方案间曲线下面积比较采用DeLong检验,联合诊断实施Logistic二元回归拟合,返回诊断概率 $\text{logit}(p)$,将其作为独立检验变量,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组血清VEGF、hs-CRP、MMP-9水平比较

与对照组比较,研究组血清VEGF、hs-CRP、MMP-9水平均明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表1。

2.2 研究组不同神经损伤程度、梗死病灶直径血清各指标水平比较

研究组不同神经损伤程度、梗死病灶直径血清VEGF、hs-CRP、MMP-9水平比较:轻度 $<$ 中度 $<$ 重度,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表2。

表1 两组血清 VEGF、hs-CRP、MMP-9 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)
Table 1 Comparison of serum VEGF, hs-CRP and MMP-9 levels between 2 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	VEGF (pg/mL)	hs-CRP (mg/L)	MMP-9 (pg/mL)
研究组	95	195.84±89.37	9.28±2.59	996.35±248.75
对照组	95	90.63±35.41	5.06±1.78	615.86±189.17
t 值		10.668	13.088	11.867
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

表2 研究组不同神经损伤程度、梗死病灶直径血清各指标水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of serum levels of various indicators of different nerve injury degrees and infarct lesion diameters in the study group ($\bar{x} \pm s$)

病情	组别	n	VEGF (pg/mL)	hs-CRP (mg/L)	MMP-9 (pg/mL)
神经损伤程度	轻度	44	152.37±78.59	7.81±1.75	874.92±215.68
	中度	30	192.46±85.05	9.22±2.21	990.54±228.30
	重度	21	242.69±92.61	10.81±2.40	1123.59±248.71
	F 值		8.420	15.620	8.762
	P 值		<0.001	<0.001	<0.001
梗死病灶直径	腔隙性梗死	26	150.68±75.91	7.84±1.71	879.60±217.45
	小梗死	46	196.53±83.26	9.25±2.01	992.31±231.08
	大梗死	23	240.31±90.12	10.75±2.36	1117.14±246.26
	F 值		7.131	12.601	6.440
	P 值		0.001	<0.001	0.002

2.3 血清各指标与 ACI 患者 NIHSS 评分、梗死病灶直径的相关性

Pearson 相关性分析显示,血清 VEGF、hs-CRP、MMP-9 水平与 ACI 患者 NIHSS 评分、梗死病灶直径呈正相关 ($P < 0.05$)。见表 3。

表3 血清各指标与 ACI 患者 NIHSS 评分、梗死病灶直径的相关性分析

Table 3 Correlation analysis of serum indexes with NIHSS score and diameter of infarct lesion in ACI patients

指标	NIHSS 评分		梗死病灶直径	
	r 值	P 值	r 值	P 值
VEGF (pg/mL)	0.663	<0.001	0.628	<0.001
hs-CRP (mg/L)	0.783	<0.001	0.754	<0.001
MMP-9 (pg/mL)	0.675	<0.001	0.591	<0.001

2.4 血清各指标诊断 ACI 的价值

绘制血清 VEGF、hs-CRP、MMP-9 诊断 ACI 的 ROC 曲线,结果显示,各指标诊断的 AUC 均在 0.8

以上,尤其是各指标联合诊断的 AUC 最大,为 0.929。见表 4、图 1。

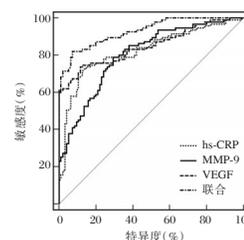


图1 血清 VEGF、hs-CRP、MMP-9 诊断 ACI 的 ROC
Figure 1 ROC of ACI diagnosed by serum VEGF, hs-CRP, MMP-9

2.5 研究组不同预后患者临床资料

研究组患者治疗后 1 个月预后良好 75 例,预后不良 20 例。预后良好患者的年龄、神经损伤程度、梗死病灶直径、治疗前和治疗后血清 VEGF、hs-CRP、MMP-9 水平均低于预后不良患者 ($P < 0.05$)。见表 5。

表5 研究组不同预后患者临床资料比较 [$n(\%)$, ($\bar{x} \pm s$)]
Table 5 Comparison of clinical data of patients with different prognosis in the study group [$n(\%)$, ($\bar{x} \pm s$)]

指标	预后良好 (n=75)	预后不良 (n=20)	χ^2/t 值	P 值
性别(男/女)	42/33	13/7	0.525	0.469
年龄(岁)	53.71±4.69	59.62±5.84	4.747	<0.001
BMI(kg/m ²)	23.41±2.15	24.33±2.37	1.664	0.099
吸烟(是/否)	26/49	9/11	0.725	0.395
饮酒(是/否)	21/54	8/12	1.072	0.301
治疗前				
VEGF (pg/mL)	167.53±85.76	224.15±98.92	2.539	0.013
hs-CRP (mg/L)	8.46±2.04	10.10±2.61	3.005	0.003
MMP-9 (pg/mL)	891.38±220.76	1101.32±266.05	3.616	0.001
治疗后				
VEGF (pg/mL)	124.54±21.83	159.84±36.79	5.478	<0.001
hs-CRP (mg/L)	6.59±1.17	8.26±1.42	5.416	<0.001
MMP-9 (pg/mL)	683.51±122.69	816.74±185.39	3.841	<0.001
神经损伤程度				
轻度	44 (58.67)	0 (0.00)		
中度	20 (26.67)	11 (14.67)	4.451	<0.001
重度	10 (50.00)	10 (50.00)		
梗死病灶直径				
腔隙性梗死	26 (34.67)	0 (0.00)	3.758	<0.001
小梗死	37 (49.33)	9 (45.00)		
大梗死	12 (16.00)	11 (55.00)		

表4 血清 VEGF、hs-CRP、MMP-9 诊断 ACI 的价值分析

Table 4 Analysis of the value of serum VEGF, hs-CRP and MMP-9 in the diagnosis of ACI

指标	AUC	95%CI	Z 值	断值	敏感度 (%)	特异度 (%)	P 值
VEGF	0.849	0.791-0.897	12.243	>132.17 pg/mL	74.75	87.36	<0.001
hs-CRP	0.823	0.762-0.875	10.359	>7.39 mg/L	73.68	85.26	<0.001
MMP-9	0.804	0.740-0.858	9.684	>766.82 pg/mL	78.95	70.53	<0.001
联合诊断	0.929	0.883-0.961	24.628	-	82.15	92.63	<0.001

2.6 ACI 预后的影响因素

回归分析结果显示,治疗后血清 VEGF、hs-CRP、MMP-9 均为 ACI 预后的影响因素 ($P < 0.05$)。见表 6。

表 6 ACI 预后的影响因素分析

Table 6 Analysis of factors affecting the prognosis of ACI

变量	β 值	S.E值	Wald χ^2 值	OR值	95%CI	P值
VEGF	1.557	0.581	7.186	4.747	2.563~8.791	<0.001
hs-zCRP	1.404	0.542	6.710	4.071	2.074~7.992	0.004
MMP-9	1.249	0.524	5.681	3.487	1.589~7.651	0.015

注:治疗后血清 VEGF、hs-CRP、MMP-9 水平均以研究组均值为界, <均值赋值 1, \geq 均值赋值 2。

3 讨论

ACI 患病率占全部脑卒中的 69.6%~70.8%, 主要患病群体为中老年人, 近年来随着我国人口老龄化加剧, ACI 的防治越来越受临床重视^[10]。ACI 的发病机制较为复杂, 涉及动脉粥样硬化、炎症反应等多方面, 多种细胞因子参与疾病的发生发展。报道显示, 在脑组织中, VEGF 是血管生成、神经保护和神经发生的重要调节因子, 在脑组织发生损伤时, VEGF 可介导脑屏障破坏、血管渗漏及神经炎症等, 与疾病进展密切相关^[11]。本研究发现, ACI 患者血清 VEGF 水平明显高于健康人群, 与国内相关研究^[12]结果一致, 进一步证实 VEGF 与 ACI 的发生有关。笔者认为, VEGF 是血管新生的关键因子, 可在低氧、炎症等因素刺激下生成、释放, ACI 发生后脑组织处于缺血缺氧状态, 机体为保护脑组织大量释放 VEGF, 其水平升高能促进缺血脑组织的血管生成, 提高损伤脑组织的血流灌注水平, 增加脑组织血氧含量, 进而促进损伤神经元细胞的修复和再生, 且随着患者病情加重, 对 VEGF 生成的刺激作用增强, 导致 VEGF 水平升高, 因此本研究中血清 VEGF 与 ACI 神经损伤程度、梗死病灶直径呈正相关关系。

hs-CRP 为临床常用炎症反应标志物, 是机体炎症刺激时肝脏产生的一种急性时相反应蛋白^[13]。本研究发现, ACI 患者血清 hs-CRP 处于明显高表达状态, 提示 hs-CRP 参与 ACI 的发病机制。hs-CRP 与 ACI 的关联性主要体现于炎症反应发生时期, hs-CRP 可通过经典途径激活补体系统, 引起血管内膜损伤, 促进动脉粥样硬化形成, 形成脑梗死的危险因素。秦爽等^[14]报道指出, 在缺血事件的发生、发展中, hs-CRP 可作为独立评价指标。本研究结果中, 血清 hs-CRP 水平随着 ACI 神

经损伤程度、梗死病灶直径增加逐渐升高, 与 ACI 患者 NIHSS 评分、梗死病灶直径存在密切相关性, 进一步证实其参与 ACI 的发生发展。此外, 炎症反应可诱导 MMP-9 产生, 本研究中 ACI 患者血清 MMP-9 水平明显升高, 且与患者神经损伤程度、梗死病灶直径呈正相关。脑缺血后, MMP-9 在病灶周围的血管内皮细胞中表达亦显著增加, 主要由脑细胞合成, 也可由炎症反应中来自血液的白细胞合成, 其水平升高可促进白细胞向病灶区聚集, 可能与神经炎症之间形成相互促进作用, 加重神经损伤^[15]。

本研究发现, 血清 VEGF、hs-CRP、MMP-9 在 ACI 诊断方面均具有一定价值, 且各指标联合诊断的 AUC 达 0.929, 可为 ACI 的早期诊断提供更准确数据参考。VEGF、hs-CRP、MMP-9 在 ACI 发生中的作用机制不同, VEGF 可反映脑屏障破坏、血管渗漏及神经炎症等情况, hs-CRP 主要反映炎症损伤程度, 而 MMP-9 可反映脑血管内皮细胞通透性及炎症细胞聚集情况, 3 种指标联合可更全面反映病变情况, 从而为 ACI 的诊断提供更全面信息。本研究结果提示治疗后检测血清 VEGF、hs-CRP、MMP-9 水平有助于判断 ACI 疾病转归方向, 在预测 ACI 预后方面具有一定潜力。

综上所述, ACI 患者血清 VEGF、hs-CRP、MMP-9 水平明显升高, 各指标联合在 ACI 诊断方面具有较高应用价值, 且与患者预后有关, 可能是预测 ACI 预后的潜在指标, 但具体预测价值尚未明确, 这也是本研究的不足之处, 后续工作中将进一步深入探讨。

参考文献

- [1] Li Z, Xin Z. Expression and significance of S-100 β , CysC and NF- κ B in patients with acute cerebral infarction [J]. Exp Ther Med, 2021, 21(2): 149.
- [2] 李星, 李博, 王伊龙. 血清 CXCL16、PLGF 水平变化与脑梗死患者 TOAST 分型、预后的相关性 [J]. 热带医学杂志, 2019, 19(9): 1120-1122+1134.
- [3] 张弛, 袁健, 彭刚, 等. 星形细胞肿瘤组织 EGFR、VEGF 表达及其与病理分级的相关性研究 [J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(08): 1086-1089.
- [4] 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.
- [5] Choi JI, Ha SK, Lim DJ, et al. S100 β , Matrix Metalloproteinase-9, D-dimer, and Heat Shock Protein 70 Are Serologic Biomarkers of Acute Cerebral Infarction in a Mouse Model of Transient MCA Occlusion [J]. J Korean Neurosurg Soc, 2018, 61(5): 548-558.

(下转第 912 页)

p16、Ki-67检测在宫颈上皮内瘤变诊断及宫颈癌筛查中的价值

陈炜^{1*} 周宁² 廖茜¹ 彭君臣¹

[摘要] **目的** 分析抑制基因蛋白(p16)、增殖细胞核蛋白(Ki-67)免疫组化检测在宫颈上皮内瘤变(CIN)诊断及宫颈癌筛查中的应用价值。**方法** 采用免疫组化SP法检测54例CIN、13例宫颈癌、14例正常宫颈黏膜上皮中p16、Ki-67表达水平。比较CIN、宫颈癌、正常宫颈黏膜上皮p16、Ki-67免疫组化结果,并分析p16、Ki-67及两者联合检测鉴别诊断CIN、宫颈癌、正常宫颈黏膜上皮的敏感性、特异性及准确性。**结果** 正常宫颈黏膜上皮中,p16、Ki-67阳性表达率分别为7.14%、28.57%,显著低于CIN、宫颈癌的阳性表达率,差异有统计学意义($P<0.05$)。CIN中,p16、Ki-67阳性表达率随CIN等级增加而上升,其中CIN I级p16阳性表达率显著低于CIN II级、CIN III级及宫颈癌,差异有统计学意义($P<0.05$)。p16鉴别诊断CIN、宫颈癌的敏感性与Ki-67比较差异无统计学意义($P>0.05$),但p16、Ki-67联合诊断的敏感性高于单独的p16、Ki-67检测,差异有统计学意义($P<0.05$)。三种检测方法的特异性数据比较差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** p16、Ki-67阳性表达率随宫颈病变严重程度加重而增高,两者联合检测可有效区分不同等级CIN及宫颈癌,可作为宫颈癌前病变进展的一个敏感标志物。

[关键词] 宫颈癌;抑制基因蛋白;增殖细胞核蛋白;宫颈上皮内瘤变

The value of p16 and Ki-67 detection in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer screening

CHEN Wei^{1*}, ZHOU Ning², LIAO Qian¹, PENG Junchen¹

(1. Department of Gynecology, Sichuan Mianyang 404 hospital, Mianyang, Sichuan, China, 621000;

2. Department of Pathology, Sichuan Mianyang 404 hospital, Mianyang, Sichuan, China, 621000)

[ABSTRACT] **Objective** To analyze the application value of suppressor gene protein (p16) and proliferating cell nuclear protein (Ki-67) immunohistochemical detection in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) and the screening of cervical cancer. **Methods** Immunohistochemical SP method was used to detect the expression levels of p16 and Ki-67 in 54 cases with CIN, 13 cases with cervical cancer, and 14 cases with normal cervical mucosal epithelium. The p16 and Ki-67 immunohistochemical results in patients with CIN, cervical cancer, and normal cervical mucosal epithelium were compared. The sensitivity, specificity, and accuracy of p16, Ki-67 and the combined detection of the two in the differential diagnosis of CIN, cervical cancer, and normal cervical mucosal epithelium were analyzed. **Results** In normal cervical mucosal epithelium, the positive expression rates of p16 and Ki-67 were 7.14% and 28.57%, respectively, which were significantly lower than that of CIN and cervical cancer, the difference is statistically significant ($P<0.05$). In CIN, the positive expression rates of p16 and Ki-67 increased with the increasing of CIN grade. The positive expression rate of p16 in CIN at grade I was significantly lower than that in CIN at grade II, CIN at grade III and cervical cancer, the difference is statistically significant ($P<0.05$). There is no significant difference in the sensitivity between p16 and Ki-67 in the differential diagnosis of CIN and cervical

基金项目:国家卫健委疾控局癌症早诊早治项目(农村)(GTCZ-2020-SC-51-0009)

作者单位:1. 四川绵阳四〇四医院妇科,四川,绵阳 621000

2. 四川绵阳四〇四医院病理科,四川,绵阳 621000

*通信作者:陈炜, E-mail: guo57398ceng3896@163.com

cancer ($P>0.05$). The sensitivity of p16+Ki-67 was higher than that of p16 and Ki-67 alone, the difference is statistically significant ($P<0.05$). There is no significant difference in specificity data between the three detections ($P>0.05$). **Conclusion** The positive expression rate of p16 and Ki-67 increases with the severity of cervical lesions. The combined detection of the two can effectively distinguish different grades of CIN and cervical cancer, and can be used as a sensitive marker for the progression of cervical precancerous lesions.

[KEY WORDS] Cervical cancer; Suppressor gene protein; Proliferating cell nuclear protein; Cervical intraepithelial neoplasia

上皮内瘤样病变(cervical intraepithelial neoplasia, CIN)是一组与宫颈浸润癌密切相关的癌前期病变的统称,反映了宫颈癌发生中连续发展的过程^[1-2]。大部分低级别CIN可自然消退,但高级别具有癌变潜能。宫颈癌发病隐匿、疾病进展缓慢,早期无特异性临床症状,为早期预防、诊治带来一定困难^[3]。因此,在宫颈癌前病变阶段检出反映病变进展的标志物,对宫颈癌的早期防治具有重要意义^[4]。细胞增殖失控是发生恶性病变的重要原因,抑制基因蛋白16(Suppressor gene protein 16, p16)为细胞周期蛋白激酶的抑制因子,p16-CyclinD1-CDK-Rb组成的调控途径与宫颈肿瘤的发生有关^[5]。原癌基因细胞增殖核抗原(nuclear-associated antigen, Ki-67)是一种核蛋白,在维持细胞增殖活性中具有重要作用^[6]。本组研究通过检测p16、Ki-67在CIN及宫颈癌中的表达,探讨其在诊断CIN及宫颈癌筛查中的应用价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取本院2017年4月至2020年4月活检或手术切除的子宫组织标本共106例。纳入标准:①年龄大于25岁以上女性;②临床病历资料完整;③已婚或有性生活;④均符合CIN及宫颈癌的诊断标准^[7],且病理结果经2位或以上经验丰富的病理科医师确诊。排除标准:①孕妇、产妇及哺乳期妇女;②合并其他恶性疾病者;③术前接受放疗、化疗者;④标本信息不全的标本。

最终共纳入81例,平均年龄为(45.87±13.52)岁。其中CIN共54例(I级21例,II级18例,III级15例),宫颈癌13例(组织学分级:I级6例,II级5例,III级2例),正常宫颈黏膜上皮14例。

1.2 方法

采用S-P免疫组化染色,标本均用甲醛溶液浸泡,常规脱水、透明、浸蜡、石蜡包埋,4.0 μm厚度连续切片。然后根据S-P免疫组化染色法对p16、

Ki-67进行检测。主要试剂:鼠抗人p16单克隆抗体、鼠抗人Ki-67单克隆抗体,上述抗体及SP法超敏试剂盒均由福州迈新生物技术开发公司生产。检测过程严格按照说明进行。一抗阴性对照使用PBS(磷酸盐缓冲液)进行代替。

染色结果判断^[8]:p16、Ki-67阳性存在于细胞核或细胞浆内,以棕黄色颗粒为主。结果根据阳性细胞百分比、染色强度综合判定。阳性细胞百分比:无阳性细胞0分,阳性细胞<10% 1分,阳性细胞10%~50% 2分,阳性细胞50%~75% 3分,阳性细胞≥75% 4分。染色强度判定:无色0分,淡黄色1分,棕黄色2分,棕褐色3分。通过上述两项评分的乘积来综合判定结果:0~3分为阴性(-),4~5分为弱阳性(+),6~7分为中度阳性(++),8~12分为强阳性(+++)。

1.3 观察指标

比较CIN、宫颈癌、正常宫颈黏膜上皮p16、Ki-67免疫组化结果;分析p16、Ki-67及两者联合检测鉴别诊断CIN、宫颈癌、正常宫颈黏膜上皮的敏感性、特异性及准确性。

1.4 统计学方法

采用SPSS 22.0软件进行统计分析;计数资料采用 $n(\%)$ 表示,行 χ^2 检验;不同组织p16、Ki-67表达采用秩和检验;以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CIN、宫颈癌、正常宫颈黏膜上皮中p16、Ki-67表达情况

在不同组织类型中,p16、Ki-67阳性表达率($P<0.05$)。CIN中,p16、Ki-67阳性表达率随CIN等级增加而上升($P<0.05$)。见表1。

2.2 p16、Ki-67及两者联合检测鉴别诊断CIN、宫颈癌的价值

p16鉴别诊断CIN、宫颈癌的敏感性与Ki-67比较差异无统计学意义($P>0.05$),但p16+Ki-67联合诊断的敏感性高于单独的p16、Ki-67检测,差异有

表1 CIN、宫颈癌、正常宫颈黏膜上皮中p16、Ki-67表达情况 [n(%)]

Table 1 expression of p16、Ki-67 in CIN, cervical cancer and normal cervical epithelium [n(%)]

组织类型 n	p16 表达强度				阳性 表达率 (%)	Z 值	P 值	Ki-67 表达强度				阳性 表达率	Z 值	P 值
	-	+	++	+++				-	+	++	+++			
正常宫颈 黏膜上皮	14 13(92.86)	1 7(7.14)	0 0(0.00)	0 0(0.00)	1 (7.14)	-2.06	0.039	10 (71.43)	3 (21.43)	1 (7.14)	0 0(0.00)	4 (28.57)		
CIN I 级	21 13(61.90)	5 23(81.25)	3 14(49.99)	0 0(0.00)	8 (38.10)			3 (14.29)	9 42(86.00)	7 33(80.95)	2 (9.52)	18 (85.71)	-3.34	0.001
CIN II 级	18 3(16.67)	8 44(44.44)	4 22(22.22)	3 16(67.74)	15 (83.33)			1 (5.56)	9 50(90.00)	6 33(83.33)	2 (11.11)	17 (94.44)		
CIN III 级	15 1(6.67)	6 40(80.00)	5 33(88.89)	3 20(80.00)	14 (93.33)			0 (0.00)	7 46(86.67)	5 33(88.89)	3 (20.00)	15 (100.00)		
宫颈癌	13 0(0.00)	6 46(84.62)	5 38(85.71)	2 15(37.50)	13 (100.00)			0 (0.00)	4 30(75.00)	6 46(86.67)	3 (23.08)	13 (100.00)		

统计学意义 ($\chi^2=6.500, 4.887, P=0.011, 0.027$)。三种检测方法的特异性数据比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见表2。

表2 p16、Ki-67 检测鉴别诊断 CIN、宫颈癌的价值 [n(%)]

Table 2 the value of p16, Ki-67 in differential diagnosis of CIN and cervical cancer [n(%)]

检测指标	临床结果		敏感性 (%)	特异性 (%)
	宫颈癌 (n=13)	CIN (n=54)		
p16	6(46.15)	52(96.30)	46.15	96.30
Ki-67	7(53.85)	48(88.89)	53.85	88.89
p16+Ki-67	12(92.31)	49(90.74)	92.31	90.84

2.3 3种检测方法效果评价

采用ROC曲线分析p16、Ki-67及两者联合检测对CIN、宫颈癌鉴别诊断价值,各指标曲线下面积分别为0.751、0.675及0.769,其中以联合检测的预测价值最佳。见图1。

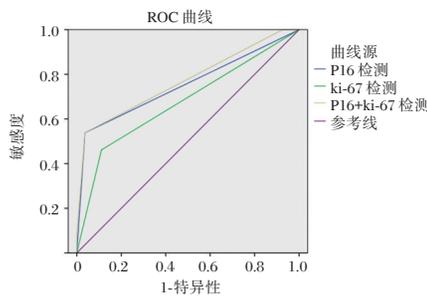


图1 3种检测方法的ROC曲线

Figure 1 ROC curve of 3 detection methods

3 讨论

宫颈癌又称为子宫颈癌,系指发生在宫颈阴道部或移行带的鳞状上皮细胞及宫颈内膜的柱状上皮细胞交界处的恶性肿瘤。相关研究显示,宫颈癌主要是由高危型HPV导致宫颈鳞状上皮发生异型增生引起,由CIN等癌前病变长期发展形成,但并非所有的CIN都会发展为癌,且CIN发展为癌的过程较长^[9]。因此,正确预测CIN的发展,对宫颈癌早期防治和预防CIN患者过度治疗具有重要意义。

过程较长^[9]。因此,正确预测CIN的发展,对宫颈癌早期防治和预防CIN患者过度治疗具有重要意义。

p16是在人染色体9p21中发现的一个直接参与细胞周期调控的抑癌基因。对于正常细胞的HPV一过性感染,检测不到p16表达;而在HPV转化性感染后,可使抑癌基因失活,致癌基因E6和E7过表达,细胞无限制增殖,引起p16的过度表达,并被免疫组化检测到^[10]。Ciesielska等^[11]报道指出,CIN和宫颈癌中网膜母细胞基因的失活会导致p16表达升高。本组研究结果提示p16高表达参与宫颈上皮内瘤变到癌的演进过程,故连续监测p16表达可有效反映宫颈黏膜病变进展情况。

Ki-67的表达出现于除G₀和G₁早期之外的细胞周期中,细胞有丝分裂后其蛋白含量迅速减少,是全面反映细胞群增殖活性的可靠指标^[12]。高度增生的细胞多与癌前病变组织及恶性组织相关,增生常被认为是生长紊乱的早期指标^[13]。Ki-67是目前已知的增殖抗原中最具增殖能力代表性,且应用广泛的细胞增殖标记之一^[14]。本组研究中,Ki-67阳性表达率随宫颈病变严重程度加重而增高,提示在宫颈癌发生发展过程中,细胞增殖活性也逐渐增强。因此Ki-67可作为预测CIN和宫颈癌发生、发展过程中的重要标记物。

Ovestad I等^[15]研究发现,增加p16免疫组化染色结合HE切片,可提高高级别CIN的诊断准确性、敏感性。病理学专家在诊断高级别CIN中,发现p16染色表现的重复性极好,可明显改善宫颈组织病理的常规诊断^[16]。本组研究结果发现p16+Ki-67联合诊断的敏感性高于单独的p16、Ki-67检测。由此可见单一的p16用于诊断宫颈病变误诊率较小,但存在一定漏诊率,因此认为p16染色不适用于早期发现宫颈病变。而单一的Ki-67在诊断宫颈病变上漏诊率较小,但误诊率高,而联合两种标记物能有效提高诊断的可靠性。

综上所述,p16、Ki-67 阳性表达率随宫颈病变严重程度加重而增高,两者联合检测可有效区分不同等级 CIN 及宫颈癌,可作为宫颈癌前病变进展的一个敏感标志物,能准确识别高级别 CIN 病变并及时治疗,阻断宫颈癌变进程,为临床早期预防、诊治宫颈癌前病变及宫颈癌提供了可靠的理论依据。

参考文献

- [1] Ziemke P, Griesser H. Indications for p16/Ki-67 in cervical cytology[J]. *Pathologe*, 2017, 46(3):1-7.
- [2] Celewicz A, Celewicz M, Weżowska M, et al. Clinical efficacy of p16/Ki-67 dual-stained cervical cytology in secondary prevention of cervical cancer[J]. *Polish J Pathol*, 2018, 69(1):42-47.
- [3] 宋明泽,程一鸣,李刚,等. p16/Ki-67 双染检测技术在宫颈癌及癌前病变筛查中的价值[J]. *国际肿瘤学杂志*, 2020, 47(11):675-681.
- [4] Da Costa LBE, Triglia RDM, Andrade LALDA. p16INK4a, Cytokeratin 7, and Ki-67 as Potential Markers for Low-Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia Progression [J]. *J Lower Gen Tract Dis*, 2017, 21(2):94-97
- [5] 许淑霞,林建松,詹燕美. p16/Ki-67 免疫细胞化学双染法对宫颈病变的筛查价值[J]. *中华病理学杂志*, 2018, 47(3):207-208.
- [6] 邓丁梅,叶娴,温润耀,等. ER、PR 以及 Ki-67 状态与乳腺癌新辅助化疗疗效的相关性[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2021, 13(01):83-86+90.
- [7] Ciavattini A, Sopracordevole F, Di Giuseppe J, et al. Cervical intraepithelial neoplasia in pregnancy: Interference of pregnancy status with p16 and Ki-67 protein expression [J]. *Oncol Lett*, 2017, 26(9):1686-1689.
- [8] Piaton E, Advenier AS, Carré, Christian, et al. p16/Ki-67 dual labeling and urinary cytology results according to the New Paris System for Reporting Urinary Cytology: Impact of extended follow-up[J]. *Cancer*, 2017, 54(10):106-107.
- [9] Rodríguez-TA, Martí C, Aida AM, et al. Value of HPV 16/18 Genotyping and p16/Ki-67 Dual Staining to Predict Progression to HSIL/CIN2+ in Negative Cytologies From a Colposcopy Referral Population[J]. *Am J Clin Pathol*, 2018, 68(5):5.
- [10] Das D, Sengupta M, Basu K, et al. Role of p16/Ki-67 Dual Immunostaining in Detection of Cervical Cancer Precursors [J]. *J Cytol*, 2018, 35(3):1654-1655.
- [11] Ciesielska U, Zatonki T, Nowinska K, et al. Expression of Cell Cycle-related Proteins p16, p27 and Ki-67 Proliferating Marker in Laryngeal Squamous Cell Carcinomas and in Laryngeal Papillomas[J]. *Ant Res*, 2017, 37(5):2407.
- [12] Han Q, Guo H, Geng L, et al. p16/Ki-67 dual-stained cytology used for triage in cervical cancer opportunistic screening[J]. *Chin J Cancer Res*, 2020, 32(2):208-217.
- [13] Maebayashi T, Ishibashi N, Aizawa T, et al. Roles of Ki-67 and p16 as biomarkers for unknown primary head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Eur Arch Oto-Rhino-Laryngol*, 2019, 276(4):1221-1229.
- [13] Kremer WW, Vink FJ, Zummeren MV, et al. Characterization of cervical biopsies of women with HIV and HPV co-infection using p16ink4a, ki-67 and HPV E4 immunohistochemistry and DNA methylation [J]. *Mod Pathol*, 2020(Suppl 1):S-868.
- [15] Ovestad IT, Dalen I, Hansen E, et al. Clinical value of fully automated p16/Ki-67 dual staining in the triage of HPV-positive women in the Norwegian Cervical Cancer Screening Program [J]. *Cancer Cytopathol*, 2017, 125(6):1563-1564.
- [16] Pirtea L, Secosan C, Margan M, et al. p16/Ki-67 dual staining has a better accuracy than human papillomavirus (HPV) testing in women under 30 years old [J]. *Bosnian J Basic Med Sci*, 2018, 19(4):4164-4166.

(上接第 908 页)

- [6] 中华医学会神经病学分会,中华医学会神经病学分会脑血管病学组. 中国急性缺血性脑卒中诊治指南 2018[J]. *中华神经科杂志*, 2018, 51(9):666-682.
- [7] Amalia L, Dalimonthe NZ. Clinical significance of Platelet-to-White Blood Cell Ratio (PWR) and National Institute of Health Stroke Scale (NIHSS) in acute ischemic stroke [J]. *Heliyon*, 2020, 6(10):e05033.
- [8] 郭连峰,牟娜,刘兆玮,等. 老年急性脑梗死患者血清 CRP、VEGF 及 YKL-40 水平动态变化及相关性[J]. *中国老年学杂志*, 2020, 40(1):14-19.
- [9] Yamal JM, Hannay HJ, Gopinath S, et al. Glasgow Outcome Scale Measures and Impact on Analysis and Results of a Randomized Clinical Trial of Severe Traumatic Brain Injury [J]. *J Neurotrauma*, 2019, 36(17):2484-2492.
- [10] 吴远华,张艺凡. 急性脑梗死早期中西医结合诊疗方案贵州专家共识[J]. *贵州中医药大学学报*, 2021, 43(1):98-102.
- [11] 翟夏音. 急性脑梗死患者血清 VEGF、VILIP-1、sCD40L、Aβ1-42 蛋白变化与认知功能损害的相关性[J]. *淮海医药*, 2020, 38(5):453-456, 460.
- [12] 安宏娜,陈玮,吾红光,等. 急性脑梗死患者血清 AQP1、AQP4、VEGF 表达与脑水肿严重程度的关系[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2019, 27(11):956-959+964.
- [13] 李占增,任英巧,伍淑玲,等. hs-CRP、NF-κB、VCAM-1 与缺血性脑血管病病情及预后关系[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2020, 12(8):1034-1038.
- [14] 秦爽,霍豆,邢瑞青,等. 血清 VEGF、SAA、hs-CRP 联合检测对急性脑梗死的诊断价值[J]. *国际检验医学杂志*, 2019, 40(2):222-225.
- [15] 陈琼,凌文通,韩登科,等. MMP-9、WBC、Glu 和 HbA1C 在急性脑梗死中的表达及其临床意义[J]. *岭南急诊医学杂志*, 2019, 24(2):133-135.

Nupr1、HE4 及 AFP 表达与卵巢癌病理参数、预后生存的关系

陈燕萍 陈婧 洪丽玲 陈慧*

【摘要】目的 分析核蛋白1(Nupr1)、人附睾蛋白4(HE4)及甲胎蛋白(AFP)与卵巢癌病理参数、预后生存的关系。**方法** 分析2015年1月至2018年12月本院收治的90例卵巢癌和80例卵巢良性病变患者临床资料,分别作为卵巢癌组和良性病变组。比较2组Nupr1、HE4及AFP表达,记录所有卵巢癌患者临床病理特征及预后生存情况,使用Logistic回归模型分析影响卵巢癌患者预后生存的独立危险因素。**结果** 卵巢癌组Nupr1、HE4及AFP阳性表达率均高于良性病变组,差异有统计学意义($P<0.05$)。FIGO分期:Ⅲ+Ⅳ期、分化程度:低分化者Nupr1、HE4及AFP阳性表达率均高于FIGO分期:I+Ⅱ期、分化程度:中高分化者,差异有统计学意义($P<0.05$)。随访2年结果显示:90例卵巢癌患者死亡51例,存活39例,存活率为43.33%。生存组与死亡组两组FIGO分期、组织分化程度、淋巴转移情况及Nupr1、HE4和AFP阳性表达比较差异有统计学意义($P<0.05$)。存在淋巴转移、Nupr1、HE4和AFP阳性为影响卵巢癌患者预后生存的独立危险因素($P<0.05$)。**结论** Nupr1、HE4及AFP在卵巢癌患者中呈高表达状态,三者异常表达与患者临床病理特征及预后生存有密切关系,可作为预测患者预后生存的有效指标。

【关键词】 Nupr1; HE4; AFP; 卵巢癌

Relationship between the expressions of Nupr1, HE4 and AFP and the pathological parameters, prognosis and survival of ovarian cancer

CHEN Yanping, CHEN Jing, HONG Liling, CHEN Hui*

(Department of Obstetrics and Gynecology, No.909 Hospital of PLA Joint Logistics Support Force, Zhangzhou, Fujian, China, 363000)

【ABSTRACT】 Objective To analyze the relationships between the expressions of nuclear protein 1 (Nupr1), human epididymis protein 4 (HE4) and alpha fetoprotein (AFP), pathological parameters and prognosis survival of patients with ovarian cancer. **Methods** The clinical data of 90 patients with ovarian cancer and 80 patients with benign ovarian lesions admitted to this hospital from January 2015 to December 2018 were analyzed and selected as the ovarian cancer group and the benign lesion group, respectively. The expressions of Nupr1, HE4 and AFP were compared between 2 groups. The clinicopathological features and prognosis survival of all patients with ovarian cancer were recorded, and the logistic regression model was used to analyze the independent risk factors affecting the prognosis survival of patients with ovarian cancer. **Results** The positive expression rates of Nupr1, HE4 and AFP in the ovarian cancer group were all significantly higher than those in the benign lesion group, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). The positive expression rates of Nupr1, HE4 and AFP in patients who were at Ⅲ + Ⅳ in FIGO staging with lower differentiation were higher than those in patients who were at I + Ⅱ in FIGO staging with moderate to higher differentiation, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). The follow-up results showed that in the 90 patients with ovarian cancer, 51 died and 39 survived, the survival rate was 43.33%. There were statistically significant differences between the survival group and the death group in FIGO stage, degree of tissue differentiation, lymphatic metastasis, and the positive expression of Nupr1, HE4 and AFP ($P<0.05$).

基金项目:福建省科技厅计划项目(2014Y3115)

作者单位:中国人民解放军联勤保障部队第九〇九医院妇产科,福建,漳州 363000

*通信作者:陈慧, E-mail:chenhui175@163.com

The presence of lymphatic metastasis and positive Nupr1, HE4 and AFP are independent risk factors affecting the prognosis survival of patients with ovarian cancer ($P<0.05$). **Conclusion** Nupr1, HE4 and AFP are highly expressed in patients with ovarian cancer. The abnormal expressions of the three is closely related to the clinical pathological features and prognosis and survival of patients, and can be used as effective indicators for predicting the prognosis survival of patients.

[KEY WORDS] Nupr1; HE4; AFP; Ovarian cancer

卵巢癌是女性生殖系统常见的恶性肿瘤,近年来随着研究的深入,卵巢恶性肿瘤的基础研究和临床诊治方面均取得很大的进展,但其5年生存率仍未见明显提高^[1]。肿瘤的转移和复发在卵巢癌发展中起着至关重要的作用。核蛋白1(nuclear protein 1, Nupr1)是一种高碱性、多功能的小分子蛋白质,参与促进细胞生长和再生的应激反应,多项研究均检测出其在恶性肿瘤患者中存在高表达现象^[2]。人附睾蛋白4(human epididymis protein 4, HE4)和胎蛋白(alpha fetoprotein, AFP)作为常见的肿瘤相关标志物,在卵巢癌的诊治和预后生存评估中的作用引发热议^[3]。本研究就Nupr1、HE4及AFP表达与卵巢癌病理参数、预后生存生存的关系进行分析,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2015年1月至2018年12月本院收治的90例卵巢癌和80例卵巢良性病变患者,分别作为卵巢癌组和良性病变组。纳入标准:①卵巢癌组满足卵巢癌诊疗标准^[4];②良性病变组满足卵巢良性病变诊疗标准^[5];③临床及随访资料完整者。排除标准:①伴有严重的免疫系统疾患、血液循环系统障碍以及结缔组织疾病者;②既往存在生殖系统手术史者;③入组前存在子宫放化疗史者。两组一般资料比较差异无统计学意义($P>0.05$),见表1。本研究经医院伦理委员会批准,所有研究对象均知情同意。

表1 两组一般资料比较($\bar{x}\pm s$)

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

组别	n	平均年龄(岁)	体质指数(kg/m ²)	孕次(次)	产次(次)
卵巢癌组	90	54.16±4.25	22.10±2.54	2.25±1.03	1.57±0.49
良性病变组	80	54.30±4.33	22.16±2.55	2.28±1.01	1.59±0.41
t值	-	0.212	0.153	0.191	0.287
P值	-	0.832	0.878	0.849	0.775

1.2 检测方法

1.2.1 Nupr1 蛋白检测

Nupr1 蛋白检测试剂盒购自北京中杉生物技术

公司,操作严格按照试剂盒说明书进行。Nupr1 蛋白在乳腺癌中显示胞浆、胞核着棕黄色颗粒;采用Volm双评分法进行判定,在染色均匀的肿瘤区,选取5个高倍镜视野($\times 400$):按阳性细胞百分率(A值)评分:1分,2分,3分;按染色强度(B值)评分:不着色为0分,浅棕黄色为1分,棕黄色为2分,棕褐色为3分。综合染色阳性细胞数与染色强度判断结果:阴性(-):0分,弱阳性(+):1~2分,中度阳性(++):3~4分,强阳性(+++):5~6分;两种计分的乘积为每例的加权分数,加权分数为0为阴性,其余均为阳性^[5]。

1.2.2 HE4 及 AFP 检测

采用电化学发光法检测,仪器选择Elec-sys2010罗氏自动电化学发光分析仪,试剂盒购自上海罗氏诊断产品有限公司,严格按照说明书进行操作。血清HE4阳性标准为 >140 pmol/mL,AFP阳性标准为 >55 U/L^[6-7]。

1.3 随访方法

所有卵巢癌病例主要是住院或门诊复查,小部分采用电话方式随访观察。随访时间为2年,随访截止于死亡或到2020年12月31日。

1.4 统计学分析

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,影响卵巢癌患者预后生存的相关因素采用非条件单因素和多因素Logistic回归模型分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组 Nupr1、HE4 及 AFP 表达比较

卵巢癌组Nupr1、HE4及AFP阳性表达率均高于良性病变组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表2。

2.2 不同临床病理特征患者 Nupr1、HE4 及 AFP 表达情况

FIGO分期:Ⅲ+Ⅳ期、分化程度:低分化者Nupr1、HE4及AFP阳性表达率均高于FIGO分期:I+Ⅱ期、分化程度:中高分化者,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表3。

表2 2组Nupr1、HE4及AFP表达比较 [n(%)]

Table 2 Comparison of expression of nupr1, HE4 and AFP in two groups [n(%)]

组别	n	Nupr1		HE4		AFP	
		阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性
卵巢癌组	90	76(84.44)	14(15.56)	7(83.33)	15(16.67)	70(77.78)	20(22.22)
良性病变组	80	11(13.75)	69(86.25)	7(8.75)	73(91.25)	16(20.00)	64(80.00)
χ^2 值	-	84.714		103.574		56.562	
P值	-	<0.001		<0.001		<0.001	

表3 不同临床病理特征患者Nupr1、HE4及AFP表达情况 [n(%)]

Table 3 expression of nupr1, HE4 and AFP in patients with different clinicopathological characteristics [n(%)]

临床特征	例数 (n=90)	Nupr1		χ^2 值	P值	HE4		χ^2 值	P值	AFP		χ^2 值	P值	
		阳性 (n=76)	阴性 (n=14)			阳性 (n=75)	阴性 (n=15)			阳性 (n=70)	阴性 (n=20)			
年龄(岁)	≤65	56	47(61.84)	9(64.59)	0.030	0.862	47(62.67)	9(60.00)	0.038	0.846	44(62.86)	12(60.00)	0.054	0.816
	>65	34	29(38.16)	5(35.71)			28(37.33)	6(40.00)			26(37.14)	8(40.00)		
FIGO分期	I+II	40	38(50.00)	2(14.29)	6.107	0.013	38(50.67)	2(13.33)	6.627	0.010	36(51.43)	4(20.00)	6.223	0.013
	III+IV	50	38(50.00)	12(85.71)			37(49.33)	13(86.67)			34(48.57)	16(80.00)		
分化程度	中高分化	44	31(40.79)	13(92.86)	12.827	<0.001	31(41.33)	13(86.67)	10.281	0.001	26(37.14)	18(90.00)	17.393	<0.001
	低分化	46	45(59.21)	1(7.14)			44(58.67)	2(13.33)			44(62.86)	2(10.00)		
病理类型	浆液性癌	30	25(32.89)	5(35.71)	0.662	0.882	26(34.67)	4(26.67)	0.583	0.900	25(35.71)	5(25.00)	0.939	0.816
	粘液性癌	25	22(28.95)	3(21.43)			20(26.67)	5(33.33)			19(27.14)	6(30.00)		
	透明细胞癌	21	18(23.68)	3(21.43)			17(22.67)	4(26.67)			16(22.86)	5(25.00)		
组织分化程度	子宫内样癌	14	11(14.47)	3(21.43)	0.110	0.740	12(16.00)	2(13.33)	0.458	0.498	10(14.29)	4(20.00)	0.013	0.908
	G1-G2	55	47(61.84)	8(57.14)			47(62.67)	8(53.33)			43(61.43)	12(60.00)		
G3	35	29(38.16)	6(42.86)	28(37.33)	7(46.67)	27(38.57)	8(40.00)							

2.3 96例卵巢癌患者预后生存情况

截至随访2年结束,90例卵巢癌患者死亡51例,存活39例,存活率为43.33%。

2.4 影响卵巢癌患者预后生存单因素分析

经非条件单因素 Logistic 回归模型分析,生存组与死亡组年龄、病理类型、有无腹水者比较差异无统计学意义(P>0.05),两组 FIGO 分期、组织分化程度、淋巴转移情况及 Nupr1、HE4 和 AFP 阳性表达比较差具有统计学意义(P<0.05)。见表4。

2.5 影响卵巢癌患者预后生存多因素分析

经非条件多因素 Logistic 回归模型分析,存在淋巴转移、Nupr1、HE4 和 AFP 阳性为影响卵巢癌患者预后的独立危险因素(P<0.05)。见表5。

3 讨论

中国最新卵巢癌发病与死亡数据分析显示,卵巢癌发病率约为6.47/10万,死亡率约为2.74/10万^[8]。本研究中90例卵巢癌患者截止随访2年结束,生存率仅为43.33%,如何提高卵巢癌患者生存时间已成为临床关注焦点。流行病学研究表明,妇科炎症、多囊卵巢综合征和子宫内膜异位症是卵巢癌发生的危险因素^[9]。

表4 影响卵巢癌患者预后生存单因素分析 [n(%)]

Table 4 single factor analysis on prognosis of patients with ovarian cancer [n(%)]

临床特征	例数 (n=90)	生存 (n=39)	死亡 (n=51)	χ^2 值	P值	
年龄(岁)	≥60	56	24(61.54)	32(62.75)	0.014	0.907
	<60	34	15(38.46)	19(37.25)		
FIGO分期	I+II	40	28(71.79)	12(23.53)	20.851	<0.001
	III+IV	50	11(29.48)	39(76.47)		
分化程度	中高分化	44	27(69.23)	17(33.33)	11.397	0.001
	低分化	46	12(30.77)	34(66.67)		
Nupr1	阳性	76	37(94.87)	39(76.71)	5.697	0.017
	阴性	14	2(5.13)	12(23.53)		
HE4	阳性	75	36(92.31)	39(76.71)	3.991	0.046
	阴性	15	3(7.69)	12(23.53)		
AFP	阳性	70	26(66.67)	44(86.27)	4.916	0.027
	阴性	20	13(33.33)	7(13.73)		
淋巴转移	有	53	18(46.16)	35(68.63)	4.610	0.032
	无	37	21(53.84)	16(31.37)		
腹水	有	30	12(30.77)	18(35.29)	0.204	0.652
	无	60	27(69.23)	33(64.71)		
病理类型	浆液性癌	30	13(33.33)	17(33.33)	0.493	0.921
	粘液性癌	25	11(28.21)	14(27.45)		
	透明细胞癌	21	8(20.51)	13(25.49)		
	子宫内膜样癌	14	7(17.95)	7(13.73)		

Nupr1 为一种广泛分布于体内的应激诱导蛋白,具有转录活性,可通过参与不同的胞内信号途径发挥不同的功能,并且已有大量研究证实其在多

表5 影响卵巢癌患者预后生存多因素分析

Table 5 multivariate analysis of prognostic factors in patients with ovarian cancer

影响因素	回归系数	标准误	Wald χ^2 值	OR 值	95%CI	P 值
FIGO 分期(Ⅲ+Ⅳ期 vs Ⅰ+Ⅱ期)	0.856	0.747	4.622	2.354	0.544~10.177	0.155
分化程度(低分化 vs 中高分化程度)	0.812	0.709	4.150	2.252	0.561~9.040	0.263
淋巴转移(有 vs 无)	0.928	0.184	4.141	2.529	1.764~3.628	<0.001
Nupr1(阳性 vs 阴性)	0.778	0.120	4.289	2.177	1.721~2.754	<0.001
HE4(阳性 vs 阴性)	0.797	0.241	4.326	2.29	1.384~3.559	<0.001
AFP(阳性 vs 阴性)	1.069	0.153	4.078	2.912	2.158~3.931	<0.001

种肿瘤的发生、发展和转移过程起重要作用^[10]。不同类型的恶性肿瘤细胞, Nupr1 调控细胞增殖能力有所不同。Patricia 等^[11]研究发现, Nupr1 可以在人类乳腺癌发展的早期发挥促进肿瘤生长的作用, 且与乳腺癌转移及预后生存不良相关, 这提示 Nupr1 可能是促进肿瘤细胞向远处转移生长的关键蛋白。本研究结果提示 Nupr1 在卵巢癌中具有促肿瘤作用, 其可能是肿瘤治疗的潜在靶点。

HE4 是 B7 家族成员, 是一种与附睾和生殖特异度相关的蛋白, 也是近年发现的新型卵巢癌标志物^[12]。一般情况下, 血清 HE4 在正常成人中的表达水平较低, 恶性肿瘤由于基因转录调控发生异常, 沉默基因异常活跃, 导致早期沉默的 HE4 基因开始转录和翻译, 表现为其表达状态的异常^[13]。AFP 是胚胎时期由卵黄囊产生的一种特殊糖蛋白, 是胎儿血清最常见的组成成分。当卵巢癌发生时, AFP 基因被肿瘤细胞激活, 血清内 AFP 浓度升高, 其体内水平含量的高低与肿瘤生物学特性、分化程度及病情的发展程度均具有一定的相关性。有关学者认为, AFP 可作为诊断卵巢癌主要的特异性生化指标。本研究结果 Logistic 回归模型分析提示 Nupr1、HE4 和 AFP 在卵巢癌中过表达可能参与癌细胞转移和侵袭, 促进卵巢癌进展。

综上所述, Nupr1、HE4 及 AFP 在卵巢癌患者中呈高表达状态, 三者异常表达与患者临床病理特征及预后生存有密切关系, 可作为预测患者预后生存的有效指标。

参考文献

[1] 徐文莉, 林燕华, 罗艺, 等. 上皮性卵巢癌血浆中 microRNA-30a-5p 含量与分级及分期的关系[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2017, 9(6):381-385.

[2] Ridings-Figueroa R, Stewart ER, Nesterova TB, et al. The nuclear matrix protein CIZ1 facilitates localization of Xist RNA to the inactive X-chromosome territory[J]. Gen Devel,

2017, 31(9):876.

- [3] Hirata K, Nambara T, Kawatani K, et al. 4-Phenylbutyrate ameliorates apoptotic neural cell death in Down syndrome by reducing protein aggregates[J]. Sci Rep, 2020, 10(1):14047.
- [4] Coburn SB, Bray F, Sherman ME, et al. International patterns and trends in ovarian cancer incidence, overall and by histologic subtype[J]. Int J Cancer, 2017, 140(11):2451-2460.
- [5] Tyulyandina A, Harrison D, Yin W, et al. Alofanib, an allosteric FGFR2 inhibitor, has potent effects on ovarian cancer growth in preclinical studies [J]. Invest New Drugs, 2017, 35(2):1-7.
- [6] Wang F, Wang Z, Gu X, et al. miR-940 Upregulation Suppresses Cell Proliferation and Induces Apoptosis by Targeting PKC- δ in Ovarian Cancer OVCAR3 Cells[J]. Oncol Res Featur Precl Clin Cancer Ther, 2017, 25(1):107-114.
- [7] Aslan D, Karabacak RO, Aslan OD. Maternal serum alpha-fetoprotein levels are normal in Fanconi anemia: Can it be a lack of postnatal inhibition of AFP gene resulting in the elevation?[J]. Pediatr Blood Cancer, 2017, 56(89):417-422.
- [8] 杨东, 杨宇, 白云波, 等. 卵巢癌组织 ERCC1, Vimentin 表达与临床病理特征及预后的关系分析[J]. 现代生物医学进展, 2020, 20(5):72-75+119.
- [9] 乔爱琪, 刘青华, 郝彦凤, 等. OCT-4、CD117 表达与卵巢癌临床病理特征及预后的关系[J]. 肿瘤研究与临床, 2018, 30(8):516-520.
- [10] Kollároví G, Topping CE, Shaw EP, et al. The human HELLS chromatin remodelling protein promotes end resection to facilitate homologous recombination and contributes to DSB repair within heterochromatin [J]. Nucleic Acids Res, 2019, 12(4):4-9.
- [11] Piek A, Meijers WC, Schrotten NF, et al. HE4 Serum Levels Are Associated with Heart Failure Severity in Patients With Chronic Heart Failure[J]. J Card Fail, 2017, 56(41):857-859.
- [12] Wymer KM, Daneshmand S, Pierorazio PM, et al. Mildly elevated serum alpha-fetoprotein (AFP) among patients with testicular cancer may not be associated with residual cancer or need for treatment[J]. Ann Oncol, 2017, 56(42):899-902.
- [13] 徐雁飞, 聂敦利, 曾敏. 卵巢癌患者血清 HB-EGF 水平及与临床病理参数和预后的关系[J]. 中国妇幼保健, 2020, 35(10):157-160.

CDK8、CXCL13及REG γ 在子宫内膜癌组织中的表达及临床意义

哈斯图雅¹ 钗丽干² 崔山丹¹ 夏书琴^{1*}

[摘要] 目的 研究周期蛋白依赖性蛋白激酶8(CDK8)、趋化因子13(CXCL13)及蛋白酶体激活因子11S调节蛋白复合物 γ 亚单位(REG γ)表达与子宫内膜癌(EC)病理特征关系及其对预后生存的预测价值。方法 收集90例EC患者的临床资料作为研究组,另选取同期本院健康体检者78例作为对照组,分析CDK8、CXCL13及REG γ 表达与EC临床病理特征、预后生存的关系。结果 研究组CDK8、CXCL13及REG γ 阳性表达率均高于对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。DK8、CXCL13、REG γ 的阳性表达者分别和DK8、CXCL13、REG γ 的阴性表达者分化程度、淋巴结转移、病理类型、肌层浸润深度及临床分期比较差异均具有统计学意义($P<0.05$)。术后对患者进行1年随访,死亡17例(18.89%)。多元Logistic回归分析结果显示,CDK8、CXCL13及REG γ 阳性表达是影响EC患者预后死亡的独立危险因素($P<0.05$)。ROC结果显示,CDK8、CXCL13及REG γ 单项检测曲线下面积(AUC)分别为0.614、0.754、0.654,联合检测AUC为0.769,较单独检测高。结论 CDK8、CXCL13及REG γ 在EC中阳性表达率高,推测CDK8、CXCL13及REG γ 参与了EC组织增生、分化及发展过程,临床上可通过检测三者表达情况对患者病情进展及预后进行评估。

[关键词] CDK8; CXCL13; CXCL13; 子宫内膜癌

Aberrant expression and clinical significance of CDK8, CXCL13 and REG γ in endometrial carcinoma

HASITUYA¹, CHAI Ligan², CUI Shandan¹, XIA Shuqin^{1*}

(1. Department of Obstetrics and Gynecology, Inner Mongolia People's Hospital, Hohhot, Inner Mongolia, China, 010017; 2. Department of Pathology, Inner Mongolia People's Hospital, Hohhot, Inner Mongolia, China, 010017)

[ABSTRACT] **Objective** To study the relationship between the expression of cyclin-dependent protein kinase8 (CDK8), Chemokine CXC ligand13 (CXCL13) and 11S regulator complex gamma subunit (REG γ) and the pathological characteristics of endometrial cancer (EC) and to study its predictive value for prognostic survival. **Method** The clinical data of 90 EC patients were collected as the study group, and 78 patients who underwent physical examination in our hospital during the same period were selected as the control group. The relationship between the expression of CDK8, CXCL13 and REG γ and EC clinicopathological characteristics, prognosis survival was analyzed. **Result** The positive expression rates of CDK8, CXCL13 and REG γ in the study group were higher than those in the control group, the difference is statistically significant ($P<0.05$). The differences in the degree of differentiation, lymph node metastasis, pathological type, depth of myometrial invasion, and clinical stage between patients with the positive CDK8, CXCL13 and REG γ and patients with the negative CDK8, CXCL13 and REG γ were statistically significant ($P<0.05$). The patients were followed up for 1

基金项目:内蒙古自治区自然科学基金(2016MS0843)

作者单位:1. 内蒙古自治区人民医院妇产科,内蒙古,呼和浩特 010017

2. 内蒙古自治区人民医院病理科,内蒙古,呼和浩特 010017

*通信作者:夏书琴, E-mail: xiashuqin.h@163.com

year after the operation, and 17 cases (18.89%) died. Multivariate logistic regression analysis showed that the low-to-medium tumor differentiation, clinical stage III, combined lymph node metastasis, the positive expression of CDK8, CXCL13 and REG γ were independent risk factors affecting the prognosis death of patients with EC ($P<0.05$). ROC results showed that the area under curve (AUC) of CDK8, CXCL13, and REG γ alone were 0.614, 0.754, and 0.654, respectively, and the AUC of combined detection was 0.769, which was significantly higher than that of the single detection. **Conclusion** The positive expression rate of CDK8, CXCL13 and REG γ in EC is high. It is speculated that CDK8, CXCL13 and REG γ are involved in the proliferation, differentiation, and development of EC tissues. Clinically, the progression and prognosis of patients can be evaluated by detecting the expression of the three indicators.

[KEY WORDS] CDK8; CXCL13; CXCL13; Endometrial cancer

子宫内膜癌(Endometrial Carcinoma, EC)为女性生殖系统三大恶性肿瘤之一,近年来发病率和病死率均有上升趋势,对女性生命健康造成严重威胁^[1]。寻找EC早期诊断及侵袭转移相关的分子标志物尤其重要^[2]。既往研究发现,EC增殖、转移及扩散与周期蛋白依赖性蛋白激酶(cyclin-dependent protein kinases, CDKs)表达情况密切相关,CDKs在细胞增殖与分化中具有调控作用^[3]。趋化因子13(Chemokine CXC ligand13, CXCL13)是CXC类趋化因子家族的一员,在多种恶性肿瘤发生、发展中具有重要作用^[4]。蛋白酶体激活因子11S调节蛋白复合物 γ 亚单位(11S regulator complex gamma subunit, REG γ)则是一种定位于细胞核内的蛋白质,与细胞生长调控存在密切联系^[5]。基于此,本研究通过检查EC患者CDK8、CXCL13及REG γ 的水平,旨在探讨上述因子水平在EC中的表达及临床意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取本院2015年6月至2019年6月的90例EC患者作为研究组。纳入标准:①均符合子宫内膜癌诊断标准^[6];②临床资料无缺损或丢失;③入组时未接受任何治疗,包括药物、放疗及化疗等;④主要脏器功能正常,无严重心、肝肾功能障碍;⑤年龄30~80岁。排除标准:①患有其他恶性肿瘤患者;②癌症转移;③近期使用抗焦虑、抑郁等药物者;④存在认知功能障碍者。平均年龄(48.56 \pm 6.77)岁;病程平均(3.79 \pm 2.58)年;临床分期:I期50例,II期19例,III期21例;有淋巴结转移者22例;分化程度:高分化65例,中低分化25例。收集同期接受健康体检的志愿者78例纳入对照组,平均年龄(47.89 \pm 5.46)岁,两组一般资料比较差异无

统计学意义($P>0.05$)。本研究经过医院伦理委员会批准通过,所有受试者均签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 试剂

鼠抗人CDK8、CXCL13及REG γ 单克隆抗体购自北京中杉金桥生物工程有限公司;SP免疫组织化学系列工作液试剂盒、DAB显色剂购自河北博海生物有限公司。

1.2.2 染色方法

所有标本手术切除后立即用10%甲醛固定,组织切片后脱蜡、水化。根据链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶(Streptomycin avidin peroxidase, S-P)免疫组化染色法对CDK8、CXCL13及REG γ 水平进行检测,具体方法严格按照试剂盒说明执行。每批切片染色均以PBS代替一抗作阴性对照,CDK8、CXCL13及REG γ 用已知阳性表达的组织切片作阳性对照。一抗稀释比例均为1:100。

1.2.3 结果判断^[7]

CDK8呈细胞膜着色,CXCL13呈细胞质或细胞膜着色,REG γ 呈细胞核着色,根据阳性细胞百分比、染色强度判定。无阳性细胞0分,阳性细胞<10% 1分,阳性细胞10%~50% 2分,阳性细胞>50% 3分。染色强度判定:无色0分,淡黄色1分,棕黄色2分,棕褐色3分。总积分:上述2项评分的乘积。阳性:总积分 \geq 3分。

1.3 观察指标

①比较对照组与研究组CDK8、CXCL13及REG γ 蛋白表达情况。②分析CDK8、CXCL13及REG γ 表达与EC临床病理特征的关系。③对患者进行1年电话随访,分析其预后生存与死亡情况,并影响EC患者预后死亡的独立危险因素。④分析CDK8、CXCL13及REG γ 蛋白表达对EC患者预后预测价值。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析,计数资料以 $n(\%)$ 表示,采用 χ^2 检验;计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,采用 t 检验;采用多元 Logistic 回归分析影响 EC 患者预后生存的独立危险因素;采用 ROC 曲线分析 CDK8、CXCL13 及 REG γ 对 EC 患者预后死亡的预测价值;以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组 CDK8、CXCL13 及 REG γ 蛋白表达比较

研究组 CDK8、CXCL13 及 REG γ 阳性表达率均高于对照组,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 CDK8、CXCL13 及 REG γ 蛋白表达与 EC 临床病理特征的关系

CDK8、CXCL13 的阳性表达者在年龄、肿瘤直径比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), CDK8、CXCL13 的阳性表达者在分化程度、淋巴结转移、病理类型、肌层浸润深度及临床分期比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。REG γ 的阳性表达者年龄、肿瘤直径、分化程度及临床分期比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), REG γ 的阳性表达

者在淋巴结转移、病理类型及肌层浸润深度比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。

2.3 影响 EC 患者预后死亡的危险因素分析

术后对患者进行 1 年随访,其中死亡 17 例,死亡率为 18.89%。多元 Logistic 回归分析结果显示,肿瘤分化程度中低、临床分期 III、合并淋巴结转移、CDK8、CXCL13 及 REG γ 阳性表达是影响胃癌患者预后死亡的独立危险因素 ($P < 0.05$)。见表 3。

2.4 CDK8、CXCL13 及 REG γ 单项及联合检测对 EC 患者预后生存的预测价值

ROC 结果示,CDK8、CXCL13 及 REG γ 联合检测 AUC 为 0.769,较单独检测高。见表 4、图 1。

3 讨论

EC 是临床妇科最常见的恶性肿瘤之一。其发病率已有超过宫颈癌的趋势^[8]。恶性肿瘤的发生、发展及浸润转移是由各种信号传导、趋化因子、转录因子等途径共同实现,因此,寻找识别 EC 发展相关的新型因子及预测预后的标志物是近年来研究的热点^[9]。

CDK8 是细胞周期依赖性蛋白激酶 (Cell cycle dependent protein kinase, CDK) 家族中的一员,目

表 1 两组 CDK8、CXCL13 及 REG γ 蛋白表达比较 [$n(\%)$]

Table 1 Comparison of Cdk8, CXCL13 and reg γ protein expression between 2 groups [$n(\%)$]

组别	n	CDK8		CXCL13		REG γ	
		阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性
研究组	90	76(84.44)	14(15.56)	57(63.33)	33(36.67)	70(77.78)	20(22.22)
对照组	78	10(12.82)	68(87.18)	0(0.00)	78(100.00)	16(20.51)	62(79.49)
χ^2 值		85.793		74.768		54.842	
P 值		<0.001		<0.001		<0.001	

表 2 CDK8、CXCL13 及 REG γ 蛋白表达与 EC 临床病理特征的关系 [$n(\%)$]

Table 2 the relationship between the expression of Cdk8, CXCL13 and reg γ and the clinicopathological features of EC [$n(\%)$]

临床病理特征	n	CDK8 阳性 (n=76)		CXCL13 阳性 (n=57)		REG γ 阳性 (n=70)			
		χ^2 值	P 值	χ^2 值	P 值	χ^2 值	P 值		
年龄(岁)	<50	41	34(44.74)	25(43.86)	0.180	0.671	37(52.86)	1.339	0.247
	≥ 50	49	42(55.26)	32(56.14)			33(47.14)		
肿瘤直径(cm)	<4	33	27(35.53)	17(29.82)	3.134	0.077	29(41.43)	0.228	0.633
	≥ 4	57	49(64.47)	40(70.18)			41(58.57)		
分化程度	高	65	51(67.11)	36(63.16)	6.367	0.012	58(82.86)	2.558	0.110
	低~中	25	25(32.89)	21(36.84)			12(17.14)		
淋巴结转移	有	22	22(28.95)	20(35.09)	9.353	0.002	22(31.43)	4.916	0.027
	无	68	54(71.05)	37(64.91)			48(68.57)		
病理类型	鳞癌	45	44(57.89)	40(70.18)	25.311	<0.001	41(58.57)	9.257	0.002
	腺癌	45	32(42.11)	17(29.82)			29(41.43)		
肌层浸润深度(cm)	<1/2	27	17(22.37)	9(15.79)	14.949	<0.001	10(14.29)	37.041	<0.001
	$\geq 1/2$	63	59(77.63)	48(84.21)			60(85.71)		
临床分期	I~II 期	69	55(72.37)	37(64.91)	12.007	<0.001	53(75.71)	0.160	0.689
	III 期	21	21(27.63)	20(35.09)			17(24.29)		

表3 影响EC患者预后死亡的危险因素分析

Table 3 Analysis of risk factors influencing the prognosis of EC patients

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:≥50岁(参照组:<50岁)	1.250	0.871~1.793	0.697	-	-	-
肿瘤直径:≥3cm(参照组:<3cm)	1.260	0.850~1.868	0.514	-	-	-
肿瘤分化程度:中低(参照组:高)	1.644	1.312~2.059	0.014	1.866	1.354~3.408	<0.001
TNM分期:Ⅲ(参照组:I~Ⅱ)	1.650	1.289~2.113	0.023	2.044	1.260~3.317	<0.001
淋巴结转移:有(参照组:无)	1.398	1.062~1.839	0.021	2.040	1.313~3.171	<0.001
病理类型:磷癌(参照组:腺癌)	1.106	0.754~1.594	0.357	-	-	-
肌层浸润深度:≥1/2(参照组:<1/2)	1.121	0.756~1.662	0.541	-	-	-
CDK8阳性(参照组:阴性)	1.960	1.595~2.048	0.007	1.826	1.193~2.794	<0.001
CXCL13阳性(参照组:阴性)	1.692	1.269~2.257	0.002	1.763	1.014~3.064	<0.001
REGγ阳性(参照组:阴性)	1.571	1.253~1.970	0.014	1.902	1.949~3.401	<0.001

表4 CDK8、CXCL13及REGγ单项及联合检测对EC患者预后生存的预测价值

Table 4 the prognostic value of Cdk8, CXCL13 and reg γ single and combined detection in EC patients

预测因子	敏感度(%)	特异度(%)	AUC	95%CI
CDK8	0.614	0.523	0.627	0.467~0.786
CXCL13	0.754	0.851	0.773	0.638~0.908
REGγ	0.654	0.724	0.675	0.519~0.831
三者联合	0.964	0.813	0.769	0.623~0.914

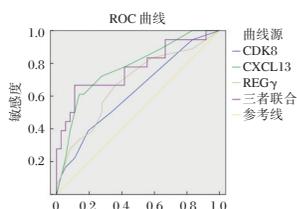


图1 CDK8、CXCL13及REGγ单项及联合检测曲线分析
Figure 1 Analysis of single and combined detection curves of Cdk8, CXCL13 and reg γ

前CDK8基因发挥致癌作用的机制尚未十分明确^[10]。但国外已有较多研究表明,CDK8表达异常在恶性黑色素瘤、结直肠癌、胃癌的发生中起到重要作用^[11]。而鲜有关于CDK8表达与宫颈癌发生发展关系的相关研究。本组研究结果与Remy等^[12]研究结果报道相符。进一步多元Logistic回归分析影响EC患者预后死亡的危险因素发现,CDK8阳性表达亦是影响EC患者死亡的危险因素,因此可推断CDK8也可作为评估EC患者预后的指标之一。

CXCL13是自趋化因子家族的细胞因子,可调控肿瘤细胞的生长、增殖,抑制肿瘤细胞凋亡,最终诱发恶性肿瘤的发生发展。Bhatti等^[13]研究表明,CXCL13在恶性肿瘤,如肝癌、胃癌中均呈高表达,其表达率与患者术后生存率密切相关。Shea等^[14]研究发现,CXCL13抑制剂可通过作用于CX-

CR5/ERK信号通路来减弱肿瘤组织的生长。多元Logistic回归分析发现,CXCL13阳性表达是影响EC患者预后死亡的危险因素。可见CXCL13表达在EC的恶性进展过程中具有重要作用,其高表达提示预后不良,这可能与与CXCL13促进肿瘤新生血管的生成及肿瘤细胞的增殖活化、转移有关。

REGγ是一种定位于细胞核内的蛋白质。多项研究发现,该因子在乳腺癌、直肠癌等恶性肿瘤中呈高表达,被认为是一种潜在的癌症标签^[15]。本研究结果发现,与正常对照组比较,EC患者REGγ阳性表达率明显升高,且与分化程度、淋巴结转移、病理类型及肌层浸润深度有关,推测REGγ对于子宫内膜癌的晚期评估和预后监测可能起到辅助作用。进一步ROC曲线分析提示联合检测上述指标可作为预测患者预后生存的有效手段。但是,EC发展过程是一个有多级因子作用的复杂过程,由于本研究纳入样本量较少,有可能造成统计学上有所偏差,因此尚需要大样本量研究证实。

综上所述,CDK8、CXCL13及REGγ在EC中阳性表达率高,推测CDK8、CXCL13及REGγ参与了EC组织增生、分化及发展过程,临床上可通过检测三者表达情况对患者病情进展及预后进行评估。

参考文献

[1] 麦碧,陈永秀,胡桂英,等.长链非编码RNA LINC00393在子宫内膜癌临床预后判断中的意义[J].分子诊断与治疗杂志,2019,11(3):198-203.
[2] Heudel PE, Fabbro M, Roemer-Becuwe C, et al. Phase II study of the PI3K inhibitor BKM120 in patients with advanced or recurrent endometrial carcinoma: a stratified type I-type II study from the GINECO group [J]. Brit J Cancer, 2017, 116(3):303-309.

宁德市医院体检人群及住院患者HTLV-I感染情况分析

叶仁清 叶作东 傅芬蕊 齐育英*

[摘要] 目的 研究宁德市医院体检人群及住院患者中人类嗜T淋巴细胞病毒I型(HTLV-I)的感染流行情况、年龄特征及性别差异,为了解HTLV-I流行病学和预防控制提供依据。方法 采用双抗原夹心酶联免疫(ELISA)法对宁德市体检人群及住院患者进行HTLV-I/II抗体筛查,初筛阳性标本采用HTLV-I PCR检测和基因测序检测进行进一步确证。结果 宁德市医院9 269份标本中HTLV-I确证阳性者93份,感染率1.00%;其中女性与男性HTLV-I的抗体阳性率分别为1.11%,0.88%,差异无统计学意义($P>0.05$);随着年龄增长,HTLV-I感染率呈上升趋势,61~75岁,76~98岁抗体阳性率分别达到1.97%,2.11%。结论 宁德市医院体检人群及住院患者的HTLV-I感染率较高。HTLV-I感染率随年龄增长而上升,在HTLV-I的筛查和防治中应重点关注中老年人人群。

[关键词] HTLV-I; ELISA; 感染率; 年龄

Analysis of HTLV - I infection status among the physical examination and hospitalized patients in ningde hospital

YE Renqing, YE Zuodong, FU Fenrui, QI Yuying*

(Department of Laboratory Medicine, Ningde Hospital, Fujian Medical University, Ningde, Fujian, China, 35200)

[ABSTRACT] **Objective** Research infection prevalence and the differences of age and gender of Human T-lymphotropic virus type-I (HTLV-I) among the physical examination and hospitalized patients in ningde hospital, provide a reference for the development of scientific prevention and control measures. **Methods** The ELISA method was used to screen the physical examination and hospitalized patients of ningde hospital for HTLV - I/II antibodies. All of the positive samples were confirmed by HTLV - I PCR and gene sequencing. **Results** 93 HTLV - I positive people were confirmed in 9269 blood specimens from ningde hospital. The overall infection rate was 1.00%. The infection rate of female with HTLV-I was 1.11% and the infection rate of male with HTLV-I was 0.88%. No significant difference in infection rate between male and female ($P<0.05$). Significantly upward trends in infection rate were observed with increasing age. The infection rate of 61~75 years old and 76~98 years old was 1.97%, 2.11% respectively. **Conclusion** HTLV-I infections of the physical examination and hospitalized patients in ningde hospital was relatively high. The infection rate of HTLV-I increased with age. More attention should be paid on protection and screening of HTLV-I with middle-aged and elderly people.

[KEY WORDS] HTLV-I; ELISA; Infection rate; Age

人类嗜T淋巴细胞病毒I型(Human T-lymphotropic virus type-I, HTLV-I)属逆转录病毒科(Retroviridae),RNA肿瘤病毒亚科(Oncovirubae),是首个

发现的人类逆转录病毒^[1-2],临床上可引起成年人T淋巴细胞白血病(Adult T-cell leukemia, ATL)、热带痉挛性下肢瘫痪以及HTLV相关性多肌炎、淋巴结

基金项目:宁德市2019年市指导性课题(20190028)

作者单位:宁德师范学院附属宁德市医院检验科,福建,宁德 352000

*通信作者:齐育英, E-mail: wj486101@163.com

炎及相关性脊髓病等严重疾病^[3]。目前全球已有约1 000万~2 000万人感染了HTLV-I^[4],造成严重的卫生经济负担。研究显示,福建省是我国HTLV-I高流行区,其中宁德市的感染率呈现较高水平^[5]。目前关于宁德市HTLV-I具体感染情况相关的报道都是基于献血人群的研究,一定程度上不能代表全体人群。本文通过对体检人群及病患人群的筛查,旨在了解近年来宁德市人群HTLV-I感染的流行情况及分析感染不同年龄段、性别与感染状况的关系。

1 材料与方法

1.1 研究对象

收集2019年4月至2019年12月在宁德市医院体检和住院患者的新鲜血清及部分全血标本9 269份,其中2 274份为全市体检标本,3 405份为随机选取的门诊体检标本,3 590份为随机选取的住院患者标本。9 269份标本中,男性为4 205例,女性为5 064例,标本年龄分布见表1,年龄中位数为46岁。

表1 研究标本年龄分布表 [n(%)]

Table 1 Age distribution of sample [n(%)]

年龄分组(岁)	男性标本率(份)	女性标本率(份)	总标本率(份)
0~17	183(2.0)	176(1.9)	359(3.9)
18~30	660(7.1)	1 246(13.4)	1 906(20.6)
31~45	910(9.8)	1 369(14.8)	2 279(24.6)
46~60	1 218(13.1)	1 362(14.7)	2 580(27.8)
61~75	908(9.8)	715(7.7)	1 623(17.5)
76~98	326(3.5)	196(2.1)	522(5.6)
合计	4 205(45.4)	5 064(54.6)	9 269(100.0)

1.2 试剂与仪器

1.2.1 试剂

HTLV-I/II抗体检测试剂盒(ELISA法)(批号:T20190302B,96人份/盒)、HTLV-I核酸检测试剂盒(PCR-荧光探针法)(批号:HPQ20190101,48人份/盒)和DNA/RNA提取试剂盒(磁珠法)(批号:20190101,48人份/盒)均来源于北京万泰生物药业股份有限公司。

1.2.2 仪器

郑州安图生物工程有限公司酶标仪(PHPMO型)、台湾圆点半自动核酸提取仪(SLA-32)、美国伯乐实时荧光定量PCR仪(CFX96)、美国ABI DNA测序仪(3730XL)。

1.3 方法

1.3.1 抗HTLV-I/II初筛

使用北京万泰HTLV-I/II抗体检测试剂盒

(双抗原夹心酶联免疫法)对9 269份标本进行抗体检测,对初次检测阳性标本进行双孔复查,复查结果仍为阳性者判定为ELISA初筛阳性。

1.3.2 HTLV-I确证试验

使用北京万泰HTLV-I型核酸检测试剂盒(PCR-荧光探针法)对初筛阳性病例的血细胞标本进行PCR确证实验。

1.3.3 测序分析

据HTLV-I型插入序列pol、tax基因信息,在NCBI中查找高度保守参考序列,使用软件Primer Premier 3.0进行引物设计,将保存初筛阳性者血细胞标本进行核酸提取,目的基因经PCR扩增后进行测序,测序结果在GenBank中与NCBI网站上已发表的HTLV-I型pol或tax基因序列进行比对分析。HTLV-I pol基因(上游引物序列5'-TGGGC-GCTACCTGAAGTTC-3',下游引物序列5'-GGC-CACTGCTGCTTGGACT-3',产物293 bp),HTLV-I tax基因(上游引物序列5'-GGCCTTCCTCAC-CAATGTTC-3',下游引物序列5'-GGATATTT-GGGCTCATGGTC-3',产物469 bp),同源性均在98%以上判定为HTLV-I阳性。

1.4 统计学方法

采用SPSS2 6.0软件进行统计学分析;计数资料以n(%)表示,两组间比较采用 χ^2 检验;检验水准 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HTLV-I检测结果

对宁德市9 269份血清标本进行HTLV-I/II抗体筛查,经初筛和确证后93份标本判定为HTLV-I抗体阳性,阳性率为1.00%。HTLV-I PCR检测和HTLV-I基因测序分析结果一致率100%。

2.2 HTLV-I感染的年龄分布

76~98岁年龄组阳性率最高达到2.11%,其次是61~75岁年龄组,HTLV-I阳性率达1.97%,0~17岁年龄组最低为0.00%。见表2。

2.3 HTLV-I感染的性别差异

男性HTLV-I抗体阳性率为0.88%,女性HTLV-I抗体阳性率为1.11%,两者比较,差异无统计学意义($P>0.05$),不同年龄组间男性、女性HTLV-I抗体阳性率比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表3。

表2 不同年龄组 HTLV-I 阳性率 [n(%)]

Table 2 The infection rate of HTLV-I in different age groups [n(%)]

年龄	确认阳性人数	总标本数
0~17	0(0.00)	359
18~30	4(0.21)	1 906
31~45	17(0.75)	2 279
46~60	29(1.12)	2 580
61~75	32(1.97)	1 623
76~98	11(2.11)	522
合计	93(1.00)	9 269

表3 不同性别组 HTLV-I 阳性率 [n(%)]

Table 3 The infection rate of HTLV-I in different gender groups [n(%)]

年龄	确认阳性数		标本数		χ^2 值	P值
	男	女	男	女		
0~17	0(0.00)	0(0.00)	183	176	-	-
18~30	2(0.30)	2(0.16)	660	1246	-	0.613
31~45	5(0.55)	12(0.88)	910	1369	0.790	0.374
46~60	9(0.74)	20(1.47)	1218	1362	3.079	0.079
61~75	14(1.54)	18(2.52)	908	715	1.970	0.160
76~98	7(2.15)	4(2.04)	326	196	0.007	0.935
合计	37(0.88)	56(1.11)	4205	5064	1.181	0.277

2.4 不同年龄及性别组标本 HTLV-I 阳性率

不同性别组随着年龄增长,HTLV-I 阳性率均呈现明显上升趋势。见图1。

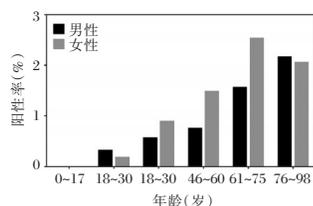


图1 不同年龄及性别组标本 HTLV-I 阳性率

Figure 1 The infection rate of HTLV-I in different age and gender groups

3 讨论

对 HTLV-I 感染引起的相关疾病至今尚未成功研究出有效的治疗药物和预防性疫苗,也未发现有效免疫性抗体产生或自行清除的报道^[1,6]。目前唯一有效办法就是及时发现 HTLV-I 感染者,采取措施切断其传播途径^[7]。

1985 年曾毅等^[8]首次对来自全国 28 个省市的 9269 份血清样本筛查并进一步确证 HTLV-I 抗体阳性率为 0.08%。随着更多的 HTLV-I 筛查调查的开展,更多地区和人群中 HTLV-I 感染情况逐渐被发现,其中主要集中在东南沿海地区。季阳等^[9]调查

了 1997 年~1998 年四川、福建、新疆、浙江、山东和湖北六省区的无偿献血者,血清 HTLV-I 抗体阳性率为 0.02%,感染者均为东南沿海地区献血者。而我国现有报道中,宁德市 HTLV-I 的感染率呈现较高水平,陈长荣等^[10]在 2004 至 2009 年对福建省 131 823 份无偿献血标本进行 HTLV 抗体筛查后发现,检出阳性标本中来自宁德市的标本远高于其他地区,占比高达 33.33%(8/24)。徐东峰等^[11]在 2013 年对福建省宁德地区无偿献血者进行 HTLV-I 抗体筛查,确认阳性率为 0.34%。欧山海等^[12]对 2016 年~2018 年无偿献血者的 -I 抗体筛查结果中报道宁德市抗体阳性率为 0.18%。本文调查结果说明了宁德市属于 HTLV-I 高流行地区。与该地区现有报道相比,HTLV-I 抗体阳性率显著增加,主要是由于筛查人群的差异,之前有关该地区的研究对象均为献血者,本文筛查对象为体检人群及门诊和住院患者,一定程度上更能代表普遍群体。同时也需要谨防人群的感染率增加。HTLV 的传播途径包括垂直感染、性接触传播、共用针头如静脉注射毒瘾者以及输血传播等^[13],研究发现 HTLV 感染常表现出明显的家庭聚集性^[14],并具有区域集中的特点^[15],宁德市作为 HTLV-I 感染率相对较高的地区,若疏于防治可能导致感染率进一步提升。在世界上其他国家和地区的调查中曾提到人群的年龄和性别是 HTLV-I 的危险因素^[16],本研究结果显示性别因素不是 HTLV-I 流行的危险因素,与王惠榕等^[5]报道结果一致。

本文首次对宁德市医院体检人群及住院患者中 HTLV-I 感染情况进行调查,统计得到 HTLV-I 感染率为 1.00%,高于该地区献血人群 HTLV-I 感染率的报道,可能由于献血人群整体健康水平更高造成了结果的差异。本文调查结果进一步丰富了 HTLV-I 流行病学统计的样本来源,为制定科学的防控措施提供参考。造成人群差异更深层次的机理在本文中并未开展研究,在后续的调查工作中应关注筛查人群不同导致的流行病学统计学结果差异。另外,此次调查结果显示性别对 HTLV-I 感染率的影响并不显著,而随着年龄增长,HTLV-I 感染率呈现明显上升趋势,因此应重点关注对中老年人群 HTLV-I 的筛查和预防。

参考文献

[1] ABRAMS A, AKAHATA Y, JACOBSON SJV. The Preva-

- lence and Significance of HTLV-I/II Seroindeterminate Western Blot Patterns[J]. *Viruses*, 2011, 3(8):1320-1331.
- [2] HINUMA Y, NAGATA K, HANAOKA M, et al. Adult T-cell leukemia: antigen in an ATL cell line and detection of antibodies to the antigen in human sera[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981, 78(10):6476-6480.
- [3] POIESZ BJ, POIESZ MJ, CHOI DJCI. The Human T-Cell Lymphoma/Leukemia Viruses[J]. *Cancer Invest*, 2003, 21(2):253-77.
- [4] MITCHELL, MICHAEL, S, et al. Phenotypic and Genotypic Comparisons of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Reverse Transcriptases from Infected T-Cell Lines and Patient Samples[J]. *J Virol*, 2007, 81(9):4422-4428.
- [5] 王惠榕, 严延生, 张秋文, 等. 福建东部沿海地区人类嗜T淋巴细胞白血病病毒 I/II 感染的血清流行病学研究[J]. *中华流行病学杂志*, 2004, 25(5):428-430.
- [6] 张培, 沈佐君. MTX 治疗急性淋巴细胞白血病的研究进展[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2012, 4(6):420-424.
- [7] 席婧媛, 于广鑫, 钱相君, 等. 新型冠状病毒实验室诊断技术进展[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2020, 12(3):265-269.
- [8] 曾毅, 蓝祥英, 王必瑞, 等. 成人 T 细胞白血病病毒抗体的血清流行病学调查[J]. *病毒学报*, 1985(04):344-348.
- [9] 季阳, 庄文, 曹凤, 等. 中国献血者中人类嗜 T 淋巴细胞病毒感染流行病学研究[J]. *医学研究通讯*, 2005, 34(1):28-29.
- [10] 陈长荣, 谢金镇, 张永昌, 等. 厦门市无偿献血者 HTLV 感染情况及基因亚型分析[J]. *中国输血杂志*, 2012(12):1257-1261.
- [11] 徐冬峰, 李海华, 汤纯柳. 宁德市无偿献血人群 HTLV-I/II 感染情况调查[J]. *中国输血杂志*, 2015, 28(1):63-64.
- [12] 欧山海, 林洪铿, 徐冬峰, 等. 福建省无偿献血者 HTLV-1/2 感染情况研究[J]. *中国输血杂志*, 2020, 33(6):610-613.
- [13] SONODA S, HONG CL, TAJIMA KJCS. Ethnoepidemiology of HTLV-1 related diseases: ethnic determinants of HTLV-1 susceptibility and its worldwide dispersal[J]. *Cancer Sci*, 2011, 102(2):295-301.
- [14] MORIUCHI M, MORIUCHI H. Seminal fluid enhances replication of human T-cell leukemia virus type 1: implications for sexual transmission[J]. *J Virol*, 2004, 78(22):12709-12711.
- [15] 张国忠, 张军, 林丽容, 等. 在福建东南沿海局部地域献血员中检出 HTLV-I[J]. *海峡预防医学杂志*, 2002(1):19-21.
- [16] LECHATMF, SHRAGER DI, DECLERCQ E, et al. Decreased survival of HTLV-I carriers in leprosy patients from the Democratic Republic of the Congo: a historical prospective study[J]. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*, 1997, 15(5):387-390.

(上接第 920 页)

- [3] 郭建宾, 钱海利, 马飞, 等. 子宫内膜癌患者再发乳腺癌的临床病理特征及预后分析[J]. *解放军医学杂志*, 2020, 45(1):100-104.
- [4] Khabaz MN, Abdelrahman AS, Butt NS, et al. Cyclin D1 is significantly associated with stage of tumor and predicts poor survival in endometrial carcinoma patients[J]. *Ann Diagn Pathol*, 2017, 41(4):47-51.
- [5] 王晓华, 景阳, 付久园, 等. Artemin CXCL13 MMP-9 在子宫内膜癌组织中的表达及临床意义[J]. *河北医学*, 2019, 025(9):1480-1484.
- [6] Rovirosa A, Cortes K, Ascaso C, et al. Results of Vaginal Relapse and Toxicity of 3 192 ir HDR Brachytherapy Schedules in Postoperative Endometrial Carcinoma[J]. *Intern J Rad Oncol Biol Phys*, 2017, 99(2):E309.
- [7] Kim D, Wang CY, Hu R, et al. Antitumor Activity of Vanicoside B Isolated from *Persicaria dissitiflora* by Targeting CDK8 in Triple-Negative Breast Cancer Cells[J]. *J Natur Prod*, 2019, 82(11):3140-3147.
- [8] Lynch CJ, Bernad R, Ana MV, et al. Global hyperactivation of enhancers stabilizes human and mouse naive pluripotency through inhibition of CDK8/19 Mediator kinases[J]. *Nat Cell Biol*, 2020, 22(10):1-16.
- [9] 冯敏, 步宏, 王巍. 子宫内膜癌分子分型的研究进展及其临床意义[J]. *中华病理学杂志*, 2019, 48(12):997-1000.
- [10] Postlmayr A, Dumeau CE, Wutz A. Cdk8 is required for establishment of H3K27me3 and gene repression by Xist and mouse development[J]. *Development*, 2020, 147(11):175141.
- [11] Leake MC, Coles MC, O'Toole PJ, et al. B-cell Zone Reticular Cell Microenvironments Shape CXCL13 Gradient Formation[J]. *Nat Commun*, 2020, 96(11):e6321.
- [12] Remy MM, SchB N, Kottanattu L, et al. Cerebrospinal fluid CXCL13 as a diagnostic marker of neuroborreliosis in children: a retrospective case-control study[J]. *J Neuroinflammation*, 2017, 14(1):173.
- [13] Bhatti MZ, Pan L, Wang T, et al. REG γ potentiates TGF- β /Smad signal dependent epithelial-mesenchymal transition in thyroid cancer cells[J]. *Cell Signal*, 2019, 64(6):109412.
- [14] Shea K, Rouse R. Detection of Reg3 γ by Immunohistochemistry in Cerulein-Induced Model of Acute Pancreatic Injury in Mice and Rats[J]. *Pancreas*, 2019, 48(8):1.
- [15] Galle PR, Kim RD, Sung MW, et al. 990P Updated results of a phase Ib study of regorafenib (REG) plus pembrolizumab (PEMBRO) for first-line treatment of advanced hepatocellular carcinoma (HCC)[J]. *Ann Oncol*, 2020, 31(10):S691-S692.

血清 miR-155、miR-302b、miR-208a 水平与 AMI 患者 PCI 术后 MACE 发生的关系

孙大敬^{1*} 王小虎² 曹凌飞² 秦明明² 龙慧珍³

[摘要] 目的 分析血清 miR-155、miR-302b、miR-208a 水平与急性心肌梗死(AMI)患者经皮冠状动脉介入治疗(PCI)术后主要不良心血管事件(MACE)发生的关系。方法 选择本院收治的 89 例 AMI 患者为研究对象,所有患者均进行 PCI 检查和血清 miR-155、miR-302b、miR-208a 水平检测,根据患者术后是否发生 MACE 将其分为 MACE 组($n=26$)和无 MACE 组($n=63$),比较两组临床资料和血清 miR-155、miR-302b、miR-208a 水平,采用多因素 Logistic 回归分析 AMI 患者 PCI 术后发生 MACE 的影响因素。结果 MACE 组与 MACE 组心功能分级、肌酸激酶同工酶(CK-MB)和心肌肌钙蛋白 I (cTnI)水平比较差异均有统计学意义($P<0.05$)。MACE 组血清 miR-155、miR-302b、miR-208a 水平均高于无 MACE 组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。多因素 Logistic 回归分析显示,心功能分级、CK-MB、cTnI、miR-155、miR-302b、miR-208a 是 AMI 患者 PCI 术后 MACE 发生的影响因素($P<0.05$)。结论 AMI 患者血清 miR-155、miR-302b、miR-208a 水平与 PCI 术后发生 MACE 有关,监测上述指标变化对评估和防治 MACE 具有重要意义。

[关键词] 急性心肌梗死;经皮冠状动脉介入治疗;miR-155;miR-302b;miR-208a

Relationship between serum levels of miR - 155, miR - 302b and miR - 208a and major adverse cardiovascular events in AMI patients after PCI

SUN Dajing^{1*}, WANG Xiaohu², CAO Lingfei², QIN Mingming², LONG Huizhen³

(1. Department of Cardiology, the First Provincial Hospital of Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou, Henan, China, 450000; 2. Department of Cardiology, Henan Provincial Hospital, Zhengzhou, Henan, China, 450000; 3. Department of Cardiology, Henan Chest Hospital, Zhengzhou, Henan, China, 450000)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the relationship between serum miR-155, miR-302b and miR-208a levels and major adverse cardiovascular events (MACE) in patients with acute myocardial infarction (AMI) after percutaneous coronary intervention (PCI). **Methods** 89 patients with AMI treated by PCI were selected as the study subjects. Serum miR-155, miR-302b and miR-208a levels of all subjects were tested. The patients were divided into the MACE group ($n=26$) and the non-MACE group ($n=63$) according to the absence or presence of MACE after operation. The clinical data, levels of serum miR-155, miR-302b and miR-208a were compared between the two groups. Multivariate logistic regression analysis was conducted to screen the influencing factors of MACE in patients with AMI after PCI. **Results** There were statistically significant differences in cardiac function classification, creatine kinase isoenzyme (CK-MB) and cardiac troponin (cTnI) levels between the MACE group and the non-MACE group ($P<0.05$). The levels of serum miR-155, miR-302b and miR-208a in the MACE group were higher than those in the non-MACE group, and the differences were

基金项目:河南省医学科技攻关计划项目(162102310115)

作者单位:1. 河南省人民医院省直第一医院(河南省直属机关第一门诊部)心内科,河南,郑州 450000

2. 河南省省立医院心内科,河南,郑州 450000

3. 河南省胸科医院心内科,河南,郑州 450000

*通信作者:孙大敬, E-mail:sdj050718@163.com

statistically significant ($P < 0.05$). Multivariate logistic regression analysis showed that cardiac function classification, CK-MB, cTnI, miR-155, miR-302b, and miR-208a were influencing factors of MACE in patients with AMI after PCI ($P < 0.05$). **Conclusion** The serum levels of miR-155, miR-302b, and miR-208a are related to MACE after PCI. Monitoring the changes in the above indicators is of great significance for evaluation and prevention of MACE.

[KEY WORDS] Acute myocardial infarction; Percutaneous coronary intervention; miR-155; miR-302b; miR-208a

急性心肌梗死 (acute myocardial infarction, AMI) 为冠状动脉堵塞所引起的严重冠心病, 可引发多种并发症, 对患者生命安全威胁极大。经皮冠状动脉介入治疗 (percutaneous transluminal coronary intervention, PCI) 是当前临床治疗 AMI 的重要手段之一, 其可疏通堵塞血管, 改善心肌缺血, 缓解患者临床症状^[1-2]。研究发现, AMI 患者术后易发生主要不良心血管事件 (major adverse cardiovascular events, MACE), 包括心绞痛、急性心力衰竭、心源性死亡等^[3]。及早预测 MACE 发生, 有利于向患者实施针对性干预措施, 以降低 MACE 发生风险, 改善其预后。微小 RNA (microRNA, miRNA) 能够与靶基因 mRNA 互补结合, 继而调控靶基因表达^[4]。报道指出, miRNA 能够调控多类蛋白编码基因, 在多数细胞生命活动中扮演了重要角色, 在多种疾病尤其是肿瘤和心血管疾病中参与了相关病理改变^[5-6]。本次研究探讨血清 miR-155、miR-302b、miR-208a 水平与患者术后 MACE 发生的关系, 以期为指导临床防治 MACE 提供依据。

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 89 例 AMI 患者, 纳入标准: ①符合《急性 ST 段抬高型心肌梗死诊断与治疗指南》^[7] 中的诊断标准; ②年龄 ≥ 18 岁; ③满足 PCI 治疗指征, 且在发病 24 h 内完成 PCI 治疗; ④临床资料完整。排除标准: ①脑血管病急性期; ②严重肝肾功不全; ③妊娠及哺乳女性; ④恶性肿瘤; ⑤存在先天性、

肺源性或风湿性等其他类型心脏病、心肌炎、主动脉夹层等; ⑥自身免疫性疾病; ⑦结缔组织疾病; ⑧急性感染。根据住院期间患者是否并发 MACE, 将其分为 MACE 组 ($n=26$) 和无 MACE 组 ($n=63$), 其中 MACE 组中梗死后心绞痛 14 例、急性心力衰竭 8 例、心源性死亡 4 例。患者或家属对本研究知情且签署同意书, 本次研究获得本院伦理委员会审批通过。

1.2 方法

1.2.1 血清 miR-155、miR-302b、miR-208a 水平检测

采集患者外周静脉血 3 mL 至无菌干燥试管中, 3 000 r/min 离心 15 min 后分离血清, 于 -80°C 环境中保存待检。向含样本的离心管中加入 1 mL Trizol 溶液, 匀浆, 根据 Trizol 说明书提取总 RNA, 计算其浓度和纯度。提取 2 μL 总 RNA 进行反转录操作, 反转录试剂盒由北京艾德莱生物科技公司提供, 采用 20 μL 反转录体系, 反转录体系过程: 16°C 60 min, 42°C 60 min, 85°C 5 min, 4°C 直至收取。将收取的 cDNA 于 -20°C 环境中保存。依照 GeneBank 提供的基因序列, 进行 miR-155、miR-302b、miR-208a 引物序列合成 (上海生工生物工程技术有限公司合成)。见表 1。

进行扩增反应, PCR 扩增仪美国 ABI step one 实时反应 PCR 扩增仪, PCR 总反应体系为 20 μL , qRT-PCR 反应条件: 94°C 预变性 3 min; 94°C 20 s, 60°C 20 s, 40 个循环; 72°C 40 s。记录 Ct 值, 将 U6 作为内参照基因, 检测 miR-155、miR-302b、miR-208a 基因, 通过 qRT-PCR Soft 3.0 计算各基因表达量。

1.2.2 临床资料收集

收集 MACE 组和无 MACE 组临床资料, 包括

表 1 miR-155、miR-302b、miR-208a 引物序列

Table 1 Primer sequences of miR-155, miR-302b and miR-208a

指标	正向引物序列	反向引物序列
miR-155	5'-TGCCTCGAACTGCACTCGTAG-3'	5'-GCGAGCAGAGAATAATAGGAC-3'
miR-302b	5'-GGGAUAAGACGAACAAAAG-3'	5'-CAGTGCCTGTCTGGAGT-3'
miR-208a	5'-GCGGACCAATCCTAGTATGC-3'	5'-CAATACTGCCAGCTACCGTC-3'

性别、年龄、吸烟史、冠心病家族史、高血压史、糖尿病史、高血脂史、心肌梗死部位、心功能分级、心率(heart rate, HR)、收缩压(systolic blood pressure, SBP)、舒张压(diastolic blood pressure, DBP)、心肌肌钙蛋白 I (cardiac troponin I, cTn I) 及肌酸激酶同工酶(creatine kinase isoenzyme, CK-MB)。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 20.0 软件进行数据分析,计数资料以 $n(\%)$ 表示,采用 χ^2 检验;计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,若各组满足正态性且两组间方差齐性,采用 t 检验行组间比较,采用多因素 Logistic 回归分析 AMI 患者 PCI 术后发生 MACE 的影响因素,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MACE 组与无 MACE 组临床资料比较

MACE 组与 MACE 组心功能分级、CK-MB 和 cTnI 水平比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。

表2 MACE组与无MACE组临床资料比较 [$n(\%), (\bar{x} \pm s)$]
Table 2 Comparison of clinical data between MACE group and non-MACE group [$n(\%), (\bar{x} \pm s)$]

临床资料	<i>n</i>	MACE组 (<i>n</i> =26)	无MACE组 (<i>n</i> =63)	χ^2 值	<i>P</i> 值
性别	男	72	22(84.62)	0.757	0.384
	女	17	4(15.38)		
年龄	<60岁	58	16(61.54)	0.213	0.644
	≥60岁	31	10(38.46)		
吸烟史	有	48	15(57.69)	0.209	0.648
	无	41	11(42.31)		
冠心病家族史	有	23	8(30.77)	0.465	0.495
	无	66	18(69.23)		
高血压史	有	61	20(76.92)	1.197	0.274
	无	28	6(23.08)		
糖尿病史	有	21	7(26.92)	0.226	0.635
	无	68	19(73.08)		
高血脂史	有	27	10(38.46)	1.147	0.284
	无	62	16(61.54)		
心肌梗死部位	心肌前壁	27	9(34.62)	2.577	0.462
	心肌下壁	34	12(46.15)		
	广前壁	17	3(11.54)		
	其他	11	2(7.69)		
心功能分级	I~II级	56	11(42.31)	6.690	0.010
	III~IV级	33	15(57.69)		
HR(次/min)		89.41±6.54	87.72±8.03	0.950	0.345
SBP(mmHg)		136.73±6.18	134.99±5.54	1.302	0.196
DBP(mmHg)		85.39±5.32	86.04±6.06	0.476	0.635
CK-MB(U/L)		66.25±7.17	55.37±5.21	7.991	<0.001
cTnI(mg/L)		1.26±0.18	1.04±0.15	5.928	<0.001

2.2 MACE 组与无 MACE 组血清 miR-155、miR-302b、miR-208a 水平比较

MACE 组血清 miR-155、miR-302b、miR-208a 水平均高于无 MACE 组,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 3。

表3 两组血清miR-155、miR-302b、miR-208a水平比较 ($\bar{x} \pm s$)
Table 3 Comparison of serum miR-155, miR-302b and miR-208a levels between 2 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	miR-155	miR-302b	miR-208a
MACE组	26	1.92±0.20	6.23±0.69	49.71±4.52
无MACE组	63	1.43±0.15	4.16±0.57	38.57±3.61
<i>t</i> 值		12.670	14.632	12.275
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001

2.3 AMI 患者 PCI 术后 MACE 发生的多因素 Logistic 回归分析

Logistic 回归分析,结果显示心功能分级、CK-MB、cTnI、miR-155、miR-302b、miR-208a 是 AMI 患者 PCI 术后 MACE 发生的影响因素 ($P < 0.05$)。见表 4。

表4 AMI患者PCI术后MACE发生的多因素Logistic回归分析

Table 4 Multivariate Logistic regression analysis of MACE in AMI patients after PCI

变量	β 值	SE值	Wald χ^2 值	OR值	95%CI	<i>P</i> 值
心功能分级	0.978	0.411	5.662	2.659	1.188~5.951	0.018
CK-MB	1.035	0.352	8.646	2.815	1.412~5.612	0.003
cTnI	0.996	0.381	6.834	2.707	1.283~5.713	0.009
miR-155	1.127	0.344	10.733	3.086	1.573~6.057	0.001
miR-302b	1.019	0.288	12.519	2.770	1.575~4.872	<0.001
miR-208a	1.104	0.330	11.192	3.016	1.580~5.759	0.001

3 讨论

我国 AMI 发病率长期处于高水平,病例已有 200 万,死亡率也在不断升高^[8]。PCI 是指通过心导管技术对阻塞的冠状动脉管腔进行疏通,以恢复心肌血流灌注,改善心肌缺血缺氧^[9]。调查显示,AMI 患者进行 PCI 治疗后,MACE 发生率为 18%~42.4%^[10]。MACE 是造成患者预后不良的重要原因,因此准确评估 MACE 发生-意义重大。

miRNA 为小分子单链 RNA,其基因编码长度一般为 20~24 个核苷酸,能够精细调节生物生理功能。研究表明,血液循环中可见 miRNAs 表达,对于心血管病变患者而言,miRNAs 可能成为其疾病

诊断、预后评估的重要生物标志物^[11]。汪晶等^[12]进行动物实验,结果表明 miR-221 在 AMI 大鼠心肌组织中呈高表达,下调 miR-221 能够抑制 AMI 大鼠心肌细胞凋亡。陈劲松等^[13]研究分析老年 AMI 患者血清 miR-214 表达情况,显示患者血清 miR-214 水平明显高于正常人,且与 CK-MB、cTnI 含量均呈正相关,其认为老年 AMI 患者血清 miR-214 高表达可能与心肌损伤有关。本次研究选取 miR-155、miR-302b、miR-208a 为观察指标,其中 miR-155 广泛表达于免疫细胞中,能够直接作用于细胞因子、转录因子等靶点,调节机体炎症反应和免疫功能。石一夫等^[14]研究发现,2 型糖尿病合并冠心病患者血清 miR-155 水平和甘油三酯、低密度脂蛋白胆固醇呈明显负相关,认为冠心病的发生与 miR-155 有关。miR-302b 是目前研究较多的 miRNA 家族成员之一,国内外研究表明,miR-302b 能够对细胞周期进行调控,参与了细胞损伤、坏死和凋亡过程^[15-16]。miR-208a 是由 *Myh6* 基因的第 29 号内含子编码,也是 miRNA 家族的重要成员,其特异性表达于心脏,可调节肌球蛋白容量及肌纤维性能,在动脉粥样硬化、心肌梗死等病理过程中均发挥了重要作用^[17]。本研究中 MACE 组血清 miR-155、miR-302b、miR-208a 水平平均高于无 MACE 组,提示 AMI 患者 PCI 术后 MACE 发生可能与 miR-155、miR-302b、miR-208a 有关。

资料显示,在心肌组织缺血性损伤时,miR-155、miR-302b、miR-208a 水平显著升高,而下调 miR-155、miR-302b、miR-208a 表达能起到组织保护作用。故而监测 AMI 患者血清 miR-155、miR-302b、miR-208a 水平,有利于评估患者预后。

综上所述,PCI 术后发生 MACE 的 AMI 患者血清 miR-155、miR-302b、miR-208a 水平均呈高表达,监测 AMI 患者上述指标水平对评估患者预后、制定干预措施具有重要意义。

参考文献

[1] 钦佩,周志安,边树伟,等. 术前血压水平与经皮冠状动脉介入治疗急性心肌梗死患者预后的关系[J]. 中华高血压杂志, 2019, 27(6):536-542.

- [2] 彭胡,唐克彬,颜彪,等. 泸州地区冠心病 PCI 治疗患者 CYP2C19 基因多态性分布的研究[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2019, 11(2):107-110.
- [3] 陈鑫森,邵萌,张天,等. 血液学参数预测急性 ST 段抬高型心肌梗死患者经皮冠状动脉介入治疗术后发生主要不良心血管事件的价值研究[J]. 中国全科医学, 2020, 23(27):3389-3395.
- [4] 刘琳,温臻,张瑞,等. miR-342-3p 与女性相关疾病的研究进展[J]. 实用医学杂志, 2018, 34(18):3140-3142.
- [5] 林延艳,赵林双. microRNA 222 在心血管疾病中的研究进展[J]. 中国糖尿病杂志, 2017, 25(6):565-568.
- [6] 谷仕艳,陈虹宇,张遵真. 微小 RNA 与氧化应激相互调控在疾病发生发展中的研究进展[J]. 现代预防医学, 2017, 44(2):306-308,374.
- [7] 中华医学会心血管病学分会,中华心血管病杂志编辑委员会. 急性 ST 段抬高型心肌梗死诊断和治疗指南[J]. 中华心血管病杂志, 2015, 43(5):380-393.
- [8] 俞奇,王斌,王焱,等. 我国 2002-2016 年间急性心肌梗死死亡趋势分析[J]. 中华疾病控制杂志, 2019, 23(1):5-9+28.
- [9] 曹占伟,张曙光. 应激性高血糖对急性冠脉综合症患者 PCI 术后心肌灌注与生存状况的影响[J]. 中华急诊医学杂志, 2016, 25(6):827-829.
- [10] 方子美,陈小芳,余向东. 血清 FGF23、Fetuin-A 检测对 STEMI 患者 PCI 术后发生 MACE 的预测价值[J]. 山东医药, 2019, 59(25):22-26.
- [11] Ultimo S, Zauli G, Martelli AM, et al. Cardiovascular disease-related miRNAs expression: potential role as biomarkers and effects of training exercise[J]. Oncotarget, 2018, 9(24):17238-17254.
- [12] 汪晶,谭立业,刘卓,等. miR-221 在急性心肌梗死大鼠中表达及其作用[J]. 中国公共卫生, 2017, 33(6):930-933.
- [13] 陈劲松,刘访遥,刘运阳,等. miR-214 在老年急性心肌梗死患者血清中的表达及其临床意义[J]. 中国急救医学, 2018, 38(4):341-344.
- [14] 石一夫,张焱,王奕,等. 2 型糖尿病合并冠心病患者血清 miR, miR5 水平与脂代谢的关系[J]. 心血管康复医学杂志, 2019, 28(4):419-423.
- [15] Wang N, Zhang Z, Lv J. Fentanyl inhibits proliferation and invasion via enhancing miR-302b expression in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Oncol Lett, 2018, 16(1):459-466.
- [16] 羊子伦,羊壮绵,郑伟民,等. 血清微小 RNA-302b 在老年急性心肌梗死患者中的诊断价值[J]. 国际心血管病杂志, 2019, 46(5):309-312.
- [17] 耿国英,刘恒亮,赵玉洁,等. 血清 miR-208a 在急性冠状动脉综合征早期鉴别诊断中的价值[J]. 中华老年医学杂志, 2020, 39(8):874-878.

· 论 著 ·

HPV感染的CIN和宫颈癌患者血清TGF-β1、HPV16VLPs-IgG1和IgG2抗体表达的临床意义

陈娟^{1*} 宋化雨¹ 程瑶瑶¹ 谢佳²

[摘要] **目的** 分析人乳头瘤病毒(HPV)感染的宫颈上皮内瘤变(CIN)和宫颈癌患者血清TGF-β1、HPV16VLPs-IgG1和IgG2抗体水平及阳性表达情况。**方法** 选取2017年5月至2018年8月在本院接受治疗的HPV感染、CIN和宫颈癌患者为研究对象,选取同期非HPV感染的子宫肌瘤或宫颈炎者作为对照组。观察各组血清TGF-β1、HPV16VLPs-IgG1和IgG2抗体吸光度A值及阳性表达的差异,分析各指标阳性表达与宫颈癌病理特征的关系,采用多因素Logistic回归筛选影响宫颈癌患者TGF-β1、HPV16VLPs-IgG1和IgG2抗体阳性表达的独立危险因素。**结果** HPV感染、CIN I、CIN II~III、宫颈癌及对照组患者血清TGF-β1、HPV16VLPs-IgG1和IgG2抗体阳性表达率及吸光度A值差异均有统计学意义($P<0.05$),且阳性表达率和吸光度A值均随宫颈病变级别升高而升高。CIN II~III及宫颈癌患者血清TGF-β1与HPV16VLPs-IgG1和IgG2抗体吸光度A值均呈显著正相关($P<0.05$)。组织分化程度、FIGO分期是宫颈癌患者血清TGF-β1、HPV16VLPs-IgG1和IgG2阳性表达的独立危险因素($P<0.05$)。**结论** HPV感染的CIN和宫颈癌患者血清TGF-β1、HPV16VLPs-IgG1和IgG2抗体阳性表达率均较高,且与宫颈病变级别密切相关。

[关键词] 人乳头瘤病毒;宫颈癌;宫颈上皮内瘤变;转化生长因子-β1;免疫球蛋白

Clinical significance of serum TGF- beta 1, HPV16VLPs-IgG1 and IgG2 antibodies levels in patients with HIV-infected CIN and cervical cancer

CHEN Juan¹, SONG Huayu¹, CHENG Yaoyao¹, XIE Jia²

(1. Department of Obstetrics and Gynecology, Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Hospital, Panzhihua, Sichuan, China, 617000; 2. Department of Obstetrics and Gynecology, Panzhihua Central Hospital, Panzhihua, Sichuan, China, 617000)

[ABSTRACT] **Objective** To analyze the serum TGF- beta 1, HPV16VLPs-IgG1 and IgG2 antibody levels in patients with human papillomavirus (HPV) infected cervical intraepithelial neoplasia (CIN) and cervical cancer, and their clinical significance. **Methods** Patients with HPV infection, CIN and cervical cancer treated in our hospital from May 2017 to August 2018 were selected as the research objects. Patients with non-hpv infected uterine fibroids or cervicitis treated in our hospital at the same time were selected as the control group. The differences in the absorbance A value and positive expression of serum TGF- beta 1, hpv16vlp-igg1 and IgG2 antibodies in each group were observed, and the relationship between different pathological features of cervical cancer patients and the expression of TGF- beta 1, hpv16vlp- igg1 and IgG2 antibodies was compared. Multivariate logistic regression was used to screen the independent risk factors affecting positive expression of TGF- beta 1, HPV16VLPs-IgG1 and IgG2 antibodies in patients with cervical cancer. **Results** There were statistically significant differences in the positive expression rates of serum TGF-β1, HPV16VLPs-

基金项目:四川省科技计划项目(2017JY26615)

作者单位:1. 四川省攀枝花市中西医结合医院妇产科,四川,攀枝花,617000

2. 四川省攀枝花市中心医院妇产科,四川,攀枝花,617000

*通信作者:陈娟, E-mail:9305479@qq.com

IgG1 and IgG2 antibodies and the Absorbance A value in patients with HPV infection, CIN I, CIN II ~ III, cervical cancer and the control group ($P < 0.05$), and the positive expression rates and the Absorbance A value increased with the increase of cervical lesion grade. Serum TGF- β 1 of patients with CIN II ~ III and cervical cancer showed significant positive correlation with the absorbance A value of HPV16VLPs-IgG1 and IgG2 antibodies ($P < 0.05$). The degree of tissue differentiation and FIGO staging are independent risk factors for the positive expression of serum TGF- β 1, HPV16VLPs-IgG1 and IgG2 in patients with cervical cancer ($P < 0.05$).

Conclusion The positive expression rates of serum TGF- β 1, HPV16VLPs-IgG1 and IgG2 antibodies in patients with HPV-infected CIN and cervical cancer are all higher, and are closely related to the level of cervical lesions.

[KEY WORDS] Human papillomavirus; Cervical cancer; Cervical intraepithelial neoplasia; Convert growth factor - beta 1; Immunoglobulin

人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)是导致宫颈上皮内瘤变(cervical intraepithelial neoplasia, CIN)的主要因子^[1]。CIN是病毒性的癌症前体,也是宫颈癌发展的必要条件^[2]。机体免疫力很大程度上决定HPV感染的可能性,T细胞介导的细胞免疫应答在抗HPV中发挥了重要的作用主要作用^[3-4]。抗人乳头瘤病毒样颗粒(Human papillomavirus virus-like particles, HPV VLPs)免疫球蛋白(immunoglobulin, Ig)的G1和G2抗体是评价HPV感染程度的特异性标志物,可以反映机体受HPV进攻时出现的免疫反应程度^[5-6]。转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)与细胞增殖、分化密切相关^[7]。本次研究以单纯HPV感染、CIN和宫颈癌患者为研究对象,对比分析血清TGF- β 1、HPV16VLPs-IgG1和IgG2抗体水平及阳性表达情况,探讨其在宫颈病变发生发展中的临床意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2017年5月至2018年8月在本院接受治疗的HPV感染、CIN和宫颈癌患者为研究对象。纳入标准:①成年者;②TCT结果异常、HPV-DNA阳性、EC及宫颈活检或术后病理明确诊断为单纯HPV感染、CIN和宫颈癌;③无其他生殖系统疾病者。排除标准:①合并其他原发肿瘤、全身感染、免疫疾病等患者;②临床资料不全者;③不愿参与本项研究者。根据标准共纳入病例数150例,其中HPV感染者32例,年龄平均(43.68 \pm 11.37)岁;CIN者68例,年龄平均(45.63 \pm 13.02)岁,CIN I者30例,CIN II~III者38例;宫颈癌者50例,年龄平均(45.66 \pm 12.98)岁;同时选取同期在本院接受诊治的非HPV感染的子宫肌瘤或宫颈炎者50例作为对照组,年龄平均(45.69 \pm 13.11)岁。各组一般资

料差异无统计学意义($P > 0.05$)。所有患者知情同意。本实验经医院伦理委员会批准同意。

1.2 检测指标及方法

收集所有受试者外周静脉血2 mL,静置2 h后,常规离心后分离获得血清,置-80 $^{\circ}$ C冰箱保存。在HPV-16VLPs包被的96孔酶标板上,每孔加入80 μ L样品稀释液;再加入20 μ L用前述方法检测出的IgG阳性的血清,用酶标仪测定在双波长450/620 nm下各孔的吸光度A值,根据试剂盒说明书进行操作最后得到血清HPV VLPs的IgG1、IgG2抗体水平。另取所有受试者外周静脉血5 mL,将血液样品离心3 000 r/min,20分钟分离血清并且储存在-80 $^{\circ}$ C冰箱中待测严格按TGF- β 1 ELISA试剂盒说明书操作。

1.3 判定标准

临界值(C.O)=阴性对照孔A值均值+0.18,参见试剂盒。样品A值(S)/C.O<1者为HPV抗体阴性,样品A值(S)/C.O \geq 1者为HPV抗体阳性。

1.4 统计分析

采用SPSS 18.0软件进行数据分析。计数资料用n(%)表示,用 χ^2 比较,计量资料用($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用方差分析,两组间比较采用t检验,相关性采用Pearson相关分析,采用Logistic回归分析法分析影响宫颈癌患者TGF- β 1、HPV16VLPs-IgG1和IgG2抗体表达的相关因素。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血清TGF- β 1、HPV16VLPs-IgG1和IgG2抗体水平及阳性表达情况

HPV感染、CIN I、CIN II~III、宫颈癌及对照组患者血清TGF- β 1、HPV16VLPs-IgG1和IgG2抗体阳性表达率及吸光度A值差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表1。

表1 各组血清 TGF-β1、HPV16VLPs-IgG1 和 IgG2 抗体吸光度 A 值及阳性表达的差异 [n(%), ($\bar{x} \pm s$)]
Table 1 The difference of absorbance A value and positive expression of serum TGF-β1, HPV16VLPs-IgG1 and IgG2 antibodies [n(%), ($\bar{x} \pm s$)]

组别	例数	TGF-β1		HPV16VLPs-IgG1		HPV16VLPs-IgG2	
		阳性表达	A 值	阳性表达	A 值	阳性表达	A 值
对照组	50	4(8.0)	0.195±0.028	4(8.0)	0.294±0.037	5(10.0)	1.578±0.074
HPV 感染	32	8(25.0) ^a	0.209±0.052	8(25.0) ^a	0.308±0.043	9(28.1) ^a	0.568±0.051 ^a
CIN I	30	8(26.7) ^a	0.517±0.124 ^{ab}	9(30.0) ^a	1.083±0.126 ^{ab}	9(30.0) ^a	1.613±0.088 ^b
CIN II~III	38	16(42.1) ^a	0.850±0.228 ^{ab}	16(42.1) ^a	1.799±0.154 ^{abc}	15(39.5) ^a	1.761±0.099 ^b
宫颈癌	50	42(84.0) ^{abcd}	1.439±0.303 ^{abcd}	40(80.0) ^{abcd}	2.464±0.232 ^{abcd}	38(76.0) ^{abcd}	1.999±0.175 ^{abcd}
χ ² /F 值		67.466	345.629	59.600	1903.334	49.458	855.473
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与对照组比较,^aP<0.05;与 HPV 感染比较,^bP<0.05;与 CIN I 比较,^cP<0.05;与 CIN II~III 比较,^dP<0.05。

2.2 血清 TGF-β1 与 HPV16VLPs-IgG1 和 IgG2 抗体的相关性

CIN II~III 及宫颈癌患者血清 TGF-β1 与 HPV16VLPs-IgG1 和 IgG2 抗体吸光度 A 值均呈显著正相关(CIN II~III: r=0.661, P<0.001; r=0.529, P=0.001。宫颈癌: r=0.850, P<0.001; r=0.738, P<0.001)。

2.3 血清 TGF-β1、HPV16VLPs-IgG1 和 IgG2 抗体阳性表达与宫颈癌临床病理特征的关系

宫颈癌患者血清 TGF-β1、HPV16VLPs-IgG1 和 IgG2 抗体阳性表达者组织低、中分化, II~III 期,

有无淋巴结转移所占比例明显高于阴性表达者, 差异均有统计学意义(P<0.05)。见表 2。

2.4 宫颈癌血清 TGF-β1、HPV16VLPs-IgG1 和 IgG2 抗体阳性表达影响因素的 Logistic 回归分析

分别以宫颈癌血清 TGF-β1、HPV16VLPs-IgG1 和 IgG2 抗体阳性表达为因变量, 以上述单因素分析中 P<0.05 的指标为自变量, 建立 Logistic 回归模型, 结果显示, 组织分化程度、FIGO 分期是宫颈癌患者血清 TGF-β1、HPV16VLPs-IgG1 和 IgG2 阳性表达的独立危险因素(P<0.05)。见表 3。

表2 血清 TGF-β1、HPV16VLPs-IgG1 和 IgG2 抗体阳性表达与宫颈癌临床病理特征的关系 [n(%)]
Table 2 Correlation between positive expression of serum TGF-β1, HPV16VLPs-IgG1 and IgG2 antibodies and clinicopathological features of cervical cancer [n(%)]

项目	n	TGF-β1		HPV16VLPs-IgG1 抗体		HPV16VLPs-IgG2 抗体		
		阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性	
年龄	<50 岁	35	30(85.7)	5(14.3)	27(77.1)	8(22.9)	25(71.4)	10(28.6)
	≥50 岁	15	12(80.0)	3(20.0)	13(86.7)	2(13.3)	13(86.7)	2(13.3)
χ ² 值			0.255		0.595		1.337	
P 值			0.614		0.440		0.248	
肿瘤直径	<4cm	28	22(78.6)	6(21.4)	22(78.6)	6(21.4)	21(75.0)	7(25.0)
	≥4cm	22	20(90.9)	2(9.1)	18(81.8)	4(18.2)	17(77.3)	5(22.7)
χ ² 值			1.395		0.081		0.035	
P 值			0.238		0.776		0.852	
组织分化程度	高分化	28	21(75.0)	7(25.0)	18(64.3)	9(35.7)	17(60.7)	11(39.3)
	低、中分化	22	21(95.5)	1(4.5)	21(95.5)	1(4.5)	21(95.5)	1(4.5)
χ ² 值			3.835		6.522		8.152	
P 值			0.050		0.011		0.004	
病理类型	鳞癌	41	35(85.4)	6(14.6)	33(80.5)	8(19.5)	32(78.0)	9(22.0)
	腺癌	9	7(77.8)	2(22.2)	7(77.8)	2(22.2)	6(66.7)	3(33.3)
χ ² 值			0.316		0.034		0.524	
P 值			0.574		0.854		0.469	
FIGO 分期	I 期	23	16(69.6)	7(30.4)	13(56.5)	10(43.5)	11(47.8)	12(52.2)
	II~III 期	27	26(96.3)	1(3.7)	27(100)	0(0)	27(100)	0(0)
χ ² 值			6.603		10.735		18.535	
P 值			0.010		0.001		<0.001	
淋巴结转移	无	30	23(76.7)	7(23.3)	20(66.7)	10(33.3)	19(63.3)	11(26.7)
	有	20	19(95.0)	1(5.0)	20(100)	0(0)	19(95.0)	1(5.0)
χ ² 值			4.688		8.333		6.597	
P 值			0.030		0.004		0.010	

表3 宫颈癌血清 TGF- β 1、HPV16VLPs-IgG1 和 IgG2 抗体阳性表达影响因素的 Logistic 回归分析Table 4 Logistic regression analysis of the factors affecting the positive expression of TGF- β 1, HPV16VLPs-IgG1 and

IgG2 antibodies in serum of cervical cancer

因变量	自变量	B 值	S.E. 值	Wald χ^2 值	OR 值	95%CI	P 值
血清 TGF- β 1 阳性表达	组织分化程度	-2.461	1.204	4.177	0.085	0.008~0.904	0.041
	FIGO 分期	2.688	1.187	5.123	14.695	1.434~150.623	0.024
	淋巴结转移	1.459	1.234	1.398	4.302	0.383~48.308	0.237
	常量	1.876	2.398	0.612	6.528		0.434
血清 HPV16VLPs-IgG1 抗体阳性表达	组织分化程度	-2.760	1.213	5.176	0.063	0.006~0.682	0.023
	FIGO 分期	3.011	1.241	5.885	20.312	1.783~231.373	0.015
	淋巴结转移	1.027	1.306	0.619	2.794	0.216~36.131	0.431
	常量	1.700	2.419	0.494	5.472	0.002~0.283	0.482
宫颈癌血清 HPV16VLPs-IgG2 抗体阳性表达	组织分化程度	-3.841	1.316	8.519	0.021		0.004
	FIGO 分期	3.746	1.342	7.789	42.360	3.051~588.183	0.005
	淋巴结转移	1.459	1.454	1.007	4.303	0.249~74.446	0.316
	常量	2.137	2.415	0.783	8.474		0.376

注:组织分化程度:1=低、中分化,2=高分化;FIGO 分期:1=I 期,2=II~III 期;淋巴结转移:1=有转移,0=无转移。

3 讨论

HPV 感染常在一年内自然清除,但有一部分难清除的 HPV,尤其是 HPV16 会导致 CIN 甚至宫颈癌的发生^[8-9]。HPV 感染能否清除或是持续感染主要取决于机体的免疫力,因此,可以将血清免疫因子水平作为感染 HPV 后机体病变的评测指标。

目前已知 Th2 细胞可通过分泌炎症因子激活 IgG1, Th1 细胞通过分泌 TGF- β 1 促进其分化为 IgG2^[10-11]。Wang 等^[12]研究发现,HPV 感染者血清 IgG1 常显著升高,且是最终进展为宫颈癌的独立危险因素,其宫颈癌相对风险随 IgG1 水平的升高而逐渐增加。另有研究发现,大部分血清 IgG 抗体(+),而 HPV16-DNA(-)的正常女性,其血清抗体主要以 IgG2 为主;而 48% 的 HPV16-DNA(+) 的 CIN 及 5% 的 HPV16-DNA(+) 的宫颈癌女性,也能检测出以 IgG2 为主的抗体,提示 HPV 感染后以 HPV16VLPs-IgG2 抗体为主的免疫反应可能对 HPV 感染清除及 CIN 的逆转具有重要预测价值^[13-14]。而杨文静等^[15]的研究发现,CIN 和宫颈癌患者血清内 TGF- β 1 及其受体的浓度均明显升高, TGF- β 1 与癌细胞浸润、淋巴结转移和癌症分期等密切相关,提示 TGF- β 1 高表达是宫颈癌的主要表现之一,并参与宫颈癌变的发生发展。

本研究结果发现,随着宫颈病变级别的升高,血清 TGF- β 1、HPV16VLPs-IgG1 和 IgG2 抗体阳性表达率及吸光度 A 值也随之升高,表明各指标血清学检测阳性既代表现存 HPV 感染,也可表示既往 HPV 感染,是累积 HPV 的指标而 HPV16VLPs-IgG

抗体表达可能通过对血清 TGF- β 1 表达的调控而促进宫颈病变的发生发展。另外,非 HPV 感染子宫病变、HPV 感染、CIN I 患者以 IgG2 抗体表达为主,CIN II~III 及宫颈癌患者则以 IgG1 抗体表达为主,提示病毒清除与 Th1 反应有关,而随宫颈病变程度级别的升高逐渐向 Th2 反应转变。另外,本研究还发现,宫颈癌组织低、中分化程度以及 FIGO 分期为 II~III 期是宫颈癌患者 TGF- β 1、HPV16VLPs-IgG1 和 IgG2 抗体阳性表达的独立危险因素。提示检测 TGF- β 1、HPV16VLPs-IgG1 和 IgG2 抗体阳性表达情况可能对评估宫颈癌病情及预后具有一定的参考价值。

本研究由于 HPV 血清检测存在时间差异, HPV 感染后很长时间内才能在血清中检测到,许多新近感染 HPV 的患者因尚未发生血清转换而抗体检测阴性,在接下来的研究中需要对 HPV 相关指标作更加准确的分析,为 HPV16VLPs-IgG1 和 IgG2 抗体、TGF- β 1 成为 HPV 相关疾病的诊断、治疗的有效指标提供依据。

参考文献

- [1] Hoffman SR, Le T, Lockhart A, et al. Patterns of persistent HPV infection after treatment for cervical intraepithelial neoplasia (CIN): A systematic review [J]. Int J Cancer, 2017, 141(1):8-23.
- [2] Mittal S, Basu P, Muwonge R, et al. Risk of high-grade precancerous lesions and invasive cancers in high-risk HPV-positive women with normal cervix or CIN I at baseline—A population-based cohort study [J]. Intern J Cancer, 2017, 140(8): 1850-1859.

(下转第 937 页)

动态监测降钙素原联合T细胞亚群PD-1表达水平对脓毒症预后的预测价值

钟坚¹ 李少洪¹ 陈金成¹ 陈丹¹ 张伟¹ 李小悦^{2*}

[摘要] **目的** 分析动态监测降钙素原(PCT)联合T细胞亚群程序性死亡受体-1(PD-1)表达水平对脓毒症预后的预测价值。**方法** 选择2018年10月至2020年10月本院急诊监护室(EICU)及重症监护室(ICU)收治的195例脓毒症患者为研究对象,根据28 d后预后情况分为死亡组($n=37$)与生存组($n=158$)。比较两组基线资料[急性生理与慢性健康评分(APACHE II)、感染相关性器官功能衰竭评分(SOFA)]、入院时、入院3~4 d、7~8 d后PCT、T细胞亚群PD-1表达[CD3⁺T细胞PD-1(PD-1/CD3⁺)、PD-1/CD4⁺、PD-1/CD8⁺、CD4⁺/CD3⁺细胞中PD-1、CD8⁺/CD3⁺细胞中PD-1],分析PCT、T细胞亚群PD-1表达与APACHE II、SOFA评分的相关性,探讨脓毒症预后的影响因素,评价不同时间点PCT联合T细胞亚群PD-1表达对脓毒症预后的预测价值。**结果** 死亡组入院3~4 d、7~8 d后PCT、CD4⁺/CD3⁺细胞中PD-1、CD8⁺/CD3⁺细胞中PD-1均高于生存组,差异有统计学意义($P<0.05$);入院3~4 d、7~8 d后PCT、CD4⁺/CD3⁺细胞中PD-1、CD8⁺/CD3⁺细胞中PD-1表达均与APACHE II、SOFA评分呈正相关($P<0.05$);入院3~4 d、7~8 d后PCT、CD4⁺/CD3⁺细胞中PD-1、CD8⁺/CD3⁺细胞中PD-1表达是脓毒症预后的重要影响因素($P<0.05$);入院7~8 d后PCT、CD4⁺/CD3⁺细胞中PD-1、CD8⁺/CD3⁺细胞中PD-1联合预测脓毒症预后的曲线下面积(AUC)最大。**结论** 动态监测PCT联合T细胞亚群PD-1表达可为脓毒症早期针对性治疗方案制定、预后预测提供可靠依据。

[关键词] 动态监测;降钙素原;T细胞亚群;程序性死亡受体-1;脓毒症;预后

Dynamic monitoring of procalcitonin combined with PD-1 expression level of T cell subsets for predicting prognosis of sepsis

ZHONG Jian¹, LI Shaohong¹, CHEN Jincheng¹, CHEN Dan¹, ZHANG Wei¹, LI Xiaoyue^{2*}

[1. Department of Emergency Medicine, Donghua Hospital Affiliated to Sun Yat Sen University (Emergency Department, DongGuan Tungwah Hospital, Guangdong Dongguan), Dongguan, Guangdong, China, 523110; 2. Department of Critical Care Medicine, the Fifth Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zhuhai, Guangdong, China, 519100]

[ABSTRACT] **Objective** To analyze the predictive value of dynamic monitoring of procalcitonin (PCT) combined with T cell subsets programmed death receptor-1 (PD-1) expression on the prognosis of sepsis. **Methods** From October 2018 to October 2020, 195 patients with sepsis admitted to the emergency intensive care unit (EICU) and intensive care unit (ICU) of our hospital were selected as the research objects. According to the prognosis of 28 days, they were divided into death group ($n=37$) and survival group ($n=158$). The baseline data [acute physiology and chronic health evaluation - II (APACHE II), sepsis related organ failure assessment (SOFA)], the expressions of PCT and T cell subsets PD-1 [CD3⁺T cell PD-1 (PD-1/CD3⁺), PD-1/CD4⁺, PD-1/CD8⁺, PD-1 in CD4⁺/CD3⁺ cells, PD-1 in CD8⁺/CD3⁺ cells] at admission, 3 to 4 days, and 7 to 8 days after admission were compared between the two groups. The correlation between the expression of

基金项目:东莞市社会科技发展重点项目(2018507150461630)

作者单位:1. 中山大学附属东华医院(东莞东华医院)急诊医学科,广东,东莞 523110

2. 遵义医科大学第五附属(珠海)医院重症医学科,广东,珠海 519100

*通信作者:李小悦, E-mail: euyeyu1983@126.com

PCT, T cell subset PD-1 and APACHE II, SOFA score was analyzed, and the factors affecting the prognosis of sepsis were discussed. The predictive value of PCT combined with PD-1 expression of T cell subsets at different time points on the prognosis of sepsis was evaluated. **Results** The PCT and PD-1 in CD4⁺/CD3⁺ cells and in CD8⁺/CD3⁺ cells in the death group were higher than those in the survival group 3 to 4 days and 7 to 8 days after admission, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The expressions of PCT and PD-1 in CD4⁺/CD3⁺ cells and CD8⁺/CD3⁺ cells were positively correlated with APACHE II and SOFA scores 3 to 4 days and 7 to 8 days after admission ($P < 0.05$). The expression of PCT and PD-1 in CD4⁺/CD3⁺ cells and CD8⁺/CD3⁺ cells were important factors influencing the prognosis of sepsis after 3 to 4 days and 7 to 8 days after admission ($P < 0.05$). The area under the curve (AUC) predicted by the combination of PCT and PD-1 in CD4⁺/CD3⁺ cells and CD8⁺/CD3⁺ cells 7-8 days after admission to the hospital was the largest. **Conclusion** Dynamic monitoring of the expression of PCT combined with PD-1 of T cell subsets can provide a reliable basis for the formulation of early targeted treatment plans and prognosis prediction of sepsis.

[KEY WORDS] Dynamic monitoring; Procalcitonin; T cell subsets; Programmed death receptor-1; Sepsis; Prognosis

脓毒症是重症监护室(intensive care units, ICU)患者死亡的主要原因,调查统计,全世界每年脓毒症患病人数 > 1900 万,其中病死率高达 25%~80%^[1]。脓毒症病理机制较为复杂,相关研究表明^[2],促炎与抗炎反应所致免疫抑制反应是其主要的病理机制,而程序性死亡受体-1(programmed cell death-1, PD-1)在 T 细胞亚群的持续性高表达可能是参与免疫抑制形成的直接因素。降钙素原(procalcitonin, PCT)是一种内源性非类固醇类抗炎物质,可调控细胞因子,评估机体感染程度。然而关于 PCT 联合 T 细胞亚群 PD-1 表达对脓毒症预后的预测效能临床尚未完全明确,仍需进一步论证。基于此,本研究尝试动态监测 PCT 联合 T 细胞亚群 PD-1 表达水平对脓毒症预后的预测价值。

1 资料和方法

1.1 一般资料

选择 2018 年 10 月至 2020 年 10 月本院急诊监护室(emergency intensive care unit, EICU)及 ICU 收治的 195 例脓毒症患者为研究对象,均符合脓毒症诊断标准^[3];排除患有肿瘤、自身免疫性疾病及原发器官功能障碍者;入院前 2 周使用糖皮质激素或其他能影响免疫功能药物者;长期心源性休克、急性脑血管病变或长期器官灌注异常者。其中女 68 例,男 127 例,45~72 岁,年龄平均(56.20±4.16)岁;根据 28 d 后预后情况分为死亡组($n=37$)与生存组($n=158$)。本院伦理委员会经审核评议同意本研究,研究对象均知情同意。

1.2 方法

1.2.1 基线资料

采用一般调查问卷收集患者年龄、性别、感染来源、感染类型、急性生理与慢性健康评分(acute physiology and chronic health evaluation II, APACHE II)^[4]、感染相关性器官功能衰竭评分(sepsis related organ failure assessment, SOFA)^[5]等内容,其中 APACHE II 评分范围为 0~71 分,得分与病情程度呈正相关;SOFA 评分主要包含呼吸系统、血液系统、肝脏系统、心血管系统、中枢神经系统、肾脏等 6 项,总分 0~24 分,评分越低,表示病情越轻,预后越好。

1.2.2 PCT、T 细胞亚群 PD-1 表达检测

分别于入院时、入院 3~4 d、7~8 d 后空腹取外周静脉血 4 mL,均分为 2 份:①取其中一份,常规离心处理[1 000×g 离心 10 min(离心半径 8 cm)],取上清液,-80℃低温保存,根据瑞士罗氏公司 E170 全自动电化学发光免疫分析仪及配套试剂盒说明书测定血清 PCT 水平;②另一份添加适量肝素抗凝,根据美国 Becton Dickinson 公司流式细胞仪说明书测定 CD3⁺T 细胞 PD-1(PD-1/CD3⁺)、CD4⁺T 细胞 PD-1(PD-1/CD4⁺)、CD8⁺T 细胞 PD-1(PD-1/CD8⁺)、CD4⁺/CD3⁺细胞中 PD-1、CD8⁺/CD3⁺细胞中 PD-1 表达。

1.2.3 治疗方法

所有患者均合理应用敏感抗菌药物,同时予以营养支持、扩充血容量、纠正水电解质、酸碱紊乱等基础治疗。

1.3 统计学方法

采用统计学软件 SPSS 22.0 处理数据,计量

资料用($\bar{x} \pm s$)描述、两组间比较用 t 检验;计数资料用 $n(\%)$ 表示、 χ^2 检验;采用 COX 回归分析脓毒症预后的影响因素;采用 Pearson 相关系数模型分析 PCT、T 细胞亚群 PD-1 表达与 APACHE II、SOFA 评分的相关性;绘制受试者工作特征曲线(ROC)得到曲线下面积(AUC),检验入院 3~4 d、7~8 d 后 PCT 联合 T 细胞亚群 PD-1 表达对脓毒症预后的预测价值。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组基线资料比较

两组年龄、性别、感染来源比较差异无统计学意义($P > 0.05$);感染类型、APACHE II 评分、SOFA 评分比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

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

基线资料	死亡组 ($n=37$)	生存组 ($n=158$)	χ^2/t 值	P 值
男性	24(64.86)	103(65.19)	0.01	0.970
年龄(岁)	58.44±12.61	55.68±15.94	0.983	0.327
感染来源				
呼吸道	11(29.73)	44(27.85)		
泌尿道	9(24.32)	35(22.15)		
肝胆系统	8(21.62)	31(19.62)		
血流感染	4(10.814)	20(12.66)	0.569	0.989
皮肤组织	2(5.41)	12(7.59)		
其他	3(8.11)	16(10.13)		
感染类型				
脓毒症	13(35.14)	99(62.66)	9.290	0.002
脓毒性休克	24(64.86)	59(47.34)		
APACHE II 评分(分)	23.92±8.23	15.28±6.84	6.644	<0.001
SOFA 评分(分)	10.14±4.76	6.36±3.92	5.061	<0.001

2.2 两组不同时间点 PCT、T 细胞亚群 PD-1 表达比较

死亡组入院 3~4 d、7~8 d 后 PCT、CD4⁺/CD3⁺ 细胞中 PD-1、CD8⁺/CD3⁺ 细胞中 PD-1 均高于生存组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

2.3 PCT、T 细胞亚群 PD-1 表达与 APACHE II、SOFA 评分的相关性

Pearson 相关性分析可知,入院 3~4 d、7~8 d 后 PCT、CD4⁺/CD3⁺ 细胞中 PD-1、CD8⁺/CD3⁺ 细胞中 PD-1 表达均与 APACHE II、SOFA 评分呈正相关($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 PCT、T 细胞亚群 PD-1 表达与 APACHE II、SOFA 评分的相关性

Table 3 Correlation between PCT, PD-1 expression of T cell subsets and Apache II, sofa scores

指标	APACHE II 评分		SOFA 评分	
	r 值	P 值	r 值	P 值
入院 3~4 d 后				
PCT	0.508	0.009	0.467	0.014
CD4 ⁺ /CD3 ⁺ 细胞中 PD-1	0.519	0.005	0.520	0.004
CD8 ⁺ /CD3 ⁺ 细胞中 PD-1	0.537	0.001	0.543	<0.001
入院 7~8 d 后				
PCT	0.635	<0.001	0.629	<0.001
CD4 ⁺ /CD3 ⁺ 细胞中 PD-1	0.607	<0.001	0.598	<0.001
CD8 ⁺ /CD3 ⁺ 细胞中 PD-1	0.624	<0.001	0.615	<0.001

2.4 脓毒症预后影响因素

以患者 28 d 后预后为因变量(生存=0,死亡=1),建立 COX 回归模型,将感染类型、SOFA 评分、APACHE II 评分、血乳酸等其他因素调整后,入院 3~4 d、7~8 d 后 PCT、CD4⁺/CD3⁺ 细胞中 PD-1、CD8⁺/CD3⁺ 细胞中 PD-1 表达仍是脓毒症预后的重要因素($P < 0.05$)。见表 4。

表 2 两组不同时间点 PCT、T 细胞亚群 PD-1 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of PCT and PD-1 expression of T cell subsets between the two groups at different time points ($\bar{x} \pm s$)

时间	组别	例数	PCT($\mu\text{g/L}$)	PD-1/CD3 ⁺ (%)	PD-1/CD4 ⁺ (%)	PD-1/CD8 ⁺ (%)	CD4 ⁺ /CD3 ⁺ 细胞中 PD-1 (%)	CD8 ⁺ /CD3 ⁺ 细胞中 PD-1 (%)
入院时	死亡组	37	49.66±18.56	8.60±3.49	4.43±1.39	3.87±1.50	15.69±6.16	18.59±7.93
	生存组	158	48.30±14.14	9.39±2.15	3.86±1.84	4.12±2.25	16.89±5.80	19.53±6.81
	t 值		0.494	1.761	1.769	0.643	1.120	0.732
	P 值		0.622	0.080	0.079	0.521	0.264	0.465
入院 3~4 d 后	死亡组	37	68.63±20.49	10.87±3.31	5.10±2.72	4.39±2.10	22.91±8.10	23.68±6.65
	生存组	158	39.45±15.27	9.88±5.69	5.05±2.57	3.78±1.66	13.82±4.06	17.39±5.75
	t 值		7.936	1.843	0.105	1.908	9.828	5.810
	P 值		<0.001	0.067	0.916	0.058	<0.001	<0.001
入院 7~8 d 后	死亡组	37	73.84±20.43	11.58±2.51	5.14±2.24	4.26±1.16	26.98±10.61	25.51±8.02
	生存组	158	35.62±13.86	10.54±4.55	5.54±2.10	4.33±1.06	12.47±5.49	16.15±4.86
	t 值		13.677	1.342	1.030	0.355	11.776	9.173
	P 值		<0.001	0.181	0.304	0.723	<0.001	<0.001

表4 脓毒症预后影响因素 COX 回归分析

Table 4 COX regression analysis of prognostic factors of sepsis

	因素	β 值	S.E. 值	Wald χ^2 值	HR	95%CI	P 值
入院 3~4 d 后	PCT	0.990	0.328	9.106	2.691	1.695~4.271	<0.001
	CD4 ⁺ /CD3 ⁺ 细胞中 PD-1	0.911	0.332	7.530	2.487	1.592~3.885	<0.001
	CD8 ⁺ /CD3 ⁺ 细胞中 PD-1	0.829	0.340	5.946	2.291	1.468~3.576	<0.001
入院 7~8 d 后	PCT	1.149	0.319	12.971	3.155	2.041~4.876	<0.001
	CD4 ⁺ /CD3 ⁺ 细胞中 PD-1	1.007	0.308	10.690	2.737	1.735~4.319	<0.001
	CD8 ⁺ /CD3 ⁺ 细胞中 PD-1	0.923	0.297	9.664	2.518	1.614~3.927	<0.001

2.5 不同时间点 PCT、T 细胞亚群 PD-1 表达对脓毒症预后的预测价值

绘制 ROC 曲线显示,入院 7~8 d 后 PCT、CD4⁺/

CD3⁺细胞中 PD-1、CD8⁺/CD3⁺细胞中 PD-1 表达联合预测脓毒症预后的 AUC 大于入院 3~4 d 后,敏感度、特异度分别为 81.08%、94.30%。见表 5。

表5 不同时间点 PCT、T 细胞亚群 PD-1 表达对脓毒症预后的预测价值

Table 5 the predictive value of PCT and PD-1 expression in sepsis at different time points

	指标	AUC	95%CI	Z 值	cut-off 值	敏感度(%)	特异度(%)	P 值
入院 3~4 d 后	PCT	0.797	0.733~0.851	7.051	>58.98 $\mu\text{g/L}$	67.57	79.11	<0.001
	CD4 ⁺ /CD3 ⁺ 细胞中 PD-1	0.756	0.690~0.815	5.221	>20.54%	59.46	89.24	<0.001
	CD8 ⁺ /CD3 ⁺ 细胞中 PD-1	0.765	0.699~0.822	6.097	>22.07%	67.57	81.01	<0.001
	联合预测	0.850	0.792~0.897	8.579	-	70.27	93.04	<0.001
入院 7~8 d 后	PCT	0.830	0.770~0.880	8.967	>59.04 $\mu\text{g/L}$	62.16	89.87	<0.001
	CD4 ⁺ /CD3 ⁺ 细胞中 PD-1	0.831	0.771~0.881	7.836	>21.18%	64.86	91.14	<0.001
	CD8 ⁺ /CD3 ⁺ 细胞中 PD-1	0.826	0.765~0.876	7.301	>21.64%	75.68	80.38	<0.001
	联合预测	0.941	0.898~0.970	21.984	-	81.08	94.30	<0.001

3 讨论

T 细胞耗竭是促使脓毒症免疫抑制形成的重要机制^[6-7],而 PD-1 通过结合程序性细胞死亡蛋白配体-1(PD-L1),可诱导免疫受体酪氨酸转化为基序酪氨酸磷酸化,诱导负性信号传输,从而产生负性调节,抑制 T 细胞效应及增殖功能。另有学者指出^[8],PD-1 作为负性共刺激分子,其表达持续上调,提示 DCregs 分化,可抑制 T 细胞活化,参与外周免疫耐受形成。

本研究显示,CD4⁺/CD3⁺细胞中 PD-1、CD8⁺/CD3⁺细胞中 PD-1 在脓毒症死亡患者中呈异常升高表达,结合王宗培^[9]研究分析其机制可能在于:T 细胞亚群 PD-1 表达持续升高一定程度可引发线粒体呼吸功能障碍与糖酵解缺陷,提高 CD4⁺T 细胞凋亡易感性,抑制 CD4⁺T 细胞增殖,诱导 Treg 细胞释放大量白细胞介素 10,进而激活细胞过度活化保护性反应,降低 T 细胞免疫功能,介导持续性不可逆免疫抑制形成,从而增加脓毒症死亡风险。APACHE II、SOFA 评分是目前临床评估脓毒症病情程度的主要指标。本研究经 Pearson 相关性分析,入院 3~4 d、

7~8 d 后 CD4⁺/CD3⁺细胞中 PD-1、CD8⁺/CD3⁺细胞中 PD-1 表达均与脓毒症死亡患者 APACHE II、SOFA 评分存在正相关性,这一结果间接反映了 T 细胞亚群 PD-1 表达对脓毒症病情严重程度具有研究潜力。

PCT 是临床广泛认可的细菌感染早期生物学标志,其水平在持续性炎症或自身免疫疾病中迅速急剧增加^[10-11]。王绪松等^[12]通过 96 例脓毒症死亡患者发现,随时间推移,脓毒症死亡患者 PCT 水平出现持续升高,支持本研究观点,这可能归因于脓毒症死亡患者病情严重,感染无法得到有效控制,易诱发多器官障碍综合征,激活炎症级联反应,从而导致血清 PCT 水平明显升高。进一步经 COX 回归分析可知,入院 7~8 d 后 PCT HR 值为 3.155,表示 $\geq 42.87 \mu\text{g/L}$ 患者在某时刻死亡的危险度是 $< 42.87 \mu\text{g/L}$ 患者的 3.155 倍,佐证了 PCT 是脓症患者死亡的独立危险因素,但其与赵梦雅等^[13]观点存在一定差异,可能与纳入样本量、感染部位、合并器官损伤等情况有关。但由于脓症患者病因复杂性及感染程度不一,临床均认为与单一指标预测相比,多个指标联合更能准确评估患者预后。

因此,本研究尝试联合预测,结果显示,入院7~8 d后 PCT、CD4⁺/CD3⁺细胞中 PD-1、CD8⁺/CD3⁺细胞中 PD-1 联合预测脓毒症预后的 AUC 大于入院3~4 d后。提示联合检测 PCT、T 细胞亚群 PD-1 表达可作为开展个性化脓毒症治疗、判断患者预后的重要预测手段。

综上可知,动态监测 PCT 联合 T 细胞亚群 PD-1 表达可为脓毒症早期针对性治疗方案制定、预后预测提供可靠依据。但本研究为单中心病例对照,研究结果仍需大规模、多中心研究进一步证实。

参考文献

- [1] 薛秋丽,董丽华,刘忠民. T 淋巴细胞在脓毒症发病机制中的作用[J]. 中国实验诊断学, 2019, 23(2): 329-332.
- [2] 高经华,刘喆滢,刘志锋. 共抑制分子在脓毒症免疫功能障碍中作用的研究进展[J]. 中华危重病急救医学, 2020, 32(1): 121-125.
- [3] Rhodes A, Evans LE, Alhazzani W, et al. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016[J]. Int Care Med, 2017, 43(3): 304-377.
- [4] Zou X, Li S, Fang M, et al. Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II Score as a Predictor of Hospital Mortality in Patients of Coronavirus Disease 2019[J]. Crit Care Med, 2020, 48(8): e657-e665.
- [5] Su Y, Tu GW, Ju MJ, et al. Comparison of CRB - 65 and quick sepsis - related organ failure assessment for predicting the need for intensive respiratory or vasopressor support in patients with COVID-19[J]. J Infect, 2020, 81(4): 647-679.
- [6] 张俊谊,杨毅,刘玲. 程序性细胞死亡蛋白-1 及其配体与脓毒症中 T 细胞耗竭状态[J]. 中华内科杂志, 2019, 58(2): 158-160.
- [7] 曲冰杰,郭剑颖,王宏伟. 脓毒症患者免疫紊乱中树突细胞与 T 细胞分化及表型研究[J]. 中国免疫学杂志, 2019, 35(12): 1487-1490.
- [8] 江稳强. ICU 脓毒症(Sepsis 3.0)患者淋巴细胞亚群共信号分子表达的预后预测价值[D]. 广州:南方医科大学, 2018.
- [9] 王宗培. 脓毒症患者 T 细胞 PD-1、树突状细胞 PD-L1 的表达及意义[D]. 遵义:遵义医科大学, 2020.
- [10] 张永寿,王雁,何丽萍,等. 联合检测 WBC、SAA、PCT、CRP 在婴幼儿感染性疾病中的诊断价值[J]. 热带医学杂志, 2020, 20(2): 229-232.
- [11] 胡冰,周栩平,时英才,等. 血清 SAA、sTREM-1、PCT 联合检测在新生儿宫内感染性肺炎中的价值[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2021, 13(3): 441-444.
- [12] 王绪松,庞春玉,陈绵平. 血清 PCT sTREM-1 及 D-二聚体水平对脓毒症患者预后评估的价值[J]. 中国急救医学, 2019, 39(10): 949-952.
- [13] 赵梦雅,段美丽. 血乳酸和乳酸清除率与降钙素原联合检测对脓毒症患者病情严重程度及预后评估的临床意义[J]. 中华危重病急救医学, 2020, 32(4): 449-453.
- [3] Wang X, Wang G, Zhang L, et al. LncRNA PVT1 promotes the growth of HPV positive and negative cervical squamous cell carcinoma by inhibiting TGF-β1 [J]. Cancer Cell Int, 2018, 18(1): 70-75.
- [4] 潘静,许艳茹,闫泓霖,等. HPV 检测联合 TCT 和 SCC-Ag 评估宫颈癌早期治疗效果的应用[J]. 检验医学与临床, 2017, 14(18): 36-37.
- [5] 郭敏,朱波,叶琳,等. 宫颈癌术后 HPV 持续感染的危险因素及对免疫失衡的影响[J]. 中华医院感染学杂志, 2017, 27(17): 4000-4003.
- [6] Kim HJ, Cho SY, Park MH, et al. Comparison of the size distributions and immunogenicity of human papillomavirus type 16 L1 virus-like particles produced in insect and yeast cells[J]. Archiv Pharm Res, 2018, 41(5): 544-553.
- [7] 谢云鹏,柳新,刘兵,等. TGF-β1、Smad7 及 VEGF 在脑胶质瘤中表达及与病理特征、预后的关系[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2021, 13(1): 38-42.
- [8] 李莉,陈汶,杨欢,等. HPV 检测技术在宫颈癌中的研究进展[J]. 癌症进展, 2018, 16(3): 278-281.
- [9] 梁艳华,毕超,梁景耀,等. 不同亚型 HPV 感染与女性宫颈疾病的相关性[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2017, 9(3): 196-200.
- [10] 郭敏,朱波,叶琳. 宫颈癌术后 HPV 持续感染的危险因素及对免疫失衡的影响[J]. 中华医院感染学杂志, 2017, 27(17): 4000-4003.
- [11] 王惠霞,李淑红. 宫颈上皮内瘤变与宫颈癌中相关细胞因子的表达及意义[J]. 西南国防医药, 2017, 27(3): 285-287.
- [12] Wang ZH, Kjellberg L, Abdalla H, et al. Type specificity and significance of different isotypes of serum antibodies to human papillomavirus capsids[J]. J Infect Dis, 2000, 181(2): 456-462.
- [13] Matsumoto K, Yoshikawa H, Yasugi T, et al. Balance of IgG subclasses toward human papillomavirus type 16 (HPV16) L1-capsids is a possible predictor for the regression of HPV16-positive cervical intraepithelial neoplasia [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1999, 258(1): 128-131.
- [14] Matsumoto K, Yoshikawa H, Yasugi T, et al. IgG antibodies to human papillomavirus 16, 52, 58, and 6 L1 capsids: case-control study of cervical intraepithelial neoplasia in Japan [J]. J Med Virol, 2003, 69(3): 441-446.
- [15] 杨文静,王璐. 血清鳞状细胞癌相关抗原联合 IL-6、TGF-β 在宫颈癌中的诊断价值及临床意义[J]. 标记免疫分析与临床, 2017, 24(1): 77-80.

(上接第 932 页)

WBC、CRP/LYM%、PLT在病毒、呼吸道细菌感染中诊断效能

刘佳 孙成栋* 张雪梅 白鹭

[摘要] **目的** 探讨白细胞(WBC)、C反应蛋白与淋巴细胞百分比的比值(CRP/LYM%)、血小板(PLT)在病毒、呼吸道细菌感染中的鉴别诊断效能。**方法** 选取2017年5月至2020年6月本院发热急诊门诊收治的62例病毒性急性呼吸系统感染患者(病毒组)、66例细菌性急性呼吸系统感染患者(细菌组),并选取同期体检中心35例健康人群作为对照组。比较3组及病毒、呼吸道细菌感染不同严重程度者WBC、CRP/LYM%、PLT水平,分析各指标与严重程度的相关性以及对病毒、呼吸道细菌感染的鉴别诊断价值。**结果** 3组WBC、CRP、LYM%、CRP/LYM%、PLT比较,差异有统计学意义($P<0.05$);WBC、PLT与病毒严重程度呈负相关,WBC、CRP、CRP/LYM%与呼吸道细菌感染严重程度呈正相关,PLT与呼吸道细菌感染严重程度呈负相关($P<0.05$);WBC鉴别诊断病毒、呼吸道细菌感染的曲线下面积(AUC)大于CRP、LYM%、CRP/LYM%、PLT,为0.865。**结论** WBC、CRP/LYM%、PLT对病毒、呼吸道细菌感染具有一定鉴别诊断效能,可为临床合理应用抗菌药物治疗、促进病情转归提供实验室数据支持。

[关键词] 白细胞; C反应蛋白; 淋巴细胞百分比; 血小板; 病毒; 呼吸道细菌感染

Diagnostic efficacy of WBC, CRP/LYM%, PLT in viral and respiratory bacterial infections

LIU Jia, SUN Chengdong, ZHANG Xuemei, BAI Lu

(Department of Infectious Diseases, Beijing Jishuitan Hospital, Beijing, China, 100096)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the differential diagnosis of white blood cell (WBC), C-reactive protein to lymphocyte percentage (CRP/LYM%), and platelet (PLT) in the differential diagnosis of viral and respiratory bacterial infections. **Methods** From May 2017 to June 2020, 62 patients with viral acute respiratory infection (virus group) and 66 patients with bacterial acute respiratory infection (bacterial group) admitted to the fever emergency department of our hospital from May 2017 to June 2020 were selected, and 35 healthy people from the physical examination center during the same period were selected as the control group. The WBC, CRP/LYM%, and PLT levels of the three groups and those with different severity of viral and respiratory bacterial infections were compared, and the correlation between each index and severity and the differential diagnosis value of viral and respiratory bacterial infections were analyzed. **Results** There were statistically significant differences in WBC, CRP, LYM%, CRP/LYM%, and PLT among the three groups ($P<0.05$). WBC and PLT are negatively correlated with the severity of the virus. WBC, CRP, CRP/LYM% were positively correlated with the severity of respiratory tract bacterial infection, and PLT was negatively correlated with the severity of respiratory bacterial infection ($P<0.05$). The area under the curve (AUC) of WBC for differential diagnosis of viral and respiratory bacterial infections was greater than CRP, LYM%, CRP/LYM%, and PLT, which was 0.865. **Conclusion** WBC, CRP/LYM%, and PLT have a certain differential diagnosis efficacy for viral and respiratory bacterial infections, and they can provide laboratory data support for the

基金项目:吴阶平医学基金会临床科研专项资助基金(320.6750.19089-98)

作者单位:北京积水潭医院感染疾病科,北京市 100096

*通信作者:孙成栋, E-mail: wps336a@163.com

clinical rational application of antimicrobial therapy and the promotion of disease outcome.

[KEY WORDS] White blood cells; C-reactive protein; Lymphocyte percentage; Platelets; Viruses; Respiratory tract bacterial infection

急性呼吸系统感染为临床常见感染性疾病, 相关研究认为, 其发生病理机制可能与细菌、病毒等病原微生物入侵呼吸道后黏附于上皮细胞, 分泌大量毒素, 激活免疫介导的炎性损伤有关, 若未予以及时有效干预, 可严重威胁患者生命安全^[1-2]。然而由于呼吸道细菌感染、病毒感染初期均表现为发热、咽痛、咳嗽等临床症状, 极易发生混淆, 影响治疗方案选择。因此, 探索一种有效鉴别诊断手段具有重要价值。白细胞(white blood cell, WBC)是机体抵抗病原微生物侵袭的重要防线^[3]。血小板(platelets, PLT)作为一个关键免疫细胞, 是免疫炎性反应的首道屏障^[4]。淋巴细胞百分比(lymphocyte percentage, LYM%)可反映机体炎症反应, 评估机体感染时病理反应; C反应蛋白(C-reactive protein, CRP)亦可调控机体非特异性免疫应答^[5], 但关于二者比值在鉴别诊断急性呼吸系统感染类型中的价值临床尚未完全明确, 有待进一步证实。基于此, 本研究尝试探讨WBC、CRP/LYM%、PLT在病毒、呼吸道细菌感染中鉴别诊断效能。详情如下。

1 资料和方法

1.1 一般资料

选取2017年5月至2020年6月本院发热急诊门诊收治的62例病毒性急性呼吸系统感染患者(病毒组)、66例细菌性急性呼吸系统感染患者(细菌组), 并选取同期体检中心35例健康人群作为对照组。其中病毒组: 女25例, 男37例, 年龄平均(23.67±2.72)岁; 细菌组: 女22例, 男44例, 年龄平均(22.86±2.94)岁; 对照组: 女12例, 男23例, 年龄平均(22.73±3.15)岁。3组年龄、性别等基本资料比较, 差异无统计学意义($P>0.05$)。本院伦理委员会经审核评议同意本研究, 研究对象均知情同意。

纳入标准: 急性呼吸系统感染均符合《临床诊疗指南: 呼吸病学分册》^[6]中相关标准: 伴有发热、咳嗽咳痰、气促鼻塞及肺部湿啰音等临床症状体征; 经胸部X线片检查显示肺部密度增高影呈小点片状且边缘清晰度较低; 经鼻或咽拭子做病毒或细菌培养、分离或鉴定, 明确感染类型为病毒或细菌。排除标准: 合并肝肾等其他重要脏器器质

性病变者; 凝血机制紊乱或活动性出血者; 合并自身免疫系统疾病者; 精神行为异常者。

1.2 方法

治疗前抽取外周静脉血6 mL, 均分为2份: ①取其中一份, 置于乙二胺四乙酸二钾抗凝管中, 采用800i全自动血细胞分析仪测定WBC、PLT、LYM%, 严格按照日本SYSMEX株式会社提供的仪器说明书操作; ②另一份常规离心处理[2 500 r/min离心8 min(离心半径6 cm)], 取上清液, -70℃低温保存。运用免疫比浊法测定CRP, 严格按照上海雅吉生物科技有限公司提供的试剂盒说明书操作。

1.3 观察指标

①比较3组WBC、CRP、LYM%、CRP/LYM%、PLT。②比较病毒、呼吸道细菌感染不同严重程度者WBC、CRP、LYM%、CRP/LYM%、PLT水平, 其中病情严重程度均采用威斯康辛上呼吸道症状调查表(The Wisconsin Upper Respiratory Symptom Survey, WURSS-21)^[7]进行评估, ≤ 3 分为轻度, $3^+ \sim 7$ 分为中度, >7 分为重度。③分析WBC、CRP、LYM%、CRP/LYM%、PLT与病毒、呼吸道细菌感染严重程度的关系。④评价WBC、CRP、LYM%、CRP/LYM%、PLT对病毒、呼吸道细菌感染的鉴别诊断价值。

1.4 统计学方法

采用统计学软件SPSS 22.0处理数据, 计量资料以($\bar{x} \pm s$)描述, 多组间比较采用单因素方差分析, 进一步两两组间比较采用SNK-q检验, 组间比较采用独立样本 t 检验; 计数资料用 $n(\%)$ 表示, χ^2 检验; 相关性采用Spearman相关系数模型分析; 绘制受试者工作特征曲线(ROC)得到曲线下面积(AUC), $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3组WBC、CRP、LYM%、CRP/LYM%、PLT比较

3组WBC、CRP/LYM%比较: 细菌组>对照组>病毒组, 差异有统计学意义($P<0.05$); CRP: 细菌组>病毒组>对照组; LYM%: 病毒组>细菌组>对照组, 差异有统计学意义($P<0.05$); PLT: 细菌组<病毒组<对照组, 差异有统计学意义($P<0.05$)。见表1。

表1 3组WBC、CRP、LYM%、CRP/LYM%、PLT比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of WBC, CRP, LYM%, CRP/LYM%, PLT in 3 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	WBC($\times 10^9/L$)	CRP(mg/L)	LYM%(%)	CRP/LYM%	PLT($\times 10^9/L$)
病毒组	62	5.82 \pm 1.84 ^{ab}	10.22 \pm 3.34 ^{ab}	46.45 \pm 5.09 ^{ab}	0.22 \pm 0.06 ^{ab}	180.47 \pm 52.42 ^{ab}
细菌组	66	14.25 \pm 4.08 ^a	18.86 \pm 6.27 ^a	31.97 \pm 7.38 ^a	0.59 \pm 0.18 ^a	152.68 \pm 50.09 ^a
对照组	35	7.09 \pm 2.25	8.15 \pm 2.65	22.64 \pm 1.89	0.36 \pm 0.10	213.05 \pm 65.28
F值		138.679	81.889	214.338	133.475	14.326
P值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与对照组比较,^a $P<0.05$;与细菌组比较,^b $P<0.05$ 。

2.2 病毒感染不同严重程度者WBC、CRP、LYM%、CRP/LYM%、PLT水平比较

病毒感染不同严重程度者WBC、PLT比较:重度<中度<轻度,差异有统计学意义($P<0.05$);病毒不同严重程度者CRP/LYM%、CRP比较,差异无统计学意义($P>0.05$);中度和重度病毒感染者LYM%高于轻度患者($P<0.05$),中度和重度患者者LYM%比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表2。

2.3 呼吸道细菌感染不同严重程度者WBC、CRP、LYM%、CRP/LYM%、PLT水平比较

呼吸道细菌感染不同严重程度者WBC、CRP、CRP/LYM%比较:重度>中度>轻度,差异有统计学意义($P<0.05$);PLT比较:重度<中度<轻度,差异有统计学意义($P<0.05$);不同细菌感染程度患者LYM%比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表3。

表2 病毒感染不同严重程度者WBC、CRP、LYM%、CRP/LYM%、PLT比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of WBC, CRP, LYM%, CRP/LYM%, PLT in patients with different severity of virus infection ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	WBC($\times 10^9/L$)	CRP(mg/L)	LYM%(%)	CRP/LYM%	PLT($\times 10^9/L$)
轻度	26	8.02 \pm 2.55	9.88 \pm 3.03	42.96 \pm 5.69	0.23 \pm 0.06	205.42 \pm 62.34
中度	20	5.11 \pm 1.62 ^a	10.15 \pm 3.17	48.33 \pm 6.08 ^a	0.21 \pm 0.07	176.33 \pm 55.91 ^a
重度	16	3.13 \pm 1.02 ^{ab}	10.86 \pm 3.42	49.36 \pm 6.44 ^a	0.22 \pm 0.06	145.10 \pm 44.68 ^{ab}
F值		32.562	0.478	7.219	0.565	5.781
P值		<0.001	0.622	0.002	0.571	0.005

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

表3 呼吸道细菌感染不同严重程度者WBC、CRP、LYM%、CRP/LYM%、PLT比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of WBC, CRP, LYM%, CRP/LYM%, PLT in patients with different severity of respiratory tract bacterial infections ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	WBC($\times 10^9/L$)	CRP(mg/L)	LYM%(%)	CRP/LYM%	PLT($\times 10^9/L$)
轻度	28	11.02 \pm 3.54	13.64 \pm 4.76	34.10 \pm 9.06	0.40 \pm 0.11	180.15 \pm 52.26
中度	20	15.15 \pm 4.82 ^a	18.14 \pm 5.19 ^a	31.28 \pm 7.89	0.58 \pm 0.18 ^a	150.29 \pm 49.88 ^a
重度	18	18.27 \pm 5.01 ^{ab}	27.78 \pm 8.63 ^{ab}	30.87 \pm 8.11	0.90 \pm 0.27 ^{ab}	112.60 \pm 35.43 ^{ab}
F值		14.238	29.073	1.033	36.335	9.972
P值		<0.001	<0.001	0.362	<0.001	<0.001

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

2.4 WBC、CRP、LYM%、CRP/LYM%、PLT与病毒、呼吸道感染严重程度的关系

Spearman进行相关性分析显示,WBC、PLT与病毒严重程度呈负相关($P<0.05$),CRP、LYM%、CRP/LYM%与病毒严重程度正相关性($P>0.05$);WBC、CRP、LYM%、CRP/LYM%与呼吸道感染严重程度呈正相关($P<0.05$),PLT与呼吸道感染严重程度呈负相关($P<0.05$)。见表4。

表4 WBC、CRP、LYM%、CRP/LYM%、PLT与病毒、呼吸道感染严重程度的关系

Table 4 The relationship between WBC, CRP, LYM%, CRP/LYM%, PLT and the severity of viral and respiratory bacterial infections

指标	病毒严重程度		呼吸道感染严重程度	
	r值	P值	r值	P值
WBC	-0.602	<0.001	0.625	<0.001
CRP	0.106	0.734	0.562	<0.001
LYM%	0.135	0.697	0.097	0.825
CRP/LYM%	0.116	0.785	0.719	<0.001
PLT	-0.517	<0.001	-0.488	<0.001

2.5 WBC、CRP、LYM%、CRP/LYM%、PLT 鉴别诊断病毒、呼吸道细菌感染的 ROC

以病毒组为阳性样本,以细菌组为阴性样本,绘制各指标鉴别诊断病毒、呼吸道细菌感染的 ROC,结果显示,WBC、CRP、LYM%、CRP/LYM%、PLT 鉴别诊断的 AUC 分别为 0.865、0.793、0.775、0.812、0.686($P<0.05$)。见表 5、图 1。

表 5 ROC 分析结果

Table 5 ROC analysis results

指标	AUC	95%CI	cut-off 值	敏感度 (%)	特异度 (%)	P 值
WBC	0.865	0.794~0.919	$\leq 9.47 \times 10^9/L$	93.55	71.21	<0.001
CRP	0.793	0.712~0.859	≤ 16.12	85.48	60.61	<0.001
LYM%	0.775	0.693~0.844	> 38.71	75.81	72.73	<0.001
CRP/LYM%	0.812	0.734~0.876	≤ 0.44	95.16	65.15	<0.001
PLT	0.686	0.598~0.765	$> 165.22 \times 10^9/L$	61.29	71.21	<0.001

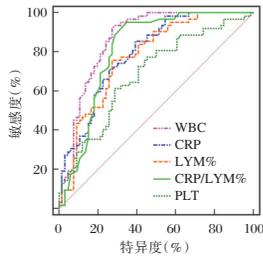


图 1 WBC、CRP、LYM%、CRP/LYM%、PLT 鉴别诊断病毒、呼吸道细菌感染的 ROC

Figure 1 ROC for differential diagnosis of viral and respiratory bacterial infections by WBC, CRP, LYM%, CRP/LYM%, PLT

3 讨论

血常规是急性呼吸道感染疾病常规检查项目,其中 WBC 是临床评估病毒与细菌感染的常规指标。本研究通过全自动血细胞分析仪检测可知,WBC 在病毒者中过度下降,反之,其在呼吸道细菌感染者中则过度升高,与崔健等^[8]研究结果相似,可见 WBC 升高可为病毒、呼吸道细菌感染鉴别诊断提供循证支持。

PLT 是表示血小板生成与凋亡的主要参数,通过与中性粒细胞、单核细胞及炎性血管内皮相互作用,参与炎症扩散进程^[9]。同时,有学者指出^[10],PLT 表达下降是导致严重感染的重要影响因素。本研究结果与刘道利等^[11]研究存在一定差异,这可能归因于巨核细胞感染作为病毒躲藏的独特场所,其感染可能对 PLT 合成造成间接影

响。提示 PLT 表达可作为临床鉴别诊断病毒、呼吸道细菌感染的参考依据。本研究经 Spearman 相关性分析还表明,PLT 与呼吸道细菌感染、病毒严重程度均存在负相关关系,考虑 PLT 下降机制可能在于一方面病毒病毒感染不仅会损伤骨髓基质细胞,一定程度还会激活免疫反应,损坏机体特异性或非特异性自身抗体,抑制抗体介导的 PLT 表达。

CRP 具有激活补体、调控粒细胞、巨噬细胞吞噬作用,是鉴别早期病毒感染与细菌感染的非特异度指标^[12-13]。LYM% 是机体免疫应答的主要组成部分^[14]。然而由于上呼吸道病毒感染时 CRP 多正常或轻度升高,LYM% 常升高;细菌感染时 CRP 常明显升高,LYM% 常正常,单独应用 CRP 或 LYM% 变化趋势不一致,故本研究采用 CRP/LYM%,不仅能表现 CRP 在感染中的作用,还能体现淋巴细胞变化,当机体遭受细菌感染或病毒感染时,有助于判断体内感染情况。本研究结果结合张永寿等^[15]观点究其机制可能为呼吸道感染发生可导致淋巴细胞水平紊乱,激活 CRP、白细胞介素 6 等细胞因子表达,介导 T 细胞减少,引起全身炎症反应,进而加重病情程度。而 CRP/LYM% 与病毒严重程度无相关性可能与病毒侵袭机体后在细胞内寄生或复制,导致 CRP 表达无显著上升有关。为进一步明确 CRP/LYM% 对病毒、呼吸道细菌感染的鉴别诊断价值,本研究通过绘制 ROC 曲线结果得知 CRP/LYM% 有望成为鉴别诊断病毒、呼吸道细菌感染的敏感指标,故建议临床采用 WBC、CRP/LYM%、PLT 共同鉴别诊断方式,以获取更加可靠结果,指导临床合理使用抗菌药物治疗。

综上可知,WBC、CRP/LYM%、PLT 对病毒、呼吸道细菌感染具有一定鉴别诊断效能,可为临床合理应用抗菌药物治疗、促进病情转归提供实验室数据支持。但本研究为单中心、小样本研究,今后需扩大样本量做多中心研究。

参考文献

[1] 陈健,郑雅旭,孔德川,等.上海市实施急性呼吸道感染综合监测应对新发呼吸道传染病的实践与思考[J].中华流行病学杂志,2020,41(12):1994-1998.
 [2] 袁彩君,张祎,付品佳.驻马店市某医院儿科门诊上呼吸道感染儿童抗生素使用情况分析[J].华南预防医学,2020,46(1):76-77,81. (下转第 946 页)

RLP76、Wip-1 及 Gal-9 在子宫内膜癌的表达及与细胞凋亡的相关性

王丽娜* 史凤菊 姜艳辉

[摘要] 目的 探讨 RLP76、野生型 p53 诱导磷酸酶 1 (*Wip-1*) 及半乳糖素-9 (*Gal-9*) 在子宫内膜癌的表达与细胞凋亡的相关性。方法 收集 2014 年 12 月至 2016 年 12 月本院病理科 64 份子宫内膜癌标本作为子宫内膜癌组(进行细胞培养转染后分为抑制组、阴性对照组、空白对照组), 68 份子宫内膜不典型增生标本作为对照组。比较子宫内膜癌组、对照组 RLP76、*Wip-1* 及 *Gal-9* 水平, 分析 3 指标与子宫内膜癌患者病理特征、细胞凋亡的相关性。随访至 2020 年 2 月, 了解预后情况。结果 子宫内膜癌组 RLP76 和 *Gal-9* 阳性率及 *Wip-1* 表达量均显著高于对照组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。有淋巴结转移的患者 RLP76 和 *Gal-9* 阳性率、*Wip-1* 表达量显著高于无淋巴结转移患者, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。抑制组 RLP76 和 *Gal-9* 阳性率、*Wip-1* 表达量显著高于阴性对照组及空白对照组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。RLP76、*Gal-9* 及 *Wip-1* 与子宫内膜癌组细胞凋亡率呈正相关 ($P < 0.05$)。子宫内膜癌患者预后四年死亡率为 65.63% (42/64), RLP76 阳性、*Gal-9* 阳性及 *Wip-1* 高表达的患者死亡率显著高于 RLP76 阴性、*Gal-9* 阴性及 *Wip-1* 低表达的患者, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 子宫内膜癌组织中 RLP76、*Gal-9* 及 *Wip-1* 表达与细胞凋亡率呈正相关, 三者对明确子宫内膜癌患者淋巴结转移情况有重要评估价值。

[关键词] RLP76; *Wip-1*; *Gal-9*; 子宫内膜癌

The expression of RLP76, *Wip-1* and *Gal-9* in endometrial carcinoma and their correlation with apoptosis

WANG Lina*, SHI Fengju, LOU Yanhui

(The People's Hospital of Shanting District, Zaozhuang City, Zaozhuang, Shandong, China, 277100)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the expression of RLP76, wild type p53 inducible phosphatase 1 (*Wip-1*) and galectin-9 (*Gal-9*) in endometrial cancer, and their correlation with cell apoptosis. **Methods** 64 specimens of endometrial cancer (endometrial cancer group) and 68 specimens of endometrial dysplasia (control group) from the Department of Pathology of this hospital from December 2014 to December 2016 were selected (after cell culture and transfection, they are divided into the inhibition group, the negative control group, and the blank control group). 68 specimens of endometrial atypical hyperplasia were used as the control group. The expression levels of RLP76, *Gal-9* and *Wip-1* between the endometrial cancer group and the endometrial dysplasia group were compared, and the correlations between the three indicators, the pathological characteristics and apoptosis of patients with endometrial cancer were analyzed. The follow-up study was ended in February 2020 to evaluate the prognosis. **Results** The positive rates of RLP76 and *Gal-9* and the expression of *Wip-1* in the endometrial cancer group were significantly higher than those in the control group, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). The positive rates of RLP76 and *Gal-9* and *Wip-1* expression in patients with lymph node metastasis were significantly higher than those without lymph node metastasis, and

基金项目: 山东省医药卫生科技发展计划项目(2018WS015)

作者单位: 枣庄市山亭区人民医院, 山东, 枣庄 277100

*通信作者: 王丽娜, E-mail: 18606426200@163.com

the differences were statistically significant ($P<0.05$). The positive rate of RLP76 and Gal-9 and the expression of Wip-1 in the inhibition group were significantly higher than those in the negative control group and the blank control group, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). RLP76, Gal-9 and Wip-1 were positively correlated with the apoptosis rate of the endometrial cancer group ($P<0.05$). The prognostic four-year mortality rate of patients with endometrial cancer was 65.63% (42/64). The mortality rate of patients with positive RLP76, positive Gal-9, and Wip-1 high expression was significantly higher than that of patients with negative RLP76, negative Gal-9, and Wip-1 low expression, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** The expression of RLP76, Gal-9 and Wip-1 in endometrial cancer tissue is positively correlated with the rate of cell apoptosis, and the three indicators have important evaluation value for clarifying lymph node metastasis in patients with endometrial cancer.

[KEY WORDS] RLP76 protein; Wip-1; Gal-9; Endometrial cancer

子宫内膜癌是女性生殖系统恶性肿瘤之一,近年来该病发病率在世界各国均有增高趋势,且发病年龄也呈年轻化发展,严重危害女性的生命健康^[1]。RLP76是Ras超家族成员,定位于人18号染色体。国外文献报道,RalA可作为膜蛋白转运体调控细胞内过氧化脂质体水平,调控细胞增殖、分化及凋亡,与恶性肿瘤发生、进展相关^[2]。野生型p53诱导磷酸酶1(Wild type p53 inducible phosphatase 1, Wip-1)对p53起负性调控作用,诱导p53突变。已有文献证实,Wip-1与子宫内膜癌增殖、凋亡有关^[3]。半乳凝素-9(Galectin-9, Gal-9)可通过抑制T细胞活化和增殖负性调控机体免疫应答,其与子宫内膜癌的关系研究较多^[4],但尚未有明确定论。本研究旨在探讨RLP76、Wip-1及Gal-9在子宫内膜癌的表达情况,以期为临床开展子宫内膜癌机制研究提供基础资料,现研究报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集2014年12月至2016年12月在本院收治的64例子宫内膜癌患者(共64份子宫内膜癌标本)作为子宫内膜癌组。平均年龄(56.41±5.74)岁;根据国际妇产科联盟(International Federation of Gynaecology and Obstetrics, FIGO)分期^[5]: I~II期30例, III~IV期34例。纳入标准:①均经手术或实验室检查确诊为子宫内膜癌^[6];②均为初次确诊子宫内膜癌的患者,纳入研究前未接受放疗治疗;③无手术禁忌症;④所有患者均已签署知情同意书;⑤本研究经本院伦理委员会审核通过(QDDXFSYY-2017015)。排除标准:①精神病史者;②合并其他妇科恶性肿瘤、其他系统

恶性肿瘤者;③复发或已接受过其他治疗的子宫内膜癌和患者。

选取同期在本院进行手术治疗的子宫内膜不典型增生患者68例(共68份子宫内膜不典型增生标本)设为对照组。平均年龄(56.21±5.66)岁。2组患者基线资料比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

1.2 方法

1.2.1 RLP76及Gal-9检测方法

采用S-P免疫组化染色。将子宫内膜癌组、对照组标本经常规石蜡切片、脱水。RLP76、Gal-9兔多克隆抗体均采购自美国Epitomics公司。免疫组化染色结果判定^[7]:结合阳性细胞百分比和染色强度判定对结果进行判定。阳性细胞百分比为0计0分, ≤10%计1分, >10%~25%计2分, >25%~50%计3分, >50%计4分;细胞质无染色计0分,淡黄色计1分,棕黄色计2分,棕褐色计3分;两项评分之和≤2分为阴性, ≥3分为阳性。

1.2.2 Wip-1表达量检测方法

采用实时荧光定量PCR技术检测。取转染培养的ECC-1和KLE细胞,加入细胞裂解液,按照Trizol总RNA提取试剂盒说明对总RNA进行提取,并检测纯度。用逆转录试剂盒将总RNA逆转录为模板链cDNA,以cDNA为模板,按照PCR试剂盒要求进行PCR。wip-1引物:上游5'-GTT CGT AGCAAT GCC TTC TCA-3',下游5'-CAC TTT CTT GGG CTTTCA TTT G-3';β-actin引物:上游5'-CAC TGT GTT GGCGTA CAG GTC T-3',下游5'-GCG AGA TGA CCC AGATcA T-3'。PCR反应条件:94℃ 2 min;92℃ 60 S, 56℃ 30 S, 74℃ 30 s,连续进行38个循环。每份样品均设置3个

平行反应复孔。根据 Lipofectimane 2000 脂质体转染试剂盒将细胞进行转染,分为抑制组、阴性对照组、空白对照组。Wipr1 siRNA 组细胞转染 *Wip-1* siRNA 质粒, *Wip-1* 特异性 siRNA 靶序列:5'-CCA ATG AAG ATGAGT TAT G-3' i。siRNA 对照组细胞转染 *Wip-1* siRNA 基因无同源性的阴性对照序列:5'-CTG GAC TTT CAG AAG AACA-3'。空白对照组细胞转染空白质粒。以内参为参考,用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法获得子宫内膜癌标本和子宫内膜不典型增生组织及抑制组、阴性对照组、空白对照组中 *Wip-1* 表达量。*Wip-1*: ≥ 1.8 视为异常增高^[6]。

1.2.3 随访

以电话随访及门诊复查的方式对患者随访4年,随访截止时间2020年12月,了解患者预后情况。

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 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用 *F* 检验;计数资料通过 $n(\%)$ 表示,采用 χ^2 检验;采用 Pearson 直线相关分析 RLP76、Gal-9 及 *Wip-1* 与子宫内膜癌患者细胞凋亡的相关性;以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者 RLP76、Gal-9 及 *Wip-1* 表达情况比较

子宫内膜癌组 RLP76 和 Gal-9 阳性率及 *Wip-1* 表达量均显著高于对照组,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 两组患者 RLP76、Gal-9 及 *Wip-1* 表达情况比较
[$n(\%), (\bar{x} \pm s)$]

Table 1 Comparison of expression of rlp76, Gal-9 and *wip-1* gene in two groups [$n(\%), (\bar{x} \pm s)$]

分组	n	RLP76		Gal-9		<i>Wip-1</i>
		阳性	阴性	阳性	阴性	
子宫内膜癌组	64	51(79.69)	13(20.31)	49(76.56)	15(13.44)	2.40±0.19
对照组	68	35(51.47)	33(48.53)	30(44.12)	38(55.88)	1.48±0.15
<i>t</i> / χ^2 值			11.562		14.443	
<i>P</i> 值			<0.001		<0.001	<0.001

2.2 子宫内膜癌组患者 RLP76、Gal-9 及 *Wip-1* 表达情况与病理特征的关系

有淋巴结转移的患者 RLP76 和 Gal-9 阳性率及 *Wip-1* 表达量显著高于无淋巴结转移患者,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。

2.3 不同转染组细胞中 RLP76、Gal-9 及 *Wip-1* 表达情况比较

抑制组 RLP76、Gal-9 及 *Wip-1* 表达量显著高于阴性对照组及空白对照组,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 不同转染组细胞中 RLP76、Gal-9 及 *Wip-1* 表达情况比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of apoptosis rates of rlp76, Gal-9 and *wip-1* gene in different transfection groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	RLP76	Gal-9	<i>Wip-1</i>
抑制组	33.25±3.29	38.64±3.41	17.85±1.18
阴性对照组	14.16±3.12 ^a	15.31±2.93 ^a	5.14±0.40 ^a
空白对照组	13.88±2.99 ^a	14.93±2.80 ^a	5.37±0.52 ^a
<i>F</i> 值	802.430	1262.290	5571.160
<i>P</i> 值	<0.001	<0.001	<0.001

注:与抑制组比较,^a $P < 0.05$ 。

表 2 子宫内膜癌组患者 RLP76、Gal-9 及 *Wip-1* 表达情况与病理特征的关系 [$n(\%), (\bar{x} \pm s)$]

Table 2 the relationship between the expression of rlp76, Gal-9 and *wip-1* gene and pathological features in endometrial carcinoma [$n(\%), (\bar{x} \pm s)$]

病理指标	例数 (n=64)	RLP76		χ^2 值	<i>P</i> 值	Gal-9		χ^2 值	<i>P</i> 值	<i>Wip-1</i>	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值	
		阳性 (n=51)	阴性 (n=13)			阳性 (n=49)	阴性 (n=15)						
年龄(岁)	≥ 50	25	20(39.22)	5(38.46)	0.002	0.960	18(36.73)	7(46.67)	0.476	0.490	2.02±0.42	0.957	0.342
	<50	39	31(60.78)	8(61.54)			31(63.25)	8(53.33)			1.92±0.40		
病理分级	I~II	33	28(54.90)	5(38.46)	1.121	0.290	25(51.02)	8(53.33)	0.025	0.875	1.95±0.46	1.292	0.201
	III~IV	31	23(45.10)	8(61.54)			24(48.95)	7(46.67)			2.11±0.53		
FIGO 分期	I~II	30	21(41.18)	9(69.23)	3.274	0.070	24(48.95)	6(40.00)	0.372	0.542	2.07±0.39	0.873	0.386
	III~IV	34	30(58.82)	4(30.77)			25(51.02)	9(60.00)			2.16±0.43		
组织学分级	G ₁	17	12(23.53)	5(38.46)	2.098	0.148	9(18.37)	8(53.33)	0.161	0.688	1.93±0.32	1.160	0.321
	G ₂	26	19(37.25)	7(53.85)			20(40.82)	6(60.00)			2.02±0.35		
	G ₃	21	20(39.22)	1(7.69)			20(40.82)	1(6.67)			2.11±0.41		
淋巴结转移	有	40	37(72.55)	3(23.08)	10.818	0.001	35(71.43)	5(33.33)	7.111	0.008	2.64±0.27	11.811	<0.001
	无	24	14(27.45)	10(76.92)			14(28.57)	10(66.67)			1.93±0.15		

2.4 RLP76、Gal-9 及 *Wip-1* 与子宫内膜癌组患者细胞凋亡率的相关性

Pearson 相关性显示, RLP76($r=0.781$)、Gal-9($r=0.773$)及 *Wip-1*($r=0.836$)与子宫内膜癌组患者细胞凋亡率呈正相关($P<0.05$)。

2.5 RLP76、Gal-9 及 *Wip-1* 与子宫内膜癌组患者预后的关系

随访结果显示, 子宫内膜癌患者预后四年死

亡率为 65.63%(42/64)。RLP76 阳性、Gal-9 阳性及 *Wip-1* 高表达的患者死亡率显著高于 RLP76 阴性、Gal-9 阴性及 *Wip-1* 低表达的患者, 差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 4。

3 讨论

尽管近年来诊疗子宫内膜癌的手段已得到显著进步, 但患者 5 年预后生存率仍较低。肿瘤细

表 4 RLP76、Gal-9 及 *Wip-1* 与子宫内膜癌组患者预后的关系 [$n(\%)$]

类别	<i>n</i>	RLP76		Gal-9		Wip-1	
		阳性($n=51$)	阴性($n=13$)	阳性($n=49$)	阴性($n=15$)	高表达($n=44$)	低表达($n=20$)
生存	22	11(50.00)	11(50.00)	10(45.45)	12(54.55)	6(27.27)	16(72.73)
死亡	42	40(95.24)	2(4.76)	39(92.86)	3(7.14)	38(90.48)	4(9.52)
χ^2 值		18.254		18.079		26.844	
<i>P</i> 值		<0.001		<0.001		<0.001	

胞侵袭、转移是子宫内膜癌患者预后较差的主要原因, 随着疾病的进展及细胞内相关基因表达的变化, 细胞凋亡受到抑制, 导致宫颈上皮细胞平衡被破坏从而引发癌变。寻找参与肿瘤侵袭、转移过程中的有效标志物对评估子宫内膜癌患者病情进展、预后具有重要参考价值。

RLP76 调控细胞生长、迁移、分裂和凋亡, 主要表达于乳腺、心脏、肝脏和红细胞中。Ngoi N 等学者^[8]研究指出, RLP76 在肿瘤组织中表达异常增高, 在多种信号通路中发挥关键性调控作用, 参与细胞增殖、迁移。本研究发现, 子宫内膜癌组织中 RLP76 阳性表达率显著高于子宫内膜不典型增生组织标本, 且 RLP76 阳性表达的患者淋巴结转移风险更大, 进一步证实上述观点。本研究还发现抑制组 RLP76 细胞凋亡率高于阴性对照组和空白对照组, 与既往文献报道结果一致^[9], 提示 RLP76 可促使子宫内膜癌细胞凋亡。考虑为 RLP76 通过上调凋亡抑制因子表达、抑制凋亡相关基因表达, 从而使子宫内膜癌细胞逃避凋亡程序, 实现异常增殖所致。

大量研究证实, *Wip-1* 能够通过直接或间接途径使抑癌基因 *p53* 磷酸化进程被抑制, 从而使 *p53* 失活, 给肿瘤的发生、发展提供了有利环境^[10]。相关研究报道, 在甲状腺癌、小细胞肺癌、子宫内膜癌组织中, *Wip-1* 呈高表达状态, 与恶性肿瘤淋巴结转移、肿瘤临床分期有显著相关性, 高表达的 *Wip-1* 可打破机体内环境稳定, 影响 *p53* 活性, 促进肿瘤发生、细胞凋亡^[11]。

Gal-9 蛋白在细胞质、细胞外基质及细胞核内均有分布, 研究表明, 前列腺癌、肾癌、胃癌等多种癌组织中层强阳性表达^[12]。Joly 等学者^[13]报道 Gal-9 蛋白在宫颈上皮细胞不典型增生至癌变过程中凸显重要作用。国内学者报道, Gal-9 可诱导胸腺细胞、T 细胞及巨噬细胞的凋亡, 同时对肿瘤细胞凋亡、转移等发挥了一定作用, 与本研究得出结果一致^[14]。同时, 本研究还发现, RLP76、Gal-9 蛋白及 *Wip-1* 与子宫内膜癌组患者细胞凋亡率呈正相关。提示, 随着细胞凋亡的发生, RLP76、Gal-9 蛋白及 *Wip-1* 表达量逐渐升高。表明子宫内膜癌患者在对抗肿瘤发生发展的过程中, 可能受到 RLP76、Gal-9 蛋白及 *Wip-1* 等因素的影响, 导致细胞凋亡、增殖的平衡被打破^[15]。

综上所述, 子宫内膜癌组织中 RLP76、Gal-9 蛋白及 *Wip-1* 表达与患者淋巴结转移密切相关, 且与细胞凋亡率呈正相关。提示三者对子宫内膜癌患者细胞凋亡产生影响, 对明确子宫内膜癌患者淋巴结转移情况有重要评估价值, 检测 RLP76、Gal-9 蛋白及 *Wip-1* 可为临床评估病情进展和诊疗效果提供可靠依据。后续笔者将扩大样本量, 进一步分析子宫内膜癌细胞增殖、凋亡等生物学过程。

参考文献

- [1] 舒新红, 范红莉, 李小燕. 子宫内膜癌患者肿瘤组织和血清中 SOX1 和 VIM 启动子的甲基化检测及其临床意义 [J]. 分子诊断与治疗杂志, 2018, 10(5):301-306.

- [2] Kommos S, Mcconechy MK, Kommos F, et al. Final Validation of the ProMise Molecular Classifier for Endometrial Carcinoma in a Large Population-based Case Series [J]. *Ann Oncol*, 2018, 11(23):75-79.
- [3] Sloan EA, Ring KL, Willis BC, et al. PD-L1 Expression in Mismatch Repair-deficient Endometrial Carcinomas, Including Lynch Syndrome-associated and MLH1 Promoter Hypermethylated Tumors [J]. *Am J Surg Pathol*, 2017, 41(3):326-333.
- [4] Heudel PE, Fabbro M, Roemer-Becuwe C, et al. Phase II study of the PI3K inhibitor BKM120 in patients with advanced or recurrent endometrial carcinoma: a stratified type I-type II study from the GINECO group [J]. *Br J Cancer*, 2017, 116(3):303-309.
- [5] 樊新龙, 郭囡, 高鑫, 等. 下调口腔鳞状细胞癌 Tac8113 细胞的 Galectin-9 表达对 CIK 杀伤作用的影响 [J]. *现代肿瘤医学*, 2018, 26(24):3889-3892.
- [6] van der Putten LJ, van de Vijver K, Bartosch C, et al. Reproducibility of measurement of myometrial invasion in endometrial carcinoma. *Virchows Arch*, 2017, 470(1):63-68.
- [7] Ni J, Liang S, Shan B, et al. Methylation-associated silencing of miR638 promotes endometrial carcinoma progression by targeting MEF2C [J]. *Int J Mol Med*, 2020, 45(6):14-20.
- [8] Ngoi N, Sachdeva M, Haran P, et al. Clinical outcomes of MSI-high (MSI-H) versus stable (MSS) endometrial carcinoma (EC) after front-line platinum chemotherapy and subsequent matched therapy [J]. *J Clin Oncol*, 2020, 38(15):6086-6086.
- [9] Conlon N, Paula ADC, Ashley CW, et al. Endometrial Carcinomas with a "Serous" Component in Young Women are Enriched for DNA Mismatch Repair Deficiency, Lynch Syndrome, and POLE Exonuclease Domain Mutations [J]. *Am J Surg Pathol*, 2020, 44(5):641-648.
- [10] Ueno Y, Forghani B, Forghani R, et al. Endometrial Carcinoma: MR Imaging-based Texture Model for Preoperative Risk Stratification - A Preliminary Analysis [J]. *Radiology*, 2017, 284(3):16-20.
- [11] Suidan RS, He W, Sun CC, et al. Impact of body mass index and operative approach on surgical morbidity and costs in women with endometrial carcinoma and hyperplasia [J]. *Gynecol Oncol*, 2017, 145(1):55-60.
- [12] 冯艳萍, 卞亚辉, 赵婷婷, 等. Wip1 在卵巢癌细胞系中的表达与沉默 [J]. *河北医药*, 2019, 41(14):2085-2090.
- [13] Joly F, Brachet PE, Lacourtoisie SA, et al. Multicentre randomized phase II trial of olaparib as maintenance therapy in platinum-sensitive advanced endometrial carcinoma: The GINECO-UTOLA study [J]. *J Clin Oncol*, 2020, 38(15):610-615.
- [14] Nasioudis D, Frey MK, Chapman-Davis E, et al. Outcomes of minimally invasive surgery for patients with endometrial carcinoma involving the cervix [J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2020, 30(5):102-113.
- [15] 刘一颖, 杨晓雪, 于晓波. 甲状腺癌的超声弹性成像参数与病灶组织中癌细胞生长, 新生血管形成的关系 [J]. *海南医学院学报*, 2018, 24(7):73-75.

(上接第 941 页)

- [3] 熊梦然, 陈雷, 王丽纯, 等. 肾上腺髓质素前体 (proADM) 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.
- [4] Koupenova M, Corkrey HA, Vitseva O, et al. The role of platelets in mediating a response to human influenza infection [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1):1780.
- [5] Giannini O, Del Giorno R, Zasa A, et al. Comparative Impact of C-Reactive Protein Testing in Hospitalized Patients with Acute Respiratory Tract Infection: A Retrospective Cohort Study [J]. *Adv Ther*, 2019, 36(11):3186-3195.
- [6] 钟南山. 临床诊疗指南: 呼吸病学分册 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2009:6-8.
- [7] Antualpa K, Aoki MS, Moreira A. Intensified Training Period Increases Salivary IgA Responses But Does Not Affect the Severity of Upper Respiratory Tract Infection Symptoms in Prepubertal Rhythmic Gymnasts [J]. *Pediatr Exerc Sci*, 2018, 30(2):189-197.
- [8] 崔健, 杨国峰, 陈永新. 甲型/乙型流感阳性与阴性患者 C 反应蛋白和白细胞计数的变异及意义 [J]. *解放军预防医学杂志*, 2020, 38(6):4-6.
- [9] 孟欣, 胡辽辽, 张宁, 等. 中性粒细胞/淋巴细胞比值在甲、乙型流感病毒感染患者预测价值分析 [J]. *国际检验医学杂志*, 2019, 40(20):2464-2467.
- [10] 吕黎. 124 例感染相关性血小板减少症的临床分析 [D]. 甘肃中医药大学, 2019.
- [11] 刘道利, 龙华婧, 夏阳, 等. 甲型和乙型流感患者白细胞分类比较及临床特征分析 [J]. *国际检验医学杂志*, 2017, 38(13):1740-1742.
- [12] 杨德彬, 冯日昇, 王玲玲, 等. 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 [J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2020, 12(2):212-216.
- [13] Neeser OL, Vukajlovic T, Felder L, et al. A high C-reactive protein/procalcitonin ratio predicts Mycoplasma pneumoniae infection [J]. *Clin Chem Lab Med*, 2019, 57(10):1638-1646.
- [14] 李若青, 田继刚, 杨芳, 等. 2019-新型冠状病毒感染的肺炎患者血清白蛋白浓度与淋巴细胞水平关系的临床研究 [J]. *中华急诊医学杂志*, 2020, 29(4):478-482.
- [15] 张永寿, 王雁, 何丽萍, 等. 联合检测 WBC、SAA、PCT、CRP 在婴幼儿感染性疾病中的诊断价值 [J]. *热带医学杂志*, 2020, 20(2):229-232.

· 论 著 ·

miR-32-5p 靶向 FOXN3 调控 EMT 通路影响子宫内膜癌细胞迁移和侵袭

董艳¹ 杜安飞² 辛本勤³ 曹佳伟^{4*}

[摘要] 目的 研究 miR-32-5p 对子宫内膜癌细胞迁移和侵袭的影响和潜在机制。方法 以正常人子宫内膜上皮细胞 hEEC 为对照, qRT-PCR 和 Western blot 检测子宫内膜癌细胞系 Ishikawa、HEC-1A 和 JEC 中 miR-32-5p 和 FOXN3 的表达; 在 Ishikawa 细胞中高表达 FOXN3 和敲减 miR-32-5p, Western blot 检测 FOXN3、E-Cadherin、N-Cadherin 和 Vimentin 蛋白表达水平, Transwell 实验检测细胞迁移和侵袭能力, 双荧光素酶报告系统验证 miR-32-5p 和 FOXN3 的关系。结果 与 hEEC 相比, 子宫内膜癌细胞系 Ishikawa、HEC-1A 和 JEC 组细胞中 miR-32-5p 表达量均显著升高 ($P < 0.05$), FOXN3 的 mRNA 和蛋白表达量均显著下降 ($P < 0.05$); 采用表达差异较大的 Ishikawa 进行后续实验。抑制 miR-32-5p 表达后 Ishikawa 细胞迁移数量、和侵袭数量以及 N-Cadherin、Vimentin 蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$), E-Cadherin 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$)。高表达 FOXN3 后 Ishikawa 细胞迁移数量和侵袭数量以及 N-Cadherin、Vimentin 蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$), E-Cadherin 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$)。miR-32-5p 靶向负向调控 FOXN3 的表达。敲减 FOXN3 部分逆转了抑制 miR-32-5p 表达对 Ishikawa 细胞迁移、侵袭以及 E-Cadherin、N-Cadherin 和 Vimentin 蛋白表达的影响。结论 miR-32-5p 靶向 FOXN3 可能通过 EMT 通路调控子宫内膜癌细胞迁移和侵袭。miR-32-5p 是子宫内膜癌的潜在分子靶点。

[关键词] 子宫内膜癌; miR-32-5p; FOXN3; EMT 信号通路

miR-32-5p targets FOXN3 to regulate the EMT pathway and affect the migration and invasion of endometrial cancer cells

DONG Yan, DU Anfei, XIN Benqin, CAO Jiawei*

(1. Rizhao Maternal and Child Health Care Hospital, Rizhao, Shandong, China, 276800; 2. Department of Laboratory, Juxian Hospital of Traditional Chinese Medicine, Rizhao, Shandong, China, 276500; 3. Rizhao Central Blood Station, Rizhao, Shandong, China, 276800; 4. Qingdao Chest Hospital, Clinical Laboratory, Qingdao, Shandong, China, 266043)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the effects of miR-32-5p on the cell migration and invasion of endometrial cancer cells and its potential mechanism. **Methods** Using the normal endometrial epithelial cells (hEEC) as the control, the expression levels of miR-32-5p and FOXN3 in endometrial cancer cell lines Ishikawa, HEC-1A and JEC were detected by qRT-PCR and Western blot. Then FOXN3 was highly expressed and miR-32-5p was knocked down in Ishikawa cells, the expression levels of FOXN3, E-cadherin, N-cadherin and vimentin proteins in Ishikawa cells were determined by western blot, and the cell migration and invasion abilities were measured by Transwell assay. The relationship between miR-32-5p and FOXN3 was verified by

作者单位: 1. 日照市妇幼保健院检验科, 山东, 日照 276800

2. 日照市莒县中医医院检验科, 山东, 日照 276800

3. 日照市中心血站, 山东, 日照 276800

4. 青岛市胸科医院检验科, 山东, 青岛 266000

*通信作者: 曹佳伟, E-mail: zwcao123@163.com

dual-luciferase reporter assay system. **Results** Compared with the hEEC, the expression of miR-32-5p in endometrial cancer cell lines of Ishikawa, HEC-1A and JEC was significantly increased ($P<0.05$), and the expression of FOXN3 mRNA and protein was remarkably decreased ($P<0.05$). Ishikawa, whose expression differs greatly, was used for subsequent experiments. After inhibiting the expression of miR-32-5p, the number of migration and invasion of Ishikawa cells as well as the expression of N-cadherin and vimentin proteins were significantly reduced ($P<0.05$), while the expression of E-cadherin was significantly increased ($P<0.05$). After overexpression of FOXN3, the number of migration and invasion of Ishikawa cells and the expression of N-cadherin and vimentin proteins were significantly reduced ($P<0.05$), and the expression of E-cadherin protein was significantly increased ($P<0.05$). miR-32-5p targets and negatively regulates the expression of FOXN3. Knockdown of FOXN3 partially reversed the effects of inhibiting miR-32-5p expression on Ishikawa cell migration, invasion and protein expression of E-cadherin, N-cadherin and vimentin. **Conclusion** miR-32-5p targeting FOXN3 may regulate the migration and invasion of endometrial cancer cells through the EMT pathway. miR-32-5p is a potential molecular target for endometrial cancer.

[KEY WORDS] Endometrial cancer; miR-32-5p; FOXN3; EMT signaling pathway

子宫内膜癌(endometrial cancer, EC)是最常见的妇科恶性肿瘤之一,发病率呈上升趋势^[1]。标准治疗包括原发性子宫切除术和双侧输卵管卵巢切除术^[1],为提高复发或转移患者的生存质量,个性化的分子靶向治疗也在进行研究和试验。研究显示胰腺癌中 miR-32-5p 表达上调,并通过下调第 10 号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源基因(phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten, PTEN)表达促进胰腺癌转移^[2]。宫颈癌中 miR-32-5p 低表达, miR-32-5p 通过靶向同源盒 B8(homeobox B8, HOXB8)抑制宫颈癌细胞恶性行为^[3]。有报道称 EC 中 miR-32-5p 高表达^[4],但其在 EC 中的作用并未阐明。叉头蛋白 N3(Fork head Box N3, FOXN3)是一种转录抑制因子,参与细胞周期调控和肿瘤发生等过程^[5]。研究显示 FOXN3 在肝癌、肺癌、乳腺癌等恶性肿瘤中显著下调,上调 FOXN3 可抑制癌细胞的上皮-间充质转化(epithelial mesenchymal transition, EMT)进程,抑制肿瘤转移,在癌症进展中充当抑癌基因角色^[6]。本研究通过 Starbase 预测发现, miR-32-5p 与 FOXN3 可能存在靶向关系。

1 材料与方法

1.1 材料

人正常子宫内膜上皮细胞 hEEC 购自北纳生物, EC 细胞 JEC 由本院子宫内膜癌患者自愿捐赠, EC 细胞系 Ishikawa 和 HEC-1A 购自美国 ATCC; McCoy's 5a 培养基、杜尔伯格伊戈尔培养基(dulbecco's modified eagle medium, DMEM)和胎

牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自美国 Gibco 公司;引物、miR-32-5p 模拟物(miR-32-5p)、miR-32-5p 抑制剂(anti-miR-32-5p)、FOXN3 过表达载体(pcDNA-FOXN3)、FOXN3 抑制剂(si-FOXN3)和对照(miR-con、anti-miR-con、si-con 和 pcDNA-con)、FOXN3 的野生型(wild type, WT)和突变型(mutant type, MUT)双荧光素酶报告载体购自上海吉玛制药有限公司;FOXN3 抗体、E-钙粘蛋白(E-Cadherin)抗体、N-钙粘蛋白(N-Cadherin)抗体和波形蛋白(Vimentin)抗体购自英国 Abcam 公司; β -actin 抗体购自上海碧云天生物技术有限公司;双荧光素酶报告系统购自美国 Promega 公司;Lipofectamine 2000 转染试剂、总 RNA 提取试剂盒、real-time PCR 试剂盒、反转录试剂盒购自美国 Invitrogen 公司;光学显微镜、全自动酶标仪、发光仪和 Real-time PCR 仪购自美国 Bio-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养、转染

在 DMEM 高糖培养液中分别培养 hEEC、Ishikawa 和 JEC 细胞,在 McCoy's 5a 培养液中培养 HEC-1A 细胞,培养液中均添加 10% FBS、100 U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素,培养条件:在饱和湿度、37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 培养箱中培养细胞,消化传代。以 2×10^6 个细胞/mL 接种 Ishikawa 细胞于 6 孔板培养,当细胞基本融合为一层时根据 Lipofectamine 2000 转染试剂说明书进行转染。未转染细胞记为正常对照(NC)组(①组)。根据转染物不同分为 anti-miR-32-5p 组(②组)、anti-miR-con 组(③组)、pcDNA-con 组(④组)、pcDNA-FOXN3 组(⑤组)、miR-con 组

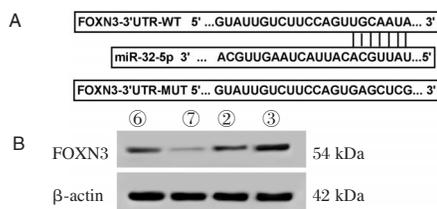
表3 FOXN3高表达对Ishikawa细胞迁移和侵袭的影响 ($\bar{x} \pm s, n=9$)

Table 3 Effects of FOXN3 overexpression on migration and invasion of Ishikawa cells ($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	FOXN3	E-Cadherin	N-Cadherin	Vimentin	细胞迁移数量	细胞侵袭数量
①组	0.30±0.03	0.35±0.04	1.08±0.11	0.88±0.08	225.01±22.51	153.28±15.39
④组	0.35±0.04	0.36±0.05	1.05±0.12	0.90±0.09	224.18±22.52	148.07±15.03
⑤组	0.85±0.09	0.72±0.07	0.45±0.06	0.41±0.04	98.25±9.91	72.18±7.50
F值	235.613	133.300	113.292	128.963	129.195	107.199
P值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

2.4 miR-32-5p靶向FOXN3

FOXN3的3'-UTR与miR-32-5p的结合位点,见图1。与miR-con+WT-FOXN3组相比,miR-32-5p+WT-FOXN3组Ishikawa细胞的荧光素酶相对活性显著降低($P<0.05$);而与miR-con+MUT-FOXN3组比较,miR-32-5p+MUT-FOXN3的荧光素酶相对活性无明显变化。与anti-miR-con组比较,anti-miR-32-5p组Ishikawa细胞中FOXN3表达量显著升高($P<0.05$)。见表4、表5。



注:A为starbase对miR-32-5p和FOXN3结合进行预测示意图;B为Western Blot检测FOXN3表达量。

图1 miR-32-5p靶向调控FOXN3表达

Figure 1 miR-32-5p targets and regulates the expression of FOXN3

表4 双荧光素酶活性检测 ($\bar{x} \pm s, n=9$)

Table 4 Double luciferase activity assay ($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	荧光素酶相对活性	分组	荧光素酶相对活性
⑩	1.00±0.15	⑫	1.01±0.12
⑪	0.33±0.03	⑬	0.98±0.11
t值	13.140	t值	0.553
P值	0.000	P值	0.588

表6 敲减FOXN3逆转miR-32-5p低表达对Ishikawa迁移和侵袭的影响 ($\bar{x} \pm s, n=9$)

Table 6 Knockdown of FOXN3 reversed the effect of downr-expression of miR-32-5p on migration and invasion of Ishikawa cells ($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	FOXN3	E-Cadherin	N-Cadherin	Vimentin	细胞迁移数	细胞侵袭数
②组	0.35±0.04	0.30±0.03	1.10±0.13	0.90±0.10	223.67±22.37	151.37±15.16
③组	0.76±0.08	0.70±0.10	0.40±0.04	0.36±0.04	113.46±11.35	80.42±8.05
⑧组	0.78±0.09	0.72±0.08	0.42±0.05	0.40±0.05	110.32±11.04	82.14±8.25
⑨组	0.42±0.05	0.38±0.04	1.00±0.10	0.80±0.09	200.49±20.05	131.09±13.11
F值	97.339	89.079	160.568	122.541	107.308	85.329
P值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

表5 Western Blot检测FOXN3的表达 ($\bar{x} \pm s, n=9$)

Table 5 The expression level of FOXN3 was detected by Western blot ($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	FOXN3
⑥组	0.32±0.03
⑦组	0.10±0.01
②组	0.36±0.04
③组	0.75±0.08
F值	292.367
P值	0.000

2.5 敲减FOXN3逆转miR-32-5p低表达对Ishikawa迁移和侵袭的影响

与miR-32-5p+si-con组相比,miR-32-5p+si-FOXN3组的FOXN3和E-cadherin表达量显著降低($P<0.05$),N-cadherin和Vimentin表达显著上升,迁移和侵袭细胞数均显著上升($P<0.05$)。见表6。

3 讨论

EC多发于老年妇女,其发病率和死亡率呈上升趋势,发病年龄较前几年有所下降^[7-8]。研究EC的分子抑制靶点,对患者的个性化靶向治疗具有重要意义。

miR-32-5p在多种癌症中出现差异表达,在癌细胞的凋亡、化学敏感性、转移和耐药性中起着重要作用。前列腺癌中顺铂治疗后miR-32-5p表达下调,参与调节前列腺癌化学敏感性^[9]。透明细胞肾细胞癌中miR-32-5p高表达促进癌细胞侵袭和迁

移,舒尼替尼也通过调控 miR-32-5p 发挥抑癌作用^[10]。肝癌多药耐药细胞中 miR-32-5p 表达升高,诱导多药耐药^[11]。miR-32-5p 在 EC 中表达上调,其具体作用和机制尚不清楚。本研究结果表明,EC 细胞系 Ishikawa、HEC-1A 和 JEC 中 miR-32-5p 表达均显著升高,与上述研究结果^[7]一致;采用表达差异较大的 Ishikawa 细胞进行功能分析,结果表明低表达 miR-32-5p 可抑制 Ishikawa 细胞迁移和侵袭。说明 miR-32-5p 在 EC 的发展中具有重要作用。

Starbase 预测发现 FOXN3 的 3'-UTR 与 miR-32-5p 存在结合位点,提示两者存在调控关系。FOXN3 编码叉头/翼螺旋转录因子家族的一个成员,可通过与 Ski 相互作用蛋白(Ski interacting protein, SKIP)结合参与细胞基本过程调控,在肿瘤发生和对癌症治疗的反应中起重要作用^[12]。结直肠癌中 FOXN3 显著下调,被证实是 N-cadherin 的直接转录抑制因子,对肿瘤的迁移、侵袭和转移均具有重要作用^[13]。FOXN3 在骨肉瘤中下调,上调 FOXN3 抑制骨肉瘤迁移和侵袭^[14]。FOXN3 在 EC 中的表达和作用尚不清楚。本研究结果说明 FOXN3 在 EC 细胞的转移中具有重要作用。此外,miR-32-5p 靶向负调控 FOXN3 表达,敲减 FOXN3 部分逆转了抑制 miR-32-5p 表达对 Ishikawa 细胞迁移和侵袭的影响,证实了在 EC 中两者存在调控关系。

EMT 是肿瘤细胞转移的重要前提,在此过程中上皮细胞极性丧失,形成了一种以细胞骨架重塑和迁移活动为特征的间充质样特性^[15]。本研究发现,Ishikawa 细胞中 miR-32-5p 低表达和 FOXN3 过表达均可抑制间质标志物 N-cadherin 和 Vimentin 表达,促进上皮标志物 E-cadherin 表达,抑制 EMT 进程,而敲减 FOXN3 部分逆转了抑制 miR-32-5p 表达对细胞 EMT 的影响,这与 Chen 等^[16]报道 FOXN3 在舌鳞癌中的抗 EMT 作用吻合。

综上所述,本研究证实,miR-32-5p 靶向 FOXN3 可能通过抑制 EMT 通路抑制 EC 细胞的迁移和侵袭。miR-32-5p 可能是 EC 的潜在分子靶点。

参考文献

[1] Morice P, Leary A, Creutzberg CL, et al. Endometrial cancer[J]. *Lancet*, 2016, 387(10023):1094-1108.

[2] Saliminejad K, Khorram Khorshid HR, Soleymani Fard S, et al. An overview of microRNAs: Biology, functions, therapeutics, and analysis methods[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(5): 5451-5465.

[3] Cao ZQ, Wang JF, Chen DH, et al. Long non-coding RNA GAS5 suppresses pancreatic cancer metastasis through modulating miR-32-5p/PTEN axis[J]. *Cell Biosci*, 2017, 7(1):66.

[4] Liu YJ, Zhou HG, Chen LH, et al. MiR-32-5p regulates the proliferation and metastasis of cervical cancer cells by targeting HOXB8[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(1):87-95.

[5] 何航, 张蕊, 李艳. FOXN3 蛋白在恶性肿瘤中的研究进展[J]. *现代肿瘤医学*, 2018, 26(5):804-809.

[6] Kong X, Zhai J, Yan C, et al. Recent Advances in Understanding FOXN3 in Breast Cancer, and Other Malignancies[J]. *Front Oncol*, 2019, 9: 234.

[7] Jayaraman M, Radhakrishnan R, Mathews CA, et al. Identification of novel diagnostic and prognostic miRNA signatures in endometrial cancer[J]. *Genes Cancer*, 2017, 8(5-6): 566-576.

[8] Moore K, Brewer MA. Endometrial Cancer: Is This a New Disease?[J]. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*, 2017, 37:435-442.

[9] Zhang L, Li X, Chao Y, et al. KLF4, a miR-32-5p targeted gene, promotes cisplatin-induced apoptosis by upregulating BIK expression in prostate cancer[J]. *Cell Commun Signal*, 2018, 16(1):53.

[10] Wang M, Sun Y, Xu J, et al. Preclinical studies using miR-32-5p to suppress clear cell renal cell carcinoma metastasis via altering the miR-32-5p/TR4/HGF/Met signaling[J]. *Int J Cancer*, 2018, 143(1):100-112.

[11] Fu X, Liu M, Qu S, et al. Exosomal microRNA-32-5p induces multidrug resistance in hepatocellular carcinoma via the PI3K/Akt pathway[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37(1):52.

[12] Scott KL, Plon SE. CHES1/FOXN3 interacts with Ski-interacting protein and acts as a transcriptional repressor[J]. *Gene*, 2005, 359(1):119-126.

[13] Mudduluru G, Abba M, Batliner J, et al. A Systematic Approach to Defining the microRNA Landscape in Metastasis[J]. *Cancer Res*, 2015, 75(15):3010-3019.

[14] Xue W, Ma L, Wang Z, et al. FOXN3 is downregulated in osteosarcoma and transcriptionally regulates SIRT6, and suppresses migration and invasion in osteosarcoma[J]. *Oncol Rep*, 2019, 41(2):1404-1414.

[15] 杜彦丹, 牛艺卿, 郑海军, 等. Snail 基因甲基化与 TGFβ1 诱导前列腺癌细胞发生 EMT 的相关性研究[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2019, 11(06):451-456.

[16] Chen S, Zhang J, Sun L, et al. miR-611 promotes the proliferation, migration, and invasion of tongue squamous cell carcinoma cells by targeting FOXN3[J]. *Oral Dis*, 2019, 25(8): 1906-1918.

HbA1c、25(OH)D、UA 与 AIS 合并 CMBs 患者认知功能障碍的关系研究

甄伟兰* 袁丹 王英鹏 王海鹏 王莹

[摘要] 目的 研究糖化血红蛋白(HbA1c)、25-羟基维生素 D[25(OH)D]、尿酸(UA)与急性缺血性脑卒中(AIS)合并脑微出血(CMBs)患者认知功能障碍的关系。方法 选取2017年8月至2020年8月本院接收140例AIS患者临床资料作为研究对象,根据是否合并CMBs进行分组,将合并CMBs者设为研究组($n=76$),未合并CMBs者设为对照组($n=64$)。比较两组患者HbA1c、25(OH)D及UA水平,采用蒙特利尔认知评价量表(MOCA)比较两组患者认知功能情况,采用多元Logistic回归分析影响AIS合并CMBs患者认知功能障碍的危险因素。结果 研究组患者HbA1c、UA水平明显高于对照组,25(OH)D明显低于对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。研究组患者延迟回忆、语言能力、抽象思维、定向力、注意力与计算力、视空间及执行能力评分明显低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。根据研究组患者认知功能情况进行分组,认知功能良好组34例,认知功能障碍组42例,经多元Logistic回归显示:脑微出血数量(2级)、HbA1c(异常)、25(OH)D(异常)及UA(异常)为影响AIS合并CMBs患者认知功能障碍的独立危险因素($P<0.05$)。结论 HbA1c、25(OH)D及UA水平与急性缺血性脑卒中合并脑微出血患者认知功能障碍密切相关,临床上检测其水平对监测患者认知功能障碍具有重要意义。

[关键词] HbA1c; 25(OH)D; UA; 急性缺血性脑卒中; 脑微出血; 认知功能

Study on the relationship between the levels of HbA1c, 25(OH)D and UA and cognitive dysfunction in patients with acute ischemic stroke combined with cerebral microbleeds

ZHEN Weilan*, YUAN Dan, WANG Yingpeng, WANG Haipeng, WANG Ying

(Department of Neurology, Beijing Aerospace General Hospital, Beijing, China, 100076)

[ABSTRACT] **Objective** To study the relationship between the levels of glycosylated hemoglobin (HbA1c), 25-hydroxyvitamin D [25(OH)D], uric acid (UA) and cognitive dysfunction in patients with acute ischemic stroke (AIS) combined with cerebral microbleeds (CMBs). **Methods** The clinical data of 140 patients with AIS from August 2017 to August 2020 were selected as the research objects. They were grouped according to whether they were combined with CMBs. Those combined with CMBs were set as the study group ($n=76$), and those without CMBs were set as the control group ($n=64$). The HbA1c, 25(OH)D and UA levels of patients between the two groups were compared, the cognitive function of patients between the two groups was compared [the Montreal Cognitive Assessment (MOCA)], and multivariate logistic regression analysis was used to analyze the risk factors of cognitive dysfunction in patients with AIS and CMBs. **Results** The levels of HbA1c and UA in the study group were significantly higher than those in the control group, and 25(OH)D was significantly lower than that in the control group. The differences were statistically significant ($P<0.05$). The scores of delayed recall, language ability, abstract thinking, orientation, attention and calculation, visual space and executive ability in the study group were significantly lower than those in the control group, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). The patients in the study group were

基金项目:北京航天总医院创新基金项目(2018-511)

作者单位:北京航天总医院神经内科,北京100076

*通信作者:甄伟兰, E-mail:li262647zhang662@163.com

further divided into subgroups according to the cognitive function. There were 34 cases in the good cognitive function subgroup and 42 cases in the cognitive dysfunction subgroup. The result of multivariate logistic regression showed that the number of cerebral microbleeds (grade 2), HbA1c (abnormal), 25(OH)D (abnormal) and UA (abnormal) were independent risk factors affecting cognitive dysfunction in patients with AIS and CMBs ($P < 0.05$). **Conclusion** The levels of HbA1c, 25(OH)D and UA are closely related to the cognitive dysfunction of patients with acute ischemic stroke combined with cerebral microbleeds. The clinical detection of their levels is of great significance for monitoring the cognitive dysfunction of patients.

[KEY WORDS] HbA1c; 25(OH)D; UA; Acute ischemic stroke; Cerebral microbleeds; Cognitive function

急性缺血性脑卒中(Acute ischemic stroke, AIS)是各种原因导致的脑组织血液供应障碍,并由此产生缺血缺氧性坏死,进而出现神经功能障碍的一组临床综合征^[1]。研究指出,AIS患者常合并脑微出血(Cerebral microbleeds, CMBs)症状,可导致患者认知功能障碍并出现血清特定标记物变化,具有极高的危险性,如不及时治疗,可对患者生命安危造成严重影响^[2]。因此,如何高效诊断和治疗AIS合并CMBs,对保障患者预后具有重要意义。糖化血红蛋白(Glycosylated hemoglobin, HbA1c)作为人体血液中红细胞内的血红蛋白与血糖结合的产物,可加快血管受损,促进淋巴及单核细胞吞噬能力增加,导致粥样斑块累积,加重AIS发生CMBs现象^[3]。尿酸(Uric Acid, UA)是机体嘌呤代谢的终产物,具有清除自由基、抗氧化的作用,研究发现尿酸水平高低与阿尔茨海默病的发生具有一定相关性^[4]。研究发现25-羟基维生素D(25-Hydroxy vitamin D, 25(OH)D)对促炎细胞引起的认知功能障碍具有显著改善作用,并证实血管性痴呆所引起的认知功能障碍可能与25(OH)D水平密切相关^[5]。本文就HbA1c、25(OH)D及UA水平变化与AIS合并CMBs患者认知功能障碍的关系进行研究,现报道如下。

1 一般资料

1.1 资料与方法

选取2017年8月至2020年8月本院接收140例AIS患者临床资料作为研究对象。纳入标准:①所有患者符合中国急性缺血性脑卒中诊治指南2010版^[6];②临床资料完整;排除标准:①合并肝肾功能严重不全及恶性肿瘤疾病者;②合并痴呆等精神疾患无法配合本研究开展者。根据是否合并CMBs进行分组,将合并CMBs者设为研究组,未合并CMBs者设为对照组,其中,研究组患者49

例,男31例,女18例,年龄平均年龄(65.41 ± 5.71)岁;对照组患者91例,男58例,女33例,年龄平均年龄(65.81 ± 5.83)岁。研究组与对照组性别、年龄等一般资料比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。本研究经医院伦理委员会批准,患者均签署知情同意书。

1.2 实验室指标检测

所有患者采用未加抗凝剂的标准采样管采集清晨空腹静脉全血5 mL,离心($3\ 000\ \text{r/min}$, 10 min),分离血清存放于EP管中, -80°C 保存待检。采用电化学发光法检测25(OH)D,试剂盒购自罗氏公司;HbA1c采用离子交换高效液相色谱法检测,试剂盒由东曹(广州)化工有限公司提供;UA采用尿酸酶比色法,试剂盒由雅培公司提供。所有操作均按试剂盒操作说明进行。

1.3 认知功能评分

由本院主任医师通过蒙特利尔认知评价量表(the Montreal cognitive assesment, MOCA)^[7]进行判定,包括语言、注意力与计算力、视空间执行能力、抽象思维、延迟记忆、定向力等六个方面进行认知评估,满分30分,高于26分即为正常。根据研究组患者认知功能情况进行分组,将 ≥ 26 分以上者设为认知功能良好组,将 < 26 分以上者设为认知功能障碍组。

1.4 统计学方法

采用SPSS 22.0软件进行统计分析,计数资料以 $n(\%)$ 表示,采用 χ^2 检验,计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,采用 t 检验;采用多元Logistic回归分析影响AIS合并CMBs患者认知功能障碍的危险因素,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 研究组与对照组患者HbA1c、25(OH)D及UA水平比较

研究组患者HbA1c、UA水平明显高于对照

组,25(OH)D水平明显低于较对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。见表1。

表1 研究组与对照组患者HbA1c、25(OH)D及UA水平比较($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Comparison of HbA1c, 25(OH)D and UA levels between study group and control group ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	HbA1c(%)	25(OH)D(nmol/L)	UA(umol/L)
对照组	91	5.51±0.26	64.33±12.61	334.15±62.41
研究组	49	8.06±0.29	41.52±3.71	421.52±63.85
t值	-	53.140	12.3858	7.837
P值	-	<0.001	<0.001	<0.001

2.2 研究组与对照组患者认知功能情况比较

研究组患者延迟回忆、语言能力、抽象思维、定向力、注意力与计算力、视空间及执行能力评分明显低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表2。

2.3 影响AIS合并CMBs患者认知功能障碍的单因素分析

单因素分析结果显示,认知功能良好组与认知功能障碍组性别、年龄、高血压病史、高血脂病史、吸烟等占比比较差异均无统计学意义($P>0.05$),认知功能良好组与认知功能障碍组脑微出血数量、脑

表2 研究组与对照组患者认知功能情况比较($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Comparison of cognitive function between study group and control group ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	延迟回忆	语言能力	抽象思维	定向力	注意力与计算力	视空间及执行能力	总分
对照组	91	3.31±0.65	4.51±0.62	1.32±0.11	6.71±0.72	5.41±0.73	4.89±0.61	25.33±4.26
研究组	49	2.94±0.86	3.75±0.85	0.83±0.19	5.81±0.63	4.95±0.82	3.72±0.66	18.67±7.34
t值	-	2.860	6.053	19.338	7.360	3.404	10.516	6.797
P值	-	0.004	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

白质疏松、HbA1c、25(OH)D及UA水平等比较差异有统计学意义($P<0.05$)。见表3。

2.4 影响AIS合并CMBs患者认知功能障碍的多因素分析

脑微出血数量(2级)、HbA1c(异常)、25(OH)D(异常)及UA(异常)水平为影响AIS合并CMBs患者认知功能障碍的独立危险因素($P<0.05$)。见表4。

3 讨论

随着人口老龄化的加快,脑血管发病率日益增加。AIS作为常见高发的脑血管疾病,其发病机制复杂,具有极高的致残率及致死率,已成为危害社会的公共卫生问题^[8]。CMBs广泛分布于大脑基底节区及皮质内,可引起周围脑组织血液循环障碍、代谢紊乱、血脑屏障受损及多种活性物质释放,加重脑组织损害^[9]。如何有效治疗AIS合并CMBs对患者具有重要意义。

HbA1c是人体血液中红细胞内的血红蛋白与血糖结合的产物,是血红蛋白在高糖作用下缓慢连

表3 影响AIS合并CMBs患者认知功能障碍的单因素分析 [$n(\%)$, ($\bar{x}\pm s$)]

Table 3 single factor analysis of cognitive impairment in AIS patients with CMBS [$n(\%)$, ($\bar{x}\pm s$)]

因素	认知功能良好组(n=35)	认知功能障碍组(n=14)	χ^2/t 值	P值
性别	男	21(60.00)	0.562	0.453
	女	14(40.00)		
年龄(岁)	<65	25(71.43)	3.513	0.061
	≥65	10(28.57)		
高血压病史	有	23(65.71)	1.040	0.308
	无	12(34.29)		
脑微出血数量	1级	29(82.86)	20.232	<0.001
	2级	6(17.14)		
高血脂病史	有	13(37.14)	2.978	0.084
	无	22(62.86)		
吸烟	有	12(34.29)	0.316	0.574
	无	23(65.71)		
脑白质疏松	有	7(20.00)	14.761	<0.001
	无	28(80.00)		
HbA1c(%)	5.03±2.74	8.11±0.24	4.173	<0.001
25(OH)D(nmol/L)	40.67±4.56	33.79±4.02	4.925	<0.001
UA(μmol/L)	325.18±31.86	453.62±31.75	12.760	<0.001

表4 影响AIS合并CMBs患者认知功能障碍的多因素分析

Table 4 multivariate analysis of cognitive impairment in AIS patients with CMBS

影响因素	回归系数	标准误	Wald χ^2 值	OR值	95%CI	P值
脑白质疏松(有 vs 无)	0.506	0.316	5.126	1.658	0.89~3.08	0.215
脑微出血数量(1级 vs 2级)	0.928	0.815	9.752	2.490	1.67~3.73	<0.001
HbA1c(正常 vs 异常)	0.712	0.314	10.113	2.030	1.10~3.77	<0.001
25(OH)D(正常 vs 异常)	0.912	0.274	9.864	2.480	1.45~4.25	<0.001
UA(正常 vs 异常)	0.876	0.157	10.054	2.400	1.76~3.26	<0.001

续形成非酶促反应产物,可有效反映患者近期血糖控制情况^[10]。相关研究表明,HbA1c的水平升高可增加心脑血管疾病患病风险^[11]。UA是血浆中抗氧化作用的主要成分,具有防止细胞溶解凋亡的作用,并通过螯合体内过多的金属离子,起到保护神经元的作用^[12]。UA水平上升可导致内皮功能障碍,影响心脑血管系统^[13]。研究发现,25(OH)D不仅具有预防低钙、骨质疏松、感染等作用,还在防治心血管及神经系统疾病方面有一定效应。研究发现,25(OH)D广泛存在于脑组织中,当25(OH)D浓度降低后可导致脑卒中患者CMBs风险性增高。本研究显示,研究组患者HbA1c、UA水平明显高于对照组,且25(OH)D明显低于较对照组,这与Fan等学者^[14]研究相似,考虑原因与HbA1c、UA水平升高增高刺激内皮素活性,从而激活平滑肌内皮素受体及肾素血管紧张素系统,加快血管收缩有关;同时,增多的糖基化终末产物使核转录因子及激活蛋白因子增加,导致趋化、黏附因子表达上升,促进淋巴、单核细胞吞噬增强,导致粥样斑块累积,引起AIS发生CMBs。

近年来,关于脑梗死导致的认知功能障碍广泛受到国内外研究学者关注。MOCA作为国内外最普及、最常用的认知功能评判量表,对脑梗死患者进行认知功能判定、延缓患者进展为痴呆具有重要作用^[15-16]。本研究对AIS患者进行研究发现,合并CMBs者认知功评分明显低于未合并CMBs者。为进一步明确影响AIS合并CMBs患者认知功能障碍的危险因素,本研究采用多元Logistic回归分析发现,HbA1c、25(OH)D及UA水平异常与患者认知功能障碍密切相关。说明HbA1c、25(OH)D、UA水平与患者认知功能关系密切,检测其水平对AIS合并CMBs认知功能病情指导具有重要意义。但关于其以何种作用机制作用于认知功能的进展仍未明确,后续仍将继续深入研究。

综上所述,HbA1c、25(OH)D及UA水平与急性缺血性脑卒中合并脑微出血患者认知功能障碍密切相关,临床工作者可通过加强监测这三项指标,以了解患者认知功能情况,评估患者预后。

参考文献

- [1] Yamashiro K, Tanaka R, Kurita N, et al. Cerebral Microbleeds and Chronic Kidney Disease in Acute Ischemic Stroke Patients with Atrial Fibrillation [J]. J Stroke Cerebrov Dis, 2020, 29(4):104650.
- [2] Ding Y, Gu Z, Zhai T, et al. Effect of butylphthalide on new cerebral microbleeds in patients with acute ischemic stroke [J]. Medicine, 2020, 99(32):21594.
- [3] Hu J, Zhou W, Zhou Z, et al. miR-22 and cerebral microbleeds in brainstem and deep area are associated with depression one month after ischemic stroke [J]. Braz J Med Biol Res, 2020, 53(5):164-173.
- [4] 孙彦杰,刘娜,李欣,等. 丁苯酞对血管性轻度认知功能障碍患者肿瘤坏死因子- α 和白介素-8及尿酸酸的影响[J]. 中国新药杂志, 2020, 29(6):55-58.
- [5] Igarashi S, Ando T, Takahashi T, et al. Development of cerebral microbleeds in patients with cerebral hyperperfusion following carotid endarterectomy and its relation to postoperative cognitive decline [J]. J Neurosurg, 2021, 10(2):1-7.
- [6] 中华医学会神经病学分会脑血管病学组急性缺血性脑卒中诊治指南撰写组. 中国急性缺血性脑卒中诊治指南2010 [J]. 中国临床医生, 2011, 2(3):50-59.
- [7] Choi KH, Kim JH, Lee C, et al. Microbleeds and Outcome in Patients With Acute Ischemic Stroke and Atrial Fibrillation Taking Anticoagulants [J]. Stroke, 2020, 51(12):571-574.
- [8] 杨苗娟,曾思琳,徐铅辉,等. 脑小血管病总负荷评分与静脉溶栓治疗急性缺血性卒中患者1年预后相关性研究 [J]. 中国卒中杂志, 2020, 15(6):87-93.
- [9] Yuan J, Li X, Hu W. The clinical risk factors of cerebral microbleeds and its relationship with cognitive dysfunction [J]. Alzheim Dem, 2020, 16(3):306-308.
- [10] 付慧清,王新颜,吴洁清,等. 2型糖尿病患者HbA1c、25-OH-D3及T淋巴细胞亚群与胰岛素分泌的相关性分析 [J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(12):1713-1716+1721.
- [11] 周涛,宋光捷. 己酮可可碱对大鼠脑缺血再灌注损伤氧化应激反应和Nrf2-ARE信号通路的影响 [J]. 解放军医药杂志, 2019, 30(11):417-418.
- [12] 王楠,何远宏,潘双杰. 阿尔茨海默病患者认知功能及血清铜、同型半胱氨酸、尿酸水平、tau和A β 1-42蛋白的检测 [J]. 郑州大学学报:医学版, 2015, 58(3):407-409.
- [13] Schlemm L, Endres M, Werring DJ, et al. Benefit of Intravenous Thrombolysis in Acute Ischemic Stroke Patients With High Cerebral Microbleed Burden [J]. Stroke, 2019, 51(1):503-505.
- [14] Fan S, Wang Z, Li Q, et al. Relationship between BSP mRNA expression and 25(OH)D/OPG in peripheral blood of newly diagnosed T2DM patients with different bone mass [J]. Endokrynol Polska, 2020, 71(2):631-634.
- [15] Smythe MA, Parker D, Garwood CL, et al. Timing of Initiation of Oral Anticoagulation after Acute Ischemic Stroke in Patients with Atrial Fibrillation [J]. Pharmacotherapy, 2020, 40(1):55-71.
- [16] Shin YY, Ha SH, Woo HG, et al. Subclinical Peripheral Arterial Disease in Patients with Acute Ischemic Stroke: A Study with Ultrasonography [J]. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2019, 28(11):715-717.

CA153、CA199联合AFP检测在卵巢癌病情进展、化疗近期疗效的评估

张佟 王文莉 叶红*

[摘要] **目的** 分析糖类抗原153(CA153)、糖类抗原199(CA199)联合甲胎蛋白(AFP)检测在卵巢癌病情进展、化疗近期疗效评估中的应用价值。**方法** 选取2016年11月至2018年11月本院收治的108例卵巢癌患者临床资料为研究组。另选取同期在本院接受健康体检的正常妇女100例作为对照组。对比不同研究对象CA153、CA199、AFP水平差异,分析CA153、CA199、AFP在卵巢癌患者中的变化,采用非条件单因素和多因素Logistic回归模型分析影响卵巢癌患者化疗疗效的相关因素,采用ROC曲线分析CA153、CA199联合AFP检测在卵巢癌化疗近期疗效评估中的应用价值。**结果** 研究组治疗前CA153、CA199、AFP水平较对照组高,差异有统计学意义($P<0.05$)。研究组治疗后CA153、CA199、AFP水平较治疗前降低,差异有统计学意义($P<0.05$),且与对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。FIGO分期:Ⅲ+Ⅳ期、分化程度:低分化、存在淋巴转移者CA153、CA199、AFP水平高于FIGO分期:I+Ⅱ期、分化程度:中高分化及无淋巴转移者,差异具有统计学意义($P<0.05$)。108例患者治疗有效率为78.70%,无效率为21.30%。FIGO分期、CA153、CA199、AFP水平为影响卵巢癌患者化疗近期疗效的独立危险因素($P<0.05$)。CA153、CA199、AFP三者联合检测AUC(0.71)最大。**结论** CA153、CA199、AFP水平在卵巢癌患者中显著上升,联合监测三者水平可有效评估卵巢癌患者病情发展、化疗近期疗效。

[关键词] CA153; CA199; AFP; 卵巢癌

Evaluation of CA153 and CA199 combined with AFP detection in the progress of ovarian cancer and the short-term efficacy of chemotherapy

ZHANG Tong, WANG Wenli, YE Hong*

(Gynecological Minimally Invasive Center, Beijing Obstetrics and Gynecology Hospital, Capital Medical University, Beijing, China, 100006)

[ABSTRACT] **Objective** To analyze the application value of carbohydrate antigen 153 (CA153), carbohydrate antigen 199 (CA199) combined with alpha fetoprotein (AFP) detection in the evaluation of the disease progress of ovarian cancer and the short-term efficacy of chemotherapy. **Methods** The clinical data of 108 patients with ovarian cancer admitted to this hospital from November 2016 to November 2018 were retrospectively analyzed and selected as the study group. In addition, 100 women who received physical examination in this hospital during the same period were selected as the control group. The levels of CA153, CA199, and AFP in different subjects were compared, and the changes of CA153, CA199, and AFP in patients with ovarian cancer were analyzed. Unconditional univariate and multivariate logistic regression models were used to analyze the related factors that affect the efficacy of chemotherapy in patients with ovarian cancer. The ROC curve was used to analyze the application value of CA153 and CA199 combined with AFP in the evaluation of the short-term efficacy of chemotherapy for ovarian cancer. **Results** The levels of CA153, CA199, and AFP in the study group before treatment were higher than those in the control group, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). After treatment, the levels of CA153, CA199, and AFP in the study group were lower than those before treatment, the differences were statistically significant ($P<0.05$).

作者单位:首都医科大学附属北京妇产医院妇科微创中心,北京 100006

*通信作者:叶红, E-mail: yehong@ccmu.edu.cn

and compared with those in the control group, the differences were not statistically significant ($P>0.05$). FIGO staging: III + IV, degree of differentiation: poorly differentiated, with lymphatic metastasis, CA153, CA199, AFP levels are higher than FIGO staging: I + II, degree of differentiation: moderately differentiated and no lymphatic metastasis, the difference is statistically significant ($P<0.05$). The effective rate of treatment in 108 patients was 78.70%, and the ineffective rate was 21.30%. FIGO staging, CA153, CA199, and AFP levels were independent risk factors that affect the short-term efficacy of chemotherapy in ovarian patients ($P<0.05$). The RUCs of CA153, CA199, AFP and the AUC (0.710) of combined detection was the largest. **Conclusion** The levels of CA153, CA199, and AFP increase significantly in patients with ovarian cancer. The combined monitoring of the three indicators can effectively assess the development of ovarian cancer patients and the short-term efficacy of chemotherapy.

[KEY WORDS] CA153; CA199; AFP; Ovarian cancer

卵巢癌是临床上较为常见的妇科肿瘤疾病,由于卵巢位于盆腔深部,卵巢癌的早期症状不明显,故卵巢癌的早期诊断比较困难^[1]。随着卵巢癌患病率逐年上升,寻求能为卵巢癌诊断、病情监测和预测复发提供可靠依据的肿瘤标记物成为国内外学者关注的焦点。糖类抗原 153 (cancer antigen153, CA153) 是乳腺癌最重要的特异性标志物,而糖类抗原 199 (cancer antigen199, CA199) 对黏液性卵巢癌和透明细胞癌有较高的敏感性^[2]。甲胎蛋白 (alpha fetoprotei, AFP) 多应用于肝癌诊断,由于相关研究发现 AFP 在卵巢生殖细胞中也可分泌,因此有学者认为检测血清 AFP 对卵巢癌的诊断及评估具有重要意义^[3]。本研究将研究 CA153、CA199、AFP 三者联合检测在卵巢癌病情进展、化疗近期疗效评估中的应用价值,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2016 年 11 月至 2018 年 11 月本院收治的 108 例卵巢癌患者作为研究组,年龄平均年龄 (49.38±6.75) 岁;国际妇产科联盟 (International Federation of Gynecology and Obstetrics, FIGO) 2018 分期^[4]: I + II 期 52 例, III + IV 期 56 例。纳入标准:①满足卵巢癌诊疗标准^[5];②均为初诊患者,无手术适应症,无肿瘤根治手术史、放化疗史;③临床资料完整。排除标准:①合并心功能不全、肝肾功能异常、恶性肿瘤等;②合并免疫系统、血液系统、精神系统疾病;③临床资料不全及不配合检查。另选取同期在本院接受健康体检的体检正常妇女 100 例作为对照组,年龄平均 (49.50±6.73) 岁,均未检出卵巢病变,并排除家族恶性肿瘤病史者。本

研究已获得医学伦理委员会批准,所有研究对象均签署知情同意书,两组一般资料比较无统计学意义 ($P>0.05$),具有可比性。见表 1。

表 1 两组一般资料比较 ($\bar{x}\pm s$)

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

组别	<i>n</i>	年龄	BMI (kg/m ²)	居住地区 (农村/城镇)	产次 (次)	孕次 (次)
研究组	108	49.38±6.75	22.63±2.47	50/58	1.63±0.52	2.15±0.36
对照组	100	49.50±6.73	22.81±2.48	46/54	1.56±0.53	2.17±0.39
<i>t</i> 值		0.128	0.524	0.002	0.961	0.385
<i>P</i> 值		0.898	0.601	0.966	0.338	0.701

1.2 治疗方法

研究组患者于入组后给予常规治疗,在此基础上给予 TC 化疗,即紫杉醇+卡铂为主的化疗。卡铂 (齐鲁制药有限公司,规格 0.1 g/支,国药准字 H10920028) 用法:卡铂 AUC 5~6, 静脉点滴;紫杉醇 (哈药集团生物工程有限公司,规格 30 mg/支,国药准字 H20059962) 用法:紫杉醇 175 mg/m², 静脉滴注,时间控制在 3 h 内。治疗前 2 d 给予地塞米松 (郑州卓峰制药有限公司,规格 5 mg/支,国药准字 H41020055) 预防紫杉醇过敏,用量为 8 mg/d,连服 3 d。21 d 为 1 个疗程,治疗 3~6 个疗程。

1.3 检测方法

采集研究组治疗前、治疗 3~6 个疗程后及对照组外周静脉血 5 mL,置于未加抗凝剂的标准采样管中,离心 (3 000 r/min, 10 min) 取上清液分装于聚丙烯 EP 管内,在 -80℃ 超低温冰箱中待检。试剂盒购自 Roche 公司,采用电化学发光法检测严格按照仪器操作规程及试剂盒说明书进行检测。正常值参考范围^[6-8]: CA153 <25 U/mL、CA199 <37 U/mL、AFP <55 U/L。

1.4 疗效判定^[9]

疗效评价^[9]:所有患者在治疗结束后进行体格

检查腹盆腔MRI、CT及彩超检查,分别为完全缓解;部分缓解、稳定、进展。治疗以完全缓解+部分缓解为有效。

1.5 统计学分析

采用SPSS 22.0软件进行统计分析,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用*t*检验,多组间比较采用*F*检验;计数资料以*n*(%)表示,采用 χ^2 检验,影响卵巢癌患者化疗疗效的相关因素采用非条件单因素和多因素Logistic回归模型分析,采用ROC曲线分析CA153、CA199联合AFP检测在卵巢癌化疗近期疗效评估中的应用价值,以*P*<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 研究组治疗前后与对照组CA153、CA199、AFP水平比较

研究组治疗前CA153、CA199、AFP水平较对照组高,差异有统计学意义(*P*<0.05)。研究组治疗后CA153、CA199、AFP水平较治疗前降低,差异有统计学意义(*P*<0.05),与对照组比较无统计学意义(*P*>0.05)。见表2。

2.2 CA153、CA199、AFP水平与卵巢癌患者病情进展的关系

不同年龄、组织分化程度及组织学类型患者CA153、CA199、AFP水平比较无统计学意义(*P*>0.05)。FIGO分期:Ⅲ+Ⅳ期、分化程度:低分化、存在淋巴转移者CA153、CA199、AFP水平均高于FIGO分期:I+Ⅱ期、分化程度:中高分化及无淋巴转移者,差异有统计学意义(*P*<0.05)。见表3。

表2 研究组治疗前后与对照组CA153、CA199、AFP水平比较($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of CA153, CA199 and AFP levels between study group and control group before and after treatment ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	CA153 (U/mL)	CA199 (U/mL)	AFP (U/mL)
研究组 治疗前	108	96.51±45.82 ^a	89.36±40.12 ^a	116.97±38.55 ^a
研究组 治疗后	108	24.75±4.02 ^b	34.57±5.74 ^b	50.69±4.72 ^b
对照组	100	20.11±5.69	31.10±5.90	48.95±6.57
<i>F</i> 值		266.06	198.44	302.65
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001

注:与同组治疗前比较,^a*P*<0.05;与对照组比较,^b*P*<0.05。

2.3 108例卵巢癌患者近期疗效情况

化疗疗程结束后,108例患者中完全缓解者57例,部分缓解者28例,稳定者19例,进展者4例,治疗有效率为78.70%,无效率为21.30%。按照治疗疗效,将研究组患者分为有效组(*n*=85)和无效组(*n*=23)。

2.4 影响卵巢癌患者化疗近期疗效的单因素分析

经非条件单因素Logistic回归模型分析:年龄、病理类型、有无腹水及肿瘤最大径与卵巢癌患者化疗近期疗效无关(*P*>0.05),分化程度与卵巢癌患者化疗近期疗效呈负相关(*P*<0.05),FIGO分期、淋巴转移情况及CA153、CA199、AFP水平与卵巢癌患者化疗近期疗效呈正相关(*P*<0.05)。见表4。

2.5 影响卵巢癌患者化疗近期疗效的多因素分析

非条件多因素Logistic回归模型分析:FIGO分期、CA153、CA199、AFP水平为影响卵巢癌患者化疗近期疗效的独立危险因素(*P*<0.05)。见表5。

表3 不同临床病理特征患者CA153、CA199、AFP表达情况($\bar{x} \pm s$)

Table 3 expression of CA153, CA199 and AFP in patients with different clinicopathological characteristics ($\bar{x} \pm s$)

临床特征	<i>n</i>	CA153(U/mL)	<i>t/F</i> 值	<i>P</i> 值	CA199(U/mL)	<i>t/F</i> 值	<i>P</i> 值	AFP(U/mL)	<i>t/F</i> 值	<i>P</i> 值
年龄(岁)	≤65	60	90.50±40.83	0.297	80.52±36.99	0.281	0.779	108.09±36.98	0.349	0.728
	>65	48	92.85±41.02		82.54±37.14			110.59±37.11		
FIGO分期	I+Ⅱ	52	63.89±38.71	4.159	70.41±32.58	2.253	0.026	94.50±35.22	3.094	0.003
	Ⅲ+Ⅳ	56	96.54±42.58		85.97±38.66			115.88±36.48		
分化程度	中高分化	59	58.09±32.15	5.274	69.26±26.80	2.693	0.008	87.49±35.66	3.096	0.003
	低分化	49	94.73±40.05		84.63±32.52			109.59±38.41		
组织分化程度	G1~G2	42	86.97±42.87	0.186	85.05±34.71	0.156	0.876	107.98±38.50	0.163	0.871
	G3	66	88.54±42.51		86.11±34.25			106.74±38.66		
淋巴结转移	有	45	98.05±30.28	3.739	87.90±38.74	2.705	0.008	105.39±36.51	2.368	0.020
	无	63	74.99±32.50		68.52±35.19			88.79±35.48		
病理学类型	浆液性	40	80.96±41.52	0.020	87.46±31.96	0.040	0.990	101.74±35.21	0.010	0.998
	粘液性	38	82.08±41.84		88.50±31.88			102.55±35.16		
子宫内膜样癌	20	83.66±40.08			85.49±32.55			100.85±36.17		
透明细胞癌	10	82.11±40.69			86.97±32.57			101.26±36.45		

表4 影响卵巢癌患者化疗近期疗效的单因素分析 [n(%)]

Table 4 single factor analysis of short-term efficacy of chemotherapy in patients with ovarian cancer [n(%)]

临床特征	n	有效组(n=85)	无效组(n=23)	χ ² 值	P值
年龄(岁)	≤65	45(52.94)	15(65.22)	1.105	0.293
	>65	40(47.06)	8(34.78)		
FIGO分期	I+II	49(57.65)	3(13.04)	14.425	<0.001
	III+IV	36(42.35)	20(86.96)		
分化程度	中高分化	59(64.71)	4(17.39)	16.350	<0.001
	低分化	49(35.29)	19(82.61)		
淋巴转移	有	45(29.41)	20(86.96)	24.662	<0.001
	无	63(70.59)	3(13.04)		
腹水	有	42(37.65)	10(43.48)	0.259	0.611
	无	66(62.35)	13(56.52)		
病理类型	浆液性	36(30.59)	10(43.48)	0.199	0.905
	粘液性	32(30.59)	6(26.09)		
	子宫内膜样癌	10(9.41)	2(8.70)		
	透明细胞癌	30(29.41)	5(21.73)		
肿瘤最大径(cm)	>7	35(30.59)	9(39.13)	0.603	0.437
	≤7	73(69.41)	14(60.87)		
CA153	异常	80(69.41)	21(91.30)	4.518	0.034
	正常	28(30.59)	2(8.70)		
CA199	异常	89(77.65)	23(100.00)	6.239	0.012
	正常	19(22.35)	0(0.00)		
AFP	异常	84(72.94)	22(95.65)	5.402	0.020
	正常	24(27.06)	1(4.35)		

表5 影响卵巢癌患者化疗近期疗效的多因素分析

Table 5 multivariate analysis on the short-term efficacy of chemotherapy in patients with ovarian cancer

影响因素	回归系数	标准误	Wald χ ² 值	OR值	95%CI	P值
CA153(异常 vs 正常)	0.984	0.154	4.018	2.675	1.978~3.618	<0.001
CA199(异常 vs 正常)	0.895	0.135	4.119	2.447	1.878~3.189	<0.001
AFP(异常 vs 正常)	0.711	0.117	4.987	2.036	1.619~2.561	<0.001
FIGO分期(III+IV期 vs I+II期)	0.965	0.268	4.561	2.625	1.552~4.438	<0.001
分化程度(低分化 vs 中高分化程度)	1.311	0.997	4.230	3.710	0.526~26.183	0.511
淋巴转移(有 vs 无)	1.025	0.946	4.951	2.787	0.436~17.799	0.088

2.6 CA153、CA199联合AFP检测在卵巢癌化疗近期疗效评估中的应用价值

ROC曲线分析显示,CA153、CA199、AFP单一及三者联合AUC分别为0.705、0.510、0.665、0.710,各指标AUC以联合检测最大,见表6、图1。

表6 CA153、CA199联合AFP检测在卵巢癌化疗近期疗效评估中的预测价值

Table 6 Predictive value of CA153, CA199 combined with AFP detection in short-term efficacy evaluation of ovarian cancer chemotherapy

预测因子	敏感度(%)	特异度(%)	AUC	95%CI
CA153	74.90	80.41	0.705	0.478~0.932
CA199	75.56	81.63	0.510	0.292~0.728
AFP	78.09	81.56	0.665	0.465~0.865
三者联合	89.71	82.33	0.710	0.475~0.945

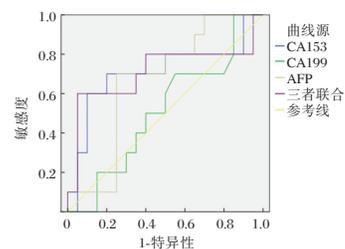


图1 CA153、CA199联合AFP检测在卵巢癌化疗近期疗效评估中的的预测价值

Figure 1 The predictive value of CA153 and CA199 combined with AFP in the assessment of the short-term efficacy of ovarian cancer chemotherapy

3 讨论

紫杉醇联合卡铂是临床治疗卵巢癌的一线化疗方案,具有明确的疗效且不良反应较少^[9]。影响卵巢癌化疗患者临床疗效的因素较多,既往文献

指出 FIGO 分期与患者疗效关系密切, FIGO 分期越高者临床无效率越高, 这与本研究结果一致^[10]。单纯依靠临床参数等评估患者疗效存在局限性, 随着有关肿瘤发生机制研究的不断深入, 国内外学者发现多种血清肿瘤标志物联合检测亦可为卵巢癌临床治疗疗效判断给予一定的启示^[11]。

血清 CA153 最早发现于乳腺癌上皮细胞, 是乳腺细胞上皮表面糖蛋白的变异体。研究发现, 细胞癌变时由于糖基化转移酶被激活, 可引起细胞表面糖类的变化^[12]。血清 CA153 常在乳腺癌中过度表达, 是目前公认的诊断乳腺癌较为特异的一种肿瘤标志物。血清 CA199 则是一种与胰腺癌、胆囊癌、胃癌和结肠癌相关的肿瘤标志物, 又被称作胃肠癌相关抗原, 分子量大约为 10 KD 左右。研究表示, CA199 可于卵巢癌变细胞细胞膜上大量脱落至血液中, 进而在卵巢癌患者中高表达, 对于检测卵巢癌有着较高的灵敏性^[13]。本研究结果有力地佐证了 CA153、CA199 与卵巢癌病情发生、发展关系密切。虽然 CA199 已广泛应用于卵巢癌的诊断中, 但 CA199 预测卵巢癌患者化疗疗效的应用较少。本研究结果提示 CA153、CA199 水平异常者化疗后临床无效率可能会高于 CA153、CA199 正常者, 在临床应用中可以将两者应用于卵巢癌的分期、分型以及分化程度和治疗后效果的判断。

AFP 是一种糖蛋白, 近年来发现 AFP 可由生殖器官恶性肿瘤产生^[14]。研究显示, 卵巢癌病情进展过程中, 当癌细胞快速增殖分裂时, AFP 可通过特殊途径迅速被激活而释放到血液中呈现高表达^[15]。本研究结果表明 AFP 在评估卵巢癌发生发展及治疗疗效中具有良好的辅助作用。本研究采用 ROC 曲线分析 CA153、CA199、AFP 单一或联合检测在卵巢癌化疗近期疗效评估中的应用价值, 结果显示各指标 AUC 以联合检测最大。因此单项 CA153、CA199、AFP 检测在卵巢癌诊断中的灵敏度不高, 必须联合三者进行检测, 进而提高对卵巢癌的临床诊断、预后评估的效能。

综上所述, CA153、CA199、AFP 水平在卵巢癌患者中显著上升, 联合监测三者水平可有效评估卵巢癌患者病情发展、化疗近期疗效。

参考文献

- [1] 黄丽萍, 刘辉. 肿瘤标志物在卵巢癌的研究现状[J]. 中华妇幼临床医学杂志(电子版), 2017, 13(3):265-269.
- [2] 陈瑜, 杨龙. 热疗对食管癌患者的辅助治疗作用及其对血清糖类抗原 199 及血管内皮生长因子的影响[J]. 中华老年多器官疾病杂志, 2018, 17(9):677-681.
- [3] Peng SJ, Wang CF, Yu YJ, et al. CYFRA21-1/TG ratio as an accurate risk factor to predict eye metastasis in nasopharyngeal carcinoma: A STROBE-compliant article[J]. *Medicine*, 2020, 99(46):22773.
- [4] 赵晓娟, 魏珂. 术前血清 CA125 和 HE4 水平预测卵巢上皮性癌患者淋巴结转移的应用价值[J]. 解放军医药杂志, 2018, 30(6):25-28.
- [5] Gan W, Huang JL, Zhang MX, et al. New nomogram predicts the recurrence of hepatocellular carcinoma in patients with negative preoperative serum AFP subjected to curative resection[J]. *J Surg Oncol*, 2018, 56(45):5145-5147.
- [6] Kim JH, Park JY. The significance of preoperative serum cancer antigen 125 in malignant ovarian germ cell tumors[J]. *Gynecol Oncol*, 2017, 145(50):215-216.
- [7] Wang T, Liu S, Zheng YB, et al. Clinical Study on Using 125I Seeds Articles Combined with Biliary Stent Implantation in the Treatment of Malignant Obstructive Jaundice[J]. *Antic Res*, 2017, 37(8):4649-4653.
- [8] Callero MA, Rodriguez CE, Sólamo, Aldana, et al. The Immune System As a New Possible Cell Target for AFP 464 in a Spontaneous Mammary Cancer Mouse Model[J]. *J Cell Biochem*, 2017, 45(51):625-629.
- [9] 张富斌, 崔李宁, 徐科君. 紫杉醇脂质体与传统紫杉醇联合卡铂治疗卵巢癌的疗效及不良反应的对比分析[J]. 中华全科医学, 2017, 15(5):808-810.
- [10] 徐文莉, 林燕华, 罗艺, 等. 上皮性卵巢癌血浆中 microRNA-30a-5p 含量与分级及分期的关系[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2017, 9(6):381-385.
- [11] Qing W, Liyun C, Robert H. Parallel Comparison of Cancer Antigen 15.3 and Cancer Antigen 27.29 in Breast Cancer[J]. *Am J Clin Pathol*, 2019, 50(45):83-85.
- [12] Laban S, Gangkofner DS, Holzinger D, et al. Antibody Responses to Cancer Antigens Identify Patients with a Poor Prognosis among HPV - Positive and HPV - Negative Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Patients[J]. *Clin Cancer Res*, 2019, 25(24):7405-7412.
- [13] Cao G, Yu X, Jiang XH, et al. Serum cell-free DNA concentrations and integrity analysis of colorectal cancer patients before and after surgery[J]. *Cell Molec Biol*, 2019, 65(6):44-51.
- [14] Aixia, Zhang, Bin, et al. Advanced intrahepatic cholangiocarcinoma treated using anlotinib and microwave ablation: A case report. [J]. *Medicine*, 2019, 98(52):18435.
- [15] Park SJ, Jang JY, Jeong SW, et al. Usefulness of AFP, AFP-L3, and PIVKA-II, and their combinations in diagnosing hepatocellular carcinoma[J]. *Medicine*, 2017, 96(11):5811.

上尿路结石急诊术围术期NLR、CRP、KIM-1变化及对SIRS诊断价值

杨永刚* 李外兴 李喆 伍小军

[摘要] **目的** 探讨上尿路结石急诊术围术期中性粒细胞/淋巴细胞比值(NLR)、C反应蛋白(CRP)、尿肾损伤分子-1(KIM-1)变化及对全身炎症反应综合征(SIRS)诊断价值。**方法** 选取本院98例上尿路结石急诊术患者,根据术后是否发生SIRS分为SIRS组($n=16$)、非SIRS组($n=82$)。比较两组一般资料、围术期NLR、CRP、KIM-1水平,分析各指标与SIRS评分相关性及其诊断SIRS的价值。**结果** SIRS组确诊后NLR、CRP、KIM-1高于非SIRS组($P<0.05$);确诊后NLR、CRP、KIM-1与SIRS评分间存在正相关关系($P<0.05$);NLR、CRP、KIM-1诊断SIRS的曲线下面积(AUC)均在0.7以上,各指标联合诊断的AUC最大,为0.963。**结论** 上尿路结石急诊术后NLR、CRP、KIM-1水平明显升高对临床诊断SIRS具有良好应用价值。

[关键词] 上尿路结石;全身炎症反应综合征;中性粒细胞/淋巴细胞比值;C反应蛋白;尿肾损伤分子-1

Changes of NLR, CRP, KIM-1 in the perioperative period of emergency surgery for upper urinary calculi and their diagnostic value for SIRS

YANG Yonggang*, LI Waixing, LI Zhe, WU Xiaojun

(Department of Emergency Medicine, Longhua District People's Hospital, Shenzhen, Guangdong, China, 518109)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the perioperative changes of neutrophils lymphocytes ratio (NLR), C-reactive protein (CRP), kidney injury molecule-1 (KIM-1) during emergency surgery for upper urinary tract stones and their diagnostic value for systemic inflammatory response syndrome (SIRS). **Methods** A total of 98 patients undergoing emergency surgery for upper urinary calculi in our hospital were selected and divided into the SIRS group ($n=16$) and the non-SIRS group ($n=82$) according to whether SIRS occurred after surgery. The general data, perioperative NLR, CRP, and KIM-1 levels in the two groups were compared, and the correlation between each indicator and the SIRS score and its diagnostic value for SIRS were analyzed. **Results** After diagnosis, NLR, CRP, and KIM-1 in the SIRS group were higher than those in the non-SIRS group ($P<0.05$). After diagnosis, there was a positive correlation between NLR, CRP, KIM-1 and SIRS score ($P<0.05$). The area under the curve (AUC) of NLR, CRP, and KIM-1 in the diagnosis of SIRS were all above 0.7, and the AUC of the combined diagnosis of each indicator was the largest, which was 0.963. **Conclusion** The level of NLR, CRP, and KIM-1 increased significantly after emergency surgery for upper urinary calculi, which has good application value for the clinical diagnosis of SIRS.

[KEY WORDS] Upper urinary tract stones; Systemic inflammatory response syndrome; Neutrophils lymphocytes ratio; C-reactive protein; Kidney injury molecule-1

基金项目:深圳市宝安区社会公益基金项目(2016CX050)

作者单位:深圳市龙华区人民医院急诊医学科,广东,深圳 518109

*通信作者:杨永刚, E-mail: yangyonggang@163.com

全身炎症反应综合征(Systemic inflammatory response syndrome, SIRS)是机体对创伤、手术、感染等因素造成的严重损伤产生的全身性非特异性炎症反应,主要表现为呼吸频率与心率加快^[1-2]。目前,手术为临床治疗上尿路结石的常用、有效方法,但术后易出现SIRS,发生率可达9.8%~37.0%,不仅影响患者术后康复,严重者可能转变为脓毒血症,导致多脏器功能衰竭,增加病死率^[3]。新近研究指出,术期中性粒细胞/淋巴细胞比值(Neutrophils lymphocytes ratio, NLR)为目前反映机体炎症状态的常用指标,与多种炎症性疾病的发生发展相关^[4]。C反应蛋白(C-reactive protein, CRP)是一种非特异的炎症标志物,在炎症性疾病的诊断、病情及预后评估方面均具有一定价值^[5]。尿肾损伤分子-1(Kidney injury molecule-1, KIM-1)是一种跨膜蛋白,在肾小管上皮损伤时其表达水平明显升高^[6]。而SIRS患者体内大量炎症因子释放,炎症因子可引起肾小管上皮细胞损伤,促进KIM-1表达增加^[7],但其在SIRS中的变化情况尚无研究报道。基于此,本研究尝试探究上尿路结石急诊术围术期NLR、CRP、KIM-1变化及诊断SIRS的价值。报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2020年1月至2020年12月本院收治的98例上尿路结石急诊术患者,2项或2项以上即可诊断SIRS^[8]:①体温 $>38^{\circ}\text{C}$ 或 $<36^{\circ}\text{C}$;②心率 >90 次/min,或低血压(收缩压 <90 mmHg,或较基线降低 >40 mmHg);③呼吸频率 >20 次/min,或通动脉血二氧化碳分压 <32 mmHg;④外周血白细胞计数 $>12\times 10^9/\text{L}$ 或 $<4\times 10^9/\text{L}$,或未成熟白细胞 $>10\%$,但应排除可以引起上述急性异常改变的其他原因。根据术后1周内是否发生SIRS分为SIRS组($n=16$)、非SIRS组($n=82$)。SIRS组:男9例,女7例;年龄平均(42.64 ± 10.59)岁;非SIRS组:男40例,女42例;年龄平均(39.87 ± 9.36)岁。

纳入标准:①经泌尿系统B超、排泄性尿路造影或泌尿系统CT平扫等影像学检查确诊为尿路结石;②需行急诊手术治疗;③首次行泌尿系手术;④年龄 ≥ 18 岁;⑤认知功能良好,无沟通交流障碍;⑥患者知晓本研究,已签署同意书。排除标准:①恶性肿瘤患者;②术前严重尿路感染、脓毒症患者;③血液系统疾病患者;④自身免疫性疾病

患者;⑤严重心脑血管疾病、肝肾功能障碍者。

1.2 方法

分别于治疗前、SIRS确诊后采集所有患者外周静脉血5 mL,取其中2 mL血液标本采用Sysmex XE-5000五分类全自动血细胞分析仪与配套试剂检测中性粒细胞值及淋巴细胞值,计算NLR。取3 mL血液标本,离心处理(转速3 500 r/min,离心半径8 cm,离心时间5 min),取血清,由专业检测人员采用酶联免疫吸附法测定血清CRP、KIM-1水平,检测试剂盒购自青岛捷世康生物科技有限公司。

1.3 观察指标

两组一般资料、围术期(治疗前、SIRS确诊后)NLR、CRP、KIM-1水平,分析各指标与SIRS评分相关性及诊断SIRS的价值。一般资料包括性别、年龄、体质指数(Body mass index, BMI)、饮酒史、吸烟史、手术类型(输尿管镜手术、输尿管软镜手术、经皮肾镜手术)、手术时间、合并疾病(高脂血症、糖尿病、心脏病、高血压),本研究采用的饮酒定义为:每日饮白酒 ≥ 2 两或啤酒 ≥ 2 瓶,每周饮酒 ≥ 1 次;吸烟定义为:每天抽烟 ≥ 1 支,连续吸烟时间 >6 月。SIRS评分根据患者确诊时体温、心率、平均动脉压、呼吸频率等临床体征评估,总分0~32分,分值越高病情越严重^[9]。

1.4 统计学方法

数据处理采用SPSS 22.0软件,计数资料以 $n(\%)$ 数描述,采用 χ^2 检验,计量资料用 $(\bar{x}\pm s)$ 描述,两组间比较采用 t 检验。相关性分析采用Pearson相关系数模型,通过偏相关性进行多因素分析,诊断效能分析采用受试者工作特征(ROC)曲线,不同诊断方案间曲线下面积比较采用DeLong检验,联合诊断实施Logistic二元回归拟合,返回诊断概率 $\text{logit}(p)$,将其作为独立检验变量。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组一般资料比较

两组年龄、性别、BMI、饮酒史、吸烟史、手术类型、高脂血症、心脏病、高血压比较,差异无统计学意义($P>0.05$);SIRS组手术时间较非SIRS组长,糖尿病患者占比较非SIRS组高,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表1。

2.2 两组围术期NLR、CRP、KIM-1变化

术前两组NLR、CRP、KIM-1比较,差异无统计学

表1 两组一般资料对比 [n(%), ($\bar{x} \pm s$)]

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

资料	SIRS组 (n=16)	非SIRS组 (n=82)	t/χ^2 值	P值
年龄(岁)	42.64±10.59	39.87±9.36	1.060	0.292
性别			0.299	0.585
男	9(56.25)	40(48.78)		
女	7(43.75)	42(51.22)		
BMI(kg/m ²)	24.57±1.73	24.29±2.05	0.511	0.610
饮酒史	15(93.75)	78(95.12)	0.052	0.820
吸烟史	9(56.25)	36(43.90)	0.822	0.365
手术类型			0.111	0.946
输尿管镜手术	5(31.25)	29(35.37)		
输尿管软镜手术	6(37.50)	28(34.15)		
经皮肾镜手术	5(31.25)	25(30.49)		
手术时间(min)	97.68±20.54	76.89±18.94	3.962	<0.001
合并疾病				
高脂血症	5(31.25)	30(36.59)	0.166	0.684
糖尿病	6(37.50)	2(2.44)	17.524	<0.001
心脏病	1(6.25)	7(8.54)	0.038	0.847
高血压	2(12.50)	12(14.63)	0.028	0.867

表2 两组围术期NLR、CRP、KIM-1变化 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Perioperative NLR, CRP, KIM-1 changes in the two groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	NLR		CRP(mg/L)		KIM-1(ng/L)	
		术前	确诊后	术前	确诊后	术前	确诊后
SIRS组	16	1.35±0.39	2.69±0.85	13.86±3.95	125.24±60.03	11.78±3.54	30.92±10.54
非SIRS组	82	1.42±0.45	1.81±0.57	15.04±4.89	48.89±15.15	13.05±4.12	17.68±5.49
t值		0.581	5.176	0.908	10.155	1.152	7.406
P值		0.563	<0.001	0.366	<0.001	0.252	<0.001

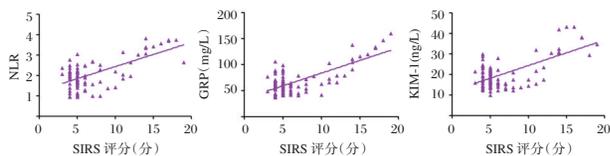


图1 NLR、CRP、KIM-1与SIRS评分相关性

Figure 1 Correlation between NLR, CRP, KIM-1 and SIRS score

表3 偏相关性分析

Table 3 Partial correlation analysis

影响因素	偏回归系数	标准误差	偏回归系数(标准化)	t值	P值
常量	3.305				
NLR	4.594	0.451	4.262	10.186	<0.001
CRP	8.364	0.336	8.015	24.893	<0.001
KIM-1	3.879	0.269	3.644	14.420	<0.001

3 讨论

SIRS是上尿路结石术后严重并发症,术后尽早发现并给予有效治疗对控制SIRS进展、改善患者预后至关重要^[10]。SIRS被认为是机体对致病因子防御性的应激反应过度,最终转变为全身炎症

意义($P>0.05$);SIRS组确诊后NLR、CRP、KIM-1较非SIRS组高,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表2。

2.3 NLR、CRP、KIM-1与SIRS评分相关性

SIRS组SIRS评分为(14.68±3.16)分,非SIRS组SIRS评分为(4.11±1.05)分,组间比较,SIRS组较非SIRS组高($t=24.507, P<0.001$)。由于术前两组各指标相似,故应用确诊后各指标作为源数据,采用Pearson进行相关性分析,结果显示,确诊后NLR、CRP、KIM-1与SIRS评分呈正相关($P<0.05$)。见图1。

2.4 偏相关性分析

将手术时间、糖尿病控制后,确诊后NLR、CRP、KIM-1仍与SIRS评分相关($P<0.05$)。见表3。

2.5 NLR、CRP、KIM-1诊断SIRS价值

以确诊后SIRS组、非SIRS组数据作为阳性、阴性样本,绘制各指标诊断SIRS的ROC曲线,结果显示,NLR、CRP、KIM-1联合诊断SIRS的AUC为0.963($P<0.05$),大于各指标单独诊断。见表4。

表4 NLR、CRP、KIM-1诊断SIRS的价值分析结果

Table 4 Results of the value analysis of NLR, CRP, and KIM-1 in the diagnosis of SIRS

指标	AUC	95%CI	cut-off值	敏感度(%)	特异度(%)	P值
NLR	0.764	0.668~0.844	>2.17	75.00	69.51	<0.001
CRP	0.863	0.779~0.924	>78.58 mg/L	81.25	87.80	<0.001
KIM-1	0.826	0.736~0.895	>26.06 ng/L	68.75	93.90	<0.001
联合	0.963	0.904~0.991	-	87.50	95.12	<0.001

损伤病理过程的临床综合征,其发生可刺激机体大量释放炎症因子^[11]。因此炎症标志物在本病的发生发展中发挥重要作用。

NLR为近年来新发现的炎症反应标志物,本研究发现,上尿路结石急诊术后发生SIRS患者确诊后NLR水平明显升高,参与SIRS的发病机制。史建国等^[12]研究发现,术前NLR是经皮肾镜术后发生感染性并发症的独立危险因素。支持本研究结果。NLR是中性粒细胞与淋巴细胞的比值,NLR水平升高提示机体内中性粒细胞含量增加、淋巴细胞含量减少,其中中性粒细胞是人体免疫

系统的天然免疫细胞,在全身和局部炎症反应中起积极作用,机体发生炎症后其含量增加,可刺激黏附因子、脂类炎症介质等炎症介质分泌释放,加重炎症组织损伤,淋巴细胞是调节机体免疫及防御功能的细胞,其含量减少导致降低机体免疫应答及防御功能,引发并加重炎症反应^[13-14]。本研究还发现,发生 SIRS 患者血清 CRP 水平明显高于未发生 SIRS 患者,CRP 急性时相反应蛋白,当机体发生炎症反应时,肝细胞迅速、大量合成并释放 CRP,导致血液系统中 CRP 水平明显升高,是反映机体炎症程度的敏感性指标。此外,本研究首次发现上尿路结石急诊术后发生 SIRS 患者的血清 KIM-1 水平明显升高,推测 KIM-1 可能也参与 SIRS 的发病机制。KIM-1 是评估肾损伤的常用标志物,存在于肾脏近曲小管上皮细胞内,其在正常的机体内不表达,当肾小管上皮发生损伤时,KIM-1 水平快速升高^[15]。笔者认为,SIRS 发生后,机体内炎症细胞、炎症因子水平明显升高,在炎症细胞因子的刺激下,肾小管上皮细胞发生损伤,导致 KIM-1 被大量释放,并进入血液系统,从而引起血清 KIM-1 水平升高。

本研究发现确诊后 NLR、CRP、KIM-1 与 SIRS 评分存在正相关关系,且将手术时间、糖尿病等因素控制后,各指标仍与 SIRS 评分显著相关,进一步证实 NLR、CRP、KIM-1 与 SIRS 的发生发展有关,可能应用于 SIRS 的诊断。基于上述结果,本研究尝试采用 ROC 曲线分析 NLR、CRP、KIM-1 诊断 SIRS 的价值,结果发现各指标诊断的 AUC 均在 0.7 以上,均具有一定诊断价值,但单独诊断的效能仍不尽理想,而各指标联合诊断的 AUC 高达 0.963,高于各指标单独诊断,且联合诊断的最佳敏感度、特异度分别为 87.50%、95.12%,可为临床诊断 SIRS 提供更准确数据参考。此外,上尿路结石急诊术后发生 SIRS 患者手术时间长于未发生 SIRS 患者,糖尿病患者占比明显高于未发生 SIRS 患者,提示合并糖尿病、手术时间较长均可能增加术后 SIRS 发生率,因此术前应采取有效措施控制血糖,术中应尽量缩短手术时间,以降低 SIRS 发生风险。

综上所述,上尿路结石急诊术后发生 SIRS 患者 NLR、CRP、KIM-1 水平明显升高,术后检测各指标水平可辅助临床诊断 SIRS,具有较高临床应用价值。但本研究存在样本量较少的不足,后续工作中仍需纳入更多样本量进一步验证。

参考文献

- [1] Margraf A, Ludwig N, Zarbock A, et al. Systemic Inflammatory Response Syndrome After Surgery: Mechanisms and Protection[J]. *Anesth Analg*, 2020, 131(6):1693-1707.
- [2] Serafim R, Gomes JA, Salluh J, et al. A Comparison of the Quick-SOFA and Systemic Inflammatory Response Syndrome Criteria for the Diagnosis of Sepsis and Prediction of Mortality: A Systematic Review and Meta-Analysis[J]. *Chest*, 2018, 153(3):646-655.
- [3] 王羿翔,李明山,刘屹立,等.两种淋巴细胞比预测经皮肾镜碎石取石术后全身炎症反应的作用[J]. *微创泌尿外科杂志*, 2019, 8(5):340-344.
- [4] 陶珍,崔连奇,赵磊,等. NLR、血清 CHE、Ang-1 与 ACI 患者病情变化的关系[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2020, 12(5):575-578, 586.
- [5] 张永寿,王雁,何丽萍,等.联合检测 WBC、SAA、PCT、CRP 在婴幼儿感染性疾病中的诊断价值[J]. *热带医学杂志*, 2020, 20(2):229-232+280.
- [6] Kushlinskii NE, Gershtein ES, Naberezhnov DS, et al. Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1) in Blood Plasma of Patients with Clear-Cell Carcinoma[J]. *Bull Exp Biol Med*, 2019, 167(3):388-392.
- [7] 刘瑞清,孟志云,褚洪光,等.脓毒症患者血清 NGAL、KIM-1、Cys-C 对急性肾损伤的诊断能效[J]. *中国医药导报*, 2019, 16(29):128-131.
- [8] Hagen M, Sembill JA, Sprügel MI, et al. Systemic inflammatory response syndrome and long-term outcome after intracerebral hemorrhage [J]. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*, 2019, 6(5):e588.
- [9] 张华东,潘楚云,江意春,等. qSOFA 联合 SIRS 评分对急诊脓毒症的早期诊断效能的 Meta 分析[J]. *医学理论与实践*, 2020, 33(9):1448-1450.
- [10] 何士尧,丁克文,吕建裕.鞘外持续引流对输尿管软镜术后全身炎症反应综合征的预防作用[J]. *国际泌尿系统杂志*, 2020, 40(2):193-196.
- [11] Zhang W, Zheng Y, Feng X, et al. Systemic inflammatory response syndrome in Sepsis - 3: a retrospective study [J]. *BMC Infect Dis*, 2019, 19(1):139.
- [12] 史建国,王卫宁,王领军,等.中性粒细胞/淋巴细胞比值——预测上尿路结石经皮肾镜术后全身炎症反应综合征的新指标[J]. *河北医科大学学报*, 2018, 39(12):1398-1402.
- [13] 刘志远,洪梅,肖韡,等.中性粒细胞与淋巴细胞比值对非小细胞肺癌发生放射性肺炎的预测价值[J]. *中华生物医学工程杂志*, 2020, 26(2):137-143.
- [14] 徐玉秀,张岩,高贤.血常规检测对慢性阻塞性肺疾病患者预后预测作用[J]. *华南预防医学*, 2020, 46(1):69-71, 75.
- [15] 张盈莹,卓永,欧佩,等.尿 NGAL 及 KIM-1 水平对藏区糖尿病肾脏病的临床诊断价值研究[J]. *国际内分泌代谢杂志*, 2020, 40(5):294-299.

klotho、MHR、Lp-PLA2 诊断无症状脑梗死价值及临床意义

杨芳* 张佳星 端木勤浩

[摘要] **目的** 探讨单向跨膜蛋白(klotho)、单核细胞与高密度脂蛋白胆固醇比值(MHR)、脂蛋白相关磷脂酶 A2(Lp-PLA2)诊断无症状脑梗死(SBI)价值及临床意义。**方法** 选取本院收治的 104 例 SBI 患者(SBI 组)及 45 例健康体检者(对照组)。比较两组一般资料、klotho、MHR、Lp-PLA2 水平,采用 Pearson 分析与 IMT 相关性,Logistic 回归方程分析 SBI 的相关影响因素,受试者工作特征曲线(ROC)分析诊断价值。**结果** 以 SBI 组各指标均值为分界,klotho、MHR、Lp-PLA2 高水平与低水平患者无斑块、稳定斑块、易损斑块分布情况比较,差异有统计学意义($P<0.05$);klotho 与 IMT 呈负相关,MHR、Lp-PLA2 与 IMT 呈正相关($P<0.05$);Logistic 回归分析显示,klotho、MHR、Lp-PLA2 仍与 SBI 发生相关($P<0.05$);klotho+MHR+Lp-PLA2 诊断 SBI 的 AUC 为 0.918,大于单一指标诊断($P<0.05$)。**结论** klotho+MHR+Lp-PLA2 可为临床完善 SBI 诊断机制提供参考,且对指导临床探明 SBI 发生发展机制具有重要意义,便于及时完善治疗方案。

[关键词] 单向跨膜蛋白;单核细胞;高密度脂蛋白胆固醇;无症状脑梗死;脂蛋白相关磷脂酶 A2

The value and clinical significance of klotho, MHR, Lp-PLA2 in the diagnosis of silent brain infarct

YANG Fang*, ZHANG Jiaying, DUAN Muqinhao

(Department of Neurology, Emergency General Hospital, Beijing, China, 100028)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the value and clinical significance of klotho, monocyte count to HDL-C ratio (MHR), lipoprotein-associated phospholipaseA2 (Lp-PLA2) in the diagnosis of silent brain infarct (SBI). **Methods** A total of 104 SBI patients (SBI group) and 45 healthy subjects (control group) in our hospital from December 2017 to December 2020 were selected. The general data, klotho, MHR, and Lp-PLA2 levels of the two groups were compared, and the carotid plaque distribution of patients with different klotho, MHR, and Lp-PLA2 levels were compared. Pearson was used to analyze the correlation with IMT, the logistic regression equation was used to analyze the relevant influencing factors of SBI. The receiver operating characteristic curve (ROC) and area under ROC (AUC) were used to analyze the diagnostic value. **Results** Based on the mean value of each indicator in the SBI group, there was a statistically significant difference in the distribution of no plaques, stable plaques, and vulnerable plaques between patients with high and low levels of klotho, MHR, and Lp-PLA2 ($P<0.05$). Klotho was negatively correlated with IMT, and MHR and Lp-PLA2 were positively correlated with IMT ($P<0.05$). Logistic regression analysis showed that klotho, MHR, and Lp-PLA2 were related to the occurrence of SBI ($P<0.05$). The AUC of klotho+MHR+Lp-PLA2 in the diagnosis of SBI was 0.918, which was greater than a single indicator diagnosis ($P<0.05$). **Conclusion** Klotho+MHR+Lp-PLA2 can provide a reference for clinical improvement of the diagnosis mechanism of SBI, and it is of great significance to guide the clinical exploration of the occurrence and development mechanism of SBI, and facilitate the timely improvement of the treatment plan.

[KEY WORDS] Klotho; Monocytes; High - density lipoprotein cholesterol; Silent brain infarct; Lipoprotein-associated phospholipaseA2

基金项目:首都卫生发展科研基金(首发 2011-6011-01)

作者单位:应急总医院神经内科,北京市 100028

*通信作者:杨芳, E-mail: yhh8282021@126.com

无症状脑梗死(Silent brain infarct, SBI)是指影像学或尸检确认存在颅内梗死灶,但患者无明显脑梗死发作史,其不良预后主要是发生症状性脑梗死及认知功能障碍。临床已证实,SBI是老年群体常见、多发疾病,患病率可达28%,且高血压、动脉硬化是其主要危险因素,而近年受高血压、糖尿病发病率升高影响,SBI发病率亦呈显著升高趋势^[1-2]。因此,如何加强SBI筛查以积极指导制定治疗方案是当前急需解决问题之一。脂蛋白相关磷脂酶A2(Lipoprotein-associated phospholipase A2, Lp-PLA2)是炎性细胞生成的一种能加快氧化磷脂水解的酶,有研究指出,其水平变化与动脉硬化形成有关,是预测脑缺血缺氧的重要指标^[3];单向跨膜蛋白(klotho)是近年新发现参与血管内皮活性物质生成及分泌调节过程的蛋白,能促进血管舒张及新生血管形成,有抗动脉硬化作用^[4];单核细胞与高密度脂蛋白胆固醇比值(Monocyte count to HDL-C ratio, MHR)是新发现炎性指标,其水平变化亦与动脉硬化进程有关^[5]。基于上述研究,本研究首次探讨klotho、MHR、Lp-PLA2在SBI诊断中的价值及临床意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2017年12月至2020年12月本院收治的104例SBI患者(SBI组)及45例健康体检者(对照组)。SBI组男59例,女45例,年龄平均(63.58±6.44)岁,饮酒史98例,吸烟史52例。对照组男20例,女25例,年龄平均(60.97±7.03)岁,饮酒史45例,吸烟史18例。

纳入标准:经影像学+病史及排除性诊断确诊^[6];头颅CT或(和)MRI检查见直径≥3 mm梗死灶,CT示低密度影,MRI示T₁低信号,T₂及液体衰减反转恢复高信号;无脑梗死相关症状,且入组前无相关治疗史;患者、家属知情理解签署同意书。排除标准:入院前1周内感染史;明确有脑卒中、脑损伤、短暂性脑缺血发作史;伴严重肝肾心功能缺陷者;有心房颤动或心脏瓣膜病;存在其他非血管性疾病所致软化灶。本研究经本院医学伦理委员会审批通过。

1.2 方法

①生化指标:入院时采用非抗凝真空管采集肘静脉血2 mL,离心(半径10 cm,转速3 500 r/

min,时间10 min),采集上层血清,采用上海心语生物科技有限公司双抗体夹心ELISA法试剂盒测Lp-PLA2水平;采用上海执诚生物科技有限公司酶联免疫试剂盒测klotho水平;罗氏全自动免疫生化仪(cobas 8000型)测高密度脂蛋白胆固醇;另取抗凝血2 mL,采用Sysmex-XN9000全自动血球仪测单核细胞计数,计算MHR。②颈动脉粥样硬化检查:日本日立公司Hi vision preirus彩色超声诊断仪检查颈总动脉及分支血管内膜,结合《中国脑卒中血管超声检查指导规范(概要)》^[6]分内膜中层厚度(Intima-media thickness, IMT)≥1.5 mm,若内膜厚度增加>周边IMT 1/2即为斑块,否则为无斑块,其中扁平斑块、硬斑块为稳定斑块;混合斑块、软斑块、溃疡型斑块为易损斑块。

1.3 统计学处理

采用统计学软件SPSS 23.0处理数据,计数资料以n(%)描述,采用 χ^2 检验,计量资料以($\bar{x} \pm s$)描述,两组间比较采用独立样本t检验;Pearson、Logistic回归方程分析变量关系;受试者工作特征曲线(ROC)分析诊断价值。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般资料、klotho、MHR、Lp-PLA2比较

两组年龄、性别、体质量指数、饮酒史、吸烟史、低密度脂蛋白、总胆固醇、糖尿病、冠心病、高血压分布比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);SBI组高密度脂蛋白、klotho低于对照组,甘油三酯、IMT、颈动脉斑块占比、MHR、Lp-PLA2高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表1。

2.2 不同klotho、MHR、Lp-PLA2水平者颈动脉斑块分布情况比较

以SBI组各指标均值(klotho为604.87 pg/mL、MHR为12.59、Lp-PLA2为109.75 $\mu\text{g/L}$)为分界,将SBI组患者分为klotho、MHR、Lp-PLA2高水平与低水平患者。klotho、MHR、Lp-PLA2高水平与低水平患者无斑块、稳定斑块、易损斑块分布情况比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表2。

2.3 klotho、MHR、Lp-PLA2与IMT关系

采用Pearson进行相关性分析,结果显示,klotho($r = -0.809, P < 0.001$)与IMT呈负相关,MHR($r = 0.666, P < 0.001$)、Lp-PLA2($r = 0.810, P < 0.001$)与IMT呈正相关。

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

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

资料	SBI组 (n=104)	对照组 (n=45)	t/ χ^2 值	P值
年龄(岁)	63.58±6.44	60.97±7.03	2.209	0.029
性别(男/女)	59/45	20/25	1.904	0.168
体质指数(kg/m ²)				
偏瘦	10(9.62)	8(17.78)	1.684	0.092
正常	39(37.50)	20(44.44)		
超重	36(34.62)	11(24.44)		
肥胖	19(18.27)	6(13.33)		
饮酒史	98(94.23)	45(100.00)	1.418	0.234
吸烟史	52(50.00)	18(40.00)	1.261	0.262
低密度脂蛋白(mmol/L)	2.81±0.79	2.59±0.65	1.642	0.103
高密度脂蛋白(mmol/L)	1.04±0.25	1.30±0.28	5.619	<0.001
总胆固醇(mmol/L)	4.39±0.61	4.25±0.65	1.261	0.209
甘油三酯(mmol/L)	2.01±0.69	1.59±0.44	3.762	<0.001
IMT(mm)	1.89±0.30	0.54±0.17	28.253	<0.001
颈动脉斑块	91(87.50)	7(15.56)	72.216	<0.001
既往史				
糖尿病	28(26.92)	6(13.33)	3.294	0.070
冠心病	5(4.81)	4(8.89)	0.343	0.558
高血压	19(18.27)	5(11.11)	1.191	0.275
klotho(pg/mL)	604.87±196.56	880.94±281.44	6.866	<0.001
MHR	12.59±4.06	8.22±2.65	6.629	<0.001
Lp-PLA2(μ g/L)	109.75±34.29	76.68±23.52	5.892	<0.001

表2 不同klotho、MHR、Lp-PLA2水平者颈动脉斑块分布情况比较 $[n(\%)]$

Table 2 Comparison of carotid plaque distribution in patients with different levels of klotho, MHR, and Lp-PLA2 $[n(\%)]$

指标	组别	例数	无斑块	稳定斑块	易损斑块
klotho	低水平	49	2(4.08)	19(38.78)	28(57.14)
	高水平	55	11(20.00)	34(61.82)	10(18.18)
	χ^2 值		6.004	5.506	16.964
	P值		0.014	0.019	<0.001
MHR	低水平	56	11(19.64)	34(60.71)	11(19.64)
	高水平	48	2(4.17)	19(39.58)	27(56.25)
	χ^2 值		5.660	4.618	14.937
	P值		0.017	0.032	<0.001
Lp-PLA2	低水平	49	12(24.49)	30(61.22)	7(14.29)
	高水平	55	1(1.82)	23(41.82)	31(56.36)
	χ^2 值		12.178	3.905	19.787
	P值		0.001	0.048	<0.001

2.4 SBI影响因素的Logistic回归方程分析

以是否有SBI为因变量(无为0,有为1),纳入klotho、MHR、Lp-PLA2作为自变量(为便于数据统计分析,低于均值赋值为1,高于均值赋值为2),结果显示,调整了高密度脂蛋白、甘油三酯、IMT、颈动脉斑块后,klotho、MHR、Lp-PLA2仍与SBI发生相关($P<0.05$)。见表3。

表3 SBI影响因素的Logistic回归方程分析

Table 3 Logistic regression equation analysis of SBI influencing factors

影响因素	β 值	SE值	Wald χ^2	OR值	95%CI	P值
klotho	-0.833	0.237	12.360	0.435	0.364~0.519	<0.001
MHR	0.240	0.074	10.479	1.271	1.056~1.529	<0.001
Lp-PLA2	1.160	0.341	11.575	3.190	2.182~4.665	<0.001

注:两组klotho、MHR、Lp-PLA2均值依次为688.25 pg/ml、22.27、99.76 μ g/L。

2.5 klotho、MHR、Lp-PLA2诊断价值

klotho、MHR、Lp-PLA2联合诊断SBI的AUC 0.918,大于单一指标诊断($P<0.05$)。见表4、图1。

表4 ROC分析结果

Table 4 ROC analysis results

指标	AUC	95%CI	cut-off值	敏感度(%)	特异度(%)	P值
klotho	0.768	0.691~0.833	≤ 778.55 pg/mL	82.69	66.67	<0.001
MHR	0.839	0.770~0.894	> 10.09	80.77	77.78	<0.001
Lp-PLA2	0.765	0.689~0.830	> 90.35 μ g/L	72.12	75.56	<0.001
联合	0.918	0.861~0.956		88.46	80.00	<0.001

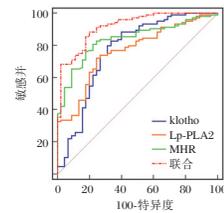


图1 klotho、MHR、Lp-PLA2诊断价值

Figure 1 Diagnostic value of klotho, MHR, Lp-PLA2

3 讨论

近年受饮食、生活方式变化等多种因素影响,脑梗死已逐渐发展成严重危害公众健康的公共卫生问题之一。调查数据显示,SBI群体每年首次出现症状性脑梗死的发生率达10%,是无SBI群体的5倍^[7]。

当前有效预测SBI发生风险的机制尚有局限性,高清晰度超声及改良辅助计算法通过筛查颈动脉斑块形成情况可有效预测颈动脉斑块所致脑梗死风险事件,但敏感度尚不足80%,且对技术要求高^[8]。基于高血压、动脉硬化是SBI发生的主要因素,而高血压、动脉硬化二者又互为危险因素,可互相、共同作用加剧SBI的发生、发展,MHR作为与动脉硬化进程关系密切的生化指标,其值异常可能与SBI发生有关^[9]。本研究发现,SBI组MHR高于对照组,此结论与上述研究相符。机制可能是:单核细胞迁入粥样斑块,造成局部炎症反

应活跃更易促进易损斑块形成;高密度脂蛋白水平降低则不利于机体发挥抗炎、抗氧化、抗血栓形成等功能,造成抗动脉硬化的作用减弱。Logistic 回归分析 MHR 升高是 SBI 发生的危险因素。

Lp-PLA2 是预测脑梗死及心血管事件的独立预测因子,其显著升高对预测颈动脉斑块形成的敏感度及特异度分别为 70.8%、67.1%,具有良好预测能力,但目前 Lp-PLA2 在国内尚未推广^[10]。本研究发现,在 SBI 中 Lp-PLA2 水平变化趋势与 MHR 一致,随斑块形成及稳定性降低,Lp-PLA2 水平呈升高趋势,分析主要是因 Lp-PLA2 可影响体内脂质代谢过程,在促颈动脉斑块形成、破裂过程中发挥重要作用,其主要由动脉斑块内淋巴细胞、巨噬细胞、泡沫细胞生成,并与脂蛋白结合成复合物进入血管内膜后生成溶血磷脂酰胆碱及氧化脂肪酸等促炎介质,参与炎症因子的级联放大效应^[11]。既往研究显示,Lp-PLA2 所释放溶血磷脂酰胆碱、氧化脂肪酸表现广泛性促炎及促凋亡活性,且易损斑块患者外周血 Lp-PLA2 水平显著升高^[12]。经 Pearson 分析,Lp-PLA2 与 IMT 呈正相关,证实 Lp-PLA2 水平与斑块形成有关。此结论支持 Lp-PLA2 是动脉硬化炎性介质的假说^[13],因此,其或可从介导颈动脉内膜炎症反应及产生斑块层面为临床诊断 SBI 提供参考。

klotho 是机体 klotho 基因所编码蛋白质,有研究显示,其在抗动脉硬化、舒张血管等生物学过程中发挥重要作用,可保护血管内皮^[14]。本研究发现,SBI 发病及易损斑块形成过程与体内 klotho 表达有关,提示 klotho 可应用于对 SBI 发生风险的评价。但近年研究已证实,SBI 发生与多因素、多过程有关,如:高密度脂蛋白、甘油三酯、IMT、颈动脉斑块等^[15]。本研究采用 Logistic 回归方程调整了高密度脂蛋白、甘油三酯、IMT、颈动脉斑块后,klotho、MHR、Lp-PLA2 仍与 SBI 发生相关,klotho+MHR+Lp-PLA2 诊断 SBI 的 AUC 大于单一指标诊断,客观说明 klotho、MHR、Lp-PLA2 与 SBI 发生呈独立显著相关,可作为临床诊断 SBI 的有效补充。

综上所述,klotho+MHR+Lp-PLA2 可为临床完善 SBI 诊断机制提供参考,且对指导临床探明 SBI 发生发展机制具有重要意义,便于及时完善治疗方案。

参考文献

- [1] 中华医学会神经病学分会,中华医学会神经病学分会脑血管病学组.中国无症状脑梗死诊治共识[J].中华神经科杂志,2018,51(9):692-698.
- [2] 苏承,宋菲,王志达,等.2型糖尿病患者中陈旧性脑梗死的流行状况和相关因素分析[J].中国慢性病预防与控制,2020,28(1):38-41.
- [3] 孙锴,王焱,王大同,等.Lp-PLA2、Hcy 表达水平与动脉瘤性蛛网膜下腔出血预后的关系[J].热带医学杂志,2019,19(12):1519-1523.
- [4] 杨慧敏,王芳洁,姚晓利.微RNA-34a-5p 通过靶向调控 KLOTHO 对病毒性心肌炎心肌细胞损伤的影响及机制研究[J].中华生物医学工程杂志,2019,25(5):571-577.
- [5] 郎勇,冉迅,屈模英.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[J].分子诊断与治疗杂志,2020,12(9):1184-1186,1191.
- [6] 国家卫生计生委脑卒中防治工程委员会.中国脑卒中血管超声检查指导规范(概要)[C].2015年湖北省神经康复学术会议论文集,2015:223-226.
- [7] 梁明月,赵会民.单核细胞/高密度脂蛋白胆固醇比值诊断高血压并发无症状脑梗死的价值[J].实用医学杂志,2019,35(16):2645-2648.
- [8] 张涛,罗杰,杨晓文,等.颈动脉斑块内新生血管显影程度对脑梗死的诊断价值[J].中西医结合心脑血管病杂志,2019,17(22):3610-3613.
- [9] 王兴萍,岳学静,程度,等.单核细胞/高密度脂蛋白胆固醇比值评估高血压患者并发急性脑梗死预后价值[J].华南预防医学,2020,46(1):66-68.
- [10] Yang Y, Xue T, Zhu J, et al. Serum lipoprotein-associated phospholipase A2 predicts the formation of carotid artery plaque and its vulnerability in anterior circulation cerebral infarction[J]. Clin Neurol Neurosurg, 2017, 160(1):40-45.
- [11] 刘希奇,李孝庆,姚彦,等.急性脑梗死患者血清 CXCL16 GDF15 Lp-PLA2 水平变化及临床意义[J].河北医学,2019,25(3):580-584.
- [12] 岑锦明,杨希立,许兆延,等.iMapTM 血管内超声检测冠状动脉粥样斑块坏死核心与心血管疾病危险因素、Lp-PLA2 相关性[J].介入放射学杂志,2018,27(12):1134-1139.
- [13] Wang C, Fang X, Hua Y, et al. Lipoprotein-Associated Phospholipase A2 and Risk of Carotid Atherosclerosis and Cardiovascular Events in Community-Based Older Adults in China[J]. Angiology, 2018, 69(1):49-58.
- [14] 毛琦,项朝君,童武阳,等.冠状动脉粥样硬化患者血清 Klotho 与糖脂代谢紊乱的相关性研究[J].临床心血管病杂志,2020,36(3):238-243.
- [15] 于海荣,滕继军,谢安木,等.无症状脑梗死患者新发脑梗死的临床特点及病情严重程度相关因素分析[J].西部医学,2020,32(3):422-425.

卵巢上皮性癌中 VEGF、CD4⁺、CD8⁺及 COX-2 表达与 TIDC 相关性

吴明燕 康雪芳 林月丽 林也容 张兰 黄丽玲 陈慧*

【摘要】目的 分析卵巢上皮性癌中血管内皮生长因子(VEGF)、CD4⁺、CD8⁺及环氧合酶-2(COX-2)的表达与肿瘤浸润性树突状细胞(TIDC)的相关性。**方法** 选取本院2016年12月至2020年1月收治的110例卵巢上皮性癌患者作为研究组,另选取同期进行体检的70例健康女性作为对照组。比较两组S-100及VEGF、COX-2、CD4⁺、CD8⁺表达情况。分析上述因子与卵巢上皮性癌病理特征及TIDC的相关性。**结果** 研究组S-100、VEGF及COX-2阳性表达率和CD4⁺、CD8⁺水平均显著高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。TIDC数密度与患者临床分期、腹水呈显著相关性($P<0.05$)。VEGF、COX-2阳性表达率与患者临床分期及病理分级呈显著相关性($P<0.05$)。浆液性癌患者CD4⁺水平显著高于黏液性癌患者,差异有统计学意义($P<0.05$)。CD8⁺水平与患者临床分期、腹水及病理分级均呈显著相关性($P<0.05$)。相关性分析结果显示,VEGF、COX-2、CD8⁺与TIDC均呈负相关关系($P<0.05$),CD4⁺与TIDC无显著相关性($P>0.05$)。**结论** 卵巢上皮性癌组织中VEGF、COX-2、CD8⁺、CD4⁺均存在异常表达,且VEGF、COX-2、CD8⁺水平可影响卵巢上皮性癌中TIDC的密度,可能影响宿主的抗肿瘤免疫能力与肿瘤的浸润转移。

【关键词】 卵巢上皮性癌;肿瘤浸润性树突状细胞;环氧合酶-2;血管内皮生长因子;淋巴细胞

Correlation between the expression of VEGF, CD4⁺, CD8⁺ and COX-2 in epithelial ovarian cancer and tumor infiltrating dendritic cells

WU Mingyan, KANG Xuefang, LIN Yueli, LIN Yerong, ZHANG Lan, HUANG Liling, CHEN Hui*

(Department of Obstetrics and Gynecology, No.909 Hospital of PLA Joint Logistics Support Force, Zhangzhou, Fujian, China, 363000)

【ABSTRACT】 Objective To analyze the correlation between the expression of Vascular endothelial growth factor (VEGF), CD4, CD8 and Cyclooxygenase - 2 (COX - 2) in patients with ovarian epithelial carcinoma and tumor infiltrating dendritic cells (TIDC). **Methods** 110 patients with epithelial ovarian cancer admitted to this hospital from December 2016 to January 2020 were selected as the study group. 70 healthy women who had physical examination during the same period were selected as the control group. The expressions of S - 100 and VEGF, COX - 2, CD4⁺ and CD8⁺ were compared between the two groups. The correlations between the above factors, the pathological characteristics of epithelial ovarian cancer and TIDC were analyzed. **Results** The positive expression rates of S-100, VEGF and COX-2, and the levels of CD4⁺ and CD8⁺ in the study group were significantly higher than those in the control group, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). TIDC number density was significantly correlated with the clinical stage and ascites of patients ($P<0.05$). The positive expression rates of VEGF and COX-2 were significantly correlated with the clinical stage and pathological grade of patients ($P<0.05$). The CD4⁺ level of patients with serous cancer was significantly higher than that of patients with mucinous cancer, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). The CD8⁺ level was significantly correlated with the clinical stage, ascites, and pathological grade of the patients ($P<0.05$). The correlation analysis showed that VEGF, COX-2, and CD8⁺ were all negatively correlated with TIDC ($P<0.05$), and CD4⁺ had no significant correlation with TIDC ($P<$

基金项目:福建省科技厅计划项目(2016Y3125)

作者单位:中国人民解放军联勤保障部队第九〇九医院妇产科,福建,漳州 363000

*通信作者:陈慧, E-mail:chenhui175@163.com

0.05)。Conclusion There are abnormal expressions of VEGF, COX-2, CD8⁺, and CD4⁺ in ovarian epithelial cancer tissues, and the levels of VEGF, COX-2 and CD8⁺ can affect the density of TIDC in patients with epithelial ovarian cancer, which may affect the host's anti-tumor immunity and invasive metastasis of tumor.

[KEY WORDS] Epithelial ovarian cancer; Tumor-infiltrating dendritic cells; Cyclooxygenase-2; Vascular endothelial growth factor; Lymphocytes

卵巢上皮性癌约占女性恶性肿瘤的3%~4%,具有高死亡率、高发病率的特点^[1]。肿瘤细胞的快速生长与转移是导致患者预后不良的主要危险因素,目前已有研究证实,肿瘤快速生长与转移及免疫抑制有关^[2]。T淋巴细胞介导的细胞免疫在机体排斥肿瘤细胞时起主要作用,但肿瘤抗原只有经抗原递呈细胞的抗原递呈后才能被T淋巴细胞识别。当今免疫学研究认为,机体处于免疫激活或免疫抑制依赖于抗原呈递细胞(Antigen presenting cell, APC)的抗原递呈功能^[3]。人体内功能最强的专职APC为树突状细胞(Dendritic cell, DC)。肿瘤组织局部浸润的DC称为肿瘤浸润性DC(Tumor invasive DC, TIDC),其能真实反映组织局部的免疫状态^[4]。组织中环氧合酶-2(Cyclooxygenase-2, COX-2)、血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)等因子均与TIDC的分化、成熟有关^[5]。本研究将通过分析卵巢上皮性癌中VEGF、CD4⁺、CD8⁺及COX-2表达与TIDC的关系,探讨卵巢上皮性癌局部免疫功能抑制的可能机制。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取本院2016年12月至2020年1月收治的110例卵巢上皮性癌患者作为研究组。纳入指标:①均符合卵巢上皮性癌的诊断标准^[6];②自愿参与本次研究,且签署知情同意书者;③临床资料无缺失或丢失;④未进行化疗、放疗等治疗者。排除标准:①心脏、肝肾功能不全;②神经功能障碍者;③合并其他恶性疾病;④哺乳期妇女或妊娠期孕妇。平均年龄为(51.98±10.74)岁;临床分期:I期30例,II期33例,III期30例,IV期17例;病理类型:浆液性癌81例,黏液性癌29例;伴有腹水者41例;病理分级G₁39例,G₂37例,G₃34例。另同期选取进行健康体检的70例女性体检者作为对照组,平均年龄为(50.87±9.36)岁。两组一般资料比较差异无统计学意义($P>0.05$)。本研究经医院医学伦理委员会批准通过。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂

一抗均为浓缩型,鼠抗人S-100单克隆抗体,购自美国Neomarkers公司。鼠抗人VEGF、COX-2单克隆抗体,购自美国Santa Cruz公司。链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连接(SP)免疫组化超敏试剂盒、胰蛋白酶及二氨基联苯氨酶底物显色试剂盒,购自福州迈新生物技术开发有限公司。

1.2.2 检测方法

首先进行标本准备:组织切片后脱蜡、水化。然后根据S-P免疫组化染色法对S-100、VEGF及COX-2进行检测,检测过程严格按照说明进行。一抗阴性对照使用PBS(磷酸盐缓冲液)进行代替。

1.2.3 结果判断^[7]

根据S-100、VEGF及COX-2阳性细胞百分比、染色强度判定。分为:0分、1分、2分、3分、4分。染色强度判定:0分:无色,1分:淡黄色,2分:棕黄色,3分:棕褐色。总积分:上述2项评分的乘积。阳性:总积分>4分。

1.2.4 T淋巴细胞检测

空腹抽取所有受检者3 mL静脉血,3 500 r/min离心15 min,分离血清,取上清液,置于-80℃低温保存待检。采用贝克曼流式细胞仪检测患者外周血T淋巴细胞亚群(CD4⁺、CD8⁺)。

1.2.5 TIDC确认标准^[8]

TIDC确认标准:细胞形态完整,细胞核与细胞形态不规则,细胞质可见明显凸起;S-100蛋白染色阳性。TIDC计数:由两名或以上病理科医师进行阅片。低倍镜下任选染色背景清晰处,然后在高倍镜下任选5个视野计数TIDC总数,并计算其平均值,为TIDC数密度。

1.3 观察指标

①比较两组S-100 TIDC及VEGF、COX-2、CD4⁺、CD8⁺表达情况。②分析卵巢上皮性癌病理特征与TIDC数密度及VEGF、COX-2、CD4⁺、CD8⁺的关系。③分析VEGF、COX-2、CD4⁺、CD8⁺与TIDC的相关性。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析, 计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 采用 *t* 检验; 计数资料以 *n*(%) 表示, 采用 χ^2 检验; 采用 Pearson 法对各参数进行相关性分析; 以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组 S-100 及 VEGF、COX-2、CD4⁺、CD8⁺ 表达情况比较

研究组 S-100 及 VEGF、COX-2 阳性表达率和 CD4⁺、CD8⁺ 水平均显著高于对照组, 差异均有统计学意义 (*P*<0.05)。见表 1、图 1。

2.2 卵巢上皮性癌病理特征与 TIDC 数密度及 VEGF、COX-2、CD4⁺、CD8⁺ 的关系

临床分期 III~IV 期、有腹水者 TIDC 数密度明显高于 I~II 期、无腹水者, 差异有统计学意义 (*P*<0.05)。临床分期 III~IV 期、病理分级 G₃ 者 VEGF、COX-2 阳性表达率与 I~II 期、G₁-G₂ 级者, 差异有统计学意义 (*P*<0.05)。浆液性癌患者 CD4⁺ 水平显著高于黏液性癌患者, 差异有统计学意义 (*P*<0.05)。临床分期 III~IV 期、有腹水及病理分级 G₃ 者 CD8⁺ 水平明显高于 I~II 期、无腹水及病理分级 G₁-G₂ 级者, 差异有统计学意义 (*P*<0.05)。见表 2。

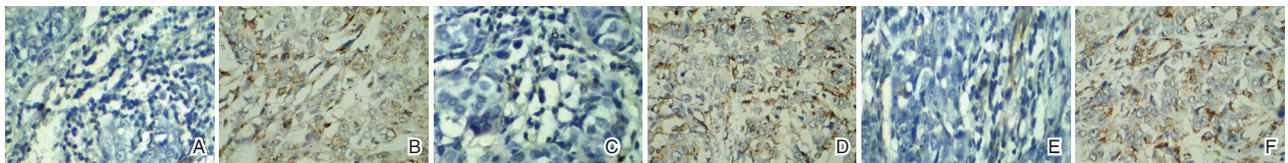
2.3 VEGF、COX-2、CD4⁺、CD8⁺ 与 TIDC 的相关性分析

VEGF、COX-2、CD8⁺ 与 TIDC 均呈负相关关系 ($r_1=-0.654, r_2=-0.584, r_3=-0.524, P<0.05$), CD4⁺ 与 TIDC 无显著相关性 ($r=-0.112, P>0.05$)。

表 1 两组 S-100 及 VEGF、COX-2、CD4⁺、CD8⁺ 表达情况 [*n*(%), $(\bar{x} \pm s)$]

Table 1 Expression of S-100 and VEGF, COX-2, CD4⁺, CD8⁺ in two groups [*n*(%), $(\bar{x} \pm s)$]

组别	<i>n</i>	S-100		VEGF		COX-2		CD4 ⁺	CD8 ⁺
		阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性		
对照组	70	44(62.86)	26(37.14)	3(4.29)	67(95.71)	4(5.71)	66(94.29)	10.71±6.02	10.94±6.28
研究组	110	91(82.73)	19(17.27)	78(70.81)	32(29.09)	83(75.45)	27(24.55)	18.77±9.56	38.95±15.75
<i>t</i> / χ^2 值		9.008		76.718		83.316		6.300	14.168
<i>P</i> 值		0.003		<0.001		<0.001		<0.001	<0.001



注: A、C、E 为 S-100、VEGF、COX-2 在正常组织中表达; B、D、F 为 COX-2、VEGF、COX-2 在卵巢上皮性癌中表达。

图 1 免疫组化染色图 (SP, × 400)

Figure 1 immunohistochemical staining (SP, × 400)

表 2 卵巢上皮性癌病理特征与 TIDC 数密度及 VEGF、COX-2、CD4⁺、CD8⁺ 的关系 [$(\bar{x} \pm s), n(\%)$]

Table 2 The relationship between the pathological characteristics of epithelial ovarian cancer and the number density of TIDC, VEGF, COX-2, CD4⁺, CD8⁺ [$(\bar{x} \pm s), n(\%)$]

病理特征	<i>n</i>	TIDC 数密度	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值	VEGF 阳性			COX-2 阳性			CD4 ⁺			CD8 ⁺			
					χ^2 值	<i>P</i> 值	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值	χ^2 值	<i>P</i> 值	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值	χ^2 值	<i>P</i> 值	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值	
年龄	<45 岁	65	9.17±2.07	1.287	0.201	47(72.30)	3.329	0.068	49(75.38)	0.001	0.984	14.27±9.77	0.596	0.553	27.90±9.65	0.451	0.653
	≥45 岁	45	9.71±2.28			31(68.89)			34(75.56)			15.21±4.86			28.78±10.65		
肿瘤直径	<10 cm	47	8.45±1.56	0.530	0.598	35(74.47)	0.504	0.478	37(78.72)	0.473	0.491	13.56±8.54	0.553	0.673	33.56±18.56	0.239	0.812
	≥10 cm	63	8.62±1.74			43(68.25)			46(73.02)			12.89±7.98			32.74±17.26		
组织学类型	浆液性	81	9.74±1.07	1.515	0.133	58(71.60)	0.072	0.788	60(74.07)	0.316	0.574	18.03±8.21	0.423	0.115	34.56±19.56	0.197	0.845
	黏液性	29	9.35±1.48			20(68.97)			23(79.31)			14.98±10.56			33.74±18.47		
临床分期	I~II	63	10.19±2.74	4.695	0.001	31(49.21)	33.667	0.001	38(60.32)	18.242	0.001	17.25±12.37	0.673	0.756	26.87±9.45	2.341	0.021
	III~IV	47	8.04±1.77			47(100.00)			45(95.74)			16.54±11.05			31.54±18.05		
腹水	有	41	7.56±1.26	6.572	0.001	28(68.29)	0.420	0.517	30(73.17)	0.184	0.668	15.97±9.54	1.587	0.440	33.17±20.56	3.395	0.001
	无	69	10.84±3.04			50(72.46)			53(76.81)			14.65±8.06			20.77±17.21		
病理分级	G ₁ -G ₂	76	8.15±1.47	0.317	0.752	44(57.89)	20.189	0.001	51(67.11)	9.255	0.002	17.68±12.94	0.115	0.792	26.87±15.56	2.548	0.012
	G ₃	34	8.06±1.14			34(100.00)			32(94.12)			16.99±11.87			35.56±18.55		

3 讨论

肿瘤的发生、发展与机体免疫相关,近些年肿瘤免疫学的发展为临床诊治方面提供了新方向。树突细胞在肿瘤患者中可作为一种抗原呈递细胞,刺激细胞毒性T细胞等的增殖,进而对肿瘤细胞进行杀伤^[9-10]。由于体外分离培养TIDC较困难,因而对TIDC的研究受到方法学的限制。本研究中采用S-100蛋白标记卵巢上皮性癌TIDC。大多数TIDC体积大、树突较长,分布于肿瘤细胞之间,可通过内胞饮、吞噬等方式摄取卵巢癌抗原^[11]。Camerin等^[12]研究显示,分布在肿瘤外围间质的TIDC因更靠近淋巴组织,可能处于抗原递呈阶段。本研究中,卵巢上皮性癌患者S-100阳性表达率显著高于健康女性,与Roze等^[13]研究报道相符。推测其原因可能是在卵巢上皮性癌抗原的刺激下,循环中的一部分DC趋化到肿瘤微环境中,参与机体免疫应答。

VEGF是重要的肿瘤血管生成通路,尤其是血管内皮生长因子受体2(Vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR2),在血管发生和血管生成中起重要作用。COX-2是一种诱导酶,组织损伤或者患有炎症的情况下,COX-2表达会增强。COX-2可明显促进VEGF、转化生长因子 β 1(Transferring growth factor-beta 1, TGF-1)等前血管形成因子的生成。VEGF可通过骨髓造血前体细胞上的受体血管内皮生长因子受体1(Vascular endothelial growth factor receptor 1, VEGFR1)与VEGFR2结合,抑制造血前体细胞转录因子核因子 κ B的激活,阻滞DC前体细胞向DC分化,诱导DC细胞凋亡,进而减少DC数量。Adler等^[14]研究证实,胃癌组织中VEGF表达与TIDC密度呈负相关。基于上述文献结果,本研究推测卵巢上皮性癌中VEGF、COX-2表达可能与TIDC存在相关性,结果证实,上述因子与TIDC呈负相关。推测可能是卵巢癌组织中高水平VEGF、COX-2抑制了TIDC的分化。

在控制具有免疫原性肿瘤细胞生长过程中,T细胞介导的免疫应答最为重要。T细胞亚群主要包括CD8⁺、CD4⁺,前者可直接作为效应细胞特异性杀伤癌细胞,后者则主要分泌细胞因子调节肿瘤免疫。Mrch等^[15]研究发现,卵巢上皮性癌中,CD8⁺、CD4⁺表达与正常卵巢组织比较差异具有统计学意义,且在Ⅲ~Ⅳ期、G₃中表达明显下降。本研究与上述报道一致,表明中晚期卵巢癌中T细

胞活性功能显著下降。进一步分析结果提示局部组织中CD8⁺的分布与数量可能受TIDC的调节。

综上所述,卵巢上皮性癌组织中VEGF、COX-2、CD8⁺、CD4⁺均存在异常表达,且VEGF、COX-2、CD8⁺水平可影响卵巢上皮性癌中TIDC的密度,可能影响宿主的抗肿瘤免疫能力与肿瘤的浸润转移。

参考文献

- [1] 孙娟, 信艳萍, 张国梅, 等. 慢病毒介导HMG5基因沉默对卵巢癌细胞增殖, 迁移, 侵袭的影响及其机制研究[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2019, 11(6):53-58.
- [2] Li H, Cai Q, Godwin AK, et al. Enhancer of Zeste Homolog 2 Promotes the Proliferation and Invasion of Epithelial Ovarian Cancer Cells[J]. Mol Med Rep, 2017, 16(3):3600.
- [3] 潘忠勉, 谭芳春, 陈昌贤, 等. 卵巢上皮性癌耐药相关ceRNA的生物信息学分析及临床验证[J]. 中华妇产科杂志, 2021, 56(2):121-130.
- [4] Fletcher NM, Memaj I, Morris RT, et al. Targeting myeloperoxidase enhances apoptosis in chemoresistant epithelial ovarian cancer cells by reversing s-nitrosylation of caspase-3[J]. Gynecol Oncol, 2018, 149(10):73-75.
- [5] 唐淑贞, 张日文, 梁俊文. 黄芪甲苷对人卵巢癌细胞系SKOV-3细胞增殖, 凋亡, 侵袭和迁移的影响[J]. 医学分子生物学杂志, 2019, 16(4):339-344.
- [6] Boms Yonai N, Lavie O, Segev Y, et al. OC08.06: Added value of sonography to preoperative evaluation of advanced stage epithelial ovarian cancer: selecting treatment options[J]. Ultras Obstetr Gynecol, 2018, 52(9):18-19.
- [7] 陈永香, 文芳, 吴金健, 等. CXCR4及CD44和CD133的表达与上皮性卵巢癌临床病理特征的相关性[J]. 贵阳医学院学报, 2019, 44(9):1084-1087.
- [8] Webb PM, Jordan SJ. Epidemiology of epithelial ovarian cancer[J]. Best Pract Res Clin Obstetr Gynaecol, 2017, 41(9):479-480.
- [9] Padmakumar S, Parayath NN, Nair SV, et al. Enhanced anti-tumor efficacy and safety with metronomic intraperitoneal chemotherapy for metastatic ovarian cancer using biodegradable nanotextile implants[J]. J Contr Release, 2019, 305(65):29-40.
- [10] Kuerti S, Oliveira-Ferrer L, Milde-Langosch K, et al. VEGF-C expression attributes the risk for lymphatic metastases to ovarian cancer patients[J]. Oncotarget, 2017, 8(26):995-996.
- [11] Helali AE, McCabe N, Steele C, et al. Abstract 7: Platinum resistance in epithelial ovarian cancer is dependent on a PDGFR alpha-VEGF-A signalling mechanism that activates downstream angiogenesis pathways[J]. Cancer Res, 2018, 78(13 Supplement):7-7.
- [12] Camerin GR, Brito ABC, José Vassallo, et al. VEGF gene polymorphisms and outcome of epithelial ovarian cancer patients[J]. Future Oncol, 2017, 13(5):409-414.

(下转第976页)

南京市1例暴露感染HIV病例的溯源调查

董潇潇* 许文炯 乔梦凯 毛子晴 张洪英 王燕 吴咏梅

[摘要] **目的** 明确疑似医源性感染的医务人员与暴露源 HIV 感染病例之间的传播关系。**方法** 采集疑似医源性感染者和暴露源病例的血样,提取血浆 RNA,逆转录及巢式 PCR 扩增后测序,进行基因亚型分析,计算基因距离并构建系统进化树。**结果** 疑似医源性感染的医务人员的 HIV 基因亚型为 CRF-01AE 重组亚型,暴露源病例为 CRF-07BC 重组亚型,两者 pol 区、gag 区和 env 区的基因距离分别为 0.135、0.187、0.319,均大于各自与其对应相似株的基因距离,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 认为该医务人员与其暴露源 HIV 感染病例不存在传播关系。

[关键词] 艾滋病;职业暴露;分子溯源

Traceability investigation of a case of exposure and infection with HIV in Nanjing

DONG Xiaoxiao*, XU Wenjiong, QIAO Mengkai, MAO Ziqing, ZHANG Hongying, WANG Yan, WU Yongmei

(Nanjing Municipal Center for Disease Control and Prevention, Nanjing, Jiangsu, China, 210003)

[ABSTRACT] **Objective** To clarify the transmission relationship between the medical staff suspected of iatrogenic infection and the source case of HIV infection. **Methods** Blood samples were collected from medical staff suspected of iatrogenic infection and the source patient of HIV infection. RNA was extracted from plasma, amplified by RT-PCR and nested PCR, and then sequenced for gene subtype analysis. Gene distance was calculated and phylogenetic tree was constructed. **Results** The HIV gene subtype of medical staff suspected of iatrogenic infection is CRF-01AE recombinant subtype, and the exposure source case of is CRF-07BC recombinant subtype. The genetic distances of the pol, gag and env regions were 0.135, 0.187 and 0.319, respectively, which were greater than the genetic distances between each and their corresponding similar strains, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** It is considered that there is no transmission relationship between the medical staff and the HIV infection cases from which they were exposed.

[KEY WORDS] AIDS; Occupational exposure; Molecular tracing

艾滋病(Acquired immunodeficiency syndrome, AIDS)的职业暴露是指工作人员在从事相关工作时被艾滋病病毒(human immunodeficiency virus, HIV)感染者/AIDS病人(HIV/AIDS)的血液、体液污染了皮肤、粘膜,又或被含有 HIV 的血液、体液污染的针头等利器刺破皮肤,有被 HIV 感染的风险^[1]。AIDS 职业暴露涉及到医疗卫生人员和人民警察,其中以医疗卫生人员为主^[2-3]。传统的职业暴露后感染的认定主要依赖于随访期内暴露者 HIV

抗体是否发生阳转,而在某些特殊情况下,比如暴露者在暴露前、后6个月内发生过易感染 HIV 的行为,或是在暴露时未按照职业暴露处置管理的感染的溯源认定,则需要依赖分子流行病学检测技术。本市一例医务人员曾被某 HIV 感染者气道分泌物污染了皮肤,暴露者在暴露后22天检测其 HIV 抗体为阳性,怀疑其为职业暴露后感染。本调查对其进行了分子流行病学溯源检测,现将结果报告如下。

基金项目:南京市医学科技发展一般性课题(YKK18176);南京市医学科技发展重点课题(ZKX19048)

作者单位:南京市疾病预防控制中心,江苏,南京 210003

*通信作者:董潇潇, E-mail: doreenxiao@163.com

1 资料与方法

1.1 研究对象及流行病学资料

医务人员(以下简称H),男,29岁,曾在处置急诊病人(暴露源病人,以下简称S)时被其气道分泌物喷溅至手前臂,污染部位皮肤无破损,并立即以清水冲洗污染的皮肤。当时未按照职业暴露流程处置上报,不曾留取本底血清,也不曾服用药物进行暴露后预防。随后S的入院检查结果显示HIV抗体初筛阳性。暴露发生后的第22天H体检显示HIV抗体筛查阳性,H否认其他可能感染HIV的高危行为,认为暴露后感染的可能性最大。本研究经伦理委员会批准同意。

1.2 研究方法

1.2.1 采样及血清学检测

暴露后第22天用EDTA抗凝管采集H和S全血6 mL,立即颠倒混匀,3 000 r/min离心15

min后分离血浆留存。参照《全国艾滋病检测技术规范(2020修订版)》^[4],首先进行HIV抗体筛查实验,试剂为Bio-Rad人类免疫缺陷病毒抗原抗体诊断试剂盒第四代(酶联免疫法,批号:0A0488)和Alere人类免疫缺陷病毒HIV(1+2)型抗体检测试剂盒(胶体硒法,批号:98806K100A);初筛阳性样本进行补充实验,试剂为MP人类免疫缺陷病毒(HIV1+2)型抗体检测试剂盒(免疫印迹法,批号:AE9029)。

1.2.2 核酸提取及目的片段扩增

取200 μ L血浆,提取血浆中病毒RNA,使用医脉赛全自动核酸提取仪(EmagPure-96Plus)及配套试剂,提取方法参照试剂说明书。提取的RNA通过逆转录PCR及巢式PCR的方法扩增目的片段。目的片段包括HIV-1聚合酶*pol*区、衣壳蛋白*gag*区及包膜蛋白*env*区基因片段。扩增试剂由大连宝生物工程有限公司生产,扩增引物见表1。

表1 HIV-1 PCR扩增引物

Table 1 HIV-1 PCR primers

目的基因	引物名称	序列	位置(HXB2)
<i>pol</i>	F1a	TGAARGAITGYACTGARAGRCAGGCTAAT	2057-2085
	F1b	ACTGARAGRCAGGCTAATTTTTTAG	2068-2092
	RT-R1	ATCCCTGCATAAATCTGACTTGC	3370-3348
	PRT-F2	CTTTARCTTCCCTCARATCACTCT	2243-2266
	RT-R2	CTTCTGTATGTCATTGACAGTCC'	3326-3304
	<i>gag</i>	GAG-L	TCGACGCAGGACTCGGCTTGC
GAG-E2		TCCAACAGCCCTTTTTCTAGG	2032-2011
GUX		AGGAGAGAGATGGGTGCGAGAGCGTC	781-806
GDX		GGCTAGTTCCTCCTACTCCCTGACAT	1861-1836
<i>env</i>	ED5	ATGGGATCAAAGCCTAAAGCCATGTG	6557-6582
	ED12	AGTGCTTCTGCTGCTCCCA	7792-7811
	Env7	CTGTAAATGGCAGTCTAGC	7002-7021
	Env8	CACTTCTCAATTGTCCCTCA	7668-7648

1.3 测序及序列分析

目的产物经电泳鉴定无误后,扩增成功的HIV-1 *pol*区、*gag*区和*env*区产物送至上海生工生物工程股份有限公司纯化并测序。反馈的基因序列使用Contig Express校正和拼接,在美国洛斯阿拉莫斯国家实验室HIV核酸序列数据库(<http://www.hiv.lanl.gov>)中比对,判断基因亚型。利用Mega软件的Neighbor Joining法针对不同目的基因将待溯源样本及其相似序列同各自参考序列分别构建系统进化树,同时计算基因距离,其中*pol*区加入5个已知亚型的南京本土HIV感染病例的序列作为对照。

1.4 统计学方法

将基因距离录入Excel表,使用SPSS 20.0软件进行数据分析;进行成对样本*t*检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血清学检测结果

H和S血清学结果均为HIV抗体阳性;两者补充实验条带基本一致,S比H多一条p39条带。见表2。

2.2 基因亚型及距离

H和S两份样本均成功扩增了HIV-1 *pol*区、*gag*区和*env*区三个目的片段;三个区的基因亚型

表2 血清学检测结果
Table 2 Serological test results

标本	HIV-1 抗体检测		
	筛查	补充实验	结果判定
H	有反应	gp160、gp120、p66、p51、gp41、p31、p24、p17	HIV 抗体阳性
S	有反应	gp160、gp120、p66、p51、gp41、p39、p31、p24、p17	HIV 抗体阳性

表3 基因亚型及基因距离

Table 3 Gene subtype and gene distance

样本	目的基因	基因亚型	相似株	基因距离		t 值	P 值
				与相似株	H 与 S		
H	Pol	CRF01-AE	GZ11038、2011M152	0.025	0.135(pol)	4.621	0.044
	Gag	CRF01-AE	7030、Harbin57	0.041			
	Env	CRF01-AE	20170826-243、BJOXO23000.e18	0.091			
S	Pol	CRF07-BC	MK543583、LS1074	0.012	0.319(env)	4.661	0.043
	Gag	CRF07-BC	2020、hivgag76	0.023			
	Env	CRF07-BC	1114、33.20-19	0.065			

本H与CRF01-AE参考亚型聚为一簇,判断H为CRF01-AE亚型,而S判为CRF-07BC群。HIV-1 gag区序列系统进化树见图2,H与CRF01AE亚型参考序列聚在一起,而S与CRF07BC亚型参考序列聚成一簇。HIV-1 env区系统进化树如图3,H判定为CRF01AE亚型,而S与CRF07-BC、CRF08-BC两种亚型参考序列聚在一起,认定其为BC重组亚型。

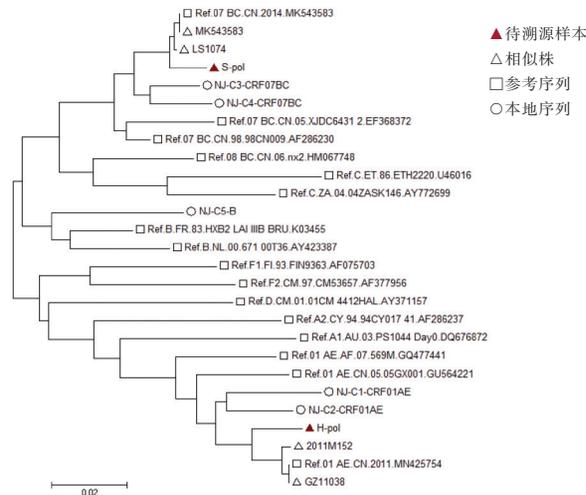


图1 溯源样本 HIV-1 pol 区序列系统进化树

Figure 1 Phylogenetic tree of HIV-1 pol region in traceable samples

3 讨论

HIV 感染的溯源调查可以有效地确定传染源,推测传播途径甚至明确传播方向。以往的溯源多依赖于流行病学调查与追踪^[5],而且流行病学调查

检测结果,H均为CRF01-AE型,S均为CRF07-BC亚型;pol区、gag区和env区序列H与S的基因距离分别为0.135、0.187、0.319,均大于H与其对应相似株的基因距离,也大于S与其对应相似株的基因距离。见表3。

2.3 系统进化树构建

HIV-1 pol 区序列系统进化树如图1所示,样

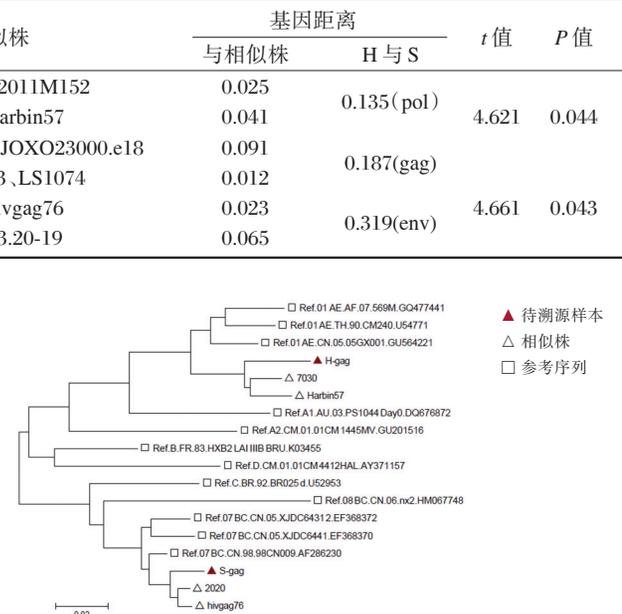


图2 溯源样本 HIV-1 gag 区序列系统进化树

Figure 2 Phylogenetic tree of HIV-1 gag region in traceable samples

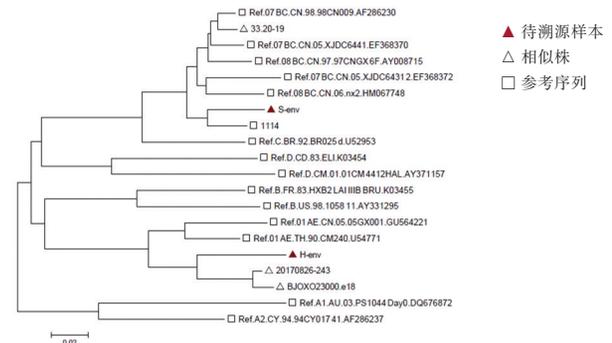


图3 溯源样本 HIV-1 env 区序列系统进化树

Figure 3 Phylogenetic tree of HIV-1 env region in traceable samples

对信息的准确性和详细度要求更高,也需要专业的访谈技巧。一旦出现被调查对象的不配合,线索有误或中断的情况,会影响调查结果,进而影响溯源的可靠性^[6-7]。

HIV分子溯源技术是利用分子生物学技术对疑似传播关系的感染者体内的HIV病毒进行同源性分析。HIV病毒基因组为两条单正链RNA,每条约9.7 kb。本次溯源调查分别扩增了其中三个基因片段,包括编码聚合酶前体蛋白的*pol*区,以及编码衣壳蛋白和包膜蛋白*gag*区和*env*区。*Pol*区基因相对保守,通常用于分子流行病学的基因亚型检测^[8-9],*gag*区和*env*区变异速度更快,在溯源性分析中应用更多,尤其是包含高变异V3环区的*env*基因区^[10-12]。本次调查结果三个区的基因亚型结果互相符合,且不论是样本H或S与各自相似株的基因距离还是H与S的基因距离,均为*pol*<*gag*<*env*,基因距离越大,说明变异速度越快,这与时丽丽等文献中阐述的观点一致^[13]。

本调查采用的PCR产物Sanger测序的方法,是将巢式PCR扩增产物纯化后直接测序,流程相对简单,是HIV分子溯源技术中最基础的方法。在本研究结果从分子生物学角度,认为两者不存在传播关系。直接测序法对于传染源的确定具有很大的价值。然而判断已知传播关系的传播方向或是获得感染者体内更多准种的信息,则需要进一步用到高通量测序的方法^[14]。

在职业暴露的溯源鉴定中,拥有先进的检测手段可以提供客观而真实的实验室证据,但职业暴露的规范化管理也显得尤为重要。首先要不断强化医务人员的生物安全意识,定期宣传培训,日常工作应当严格遵守操作规程,采用合适的防护。尤其是在接触高危人群/样本,或是从事风险较高的操作时要提高警惕,万不可有侥幸心理。医疗机构应当有详细的职业暴露应急预案及处置流程,处理伤口的同时,也要及时登记上报评估,并做好追踪工作^[15]。该案例也提示,科学严谨的预防处置工作不仅可以提高职业暴露的溯源鉴定的效率,也可以降低暴露后感染HIV的风险。

参考文献

- [1] 国家卫生健康委办公厅. 关于印发《职业暴露感染艾滋病病毒处理程序规定》的通知[Z/OL]. (2015-07-23). <http://www.nhc.gov.cn/jkj/s3585/201507/902caba665ac4d38ade13856d5b376f4.shtml>.
 - [2] 朱晓艳,王国永,郝连正,等. 2010-2015年山东省HIV职业暴露情况分析[J]. 现代预防医学, 2017, 44(1):29-31.
 - [3] 端琼丽,邵燕波,张维义,等. 2009-2013年红河州艾滋病病毒职业暴露情况分析[J]. 现代预防医学, 2015, 42(9):1564-1566.
 - [4] 中国疾病预防控制中心. 全国艾滋病检测技术规范(2020年修订版)[EB/OL]. [2020-5]. http://ncaids.chinacdc.cn/xxgx/jjszl/202005/t20200518_216798.htm.
 - [5] Dalle NF, Di LF, Sanfilippo A, et al. Contact tracing and partner notification among a cohort of HIV-1 infected patients. A prospective study carried out in Palermo in 2012[J]. Recent Prog Med, 2014, 105(9):327-332.
 - [6] 李燕,陈绮珊,梁颖茹,等. 广州市2008-2009年新报告HIV感染者/AIDS病人溯源调查分析[J]. 中国艾滋病性病, 2011, 17(2):131-134.
 - [7] 潘晓红,张佳峰,陈琳,等. 浙江省农村外来婚嫁女HIV亚型感染溯源及家庭内传播研究[J]. 中华流行病学杂志, 2011, 32(11):1077-1081.
 - [8] 吴健,王绪琴,周艳秋,等. 上海市2007-2013年HIV-1分子流行病学演变趋势[J]. 中国艾滋病性病, 2016, 22(1):5-9.
 - [9] 周莹,徐晓琴,卢静,等. 2015年江苏省HIV耐药警戒线调查[J]. 南京医科大学学报(自然科学学报), 2017, 37(2):256-260.
 - [10] Jochimsen EM, Luo CC, Beltrami JF, et al. Investigations of possible failures of postexposure prophylaxis following occupational exposures to human immunodeficiency virus [J]. Arch Intern Med, 1999, 159(19):2361-2363.
 - [11] 时丽丽,赵琦,蒋岩,等. 一起疑似输血传播HIV的分子流行病学研究[J]. 中华预防医学杂志, 2013, 47(5):427-430.
 - [12] Leitner T, Escanilla D, Franzen C, et al. Accurate reconstruction of a known HIV-1 transmission history by phylogenetic tree analysis [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(20):10864-10869.
 - [13] 时丽丽,赵琦,温玉洁,等. HIV暴露后感染分子溯源技术的研究进展[J]. 中国艾滋病性病, 2015, 21(8):746-749.
 - [14] 伍永勤,邹潇白,陈曦. 艾滋病溯源技术研究进展[J]. 实用预防医学, 2017, 24(6):762-765.
 - [15] 毛丽娜. 医疗机构艾滋病职业暴露的研究进展[J]. 中国艾滋病性病, 2020, 26(4):458-460.
-
- (上接第972页)
- [13] Roze JF, Veldhuis WB, Hoogendam JP, et al. Prognostic value of radiological recurrence patterns in ovarian cancer[J]. Gynecol Oncol, 2020, 15(6):42-46.
 - [14] Adler EK, Corona RI, Lee JM, et al. The PAX8 cistrome in epithelial ovarian cancer [J]. Oncotarget, 2017, 8(65):108316-108332.
 - [15] Mrch LS, Dehlendorff C, Baandrup L, et al. Use of antidepressants and risk of epithelial ovarian cancer [J]. Intern J Cancer, 2017, 141(11):954-955.

EmAb、ACA 及 PDW 联合检测在复发性流产临床诊断中的应用价值

韦志萍* 林忠

[摘要] **目的** 探讨抗子宫内膜抗体(EmAb)、抗心磷脂抗体(ACA)及血小板分布宽度(PDW)联合检测在复发性流产临床诊断中的应用价值。**方法** 对2018年7月-2020年6月本院收治的106例复发性流产的产妇的临床治疗进行整理,设为观察组;选取同期在本院进行孕检的106例健康女性设为对照组。比较2组EmAb、ACA及PDW表达情况,并比较不同流产次数的产妇血清mAb、ACA及PDW水平。比较不同人群EmAb、ACA及PDW表达情况,绘制ROC曲线分析EmAb、ACA及PDW检测及三者联合检测对妊娠期妇女发生复发性流产的预测价值。**结果** 观察组EmAb及ACA阳性表达率明显高于对照组,PDW表达水平显著高于对照组,差异均具有统计学意义($P<0.05$)。EmAb、ACA阳性表达率:流产4次>流产3次>流产2次,PDW表达水平:流产4次>流产3次>流产2次,差异均具有统计学意义($P<0.05$)。ROC曲线分析结果显示,EmAb、ACA、PDW单独及三者联合检测曲线下面积分别为0.878、0.834、0.855、0.945,各指标曲线下面积以联合检测最大($P<0.005$)。**结论** 血清AcA、EMAb、PDW水平检测对孕早期复发性流产的诊断具有重要临床意义,三者可作为预测复发性流产的敏感性指标。

[关键词] EmAb; ACA; PDW; 复发性流产

Application value of combined detection of EmAb, ACA and PDW in clinical diagnosis of recurrent miscarriage

WEI Zhiping*, LIN Zhong

(Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning, Guangxi, China, 530022)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the application value of combined detection of anti-endometrial antibody (EmAb), anticardiolipin antibody (ACA) and platelet distribution width (PDW) in the clinical diagnosis of recurrent abortion. **Method** The clinical data of 106 women with recurrent miscarriage admitted to this hospital from July 2018 to June 2020 were sorted out and set as the observation group. 106 healthy women with pregnancy examination in this hospital during the same period who were selected were set as the control group. The expressions of Emab, ACA, and PDW in the two groups were measured and compared, and the serum mAb, ACA, and PDW levels of women with different number of abortions were compared. The levels of serum Emab, ACA and PDW in different people were compared, and the ROC curve was drawn to analyze the predictive value of Emab, ACA and PDW detection and the combined detection of the three for the diagnosis of recurrent miscarriage in pregnant women. **Result** The positive expression rates of Emab and ACA in the observation group were significantly higher than those in the control group. The PDW level in the observation group was significantly higher than that in the control group. The difference of serum Emab, ACA and PDW levels between the two groups was statistically significant ($P<0.05$). The positive expression rates of Emab and ACA in patients with 4 abortions were significantly higher than those in the control group, and the level of PDW was significantly higher than that in the control group. There were statistically significant differences of the

基金项目:广西自然科学基金重点项目(2018JJD140015)

作者单位:广西中医药大学,广西,南宁 530022

*通信作者:韦志萍, E-mail: gao99850xiao4916@163.com

levels of serum Emab, ACA and PDW between the two groups ($P < 0.05$). The ROC curve analysis results show that the area under the curve of Emab, ACA, PDW alone and the three combined detection curves are 0.878, 0.834, 0.855, 0.945, respectively. The area under the curve of the three combined detection was the largest ($P < 0.005$). **Conclusion** The higher the number of recurrent miscarriages is, the higher the serum AcA, EMab, and PDW levels of pregnant women are. The detection of serum AcA, EMab and PDW levels has important clinical significance in the diagnosis of recurrent miscarriage in the first trimester, and the three can be used as sensitive indicators for predicting recurrent miscarriage.

[KEY WORDS] EmAb; ACA; PDW; recurrent miscarriage

美国生殖医学学会对复发性流产的定义是:指连续出现2次及2次以上妊娠丢失^[1]。目前,部分复发性流产的病因尚未明确,消除复发性流产给患者带来的困扰,确保产妇顺利生产是当前临床面临的难题。有学者研究指出,产妇自身抗体水平异常与复发性流产的发生存在密切联系,抗子宫内膜抗体(Anti-endometrial antibody, EmAb)、抗心磷脂抗体(Anticardiolipin antibody, ACA)均为自身抗体群,可抑制前列腺素生成,激活血小板的作用,当血液处于高凝状态时,会引发胎盘功能不足,导致对胎儿供氧不足,最终引发胎儿死亡^[2-3]。血小板分布宽度(Platelet distribution width, PDW)是反映血小板活化程度、血栓进展程度的重要指标^[4]。本研究以分析 EmAb、ACA 及 PDW 联合检测在复发性流产临床诊断中的应用价值。现研究报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2018年7月至2020年6月本院收治的106例复发性流产产妇作为观察组。纳入标准:①均符合《复发性流产诊治的专家共识》^[5],经B超检查确定为流产,且自然流产次数在2次以上;②夫妇染色体核型分析正常;③生殖内分泌激素水平正常范围内。排除标准:①合并系统性红斑狼疮、多发性肌炎等自身免疫性疾病者;②合并妊娠糖尿病、高血压等影响 EmAb、ACA 及 PDW 水平的疾病者;③生殖器官感染或畸形。

选取同期在本院进行孕检的健康女性106例设为对照组,入选孕妇均否认自然流产史,无自身免疫性疾病。2组产妇一般资料比较差异无统计学意义($P > 0.05$),见表1。本研究经医院伦理委员会批准通过,研究对象均签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 PDW 水平检测方法

对照组于体检当日清晨空腹采取肘静脉血

表1 2组患者基线资料比较($\bar{x} \pm s$)

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

组别	n	平均年龄(岁)	体质质量指数(kg/m ²)	停经时间(周)	自然流产次数(次)
观察组	106	25.41±3.31	26.08±2.31	10.38±0.95	2.01±0.22
对照组	106	25.48±3.39	26.12±2.37	10.31±0.90	-
t值	-	0.152	0.124	0.551	-
P值	-	0.879	0.901	0.582	-

5 mL,观察组患者于入院当日清晨空腹采取肘静脉血5 mL。乙二胺四乙酸二钾抗凝,室内质控品恢复至室温。采用日本希森美康医用电子有限公司生产的全自动血细胞分析仪(型号:SysmexXN-1000)检测PDW水平,配套试剂盒购自希森美康医用电子有限公司(批号20190322)。PDW参考范围值:9~13(%)^[6]。

1.2.2 ACA 及 EmAb 水平检测方法

采用化学发光法检测2组血清ACA水平,试剂盒购自北京源德生物医学工程有限公司,所有操作严格按照试剂盒说明书进行。应用ELISA对2组血清EmAb水平检测,试剂盒购自郑州安图生物工程有限公司,所有操作严格按照试剂盒说明书进行。应用波长为450nm的酶标仪对实验孔光密度值(Optical density value, OD)进行测定,当OD值大于或等于1临界值则可判断为阳性,反之则判断为阴性^[7]。

1.3 观察指标

比较2组EmAb、ACA及PDW表达情况,并比较不同流产次数的产妇血清mAb、ACA及PDW水平;分析EmAb、ACA及PDW表达水平与流产次数的关系。

1.4 统计学方法

采用SPSS 18.0软件进行数据统计分析,计数资料以n(%)表示,采用 χ^2 检验;计量资料采用($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较行t检验;多组间比较行F检验;绘制ROC曲线,并计算ROC曲线下面积

等指标,以分析 EmAb、ACA 及 PDW 检测及三者联合检测对妊娠期妇女发生复发性流产的预测价值;以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 2组 EmAb、ACA 及 PDW 表达情况比较

观察组 EmAb 及 ACA 阳性表达率高于对照组,PDW 表达水平高于对照组,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 2组 EmAb、ACA 及 PDW 表达情况比较

[$n(\%)$, ($\bar{x} \pm s$)]

Table 2 Comparison of expression of EMAb, ACA and PDW between 2 groups [$n(\%)$, ($\bar{x} \pm s$)]

组别	n	EmAb		ACA		PDW(%)
		阳性	阴性	阳性	阴性	
观察组	106	49(46.23)	57(53.77)	44(41.51)	62(58.49)	16.41±3.89
对照组	106	10(9.43)	96(90.57)	6(5.66)	100(94.34)	11.23±2.09
t/χ ² 值	-	35.721		37.794		12.077
P值	-	<0.001		<0.001		0.001

2.2 观察组不同流产次数 EmAb、ACA 及 PDW 表达情况比较

EmAb、ACA 阳性表达率:流产 4 次>流产 3 次>流产 2 次,PDW 表达水平:流产 4 次>流产 3 次>流产 2 次,差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。见表 3。

2.3 EmAb、ACA 及 PDW 检测及三者联合检测对妊娠期妇女发生复发性流产的预测价值

ROC 曲线分析结果显示:EmAb、ACA、PDW 单独及三者联合检测曲线下面积分别为 0.878、0.834、0.855、0.945,各指标曲线下面积以联合检测最大($P < 0.005$),见表 4 及图 1。

3 讨论

复发性流产是育龄期女性不育疾病中的顽疾,染色体因素、内分泌因素、感染因素、生殖器解剖等多种因素均会引发复发性流产。随着广大学者对复发性流产作用机制研究的不断深入,目前认为复

表 4 EmAb、ACA 及 PDW 检测及三者联合检测对妊娠期妇女发生复发性流产的预测价值

Table 4 the predictive value of EMAb, ACA and PDW detection and their combined detection for recurrent abortion in pregnant women

预测指标	最佳临界值	灵敏度	特异度	ROC 曲线下面积	95%可信区间
EmAb	26.12	0.898	0.799	0.878	0.762~0.993
ACA	26.07	0.865	0.815	0.834	0.699~0.969
PDW	26.00	0.856	0.832	0.855	0.734~0.976
三者联合检测	26.58	0.912	0.908	0.945	0.868~1.000
预测指数模型	1.654	0.859	0.842	0.895	0.734~0.994

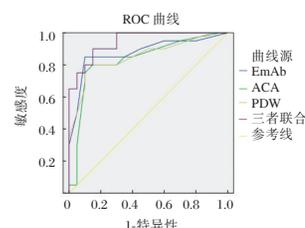


图 1 EmAb、ACA 及 PDW 检测及三者联合检测对妊娠期妇女发生复发性流产的预测价值

Figure 1 the predictive value of EMAb, ACA and PDW detection and their combined detection for recurrent abortion in pregnant women

发性流产患者存在潜在的自身免疫功能的失调,因此复发性流产也称为“亚临床自身免疫疾病”^[8]。

有学者研究报道,ACA 是引起反复流产、死胎、妊娠高血压疾病和胎儿宫内生长受限等最主要的自身抗体^[9]。本研究中,观察组 ACA 阳性表达率明显高于正常孕妇,流产 4 次的患者 ACA 阳性表达率明显高于流产 2 次及流产 3 次的患者,这一研究结果与既往文献报道结果一致^[10-11]。ACA 是一种以血小板和内皮细胞膜上带负电荷的心磷脂作为靶抗原的自身抗体,位于细胞膜脂质双层的内层,能够避免被免疫系统所识别^[12]。ACA 激活血小板的活性,促使血小板黏附、聚集,并释放出血栓素 A2 引起血小板凝聚,最终形成血栓,同时 ACA 高表达还会促使胎盘血管收缩和血栓形成,胎盘的

表 3 观察组不同流产次数 EmAb、ACA 及 PDW 表达情况比较 [$n(\%)$, ($\bar{x} \pm s$)]

Table 3 Comparison of EMAb, ACA and PDW expression in observation group with different abortion times [$n(\%)$, ($\bar{x} \pm s$)]

次数	例数 (n=106)	EmAb		ACA		PDW(%)
		阳性(n=49)	阴性(n=57)	阳性(n=44)	阴性(n=62)	
2次	31	2(4.08)	29(50.88)	1(2.27)	30(48.39)	15.62±1.89
3次	40	13(26.53)	27(47.37)	8(18.18)	32(51.61)	17.45±2.08
4次	35	34(69.39) ^a	1(1.75)	35(79.55) ^a	0(0.00)	19.22±2.33 ^a
F/χ ² 值	-	4.457		8.634		23.850
P值	-	0.035		0.003		<0.001

注:与流产 3 次比较,^a $P < 0.005$ 。

血流量减少,致使胎儿氧供不足而死亡^[13]。可见,ACA可作为检测不良妊娠结局的重要指标。

PDW是反映血小板大小分布的指标,通过形态及功能而发生变化,是血小板活化的特异性标志物^[13]。已有较多文献报道,PDW与心脑血管疾病、糖尿病等代谢性疾病的发生有着密切联系^[14]。Shukla等学者^[15]报道,在复发性流产患者,PDW表达水平会明显高于正常孕妇,且PDW表达量会随着患者流产次数增加而提高,这一研究结果与本研究结果一致。

本研究经采用ROC曲线分析流产次数与EmAb、ACA及PDW检测及三者联合检测对妊娠期妇女发生复发性流产的预测价值,结果显示各指标曲线下面积以联合检测最大,这一研究结果与Ransing等学者^[16]报道结果一致。EMAb存在于子宫内腔中,是一种特异性的自身抗体,子宫内膜是胚胎着床及发育的重要场所,内膜的功能直接影响孕妇的妊娠情况^[17]。可见尽早对妊娠期妇女加强EmAb、ACA及PDW联合检测,可预测其妊娠结局,有利于临床尽早确定针对性的诊治方案,从而改善妊娠结局。

综上所述,复发性流产次数越多,则妊娠期妇女血清AcA、EMAb、PDW水平越高。血清AcAb、EMAb、PDW水平检测对孕早期复发性流产的诊断具有重要临床意义,三者可作为预测复发性流产的敏感性指标。复发性流产病因非常复杂,且尚未有明确定论,后续笔者将扩大样本量,研究其他免疫性因素与该病之间的关系,以进一步完善基础研究及临床实践研究,为临床疗效治疗提供理论依据。

参考文献

- [1] 徐书星,霍庆赞,张明远,等.血清CA153,CEA,SF,CT及Hey联合检测对乳腺癌的临床诊断价值[J].分子诊断与治疗杂志,2020,12(2):190-194.
- [2] 周燕,罗孟军,陈莉农,等.抗精子抗体,抗子宫内膜抗体,抗心磷脂抗体和抗核抗体检测在复发性流产诊断中的价值[J].中国计划生育和妇产科,2020,12(5):25-28.
- [3] 张艳,郑红云,童永清,等.miR-200c在复发性流产患者绒毛组织中的表达及其对滋养细胞的影响[J].医学分子生物学杂志,2019,41(1):76-80.
- [4] 罗丹,迟曰梅,王新超.CA153、CA125、CEA联合检测在乳腺癌诊断中的临床意义[J].中国医学创新,2018,15(6):134-137.
- [5] Roua A, Taher MS, Ahmed A. Relationship of 14-bp insertion/deletion gene polymorphism of HLA-G with Consanguinity in recurrent abortion in Baghdad, Iraq [J]. Res J Biotechnol, 2019, 14(1):303-306.
- [6] Karim S, Jamal HS, Rouzi A, et al. Genomic answers for recurrent spontaneous abortion in Saudi Arabia: An array comparative genomic hybridization approach [J]. Reprod Biol, 2017, 15(22):164-168.
- [7] Rahmani F, Hadinedoushan H, Ghasemi N. Relative Expression of OX40, OX40L mRNA, and OX40L Serum Levels in Women with Recurrent Spontaneous Abortion [J]. Immunol Invest, 2019, 48(5):408-489.
- [8] Moore EC, Porter LM, Ruha AM. Rattlesnake venom-induced recurrent coagulopathy in first trimester pregnant women- Two Cases [J]. Toxicol, 2019, 16(3):8-11.
- [9] Takeuchi M, Nagasaka K, Yoshida M, et al. On-chip immunofluorescence analysis of single cervical cells using an electroactive microwell array with barrier for cervical screening [J]. Biomicrofluidics, 2019, 13(4):441-448.
- [10] Yokoi E, Mabuchi S, Komura N, et al. The role of myeloid-derived suppressor cells in endometrial cancer displaying systemic inflammatory response: clinical and preclinical investigations [J]. OncoImmunology, 2019, 8(12):166-171.
- [11] Jimeno A, Moore KN, Gordon M, et al. A first-in-human phase 1a study of the bispecific anti-DLL4/anti-VEGF antibody navicixizumab (OMP-305B83) in patients with previously treated solid tumors [J]. Invest New Drugs, 2019, 37(3):461-472.
- [12] Oplawski M, Dziobek K, Adwent I, et al. Expression Profile of Endoglin in Different Grades of Endometrial Cancer [J]. Curr Pharm Biotechnol, 2018, 19(12):990-995.
- [13] Jimeno A, Moore KN, Gordon M, et al. A first-in-human phase 1a study of the bispecific anti-DLL4/anti-VEGF antibody navicixizumab (OMP-305B83) in patients with previously treated solid tumors [J]. Invest New Drugs, 2019, 37(3):461-472.
- [14] Akihiro T, Yuta M, Kenji U, et al. Thrombotic microangiopathy associated with anticardiolipin antibody in a kidney transplant recipient with polycythemia [J]. CEN Case Rep, 2019, 8(1):1-7.
- [15] Shukla MR, Deutsch JW, Pereira LE, et al. Development of a novel magnetic particle-based agglutination immunoassay for anticardiolipin antibody detection in syphilis [J]. Sexually Transm Infect, 2020, 96(6):411-416.
- [16] Ransing RS, Patil B, Grigo O. Mean Platelet Volume and Platelet Distribution Width Level in Patients with Panic Disorder [J]. J Neurosci Rural Pract, 2017, 8(2):174-178.
- [17] Gilman-Sachs A, Duchateau BK, Aslakson CJ, et al. Natural killer (NK) cell subsets and NK cell cytotoxicity in women with histories of recurrent spontaneous abortions [J]. Am J Rep Immunol, 2019, 20(1):99-105.

Galectin-9、*NOX-1* mRNA 在胆囊癌中表达变化及与癌细胞生物学行为指标的关系

彭正* 陈之强 杨琦

【摘要】 目的 探究半乳糖凝集素9(*Galectin-9*)、NADPH氧化酶1(*NOX-1*)mRNA在胆囊癌中表达变化及与癌细胞生物学行为指标的关系。方法 选取本院胆囊癌患者84例,检测对比癌组织与与距离癌组织边缘5 cm左右的癌旁正常组织中*Galectin-9*、*NOX-1* mRNA相对表达量,分析癌组织中*Galectin-9* mRNA与*NOX-1* mRNA关联性及其与临床病理特征、癌细胞生物学行为指标的关系。结果 癌组织中*Galectin-9* mRNA相对表达量低于癌旁正常组织,*NOX-1* mRNA相对表达量高于癌旁正常组织,差异有统计学意义($P<0.05$);癌组织中*Galectin-9* mRNA与*NOX-1* mRNA呈负相关($r=-0.688$, $P<0.001$);*Galectin-9* mRNA与临床分期、淋巴结转移、分化程度显著相关($P<0.05$);*NOX-1* mRNA与临床分期、淋巴结转移、分化程度、肿瘤浸润深度显著相关($P<0.05$);*Galectin-9* mRNA与*p-STAT3*、*Bcl-2*、*MMP-7* mRNA呈负相关,*NOX-1* mRNA与*p-STAT3*、*Bcl-2*、*MMP-7* mRNA呈正相关($P<0.05$)。结论 *Galectin-9* mRNA下调、*NOX-1* mRNA上调可能是胆囊癌发生的重要机制,且两者表达水平与临床病理特征、生物学行为指标密切相关,能为临床诊治提供有效信息。

【关键词】 胆囊癌;半乳糖凝集素9;NADPH氧化酶1;临床病理特征;癌细胞生物学行为指标

Galectin-9 and *NOX-1* mRNA expression changes in gallbladder carcinoma and their relationship with the biological behavior of cancer cells

PENG Zheng*, CHEN Zhiqiang, YANG Qi

(The First Department of General Surgery, Shunyi Hospital, Beijing, China, 101300)

【ABSTRACT】 **Objective** To explore the expression changes of *Galectin-9* (*Galectin-9*) and *NADPH* oxidase 1 (*NOX-1*) mRNA in gallbladder cancer and their relationship with the biological behavior indicators of cancer cells. **Methods** A total of 84 patients with gallbladder cancer in our hospital were selected, and the relative expression of *Galectin-9* and *NOX-1* mRNA in the cancer tissue and the normal tissue adjacent to the cancers about 5 cm away from the edge of the cancer tissue was tested and compared. The correlation between *Galectin-9* mRNA and *NOX-1* mRNA in cancer tissues and their relationship with clinicopathological characteristics and biological behavior indicators of cancer cells was analyzed. **Results** The relative expression of *Galectin-9* mRNA in cancer tissues was lower than that in normal tissues adjacent to cancer, and the relative expression of *NOX-1* mRNA was higher than that in normal tissues adjacent to cancer ($P<0.05$). *Galectin-9* mRNA and *NOX-1* mRNA in cancer tissues were negatively correlated ($r=-0.688$, $P<0.001$). Both *Galectin-9* and *NOX-1* mRNA levels were significantly correlated with clinical stage, lymph node metastasis, and degree of differentiation ($P<0.05$). *Galectin-9* mRNA was negatively correlated with *p-STAT3*, *Bcl-2*, and *MMP-7* mRNA, and *NOX-1* mRNA was positively correlated with *p-STAT3*, *Bcl-2*, and *MMP-7* mRNA ($P<0.05$). **Conclusion** The downregulation of *Galectin-9* mRNA and the upregulation of *NOX-1* mRNA may be an important mechanism for the occurrence of gallbladder cancer, and their expression levels are closely related to

基金项目:北京市医院管理局临床技术创新项目(XMLX201709)

作者单位:北京市顺义区医院普外一科,北京 101300

*通信作者:彭正, E-mail: pengzheng92@126.com

clinicopathological characteristics and biological behavior indicators, which can provide effective information for clinical diagnosis and treatment.

[KEY WORDS] Gallbladder cancer; Galectin 9; NADPH oxidase 1; Clinicopathological characteristics; Cancer cell biological behavior indicators

胆囊癌是临床常见消化道系统恶性肿瘤,早期缺乏特异性临床表现,恶性程度高,具有早期诊断困难、根治性手术切除率低、预后较差等特点,据统计,其5年生存率不足5%^[1]。研究表明,癌细胞侵袭性强、转移速度快是胆囊癌预后差、生存期短的主要因素^[2]。胆囊癌发病机制较为复杂,目前临床普遍认为其发生发展过程涉及多种蛋白、基因,筛选出可靠标志物对早期诊断及预后改善具有重要意义。半乳糖凝集素9(Galactose lectin 9, Galectin-9)是一种抑癌基因,既往临床已发现其在胃癌、宫颈癌、食管鳞癌中均呈低表达,与病理进展密切相关^[3]。NADPH氧化酶1(NADPH oxidase 1, NOX1)是细胞内重要的氧化酶之一,在多种肿瘤发生与转移中发挥关键作用^[4]。但关于两者在胆囊癌中的作用仍缺乏验证。为此,本研究分析Galectin-9、NOX-1 mRNA在胆囊癌中表达变化及与癌细胞生物学行为指标的关系,旨在为临床提供数据支持。报告如下。

1 对象与方法

1.1 研究对象

选取本院2016年5月至2020年8月胆囊癌患者84例作为研究对象,其中男40例,女44例,平均年龄(63.59±6.02)岁,肿瘤大小:平均(5.63±1.14)cm,临床分期:I~II期30例,III~IV期54例,肿瘤浸润深度:Tis~T₂ 38例,T₃~T₄ 46例,分化程度:高分化29例,中分化23例,低分化32例,淋巴结转移40例。选取距离癌组织边缘5cm左右的组织为癌旁正常组织。纳入标准:均经超声检查、病理检查证实为胆囊癌;手术切除前均未接受放化疗,预计生存期>6个月。排除标准:合并其他恶性肿瘤者;存在胆道系统良性肿瘤者;伴有心肝肾等重要脏器严重功能异常者;临床资料缺失者。

1.2 方法

取胆囊癌患者手术切除的癌组织及距离癌组织边缘5cm左右的癌旁正常组织标本,采用Trizol法提取总RNA,于紫外分光光度计上定量分析RNA纯度及浓度。采用日本TaKaRa公司反转录

试剂盒(PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser)将1 μg总RNA逆转录为cDNA,引物序列由上海杰李生物公司合成,反应条件为:95℃预变性30 s,95℃变性5 s,60℃退火30 s,72℃ 2 min,40个循环,72℃延伸10 min,以2^{-ΔΔCT}值表示Galectin-9 mRNA、NOX-1 mRNA、癌细胞生物学行为指标[磷酸化信号转导与转录激活因子3(Phosphorylation signal transduction and transcription activator 3, p-STAT3)、凋亡抑制基因Bcl-2、基质金属蛋白酶7(Matrix metalloproteinase 7, MMP-7)mRNA相对表达量。

1.3 统计学方法

采用统计学软件SPSS 22.0处理数据,计量资料以($\bar{x} \pm s$)描述,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两组间比较采用LSD-*t*检验,两组间比较采用独立样本*t*检验;相关性分析采用Spearman/Pearson相关系数模型。*P*<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 癌组织与癌旁正常组织中Galectin-9、NOX-1 mRNA相对表达量

癌组织中Galectin-9 mRNA相对表达量低于癌旁正常组织,NOX-1 mRNA相对表达量高于癌旁正常组织,差异有统计学意义(*P*<0.05)。见表1。

表1 癌组织与癌旁正常组织中Galectin-9、NOX-1 mRNA相对表达量比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of Galectin-9 and NOX-1 mRNA expression between cancer tissues and adjacent normal tissues ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	Galectin-9 mRNA	NOX-1 mRNA
癌组织	84	0.20±0.06	2.78±0.41
癌旁正常组织	84	0.72±0.20	1.03±0.22
<i>t</i> 值		22.824	34.471
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001

2.2 癌组织中Galectin-9 mRNA与NOX-1 mRNA关联性

Pearson相关性分析,癌组织中Galectin-9 mRNA与NOX-1 mRNA呈负相关($r=-0.688, P<0.001$)。

2.3 癌组织中 Galectin-9、NOX-1 mRNA 与临床病理特征的关系

Galectin-9 mRNA 与年龄、性别、肿瘤大小、

肿瘤浸润深度无关 ($P>0.05$), 与临床分期、淋巴结转移、分化程度显著相关 ($P<0.05$)。见表 2。

表 2 癌组织中 Galectin-9、NOX-1 mRNA 与临床病理特征的关系

Table 2 Relationship between Galectin-9、NOX-1 mRNA and clinicopathological features in carcinoma

临床病理特征	n	Galectin-9 mRNA	t/F 值	P 值	r 值	NOX-1 mRNA	t/F 值	P 值	r 值	
年龄(岁)	<60	34	0.19±0.06	1.360	0.178	0.173	2.77±0.52	0.156	0.876	0.204
	≥60	50	0.21±0.07				2.79±0.61			
性别	男	40	0.19±0.05	0.679	0.499	0.146	2.75±0.54	0.480	0.633	0.186
	女	44	0.20±0.08				2.81±0.60			
临床分期	I~II 期	30	0.32±0.10	12.342	<0.001	-0.624	2.01±0.26	10.727	<0.001	0.597
	III~IV 期	54	0.13±0.04				3.21±0.58			
肿瘤大小(cm)	<5	29	0.22±0.09	1.824	0.072	-0.108	2.73±0.59	0.565	0.573	0.144
	≥5	55	0.19±0.06				2.81±0.63			
肿瘤浸润深度	Tis~T ₂	38	0.21±0.08	1.833	0.071	-0.103	2.10±0.28	13.617	<0.001	0.639
	T ₃ ~T ₄	46	0.18±0.07				3.34±0.50			
淋巴结转移	无	44	0.28±0.09	11.380	<0.001	-0.607	2.03±0.32	14.508	<0.001	0.675
	有	40	0.11±0.03				3.61±0.64			
分化程度	高分化	29	0.30±0.10	64.751	<0.001	0.811	1.82±0.21	144.162	<0.001	-0.903
	中分化	23	0.22±0.06				2.79±0.36			
	低分化	32	0.10±0.03				3.64±0.57			

2.5 癌组织中 Galectin-9 mRNA 与癌细胞生物学行为指标相关性

以癌组织中 Galectin-9 mRNA 平均值为界分为低表达、高表达。Galectin-9 mRNA 低表达癌组织中 p-STAT3、Bcl-2、MMP-7 mRNA 相对表达量高于高表达癌组织 ($P<0.05$)。见表 3。Pearson 相关性分析, Galectin-9 mRNA 与 p-STAT3、Bcl-2、MMP-7 mRNA 呈负相关 ($r=-0.619、-0.583、-0.657, P$ 均 <0.05)。

表 3 癌组织中 Galectin-9 mRNA 与癌细胞生物学行为指标相关性

Table 3 Correlation between Galectin-9 mRNA and biological behavior of cancer cells

组别	n	p-STAT3 mRNA	Bcl-2 mRNA	MMP-7 mRNA
低表达癌组织	56	17.16±3.15	0.87±0.20	9.21±1.26
高表达癌组织	28	13.82±2.28	0.59±0.13	7.34±1.05
t 值		4.989	6.721	6.761
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

2.6 癌组织中 NOX-1 mRNA 与癌细胞生物学行为指标相关性

以癌组织中 NOX-1 mRNA 平均值为界分为低表达、高表达。NOX-1 mRNA 低表达癌组织中 p-STAT3、Bcl-2、MMP-7 mRNA 相对表达量低于高表达癌组织 ($P<0.05$), 见表 4。相关性分析, NOX-1 mRNA 与 p-STAT3、Bcl-2、MMP-7 mRNA 呈正相关 ($r=0.633、0.712、0.604, P$ 均 <0.05)。

表 4 癌组织中 NOX-1 mRNA 与癌细胞生物学行为指标相关性 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Correlation between NOX-1 mRNA and biological behavior of cancer cells ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	p-STAT3 mRNA	Bcl-2 mRNA	MMP-7 mRNA
低表达癌组织	31	14.11±2.36	0.61±0.11	7.29±1.38
高表达癌组织	53	17.18±3.07	0.88±0.22	9.35±1.12
t 值		4.796	6.372	7.458
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

3 讨论

胆囊癌在所有胆道系统恶性肿瘤中约占 41.30%, 由于早期诊断困难, 导致多数初诊患者已发展至进展期或晚期, 其中 61.50%~63.80% 患者已发生转移, 丧失根治性救治机会, 且普遍预后较差^[5-6]。因此, 寻找分子标志物为临床早期诊断提供依据、为改善预后创造有利条件成为临床重要课题。

Galectin-9 是半乳糖凝集素家族中重要成员之一, 既往研究表明, Galectin-9 可通过调控细胞功能参与炎症、免疫、肿瘤等疾病发生发展过程^[7]。Enninga EA 等^[8]报道中显示, Galectin-9 低表达能够加快黑色素瘤细胞增殖、迁移、侵袭, 过表达能够加快黑色素瘤细胞凋亡。本研究结果说明其可能通过下调表达促进胆囊癌发生, 并加快病理改变及病情进展。结合陶桢等^[9]研究考虑原因主要在于 Galectin-9 具有抑制肿瘤作用, 可通过特异性结合

细胞表面、细胞间质中的半乳糖,传递细胞间、细胞与间质间的信号,从而对细胞黏附、聚集、分化、增殖、凋亡产生调控作用。当其低表达时,无法满足自身对肿瘤的抑制作用,导致肿瘤细胞加快增殖、分化,促进病理改变,不断加重病情程度^[10]。本研究还显示,*Galectin-9*与*p-STAT3*、*Bcl-2*、*MMP-7* mRNA呈负相关,可能是由于*Galectin-9*抑癌作用与*p-STAT3*、*Bcl-2*、*MMP-7*促癌作用形成反向机制而致。由上述结果可知,以*Galectin-9*为靶点,提高其在胆囊癌组织中的表达,可能会显著抑制胆囊癌淋巴结转移及组织分化,为临床改善预后提供新思路。

大量临床实践证实,氧化应激在肿瘤发生发展中具有重要作用^[11-12]。NOX1是诱导氧化应激反应的关键酶之一,能够增加细胞内活性氧(ROS)水平,参与肿瘤细胞外基质重构及细胞迁移、增殖等病理生理过程^[13]。Yamamoto T等^[14]报道中显示,NOX1过表达会促使胃癌肿瘤细胞出现氧化应激反应,从而促使细胞周期蛋白D1(Cyclin D1)含量增加,促进胃癌细胞增殖。本研究结果表明NOX1可通过上调表达促进胆囊癌发生,并对病理改变产生加速作用。推测NOX1过表达在胆囊癌中的作用机制为:NOX1上调后诱导胆囊癌组织内肿瘤细胞产生氧化应激反应,从而异常氧化蛋白质,使其丧失生物活性,并损伤DNA双链,引发DNA双链畸变及碱基突变,进而激活原癌基因、抑制抑癌基因活性,导致正常细胞发生癌变;还可经由刺激肿瘤细胞增殖相关基因突变等途径加快肿瘤细胞变异,增强其恶性程度。*p-STAT3*、*Bcl-2*、*MMP-7*是胆囊癌传统肿瘤增殖、侵袭基因,在胆囊癌发生发展中发挥重要作用^[15-16]。本研究结果提示NOX-1能与*p-STAT3*、*Bcl-2*、*MMP-7*等多项传统肿瘤增殖、侵袭基因发挥共同作用,促进胆囊癌病情进展。故临床可通过检测胆囊癌组织中NOX-1 mRNA相对表达量为评估病情、制定针对性抗肿瘤方案提供相关参考依据。

此外,本研究结果还显示,胆囊癌组织中*Galectin-9* mRNA与NOX-1 mRNA具有负相关关系,可见两者在胆囊癌发生进展过程中联系紧密,联合检测能为临床提供更为可靠、全面的诊治依据,为后续治疗创造良好基础。本研究不足之处在于:作为小样本研究,可能造成数据偏移,需进一步采取多中心、大样本分析。

综上所述,*Galectin-9* mRNA下调、NOX-1 mRNA上调可能是胆囊癌发生的重要机制,且两

者表达水平与临床病理特征、癌细胞生物学行为指标密切相关,为临床诊治提供有效信息。

参考文献

- [1] 杨彦,王剑明. 胆囊癌病理分期与肝切除范围[J]. 外科理论与实践, 2017,22(3):205-210.
- [2] 耿智敏,李起,张震,等. 胆囊癌相关生存预测模型的研究现状[J]. 中华外科杂志, 2020,58(8):649-652.
- [3] Zhang L, Tian S, Pei M, et al. Crosstalk between histone modification and DNA methylation orchestrates the epigenetic regulation of the costimulatory factors, Tim-3 and galectin-9, in cervical cancer[J]. Oncol Rep, 2019,42(6):2655-2669.
- [4] Liang S, Ma HY, Zhong Z, et al. NADPH Oxidase 1 in Liver Macrophages Promotes Inflammation and Tumor Development in Mice[J]. Gastroenterology, 2019,156(4):1156-1172.
- [5] 施永恒,陈晓宇,刘强,等. NADPH氧化酶1在胆囊癌组织中的表达及临床意义[J]. 肝胆胰外科杂志, 2018,30(4):312-316.
- [6] 虞吉好,张敏,郑荣寿,等. 中国2014年胆囊癌发病与死亡情况分析[J]. 中华肿瘤杂志, 2018,40(12):894-899.
- [7] 穆合塔尔·木合买提,李奇凤,赵晶,等. Tim3/Galectin-9在肺结核患者中的表达研究[J]. 热带医学杂志, 2020,20(8):1033-1035,1055.
- [8] Enninga EA, Nevala WK, Holtan SG, et al. Galectin-9 modulates immunity by promoting Th2/M2 differentiation and impacts survival in patients with metastatic melanoma[J]. Melanoma Res, 2016,26(5):429-441.
- [9] 陶楨,裴斐. miR-455-5p和Galectin-9在胆囊癌中的表达[J]. 中国临床研究, 2018,31(8):13-17.
- [10] Zhang CX, Huang DJ, Baloch V, et al. Galectin-9 promotes a suppressive microenvironment in human cancer by enhancing STING degradation[J]. Oncogenesis, 2020,9(7):65.
- [11] 李文敏,徐暘,陈秀生,等. 血管紧张素(1-7)抑制血管生成的机制[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2013,5(4):279-283.
- [12] 陈吉杰,崔华英,魏春华,等. 肺癌患者氧化损伤与趋化因子IP-10、Rantes的相关性研究[J]. 国际呼吸杂志, 2020,40(7):516-520.
- [13] Ishii T, Warabi E. Mechanism of Rapid Nuclear Factor-E2-Related Factor 2 (Nrf2) Activation via Membrane-Associated Estrogen Receptors: Roles of NADPH Oxidase 1, Neutral Sphingomyelinase 2 and Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)[J]. Antioxidants (Basel), 2019,8(3):69.
- [14] Yamamoto T, Nakano H, Shiomi K, et al. Identification and Characterization of a Novel NADPH Oxidase 1 (Nox1) Inhibitor That Suppresses Proliferation of Colon and Stomach Cancer Cells[J]. Biol Pharm Bull, 2018,41(3):419-426.
- [15] 栗宏红,段吉明,薛军军,等. C-myc和Bcl-2在胆囊癌中的表达及意义[J]. 中国现代医生, 2018,56(8):165-168.
- [16] 张茜,郑琪,陈旭,等. 苦参碱对胆囊癌患者血清及胆囊组织中MMP-7、p-STAT3及E-Cad水平的影响[J]. 现代生物医学进展, 2016,16(30):5872-5874+5986.

不同时间窗阿替普酶静脉溶栓治疗急性脑梗死的疗效观察

刘汉臣^{1*} 张琦¹ 王杰斌²

[摘要] 目的 探讨不同时间窗阿替普酶(rt-PA)静脉溶栓治疗急性脑梗死(ACI)的疗效及对超敏C反应蛋白(hs-CRP)、脂联素(APN)、应激因子、神经分子生物学指标水平的影响。方法 选取2018年2月至2020年11月收治的ACI患者100例,根据患者接受rt-PA静脉溶栓时间分为两组,观察组为50例发病距离溶栓时间<3h的患者,对照组为50例发病距离溶栓时间在3~4.5h的患者,比较两组患者的治疗效果、治疗前后血清超敏C反应蛋白(hs-CRP)、脂联素(APN)、应激因子丙二醛(MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-px)、超氧化物歧化酶(SOD)、神经生长因子(NGF)、髓鞘碱性蛋白(MBP)水平及美国国立卫生研究院卒中量表(NIHSS)评分、脑卒中患者临床神经功能受损度评分(MESSS)评分。结果 观察组治疗的总有效率为88.00%,稍高于对照组80.00%,两组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。治疗后观察组的hs-CRP低于对照组,APN水平高于对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。治疗后观察组的MDA水平低于对照组,SOD、GSH-px水平高于对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。治疗后观察组的血清NGF、MBP水平高于对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。治疗后观察组的NIHSS、MESSS评分低于对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。结论 使用rt-PA静脉溶栓治疗ACI患者,治疗时间窗越短,疗效越好,可明显改善血清hs-CRP、APN和应激因子水平,减轻对神经功能的影响。

[关键词] 急性脑梗死;阿替普酶;溶栓;超敏C反应蛋白;脂联素

Curative effects of intravenous thrombolysis with alteplase in different time windows on acute cerebral infarction

LIU Hanchen^{1*}, ZHANG Qi¹, WANG Jiebin²

(1. Department of the Second Ward Neurology, Linxi Hospital, Kailuan General Hospital, Tangshan, Hebei, China, 063103; 2. Department of the First Ward Neurology, Linxi Hospital, Kailuan General Hospital, Tangshan, Hebei, China, 063103)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the curative effects of intravenous thrombolysis with alteplase (rt-PA) in different time windows on the treatment of acute cerebral infarction (ACI), and the influence on levels of high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP), adiponectin (APN), stress factors and neurological molecular biological indicators. **Methods** A total of 100 ACI patients who were admitted to the hospital from February 2018 to November 2020 were enrolled. According to the different intravenous thrombolysis time with alteplase, they were divided into the observation group (50 cases, interval between onset and thrombolysis shorter than 3h) and the control group (50 cases, interval between onset and thrombolysis within 3~4.5 h). The curative effect, levels of serum hs-CRP, APN, stress factors malondialdehyde (MDA), Glutathione peroxidase (GSH-px) and superoxide dismutase (SOD), nerve growth factor (NGF), myelin basic protein (MBP), National Institute of Health stroke scale (NIHSS) and Modified Edinburgh Scandinavian stroke scale

基金项目:河北省卫生厅科研基金项目(20210578)

作者单位:1. 开滦总医院林西医院神经内科二病区,河北,唐山 063103

2. 开滦总医院林西医院神经内科一病区,河北,唐山 063103

*通信作者:刘汉臣, E-mail: xibanxiang67365@163.com

(MESSS) scores before and after treatment were compared between the two groups. **Results** The total response rate of treatment in the observation group was slightly higher than that in the control group (88.00% vs 80.00%) ($P>0.05$). After treatment, hs-CRP in the observation group was significantly lower than that in the control group ($P<0.05$), while APN level was significantly higher than that in the control group ($P<0.05$). After treatment, MDA level in the observation group was significantly lower than that in the control group ($P<0.05$), while levels of SOD and GSH-px were significantly higher than those in the control group ($P<0.05$). After treatment, serum NGF and MBP levels in the observation group were higher than those in the control group ($P<0.05$). After treatment, NIHSS and MESSS scores in the observation group were significantly lower than those in the control group ($P<0.05$). **Conclusion** Using rt-PA intravenous thrombolysis to treat ACI patients, the shorter the treatment time window, the better the curative effect, which can significantly improve the serum hs-CRP, APN and stress factor levels, and reduce the impact on nerve function.

[KEY WORDS] Different time windows; Alteplase; Acute cerebral infarction; High sensitivity C-reactive protein; Adiponectin

急性脑梗死(acute cerebral infarction, ACI)为局部脑组织血液供应障碍导致的神经功能缺失,该病的病残率和致死率较高,患者治疗后常出现以偏瘫为主的后遗症,对患者生活质量有很大影响^[1-2]。该病的病理机制主要是血栓阻塞导致脑血管闭塞,从而出现缺血缺氧,溶栓治疗可改善脑部血液循环^[3]。阿替普酶又称为重组组织型纤溶酶原激活剂(recombinant tissue-plasminogen activator, rt-PA),是临床常用于治疗急性脑梗死的溶栓药物,能有效降低患者病残率^[4]。临床发现不同治疗时间窗的患者预后存在差异,有研究显示越早使用rt-PA进行溶栓治疗,患者治疗效果越好^[5]。本研究分析不同时间窗应用rt-PA静脉溶栓对ACI的疗效,并从血清超敏C反应蛋白(hypersensitive C-reactive protein, hs-CRP)、脂联素(adiponectin, APN)、应激因子、神经分子生物学指标水平的角度深入探讨rt-PA对炎症和应激的影响,为临床治疗方案的选择提供依据,报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2018年2月至2020年11月本院收治的ACI患者100例。纳入标准:①符合ACI的诊断标

准^[6];②发病到溶栓治疗时间不超过4.5 h;③年龄<80岁;④患者和家属知晓治疗方案,自愿参与研究并签署知情同意书。排除标准:①严重器质性疾病或严重糖尿病患者;②对本研究药物过敏者;③脑出血患者;④凝血功能障碍;⑤口服抗凝药物或接受过肝素治疗;⑥溶栓禁忌症;⑦既往心肌梗死、肺栓塞、脑梗死溶栓治疗史;⑧近两个月有重大外科手术史。根据患者接受rt-PA静脉溶栓时间分为两组,观察组为50例发病距离溶栓时间<3 h的患者,对照组为50例发病距离溶栓时间在3~4.5 h的患者,两组一般资料比较差异无统计学意义($P>0.05$),见表1。本研究通过医院伦理委员会批准。

1.2 方法

患者入院后均给予对症治疗,吸氧,使用脑神经保护剂脑苷肌肽注射液,配合抗血小板聚集、降脂稳斑类药物。观察组患者在发病距离溶栓时间3 h内接受溶栓治疗,对照组患者在发病距离溶栓时间3~4.5 h内接受溶栓治疗。将rt-PA(德国Boehringer Ingelheim Pharma GmbH公司,注册证号S20160055,50 mg/支)干粉用注射水溶解,将其配置成浓度为1 mg/mL的注射液,剂量为0.75~0.85 mg/kg,先将总量的10%在1~2 min内静脉推注,剩下的90%在60 min内静脉滴注。

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

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

组别	n	男/女	年龄(岁)	糖尿病	高血压	高脂血症	吸烟史	饮酒史	发病到入院时间(h)
观察组	50	31/19	61.48±5.41	9(18.00)	14(28.00)	8(16.00)	23(46.00)	27(54.00)	2.01±0.23
对照组	50	29/21	62.53±5.37	13(26.00)	15(30.00)	10(20.00)	19(38.00)	22(44.00)	2.09±0.26
χ^2/t 值		0.167	0.974	0.932	0.049	0.271	0.657	1.000	1.630
P值		0.683	0.332	0.334	0.826	0.603	0.418	0.317	0.106

1.3 观察指标

1.3.1 疗效

显效:脑电图显示轻度异常,生命体征平稳,神志清晰,语言功能恢复,四肢无力好转,意识较前清楚,日常生活基本无需他人帮助,美国国立卫生研究院卒中量表^[7](National Institute of Health stroke scale, NIHSS)评分降低幅度 $\geq 70\%$;有效:脑电图显示中度异常,日常生活还需其他人协助,NIHSS评分降低幅度30~69%;无效:没有达到显效、有效的标准。

1.3.2 相关指标

治疗前、治疗7 d后,采集患者外周静脉血5 mL,分离血清,检测hs-CRP、APN水平。hs-CRP采用散射比浊法,APN采用化学发光法,试剂盒购自广元山东生物科技有限公司。

检测丙二醛(malondialdehyde, MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(Glutathione peroxidase, GSH-px)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)水平。MDA、GSH-px采用酶联免疫吸附法,SOD采用化学发光法,试剂盒购自罗美(武汉)生物科技有限公司。

检测神经生长因子(nerve growth factor, NGF)、髓鞘碱性蛋白(myelin basic protein, MBP)水平。NGF、MBP采用双抗体夹心法,试剂盒购自艾博抗(上海)贸易有限公司。

1.3.2 神经认知功能

采用NIHSS评估患者神经功能缺损情况^[8],满分42分,分为4个等级:重度、中重度、中度、轻度。脑卒中患者临床神经功能受损度评分(Modified Edinburgh Scandinavian stroke scale, MESSS)^[8],满分45分,分为3个等级:轻度(1~15分)、中度、重度。

1.4 统计学分析

采用SPSS 22.0软件处理数据,计量资料采用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,行 t 检验。计数资料采用 $n(\%)$ 表示,行 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者疗效比较

对照组治疗总有效率较观察组低,比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表2。

表2 两组患者疗效比较 [$n(\%)$]

组别	n	无效	有效	显效	总有效率
观察组	50	6(12.00)	23(46.00)	21(42.00)	44(88.00)
对照组	50	10(20.00)	24(48.00)	16(32.00)	40(80.00)
χ^2 值					1.190
P 值					0.275

2.2 治疗前后两组血清hs-CRP、APN水平比较

治疗前两组的血清hs-CRP、APN水平比较差异无统计学意义($P > 0.05$),治疗7 d后观察组的血清hs-CRP明显低于对照组,血清APN水平明显高于对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表3。

表3 治疗前后两组血清hs-CRP、APN水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	hs-CRP(mg/L)		APN(ng/mL)	
		治疗前	治疗7 d后	治疗前	治疗7 d后
观察组	50	44.78 \pm 10.29	18.29 \pm 5.72	4.07 \pm 0.67	9.93 \pm 1.95
对照组	50	44.91 \pm 11.34	29.12 \pm 6.31	4.21 \pm 0.72	7.68 \pm 1.76
t 值		0.060	8.992	1.007	6.057
P 值		0.952	<0.001	0.317	<0.001

2.3 治疗前后两组应激因子水平比较

治疗前两组的应激因子水平比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。治疗7 d后观察组的血清MDA水平低于对照组,血清SOD、GSH-px水平高于对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表4。

2.4 治疗前后两组血清NGF、MBP水平比较

治疗前两组的血清NGF、MBP水平比较差异无统计学意义($P > 0.05$),治疗7 d后观察组的血清NGF、MBP水平明显高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表5。

表4 治疗前后两组应激因子水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	GSH-px (mmol/L)		MDA (mmol/L)		SOD (U/mL)	
		治疗前	治疗7 d后	治疗前	治疗7 d后	治疗前	治疗7 d后
观察组	50	26.81 \pm 7.23	46.39 \pm 14.29 ^a	9.32 \pm 1.46	5.56 \pm 0.47 ^a	4.05 \pm 0.89	6.63 \pm 1.32 ^a
对照组	50	27.13 \pm 6.89	34.87 \pm 13.34 ^a	9.37 \pm 1.53	7.23 \pm 0.54 ^a	4.14 \pm 0.91	5.27 \pm 1.29 ^a
t 值		0.227	5.210	0.167	16.495	0.500	4.167
P 值		0.821	<0.001	0.868	<0.001	0.618	0.001

注:与治疗前比较^a $P < 0.05$ 。

表5 治疗前后两组血清NGF、MBP水平比较($\bar{x}\pm s$)Table 5 Comparison of serum NGF and MBP levels between the two groups before and after treatment ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	NGF(ng/mL)		MBP(ng/mL)	
		治疗前	治疗7 d后	治疗前	治疗7 d后
观察组	50	15.36±3.15	40.19±8.35	32.28±10.02	59.66±13.08
对照组	50	14.62±3.34	30.57±8.10	35.56±9.85	47.12±10.33
t值		1.140	5.847	1.651	5.320
P值		0.257	<0.001	0.102	<0.001

2.5 治疗前后两组神经认知功能比较

治疗前两组MESSS、NIHSS评分比较差异无统计学意义($P>0.05$)。治疗7 d后观察组MESSS、NIHSS评分低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),见表6。

表6 治疗前后两组神经认知功能比较($\bar{x}\pm s$)Table 6 Comparison of neurocognitive function between the 2 before and after treatment ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	MESSS(分)		NIHSS(分)	
		治疗前	治疗7 d后	治疗前	治疗7 d后
观察组	50	11.78±2.42	5.29±0.98	10.13±2.13	4.86±1.43
对照组	50	12.03±2.19	7.17±1.14	9.95±1.98	6.24±1.87
t值		0.542	8.843	0.438	4.145
P值		0.589	<0.001	0.663	0.001

3 讨论

ACI是血流循环障碍导致缺血缺氧而发生的脑组织坏死,血栓堵塞脑动脉是主要原因,因此溶栓为重要的治疗方法。rt-PA是利用基因重组技术制造的第二代特异性溶栓剂,可以选择性与血栓表面的纤维蛋白原结合,促进纤维蛋白溶解,起效快,且对正常凝血功能无明显影响,安全高效^[9-10]。本研究结果原因可能是因为脑组织对缺血缺氧损害十分的敏感,ACI病灶由中心坏死区域和周围缺血半暗带、外侧低灌注区域组成,长时间的缺血缺氧状态会给脑组织和神经细胞带来不可逆的损伤^[11]。因此溶栓治疗的时间窗越短,可越早改善血栓阻塞造成的缺血缺氧状态,改善血流微循环,增加脑部氧代谢,减少缺血半暗带脑组织坏死的面积,提高治疗效果。

本研究结果说明缩短rt-PA治疗时间窗可减轻患者的炎症损伤。炎症反应是脑梗死的重要病理改变,炎症因子水平异常与血栓的形成有关,而且会加重神经功能损伤^[12-13]。hs-CRP是临床检测常用的炎症指标,当机体受到损伤时短时间内会急剧升高,随着病情好转,而逐渐降低。APN具有抗

炎作用,可抑制动脉粥样硬化,当血管病变时APN可在受损血管壁上沉积,对血管内皮起保护作用。

MDA、SOD是临床检测机体组织氧代谢功能的重要指标。GSH-px可以清除由活性氧诱发的脂质过氧化物,保护细胞膜结构和功能的完整性。脑梗死病人脑部微循环障碍,氧化与抗氧化平衡被打破,出现过多的自由基,诱发脑部细胞损伤^[14]。研究结果表明尽早采用rt-PA溶栓治疗,可减轻病人的氧化应激反应。NGF是促进神经细胞生长、发育、分化、修复的重要因子,NGF水平上升能够抑制毒性氨基酸、氧自由基释放,减少细胞凋亡,从而阻止脑缺血再灌注损伤,减轻继发的病理损害,促进神经细胞损伤修复和营养代谢^[15]。MBP是神经少突细胞和施万细胞分泌的髓鞘蛋白质,主要功能是保护髓鞘、维持髓鞘功能稳定、促进神经髓鞘组织再生^[16]。本研究发现治疗7 d后观察组的NIHSS和MESSS评分低于对照组,说明缩短rt-PA治疗时间窗可促进神经认知功能恢复。ACI起病急、病情进展快,对梗死病灶周围的神经胶质细胞、神经元造成不可逆损伤,故应尽早争取溶栓时间,阻止病情恶化,减少对脑功能组织、神经系统的损伤,有助于认知功能的恢复。

综上所述,发病3 h内接受治疗疗效更佳,越早接受rt-PA治疗越早将血栓溶解,可促进脑部血液流通,改善血液微循环,降低炎症反应,减轻脑组织的氧化应激反应,有助于神经功能的恢复。

参考文献

- [1] Arba F, Inzitari D, Ali M, et al. Small vessel disease and clinical outcomes after IV rtPA treatment [J]. Acta Neurol Scand, 2017, 136(1): 72-77.
- [2] Goldman S, Prior SM, Bembek JP, et al. Activation of blood coagulation and thrombin generation in acute ischemic stroke treated with rtPA [J]. J Thromb Thrombolysis, 2017, 44(3): 362-370.
- [3] Tsvigoulis G, Katsanos AH, Zand R, et al. Antiplatelet pretreatment and outcomes in intravenous thrombolysis for stroke: a systematic review and meta-analysis [J]. J Neurol, 2017, 264(6): 1227-1235.
- [4] Mowla A, Kamal H, Lail NS, et al. Intravenous thrombolysis for acute ischemic stroke in patients with thrombocytopenia [J]. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2017, 26(7): 1414-1418.
- [5] Sagnier S, Galli P, Poli M, et al. The impact of intravenous thrombolysis on outcome of patients with acute ischemic stroke after 90 years old [J]. BMC Geriatr, 2016, 16(1): 156-163.

TLR9 mRNA 表达水平与SLE患者病情及疾病进展的相关性

刘志明* 郜苗苗 邵丽丽 朱翠敏 刘秀芬

[摘要] 目的 探讨Toll样受体9 (TLR9) mRNA表达水平与系统性红斑狼疮(SLE)患者病情及疾病进展的相关性。方法 纳入2016年6月至2018年3月在本院诊断及治疗的SLE患者129例,测定所有受试者TLR9 mRNA表达水平,以TLR9 mRNA表达水平中位数为界值,分为TLR9低表达组($n=62$)和TLR9高表达组($n=62$),记录所有患者临床参数。随访2年后,记录两组患者进展情况,应用Logistic回归分析影响SLE疾病进展的危险因素。结果 129例患者共5例因不同原因失访,共124例患者完成随访的患者中共60例患者发生疾病进展,将其作为进展组,余64例未发生疾病进展的患者作为非进展组;K-M生存分析曲线显示,TLR9高表达组SLE患者2年疾病进展风险高于TLR9低表达组($\chi^2=5.971$, $P=0.015$);Logistic多因素显示持续性蛋白尿($OR=0.083$)、高C反应蛋白水平($OR=0.054$)、TLR9 mRNA高表达($OR=0.090$)是SLE疾病进展危险因素,ROC曲线分析显示,TLR9 mRNA高表达预测SLE患者疾病进展风险的AUC为0.716,特异度为86.56%,敏感度为78.35%高于持续性蛋白尿、C反应蛋白水平($P<0.05$)。结论 持续性蛋白尿、C反应蛋白水平、TLR9 mRNA高表达是SLE患者疾病进展的危险因素,其中TLR9 mRNA高表达可作为预测SLE患者疾病进展风险的重要指标。

[关键词] TLR9 mRNA; 系统性红斑狼疮; 疾病进展; 无进展生存期

Correlation between TLR9 mRNA expression and SLE patients' condition and disease progression

LIU Zhiming*, GAO Miaomiao, SHAO Lili, ZHU Cuimin, LIU Xiufen

(Department of Pediatrics, Cangzhou Central Hospital, Cangzhou, Hebei, China, 061000)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the relationship between the expression level of Toll-like receptor 9 (TLR9) mRNA and the condition and disease progression of patients with systemic lupus erythematosus (SLE) in this study. **Methods** A total of 129 SLE patients diagnosed and treated in our hospital from June 2016 to March 2018 were enrolled, and the TLR9 mRNA expression levels of all subjects were measured. The median TLR9 mRNA expression level was used as the cut-off value, and they were divided into TLR9 low expression groups ($n=62$) and TLR9 high expression group ($n=62$), and the clinical parameters of all patients were recorded. After 2 years of follow-up, the progress of the two groups of patients was recorded, and the risk factors that affected the progression of SLE were analyzed by logistic regression. **Results** A total of 129 patients, 5 cases were lost to follow-up due to different reasons, a total of 124 patients completed follow-up patients, a total of 60 patients had disease progression, which was regarded as the progressive group, and the remaining 64 patients without disease progression were regarded as the non-progressive group. Using the median of TLR9 mRNA expression as the cutoff value, they were divided into the TLR9 low expression group ($n=62$) and the TLR9 high expression group ($n=62$), KM survival analysis curve showed that the two-year risk of disease progression in SLE patients in the TLR9 high expression group was higher than that in the TLR9 low

基金项目:河北省卫生健康委科研基金项目(20200302)

作者单位:沧州市中心医院儿科,河北,沧州 061000

*通信作者:刘志明, E-mail: czyslzm163.com

expression group (log-rank $\chi^2=0.000$, $P<0.015$). Logistic multivariate showed persistent proteinuria ($OR=0.083$) and high C response Protein level ($OR=0.054$) and high TLR9 mRNA expression ($OR=0.090$;) are risk factors for SLE disease progression. ROC curve analysis shows that high TLR9 mRNA expression predicts the risk of disease progression in SLE patients with an AUC of 0.716 and a specificity of 86.56%. The sensitivity was 78.35% higher than that of persistent proteinuria and C-reactive protein ($P<0.05$). **Conclusion** Persistent proteinuria, C-reactive protein levels, and high TLR9 mRNA expression are risk factors for disease progression in SLE patients, and high expression of TLR9 mRNA can be used as an important indicator for predicting the risk of disease progression in SLE patients.

[KEY WORDS] TLR9 mRNA; Systemic lupus erythematosus; Disease progression; Progression-free survival

系统性红斑狼疮(Systemic lupus erythematosus, SLE)是典型的自身免疫性疾病,随着疾病的进展可累及多个脏器,以肾脏损伤最为常见^[1]。在预测 SLE 患者疾病进展及预后方面预测难度大。既往对 SLE 疾病进展的研究主要集中在评估患者临床表现及实验室检查参数方面,但预测效果不尽人意^[2]。随着对 SLE 深入研究证实肾功能不全是 SLE 预后最可靠的预测因子^[3],然而,目前尚无准确预测 SLE 预后的生物标志物。Toll 样受体 9 (Toll-like receptors-9, TLR9)是参与非特异性免疫的重要蛋白质分子,也是连接非特异性免疫和特异性免疫的桥梁,广泛表达于 SLE 患者单核细胞、T 细胞和 B 细胞中的跨膜受体中。也有研究表明,TLR9 mRNA 的表达与 SLE 疾病活动性相关^[4-5]。但少有研究将 TLR9 mRNA 表达水平用于预测 SLE 疾病进展风险的预测,基于此,本研究通过测定 TLR9 mRNA 的表达水平,并探讨其与 SLE 患者疾病进展的相关性。

1 资料和方法

1.1 临床资料

纳入 2016 年 6 月至 2018 年 3 月在本院诊断及治疗的 SLE 患者 129 例。其中男性 3 例,女性 126 例;平均年龄(42.87 ± 9.78)岁;平均病程(6.74 ± 2.12)月。纳入标准:①符合 SLE 诊断标准,并确诊为 SLE 的患者^[6];②入组前未使用类固醇或免疫抑制剂等;③临床资料完整;④签署知情同意书。排除标准:①合并其他器官或组织肿瘤;②合并严重心血管系统疾病;③活动性感染;④依从性差,不配合随访者。本实验经医院伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 治疗方法

所有入组患者均参照 2010 年版中华医学会风湿病学分会制定的《系统性红斑狼疮诊断及治疗

指南》^[7]的治疗方案进行治疗,包括甲基强的松龙 [Pfizer Italia S.r.l.(意大利),批准文号 H20150245] 0.5 mg/kg/d,羟氯喹(上海上药中西制药有限公司,国药准字 H19990263)400 mg/d,环磷酰胺(通化茂祥制药有限公司,国药准字 H22022673)100 mg/2d,霉酚酸盐(上海罗氏制药有限公司,国药准字 H20031277)25 mg/kg/d,环孢素(杭州中美华东制药有限公司,国药准字 H20031277)3 mg/kg/d,甲氨蝶呤(通化茂祥制药有限公司,国药准字 H22022674) 10~15 mg/w,硫唑嘌呤 [Excella GmbH(德国),批准文号 H20170288] 50 mg, 2次/d。

1.2.2 TLR9 mRNA 表达水平测定

收集所有患者在免疫抑制治疗前和 2 年后的外周静脉血样本 2 mL;在 4℃, 1 000 r/min 的条件下离心 10 min,使用总 RNA 提取试剂盒(购自 Thermo Fisher Scientific 公司)进行提取,提取后置于 -80℃ 冰箱保存。使用 TRIzol 从全血中分离总 RNA;使用 BioTek Synergy™ H1 杂交解读器测定 RNA 纯度;使用 Takara Biotechnology 公司生产的 PrimeScript RT 试剂盒将 RNA 样本逆转录为 cDNA;使用 Thermo Fisher Scientific 生产的 SYBR Green PCR Master Mix 试剂盒和 ABI 7500 Real-Time PCR 系统检测 TLR9 mRNA 相对于 GAPDH 的水平;定量测量使用 2^{-ΔΔCt} 方式。引物序列为:TLR9 正向, 5'-CTG CCT TCC TAC CCT GTG AG-3' 和反向, 5'-GGA TGC GGT TGG AGG ACA A-3';GAPDH 正向, 5'-CGG ATT TGG TCG TAT TGG G-3' 和反向, 5'-TCT CGC TCC TGG AAG ATG G-3'。

1.3 观察指标

收集两组患者一般资料包括年龄、性别、BMI 等;实验室检查资料包括持续性蛋白尿、C 反应蛋白水平、IgG、C3、C4、IgA、IgM、SLEDAI、白细胞计数、肾小球滤过率、血清肌酐等。

1.4 随访

两组患者均门诊随访2年,随访项目包括SLE病情及疾病进展情况,对病情加重的患者调整治疗方案,随访截止时间2020年3月17日。疾病进展定义为在随访期间患者出现SLE相关性死亡或活动性疾病。

1.5 统计学处理

采用SPSS 20.0统计软件对数据进行分析,计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,组间比较采用独立样本t检验;计数资料采用 $n(\%)$ 表示,采用 χ^2 检验;采用Logistic回归方程分析SLE病情及疾病进展的独立危险因素,绘制工作特征曲线(ROC)评估TLR9 mRNA的表达水平与SLE病情及疾病进展的相关性,K-M生存曲线分析不同TLR9 mRNA表达水平的SLE患者疾病进展风险;以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SLE患者疾病进展情况及分组

随访2年,截止末次随访时间2020年3月17日,129例患者共5例因不同原因失访,共计124例患者完成随访,共60例患者发生疾病进展,将其作为进展组,余64例未发生疾病进展的患者作为非进展组。

2.2 两组患者临床资料比较

进展组持续性蛋白尿、c反应蛋白水平、TLR9 mRNA高于非进展组,差异有统计学意义($P < 0.05$),其余组间比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表1。

2.3 SLE患者疾病进展风险的预测因素分析

Logistic多因素显示持续性蛋白尿、c反应蛋白水平、TLR9 mRNA表达水平是SLE患者疾病进展风险的独立危险因素。见表2。

2.4 两组患者疾病进展发生风险比较

以TLR9 mRNA表达水平中位数为界值,分为TLR9低表达组($n=62$)和TLR9高表达组($n=62$);K-M生存分析曲线显示,TLR9高表达组SLE患者2年疾病进展风险高于TLR9低表达组(log-rank $\chi^2=5.971, P=0.015$)。见图1。

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

Table 1 Comparison of clinical data between 2 groups

临床资料	进展组 (n=60)	非进展组 (n=64)	χ^2/t 值	P值
年龄(岁)	41.45±10.47	43.19±12.84	0.618	0.539
性别(女/男)	59/1	62/2	0.279	0.597
BMI(kg/m ²)	24.42±3.51	23.25±3.18	1.450	0.152
吸烟	43	38	2.066	0.151
持续性蛋白尿(g/d)	23.75±1.42	12.63±1.87	27.760	<0.001
SBP(mmHg)	146.82±10.81	143.77±10.55	1.186	0.240
DBP(mmHg)	95.33±10.75	93.47±11.68	0.689	0.494
c反应蛋白水平(mg/L)	6.14±1.08	4.80±1.51	4.249	<0.001
IgG	21.76±4.61	22.78±4.72	0.908	0.367
IgA	3.51±0.74	3.84±0.81	1.768	1.768
IgM	1.45±0.34	1.40±0.30	0.647	0.260
C3	0.64±0.17	0.70±0.21	1.306	0.098
C4	0.10±0.03	0.11±0.03	1.384	0.085
白细胞计数	613.18±100.22	649.27±80.57	1.646	1.646
血清胱抑素C(mg/L)	2.52±0.80	2.75±0.71	1.262	0.106
尿酸(μmol/L)	363.89±78.60	389.65±75.87	1.385	0.085
BUN(mmol/L)	8.56±2.61	8.27±2.34	0.485	0.314
SCr(μmol/L)	73.47±22.73	72.85±23.82	0.111	0.111
TLR9 mRNA表达	40451.75±8587.21	26214.77±6132.57	7.905	<0.001

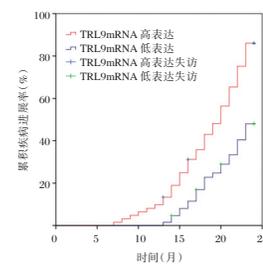


图1 两组患者疾病进展发生风险比较

Figure 1 Comparison of the risk of disease progression between 2 groups

2.5 TLR9 mRNA表达水平预测SLE疾病进展风险的效能

钙蛋白酶-1预测TLR9 mRNA表达水平预测SLE疾病进展风险的AUC为0.958,高于持续性蛋白尿、c反应蛋白水平。见表3、图2。

表2 多因素 Logistic 分析结果

Table 2 Multi-factor Logistic analysis results

相关指标	β 值	S.E.值	Wald值	df值	OR值	95%CI	P值
持续性蛋白尿	-2.377	0.862	7.610	1.000	0.083	0.029~0.546	0.024
c反应蛋白水平	-2.924	1.317	4.929	1.000	0.054	0.054~0.710	0.046
TLR9 mRNA 表达水平	-2.413	0.823	8.416	1.000	0.090	0.018~0.457	0.004
常数	62.310	29.067	4.595	1.000			

表3 *TLR9* mRNA 表达水平预测 SLE 疾病进展风险的效能
Table 3 The efficacy of *TLR9* mRNA expression level in predicting the risk of SLE disease progression

相关指标	AUC	SE 值	95%CI	特异度 (%)	敏感度 (%)
持续性蛋白尿	0.809	0.039	0.744~0.907	74.42	71.24
c 反应蛋白水平	0.787	0.044	0.704~0.855	70.55	66.83
<i>TLR9</i> mRNA 表达水平	0.958	0.011	0.934~0.996	86.56	78.35

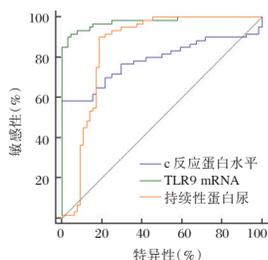


图2 *TLR9* mRNA 表达水平预测 SLE 疾病进展风险的 ROC 曲线

Figure 2 The ROC curve of *TLR9* mRNA expression level predicting the risk of SLE disease progression

3 讨论

SLE 为自身免疫性疾病,发病机制复杂,其确切机制至今尚未完全清楚^[8]。*TLR9* 是存在于一线防御细胞上的一种识别病原体相关分子模式 (pathogen-associated molecular pattern, PAMP) 的受体^[9]。有学者^[10]应用系列 *TLR* 配体刺激 RAW264.7 发现 *TLR* 能够上调免疫反应;*TLR* 通过可能通过某种细胞反应诱发机体自身免疫反应或促进自身免疫性疾病进展。

TLR9 由 *TLR9* mRNA 转录而来,是一种跨膜受体,由含亮氨酸重复序列的胞外区、含半胱氨酸的跨膜区以及具有核心元件的胞内区组成,胞内区结构与白介素-1 型保内结构域高度同源,具高度保守空间结构,直接参与下游信号传导^[11]。既往研究表明^[12-13]*TLR9* 在 SLE 单核细胞、T 细胞和 B 细胞中高表达,活动性 SLE 患者中 *TLR9* 表达较非活动期对照升高。本研究结果提示 *TLR9* 参与了活动性 SLE 的疾病进展机制。

既往研究指出^[14]血管炎、血液异常及肾小球肾炎是 SLE 患者临床无缓解的独立危险因素。研究表明^[15]肾脏、神经功能损伤缓解是 SLE 患者预后良好的独立预测因素。本研究结果与以往结果部分相似,证实肾脏功能受累及 c 反应蛋白水平升高是 SLE 疾病进展的独立危险因素。另发现

TLR9 mRNA 也是 SLE 患者疾病进展的危险因素。ROC 曲线结果说明高水平 *TLR9* mRNA 表达可预测 SLE 患者疾病进展。*TLR9* 在 SLE 发病机制中的作用尚未明确。先前动物研究表明^[16]*TLR9* 的激活可导致 MRL-Fas 狼疮易发小鼠肾炎的进展,可能为 *TLR9* 的激活诱发了自身免疫反应,影响了患者自身抗体的产生。在另一项动物研究中敲除 SLE 小鼠 *TLR9* 后小鼠抗 DNA 成分自身抗体明显减少,主要表现为抗核小体抗体明显减少^[17],而在 SLE 中发现核小体、自身抗体等在 SLE 疾病的发展过程中起着重要作用。*TLR9* 及其信号通路与 SLE 自身抗体的转型有关,在 SLE 小鼠模型中发现自身抗体 IgG_{2a,2b} 亚型是致病的主要亚型^[18],对自身肾小球基底膜、DNA 等是反应性自身抗体。*TLR9* 及其信号通路与自身抗体向 IgG_{2a,2b} 亚型密切相关。*TLR9* 缺失的 SLE 小鼠 IgG_{2a,2b} 亚型水平明显减少,病理损伤明显减轻,生存期也明显延长^[19]。提示 *TLR9* mRNA 的高表达 SLE 患者存在严重的自身免疫反应,自身免疫反应越重,恢复越困难,致患者预后差。

综上所述,持续性蛋白尿、C 反应蛋白水平、*TLR9* mRNA 高表达是 SLE 患者疾病进展的危险因素,*TLR9* 参与了 SLE 的发病机制,*TLR9* mRNA 高表达可能预测 SLE 在 2 年内的进展情况,因此,*TLR9* mRNA 高表达水平可作为预测 SLE 患者疾病进展风险的重要生物标志物。同时本研究还存在不足之处,本研究测量的 *TLR9* mRNA 表达水平是机体在某一时间点的结果,其不代表整个疾病进展时间段。另外由于样本量较少且来源较单一,会影响研究结果,因此后期我们将进行大样本、多中心、连续时间的研究。

参考文献

- [1] 刘芳,陈致瑜,黄广静,等. 诱导 *TLR* 耐受对 SLE 的治疗潜能[J]. 现代免疫学, 2019,39(2):174-176.
- [2] Yuan Y, Zhao L, Ma N, et al. Up-regulated Complement 3 Production by Toll-like receptor 9/Transforming Growth Factor-Beta 1/Complement 3 Pathway in Whole Blood Cells of Lupus Thrombocytopenia[J]. Arch Rheumatol, 2017,32(4): 275-283.
- [3] 兰天,刘巍梦,邹阳,等. MicroRNA-21 表达与糖尿病肾病相关性研究[J]. 华南预防医学, 2019,45(4):376-378.
- [4] 吕君,张洋,艾平,等. 系统性红斑狼疮患者血清中 miR-23b 表达水平与疾病活动性的关系及作用机制[J]. 热带医学杂志, 2020,20(5):663-666,679.

- [5] Xu Y, Shen J, Ran Z. Emerging views of mitophagy in immunity and autoimmune diseases [J]. *Autophagy*, 2020, 16(1):3-17.
- [6] Mande P, Zirak B, Ko WC, et al. Fas ligand promotes an inducible TLR-dependent model of cutaneous lupus-like inflammation[J]. *J Clin Invest*, 2018, 128(7):2966-2978.
- [7] 中华医学会风湿病学分会. 系统性红斑狼疮诊断及治疗指南中华医学会风湿病学分会[J]. *中华风湿病学杂志*, 2010, 14(5):342-346.
- [8] Li XL, Zhang Z, Zhang H. Expression Level of TLR9, but not Hypomethylation, Is Correlated With SLE Disease Activity[J]. *Physiol Res*, 2019, 68(6):973-980.
- [9] Murayama G, Furusawa N, Chiba A, et al. Enhanced IFN- α production is associated with increased TLR7 retention in the lysosomes of plasmacytoid dendritic cells in systemic lupus erythematosus[J]. *Arthritis Res Ther*, 2017, 19(1):234.
- [10] Sakata K, Nakayama S, Miyazaki Y, et al. Up-Regulation of TLR7-Mediated IFN- α Production by Plasmacytoid Dendritic Cells in Patients With Systemic Lupus Erythematosus [J]. *Front Immunol*, 2018, 9:1957.
- [11] 仲华, 王朝辉, 林志强, 等. 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[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2020, 12(11):1565-1569.
- [12] Celhar T, Yasuga H, Lee HY, et al. Toll-Like Receptor 9 Deficiency Breaks Tolerance to RNA-Associated Antigens and Up-Regulates Toll-Like Receptor 7 Protein in Sle1 Mice [J]. *Arthritis Rheumatol*, 2018, 70(10):1597-1609.
- [13] 张明娇, 吴勇. SLE 及 LN 患者血清 C1q 的表达水平及意义 [J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2020, 12(6):827-830.
- [14] 罗小梅, 黄爱良, 范润哥, 等. TLR9-MYD88-TARF6-IRF5 信号通路与系统性红斑狼疮患者疾病活动的相关性研究[J]. *广西医科大学学报*, 2018, 35(3):319-323.
- [15] Yuan Y, Yang M, Wang K, et al. Excessive activation of the TLR9/TGF- β 1/PDGF-B pathway in the peripheral blood of patients with systemic lupus erythematosus [J]. *Arthritis Res Ther*, 2017, 19(1):70.
- [16] 许敏玲, 陈桃, 蔡琪. 糖皮质激素治疗对系统性红斑狼疮患者外周单个核细胞 TLR7 和 TLR9 表达的影响及相关因素分析[J]. *实用医学杂志*, 2019, 35(12):1961-1966.
- [17] Elloumi N, Fakhfakh R, Abida O, et al. Relevant genetic polymorphisms and kidney expression of Toll-like receptor (TLR)-5 and TLR-9 in lupus nephritis [J]. *Clin Exp Immunol*, 2017, 190(3):328-339.
- [18] Murayama G, Furusawa N, Chiba A, et al. Enhanced IFN- α production is associated with increased TLR7 retention in the lysosomes of plasmacytoid dendritic cells in systemic lupus erythematosus[J]. *Arthritis Res Ther*, 2017, 19(1):234.
- [19] Yuan Y, Zhao L, Ye Z, et al. Association of toll-like receptor 9 expression with prognosis of systemic lupus erythematosus [J]. *Exp Ther Med*, 2019, 17(4):3247-3254.

(上接第 988 页)

- [6] Neuberger U, Mohlenbruch MA, Herweh C, et al. Classification of Bleeding Events: Comparison of ECASS III (European Cooperative Acute Stroke Study) and the New Heidelberg Bleeding Classification[J]. *Stroke*, 2017, 48(7):1983-1987.
- [7] 中国卒中学会科学声明专家组. 急性缺血性卒中静脉溶栓: 中国卒中学会科学声明[J]. *中国卒中杂志*, 2017, 12(3):267-284.
- [8] Lyden P. Using the National Institutes of Health Stroke Scale: a cautionary tale[J]. *Stroke*, 2017, 48(2):513-519.
- [9] Tsvigoulis G, Zand R, Katsanos AH, et al. Risk of symptomatic intracerebral hemorrhage after intravenous thrombolysis in patients with acute ischemic stroke and high cerebral microbleed burden: a meta-analysis [J]. *JAMA Neurol*, 2016, 73(6):675-683.
- [10] Luo S, Zhuang M, Zeng W, et al. Intravenous thrombolysis for acute ischemic stroke in patients receiving antiplatelet therapy: a systematic review and meta-analysis of 19 studies [J]. *J Am Heart Assoc*, 2016, 5(5):3242.
- [11] Beard DJ, Logan CL, Mcleod DD, et al. Ischemic penumbra as a trigger for intracranial pressure rise-A potential cause for collateral failure and infarct progression [J]. *J Cereb Blood Flow, Metab*, 2016, 36(5):917-927.
- [12] Sabbaghziarani F, Mortezaee K, Akbari M, et al. Stimulation of neurotrophic factors and inhibition of proinflammatory cytokines by exogenous application of triiodothyronine in the rat model of ischemic stroke [J]. *Cell Biochem Funct*, 2017, 35(1):50-55.
- [13] Zhou L, Zhang J, Wang C, et al. Tanshinone inhibits neuronal cell apoptosis and inflammatory response in cerebral infarction rat model [J]. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 2017, 30(2):123-129.
- [14] Atik I, Kozacı N, Beydilli I, et al. Investigation of oxidant and antioxidant levels in patients with acute stroke in the emergency service [J]. *Am J Emerg Med*, 2016, 34(12):2379-2383.
- [15] 王卓. 注射用鼠神经生长因子联合 rt-PA 静脉溶栓对急性脑梗死患者神经功能及血清 NGF、MBP 水平的影响 [J]. *卒中与神经疾病*, 2019, 26(5):526-530.
- [16] 李月, 郑燎源. 脑胶质瘤患者手术前后血清 S100B、髓鞘碱性蛋白、神经元特异性烯醇化酶水平变化及其临床意义 [J]. *实用医院临床杂志*, 2020, 17(6):127-131.

VEGF、BCRP 蛋白及血清 LDH 与晚期 NSCLC 一线化疗预后的关系

孔佑虔¹ 王小玉¹ 宋爱英² 唐寅^{2*}

[摘要] 目的 分析 VEGF 及 BCRP 蛋白及血清 LDH 与晚期 NSCLC 一线化疗预后的关系。方法 选取本院 2016 年 6 月至 2018 年 6 月间收治的 115 例晚期 NSCLC 患者,收集肿瘤组织及肿瘤旁的正常胃粘膜组织,分别作为癌组织组和癌旁正常组织组。比较 VEGF 及 BCRP 蛋白及血清 LDH 表达情况;统计患者化疗预后;采用多元 Logistic 回归分析影响晚期 NSCLC 患者化疗预后生存的危险因素;采用 ROC 分析 VEGF 及 BCRP 蛋白及血清 LDH 对晚期 NSCLC 患者化疗预后生存的预测价值。结果 癌组织组 VEGF、BCRP 阳性表达率和血清 LDH 水平显著高于癌旁正常组织组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。经两年随访显示,患者 2 年生存率为 31.30%(36/115)。组织中低分化、TNM 分期:Ⅲ+Ⅳ期、淋巴转移、血清 LDH 异常升高、VEGF 及 BCRP 蛋白阳性表达为影响晚期 NSCLC 患者化疗预后生存的独立危险因素($P<0.05$)。ROC 曲线显示:LDH、VEGF 及 BCRP 及三者联合曲线下面积以联合检测最大(0.892)。结论 VEGF 及 BCRP 蛋白及血清 LDH 与晚期 NSCLC 患者化疗及预后密切相关,临床可根据该水平变化制定个体化治疗方案,对延长患者生存期具有重要作用。

[关键词] 血清 LDH; VEGF 蛋白; BCRP 蛋白; 晚期非小细胞肺癌

Relationship between the levels of VEGF, BCRP, serum LDH and the prognosis of advanced non-small cell lung cancer first-line chemotherapy

KONG Youqian¹, WANG Xiaoyu¹, SONG Aiyong², TANG Yin^{2*}

(1. Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin, Heilongjiang, China, 150040; 2. Department of Oncology, First Affiliated Hospital, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin, Heilongjiang, China, 150040)

[ABSTRACT] **Objective** To analyze the relationship between the levels of VEGF, BCRP, serum LDH and the prognosis of patients with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) after first-line chemotherapy. **Methods** 115 patients with advanced NSCLC admitted to this hospital from June 2016 to June 2018 were selected. The tumor tissue and the normal gastric mucosa tissue adjacent to the tumor were collected as the cancer tissue group and the normal tissue adjacent to the cancer group. The levels of serum LDH, VEGF and BCRP protein were measured and compared. The prognosis after first-line chemotherapy in patients with advanced NSCLC was counted. Multivariate logistic regression analysis was used to analyze the risk factors that affect the prognosis survival of patients with advanced NSCLC after chemotherapy. ROC was used to analyze the predictive value of VEGF, BCRP protein and serum LDH for the prognostic survival of patients with advanced NSCLC after chemotherapy. **Results** The positive expression rates of VEGF and BCRP and serum LDH level in the cancer tissue group were significantly higher than those in the adjacent normal tissue group, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). The patients were followed up for two years, and the 2-year survival rate of the patients was 31.30%(36/115). Multivariate logistic regression showed that the

基金项目:黑龙江省中医药管理局 2020 年度科技计划项目(ZHY2020-105)

作者单位:1. 黑龙江中医药大学,黑龙江,哈尔滨 150040

2. 黑龙江中医药大学附属第一医院肿瘤科,黑龙江,哈尔滨 150040

*通信作者:唐寅, E-mail:heartrate@163.com

poor differentiation in tissues, TNM stage: III + IV stage, lymphatic metastasis, abnormal increase in serum LDH, positive expression of VEGF and BCRP protein were independent risk factors affecting the prognosis survival of patients with advanced NSCLC after first-line chemotherapy ($P < 0.05$). The ROC curve showed that the area under the curve of LDH, VEGF, BCRP and the area under the curve of combined test was the largest (0.892). **Conclusion** VEGF, BCRP protein and serum LDH are closely related to chemotherapy and prognosis in patients with advanced NSCLC. Clinically, individualized treatment plans can be formulated based on changes in this level, which plays an important role in prolonging the survival of patients.

[KEY WORDS] Serum LDH; VEGF; BCRP; Advanced non-small cell lung cancer

现临床上对于晚期非小细胞癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)患者的治疗以一线化疗为主,但经临床长期应用发现,该治疗方案中位生存时间较短^[1]。及时明确影响晚期NSCLC患者一线化疗的原因进而采取治疗措施具有重要意义^[2]。乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)是一种酵解酶,广泛存在于机体的各种组织中,在恶性实体瘤中LDH水平明显增高^[3]。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)系肿瘤生长、侵袭及转移相关主要调控因子之一,其表达水平与肿瘤组织及淋巴结转移密切相关^[4]。乳腺癌耐药蛋白(Breast cancer resistance protein, BCRP)是新近发现的ABC亚家族成员之一,有报道显示其在急性白血病、乳腺癌耐药中有一定作用,但在NSCLC中的作用报道甚少^[5]。本文就VEGF及BCRP蛋白及血清LDH与晚期NSCLC一线化疗预后的关系进行研究,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集115例晚期NSCLC患者肿瘤组织及肿瘤旁的正常粘膜组织(距肿瘤组织5 cm处),分别作为癌组织组($n=115$)、癌旁正常组织组,各115例。纳入标准:①所有患者符合美国国家癌症综合网NSCLC治疗指南2008年版^[6],且经病理检查证实;②未接受化疗、放疗等辅助治疗;③本研究患者临床资料均完整;④无其它恶性疾病。排除标准:①合并肝、肾、心脏脏器严重疾病者;②合并严重神经功能、认知功能障碍者;③依从性差者。其中男59例,女56例,平均年龄(60.31 ± 6.65)岁。本研究经医院医学伦理委员会批准,受试家属均签署知情同意书。

1.2 一线化疗方案

GP方案:吉西他滨 100 mg/m^2 , TP方案:多西他赛 175 mg/m^2 , NP方案:长春瑞滨 $25 \sim 30 \text{ ng/m}^2$, 均联合卡铂[按 $\text{AUC}=5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 的剂量估

算,第1天用药];分别于第1、8天各给药1次,21天为1个周期。所有患者至少化疗2个周期。

1.3 检测方法

抽取患者清晨空腹静脉血5 mL,离心($3\ 000 \text{ r/min}$, 10 min)分离血清于EP管中,置于 -80°C 冰箱中待检。采用全自动生分析仪(日立公司7600-10)检测血清LDH水平,操作严格按照说明书进行。

VEGF、BCRP:采集所有研究对象肿瘤组织及肿瘤旁的正常粘膜组织,采用免疫组化法进行检测。VEGF单克隆抗体试剂盒购于北京中山生物技术有限公司;BCRP单克隆抗体购于Chemical公司。免疫组化采用链霉素抗生物素蛋白-过氧化酶连接法(streptavidin-peroxidase, SP)法,SP试剂盒购自北京中山生物科技有限公司。各步骤均严格按照试剂盒说明书进行操作。染色结果判定标准^[7]:以细胞核中出现棕黄色颗粒为VEGF、BCRP阳性染色细胞。每张切片随机选取10个高倍视野,按照阳性细胞的染色数量和显色强度分级评分,取其平均值。细胞染色数量的评分按照阳性细胞计数占同类细胞的百分比,计算该病例的细胞阳性率。本研究从患者治疗开始采用电话、微信等方式随访,随访2年,截止于2020年6月。

1.4 统计学分析

采用SPSS 22.0软件进行分析,计数资料以 $n(\%)$ 表示, χ^2 检验,计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 描述, t 检验;采用多元Logistic回归分析影响晚期NSCLC患者预后生存的危险因素,采用ROC分析血清LDH、VEGF及BCRP蛋白对晚期NSCLC患者一线化疗预后生存的预测价值;以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 VEGF、BCRP、LDH表达情况比较

癌组织组VEGF、BCRP阳性表达率及血清LDH水平显著高于癌旁正常组织组,差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。见表1。

表1 两组 VEGF、BCRP、LDH 表达情况比较 [n(%), (x̄±s)]

Table 1 The expression of VEGF, BCRP and LDH were compared between 2 groups [n(%), (x̄±s)]

组别	n	VEGF		BCRP		LDH(U/L)
		阳性	阴性	阳性	阴性	
癌组织组	115	99(86.08)	16(13.91)	101(87.82)	14(12.17)	239.11±65.52
癌旁正常组织组	115	19(16.52)	96(83.47)	21(18.26)	94(81.73)	169.42±26.15
t/χ²值		111.380		111.718		10.593
P值		<0.001		<0.001		<0.001

2.2 预后情况

经随访显示,患者2年生存率为31.30%(36/115)。

2.3 影响晚期 NSCLC 患者一线化疗预后生存的单因素

患者年龄、性别非影响患者预后生存的相关危险因素(P>0.05),临床分期、分化程度、病理类型、淋巴转移、LDH、VEGF 及 BCRP 蛋白表达为影响患者预后生存的相关危险因素(P<0.05)。见表2。

表2 影响晚期 NSCLC 患者一线化疗预后生存的单因素

Table 2 univariate analysis of prognostic factors in patients with advanced NSCLC after first-line chemotherapy

临床特征	例数 (n=115)	生存 (n=36)	死亡 (n=79)	χ²值	P值
年龄(岁)					
≥60	57	16(44.44)	41(51.90)	0.550	0.458
<60	58	20(55.56)	38(48.10)		
性别					
男	59	18(50.00)	41(51.90)	0.036	0.850
女	56	18(50.00)	38(48.10)		
分化程度					
中低分化	63	8(22.22)	55(69.62)	22.429	<0.001
高分化	52	28(77.78)	24(30.38)		
临床分期分期					
I+II	51	25(69.44)	26(32.91)	13.374	<0.001
III+IV	64	11(30.56)	53(67.09)		
BCRP					
阳性	101	22(61.11)	79(100.00)	34.981	0.016
阴性	14	14(38.89)	0(0.00)		
淋巴转移					
有	66	2(5.56)	64(81.01)	57.582	<0.001
无	49	34(94.44)	15(18.99)		
VEGF					
阳性	99	20(55.56)	79(100.00)	40.786	<0.001
阴性	16	16(44.44)	0(0.00)		
LDH(U/L)					
正常	23	21(58.33)	2(2.53)	48.129	<0.001
异常升高	92	15(41.67)	77(97.47)		
病理类型					
鳞癌	72	6(16.67)	66(83.54)	47.429	<0.001
非鳞癌	43	30(83.33)	13(16.46)		

2.4 影响晚期 NSCLC 患者一线化疗预后生存的多因素分析

组织中低分化、TNM分期: III+IV期、淋巴转

移、血清 LDH 异常升高、VEGF 及 BCRP 蛋白阳性表达为影响晚期 NSCLC 患者一线化疗预后生存的独立危险因素(P<0.05)。见表3。

表3 影响晚期 NSCLC 患者一线化疗预后生存的多因素

Table 3 multivariate analysis of prognostic factors in patients with advanced NSCLC after first-line chemotherapy

影响因素	回归系数	标准误	Wald χ²值	OR	95%CI	P值
病理类型:鳞癌	0.151	0.335	1.264	1.16	0.60~2.24	0.172
分化程度:中低分化	0.546	0.137	3.322	1.73	1.32~2.26	0.003
TNM分期: III+IV期	0.861	0.142	3.793	2.37	1.79~3.12	0.001
淋巴转移	0.951	0.184	3.462	2.59	1.80~3.71	0.001
LDH(U/L)异常升高	0.694	0.241	3.338	2.00	1.25~3.21	0.009
BCRP 阳性	0.769	0.153	3.946	2.16	1.60~2.91	0.016
VEGF 阳性	0.915	0.205	3.811	2.49	1.67~3.73	0.008

2.5 VEGF 及 BCRP 蛋白及血清 LDH 对晚期 NSCLC 患者一线化疗预后生存的预测价值

LDH、VEGF 及 BCRP 及三者联合曲线下面积分别为 0.882、0.683、0.650、0.892,各指标曲线下面积以联合检测最大。见表4、图1。

表4 VEGF、BCRP 蛋白及血清 LDH 对晚期 NSCLC 患者一线化疗预后生存的预测价值

Table 4 Prognostic value of VEGF, BCRP protein and serum LDH in patients with advanced NSCLC after first-line chemotherapy

预测指标	最佳临界值	敏感度 (%)	特异性 (%)	AUC	95%CI
LDH	26.13	0.621	0.624	0.882	0.771~0.993
VEGF	25.34	0.713	0.721	0.683	0.501~0.866
BCRP	26.48	0.746	0.752	0.650	0.462~0.838
LDH、VEGF 及 BCRP 联合检测	27.62	0.894	0.898	0.892	0.771~1.000

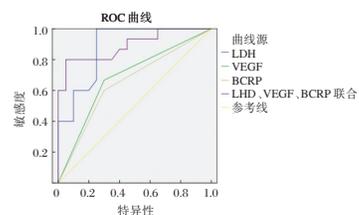


图1 ROC 分析

Figure 1 ROC analysis

3 讨论

一线化疗是近年来肺癌治疗的领域突破,使 NSCLC 的治疗方法有了长足的进展,但部分患者治疗效果仍不理想,影响预后。因此,寻求有效治疗靶点对改善晚期 NSCLC 患者一线化疗预后具有重要意义^[8]。

BCRP 是 ABC 转运蛋白超家族成员之一,目前,临床认为其可通过自身形成二聚体参与肿瘤进展而发挥作用^[9]。相关研究证实 BCRP 细胞株对依托泊甙、多柔比星等多种化疗药耐药,且与急性白血病、小细胞肺癌、乳腺癌等多种肿瘤对化疗的敏感性有关^[9]。本研究结果说明 BCRP 是影响晚期癌症患者无进展生存期及总生存期的重要预后因素^[10]。

VEGF 是目前认为作用最强、特异性最高的血管生成调控因子,可特异作用于血管内皮细胞,促进其增殖及新生血管形成,增加血管通透性。相关研究发现,低分化肺癌 VEGF 阳性表达率明显高于高分化肺癌,认为 VEGF 的表达水平与肿瘤组织血管生成程度有关,并和肿瘤的恶性程度显著相关^[11]。同时, Tanaka 等^[12]研究显示, VEGF 可促使肿瘤血管生成使肿瘤体积增加,肿瘤细胞通过静脉淋巴管吻合处从血液循环中进入淋巴管,与肿瘤淋巴结转移的概率随血液循环中肿瘤细胞的增加而增高, VEGF 对淋巴结转移具有间接促进作用。类似的, Hirabae 等^[13]研究显示, VEGF 表达与肺癌淋巴结转移有密切关系,可通过转导 VEGF 反义核苷酸降低 VEGF 表达,使肺癌淋巴结转移降低。本研究显示, VEGF 阳性与晚期 NSCLC 患者一线化疗预后生存密切相关,说明 VEGF 表达水平对临床治疗及预后具有重要指导意义。

LDH 属氢转移酶,可催化乳酸氧化成丙酮酸,与细胞代谢、缺氧、无氧酵解、活性状态和恶性转化等密切相关。研究发现,肿瘤细胞坏死后,体内代谢转换率加快,细胞膜通透性改变,使组织酶入血,导致血清 LDH 活性增加^[14]。进展期胰腺癌患者予以治疗后显示,完全缓解后血清 LDH 水平明显降低,提示肿瘤代谢降低,细胞膜通透性恢复^[15]。本研究结果说明血清 LDH 升高对反映肿瘤负荷情况具有重要作用。ROC 曲线分析,结果显示 VEGF 及 BCRP 蛋白及血清 LDH 联合检测下面积最大,特异、敏感度高。进一步提示联合检测对晚期 NSCLC

患者一线化疗预后具有重要意义,临床可通过联合检测多项指标提高对晚期 NSCLC 患者一线化疗预后的评估价值。

综上所述, VEGF 及 BCRP 蛋白及血清 LDH 与晚期 NSCLC 患者一线化疗预后密切相关,临床可根据该水平变化制定个体化治疗方案,对延长患者生存期具有重要作用。

参考文献

- [1] 田春艳,李馥郁,杨晋,等.吉非替尼联合吉西他滨和顺铂化疗方案治疗晚期非小细胞肺癌临床疗效及对血清肿瘤标志物的影响[J].解放军医药杂志,2018,30(4):31-34.
- [2] 张慧芳,马金沙,李璐,等. EGFR-TKIs 一线治疗晚期非小细胞肺癌的有效性和安全性比较:网状 Meta 分析[J].中华疾病控制杂志,2020,24(2):92-98.
- [3] Imakita T, Matsumoto H, Hirano K, et al. Impact on prognosis of rebiopsy in advanced non-small cell lung cancer patients after epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor treatment: a systematic review [J]. BMC Cancer, 2019, 19(1):385-389.
- [4] An TX, Qin SH, Sun DH, et al. Unique Protein Profiles of Extracellular Vesicles as Diagnostic Biomarkers for Early and Advanced Non-Small Cell Lung Cancer [J]. Proteomics, 2019, 26(9):408-411.
- [5] Wu YL, Zhao Q, Deng L, et al. Leptomeningeal metastasis after effective first-generation EGFR TKI treatment of advanced non-small cell lung cancer [J]. Lung Cancer, 2019, 12(2):1-5.
- [6] 石远凯. 美国国家癌症综合网非小细胞肺癌治疗指南 2008 年第二版介绍[J]. 中华肿瘤杂志, 2016, 30(5):397-400.
- [7] Soetandyo N, Hanafi AR, Agustini S, et al. Prognosis of advanced stage non-small-cell lung cancer patients receiving chemotherapy: adenocarcinoma versus squamous cell carcinoma [J]. Med J Indon, 2020, 29(1):26-31.
- [8] Yoshimura A, Uchino J, Hasegawa K, et al. Carcinoembryonic antigen and CYFRA 21-1 responses as prognostic factors in advanced non-small cell lung cancer [J]. Transl Lung Cancer Res, 2019, 8(3):227-234.
- [9] 王鹏,李莉,张初峰,等. 多西他赛±铂类二线治疗 78 例晚期非小细胞肺癌临床观察[J]. 中华肿瘤防治杂志 2020, 27(9):745-749.
- [10] Oyanagi J, Koh Y, Sato K, et al. Predictive value of serum protein levels in patients with advanced non-small cell lung cancer treated with nivolumab [J]. Lung Cancer, 2019, 12(1):172-175.
- [11] Ren H, Hu Y, Xie T, et al. Effect of gefitinib on serum EGFR and CYFRA211 in patients with advanced nonsmall cell lung cancer [J]. Oncol Lett, 2019, 18(4):4167-4175.

CRP/PA、LDH预测儿童细菌性脑膜炎预后的效能分析

梁森全* 莫庆仪 梁桂明 黄晓雯 葛晓宁

[摘要] **目的** 探讨C反应蛋白与前白蛋白比值(CRP/PA)、预测儿童细菌性脑膜炎(BM)预后的效能。**方法** 选取南方医科大学附属中山博爱医院收治的135例BM患儿,根据预后效果不同分为病死组($n=16$)、生存组($n=119$)。比较两组一般资料、治疗方案、CRP/PA、LDH水平, Spearman、Logistic回归方程、受试者工作特征曲线(ROC)分析数据。**结果** 两组病情程度比较,差异有统计学意义($P<0.05$);病死组CRP/PA、LDH高于生存组,差异有统计学意义($P<0.05$);CRP/PA、LDH与病情程度呈正相关($P<0.05$);Logistic回归方程分析,将病情程度控制后,CRP/PA、LDH仍与预后相关($P<0.05$);ROC分析,CRP/PA+LDH预测儿童BM预后的AUC为0.932,高于单一指标预测($P<0.05$)。**结论** BM患儿CRP/PA、LDH显著升高且与病情程度密切相关,三者联合检测可为临床评估预后提供参考,便于及时完善治疗方案。

[关键词] C反应蛋白;前白蛋白;胆碱酯酶;乳酸脱氢酶;儿童;细菌性脑膜炎

Analysis of the efficacy of CRP/PA and LDH in predicting the prognosis of children with bacterial meningitis

LIANG Senquan*, MO Qingyi, LIANG Guiming, HUANG Xiaowen, GE Xiaoning

(Department of Pediatrics, Zhongshan Boai Hospital Affiliated to Southern Medical University, Zhongshan, Guangdong, China, 528403)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the prognosis of C-reactive protein to prealbumin ratio (CRP/PA) and lactate dehydrogenase (LDH) in predicting the prognosis of bacterial meningitis (BM) in children. **Methods** A total of 135 children with BM admitted to Zhongshan Boai Hospital Affiliated to Southern Medical University were selected and divided into the death group ($n=16$) and the survival group ($n=119$) according to their different prognostic effects. The general information, treatment plan, CRP/PA, and LDH levels of the two groups were compared. Spearman, logistic regression equation, receiver operating characteristic curve (ROC) were used to analyze the data. **Results** There was a statistically significant difference in the degree of disease between the two groups ($P<0.05$). CRP/PA and LDH in the death group were higher than those in the survival group ($P<0.05$). CRP/PA, LDH were positively correlated with the severity of the disease ($P<0.05$). Logistic regression equation analysis showed that CRP/PA and LDH were still related to the prognosis after controlling the severity of the disease ($P<0.05$). The ROC analysis showed that the AUC of CRP/PA+LDH predicting the prognosis of children with BM was 0.932, which was higher than the single indicator prediction ($P<0.05$). **Conclusion** CRP/PA and LDH in children with BM are significantly increased and are closely related to the severity of the disease. The combined detection of the three can provide references for clinical evaluation of prognosis and facilitate timely improvement of treatment plan.

[KEY WORDS] C-reactive protein; Prealbumin; Cholinesterase; Lactate dehydrogenase; Children; Bacterial meningitis

基金名称:广东省医学科学技术研究基金(20161141551612)

作者单位:南方医科大学附属中山博爱医院儿科,广东,中山528400

*通信作者:梁森全, E-mail:li1998abc@163.com

细菌性脑膜炎(Bacterial meningitis, BM)是细菌感染所致中枢神经系统疾病,而儿童群体因各项生理机能发育尚未成熟,成为此疾病的多发、常见群体^[1]。数据显示,发达国家儿童BM病死率约5%,病残率约15%,而发展中国家病死率达15%,病残率超过25%^[2]。目前儿童BM尚无特异性治疗方案,因此,有效诊断、尽早识别预后是积极完善治疗方案,降低病死、病残风险的重要环节。C反应蛋白(C-reactive protein, CRP)是肝细胞所合成急性时相反应蛋白,其在感染性疾病诊断、病情转归评价中有重要价值;前白蛋白(Prealbumin, PA)是肝细胞生成的快速转运蛋白之一,是一种非特异性防御物质,可在清除有害物质时被消耗,而CRP/PA更能客观反映机体炎症反应^[3];乳酸脱氢酶(Lactate dehydrogenase, LDH)是葡萄糖酵解过程重要酶,广泛分布在体液及各组织内,且感染时细胞内LDH可大量释放至细胞外,为临床评价病情特征提供参考^[4]。本研究首次探讨CRP/PA、LDH在儿童BM预后中的预测价值,为临床完善相关诊疗机制提供参考。现报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2015年1月至2020年6月南方医科大学附属中山博爱医院收治的135例BM患儿,根据预后效果不同分为病死组($n=16$)、生存组($n=119$)。纳入标准:符合《儿童社区获得性细菌性脑膜炎诊断与治疗专家共识》BM诊断标准^[5];均明确感冒、发热史,伴不同程度头痛、呕吐、抽搐、意识障碍等典型症状;年龄1d~10岁;首次确诊,且入组前无相关治疗史;无凝血系统疾病;家属知情同意。排除标准:伴其他神经系统疾病、肿瘤疾病、血液系统疾病者;有结核感染类疾病者;存在真菌、病毒等感染者;合并其他部位感染者。本实验经伦理委员会批准。

1.2 方法

①治疗方法:135例BM患儿均予以对症支持治疗及病因治疗,包括保证休息、补充营养、维持水及电解质稳定、预防呕吐误吸、预防惊厥咬舌、物理降温、吸氧治疗等,同时予以抗感染治疗,其中58例予以利奈唑胺(Fresenivis Kabi Norge As, Norway,生产批号:19J31U33)联合美平(住友制药有限公司,Sumitomo Dainippon Pharma Co, Ltd,生产批号:2395C)或头孢曲松(上海罗氏制药有限公

司,生产批号:SH6065)治疗,利奈唑胺,10 mg/(kg·次),q8h,静滴;美平,40 mg/(kg·次),q8h,静滴;头孢曲松,100 mg/(kg·次),qd,静滴;其中77例采取万古霉素(浙江医药股份有限公司新昌制药厂,生产批号:113190815)联合美平或头孢曲松治疗,美平或头孢曲松用法用量同上,万古霉素,1万U/(kg·次),q6h,静滴。治疗效果判定:根据1个月内治疗情况分生存、病死。②生化指标检测方法:治疗前采用非抗凝真空管采集股静脉血2 mL,离心(半径10 cm,转速3 500 r/min,时间15 min),采集上层血清,上海科华生物工程股份有限公司乳酸法检测试剂盒测LDH水平;广州科方生物技术股份有限公司免疫比浊法试剂盒测CRP、PA水平,计算CRP/PA值。

病情程度判定标准^[6]:轻度、中度、重度。

1.3 观察指标

①统计135例BM患儿1个月内治疗情况,分组对比不同治疗情况患儿一般资料、治疗方案。②两组CRP/PA、LDH比较。③分析CRP/PA、LDH与病情程度相关性。④Logistic回归方程分析预后影响因素。⑤CRP/PA、LDH预测预后的

1.4 统计学处理

采用统计学软件SPSS 22.0处理数据,计数资料 $n(\%)$ 描述,采用 χ^2 检验,计量资料采取Bartlett方差齐性检验与Kolmogorov-Smirnov正态性检验,均确认具备方差齐性且近似服从正态分布,以 $(\bar{x} \pm s)$ 描述,两组间比较采用独立样本 t 检验;Spearman、Logistic回归分析模型分析变量间关系;受试者工作特征曲线(ROC)分析预测儿童BM预后的价值。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组一般资料比较

两组年龄、性别、体质量、治疗方案比较,差异无统计学意义($P>0.05$);两组病情程度比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表1。

2.2 两组CRP/PA、LDH比较

病死组CRP/PA、LDH高于生存组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表2。

2.3 CRP/PA、LDH与病情程度相关性

Spearman相关性分析结果显示,CRP/PA($r=0.745, P<0.001$)、LDH($r=0.594, P<0.001$)与病情程度呈正相关。见图1。

表1 两组一般资料对比 [n(%), ($\bar{x}\pm s$)]

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

资料	病死组 (n=16)	生存组 (n=119)	t/ χ^2 值	P值
年龄(岁)	4.76±1.47	5.33±1.89	0.141	0.708
性别				
男	7(43.75)	58(48.74)		
女	9(56.25)	61(51.26)	0.141	0.708
体质量(kg)	16.94±4.92	18.15±5.19	0.881	0.380
病情程度				
轻度	0(0.00)	11(9.24)		
中度	5(31.25)	72(60.50)	2.692	0.007
重度	11(68.75)	36(30.25)		
治疗方案				
利奈唑胺	7(43.75)	51(42.86)	0.005	0.946
万古霉素	9(56.25)	68(57.14)	0.005	0.946
美罗培南	11(68.75)	87(73.11)	0.005	0.945
头孢曲松	13(81.25)	100(84.03)	0.006	0.938

表2 两组CRP/PA、LDH比较 ($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Comparison of CRP/PA, LDH between 2 groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	CRP/PA	LDH(U/L)
病死组	16	0.84±0.25	418.79±125.47
生存组	119	0.42±0.12	314.88±102.03
t值		11.202	3.719
P值		<0.001	0.003

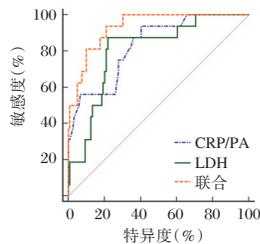


图1 CRP/PA、LDH预测预后的ROC

Figure 1 ROC of CRP/PA, LDH predicting prognosis

2.4 预后影响因素的Logistic回归方程分析

以预后情况为因变量,0=生存,1=病死;由于各自变量为连续变量,为便于统计数据,参考各指标均值进行分层,将CRP/PA、LDH转化为二分类变量,采用二分类Logistic回归方程分析,结果显示,将病情程度控制后,CRP/PA、LDH仍与预后相关($P<0.05$)。见表3。

表3 预后影响因素的Logistic回归方程分析

Table 3 Logistic regression equation analysis of prognostic factors

影响因素	赋值	β 值	SE值	Wald χ^2	OR值	95%CI	P值
CRP/PA							
≤ 0.47	1				1		
> 0.47	2	0.606	0.186	10.629	1.834	1.335~2.519	<0.001
LDH							
≤ 327.20 U/L	1				1		
> 327.20 U/L	2	1.441	0.356	16.387	4.225	3.918~4.557	<0.001

2.5 CRP/PA、LDH预测预后的ROC

阳性样本:病死组;阴性样本:生存组;绘制CRP/PA、LDH单独预测儿童BM预后的ROC,结果显示,CRP/PA、LDH预测预后的AUC依次为0.832、0.805;采用Logistic二元回归对CRP/PA、LDH单独预测预后的ROC进行拟合,分析各指标联合预测预后的ROC,结果显示,CRP/PA+LDH预测预后的AUC为0.932。见表4。

表4 ROC分析结果

Table 4 ROC analysis results

指标	AUC	95%CI	cut-off值	敏感度(%)	特异度(%)	P值
CRP/PA	0.832	0.758~0.891	>0.58	93.75	59.66	<0.001
LDH	0.805	0.728~0.868	>396.91 U/L	87.50	78.15	<0.001
联合	0.932	0.876~0.968		90.75	78.99	<0.001

3 讨论

儿童BM多由革兰阳性菌、革兰阴性菌感染诱发。目前抗感染及对症支持治疗是儿童BM主要治疗手段,但当前尚缺乏儿童BM预后有效的评估机制,不便于临床及时完善治疗方案。因此,积极完善相关预警机制显得尤为重要。

CRP是急性时相蛋白重要成员之一,其生成量与炎症反应关系密不可分,常被作为炎症标志物。PA是近年研究较多的一种由肝细胞生成的血浆白蛋白,其半衰期较短,与同类因子对比,在血清中水平变化更加敏感,能更早、更迅速反映机体异常情况。相关研究指出,机体应激反应程度与血清CRP水平呈正相关,与PA水平呈负相关,且CRP/PA能客观反映全身炎症反应及并发症发生风险,为临床评估病情提供参考^[7-8]。基于BM可诱发机体产生强应激反应及炎症反应,本研究对BM患儿血清CRP/PA检测发现,病死组CRP/PA高于生存组,此符合CRP、PA生理特性,受细菌感染影响,CRP大量生成以激活补体、加强吞噬细胞吞噬活性,而PA作为机体营养评价指标,在儿童BM发病后可致其合成降低,同时作为非特异性宿主防御蛋白,在机体清除感染时可被利用消耗,因此,整体表现CRP/PA升高^[9-10]。本研究还发现,CRP/PA与BM患儿病情程度呈正相关,提示CRP/PA或可为临床评价儿童BM病情提供参考。

LDH主要分布在心、肾、骨骼肌等组织内,但近年相继有研究^[11-12]显示,在中枢神经系统感染性疾病中血清LDH水平显著升高。本研究也发现,

病死组 LDH 高于生存组,但目前 LDH 升高的具体机制尚未明确,分析可能是 BM 急性期伴随大量细菌侵入机体,所产生毒素通过刺激机体生成抗炎因子而促进 LDH 释放入血;BM 发病后可能会继发心肌损害造成 LDH 大量生成并释放至细胞外;当儿童 BM 发病时脑神经组织细胞短时间内出现缺氧、缺血等病理性改变,可刺激细胞大量生成 LDH 并扩散至脑脊液,同时在炎性损害刺激下,血脑屏障系统通透性改变,LDH 持续进入外周血系统,同样说明 BM 患儿血清 LDH 升高可能与病情有关^[13]。

Spearman 分析发现,CRP/PA、LDH 均与儿童 BM 病情存在密切关系。基于病死患儿多病情危重,因此,CRP/PA、LDH 或可为临床评估预后提供参考。但还有研究指出,儿童 BM 病情转归是多因素、多过程参与的结果,病情程度等均与患儿预后有关^[14-15]。本研究进一步采用 Logistic 回归方程控制病情程度后发现,CRP/PA、LDH 仍与 BM 患儿预后相关,且 CRP/PA+LDH 预测预后的 AUC 为 0.932,大于单独指标预测,客观说明此方案可为临床评估儿童 BM 预后提供客观依据。但本研究不足在于 CRP/PA、LDH 变化同样受多过程调控,其对应调控机制是否可作为临床治疗儿童 BM 的新途径尚未明确,仍需后期继续探究。

综上所述,BM 患儿 CRP/PA、LDH 显著升高且与病情程度密切相关,三者联合检测可为临床评估预后提供参考,便于及时完善治疗方案。

参考文献

- [1] 吴丽文,韩蔚,王国丽,等. 中西部地区儿童细菌性脑膜炎的病原学及诊断分析[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2018, 33(10):778-782.
- [2] 张惠琴,张静静,陶小娟,等. 儿童细菌性脑膜炎的临床特征及预后不良危险因素分析[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2016, 31(24):1859-1862.
- [3] 金霞霞,徐玖飞,王静,等. 高敏 C 反应蛋白/白蛋白比值与复发性脑梗死的关系[J]. 天津医药, 2020, 48(4): 298-301.
- [4] 李会东,邢柏. 乳酸脱氢酶对感染性休克患者预后的评估价值[J]. 中国急救医学, 2019, 39(3):211-215.
- [5] 中华医学会儿科学分会神经学组. 儿童社区获得性细菌性脑膜炎诊断与治疗专家共识[J]. 中华儿科杂志, 2019, 57(8):584-591.
- [6] 邱春芳,吴健锋,裴飞,等. 血浆氧化应激因子水平与脓毒症患者预后的相关性研究[J]. 中华危重病急救医学, 2019, 31(7):847-851.
- [7] 相前,李缨,宣琪,等. CRP 与 PA 比值对脓毒症患者评估预后的价值[J]. 山西医科大学学报, 2019, 50(1):102-105.
- [8] de Blauw D, Bruning A, Vijn LJ, et al. Blood and cerebrospinal fluid characteristics in neonates with a suspected central nervous system infection [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2019, 98(25):e16079.
- [9] 易继涛,王从平,贾敏. IFN- γ 、TNF- α 、降钙素原和 C-反应蛋白水平在细菌性脑膜炎早期诊断中的意义[J]. 神经损伤与功能重建, 2018, 13(3):122-124.
- [10] 陈颖,徐晓红,胡琦音,等. MRI 联合脑脊液天门冬氨酸氨基转移酶、乳酸脱氢酶、 β -2-微球蛋白诊断新生儿化脓性脑膜炎的效果研究[J]. 中国妇幼保健, 2020, 35(17): 3205-3208.
- [11] Li H, Xiao R, Javed R, et al. Evaluation of cerebrospinal fluid and blood parameters finding in early diagnosis and drug therapy of suspected bacterial meningitis in neonates [J]. *J Res Med Sci*, 2020, 25(1):77.
- [12] 夏桂丽,李兴鹏,费娅丽,等. MSCT 联合脑脊液检查对中枢性神经系统感染的诊断鉴别价值[J]. 中国 CT 和 MRI 杂志, 2021, 19(1):28-30.
- [13] 颜慧恒,李晖,王艳丽,等. 不同情况新生儿细菌性脑膜炎的住院情况及近期预后分析[J]. 广东医学, 2018, 39(24): 3635-3639.
- [14] 陈娇娇,何玲君. 化脓性脑膜炎患儿近期预后不良的危险因素调查分析[J]. 中国妇幼保健, 2019, 34(21):4929-4931.
- [15] 徐雪勤,马永磊,杨喜勇. 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[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(6):741-745.

(上接第 997 页)

- [12] Tanaka H, Taima K, Makiguchi T, et al. Activity and bioavailability of tepotinib for leptomeningeal metastasis of NSCLC with MET exon 14 skipping mutation [J]. *Cancer Commun*, 2021, 13(4):507-509.
- [13] Hirabae A, Ichihara E, Sunami R, et al. Rapid Disease Progression of Advanced Non-small Cell Lung Cancer Five Months after Cessation of Pembrolizumab [J]. *Acta Med Okayama*, 2020, 74(5):423-425.
- [14] 谭于飞,麻恒翔,赵兵,等. 靶动脉灌注维拉帕米和化疗药物治疗中晚期非小细胞肺癌的疗效分析[J]. 中华肿瘤杂志, 2020, 42(6):486-490.
- [15] Chan SWS, Smith E. Next Generation of Advanced Non-small Cell Lung Cancer Therapy: Targeted and Immuno-Therapies [J]. *Int J Med Students*, 2020, 8(1):26-32.

b-FGF、TGF- β 1、microRNA-34a与慢性乙型肝炎肝纤维化程度的相关性

李园园^{1,2*} 苏峰² 王艳² 栾兴龙^{2*}

[摘要] 目的 分析血清碱性成纤维细胞生长因子(b-FGF)、转化生长因子- β 1(TGF- β 1)、微小RNA(miRNA)-34a与慢性乙型肝炎(CHB)肝纤维化的相关性。方法 选取2018年9月至2020年9月本院收治的180例CHB患者作为CHB组,依据肝脏硬度测量值(LSM)将患者分为轻度肝纤维化组43例、中度肝纤维化组78例、重度肝纤维化组59例,同时选取170例同期于本院接受健康体检且结果正常者作为对照组。对比各组间b-FGF、TGF- β 1及microRNA-34a表达差异,采用Pearson相关性分析b-FGF、TGF- β 1及microRNA-34a水平与CHB肝纤维化的相关性。结果 CHB组血清b-FGF、TGF- β 1、microRNA-34a水平高于对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。不同肝纤维化程度患者b-FGF、TGF- β 1、microRNA-34a水平比较:轻度纤维化组<中度纤维化组<重度纤维化组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。CHB患者b-FGF、TGF- β 1、microRNA-34a水平与LSM呈正相关($P<0.05$)。结论 b-FGF、TGF- β 1及microRNA-34a表达与CHB纤维化程度呈显著相关性,联合检测三者表达情况对CHB病情和纤维化具有一定的诊断价值。

[关键词] b-FGF; TGF- β 1; microRNA-34a; 慢性乙型肝炎; 肝纤维化

Correlation between b-FGF, TGF- β 1, microRNA-34a and the degree of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis B

LI Yuanyuan^{1,2*}, SU Feng², WANG Yan², LUAN Xinglong

(1. Department of Gastroenterology, Huxi Hospital Affiliated of Jining Medical College, Heze, Shandong, China, 274000; 2. Department of Gastroenterology, Shan County Central Hospital, Heze, Shandong, China, 274000)

[ABSTRACT] **Objective** To analyze the correlation between the serum basic fibroblast growth factor (b-FGF), transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) and microRNA (miRNA)-34a and the liver fibrosis in patients with chronic hepatitis B (CHB). **Methods** The 180 CHB patients admitted to this hospital from September 2018 to September 2020 were selected as the CHB group. According to the liver stiffness measurement (LSM), the patients were divided into a mild liver fibrosis group with 43 cases and a moderate liver group, and a severe liver fibrosis group with 59 cases. At the same time, 170 cases were selected as the control group who received a health checkup in this hospital during the same period. The differences in the levels of b-FGF, TGF- β 1 and microRNA-34a among the groups were compared, and the correlation between b-FGF, TGF- β 1 and microRNA-34a levels and CHB liver fibrosis was analyzed by Pearson correlation. **Results** The levels of serum b-FGF, TGF- β 1 and microRNA-34a in the CHB group were higher than those in the control group, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). The levels of b-FGF, TGF- β 1 and microRNA-34a in patients with different degrees of liver fibrosis were as follows: the mild fibrosis group<the moderate

基金项目:山东省医药卫生科技发展计划项目(2018ws135)

作者单位:1.济宁医学院附属湖西医院消化内科,山东,菏泽 274000

2.单县中心医院消化内科,山东,菏泽 274000

*通信作者:李园园, E-mail:long980322@163.com

fibrosis group <the severe fibrosis group. The difference was statistically significant ($P<0.05$). The levels of b-FGF, TGF- β 1 and microRNA-34a in CHB patients were positively correlated with LSM, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** The expressions of b-FGF, TGF- β 1 and microRNA-34a are significantly correlated with the degree of CHB fibrosis. The combined detection of the three expressions has certain diagnostic value for CHB disease and fibrosis.

[KEY WORDS] b-FGF; TGF- β 1; MicroRNA-34a; Chronic hepatitis B; Liver fibrosis

慢性乙型肝炎(chronic viral hepatitis B, CHB)主要由乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)长期感染引起,是世界范围内的重大公共卫生问题之一。CHB病程较长时可引起患者肝细胞损伤,并使肝脏出现纤维化甚至肝硬化^[1]。肝硬化是诱发肝癌最常见的原因,相关研究显示,通过对慢性乙肝患者不同肝纤维化程度进行区分诊断,及时监测肝纤维化进展,进行恰当的干预可使疾病进展减缓或稳定在一定阶段,对延长慢性乙肝患者的生存时间和改善生活质量有重要意义^[2]。在CHB患者肝细胞破坏、肝纤维化形成的过程中碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, b-FGF)和转化生长因子- β 1(transforming growth factor - β , TGF- β 1)的作用逐渐受到关注^[3]。此外,微小RNA(microRNA, miRNA)作为重要的调控分子,是分子水平上监测疾病进展的敏感指标^[4]。miR-34家族包含由两种不同基因编码的三个microRNA: miR-34a、miR-34b和miR-34c。近年来,miRNA-34家族在CHB中的表达异常为肝纤维化的诊断等提供了新靶点^[5]。本研究通过分析b-FGF、TGF- β 1及microRNA-34a在CHB患者中的表达情况,旨在探讨三者联合对肝纤维化诊断、病情评估的价值,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 基线资料

选取2018年9月至2020年9月本院收治的180例CHB患者作为CHB组,其中男性92例,女性88例,年龄平均(48.52 \pm 6.18)岁。纳入标准:①HbeAg均为阳性并接受肝活检检查;②符合《病毒性肝炎防治方案》^[6]中慢性乙型肝炎诊断及《肝纤维化中西医结合诊疗指南》^[7]肝纤维化诊断标准。排除标准:①感染甲型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、丁型肝炎病毒、戊型肝炎病毒、人类免疫缺陷病毒引起的肝功能异常;②合并内分泌、血液系统疾病及心、肾功能衰竭者;③合并肝癌、脂肪肝等其他类型肝脏疾病;④既往存在肝脏或胆切除术者;

⑤哺乳期或妊娠妇女。依据肝脏硬度测量值(liver stillness measurement, LSM)^[8]将患者分为轻度肝纤维化组43例(LSM<9.7 kPa)、中度肝纤维化组78例(9.7 kPa \leq LSM<17.5 kPa)、重度肝纤维化组59例(LSM \geq 17.5 kPa)。

同时选取170例同期于本院接受健康体检且结果正常者作为对照组,其中男性89例,女81例,年龄平均年龄(48.58 \pm 6.19)岁。CHB组、对照组年龄及性别等基线资料比较差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。所有研究对象均签署知情同意书,本研究已获得医院伦理委员会批准。

1.2 检测方法

1.2.1 血清b-FGF、TGF- β 1检测

抽取所有研究对象空腹静脉血3 mL,离心(2 000 r/min, 15 min)去除残余细胞成分,取上层血清置于-70 $^{\circ}$ C待检。采用酶联免疫吸附法检测b-FGF、TGF- β 1水平,试剂盒北京北方生物技术研究所提供,操作步骤严格按说明书执行。

1.2.2 血microRNA-34a检测

血清标本收集:清晨空腹抽取所有研究对象外周静脉血3 mL于试管中,静置20 min后离心(8 000 r/min, 4 $^{\circ}$ C, 10 min)去除残余细胞成分,取上层血清转移至另一试管中,再次离心(1 300 r/min, 4 $^{\circ}$ C, 10 min),最后取500 μ L血清转移至无RNA酶的EP管中分装,放入-80 $^{\circ}$ C冰箱保存。采用逆转录和实时荧光定量-PCR法检测血microRNA-34a水平。miScript II RT逆转录试剂盒购自德国QIAGEN公司,反应体系为:miScriptHispect(5x)4 μ L, miScriptNucleics(10x)2 μ L, miScript Reverse Transcriptase 2 μ L, RNA模板12 μ L。逆转录条件:37 $^{\circ}$ C 60 min, 95 $^{\circ}$ C 10 min。按照试剂盒进行qPCR反应(miScript SYBR Green试剂盒,德国QIAGEN公司),反应体系10 μ L;预加热95 $^{\circ}$ C 30 min;变性94 $^{\circ}$ C 15 s,退火55 $^{\circ}$ C 30 s,延伸70 $^{\circ}$ C 30 s,共40个循环。Ct值为反应孔的荧光信号达到设定阈值的循环数。采用U6作为内参,血清中miRNA-34a的相对表达量为 $2^{-\Delta Ct} = Ct_{miRNA-34a} - Ct_{U6}$ 。

1.3 统计学方法

应用 SPSS 20.0 统计学软件进行分析, 计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验, 多组间行 *F* 检验; 相关性采用 Pearson 分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CHB 组与对照组血清 b-FGF、TGF-β1、microRNA-34a 水平比较

CHB 组血清 b-FGF、TGF-β1、microRNA-34a 水平高于对照组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 CHB 组与对照组血清 b-FGF、TGF-β1、microRNA-34a 水平比较 $(\bar{x} \pm s)$

Table 1 Comparison of serum levels of b-FGF, TGF-β1 and microRNA-34a between CHB group and control group $(\bar{x} \pm s)$

组别	<i>n</i>	b-FGF (pg/mL)	TGF-β1 (pg/mL)	microRNA-34a
CHB 组	180	36.90±10.25	596.85±123.74	0.95±0.32
对照	170	13.08±3.52	302.52±56.21	0.21±0.05
<i>t</i> 值	-	28.740	28.370	29.807
<i>P</i> 值	-	<0.001	<0.001	<0.001

2.2 不同肝纤维化程度患者血清 b-FGF、TGF-β1、microRNA-34a 水平比较

不同肝纤维化程度患者 b-FGF、TGF-β1、microRNA-34a 水平比较: 轻度纤维化组 < 中度纤维化组 < 重度纤维化组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 不同肝纤维化程度患者血清 b-FGF、TGF-β1、microRNA-34a 水平比较 $(\bar{x} \pm s)$

Table 2 Comparison of serum levels of b-FGF, TGF-β1 and microRNA-34a in patients with different degrees of liver fibrosis $(\bar{x} \pm s)$

组别	<i>n</i>	b-FGF (pg/mL)	TGF-β1 (pg/mL)	microRNA-34a
轻度肝纤维化组	43	25.81±9.68	497.36±117.52	0.63±0.29
中度肝纤维化组	78	34.78±9.75 ^a	558.39±119.80 ^a	0.84±0.25 ^a
重度肝纤维化组	59	43.56±8.51 ^{ab}	632.50±85.72 ^{ab}	1.12±0.16 ^{ab}
<i>F</i> 值	-	45.30	19.58	55.91
<i>P</i> 值	-	<0.001	<0.001	<0.001

注: 与轻度肝纤维化组比较, ^a $P < 0.05$; 与中度肝纤维化组比较, ^b $P < 0.05$ 。

2.3 CHB 患者 b-FGF、TGF-β1 及 microRNA-34a 水平与肝纤维化程度的相关性分析

CHB 患者 b-FGF、TGF-β1 及 microRNA-34a 水平与 LSM 呈正相关 ($P < 0.05$)。见表 3、图 1。

表 3 CHB 患者 b-FGF、TGF-β1 及 microRNA-34a 水平与 LSM 的相关性

Table 3 Correlation between the levels of b-FGF, TGF-β1 and microRNA-34a and LSM in CHB patients

因素	<i>r</i> 值	<i>P</i> 值
b-FGF	0.986	<0.001
TGF-β1	0.849	0.014
microRNA-34a	0.974	0.005

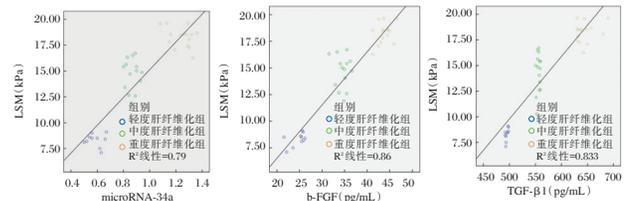


图 1 CHB 患者 b-FGF、TGF-β1 及 microRNA-34a 水平与肝纤维化程度的相关性分析散点图

Figure 1 Scatter diagram of correlation analysis between b-FGF, TGF-β1 and microRNA-34a levels and liver fibrosis in CHB patients

3 讨论

CHB 的危害性在于其可发展成为严重的肝脏疾病及产生相关并发症, 导致慢性乙肝患者的高死亡率^[9]。因此, 诊断慢性乙肝患者肝纤维化的存在、鉴别肝纤维化的程度, 从而实施合适的治疗方法控制或逆转肝纤维化是至关重要的。

肝穿刺活组织检查是从组织病理学的角度诊断肝脏病变, 评估疾病预后, 以及辅助判断临床治疗决策的可行性及为调整治疗方案提供指导的一种参考方法^[10]。然而, 肝穿刺活组织作为有创侵入性检查, 实施的风险性较高; 同时由于取样量的限制, 在评估肝纤维化程度时缺乏一定的准确性。由于肝纤维化作为一个极其复杂的动态应急反应, 是多种细胞、多种因素相互促进和制约的结果, 因此一些血清生物化学指标逐渐成为临床监测手段, 并引起广泛关注。

b-FGF 是成纤维细胞生长因子家族成员之一, 主要在调控细胞分化、增殖中发挥作用, 肝窦内皮细胞、成肌纤维样细胞、血管内皮及平滑肌细胞和肝细胞是 bFGF 分泌的主要场所^[11]。b-FGF 在正常肝脏的表达对维持肝脏生理功能具有重要作用, 主要包括维持血管活性、促进组织损伤修复及激活内皮细胞等。研究发现, 在肝脏疾病的早期阶段, 由于肝组织发生微循环障碍导致 b-FGF 合成增加,

刺激内皮细胞增生、迁移及分化,促使新血管形成^[12]。而在肝病的中后期,b-FGF在肝血管间隔及肝窦壁表达逐渐增强,一方面可减少细胞外基质降解所必需的酶,另一方面则抑制蛋白酶活性物质,从而导致细胞外基质堆积,影响机体的反应性^[13]。从本研究中可以看出,随着肝纤维化程度的不断加重,b-FGF水平呈上升趋势,且CHB患者b-FGF水平与LSM呈正相关关系,有力地佐证了血清b-FGF的高表达可加快CHB病程,通过监测b-FGF水平变化可评估肝纤维化程度,为临床治疗提供思路。

在肝脏中,TGF- β 主要由非实质细胞合成,如肌成纤维细胞等。TGF- β 1可刺激肝星状细胞转化为肌成纤维细胞,从而增加细胞外基质的合成,并且TGF- β 1使肝星状细胞活化后肝星状细胞又可分泌大量的TGF- β 1,造成肝纤维化持续发展;同时TGF- β 1还可上调I、III、IV型胶原表达,并降低基质金属蛋白酶合成及抑制促进纤溶酶原激活物的表达,降低细胞外基质的降解,从而加速纤维化发生发展。本研究结果进一步证实TGF- β 1是一种在肝纤维化发生、发展中具有重要作用细胞因子。此外,既往文献显示,肝炎病毒可通过免疫病理损伤直接或间接引起Kupffer细胞的大量激活、浸润,进而增加TGF- β 1的分泌^[14]。而大量的TGF- β 1又可刺激贮脂细胞和其他间质细胞分泌TGF- β 1,从而形成恶性循环。本研究发现CHB患者TGF- β 1水平与肝纤维化程度呈正相关关系,故对CHB患者TGF- β 1水平进行监测有助于早期肝纤维化的诊断及肝纤维化程度的判断。

信号通路参与肝星状细胞凋亡,高表达的miR-27a和miR-27b则可参与肝星状细胞活化并与肝脏中脂质代谢相关^[15]。动物实验显示,在博来霉素诱导的肺纤维化小鼠中,miR-34a消融处理的小鼠比野生型小鼠的肺纤维化更严重^[16]。本研究发现microRNA-34a水平与肝纤维化程度呈正相关关系,进一步提示血浆miR-34a可作为鉴别慢性乙肝患者不同肝纤维化阶段的新候选标志物。

综上所述,b-FGF、TGF- β 1及microRNA-34a表达与CHB纤维化程度呈现显著相关性,联合检测三者表达情况对CHB病情和纤维化具有一定的诊断价值。

参考文献

- [1] 张利娟,童巧霞.慢性乙型肝炎肝纤维化患者血清25羟维生素D3水平临床研究[J].中华疾病控制杂志,2018,22(10):44-47,73.
- [2] Maini MK, Burton AR. Restoring, releasing or replacing adaptive immunity in chronic hepatitis B[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2019, 16(11):662-675.
- [3] 杨欣,李清林,陈卓辉,等.疏肝健脾活血方对肝纤维化过程中大鼠TGF- β 1/Smad信号通路的影响[J].中华中医药杂志,2017,32(4):1694-1698.
- [4] 王煜,马娟,张旭,等.慢性乙型肝炎患者STING表达与病毒载量及肝组织病理的相关性[J].中华医院感染学杂志,2020,30(1):92-95.
- [5] 李岩,娄宪芝,张晓旭.替比夫定联合水飞蓟宾治疗乙型肝炎肝硬化的临床疗效[J].保健医学研究与实践,2018,15(4):60-62.
- [6] Adjei CA, Stutterheim SE, Naab F, et al. Barriers to chronic Hepatitis B treatment and care in Ghana: A qualitative study with people with Hepatitis B and healthcare providers [J]. PLoS ONE, 2019, 14(12):e0225830.
- [7] Haque S, Morris J C. Transforming Growth Factor-beta: A Therapeutic Target for Cancer [J]. Hum Vaccin Immunother, 2017, 13(8):1741-1750.
- [8] John R. Couchman. Transforming growth factor- β activation in cell-free extracellular matrix preparations. Commentary [J]. Folia Histochemi Cytobiol, 2019, 57(4):157-158.
- [9] Mara U, Ayman A, Qiwei Y, et al. Targeting the transforming growth factor- β pathway: a novel mechanism of ulipristal acetate action against uterine fibroids [J]. Fertil Steril, 2019.
- [10] 金彩婷,郭利伟,梁伟峰.慢性乙型病毒性肝炎肝纤维化无创性血清诊断指标研究进展[J].中华实验和临床感染病杂志(电子版),2018,12(1):11-14.
- [11] Mak L, Seto W, Fung J, et al. Use of HBsAg quantification in the natural history and treatment of chronic hepatitis B [J]. Hepatol Int, 2019, 14(6):35-46.
- [12] Xie J, Tu T, Zhou S H, et al. Transforming growth factor (TGF)- β 1 signal pathway: A promising therapeutic target for attenuating cardiac fibrosis [J]. Int J Cardiol, 2017, 23(9):9-13.
- [13] Zhang L, Chen T, Yin Y, et al. Dietary microRNA-A Novel Functional Component of Food [J]. Adv Nutr, 2019, 10(4):711-721.
- [14] 徐文莉,林燕华,罗艺,等.上皮性卵巢癌血浆中microRNA-30a-5p含量与分级及分期的关系[J].分子诊断与治疗杂志,2017,9(6):381-385.
- [15] Reginald V.C.T. van der Kwast, Quax PHA, Nossent AY. An Emerging Role for isomiRs and the microRNA Epitranscriptome in Neovascularization [J]. Cells, 2019, 9(1):61.
- [16] Macgregor-Das AM, Samarjit D. A microRNA's Journey to the Center of the Mitochondria [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2018, 315(2):206-215.

Kt/V、CRP/ALB、UA与腹膜透析钙磷代谢紊乱关系及预测颈动脉硬化价值

徐可¹ 刘敏^{2*} 郭利芹¹ 张灵灵¹

[摘要] 目的 探讨透析充分性(Kt/V)、C反应蛋白与白蛋白比值(CRP/ALB)、血尿酸(UA)与慢性肾衰竭(CRF)腹膜透析患者钙磷代谢紊乱的相关性。方法 选取本院收治的98例CRF腹膜透析患者,根据是否伴有颈动脉硬化分为有硬化组($n=47$)、无硬化组($n=51$)。比较两组基线资料、Kt/V、CRP/ALB、UA,分析Kt/V、CRP/ALB、UA与校正血钙、血磷相关性及其颈动脉硬化相关因素,受试者工作特征曲线(ROC)及曲线下面积(AUC)分析Kt/V、CRP/ALB、UA评估颈动脉硬化的价值。结果 有硬化组校正血钙、Kt/V低于无硬化组,血磷、CRP/ALB、UA高于无硬化组($P<0.05$);Kt/V与校正血钙呈正相关,CRP/ALB、UA与校正血钙呈负相关($P<0.05$);Kt/V与血磷呈负相关,CRP/ALB、UA与血磷呈正相关($P<0.05$);Kt/V、CRP/ALB、UA与颈动脉硬化有关,联合评估颈动脉硬化的AUC为0.912,大于单一指标评估($P<0.05$)。结论 Kt/V、CRP/ALB、UA与CRF腹膜透析患者钙磷代谢紊乱关系密切,三者可互相作用促进颈动脉硬化形成,联合预测颈动脉硬化具有较高价值,便于指导临床完善相关诊疗机制。

[关键词] C反应蛋白;白蛋白;慢性肾衰竭;腹膜透析;钙磷代谢

The relationship between Kt/V, CRP/ALB, UA and peritoneal dialysis calcium and phosphorus metabolism disorder and its value in predicting carotid atherosclerosis

XU Ke¹, LIU Min^{2*}, GUO Liqin¹, ZHANG Lingling¹

(1. Department of Nephrology, Xinxiang Central Hospital, Xinxiang, Henan, China, 453000; 2. Department of Hypertension, Henan People's Hospital, Zhengzhou, Henan, China, 450003)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the relationship between dialysis adequacy (Kt/V), C-reactive protein to albumin ratio (CRP/ALB), serum uric acid (UA) and disorders of calcium and phosphorus metabolism in patients with chronic renal failure on peritoneal dialysis. **Methods** A total of 98 peritoneal dialysis patients with chronic renal failure in our hospital were selected and divided into sclerosing group ($n=47$) and non-sclerosing group ($n=51$) according to whether they were accompanied by carotid atherosclerosis. The baseline data, Kt/V, CRP/ALB, UA of the two groups were compared, and the correlations between Kt/V, CRP/ALB, UA and corrected blood calcium, blood phosphorus and carotid arteriosclerosis were analyzed. Receiver operating characteristic curve (ROC) and area under the curve (AUC) were used to analyze the value of Kt/V, CRP/ALB, and UA in assessing carotid atherosclerosis. **Results** The corrected blood calcium and Kt/V of the sclerosing group were lower than those of the non-sclerosing group, and the blood phosphorus, CRP/ALB and UA were higher than those of the non-sclerosing group ($P<0.05$). Kt/V was positively correlated with corrected blood calcium, and CRP/ALB and UA were negatively correlated with corrected blood calcium ($P<0.05$). Kt/V was negatively correlated with blood phosphorus, and CRP/ALB and UA were positively correlated with blood phosphorus ($P<0.05$). Kt/V, CRP/ALB and UA were related to carotid atherosclerosis. The

基金项目:河南省高等学校重点科研项目资助计划立项(20A320001)

作者单位:1.河南省新乡市中心医院肾内科,河南,新乡 453000

2.河南省人民医院高血压科,河南,郑州 450003

*通信作者:刘敏, E-mail:liumin136@126.com

AUC of the combined assessment of carotid atherosclerosis was 0.912, which was greater than the single index assessment ($P < 0.05$). **Conclusion** Kt/V, CRP/ALB, UA are closely related to the disorder of calcium and phosphorus metabolism in patients with chronic renal failure on peritoneal dialysis, and the three can interact to promote the formation of carotid arteriosclerosis. The combined prediction of carotid atherosclerosis has high value, which is convenient to guide the clinical improvement of related diagnosis and treatment mechanisms.

[KEY WORDS] C-reactive protein; Albumin; Chronic renal failure; Peritoneal dialysis; Calcium and phosphorus metabolism

目前腹膜透析是临床治疗慢性肾衰竭(Chronic renal failure, CRF), 延长患者生存期的常用手段之一, 可对肾脏功能起到部分代替作用, 继而维持机体正常代谢。但近年随腹膜透析应用广泛, 部分患者常出现钙磷代谢紊乱等一系列病理生理性变化, 可对动脉血管, 尤其是颈动脉血管造成不良影响, 引起颈动脉硬化, 并最终诱发血栓性疾病^[1-2]。透析充分性(effective urea clearance time/volume, Kt/V)是腹膜透析患者钙磷代谢紊乱的主要危险因素^[3]; C反应蛋白(C-reactive protein, CRP)结合脂蛋白后可激活补体, 并损害血管内皮^[4]; 白蛋白(Albumin, ALB)是预测血管疾病发病风险及全因病死风险的敏感指标, 有研究表明, CRP/ALB在评估炎症反应中微血管通透性改变中具有重要价值^[5]; 尿酸(Uric acid, UA)是机体重要代谢产物, 有研究指出, 高UA是腹膜透析患者血管事件发生的独立危险因素^[6]。本研究首次探讨Kt/V、CRP/ALB、UA与CRF腹膜透析患者钙磷代谢紊乱相关性及其预测颈动脉硬化价值, 旨在为临床深入了解CRF腹膜透析钙磷代谢紊乱的机制, 防治颈动脉硬化及其引发的并发症提供参考。现报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2017年1月至2021年1月本院收治的98例CRF腹膜透析患者, 根据是否伴有颈动脉硬化分为有硬化组($n=47$)、无硬化组($n=51$)。纳入标准: 符合CRF诊断标准^[7]; 根据《头颈部血管超声若干问题的专家共识(颈动脉部分)》^[8]采用颈部超声检查判定是否存在颈动脉硬化, 内膜平均厚度(IMT) < 1.0 mm为无硬化, 否则为有硬化; 腹膜透析时间 > 6 个月; 透析规律; 患者、家属知情理解签署同意书。排除标准: 近3个月内有免疫制剂应用史者; 肾移植者; 有心脑血管疾病发生者(脑卒中、心肌梗死、心绞痛等); 有传染性疾病者; 有严重精

神疾病及认知障碍者; 肿瘤疾病者。

1.2 方法

CRP、ALB、UA等生化指标检测均为腹膜透析前检测, 采用非抗凝真空管抽取晨空腹肘静脉血2 ml, 离心(半径8 cm, 转速3 500 r/min, 时间15 min), 采集上层血清, 采用基蛋生物科技股份有限公司免疫透射比浊法试剂盒测CRP水平, 采用厦门市波生生物技术有限公司ALB溴甲酚绿法试剂盒检测ALB水平, 计算CRP/ALB值; 采用武汉明德生物科技有限公司化学发光法试剂盒测UA水平。采用透析充分性检测、腹膜平衡试验(Peritoneal Equilibration Test, PET), 检测血钙水平并根据公式校正血 $[Ca^{2+}]$ (mg/L)=实测 $[Ca^{2+}]$ (mg/L)+ $0.8 \times (4 - \text{白蛋白值})$ 计算血清校正钙值, 采用磷钼酸紫外分光光度法检测血磷含量。并根据公式计算Kt/V, $Kt/V = -\ln(R - 0.008 \times t) + (4 - 3.5 \times R) \times UF/W$, 其中。ln是自然对数, R是透析后与透析前血尿素的比值, K为透析器的尿素清除率, t为透析时间, V为尿素在体内的分布容积, UF是超滤率, 单位为升, w为透析后病人体重。

1.3 观察指标

①采用问卷调查形式收集两组基线资料包括年龄、性别、体质量指数、透析龄、收缩压、舒张压、尿素氮、血肌酐、甘油三酯、胆固醇、低密度脂蛋白、高密度脂蛋白、甲状旁腺素、 β_2 微球蛋白、原发病等资料, 原发病诊断依照《肾脏病诊疗指南》^[9]进行诊断。②两组钙磷代谢指标、Kt/V、CRP/ALB、UA比较。③分析Kt/V、CRP/ALB、UA与钙磷代谢关系。④分析颈动脉硬化相关因素。⑤分析Kt/V、CRP/ALB、UA评估颈动脉硬化的价值。

1.4 统计学处理

采用统计学软件SPSS 23.0处理数据, 计数资料以 $n(\%)$ 描述, 采用 χ^2 检验, 计量资料($\bar{x} \pm s$)描述, 两组间比较采用独立样本t检验; 多组间采用方差分析。Pearson、Logistic回归方程分析变量间关

系;MedCalc 软件绘制受试者工作特征曲线(ROC)分析预测价值。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组基线资料比较

两组年龄、性别、体质量指数、透析龄、收缩压、舒张压、尿素氮、肌酐、甘油三酯、胆固醇、低密度脂蛋白、高密度脂蛋白、甲状旁腺素、 β_2 微球蛋白、原发病比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 两组基线资料对比 $[(\bar{x} \pm s), n(\%)]$
Table 1 Comparison of baseline data between 2 groups $[(\bar{x} \pm s), n(\%)]$

资料	有硬化组 (n=47)	无硬化组 (n=51)	t/ χ^2 值	P 值
年龄(岁)	62.15±11.24	60.78±10.19	0.633	0.528
性别(男/女)	25/22	30/21	0.315	0.575
体质量指数 (kg/m ²)	24.15±1.52	23.99±1.38	0.546	0.586
透析龄(月)	34.48±12.26	31.97±10.87	1.074	0.286
收缩压(mmHg)	137.68±8.57	136.33±10.14	0.709	0.480
舒张压(mmHg)	78.14±9.75	80.02±8.34	1.028	0.307
尿素氮(mmol/L)	23.25±5.49	22.97±6.08	0.239	0.812
肌酐(μ mol/L)	815.07±236.41	803.88±217.65	0.244	0.808
甘油三酯(mmol/L)	1.78±0.36	1.69±0.43	1.118	0.266
胆固醇(mmol/L)	5.02±0.61	4.89±0.57	1.091	0.278
低密度脂蛋白 (mmol/L)	2.34±0.66	2.48±0.52	1.171	0.245
高密度脂蛋白 (mmol/L)	1.05±0.27	1.16±0.28	1.976	0.051
甲状旁腺素 (pg/mL)	369.42±103.05	372.60±97.19	0.157	0.875
β_2 微球蛋白 (mmol/L)	30.05±6.40	28.59±5.92	1.225	0.224
原发病				
高血压肾硬化	16(34.04)	20(39.22)		
糖尿病肾病	19(40.43)	17(33.33)	0.547	0.761
慢性肾小球肾炎	12(25.53)	14(27.45)		

2.2 两组钙磷代谢指标、Kt/V、CRP/ALB、UA 比较

有硬化组校正血钙、Kt/V 低于无硬化组,血磷、CRP/ALB、UA 高于无硬化组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 两组钙磷代谢指标、Kt/V、CRP/ALB、UA 比较 $(\bar{x} \pm s)$
Table 2 Comparison of calcium and phosphorus metabolism indexes, Kt/V, CRP/ALB, UA between 2 groups $(\bar{x} \pm s)$

资料	有硬化组 (n=47)	无硬化组 (n=51)	t 值	P 值
校正血钙(mmol/L)	2.01±0.15	2.20±0.13	6.715	<0.001
血磷(mmol/L)	1.89±0.39	1.50±0.41	4.816	<0.001
Kt/V	1.24±0.15	1.56±0.26	7.380	<0.001
CRP/ALB	0.83±0.27	0.48±0.17	7.742	<0.001
UA(μ mol/L)	485.03±145.84	413.49±120.66	2.654	0.009

2.3 Kt/V、CRP/ALB、UA 与钙磷代谢关系

采用 Pearson 进行相关性分析,结果显示,Kt/V 与校正血钙呈正相关,CRP/ALB、UA 与校正血钙呈负相关;Kt/V 与血磷呈负相关,CRP/ALB、UA 与血磷呈正相关($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 相关性参数
Table 3 Correlation parameter

指标		校正血钙	血磷
Kt/V	r 值	0.781	-0.647
	P 值	<0.001	<0.001
CRP/ALB	r 值	-0.675	0.699
	P 值	<0.001	<0.001
UA	r 值	-0.628	0.563
	P 值	<0.001	<0.001

2.4 颈动脉硬化单因素与多因素 Logistic 回归方程分析

以颈动脉硬化情况作为因变量(无赋值为 0,有赋值为 1),以 Kt/V、CRP/ALB、UA 作为自变量(低于均值赋值为 1,高于均值赋值为 2),应用单因素和多因素 Logistic 回归方程分析,结果显示,将校正血钙、血磷控制后,Kt/V、CRP/ALB、UA 仍与颈动脉硬化相关($P < 0.05$)。见表 4。

表 4 颈动脉硬化单因素和多因素 Logistic 回归方程分析
Table 4 Multivariate logistic regression equation analysis of carotid atherosclerosis

影响因素	单因素分析		多因素分析	
	OR(95%CI)	P 值	OR(95%CI)	P 值
Kt/V	0.574(0.411~0.803)	<0.001	0.311(0.215~0.451)	<0.001
CRP/ALB	1.826(1.428~2.334)	<0.001	1.405(1.234~1.599)	<0.001
UA	2.675(2.334~3.065)	<0.001	2.216(2.065~2.379)	<0.001

注:Kt/V、CRP/ALB、UA 均值依次为 1.41、0.65、447.80 μ mol/L。

2.5 Kt/V、CRP/ALB、UA 评估颈动脉硬化的 ROC

ROC 结果显示,Kt/V、CRP/ALB、UA 评估颈动脉硬化的 AUC 分别为 0.766、0.816、0.749 ($P < 0.05$);应用 Logistic 二元拟合回归,结果显示,Kt/V+CRP/ALB+UA 评估颈动脉硬化的 AUC 为 0.912 ($P < 0.05$)。见图 1、表 5。

3 讨论

目前有关 CRF 腹膜透析患者钙磷代谢紊乱的相关研究较多,有学者提出,钙磷代谢紊乱可显著增加患者血管疾病发生风险^[10]。本研究结果提示上述因素不足以评价 CRF 腹膜透析患者颈动脉硬

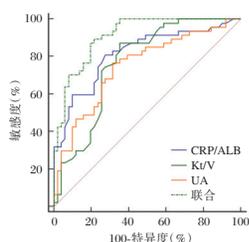


图1 Kt/V、CRP/ALB、UA 评估颈动脉硬化的 ROC

Figure 1 Kt/V, CRP/ALB, UA to assess ROC of carotid atherosclerosis

表5 ROC 分析结果

Table 5 ROC analysis results

指标	AUC	95%CI	Z值	cut-off 值	敏感度 (%)	特异度 (%)	P 值
Kt/V	0.766	0.670~0.846	5.459	≤1.39	87.23	64.71	<0.001
CRP/ALB	0.816	0.725~0.887	7.233	>0.66	80.85	72.55	<0.001
UA	0.749	0.652~0.831	4.995	>439.52 μmol/L	76.60	68.63	<0.001
联合	0.912	0.837~0.959	14.802		89.36	78.43	<0.001

重要蛋白质,主要功能是维持机体营养、渗透压。本研究结果提示 CRP/ALB 变化可为临床评价钙磷代谢情况提供参考。

UA 是人体主要代谢产物,研究显示,血 UA 水平与多种因素有关,如:性别、年龄、病史等均可影响血 UA 水平^[11]。本研究在控制性别、年龄等相关因素后发现,是否发生颈动脉硬化患者间 UA 水平有显著差异,说明 UA 水平变化可能与颈动脉硬化发生有关。Kt/V 是评估 CRF 患者透析耐受程度的主要指标。目前已得到广泛证实,Kt/V 是钙磷代谢紊乱的独立危险因素^[12]。本研究也发现,Kt/V 与血磷呈负相关,与校正血钙呈正相关。但目前 KtV、UA 水平与钙磷代谢紊乱所致颈动脉硬化间具体关系如何,尚无定论。同时有多项研究指出,CRF 腹膜透析患者颈动脉硬化发生发展是多因素作用的结果,众多因素或单独,或协同促进颈动脉硬化发生发展^[13-14]。本研究进一步采用 Logistic 回归方程分析,发现单因素分析中校正血钙、血磷、Kt/V、CRP/ALB、UA 均与颈动脉硬化相关,但多因素分析中仅 Kt/V、CRP/ALB、UA 与颈动脉硬化相关,客观说明在 CRF 腹膜透析患者钙磷代谢紊乱所致颈动脉硬化中,Kt/V、CRP/ALB、UA 可能存在协同作用而加剧颈动脉硬化发生发展。继续 ROC 分析显示,Kt/V+CRP/ALB+UA 评估颈动脉硬化的 AUC 为 0.912,可为临床完善颈动脉硬化风险预测机制提供参考。

综上所述,Kt/V、CRP/ALB、UA 与 CRF 腹膜透析患者钙磷代谢紊乱关系密切,三者可互相作用

发生风险。此外,本研究还发现,有硬化组校正血钙、Kt/V 低于无硬化组,血磷、CRP/ALB、UA 高于无硬化组,说明校正血钙、Kt/V、血磷、CRP/ALB、UA 异常可能与颈动脉硬化有关。CRP 是机体受感染或组织损伤时外周血内急剧升高的一种急性蛋白,可在急性炎症反应时通过刺激血管内皮细胞生成炎症细胞趋化因子及细胞因子而促使外周血单核细胞生成并释放白细胞介素-6 等多种炎症因子,并最终引起血管内皮病变;ALB 是血浆内最

促进颈动脉硬化形成,联合预测颈动脉硬化具有较高价值,便于指导临床完善相关诊疗机制。

参考文献

- [1] 帕提古丽·阿斯讨拜,张艳,布合力其·麦麦提,等.慢性肾脏病患者血浆成纤维细胞生长因子 23 水平与骨矿物质代谢的相关性分析[J].国际泌尿系统杂志,2021,41(1):135-138.
- [2] Stachowska-Pietka J, Poleszczuk J, Flessner MF, et al. Alterations of peritoneal transport characteristics in dialysis patients with ultrafiltration failure: tissue and capillary components[J]. Nephrol Dial Transplant, 2019,34(5):864-870.
- [3] 丁宁,郑洁,张国娟. Kt 评估维持性血液透析患者透析充分性的研究[J].中国血液净化,2019,18(01):11-15.
- [4] 周卫,刘莉,Puri R,等.接受最佳治疗的高危血管病患者中 C 反应蛋白对脂蛋白(a)相关心血管病风险的影响[J].中华高血压杂志,2020,28(11):1013.
- [5] 谭伟,田辉,袁强,等.外周血 NLR 和 CRP/ALB 值对获得性败血症预后评估的临床价值[J].现代医学,2020,48(6):699-704.
- [6] 郎勇,冉迅,屈模英.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[J].分子诊断与治疗杂志,2020,12(9):1184-1186+1191.
- [7] 中国中西医结合学会肾脏疾病专业委员会.慢性肾衰竭中西医结合诊疗指南[J].中国中西医结合杂志,2015,35(9):1029-1033.
- [8] 国家卫生计生委脑卒中防治工程委员会,血管超声专业委员会,中国超声医学工程学会,等.头颈部血管超声若干问题的专家共识(颈动脉部分)[J].中国脑血管病杂志,2020,17(6):346-353.
- [9] 徐刚.肾脏病诊疗指南[M].北京:科学出版社,2013.

液相色谱-串联质谱法测定 25-羟基维生素 D

潘晓芳¹ 黄燕虹¹ 黄浩然² 李海明² 陈建起² 吴静标^{1*}

[摘要] 目的 建立液相色谱-串联质谱法(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)同时测定血清中 25-OH VD₂和 25-OH VD₃的方法。方法 采用蛋白沉淀(PPT)和液液萃取(LLE)相结合的方法对待测的人血清样本进行前处理,然后取样本提取液用 LC-MS/MS 系统中进行分析。以 25-OH VD 同位素作为内标,通过对校准品中 25-OH VD₂和 25-OH VD₃的峰面积及其内标峰面积的比值对相应的校准品浓度拟合标准曲线,再将其他检测样本中 25-OH VD₂和 25-OH VD₃峰面积与相应内标峰面积的比值代入拟合的标准曲线方程中计算浓度,从而 LC-MS/MS 快速测定 25-OH VD₂和 25-OH VD₃的方法。结果 本实验条件下可同时快速检测血清 25-OH VD₂和 25-OH VD₃,分析时间仅为 2.8 min,特异性高,25-OH VD₂和 25-OH VD₃的信噪比(S/N)最小为 69,25-OH VD₂和 25-OH VD₃分别在 2~100 ng/mL 和 5~250 ng/mL 范围内具有良好线性关系,峰面积比与对应的浓度线性相关系数均>0.999,重复性的变异系数 CV 最大为 3.67%和 3.39%。结论 本研究成功建立了 LC-MS/MS 简单快捷、灵敏度高、准确测定血清 25-羟基维生素 D 的方法。

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

Determination of 25 - hydroxyvitamin D by liquid chromatography - tandem mass spectrometry

PAN Xiaofang¹, HUANG Yanhong¹, HUANG Haoran², LI Haiming², CHEN Jianqi², WU Jingbiao^{1*}

(1. Division IV of General Laboratory, Guangdong Medical Devices Quality Surveillance and Test Institute, Guangzhou, Guangdong, China, 510663; 2. Guangzhou Fenghua Bioengineering Co., Ltd., Guangzhou, Guangdong, China, 510730)

[ABSTRACT] **Objective** To establish a method for the quantitative determination of 25 - hydroxyvitamin D by using liquid chromatography - tandem mass spectrometry (LC - MS/MS). **Methods** Human serum samples were pretreated by using protein precipitation and liquid - liquid extraction methods, sample extract was obtained and injected into LC - MS/MS. The concentration of 25 - hydroxyvitamin D was quantified by the isotope internal standard method and standard curve was employed with a series of calibration. **Results** Under the conditions of this experiment, the serum 25 - OH VD₂ and 25 - OH VD₃ can be rapidly detected at the same time, the analysis time is only 2.8 min, and the specificity is high. The minimum Signal to Noise Ratio was 69. There was a good liner relationship in the concentration range of 2 ng/mL~100 ng/mL and 5 ng/mL~250 ng/mL for 25 - hydroxyvitamin D₂ and 25 - hydroxyvitamin D₃ and the correlation coefficients between the peak area ratios and concentrations for 25 - dihydroxyvitamin D were higher than 0.999. The Maximum repeatability and within laboratory coefficients of variation (CV) of 25 - hydroxyvitamin D₂ and 25 - hydroxyvitamin D₃ were 3.67% and 3.39%. **Conclusion** In this study, the LC - MS/MS method is simple, fast, sensitive, and accurate for the determination of serum 25 - hydroxyvitamin D.

[KEY WORDS] 25 - hydroxyvitamin D; 25 - hydroxyvitamin D₂; 25 - hydroxyvitamin D₃; LC - MS/MS

基金项目:广州市科创伟项目(201802010048)

作者单位:1. 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

2. 广州市丰华生物工程有限公司,广东,广州 510730

*通信作者:吴静标, E-mail: wujingbiao200@163.com

注:潘晓芳与黄燕虹为共同第一作者

维生素D(vita min D, VD)是人体必需的一类脂溶性类固醇衍生物。体内VD经两次羟基化,形成具有生物活性的维生素代谢物(1,25-二羟基维生素D₂,1,25-二羟基维生素D₃等),其家族中最重要的成员就是25-羟基维生素D₂(25-hydroxyvita min D₂,25-OH VD₂)和25-羟基维生素D₃(25-hydroxyvita min D₃,25-OH VD₃)^[1]。《维生素D及其类似物临床应用共识》指出: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]。LC-MS/MS法能够有效区分25-OH VD₂和25-OH VD₃,比免疫法灵敏度更高,是临床检测维生素D的金标准^[2-3]。因此,本研究建立了同时准确快捷测定血清中25-羟基维生素D₂及25-羟基维生素D₃的LC-MS/MS法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要仪器

采用三重四极杆质谱分析系统(FH-6000MD,广州市丰华生物工程有限公司);色谱柱(Accu-core aQ 2.1×50 mm,2.6 μm,Thermo Fisher Scientific公司);多管漩涡混合仪(杭州奥盛仪器有限公司);台式高速离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);氮吹仪(杭州奥盛仪器有限公司);氮气发生器(Peak Scientific公司)。

1.1.2 主要试剂

25-羟基维生素D测定试剂盒(液相色谱-串联质谱法)(广州市丰华生物工程有限公司,批号:20190408);甲醇:色谱纯,含量≥99.9%(Thermo Fisher公司);实验用水为Synergy超纯水,电阻率不低于18 MΩ·cm⁻¹。

1.2 实验参数

1.2.1 质谱参数

色谱柱为Accu-core aQ C18色谱柱(2.1×50 mm,2.6 μm);柱温为40℃;流速为0.5 mL/min;进样量为10 μL;流动相A为超纯水(含0.1%甲酸),流动相B为甲醇(含0.1%甲酸)。采用梯度洗脱:0.0~1.0 min 70%B,1.0~2.0 min 75%B,2.0~2.1 min 98%B,2.1~2.6 min 100%B,2.6~3.5 min 100%B,3.5~3.6 min 70%B,3.6~5.0 min 70%B。质谱参数:离子源为电喷雾离子源(ESI);离子模式为正极;喷雾电压为3 500 V;离子传输管温度为300℃;喷雾温度为400℃;鞘气流速为50;辅助气流速为12;吹扫

气流速为0;Q1、Q3分辨率(半峰宽)为0.7;质谱选择反应监测(SRM)参数见表1。

表1 质谱参数

Table 1 Mass Spectrum Parameters

化合物名称	极性	母离子质荷比(m/z)	子离子荷比(m/z)	碰撞能量(V)	RF透镜电压(V)
25-OH VD ₂	Positive	413.3	355.1 ^a	10	100
25-OH VD ₂	Positive	413.3	395.1	10	100
25-OH VD ₂ -d3	Positive	416.3	358.2 ^a	10	100
25-OH VD ₃	Positive	401.3	365.1 ^a	10	97
25-OH VD ₃	Positive	401.3	383.1	10	97
25-OH VD ₃ -d3	Positive	404.3	368.2 ^a	10	105

注:^a为定量离子。

1.2.2 液相色谱参数

柱温:40℃;进样量:10 μL;流动相:A-超纯水(含0.1%甲酸),B-纯甲醇(含0.1%甲酸)。液相梯度见表2。

表2 液相梯度

Table 2 Liquid Chromatography Gradient

时间(min)	流速(mL/min)	A(%)	B(%)	Curve
0	0.5	30	70	5
1	0.5	30	70	5
2	0.5	25	75	5
2.1	0.5	2	98	5
2.6	0.5	0	100	5
3.5	0.5	0	100	5
3.6	0.5	30	70	5
5	0.5	30	70	5

1.3 试液配制

1.3.1 同位素内标工作液的配制

取1.04 mg 25-OH VD₂-d3和1.05 mg 25-OH VD₃-d3标准品,用无水乙醇溶解,分别配成1 000 μg/mL的25-OH VD₂-d3和25-OH VD₃-d3同位素内标准品储备液,再稀释配制成2.5 μg/mL和5.0 μg/mL的25-OH VD₂-d3和25-OH VD₃-d3同位素内标准品。

1.3.2 工作标准液的配制

取1.01 mg 25-OH VD₂和1.01 mg 25-OH VD₃标准品,用无水乙醇溶解,分别配成1 000 μg/mL的25-OH VD₂和25-OH VD₃标准品储备液。

将两种标准品储备液,以BSA磷酸盐缓冲水溶液为溶剂,采用逐级稀释法,配成6个25-OH VD₂和25-OH VD₃标准品混合液,得到1.99、3.98、9.95、19.90、39.80、99.50 ng/mL的25-OH VD₂工作标准溶液和4.98、10.95、29.85、59.70、104.48、248.75 ng/mL的25-OH VD₃工作标准溶液。

1.3.3 25-OH VD的待测样本的制备

①取待测样本200 μL于相应的2 mL离心管

中,加入 200 μ L 的 25-OH VD 同位素内标工作液,旋涡 45 秒。②加入 1 000 μ L 的 25-OH VD 萃取液,在 2 000~2 400 rpm 振频下旋涡振荡 10 分钟,于 -20 $^{\circ}$ C 下静置 10 分钟,13 000 rpm 离心 5 分钟。③取最上层液体 800 μ L 转移到 96 孔 V 型底深孔板中,室温下氮气吹干。④加入 200 μ L 的 25-OH VD 复溶液,盖好硅胶垫封板,在 2 000~2 400 rpm 振频下旋涡振荡 3 分钟,进行复溶,置于 96 孔板离心机中 3 000~3 500 rpm 离心 5 分钟。⑤放入自动进样器中,吸取上清液,进行样本检测、分析。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 19.0 对线性相关性、准确度相对偏差、重复性变异系数进行分析。

2 结果

2.1 保留时间和色谱分离验证

25-OH VD₂、25-OH VD₂-d₃ 和 25-OH VD₃、25-OH VD₃-d₃ 对应色谱图见图 1 和图 2,分别在 2.80、2.79 和 2.76、2.76 min 出峰。

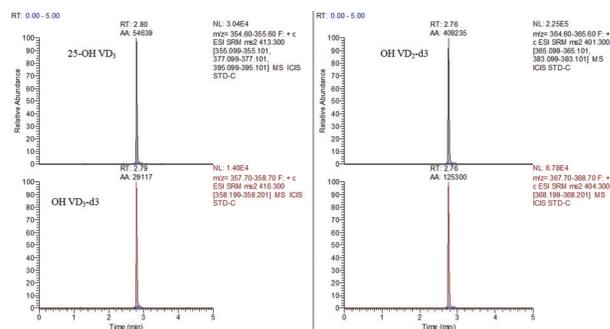


图 1 25-羟基维生素 D₂、25-羟基维生素 D₂-d₃ 和 25-羟基维生素 D₃、25-羟基维生素 D₃-d₃ 的分析色谱图

Figure 1 Chromatogram of 25-OH VD₂, 25-OH VD₂-d₃, 25-OH VD₃, 25-OH VD₃-d₃

2.2 分析方法的线性关系验证

测试系列 25-OH VD₂ 和 25-OH VD₃ 工作标准溶液,将结果平均值和理论值用最小二乘法进行线性拟合,并计算线性相关系数(*r*),结果见图 3。

2.3 准确度试验结果

分别检测 25-OH VD₂ 和 25-OH VD₃ 的高低两个样本,计算相对偏差,25-OH VD₂ 高低两个样本的相对偏差分别为 -5.62%~4.73% 和 -3.11%~1.48%,25-OH VD₃ 高低两个样本的相对偏差分别为 1.23%~7.91% 和 -4.09%~1.27%,见表 3。

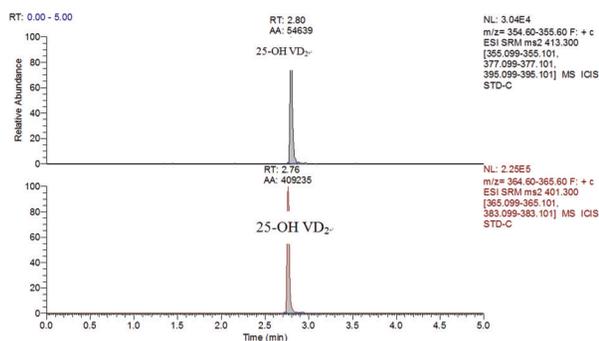


图 2 25-羟基维生素 D₂ 和 25-羟基维生素 D₃ 完全分离分析色谱图

Figure 2 Representative Chromatogram of 25-OH VD₂ and 25-OH VD₃

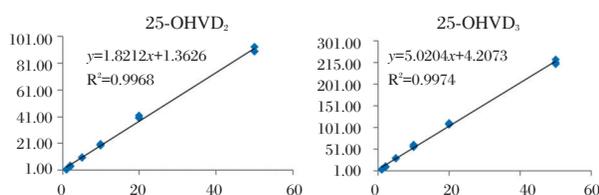


图 3 25-羟基维生素 D₂ 和 25-羟基维生素 D₃ 线性关系

Figure 3 Standard working curve of 25-hydroxyvitamin D₂ and 25-hydroxyvitamin D₃

表 3 25-羟基维生素 D₂ 和 25-羟基维生素 D₃ 准确度测试结果

Table 3 Accuracy of 25-OH VD₂ and 25-OH VD₃

化合物名称	样本	峰面积	内标峰面积	理论浓度 (ng/mL)	实测浓度 (ng/mL)	相对偏差 (%)
25-OH VD ₂	样本 1	132852	25796		11.06	0.62
		140061	28189	10.99	10.65	-3.11
		140802	27120		11.15	1.48
25-OH VD ₂	样本 2	240474	26092		20.27	-5.62
		252511	24761	21.48	22.50	4.73
		132852	25796		21.85	0.62
25-OH VD ₃	样本 1	860353	90056		37.37	-4.09
		915168	92069	38.96	38.97	0.02
		914658	90940		39.46	1.27
25-OH VD ₃	样本 2	971385	63507		61.17	2.05
		992282	61465	59.94	64.68	7.91
		938149	61812		60.68	1.23

2.4 检测限试验结果

在 H-ESI 正离子模式下,检测经过前处理浓度为 2 ng/mL 的和 25-OH VD₂/D₃ 时,最小信噪比 SN 为 69,试验结果见表 4。

2.5 重复性试验结果

用同一批试剂盒,以质控品的低值和高值为样本,每个测试样本重复检测 10 次,计算变异系数,试验结果显示 25-OH VD₂/D₃ 的变异系数 CV 最大分别为 3.67% 和 3.39%,见表 5。

表4 25-羟基维生素D₂和25-羟基维生素D₃信噪比
Table 4 Minimum Signal to Noise Ratio of 25-OH VD₂ and 25-OH VD₃

化合物名称	峰面积	信噪比(S/N)
25-OH VD ₂	43 314	74
25-OH VD ₂	45 272	77
25-OH VD ₂	46 262	69
25-OH VD ₃	91 830	107
25-OH VD ₃	91 810	75
25-OH VD ₃	92 729	76

表5 25-羟基维生素D₂和25-羟基维生素D₃测试结果及变异系数

Table 5 Results and Laboratory coefficients of variation (CV) of 25-OH VD₂ and 25-OH VD₃

化合物名称	峰面积	内标峰面积	理论浓度 (ng/mL)	实测浓度 (ng/mL)	相对偏差 (%)	SD	M	CV%
25-OH VD ₂	135383	27034	10.95	10.74	-1.95			
低值样本	134924	26538	10.95	10.91	-0.37			
	133514	26922	10.95	10.63	-2.96			
	129706	26865	10.95	10.33	-5.67			
	133803	25583	10.95	11.24	2.65	0.34	10.89	3.13
	133274	25892	10.95	11.05	0.93			
	136833	26314	10.95	11.17	2.03			
	121848	24275	10.95	10.76	-1.71			
	125352	25392	10.95	10.58	-3.42			
	135083	25398	10.95	11.44	4.48			
25-OH VD ₂	247821	25547	21.39	21.37	-0.10			
高值样本	254507	26264	21.39	21.35	-0.21			
	244523	24119	21.39	22.36	4.54			
	255318	26640	21.39	21.11	-1.33			
	245788	24154	21.39	22.45	4.94	0.78	21.23	3.68
	244347	25409	21.39	21.18	-0.99			
	229869	24732	21.39	20.45	-4.40			
	244182	25277	21.39	21.28	-0.53			
	248624	26221	21.39	20.87	-2.42			
	235011	26034	21.39	19.84	-7.23			
25-OH VD ₃	901298	88782	38.81	39.845	2.67			
低值样本	908673	88879	38.81	40.143	3.43			
高值样本	905552	90057	38.81	39.445	1.64			
	875278	91524	38.81	37.406	-3.62			
	904502	87725	38.81	40.504	4.36	1.33	39.39	3.39
	875900	91494	38.81	37.447	-3.51			
	920855	90869	38.81	39.771	2.48			
	883242	83546	38.81	41.587	7.16			
	869160	88995	38.81	38.248	-1.45			
	888486	88273	38.81	39.486	1.74			
25-OH VD ₃	957890	63564	59.7	60.231	0.89			
	1002057	61644	59.7	65.146	9.12			
	951778	62672	59.7	60.715	1.70			
	1008088	62640	59.7	64.474	8.00			
	971848	60743	59.7	64.083	7.34	1.92	62.47	3.07
	978607	62678	59.7	62.483	4.66			
	960876	60089	59.7	64.049	7.28			
	969324	64736	59.7	59.831	0.22			
	1002214	64044	59.7	62.631	4.91			
	962901	63057	59.7	61.062	2.28			

3 讨论

VD对人体健康至关重要,理论上与VD相关或潜在疾病均需要VD的检测。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。因此,定期检测VD水平对疾病预防有重要意义^[2]。

25-OH VD常用的检测方法有液相色谱-串联质谱法和免疫法(包括化学发光分析法、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)^[4]。LC-MS/MS法可以同时测定25-OH VD₂和25-OH VD₃,是临床检测25-OH VD的“金标准”^[2, 3-6]。相对于免疫法,LC-MS/MS法可以区分25-OH VD₂和25-OH VD₃,具有特异性强、灵敏度更高的特点,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^[7]。检验医学溯源性联合委员会(The Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine, JCTLM)认可了NIST和比利时根特大学建立的同位素LC-MS/MS法定量测定血清中25-OH VD₂、25-OH VD₃的参考方法^[8-10]。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^[11-13]。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。

广州市丰华生物工程有限公司的25-羟基维生素D测定试剂盒(液相色谱-串联质谱法)采用液液萃取法,操作简单快捷,样本前处理步骤简单、容易操作,沉淀蛋白和萃取一次完成,相比蛋白沉淀法基质效应更小,此方法简便快速,实现了对25OH-D₂和25OH-D₃的分别定量,适用于临床大样本量检测;其次试剂盒稳定性很好,可以满足2-8℃存放,随取随用;检测25-OH VD₂和25-OH VD₃有良好的线性关系,准确性高,重复性好的特点。25-OH VD测定的其中一个问题是室间变异较大,各种免疫学方法之间的变异比较大,该试剂盒溯源至由美国国家标准与技术研究院(National

Institute of Standards and Technology, NIST)提供的SRM 968f,严格按照国家《医疗器械生产质量管理规范》进行质量管理体系建设,并获得ISO 9001及ISO 13485认证证书,试剂盒采用SRM 968f验证了方法的准确性,结果显示25OH-D₂和25OH-D₃的准确度均在100%左右。综上,广州市丰华生物工程有限公司的25-羟基维生素D测定试剂盒(液相色谱-串联质谱法)可以准确反映VD₂和VD₃情况,适用于儿童、孕妇、成年人、老年人的VD水平检测,可以辅助临床指导上述人群有效合理地补充维生素,做到早发现、早干预、早治疗,对营养性疾病的降低有重大意义。

然而此次实验尚有不足,然而此次实验尚有不足,首先未通过比对或室间评价来验证体系的临床效果,其次是此方法仍然面临25-OH VD与结合蛋白彻底分离的问题。

参考文献

- [1] Cai ZL, Zhang QX, Xia ZQ, et al. Determination of serum 25-hydroxyvita min D status among population in southern China by a high accuracy LC-MS/MS method traced to reference measurement procedure[J]. *Nutr Metab (Lond)*, 2020, 17:8.
- [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] 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.
- [4] 潘晓芳,吴静标,黄燕虹,等.我国25-羟基维生素D检测方法及其研究进展[J].*分子诊断与治疗杂志*, 2020, 12(12):1591-1595+1584.
- [5] Van den Ouweland, Johannes MW. Analysis of vita min D metabolites by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Trends Analyt Chem*, 2016, 84:117-130.
- [6] Garg U. 25-Hydroxyvita min D Testing: Immunoassays Versus Tandem Mass Spectrometry[J]. *Clin Lab Med*, 2018, 38(3):439-453.
- [7] Hurst EA, Homer NZ, Denham SG, et al. Development and application of a LC-MS/MS assay for simultaneous analysis of 25-hydroxyvita min-D and 3-epi-25-hydroxyvita min-D metabolites in canine serum[J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2020, 199:105598.
- [8] Tai SS, Bedner M, Phinney KW. Development of a candidate reference measurement procedure for the determination of 25-hydroxyvita min D3 and 25-hydroxyvita min D2 in human serum using isotope - dilution liquid chromatography - tandem mass spectrometry[J]. *Anal Chem*, 2010, 82(5): 1942-1948.
- [9] Stepman HCM, Vanderroost A, Van Uytvanghe K, et al. Candidate reference measurement procedures for serum 25-hydroxyvita min D3 and 25-hydroxyvita min D2 by using isotope-dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Clin Chem*, 2011, 57(3): 441-448.
- [10] 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-hydroxyvita min D3 and 25-hydroxyvita min D2[J]. *Clin Chim Acta*, 2018, 487: 241-249.
- [11] Abouid M, Karażniewicz-Lada M, Pawlak K, et al. Measurement of plasma 25-hydroxyvita min D2, 25-hydroxyvita min D3 and 3-epi-25-hydroxyvita min D3 in population of patients with cardiovascular disease by UPLC-MS/MS method[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2020, 1159:122350.
- [12] Hurst EA, Homer NZ, Denham SG, et al. Development and application of a LC-MS/MS assay for simultaneous analysis of 25-hydroxyvita min-D and 3-epi-25-hydroxyvita min-D metabolites in canine serum[J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2020, 199:105598.
- [13] Scott MG, Gronowski AM, Reid IR, et al. Vita min D: the more we know, the less we know[J]. *Clin Chem*, 2015, 61(3):462-465.

(上接第1009页)

- [10] 闵永龙,刘红,李红波,等.单中心996例腹膜透析患者的转归分析[J].*中国血液净化*, 2018, 17(3):170-176.
- [11] 陈杰勇,李文启,洪智峰,等.射血分数保留慢性心力衰竭患者撤机困难的危险因素分析[J].*中华生物医学工程杂志*, 2017, 23(4):305-310.
- [12] 刘丽茹,何敏华.维持性血液透析患者钙磷代谢及甲状旁腺素水平横断面调查[J].*临床肾脏病杂志*, 2018, 18(1):25-29.
- [13] 秦慧兵,张保朝,张小林,等.血清MCP-1、HMGB1、APN、oxLDL水平与老年脑梗死病情及颈动脉粥样硬化关系[J].*华南预防医学*, 2020, 46(1):72-75.
- [14] Chen Y, Shang D, Shao J, et al. Prognostic significance of carotid plaque presence in peritoneal dialysis patients and its association with the apolipoprotein B/apolipoprotein A1 ratio[J]. *Nephrology (Carlton)*, 2020, 25(12):919-928.

膀胱尿路上皮癌临床诊断及治疗的研究进展

冉灿¹ 蔡翔¹ 龚杨洋¹ 奉友刚^{1,2*}

[摘要] 膀胱尿路上皮癌是威胁人类生命安全的恶性疾病,近年来发病率呈逐渐上升趋势,日益受到临床泌尿外科医师的重视。该疾病由于临床症状无特异性,术前定性诊断较困难,临床治疗效果不理想,预后较差。明确诊断对于手术方案的选择与制定具有决定性作用,合理的治疗手段是改善患者预后、提高其远期生存率的关键。目前临床相关回顾性研究较少,前瞻性随机对照研究基本空白。本文对膀胱尿路上皮癌的流行病学特点、临床及病理诊断、手术治疗、系统化疗(包括新辅助化疗、辅助化疗)和免疫治疗等方面的最新研究进展进行综述。

[关键词] 膀胱尿路上皮癌;影像学检查;腹腔镜手术治疗;化疗

Research progress on clinical diagnosis and treatment of urothelial carcinoma of bladder

RAN Can¹, CAI Xiang¹, GONG Yangyang¹, FENG Yougang^{1,2*}

(1. Graduate School of Zunyi Medical University, Zunyi, Guizhou, China, 563000; 2. Department of Urology, Suining Central Hospital, Suining, Sichuan, China, 629000)

[ABSTRACT] Urothelial carcinoma of bladder is a malignant disease threatening the safety of human life. In recent years, the incidence rate has gradually increased, and it has received increasing attention from urologists. Due to the non-specific clinical symptoms of the disease, preoperative qualitative diagnosis is difficult, the clinical treatment effect is not ideal, and the prognosis is poor. A clear diagnosis is decisive for the selection and formulation of surgical plans. Reasonable treatment is the key to improving the prognosis of patients and increasing their long-term survival rate. At present, there are few retrospective studies related to clinical practice, and prospective randomized control studies are basically blank. This article reviews the latest research progress in the epidemiological characteristics, clinical and pathological diagnosis, surgical treatment, systemic chemotherapy (including neoadjuvant chemotherapy, adjuvant chemotherapy) and immunotherapy of urothelial carcinoma.

[KEY WORDS] Urothelial carcinoma of bladder; Imaging examination; Laparoscopic surgery; Chemotherapy

膀胱癌为临床泌尿生殖系统中较为常见的上皮性恶性肿瘤,占全身恶性肿瘤的3.2%^[1]。膀胱癌具有很明显的“多中心发生”特点,约10%~15%的表浅性膀胱癌最终发展成肌肉浸润性膀胱癌或发生转移。膀胱癌可发生于任何年龄段,其发病率随年龄增长而增加,高发年龄为50~70岁的患

者^[2]。该病细胞类型主要为尿路上皮癌,占90%左右,少见的类型包括腺上皮癌与鳞状上皮癌^[3]。由于膀胱尿路上皮肿瘤有更高的肿瘤分期,且输尿管肌层薄,淋巴丰富,故输尿管膀胱尿路上皮癌更早出现转移或更易侵袭周围组织,最常见的远处转移包括肝脏、肺等,患者预后不佳。早期诊断,

基金项目:贵州省教育厅自然科学研究项目(GZZ20187016)

作者单位:1. 遵义医科大学研究生院,贵州,遵义 563000

2. 遂宁市中心医院泌尿外科,四川,遂宁 629000

*通信作者:奉友刚, E-mail: uroyfeng@sina.com

及时给予有效治疗是提高膀胱尿路上皮癌治疗效果的关键。本文通过综述如何诊断、治疗膀胱尿路上皮癌,旨在提高对膀胱尿路上皮癌的认识及诊治水平,改善患者预后。

1 膀胱尿路上皮癌的诊断

膀胱癌大多发生在膀胱侧壁和后壁,尤其是膀胱三角区与输尿管开口处。早期膀胱尿路上皮癌患者多无特殊阳性体征,出现阳性体征往往病至中晚期^[4]。血尿是该病常见的临床症状,约80%以上膀胱尿路上皮癌患者可见此征象,可为间歇性无痛肉眼血尿或镜下血尿^[5]。约15%左右的膀胱癌患者就诊时无任何症状,影像学检查偶然发现病灶才确诊,仅50%患者能够在术前得到明确诊断,膀胱肿瘤早期很难发现^[6-7]。但近年来,随着医疗技术的不断进步,尤其是膀胱镜及CT膀胱成像的发展,使得早期膀胱肿瘤的检出率显著提高。

1.1 膀胱镜检查

该检查目前仍是临床诊断膀胱尿路上皮癌最可靠的方法。膀胱尿路上皮癌的诊断依赖于膀胱镜检查与病变组织活检^[8]。在进行膀胱镜检查时要注意以下几点:①膀胱充盈速度不宜过快,避免因快速过度充盈而遗漏原位癌;②膀胱黏膜局限或弥散性充血灶应疑为膀胱癌,需取活检。近年发展起来的5-酞氨基乙酰丙酸和己氨乙酸丙酸(5-aminolevulinic acid and hexylacetic propionic acid, HAL)的光动力学膀胱镜检查,可有效提高膀胱肿瘤完全切除率与原位癌的诊断准确率^[9-10]。Bonaventura等^[11]研究指出,HAL荧光膀胱镜检查可高达97%。

1.2 影像学检查

作为常规筛查手段,B超能提示侵犯膀胱壁程度、肿瘤大小,结合患者血尿等相关临床症状,为进一步检查提供线索^[12]。但B超检查易受患者肠内气体、患者体型的影响,诊断价值有限。除B超外,静脉肾盂造影、CT检查及MRI等影像学检查均是重要的基本诊断方法^[13]。其中CT对膀胱肿瘤诊断与分期有重要帮助,可直接显示病灶位置、形态,常表现为膀胱软组织密度肿块影、大小不一,增强扫描强化明显,延长扫描造影剂充盈膀胱时可见充盈缺损影^[14]。虽然CT对直径较小病变可能会出现漏诊,但随着CT尿路造影及上尿路三

维成像的应用,其成像效果可与静脉肾盂造影媲美。Akinori等^[15]报道采用CT尿路造影,上尿路敏感性接近100%,特异性为60%。MRI检查则可在无辐射、无肾功能损伤情况下,清晰显示膀胱大小、病变位置及肿瘤范围。膀胱尿路上皮癌在MRI上的表现与CT相仿,可见突入腔内的肿块,或壁局限性增厚。MRI尿路造影对诊断泌尿系统肿瘤具有很高的价值,可清晰显示尿路梗阻平面及程度^[16]。但对于病变早期,肾积水、输尿管扩张不明显的患者诊断意义不大。静脉肾盂造影对于膀胱尿路未完全梗阻时,可发现肾积水、尿管充盈缺损等间接征象,但梗阻严重时患侧不显影,无法直观显示肿瘤,因此对膀胱肿瘤诊断存在一定局限性,其诊断膀胱尿路上皮癌的作用是了解肾脏形态与功能,在一定程度上显示梗阻部位及肿瘤形态。

1.3 尿脱落细胞学检查

尿脱落细胞学检查指标较多,包括有酸碱度、尿比重、尿胆原、隐血、尿蛋白、尿糖及尿红细胞等。该检查对膀胱尿路上皮癌的临床定性诊断具有重要价值,特异性可高达85%~100%,但敏感性较低^[17]。该检查费用较高,一次检查需较多的脱落细胞,且无法作为术前定性诊断的依据,因此无法在基层医院推广普及。对于膀胱尿路上皮癌的诊断金标准为膀胱镜并取活检,其灵敏度可高达94%^[18],但费用较高,属于有创检查,不宜作为常规检查手段。因此,尿脱落细胞学检查在膀胱尿路上皮癌的术前定性诊断中因其操作便捷、特异性高且无创性的优势广泛应用于临床中^[19]。

2 膀胱尿路上皮癌的治疗

由于膀胱肿瘤的发病率低,缺乏前瞻性随机对照临床研究的结果,目前对各种治疗的效果尚无统一定论。随着医疗技术的提高,现可直接看到全部尿路的各级管腔,使得早期诊断准确率大大提高。科学技术的提高也使得膀胱肿瘤治疗有了更多的选择,但总体治疗原则是不变的,即在确保临床治疗效果的同时保障患者安全。治疗方案的选择与制定主要依据肿瘤组织学、生物学特性,且必须将患者身体状况、对侧肾功能考虑在内,告知患者治疗方案能带来的益处及存在的风险。临床目前对膀胱尿路上皮癌的治疗方法仍是以手术为主,辅以化疗、放射治疗,术后定期膀胱灌注治疗。

2.1 腹腔镜下根治性膀胱切除与尿流改道

腹腔镜下根治性膀胱切除术+尿流改道是治疗膀胱癌最有效的手段,具有创伤小、康复快的优势,但切除膀胱后仍需做一小切口来完成尿流改道,手术时间较长,且费用较高,使其临床应用受到限制^[20]。在并发症与控瘤效果方面,腔镜下手术与开腹手术相当^[21]。在尿流改道方面,肠道原位新膀胱仍以应用回肠为主,少数应用结肠或回结肠。尽管成功的原位新膀胱术具有明显优势,但该方法操作复杂、术后并发症多,临床实际应用有限^[22]。总的来说,目前回肠导管术占全部尿路改道术的80%左右,少数则做输尿管与乙状结肠吻合,利用肛门括约肌控尿的可控性尿流改道^[23]。

目前关于根治术中是否清扫淋巴结及清扫淋巴结是否能改善患者预后仍存在一定争议。近年来,大样本的回顾性分析研究结果发现,根治术中清扫淋巴结可改善患者预后,为术后辅助治疗提供指导意见,但扩大淋巴结清扫对改善患者预后意义不大^[24-25]。

2.2 围手术辅助化疗

膀胱尿路上皮癌对化疗中度敏感,临床总有效率在70%左右^[26]。Bhutada等^[27]研究发现,新辅助化疗可有效改善术后患者远期生存率。分层分析发现新辅助化疗主要使局部晚期的膀胱癌(T3/T4或区域淋巴结阳性)患者获益,对早期患者预后没有影响。由于术前分期的局限性,部分患者对化疗不敏感,新辅助化疗会导致患者错过最佳治疗时期,以及担心化疗副作用对手术结果造成影响,导致新辅助化疗在临床上无法普及。而术后辅助化疗则在逐年增加,目前已达到20%^[28]。主要是针对术后病理分期为局部晚期或切缘阳性的患者。Teruo I等^[29]研究结果表明,术后辅助化疗可改善患者预后。但术后辅助化疗缺乏前瞻性随机对照研究的证据支持,因此对其确切疗效存在质疑。由于腹腔镜下根治性膀胱切除+尿流改道手术复杂、术后并发症发生率高,有关术后辅助化疗的前瞻性随机对照临床研究难度非常之大,入组患者非常难,部分设计良好的多中心研究在施行多年后无法完成入组患者而终止,许多已入组的病例因术后并发症无法按研究方案的要求进行辅助化疗,导致疗效无法判断^[30]。

2.3 免疫治疗

尿路上皮癌属于具有广泛突变谱的恶性肿瘤,其可能会在已广泛应用的免疫治疗中受益。基于肿瘤免疫学研究数据,截止目前,几种免疫检查点抑制剂,比如PD-1、PD-L1和细胞毒T淋巴细胞相关蛋白4抑制剂,正在进行研究或者已经临床应用于治疗包括局部进展期或远处转移尿路上皮癌。Atezolizumab、Pembrolizumab、Nivolumab、Durvalumab及Avelumab 5种免疫检查点抑制剂已获得美国食品和药品监督管理局批准,作为铂类化疗失败的进展期或远处转移尿路上皮癌患者的一线或二线治疗药物^[31]。且国外多项关于上述5种免疫检查点抑制剂治疗铂类难治性进展期或远处转移尿路上皮癌患者的Ⅲ期临床试验结果均提示其疗效显著,患者相关不良反应发生率低^[32]。由于免疫检查点抑制剂在治疗尿路上皮癌患者中表现出了临床有效性和安全性,为进一步增强免疫检查点抑制剂治疗膀胱尿路上皮癌的疗效和提供更加有效的阻断途径,目前几项PD-1/PD-L1抑制剂联合化疗治疗尿路上皮癌的试验正在进行中。

3 小结与展望

早期诊断、及时有效治疗是改善膀胱尿路上皮癌患者预后的关键,通过早期诊断有利于对患者进行个体化的管理与治疗。目前缺乏对该疾病敏感性高、特异性好的检验和检查诊断方法,且目前仍缺乏统一标准,有待于进一步的临床研究。局部治疗方法有手术切除、体外放疗化疗及免疫治疗等。而有关膀胱尿路上皮癌的诊断与治疗仍存在许多技术性的问题需进一步解决。但近几十年来,经过研究者的长期努力,对膀胱尿路上皮癌发病机制有了更深的了解,不断筛选出用于临床诊断和预测膀胱尿路上皮癌复发、进展检查手段与治疗方法,从而更好地改善患者预后,提高其生存质量与远期生存率。

参考文献

- [1] 肖飞, 辛士永, 邵长帅, 等. miR-182-5p通过HOXB7基因调控膀胱癌细胞的增殖和侵袭迁移[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(8): 1103-1107.
- [2] Geynisman DM, Handorf E, Wong YN, et al. Advanced small cell carcinoma of the bladder: clinical characteristics, treatment patterns and outcomes in 960 patients and comparison with urothelial carcinoma[J]. Cancer Med, 2016, 5(2):192-199.

- [3] 郑铎, 刘隽, 岳中瑾, 等. 上尿路尿路上皮癌术后膀胱灌注化疗的研究进展[J]. 中华泌尿外科杂志, 2020, 41(5): 397-400.
- [4] Anja R, Nadine R, Anica H, et al. Diagnostic and Prognostic Potential of MicroRNA Maturation Regulators Droscha, AGO1 and AGO2 in Urothelial Carcinomas of the Bladder [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(6):1622-1623.
- [5] 吴建强, 黄成, 赵浩, 等. 培美曲塞钠和吉西他滨分别联合顺铂治疗晚期膀胱尿路上皮癌的安全性和有效性的临床对比研究[J]. 国际泌尿系统杂志, 2019, 39(5): 811-815.
- [6] Gunlusoy B, Ceylan Y, Degirmenci T, et al. The potential effect of age on the natural behavior of bladder cancer: Does urothelial cell carcinoma progress differently in various age groups? [J]. *Kaohsiung J Med Sci*, 2016, 32(5):261-266.
- [7] 张涛, 王志平. 膀胱尿路上皮癌PD-1/PD-L1抑制剂的治疗进展[J]. 海南医学院学报, 2019, 25(8): 81-86.
- [8] Darling D, Luxmanan C, Paul O' Sullivan, et al. Clinical Utility of Cxbladder for the Diagnosis of Urothelial Carcinoma [J]. *Adv Ther*, 2017, 34(5):1087-1096.
- [9] Lázaro M, Gallardo E, Doménech, M, et al. SEOM Clinical Guideline for treatment of muscle-invasive and metastatic urothelial bladder cancer (2016)[J]. *Clin Transl Oncol*, 2016, 18(12):1197-1205.
- [10] Taylor J, Meng X, Ghandour R, et al. Advancements in the clinical management of upper tract urothelial carcinoma [J]. *Exp Rev Ant Ther*, 2019, 19(12):465.
- [11] Bonaventura A, Jung V, Ohlmann CH, et al. Fluorescence in situ hybridization for upper urinary tract urothelial carcinoma - an important diagnostic tool in clinical practice [J]. *Eur Urol Suppl*, 2017, 16(3):e1801.
- [12] Basu A, Rafatnia A, Manoli H, et al. MDSC clinical assay for cancer detection and monitoring in urothelial carcinoma [J]. *J Clin Oncol*, 2018, 36(5_suppl):TPS110-TPS110.
- [13] 徐玉节, 候腾, 李兵, 等. 经腹入路一站式腹腔镜肾脏-输尿管-膀胱袖状切除术治疗上尿路尿路上皮癌的临床研究[J]. 临床泌尿外科杂志, 2019, 34(2):32-35.
- [14] Hayashida M, Yano A, Hagiwara K, et al. Relevance of concurrent hypercalcemia in ureteric sarcoidosis complicated with bladder urothelial carcinoma: a case report [J]. *BMC Nephrol*, 2020, 21(1):644-645.
- [15] Akinori M, Hirotsugu N, Ikko T, et al. Clinical Significance of Squamous Differentiation in Urothelial Carcinoma of the Bladder [J]. *Cancer control*, 2018, 25(1):107327481880026.
- [16] 杨进, 董小敏, 乔西民, 等. 膀胱癌患者尿液尿路上皮癌胚抗原1基因表达及意义[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2020, 34(11):25-28.
- [17] Aragon-Ching JB, Trump DL, Wang H. Comparative analyses of trends and survival in patients with urothelial versus nonurothelial bladder carcinoma: National Cancer Database (NCDB) analysis [J]. *J Clin Oncol*, 2019, 37(7_suppl):402.
- [18] 付什, 杨灿, 巩宇航, 等. 上尿路尿路上皮癌术后并发膀胱肿瘤的研究进展[J]. 临床泌尿外科杂志, 2019, 34(2):47-51.
- [19] Nagumo Y, Kawai K, Kojima T, et al. Prognostic significance of non-urothelial carcinoma of bladder: analysis of nationwide hospital-based cancer registry data in Japan [J]. *Jpn J Clin Oncol*, 2020, 50(3):7486.
- [20] John A, Robador JR, Vidalys S, et al. Urothelial carcinoma of the bladder induces endothelial cell activation and hypercoagulation [J]. *Mol Cancer Res*, 2020, 18(7):1099-1109.
- [21] 郭雪涛, 马远, 王昕, 等. 短周期二次经尿道膀胱肿瘤电切术联合化疗治疗T2期膀胱尿路上皮癌的临床分析[J]. 癌症进展, 2020, 18(6):618-620.
- [22] Simone DB, Brian R, Tim S, et al. The dog as an animal model for bladder and urethral urothelial carcinoma: Comparative epidemiology and histology [J]. *Oncol Lett*, 2018, 16(2):1641-1649.
- [23] Akhtar M, Al-Bozom IA, Gashir MB, et al. Intrinsic Molecular Subclassification of Urothelial Carcinoma of the Bladder: Are We Finally there? [J]. *Adv Anat Pathol*, 2019, 26(4):1.
- [24] 李曾, 廖洪, 毛顿, 等. 原发性膀胱浆细胞样/印戒细胞尿路上皮癌的临床特征和诊治分析[J]. 现代泌尿生殖肿瘤杂志, 2018, 10(1):16-21.
- [25] Doeveren TV, Nakauma - Gonzalez JA, Mason AS, et al. The clonal relation of primary upper urinary tract urothelial carcinoma and paired urothelial carcinoma of the bladder [J]. *Int J Cancer*, 2020, 36(5):241-242.
- [26] Sirohi D, Gandhi J, Amin MB, et al. Amyloidosis of the bladder and association with urothelial carcinoma: report of 29 cases [J]. *Hum Pathol*, 2019, 93(6):48-53.
- [27] Bhutada E, Shepherd B, Lampe G, et al. Infiltrating high grade micropapillary urothelial carcinoma of the bladder in association with bk virus in kidney-pancreas transplant recipient: a case report [J]. *Pathology*, 2019, 51(9):73-74.
- [28] Devrim T, Atac F, Altunkaya C, et al. Rare Plasmacytoid Urothelial Carcinoma of the Bladder: Two Case Reports [J]. *Urol J*, 2018, 16(1):46.
- [29] Teruo I, Hirofumi U, Yukihiko A, et al. A Panel of MicroRNA Signature as a Tool for Predicting Survival of Patients with Urothelial Carcinoma of the Bladder [J]. *Eur Urol Suppl*, 2018, 16(3):e675.
- [30] Schuetfort V, Shariat S F, Rink M. Surgery only? Multimodal treatment for urothelial carcinoma of the bladder [J]. *Aktuelle Urol*, 2020, 51(4):353-362.
- [31] Sarier M, Sepin N, Keles Y, et al. Is There any Association between Urothelial Carcinoma of the Bladder and Human Papillomavirus? A Case-Control Study [J]. *Urol Int*, 2019, 45(9):1-6.
- [32] Takemoto K, Teishima J, Kohada Y, et al. The Impact of Histological Variant on Oncological Outcomes in Patients With Urothelial Carcinoma of the Bladder Treated With Radical Cystectomy [J]. *Anticancer Res*, 2020, 40(8):4787-4793.

CD74的免疫学功能及在系统性红斑狼疮中的研究进展

纪婷婷¹ 袁超^{2*} 黄琴³

[摘要] CD74, 又称恒定链, 是一种非多态性 II 型跨膜糖蛋白, 最初认为它是 MHC II 类分子的分子伴侣, 辅助递呈外源性抗原肽, 启动体液免疫反应, 后来发现 CD74 作为巨噬细胞迁移抑制因子(MIF)的高亲和力受体, 可以介导其生物学效应的发挥, CD74 还具有调节淋巴细胞发育及介导胸腺选择等作用。系统性红斑狼疮(SLE)是一种病因不明的累及多系统的自身免疫性疾病, 近年来研究发现 CD74 可能在 SLE 的发病机制中发挥作用, MIF-CD74 信号通路有望成为有效治疗靶点。本文总结了 CD74 的结构和免疫学功能, 以及 MIF-CD74 信号通路在 SLE 的发病机制和靶向治疗中的研究进展。

[关键词] CD74; 系统性红斑狼疮; 巨噬细胞迁移抑制因子; 免疫学功能; 综述

Immunological function of CD74 and its research progress in systemic lupus erythematosus

Ji Tingting¹, Yuan Chao^{2*}, Huang Qin³

(1. Department of Laboratory Medicine, Guangzhou, Guangdong, China, 510515; 2. Department of Neurology, Guangzhou, Guangdong, China, 510515; 3. Department of Rheumatology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong, China, 510515)

[ABSTRACT] CD74, also known as the invariant chain, is a non-polymorphic II type transmembrane glycoprotein. It is a molecular chaperone of MHC II molecules, which assisted in the presentation of exogenous antigen peptides and initiated humoral immune responses. CD74 is also a high-affinity receptor of macrophage migration inhibitory factor (MIF), and mediates its biological effects. In addition, CD74 has a function of regulating lymphocytes development and mediating thymus selection. Systemic lupus erythematosus (SLE) is an autoimmune disease involving multiple systems with unknown etiology. In recent years, studies have found the CD74 plays a role in the pathogenesis of SLE, and the MIF-CD74 signaling pathway is expected to become an effective therapeutic target. This article summarizes the structure and immunological functions of CD74, as well as the progress of research on the MIF-CD74 signaling pathway in the pathogenesis and targeted therapy of SLE.

[KEY WORDS] CD74; Systemic lupus erythematosus; Macrophage migration inhibitory factor; Immunological function; Review

CD74, 又称作恒定链(invariant chain, Ii), 是一种非多态性 II 型跨膜糖蛋白, 最初被认为是 MHC II 类分子的分子伴侣, 辅助 MHC II 类分子递呈外源性抗原肽, 后来的研究发现 CD74 也参与了 MHC I 类分子的内源性抗原的递呈^[1-2]。CD74 还参与了免疫系统多种细胞的生理过程, 介导许多

疾病的发生发展, 包括自身免疫性疾病、肿瘤、代谢性疾病等^[3-4]。系统性红斑狼疮(Systemic Lupus Erythematosus, SLE)是一种病因不明的累及多系统的自身免疫性疾病, 特征为自身抗体的产生、补体活化及免疫复合物的沉积, 造成靶器官的炎症和损伤。SLE 的主要发病人群是育龄期女性, 临

基金项目: 国家自然科学基金项目(81801624), 广东省医学科研基金(A2019020)

作者单位: 1. 南方医科大学南方医院检验科, 广东, 广州 510515

2. 南方医科大学南方医院神经内科, 广东, 广州 510515

3. 南方医科大学南方医院风湿免疫科, 广东, 广州 510515

*通信作者: 袁超, E-mail: yuanchao613@163.com

床表现具有多样性,任何一个重要器官都可能受累^[5]。近年来许多基础研究发现,CD74在SLE的发病机制中发挥作用,本研究就CD74的免疫学功能及其在SLE中的研究进展做一简要综述。

1 CD74的结构和免疫学功能

CD74的结构由N端胞质区,短跨膜区和C端长网腔区三个结构域组成,呈高度保守性。人类CD74由5号染色体编码,根据分子大小分为4个亚型:p33、p35、p41、p43。CD74主要存在于细胞内,与MHC II类分子的 α 和 β 链在免疫细胞的内质网内聚合成三聚体或九聚体($\alpha\beta\text{Ii}$)₃,促进MHC II类分子折叠与组装,促使MHC II类复合物从内质网中排出^[6]。约2%~5%的CD74表达于细胞表面,如B细胞系、上皮细胞、单核细胞等,然而这些细胞如何调控CD74的表达尚不清楚。CD74在损伤、炎症和肿瘤等不同疾病中的表达均升高,提示其在多种免疫应答、免疫调节中发挥重要作用^[7-8]。

1.1 调节分子运输

CD74的基本功能是辅助MHC II类分子递呈外源性抗原肽。在上述九聚体中,CD74分子的MHC II相关恒定链肽(class II-associated invariant chain peptide, CLIP)占据II类分子的肽结合区,阻止内源性肽与II类分子的结合。当外来抗原进入体内,含外来抗原多肽的内体-溶酶体可与CD74融合,CD74被蛋白酶降解,仅CLIP残留,直至被待提呈的抗原肽取代,MHC II类分子结合抗原肽并随后转运至细胞表面,被T细胞表面的受体识别从而启动免疫应答^[2,9]。MHC II类分子与CD74的结合是动态的,不同的II类分子表型与CD74的不同区段之间存在复杂的相互作用,进一步调控MHC II类分子与抗原肽的结合^[10]。CD74也可以辅助MHC I类分子递呈内源性抗原肽。已经证实小鼠CD74介导MHC I类分子在内体与外源性抗原的定位,参与MHC I类分子交叉递呈抗原肽,继而启动细胞毒T淋巴细胞应答^[11]。

1.2 调节淋巴细胞发育

CD74参与调节B、T淋巴细胞的发育。在B细胞成熟过程中,缺乏CD74的B细胞不能由过渡1型分化为过渡2型。CD74的N端序列片段(N-terminal fragments, NTF)可以影响B细胞的膜内蛋白酶类信号肽肽酶2A(signal peptide peptidase-like 2A, SPPL2A)缺失株的B细胞受体信号的传导^[12]。在SPPL2A缺陷小鼠中,未加工的CD74 NTF的积

累干扰了外周B细胞稳态^[13]。人的B细胞中若缺乏SPPL2a也会造成CD74 NTF的积累^[14]。因此,SPPL2a可以通过CD74依赖性方式在小鼠和人体中调节B细胞发育。体外实验也表明使用特异性抗体同时或单独抑制MIF或CD74可显著影响B细胞增殖^[15]。胸腺T细胞缺乏CD74会导致异常的T细胞成熟。由B细胞、巨噬细胞、树突状细胞和胸腺上皮细胞表达的MHC II类分子,可以向辅助T细胞提供抗原肽,并指导CD4⁺T细胞的胸腺选择。Wong P等人对CD74缺陷小鼠进行研究发现在缺乏CD74的情况下MHC II类分子的改变对CD4⁺T细胞的胸腺选择及外周表型有显著影响^[16]。

1.3 MIF的高亲和力受体

CD74作为巨噬细胞迁移抑制因子(Macrophage migration inhibitory factor, MIF)的高亲和力受体,可以介导其生物学效应的发挥^[7]。MIF是一种具有多效性的促炎因子,在固有免疫中发挥重要作用,比如抑制巨噬细胞迁移、促进白细胞在炎症部位募集等^[17]。MIF由多种细胞分泌,与各类细胞受体(如CD74、CXCR2和CXCR4等)相互作用,发挥不同的生物学功能。MIF的过量表达与过度的炎症反应和免疫病理过程密切相关^[18]。MIF与CD74胞外段结合,造成细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)通路活化,该过程需要通过CD74/CD44复合受体共同介导。CD44是一种单次跨膜蛋白,具有激酶活化特征。除了ERK通路以外,MIF还可以通过CD74/CD44复合受体相互作用,激活磷脂酰肌醇-3激酶/AKT(phosphatidylinositol 3-kinase/AKT, PI3K-AKT)转导级联,细胞核激活核转录因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)和单磷酸腺苷激活的蛋白激酶(adenosine mono phosphate-activated protein kinase, AMPK)通路,启动B细胞增殖。在T细胞中,CD74和CXCR4在细胞膜上形成信号复合物,参与MIF激活AKT、JNK信号途径及上调CXCL8的表达^[2]。

2 CD74在SLE中的研究进展

SLE目前病因不明,病理机制涉及T细胞和B细胞调节异常、功能受损,自身抗体的产生以及炎症细胞因子的参与,如TNF- α 、IL-6、IFN- γ 、IL-10等^[5]。近年来有关CD74在SLE中的研究进展都是围绕着MIF-CD74信号通路及其相关的免疫炎症细胞因子展开。

2.1 MIF-CD74 信号通路参与狼疮肾炎的发病

狼疮肾炎是 SLE 最常见的临床表现之一^[19], MIF-CD74 信号通路参与狼疮肾炎的发病。肾小管上皮细胞表面表达 CD74, 也分泌低水平的 MIF。出现急性肾损伤时, MIF 和 CD74 的表达会增多以应对损伤部位的炎症反应需要^[20]。一项针对 SLE 病人体内 MIF 表达水平的荟萃研究表明, SLE 病人血清 MIF 过度表达, 并且与狼疮疾病活动度、肾损伤的严重程度呈正相关^[21]。此外, 针对狼疮肾炎患者尿液靶向蛋白质组学的荟萃分析表明 MIF 在狼疮肾炎患者尿液中也显著升高^[22]。Hoi AY 等^[23]人的研究发现 MRL/lpr 狼疮小鼠的肾脏和皮肤的 MIF 水平明显高于无疾病状态的 MRL/MpJ 对照小鼠, MIF 基因缺乏的 MRL/lpr 狼疮小鼠的肾小球肾炎和皮肤表现较 MRL/lpr 小鼠均有所减轻, 且存活时间更长。BWF₁ 狼疮小鼠的 B 细胞中 CD74 蛋白及 mRNA 水平较健康对照小鼠显著升高, 其 MIF 与 CD44 的水平也显著升高^[24]。在 MRL/lpr 狼疮小鼠肾组织中, 总体 CD74 水平较正常对照组高, 炎性浸润区的肾小球、肾小管间质 CD74⁺ 细胞多于对照组, 推测 CD74 可能为狼疮肾炎病理表现与发展的直接因素^[25]。Cai 等^[26]发现 β -arrestin 2 敲除小鼠的狼疮肾炎更严重, 而 β -arrestin 2 与 Zbtb46 存在相互作用, 这种相互作用可能是通过作用于 CD74 等而抑制树突状细胞迁移。

2.2 与 MIF-CD74 有关的靶向治疗

CD74 广泛表达于霍奇金淋巴瘤, B 细胞淋巴瘤, 结外 NK/T 细胞淋巴瘤, 成熟 T 细胞淋巴瘤及浆细胞骨髓瘤, 此前以 CD74 为靶点的人源化单克隆抗体 Milatuzumab (又称 hLL1 或 IMMU-115) 被应用于治疗多发性骨髓瘤、非霍奇金淋巴瘤和慢性淋巴细胞白血病等恶性血液系统疾病^[27-28]。Milatuzumab 可以迅速结合肿瘤 B 细胞分泌的大量的 CD74, 继而抑制 B 细胞系的增殖并促进其凋亡, 因此 Milatuzumab 可以作为拮抗剂阻断 MIF-CD74 的信号传导。体外实验证明, Milatuzumab 具有抑制 CD27 幼稚 B 细胞增殖的能力, 有望成为治疗自身免疫性疾病的单抗^[29]。Leng L 等^[30]人使用 MIF 拮抗剂 ISO-1 治疗 MRL/lpr 小鼠和 NZB/NZW F1 小鼠时发现, MRL/lpr 小鼠的肾小球肾炎缓解, CD74⁺ 和 CXCR4⁺ 诱导的白细胞聚集被抑制以及血浆 TNF- α 的水平出现降低, 并且 NZB/NZW F1 小鼠的 CCL2 水平也发生了降低; 在用 ISO-1 处理后, 两种狼疮易感性小鼠的肾组

织中 TNF- α 、IL-1 β 和 CCL2 的 mRNA 表达均降低。然而, 2012 年有一项抗 MIF 单克隆抗体在狼疮肾炎中应用的 I 期临床研究 (NCT01541670) 由于招募人数有限被提前终止^[31]。组织蛋白酶 S 是一种在抗原提呈细胞中表达的半胱氨酸蛋白酶, 参与 CD74 的降解, Rupanagudi K V 等^[32]人使用组织蛋白酶 S 拮抗剂 RO5461111 治疗 MRL/lpr 小鼠发现, RO5461111 在抑制组织蛋白酶 S 的同时, 可间接抑制 CD74 的降解, 缓解体液免疫和组织炎症, 改善狼疮小鼠的系统损害。hCDR1 是一种基于人自身抗体互补决定区 1 (complementarity-determining region 1, CDR1) 的耐受肽, 可以减轻自发狼疮模型小鼠的临床症状。动物实验发现, 接受 hCDR1 治疗的 BWF₁ 狼疮小鼠脾细胞表面, 脑部海马体与肾组织中 CD74 与 CD44 的表达显著下调, 表明 hCDR1 对狼疮小鼠的治疗作用至少有一部分是通过影响 MIF-CD74 信号通路来实现^[21]。对急性肾损伤小鼠模型的研究表明 MIF 基因敲除或使用 MIF 抑制剂可使 CD74-NF κ B 信号通路失活而起治疗作用^[33], 狼疮肾炎患者血液、尿液存在 MIF 上升的现象, 针对 MIF 的靶向治疗也可能通过该机制起治疗作用。

3 总结与展望

综上所述, CD74 在自身免疫反应中发挥重要作用, MIF-CD74 信号通路与 SLE, 尤其是狼疮肾炎的发病机制密切相关。因此, 未来在 SLE 的靶向治疗领域, MIF-CD74 信号通路有望成为有效治疗靶点, 但其应用范围、对于 SLE 病人的疗效及不良反应还有待临床试验进一步研究。

参考文献

- [1] Lausen M, Poulsen TBG, Christiansen G, et al. Proteomic analysis of lipopolysaccharide activated human monocytes [J]. Mol Immunol, 2018, 103:257-269.
- [2] Su H, Na N, Zhang X, et al. The biological function and significance of CD74 in immune diseases [J]. Inflamm Res, 2017, 66(3): 209-216.
- [3] Bilsborrow JB, Doherty E, Tilstam PV, et al. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) as a therapeutic target for rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus [J]. Exp Opin Ther Targets, 2019, 23(9): 733-744.
- [4] Laskin J, Liu SV, Tolba K, et al. NRG1 fusion-driven tumors: biology, detection, and the therapeutic role of afatinib and other ErbB-targeting agents [J]. Ann Oncol, 2020, 31(12): 1693-1703.

- [5] Mahajan A, Amelio J, Gairy K, et al. Systemic lupus erythematosus, lupus nephritis and end-stage renal disease: a pragmatic review mapping disease severity and progression [J]. *Lupus*, 2020, 29(9): 1011-1020.
- [6] Schröder B. The multifaceted roles of the invariant chain CD74-More than just a chaperone [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1863(6 Pt A): 1269-1281.
- [7] Cheng WL, Kao YH, Chen YC, et al. Macrophage migration inhibitory factor increases atrial arrhythmogenesis through CD74 signaling [J]. *Transl Res*, 2020, 216: 43-56.
- [8] Sogkas G, Klose K, Baerlecken N, et al. CD74 is a T cell antigen in spondyloarthritis [J]. *Clini Exper Rheum*, 2020, 38(2): 195-202.
- [9] Mensali N, Grenov A, Pati NB, et al. Antigen-delivery through invariant chain (CD74) boosts CD8 and CD4 T cell immunity [J]. *Oncoimmunology*, 2019, 8(3): 1558663.
- [10] Nguyen TB, Jayaraman P, Bergseng E, et al. Unraveling the structural basis for the unusually rich association of human leukocyte antigen DQ2.5 with class-II-associated invariant chain peptides [J]. *J Biol Chem*, 2017, 292(22): 9218-9228.
- [11] Basha G, Omilusik K, Chavez-Steenbock A, et al. A CD74-dependent MHC class I endolysosomal cross-presentation pathway [J]. *Nat Immunol*, 2012, 13(3): 237-245.
- [12] Schneppenheim J, Looock AC, Hüttl S, et al. The Influence of MHC Class II on B Cell Defects Induced by Invariant Chain/CD74 N-Terminal Fragments [J]. *J Immunol*, 2017, 199(1): 172-185.
- [13] Schneppenheim J, Hüttl S, Mentrup T, et al. The intramembrane proteases signal Peptide peptidase-like 2a and 2b have distinct functions in vivo [J]. *Mol Cell Biol*, 2014, 34(8): 1398-1411.
- [14] Hüttl S, Helfrich F, Mentrup T, et al. Substrate determinants of signal peptide peptidase-like 2a (SPPL2a)-mediated intramembrane proteolysis of the invariant chain CD74 [J]. *Biochem J*, 2016, 473(10): 1405-1422.
- [15] Klasen C, Ziehm T, Huber M, et al. LPS-mediated cell surface expression of CD74 promotes the proliferation of B cells in response to MIF [J]. *Cell Signal*, 2018, 46: 32-42.
- [16] Wong P, Rudensky AY. Phenotype and function of CD4⁺T cells in mice lacking invariant chain [J]. *J Immunol*, 1996, 156(6): 2133-2142.
- [17] Hoffmann A, Zwißler LC, El Bounkari O, et al. Studying the Pro-Migratory Effects of MIF [J]. *Methods Mol Biol*, 2020, 2080: 1-18.
- [18] Harris J, VanPatten S, Deen NS, et al. Rediscovering MIF: New Tricks for an Old Cytokine [J]. *Trends Immunol*, 2019, 40(5): 447-462.
- [19] Parikh SV, Almaani S, Brodsky S, et al. Update on Lupus Nephritis: Core Curriculum 2020 [J]. *Am J Kidney Dis*, 2020, 76(2): 265-281.
- [20] Shachar I. An essential MIF-CD74 signaling axis in kidney tubular regeneration, with prospects for precision medicine and pharmacological augmentation [J]. *Am J Physiol Renal physi-*
- ol*, 2017, 313(5): F1084-F1086.
- [21] Bae SC, Lee YH. Circulating macrophage migration inhibitory factor levels and its polymorphisms in systemic lupus erythematosus: A meta-analysis [J]. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2017, 63(10): 74-79.
- [22] Zhang T, Duran V, Vanarsa K, et al. Targeted urine proteomics in lupus nephritis - a meta-analysis [J]. *Expt Rev Proteom*, 2020, 17(10): 767-776.
- [23] Hoi AY, Hickey MJ, Hall P, et al. Macrophage migration inhibitory factor deficiency attenuates macrophage recruitment, glomerulonephritis, and lethality in MRL/lpr mice [J]. *J Immunology*, 2006, 177(8): 5687-5696.
- [24] Lapter S, Ben-David H, Sharabi A, et al. A role for the B-cell CD74/macrophage migration inhibitory factor pathway in the immunomodulation of systemic lupus erythematosus by a therapeutic tolerogenic peptide [J]. *Immunology*, 2011, 132(1): 87-95.
- [25] Zhou Y, Chen H, Liu L, et al. CD74 Deficiency Mitigates Systemic Lupus Erythematosus-like Autoimmunity and Pathological Findings in Mice [J]. *J Immunol*, 2017, 198(7): 2568-2577.
- [26] Cai Y, Yang C, Yu X, et al. Deficiency of β -Arrestin 2 in Dendritic Cells Contributes to Autoimmune Diseases [J]. *J Immunol*, 2019, 202(2): 407-420.
- [27] Sohail A, Mushtaq A, Iftikhar A, et al. Emerging immune targets for the treatment of multiple myeloma [J]. *Immunotherapy*, 2018, 10(4): 265-282.
- [28] Zhao S, Molina A, Yu A, et al. High frequency of CD74 expression in lymphomas: implications for targeted therapy using a novel anti-CD74-drug conjugate [J]. *J Pathol Clin Res*, 2019, 5(1): 12-24.
- [29] Frölich D, Blassfeld D, Reiter K, et al. The anti-CD74 humanized monoclonal antibody, milatuzumab, which targets the invariant chain of MHC II complexes, alters B-cell proliferation, migration, and adhesion molecule expression [J]. *Arthr Res Ther*, 2012, 14(2): R54.
- [30] Leng L, Chen L, Fan J, et al. A small-molecule macrophage migration inhibitory factor antagonist protects against glomerulonephritis in lupus-prone NZB/NZW F1 and MRL/lpr mice [J]. *J Immunol*, 2011, 186(1): 527-538.
- [31] Bilsborrow JB, Doherty E, Tilstam PV, et al. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) as a therapeutic target for rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus [J]. *Exp Ther Targ*, 2019, 23(9): 733-744.
- [32] Rupanagudi KV, Kulkarni OP, Lichtnekert J, et al. Cathepsin S inhibition suppresses systemic lupus erythematosus and lupus nephritis because cathepsin S is essential for MHC class II-mediated CD4 T cell and B cell priming [J]. *Ann Rheum Dis*, 2015, 74(2): 452-463.
- [33] Li J, Tang Y, Tang PMK, et al. Blocking Macrophage Migration Inhibitory Factor Protects Against Cisplatin-Induced Acute Kidney Injury in Mice [J]. *Mol Ther*, 2018, 26(10): 2523-2532.

广东药科大学生命科学与生物制药学院

广东药科大学生命科学与生物制药学院由原生命科学与生物制药学院和原基础学院优化融合而成。现拥有生物制药、生物工程、生物科学、生物技术、海洋药学5个本科专业/系,以及基础医学方向的人体解剖与组织胚胎学系、病原生物学与免疫学系、生物化学与分子生物学系、细胞生物学与医学遗传学系、病理学与病理生理学系、生理学系,共11个学系;拥有广东省第一个生物工程一级学科硕士学位点、基础医学一级学科硕士学位点、微生物与生化药学二级学科硕士学位点,同时也是生物与医药专业学位硕士点承担单位之一,是国家和广东省“生物医药创新性人才培养实验区”。

学院师资队伍雄厚,目前在职工168人,具有博士学位专任教师118人,副高以上教师94人,南粤优秀教师2名,广东省“千百十工程”省级培养对象5人,广东省级教学团队1个,广东省高校创新科研团队2个。近五年来取得全国高等医学院校青年教师教学基本功比赛、广东省高校青年教师教学大赛等各类奖项共13项。

学院现有专业实验室面积约10 000平米,教学科研设备总资产约4 500万元。拥有广东省生物技术候选药物研究重点实验室、广东省生物活性药物研究重点实验室、广东省高校国际暨港澳台合作创新平台—广东药科大学中英生物资源与创新药物联合研究中心、广东省高校实验教学示范中心——生物制药综合性工程训练中心、广东省基础综合技能实验教学示范中心、中央财政支持建设的“药用生物活性物质研究创新实践基地”、广东药科大学亮点工程“人体科学教育中心”等教学重点平台。近年来,获批省级质量工程项目18项,获广东省教学成果一等奖等教学成果奖4项。

学院科研主要聚焦于生命科学、基础医学、生物医药领域开展基础研究与应用开发,包括生物制药、生物材料、细胞工程、抗体工程、免疫治疗、生物资源等。近年来,承担了包括国家“重大新药创制”重大科技专项、国家863高技术研究发展计划、国家自然科学基金、各类省市级科技项目以及企业委托的新药研发与产业化项目多项,发表学术论文近800余篇,登记软件著作权2项,获得省市级科研成果奖多项。



杂志简介：

《分子诊断与治疗杂志》于 2009 年 5 月创刊，是由中山大学主管，《中国家庭医生》杂志社有限公司主办，广州达安基因股份有限公司承办的面向国内外公开发行的分子医学权威性刊物，也是我国第一份以分子诊断与治疗学科为主要内容的分子医学专业学术期刊。本刊以传播分子医学理念、报道分子医学前沿、倡导分子医学创新、促进分子医学进步为办刊宗旨。主要刊登我国医学分子诊断和分子治疗相关领域中的基础理论研究、临床实践和技术方法的最新研究成果以及国内分子医学新技术、新理论和新进展等方面的文章。目前有编委及审稿专家 80 余人。在编委会和审稿专家及编辑部的共同努力下，于 2016 年被收录为“中国科技核心期刊”（中国科技论文统计源期刊）。

目前有“述评”、“论著”、“综述”、“前沿进展”、“专家笔谈”、“讲座”、“动态”和“专栏”等栏目。涵盖基因诊断、免疫诊断、核酸分子诊断、蛋白分子诊断、信号分子诊断、分子影像诊断、诊断仪器应用、基因治疗、核酸分子治疗、蛋白分子治疗等内容。

