



ISSN 1674-6929

CN 44-1656/R

邮发代号: 46-283

分子诊断与治疗杂志

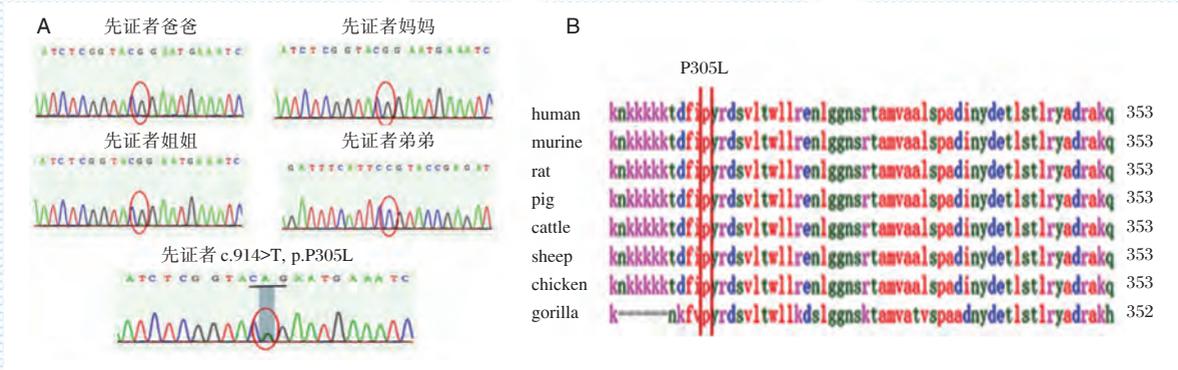
FENZI ZHENDUAN YU ZHILIAO ZAZHI

2020年10月 第12卷 第10期 总第74期

JOURNAL OF

MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Volume 12 Number 10 October 2020



注: A. 先证者及其家人 Sanger 测序结果显示 *KIF1A*:c.914C>T, p.P305L 有一个新生杂合突变。红色圆圈是突变位点。弟弟是正义链,其余都是反义链; B. *KIF1A* 基因的 (p.P305L) 氨基酸序列比对。 *KIF1A* 的 294-353 位在不同物种间高度保守。

图(P1297) 先证者家系 Sanger 测序结果和 *KIF1A* 基因 (p.P305L) 不同物种氨基酸序列

Figure(P1297) Sanger sequencing results of proband family and *KIF1A* gene (p.P305L) amino acid sequence of different species

中山大学 主管

中国科技核心期刊 (中国科技论文统计源期刊)

中国核心期刊 (遴选) 数据库收录期刊

中国期刊全文数据库全文必录期刊

中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊

中文生物学期刊文献数据库 CMCC 收录期刊

中国生物医学期刊引文数据库 CMCI 收录期刊

中国学术期刊影响因子年报统计源期刊

ISSN 1674-6929



9 771674 692204



朱冰



朱冰,博士,广州市妇女儿童医疗中心病毒研究室(原中心实验室)主任/主任医师、教授、博士生导师。广州市高层次卫生人才(医学重点人才)

中国医疗保健国际交流促进会分子诊断学分会儿科感染学部副主任;中国医疗保健国际交流促进会分子诊断学分会常委;中国中西医结合学会检验医学专业委员会委员;中国微生物学会人兽共患病病原学专业委员会委员;广东省预防医学会医学病毒学专业委员会常委;广东省精准医学应用学会精准检测分会常委;广东省医学会医院感染预防与控制学分会第一届委员会常委;广东省预防医学会微生物与免疫学专业委员会常委;广东省医学教育协会生物化学与分子生物学专业委员会第一届常委;广东省医学教育协会检验医学专业委员会第一届常委;广东省临床基因检测质量控制中心专家组成员等。

1998年第一军医大学南方医院传染病硕士研究生毕业后进入广州市儿童医院中心实验室工作,主要从事儿童病毒感染性疾病相关研究。擅长儿童病毒性疾病的实验室诊断及研究,在平凡的岗位上敬业奉献,带领本专业医疗技术人员在历次突发传染病事件中表现突出。分别于2003年荣获广东省抗击非典三等功、广州市抗击非典先进个人;2003年、2008年获广州市卫生局嘉奖;2011年被广州市卫生局荣记三等功、广州市卫生局局管科技人才;2013年获广州市流感监测工作先进个人;2008年、2011年、2017年和2018年被评为广州市妇女儿童医疗中心优秀党员;2018年获广州市高层次卫生人才(医学重点人才)。

在SARS、手足口病、甲流、登革热、新冠等多起突发传染病事件中,均能带头攻关,第一时间建立相应的病原学检测技术,及时协助临床及时诊断及治疗。在新型冠状病毒感染肺炎疫情中,反应迅速应对及时,在2020年1月中旬即带领填对建立了新型冠状病毒的核酸检测技术并对检测人员进行培训,做好及时应对疫情的准备,是广东省第一家开展新冠病毒核酸检测的医院,并检测出广州市第一位新冠病毒感染儿童患者主要研究方向为:①儿童常见病毒感染的实验室诊断及研究;②基于纳米技术及多糖的抗病毒研究。先后主持国家自然科学基金、广东省自然科学基金、广东省科技计划项目及广州市科技计划项目等十余项科研课题。主持临床试剂注册试验80余项。以第一作者及通讯作者发表SCI论文40篇,合计影响因子176.017,单篇影响因子最高36.13。与临床合作,研究了十名感染新冠病毒并通过胃肠道和呼吸道进行病毒排泄的儿童流行病学和临床特征。研究成果“Characteristics of pediatric SARS-CoV-2 infection and potential evidence for persistent fecal viral shedding”以共同第一作者在Nature Medicine发表,这篇文章提示了儿童新冠病毒粪便传播的可能性。截止2020年6月16日,已累计在全球被下载32万次,成为全世界知名杂志最具影响力排名前1%的研究成果。

分子诊断与治疗杂志

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

月刊 2020年10月 第12卷 第10期 总第74期 Bimonthly Volume 12 Number 10 October 2020

主管	中山大学
主办	《中国家庭医生》杂志社有限公司
承办	中山大学达安基因股份有限公司
总编辑	张翼鹏
顾问	申子瑜
主编	李明
编辑部主任	蒋析文
编辑部副主任	刘悦
编辑部	《分子诊断与治疗杂志》编辑部
编辑	李晓兰 李彩珍 莫源浩
出版	《中国家庭医生》杂志社有限公司
地址	广州市天河区天河北路179号祥龙大厦11楼(510620)
电话	(020) 32290789-206, 32290789-201
电子邮箱	jmdt@vip.163.com
刊号	ISSN 1674-6929 CN 44-1656/R
邮发代号	46-283
发行单位	广东省报刊发行局
发行范围	国内外公开发售
广告发布登记通知书	440100190057
印刷	天意有福科技股份有限公司
出版日期	2020年10月18日
定价	RMB 15.00元
Responsible Institution	<i>Sun Yat-sen University</i>
Sponsor	<i>China Family Doctors Magazine Publisher Co., Ltd.</i>
Organizer	<i>Da An Gene Co., Ltd. of SunYat-sen University</i>
Editor in Chief	<i>ZHANG Yipeng</i>
Consultant	<i>SHEN Ziyu</i>
Editor in Chief	<i>LI Ming</i>
Managing Director	<i>JIANG Xiwen</i>
Associate Editor	<i>LIU Yue</i>
Editorial Office	<i><JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY> Editorial Office</i>
Editors	<i>LI Xiaolan LI Caizhen MO Yuanhao</i>
Editing	<i>China Family Doctors Magazine Publisher Co., Ltd.</i>
Add	<i>11 Fl., Xianglong Building, 179# Tian he bei Lu, Guangzhou, China 510620</i>
Tel	<i>(020) 32290789-206, 32290789-201</i>
E-mail	<i>jmdt@vip.163.com</i>
CSSN	<i>ISSN 1674-6929 CN 44-1656/R</i>
Printing	<i>TianYi Yofus Technology Co., Ltd.</i>
Publish Date	<i>2020.10.18</i>
Price	<i>RMB 15.00</i>



扫码订购《分子诊断与治疗杂志》

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



中国科技核心期刊

(中国科技论文统计源期刊)

收录证书

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

分子诊断与治疗杂志

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

特颁发此证书。

中国科学院信息研究所

Institute of Scientific and Technical Information of China

北京复兴路15号 100038 www.istic.ac.cn

2019年11月

证书编号：2018-G556-0387
有效期至：2020年12月



分子诊断与治疗杂志

月刊 2020年10月 第12卷 第10期

目次

述评

基因编辑及其在疾病治疗中的应用研究进展 华亮 朱冰(1281)

论著

人类白细胞抗原 B27 核酸检测国家参考品的建立 胡泽斌 高飞 孙楠 等(1285)

早孕期流产胚胎组织 MLPA 检测结果及与年龄和孕周的关系分析
..... 陈杏园 罗世强 王秋华 等(1289)

1例基因 *KIF1A* 错义突变致常染色体显性智力障碍9型病例报道
..... 沈茹 蒋鸿超 吴建敏 等(1294)

血 CTCs、cfDNA 检测在乳腺癌中的应用 常立伟 杨东炜 刘东辰(1298)

子痫前期患者血清 VEGF、IL-18、MCP-1 水平及与血液流变学指标关系
..... 王娜 王英 万里新 等(1303)

慢性乙型肝炎患者外周血中 sFGL2 检测的临床意义 洪晓绿 潘小平 徐沛演 等(1307)

羊水穿刺在产前筛查无创高风险病例中染色体异常的产前诊断价值
..... 刘慧 方慧琴 陈薇 等(1311)

脓毒症患者 Th1/Th2 细胞失衡与疾病严重程度、肺损伤的关系
..... 陈丽君 王佳 张文静(1315)

肺癌患者血清 miRNA-4534 水平和病理分期与预后的关系
..... 杨寿艳 邓彬兵 孟雄 等(1319)

血清钙离子、ALP 及 CYFRA21-1 对肺癌早期骨转移的预测价值
..... 赵车冬 徐倩 马婧 等(1323)

β -arrestin2、RBP4 及 FGF-21 在 2 型糖尿病足中的表达及与糖脂代谢的关系研究
..... 李刚 籍胤玺 冯延冰 等(1328)

外周血 miR-23b-3p 表达水平对重症肺炎患儿病情及预后的评估价值 吴英 刘成桂(1332)

PCOS 患者 IL-17A、Betatrophin、可溶性 CD68 表达水平及与卵巢功能的关系
..... 席彦东 沈自旺 白虹(1336)

OSAHS 患者 ADMA、25 羟维生素 D 和 BMI 变化及其与疾病严重程度相关性研究
..... 谭晓纯 尹凤先(1341)

hrHPV E6/E7 mRNA 载量水平与宫颈癌前病变的相关性分析
..... 郭晨辉 徐小晶 孔薇 等(1345)

血清 25-羟基维生素 D、IL-17 水平与糖尿病视网膜病变的关系分析	孙晓菲 范慧洁 田勇(1349)
血清 CTRP1、尿酸水平在冠心病临床诊断中的应用价值	王正飞 杨龙 兰占占 等(1353)
ASF1B 对子宫内膜癌细胞恶性行为的影响及相关机制	白驹 斗泽加(1357)
CD56 表达与甲状腺乳头状癌临床病理特征的关系及对远处转移的预测价值	许超 盛以泉 葛丽卫 等(1363)
HIF-1 α 、VEGF 及 TIMP 与心脏瓣膜置换术后并发压力性损伤的相关性研究	申荣华 谢静 刘燕 等(1367)
SD/CRL 比值联合血 β -HCG、E2 水平对 IVF/ICSI-ET 早期流产的预测价值	芦爱华 赵永新 李洁 等(1371)
下调 miR-4262 抑制肺癌细胞 A549 转移潜能的机制	朱丽 龚波(1375)
先天性甲状腺功能减低症患儿 IGF-1、IGFBP-3 及 Hcy 水平变化及临床意义	唐容华 李琴 陈晓蓉 等(1380)
CD64 结合血常规在重症患者感染性发热与非感染性发热诊断及鉴别诊断中的应用	杜向阳 张文英 闫琳(1384)
血清 AT-III、Lp-PLA2 水平与急性冠脉综合征患者冠脉狭窄程度的关系分析	李燕平 李雪 王珍(1388)
盐酸羟考酮负调控 LncRNA LINC01857 抑制宫颈癌细胞 Siha 增殖、迁移及侵袭	张秀双 徐铭军 车向明 等(1392)
基于血清 NAG、NGAL、LFABP 的风险评分模型对老年重度乙肝患者肝肾综合征的预测价值	杨鑫 刘小静 陈云茹 等(1397)
miRNA-320a、hTcf-4、 β -catenin 在肝癌组织的表达及临床意义	祁蕙燕 郭剑 程燕莉(1401)
胱抑素 C 和肾积液 CT 值在尿路结石梗阻性肾积脓患者中的临床意义	郭亮 徐鹏程 胡恒龙(1406)
北京市海淀区女性人乳头瘤病毒感染结果分析	王海滨 张冬青 赵娇(1411)
急性心梗后心功能预后与血尿酸及肌酸肌酶同工酶水平的相关性	胡超勇 邹华伟 高鹏芝(1415)
miR-22-3p 对 IL-1 β 诱导软骨细胞损伤的影响及其机制研究	李巍 冯胜华 赵景明(1419)

综 述

瞬时感受器电位香草酸受体 1 抑制剂在神经病理性疼痛中的研究进展	盛树悦 田映红 张兴梅(1424)
----------------------------------	-------------------

专家风采

朱冰	(封二)
----	------

实验室巡礼

广州市妇女儿童医疗中心病毒研究室(原中心实验室)	(封三)
--------------------------	------

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Monthly Volume 12 Number 10 October 2020

CONTENTS

COMMENTS

Progress of research on gene editing toward therapeutic applications

HUA Liang, ZHU Bing (1281)

ORIGINAL ARTICLES

Establishment of the National reference materials for Human Leukocyte Antigen B27 Nucleic Acid Detection

HU Zebin, GAO Fei, SUN Nan, SUN Binyu, LI Lili, SUN Jing, QU Shoufang, HUANG Jie (1285)

Analysis of MLPA results of aborted embryonic tissue in early pregnancy and its relationship with maternal age and gestational age

CHEN Xingyuan, LUO Shiqiang, WANG Qiuhua, YUAN Dejian, XU Zehui, WANG Jingren, QIN Liuqun, TANG Ning (1289)

A Case Report of Autosomal Dominant Mental Retardation Type 9 caused by a Missense Mutation in Gene *KIF1A*

SHEN Ru, JIANG Hongchao, WU Jianmin, YANG Xiaohong, ZHANG Lin, DUAN Lifan, LI Haibo (1294)

Application of serum CTCs and cfDNA detection in breast cancer

CHANG Liwei, YANG Dongwei, LIU Dongchen (1298)

Serum VEGF, IL-18, MCP-1 levels of patients with preeclampsia and their relationship with hemorheology indicators

WANG Na, WANG Ying, WAN Lixin, WU Peiwei, LAN Lan, YAO Li, ZHANG Xiaohuan, LI Song (1303)

The clinical significance of detection of sFGL2 in peripheral blood of patients with chronic hepatitis B

HONG Xiaolv, PAN Xiaoping, XU Peiyan, HUANG Xiaohua (1307)

The value of amniocentesis in the prenatal diagnosis of chromosomal abnormalities in non-invasive high-risk cases of prenatal screening

LIU Hui, FANG Huiqin, CHEN Wei, YAN Yalan, YUAN Jing (1311)

Relationship between Th1/Th2 cell imbalance and disease severity, lung injury in patients with sepsis

CHEN Lijun, WANG Jia, ZHANG Wenjing (1315)

Relationship between serum miRNA-4534 level and pathological staging and prognosis of patients with lung cancer

YANG Shouyan, DENG Binbing, MENG Xiong, WANG Xi, MU Qiantu (1319)

Predictive value of serum calcium ions, ALP and CYFRA21-1 for early bone metastases of lung cancer

ZHAO Chedong, XU Qian, MA Jing, ZHANG Jian (1323)

Expression of β -arrestin2, RBP4 and FGF-21 in type 2 diabetic foot and its relationship with glucose and lipid metabolism

LI Gang, JI Yinxi, FENG Yanbing, GAO Yi, SONG Xiaofei, LI Song (1328)

Evaluation value of peripheral blood miR-23b-3p expression level in the condition and prognosis of children with severe pneumonia

WU Ying, LIU Chenggui (1332)

Serum levels of IL-17A, Betatrophin and soluble CD68 in patients with PCOS and their relationship with ovarian function

XI Yandong, SHEN Ziwang, BAI Hong (13326)

Correlation of ADMA, 25 hydroxyvitamin D and BMI with severity of OSAHS

TAN Xiaochun, YIN Fengxian (1341)

Correlation analysis between the level of hrHPV E6/E7 mRNA load and cervical intraepithelial neoplasia <i>GUO Chenhui, XU Xiaojing, KONG Wei, XIANG Min</i>	(1345)
Analysis of the relationship between serum 25-hydroxyvitamin D, IL-17 levels and diabetic retinopathy <i>SUN Xiaofei, FAN Huijie, TIAN Yong</i>	(1349)
The value of serum CTRP1 and uric acid levels in clinical diagnosis of coronary heart disease <i>WANG Zhengfei, YANG Long, LAN Zhanzhan, ZHANG Dongdong, LIU Chunming</i>	(1353)
Effect of ASF1B on the malignant behavior of endometrial carcinoma cells and its mechanism <i>BAI Ju, DOU Zejia</i>	(1357)
Relationship between the expression of CD56 and the clinicopathological features of papillary thyroid carcinoma and its predictive value for distant metastasis <i>XU Chao, SHENG Yiquan, GE Liwei, SHEN Haiying</i>	(1363)
Correlation between HIF-1 α , VEGF TIMP and pressure injury after heart valve replacement <i>SHEN Ronghua, XIE Jing, LIU Yan, LI Xiuli, FENG Junyan</i>	(1367)
Predictive value of SD/CRL ratio combined with serum β -HCG and E2 levels in early abortion of patients undergoing IVF/ICSI-ET <i>LU Aihua, ZHAO Yongxin, LI Jie, LIU Rui</i>	(1371)
Mechanism of down-regulation of miR-4262 in inhibiting the metastatic potential of lung cancer cell A549 <i>ZHU Li, GONG Bo</i>	(1375)
Changes and clinical significance of IGF-1, IGFBP-3 and Hcy levels in children with congenital hypothyroidism <i>TANG Ronghua, LI Qin, CHEN Xiaorong, TANG Zhongjun</i>	(1380)
Application of neutrophil CD64 combined with blood routine in the diagnosis and differential diagnosis of infectious and non-infectious fever in severe patients <i>DU Xiangyang, ZHANG Wenyong, YAN Lin</i>	(1384)
Relationship between serum AT-III, Lp-PLA2 levels and severity of coronary artery stenosis in patients with acute coronary syndrome <i>LI Yanping, LI Xue, WANG Zhen</i>	(1388)
Oxycodone hydrochloride negatively regulated LncRNA LINC01857 to inhibit the proliferation, migration and invasion of cervical cancer cell Siha <i>ZHANG Xiushuang, XU Mingjun, CHE Xiangming, CAO Xiuling, LI Xiaoguang</i>	(1392)
Predictive value of risk scoring model based on serum NAG, NGAL and LFABP for hepato-renal syndrome in elderly patients with severe hepatitis B <i>YANG Xin, LIU Xiaojing, CHEN Yunru, ZHANG Xi, XU Juan</i>	(1397)
Expression and clinical significance of miRNA-320a, hTcf-4 and β -catenin in hepatocellular carcinoma <i>QI Huiyan, GUO Jian, CHENG Yan Li</i>	(1401)
The clinical significance of cystatin C and CT value of renal effusion in patients with obstructive empyema of urinary tract stones <i>GUO Liang, XU Pengcheng, HU Henglong</i>	(1406)
Analysis of Female Human Papillomavirus infection in Haidian District, Beijing <i>WANG Haibin, ZHANG Dongqing, ZHAO Jiao</i>	(1411)
Correlation between the prognosis of cardiac function and serum uric acid and CK-MB levels after acute myocardial infarction <i>HU Chaoyong, ZOU Huawei, GAO Pengzhi</i>	(1415)
Effect of miR-22-3p on IL-1 β -induced chondrocyte damage by regulating the expression of TRIM8 <i>LI Wei, FENG Shenghua, ZHAO Jingming</i>	(1419)

REVIEWS

Research progress of transient Receptor Potential Vanilloid 1 inhibitors in neuropathic pain <i>SHENG Shuyue, TIAN Yinghong, ZHANG Xingmei</i>	(1424)
---	--------

基因编辑及其在疾病治疗中的应用研究进展

华亮 朱冰*

[摘要] 基因编辑是指对基因组进行定点修饰的一项新技术。利用该技术,可以精确地定位到基因组的某一位点上,在这位点上剪断靶标 DNA 或 RNA 片段并插入新的基因片段。此过程通过人工的手段模拟基因的自然突变,进而达到修改编辑生物体原有基因组的目的。基因编辑技术自诞生以来,经历五代发展,技术越来越成熟,编辑精度也日益提高,已经越来越广泛地被应用于包括疾病治疗在内的多种生物学领域,成为近年来的研究热点。本文就基因编辑技术及其在疾病治疗中的应用研究进展进行简要综述。

[关键词] 基因编辑; 疾病治疗

Progress of research on gene editing toward therapeutic applications

HUA Liang, ZHU Bing*

(Central Laboratory of Guangzhou Women and Children's Medical Center, Guangzhou, Guangdong, China, 510120)

[ABSTRACT] Gene editing refers to a new technology for site-specific modification of the genome. Using this technology, you can accurately locate a certain site in the genome, cut the target DNA or RNA fragment at this site and insert a new gene fragment. This process simulates the natural mutation of genes by artificial means, and then achieves the purpose of modifying and editing the original genome of the organism. Since its birth, gene editing technology has experienced five generations of development, the technology has become more and more mature, and the editing accuracy has also been improved. It has been more and more widely used in various biological fields including disease treatment and has become a research hotspot in recent years. This article briefly reviews the progress of researches on gene editing technology and the therapeutic applications.

[KEY WORDS] Gene editing; Therapeutic application

DNA 双螺旋结构的提出,开启了现代分子生物学的时代。从此,人类对疾病尤其是遗传性疾病的认识进入了 DNA 分子层面。随着基因测序技术的不断发展,越来越多的疾病的分子机理被发现。2015 年美国总统奥巴马提出“精准医疗”的概念,通过修改或编辑基因序列的方式进行个体化疾病治疗越来越成为研究和关注的热点。

1 基因编辑的原理

基因编辑技术的基本原理大致相同:通过人工核酸内切酶,精确靶向特异性切割 DNA 双链诱

导形成位点特异性的 DNA 双链断裂(double-strand break, DSB),DSB 产生后,激活细胞启动两种主要的天然修复机制:非同源末端连接(NHEJ)和同源重组修复(HRR)。通常,细胞主要通过 NHEJ 方式进行修复,NHEJ 在断裂 DNA 修复重连的过程中,能够在 DSB 位点产生碱基随机插入或缺失(indel),常造成移码突变使基因失活,从而实现目的基因的敲除。若一个外源性供体基因序列存在,NHEJ 机制会将其连入双链断裂 DSB 位点,从而实现定点的外源基因敲入。当一个带有同源臂的重组供体存在时,细胞还会采取 HDR 的方式

作者单位:广州市妇女儿童医疗中心中心实验室,广东,广州 510120

*通信作者:朱冰, E-mail: zhubing0327@163.com

对 DSB 进行修复,供体中的外源目的基因会通过同源重组过程完整的整合到靶位点,从而实现特定位点的精确插入、缺失或者碱基置换,而不会出现随机的碱基插入或丢失。

2 基因编辑的简要发展历程

1986年,Smithies等^[1]提出同源重组能够被应用于人类疾病的治疗,标志着基因组编辑时代的开启。同年,Kirk R等^[2]用核内注射的方法对哺乳动物细胞内染色体上由突变造成的基因缺陷进行修复时首次提出基因编辑的概念。

借助不同的核酸内切酶平台,研究人员能够在靶基因组中制造位点特异性的DNA断裂点。伴随着用于基因编辑的人工核酸内切酶平台的发展,其介导的基因编辑技术也历经了多个阶段的变革。

2.1 大范围核酸酶技术

大范围核酸酶是一种具有较大切割位点(12~45 bp)的序列特异性核酸内切酶。研究者将其用于细胞系诱导靶序列附近产生DSB,以达到在基因组中敲除内源基因或敲入外源基因的目的,或矫正与单基因疾病相关的突变。它的编辑精度高,自身编码基因较小,易包装入AAV载体中。但是,由于其种类限制,以及大部分大范围核酸酶很难在人基因组上找到合适的位点,使其广泛应用受到限制。

2.2 锌指蛋白(Zinc finger protein, ZFP)技术

ZFP是一类通过Cys2-His2锌指结构域结合DNA的转录因子。ZFN主要包括用于识别和结合特定DNA序列重复的ZFP和可以通过二聚体化非特异地切割DNA的核酸内切酶Fok I。利用一对串联的锌指结合特异DNA,将Fok I的两个亚基带到特定基因组位点,对DNA进行切割产生DSB。该技术靶向结合效率高,但是其识别特定DNA的锌指序列需要通过文库筛选来确定,锌指核酸酶存在上下游DNA序列的依赖效应,进一步加大了筛选的难度,无法实现对任意靶基因的结合,亦无法实现高通量的基因编辑。且可能产生脱靶效应,引发细胞毒性,对其推广运用造成了一定的影响。

2.3 转录激活因子样效应物核酸酶(Transcription activator-like effector nucleases, TALEN)技术

与ZFN相似,TALEN也由两部分构成,一部分是由33-35个氨基酸的重复单元组成,通过位于12位和13位的两个可变氨基酸残基识别并结合DNA序列,其唯一靶向限制是对N端结构有5'T

的要求,所以,理论上可以通过构建不同的位于12位和13位的两个可变氨基酸残基达到靶向几乎任何DNA序列的目的。另一部分是与ZFN相同的限制性核酸内切酶Fok I。TALEN技术在一定程度上克服了ZFN技术存在的脱靶问题,设计简单,特异性和活性更高。目前,已在人类多功能干细胞和体细胞中有效诱导NHEJ和HDR。但是,TALEN的体积比ZFN大,使得某些病毒传递系统的包装较困难,从而限制了其用于高通量的基因编辑。

2.4 成簇规律间隔短回文重复序列/成簇规律间隔短回文重复序列关联蛋白(clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated proteins, CRISPR/Cas)技术

CRISPR/Cas9技术通过sgRNA与靶标DNA中相对保守的PAM序列的上游基因互补配对,再经Cas9蛋白对靶标基因进行切割。通过设计与目标片段匹配的sgRNA,就可以精确地定位到所有的DNA位置,然后由Cas9剪切DNA形成DSB。为了避免NHEJ出现基因变异,可使用外源DNA模板进行HDR,对靶标基因进行修饰,从而实现精准基因编辑。且CRISPR系统可以同时靶向多个基因,这对研究复杂的人类疾病上是一个巨大的进步。与ZFN和TALEN相比,CRISPR/Cas9设计简便、成本低、效率高,可用于高通量的基因编辑。然而,CRISPR/Cas9系统也有其不足之处,主要体现在功能发挥时系统对DNA上PAM序列的依赖性以及切割时潜在的脱靶效应。在CRISPR/Cas9系统中,Cas9只在具有PAM序列且可以与sgRNA互补配对的靶序列发生切割。基于这些需要改善的方面,研究人员开创性地发现了一些识别更多样PAM的CRISPR/Cas系统,这些优化或改造的Cas9可降低50~1500倍的脱靶率,极大地解决了脱靶问题。

2.5 单碱基编辑(Base editor, BE)技术

2016年,哈佛大学的David Liu实验室报道了一种基于脱氨酶与CRISPR/Cas9系统融合形成的BE技术^[3]:由sgRNA和经过改造的Cas9、胞嘧啶脱氨酶和尿嘧啶糖基化酶抑制子组成的复合物。胞嘧啶脱氨酶可将胞嘧啶脱氨基变为尿嘧啶,在DNA复制过程中则变为胸腺嘧啶。BE技术不引入DSB,不需要重组修复模板,且效率远高于由DSB引起的同源重组修复,对许多点突变造成的疾病具有很大的应用潜能。

2.6 表观基因组编辑和转录调控

表观遗传修饰和转录调控是把各种表观调控效应器融合到工程化缺陷型核酸酶(dCas9)上,利用dCas9靶向识别并结合DNA的特性,实现在特定位点上表观基因组的编辑。这些调控效应器同dCas9的结合拓展了CRISPR在转录调控和表观基因组编辑的应用范围,且dCas9的表观基因组编辑具有很高的安全性和特异性,无明显的脱靶效应,为体内表观基因修饰和治疗奠定了基础。

3 基因编辑在疾病治疗中的应用

基因编辑治疗人类疾病在体内和体外都取得了成功。体内基因治疗包括组织特异性靶向,局部递送或靶细胞特异性基因表达;而离体疗法靶向体外的细胞,这些修饰的细胞可用于疾病建模或用作治疗剂。

3.1 体外基因编辑

体外基因编辑是从病人身上提取相应的细胞,在基因编辑后将细胞移植回患者相应部位以达到治疗疾病的目的的治疗方法。该技术最大的优点在于它消除了捐赠者组织与移植者之间的免疫排斥。将所需基因转移到造血干细胞,然后移植给患者已经改善甚至治疗了血液系统和免疫系统的单基因病。如:X连锁严重的联合免疫缺陷、腺苷脱氨酶、严重的联合免疫缺陷、肾上腺脑白质营养不良、异染性白质营养不良、Wiskott-Aldrich综合征和 β -地中海贫血^[4-5]。

通过基因编辑和NHEJ对目的基因进行插入或敲除操作研究已经应用于包括镰状细胞病和地中海贫血在内的血红蛋白病^[6]。使用HRR进行基因编辑也显示出巨大潜力。如在影响造血系统的遗传缺陷中,已经发现了许多疾病,包括溶酶体酶缺乏症^[7],地中海贫血^[8],慢性肉芽肿病^[9]和X连锁高IgM综合征^[10]。

3.2 体内基因编辑

当受影响的细胞或组织无法从患者身上获得,或者离体操作后无法有效地移植回患者体内,则必须进行体内基因编辑。

杜氏肌营养不良(Duchenne muscular dystrophy, DMD)是基因突变引起的,导致骨骼肌和心肌进行性变性。利用AAV载体将Cas9和sgRNAs递送到DMD小鼠体内,能够使DMD基因外显子缺失,靶细胞再通过NHEJ对目的基因进行修复,

从而部分恢复阅读框,使骨骼肌和心肌的生化和功能改善^[11-12]。

利用AAV载体结合NHEJ的基因编辑方法被用于中枢神经系统的遗传病。学者们将所需成分直接注射到患者视网膜或大脑中治疗这些疾病。如亨廷顿舞蹈症^[13],常染色体显性遗传性视网膜色素变性^[14],以及莱伯先天性黑蒙症10^[15]。

对于需要基因校正或基因替代进行治疗的疾病,其治疗方式是使患者体内获得足够的体内HRR。这种方法已被用于治疗一些肝脏代谢性疾病:鸟氨酸转氨甲酰酶缺乏症^[16]、乙型血友病^[17]、黏多糖贮积症I、黏多糖贮积症II、法布雷病和戈谢病^[18-19]。学者们还通过敲除同一代谢途径中的基因,将I型酪氨酸血症转变为更良性的III型酪氨酸血症^[20]。

3.3 病毒性疾病的基因编辑

基因编辑同样被用于病毒性疾病。研究人员通过gRNA和用AAVs转染的Cas9成功去除了HIV转基因小鼠中跨LTR和gag区的病毒DNA基因组^[21]。一项针对病毒逃逸和突变的单独研究表明,靶向HIV基因组两个不同区域的两个强gRNA可以完全阻止病毒复制^[22]。

乙型肝炎具有共价闭合的环状DNA(cccDNA),其在肝脏中处于休眠状态,且cccDNA充当慢性感染和再激活转录的模板,因此抗病毒药无法成功消除该病毒。研究人员通过HBV靶向gRNA,并利用Cas9切割cccDNA,造成多个缺失和突变,随后通过宿主的NHEJ机制对其进行了修复。结果显示可以将HBV感染减少多达八倍^[23]。

3.4 表观遗传学疾病的基因编辑

表观遗传修饰的失调与多种人类疾病有关,基因编辑技术的应用为表观遗传机制异常疾病的研究和治疗创造了一种全新的方法。如,在自然界中,表观遗传沉默可以导致靶基因表达在多个有丝分裂过程中完全减弱。通过靶向组蛋白和DNA甲基转移酶的不同组合在不同的位点实现对靶基因最大程度的抑制^[24]。基于神经元优化的CRISPR系统能够在多个主要啮齿动物神经元培养系统上实现强大,模块化和可调的基因诱导以及多重基因调控^[25]。研究证明,Cas9系统在体内可以通过反表观遗传重塑激活内源性靶基因^[26],并被用于糖尿病,肌肉营养不良和急性肾脏疾病的小鼠模型中。此外,CRISPR-Cas9还被用于体内小鼠视网膜色素变性模型中,通过使Nrl(棒状光

感受器的主要调节基因)失活而将棒状光感细胞重编程为圆锥状细胞,证明 CRISPR-Cas9 可通过转录抑制防止视力丧失^[27]。

4 结语与展望

在过去的十年中,基因编辑取得了长足的进步。特别是2013年后,随着 CRISPR/Cas9 系统的开发,我们取得了更大的进步。借助这些工具,我们已经拥有了一类全新的疗法来治疗甚至治愈以前缺乏有效干预措施的疾病。基因编辑技术将被应用于生物医学的许多领域并将彻底改变这些领域。虽然,目前这一技术还需要加以完善。但是,我们相信:一旦该技术变得更普及,无疑将使患者受益。而这些技术肯定会得到进一步完善,并在未来的某一天可能会成为许多疾病的主流疗法。

参考文献

- [1] Smithies O, Powers PA. Gene Conversions and Their Relation to Homologous Chromosome Pairing [J]. *Philos trans R Soc Lond B Biol sci*, 1986, 312(1154):291-302.
- [2] homas KR, Folger KR, Capecchi MR. High frequency targeting of genes to specific sites in the mammalian genome [J]. *Cell*, 1986, 44(3):419-428.
- [3] Komor AC, Kim YB, Packer MS, et al. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage [J]. *Nature*, 2016, 533(7603):420-424.
- [4] Wang X, Rivière I. Genetic Engineering and Manufacturing of Hematopoietic Stem Cells [J]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2017, 5:96-105.
- [5] Cavazzana M, Mavilio F. Gene Therapy for Hemoglobinopathies. *Hum Gene Ther* [J]. 2018, 29(10):1106-1113.
- [6] Yuxuan W, Jing Z, Benjamin PR, et al. Highly efficient therapeutic gene editing of human hematopoietic stem cells [J]. *Nature Med*, 2019, 25(5):776-783.
- [7] Gomez-Ospina N, Scharenberg SG, Mostrel N, et al. Human genome-edited hematopoietic stem cells phenotypically correct Mucopolysaccharidosis type I [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1):4045.
- [8] Chiara A, Vasco M, Annalisa L, et al. Induction of fetal hemoglobin synthesis by CRISPR/Cas9-mediated editing of the human β -globin locus [J]. *Blood*, 2018, 131(17):1960-1973.
- [9] Sweeney CL, Merling RK, De Ravin SS, et al. Gene Editing in Chronic Granulomatous Disease [J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 1982:623-665.
- [10] Kuo CY, Long JD, Campo-Fernandez B, et al. Site-Specific Gene Editing of Human Hematopoietic Stem Cells for X-Linked Hyper-IgM Syndrome [J]. *Cell Rep*, 2018, 29(9):2606-2616.
- [11] Yi-Li M, Rhonda BD, Eric NO, et al. CRISPR Correction of Duchenne Muscular Dystrophy [J]. *Ann rev med*, 2019, 70:239-255.
- [12] Duchêne BL, Cherif K, Iyombe-Engembe JP, et al. CRISPR-Induced Deletion with SaCas9 Restores Dystrophin Expression in Dystrophic Models In Vitro and In Vivo [J]. *Mol Ther*, 2018, 26(11):2604-2616.
- [13] Nishiyama J, Mikuni T, Yasuda R. Virus-mediated genome editing via homology-directed repair in mitotic and postmitotic cells in mammalian brain [J]. *Neuron*, 2017, 96(4):755-768.e5.
- [14] Kanmin X, Robert EM. Correcting visual loss by genetics and prosthetics [J]. *Current opinion in physiology*, 2020, 16:1-7.
- [15] Maeder ML, Stefanidakis M, Wilson CJ, et al. Development of a gene-editing approach to restore vision loss in Leber congenital amaurosis type 10 [J]. *Nat Med*, 2019, 25(2):229-233.
- [16] Yang Y, Wang L, Bell P, et al. A dual AAV system enables the Cas9-mediated correction of a metabolic liver disease in newborn mice [J]. *Nat Biotechnol*, 2016, 34(3):334-338.
- [17] Bergmann T, Ehrke-Schulz E, Gao J, et al. Designer nuclease-mediated gene correction via homology-directed repair in an in vitro model of canine hemophilia B [J]. *J Gene Med*, 2018, 20(5):e3020.
- [18] Sharma R, Anguela XM, Doyon Y, et al. In vivo genome editing of the albumin locus as a platform for protein replacement therapy [J]. *Blood*, 2015, 126(15):1777-1784.
- [19] Laoharawee K, DeKolver RC, Podetz-Pedersen KM, et al. Dose-Dependent Prevention of Metabolic and Neurologic Disease in Murine MPS II by ZFN-Mediated In Vivo Genome Editing [J]. *Mol Ther*, 2018 26(4):1127-1136.
- [20] Pitkänen ST, Salo MK, Heikinheimo M. Hereditary tyrosinaemia type I: from basics to progress in treatment [J]. *Ann Med*, 2000, 32(8):530-538.
- [21] Kaminski R, Chen Y, Fischer T, et al. Elimination of HIV-1 genomes from human T-lymphoid cells by CRISPR/Cas9 gene editing [J]. *Sci Rep*, 2016, 6(1):22555.
- [22] Lebbink RJ, de Jong DCM, Wolters F, et al. A combination-al CRISPR/Cas9 gene-editing approach can halt HIV replication and prevent viral escape [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):41968.
- [23] Seeger C, Sohn JA. Targeting Hepatitis B Virus With CRISPR/Cas9 [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2014, 3(12):e216.
- [24] O'Geen H, Bates SL, Carter SS, et al. Ezh2-dCas9 and KRAB-dCas9 enable engineering of epigenetic memory in a context-dependent manner [J]. *Oncotarget*, 2019, 12(1):1-20.
- [25] Savell KE, Bach SV, Zipperly ME, et al. A Neuron-Optimized CRISPR/dCas9 Activation System for Robust and Specific Gene Regulation [J]. *eNeuro*, 2019, 6(1):1-17.
- [26] Liao H-K, Hatanaka F, Araoka T, et al. In vivo target gene activation via CRISPR/Cas9-mediated trans-epigenetic modulation [J]. *Cell*, 2017, 171(7):1495-1507.e15.
- [27] Moreno AM, Fu X, Zhu J, et al. In Situ Gene Therapy via AAV-CRISPR-Cas9-Mediated Targeted Gene Regulation [J]. *Mol Ther*, 2018, 26(7):1818-1827.

人类白细胞抗原 B27 核酸检测国家参考品的建立

胡泽斌 高飞 孙楠 孙彬裕 李丽莉 孙晶 曲守方* 黄杰*

[摘要] 目的 建立人类白细胞抗原 B27 核酸检测国家参考品。方法 采集 HLA-B27 阳性和阴性志愿者的新鲜外周血,经 EB 病毒转化,培养建立永生细胞系。提取细胞基因组 DNA,制备成国家参考品并经高通量测序验证。用 4 家协作标定单位的 HLA-B27 核酸检测试剂,采用荧光 PCR 法、PCR-SSP 法、SBT 测序法对国家参考品进行定值,并进行国家参考品的复溶(在 -20℃ 和 25℃ 之间反复冻融 3 次)稳定性和均匀性研究。结果 成功制备 HLA-B27 国家参考品,包含 3 例 HLA-B27 阳性 DNA 样本和 7 例 HLA-B27 阴性 DNA 样本。经荧光 PCR 法、PCR-SSP 法、SBT 测序法协作标定,参考品定值准确。参考品均匀性结果一致,参考品复溶 3 次后仍然稳定。结论 人类白细胞抗原 B27 核酸检测国家参考品的各项指标均符合要求,可用于人类白细胞抗原 B27 核酸检测试剂盒的性能评价。

[关键词] 人类白细胞抗原; B27; SBT 测序法; 国家参考品; 协作标定

Establishment of the National reference materials for Human Leukocyte Antigen B27 Nucleic Acid Detection

HU Zebin, GAO Fei, SUN Nan, SUN Binyu, LI Lili, SUN Jing, QU Shoufang*, HUANG Jie*

(Division of In Vitro Diagnostic Reagents, National Institute for Food and Drug Control, Beijing, China, 100050)

[ABSTRACT] Objective To establish a national reference material for HLA - B27 nucleic acid detection. Methods Fresh peripheral blood of HLA - B27 positive and negative volunteers was collected, transformed with EB virus, and cultured to establish immortalized cell lines. The genomic DNA was extracted from the cells, and prepared for the national reference material which was verified by the next generation sequencing technology. Moreover, the accuracy of the national reference was verified by fluorescence PCR, PCR - SSP method and SBT sequencing method, with HLA - B27 nucleic acid detection reagents from four collaborative manufacturers. The stability after 3 cycles of freezing and thawing at - 20℃ and 25℃ and homogeneity of the national reference materials were studied as well. Results The national reference materials of HLA-B27 were successfully prepared, including 3 HLA-B27 positive DNA samples and 7 HLA-B27 negative DNA samples. The reference materials were accurately valued by SBT sequencing and other methods, and the homogeneity of reference material was consistent. The reference material is stable after 3 cycles of freezing - thawing, which met the requirements of the national reference material. Conclusion All indexes of the national reference material for human leukocyte antigen B27 nucleic acid detection meet the requirements and can be used for the performance evaluation of human leukocyte antigen B27 nucleic acid detection kit.

[KEY WORDS] Human leukocyte antigen; B27; SBT sequencing; National reference materials; Collaborative calibration

基金项目:生殖健康及重大出生缺陷防控研究(2016YFC1000300)

作者单位:中国食品药品检定研究院体外诊断试剂检定所,北京 100050

*通信作者:曲守方, E-mail:qushoufang@126.com;黄杰, E-mail:jhuang5522@126.com

注:胡泽斌和高飞为并列第一作者

人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA)B27抗原的表达与强直性脊椎炎有高度相关性,超过90%的强直性脊椎炎患者其HLA-B27抗原表达为阳性,普通人群中仅5%~10%的为阳性^[1-3]。迄今已有70多种HLA-B27亚型被发现和鉴定,在中国人群中B2705和B2704亚型分布最广并且与强直性脊椎炎密切相关^[4-6]。随着基因检测技术的发展和相关试剂盒的研发上市,基于聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)的HLA-B27核酸检测已成为临床上的常用检测手段^[7-9]。然而目前,我国尚无针对HLA-B27核酸检测试剂盒的国家参考品,无法对此类试剂盒进行统一的质量评估。为确保HLA-B27核酸检测临床测定结果可靠,为临床诊断提供有力证据,中国食品药品检定研究院体外诊断试剂检定所非传染病诊断试剂室计划研制一套能够进行HLA-B27核酸检测性能评价的国家参考品。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂

人外周血淋巴细胞分离液、环孢霉素A和二甲基亚砜,由北京索莱宝科技有限公司提供;基因组DNA提取试剂盒(磁珠法),HLA高分辨基因分型建库试剂盒,Qubit™ ssDNA Assay Kit(Invitrogen),MGISEQ-2000RS高通量测序试剂套装,由深圳华大智造科技有限公司提供;人类白细胞抗原B位点基因高分辨分型试剂盒(测序法)由北京博奥晶典生物技术有限公司提供;人类白细胞抗原B27核酸检测试剂盒(荧光PCR法)由江苏默乐生物科技股份有限公司提供;SeCore HLA B位点测序分型试剂盒(测序法)由北京旌准医疗科技有限公司提供;人类白细胞抗原B*27基因分型试剂盒(SSP法和荧光PCR法)由江苏伟禾生物科技有限公司提供。

1.1.2 主要仪器

MGISEQ-2000RS测序仪由深圳华大智造科技有限公司提供;基因扩增仪S1000(Bio-Rad)、基因分析仪3730xL(ThermoFisher)由北京博奥晶典生物技术有限公司提供;SLAN-96P全自动医用PCR分析系统由江苏默乐生物科技股份有限公司提供;ABI 3130/3130XL DNA测序仪/基因分析仪由北京旌准医疗科技有限公司提供;ABI GeneAmp-

PCR System 9700、ABIReal-Time PCR Systems 7500由江苏伟禾生物科技有限公司提供。

1.2 方法

1.2.1 样本收集

招募自愿参与本项目的外周血捐献者,并签署了知情同意书。自2018年2月至2019年2月,共收集到HLA-B2704阳性样本2例、HLA-B2705阳性样本3例、HLA-B27阴性样本8例。采集志愿者10 mL新鲜外周血,放入一次性肝素钠/锂或枸橼酸钠抗凝管采血管中,2~8℃保存运输至实验室。核淋巴细胞,加入病毒液制备完全转化液,进行细胞转化与细胞培养、冻存。建立细胞系后进行种子细胞系扩大培养。

1.2.2 国家参考品的制备与验证

将采集的志愿者外周血进行永生化细胞系的建立^[10-11],按基因组DNA提取试剂盒操作步骤,提取10例成功建系的细胞基因组DNA,使用安捷伦NanoDorp测定其OD260/OD280值检验纯度,利用琼脂糖凝胶电泳胶检验DNA的完整性。使用Qubit Fluorometer3.0对10例DNA样本进行定量后稀释至20 ng/μL的浓度,采用高通量测序(next generation sequencing, NGS)技术对每个样本验证。验证合格的DNA样本进行分装并贴上标签。

1.2.3 国家参考品的协作标定

分别使用4家协作标定单位的HLA-B27检测试剂盒对国家参考品进行协作标定,按照试剂盒说明书进行操作。测序法每个样本测定1次,PCR法每个样本测定3次。按照说明书的检测限要求将参考品样本稀释之后进行再次检测。

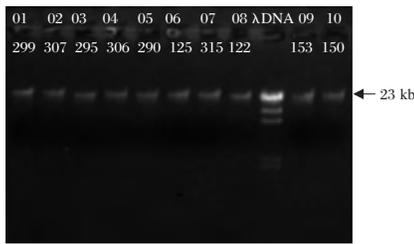
1.2.4 国家参考品稳定性和均匀性验证

随机选取五套国家参考品,在-20℃与25℃之间反复冻融3次(每隔1天一次)之后,分别使用测序法、PCR法、SSP法的HLA-B27检测试剂盒对参考品进行稳定性验证。另外随机取出三套国家参考品,使用测序法的HLA-B27检测试剂盒对参考品进行均匀性验证。

2 结果

2.1 国家参考品的制备及验证

每套HLA-B27国家参考品包括10例基因组DNA样本(3例HLA-B2705阳性、7例HLA-B27阴性)。琼脂糖凝胶电泳结果显示01-10号样本的DNA条带完整锐利,且分子量在23 kb左右,见图1。



注:λDNA为λ DNA-Hind III digest marker, 01-10分别为10例基因组DNA样本,第二行数字表示每个样本编号的末3位,同表1中样本编号/前的末3位。

图1 10例样本提取的DNA质量验证

Figure 1 The quality of extracted genomic DNA from 10 Samples

01-10号样本的OD260/OD280值均在1.80~2.15之间,表明DNA的纯度较高符合检测需求经NGS测序技术对每个样本的HLA-B位点进行4位

高分辨基因分型检测,HLA-B位点的分型结果均与建系之前的外周血基因组DNA的分型信息一致,最后按照30 μL体积进行分装,贴标签,见表1。

2.2 国家参考品的协作标定

实验室邀请4家协作标定单位(分别用A、B、C、D代表),采用PCR-基因测序分型法(sequence based genotyping, SBT)、荧光PCR法、和PCR--序列特异性引物法(sequence specific primer, SSP)对国家参考品进行了验证,见表2。

2.3 国家参考品的稳定性和均匀性验证

使用A单位的HLA-B位点基因高分辨分型试剂盒(SBT法)对3套参考品和2套反复冻融3次后的参考品进行检测,使用C单位和D单位的HLA-B27核酸检测试剂盒(PCR法和SSP法)对3套反复冻融3次后的参考品进行检测。见表3。

表1 10例DNA样本的验证结果

Table 1 Verification results of genomic DNA from 10 Samples

样本编号	分装浓度(ng/μL)	分装体积(μL)	A260/A280	HLA-B基因分型结果	参考品分类
CNGB030299/HLA19061-01	20	30	1.94	B*15:27 B*38:02	阴性
CNGB030307/HLA19069-02	20	30	1.82	B*13:01 B*35:03	阴性
CNGB030295/HLA19057-03	20	30	1.89	B*15:11 B*51:01	阴性
NGB030306/HLA19068-04	2	30	1.89	B*08:01 B*40:06	阴性
CNGB030290/HLA19052-05	20	30	1.84	B*52:01 B*58:01	阴性
CNGB030125/HLA18005-06	20	30	1.88	B*13:02 B*15:02	阴性
CNGB030315/HLA19077-07	20	30	1.88	B*13:01 B*58:01	阴性
CNGB030122/HLA18002-08	20	30	1.83	B*27:05 B*48:01	阳性
CNGB030153/HLA18024-09	20	30	1.89	B*27:05 B*44:03	阳性
CNGB030150/HLA18021-10	20	30	1.8	B*27:05 B*58:01	阳性

表2 4家协作标定单位的验证结果

Table 2 Verification results of references by detection kits from 4 manufacturers

样本编号	A单位(SBT法)	B单位(SBT法)	C单位(PCR法)	D单位(PCR法)	D单位(SSP法)
CNGB030299/HLA19061-01	B*15:27 B*38:02	B*15:27 B*38:02	阴性	阴性	阴性
CNGB030307/HLA19069-02	B*13:01 B*35:03	B*13:01 B*35:03	阴性	阴性	阴性
CNGB030295/HLA19057-03	B*15:11 B*51:01	B*15:11 B*51:01	阴性	阴性	阴性
NGB030306/HLA19068-04	B*08:01 B*40:06	B*08:01 B*40:06	阴性	阴性	阴性
CNGB030290/HLA19052-05	B*52:01 B*58:01	B*52:01 B*58:01	阴性	阴性	阴性
CNGB030125/HLA18005-06	B*13:02 B*15:02	B*13:02 B*15:02	阴性	阴性	阴性
CNGB030315/HLA19077-07	B*13:01 B*58:01	B*13:01 B*58:01	阴性	阴性	阴性
CNGB030122/HLA18002-08	B*27:05 B*48:01	B*27:05 B*48:01	阳性	阳性	B*27:05
CNGB030153/HLA18024-09	B*27:05 B*44:03	B*27:05 B*44:03	阳性	阳性	B*27:05
CNGB030150/HLA18021-10	B*27:05 B*58:01	B*27:05 B*58:01	阳性	阳性	B*27:05

3 讨论

大量研究数据表明,基于PCR方法学的HLA-B27核酸检测已经成为临床辅助诊断强直性脊柱炎的常用方法^[12-14],而试剂盒的质量是保障临床诊断准确的关键因素。然而不同企业不同方法

学的试剂盒在检测原理、原材料、生产工艺等方面均有所差异,在质量控制和性能评价中使用各自的企业参考品,导致不同试剂盒的检验结果缺乏可比性,建立标准化的国家参考品可以对不同试剂盒的质量进行统一评价。

标准物质是指具有一种或多种足够均匀并且

表3 国家参考品稳定性和均匀性的验证结果

Table 3 Verification results of stability and homogeneity for references

样本编号	参考品标示结果		与参考品标示结果是否一致			
	基因分型结果	阴阳性分类结果	A单位 (SBT法)	C单位 (PCR法)	D单位 (PCR法)	D单位 (SSP法)
CNGB030299/HLA19061-01	B*15:27 B*38:02	阴性	一致	一致	一致	一致
CNGB030307/HLA19069-02	B*13:01 B*35:03	阴性	一致	一致	一致	一致
CNGB030295/HLA19057-03	B*15:11 B*51:01	阴性	一致	一致	一致	一致
NGB030306/HLA19068-04	B*08:01 B*40:06	阴性	一致	一致	一致	一致
CNGB030290/HLA19052-05	B*52:01 B*58:01	阴性	一致	一致	一致	一致
CNGB030125/HLA18005-06	B*13:02 B*15:02	阴性	一致	一致	一致	一致
CNGB030315/HLA19077-07	B*13:01 B*58:01	阴性	一致	一致	一致	一致
CNGB030122/HLA18002-08	B*27:05 B*48:01	阳性	一致	一致	一致	一致
CNGB030153/HLA18024-09	B*27:05 B*44:03	阳性	一致	一致	一致	一致
CNGB030150/HLA18021-10	B*27:05 B*58:01	阳性	一致	一致	一致	一致

稳定的具有准确特性量值的测量标准,量值准确性、足够均匀性和良好稳定性是标准物质的三大重要特性^[15-17]。本研究通过4家实验室采用荧光PCR法、PCR-SSP法以及PCR-SBT测序法的HLA-B27检测试剂对参考品进行协作标定,其中A单位和B单位两家实验室均使用世界卫生组织推荐的HLA分型方法金标准即PCR-SBT测序法,对10例国家参考品(每一例均含2条染色体)进行4位基因分型,结果完全一致;C单位和D单位两家实验室使用荧光PCR法、PCR-SSP法的不同检测试剂,对10例国家参考品B27的阴阳性结果进行判断,结果完全一致,以上数据充分保障了国家参考品的定值准确。

本参考品是细胞系提取的基因组DNA样本,常规在在-20℃以下保存,且要求干冰或-20℃冷链运输,用户不宜反复冻融后使用。DNA样本自身的均匀性和稳定性是良好的。本研究通过3家实验室采用PCR法、PCR-SSP法以及PCR-SBT测序法,对3套国家参考品、以及5套在-20℃与25℃之间反复冻融3次之后的国家参考品进行验证,结果显示A单位、C单位和D单位的验证结果均与-20℃保存的国家参考品的标示结果完全一致,表明国家参考品在反复冻融3次之后依然稳定和均匀。此外,本参考品销售半年以来,多家用户使用后反馈良好,也表明了其稳定性和均匀性良好;本实验室既往研制的多套DNA参考品的稳定性和均匀性实验结果以及售后反馈,均表明DNA参考品一直非常稳定^[18];同时还将对该国家参考品进行长期稳定性研究以及期间核查,以确保长期放置后依然满足要求。

由于测序法的HLA-B核酸检测试剂盒应对待测样本报告出HLA-B的4位基因分型信息,国家

参考品在对此类试剂盒进行性能评价时,10例参考品均作为阳性参考品可对试剂盒的准确性指标进行评价,10例参考品稀释后可对试剂盒的检测限指标进行评价;其他方法学的HLA-B核酸检测试剂盒主要包括:荧光PCR法、PCR-SSP法、PCR-序列特异性寡核苷酸探针法(sequence specific oligonucleotide, SSO)、PCR熔解曲线法,此类试剂盒一般针对B27的常见亚型如B2705和B2704设计特异性引物,对待测样本报告阴性或阳性的结果。7例B27阴性国家参考品可对试剂盒的特异性指标进行评价,3例B27阳性国家参考品可对试剂盒的准确性和检测限指标进行评价。

综上所述,本实验室成功建立了人类白细胞抗原B27核酸检测国家参考品,该参考品的准确性、均一性和稳定性均符合要求,可用于人类白细胞抗原B27核酸检测试剂盒的质量评价。

参考文献

- [1] Romero-sanchez C, Chila-moreno L, Gómez A, et al. The Frequency of HLA-B27 in a Colombian Population with Signs of Spondyloarthritis [J]. *Curr Rheumatol Rev*, 2018, 14(3): 246-250.
- [2] Lin H, Gong YZ. Association of HLA-B27 with ankylosing spondylitis and clinical features of the HLA-B27-associated ankylosing spondylitis: a meta-analysis [J]. *Rheumatol Int*, 2017, 37(8):1267-1280.
- [3] Chen B, Li J, He C, et al. Role of HLA-B27 in the pathogenesis of ankylosing spondylitis [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 15(4):1943-1951.
- [4] 罗百文. 强直性脊柱炎患者HLA-B27表达情况及基因亚型检测分析[J]. *中国实用医刊*, 2020, 47(5):12-15.

早孕期流产胚胎组织 MLPA 检测结果及与年龄和孕周的关系分析

陈杏园¹ 罗世强² 王秋华² 袁德健² 许泽辉² 王敬仁² 覃柳群² 唐宁^{2*}

[摘要] **目的** 应用多重连接依赖式探针扩增技术(MLPA)检测流产胚胎染色体非整倍体畸变,并结合孕妇年龄、孕周等帮助流产患者分析流产的遗传学病因,为遗传咨询提供依据。**方法** 收集早孕期流产孕妇的绒毛组织样本,提取基因组DNA,应用MLPA(P036、P070)两个试剂盒探针进行染色体非整倍体畸变检测,结合孕妇年龄、孕周指标等进行统计分析。**结果** 本次研究共收集774例样本,检测成功率为98.97%(766/774),异常检出率52.09%(399/774),其中染色体非整倍体畸变50.26%,核型为47,XN,+16最多见,其次为47,XN,+22和45,XO,同时可检测出染色体单体、染色体双三体、嵌合体、染色体部分缺失/重复等多种染色体异常。孕妇在小于20岁和大于35岁年龄段中流产率较高($P<0.05$)。孕周小于12周流产胚胎中染色体异常检出率明显高于 ≥ 12 周的染色体异常检出率($P<0.05$)。**结论** 染色体畸变是早期流产最常见的遗传学病因,染色体畸变类型较多,非整倍体最常见,孕妇在低年龄段和高龄段,妊娠早期染色体畸变率较高。

[关键词] 自然流产;染色体畸变;多重连接依赖式探针扩增技术

Analysis of MLPA results of aborted embryonic tissue in early pregnancy and its relationship with maternal age and gestational age

CHEN Xingyuan¹, LUO Shiqiang², WANG Qiuhua², YUAN Dejian², XU Zehui², WANG Jingren², QIN Liuhun², TANG Ning^{2*}

(1. Department of Laboratory Medicine, Guangxi Zhuang Autonomous Region People's Hospital, Nanning, Guangxi, China, 530000; 2. Department of Medical Genetics, Liuzhou Maternal and Child Health Hospital, Liuzhou, Guangxi, China, 545001)

[ABSTRACT] **Objective** Using a multiple ligation-dependent probe amplification method (MLPA) to detect chromosomes in abortive embryos, and the genetic etiology of abortion was analyzed in combination with maternal age, gestational age to assist in further genetic counseling. **Methods** The villus tissue samples of spontaneous abortion embryos in early pregnancy were collected and genomic DNA was extracted and tested using two kit probes, MLPA (P036, P070), combined with further analysis of statistics such as age and gestational age. **Results** A total of 774 samples were collected in this study, with a detection success rate of 98.97% (766/774) and an abnormal detection rate of 52.09% (399/774). The chromosomal aneuploidy anomaly was 50.26%, the karyotype 47, XN, +16 were the most common. Chromosomal monomer, chromosome trisomes, chimeras, other complex aneuploids, deletion/duplication chromosomes and other chromosomal abnormalities were detected. Pregnant women have higher abortion rates in the age group of less than 20 years

基金项目:广西医药卫生自筹课题(Z20180042)

作者单位:1. 广西壮族自治区人民医院检验科,广西,南宁 530000

2. 柳州市妇幼保健院医学遗传科,广西,柳州 545001

*通信作者:唐宁, E-mail:tn825@126.com

注:陈杏园与罗世强为并列第一作者

old and older than 35 years old. The detection rate of chromosomal abnormalities in aborted embryos less than 12 weeks gestation was significantly higher than that of ≥ 12 weeks ($P < 0.05$), and in each type of abnormality. **Conclusion** Chromosome aberration is the most common genetic cause of early spontaneous abortion. There are many types of chromosomal aberrations and aneuploidy is the most common. Pregnant women in the lower ages and advanced age, the rate of chromosomal aberrations is higher in early pregnancy.

[KEY WORDS] Spontaneous abortion; Chromosomal abnormalities; MLPA

自然流产是指妊娠在28周前自行终止,胎儿体重 $< 1\ 000\text{ g}$ 者,是健康育龄期妇女常见的妊娠并发症,约占临床妊娠的10%~15%^[1]。造成胚胎停育的原因有很多,遗传因素在早孕期自然流产病因中占很大比例,有报道早期自然流产绒毛染色体异常率可达75%^[2],包括非整倍体、多倍体、部分缺失或部分重复等^[3]。随之而来的生殖风险取决于重排类型及其亲本来源^[4]。目前用于检测染色体畸变的方法多种多样,与常规细胞遗传学分析相比,多重连接依赖式探针扩增技术(multiple ligation-dependent probe amplification, MLPA)技术成本相对较低、劳动力密集度较低、并且等待时间较短、准确度较高,因此,MLPA可以作为早期自然流产遗传学检测的首选方法^[5]。本研究用MLPA技术检测自然流产胚胎染色体异常,分析早期自然流产胚胎染色体异常情况并进一步分析其相关的影响因素,为进一步遗传咨询提供依据。

1 资料与方法

1.1 对象

收集2016年3月到2017年12月在柳州市妇幼保健院就诊的稽留流产孕妇患者774例,患者具有停经史、血尿检查HCG阳性;超声检查见空孕囊或宫腔内见胚芽或胚胎样组织,经检测无胎心;自愿接受流产绒毛组织染色体非整倍体检测。孕妇年龄19~44岁,平均年龄 31.7 ± 5.9 岁,孕周为5周0天~15周3天。

1.2 方法

1.2.1 流产绒毛组织基因组DNA提取

镜下挑选5~10 mg绒毛组织剪碎,常规酚-氯仿法提取基因组DNA。采用ASP-2680核酸分析仪检测DNA浓度纯度,A260/A280在1.6~1.9之间,浓度为 $20 \sim 30\text{ ng}/\mu\text{L}$ 。

1.2.2 MLPA检测

采用P036和P070探针试剂盒(荷兰,MRC-Honand公司),23对染色体中除13、14、15染色体

长臂2个探针,Y染色体长臂1个探针外,其它染色体长、短臂末端各有2个检测探针。提取DNA后经过变性、杂交、连接及PCR反应后,取PCR产物进行毛细管电泳检测,并对检测数据运用Coffalyser专用软件(荷兰MRC公司)分析。

1.2.3 统计学方法

采用SPSS 20.0软件进行数据处理分析,检出率用百分率(%)表示,组间资料采用 χ^2 检验进行分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MLPA检测结果

收集774例样本,检测成功98.97%(766/774),8例因标本腐败提取的DNA浓度和纯度无法满足实验要求。MLPA检测发现染色体异常52.09%(399/774)。其中,染色体非整倍体畸变占50.26%,以47,XN,+16比例最高,其次为47,XN,+22和45,XO,同时检测出染色体单体,染色体双三体,嵌合体,和其它复杂染色体非整倍体畸变等,在复合型染色体畸变中也是涉及16、22和X染色体的较多见;染色体部分缺失或重复占1.31%。见表1。

2.2 不同年龄段组流产胚胎染色体情况

孕妇在小于20岁和大于35岁年龄段其流产胚胎中染色体异常检出率明显较高($P < 0.05$),在 ≥ 35 岁流产孕妇的胚胎中,染色体异常检出率高达66.53%。多条染色体非整倍体畸变,及大部分小染色体非整倍体畸变的流产胚胎多见于年龄 ≥ 35 岁高龄孕妇,而涉及性染色体异常流产胚胎则多见于年龄 < 35 岁孕妇。见表2。

2.3 不同孕周组流产胚胎染色体情况

不同孕周各组流产胚胎染色体异常情况见表3,孕周 < 12 周流产人群中染色体异常检出率明显高于 ≥ 12 周的染色体异常检出率($P < 0.05$), < 12 周流产人群的发生率高于 ≥ 12 周流产人群($P < 0.05$)。见表3。

表1 流产胚胎MLPA检测结果分析 [n(%)]

Table 1 Analysis of MLPA test results of aborted embryos [n(%)]

MLPA 分析结果	总例数构成比	孕周<12周检出率	孕周≥12周检出率	孕妇<35岁检出率	孕妇≥35岁检出率
47, XN, +2	11(2.76)	10(1.49)	1(1.08)	9(1.75)	2(0.8)
47, XN, +3	6(1.5)	6(0.89)	-	4(0.78)	2(0.8)
47, XN, +4	5(1.25)	5(0.74)	-	4(0.78)	1(0.4)
47, XN, +5	5(1.25)	5(0.74)	-	4(0.78)	1(0.4)
47, XN, +6	8(2.01)	8(1.19)	-	5(0.97)	3(1.2)
47, XN, +7	9(2.26)	9(1.34)	-	7(1.36)	2(0.8)
47, XN, +8	18(4.51)	17(2.53)	1(1.08)	11(2.14)	7(2.79)
47, XN, +9	5(1.25)	5(0.74)	-	-	5(1.99)
47, XN, +10	6(1.5)	6(0.89)	-	5(0.97)	1(0.4)
47, XN, +11	6(1.5)	6(0.89)	-	2(0.39)	4(1.59)
47, XN, +12	2(0.5)	1(0.15)	1(1.08)	1(0.19)	1(0.4)
47, XN, +13	21(5.26)	17(2.53)	4(4.3)	15(2.92)	6(2.39)
47, XN, +14	13(3.26)	11(1.63)	2(2.15)	6(1.17)	7(2.79)
47, XN, +15	27(6.77)	24(3.57)	3(3.23)	11(2.14)	16(6.37)
47, XN, +16	75(18.8)	68(10.1)	7(7.53)	51(9.94)	24(9.56)
47, XN, +17	4(1)	4(0.59)	-	2(0.39)	2(0.8)
47, XN, +18	9(2.26)	6(0.89)	3(3.23)	4(0.78)	5(1.99)
47, XN, +19	1(0.25)0.25	1(0.15)	-	-	1(0.4)
47, XN, +20	11(2.76)	8(1.19)	3(3.23)	5(0.97)	6(2.39)
47, XN, +21	28(7.02)	24(3.57)	4(4.3)	11(2.14)	17(6.77)
47, XN, +22	45(11.28)	43(6.39)	2(2.15)	21(4.09)	24(9.56)
45, XO	39(9.77)	31(4.61)	8(8.6)	32(6.24)	7(2.79)
45, XN, - 4	1(0.25)	1(0.15)	-	1(0.19)	-
45, XN, -21	2(0.5)	2(0.3)	-	-	2(0.8)
48, XN, +10, +11	1(0.25)	1(0.15)	-	-	1(0.4)
48, XN, +12, +16	1(0.25)	1(0.15)	-	-	1(0.4)
48, XN, +15, +16	3(0.75)	3(0.45)	-	1(0.19)	2(0.8)
48, XN, +16, +22	2(0.5)	2(0.3)	-	-	1(0.4)
48, XN, +21, +22	1(0.25)	-	1(1.08)	-	1(0.4)
48, XN, +7, +8	1(0.25)	1(0.15)	-	1(0.19)	-
48, XN, +9, +15	1(0.25)	1(0.15)	-	-	1(0.4)
48, XN, +3, +5	1(0.25)	1(0.15)	-	1(0.19)	-
48, XN, +4, +21	1(0.25)	1(0.15)	-	-	1(0.4)
48, XN, +4, +22	1(0.25)	1(0.15)	-	-	1(0.4)
48, XN, +7, +20	1(0.25)	-	1(1.08)	1(0.19)	-
48, XN, +7, +21	1(0.25)	1(0.15)	-	-	1(0.4)
46, XN, +14, - 20	1(0.25)	1(0.15)	-	-	1(0.4)
46, XN, +10, - 20	1(0.25)	1(0.15)	-	-	1(0.4)
46, X, +15	1(0.25)	1(0.15)	-	-	1(0.4)
46, X, +21	1(0.25)	1(0.15)	-	1(0.19)	-
46, X, +22	1(0.25)	1(0.15)	-	-	1(0.4)
46, X, +3	1(0.25)	1(0.15)	-	1(0.19)	-
47, XXY	1(0.25)	1(0.15)	-	1(0.19)	-
49, XN, +15, +21, +22	1(0.25)	1(0.15)	-	-	1(0.4)
49, XN, +7, +14, +15	1(0.25)	1(0.15)	-	-	1(0.4)
46, XN/47, XN, +13	1(0.25)	1(0.15)	-	-	1(0.4)
46, XN/47, XN, +2	2(0.5)	2(0.3)	-	1(0.19)	1(0.4)
47, XN, +9/48, XX, +7, +9	1(0.25)	1(0.15)	-	-	1(0.4)
Yp11.31 缺失	1(0.25)	1(0.15)	-	1(0.19)	-
8p23.3 缺失	1(0.25)	1(0.15)	-	1(0.19)	-
6q27 缺失	1(0.25)	1(0.15)	-	1(0.19)	-
2q37.3 缺失	1(0.25)	1(0.15)	-	1(0.19)	-
1p36.33 缺失	1(0.25)	1(0.15)	-	1(0.19)	-
18q11.32 缺失	1(0.25)	1(0.15)	-	1(0.19)	-
17p13.3 缺失	1(0.25)	1(0.15)	-	1(0.19)	-
15q26.3 缺失	1(0.25)	1(0.15)	-	1(0.19)	-
14q32.33 缺失	1(0.25)	1(0.15)	-	1(0.19)	-
14q32.33 缺失	1(0.25)	1(0.15)	-	1(0.19)	-
11q25 缺失, 10p15.3 重复	1(0.25)	1(0.15)	-	-	1(0.4)
11q25 缺失, 4q35.2 重复	1(0.25)	1(0.15)	-	1(0.19)	-
4p16.3 缺失, 3q29 为重复	1(0.25)	1(0.15)	-	1(0.19)	-
18q23 缺失, 6q27 重复	1(0.25)	1(0.15)	-	1(0.19)	1(0.4)
合计	399(100)	358(53.19)	41(44.09)	232(45.22)	167(66.53)

表2 不同年龄段组流产胚胎染色体情况

Table 2 Chromosomes of aborted embryos in different age groups

年龄段 (岁)	n	染色体异常例数(例)	年龄段异常检出率(%)	总体异常率(%)
<20	58	43	74.14	10.78
20~25	86	42	48.84	10.53
25~29	142	39	27.46	9.77
30~34	227	105	46.26	26.32
35~39	165	105	63.64	26.32
>40	86	62	72.09	15.54
P值			0.05	0.05

表3 不同孕周组流产胚胎染色体情况

Table 3 Chromosomes of aborted embryos in different gestational weeks

孕周	n	染色体异常数(例)	异常检出(%)	异常占比(%)
<12周	673	357	53.05	89.47
≥12周	93	42	45.16	10.53
P值			0.05	0.05

3 讨论

自然流产是妇产科常见病症之一,流行病学上最常见的原因是胎儿染色体异常^[6],可能与孕妇年龄、理化因素及遗传因素相关,因此建议自然流产胚胎进行染色体检查^[7-8]。近年来,MLPA技术在妇产科领域的应用有了较大进展,为产前筛查、产前诊断及自然流产的病因分析提供了新的技术方法。

有研究发现超过61%的染色体异常检出率^[9],这可能是由于研究群体不同结果的差异。本研究发现染色体非整倍体畸变占所有异常染色体的96.49%,以47,XN,+16最为常见,其次为47,XN,+22和45,XO,这三种异常占非整倍体异常的41.30%,同时还发现染色体单体、染色体双三体、嵌合体和其它复杂染色体非整倍体畸变等。有研究显示,大部分染色体非整倍体畸变来源于卵母细胞减数分裂,尤其是第一次减数分裂时染色体不分离^[10],只有约0~8.5%的来自受精卵最初几次的有丝分裂时染色体分离异常^[11]。本次研究中,16-三体发生率最高,它发生在母亲的卵母细胞中与其他的小染色体不同,它重组减少和不分离发生的确切机制还有待进一步研究^[12],但有研究显示在父亲的减数分裂错误中,16号染色体的不分离可能对胎儿非整倍体产生相对影响^[13]。45,XO在流产胚胎中的发生率为5.09%,与相关报道相

近^[14]。45,XO是唯一已知的可存活单体(Turner综合征),80%是父源性染色体丢失所致^[15]。流产病例中还发现1例45,XX,-4,2例45,XN,-21,说明常染色体单倍体也可能是引起早孕期流产的原因。在流产胚胎中,发现14例染色体部分缺失/重复。染色体部分缺失/重复会导致染色体不平衡,其与流产的相关性有待进一步研究。但本研究中未发现涉及1号染色体的非整倍体畸变,可能由于1号染色体上涉及胚胎生命的基因较多,在更早期未被发现的流产中已流失。综上,多种类型染色体畸变均有可能导致早期胚胎流产。

孕妇年龄已被证实与生殖细胞非整倍体的发生密切相关,在大于35岁的孕妇中,卵细胞染色体非整倍体发生率明显较高,确切原因尚未清楚,可能与高龄女性卵细胞减数分裂重组错误、纺锤体聚合蛋白缺陷和Cohesion蛋白减少等有关^[16],随着孕妇年龄增加,胚胎染色体异常率也逐渐增加。研究发现,在年轻的流产孕妇中(35岁以下),遗传异常明显较少,其流产原因可能存在其它因素的作用^[17]。但在本研究中小于20岁的孕妇中,其流产胚胎染色体异常检出率到达74.14%,确切原因有待进一步研究,可能与孕妇身体机制尚未发育成熟有关。

流产孕妇孕周小于12周染色体异常检出率明显高于孕周大于或等于12周人群,在自然流产发生时孕周越小,染色体异常的可能性就越大。在妊娠早期的流产胚胎染色体异常可能涉及任何一条或多条染色体,但孕周大于12周的流产胎儿染色体异常大多为13,18,21三体性和性染色体非整倍体,与在活产儿中能检测到的染色体畸变类型相似^[18]。

自然流产与多种因素相关,其中染色体非整倍体畸变是早期自然流产最常见的遗传学病因。孕妇小于20岁时,其流产胚胎染色体异常检出率相当高,孕妇在大于35岁后,随着年龄增大,流产胚胎染色体异常检出率越高^[19],所以适龄婚育相当重要。流产发生时的孕周越小,流产胚胎染色体异常检出率越高,所以,对早期自然流产胚胎进行遗传学检测对明确病因及进一步优生优育咨询具有重大意义。

参考文献

[1] Zimowski JG, Massalska D, Pawelec M, et al. First-trimester spontaneous pregnancy loss - molecular analysis using mul-

- tiplex ligation-dependent probe amplification [J]. Clin Genet, 2016, 89(5):620-624.
- [2] 刘祥举. 自然流产的遗传学检测研究进展[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2019, 11(4):338-342.
- [3] Zhang LM, Yang YN, Zhang RX, et al. Comparison of the etiological constitution of two and three or more recurrent miscarriage [J]. Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi, 2018, 53(12):855-859.
- [4] Kaser D. The Status of Genetic Screening in Recurrent Pregnancy Loss [J]. Obstet Gynecol Clin North Am, 2018, 45(1):143-154.
- [5] Zhao Y, Lou J, Sun M, et al. Analysis of the cause of pregnancy failure with combined MLPA assay for subtelomeric regions and ultrasonography [J]. Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi, 2017, 34(1):81-84.
- [6] Li H, Liu M, Xie M, et al. Submicroscopic chromosomal imbalances contribute to early abortion[J]. Mol Cytogenet, 2018, 11(1):41.
- [7] Hardy K, Hardy PJ. 1(st)trimester miscarriage: four decades of study[J]. Transl Pediatr, 2015, 4(2):189-200.
- [8] Yakut S, Toru HS, Cetin Z, et al. Chromosome abnormalities identified in 457 spontaneous abortions and their histopathological findings [J]. Turk Patoloji Derg, 2015, 31(2):111-118.
- [9] Franiasiak JM, Forman EJ, Hong KH, et al. The nature of aneuploidy with increasing age of the female partner: a review of 15, 169 consecutive trophoblast biopsies evaluated with comprehensive chromosomal screening [J]. Fertil Steril, 2014, 101(3):656-663.
- [10] Stephenson MD, Awartani KA, Robinson WP. Cytogenetic analysis of miscarriages from couples with recurrent miscarriage: a case-control study[J]. Hum Rep, 2002, 17(2):446-451.
- [11] Chiang T, Schultz RM, Lampson M. Meiotic origins of maternal age-related aneuploidy[J]. Biol Rep, 2012, 86(1):1-7.
- [12] 朱正锴. 早期自然流产胚胎染色体数目异常的临床分析[J]. 中国优生与遗传杂志, 2017, 25(5):47-49+58.
- [13] Neusse M, Rogenhofer N, Dürl S, et al. Increased chromosome 16 disomy rates in human spermatozoa and recurrent spontaneous abortion [J]. Fertil Steril, 2015, 104(5):1130-1137.
- [14] 胡晓东, 尹彪, 朱元昌, 等. 女性年龄与早期自然流产胚胎染色体数目异常的关系[J]. 生殖与避孕, 2014, 34(9):735-741.
- [15] Srebnik M, Boter M, Oudesluijs G. Application of SNP array for rapid prenatal diagnosis: implementation, genetic counselling and diagnostic flow [J]. Eur J, 2011, 19(12):1230-1237.
- [16] Hassold T, Hall H, Hunt P. The origin of human aneuploidy: where we have been, where we are going [J]. Hum Mol Genet, 2007, 16(2):R203-208.
- [17] Romero ST, Geiersbach KB, Paxton CN, et al. Differentiation of genetic abnormalities in early pregnancy loss [J]. Ultrasound Obstet Gynecol, 2015, 45(1):89-94.
- [18] Feichtinger M, Reiner A, Hartmann B, et al. Embryoscopy and karyotype findings of repeated miscarriages in recurrent pregnancy loss and spontaneous pregnancy loss [J]. J Assist Rep Genet, 2018, 35(8):1401-1406.
- [19] Magnus MC, et al. Role of maternal age and pregnancy history in risk of miscarriage: Prospective register based study [J]. BMJ, 2019, 364:l869.

(上接第 1288 页)

- [5] 杜冉冉, 王师, 张火兵, 等. HLA-B27 与强直性脊柱炎相关性研究进展[J]. 标记免疫分析与临床, 2018, 25(4):589-592.
- [6] 黄波, 万小涛, 张有辉. 强直性脊柱炎患者 HLA-B27 及基因亚型检测分析[J]. 检验医学与临床, 2016, 13(21):3052-3053.
- [7] 石华, 崔辰莹. 荧光定量 PCR 检测 HLA-B27 的临床应用评价[J]. 中国保健营养, 2019, 17(17):60.
- [8] 闻海丰, 冯忠军, 韩文龙, 等. 实时荧光聚合酶链反应溶解曲线检测人类白细胞抗原 B27 方法建立及评价[J]. 临床荟萃, 2015, 30(6):674-677.
- [9] 孙灵迪, 梅传忠, 王平均, 等. PCR-SBT 与 IMS-ELISA 法在强直性脊柱炎患者 HLA-B27 检测中的比较[J]. 现代检验医学杂志, 2015, 30(2):16-18.
- [10] 贾峥, 张艳艳, 孙楠, 等. 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶基因突变永生生化淋巴细胞系的建立[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(4):428-432.
- [11] 高飞, 胡泽斌, 孙楠, 等. 脆性 X 综合征外周血淋巴细胞永生生化细胞系的建立与验证[J]. 中国医药生物技术, 2019, 14(5):470-473.
- [12] 王平均, 孙灵迪, 梅传忠, 等. 聚合酶链反应-直接测序法在强直性脊柱炎患者 HLA-B27 检测中的应用[J]. 中国实验诊断学, 2015, 19(11):1898-1900.
- [13] 白世杰, 托娅, 张保平, 等. 流式细胞术与 PCR-SSP 法检测 HLA-B27 的比对及 HLA-B27 亚型的研究[J]. 检验医学与临床, 2016, 13(5):15-16.
- [14] 戎奇吉, 孙伟浩, 徐冉行, 等. HLA-B27 基因荧光定量方法的确立与多种方法比较研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2015, 35(16):3601-3603.
- [15] 全国标准物质管理委员会. 标准物质的研制管理与应用[S]. 北京:中国计量出版社, 2010.
- [16] 全浩, 韩永志. 标准物质及其应用技术[S]. 北京:中国标准出版社, 2002.
- [17] 全国标准物质管理委员会. 标准物质定值原理和统计学原理[S]. 北京:中国质检出版社, 2011.
- [18] 高飞, 胡泽斌, 游延军, 等. 脆性 X 综合征国家参考品的研制[J]. 中国医药生物技术, 2019, 14(3):269-272.

1例基因 *KIF1A* 错义突变致常染色体显性智力障碍9型病例报道

沈茹¹ 蒋鸿超¹ 吴建敏² 杨晓红¹ 张林³ 段丽芬^{4*} 李海波^{5*}

[摘要] **目的** 通过系统遗传学分析揭示1例 *KIF1A* 基因突变是导致常染色体显性遗传智力障碍9型的原因。**方法** 采用全外显子基因测序方法对昆明市儿童医院收治的5岁语言发育迟缓,走路不稳易跌倒患儿及家系进行检测,后经 Sanger 验证及家系分析。**结果** *KIF1A* 基因的变异位点是导致患儿常染色体显性智力障碍9型致病原因;找到了导致该病的 *KIF1A* 基因一个新发致病位点 c.914C>T (p.Pro305Leu)的错义突变。**结论** 证实了全外显子检测是诊断该病的关键方法;丰富了 *KIF1A* 基因致病突变谱和表型特征;同时发现一个遗传病家族成员中可能同时存在多个遗传学病因。

[关键词] 常染色体显性智力障碍9型(MRD9); *KIF1A* 基因;小脑萎缩;步态不稳

A Case Report of Autosomal Dominant Mental Retardation Type 9 caused by a Missense Mutation in Gene *KIF1A*

SHEN Ru¹, JIANG Hongchao¹, WU Jianmin², YANG Xiaohong¹, ZHANG Lin³, DUAN Lifan^{4*}, LI Haibo^{5*}

(1. Department of Laboratory, Kunming Children's Hospital Affiliated with Kunming Medical University; Yunnan Key Laboratory of Children's Major Disease Research, Kunming, Yunnan, China, 650034; 2. Department of Child Health, Kunming Children's Hospital, Kunming, Yunnan, China, 650034; 3. Department of Radiology, Kunming Children's Hospital, Kunming, Yunnan, China, 650034; 4. Department of Neurology, Kunming Children's Hospital, Kunming, Yunnan, China, 650034; 5. Central Laboratory of Birth Defects Prevention and Control, Ningbo Women & Children's Hospital, Ningbo, Zhejiang, China, 315000)

[ABSTRACT] **Objective** Systematic genetic analysis revealed that the mutation of *KIF1A* gene was the cause of autosomal dominant mental disorder type 9 (MRD9). **Methods** In this study, whole exome sequencing (WES) method was used for detection a 5 year old patient in our hospital were tested for language development retardation, unstable walking and easy to fall. **Results** The study found that the newly discovered mutation site of the *KIF1A* gene is the cause of autosomal dominant mental disorder type 9 in the patient. A new pathogenic missense mutation site of the *KIF1A* gene c.914C>T. (p.Pro305Leu) that caused the disease was found. **Conclusion** It is confirmed that WES detection is critical method for diagnosing of MRD9, enriching the *KIF1A* gene's pathogenic locus spectrum and phenotypic characteristics. At the same time, it finds that there may be multiple genetic causes in a family member of a genetic disease.

[KEY WORDS] Autosomal dominant mental retardation type 9 (MRD9); *KIF1A* gene; Cerebellar atrophy; Gait instability

基金项目:云南省科技厅重点研发计划-国际科技合作专项(2018IA047);昆明市科技保障民生发展计划项目(2019-1-S-2531800001074);云南省科技人才与平台计划-技术创新人才培养对象项目沈茹(202005AD160025)

作者单位:1. 昆明市儿童医院检验科, 云南省儿童重大疾病研究重点实验室, 云南, 昆明 650034

2. 昆明市儿童医院儿保科, 云南, 昆明 650034

3. 昆明市儿童医院放射科, 云南, 昆明 650034

4. 昆明市儿童医院神经内科, 云南, 昆明 650034

5. 宁波市妇女儿童医院出生缺陷综合防治中心, 浙江, 宁波 315000

*通信作者:段丽芬, E-mail: duanlifan@etyy.cn; 李海波, E-mail: lihaibo-775@163.com

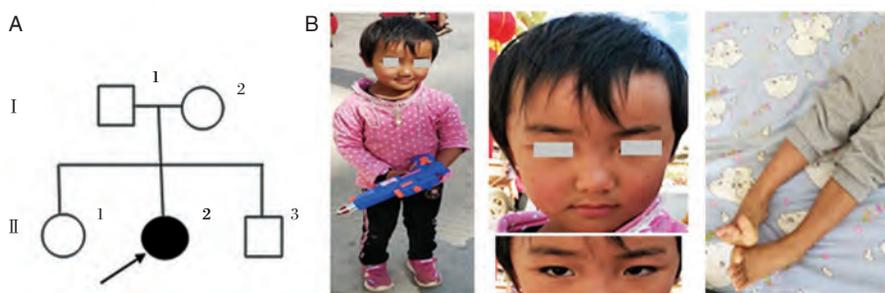
常染色体显性智力障碍9型(Autosomal dominant mental disorder type 9, MRD9)是一种常染色体显性遗传病,目前报道的文献非常少,它是由于染色体2q37肌动蛋白家族1A(Kinesin family member 1A, KIF1A)基因突变引起的智力障碍(OMIM:614255)^[1]。KIF1A基因突变可以导致常染色体显性遗传痉挛性截瘫^[2-3],遗传性感觉和自主神经病变2型(HSAN2)(OMIM:614213),可导致自闭症和多动症并伴有感觉障碍和痉挛性截瘫^[4],也可导致非综合征和综合征性智力障碍(MRD9)^[5]。MRD9的智力障碍和步态不稳是进行性的,发生在婴儿期早期,严重程度不一^[6]。如果能够早期确诊后对患儿的生长发育进行干预和对症处理,对脚部畸形的矫正和后期患儿的康复起到至关重要的作用。目前虽然已经有报道KIF1A基因突变能够导致MRD9。也有研究证实KIF1A基因突变导致常染色体显性遗传,如KIF1A运动域的新发突变(p.S69L)主要由痉挛性截瘫形式的父亲遗传给儿子^[7],另一个文献同样报道KIF1A杂合变异体在一个HSP显性分离模式的家族中被发现^[8],这些病例的主要表型也有发育迟缓和/或伴有小脑、大脑和/或视神经萎缩。目前KIF1A基因突变导致MRD9的发病机制尚不明确,鉴别诊断非常困难,本次研究采用全外显子测序发现了KIF1A基因新的致病位点,扩展了MRD9基因型与临床表型谱。

1 材料与方法

1.1 患者资料

患儿2019年6月到本院门诊就诊,患儿主诉是自幼行走不稳,步态异常易跌倒,语言表达差,外斜视;门诊拟诊双下肢行走不稳待查,精神运动语言发育迟滞收入本院病房。

入院后对患儿进行全面检查。患儿,女孩, G3P2, 2014年10月在云南省墨江县医院出生。其母亲产前检查一切正常,在孕41周顺产。患儿出生体重3.2 kg,出生时无窒息, Apgar评分10分,喂养正常。生长发育史:8个月开始爬;20个月会站立;24个月开始走,走路不稳,经常摔倒,早上较重;12个月始出牙;12个月始说话,但是至今已4岁7个月只会说爸爸、妈妈简单两三个字的词语。父母无亲缘关系;家族遗传史:患儿爷爷、两个伯父和父亲均为耳聋;患儿姐姐2010年出生,目光呆滞,反应迟钝,智力语言明显落后。目前患儿身高90 cm,体重14 kg,大小便可自理;咽反射基本正常;听力正常。眼科检查:看人时双眼角膜向上,外斜视,无视神经萎缩迹象。神经系统检查:步态异常,行走不稳,共济运动检查:指鼻试验(-),跟膝胫试验(-),Romberg试验(+)。双侧足内翻,没有足下垂;四肢肌力正常,下肢肌张力正常,腹壁反射(+),膝反射(+),双侧自发巴氏征(+),颈无抵抗,布氏征(-),克氏征(-)。见图1。



注:A 家系图;B 患儿体征:患儿4岁7个月大。

图1 家系图及常染色体显性遗传智力低下9(MRD9)患儿身体特征

Figure 1 Physical features of patient with mental retardation autosomal dominant 9 (MRD9)

1.2 诊疗经过

1.2.1 临床检查

患儿入院后除了进行肝肾功、心肌酶和电解质等常规检查外,还进行血糖、血氨、骨化二醇、铜蓝蛋白、微量元素,铁蛋白,血脂、肾功能、甲状腺功能等代谢相关检查;同时进行了颅脑及肢体的

影像学检查;以及心脏超声和心电图检查。采集患儿的足跟血干血斑进行新生儿遗传代谢病串联质谱,及尿液的气相质谱检测。

1.2.2 全外显子组基因测序

本研究通过了昆明医科大学附属昆明市儿童医院医学伦理委员会审查批准,征得患儿父母遗

传分析的知情同意。采集病人及其父母、姐姐和弟弟的外周血进行家系(Trios)测序和全外显子组+拷贝数变异(CNV)检测。

首先进行先证者及其家系的外周血提取基因组DNA,经片段化、连接接头、扩增纯化后,使用杂交捕获方法制备DNA文库,然后采用高通量测序平台(Illumina Novaseq6000, USA)检测人类全外显子组中20 099个基因的外显子区域及旁侧内含子区域(20 bp)。将测序数据与人类基因组hg19(GRCh37)参考序列进行比对,并对目标区域的覆盖度和测序质量进行评估。通过数据库多重检索,获取与受检者表型相关的1 523个基因。参照2015年版美国医学遗传学与基因组学学会(ACMG)指南对变异进行致病性评估。本检测分析了所列基因的大片段(连续2个及以上外显子)CNV,报告的CNV均经正交试验验证(qPCR或MLPA)。当检出的致病或可能致病变异存在于常染色体隐性基因中时,实验室通过NGS和/或Sanger测序确保该基因编码序列的覆盖率达到100%。

1.2.3 测序数据分析及Sanger测序验证

公共数据库(ESP6500, 1000genomes, ExAC, GnomAD)用于过滤频率高于0.001的变异。使用四种软件(PolyPhen-2、SIFT、CADD和Mutation Taster)预测单核苷酸变异(single nucleotide variants, SNV)的致病性。测序后根据ACMG指南致病性评估结合患儿临床资料分别进行遗传学分析。随后根据WES中发现的突变分别设计引物,进行PCR扩增以进行Sanger测序,验证WES的结果及遗传模式。测序结果通过Mutation Surveyor软件进行序列比对分析,并进行家系验证。

2 结果

2.1 临床结果

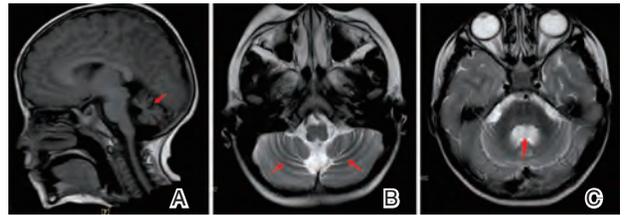
2.1.1 常规检查结果

患儿血液、尿液的串联质谱检查显示结果无异常,排除患儿有遗传代谢性疾病。

2.1.2 影像检查结果

影像学检查:颅脑+颈椎+腰骶椎MRI平扫显示双侧小脑半球体积减小,脑沟加深、增宽;第四脑室稍扩大。螺旋CT颅脑平扫未见异常;周围神经传导功能:周围神经运动传导功能异常(左侧CMAP波幅稍低)。常规心脏彩超检查未见异

常。十二通道心电图检查为窦性心律,正常心电图。胸部正侧位片示双肺纹理增多,心隔未见明显异常。见图2。



注:A. T1WI矢状位(小脑); B. T2WI横位(小脑)。C. 第四脑室稍扩大。

图2 先证者的颅脑磁共振成像数据

Figure 2 Brain Magnetic Resonance Imaging data of the proband

2.2 全外显子组基因测序

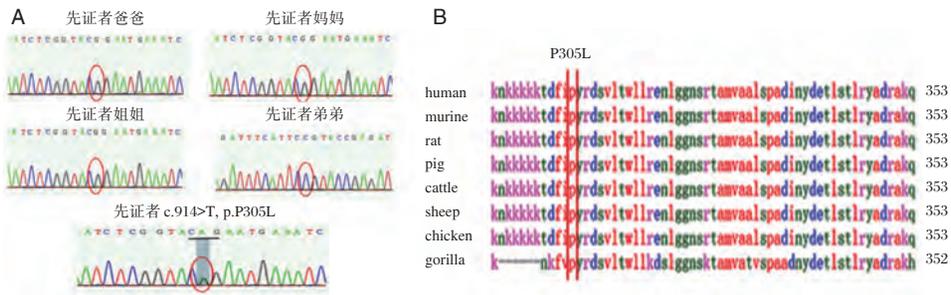
测序结果发现一个与患儿临床表型高度相关的基因*KIF1A*:c.914C>T(p.Pro305Leu)(NM_004321.7)杂合错义突变位点。此突变位点在*KIF1A*基因11号外显子区域,出现的杂合突变c.914C>T使编码区第914位碱基的胞嘧啶(C)变为胸腺嘧啶(T),该变异导致编码蛋白的第305位氨基酸的脯氨酸(Pro)变成亮氨酸(Leu)。

2.3 Sanger测序验证结果

Sanger测序验证结果显示此患儿携带*KIF1A*:c.914C>T(p.Pro305Leu)杂合突变,其父母均未携带,其姐姐及弟弟此位点均无突变,因此,该变异位点为新生变异。见图3。

3 讨论

基因突变位点*KIF1A*:c.914C>T(p.Pro305Leu)(NM_004321.7)在一般人群数据库gnomAD中未收录,该变异尚未在HGMD数据库收录,为新发现的变异位点。通过Grantham's Distance软件预测提示脯氨酸和亮氨酸的理化性质差异中等(Grantham dist:98)^[6-7]。氨基酸保守性分析表明,该位点的野生型氨基酸(Pro305)在分析的90种脊椎动物中保守,表明该位点发生变异很大的可能将不被容忍,并可能对蛋白质的结构和/或功能产生不良影响。该错义突变在3种功能预测软件中都提示有害(SIFT Score:0.001, Polyphen2 HVAR Score:0.999, Mutation Taster Score:1.1),根据ACMG指南,该变异评级为疑似致病突变,根据患儿的临床表现和基因分析结果,此患儿诊断为MRD9。



注:A.先证者及其家人 Sanger 测序结果显示 *KIF1A*:c.914C>T, p.P305L 有一个新生杂合突变。红色圆圈是突变位点。弟弟是正义链,其余都是反义链; B. *KIF1A* 基因的(p.P305L)氨基酸序列比对。*KIF1A* 的 294-353 位在不同物种间高度保守。

图 3 先证者家系 Sanger 测序结果和 *KIF1A* 基因 (p.P305L) 不同物种氨基酸序列

Figure 3 Sanger sequencing results of proband family and *KIF1A* gene (p.P305L) amino acid sequence of different species

KIF1A 基因新生突变致病有报道称表型特征为中度至重度发育迟缓或智力落后,多数表现为小脑萎缩、视神经萎缩、轴索感觉运动神经病和痉挛性麻痹^[6]。本例患者突变与 *MDR9* 已经报道过的表型有相同的特征; *MRI* 显示双侧小脑半球体积减小,脑沟加深、增宽,说明有小脑萎缩。步态异常和行走不稳的表型特征在 *MRD9* 的 *OMIM* 数据库中均有描述,值得注意的是患者还存在双侧足内翻和自发巴氏征阳性,右足尤其明显。本次病例出现的足内翻、自发巴氏征阳性、看人时角膜向上和外斜视都是 *MRD9* 首次报道的表型。

KIF1A 基因编码特定于神经元的运动蛋白^[9],最早是在研究神经轴突的膜泡运输时发现的, *KIF1A* 主要负责神经系统里轴突上突触囊泡前体的快速运输,并且它介导的轴突运输对神经的成长、存活和功能发挥有重要的作用^[10-12]。疾病相关突变使突触囊泡前体的 *KIF1A* 运动和轴突顺行转运亢进,导致运动神经元受损^[13],因此走路不稳易摔倒、语言发育迟缓和智力落后为其主要临床症状。本例患儿的原因可能与 *KIF1A* 基因突变使运动神经元受损相关。

尽管 *KIF1A* 基因突变已经在一些神经退行性疾病的家族中被描述过,但是儿童患病报道很少,对于 *KIF1A* 基因导致 *MRD9* 的表型程度和致病机制的研究知之甚少。Hamdan et al 2011 年报道的一个新生错义突变(p.T99M)影响了发育迟缓和轻度小脑萎缩儿童的 *KIF1A* 结构域的 ATP 结合位点^[14]。为了确定 Thr99Met 错义突变是否影响 *KIF1A* 沿神经突的运动,曾经有研究者们使用不同的 *KIF1A* MD-EGFP 融合构建转染了大鼠初级海马神经元,该突变被证明会影响 *KIF1A* 的运动活性^[15]。因此,我们这例患儿发病的确切机制需

要进一步的功能研究来充分阐明 *KIF1A* 变异的遗传优势和神经元类型特异性。

本次研究患儿有家族遗传史,爷爷、爸爸和叔叔均为不同程度的耳聋。本研究结果说明 *MYT1L* 基因 exon 15 碱基缺失发生 6 个移码突变后使翻译停止导致的常染色体显性精神发育迟滞 39 型。因此,本研究也证实患儿与姐姐虽然都有先天性智力落后和发育迟缓缺陷,但是 *WES* 显示她们的致病基因明显不同,所患疾病也不同。这也提示一个遗传病家族成员中,可能同时存在多个遗传学病因。

参考文献

- [1] Yoshikawa K, Kuwahara M, Saigoh K, et al. The novel de novo mutation of *KIF1A* gene as the cause for Spastic paraplegia 30 in a Japanese case[J]. *eNeurological Sci*, 2018, 14:34-37.
- [2] Pennings M, Schouten MI, van Gaalen J, et al. *KIF1A* variants are a frequent cause of autosomal dominant hereditary spastic paraplegia [J]. *Eur J Hum Genet*, 2020, 28 (1): 40-49.
- [3] Van Beusichem AE, Nicolai J, Verhoeven J, et al. Mobility Characteristics of Children with Spastic Paraplegia Due to a Mutation in the *KIF1A* Gene[J]. *Neuropediatrics*, 2020, 51 (2): 146-153.
- [4] Kurihara M, Ishiura H, Bannai T, et al. A Novel De Novo *KIF1A* Mutation in a Patient With Autism, Hyperactivity, Epilepsy, Sensory Disturbance, and Spastic Paraplegia [J]. *Intern Med*, 2020, 59(6): 839-842.
- [5] Yoshikawa K, Kuwahara M, Saigoh K, et al. The novel de novo mutation of *KIF1A* gene as the cause for Spastic paraplegia 30 in a Japanese case [J]. *eNeurological SCI*, 2019, (14): 34-37.
- [6] Lee JR, Srour M, Kim D, et al. De novo mutations in the motor domain of *KIF1A* cause cognitive impairment, spastic paraparesis, axonal neuropathy, and cerebellar atrophy [J]. *Hum Mutat*, 2015, (36): 69-78. (下转第 1302 页)

血 CTCs、cfDNA 检测在乳腺癌中的应用

常立伟* 杨东炜 刘东辰

[摘要] **目的** 探究血循环肿瘤细胞(CTCs)、循环游离DNA(cfDNA)检测在乳腺癌中的应用价值。**方法** 选取2014年4月至2016年4月经手术治疗的乳腺疾病患者163例,其中85例术后病理确诊为乳腺癌(乳腺癌组),另78例为乳腺良性疾病患者(良性疾病组),同时募集同期入院体检健康女性50例(对照组)。观察各组血CTCs、cfDNA及传统肿瘤标志物(CA125、CA153及CEA)水平,采用受试者工作特征曲线(ROC)描述上述指标单项及联合检测对乳腺癌患者的诊断价值,同时分析血CTCs、cfDNA水平与乳腺癌患者临床病理特征及预后的关系。**结果** 乳腺癌组血CTCs、cfDNA、CA125、CA153及CEA均高于良性疾病组和对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$),但良性疾病组和对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$);血CTCs、cfDNA单独或联合及三项联合检测诊断乳腺癌的AUC分别为0.752、0.885、0.857、0.852,均高于传统肿瘤标志物诊断,差异具有统计学意义($P<0.05$);肿瘤大小 ≥ 2 cm乳腺癌患者血CTCs阳性率高于肿瘤大小 < 2 cm者,差异具有统计学意义($P<0.05$);有淋巴结转移者cfDNA阳性率高于无转移者,差异具有统计学意义($P<0.05$);术后3年,疾病进展者CTCs、cfDNA阳性率均高于无疾病进展组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 血CTCs、cfDNA检测对于乳腺癌有较高的诊断价值,且与患者临床病理特征及预后密切相关。

[关键词] 循环肿瘤细胞;循环游离DNA;传统肿瘤标志物;乳腺癌

Application of serum CTCs and cfDNA detection in breast cancer

CHANG Liwei*, YANG Dongwei, LIU Dongchen

(Department of General Surgery, Chaoyang Central Hospital, Chaoyang, Liaoning, China, 122000)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the application value of circulating tumor cells (CTCs) and circulating free DNA (cfDNA) detection in breast cancer. **Methods** During the period from April 2014 to April 2016, 163 patients with breast diseases who underwent surgery were enrolled. Among them, there were 85 cases confirmed with breast cancer (breast cancer group) and 78 cases with benign breast disease (benign disease group) by postoperative pathology. Fifty healthy women who underwent physical examination during the same period were enrolled as the control group. The levels of serum CTCs and cfDNA and traditional tumor markers (CA125, CA153, CEA) in each group were observed. The diagnostic value of each indicator and their combination in breast cancer patients was described by receiver operating characteristic (ROC) curves. The relationship between serum CTCs, cfDNA levels and clinicopathological features, prognosis of breast cancer patients was analyzed. **Results** The serum CTCs, cfDNA, CA125, CA153 and CEA in the breast cancer group were higher than those in the benign disease group and the control group, the differences were statistically significant ($P<0.05$). There was no significant difference in the above indicators between the benign disease group and the control group ($P>0.05$). AUC values of serum CTCs, cfDNA, CTCs + cfDNA and CTCs + cfDNA + traditional tumor markers were 0.752, 0.885, 0.857 and 0.852, which was higher than that of traditional tumor markers, the differences were statistically significant ($P<0.05$). The positive rate of serum

基金项目:辽宁省科学技术基金资助项目(2016028619)

作者单位:辽宁省朝阳市中心医院普外科,辽宁,朝阳 122000

*通信作者:常立伟, E-mail: nujjejo6572@sina.com

CTCs in breast cancer patients with tumors not smaller than 2 cm was higher than that with tumors smaller than 2 cm, the differences were statistically significant ($P<0.05$). The positive rate of cfDNA in patients with lymph node metastasis was higher than that without lymph node metastasis, the differences were statistically significant ($P<0.05$). At 3 years after surgery, positive rates of CTCs and cfDNA in the disease progression group were higher than those in the disease non-progression group ($P<0.05$). **Conclusion** Blood CTCs and cfDNA detection have high diagnostic value for breast cancer, and are closely related to the clinical pathological characteristics and prognosis of patients.

[KEY WORDS] Circulating tumor cell; Circulating free DNA; Traditional tumor marker; Breast cancer

目前乳腺癌已成为女性最为常见的恶性肿瘤,其发病率在全球范围内均持续增长,具有较高的死亡率^[1]。我国乳腺癌发病率也长期居高不下,且发病年龄呈年轻化趋势,严重威胁女性健康状况^[2-3]。早期乳腺癌无明显症状,发现困难,延误治疗现象严重。因此,针对乳腺癌病变的早期发现是目前医学领域关注的重点。现阶段常用的诊断方法主要为一些影像学检测手段,如乳腺B超、乳腺钼靶、磁共振等,但仍需要简便操作、无创、价廉的血清肿瘤标志物提高诊断准确性^[4]。根据美国临床生化科学院(National Academy of Clinical Biochemistry, NACB)检验医学时间指南推荐,已将糖类抗原125(carbohydrate antigen 125, CA125)、糖类抗原153(carbohydrate antigen 153, CA153)及癌胚抗原(carcino-embryonic antigen, CEA)等血清肿瘤标志物用于乳腺癌的诊断^[5]。随着分子生物技术的迅猛发展,循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTCs)、循环游离DNA(circulating free DNA, cfDNA)检测在癌症诊疗过程中的作用成为研究热点^[6]。本研究旨在探究血CTCs、cfDNA联合检测在乳腺癌中的应用价值,并分析血CTCs、cfDNA水平与患者临床病理特征及预后的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2014年4月至2016年4月经手术治疗的乳腺疾病患者163例,其中85例术后病理确诊为乳腺癌(乳腺癌组),另78例为乳腺良性疾病患者(良性疾病组),同时募集同期入院体检健康女性50例(对照组)。乳腺癌组患者平均年龄(45.46 ± 11.62)岁;良性疾病组患者平均年龄(43.29 ± 12.73)岁;对照组平均年龄(46.35 ± 10.58)岁。3组年龄资料比较差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。纳入标准:乳腺癌患者经术后病理检测确诊,且为

首次、单侧发病;具有手术指征;签署知情同意书。排除标准:患者术前接受放疗、内分泌治疗等;合并其他恶性肿瘤;严重心、肝、肾等功能不全;合并出血性疾病;存在严重系统性疾病或感染;处于妊娠、哺乳期女性;精神异常,存在沟通障碍。本研究经本院伦理委员会批准,各组受试者均签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 病例资料及样本采集

收集受试者一般人口学资料和疾病相关资料,并采集受试者空腹下肘部静脉血5 mL,室温静置后待测。

1.2.2 血CTCs检测

采用免疫磁珠阴性富集法富集血液样本中的细胞,进行荧光原位杂交实验,再通过免疫荧光染色定位CTCs细胞,最后荧光显微镜下计数CTCs和判读结果。判读标准:以2个CTCs/3.2 mL血液为临界值,任一探针信号点 >2 个,无血源性白细胞表面抗原着色时,可计为1个阳性细胞,阳性细胞 >1 个时即为阳性^[7]。

1.2.3 血cfDNA、肿瘤标志物检测

分离样本血浆,参照QIAGEN血液基因组DNA纯化试剂盒(批号:51106)说明书操作,提取血浆DNA,采用荧光定量PCR检测血浆DNA含量。其中GADPH上游引物:5'GGAAGGTGAA GGTCGGAGTC3',下游引物:5'GAAGATGGTGA TGGGATTC3',探针序列:5'FAM-CAAGCTTCC CGTTCTCAGCC-TAMRA3'。以 $\geq 1\times 10^3$ 基因拷贝数为阳性标准^[8]。

应用全自动微粒子化学发光酶免疫分析仪,检测样本血清中CA125、CA153及CEA的浓度,其中各指标阳性标准为:CA125 >35 U/mL, CA153 >31.5 U/mL, CEA >5 U/mL,联合检测时任一指标超标即为阳性^[9]。

1.2.4 术后随访

术后通过门诊复查形式随访1年,随访时间截止2019年4月30日,记录患者疾病进展情况,将其中出现疾病进展的患者作为疾病进展组,剩余患者作为无疾病进展组,比较两组血CTCs、cfDNA水平。

1.3 统计学方法

采用软件SPSS 17.0分析处理数据,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,多组均数比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用SNK-*q*法;计数资料以*n*(%)表示,采用 χ^2 检验;采用受试者工作特征(receiver operating characteristic, ROC)曲线描述血CTCs、cfDNA对于乳腺癌诊断的可行性,以曲线下

面积(area under the curve, AUC)大小表示其诊断价值,组间比较采用Z检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组血清CTCs、cfDNA、CA125、CA153及CEA水平的比较

各组血清CTCs、cfDNA、CA125、CA153及CEA水平比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$),其中乳腺癌组上述指标水平明显高于良性疾病组和对照组,差异具有统计学意义($P < 0.05$),但良性疾病组和对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$),见表1。

表1 各组血CTCs、cfDNA、CA125、CA153及CEA水平的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison on levels of serum CTCs, cfDNA, CA125, CA153 and CEA among all groups ($\bar{x} \pm s$)

指标	乳腺癌组(<i>n</i> =85)	良性疾病组(<i>n</i> =78)	对照组(<i>n</i> =50)	<i>F</i> 值	<i>P</i> 值
CTCs(个)	1.34±0.29 ^{ab}	0.03±0.01	0.00±0.00	1325.262	<0.001
cfDNA($\times 10^3$ 基因拷贝数)	29.65±8.57 ^{ab}	0.05±0.01	0.03±0.01	762.096	<0.001
CA125	22.37±7.24 ^{ab}	16.21±5.20	15.43±4.67	29.931	<0.001
CA153	35.84±11.62 ^{ab}	9.13±2.65	8.87±2.41	316.891	<0.001
CEA	6.69±2.13 ^{ab}	1.85±0.54	1.76±0.42	309.314	<0.001

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与良性疾病组比较,^b $P < 0.05$ 。

2.2 血CTCs、cfDNA诊断乳腺癌的ROC分析

ROC分析血CTCs、cfDNA单独或联合及三项联合检测诊断乳腺癌的AUC高于传统肿瘤标志

物诊断,差异具有统计学意义($P < 0.05$),但cfDNA、CTCs+cfDNA及三项联合检测间两两AUC比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表2、图1。

表2 血CTCs、cfDNA及传统肿瘤标志物诊断效能分析

Table 2 Diagnostic efficiency of serum CTCs, cfDNA and traditional tumor markers

检测方法	AUC	95%CI	敏感性(%)	特异性(%)
CTCs	0.752	0.668~0.835	62.40	88.00
cfDNA	0.885	0.822~0.949	87.00	90.00
CTCs+cfDNA	0.857	0.784~0.930	89.40	82.00
CA125+CA153+CEA	0.689	0.599~0.779	51.80	86.00
三项联合	0.852	0.775~0.930	96.50	74.00

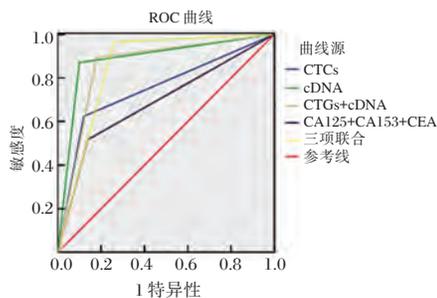


图1 血CTCs、cfDNA诊断乳腺癌的ROC曲线

Figure 1 ROC curves of serum CTCs and cfDNA in the diagnosis of breast cancer

2.3 血CTCs、cfDNA水平与乳腺癌患者临床病理特征的关系

肿瘤大小 ≥ 2 cm乳腺癌患者血CTCs阳性率高于肿瘤大小 < 2 cm者,差异具有统计学意义($P < 0.05$),CTCs阳性率在不同年龄、病理类型、绝经情况、TNM分期、分化程度、淋巴结转移患者间的比较差异无统计学意义($P > 0.05$);有淋巴结转移者cfDNA阳性率高于无转移者,差异具有统计学意义($P < 0.05$),cfDNA阳性率在不同年龄、病理类型、绝经情况、肿瘤大小、TNM分期、分化程度

患者间的比较差异无统计学意义($P>0.05$),见表3。

2.4 血 CTCs、cfDNA 水平与乳腺癌患者预后的关系
截止 2019 年 4 月 30 日,85 例乳腺癌患者术后

有 22 例出现疾病进展,其中疾病进展者 CTCs、cfDNA 阳性率分别为 19(86.36%)和 22(100.00%),均高于无疾病进展组 34(53.97%)和 49(77.78),差异具有统计学意义($\chi^2=7.290, P<0.05$)。

表 3 血 CTCs、cfDNA 水平与乳腺癌患者临床病理特征的关系 [n(%)]

Table 3 Relationship between serum CTCs, cfDNA levels and clinicopathological features of breast cancer patients [n(%)]

病理特征	n	CTCs 阳性率	χ^2 值	P 值	cfDNA 阳性率	χ^2 值	P 值	
年龄(岁)	≤40	26	15(57.69)	0.591	0.898	21(80.77)	0.228	0.973
	41~50	34	21(61.76)			29(85.29)		
	51~60	19	13(68.42)			16(84.21)		
	≥60	6	4(66.67)			5(83.33)		
病理类型	浸润性导管癌	48	31(64.58)	0.803	0.669	42(87.50)	1.347	0.510
	浸润性小叶癌	17	9(52.94)			13(76.47)		
	髓样癌	20	13(65.00)			16(80.00)		
绝经情况	有	22	14(63.64)	0.021	0.885	19(86.36)	0.173	0.677
	无	63	39(61.90)			52(82.54)		
肿瘤大小(cm)	≥2	42	31(73.81)	4.642	0.031	36(85.71)	0.288	0.591
	<2	43	22(51.16)			35(81.40)		
TNM 分期	I 期	19	9(47.37)	2.932	0.402	15(78.95)	0.552	0.907
	II	36	23(63.89)			30(83.33)		
	III	21	14(66.67)			18(85.71)		
	IV	9	7(77.78)			8(88.89)		
分化程度	低分化	18	14(77.78)	3.702	0.157	17(94.44)	2.769	0.250
	中分化	22	15(68.18)			19(86.36)		
	高分化	45	24(53.33)			35(77.78)		
淋巴结转移	有	31	22(70.97)	1.543	0.214	30(96.77)	6.222	0.013
	无	54	31(57.41)			41(75.92)		

3 讨论

CTCs 是外周血中的各类肿瘤细胞的总称,这些细胞大多是原发肿瘤部位、复发或转移病灶脱落从而进入血液循环,具有与肿瘤特异性相关的抗原蛋白质和遗传变异表达^[10]。cfDNA 是外周血游离的 DNA 总称,常以蛋白复合体形式存在,包括肿瘤来源的 DNA 和正常细胞来源的 DNA。由于癌症患者血浆中核酸酶活性降低,cfDNA 的清除率降低,导致癌症患者 cfDNA 浓度高于健康者^[11]。故检测 cfDNA 水平可实时监测癌组织情况。张潇分等^[12]研究指出,CTCs 和 cfDNA 可能是乳腺癌辅助诊断的潜在生物学标志。本研究结果提示 CTCs、cfDNA 在乳腺癌的诊断中均具有较高价值,与上述文献结果基本相符。但考虑 CTCs 和 cfDNA 的检测方法和阳性标准不同,后续还需要加大样本量进行验证。CA125、CA153 及 CEA 是常用的乳腺癌诊断血清标志物,上述指标对于乳腺癌均有较高的敏感性,但特异性较差^[13]。本研究将联合检测中任一指标阳性指定为阳性结果进一步说明血 CTCs、cfDNA 联合检测对于乳腺癌的

早期诊断有较高的应用价值。在本研究中,比较 3 种不同检查方法单独或联合及部分联合的诊断价值,在国内外相关报道较少。

乳腺癌的临床治疗主要依据患者临床病理特征,因此,分析乳腺癌的临床病理特征与 CTCs、cfDNA 的关系也是十分必要的。既往研究显示,CTCs 阳性与乳腺癌的临床分期、肿瘤大小、淋巴结状态及相关抗体表达有关^[13]。而血 cfDNA 检测作为一种液体活检,可动态评估乳腺癌患者临床疗效及预后^[14]。本研究结果提示肿瘤直径越大,肿瘤细胞脱落进入血液循环的可能性更大;有淋巴结转移者 cfDNA 阳性率高,可能是肿瘤细胞活跃增殖时释放更多 DNA 进入血循环。但本研究中其他临床病理特征与 CTCs、cfDNA 水平无明显相关性,后续将纳入更多研究对象深入分析其相关性。另外,术后随访结果显示,疾病进展患者 CTCs、cfDNA 阳性率要高于无疾病进展组,与文献报道血 CTCs、cfDNA 可评估乳腺癌患者预后的结果相符^[15-16]。

综上所述,血 CTCs、cfDNA 检测对于乳腺癌有较高的诊断价值,且与患者临床病理特征及预后密切相关,可为乳腺癌患者的早期诊断和个体

化治疗提供可靠依据。但目前血 CTCs、cfDNA 诊断乳腺癌患者的截断值尚未有确切定义,还需要不断优化检测技术和数据分析方法,提高其临床利用率。

参考文献

- [1] Salatino M, Girotti MR, Rabinovich GA. Glycans pave the way for immunotherapy in triple-negative breast cancer [J]. *Cancer Cell*, 2018, 33(2):155-157.
 - [2] Desantis C, Ma J, Bryan L, et al. Breast cancer statistics, 2013[J]. *CA Cancer J Clin*, 2014, 64(1):52-62.
 - [3] 任玉琳, 贾勇圣, 佟仲生. 乳腺癌化学预防的研究进展 [J]. *肿瘤*, 2018, 38(6):617-622.
 - [4] Jafari SH, Saadatpour Z, Salmaninejad A, et al. Breast cancer diagnosis: Imaging techniques and biochemical markers [J]. *J Cell Physiol*, 2017, 233(7):5200-5213.
 - [5] Sturgeon CM, Duffy MJ, Stenman UH, et al. National Academy of Clinical Biochemistry laboratory medicine practice guidelines for use of tumor markers in testicular, prostate, colorectal, breast, and ovarian cancers[J]. *Clin Chem*, 2008, 54(11):1935-1939.
 - [6] 梁志洪, 陈结贞, 陈永雪, 等. 循环肿瘤细胞(CTC)在乳腺癌预后与化疗评估中的应用[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2019, 11(3):209-213.
 - [7] Tan Y, Wu H. The significant prognostic value of circulating tumor cells in colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis[J]. *Curr Probl Cancer*, 2018, 42(1):95-106.
 - [8] Azad AA, Volik SV, Wyatt AW, et al. Androgen receptor gene aberrations in circulating cell-free DNA: biomarkers of therapeutic resistance in castration-resistant prostate cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21(10):2315-2324.
 - [9] 曹诗林, 韩凤琼, 宁丽洁, 等. 血清相关肿瘤标志物检测联合钼靶 CR 摄影及高频超声成像在临床触诊阴性乳腺癌诊断中的应用[J]. *实用医学杂志*, 2015, 31(4):577-579.
 - [10] Pantel K, Alix-Panabières C. Functional studies on viable circulating tumor cells[J]. *Clin Chem*, 2016, 62(2):328-334.
 - [11] Jiang P, Lo YMD. The long and short of circulating cell-free DNA and the Ins and outs of molecular diagnostics [J]. *Trends Genet*, 2016, 32(6):360-371.
 - [12] 张潇分, 贾春平, 陈宏梅, 等. 外周血循环肿瘤细胞和游离 DNA 联合检测在乳腺癌辅助诊断中的临床价值[J]. *中华检验医学杂志*, 2019, 42(8):662-668.
 - [13] 李因, 范洋, 于江媛, 等. 18F-FDG PET/CT 在原发性乳腺癌治疗后随访期间血清 CEA 和(或)CA153 升高患者中的应用[J]. *肿瘤防治研究*, 2016, 43(6):521-525.
 - [14] 李艳, 陶苏玉, 崔彩霞, 等. 外周静脉血循环肿瘤细胞在 IV 期乳腺癌寡转移与广泛转移中检测的临床价值[J]. *实用医学杂志*, 2017, 33(16):2764-2768.
 - [15] Agassi R, Czeiger D, Shaked G, et al. Measurement of circulating cell-free DNA levels by a simple fluorescent test in patients with breast cancer [J]. *Am J Clin Pathol*, 2015, 143(1):18-24.
 - [15] Khatami F, Aghayan HR, Sanaei M, et al. The potential of circulating tumor cells in personalized management of breast cancer: A systematic review [J]. *Acta Med Iran*, 2017, 55(3):175-193.
 - [16] Yang J, Cheng L, Zhang J, et al. Predictive value of circulating cell-free DNA in the survival of breast cancer patients: A systemic review and meta-analysis [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2018, 97(28):e11417.
-
- (上接第 1297 页)
- [7] Ylikallio E, Kim D, Isohanni P, et al. Dominant transmission of de novo KIF1A motor domain variant underlying pure spastic paraplegia [J]. *Eur J Hum Genet*, 2015, (23):1427-1430.
 - [8] Citterio, A. et al. Variants in KIF1A gene in dominant and sporadic forms of hereditary spastic paraparesis [J]. *J Neurol*, 2015, (262):2684-2690.
 - [9] Shin H, Wyszynski M, Huh KH, et al. Association of the kinesin motor KIF1A with the multimodular protein liprin-alpha [J]. *J Biol Chem*, 2003, (278):11393-11401.
 - [10] Hirokawa N, Noda Y, Tanaka Y, et al. Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, 10(10):682-696.
 - [11] Okada Y, Yamazaki H, Sekine-Aizawa Y, et al. The neuron-specific kinesin superfamily protein KIF1A is a unique monomeric motor for anterograde axonal transport of synaptic vesicle precursors [J]. *Cell*, 1995, 81(5):769-780.
 - [12] Kikkawa M, Okada Y, Hirokawa N. A resolution model of the monomeric kinesin motor, KIF1A [J]. *Cell*, 2000, 100(2):241-252.
 - [13] Chiba K, Takahashi H, Chen M, et al. Disease-associated mutations hyperactivate KIF1A motility and anterograde axonal transport of synaptic vesicle precursors [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116(37):18429-18434.
 - [14] Hamdan FF, Gauthier J, Araki Y. et al. Excess of de novo deleterious mutations in genes associated with glutamatergic systems in nonsyndromic intellectual disability [J]. *Am Society Human Genetics*, 2011, (3):306-316.
 - [15] Lee JR, Shin H, Choi J, et al. An intramolecular interaction between the FHA domain and a coiled coil negatively regulates the kinesin motor KIF1A [J]. *EMBO J*, 2004, (23):1506-1515.

子痫前期患者血清 VEGF、IL-18、MCP-1 水平及与血液流变学指标关系

王娜^{1*} 王英² 万里新³ 吴佩蔚⁴ 兰岚¹ 姚利¹ 张小环¹ 李松⁵

[摘要] 目的 分析子痫前期(PE)患者血清 VEGF、IL-18、MCP-1 水平及与血液流变学指标关系。方法 分析本院于2017年2月至2020年2月临床确诊的118例PE患者临床资料,根据其病情分为PE轻度组63例、PE重度组55例。同时选取60例同时时间段进行检查的正常妊娠孕妇作为对照组,观察3组人群血清 VEGF、IL-18、MCP-1 水平及血液流变学指标水平,分析其相关性。结果 PE重度组患者血清血管内皮生长因子(VEGF)、白细胞介素18(IL-18)、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)水平明显高于PE轻度组及对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$);PE重度组患者花生四烯酸诱导的血小板最大聚集率(AA)、红细胞压积(HCT)、D-二聚体(D-D)水平显著高于PE轻度组及对照组,AA、HCT、D-D随病情严重程度增加而升高,差异具有统计学意义($P<0.05$);相关性分析显示 AA、HCT、D-D、VEGF、IL-18、MCP-1 之间均为正相关($P<0.05$)。结论 子痫前期患者随着病情进展,血清 VEGF、IL-18、MCP-1 水平上升,VEGF、IL-18、MCP-1 与血液流变学指标为正相关性,可作为子痫前期患者病情判断的预测指标。

[关键词] 子痫前期;血液流变学指标;单核细胞趋化蛋白-1;血管内皮生长因子;白细胞介素18

Serum VEGF, IL-18, MCP-1 levels of patients with preeclampsia and their relationship with hemorheology indicators

WANG Na^{1*}, WANG Ying², WAN Lixin³, WU Peiwei⁴, LAN Lan¹, YAO Li¹, ZHANG Xiaohuan¹, LI Song⁵
(1. Department of Obstetrics, Nanyang Central Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Nanyang, Henan, China, 473000; 2. Department of Gynecology, Nanyang Central Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Nanyang, Henan, China, 473000; 3. Department of Oncology, Nanyang Central Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Nanyang, Henan, China, 473000; 4. Department of Reproductive Medicine, Nanyang Central Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Nanyang, Henan, China, 473000; 5. Department of Gynecology, Nanyang Central Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Nanyang, Henan, China, 473000)

[ABSTRACT] Objective To analyze the serum VEGF, IL-18, and MCP-1 levels of patients with preeclampsia (PE) and their relationship with hemorheology indicators. Methods The clinical data of 118 patients with preeclampsia who were diagnosed in this hospital from February 2017 to February 2020 were retrospectively analyzed. According to their condition, patients were divided into the mild PE group, 63 cases, and the severe PE group, 55 cases. At the same time, 60 normal pregnant women who were examined were selected as the control group. The levels of serum VEGF, IL-18, MCP-1 and hemorheology indicators

基金项目:河南省医学科技攻关计划项目(192102310368)

作者单位:1. 郑州大学附属南阳市中心医院产二科,河南,南阳 473000

2. 郑州大学附属南阳市中心医院妇三科 河南 南阳 473000

3. 郑州大学附属南阳市中心医院肿瘤科,河南,南阳 473000

4. 郑州大学附属南阳市中心医院生殖医学科,河南,南阳 473000

5. 郑州大学附属南阳市中心医院妇二科,河南,南阳 473000

*通信作者:王娜, E-mail: uvax19717@sina.cn

were observed in the three groups, and their correlation was analyzed. **Results** Serum vascular endothelial growth factor (VEGF), interleukin 18 (IL-18), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) levels of patients in the severe PE group were significantly higher than those in the mild PE group and the control group ($P<0.05$). The levels of arachidonic acid-induced maximum platelet aggregation rate (AA), hematocrit (HCT), and D-dimer (DD) of patients in the severe PE group were significantly higher than those in the mild PE group and the control group. The levels of AA, HCT and D-D increased with the severity of the disease, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). Correlation analysis showed that AA, HCT, D-D, VEGF, IL-18 and MCP-1 were all positively correlated ($P<0.05$). **Conclusion** As the disease progresses in patients with preeclampsia, serum VEGF, IL-18, MCP-1 levels increase. VEGF, IL-18, MCP-1 and hemorheological indicators are positively correlated, which can be used to judge the condition of patients with preeclampsia Predictive indicators.

[KEY WORDS] Pre-eclampsia; Hemorheology indicators; Monocyte chemoattractant protein-1; Vascular endothelial growth factor; Interleukin 18

妊娠期高血压是妊娠期特有疾病,在国外发病率为8%~13%,而在我国发病率为9.5%~10.5%^[1]。该疾病严重影响母婴健康,是孕产妇和围生儿发病率及死亡率的主要原因。子痫前期(pre-eclampsia, PE)是产科常见疾病之一,以孕期出血高血压、尿蛋白为主要特征,伴随全身血流动力学的变化。PE可分为轻度PE和重度PE,如轻度PE不及时治疗,可发展为重度PE,造成胎儿受限、脑血管意外、凝血功能障碍及末梢器官受累等一系列严重后果,可直接危及孕妇、胎儿生命危险^[2]。目前临床对于PE发病机制尚未明确,但作为检测胎儿安危的血液流变学指标越来越受到临床重视。相关文献显示,PE的发病机制与分子免疫及血液流变学指标存在一定联系^[3]。PE患者发病过程中,血管壁存在炎症反应,白细胞介素18(interleukin 18, IL-18)作为重要炎性细胞因子可反映炎症危重程度^[4]。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是目前临床上公认反应血管损伤较好的指标,其水平变化对PE患者的疾病进展具有重要意义。而单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)是现阶段临床新发现的产科危险因素,可对多种细胞具有强烈趋化作用^[5]。因此,本研究将分析PE患者患者血清VEGF、IL-18、MCP-1水平及与血液流变学指标关系,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2017年2月至2020年2月本院收治的118例子痫前期患者,根据患者严重程度分为PE

轻度组($n=63$)及PE重度组($n=55$)。其中,轻度PE的诊断标准为:孕20周后出现血压 $\geq 140/90$ mmHg、尿蛋白 ≥ 300 mg/24 h或阳性,同时还伴有上腹部不适、头疼等症状;重度PE的诊断标准为:孕20周后出现血压 $\geq 160/110$ mmHg、尿蛋白 $\geq 2.0/24$ h或强阳性、血肌酐升高、血小板减少等症状^[6]。另选60例同时间段进行检查的正常妊娠孕妇作为对照组。各组一般资料比较差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性,见表1。

表1 3组患者一般资料情况比较($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Comparison of general information of 3 groups of patients ($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	年龄(岁)	孕周(周)	BMI(kg/m ²)
PE轻度组	63	27.19 \pm 5.32	34.15 \pm 3.79	24.22 \pm 3.17
PE重度组	55	27.56 \pm 5.47	34.75 \pm 3.42	24.51 \pm 3.03
对照组	60	27.89 \pm 5.75	34.52 \pm 3.73	24.14 \pm 3.19
<i>F</i> 值	-	0.25	0.41	0.22
<i>P</i> 值	-	0.780	0.666	0.803

纳入标准:①所有患者符合《中国实用妇科与产科杂志》^[6]的诊断标准,确诊为PE;②所有患者均为单胎妊娠;③所有患者无吸烟、饮酒等不良嗜好。④所有患者及家属均已签署知情同意书;排除标准:①存在严重心、肝、肾功能不全患者或合并其他恶性肿瘤、严重并发症患者;②存在代谢紊乱或血液、免疫系统疾病患者;③存在意识障碍或精神疾病无法配合者;④临床资料不完整患者。

1.2 方法

1.2.1 VEGF、IL-18、MCP-1水平检测

所有研究对象均在清晨空腹静脉抽血5 mL,予以离心处理5 min后(转速3 500 rpm/min),留取

上层血清,放置于零下80℃恒温箱中冷藏待检。使用酶联免疫吸附法检测血清中VEGF、IL-18、MCP-1,试剂由红苏州艾莱萨生物科技有限公司提供,整个过程严格按照试剂配套说明书进行,由专业人员操作。

1.2.2 血液流变学指标检测

检测指标包括花生四烯酸诱导的血小板最大聚集率(arachidonic acid, AA)、红细胞压积(hematocrit, HCT)、D-二聚体(D-Dimer, D-D)。其中,AA予以比浊法检测,仪器为美国Sigma公司的SC-2000型号4通道血小板聚集仪;HCT采用北京赛科希德科德科技发展有限公司提供的Vintrobe压积管测定红细胞沉降率,以3 000 r/min离心30 min,记录红细胞压积值;D-D予以免疫比浊法检测,仪器为深圳市国赛生物技术有限公司的Neth-star蛋白分析仪。

1.3 观察指标

对比各组受试者血清VEGF、IL-18、MCP-1水平表达情况以及血液流变学指标,分析血清VEGF、IL-18、MCP-1水平与血液流变学指标相关性。

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,多组间比较采用F检验;计数资料用n(%)表示,并采用 χ^2 检验;相关性分析运用Spearman相关进行分析。以P<0.05为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 3组血清VEGF、IL-18、MCP-1水平表达情况

3组血清VEGF、IL-18、MCP-1水平比较:PE重度组>PE轻度组>对照组,差异有统计学意义(P<0.05)。见表2。

2.2 不同人群血液流变学指标情况

3组人群AA(%),HCT(%),D-D($\mu\text{g/mL}$)水

平比较:PE重度组>PE轻度组>对照组,差异有统计学意义(P<0.05)。见表3。

表2 3组血清VEGF、IL-18、MCP-1水平表达情况($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Expression of serum VEGF, IL-18 and MCP-1 in the 3 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	VEGF(ng/L)	IL-18(pg/ml)	MCP-1(pg/mL)
PE轻度组	63	126.45±29.41	167.16±20.75	267.05±37.56
PE重度组	55	162.05±50.24	194.05±17.42	422.04±53.01
对照组	60	39.16±8.41	103.15±27.01	140.26±20.46
F值		210.28	258.33	756.28
P值		0.000	0.000	0.000

表3 不同人群血液流变学指标($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Hemorheology indexes of different population($\bar{x} \pm s$)

组别	n	AA(%)	HCT(%)	D-D($\mu\text{g/mL}$)
PE轻度组	63	57.06±7.05	0.35±0.03	1.21±0.26
PE重度组	55	73.47±8.48	0.38±0.05	1.98±0.21
对照组	60	30.81±6.01	0.30±0.01	0.53±0.11
F值		515.76	84.19	724.59
P值		0.000	0.000	0.000

2.3 分析PE患者VEGF、IL-18、MCP-1水平及与血液流变学指标相关性

相关性分析显示AA、HCT、D-D、VEGF、IL-18、MCP-1之间均为正相关(P<0.05),见表4。

3 讨论

据不完全统计,子痫的发生率为1/200,我国每年因子痫死亡人数约5万人^[7]。PE作为子痫严重并发症之一,也是导致孕产妇及围产儿死亡的主要原因之一^[8]。PE常合并肾功能损坏及眼底病变,易发生脑溢血,患者在发病前常有头痛、眩晕、视力障碍、运动或感觉障碍等前驱症状^[9]。一旦发生脑溢血则在症状加剧后迅速转入昏迷,出现呼吸深沉、血压升高、对光反射消失及偏瘫等神经功能障碍及病理反射,严重危害患者生命安危^[10]。

表4 PE患者VEGF、IL-18、MCP-1水平及与血液流变学指标相关性

Table 4 Levels of VEGF, IL-18 and MCP-1 in PE patients and their correlation with hemorheology indexes

项目	AA(%)		HCT(%)		D-D($\mu\text{g/mL}$)		VEGF(ng/L)		IL-18(pg/mL)		MCP-1(pg/mL)	
	r值	P值	r值	P值	r值	P值	r值	P值	r值	P值	r值	P值
AA(%)	-	-	0.571	0.001	0.331	0.033	0.495	0.003	0.943	0.000	0.834	0.002
HCT(%)	0.571	0.001	-	-	0.915	<0.001	0.413	0.005	0.392	0.003	0.765	0.001
D-D($\mu\text{g/mL}$)	0.331	0.033	0.915	<0.001	-	-	0.516	0.002	0.467	0.005	0.912	0.000
VEGF(ng/L)	0.495	0.003	0.413	0.005	0.516	0.002	-	-	0.685	0.007	0.864	0.002
IL-18(pg/mL)	0.645	0.012	0.513	0.002	0.439	0.003	0.510	0.002	-	-	0.739	0.001
MCP-1(pg/mL)	0.761	0.001	0.812	0.000	0.561	0.001	0.903	0.000	0.812	0.002	-	-

相关研究表明,正常胎儿胎盘血管建立与孕早期血管生成及抗血管生成紧密相关;而PE患者由于胎盘内血管重铸,导致胎盘功能不良,引起肾小球血管内皮受损,内皮细胞间隙增大^[11]。VEGF是由内管内皮细胞分泌,在正常状态下呈低表达或无表达状态,是目前临床上公认反应血管损伤较好的指标。相关研究显示卵巢癌及乳腺癌等多种疾病中VEGF表达升高^[12]。近年来研究发现IL-18参与妊娠发生发展过程,在早期时可影响胎盘生成,而在中晚期妊娠阶段不同表达情况可影响妊娠结果,如流产、早产及其他产科合并症等^[13]。相关国外研究在妊娠并发症调查分析中显示,在复发性流产、急性脂肪肝、胎儿宫内发育迟缓等情况时IL-18较正常妊娠时水平显著上升,提出了妊娠早期母体血清IL-18水平表达可作为预测妊娠结局的观点^[14]。相关研究发现早产孕妇IL-18水平较足月孕妇浓度高^[15]。陈自力^[16]研究发现PE患者血清及胎盘组织中IL-18水平显著升高,且认为轻度PE与重度PE之间比较具有明显差异。这与本研究结果一致。在本研究结果说明炎症参与PE疾病进展过程,其水平表达具有重要作用。

PE其病理发生机制一方面与血管通透性升高,血液粘稠,使红细胞压积上升有关,另一方面与血小板活性提升,引起聚集,激活Ⅻ因子释放大量血小板因子使凝血加速有关^[17]。相关文献显示,PE患者血液浓度高,胎盘血管、脐动脉收缩因子增加,舒张因子减少,导致胎儿脐动脉血流阻力增高^[18]。本研究结果进一步说明血液流变学指标上升可促进PE患者病情加剧,其指标变化对病情严重程度具有重要意义。同时,本研究结果提示VEGF、IL-18、MCP-1与血液流变学指标可作为PE患者病情严重程度的重要参考依据。

综上所述,子痫前期患者随着病情进展,血清VEGF、IL-18、MCP-1水平上升,VEGF、IL-18、MCP-1与血液流变学指标为正相关性,可作为子痫前期患者病情判断的预测指标。

参考文献

[1] 蒋雪霞,尹道英,李晓玲,等.血清VEGF、ES水平与多囊卵巢综合征患者卵巢间质血流的关系[J].中国医药导报,2019,39(15):196-198.
[2] 邵芳.新疆哈萨克族和维吾尔族早发型子痫前期孕妇发病特点及其高危因素[J].中国优生与遗传杂志,2019,24(6):711-713.

[3] 刘筠,李萍,张敏.子痫前期患者血清STOX1、sFlt-1与病情及妊娠结局的关系[J].中国现代医学杂志,2019,29(20):246-247.
[4] 刘晓雨,贾国伟,孙荣国,等.高血压合并心功能不全对患者CyP、GDF-15、IL-18水平影响研究[J].分子诊断与治疗杂志,2020,12(5):592-595+620.
[5] 潘凤娟,唐桂娥,陶彩霞.子痫前期孕妇血清VEGF Flt-1 PLGF PAPP-A水平变化及诊断价值[J].安徽医学,2019,40(9):198-199.
[6] 彭婷,李笑天.子痫前期患者合并心脏功能不全防治[J].中国实用妇科与产科杂志,2019,35(11):1213-1217.
[7] 林捷,黄辉,杨晓英,等.辛伐他汀对高血压合并血脂异常患者血清炎症状态、血小板活化功能和血液流变学的影响[J].中华高血压杂志,2019,27(2):134-136.
[8] 张云聪,杨静,杨硕,等.健康妊娠与子痫前期患者循环微粒体携带蛋白差异分析[J].中华检验医学杂志,2019,42(4):255-261.
[9] Premru-Srsen T, Kocic Z, Fabjan Vodusek V, et al. Total gestational weight gain and the risk of preeclampsia by pre-pregnancy body mass index categories: a population-based cohort study from 2013 to 2017 [J]. J Perinat Med, 2019, 47(6):585-591.
[10] 戎国栋,赵鸿,吴蕾,等.全自动核酸提取检测仪选择和评价方案的建立和应用[J].分子诊断与治疗杂志,2019,31(3):106-107.
[11] 王江鹏,李锋同.营养支持联合奥美拉唑三联疗法对消化性溃疡患儿血清IL-18、IFN- γ 、TNF- α 水平及Treg/Th17免疫平衡的影响[J].临床误诊误治,2019,34(6):137-138.
[12] 周栩茹,谢玲玲,许宏宇,等.血清热休克蛋白70、细胞因子信号转导负调控因子3与妊娠期高血压患者免疫因子的关系及其预测价值分析[J].中国综合临床,2019,35(1):63-68.
[13] 杜文琼,赵枫,郭玲玲,等.子痫前期风险评估模型建立与验证[J].中华疾病控制杂志,2019,23(8):981-986.
[14] Bommarito PA, Kim SS, Meeker JD, et al. Urinary trace metals, maternal circulating angiogenic biomarkers, and preeclampsia: a single-contaminant and mixture-based approach [J]. Environ Health, 2019, 18(1):63.
[15] 杨天丽,喻玲,胡芸,等.哺乳动物雷帕霉素靶蛋白、核转录因子- κ B、固醇调节元件结合蛋白2在子痫前期患者中的表达及意义[J].中华围产医学杂志,2019,22(3):186-193.
[16] 陈自力,杨莉莉,杨孜,等.发病前重度子痫前期患者临床预警因素分析[J].中华医学杂志,2019,99(31):2459-2462.
[17] 胡彦,李岚,黄文珍,等.低分子肝素联合硫酸镁治疗对PE患者血清中sFlt-1、25-羟基维生素D、D-D、vWF水平的影响[J].中国妇产科临床杂志,2019,19(3):211-213.
[18] 范卓然,顾艳,华绍芳.P27基因参与子痫前期发生机制的研究进展[J].国际妇产科学杂志,2019,46(5):490-493.

慢性乙型肝炎患者外周血中 sFGL2 检测的临床意义

洪晓绿¹ 潘小平^{2*} 徐沛演¹ 黄小华¹

[摘要] 目的 评价慢性乙型肝炎(CHB)患者外周血中可溶性纤维介素蛋白2(sFGL2)检测的临床意义。方法 选取在本院就诊的140例CHB患者作为乙型肝炎病毒感染观察组(CHB组),其中25例CHB患者行抗病毒治疗(抗病毒治疗组);选取同期丙型肝炎患者42例作为丙型肝炎病毒感染观察组(CHC组);选取同期体检健康人群68例(对照组)。酶联免疫吸附试验检测各组血浆sFGL2浓度,实时定量聚合酶链式反应检测各组外周血中sFGL2 mRNA表达,比较它们在各组间的差异;Spearman分析它们与CHB各临床指标的相关性。抗病毒治疗组在抗病毒治疗3月后再次检测血浆sFGL2浓度和外周血中sFGL2 mRNA表达,比较它们抗病毒治疗前后的差异。结果 CHB组sFGL2浓度和sFGL2 mRNA表达均高于CHC组和对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$),而CHC组和对照组sFGL2浓度和sFGL2 mRNA表达比较差异无统计意义($P>0.05$)。Spearman相关性分析显示,sFGL2浓度和sFGL2 mRNA表达与HBV-DNA、ALT、AST呈正相关($P<0.05$),与GGT、T-Bil、AFP无相关性($P>0.05$)。抗病毒治疗后sFGL2浓度和sFGL2 mRNA表达较抗病毒前均显著下降,差异具有统计学意义($P<0.05$)。结论 CHB患者sFGL2显著升高,它与HBV-DNA载量、ALT、AST异常密切相关,抗病毒治疗后sFGL2显著下降。

[关键词] 可溶性纤维介素蛋白2;慢性乙型肝炎;酶联免疫吸附试验;实时定量聚合酶链式反应

The clinical significance of detection of sFGL2 in peripheral blood of patients with chronic hepatitis B

HONG Xiaolv¹, PAN Xiaoping^{2*}, XU Peiyan¹, HUANG Xiaohua¹

(1. Department of Infection Diseases, Huadu District People's Hospital, Guangzhou, Guangdong, China, 510800; 2. Department of Clinical Laboratory, Huadu District People's Hospital, Guangzhou, Guangdong, China, 510800)

[ABSTRACT] Objective To evaluate the clinical value of soluble fibrinogen-like protein 2 (sFGL2) in peripheral blood of patients with chronic hepatitis B (CHB). Methods Enzyme-linked immunosorbent assay and real-time fluorescent quantitative PCR were detected the levels of plasma sFGL2 and sFGL2 mRNA in peripheral blood of 140 CHB patients (CHB group), in which 25 cases were treated with antiviral drugs (antiviral group), 42 HCV patients (CHC group) and 48 healthy cases (control group), comparing the differences among those groups; Spearman correlation was analyzed between sFGL2 level and clinical indexes in CHB patients; estimating the differences in the levels of plasma sFGL2 and sFGL2 mRNA before and after antiviral treatment in antiviral group of 25 cases. Results The levels of plasma sFGL2 and sFGL2 mRNA in the CHB group were higher than those in the CHC group and the control group, the difference were statistically significant ($P<0.05$), no statistical difference between the CHC group and the control group in plasma sFGL2 and sFGL2 mRNA ($P>0.05$). Spearman correlation analysis showed that sFGL2 concentration and sFGL2 mRNA expression were positively correlated with HBV-DNA, ALT and AST ($P<0.05$), but not correlated with GGT, T-Bil, and AFP ($P>0.05$). The concentration of sFGL2 and the expression of sFGL2

作者单位:1. 广州市花都区人民医院感染性疾病科, 广东, 广州 510800

2. 广州市花都区人民医院医学检验科, 广东, 广州 510800

*通信作者:潘小平, E-mail: ppxpw@163.com

mRNA after antiviral treatment were significantly lower than before antiviral treatment, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** sFGL2 is significantly increased in CHB patients, which is closely related to the abnormalities of HBV-DNA load, ALT and AST, and sFGL2 is significantly decreased after antiviral treatment.

[KEY WORDS] Soluble fibrinogen-like protein 2; Chronic hepatitis B; ELISA; qRT-PCR

可溶性纤维介素蛋白2(soluble fibrinogen like protein 2, sFGL2)属纤维蛋白原相关超家族,与纤维蛋白原 β 链和 γ 链同源,其基因定位于7q11.23,全长约7 kb,含2个外显子,1个内含子^[1]。sFGL2主要是由T淋巴细胞分泌,作为免疫抑制因子,它可抑制T淋巴细胞和树突状细胞活性,介导B淋巴细胞凋亡^[2]。国内外已有研究表明,sFGL2与胰腺炎^[3]、冠心病^[4]、肾细胞癌^[5]等疾病相关。近年来,sFGL2在病毒性肝炎发病机制中的作用越来越受到重视,但大多研究主要以病理组织为主^[6-7],鉴于此,本文将分析sFGL2表达变化及临床意义,并与临床相关指标进行相关性分析,旨在探讨其预测CHB患者临床转归和预后的价值;同时深入研究sFGL2在CHB患者抗病毒治疗前后表达变化,分析它成为CHB患者抗病毒治疗监测指标的可行性。

1 资料与方法

1.1 一般资料

随机选取2019年8月1日~2020年1月22日在本院就诊的CHB患者140例作为乙型肝炎病毒感染观察组(CHB组),男性86例,女性54例,平均年龄(38.96 ± 12.07)岁。其中25例CHB患者依据临床诊断需进行抗病毒治疗(抗病毒治疗组),男性16例,女性9例,平均年龄(40.65 ± 13.41)。选取同期丙型肝炎患者42例作为丙型肝炎病毒感染观察组(CHC组),男性35例,女性7例,平均年龄(40.95 ± 6.24)岁。另外选取同期体检健康人群68例作为对照组,男性26例,女性42例,平均年龄(36.71 ± 12.85)。各组间年龄比较差异无统计学意义($F = 2.492, P = 0.116$),具有可比性。

纳入标准分别符合中华医学会感染病学分会和中华医学会肝病学会制定的慢性乙型肝炎防治指南(2019年版)^[8]或慢性乙型肝炎防治指南(2019年版)^[9]的诊断标准。排除标准:①乙肝及丙肝重叠感染者;②合并其他慢性肝病者;③合并肝恶性肿瘤或其他脏器恶性肿瘤者;④其他重要脏器功能不全。健康体检志愿者未携带肝炎病

毒。患者参与前均签署知情同意书,本研究经本院伦理委员会审核批准。

1.2 方法

1.2.1 标本采集及处理

所有受试者清晨空腹采集静脉血5 mL置于乙二胺四乙酸二钠抗凝管中,抗病毒治疗患者于抗病毒治疗3个月后清晨空腹另采集静脉血5 mL置于乙二胺四乙酸二钠抗凝管中。采血后30 min内取全血1.5 mL置于离心管中,按照人外周血淋巴细胞分离液(碧云天生物技术,上海)说明书,提取并纯化外周血单个核细胞, -80°C 保存;剩余全血1 500 rpm离心20 min,分离血浆, -80°C 保存。

1.2.2 酶联免疫吸附试验检测血浆sFGL2浓度

按照人可溶性纤维介素蛋白2(sFGL2)试剂盒(科易达生物科技有限公司,广州)说明书检测所有受试者血浆中sFGL2浓度,CHB组血浆同时送本院医学检验科检测HBV-DNA、谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)、谷氨酰转肽酶(γ -glutamyl transferase, GGT)、总胆红素(total bilirubin, T-Bil)和甲胎蛋白(alpha fetoprotein, AFP)。

1.2.3 实时定量聚合酶链式反应检测sFGL2 mRNA表达

Trizol (Invitrogen, 美国)提取外周血单个核细胞总RNA后,反转录为cDNA。以cDNA为模板,用特异性引物(sFGL2-F: AGGCAGAAACGGACT-GTTGT, sFGL2-R: CCAGGCGACCATGAAGTACA)进行扩增,以GAPGH(GAPGH-F: TGCCACACCAACTGCTTAGC, GAPGH-R: GGCATG-GACTGTGGTCATGAG)为内参。体系如下:SYBRTMPremix 10 μL ; Forward primer(10 pmol/ μL) 2 μL ; Reverse primer(10 pmol/ μL) 2 μL ; cDNA 3 μL ; H₂O 8 μL 。95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性2 min,然后按照以下条件执行40个循环:95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 45 s。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算其相对表达量,其中 $\Delta\text{CT} = \text{CT}_{\text{目的基因}} - \text{CT}_{\text{内参基因}}$, $\Delta\Delta\text{CT} = \Delta\text{CT} - \Delta\text{CT}_{\text{对照组最大值}}$,每样品重复3次,取平均Ct值。

1.3 统计学方法

运用 SPSS 13.0 软件进行数据分析, 计量资料采用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 两组间比较采用 *t* 检验, 多组间比较 *F* 检验, 相关性分析采用 Pearson 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3组间血浆 sFGL2 浓度和 sFGL2 mRNA 表达比较

3组血浆 sFGL2 浓度和 sFGL2 mRNA 表达水平比较: CHB 组 > CHC 组 > 对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 3组间血浆 sFGL2 和 sFGL2 mRNA 表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	sFGL2 浓度 (ng/mL)	sFGL2 mRNA
CHB 组	93.59±38.96	63.44±38.96
CHC 组	26.08±5.14	12.09±6.70
对照组	16.68±3.39	8.24±5.94
<i>F</i> 值	193.449	102.275
<i>P</i> 值	<0.001	<0.001

2.2 血浆 sFGL2 和 sFGL2 mRNA 表达与 CHB 患者各临床指标间的相关性分析

Spearman 分析结果表明, sFGL2 与 HBV-DNA 病毒载量、ALT、AST 呈正相关 ($P < 0.05$), 与 GGT、T-Bil、AFP 无相关 ($P > 0.05$), 见表 2。

表 2 血浆 sFGL2 和 sFGL2 mRNA 表达与 CHB 患者各临床指标间的相关性分析

Table 2 analysing the correlation between plasma sFGL2 and sFGL2 mRNA expression with clinical indexes in CHB patients

临床指标	sFGL2		sFGL2 mRNA	
	<i>r</i> 值	<i>P</i> 值	<i>r</i> 值	<i>P</i> 值
HBV-DNA (LogF)	0.982	<0.001	0.961	<0.001
ALT	0.336	<0.001	0.345	<0.001
AST	0.346	<0.001	0.401	<0.001
GGT	0.149	0.079	0.152	0.068
T-Bil	0.045	0.595	0.055	0.512
AFP	0.005	0.954	0.006	0.911

2.3 抗病毒治疗前后血浆 sFGL2 浓度和 sFGL2 mRNA 表达比较

抗病毒治疗组经 3 个月抗病毒治疗后血浆 sFGL2 浓度和 sFGL2 mRNA 表达较抗病毒治疗前显著下降, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 3。

3 讨论

目前, 乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 造成患者慢性感染的免疫学损伤机制仍不明确, T 淋巴细胞尤其是调节性 T 淋巴细胞 (regulatory T cell, Treg) 在其发生发展进程中起关键作用^[10]。sFGL2 主要由 T 淋巴细胞分泌, 是 Treg 细胞活性功能不可缺少的重要调节因子, 其生物学功能已成为近年来研究的热点^[11], 与肝脏相关疾病的研究也涉及其中, 如 COLAK 等^[12]报道 sFGL2 在非酒精性脂肪肝病中高表达; AI 等^[13]报道 sFGL2 在自身免疫性肝炎患者活动期显著升高, 其升高程度与 AIH 严重程度成正比; YU 等^[14]报道在暴发性肝炎中 sFGL2 可激活补体系统, 参与疾病的发展进程。

sFGL2 在病毒相关持续感染过程中亦具有十分重要的作用。体外实验表明, 重组的 sFGL2 可通过抑制 Tregs 细胞, 使 Th1/Th2 淋巴细胞失衡^[15]。体内研究中, Foerster 等^[16]证实在慢性丙型肝炎外周血中 sFGL2 水平与疾病的分期和预后密切相关, 肝脏炎症反应和纤维化程度越严重, 外周血 sFGL2 水平越高。而本研究结果提示 sFGL2 与病毒性肝炎密切相关。有研究指出 sFGL2 是活化型肝脏星状细胞的效应分子, 参与调控 HBV 相关肝癌患者的 T 淋巴细胞功能, 而 T 淋巴细胞失衡及免疫耐受是导致 HBV 感染后慢性化成为 CHB 的关键性因素之一^[17]。综上推测, sFGL2 可能抑制了机体针对于 HBV 的 T 淋巴细胞活性, 导致机体产生免疫耐受, 从而促进 HBV 的复制和肝病的进一步发展。因此, sFGL2 在 CHB 中的发生发展以及临床分期中的作用值得深入探讨。

陈云茹等^[18]研究血浆 sFGL2 在 HBV-DNA 不同病毒载量间无相关性, sFGL2 水平与 CHB 患者

表 3 抗病毒治疗前后血浆 sFGL2 和 sFGL2 mRNA 表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparing the levels of plasma sFGL2 and sFGL2 mRNA before and after antiviral treatment in 25 CHB cases ($\bar{x} \pm s$)

观察指标	<i>n</i>	抗病毒治疗前	抗病毒治疗后	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
血浆 sFGL2 浓度	25	127.41±24.07	74.40±22.97	48.463	<0.001
sFGL2 mRNA 相对表达量	25	97.26±12.38	25.72±12.52	22.068	<0.001

肝功能密切相关。这些结果表明,sFGL2参与了肝细胞炎症坏死过程,从而影响肝脏合成功能。因此,sFGL2水平有可能成为评估CHB患者疾病严重程度的预测因子,它可作为CHB诊治、病情变化、临床转归的观察指标,宜在临床工作中开展检测。

本研究中CHB患者经抗病毒治疗3月后,sFGL2也显著下降,这与吴盛迪等^[19]研究结果一致,提示sFGL2表达水平与抗病毒治疗疗效密切相关。因此,sFGL2可成为CHB患者抗病毒治疗监测指标。然而本研究仅局限于sFGL2在CHB患者外周血中的表达差异以及分析CHB患者抗病毒前后该指标的变化,未涉及其机制研究,下一步需进行HBV对sFGL2基因的激活功能以及sFGL2抑制Tregs细胞的相关机制研究。

综上所述,sFGL2作为一种免疫调节分子,在CHB的病理生理过程中具有重要的免疫调控作用。它在CHB患者外周血中高度表达,与肝损害临床指标密切相关,可作为CHB诊治、病情变化、临床转归的观察指标。同时,sFGL2在CHB患者抗病毒治疗后显著性下降,它也可作为CHB患者抗病毒治疗疗效的监测指标,宜在临床工作中推广应用。

参考文献

- [1] Liu M, Leibowitz JL, Clark da, et al. Gene transcription of fgl2 in endothelial cells is controlled by Ets-1 and Oet-1 and requires the presenee of both Sp1 and Sp3 [J]. *Eur J Biochem*, 2003, 270(10):2274-2286.
- [2] Liu XG, Liu Y, Chen F. Soluble fibrinogen like protein 2 (sFGL2), the novel effector molecule for immunoregulation [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(2):3711-3723.
- [3] Ye X, Ding J, Chen Y, et al. Adenovirus-mediated artificial miRNA targetting fibrinogen-like protein 2 attenuates the severity of acute pancreatitis in mice [J]. *Biosci Rep*, 2017, 37(6)1-12.
- [4] Li WZ, Yang Y, Liu K, et al. FGL2 prothrombinase contributes to the early stage of coronary microvascular obstruction through a fibrin-dependent pathway [J]. *Int J Cardiol*, 2019, 274(1):27-34.
- [5] Tang M, Cao X, Li P, et al. Increased expression of Fibrinogen-Like Protein 2 is associated with poor prognosis in patients with clear cell renal cell carcinoma [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):12676.
- [6] 李学军,夏凌辉. 重型肝炎患者fgl2凝血酶原酶基因的表达 [J]. *华中科技大学学报(医学版)*, 2003, 32(6):613-615.
- [7] 朱帆,宁琴. 重型乙型肝炎患者肝组织中纤连素基因的检测及其临床转归关系的探讨 [J]. *中华肝脏病杂志*, 2004, 12(7):385-388.
- [8] 中华医学会感染病学分会,中华医学会肝病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南(2019年版) [J]. *临床肝胆病杂志*, 2019, 35(12):2648-2669.
- [9] 中华医学会肝病学分会,中华医学会感染病学分会. 丙型肝炎防治指南(2019年版) [J]. *临床肝胆病杂志*, 2019, 35(12):2670-2686.
- [10] Gehring AJ, Protzer U. Targeting Innate and Adaptive Immune Responses to Cure Chronic HBV Infection [J]. *Gastroenterology*, 2019, 156(2):325-337.
- [11] Chan CW, Kay LS, Khadaroo RG, et al. Soluble fibrinogen like protein 2/fibroleukin exhibits immunosuppressive properties: Suppressing T cell proliferation and inhibiting maturation of bone marrow - derived dendritic cells [J]. *J Immunol*, 2003, 170(8):4036-4044.
- [12] Colak Y, Senates E, Ozturk O, et al. Plasma fibrinogen-like protein 2 levels in patients with non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Hepatogastroenterology*, 2011, 58(112):2087-2090.
- [13] Ai G, Yan W, Yu H, et al. Soluble Fgl2 restricts autoimmune hepatitis progression via suppressing Tc17 and conventional CD8⁺ T cell function [J]. *J Gene Med*, 2018, 20(7-8):e3023.
- [14] Yu H, Liu Y, Wang H, et al. Clara Cell 10 kDa Protein Alleviates Murine Hepatitis Virus Strain 3 - Induced Fulminant Hepatitis by Inhibiting Fibrinogen-Like Protein 2 Expression [J]. *Front Immunol*, 2018, 9(1):2935.
- [15] Luft O, Khattar R, Farrokhi K, et al. Inhibition of the Fibrinogen-Like Protein 2: FcγRIIB/RIII immunosuppressive pathway enhances antiviral T-cell and B-cell responses leading to clearance of lymphocytic choriomeningitis virus clone 13 [J]. *Immunology*, 2018, 154(3):476-489.
- [16] Foerster K, Helmy A, Zhu Y, et al. The novel immunoregulatory molecule FGL2: a potential biomarker for severity of chronic hepatitis C virus infection [J]. *J Hepatol*, 2010, 53(4):608-615.
- [17] Dembek C, Protzer U, Roggendorf M. Overcoming immune tolerance in chronic hepatitis B by therapeutic vaccination [J]. *Curr Opin Virol*, 2018, 30(1):58-67.
- [18] 陈云茹,孙阳阳,邸莹,等. 纤连素2在慢性病毒性肝炎患者中的表达水平及临床意义 [J]. *西安交通大学学报(医学版)*, 2018, 39(6):876-879.
- [19] 吴盛迪,蒋炜,杨橙,等. 免疫调节因子分泌型纤维介素蛋白2在慢性乙型肝炎长期抗病毒治疗中的动态变化 [J]. *中华消化杂志*, 2017, 37(11):750-755.

· 论 著 ·

羊水穿刺在产前筛查无创高风险病例中染色体异常的产前诊断价值

刘慧 方慧琴 陈薇 严雅兰 袁静*

[摘要] **目的** 探讨羊水穿刺在产前筛查无创高风险病例中染色体异常的产前诊断价值。**方法** 选取2017年1月至2019年12月本院收治的105例产前筛查无创高风险病例作为研究对象,给予遗传学咨询,在患者知情同意后,行羊水穿刺-核型分析。以临床随访结果为准,统计羊水穿刺-核型分析检出各类型染色体异常(13-三体综合征、18-三体综合征、21-三体综合征、性染色体异常等)情况及诊断各类型染色体异常的灵敏度、准确度、特异度,采用受试者工作特征曲线(ROC)及ROC下面积(AUC)分析羊水穿刺-核型分析诊断总染色体异常的效能。**结果** 105例产前筛查无创高风险病例,临床随访染色体异常83例,其中包括13-三体综合征9例,18-三体综合征13例,21-三体综合征51例,性染色体异常10例;以临床随访结果为准,羊水穿刺-核型分析诊断13-三体综合征的灵敏度为88.89%,准确度为96.19%,特异度为96.88%;羊水穿刺-核型分析诊断18-三体综合征的灵敏度为92.31%,准确度为99.05%,特异度为100.00%;羊水穿刺-核型分析诊断21-三体综合征的灵敏度为98.04%,准确度为97.14%,特异度为96.30%;羊水穿刺-核型分析诊断性染色体异常的灵敏度为90.00%,准确度为98.10%,特异度为98.95%;羊水穿刺-核型分析诊断总染色体异常的灵敏度为95.18%,特异度为72.73%,准确度为90.48%。**结论** 羊水穿刺对NIPT高风险人群染色体异常具有较高的产前诊断价值,能为优生优育、遗传咨询提供可靠的参考。

[关键词] 羊水穿刺; 无创产前诊断; 高风险; 染色体异常; 灵敏度; 特异度; 准确度

The value of amniocentesis in the prenatal diagnosis of chromosomal abnormalities in non-invasive high-risk cases of prenatal screening

LIU Hui, FANG Huiqin, CHEN Wei, YAN Yalan, YUAN Jing*

(Prenatal Diagnosis Center of Obstetrics and Gynecology, the First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei, Anhui, China, 230022)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the value of amniocentesis in the prenatal diagnosis of chromosomal abnormalities in non-invasive high-risk cases of prenatal screening. **Methods** A total of 105 non-invasive, high-risk cases of prenatal screening admitted to our hospital from January 2017 to December 2019 were selected as the research objects, and genetic counseling was given. After the patient's informed consent, amniocentesis - karyotype analysis was performed. Based on the clinical follow-up results, statistical amniocentesis - karyotype analysis was performed to detect various types of chromosomal abnormalities (13-trisomy syndrome, 18-trisomy syndrome, 21-trisomy syndrome, sex chromosomes, etc.) and the sensitivity, accuracy and specificity of diagnosing various types of chromosomal abnormalities. Receiver operating characteristic curve (ROC) and area under ROC (AUC) were used to analyze the efficacy of amniotic fluid puncture - karyotype analysis for diagnosis of total chromosomal abnormalities. **Results** Among 105 non-invasive high-risk cases of prenatal screening, there were 83 cases of chromosomal abnormalities in clinical

基金项目:2017年度安徽省自然科学基金项目(1708085MH214)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院妇产科产前诊断中心,安徽,合肥230022

*通信作者:袁静, E-mail: yuanjing_ahmu@163.com

follow-up, including 9 cases of 13-trisomy syndrome, 13 cases of 18-trisomy syndrome, 51 cases of 21-trisomy syndrome, and 10 cases of sex chromosome abnormalities. Based on the clinical follow-up results, the sensitivity of amniocentesis-karyotype analysis for 13-trisomy syndrome was 88.89%, the accuracy was 96.19%, and the specificity was 96.88%. Amniotic fluid puncture-karyotype analysis for the diagnosis of 18-trisomy syndrome had a sensitivity of 92.31%, accuracy of 99.05%, and specificity of 100.00%. The sensitivity of amniocentesis-karyotype analysis for diagnosis of 21-trisomy syndrome was 98.04%, accuracy was 97.14%, and specificity was 96.30%. Amniotic fluid puncture-karyotyping analysis had a sensitivity of 90.00%, an accuracy of 98.10%, and a specificity of 98.95%; the sensitivity of amniocentesis-karyotype analysis for diagnosis of total chromosomal abnormalities was 95.18%, specificity was 72.73%, and accuracy was 90.48%. **Conclusion** Amniotic fluid puncture has a high prenatal diagnosis value for chromosomal abnormalities in NIPT high-risk populations, and can provide a reliable reference for eugenics and postnatal care, genetic counseling.

[KEY WORDS] Amniotic fluid puncture; Non-invasive prenatal diagnosis; High risk; Chromosome abnormality; Sensitivity; Specificity; Accuracy

我国每年新出生肉眼可见先天性畸形儿 20 万~30 万,先天性出生缺陷儿总数高达 100 万左右,是出生缺陷的高发国家^[1]。染色体异常是造成新生儿出生缺陷的主要原因之一,可导致智力低下、多发畸形、发育迟缓、生育障碍等,且目前对染色体疾病,尚无有效的治疗手段,患儿娩出后,给家庭、社会带来沉重的心理、经济负担,因此产前筛查与诊断,对控制出生缺陷,提高人口质量意义重大^[2]。近年来随着二代高通量测序技术的迅速发展,无创产前检测技术(Noninvasive prenatal test, NIPT)在临床得到广泛应用,已被证实具有较高的染色体异常检出率和较低的假阳性率,在产前筛查胎儿染色体异常中起到重要作用^[3]。但由于 NIPT 筛查结果受到孕妇自身、胎儿、胎盘等诸多因素的影响,准确率降低,故临床对 NIPT 高风险人群,仍需采用羊水穿刺做进一步的诊断^[4]。以往较多报道以羊水穿刺为“金标准”,围绕 NIPT、羊水穿刺的一致性进行研究,而较少以临床随访结果为对照,验证羊水穿刺的诊断效能^[5]。鉴于此本研究将探讨羊水穿刺在 NIPT 高风险人群中的诊断价值,报告如下。

1 资料和方法

1.1 一般资料

选取 2017 年 1 月至 2019 年 12 月本院收治的 105 例产前筛查无创高风险病例,年龄 20~45 岁,平均年龄(36.24±4.30)岁;孕周 13~20 周,平均(18.54±1.60)周;初产妇 63 例,经产妇 42 例。本研究经我院伦理委员会审核批准,孕妇均知晓羊水穿刺的目的、可能存在的风险,自愿接受羊水穿刺

检查,并签署知情同意书。

纳入标准:①接受规律产前检查孕妇;②产前筛查无创高风险孕妇;③自愿接受羊水穿刺者;④承诺可配合随访;⑤单胎妊娠;能获得新生儿随访结果者。排除标准:①产前筛查无创高风险,但拒绝行羊水穿刺者;②未获临床随访结果者;③有精神病史者;④认知功能障碍者;⑤无法进行正常沟通交流者;⑥凝血功能异常者;先兆流产者;⑦有宫腔或盆腔感染征象者,体温>37.4℃者,有出血倾向者,入组前 1 年内有器官移植手术史者,近期有异体输血者;双胎妊娠者。

1.2 方法

1.2.1 NIPT 检测

采集清晨空腹肘部静脉血 5 mL, 10 000 rpm 离心 10 min,提取血浆中游离 DNA,建库、测序,PCR 扩增,采用第二代高通量测序技术进行覆盖度测序,通过生物信息分析,得到各染色体 Z 值。其中,13、18、21 号染色体 Z 值在-3.0~3.0 范围内为低风险,超出该范围为高风险。其他染色体异常及性染色体异常依具体情况作为次要发现报告。

1.2.2 羊水穿刺-核型分析

NIPT 检测高风险者,给予遗传学咨询,在患者知情同意后,于孕 18~30 周行羊膜腔穿刺术。抽取羊水 20 mL,分装于两个无菌离心管内,常温下 2 000 rpm 离心 7 min,保留(0.5~1)mL 羊水细胞层接种于 25 mL 无菌 T 形培养瓶中,培养基与细胞液混匀后,培养箱中培养(37℃、5% CO₂),第 9 或 10 d 观察生长情况,并更换新培养基,于细胞生长旺盛期收集羊水细胞,消化、低渗、预固定、一次和二次固定处理后滴片,G 显带,镜下观察,记录 20 个

分散良好中期分裂相,随机选取4个进行分析,参考人类细胞遗传学国际命名体制标准(IS-CN2013)进行核型分析。入组孕妇穿刺前均核查血型,若为Rh阴性,而其配偶为Rh阳性,介入性产前诊断穿刺后应立即注射抗RhD免疫球蛋白。

1.2.3 临床随访

为减少失访,至少留取孕妇及家属2个人员的电话,预产期后通过电话随访、查阅妇产科病例资料方式进行信息追踪,统计妊娠结局。

1.3 统计学方法

采用SPSS 22.0统计学软件处理数据,计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,行t检验,计数资料用n(%)表示,用 χ^2 检验,采用受试者工作特征曲线(Receiver operating characteristic, ROC)及ROC下面积(Area un-

der the curve, AUC)分析羊水穿刺-核型分析诊断总染色体异常的效能。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 临床随访结果

105例产前筛查无创高风险病例,临床随访染色体异常83例(79.05%),其中包括13-三体综合征9例(10.84%),18-三体综合征13例(15.66%),21-三体综合征51例(61.45%),性染色体异常10例(12.05%)。

2.2 羊水穿刺-核型分析检出各类型染色体异常情况

临床随访105例羊水穿刺-核型分析检出各类型染色体异常情况。见表1。

表1 羊水穿刺-核型分析检出13-三体综合征情况(n=105)

Table 1 Amniotic fluid puncture-karyotype analysis detected 13-trisomy syndrome (n=105)

临床随访	13-三体综合征		总计	18-三体综合征		总计	21-三体综合征		总计	性染色体异常		总计
	+	-		+	-		+	-		+	-	
+	8	1	9	12	1	13	50	1	51	9	1	10
-	3	93	96	0	92	92	2	52	54	1	94	95
总计	11	94	105	12	93	105	52	53	105	10	95	105

2.3 分析羊水穿刺-核型分析诊断各类型染色体异常的效能

以临床随访结果为准,羊水穿刺-核型分析诊

断各染色体异常的灵敏度、准确度、特异度比较差异无统计学意义($P > 0.05$),见表2。

表2 羊水穿刺-核型分析诊断各类型染色体异常的效能

Table 2 Amniotic fluid puncture-karyotype analysis for diagnosis of various types of chromosomal abnormalities

染色体异常分类	灵敏度(%)	准确度(%)	特异度(%)
13-三体综合征	88.89(8/9)	96.19(101/105)	96.88(93/96)
18-三体综合征	92.31(12/13)	99.05(104/105)	100.00(92/92)
21-三体综合征	98.04(50/51)	97.14(102/105)	96.30(52/54)
性染色体异常	90.00(9/10)	98.10(103/105)	98.95(94/95)
χ^2 值	2.504	52.049	4.090
P值	0.475	0.562	0.252

注:灵敏度=真阳性人数/(真阳性人数+假阴性人数) $\times 100\%$;准确度=(真阳性+真阴性)/总例数 $\times 100\%$;特异度=真阴性/(真阴性例数+假阴性例数) $\times 100\%$ 。

2.4 羊水穿刺-核型分析检出总染色体异常情况

临床随访检出总染色体异常83例,无染色体异常22例;羊水穿刺-核型分析检出总染色体异常85例,无染色体异常20例。见表3。

2.5 分析羊水穿刺-核型分析诊断学染色体异常的效能

以临床随访结果为准,羊水穿刺-核型分析诊断总染色体异常的灵敏度为95.18%,特异度为72.73%,准确度为90.48%,见图1。

表3 羊水穿刺-核型分析检出总染色体异常的情况

Table 3 Amniotic fluid puncture-karyotype analysis detected total chromosome abnormalities

临床随访	羊水穿刺-核型分析-总染色体异常		总计
	+	-	
+	79	4	83
-	6	16	22
总计	85	20	105

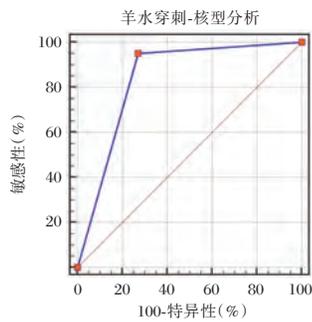


图1 羊水穿刺-核型分析诊断染色体异常的效能

Figure 1 Amniotic fluid puncture-karyotype analysis for diagnosis of chromosomal abnormalities

3 讨论

传统唐氏筛查依据母体血清学指标、胎儿超声检查、孕妇年龄等对唐氏综合征发生风险进行分层,结果高危人群建议进行金标准检查,但由于技术上的局限性,存在检出率较低与假阳性率较高的缺点,可能发生漏诊、增加不必要的有创性产前诊断事件的风险^[6]。NIPT 建立于孕妇外周血中胎儿游离 DNA 于高通量测序技术之上,是一种无创性产前筛查手段,与传统唐氏筛查相比,能减少漏诊率,参考 NIPT 决定是否实施羊水穿刺,可进一步降低有创性产前诊断的实施^[7]。

21-三体综合征是 21 号染色体数目异常导致的染色体病,60% 患儿在胎内早期即流产,存活者有明显的特殊面容、智能落后、多发畸形、生长发育障碍^[8]。朱长巍等^[9]研究显示,羊水穿刺产前筛查孕妇 21-三体综合征的灵敏度为 94.12%、特异度为 99.95%,本研究数据与之相近,证实羊水穿刺诊断 21-三体综合征具有较高的客观参考价值。18-三体综合征发生率为活产新生儿的 1/4 000~1/8 000,患儿多于生后不久死亡,存活者有严重智力障碍^[10]。本研究发现,羊水穿刺-核型分析诊断 18-三体综合征的效能较高,可为孕期遗传咨询提供有价值的参考。13-三体综合征新生儿中的发病率约为 1:25 000,女性明显多于男性,患儿的畸形和临床表现比 21 三体性明显严重,脑和内脏的畸形非常普遍,还可见颅面的畸形、智力发育障碍等^[11]。三体型的产生一般认为是在配子形成时或受精卵卵裂时出现染色体不分离,受精后形成单体型或三体型异常的子代^[12]。采用羊水穿刺-核型分析能发现异常核型,帮助孕妇选择性分娩发育正常的胎儿。一项大型数据显示,产前性染色

体异常阳性率为 0.22%,NIPT 检测性染色体的准确率为 73%,提示 NIPT 存在漏诊与误诊^[13]。

现阶段随着分子生物学检测技术的发展,胎儿染色体异常的检出率明显提高,虽然检测手段多样化,但均存在一定局限性,迄今为止无任何一项检测技术可完全取代羊水穿刺-核型分析。但作为一种侵入性产前诊断技术,具有一定的流产风险,致使很多产前高风险孕妇拒绝羊水穿刺,而错过最佳诊断时机^[14]。而根据相关报道,孕中期行羊水穿刺,相关的胎儿丢失率为 0.5%~0.86%,处于较低水平^[15]。目前普通认同,产前羊水穿刺具有风险,但并不危险,因此临床上应加强对传统唐氏筛查、NIPT 高风险孕妇的健康宣教,提高其对羊水穿刺的认知度,从而能更好地配合产前染色体异常的筛查。本研究不足之处在于,病例数较少,有待后续扩大病例数或进行多中心研究,进行进一步的验证。

羊水穿刺对 NIPT 高风险人群染色体异常具有较高的产前诊断价值,能为优生优育、遗传咨询提供可靠的参考,是产前诊断中不可替代的一种技术。

参考文献

- [1] 胡祝明,朱海波,李琳琳,等.产前无创 DNA 筛查高风险孕妇羊水穿刺诊断符合率分析[J].中华医学遗传学杂志,2018,35(2):304-306.
- [2] 李冬秀,吴学威,黄湘,等.中山市孕中期产前筛查指标中位数的建立及临床价值研究[J].分子诊断与治疗杂志,2018,10(4):278-282.
- [3] Xie X, Wang M, Goh ES, et al. Noninvasive Prenatal Testing for Trisomies 21, 18, and 13, Sex Chromosome Aneuploidies, and Microdeletions in Average-Risk Pregnancies: A Cost-Effectiveness Analysis[J]. J Obstet Gynaecol Can, 2020, S1701-2163(19)31152-1.
- [4] 杨树法,庄太凤.接受无创游离 DNA 检测的唐氏筛查高危孕妇染色体畸形潜在漏诊风险分析[J].山东医药,2019,59(26):42-44.
- [5] Vossaert L, Wang Q, Salman R, et al. Validation Studies for Single Circulating Trophoblast Genetic Testing as a Form of Noninvasive Prenatal Diagnosis[J]. Am J Hum Genet, 2019, 105(6):1262-1273.
- [6] Luo W, Pang L, He B, et al. Analysis of 21 723 Pregnant Women's First Trimester Screening for Down Syndrome in Sichuan Province [J]. Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban, 2020, 51(1):49-53.
- [7] Lee CY, Su HJ, Cheng YT, et al. Detection of fetal trisomy 9 mosaicism by noninvasive prenatal testing through maternal plasma DNA sequencing[J]. Taiwan J Obstet Gynecol, 2018, 57(4):594-597.

(下转第 1318 页)

脓毒症患者 Th1/Th2 细胞失衡与疾病严重程度、肺损伤的关系

陈丽君^{1*} 王佳¹ 张文静²

【摘要】目的 探讨脓毒症患者 Th1/Th2 细胞失衡与疾病严重程度、肺损伤的关系。方法 将 2017 年 10 月至 2019 年 10 月于本院 ICU 接受治疗的 62 例脓毒症患者根据治疗 28 d 后临床结局的不同分为死亡组(20 例)和生存组(42 例),分别于入 ICU 治疗前 1 d,入 ICU 治疗后 1、7、14 d 通过流式细胞术检测两组外周静脉血中 Th1 细胞(IFN- γ ⁺CD3⁺CD4⁺T 淋巴细胞)及 Th2 细胞(IL-4⁺CD3⁺CD4⁺T 淋巴细胞)的含量,并计算 Th1/Th2 值,分析比较两组 Th1、Th2 细胞含量及 Th1/Th2 值。根据脓毒症患者是否合并肺损伤分别肺损伤组(24 例)和非肺损伤组(38 例),分析比较两组 Th1、Th2 细胞含量及 Th1/Th2 值。**结果** 治疗后 1、7、14 d,生存组 Th1 细胞含量及 Th1/Th2 值均明显高于死亡组,差异具有统计学意义($P < 0.05$),而 Th2 细胞含量与死亡组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。肺损伤组 Th1 细胞含量及 Th1/Th2 值均明显高于非肺损伤组,差异具有统计学意义($P < 0.05$),而 Th2 细胞含量与非肺损伤组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** Th1/Th2 值的降低预示着疾病严重程度的加大,预后不良,同时脓毒症合并肺损伤患者促炎 Th1 细胞增高,Th1/Th2 平衡向 Th1 方向漂移。

【关键词】 脓毒症; Th1/Th2 细胞失衡; 疾病严重程度; 肺损伤

Relationship between Th1/Th2 cell imbalance and disease severity, lung injury in patients with sepsis

CHEN Lijun^{1*}, WANG Jia¹, ZHANG Wenjing²

(1. Emergency Department, the First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou, Hebei, China, 075000; 2. Department of Thoracic Surgery, the First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou, Hebei, China, 075000)

【ABSTRACT】 Objective To explore the relationship between Th1/Th2 cell imbalance and disease severity, lung injury in patients with sepsis. **Methods** Sixty-two patients with sepsis who were treated in ICU of the hospital from October 2017 to October 2019 were divided into the death group (20 cases) and the survival group (42 cases) according to the clinical outcomes after 28 d of treatment. At 1 d before entering ICU, and at 1, 7 and 14 d after entering ICU, contents of Th1 cells (IFN- γ ⁺CD3⁺CD4⁺ T lymphocytes) and Th2 cells (IL-4⁺CD3⁺CD4⁺T lymphocytes) in peripheral venous blood in both groups were detected by flow cytometry. The ratio of Th1/Th2 was calculated. The contents of Th1 and Th2 cells, and Th1/Th2 were analyzed and compared between the two groups. According to presence or absence of lung injury, they were further divided into the lung injury group (24 cases) and lung non-injury group (38 cases). The contents of Th1 and Th2 cells, and Th1/Th2 were analyzed and compared between the two groups. **Results** At 1, 7 and 14 d after treatment, contents of Th1 cells and Th1/Th2 in the survival group were significantly higher than those in the death group ($P < 0.05$), while differences in contents of Th2 cells were not statistically significant between the two groups ($P >$

基金项目:河北省卫健委承办项目(20200521)

作者单位:1. 河北北方学院附属第一医院急诊科,河北,张家口 075000

2. 河北北方学院附属第一医院胸外科,河北,张家口 075000

*通信作者:陈丽君, E-mail: 704750797@qq.com

0.05). The contents of Th1 cells and Th1/Th2 in the lung injury group were significantly higher than those in the lung non-injury group ($P<0.05$), while the differences in contents of Th2 cells were not statistically significant between the two groups ($P>0.05$). **Conclusion** The decrease of Th1/Th2 ratio indicates the aggravation of disease severity and poor prognosis. The pro-inflammatory Th1 cells are increased in patients with sepsis and lung injury, and the Th1/Th2 balance drifts to Th1.

[KEY WORDS] Sepsis; Th1/Th2 cell imbalance; Disease severity; Lung injury

脓毒症是人体对感染反应失调导致的器官功能障碍综合征,主要表现为寒战、高热(或低温)、心慌、气促、精神状态改变等症状,疾病可进展恶化为严重脓毒症和脓毒症休克,可导致心、肝、肺、肾等多器官功能不全及循环障碍,病死率高^[1]。目前全球每年脓毒症患者人数大约超过1 900万,有超过600万死亡,病死率超过1/4,存活患者也约300万存在认知功能障碍,严重影响患者的生命健康和生活质量^[2]。有研究表明,各种病毒或细菌的感染导致的免疫功能失衡和免疫系统紊乱在脓毒症发生发展进程中起着关键作用^[3]。辅助型T细胞(Th细胞)在人体发挥免疫功能过程中充当重要角色,主要分为Th1细胞群和Th2细胞群,Th1/Th2细胞失衡与机体免疫炎症反应密切相关^[4]。在上述研究背景下,本研究探讨脓毒症患者Th1/Th2细胞失衡与疾病严重程度、肺损伤的关系,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 一般资料

将2017年10月至2019年10月于本院ICU接受治疗的脓毒症患者62例作为研究对象,纳入标准:均符合脓毒症的相关诊断标准^[5]。排除标准:合并恶性肿瘤者;合并糖尿病等严重代谢性疾病者;合并免疫功能不全者;合并肺部疾病及肺部损伤者;合并器官移植者;不配合本项研究者。根据治疗28 d后临床结局的不同分为死亡组(20例)和生存组(42例)。死亡组男性12例,女性8例;年龄60~78岁,平均(68.40±2.73)岁;入ICU治疗前1 d Th1细胞含量(%):(15.35±8.78);Th2细胞含量(%):(1.63±0.85);Th1/Th2:(11.92±9.01)。生存组男性23例,女性19例;年龄61~79岁,平均(68.58±2.76)岁;入ICU治疗前1 d Th1细胞含量(%):15.46±8.35;Th2细胞含量(%):1.57±0.88;Th1/Th2:(11.85±9.08)。再根据脓毒症患者是否合并肺损伤分别肺损伤组(24例)和非肺损伤组(38例),肺损伤诊断标准参照相关文献^[6]。肺损伤组

男性10例,女性14例;年龄59~76岁,平均(67.38±2.63)岁;非肺损伤组男性17例,女性21例;年龄59~78岁,平均(68.12±2.75)岁;两组一般资料比较差异无统计学意义($P>0.05$)。本研究经本院医学伦理委员会批准,患者及其家属签署知情同意书。

1.2 检查方法与指标

分别于入ICU治疗前1 d,入ICU治疗后1、7、14 d取患者外周静脉血标本,采用流式细胞仪(BD, FACSCalibur)检测所有患者外周静脉血中Th1细胞(IFN- γ ⁺CD3⁺CD4⁺T淋巴细胞)及Th2细胞(IL-4⁺CD3⁺CD4⁺T淋巴细胞)的含量,并计算Th1/Th2值。分析比较死亡组与生存组、肺损伤组和非肺损伤组Th1、Th2细胞含量及Th1/Th2值。

1.3 统计学方法

用SPSS 18.0软件进行统计分析,计量资料以($\bar{x}\pm s$)的方式表示,采用 t 检验。计数资料以 $n(\%)$ 表示,组间比较采用 χ^2 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2组治疗后1、7、14 d Th1、Th2细胞含量比较

治疗后1、7、14 d,生存组Th1细胞含量均明显高于死亡组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。治疗后1 d,死亡组Th2细胞含量高于生存组,治疗后7、14 d,生存组Th2细胞含量均高于死亡组,差异有无统计学意义($P>0.05$)。见表1。

2.2 生存组与死亡组治疗后1、7、14 d Th1/Th2值比较

治疗后1、7、14 d,生存组Th1/Th2值均明显高于死亡组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。见表2。

2.4 治疗后14 d内肺损伤组与非肺损伤组Th1、Th2细胞含量及Th1/Th2值的平均水平比较

肺损伤组Th1细胞含量及Th1/Th2值均明显高于非肺损伤组,差异具有统计学意义($P<0.05$),而Th2细胞含量与非肺损伤组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。见表3。

表1 生存组与死亡组治疗后1、7、14 d Th1、Th2 细胞含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of Th1、Th2 cell content between survival group and death group at 1, 7 and 14 d after treatment ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Th1 细胞含量(%)			Th2 细胞含量(%)		
		1 d	7 d	14 d	1 d	7 d	14 d
生存组	42	17.18±5.72	20.23±6.61	22.89±8.72	1.72±0.83	2.12±0.76	2.08±0.81
死亡组	20	12.86±5.21	13.54±6.12	15.48±5.26	1.95±0.86	2.05±0.66	1.98±0.69
t 值		2.858	3.813	4.917	1.008	0.353	0.476
P 值		0.006	0.000	0.000	0.317	0.725	0.636

表2 生存组与死亡组治疗后1、7、14 d Th1/Th2 值比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of Th1/Th2 cell content between survival group and death group at 1, 7 and 14 d after treatment ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Th1/Th2 值		
		1 d	7 d	14 d
生存组	42	16.92±9.05	16.12±6.56	13.49±6.18
死亡组	20	11.95±8.72	10.17±6.48	9.76±6.33
t 值		2.045	3.351	2.205
P 值		0.045	0.001	0.031

表3 治疗后14 d内肺损伤组与非肺损伤组 Th1、Th2 细胞含量及 Th1/Th2 值的平均水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of Th1 and Th2 cell contents and Th1/Th2 values between lung injury group and non-lung injury group ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Th1 细胞含量 (%)	Th2 细胞含量 (%)	Th1/Th2 值
肺损伤组	24	18.79±9.26	2.05±0.34	11.27±7.39
非肺损伤组	38	12.45±8.63	1.98±0.46	6.85±5.21
t 值		2.739	0.642	2.762
P 值		0.008	0.523	0.007

3 讨论

脓毒症的病理机制为各种感染因素导致机体免疫炎症反应,疾病不断进展而引起全身炎症反应综合征,可累及机体多种重要脏器,其极高的致死致残率已成为学界共识^[7]。有研究表明,在脓毒症的疾病进展中,除外界感染的病原体及其分泌的有害物质外,机体免疫功能的失衡可能也是导致该病迅速恶化进展的关键因素^[8]。Th1、Th2 细胞是人体重要的辅助型 T 细胞,在机体发挥体液免疫和细胞免疫过程转中都直接或间接地起着重要作用,Th1/Th2 值的失衡更是可能通过破坏机体细胞炎症因子的平衡而导致脓毒症患者机体炎症级联反应的发生,使得病情迅速恶化^[9]。现为探讨脓毒症患者 Th1/Th2 细胞失衡与疾病严重程度、

肺损伤的关系,特做此研究。

本研究结果表明脓毒症患者 Th1/Th2 值的降低预示着其疾病严重程度的加大,预后不良。究其原因,可能是 Th1、Th2 细胞作为辅助型免疫细胞可改变机体免疫功能的状态,同时 Th1/Th2 值的变化也能反映机体细胞免疫功能状态的变化,Th1/Th2 值的升高预示着机体免疫功能较佳,预后较好^[10]。研究发现,肠粘膜屏障的破坏是脓毒症早期得以迅速进展的关键因素,肠粘膜屏障的破坏可导致大量肠源性内毒素通过肠部淋巴管道迅速扩散至全身,导致全身的毒性反应^[11]。正常情况下,内毒素抗原可被淋巴结内的抗原呈递细胞识别,从而激活机体免疫系统,活化巨噬细胞功能,最终被巨噬细胞吞噬。若机体免疫抑制状态下,内毒素抗原便不会被机体免疫系统呈递识别,甚至绕过机体淋巴系统,直接进入体循环,形成免疫逃逸现象,使得病情不受控制,迅速恶化^[12]。Th1、Th2 细胞是人体重要的免疫细胞,可较敏感地反应机体的免疫状态,Th1/Th2 值升高则预示免疫功能趋好,预后较好,反之,Th1/Th2 值降低则预示存在一定程度的免疫功能抑制,预后较差。另外,研究表明,Th1 细胞本身就具有分泌白介素 6(interleukin-6, IL-6)、白介素 8(interleukin-8, IL-8)、白介素 10(interleukin-10, IL-10)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 等促炎因子的功能,能增强机体的抗感染能力^[13],从而减轻脓毒症患者的疾病严重程度。

本研究结果提示脓毒症合并肺损伤患者促炎 Th1 细胞增高,Th1/Th2 平衡向 Th1 方向漂移。探究其机制,可能是因为脓毒症患者合并肺损伤的主要病理机制是患者机体因外界感染而产生的大量内毒素经循环系统侵入肺部,刺激促炎因子的分泌与合成,造成炎症反应,导致急性肺损伤^[14],而 Th1 细胞主要分泌干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ) 等促炎因子,IFN- γ 又能活化巨噬细胞分泌 TNF- α ,

从而造成急性肺损伤, Th2 细胞则主要分泌白介素 4 (interleukin-4, IL-4) 等抗炎因子, 能缓解急性肺损伤, 因此脓毒症合并肺损伤患者的 Th1 细胞含量更高, Th1/Th2 值也更高^[15-16]。

综上所述, Th1/Th2 值的降低预示着疾病严重程度加大, 预后不良, 同时脓毒症合并肺损伤患者促炎 Th1 细胞增高, Th1/Th2 平衡向 Th1 方向漂移。

参考文献

- [1] Coopersmith C, Backer D, Deutschman C, et al. Surviving Sepsis Campaign: Research Priorities for Sepsis and Septic Shock[J]. *Crit Care Med*, 2018, 46(8):1-5.
- [2] 胡仕静, 潘爱军, 梅清. L-选择素、降钙素原、波状蛋白在脓毒症患者中表达及意义[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2020, 12(9):1195-1199.
- [3] 王绍鸣, 张才明. 细菌性血流感染致脓毒症患者血清 PCT、CRP 及内毒素水平变化及临床意义[J]. *解放军医药杂志*, 2018, 30(1):53-55, 63.
- [4] Hou T, Liao J, Zhang C, et al. Elevated expression of miR-146, miR-139 and miR-340 involved in regulating Th1/Th2 balance with acute exposure of fine particulate matter in mice [J]. *Int immunopharmacol*, 2018, 54(6):68-77.
- [5] 姚咏明, 盛志勇, 林洪远, 等. 2001 年国际脓毒症定义会议关于脓毒症诊断的新标准[J]. *中国危重病急救医学*, 2006, 18(11):645-645.
- [6] 马晓春, 王辰, 方强, 等. 急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征诊断和治疗指南(2006)[J]. *中国危重病急救医学*, 2006, 16(12):1-6.
- [7] Andrew W, Kirkpatrick J, Craig NJ, et al. Inflammatory Mediators in Intra-abdominal Sepsis[J]. 2018, 121(4):497-514.
- [8] Levy MM, Evans LE, Rhodes A. The Surviving Sepsis Campaign Bundle: 2018 update [J]. *Int Care Med*, 2018, 26(12):1468-1472.
- [9] Song L, Xiong D, Hu M, et al. Enhanced Th1/Th2 mixed immune responses elicited by polyethyleneimine adjuvanted influenza A (H7N9) antigen HA1-2 in chickens [J]. *Poult Sci*, 2018, 34(18):523-526.
- [10] Muyong W. Combined laparoscopic-colonoscopy approach in the treatment of colorectal cancer and its effect on Th1/Th2 balance and stress response [J]. *J Colorectal Anal Surgery*, 2019, 106(58):1103-1105.
- [11] Kazuma Y. Recombinant Human Soluble Thrombomodulin in Sepsis-Induced Coagulopathy: An Updated Systematic Review and Meta-Analysis [J]. *Thrombosis Haemostasis*, 2019, 165(24):1145-1148.
- [12] Wang Q, Lian G, Song Y, et al. LncRNA MALAT1 promotes tumorigenesis and immune escape of diffuse large B cell lymphoma by sponging miR-195 [J]. *Life Sci*, 2019, 108(42):1280-1285.
- [13] Chen T, Chen Y, Bao W, et al. T-lymphocyte subsets and Th1/Th2 cytokines in convalescent patients with Epstein-Barr virus-associated aplastic anemia [J]. *Hematology*, 2020, 25(1):11-16.
- [14] Sivayoham N, Blake L, Tharimooantavida S, et al. The REDS score: a new scoring system to risk-stratify emergency department suspected sepsis: a derivation and validation study [J]. *BMJ Open*, 2019, 9(8):122-126.
- [15] Petermann F, Aleksandra P, Johnson C, et al. The Magnitude of IFN- γ Responses Is Fine-Tuned by DNA Architecture and the Non-coding Transcript of Ifng-as1 [J]. *Mol Cell*, 2019, 75(6):103-105.
- [16] Gao J, Kong R, Zhou X, et al. Correction to: MiRNA-126 expression inhibits IL-23R mediated TNF- α or IFN- γ production in fibroblast-like synoviocytes in a mice model of collagen-induced rheumatoid arthritis [J]. *Apoptosis*, 2019, 64(17):1568-1572.
- [8] Simionescu AA, Stanescu AMA. Missed Down Syndrome Cases after First Trimester False-Negative Screening-Lessons to be Learned [J]. *Medicina (Kaunas)*, 2020, 56(4):E199.
- [9] 朱长巍, 何苗, 王佩佩, 等. 羊水穿刺与 NIPT 对高龄孕妇 21-三体综合征胎儿的检出价值对比 [J]. *中国妇幼健康研究*, 2017, 28(11):1424-1426.
- [10] Kochan M, Davidoff L, Falck A. Let It Be: The Evolving Standard of Care for Trisomy 18 [J]. *Am J Bioeth*, 2020, 20(1):64-65.
- [11] Carey JC. Emerging evidence that medical and surgical interventions improve the survival and outcome in the trisomy 13 and 18 syndromes [J]. *Am J Med Genet A*, 2020, 182(1):13-14.
- [12] Sun X, Lu J, Ma X. An efficient method for noninvasive prenatal diagnosis of fetal trisomy 13, trisomy 18, and trisomy 21 [J]. *PLoS One*, 2019, 14(4):e0215368.
- [13] 孟繁杰, 罗丽双, 于月新, 等. 无创产前基因检测筛查胎儿性染色体异常 [J]. *中国医科大学学报*, 2018, 47(3):240-243.
- [14] Gray KJ, Wilkins-Haug LE. Have we done our last amniocentesis? Updates on cell-free DNA for Down syndrome screening [J]. *Pediatr Radiol*, 2018, 48(4):461-470.
- [15] Xu LL, Li DZ. Microbial invasion of amniotic cavity: What is the early sign detected by mid-pregnancy genetic amniocentesis [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2020, S0002-9378(20):30469-5.

(上接第 1314 页)

肺癌患者血清 miRNA-4534 水平和病理分期与预后的关系

杨寿艳¹ 邓彬兵^{2*} 孟雄² 王兮² 母前途²

[摘要] **目的** 探讨肺癌患者血清微小核糖核苷酸(miRNA)-4534水平和病理分期与预后的关系。**方法** 选取2014年1月至2016年6月间收治的64例肺癌患者(肺癌组)作为研究对象,并纳入30例良性肺病患者(良性肺病组)和30例体检健康志愿者作为对照组。采集受试者外周血,采用实时荧光定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)检测血清miRNA-4534的相对表达量,绘制受试者工作特征(ROC)曲线评估miRNA-4534诊断肺癌效能,分析miRNA-4534与肺癌患者病理特征的关系。随访3年,评估miRNA-4534与肺癌患者预后的关系。**结果** 肺癌组miRNA-4534相对表达量高于良性肺病组和对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);良性肺病组和对照组miRNA-4534相对表达量对比,差异无统计学意义($P>0.05$);ROC曲线显示,miRNA-4534诊断肺癌发病的曲线下面积(AUC)为0.839(95%CI:0.777~0.931, $P<0.05$),最佳临界值为2.52,敏感性76.56%,特异性98.33%;不同性别、年龄、吸烟史、肿瘤大小、病理类型间miRNA-4534相对表达量比较,差异均无统计学意义($P>0.05$),TNM III/IV期肺癌患者miRNA-4534相对表达量高于I/II期者,差异有统计学意义($P<0.05$);有淋巴结转移肺癌患者miRNA-4534相对表达量高于无淋巴结转移者,差异有统计学意义($P<0.05$);随访3年,获得随访资料者62例患者、生存率40.32%(25/62),总生存时间(26.27±9.92)个月;miRNA-4534高表达组3年生存率、生存时间均低于低表达组,差异有统计学意义($P<0.05$);miRNA-4534诊断预后不良AUC为0.914(95%CI:0.814~0.970, $P<0.05$),最佳临界值为15.69;miRNA-4534水平与肺癌患者生存期呈负相关关系($P<0.05$)。**结论** 血清miRNA-4534与肺癌发生、进展均相关,且是预测患者预后的有效指标。

[关键词] 肺癌; miRNA-4534; 病理类型; 预后

Relationship between serum miRNA - 4534 level and pathological staging and prognosis of patients with lung cancer

YANG Shouyan¹, DENG Binbing^{2*}, MENG Xiong², WANG Xi², MU Qiantu²

(1. Department of Oncology, PLA Army 958 Hospital, Chongqing, China, 400020; 2. Department of Respiratory and Critical Care Medicine, PLA Army 958 Hospital, Chongqing, China, 400020)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the relationship between serum micro - ribonucleotide (miRNA) -4534 level and pathological staging and prognosis of patients with lung cancer. **Methods** Sixty-four patients with lung cancer (lung cancer group) who were treated between January 2014 and June 2016 were selected as the research subjects. Thirty patients with benign lung disease (benign lung disease group) and thirty healthy volunteers with physical examination (control group) were included. The peripheral blood of the subjects was collected, and the relative expression level of serum miRNA - 4534 was detected by real - time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (qRT - PCR). The receiver operating characteristic (ROC) curve was plotted to evaluate the efficacy of miRNA - 4534 in the diagnosis of lung cancer. Relationship between

基金项目:重庆市社会民生科技创新专项(cstc2015shmszx10129)

作者单位:1. 中国人民解放军陆军第九五八医院肿瘤科,重庆 400020

2. 中国人民解放军陆军第九五八医院呼吸与危重症医学科,重庆 400020

*通信作者:邓彬兵, E-mail:345589984@qq.com

miRNA-4534 and pathological features in patients with lung cancer was analyzed. At 3 years of follow-up, the relationship between miRNA-4534 and prognosis of patients with lung cancer was evaluated. **Results** The relative expression level of miRNA-4534 in the lung cancer group was higher than that in the benign lung disease group and the control group, the difference was statistically significant ($P<0.05$), and there was no significant difference in the relative expression level of miRNA-4534 between the benign lung disease group and the control group, the difference was not statistically significant ($P>0.05$). ROC curve showed that the area under the curve (AUC), optimal cut-off value, sensitivity and specificity of miRNA-4534 in the diagnosis of occurrence of lung cancer were 0.839 (95% CI: 0.777~0.931, $P<0.05$), 2.52, 76.56% and 98.33%. There was no significant difference in the relative expression level of miR-4534 among patients with different gender, age, smoking history, tumor size and pathological type ($P>0.05$). The relative expression level of miR-4534 of patients with TNM stage III/IV lung cancer was higher than that of patients with stage I/II, and the difference was statistically significant ($P<0.05$), and the relative expression level of miR-4534 of patients with lymph node metastasis was higher than that of patients without lymph node metastasis ($P<0.05$). At 3 years of follow-up, there were 62 patients with follow-up data, and the survival rate and overall survival time were 40.32% (25/62) and (26.27±9.92) months. The 3-year survival rate and survival time of miR-4534 high expression group were lower than those of low expression group, the difference was statistically significant ($P<0.05$). The AUC of miRNA-4534 in the diagnosis of poor prognosis was 0.914 (95% CI: 0.814-0.970, $P<0.05$), and the optimal cutoff value was 15.69. The level of miRNA-4534 was negatively correlated with the survival time of patients with lung cancer ($P<0.05$). **Conclusion** Serum miRNA-4534 is related to the occurrence and progression of lung cancer and is an effective indicator for predicting the prognosis of patients.

[KEY WORDS] Lung cancer; Mi RNA-4534; Pathological types; Prognosis

由于发现时多数肺癌患者已至中晚期、肿瘤细胞易耐药及肿瘤生物学行为复杂等原因,多数肺癌患者生存期较短^[1]。微小核糖核苷酸(micro RNA, miRNA)是一种长度较短的单链RNA,它能够通过结合miRNA的3'-端非编码区来调节靶基因的表达^[2]。目前已知与肺癌相关的miRNA有约40种,与肺癌的发生、诊断、耐药性、治疗等方面有重要关联^[3]。此前有研究通过深度测序,观察到miR-4534在正常和恶性人类β细胞中表达有差异^[4]。然而,微小核糖核苷酸-4534(miRNA-4534)在肺癌患者中的表达、作用等尚不明确。基于此,本研究选取64例肺癌患者作为研究对象,以探讨肺癌患者血清miRNA-4534水平和病理分期与预后的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2014年1月至2016年6月间收治的64例肺癌患者作为研究对象。肺癌患者纳入标准:①均经病理检查确诊为肺癌者,且均为原发性肺癌患者^[5];②入组前未经放疗、手术等抗癌治疗;③初发肺癌者;④年龄>18岁者。排除标准:①合并其他恶性肿瘤者;②合并其他重要器官功能障碍。良

性肺病者30例包括肺炎14例、肺结核8例、炎性假瘤8例,肺癌组:男性41例、女性23例,年龄39-85岁、平均年龄(60.52±9.50)岁。良性肺病组:男性17例、女性13例,年龄34-72岁、平均年龄(60.13±8.20)岁。选取同期体检健康志愿者30例作为对照组,其中男性18例、女性12例,年龄27岁~70岁、平均年龄(60.84±6.74)岁。三组一般资料对比,差异无统计学意义($P>0.05$)。所有患者均已取得知情同意,本研究已通过医院伦理委员会审核。

1.2 检测方法

使用柠檬酸钠抗凝管收集所有研究对象的外周血3 mL,4℃下放置,1 h内3 000 r/min离心10 min,收集上清液,-80℃冻存待测。使用Trizol提取试剂(美国Invitrogen公司,批号:1420087)从血清中提取总RNA,并使用反转录技术将其反转录为cDNA(反转录试剂盒购自日本Takara公司,批号:RR047A),使用SYBR premix EX taq试剂盒进行样品上样,然后在实时聚合酶链式反应(PCR)仪中对样品进行实时荧光定量PCR(qRT-PCR,试剂盒购自日本Takara公司,实时PCR仪为美国ABI 7500型),每个样品设置三次重复孔。MiR-4534的引物序列为正向引物:5'-GTGATTTATTTTGTAAAGTTAGTATTTTGGGAG-3;反向引物:5'-ACAAA

TACRTACCACCATACCCAA-3'。由日本 Takara 公司合成,U6 引物序列为正向引物:5'-CTCGCTT CGGCAGCACA-3';反向引物:5'-AACGCTTCAC- GAATTTGCGT-3'。作为内参反应体系,使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 miRNA 的相对表达量。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计软件进行数据分析,偏态分布计量资料以 $(\bar{x}\pm s)$ 表示,偏态分布计量数据以中位数[四分位间距(p25,p75)]表示,两组间对比行独立 *t* 检验或 Mann-Whitney U 检验,多组间对比行 Kruskal-Wallis H(k)检验;计数资料以 *n*(%)表示,行 χ^2 检验;绘制 ROC 曲线评估 miRNA-4534 诊断肺癌发病及患者预后不良的效能,采用 pearson 法分析 miRNA-4534 与患者生存期的关系, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3组间 miRNA-4534 相对表达量对比

肺癌组 miRNA-4534 相对表达量高于良性肺病组和对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),良性肺病组和对照组 miRNA-4534 相对表达量比较,差异无统计学意义($P>0.05$),见表 1。

表 1 3组间 miRNA-4534 相对表达量对比
Table 1 Comparison of relative expression level of miRNA-4534 among the 3 groups

组别	<i>n</i>	miRNA-4534 相对表达量
肺癌组	64	17.82(2.74,27.44)
良性肺病	30	1.38±0.58 ^a
对照组	30	1.17±0.53 ^a
Z 值	-	46.563
P 值	-	0.000

注,与肺癌组对比,^a $P<0.05$ 。

2.2 miRNA-4534 诊断肺癌的 ROC 曲线

ROC 曲线显示,miRNA-4534 诊断肺癌发病的曲线下面积(AUC)为 0.839(95%CI:0.777~0.931, $P<0.05$),最佳临界值为 2.52,敏感性 76.56%,特异性 98.33%,见图 1。

2.3 miRNA-4534 相对表达量与肺癌临床病理特征的关系

不同性别、年龄、吸烟史、肿瘤大小、病理类型间 miRNA-4534 相对表达量比较,差异无统计学意义($P>0.05$),TNM III/IV 期肺癌患者 miRNA-4534 相对表达量高于 I/II 期者,差异有统计学意义($P<0.05$),有淋

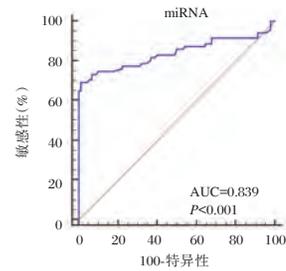


图 1 miRNA-4534 诊断肺癌的 ROC 曲线

Figure 1 ROC curve of miRNA-4534 in the diagnosis of lung cancer

巴结转移肺癌患者 miRNA-4534 相对表达量高于无淋巴结转移者差异有统计学意义($P<0.05$),见表 2。

表 2 miRNA-4534 相对表达量与肺癌临床病理特征的关系
Table 2 Correlation between relative expression of miRNA-4534 and clinicopathological features of lung cancer

临床病理特征	<i>n</i>	血清 miRNA-4534 表达量	Z 值	P 值	
性别	男性	41	16.27(2.79,26.85)	-0.385	0.700
	女性	23	23.78(3.14,29.22)		
年龄	≤60 岁	33	19.88(3.53,28.52)	-0.470	0.638
	>60 岁	31	17.54(1.58,25.49)		
吸烟史	有	36	20.50(8.91,28.78)	-0.778	0.436
	无	28	16.12(2.14,26.91)		
肿瘤大小	<5cm	35	16.27(1.87,29.69)	-0.479	0.632
	≥5cm	29	23.78(9.68,24.80)		
病理类型	腺癌	25	22.90(2.14,30.10)	-0.702	0.483
	鳞癌	39	17.54(6.41,24.64)		
TNM 分期	I/II 期	21	2.87(1.49,9.89)	-3.839	0.000
	III/IV 期	43	21.75±10.19		
淋巴结转移	未转移	34	10.24(1.23,25.50)	-2.852	0.004
	转移	30	18.96(14.31,31.83)		

2.4 随访情况

随访 3 年,肺癌组 64 例患者获得随访资料者 62 例,失访率 3.13%(2/64)。62 例患者中 3 年生存 25 例、生存率 40.32%(25/62),总生存时间(26.27±9.92)个月。

2.5 miRNA-4534 与肺癌预后的关系

高表达组 3 年生存率、生存时间均低于低表达组,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 3、图 2。

表 3 miRNA-4534 与肺癌预后的关系

Table 3 Correlation between miRNA-4534 and prognosis of lung cancer

分组	<i>n</i>	3 年生存率	生存时间(月)
高表达组	48	16(33.33)	24.77±10.16
低表达组	14	9(64.29)	36.00(26.50,36.00)
χ^2/Z 值	-	4.315	5.013
P 值	-	0.038	0.025

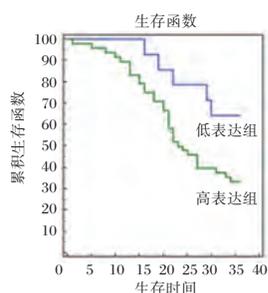


图2 miRNA-4534 高表达量和低表达量生存曲线

Figure 2 Survival curves of miRNA-4534 with high and low expression levels

2.6 miRNA-4534 诊断肺癌预后不良的 ROC 曲线

以随访3年内死亡作为预后不良绘制ROC曲线,miRNA-4534诊断预后不良AUC为0.914(95%CI:0.814~0.970, $P < 0.05$),最佳临界值为15.69。见图3。

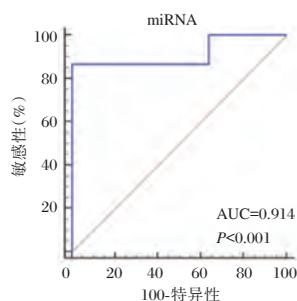


图3 miRNA-4534 诊断肺癌预后不良的 ROC 曲线

Figure 3 ROC curve of miRNA-4534 in the diagnosis of lung cancer with poor prognosis

2.7 miRNA-4534 与肺癌患者生存期的相关性分析

Pearson 相关分析法显示:miRNA-4534 水平与肺癌患者生存期呈负相关关系($r = -0.386, P = 0.002$)。

3 讨论

单个miRNA表达变化与肿瘤演进过程有紧密关联,通常miRNA可在肿瘤患者血液中被检测出异常表达,且不易被RNA酶降解破坏,这使得血液miRNA成为无创检查手段热门生物标志群^[5]。miRNA-4534位于染色体22q13.1,有研究报道该miRNA与前列腺癌侵袭性相关,通过调节血管生成抑制蛋白-1(VASH-1),促进前列腺癌的发展^[6]。miRNA-4534目前研究较少,尤其是在肺癌患者中。研究显示,VASH-1可能参与非小细胞肺癌患者肿瘤血管的形成机制,进而促进肺癌的生长、侵袭和转移^[7-8]。因此,miRNA-4534可能也是

与肺癌相关的基因,本研究探讨血清miRNA-4534在肺癌患者中的表达及其临床意义。

本研究结果显示,肺癌组miRNA-4534相对表达量明显高于良性肺病和对照组,这与miRNA-4534在前列腺癌、黑色素瘤等表达特点相似^[6,9]。miRNA-4534这一表达特点,提示其有可能作为肺癌患者的诊断指标。本研究数据显示,miRNA-4534诊断肺癌发病效能良好;性别、年龄、肿瘤大小、病理类型及吸烟史与miRNA-4534相对表达量无关;miRNA-4534可能参与肺癌进展和侵袭转移。既往文献指出,miRNA-4534作为致癌基因,其衰减可导致癌细胞的细胞周期停滞、凋亡,迁移侵袭能力和集落形成能力减弱^[10]。严淑等^[9]学者的研究显示,miRNA-4534能通过靶基因第10号染色体同源缺失性磷酸酶-张力蛋白基因(PTEN),参与人黑色素瘤的侵袭转移。而非小细胞肺癌组织中的PTEN蛋白确实与肺癌的发生发展有关^[11-12]。

PTEN是具有磷酸酶活性的抑癌基因,可抑制磷脂酰肌醇3激酶(PI3K)对下游靶蛋白的磷酸化作用,阻断蛋白激酶B(Akt)活化,抑制p-Akt激活下游蛋白,并诱导细胞凋亡,抑制肿瘤浸润、转移,是通路中的负性调节因子,PTEN在肺癌发生发展中具有重要作用^[13-14]。miRNA-4534直接靶向PTEN及其下游效应子,影响PTEN的负反馈作用,因此过表达miRNA-4534对肺癌患者产生不良影响。当然,本研究样本量稍小,且TNM III/IV期患者占比较多,可能会导致其结果发生偏倚。期待大样本量研究评估miRNA-4534对肺癌的诊断价值,尤其是早期肺癌,以进一步评估miRNA-4534的临床应用价值。

本研究随访3年患者总生存率略低于胡立红等^[15]学者的研究随访结果。且本研究中肺癌患者TNM III/IV期占比高,这可能是患者整体预后情况不佳的原因。研究还发现,miRNA-4534高表达组与肺癌预后相关。ROC曲线反映出miRNA-4534在肺癌预后预测中的有效性,且生存时间与miRNA-4534有线性相关性。值得注意的是,ROC曲线显示miRNA-4534诊断肺癌预后不良的最佳临界值为15.69,有一定应用价值,也待进一步研究验证。

综上所述,肺癌患者血清miRNA-4534相对表达量显著上升,与肺癌患者TNM分期和淋巴结转移相关,高表达miRNA-4534者预后更差。miRNA-4534也是诊断肺癌患者发病和预测其预后不良的有效指标。

(下转第1327页)

血清钙离子、ALP及CYFRA21-1对肺癌早期骨转移的预测价值

赵车冬¹ 徐倩² 马婧¹ 张键^{3*}

【摘要】目的 分析血清钙离子、碱性磷酸酶(ALP)及细胞角蛋白19片段抗原21-1(CYFRA21-1)对肺癌早期骨转移的预测价值。**方法** 研究对象为本院肿瘤内科自2017年1月至2019年7月收治的肺癌患者,根据骨转移情况分为骨转移组和无骨转移组,骨转移组根据转移程度分为单发骨转移和多发骨转移两个亚组。采集所有受试者晨间空腹静脉血检测血清钙离子、ALP、CYFRA21-1水平;绘制受试者工作特征(ROC)曲线分析血清钙离子、ALP、CYFRA21-1对肺癌早期骨转移的预测价值。**结果** 127例肺癌患者骨转移发生率为44.88%(57/127),其中腺癌骨转移发生率显著高于鳞癌、小细胞癌、腺鳞癌,差异具有统计学意义($P<0.05$),但鳞癌、小细胞癌、腺鳞癌之间骨转移发生率比较差异无统计学意义($P>0.05$);肺癌骨转移患者血清钙离子、ALP、CYFRA21-1均显著高于肺癌无骨转移患者,差异具有统计学意义($P<0.05$),且多发骨转移患者血清钙离子、ALP、CYFRA21-1显著高于单发骨转移患者,差异具有统计学意义($P<0.05$),单一指标预测时,ALP的曲线下面积(AUC)值最高以 >95.23 U/L为临界值,其预测肺癌早期骨转移的敏感度、特异度分别为57.89%、70.00%;联合预测AUC值上升至0.765,并显著高于单一血清钙离子、ALP及CYFRA21-1,以 >0.459 为临界值,其预测肺癌早期骨转移的灵敏度、特异度分别为70.18%、70.00%。**结论** 单一血清钙离子、ALP及CYFRA21-1预测肺癌早期骨转移时效能欠佳,但联合预测可提升诊断效能,可联合用于肺癌骨转移的早期预警。

【关键词】 血清钙离子;碱性磷酸酶;细胞角蛋白19片段抗原21-1;肺癌;骨转移

Predictive value of serum calcium ions, ALP and CYFRA21-1 for early bone metastases of lung cancer

ZHAO Chedong¹, XU Qian², MA Jing¹, ZHANG Jian^{3*}

(1. Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shanxi, China, 710061; 2. Department of Clinical Laboratory, Xi'an Fourth hospital, Xi'an, Shanxi, China, 710004; 3. Department of Dermatology, the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shanxi, China, 710061)

【ABSTRACT】 Objective To analyze the predictive value of serum calcium ions, alkaline phosphatase (ALP) and cytokeratin 19 fragment 21-1 (CYFRA21-1) for bone metastases of lung cancer. **Methods** Between January 2017 and July 2019, fasting venous blood samples were collected from lung cancer patients treated in the Department of Oncology of our hospital. The serum levels of calcium ion, ALP and CYFRA21-1 were measured. The incidence of bone metastasis in lung cancer patients with different pathological types was compared. The incidences of bone metastases in patients with different pathological

基金项目:西安交通大学第一附属医院院科研发展项目(YK201522)

作者单位:1. 西安交通大学第一附属医院检验科,陕西,西安 710061

2. 西安市第四医院检验科,陕西,西安 710004

3. 西安交通大学第一附属医院皮肤科,陕西,西安 710061

*通信作者:张键, E-mail: yiling10@163.com

types of lung cancer were compared. Serum levels of calcium ion, ALP and CYFRA21-1 were compared between patients with and without bone metastasis, and patients with different degrees of bone metastases. The receiver operating characteristic (ROC) curves were used to analyze the predictive value of serum calcium ion, ALP and CYFRA21-1 in bone metastases from lung cancer. **Results** The incidence of bone metastases in this study was 44.88% (57/127). The incidence of bone metastases from adenocarcinoma was significantly higher than those from squamous cell carcinoma, small cell carcinoma and adenosquamous carcinoma. However, there were no significant differences in the incidences of bone metastases from squamous cell carcinoma, small cell carcinoma and adenosquamous carcinoma ($P>0.05$). Serum levels of calcium ion, ALP and CYFRA21-1 were significantly higher in lung cancer patients with bone metastasis than in those without bone metastasis ($P<0.05$), and significantly higher in patients with multiple bone metastases than in those with single bone metastasis ($P<0.05$). In terms of single index diagnosis, the area under the curve (AUC) of ALP was the largest, with >95.23 U/L as the cut-off value. And its sensitivity and specificity for predicting bone metastases from lung cancer were 57.89% and 70.00%. The AUC of combined prediction was 0.765, significantly larger than that of each index single prediction ($P<0.05$). With >0.459 as the cut-off value, the sensitivity and specificity for predicting bone metastases from lung cancer were 70.18% and 70.00%. **Conclusion** Combined prediction of serum calcium ion, ALP and CYFRA21-1 can improve the prediction efficiency, which is better for early warning of lung cancer bone metastases.

[KEY WORDS] Serum calcium ion; Alkaline phosphatase; Cytokeratin 19 fragment antigen 21-1; Lung cancer; Bone metastasis

肺癌是常见的恶性肿瘤疾病之一,其发病率及死亡率均居恶性肿瘤首位^[1]。研究报道,约57%的患者在首诊时已发生远处转移,其中骨转移便是肺癌常见的远处转移之一,占远处转移的30%~40%^[2]。肺癌骨转移的发生不仅导致疼痛、病理性骨折、瘫痪等骨相关事件(skeletal-related events, SREs),严重影响肺癌患者生活质量,也为社会医疗带来沉重负担,是晚期肺癌死亡率高的因素之一,相关文献报道发生骨转移的肺癌患者中位生存期仅有6~10个月,严重预后不良^[3]。实验室指标检查则以血清肿瘤标志物为主,但部分指标在辅助诊断肺癌骨转移时效能欠佳,如石海蓉等^[4]研究报道神经元特异性烯醇化酶(neuron-specific enolase, NSE)诊断肺癌骨转移的敏感度、特异度分别仅为46.15%、72.00%。血清钙离子、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)及细胞角蛋白19片段抗原21-1(cytokeratin 19 fragment 21-1, CYFRA21-1)也是临床相对常见的肿瘤标志物,其在肺癌骨转移中的临床应用报道并不罕见,但受样本量、研究对象个体差异等多因素影响,不同报道结论也不尽相同^[5-6]。肺癌早期骨转移的实验室指标诊断仍缺乏公认、可供临床推广应用的有效预测指标,本研究着重分析血清钙离子、ALP及CYFRA21-1对肺癌早期骨转移的预测价值,以期对肺癌骨转移的临床诊治提供参考依据,具体报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

研究对象为本院肿瘤内科自2017年1月至2019年7月收治的肺癌患者。纳入标准:①经病理学或细胞学、纤维支气管镜等确诊为肺癌,并有CT等影像学佐证,符合肺癌诊断标准^[7];②病案资料完整能满足研究需求;③随访资料完整。排除标准:①合并骨代谢性疾病;②合并风湿性或骨关节炎病史;③合并原发或继发性骨质疏松。最终纳入127例肺癌患者,其中男79例,女48例;年龄49~84岁,平均(61.22±12.45)岁;腺癌44例、鳞癌38例、小细胞癌27例、腺鳞癌18例。本研究经医院伦理委员会批准,患者及家属签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 血清钙离子、ALP及CYFRA21-1水平检测

采集研究对象晨间空腹静脉血(血样本采集前未接受过肺癌及骨转移相关治疗),应用日立全自动生化分析仪检测患者血清钙(参考值范围2.11~2.52 mmol/L)、血清ALP(45~125 U/L);应用罗氏cobas e602电化学发光全自动免疫分析系统检测血CYFRA21-1水平。

1.2.2 肺癌骨转移诊断

所有患者均给予持续随访,按3个月/次频率接受肿瘤标志物及影像学辅助检查,若经计算机

断层扫描(computed tomography, CT)或正电子发射计算机断层扫描(positron emission tomography, PET)-CT检查明确有骨转移病灶,并经CT、磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)或病理手段明确骨转移的类型及骨转移灶数目即可诊断为骨转移。其中骨转移组根据转移程度分为单发骨转移和多发骨转移两个亚组。

1.3 统计学方法

运用SPSS 19.0软件进行统计分析,计数资料以 $n(\%)$ 描述,行 χ^2 检验;计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 描述,采用 t 检验或单因素方差分析;Logistic回归分析获得联合诊断方程式及预测概率,绘制受试者工作特征(ROC)曲线分析预测价值,曲线下面积值(AUC)值的比较采用Z检验; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肺癌骨转移发生情况比较

127例肺癌患者骨转移发生率为44.88%(57/127),且腺癌(65.91%, 29/44)骨转移发生率显著高于鳞癌(42.11%, 16/38)、小细胞癌(33.33%, 9/27)、腺鳞癌(22.22%, 4/18),差异具有统计学意义($P < 0.05$),但鳞癌、小细胞癌、腺鳞癌比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2 肺癌骨转移与肺癌无骨转移患者血清钙离子、ALP及CYFRA21-1水平比较

肺癌骨转移患者血清钙离子、ALP、CYFRA21-1均显著高于肺癌无骨转移患者,差异具有统计学意义($P < 0.05$),见表1。

2.3 不同骨转移程度的肺癌患者血清钙离子、ALP及CYFRA21-1水平比较

单发骨转移及多发骨转移患者血清钙离子、ALP、CYFRA21-1均显著高于无骨转移患者差异具有统计学意义($P < 0.05$),且多发骨转移患者血清钙离子、ALP、CYFRA21-1显著高于单发骨转移患者,差异具有统计学意义($P < 0.05$),见表2。

表1 肺癌骨转移与肺癌无骨转移患者血清钙离子、ALP及CYFRA21-1水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	血清钙离子 (mmol/L)	ALP (U/L)	CYFRA21-1 (ng/mL)
肺癌骨转移	57	2.61±0.32	107.79±42.32	26.86±8.94
肺癌无骨转移	70	2.48±0.27	78.48±40.16	22.02±6.48
t 值		-2.408	-3.972	-3.414
P 值		0.018	0.000	0.001

表2 不同骨转移程度的肺癌患者血清钙离子、ALP及CYFRA21-1水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	血清钙离子 (mmol/L)	ALP (U/L)	CYFRA21-1 (ng/mL)
单发骨转移	12	2.65±0.32	96.11±36.92	21.89±8.56
多发骨转移	45	2.71±0.22	118.19±44.86 ^{ab}	28.58±7.71
肺癌无骨转移	70	2.48±0.27	78.48±40.16	22.02±6.48
F 值		11.600	16.936	12.447
P 值		0.000	0.000	0.000

2.4 血清钙离子、ALP及CYFRA21-1水平对肺癌早期骨转移的预测价值

单一指标预测时ALP的AUC值最高,以 > 95.23 U/L为临界值,其预测肺癌早期骨转移的敏感度、特异度分别为57.89%、70.00%; Logistic回归分析获得血清钙离子、ALP及CYFRA21-1联合诊断方程式及联合预测概率,方程式 $Log(P) = -8.310 + 1.698 * \text{血清钙离子} + 0.682 * \text{ALP} + 0.661 * \text{CYFRA21-1}$;联合预测时AUC值高于单一血清钙离子、ALP及CYFRA21-1,敏感度、特异度分别为70.18%、70.00%,见表3、表4、图1。

3 讨论

骨转移作为肺癌严重预后不良的重要因素,受不同时期骨扫描设备的敏感性,当前文献所报

表3 血清钙离子、ALP、CYFRA21-1水平及其联合对肺癌骨转移的诊断价值

变量	AUC	95%CI	Z值	约登指数	临界值	敏感度(%)	特异度(%)	P 值
血清钙离子	0.611	0.520~0.696	2.182	0.190	> 2.76 mmol/L	33.33	85.71	0.029
ALP	0.682	0.594~0.762	3.853	0.278	> 95.23 U/L	57.89	70.00	0.000
CYFRA21-1	0.661	0.571~0.742	3.244	0.328	> 25.31 ng/mL	61.40	71.43	0.001
联合	0.765	0.681~0.836	6.334	0.401	> 0.459	70.18	70.00	< 0.001

表4 Logistic 回归分析
Table 4 Logistic regression analysis

变量	B 值	S.E 值	Wald χ^2 值	P 值	Exp(B) 值	95%CI
血清钙离子	1.698	0.703	5.829	0.016	5.465	1.377~21.692
ALP	0.018	0.005	11.899	0.001	1.018	1.008~1.029
CYFRA21-1	0.087	0.029	8.689	0.003	1.091	1.029~1.155
常量	-8.310	2.129	15.234	0.000	0.000	

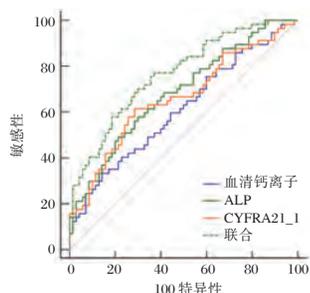


图1 血清钙离子、ALP 及 CYFRA21-1 水平对肺癌骨转移的诊断 ROC 曲线分析

Figure 1 ROC curve analysis of serum calcium, ALP and CYFRA21-1 levels in the diagnosis of bone metastasis of lung cancer

道的肺癌骨转移发生率可达 26%~55%^[8]。许尧等^[9]报道,腺癌与骨转移相关性更显著。分析可能因肺腺癌作为周围型肺癌,更易向血管生长,从而转移至全身其他部位,更易发生远处转移。与本研究结果一致。如何筛查高骨转移风险的患者,并对其进行早期诊治意义重大。但当前临床预测肺癌骨早期转移的手段仍以影像学辅助检查及病理活检为主,前者并不适用于定期监测,反复的影像学检查不仅增加放射风险,也加重疾病经济负担;而后者则为有创性检查,重复性差。探究更便捷经济、可重复性强的肺癌骨转移预测方式十分必要。

研究报道,癌症患者中高钙血症发生率高达 10%~20%,但早期高钙血症症状轻微,极难与最潜在肿瘤或肿瘤治疗相关副作用区分,其病情严重程度与血钙水平及血钙上升速度有关^[10]。本研究结果与李莉等^[11]的报道结论相似,其血清钙离子可作为预测肺癌早期骨转移的指标,但其未进一步绘制 ROC 曲线明确血清钙离子对肺癌骨转移的预测价值。本研究结果与李磊等^[12]的报道结论相似,提示单一血清钙离子预测肺癌早期骨转移效能欠佳。但孙乐等^[13]报道,以 2.47 mmol/L 为血清钙离子预测肺癌早期骨转移的临界值,其预测肺癌早期骨转移的灵敏度、特异度分别高达 71.9%、89.5%。这与本研究结论存在差异,分析造成差异

的主要原因可能与样本个体差异有关,但由此也可见,血清钙离子对肺癌骨转移的预测价值仍有待探究。而 ALP 则来源于肝脏及骨骼,是反映成骨细胞活性的敏感指标。研究指出肺癌转移所引起的骨损害多为溶骨性,合并有骨转移的乳腺癌及肺癌患者中,血清骨形成及骨吸收标志物均可见上升表达,当骨转移发生引起骨受损后成骨细胞会分泌大量碱性磷酸酶以修复受损骨骼^[14-15]。因此,肺癌骨转移患者具更高的 ALP 水平。曹仲年等^[16]也报道,ALP 是肺腺癌全身骨显像骨转移的独立危险因素之一;而车轶群等^[17]报道小细胞肺癌骨转移患者中碱性磷酸酶增高比例达 42.3%。这也为 ALP 用于肺癌骨转移的预测提供了可行性。本研究结果提示 ALP 用于预测肺癌早期骨转移一定效能,但敏感度欠佳。

而 CYFRA21-1 作为非器官特异性肿瘤标志物,其水平不受肺炎、支气管等肺部疾病及年龄、性别、吸烟、妊娠等因素影响,但在肺癌患者中具有明显高表达现象。吴琼等^[18]以 2.23 $\mu\text{g/L}$ 为 CYFRA21-1 临界值,其预测肺癌骨转移的灵敏度高达 85.70%,但特异度仅为 45.85%。本研究结果显示单一血清钙离子、ALP 及 CYFRA21-1 预测肺癌骨转移效能欠佳。因此进一步应用 Logistic 回归分析获得联合预测方程式及预测概率,结果显示联合预测具良好的敏感度及特异性。

综上所述,血清钙离子、ALP 或 CYFRA21-1 可作为肺癌早期骨转移的预测因子,且单一指标作为预测因子时一般出生 ALP 预测效能最佳,但敏感度尚有欠缺;三者联合预测可进一步优化预测效能,临床可将血清钙离子、ALP 或 CYFRA21-1 作为常规随访项目,对联合预测高风险群体加强随访,为肺癌早期骨转移的诊断提供参考。

参考文献

[1] Thakur MK, Ruterbusch JJ, Schwartz AG, et al. Risk of Second Lung Cancer in Patients with Previously Treated Lung Cancer: Analysis of Surveillance, Epidemiology and End Results

- (SEER) Data[J]. *J Thorac Oncol*, 2018, 13(6):e106-e107.
- [2] Wang GS, Chen JY, Ma RF, et al. Effects of zoledronic acid and ibandronate in the treatment of cancer pain in rats with lung cancer combined with bone metastases [J]. *Oncol Lett*, 2018, 16(2):1696-1700.
- [3] 梁委军,覃世逆,袁天柱,等. 蛋白质组学在肺癌相关标志物挖掘中的应用[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2017, 9(4):289-292.
- [4] 石海蓉,张影,陆颖,等. 血清肿瘤标志物在肺癌骨转移诊断中的价值[J]. *中华核医学与分子影像杂志*, 2018, 38(5):331-335.
- [5] Duan L, Pang HL, Chen WJ, et al. The role of GDF15 in bone metastasis of lung adenocarcinoma cells [J]. *Oncol Rep*, 2019, 41(4):2379-2388.
- [6] 孟超,汤传昊,梁军. 肺癌骨转移诊断标记物研究进展[J]. *中国肺癌杂志*, 2018, 21(8):51-55.
- [7] 支修益,石远凯,于金明. 中国原发性肺癌诊疗规范(2015年版)[J]. *中华肿瘤杂志*, 2015, 37(1):67-78.
- [8] 曹亚男,李晶晶,张航,等. 肺癌骨转移患者血清和转移灶中 LCN2 和 PDGF-BB 的检测及意义[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2019, 35(2):187-191.
- [9] 许尧,张超,郭旭,等. 肺癌不同病理类型与骨转移临床特征相关性研究[J]. *中华骨科杂志*, 2019, 39(6):329-335.
- [10] 王晓彤. 应用放射核素显像在骨转移癌患者诊断和治疗过程中的疗效分析[J]. *山西医药杂志*, 2017, 46(5):551-553.
- [11] 李莉,陈保锦,刘志武,等. 肺癌与肺癌骨转移患者血清 ODF、OCIF 及 Ca 水平的研究[J]. *检验医学与临床*, 2018, 15(10):1475-1477.
- [12] 李磊,李殿明. 血清碱性磷酸酶和血清钙水平测定对原发性肺癌骨转移的临床诊断价值[J]. *蚌埠医学院学报*, 2017, 42(2):158-161.
- [13] 孙乐,鲍扬漪. 血清 CEA、CYFRA21-1、CA125、Ca²⁺、ALP 水平检测对肺癌骨转移的临床诊断价值[J]. *检验医学与临床*, 2019, 16(9):54-57, 61.
- [14] 韩丽敏,魏丽荣,杜玉珍. 骨代谢标志物 tPINP 和 β -CTx 及 BAP 在肺癌骨转移中的临床应用[J]. *中华检验医学杂志*, 2017, 40(11):860-864.
- [15] 王善容,丁月云,朱宗平,等. SPECT/CT 融合骨显像诊断肺癌单发骨转移的价值[J]. *山东大学学报(医学版)*, 2018, 56(2):41-46.
- [16] 曹仲年,郑容,魏正茂,等. 肿瘤标志物和肺门淋巴结与肺腺癌全身骨显像骨转移的关系[J]. *肿瘤防治研究*, 2019, 46(2):51-54.
- [17] 车铁群,罗扬,王迪,等. 小细胞肺癌骨髓转移患者的临床分析[J]. *中国肺癌杂志*, 2018, 21(5):403-407.
- [18] 吴琼,马海洋,王雪臣,等. 血清肿瘤标志物在非小细胞肺癌骨转移中的诊断价值[J]. *国际肿瘤学杂志*, 2018, 45(6):337-340.

(上接第 1322 页)

参考文献

- [1] 李君强,蒋茂芬,唐晶晶,等. LASP-1 蛋白在非小细胞肺癌中的表达及其临床病理特征的相关性分析[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2019, 11(3):219-223.
- [2] 黄秋萍,袁欢,王宜林,等. miRNA 对自然杀伤细胞生长发育及功能的调控作用[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2019, 11(1):63-67.
- [3] 何艳玲,涂红缨. miRNA 与非小细胞肺癌诊治相关性的研究进展[J]. *山东医药*, 2017, 57(4):110-112.
- [4] Jima DD, Zhang J, Jacobs C, et al. Deep sequencing of the small RNA transcriptome of normal and malignant human B cells identifies hundreds of novel microRNAs [J]. *Blood*, 2010, 116(23):e118-e127.
- [5] 支修益,石远凯,于金明. 中国原发性肺癌诊疗规范(2015年版)[J]. *中华肿瘤杂志*, 2015, 37(1):67-78.
- [6] 吴伟东,丁锋,易永盛,等. 非小细胞肺癌患者血浆 miRNA-506 水平变化及其意义[J]. *山东医药*, 2017, 57(23):55-57.
- [7] Jiang Z, Zhang Y, Chen X, et al. Long noncoding RNA RBMS3-AS3 acts as a microRNA-4534 sponge to inhibit the progression of prostate cancer by upregulating VASH1 [J]. *Gene Ther*, 2019, 11(10):1016-1034.
- [8] 薛淑萍,俞婷婷,单莉. 血管抑制蛋白 VASH1 在 NSCLC 中的表达及意义[J]. *实用肿瘤杂志*, 2016, 31(2):140-144.
- [9] Nip H, Dar AA, Saini S, et al. Oncogenic microRNA-4534 regulates PTEN pathway in prostate cancer [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(42):68371-68384.
- [10] 严淑,谷大为,陈志敏,等. 甘草素通过调控 miRNA 抑制人黑色素瘤 A375 细胞的侵袭转移[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2015, 35(2):263-269.
- [11] 易华. VASH-1 在恶性肿瘤中的研究进展[J]. *内蒙古医学杂志*, 2016, 48(4):444-446.
- [12] 郭志强,钱正宇,米小芳,等. PTEN 和 mTOR 在非小细胞肺癌中的表达及意义[J]. *山西医科大学学报*, 2018, 49(6):602-605.
- [13] 许浩然,何世杰,孙亚东,等. 非小细胞肺癌组织 PTEN、p-Akt 及 p-mTOR 的表达及意义[J]. *广东医学*, 2018, 39(5):710-716.
- [14] 杨军峰,赵璞,张全,等. PTEN 蛋白缺失与 PI3K 抑制剂对非小细胞肺癌的作用[J]. *中国老年学杂志*, 2018, 38(23):5783-5786.
- [15] 胡立红,俞芳,田欢栋,等. 老年人非小细胞肺癌组织中 III β 微管蛋白和磷酸化塌陷反应介导蛋白 2 表达与化疗预后的关系[J]. *中华老年医学杂志*, 2017, 36(10):1069-1074.

β-arrestin2、RBP4 及 FGF-21 在 2 型糖尿病足中的表达及与糖脂代谢的关系研究

李刚^{1*} 籍胤奎² 冯延冰³ 高毅⁴ 宋晓飞¹ 李松⁵

【摘要】 目的 研究β抑制蛋白2(β-arrestin2)、视黄醇结合蛋白4(RBP4)及视黄醇结合蛋白4(RBP4)在2型糖尿病足中的表达及与糖脂代谢的关系。方法 选取2018年7月至2019年7月于本院接受诊治的117例2型糖尿病患者临床资料,其中合并2型糖尿病足者59例(A组),未合并糖尿病足者58例(B组),同时纳入同期55例于本院接受健康体检者作为对照组。比较3组β-arrestin2、RBP4及FGF-21的表达情况,并分析2型糖尿病足患者β-arrestin2、RBP4及FGF-21与糖脂代谢水平的相关性。结果 A组β-arrestin2水平低于B组和对照组,A组RBP4、FGF-21水平高于B组、对照组,差异均具有统计学意义($P<0.05$);A组HbA1c、TC、TG、LDL-C、HOMA-IS、HOMA-IR水平均高于B组和对照组,差异均具有统计学意义($P<0.05$),而3组HDL-C水平比较差异无统计学意义($P>0.05$);血浆β-arrestin2水平与HbA1c、TC、TG、LDL-C、HOMA-IR、BMI、FFA、HOMA-IS水平呈显著负相关($P<0.05$),RBP4、FGF-21水平与HbA1c、TC、TG、LDL-C、HOMA-IR、BMI、FFA、HOMA-IS水平呈显著正相关($P<0.05$)。结论 β-arrestin2、RBP4及FGF-21在2型糖尿病足中均存在异常表达,其水平与糖脂代谢的关系密切,三者均促进2型糖尿病足的病情发展,有望成为2型糖尿病足治疗的新靶点。

【关键词】 β-arrestin2; RBP4; FGF-21; 2型糖尿病足; 糖脂代谢

Expression of β-arrestin2, RBP4 and FGF-21 in type 2 diabetic foot and its relationship with glucose and lipid metabolism

LI Gang^{1*}, JI Yinxi², FENG Yanbing³, GAO Yi⁴, SONG Xiaofei¹, LI Song⁵

(1. Department of Orthopedics, Nanyang Central Hospital, Nanyang, Henan, China, 473000; 2. Department of Endocrine, Nanyang Central Hospital, Nanyang, Henan, China, 473000; 3. Department of Traumatology, Nanyang Central Hospital, Nanyang, Henan, China, 473000; 4. Department of Anesthesiology, Nanyang Central Hospital, Nanyang, Henan, China, 473000; 5. Department of Gynecology, Nanyang Central Hospital, Nanyang, Henan, China, 473000)

【ABSTRACT】 Objective To study the expression of Beta arrestin 2 (β-arrestin2), retinol binding protein 4 (RBP4) and FGF-21 in type 2 diabetic foot and its relationship with glucose and lipid metabolism. Method The clinical data of 117 patients with type 2 diabetes who were diagnosed and treated in our hospital from July 2018 to July 2019 were analyzed retrospectively. 59 patients with type 2 diabetic foot were regarded as group A and 58 patients without diabetic foot were regarded as group B. At the same time, 55 patients who

基金项目:河南省医学科技攻关计划项目(201902218)

作者单位:1. 南阳市中心医院骨科,河南,南阳 473000

2. 南阳市中心医院内分泌科,河南,南阳 473000

3. 南阳市中心医院创伤外科,河南,南阳 473000

4. 南阳市中心医院麻醉科,河南,南阳 473000

5. 南阳市中心医院妇科,河南,南阳 473000

*通信作者:李刚, E-mail: lp914tvsk@sina.cn

underwent a physical examination in our hospital were included as the control group. The levels of β -arrestin2, RBP4 and FGF-21 in 3 groups were compared, and the correlation between β -arrestin2, RBP4 and FGF-21 and glucose and lipid metabolism in patients with type 2 diabetic foot was analyzed. **Results** The level of β -arrestin2 in the group A was lower than that of the group B and the control group, and the levels of RBP4 and FGF-21 in the group A were higher than those of the group B and the control group. The difference was statistically significant ($P<0.05$). The levels of HbA1c, TC, TG, LDL-C, HOMA-IS, and HOMA-IR in the group A were higher than those in the group B and the control group, and the differences were statistically significant ($P<0.05$), while the levels of HDL-C in the three groups were no significantly difference ($P>0.05$). Plasma β -arrestin2 levels were significantly negatively correlated with HbA1c, TC, TG, LDL-C, HOMA-IR, BMI, FFA, and HOMA-IS levels ($P<0.05$). The levels of RBP4 and FGF-21 were significantly positively correlated with the levels of HbA1c, TC, TG, LDL-C, HOMA-IR, BMI, FFA, and HOMA-IS ($P<0.05$). **Conclusion** β -arrestin2, RBP4 and FGF-21 are abnormally expressed in type 2 diabetic foot, and their levels are closely related to the metabolism of glucose and lipid. All three promote the development of type 2 diabetic foot and are expected to become a new target in the treatment of type 2 diabetic foot.

[KEY WORDS] β -arrestin2; RBP4; FGF-21; Type 2 diabetic foot; Glucose and lipid metabolism

2型糖尿病指由于遗传或环境因素引起胰岛素分泌不足和(或)胰岛素抵抗,导致血糖水平增高的一种慢性病。糖尿病患者因周围神经病变与外周血管疾病合并过高的机械压力,可引起足部软组织及骨关节系统的破坏与畸形形成,进而引发一系列足部问题^[1]。 β 抑制蛋白2(beta arrestin 2, β -arrestin2)是抑制蛋白家族成员,不仅参与调节G蛋白偶联受体的脱敏和内化,还可作为支架蛋白转导信号通路,通过多个途径参与免疫调节^[2]。视黄醇结合蛋白4(retinol binding protein 4, RBP4)是一个新发现的脂肪因子,在脂肪组织表达和分泌,参与胰岛素抵抗的发生^[3]。成纤维细胞生长因子-21(Fibroblast growth factor 21, FGF21)属成纤维细胞生长因子家族,可在肝脏中特异性表达,可调节血糖、胰高血糖素水平以及胰岛 β 细胞功能^[4]。本研究对 β -arrestin2、RBP4及FGF-21在2型糖尿病足中的表达及与糖脂代谢的关系进行研究,为临床防治糖尿病足提供依据,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

分析2018年7月至2019年7月于本院接受诊治的117例2型糖尿病患者临床资料,其中合并2型糖尿病足者(A组)59例,未合并糖尿病足者(B组)58例;同时纳入同期55例于本院接受健康体检者作为对照组,所有研究对象临床资料完整。各组一般资料(性别、年龄等)比较差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性,见表1。

表1 3组一般资料比较($\bar{x}\pm s$)
Table 1 Comparison of general data between 3 groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	性别 (男/女)	年龄	居住区域 (城市/ 乡镇)	腰臀比
A组	59	24/35	48.59±5.71	36/23	0.80±0.13
B组	58	25/33	49.19±5.54	34/24	0.82±0.11
对照组	55	23/32	48.91±5.33	33/22	0.81±0.15
χ^2/F 值		0.071	0.170	0.070	0.340
P值		0.965	0.842	0.965	0.710

纳入标准:①年龄18~60岁;②符合世界卫生组织2型糖尿病及糖尿病足诊断标准^[5];③既往无降糖药物治疗,亦未控制饮食;④肾功能无明显异常;⑤排除1型糖尿病、继发糖尿病、妊娠糖尿病;⑥未合并其他自身免疫系统疾病、恶性肿瘤等。

1.2 方法

采集所有研究对象清晨空腹静脉血6 mL,分为两管,其中一管离心(3 200 r/min, 6 min, 半径8厘米)取上清液,置于40℃冰箱中待测。采用酶联免疫吸附试验检测 β -arrestin2、RBP4及FGF-21水平。严格遵守试剂盒(上海雅培生物科技有限公司,批号分别为160123、20151106、20151123)说明书进行。另一管采用美国BECKMAN CX8型全自动生化分析仪检测空腹血糖(fasting blood-glucose, FPG)、空腹胰岛素(fasting insulin, FINS)、糖化血红蛋白(glycated hemoglobin, HbA1c)及高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDL-C)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol,

in, LDL-C)、甘油三脂(tri-glyceride, TG)。并计算胰岛素抵抗指数(HOMA-insulin resistance index, HOMA-IR)=FPG×FINS/22.5, 胰岛素分泌指数(HOMA-βcell secretion index, HOMA-IS)=[20×FINS]/[FPG-3.5]。

1.3 统计学方法

采用SPSS 18.0软件进行统计分析,计数资料以n(%)表示,采用χ²检验,计量资料采用($\bar{x} \pm s$)表示,两组间行t检验,多组间行方差分析;以P<0.05为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 3组β-arrestin2、RBP4及FGF-21表达情况比较

A组β-arrestin2水平低于B组和对照组,差异具有统计学意义(P<0.05),A组RBP4、FGF-21水平均高于B组和对照组,差异具有统计学意义(P<0.05),见表2。

表2 3组β-arrestin2、RBP4及FGF-21表达情况比较($\bar{x} \pm s$)
Table 2 Comparison of expression of β-arrestin2, RBP4 and FGF-21 in 3 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	β-arrestin2 (pg/ML)	RBP4 (ng/ML)	FGF-21
A组	59	254.36±20.13	22.65±1.79	2.35±0.74
B组	58	313.56±19.63 ^{ab}	16.71±3.15 ^{ab}	1.83±0.59 ^{ab}
对照组	55	385.21±18.95 ^a	13.57±4.51 ^a	1.13±0.56 ^a
F值		635.74	111.48	52.46
P值		<0.001	<0.001	<0.001

注:a是与A组比较,P<0.05;b是与对照组比较,P<0.05。

2.2 3组糖脂代谢水平比较

A组HbA1c、TC、TG、LDL-C、HOMA-IS、HOMA-IR水平均高于B组和对照组,差异具有统计学意义(P<0.05),而3组HDL-C水平比较差异无统计学意义(P>0.05),见表3。

2.3 2型糖尿病足患者β-arrestin2、RBP4及FGF-21与糖脂代谢水平的相关性

血浆β-arrestin2水平与HbA1c、TC、TG、LDL-C、HOMA-IR、BMI、FFA、HOMA-IS水平呈显著负相关(P<0.05),RBP4、FGF-21水平与HbA1c、TC、TG、LDL-C、HOMA-IR、BMI、FFA、HOMA-IS水平呈显著正相关(P<0.05),见表4。

3 讨论

糖尿病足是2型糖尿病患者最严重的慢性并发症之一,是周围血管病变和神经病变共同作用的结局^[6]。随着病程的增加,患者截肢的风险亦逐渐增加,早期识别糖尿病患者发生足部病变的高危因素并以此为靶点进行干预治疗,对预防糖尿病足的形成、降低患者截肢率有重要意义^[7]。

杨越等^[8]认为胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)所致的糖代谢和脂代谢紊乱与2型糖尿病的发生息息相关,其中高脂血症对血管内皮细胞的损伤表现为改变内皮细胞的抗凝血功能,导致内皮依赖型舒张功能下降和大动脉超微结构的改变,可加速糖尿病足的形成。而IR与胰岛素受体的数目及胰岛素的亲和力有关,由于2型糖尿病足患者

表3 3组糖脂代谢水平比较($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of glucose and lipid metabolism levels in the three groups ($\bar{x} \pm s$)

指标	A组(n=59)	B组(n=58)	对照组(n=55)	F值	P值
TC(mmol/L)	6.59±1.15	5.39±0.63 ^{ab}	4.53±0.79 ^a	77.77	<0.001
TG(mmol/L)	3.57±0.79	2.21±0.51 ^{ab}	1.37±0.56 ^a	175.57	<0.001
HDL-C(mmol/L)	1.35±0.31	1.39±0.16	1.31±0.36	1.09	0.339
LDL-C(mmol/L)	4.89±0.57	3.27±0.23 ^{ab}	2.34±0.19 ^a	677.64	<0.001
HbA1c(%)	6.69±1.21	5.57±0.31 ^{ab}	4.93±0.17 ^a	83.62	<0.001
HOMA-IS	4.91±0.85	2.75±0.63 ^{ab}	1.78±0.31 ^a	357.68	<0.001
HOMA-IR	9.85±1.34	5.97±1.52 ^{ab}	3.31±1.27 ^a	323.86	<0.001

注:a是与A组比较,P<0.05;b是与对照组比较,P<0.05。

表4 2型糖尿病足患者β-arrestin2、RBP4及FGF-21与糖脂代谢水平的相关性分析

Table 4 Correlation analysis of β-arrestin2, RBP4 and FGF-21 with glucose and lipid metabolism in type 2 diabetic foot patients

自变量	HbA1c		TC		TG		LDL-C		HOMA-IR		HOMA-IR		FFA		HOMA-IS	
	r值	P值	r值	P值	r值	P值	r值	P值	r值	P值	r值	P值	r值	P值	r值	P值
β-arrestin2	-0.715	0.011	-0.631	0.007	-0.745	0.005	-0.764	0.009	-0.957	0.016	-0.871	0.011	-0.613	0.006	-0.736	0.003
RBP4	0.981	0.034	0.798	0.021	0.746	0.004	0.613	0.01	0.657	0.013	0.941	0.035	0.641	0.004	0.671	0.001
FGF-21	0.798	0.035	0.971	0.043	0.461	0.001	0.715	0.023	0.795	0.015	0.794	0.005	0.785	0.013	0.639	0.004

的胰岛素受体不足,可导致胰岛素无法充分发挥其正常的生理效应,引起抵抗素分泌增加及血脂代谢异常^[9]。本研究结果提示2型糖尿病足患者血脂代谢紊乱。

FGF家族参与机体一系列生理功能调节,在胚胎发育、细胞生长、器官形成、组织修复等多方面均发挥重要作用^[10]。FGF-21作为新近发现的肝-脂肪源细胞因子,具有增强胰岛素敏感性,改善 β 细胞功能,降低血糖和血脂等作用,已成为研究糖尿病及相关并发症的焦点^[11]。由于糖尿病患者存在代谢紊乱,血糖和血脂水平异常增高,并且损伤血管内皮细胞,从而失代偿性地促进FGF-2的合成与分泌^[12]。本研究结果与张楠等^[13]研究结果相似,提示脂肪组织所分泌的FGF-21可通过抑制胰岛素敏感器官功能,从而影响糖脂代谢和IR的发生。

Arrestin家族是一类信号调控蛋白, β -arrestin2属其中一类,可广泛表达于各组织中。以往认为, β -arrestin2主要是G蛋白偶联受体传导通路的负调节因子,而近年来研究发现其可通过调节细胞增殖、凋亡和免疫应答,在调节免疫功能中发挥重要作用,进而参与免疫相关疾病的发展^[14]。张珍等^[15]发现 β -arrestin2水平在糖尿病小鼠模型中严重下降,当给予小鼠相关 β -arrestin2干预后,小鼠的胰岛素敏感性得到恢复,其认为在胰岛素刺激下, β -arrestin2可完成胰岛素信号传递。本研究结果证明 β -arrestin2下调是胰岛素抵抗发生的重要因素,可促进2型糖尿病足的发生和发展。

RBP4属于视黄醇结合蛋白家族成员,可通过干预胰岛素受体的IRS1-Ras-MAPK信号传导通路,参与2型糖尿病患者机体内胰岛素抵抗,因此其表达情况与糖尿病足等多种血管病变并发症的发生关系密切^[16]。赵亮等^[17]发现,2型糖尿病足患者RBP4水平存在异常,并与感染的严重程度有关,这与本研究结果相似,提示RBP4可作为预测糖尿病患者发生糖尿病足的指标之一,对于评估糖尿病足患者病情、评价疗效及判断预后具有重要意义。

综上所述, β -arrestin2、RBP4及FGF-21在2型糖尿病足中均存在异常表达,其水平与糖脂代谢的关系密切,三者均促进2型糖尿病足的病情发展,有望成为2型糖尿病足治疗的新靶点。

参考文献

[1] 李长岭,张东铭,王崇贤,付艳琴. 2型糖尿病周围神经病

变相关因素分析[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2018, 10(4): 274-277.

- [2] 薛丽丽,董金华. 妊娠期糖尿病RBP4水平与糖脂代谢指标及新生儿体重的相关性研究[J]. 中华全科医学, 2017, 15(8): 1371-1373.
- [3] Jean-Charles PY, Zhang L, Wu JH, et al. Ubiquitin-specific protease 20 regulates the reciprocal functions of β -Arrestin2 in toll-like receptor 4-promoted nuclear factor κ B (NF κ B) activation[J]. J Biol Chem, 2016, 291(14): 7450.
- [4] 江芳芳,朱艳,胡玲. 初诊2型糖尿病患者血浆成纤维细胞生长因子-21与氧化应激和脂联素的关系及意义[J]. 中国老年学杂志, 2019, 39(1): 34-36.
- [5] Fisher FM, Maratos-Flier E. Understanding the physiology of FGF21[J]. Ann Rev Physiol, 2016, 78(1): 223.
- [6] 詹桂桂,杨少玲,宋潇萌,等. 糖尿病足混合细菌感染特征及影响因素分析[J]. 临床误诊误治, 2018, 31(3): 92-95.
- [7] Lee JTH, Huang Z, Pan K, et al. Adipose-derived lipocalin 14 alleviates hyperglycaemia by suppressing both adipocyte glycerol efflux and hepatic gluconeogenesis in mice[J]. Diabetologia, 2016, 59(3): 604-613.
- [8] 杨越. 早期高脂血症通过Caspase-1-Sirtuin 1通路促进内皮细胞激活[J]. 生理科学进展, 2015, 58(4): 308.
- [9] 鲁莉,魏素敏. 2型糖尿病患者自我管理行为与血糖控制水平的相关性研究[J]. 保健医学研究与实践, 2016, 13(4): 67-68.
- [10] 刘雪峰,张睿. 肾炎康复片联合金天格胶囊对糖尿病肾病患者维生素D-FGF23-Klotho内分泌轴及骨代谢的影响[J]. 解放军医药杂志, 2016, 28(12): 32-36.
- [11] Dominika S, Wojciech P, Bieta C, et al. Changes in liver gene expression and plasma concentration of Rbp4, Fetuin-A, and Fgf21 in sprague-dawley rats subjected to different dietary interventions and bariatric surgery[J]. Biom Res Int, 2018, 18(19): 1-11.
- [12] 余珂坪,王成剑,李里,等. 消渴康颗粒联合甘精胰岛素对糖尿病患者的临床疗效[J]. 中成药, 2019, 41(6): 1272-1276.
- [13] 张楠,姜天,孙莉,等. 2型糖尿病肥胖或超重患者血清成纤维细胞生长因子21水平及其临床价值研究[J]. 中华全科医学, 2018, 21(5): 521-525.
- [14] 沈莹,陆雷群,高平. 2型糖尿病合并非酒精性脂肪肝病血清骨钙素水平及与糖脂代谢的关系[J]. 海南医学院学报, 2019, 25(9): 658-661.
- [15] 张珍,聂小博,杨雪,等. 经典Wnt信号通路在2型糖尿病小鼠周围神经病变中的作用机制研究[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2018, 34(12): 1023.
- [16] Lin WT, Lin PC, Lee CY, et al. Effects of insulin resistance on the association between the circulating retinol-binding protein 4 level and clustering of pediatric cardiometabolic risk factors[J]. Pediatric Diabetes, 2018, 23(19): 1403-1407.
- [17] 赵亮,赵建山,王广霞,等. 糖尿病足溃疡患者血清视黄醇结合蛋白4的水平变化及其临床意义[J]. 中国糖尿病杂志, 2016, 24(7): 626-629.

外周血 miR-23b-3p 表达水平对重症肺炎患儿病情及预后的评估价值

吴英¹ 刘成桂^{2*}

[摘要] 目的 研究外周血 miR-23b-3p 表达水平对重症肺炎患儿病情及预后的评估价值。方法 选择2017年6月至2019年12月期间本院收治的76例重症肺炎患儿作为重症肺炎组、104例普通肺炎患儿作为普通肺炎组,另取同期体检的80例健康儿童作为对照组。采用荧光定量PCR法检测外周血 miR-23b-3p 的表达水平,酶联免疫吸附法检测血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-6(IL-6)、白介素-10(IL-10)的含量,观察28天生存情况并采用KM曲线比较累积生存率的差异、采用ROC曲线分析 miR-23b-3p 预测生存的价值。结果 重症肺炎组患儿外周血 miR-23b-3p 的表达水平低于普通肺炎组及对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);重症肺炎组中低 miR-23b-3p 表达患儿的WBC、ESR、CRP水平、APACHEII评分及血清TNF- α 、IL-6、IL-10的含量均高于高 miR-23b-3p 表达患儿,差异有统计学意义($P<0.05$);28d累积生存率低于高 miR-23b-3p 表达患儿,差异有统计学意义($P<0.05$);ROC曲线分析显示,miR-23b-3p 表达对重症肺炎患儿的28d生存情况具有预测价值。结论 重症肺炎患儿外周血高 miR-23b-3p 低表达与病情加重、炎症反应激活有关,同时也对28天生存预后具有评估价值。

[关键词] 重症肺炎; miR-23b-3p; 炎症反应; 预后; 预测

Evaluation value of peripheral blood miR - 23b - 3p expression level in the condition and prognosis of children with severe pneumonia

WU Ying¹, LIU Chenggui^{2*}

(1. Department of Pediatrics, Chengdu Women and Children's Central Hospital, Chengdu, Sichuan, China, 610074; 2. Department of Laboratory Medicine, Chengdu Women and Children's Central Hospital, Chengdu, Sichuan, China, 610074)

[ABSTRACT] Objective To study the value of peripheral blood miR-23b-3p expression level in evaluating the condition and prognosis of children with severe pneumonia. Methods From June 2017 to December 2019, 180 cases of children with pneumonia were selected, 76 children with severe pneumonia were enrolled in the severe pneumonia group, 104 children with common pneumonia were enrolled in the common pneumonia group, and 80 healthy children in the same period were selected as the control group. The expression of miR-23b-3p in peripheral blood was detected by fluorescence quantitative PCR. The serum contents of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6) and interleukin-10 (IL-10) were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. The 28-day survival was observed. The difference of cumulative survival rate was compared by KM curve, and the value of miR-23b-3p in predicting survival was analyzed by ROC curve. Result The expression level of peripheral blood miR-23b-3p in the severe pneumonia group was lower than that of the common pneumonia group and the control group. The WBC, ESR, CRP levels, APACHE II score,

基金项目:四川省科技计划项目(2019YJ0648)

作者单位:1.成都市妇女儿童中心医院 儿科,四川,成都 610074

2.成都市妇女儿童中心医院 检验科,四川,成都 610074

*通信作者:刘成桂, E-mail:yyjj54232@163.com

serum TNF- α , IL-6, IL-10 contents in children with low miR-23b-3p expression in the severe pneumonia group were higher than those of children with high mir-23b-3p expression, and the 28d cumulative survival rate was lower than that of children with high mir-23b-3p expression. ROC curve analysis showed that mir-23b-3p had predictive value for the 28-day survival of children with severe pneumonia. **Conclusion** the low expression of miR-23b-3p in peripheral blood of children with severe pneumonia is related to the aggravation of the disease and the activation of inflammatory reaction, and it is valuable for evaluating the survival prognosis of 28 days.

[KEY WORDS] severe pneumonia; miR-23b-3p; inflammatory response; prognosis; prediction

肺炎是儿科常见的感染性疾病,部分患儿可进展至重症肺炎,病情危重且进展迅速、并发症多,临床预后较差、死亡率较高^[1]。在临床实践中,准确评估重症肺炎的病情及预后对指导治疗具有重要意义,但目前临床上常用的肺炎评价指标白细胞计数(WBC)、C反应蛋白(CRP)、血沉(ESR)等存在特异性不强的缺点。另外,急性生理和慢性健康状况 II (acute physiology and chronic health evaluation II, APACHE II) 评分虽然在病情评估中展现出积极价值^[2-3],但评价过程较为繁琐,不利于在早期评估病情和预后。微小 RNA (microRNA, miR) 是近些年呼吸系统疾病研究的热点分子,国内戴彩同^[4]关于肺炎的基础研究发现 miR-23b-3p 与肺炎的发病有关。因此,本研究将以重症肺炎患儿为对象,具体分析外周血 miR-23b-3p 表达水平对病情及预后的评估价值。

1 资料与方法

1.1 资料

选择 2017 年 6 月至 2019 年 12 月期间本院收治的 180 例肺炎患儿,将 76 例重症肺炎患儿作为重症肺炎组,其中男性 40 例、女性 36 例,年龄(5.58 \pm 1.02)岁;104 例普通肺炎患儿作为普通肺炎组,其中男性 59 例、女性 45 例,年龄(6.11 \pm 1.21)岁;另取同期体检的 80 例健康儿童作为对照组,其中男性 45 例、女性 35 例,年龄(6.02 \pm 0.94)岁。3 组间一般资料的比较,差异无统计学意义($P>0.05$),具可比性。

入组标准:①符合《儿童社区获得性肺炎管理指南(2013 修订)》中相关的诊断标准^[5];②留取外周抗凝血及血清样本;③临床资料完整。排除标准:①合并支气管哮喘、支气管肺发育不良;②合并先天性疾病;③长期使用激素或免疫抑制药物。

1.2 外周血 miR-23b-3p 表达的检测

取三组受试者的外周抗凝血样本,首先采用

全血 miR 提取试剂盒(北京天根公司)分离外周血中的 miR,而后采用 miR 反转录试剂盒(北京天根公司)将外周血中的 miR 反转录为 cDNA,最后采用 miR 荧光定量 PCR 检测试剂盒(北京天根公司)配置 PCR 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,所用引物分别为 miR-23b-3p 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 $^{\circ}$ C 15 s、60 $^{\circ}$ C 40 s 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(Cycle threshold, Ct),以 U6 为内参,计算 miR-23b-3p 的表达水平。

1.3 血清炎症因子含量的检测

取三组受试者的血清样本,采用酶联免疫吸附法试剂盒(上海酶联公司)检测肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-6 (IL-6)、白介素-10 (IL-10) 的含量的含量,均按照试剂盒说明书进行检测操作。

1.4 重症肺炎患儿预后的评估

追踪重症肺炎患儿的病历资料,根据 28 d 生存情况评估预后,结局包括生存及死亡。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 21.0 软件进行数据统计,计量资料($\bar{x}\pm s$)表示,两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用方差分析、生存情况的比较通过绘制 KM 曲线并进行 Log-rank 检验,miR-23b-3p 预测预后采用 ROC 曲线分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 组受试者外周血 miR-23b-3p 表达水平的比较

3 组受试者外周血 miR-23b-3p 表达水平的比较结果:对照组>普通肺炎组>重症肺炎组,差异有统计学意义($P<0.05$);对照组与普通肺炎组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 1。

表1 3组受试者外周血 miR-23b-3p 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)
Table 1 Comparison of miR-23b-3p expression in peripheral blood of 3 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	miR-23b-3p
重症肺炎组	76	0.60±0.21
普通肺炎组	104	0.89±0.25
对照组	80	0.96±0.22
F 值		94.520
P 值		0.000

2.2 重症肺炎组中不同 miR-23b-3p 表达患儿实验室指标及 APACHEII 评分的比较

表2 重症肺炎组中不同 miR-23b-3p 表达患儿实验室指标及 APACHEII 评分的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of laboratory indexes and APACHE II scores of children with different miR-23b-3p expression in severe pneumonia group ($\bar{x} \pm s$)

miR-23b-3p 表达	n	WBC($\times 10^9/L$)	ESR(mm/h)	CRP(mg/L)	APACHEII 评分(分)
低表达	38	17.27±3.72	45.49±8.39	62.32±11.35	16.47±3.21
高表达	38	12.55±3.02	36.62±6.41	49.83±10.44	12.45±2.26
t 值		6.072	5.179	4.993	6.312
P 值		0.000	0.000	0.000	0.000

表3 重症肺炎组中不同 miR-23b-3p 表达患儿血清炎症因子含量的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of serum inflammatory factors between children with different expression of miR-23b-3p in severe pneumonia group ($\bar{x} \pm s$)

miR-23b-3p 表达	n	TNF- α (ng/mL)	IL-6 (ng/mL)	IL-10 (pg/mL)
低表达	38	52.39±9.39	104.58±22.54	86.68±13.47
高表达	38	43.11±8.37	81.47±16.58	65.47±11.09
t 值		4.548	5.091	7.493
P 值		0.000	0.000	0.000

2.4 重症肺炎组中不同 miR-23b-3p 表达患儿 28 天生存情况的比较

绘制重症肺炎组患儿 28 天生存情况的 KM 曲线并进行 Log-rank 检验,与重症肺炎组中高 miR-23b-3p 表达患儿比较,低 miR-23b-3p 表达患儿 28 天累积生存率明显降低,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 1。

2.5 miR-23b-3p 预测重症肺炎患儿 28 天生存的 ROC 曲线分析

绘制 miR-23b-3p 预测重症肺炎患儿 28 天生存的 ROC 曲线,曲线下面积为 0.6818 (95%CI: 0.5522~0.8115、 $P=0.013$),根据约登指数最大值确定最佳截断值为 0.575,该截断值预测 28 天生存的灵敏度为 72.73%、特异性为 57.14%。见图 2。

与重症肺炎组中高 miR-23b-3p 表达患儿比较,低 miR-23b-3p 表达患儿 WBC、ESR、CRP 水平及 APACHEII 评分均明显增加,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。

2.3 重症肺炎组中不同 miR-23b-3p 表达患儿血清炎症因子含量的比较

与重症肺炎组中高 miR-23b-3p 表达患儿比较,低 miR-23b-3p 表达患儿血清 TNF- α 、IL-6、IL-10 的含量明显增加,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 3。

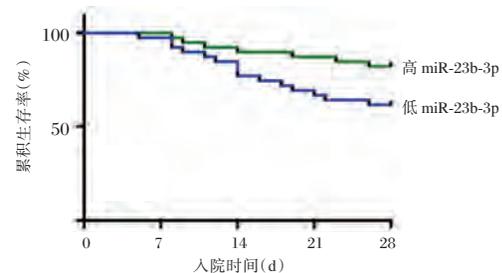


图1 重症肺炎组中不同 miR-23b-3p 表达患儿 28 天生存情况的 KM 曲线

Figure 1 KM curve of 28 day survival of children with different miR-23b-3p expression in severe pneumonia group

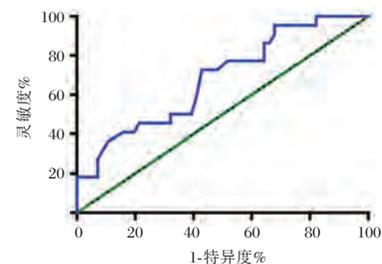


图2 miR-23b-3p 预测重症肺炎患儿 28 天生存的 ROC 曲线

Figure 2 ROC curve of miR-23b-3p in predicting 28 day survival in children with severe pneumonia

3 讨论

重症肺炎是儿科常见的危重症,具有临床救治难度大、病情发展快、预后差、死亡率较高的特

点。多项重症肺炎相关的临床研究发现,高效价血浆治疗、支气管镜肺泡灌洗术等手段能够改善患儿预后、降低死亡率^[6-7]。因此,准确判断重症肺炎的病情严重程度及预后能够为预后不良患儿的早期筛查提供依据,针对预后不良高危患儿开展高效价血浆治疗、支气管镜肺泡灌洗术等治疗预期能够改善预后。但目前临床常用的肺炎评估指标 WBC、CRP、ESR 等的特异性较差、对预后评估的效能也较弱,急需寻找重症肺炎新的病情及预后评估标志物。

miR 是近些年呼吸系统疾病研究的热点,具有广泛的生物学作用,参与体内炎症反应、氧化应激、细胞凋亡等多种生物学环节的调控。多种 miR 在肺炎、哮喘、慢性阻塞性肺疾病动物模型及临床患者中的表达均发生改变^[8-11]。miR 是一种非编码小分子 RNA,能够在转录后水平调节基因表达,进而产生相应的生物学效应,如抗炎、抗氧化、抗凋亡等。miR-23b-3p 是目前已知的一种具有明确抗炎活性的 miR。另有脓毒症相关的细胞实验发现 miR-23b-3p 能够抑制脓毒症诱导的 THP-1 细胞及心肌细胞炎症反应^[12-13]。

根据国内戴彩同^[4]的细胞实验研究,肺炎链球菌感染能够抑制肺泡上皮细胞中 miR-23b-3p 的表达,与本研究发现的重症肺炎患儿外周血中 miR-23b-3p 低表达的趋势一致;过表达 miR-23b-3p 后,肺炎链球菌诱导的肺泡上皮细胞 IL-6、IL-10 释放明显减少。在重症肺炎的发病过程中,体内炎症反应显著激活、多种炎症细胞因子大量释放,已有研究报道重症肺炎患者血清中 TNF- α 、IL-6、IL-10 的含量均明显增加且与病情严重程度有关^[14-17]。

APACHEII 评分是目前临床上评估重症肺炎病情及预后的有效方法,但该量表需要根据入院后 24h 内的各项生命体征及辅助检查进行评分,过程复杂且无法早期评估病情及预后。本研究在发现重症肺炎患儿外周血 miR-23b-3p 表达降低且与病情加重、炎症激活有关后,进一步观察了 miR-23b-3p 对预后的评估价值,通过观察 28 天生存情况来反映预后,经 KM 曲线分析可知:随着外周血 miR-23b-3p 表达减少,重症肺炎患儿的累积生存率明显降低,表明 miR-23b-3p 低表达与重症肺炎患儿预后恶化有关;经 ROC 曲线分析,miR-23b-3p 表达对重症肺炎患儿的 28 天生存情况具有预测价值,由此提示检测 miR-23b-3p 能够为

重症肺炎患儿预后的评估提供依据。

本研究的以上结果表明,重症肺炎患儿外周血高 miR-23b-3p 低表达与病情加重、炎症反应激活有关,同时也对 28 天生存预后具有评估价值,但本研究的样本量较少、今后可继续收集临床病例来验证 miR-23b-3p 在重症肺炎患儿病情及预后评估中的价值,也可设计动物实验来验证 miR-23b-3p 在重症肺炎发病过程中的抗炎及保护作用。

参考文献

- [1] 周丽,蒋鲲,王森,等. 2015-2017年上海市儿童医院重症社区获得性肺炎比例与流行特点[J]. 实用预防医学, 2019, 26(3): 282-285.
- [2] Kida Y, Ohshimo S, Kyo M, et al. Retrospective immunohistological study of autopsied lungs in patients with acute exacerbation of interstitial pneumonia managed with extracorporeal membrane oxygenation[J]. J Thorac Dis, 2019, 11(11): 4436-4443.
- [3] 张慧芳,张雪,沙玉霞,等. 血清及支气管肺泡灌洗液中 sTREM-1 水平、APACHE II 评分及 SOFA 评分对重症肺炎患儿病情及预后评价[J]. 中国当代儿科杂志, 2020, 22(6): 626-631.
- [4] 戴彩同,张少锋,黄玉洁. miR-23b-3p 靶向 PALM3 对肺炎链球菌诱导的肺泡上皮细胞凋亡及炎症因子表达的影响[J]. 中国实验诊断学, 2020, 24(6): 996-1002.
- [5] 中华医学会儿科学分会呼吸学组,《中华儿科杂志》编辑委员会. 儿童社区获得性肺炎管理指南(2013 修订)(上)[J]. 中华儿科杂志, 2013, 51(10): 745-752.
- [6] 彭红艳,陈飞燕,左云龙,等. 高效价血浆治疗重症病毒肺炎患儿临床效果分析[J]. 中华急诊医学杂志, 2020, 29(7): 970-975.
- [7] 储芳芳,王亚亭,毕良学,等. 重症肺炎合并呼吸衰竭患儿的病原学特征及支气管镜肺泡灌洗术的疗效分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2020, 30(8): 1275-1280.
- [8] Herkt CE, Caffrey BE, Surmann K, et al. A MicroRNA Network Controls Legionella pneumophila Replication in Human Macrophages via LGALS8 and MX1 [J]. mBio, 2020, 11(2): e03155-19.
- [9] Bertrams W, Griss K, Han M, et al. Transcriptional analysis identifies potential biomarkers and molecular regulators in pneumonia and COPD exacerbation [J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 241.
- [10] Wu X, Wu C, Gu W, et al. Serum Exosomal MicroRNAs Predict Acute Respiratory Distress Syndrome Events in Patients with Severe Community - Acquired Pneumonia [J]. Biomed Res Int, 2019, 5(2019): 3612020.
- [11] Lee A, Kim SN. Serum MicroRNA on Inflammation: A Literature Review of Mouse Model Studies [J]. Biomarkers, 2020, 17: 1-38.

PCOS 患者 IL-17A、Betatrophin、可溶性 CD68 表达水平及与卵巢功能的关系

席彦东* 沈自旺 白虹

[摘要] **目的** 探究多囊卵巢综合征(PCOS)患者白细胞介素-17A(IL-17A)、Betatrophin、可溶性CD68(sCD68)表达水平及与卵巢功能的关系。**方法** 选取2016年4月至2019年4月本院妇科102例PCOS患者作为研究组,另选同期48例健康体检者作为对照组。比较两组血清IL-17A、Betatrophin、sCD68水平,并比较研究组不同卵巢反应患者临床资料及血清IL-17A、Betatrophin、sCD68水平,探究血清指标、临床指标与促排卵治疗卵巢反应性的相关性及血清指标与临床指标的相关性。**结果** 研究组血清IL-17A、Betatrophin、sCD68水平高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);研究组卵巢低反应患者血清IL-17A、Betatrophin、sCD68水平高于卵巢正常反应患者,差异有统计学意义($P<0.05$);血清IL-17A、Betatrophin、sCD68与胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)、血清黄体生成素(LH)/卵泡刺激素(FSH)、抗缪勒管激素(AMH)间存在正相关关系,差异有统计学意义($P<0.05$);血清IL-17A、Betatrophin、sCD68、HOMA-IR、LH/FSH与卵巢反应性间存在负相关关系,血清AMH与卵巢反应性间存在正相关关系,差异有统计学意义($P<0.05$);控制了HOMA-IR、LH/FSH、AMH等其他因素后,血清IL-17A、Betatrophin、sCD68仍与卵巢反应性显著相关,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** PCOS患者血清IL-17A、Betatrophin、sCD68表达水平明显升高,与患者卵巢功能和胰岛素抵抗关系密切,且与患者促排卵治疗卵巢反应性呈负相关。

[关键词] 多囊卵巢综合征;白细胞介素-17A; Betatrophin;可溶性CD68;卵巢功能

Serum levels of IL-17A, Betatrophin and soluble CD68 in patients with PCOS and their relationship with ovarian function

XI Yandong*, SHEN Ziwan, BAI Hong

(Department of Gynecology, Yinchuan First People's Hospital, Yinchuan, Ningxia, China, 750001)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the serum levels of interleukin-17A (IL-17A), Betatrophin, soluble CD68 (sCD68) in patients with polycystic ovary syndrome (PCOS) and their relationship with ovarian function. **Methods** From April 2016 to April 2019, 102 PCOS patients in the Department of Gynecology of Yinchuan First People's Hospital were selected as the study group, and 48 healthy physical examination patients in the same period were selected as the control group. Serum levels of IL-17A, Betatrophin and sCD68 were compared between the two groups, and clinical data of patients with different ovarian responses in the study group were compared as well as serum levels of IL-17A, Betatrophin and sCD68, to explore the correlation between serum indicators and clinical indicators of ovulation induction and ovarian response, and the correlation between serum indicators and clinical indicators. **Results** The levels of serum IL-17A, Betatrophin and sCD68 in the study group were higher than those in the control group, the difference was statistically significant ($P<0.05$). The serum levels of IL-17A, Betatrophin and sCD68 in patients with low ovarian response in the study group were higher than those with normal ovarian response, and the difference was statistically significant

基金项目:宁夏回族自治区重点研发计划一般项目(2019BEG03041)

作者单位:银川市第一人民医院妇科,宁夏,银川 750001

*通信作者:席彦东, E-mail: mhx1966118@163.com

($P<0.05$). There was a positive correlation between serum IL-17A, Betatrophin, sCD68 and homa-insulin resistance index (HOMA-IR), serum luteinizing hormone (LH)/follicle stimulating hormone (FSH), anti-Müllerian hormone (AMH), the difference was statistically significant ($P<0.05$). There was a negative correlation between serum IL-17A, Betatrophin, sCD68, HOMA-IR, LH/FSH and ovarian reactivity, and a positive correlation between serum AMH and ovarian reactivity, the difference was statistically significant ($P<0.05$). After controlling for HOMA-IR, LH/FSH, AMH and other factors, serum IL-17A, Betatrophin, and sCD68 were still significantly correlated with ovarian reactivity, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** The levels of serum IL-17A, Betatrophin, and sCD68 in PCOS patients are significantly increased, which are closely related to the patient's ovarian function and insulin resistance, and are negatively related to the patient's ovarian response to ovulation induction therapy.

[KEY WORDS] Polycystic ovary syndrome; Interleukin-17A; Betatrophin; Soluble CD68; Ovarian function

多囊卵巢综合征(Polycystic ovarian syndrome, PCOS)是临床常见的女性内分泌疾病,发病率5%~10%^[1]。研究指出,PCOS可增加2型糖尿病、心血管疾病、以及子宫内膜癌的发生风险,严重影响女性身心健康^[2]。PCOS相关病理生理机制研究较多,但目前尚无定论,其中慢性炎症因子与疾病的发生发展密切相关,白细胞介素-17A(Interleukin-17A, IL-17A)被证实可在PCOS患者体内表达增加,可促进疾病进展^[3]。可溶性CD68(Soluble CD68, sCD68)作为单核/巨噬细胞的特异性表面分子标志物,在卵巢型子宫内膜异位症的发生发展中发挥重要作用^[4]。此外,Betatrophin是一种新发现的影响脂质代谢的因子,被认为有调节脂代谢、改善糖耐量的双重作用,在PCOS患者体内表达升高^[5]。基于此,本研究尝试分析PCOS患者选取IL-17A、Betatrophin、sCD68表达水平及与卵巢功能的关系,旨在为临床治疗本病提供数据支持。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2016年4月至2019年4月银川市第一人民医院妇科102例PCOS患者作为研究组,另选同期48例健康体检者作为对照组。纳入标准:①研究组均符合PCOS诊断标准^[6],对照组均为体检结果正常者;②自主行为能力良好,能配合完成研究;③近2个月内未使用过激素类药物、胰岛素和降脂类药物;④月经周期规律;⑤知晓本研究,已签署同意书。排除标准:①精神疾病患者;②恶性肿瘤患者;③血液系统疾病患者;④全身感染性疾病患者;⑤合并卵巢早衰、子宫畸形、宫腔粘连、甲状腺功能异常等疾病者;⑥严重心脑血管肝肾功能不全者。

1.2 方法

研究组均参照相关指南^[7]行促排卵治疗,持续治疗3个月后根据获卵数评估卵巢反应,控制性促超排卵周期获卵数 ≤ 5 个为卵巢低反应,获卵数 >5 个为卵巢正常反应。治疗前,于月经来潮后2~5 d,采集研究对象空腹静脉血6 mL,以3 500 rpm转速离心处理5 min,取血清标本置于 -70°C 冷藏室待检,采用双抗体夹心酶联免疫吸附法检测血清IL-17A、Betatrophin、sCD68水平,试剂盒分别购自苏州浩欧博生物医药有限公司、辽宁迈迪生物科技有限公司、湖南省丽拓生物科技有限公司,检测操作均按照试剂盒说明书进行。

1.3 观察指标

①研究组与对照组血清IL-17A、Betatrophin、sCD68水平。②研究组不同卵巢反应患者临床资料及血清IL-17A、Betatrophin、sCD68水平,临床资料包括年龄、初潮年龄、病程、结婚时间、性生活史、不孕年限、流产史、初潮月经紊乱、家族遗传史、BMI、胰岛素抵抗指数(Homa-insulin resistance, HOMA-IR)、血清黄体生成素(Luteinizing hormone, LH)/卵泡刺激素(Follicle stimulating hormone, FSH)、抗缪勒管激素(Anti-Müllerian hormone, AMH), $\text{HOMA-IR} = \text{空腹血糖} \times \text{空腹胰岛素} / 22.5$;取血清标本,采用化学发光免疫分析法检测血清LH及FSH水平,试剂盒购自深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司,计算LH/FSH值;采用酶联免疫吸附法检测血清AMH水平,试剂盒购自辽宁迈迪生物科技有限公司。③探究血清IL-17A、Betatrophin、sCD68、临床指标与卵巢反应性的相关性,及血清IL-17A、Betatrophin、sCD68与临床指标的相关性。

1.4 统计学方法

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

2 结果

2.1 两组一般资料比较

对比两组年龄、初潮年龄、性生活史、体质指数 (Body Mass Index, BMI)、吸烟和饮酒情况, 比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 两组一般资料比较 [$n(\%), (\bar{x} \pm s)$]
Table 1 Comparison of 2 groups of general data [$n(\%), (\bar{x} \pm s)$]

项目	研究组 ($n=102$)	对照组 ($n=48$)	t/χ^2 值	<i>P</i> 值
年龄(岁)	31.15±4.35	29.86±5.71	1.528	0.129
初潮年龄(岁)	13.48±1.61	13.15±1.49	1.197	0.233
性生活史(年)	5.39±1.09	5.61±1.26	1.096	0.275
BMI(kg/m ²)	25.91±1.77	25.46±1.58	1.502	0.135
吸烟			0.388	0.533
是	26(25.49)	10(20.83)		
否	76(74.51)	38(79.17)		
饮酒			0.558	0.270
是	20(19.61)	7(14.58)		
否	82(80.39)	41(85.42)		

注: 饮酒定义: 每日饮白酒 ≥ 2 两或啤酒 ≥ 2 瓶, 每周饮酒 ≥ 1 次; 吸烟定义: 每天抽烟 ≥ 1 支, 连续吸烟时间 > 6 月。

2.2 研究组与对照组血清 IL-17A、Betatrophin、sCD68 水平

研究组血清 IL-17A、Betatrophin、sCD68 水平较对照组高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 两组血清 IL-17A、Betatrophin、sCD68 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)
Table 2 Comparison of serum IL-17A, Betatrophin and sCD68 levels between the 2 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	IL-17A (pg/mL)	Betatrophin (pg/mL)	sCD68 (μ g/mL)
研究组	102	18.75±3.52	178.34±48.19	2.22±0.41
对照组	48	5.07±1.03	106.12±35.26	1.68±0.30
<i>t</i> 值		26.358	9.274	8.150
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001

2.3 不同卵巢反应患者临床资料

不同卵巢反应性患者 HOMA-IR、血清 LH/FSH、AMH 水平相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 不同卵巢反应患者临床资料 [$n(\%), (\bar{x} \pm s)$]

Table 3 Clinical data of different ovarian responses [$n(\%), (\bar{x} \pm s)$]

资料	卵巢低反应患者 ($n=48$)	卵巢正常反应患者 ($n=54$)	t/χ^2 值	<i>P</i> 值
年龄(岁)	31.56±4.17	30.73±4.52	0.960	0.339
初潮年龄(岁)	13.74±1.59	13.21±1.63	1.658	0.100
病程(年)	3.27±1.02	3.14±1.06	0.629	0.531
性生活史(年)	5.49±1.13	5.28±1.05	0.973	0.333
结婚时间(年)	6.43±1.27	6.17±1.31	1.015	0.313
不孕年限(年)	2.84±0.51	2.75±0.54	0.862	0.391
初潮月经紊乱			0.003	0.959
有	14(29.17)	16(29.63)		
无	34(70.83)	38(70.73)		
流产史			0.060	0.807
有	8(16.67)	10(18.52)		
无	40(83.33)	44(81.48)		
家族遗传史			0.039	0.844
有	16(33.33)	19(35.19)		
无	32(66.67)	35(64.81)		
BMI(kg/m ²)	25.77±1.71	26.04±1.83	0.767	0.445
HOMA-IR	5.53±1.14	3.26±0.82	11.635	<0.001
LH/FSH	1.84±0.30	1.23±0.27	10.809	<0.001
AMH(ng/L)	0.40±0.06	1.53±0.35	22.070	<0.001

2.4 不同卵巢反应患者血清 IL-17A、Betatrophin、sCD68 水平

卵巢低反应患者血清 IL-17A、Betatrophin、sCD68 水平较卵巢正常反应患者高差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 4。

表 4 不同卵巢反应患者血清 IL-17A、Betatrophin、sCD68 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Comparison of serum IL-17A, Betatrophin and sCD68 levels in patients with different ovarian reactions ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	IL-17A (pg/mL)	Betatrophin (pg/mL)	sCD68 (μ g/mL)
卵巢低反应患者	48	23.31±4.72	211.46±53.37	2.57±0.52
卵巢正常反应患者	54	14.70±3.06	148.90±42.08	1.91±0.23
<i>t</i> 值		11.048	6.609	8.447
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001

2.5 血清 IL-17A、Betatrophin、sCD68、临床指标与卵巢反应性的关系

Pearson 相关性分析显示, 血清 IL-17A、Betatrophin、sCD68、HOMA-IR、LH/FSH 与卵巢反应性呈负相关, AMH 与卵巢反应性呈正相关 ($P < 0.05$)。见表 5。

表5 血清IL-17A、Betatrophin、sCD68、临床指标与卵巢反应性的关系

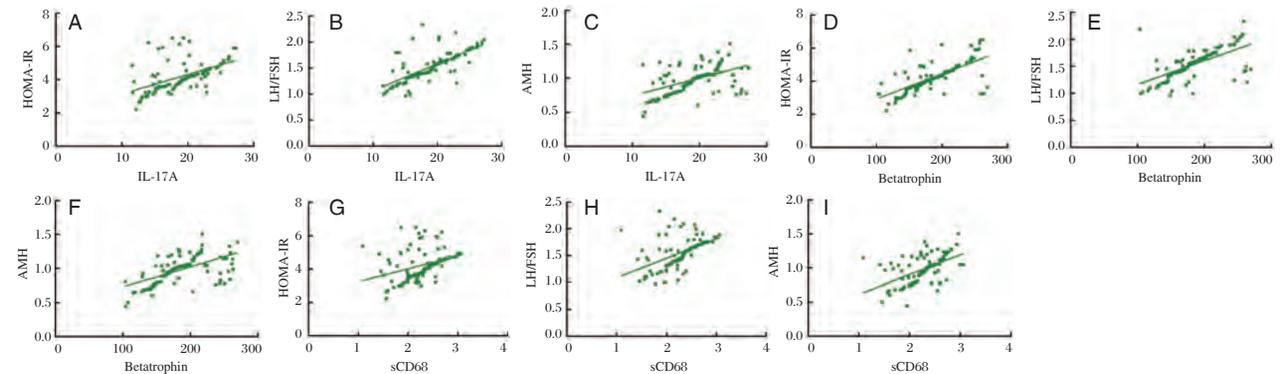
Table 5 Relationship between serum IL-17A, Betatrophin, sCD68, clinical indicators and ovarian reactivity

项目	IL-17A		Betatrophin		sCD68		HOMA-IR		LH/FSH		AMH	
	r值	P值	r值	P值	r值	P值	r值	P值	r值	P值	r值	P值
卵巢反应性	-0.539	<0.001	-0.602	<0.001	-0.497	<0.001	-0.714	<0.001	-0.822	<0.001	0.803	<0.001

2.6 血清IL-17A、Betatrophin、sCD68与临床指标的关系

Pearson相关性分析,血清IL-17A ($r=0.524$ 、

0.725 、 0.514)、Betatrophin ($r=0.695$ 、 0.632 、 0.597)、sCD68 ($r=0.328$ 、 0.485 、 0.540)与HOMA-IR、LH/FSH、AMH呈正相关($P<0.05$),见图1。



注:A为血清IL-17A与HOMA-IR的相关性;B为血清IL-17A与LH/FSH的相关性;C为血清IL-17A与AMH的相关性;D为血清Betatrophin与HOMA-IR的相关性;E为血清Betatrophin与LH/FSH的相关性;F为血清Betatrophin与AMH的相关性;G为血清sCD68与HOMA-IR的相关性;H为血清sCD68与LH/FSH的相关性;I为血清sCD68与AMH的相关性

图1 血清IL-17A、Betatrophin、sCD68与临床指标的关系

Figure 1 Relationship between serum IL-17A, Betatrophin, sCD68 and clinical indicators

2.7 多元线性逐步回归分析

多元线性逐步回归分析,将HOMA-IR、LH/FSH、AMH等其他因素控制后,血清IL-17A、Betatrophin、sCD68仍与卵巢反应性显著相关($P<0.05$),见表6。

表6 多元线性逐步回归分析

Table 6 Multiple linear stepwise regression analysis

因变量	自变量	S.E.	β	t值	P值
卵巢反应性	常量	1.014	-	7.459	<0.001
	IL-17A	0.035	0.606	6.148	<0.001
	Betatrophin	0.048	0.693	8.035	<0.001
	sCD68	0.029	0.711	7.228	<0.001

3 讨论

PCOS受基因遗传和环境因素的共同影响,发病机制复杂,文献报道证实,PCOS患者多数处于一种低度慢性炎症状态,炎症与胰岛素抵抗相互影响,最终共同促进了PCOS的发生与发展^[8-9]。本研究发现,PCOS患者血清IL-17A表达水平明显高于健康体检者,提示PCOS患者处于慢性炎症

状态,与上述研究结论一致。IL-17A水平升高可直接或间接诱导多种细胞因子、趋化因子、炎症因子和抗微生物蛋白识别介导自身免疫和慢性炎症反应,炎症反应增强可促进胰岛素抵抗,从而参与PCOS的发生。研究指出,巨噬细胞广泛分布在女性生殖系统如胎盘、乳腺、子宫、卵巢等组织中,作为免疫系统中能够导致炎症的细胞,其可释放多种炎性因子^[10]。CD68主要在单核细胞、巨噬细胞、粒细胞等细胞中表达,被认为是巨噬细胞最可靠的标记物,广泛应用于检测人体组织中存在的巨噬细胞^[11-12]。本研究发现,PCOS患者血清sCD68水平处于高表达状态,提示血清sCD68表达升高可能参与PCOS的发生。本研究还发现,Betatrophin在PCOS患者血清中呈异常高表达状态,也可能参与PCOS的发生。Betatrophin由Yi P等^[13]于2013年在胰岛素抵抗小鼠模型中首次发现并命名,认为胰岛素抵抗可诱导肝脏合成、分泌Betatrophin。且新近研究显示,Betatrophin可能通过抑制脂肪酶活性,调节脂代谢,从而促进PCOS患者体内的脂代谢紊乱,参与PCOS的发生发展^[14]。

本研究进一步通过相关性分析发现,血清 IL-17A、Betatrophin、sCD68 与 HOMA-IR、LH/FSH、AMH 呈正相关,其中 HOMA-IR 是反映机体胰岛素抵抗的重要措施,LH/FSH、AMH 是反映卵巢功能的主要指标,因此我们认为通过检测血清 IL-17A、Betatrophin、sCD68 表达情况可在一定程度上反映 PCOS 患者胰岛素抵抗及卵巢功能,有助于判断患者病情。促排卵是临床治疗 PCOS 的主要方法之一,治疗前需结合患者具体情况,如病情、卵巢储备功能等,制定治疗方案,以提高卵巢对治疗的反应性,保障卵子回收效率。本研究发现,PCOS 患者血清 IL-17A、Betatrophin、sCD68、HOMA-IR、LH/FSH、AMH 均与卵巢反应性存在密切相关性,且在控制了 HOMA-IR、LH/FSH、AMH 等其他因素后,血清 IL-17A、Betatrophin、sCD68 仍与卵巢反应性显著相关,提示血清 IL-17A、Betatrophin、sCD68 表达水平升高反映出 PCOS 患者存在卵巢低反应性,治疗效果可能较差,应积极调整治疗方案,以改善治疗效果。

参考文献

- [1] 程瑶瑶,李建辉,王淳,等. PCOS 患者 GDF-9、BMP-15、BAX 表达特点及其与卵巢储备功能的相关性[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(2): 225-228, 233.
- [2] 程瑶瑶,李建辉,王淳,等. PCOS 患者 GDF-9、BMP-15、BAX 表达特点及其与卵巢储备功能的相关性[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(2): 225-228, 233.
- [3] 王晶,陈丽,刘春华,等. 血清 IL-17A 水平在多囊卵巢综合征患者中的临床意义[J]. 检验医学, 2018, 33(7): 601-603.
- [4] 吴丹. 内异停联合腹腔镜手术对卵巢型子宫内膜异位症 CD68 及临床疗效的影响[D]. 南京中医药大学, 2016.
- [5] 何俊俊,胡红琳,代芳,等. 初诊多囊卵巢综合征患者血清 Betatrophin 水平及其影响因素[J]. 安徽医学, 2018, 39(2): 166-170.
- [6] Goodman NF, Cobin RH, Futterweit W, et al. American Association of Clinical Endocrinologists, American College of Endocrinology, and Androgen Excess and PCOS Society Disease State Clinical Review: Guide to the Best Practices in the Evaluation and Treatment of Polycystic Ovary Syndrome[J]. Endocr Pract, 2015, 21(12): 1415-1426.
- [7] Smithson DS, Vause TDR, Cheung AP. No. 362 - Ovation Induction in Polycystic Ovary Syndrome[J]. J Obstet Gynaecol Can, 2018, 40(7): 978-987.
- [8] 陈莉,孙梦娇. 多囊卵巢综合征胰岛素抵抗与慢性炎症的相关性研究进展[J]. 中国计划生育学杂志, 2018, 26(8): 750-753.
- [9] Trummer C, Pilz S, Schwetz V, et al. Vitamin D, PCOS and androgens in men: a systematic review[J]. Endocr Connect, 2018, 7(3): R95-R113.
- [10] Qi XY, Zhang BC, Zhao Y, et al. Hyperhomocysteinemia Promotes Insulin Resistance and Adipose Tissue Inflammation in PCOS Mice Through Modulating M2 Macrophage Polarization via Estrogen Suppression[J]. Endocrinology, 2017, 158(5): 1181-1193.
- [11] 韩晨阳,杨毅,李文燕,等. MicroRNA-136 靶向 CD163 抑制 CD68~+CD163~+M2 型巨噬细胞极化的作用研究[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2019, 24(1): 7-14.
- [12] 王芳,相龙全,王海庆,等. 血管瘤样纤维组织细胞瘤病理诊断 2 例并文献复习[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(2): 166-169, 189.
- [13] Yi P, Park JS, Melton D. Betatrophin: A Hormone that Controls Pancreatic β Cell Proliferation[J]. Cell, 2013, 153(4): 747-758.
- [14] 刘师伟,李欣,吴亚茹,等. Betatrophin 与多囊卵巢综合征患者 25 羟基维生素 D3 的关系[J]. 中华健康管理学杂志, 2017, 11(2): 155-160.
- [12] Zhang W, Lu F, Xie Y, et al. miR-23b Negatively Regulates Sepsis-Induced Inflammatory Responses by Targeting ADAM10 in Human THP-1 Monocytes[J]. Med Inflamm, 2019, 31(2019): 5306541.
- [13] Cao C, Zhang Y, Chai Y, et al. Attenuation of Sepsis-Induced Cardiomyopathy by Regulation of MicroRNA-23b Is Mediated Through Targeting of MyD88-Mediated NF- κ B Activation[J]. Inflammation, 2019, 42(3): 973-986.
- [14] Karhu J, Ala-Kokko TI, Vuorinen T, et al. Interleukin-5, interleukin-6, interferon induced protein-10, procalcitonin and C-reactive protein among mechanically ventilated severe community-acquired viral and bacterial pneumonia patients[J]. Cytokine, 2019, 113: 272-276.
- [15] 关敏,白雪梅. 几种常见炎症因子在小儿重症肺炎支原体肺炎中的临床意义[J]. 中国小儿急救医学, 2020, 27(5): 371-374.
- [16] Aliberti S, Morlacchi LC, Faverio P, et al. Serum and exhaled breath condensate inflammatory cytokines in community-acquired pneumonia: a prospective cohort study[J]. Pneumonia (Nathan), 2016, 23(8): 8.
- [17] 郭璇,宋瑶,阿布来提·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): 1069-1073.

(上接第 1335 页)

OSAHS 患者 ADMA、25-羟维生素 D 和 BMI 变化及其与疾病严重程度相关性研究

谭晓纯 尹凤先*

[摘要] 目的 探讨阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征(OSAHS)患者二甲基精氨酸(ADMA)、25-羟维生素 D(25-OHD)及体质指数(BMI)变化与其疾病严重程度相关性。方法 取2018年5月至2019年7月本院 OSAHS 患者 60 例作为观察组,根据呼吸暂停低通气指数(AHI)将 OSAHS 患者分为轻度($5 \text{次/h} \leq \text{AHI} < 20 \text{次/h}$)20例、中度($20 \text{次/h} \leq \text{AHI} < 40 \text{次/h}$)20例、重度($\geq 40 \text{次/h}$)20例,另选取本院同期体检健康人员 35 例作为对照组。检测各组受试者血清 ADMA、25-羟维生素 D 水平,体质指数(BMI),睡眠结构(睡眠潜伏期、总睡眠时间、觉醒总时间、觉醒次数),动脉血气指标[血氧分压(PaO_2)、二氧化碳分压(PaCO_2)、血氧饱和度(SaO_2)、PH 值],呼吸指标“呼吸暂停次数、低通气次数、呼吸暂停低通气指数(AHI)”并收集一般信息和临床资料进行相关性分析。结果 轻中重患者血清二甲基精氨酸(ADMA)、BMI 明显高于对照组,25-羟维生素 D 明显低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$);血气分析:OSAHS 组 PaCO_2 水平高于正常对照组,而 PaO_2 、 SaO_2 、PH 水平低于正常对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$);睡眠结构:睡眠潜伏期、觉醒总时间、觉醒次数大于正常对照组,总睡眠时间小于正常对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$);呼吸指标 OSAHS 组呼吸暂停次数、低通气次数、AHI 明显高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。Pearson 检验相关性分析发现血清 ADMA、BMI 与 OSAHS 患者疾病严重程度正相关,而 25-羟维生素 D 相反, ($P < 0.05$)。结论 ADMA、BMI 的增加和 25-羟维生素 D 的减少可直接导致 OSAHS 的产生和发展,控制改善 ADMA、25-羟维生素 D 和 BMI 对 OSAHS 的防治具有重要意义。

[关键词] 二甲基精氨酸; 25-羟维生素 D; 体质指数; 阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征; 呼吸紊乱指数

Correlation of ADMA, 25-hydroxyvitamin D and BMI with severity of OSAHS

TAN Xiaochun, YIN Fengxian*

(Daxing Teaching Hospital, Capital Medical University, Beijing, China, 102600)

[ABSTRACT] Objective To investigate the correlation between the changes of ADMA, 25-hydroxyvitamin D, body mass index and the severity of obstructive sleep apnea hypopnea syndrome (OSAHS). **Methods** 50 cases of OSAHS patients in Our Hospital from May 2018 to July 2019 were selected as the observation group. According to the apnea hypopnea index (AHI), the patients were divided into mild ($5 \text{ times/h} \leq \text{AHI} < 20 \text{ times/h}$), moderate ($20 \text{ times/h} \leq \text{AHI} < 40 \text{ times/h}$), and severe ($\geq 40 \text{ times/h}$) 17 cases. The levels of serum ADMA, 25-hydroxyvitamin D, body mass index (BMI), sleep structure: sleep latency, total sleep time, total wake-up time, wake-up times, arterial blood gas indicators: PaO_2 , PaCO_2 , SaO_2 , pH value, respiratory indexes: apnea times, hypoventilation times, temporary breathing Apnea hypopnea index (AHI) was used to collect general information and clinical data for correlation analysis. **Results** The serum levels of ADMA and BMI of mild, moderate and severe patients were significantly higher than those of the control

基金项目:大兴区人民医院科研课题任务书(4201926284)

作者单位:首都医科大学大兴教学医院呼吸与危重症医学科,北京 102600

*通信作者:尹凤先, E-mail: yishi20061114@163.com

group, and 25-hydroxyvitamin D was significantly lower than that of the control group, The difference was statistically significant ($P<0.05$); blood gas analysis: the level of PaCO₂ in OSAHS group was higher than that in normal control group, while PaO₂, SaO₂ and pH levels were lower than those in normal control group, the difference was statistically significant ($P<0.05$); sleep structure: sleep latency, total time of awakening and times of awakening were greater than those of normal control group, and total sleep time was shorter than that of normal control group, the difference was statistically significant ($P<0.05$) The number of apnea, times of hypoventilation and AHI in OSAHS group were significantly higher than those in control group ($P<0.05$). Pearson test showed that serum ADMA and BMI were positively correlated with the severity of OSAHS, while 25-hydroxyvitamin D was the opposite. **Conclusion** The increase of ADMA, BMI and the decrease of 25-hydroxyvitamin D can directly lead to the generation and development of OSAHS. It is important to control and improve ADMA, 25-hydroxyvitamin D and BMI for the prevention and treatment of OSAHS.

[KEY WORD] ADMA; 25-hydroxyvitamin D; BMI; OSAHS; AHI

阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征(Obstructive sleep apnea hypopnea syndrome, OSAHS)是一种常见临床睡眠障碍疾病,其主要特征是睡眠期间由于上呼吸道不同部位的狭窄导致的暂时或者持续性的通气障碍^[1-3]。由于 OSAHS 会引起患者嗜睡、自我认知障碍、低氧血症等问题,因此 OSAHS 的早期诊断具有重要的临床意义^[2-4]。研究表明,血管损伤、代谢紊乱、肥胖经常伴随 OSAHS 的发展而产生^[5-6]。二甲基精氨酸(Dimethyl arginine, ADMA)是血管损伤的重要指标、25-羟维生素 D 也是参与人体各项代谢的重要物质,体质指数(body mass index, BMI)被广泛运用于肥胖的诊断。目前针对 OSAHS 的诊断主要为睡眠检测和影像学检测,而针对 ADMA、25-羟维生素 D、BMI 与 OSAHS 关系的研究较少。因此本研究以不同疾病程度的 OSAHS 患者为研究对象,检测各组患者 ADMA、25-羟维生素 D 和 BMI 水平,探讨上述指标与 OSAHS 患者疾病严重程度是否存在相关性,为 OSAHS 的诊断与治疗提供新的途径。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2018 年 5 月至 2019 年 7 月来本院治疗的 OSAHS 患者 60 例,所有患者均符合《阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征诊治指南》OSAHS 诊断标准^[7]。根据暂停低通气指数(AHI)将 OSAHS 患者分为轻、中、重度组各 20 例($5 \text{次/h} \leq \text{AHI} < 20 \text{次/h}$ 、 $20 \text{次/h} \leq \text{AHI} < 40 \text{次/h}$ 、 $\geq 40 \text{次/h}$),选取同期体检健康人员 35 例为对照组。4 组受试者性别、年龄比较,差异无统计学意义($P>0.05$),见表 1。受试患

表 1 4 组受试者一般资料分析($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of general information between the 4 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	性别(男/女)	年龄(岁)
对照组	35	10/10	41.23±3.2
轻度组	20	10/10	40.65±4.3
中度组	20	10/10	41.71±3.7
重度组	20	10/10	42.46±2.8
t/χ ² 值		0.000	0.273
P 值		1.000	0.752

者及家属均签署知情同意书,研究获本院伦理委员会审核批准。

1.2 血清 ADMA、25-羟维生素 D 及 BMI

取各组受试者空腹 8 h 静脉血 3 mL, 36℃、4 000 r/min、30 min 离心,按照 ELISA 试剂盒说明书(碧云天公司)操作检测上层血清 ADMA、25-羟维生素 D 含量;测量受试者身高、体重,采用 BMI 计算公式计算 BMI 指标 [BMI=体重(kg) / 身高(m)×身高(m)]。

1.3 病情相关指标检测

取各组受试者空腹 8 h 动脉血 2 mL,采用用血气分析仪 MB-3100-D 测定血氧分压(Oxygen partial pressure, PaO₂)、二氧化碳分压(Partial pressure of carbon dioxide, PaCO₂)、血氧饱和度(Oxygen saturation, SaO₂)、PH 值等动脉血气指标水平;使用睡眠呼吸监测仪完成整夜监测 AHI、呼吸暂停次数、低通气次数(监测时间≥7 h);采用美国伟康公司 Alice4 多导睡眠图仪监测研究对象的睡眠结构参数:睡眠潜伏期、总睡眠时间、觉醒总时间、觉醒次数。

1.4 统计分析

采用 SPSS 24.0 软件分析各组数据;计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,两两比较采用 t 检验;计数资料采用

$n(\%)$, 比较用 χ^2 检验; 通过 Pearson 检验分析两组数据相关性, $R < 0$ 表示负相关, $R > 0$ 表示正相关, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各项检测数据比较

相比于对照组, 患病组呼吸暂停次数、低通气次数、AHI、睡眠潜伏期、觉醒总时间、觉醒次数明

显增高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 且与 OSAHS 疾病严重程度正相关。血气结果显示, 相对于对照组, 患者组 ADMA、BMI 水平的明显增加, 25-羟维生素 D 的明显减少, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 且与 OSAHS 疾病严重程度相关。血气分析随着患者病情的加重, PaO_2 、 SaO_2 、PH 水平逐步降低, PaCO_2 水平逐步升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。见表 2。

表 2 4 组受试者各项检测指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of various detection indexes among 4 groups of subjects ($\bar{x} \pm s$)

指标	对照组 ($n=35$)	轻度组 ($n=20$)	中度组 ($n=20$)	重度组 ($n=20$)	F 值	P 值
ADMA (ng/mL)	91.11±3.22	117.92±1.34	134.28±2.23	152.12±5.21	11.22	0.00
25-羟维生素 ($\mu\text{g/L}$)	27.55±3.24	20.12±1.22	16.42±5.73	11.37±4.82	12.23	0.00
BMI (kg/m^2)	20.17±1.34	22.34±1.25	24.17±2.31	27.44±1.53	9.34	0.00
PaO_2 (mmHg)	97.42±1.31	90.12±2.17	85.24±3.23	81.56±4.28	8.56	0.00
PaCO_2 (mmHg)	36.23±4.14	40.12±3.17	49.43±4.32	52.33±5.83	11.34	0.00
SaO_2 (%)	97.96±3.24	93.74±2.45	90.45±3.76	84.13±4.33	11.54	0.00
PH	7.38±0.05	7.27±0.09	7.22±0.06	7.11±0.12	7.96	0.00
睡眠潜伏期 (min)	27.62±4.23	34.12±6.75	45.47±5.22	58.92±7.11	12.34	0.00
总睡眠时间 (min)	452.73±51.22	418.23±53.78	340.17±57.47	297.46±61.21	13.46	0.00
觉醒总时间 (min)	56.48±7.11	69.57±6.78	78.67±7.23	92.34±8.32	17.35	0.00
觉醒次数 (次)	5.32±0.72	6.75±0.89	8.76±0.95	9.83±1.04	11.43	0.00
呼吸暂停次数 (次)	159.34±63.72	178.53±57.98	191.47±54.37	214.00±73.12	2.97	0.03
低通气次数 (次)	72.27±17.34	75.44±18.73	84.37±19.47	89.98±23.21	2.74	0.00
AHI (h/次)	24.37±4.56	27.54±3.78	30.17±2.94	32.87±3.57	4.65	0.00

2.2 相关性分析

OSAHS 患者 ADMA、BMI 与 PaO_2 、 SaO_2 、PH、总睡眠时间呈负相关, 与 PaCO_2 、呼吸暂停次数、低通气次数、AHI、睡眠潜伏期、觉醒总时间、觉醒次数呈正相关 ($P < 0.05$); 25-羟维生素 D 与 PaO_2 、 SaO_2 、PH、总睡眠时间呈正相关, 与 PaCO_2 、呼吸暂停次数、低通气次数、AHI、睡眠潜伏期、觉醒总时间、觉醒次数呈负相关 ($P < 0.05$)。见表 3。

3 讨论

阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征是一种常见的临床综合征, 其主要原因是上呼吸道通气功能障碍并伴有中枢调节功能受损, 进而引起呼吸紊乱、睡眠结构异常、呼吸指标异常等。OSAHS 其具体临床表现为总睡眠时间缩短, 浅睡眠时间延长, 深睡眠时间缩短, 严重者深睡眠时间甚至消失, 只存在浅睡眠, 从而导致白天嗜睡等情况^[8-9]。OSAHS 可直接导致 PaO_2 、 SaO_2 、 PaCO_2 等动脉血气指标异常, 造成机体垂体功能减退、甲状腺功能低下等代谢性疾病^[10-11]。由于 OSAHS 的病因复杂,

表 3 受试者血清 ADMA、25-羟维生素 D BMI、与 OSAHS 疾病指标相关性分析

Table 3 Analysis of the correlation between serum ADMA, 25-hydroxyvitamin DBMI and OSAHS disease indexes in subjects

指标	ADMA		25-羟维生素 D		BMI	
	R 值	P 值	R 值	P 值	R 值	P 值
PaO_2	-0.853	0.000	0.714	0.000	-0.356	0.032
PaCO_2	0.736	0.009	-0.588	0.004	0.431	0.031
$\text{SaO}_2\%$	-0.635	0.034	0.743	0.008	-0.511	0.027
PH	-0.546	0.007	0.434	0.011	-0.274	0.015
呼吸暂停次数	0.312	0.031	-0.491	0.024	0.172	0.041
低通气次数	0.218	0.019	-0.374	0.022	0.194	0.024
AHI	0.567	0.000	-0.438	0.000	0.354	0.019
睡眠潜伏期	0.493	0.016	-0.557	0.009	0.263	0.022
总睡眠时间	-0.478	0.008	0.354	0.013	-0.267	0.018
觉醒总时间	0.698	0.007	-0.662	0.005	0.165	0.036
觉醒次数	0.376	0.014	-0.278	0.021	0.245	0.032

早期诊断难度大, 所以优化 OSAHS 的早期诊断, 对 OSAHS 及其并发症的治疗具有重要意义。

研究表明肥胖、ADMA、25-羟维生素 D 变化与呼吸系统、神经系统、内分泌系统等多个系统的病变密切相关^[12]。肥胖患者的咽壁和软腭肥厚, 会导致其松弛, 则会使口咽平面变狭窄造成呼吸气

道改变,造成肺部通气效率的降低,破坏血气平衡。血气失衡可刺激机体可以产生炎症反应,氧化损伤等多种应激反应,造成刺激血液中内源性一氧化氮合酶竞争性抑制剂 ADMA 的升高,ADMA 可直接参与血管内皮功能的失调,破坏肺部血管,影响血氧循环,加重疾病的发展。25-羟维生素 D 作为维生素 D 存在于机体中的主要形式,发挥着免疫调节、代谢调节、抗肿瘤等多种生理功能^[13-14]。当机体血气紊乱发生时,持续性增加的应激反应造成机体炎症因子和氧化标志物的大量产生,这类损伤物极大的消耗了机体 25-羟维生素 D,造成机体 25-羟维生素 D 含量的降低,诱发机体各项代谢的失衡,诸如脂糖代谢紊乱,可造成脂肪的堆积,提升机体 BMI 水平,加速 OSAHS 的产生与发展。因此检测 OSAHS 患者 ADMA、25-羟维生素 D 和 BMI 对 OSAHS 的防治具有一定的临床价值^[15-17]。

本研究探讨三个指标和 OSAHS 患者疾病发展程度的关系。结果说明 OSAHS 患者普遍伴随睡眠结构异常,血气紊乱的发生。检测发现机体脂肪的堆积、血管内皮的损伤以及代谢调节物的消耗会随 OSAHS 病情的加重而上升。通过相关性分析发现 ADMA、BMI 与 PaCO₂、呼吸暂停次数、低通气次数、AHI、睡眠潜伏期、觉醒总时间、觉醒次数呈正相关,但与 PaO₂、SaO₂%、PH、总睡眠时间呈负相关,25-羟维生素 D 相反。由此我们推断 OSAHS 患者所诱发的呼吸结构异常、机体血气指标紊乱可诱导机体 ADMA 的产生、BMI 水平的上升以及 25-羟维生素 D 消耗量的增加。同时机体 ADMA、BMI 水平上升、25-羟维生素 D 水平下降所造成的血管内皮损伤、脂肪堆积、多种代谢紊乱也是加重 OSAHS 病情的重要原因。

综上所述,本研究认为 ADMA、BMI 水平的提高、25-羟维生素 D 水平的减少可能是引起 OSAHS 病程加重的重要原因,但本研究样本量较小,未涉及具体作用机制研究,相关基础研究有待进一步完善。

参考文献

[1] 黄一苇,张昊,李灵真. 成年 OSAHS 患者血清 MIF 水平与病情严重程度相关性及对并发脑梗死的预测价值[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(4): 464-468.

[2] 郭伟民,赵云,陈靖. 尿酸水平与阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征冠心病的相关性研究[J]. 中国药物与临床, 2018, 18(2): 104-105.

[3] Lu X, Wang X, Xu T, et al. Circulating C3 and glucose metabolism abnormalities in patients with OSAHS [J]. *Sleep Breath*, 2018, 22(2): 345-351.

[4] Zeng G, Teng Y, Zhu J, et al. Clinical application of MRI-respiratory gating technology in the evaluation of children with obstructive sleep apnea hypopnea syndrome [J]. *Medicine*, 2018, 97(4): e9680.

[5] Rosen CL. Clinical features of obstructive sleep apnea hypoventilation syndrome in otherwise healthy children [J]. *Pediatr Pulmonol*, 2015, 27(6): 403-409.

[6] Ojeda CE, Pilar DLR, López M, et al. Noninvasive Mechanical Ventilation in Patients with Obesity Hypoventilation Syndrome. Long-term Outcome and Prognostic Factors [J]. *Arch Bronconeumol*, 2015, 51(2): 61-68.

[7] 中华医学会呼吸病学分会睡眠呼吸障碍学组. 阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征诊治指南(2011年修订版)[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2012, 35(1): 9-12.

[8] Zerpa VZ, Llatas MC, Porrás GA, et al. Drug-induced sedation endoscopy versus clinical exploration for the diagnosis of severe upper airway obstruction in OSAHS patients [J]. *Sleep Breath*, 2015, 19(4): 1367-1372.

[9] 孙彩玲,张华钊,孙淑红. 血清 NT-proBNP、D-二聚体、ST2 水平与 COPD 合并呼吸衰竭患者预后的相关性分析[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2020, 12(2): 229-233.

[10] Zhang XQ, Zhao X, Hong PW, et al. Change in Quality of Life of OSAHS Patients with Minimally Invasive Surgery or CPAP Therapy: A 2-year Retrospective, Single-center Parallel-group Study [J]. *Curr Mol Med*, 2020, 20(3): 231-239.

[11] 韩笑,张莉. 阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征早期干预的研究[J]. *中国医学工程*, 2020, 28(1): 33-36.

[12] 唐庆,杨宁,王刚,等. 肥胖与 OSAHS 关系及治疗的研究进展[J]. *临床肺科杂志*, 2016(1): 125-129.

[13] Lee W, Lee HJ, Jang HB, et al. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) is identified as a potential biomarker of insulin resistance in skeletal muscle [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 2133.

[14] Sorrenti V, Giacomo C, Acquaviva R, et al. Blond and blood juice supplementation in high fat diet fed mice: effect on antioxidant status and DDAH/ADMA pathway [J]. *RSC Adv*, 2019, 9(20): 11406-11412.

[15] Tajti G, Papp C, Kardos L, et al. Positive correlation of airway resistance and serum asymmetric dimethylarginine (ADMA) in bronchial asthma patients lacking evidence for systemic inflammation [J]. *Allerg Asthma Clin Immunol*, 2018, 14(1): 2.

[16] 尹晶,陈文涛,郁毅刚. 重症 COPD 患者 IL-33/ST2 比值与血气指标、氧化应激反应程度的相关性分析[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2020, 12(3): 305-308.

[17] Lu X, Wang X, Xu T, et al. Circulating C3 and glucose metabolism abnormalities in patients with OSAHS [J]. *Sleep Breath*, 2018, 22(2): 345-351.

hrHPV E6/E7 mRNA 载量水平与宫颈癌前病变的相关性分析

郭晨辉^{1*} 徐小晶² 孔薇³ 项敏⁴

【摘要】 目的 分析高危型人乳头瘤病毒(hrHPV)E6/E7 mRNA 载量水平与宫颈癌前病变(CIN)的相关性。方法 分析2016年12月到2019年6月本院确诊的176例宫颈病变患者,其中CIN组144例(CIN I级62例,CIN II级45例,CIN III级37例),宫颈癌组32例,另选取同期收治的50例慢性宫颈炎患者为慢性宫颈炎组。无菌采集所有患者宫颈脱落上皮细胞,液基薄层细胞学检测宫颈细胞学贝塞斯达系统(TBS)分级,第二代捕获杂交法检测13种hrHPV DNA 载量水平,支链DNA 检测14种hrHPV E6/E7 mRNA 载量水平;ROC分析hrHPV E6/E7 mRNA 和hrHPV DNA 载量对CIN鉴别诊断的价值;Pearson相关性分析hrHPV E6/E7 mRNA 和hrHPV DNA 载量与CIN病变程度之间的相关性。结果 CIN组和宫颈癌组患者的hrHPV DNA 和hrHPV E6/E7 mRNA 载量明显高于慢性宫颈炎组($P<0.05$),CIN组的hrHPV DNA 和hrHPV E6/E7 mRNA 载量明显低于宫颈癌组($P<0.05$);hrHPV E6/E7 mRNA 鉴别诊断CIN与慢性宫颈炎的AUC为0.816($P<0.05$),hrHPV DNA 载量鉴别诊断CIN与慢性宫颈炎的AUC为0.561($P>0.05$),hrHPV E6/E7 mRNA 和hrHPV DNA 载量鉴别诊断CIN与宫颈癌的AUC分别为0.736和0.698($P<0.05$);随着TBS和CIN分级增加,hrHPV DNA 和hrHPV E6/E7 mRNA 载量呈明显升高趋势($P<0.05$),hrHPV E6/E7 mRNA 和hrHPV DNA 载量均与CIN病变程度具有显著的正相关关系($r=0.285,0.621;P<0.05$)。结论 hrHPV E6/E7 mRNA 载量水平与CIN的病变程度具有显著的相关性,可用于CIN的鉴别诊断和病变评估。

【关键词】 高危型人乳头瘤病毒;宫颈癌前病变;宫颈癌

Correlation analysis between the level of hrHPV E6/E7 mRNA load and cervical intraepithelial neoplasia

GUO Chenhui^{1*}, XU Xiaojing², KONG Wei³, XIANG Min⁴

(1. Department of Otolaryngology, Zhengdong Hospital of The First Affiliated Hospital, Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan, China, 450000; 2. Department of Gynecology, Nanyang Central Hospital, Nanyang, Henan, China, 473000; 3. The Second Ward of Department of Gynecology, Zhengdong Hospital, The First Affiliated Hospital, Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan, China, 450000; 4. The Second Ward of Department of Gynecology, River Hospital, the First Affiliated Hospital, Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan, China, 450000)

【ABSTRACT】 Objective To analyze the correlation between level of high-risk human papilloma virus (hrHPV) E6/E7mRNA load and cervical intraepithelial neoplasia (CIN). Methods A total of 176 patients who were diagnosed with cervical lesions in our hospital from December 2016 to June 2019 were

基金项目:河南省科技发展计划项目(182102310105)

作者单位:1. 郑州大学第一附属医院郑东院区耳科,河南,郑州 450000

2. 南阳市中心医院妇科,河南,南阳 473000

3. 郑州大学第一附属医院郑东院区妇科二病区,河南,郑州 450000

4. 郑州大学第一附属医院河医院区妇科二病区,河南,郑州 450000

*通信作者:郭晨辉, E-mail:longran109@163.com

retrospectively analyzed. Among them, there were 144 cases in CIN group (62 cases at grade I, 45 cases at grade II, 37 cases at grade III) and 32 cases in the cervical cancer group. Another 50 patients with chronic cervicitis who were admitted during the same period were enrolled as the chronic cervicitis group. The cervical deciduous epithelial cells were collected aseptically. The grades of cervical cytology Bethesda System (TBS) were detected by Thinprep cytology test (TCT). The levels of 13 hrHPV DNA loads were detected by hybrid capture- II (HC- II). The levels of the 14 kinds of HrHPV E6/E7 mRNA load were detected by branched-chain DNA. The differential diagnosis values of hrHPV E6/E7 mRNA and hrHPV DNA load in CIN was analyzed by ROC curves. The correlation between hrHPV E6/E7 mRNA, hrHPV DNA load and severity of CIN lesions was analyzed by Pearson correlation analysis. **Results** The hrHPV DNA and hrHPV E6/E7 mRNA load were the highest in the cervical cancer group, followed by the CIN group and the chronic cervicitis group ($P < 0.05$). AUC of hrHPV E6/E7 mRNA for differential diagnosis of CIN and chronic cervicitis was 0.816 ($P < 0.05$), AUC of hrHPV DNA for differential diagnosis of CIN and chronic cervicitis was 0.561 ($P > 0.05$), AUC values of hrHPV E6/E7 mRNA and hrHPV DNA load for differential diagnosis of CIN and cervical cancer were 0.736 and 0.698, respectively ($P < 0.05$). With the increase of TBS and CIN grades, hrHPV DNA and hrHPV E6/E7 mRNA load were significantly increased ($P < 0.05$). Both hrHPV E6/E7 mRNA and hrHPV DNA load were significantly positively correlated with severity of CIN lesions ($r = 0.285, 0.621, P < 0.05$). **Conclusion** The level of hrHPV E6/E7 mRNA load has a significant correlation with the severity of CIN lesions, and can be applied for the differential diagnosis of CIN and lesions assessment.

[KEY WORDS] High-risk human papilloma virus; Cervical intraepithelial neoplasia; Cervical cancer

宫颈癌前病变即宫颈上皮内瘤样病变(cervical intraepithelial neoplasia, CIN)是有癌变倾向,在数年至数十年期间有可能发展为宫颈癌的病变^[1-2]。已有研究显示^[3-4],高危型人乳头瘤病毒(high-risk human papillomavirus, hrHPV)持续感染是导致宫颈癌变的主要危险因素,宫颈癌患者中hrHPV阳性率高达85%~90%。HPV基因组包括早期区、晚期区和非编码区,其中早期区基因E6和E7可以参与病毒自身的复制、转录、翻译等过程,在宫颈癌变中发挥了最主要的作用,可用于宫颈癌的鉴别诊断^[5]。既往研究采用定性检测分析了hrHPV E6/E7 mRNA阳性表达与CIN和宫颈癌之间的关系,及其对CIN和宫颈癌的鉴别诊断^[6]。但hrHPV E6/E7 mRNA载量对CIN的诊断价值,及其与CIN病变程度之间的关系报道较少。因此,本研究定量分析了hrHPV E6/E7 mRNA载量与CIN病变之间的关系,旨在为宫颈癌的预防和治疗提供一定的理论基础。

1 资料与方法

1.1 一般资料

2016年12月到2019年6月本院确诊的176例宫颈病变患者,其中CIN组144例,宫颈癌组32例。CIN组患者年龄25~60岁,平均(40.87±7.62)岁,经产妇98例,未产妇46例,根据CIN分级^[7]: CIN I级62例, CIN II级45例, CIN III级37例。

宫颈癌组患者年龄28~60岁,平均(42.53±8.46)岁,经产妇24例,未产妇8例。另取同期50例慢性宫颈炎患者为慢性宫颈炎组,年龄25~60岁,平均(40.54±8.21)岁,经产妇32例,未产妇18例。3组间的年龄、经产次比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

纳入标准:均经阴道镜下组织病理学检查和宫颈液基薄层细胞学(thinprep cytology test, TCT)检测确诊,符合《宫颈癌防治指南》中CIN和宫颈癌的诊断标准^[8];均未经接受过放化疗治疗,经医院伦理委员会审核通过。排除标准:妊娠期、月经期或哺乳期患者;存在宫颈手术史;入组前2周内服用相关抗病毒药物;合并其他系统恶性肿瘤患者;合并其它免疫系统疾病者;临床资料不完整者。

1.2 方法

①检查前3 d不能性生活、阴道用药或阴道冲洗,避开月经期。将TCT专用刷伸入子宫颈内,顺时针旋转3~5周,收集宫颈脱落上皮细胞,置于采样瓶中,用于TCT、hrHPV DNA和hrHPV E6/E7 mRNA检测。②TCT检测:使用全自动细胞制片机制片,参考2001年TBS分级系统^[9],包括NSIL:无上皮病变或恶性改变;ASC-H:不典型鳞状细胞;ASC-US:意义不明的非典型鳞状细胞;LSIL:低级别鳞状CIN;HSIL:高级别鳞状CIN;SCC:鳞状细胞癌。③hrHPV DNA检测:采用第二代捕获杂交法(hybrid capture- II, HC- II)(美国凯

杰公司)检测 13 种 hrHPV DNA 表达,相对光单位/临床阈值(relative light units/cut off,RLU/CO)表示 HPV 病毒载量,重复检测 2 次取均值。④hrHPV E6/E7 mRNA 检测:采用支链 DNA (Branched-DNA, bDNA)信号扩增法(科蒂亚生物技术公司)检测 14 种 hrHPV E6/E7 mRNA 水平,严格按照试剂盒说明操作。重复检测 2 次取均值。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 22.0 软件对数据进行分析,满足正态分布的计量资料均以($\bar{x} \pm s$)表示,单因素方差分析比较多组间差异,SNK-*q* 比较多组两两间差异;ROC 分析 hrHPV E6/E7 mRNA 和 hrHPV DNA 载量对 CIN 的诊断价值;Pearson 相关性分析 hrHPV E6/E7 mRNA 和 hrHPV DNA 载量与 CIN 病变程度之间的相关性; $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组患者的 hrHPV E6/E7mRNA 和 hrHPV DNA 载量比较

CIN 组和宫颈癌组患者的 hrHPV DNA 和 hrHPV E6/E7 mRNA 载量高于慢性宫颈炎组($P < 0.05$),CIN 组患者的 hrHPV DNA 和 hrHPV E6/E7 mRNA 载量低于宫颈癌组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

表 1 各组患者的 hrHPV E6/E7mRNA 和 hrHPV DNA 载量比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of hrHPV E6/E7mRNA and hrHPV DNA load in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	hrHPV DNA [lg(RLU/CO)]	hrHPV E6/E7 mRNA [lg (copies/mL)]
CIN 组	144	1.76±0.55 ^{ab}	3.04±0.96 ^{ab}
宫颈癌组	21	2.12±0.70 ^a	4.21±1.34 ^a
慢性宫颈炎组	50	1.44±0.46	1.86±0.61
<i>F</i> 值		14.871	60.372
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001

注:与慢性宫颈炎组相比,^a $P < 0.05$;与宫颈癌组相比,^b $P < 0.05$ 。

2.2 hrHPV E6/E7 mRNA 和 hrHPV DNA 载量对 CIN 的诊断价值

hrHPV E6/E7 mRNA 在 CIN 与慢性宫颈炎鉴别诊断中 AUC 为 0.816,95%CI 为 0.719~0.913,具有统计学意义($P < 0.05$),hrHPV DNA 载量在 CIN 与慢性宫颈炎鉴别诊断中 AUC 为 0.561,无统计学意义($P > 0.05$);hrHPV E6/E7 mRNA 和 hrHPV

DNA 载量在 CIN 与宫颈癌鉴别诊断中 AUC 分别为 0.736 和 0.698,95%CI 分别为 0.664~0.808 和 0.615~0.780,具有统计学意义($P < 0.05$),见图 1。

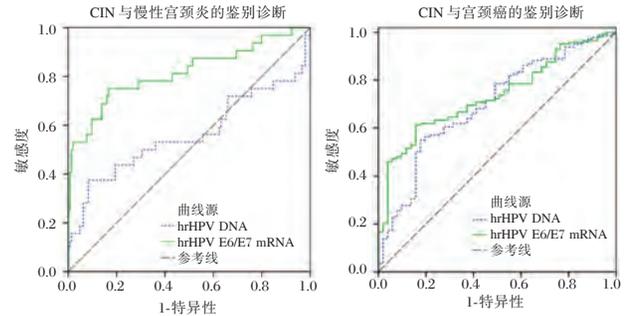


图 1 hrHPV E6/E7 mRNA 和 hrHPV DNA 载量对 CIN 的诊断价值

Figure 1 diagnostic value of hrHPV E6/E7 mRNA and hrHPV DNA load for CIN

2.3 hrHPV E6/E7 mRNA 和 hrHPV DNA 载量与宫颈细胞学 TBS 分级的关系

随着 TBS 分级增加,hrHPV DNA 和 hrHPV E6/E7 mRNA 载量呈升高趋势($P < 0.05$),HSIL 组和宫颈癌组的 hrHPV DNA 和 hrHPV E6/E7 mRNA 载量高于 ASC 组、LSIL 组和 NSIL 组;ASC 组和 LSIL 组的 hrHPV DNA 和 hrHPV E6/E7 mRNA 载量高于 NSIL 组($P < 0.05$)。宫颈癌组和 HSIL 组间差异无统计学意义($P > 0.05$),ASC 组和 LSIL 组间差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 2。

表 2 hrHPV E6/E7 mRNA 和 hrHPV DNA 载量与 TBS 分级的关系 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 relationship between hrHPV E6/E7 mRNA and hrHPV DNA load and TBS grading ($\bar{x} \pm s$)

TBS 分级	<i>n</i>	hrHPV DNA [lg(RLU/CO)]	hrHPV E6/E7 mRNA [lg (copies/mL)]
NILM	90	1.40±0.38	1.65±0.52
ASC	24	1.77±0.56 ^a	3.42±1.08 ^a
LSIL	59	1.82±0.57 ^a	3.54±1.12 ^a
HSIL	32	2.21±0.72 ^{abc}	4.21±1.24 ^{abc}
SCC	21	2.25±0.71 ^{abc}	4.33±1.40 ^{abc}
<i>F</i> 值		87.274	146.539
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001

注:与 NILM 相比,^a $P < 0.05$;与 ASC 相比,^b $P < 0.05$;与 LSIL 相比,^c $P < 0.05$ 。

2.4 hrHPV E6/E7 mRNA 和 hrHPV DNA 载量与 CIN 病变程度的关系

随着 CIN 分级增加,hrHPV DNA 和 hrHPV E6/E7 mRNA 载量呈升高趋势($P < 0.05$),CIN III 级患

者的 hrHPV E6/E7 mRNA 载量高于 CIN I 和 CIN II 期 ($P<0.05$), CIN II 级的 hrHPV E6/E7 mRNA 载量高于 CIN I ($P<0.05$), 见表 3。

表 3 hrHPV E6/E7mRNA 和 hrHPV DNA 载量与 CIN 病变程度的关系 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 relationship between hrHPV E6/E7mRNA and hrHPV DNA load and the degree of CIN lesions ($\bar{x} \pm s$)

CIN 分级	<i>n</i>	hrHPV DNA [lg(RLU/CO)]	hrHPV E6/E7 mRNA [lg (copies/mL)]
CIN I 级	62	1.52±0.48	2.01±0.62
CIN II 级	45	1.78±0.53 ^a	3.24±1.02 ^a
CIN III 级	37	2.03±0.65 ^{ab}	4.12±1.13 ^{ab}
<i>F</i> 值		10.460	66.826
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001

注:与 CIN I 级相比, ^a $P<0.05$;与 CIN II 级相比, ^b $P<0.05$ 。

2.5 hrHPV E6/E7 mRNA 和 hrHPV DNA 载量与 CIN 病变程度之间的相关性关系

Pearson 相关性分析显示, hrHPV E6/E7 mRNA 和 hrHPV DNA 载量均与 CIN 病变程度呈正相关 ($r=0.285, 0.621; P<0.05$)。

3 讨论

CIN 是宫颈非典型增生, hrHPV 持续感染是导致 CIN 发展为宫颈癌的最主要因素。既往研究常采用 hrHPV 感染来辅助临床宫颈癌的筛查, 灵敏度高, 可以作为宫颈癌初筛工具之一^[10]。然而近年来研究显示^[11], 只有宫颈上皮细胞的 hrHPV 持续性感染可能诱发宫颈癌变, 而单纯一过性 hrHPV 感染很难诱导宫颈恶性肿瘤的形成。hrHPV 持续感染受 HPV 病毒的亚型、癌基因活跃程度、宿主免疫应答等多种因素影响, 单纯的 hrHPV 检测无法区分 hrHPV 的感染状态, 对于宫颈病变的诊断、严重程度评估具有一定的局限性^[12]。HPV 基因组的调控功能主要由 E 区基因(E1、E2、E4、E5、E6 和 E7)编码, 其中 E6 基因编码的 E6 蛋白可以调节癌基因 p53 的表达, 发挥致癌作用, 而 E7 基因编码的蛋白可以降解 Rb, 释放 E2F 转录因子, 诱导细胞恶性增殖^[13]。Fan 等的研究显示^[14], E6/E7 基因的转录、翻译是调节 HPV 感染诱导宫颈癌变的重要基因, 可以反映病毒癌基因的活性, 在宫颈癌筛查中具有重要的应用价值。因此, 本研究定量分析了 hr-HPV E6/E7 mRNA 载量与 CIN 病变之间的关系, 旨在准确评估 CIN 的发生发展, 预防宫颈癌变的发生。

本研究中, CIN 组患者的 hrHPV DNA 和 hrHPV E6/E7 mRNA 水平明显高于慢性宫颈炎组, 且低于宫颈癌组, 提示 hrHPV DNA 和 hrHPV E6/E7 mRNA 水平与患者的宫颈癌变有关, 有望应用于临床诊断。本研究中, 随着 TBS 分级增加, hrHPV DNA 和 hrHPV E6/E7 mRNA 载量呈上升趋势。TBS 分级是一种基于宫颈/阴道细胞学的诊断技术, 根据宫颈细胞病变程度进行分级, 在宫颈癌筛查中具有较高的特异性, 但敏感性较低^[15]。本研究结果提示 hrHPV DNA 和 hrHPV E6/E7 mRNA 载量与宫颈细胞病变程度有关, 有望应用于临床宫颈病变的评估。

综上所述, hrHPV E6/E7 mRNA 对 CIN 具有较高的诊断价值, 且 mRNA 载量与 CIN 分级具有显著的相关性, 可以用于 CIN 的鉴别诊断和病变评估, 指导临床预防和治疗工作的进行。本研究不足之处在于样本数量较少, 且为单中心研究, 可能会对结果产生一定的统计学误差, 但本研究仍为 CIN 的诊断和防治提供了一定的理论依据。

参考文献

- [1] 刘萍. 中国大陆 13 年宫颈临床流行病学大数据评价 [J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2018, 34(1):41-45.
- [2] 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.
- [3] Nøhr B, Kjaer SK, Soylu L, et al. High-risk human papillomavirus infection in female and subsequent risk of infertility: a population-based cohort study [J]. Fertil Steril, 2019, 111(6):1236-1242.
- [4] 石杏先, 余立群, 高国兰. 318 例高级别宫颈上皮内瘤变及宫颈癌患者的 TCT 和 hrHPV 检测分析 [J]. 中国肿瘤临床, 2019, 46(2):29-32.
- [5] Rollo F, Pichi B, Benevolo M, et al. Oral testing for high-risk human papillomavirus DNA and E6/E7 messenger RNA in healthy individuals at risk for oral infection [J]. Cancer, 2019, 125(15):2587-2593.
- [6] Ren C, Zhu Y, Yang L, et al. Diagnostic performance of HPV E6/E7 mRNA assay for detection of cervical high-grade intraepithelial neoplasia and cancer among women with ASCUS Papanicolaou smears [J]. Arch Gynecol Obstet, 2018, 297(2):425-432.
- [7] Lungu OL, Sun XW, Felix J, et al. Relationship of human papillomavirus type to grade of cervical epithelial neoplasia [J]. JAMA, 1992, 267(18):2493-2496.

(下转第 1352 页)

血清 25-羟基维生素 D、IL-17 水平与糖尿病视网膜病变的关系分析

孙晓菲 范慧洁 田勇*

[摘要] **目的** 探讨血清 25-羟基维生素 D(25-OHD)、白介素-17(IL-17)水平与糖尿病视网膜病变(DR)的关系。**方法** 选取 2018 年 1 月至 2019 年 12 月间收治的 348 例糖尿病(DM)患者作为研究对象,根据眼底检查结果分为糖尿病视网膜病变组(DR 组, $n=140$)和无糖尿病视网膜病变组(NDR 组, $n=208$)。比较 DR 组和 NDR 组患者疾病相关指标[糖化血红蛋白(HbA1C)、低密度脂蛋白(LDL-C)、收缩压(SBP)、超氧化物歧化酶(SOD)]及 25-OHD、IL-17 水平,采用 Spearman 分析法分析 DR 组患者病情严重程度与 25-OHD、IL-17 水平的相关性,采用 Pearson 分析分析 25-OHD、IL-17 与 DR 组患者疾病相关指标的相关性,采用 logistics 回归分析 DR 发生的影响因素。**结果** DR 组 HbA1C、LDL-C、SBP、IL-17 均高于 NDR 组, SOD、25-OHD 水平均低于 NDR 组,差异具有统计学意义($P<0.05$); Spearman 相关性分析显示 DR 患者病情分期与 25-OHD 呈负相关关系($P<0.05$),与 IL-17 水平呈正相关关系($P<0.05$); Pearson 相关性分析显示 25-OHD 与 HbA1C、SBP 呈负相关关系($P<0.05$),与 SOD 呈正相关关系($P<0.05$),与 LDL-C 不相关($P>0.05$); IL-17 与 HbA1C、LDL-C、SBP 呈正相关关系,与 SOD 呈负相关关系($P<0.05$); logistics 回归分析显示,IL-17 是影响 DR 发生的危险因素($P<0.05$),SOD 是影响 DR 发生的保护因素($P<0.05$)。**结论** 25-OHD、IL-17 与 DR 发生进展密切相关,监测 DM 患者两指标水平有一定临床价值。

[关键词] 糖尿病视网膜病变;血清 25-羟基维生素 D;白介素-17

Analysis of the relationship between serum 25-hydroxyvitamin D, IL-17 levels and diabetic retinopathy

SUN Xiaofei, FAN Huijie, TIAN Yong*

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

[ABSTRACT] **Objective** To explore the relationship between levels of serum 25-hydroxyvitamin D (25-OHD) and interleukin-17 (IL-17) and diabetic retinopathy (DR). **Methods** 348 patients with diabetes mellitus (DM) admitted between January 2018 and December 2019 were selected for this study. According to the results of fundus examination, they were divided into the diabetic retinopathy group (DR group, $n=140$) and the non-diabetic retinopathy group (NDR group, $n=208$). The levels of disease-related indicators [glycosylated hemoglobin (HbA1C), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), systolic blood pressure (SBP), superoxide dismutase (SOD)] and 25-OHD and IL-17 were compared between the DR group and the NDR group. Spearman analysis was used to analyze the correlation between disease severity and levels of 25-OHD and IL-17 in the DR group. Pearson analysis was used to analyze the correlation between 25-OHD, IL-17 and disease-related indicators in the DR group, and logistics regression analysis was used to analyze the influencing factors of DR occurrence. **Results** The levels of HbA1C, LDL-C, SBP and IL-17 in the DR group were higher than those in the NDR group ($P<0.05$), while the levels of SOD and 25-OHD in the DR

基金项目:河南省医学科技攻关计划项目(2018020817)

作者单位:郑州人民医院内分泌科,河南,郑州 450000

*通信作者:田勇, E-mail: fhktrn37nna@sina.cn

group were lower than those in the NDR group ($P<0.05$). Spearman correlation analysis showed the disease staging of DR patients was negatively correlated with 25-OHD ($P<0.05$), positively correlated with IL-17 level ($P<0.05$). Pearson correlation analysis showed that 25-OHD was negatively correlated with HbA1C and SBP ($P<0.05$) and positively correlated with SOD ($P<0.05$), and not correlated with LDL-C ($P>0.05$). IL-17 was positively correlated with HbA1C, LDL-C and SBP ($P<0.05$) and negatively correlated with SOD ($P<0.05$). Logistics regression analysis showed that IL-17 was a risk factor affecting DR ($P<0.05$), and SOD was a protective factor affecting DR ($P<0.05$). Conclusion 25-OHD and IL-17 are closely related to the occurrence and progression of DR. Monitoring the two indicators of DM patients has certain clinical value.

[KEY WORDS] Diabetic retinopathy; Serum 25-hydroxyvitamin D; Interleukin-17

糖尿病(diabetes mellitus, DM)可引起多种眼病并发症,以视网膜病变最为常见和严重,DM患者的致盲率远高于普通人群^[1]。有研究显示,通过对糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)的早期诊断和及时治疗,超过50%的患者视力损伤及致盲可得到预防^[2],因此早期防治DR是本病诊疗关键。DR发病机制尚不十分明确,目前普遍认为,DR是多元醇代谢异常、晚期糖基化终产物堆积、蛋白激酶C活化、氧化应激、慢性炎症反应等多因素共同导致的^[3]。维生素D可参与炎症反应、糖脂代谢、免疫反应等病理生理过程^[4]。同时,近年来有动物实验表明,抗IL-17(interleukin-17, IL-17)A中和性单克隆抗体(mAb)在玻璃体腔中治疗DR模型小鼠有利于减轻其DR,考虑IL-17可能通过影响视网膜Müller细胞功能而加重DR^[5]。基于此,本研究将探究血清25-羟基维生素D(25-hydroxy-vitamin D, 25-OHD)、IL-17水平与DR的关系,以期对DR的临床防治提供理论依据,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2018年1月至2019年12月间收治的348例DM患者作为研究对象,根据眼底检查结果分为糖尿病视网膜病变组(DR组, $n=140$),男女分别为83例、57例,平均年龄(61.36 ± 13.31)岁,平均病程(9.39 ± 3.58)年;和无糖尿病视网膜病变组(NDR组, $n=208$),男女分别为126例、82例,平均年龄(58.93 ± 13.70)岁,平均病程(8.84 ± 3.29)年。两组一般资料比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

纳入标准:符合糖尿病诊断标准^[6];且接受眼底检查者;临床资料完整者;年龄 >18 岁者;经本院伦理委员会审核通过。排除标准:严重器官功能障碍、恶性肿瘤者;近期糖尿病酮症酸中毒、非酮症高血糖高渗性昏迷者;甲状旁腺功能异常、库欣

综合征等影响维生素D水平疾病史者;近期维生素D、钙剂、碳酸锂等抗精神病类药物用药史者。

1.2 试剂和仪器

iChem-540型全自动生化分析仪,购自库贝尔生物科技有限公司生产;密度脂蛋白(low-density lipoprotein, LDL-C)试剂盒、糖化血红蛋白(hemoglobin A1c, HbA1C)试剂盒,均由上海恒远科技有限公司提供;25-OHD试剂盒,由广州菲康生物技术有限公司提供;超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、IL-17试剂盒,均由上海索宝生物技术有限公司提供。

1.3 实验方法

所有患者均采集外周静脉血,3 500 rpm离心5 min,收集血清 -20°C 保存待测。采用微粒色谱法测定HbA1C水平;采用iChem-540型全自动生化分析仪(库贝尔生物科技有限公司生产)测定LDL-C水平;采用电子血压计测定患者收缩压(systolic blood pressure, SBP);采用黄嘌呤氧化酶法测定SOD水平;采用电化学发光法测定25-OHD水平;采用酶联免疫法测定IL-17水平;所有检测均严格按照试剂盒说明书和仪器操作手册进行。

1.4 评估标准

DR组患者病情严重程度评估参照《我国糖尿病视网膜病变临床诊疗指南》^[7]分为背景期视网膜病变(non-proliferative diabetic retinopathy, NPDR)和增殖期视网膜病变(proliferative diabetic retinopathy, PDR), NPDR分为I期、II期, PDR分为IV期、V期。

1.5 统计学方法

采用SPSS 18.0统计软件进行数据分析,计量资料以($\bar{x}\pm s$)表示,行 t 检验,计数资料以 $n(\%)$ 表示,行 χ^2 检验,相关性分析采用Spearman和Pearson法,多因素分析采用logistics回归分析,以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者疾病相关指标水平对比

DR组 HbA1C、LDL-C、SBP、IL-17 均高于 NDR 组,差异具有统计学意义 ($P<0.05$), DR 组 SOD、25-OHD 水平均低于 NDR 组,差异具有统计

学意义 ($P<0.05$),见表1。

2.2 DR 患者病情严重程度与 25-OHD、IL-17 水平的相关性

Spearman 相关性分析显示 DR 患者病情分期与 25-OHD 呈负相关关系 ($r_1=-0.591, P<0.05$), 与 IL-17 水平呈正相关关系 ($r_2=0.778, P<0.05$)。

表1 两组患者疾病相关指标水平对比 ($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Comparison of disease-related indicators of 2 groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	HbA1C(%)	LDL-C(mmol/L)	SBP(mmHg)	SOD(mg/L)	25-OHD(ng/mL)	IL-17(ng/L)
DR组	140	10.75±2.30	3.38±1.03	133.96±18.78	72.82±8.65	16.23±2.06	33.89±6.32
NDR组	208	9.59±2.99	3.05±1.22	128.02±17.43	95.82±11.46	19.65±2.21	21.20±4.57
t值	-	-3.881	-2.647	-3.021	21.300	14.580	-20.442
P值	-	0.000	0.009	0.003	0.000	0.000	0.000

2.3 25-OHD、IL-17 与 DR 组患者疾病相关指标的相关性

Pearman 相关性分析显示 25-OHD 与 HbA1C、SBP 呈负相关关系 ($P<0.05$), 与 SOD 呈正相关关系 ($P<0.05$), 与 LDL-C 无相关 ($P>0.05$); IL-17 与 HbA1C、LDL-C、SBP 呈正相关关系 ($P<0.05$), 与 SOD 呈负相关关系 ($P<0.05$), 见表2。

表2 25-OHD、IL-17 与 DR 组患者疾病相关指标的相关性

Table 2 Correlation between 25-OHD, IL-17 and disease-related indicators in DR group

指标	25-OHD		IL-17	
	r值	P值	r值	P值
HbA1C	-0.183	0.001	0.258	0.000
LDL-C	-0.101	0.060	0.169	0.002
SBP	-0.177	0.001	0.159	0.003
SOD	0.457	0.000	-0.571	0.000

2.4 DR 发生的影响因素 logistics 回归分析

纳入患者年龄、性别及病程进行校正, logistics 回归分析显示 IL-17 是影响 DR 发生的危险因素 ($P<0.05$), SOD 是影响 DR 发生的保护因素 ($P<0.05$), 见表3。

表3 DR 发生的影响因素 logistics 回归分析

Table 3 Logistic regression analysis of influencing factors of DR occurrence

因素	β 值	S.E.	Wald	OR	95%CI	P值
IL-17	0.532	0.107	24.867	1.702	1.381~2.098	0.000
SOD	-0.229	0.043	28.710	0.795	0.731~0.865	0.000

3 讨论

有文献指出, 维生素 D 缺乏可致 DM 发病风

险增加, 且维生素 D 水平与胰岛素抵抗指数存在明显相关性^[8], 因此 DM 患者中维生素 D 缺乏发生率相对较高。目前已有部分维生素 D 与 DM 及其并发症相关的研究, 了解其相关性对防治 DM 患者并发症有积极意义。范乐平等^[9]的研究表明维生素 D 缺乏参与 DM 及 DR 的发生发展, 是 DR 发生的独立危险因素。而樊艳婷等^[10]的研究则表明初诊 DM 患者中 DR 发生与维生素 D 水平或有无维生素 D 缺乏均不相关。故本研究分析 DR 与 25-OHD 及 IL-17 的相关性。

郝兆虎等^[11]的研究也表明, 高血压、糖尿病发病年龄、糖尿病病程均是影响 DR 发生的危险因素。在房水中, 高血糖可以通过糖基化终末产物、多元醇通路活化等途径导致血管内皮功能损伤, 高血脂会引起红细胞变形性降低, 而循环白细胞可以通过自发活化以及黏附分子表达增加来影响血管内皮功能损伤, 上述各途径最终综合导致 DM 患者 DR 发生风险增加^[12]。高血压可造成动脉血管损害, 如内皮增生、硬化等, 从而引起视网膜缺血、缺氧等致使 DR 发生^[13]。

本研究结果提示低 25-OHD 也参与 DR 发病过程。有研究指出, PDR 是 DM 危及视功能最严重的并发症, 也是重要的致盲性眼病^[14]。本研究数据显示, DR 患者病情分期与 25-OHD 呈负相关关系。国外有文献获得类似结果, 按 DR 病情严重程度对患者进行分类, 25-OHD 平均水平的降低与 DR 严重程度的增加有关^[15]。而 IL-17 水平则与 DR 分期呈正相关, 这表示 DR 患者 IL-17 水平更高者病情更严重。国外文献还发现, DR 患者房水中的 IL-17 水平较未发生 DR 的 DM 患者显著提高,

且DR病情越重,IL-17水平越高^[16]。经logistics回归分析说明炎症反应和氧化应激反应在DR发生中起重要作用。SOD是一种具有特定生物催化功能的酶,可以高效催化超氧化物自由基分解,清除氧自由基,从而对抗氧化应激反应^[17]。王伟等^[18]的研究也表明,血清SOD活性值随DR病变的进展而逐渐降低,提示DR病变发生进展与血清SOD活性值下降有关。

综上所述,25-OHD、IL-17均与DR患者病情发生及严重程度相关,且25-OHD、IL-17与DR患者SOD水平密切相关,维生素D缺乏、氧化应激和炎症反应相互作用,在DR发生发展中起重要作用。

参考文献

[1] 应焱燕,王海清,张良,等.基于区域卫生信息平台的糖尿病伴发眼病流行病学分析[J].中国慢性病预防与控制,2017,25(3):180-183.

[2] 朱姗姗,路交,刘鹤南,等.生物医学光子学在糖尿病视网膜病变中的应用进展[J].中国光学,2018,11(3):459-474.

[3] 秦学维,谢学军.视网膜内环境平衡失调对糖尿病视网膜病变影响的研究进展[J].山东医药,2017,57(17):99-102.

[4] 蒋韬,朱东林,高国芹,等.不同年龄2型糖尿病患者维生素D水平与糖尿病周围神经病变的相关性[J].河北医药,2017,39(18):2838-2841.

[5] Qiu AW, Liu QH, Wang JL. Blocking IL-17A alleviates diabetic retinopathy in rodents[J]. Cell Physiol Biochem, 2017, 41(3):960-972.

[6] 中华医学会糖尿病学分会.中国2型糖尿病防治指南(2013年版)[J].中国糖尿病杂志,2014,30(8):893-942.

[7] 中华医学会眼科学会眼底病学组.我国糖尿病视网膜病变临床诊疗指南(2014年)[S].中华眼科杂志,2014,50(11):

851-865.

[8] 董美娟,刘媛媛,姚迪,等.初诊2型糖尿病患者血清维生素D及胰岛素抵抗与炎症因子关系[J].医学研究生学报,2017,30(10):1057-1060.

[9] 范乐平,郭慕新,张玥,等.血清25羟维生素D3与糖尿病视网膜病变的相关性研究[J].营养学报,2017,39(2):139-143.

[10] 樊艳婷,张志芳,高青等.新诊断2型糖尿病患者视网膜病变与维生素D水平的关系及其危险因素[J].中国医药,2018,13(1):77-80.

[11] 郝兆虎,邵海琳,黄霄,等.青少年吸烟史、糖尿病发病年龄与糖尿病视网膜病变的相关性分析[J].中华内分泌代谢杂志,2019,35(4):319-322.

[12] 谷君,邓文娟,左丽娟,等.2型糖尿病视网膜病变患者血清Fractalkine与血脂、血糖的相关性研究[J].中国现代医学杂志,2017,27(1):86-89.

[13] Senthilvel V, Sumathi S, Jayanthi S. 印度南部2型糖尿病患者糖尿病视网膜病变相关危险因素的研究[J].国际眼科杂志,2017,17(9):1615-1619.

[14] 龙婷,陈佳,杜磊,等.增殖性糖尿病视网膜病变的手术治疗进展[J].国际眼科杂志,2017,17(11):2069-2072.

[15] Ashinne B, Rajalakshmi R, Anjana RM, et al. Association of serum vitamin D levels and diabetic retinopathy in Asian Indians with type 2 diabetes[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2018, 139(24):308-313.

[16] Geng Y, Yu Y, Liu T, et al. Levels of inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-17A, and TNF- α in aqueous humour of patients with diabetic retinopathy[J]. J Diabetes Res, 2018, 20(1):1-6.

[17] 田琴,滕尧树,李勇.超氧化物歧化酶与鼻黏膜慢性炎症性疾病关系的研究进展[J].中国眼耳鼻喉科杂志,2018,18(3):70-73.

[18] 王伟,李孝才.糖尿病视网膜病变与超氧化物歧化酶活性值的关系[J].武警医学,2018,29(8):784-785,789.

(上接第1348页)

[8] 向群英.宫颈癌防治指南[M].武汉:湖北科学技术出版社,2015:29-33.

[9] 王莹,卞美璐,刘军.对2001年TBS系统中不典型鳞状细胞分型及诊断标准的评价——附1186张宫颈细胞学涂片分析[J].中华妇产科杂志,2004,39(1):27-29.

[10] Pimple SA, Mishra GA. Optimizing high risk HPV-based primary screening for cervical cancer in low- and middle-income countries: opportunities and challenges[J]. Minerva Gynecol, 2019, 71(5):365-371.

[11] 蒋欣,张亚军,江月,等.高危HPV E6/E7 mRNA与HPV DNA检测对宫颈病变诊断及风险评估的价值[J].广东医学,2018,39(21):132-135,139.

[12] Carrasquillo O, Seay J, Amofah A, et al. HPV Self-Sam-

pling for Cervical Cancer Screening Among Ethnic Minority Women in South Florida: a Randomized Trial[J]. J Gen Intern Med, 2018, 33(7):1077-1083.

[13] 李岳军,周妙姬,邱峰.人乳头瘤病毒52型E2和E6/E7在宫颈病变中的表达及其意义[J].分子诊断与治疗杂志,2015,7(4):241-246.

[14] Fan Y, Shen Z. The clinical value of HPV E6/E7 and STAT3 mRNA detection in cervical cancer screening[J]. Pathol Res Pract, 2018, 214(5):767-775.

[15] Hosono S, Terasawa T, Katayama T, et al. Frequency of unsatisfactory cervical cytology smears in cancer screening of Japanese women: A systematic review and meta-analysis[J]. Cancer Sci, 2018, 109(4):934-943.

血清 CTRP1、尿酸水平在冠心病临床诊断中的应用价值

王正飞 杨龙 兰占占 张东东 刘春明*

【摘要】 **目的** 探讨血清 C1q 肿瘤坏死因子相关蛋白(CTRP1)、尿酸(SUA)水平在冠心病临床诊断中的应用价值。**方法** 选取2019年1月至2019年12月间收治的冠心病患者140例作为研究对象(观察组),根据疾病类型分为心肌梗死组(AMI组, $n=46$)、不稳定心绞痛组(UA组, $n=75$)和慢性稳定性心绞痛组(SAP组, $n=19$),并选取同期体检健康者50例作为对照组。比较各组一般资料[性别、年龄、体质量(BMI)、收缩压、血肌酐(SCr)、总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白(LDL-C)]及血清CTRP1、SUA水平,比较不同类型冠心病患者血清CTRP1、SUA水平,分析血清CTRP1、SUA诊断冠心病的效能,分析冠心病患者病情严重程度与血清CTRP1、SUA的关系。**结果** 两组SCr、TC比较差异无统计学意义($P>0.05$),观察组BMI、收缩压、TG、SUA均高于对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$),观察组LDL-C、CTRP1均低于对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$);不同组中CTRP1水平比较结果:对照组>SAP组>UA组>AMI组,差异具有统计学意义($P<0.05$);SUA水平比较结果:对照组<SAP组<UA组<AMI组,差异具有统计学意义($P<0.05$);ROC曲线显示CTRP1、SUA均是诊断冠心病的有效指标($P<0.05$),CTRP1、SUA联合诊断曲线下面积(AUC)最大;不同冠心病病变支数者CTRP1水平比较结果:三支<双支<单支<对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$);SUA水平比较结果:三支>双支>单支>对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 血清CTRP1、SUA与冠心病患者及其血管病变支数相关,CTRP1联合SUA诊断冠心病效能较高。

【关键词】 冠心病;病变血管支数;血清C1q肿瘤坏死因子相关蛋白;尿酸

The value of serum CTRP1 and uric acid levels in clinical diagnosis of coronary heart disease

WANG Zhengfei, YANG Long, LAN Zhanzhan, ZHANG Dongdong, LIU Chunming*

(Department of Cardiac Surgery, the 7th People's Hospital of Zhengzhou, Zhengzhou, Henan, China, 450016)

【ABSTRACT】 **Objective** To explore the value of serum C1q tumor necrosis factor-related protein (CTRP1) and uric acid (SUA) levels in the clinical diagnosis of coronary heart disease. **Methods** 140 patients with coronary heart disease admitted between January 2019 and December 2019 were selected as the research subjects (observation group), and the patients in observation group were divided into the myocardial infarction group (AMI group, $n=46$), the unstable angina group (UA group, $n=75$) and the chronic stable angina pectoris group (SAP group, $n=19$) according to the types of disease. Another 50 healthy people who underwent physical examination during the same period were selected as the control group. The general data [gender, age, body mass index (BMI), systolic blood pressure, blood creatinine (SCr), total cholesterol (TC), triglycerides (TG), low density lipoprotein-cholesterol (LDL-C)] and levels of serum CTRP1 and SUA

基金项目:河南省医学科技攻关计划联合共建项目(2018020817)

作者单位:郑州市第七人民医院心脏外科,河南,郑州 450016

*通信作者:刘春明, E-mail: z210006wangzhengfei@126.com

were compared between the two groups. Levels of serum CTRP1 and SUA were compared among patients with different types of coronary heart disease. The efficacy of serum CTRP1 and SUA was analyzed in the diagnosis of coronary heart disease. The relationship between the disease severity of patients with coronary heart disease and serum CTRP1 and SUA levels was analyzed. **Results** There were no significant differences in SCr and TC between the two groups ($P>0.05$), and the BMI, systolic blood pressure, TG and SUA in the observation group were higher than those in the control group ($P<0.05$), while the LDL-C and CTRP1 in the observation group were lower than those in the control group ($P<0.05$). Comparison of CTRP1 level in the different groups showed that the control group $>$ the SAP group $>$ the UA group $>$ the AMI group ($P<0.05$). Comparison of SUA level showed that the control group $<$ the SAP group $<$ the UA group $<$ the AMI group ($P<0.05$). ROC curves showed that CTRP1 and SUA were effective indicators in the diagnosis of coronary heart disease ($P<0.05$), and the area under the curve of combined diagnosis of CTRP1 and SUA was the largest. Comparison of CTRP1 level in patients with different lesion counts of coronary artery disease showed that three-vessel disease $<$ double-vessel disease $<$ single-vessel disease $<$ the control group ($P<0.05$). Comparison of SUA level showed that three-vessel disease $>$ double-vessel disease $>$ single-vessel disease $>$ the control group ($P<0.05$). **Conclusion** Serum CTRP1 and SUA are related to coronary heart disease patients and the number of vascular lesions. CTRP1 combined with SUA has a higher diagnostic efficiency for coronary heart disease.

[KEY WORDS] Coronary heart disease; Diseased vessel count; Serum C1q tumor necrosis factor-related protein; Uric acid

冠心病是临床常见的心血管疾病之一,主要由冠状动脉粥样硬化所致心肌缺血、缺氧引起,有较高的致残率和病死率^[1]。近年来,冠心病患病率持续上升,且患病人群趋向于年轻化^[2],严重威胁民众健康,防治冠心病成为重要的公共卫生课题。临床以冠状动脉造影(coronary artery angiography, CAG)作为冠心病诊断金标准,但因其有创性,临床应用率被严重限制,寻求更安全有效的无创冠心病诊断方法,对冠心病筛查、早期诊断起积极作用。补体 C1q/肿瘤坏死因子相关蛋白 1(complement-C1q/TNF-related protein1, CTRP1)是新发现的由脂肪组织分泌的脂肪因子超家族中的一员,有研究显示,CTRP1 是诊断冠心病的有效指标^[3]。而相关研究显示,血尿酸(serum uric acid, SUA)超过 6 $\mu\text{mol/L}$ 是冠心病发生的独立危险因素^[4],因此 SUA 也可能是诊断冠心病的有效指标。基于此,本研究选取 140 例冠心病患者作为研究对象,以探究 CTRP1、SUA 在冠心病诊断中的应用价值,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

纳入 2019 年 1 月至 2019 年 12 月间本院收治的冠心病患者 140 例作为研究对象(观察组),男性 81 例、女性 59 例,平均年龄(58.18 \pm 14.03)岁。参

照《急性冠脉综合征急诊快速诊治指南》和《慢性稳定性心绞痛诊断治疗指南》^[5-6]中的诊断标准分为心肌梗死组(AMI 组,包括 ST 段抬高型心肌梗死、非 ST 段抬高型心肌梗死, $n=46$)、不稳定性心绞痛组(UA 组, $n=75$)、慢性稳定性心绞痛组(SAP 组, $n=19$)。选取同期健康体检 50 例作为对照组,其中男性 27 例、女性 23 例,平均年龄(56.48 \pm 9.95)岁。两组一般资料比较差异无统计学意义($P>0.05$)。本研究经本院医学伦理委员会批准,患者及其家属签署知情同意书。

纳入标准:均行 CAG 检查且确诊冠心病者;年龄 >18 岁者;未合并先天性心脏病、器质性心脏瓣膜病、心肌病者。排除标准:合并其他严重器官功能障碍、恶性肿瘤者;急慢性感染者;合并血液系统疾病者;妊娠期妇女。

1.2 仪器与试剂

Centrifuge 5430 型离心机,德国 Eppendorf 公司生产;SCr、TC、TG、LDL-H、CTRP1 试剂盒,由南京波音特生物科技有限公司提供;SUA 试剂盒,由上海晶抗生物科技有限公司提供。

1.3 实验方法

所有研究对象均采集空腹外周静脉血,4 000 r/min 离心后取上清液,保存待测。使用酶联免疫吸附法测定血肌酐(serum creatinine, SCr)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride,

TG)、低密度脂蛋白(low-density lipoprotein, LDL-C)、CTRP1水平,采用尿酸酶法测定SUA水平,检测过程严格按照试剂盒说明书进行,质控均在范围内。由研究者及研究小组收集所有研究对象各类实验室检查结果数据,包括体重指数(body mass index, BMI)、血压、SCr、TC、TG、LDL-C、CTRP1、SUA。比较AMI组、SAP组和UA组CTRP1、SUA水平差异,绘制ROC曲线分析CTRP1、SUA诊断冠心病的可行性及诊断效能。收集冠心病患者CAG检查结果,分析病变支数(由狭窄≥50%的病变支数计算)与CTRP1、SUA的相关性。

1.4 数据分析

采用SPSS19.0统计软件进行数据分析,计量数据以($\bar{x} \pm s$)表示,两样本均数比较行*t*检验,多样本均数比较行单因素方差分析,计数资料以*n*(%)表示,行 χ^2 检验,相关性分析采用Spearman法,以*P*<0.05表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组实验室检查结果比较

两组SCr、TC比较差异无统计学意义(*P*>0.05),观察组BMI、收缩压、TG、SUA均高于对照组,差异具有统计学意义(*P*<0.05),观察组LDL-C、CTRP1均低于对照组,差异具有统计学意义(*P*<0.05),见表1。

表1 两组实验室检查结果比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of laboratory examination results between the 2 groups ($\bar{x} \pm s$)

项目	观察组 (<i>n</i> =140)	对照组 (<i>n</i> =50)	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
BMI(kg/m ²)	24.61±3.02	21.14±2.85	7.076	0.000
收缩压(mmHg)	126.33±10.50	114.28±9.65	7.111	0.000
SCr(μmol/L)	77.52±18.58	77.15±18.02	0.122	0.903
TC(mmol/L)	4.19±0.47	4.29±0.32	1.392	0.165
TG(mmol/L)	1.59±0.31	1.08±0.24	10.552	0.000
LDL-C(mmol/L)	2.07±0.17	2.57±0.15	18.391	0.000
CTRP1(ng/ml)	239.22±38.95	264.59±39.53	3.938	0.000
SUA(μmol/L)	323.90±69.66	278.75±68.62	3.949	0.000

2.2 不同类型冠心病患者CTRP1、SUA水平比较

不同组中CTRP1水平比较结果:对照组>SAP组>UA组>AMI组,差异具有统计学意义(*P*<0.05);SUA水平比较结果:对照组<SAP组<UA组<AMI组,差异具有统计学意义(*P*<0.05)。见表2。

表2 不同类型冠心病患者CTRP1、SUA水平比较

Table 2 Comparison of CTRP1 and SUA levels in patients with different types of coronary heart disease

组别	<i>n</i>	CTRP1(ng/mL)	SUA(μmol/L)
AMI组	46	231.95±24.91	331.30±65.30
UA组	75	238.44±20.18	317.73±58.18
SAP组	19	248.99±31.37	289.86±61.90
对照组	50	264.59±39.53	278.75±68.62
<i>F</i> 值	-	10.800	6.932
<i>P</i> 值	-	0.000	0.000

2.3 CTRP1、SUA诊断冠心病的ROC曲线

ROC曲线显示CTRP1、SUA均是诊断冠心病的有效指标(*P*<0.05),CTRP1、SUA联合诊断曲线下面积(area under the curve, AUC)最大。见图1,表3。

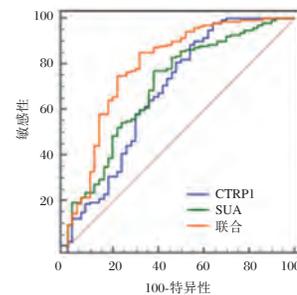


图1 CTRP1、SUA诊断冠心病的ROC曲线

Figure 1 ROC curves of CTRP1 and SUA in the diagnosis of coronary heart disease

2.4 不同冠心病病变支数者CTRP1、SUA水平比较

不同冠心病病变支数者CTRP1水平比较结果:三支<双支<单支<对照组,差异具有统计学意义(*P*<0.05);SUA水平比较结果:三支>双支>单支>对照组,差异具有统计学意义(*P*<0.05)。见表4。

表3 CTRP1、SUA诊断冠心病的ROC曲线

Table 3 ROC curves of CTRP1 and SUA in diagnosing CHD

检验变量	AUC	95%CI	最佳临界值	敏感性	特异性	<i>P</i> 值
CTRP1	0.692	0.621~0.757	≤261.67	88.57	46.00	0.000
SUA	0.713	0.643~0.776	>283.37	77.14	62.00	0.000
联合诊断	0.806	0.742~0.859	-	85.00	68.00	0.000

表4 不同冠心病病变支数者 CTRP1、SUA 水平比较
Table 4 Comparison of CTRP1 and SUA levels in patients with different coronary heart disease lesions

病变支数	n	CTRP1 (ng/mL)	SUA (μmol/L)
三支	53	230.03±28.89	336.78±50.84
双支	46	243.53±21.89	328.22±52.25
单支	41	251.97±26.86	281.01±57.95
对照组	50	264.59±39.53	278.75±68.62
F 值	-	11.118	13.260
P 值	-	0.000	0.000

2.5 冠心病病变支数与 CTRP1、SUA 水平的关系

Spearman 相关分析法显示:CTRP1 水平与冠心病病变支数呈负相关关系($r=-0.348, P=0.000$), SUA 水平与冠心病病变支数呈正相关关系($r=0.429, P=0.000$)。

3 讨论

既往文献证实,脂代谢异常与冠心病发生进展存在密切联系^[7]。CTRP1 属 CTRP 家族,主要由脂肪组织分泌,能够促进脂代谢。动物实验显示,在饮食诱导的肥胖鼠体内 CTRP1 水平显著降低^[8]。目前已有部分学者研究 CTRP 家族在心血管病中的作用。张德龙等学者^[9]的研究显示,CTRP3 是糖尿病患者发生颈动脉粥样硬化的影响因素。林文婷等学者^[10]的研究显示,CTRP1>8.28 ng/L 是冠心病发病的危险因素。但 CTRP1 诊断冠心病的相关研究仍较少,临床对该指标的认知也较少。高 SUA 致冠心病发生的机制相对明确,刘善宽等学者^[11]的研究显示,血尿酸是诊断冠心病的有效指标,但多项指标联合诊断效能显著高于单项指标。本研究探讨血清 CTRP1、尿酸与冠心病发生进展的关系,并评估其单独与联合诊断的效能,为临床选择合适的诊断方案提供参考。

本研究结果提示 SUA、CTRP1 水平诊断冠心病有可行性。但贾磊等学者^[12]的研究显示,冠心病 UA 者 CTRP1 水平显著高于对照组,与本研究结论不一致。目前冠心病患者血清 CTRP1 上升或下降仍具有争议,不同研究结论存在不同变化趋势^[13]。出现这种状态,考虑与冠心病不同病情阶段血清 CTRP1 动态变化相关。有文献指出,CTRP1 对血管中胶原有较高亲和力,阻止胶原诱导的血小板激活及血栓形成,从而发挥抗动脉粥样硬化的作用^[14]。动物实验也显示,小鼠敲除 CTRP1 后,小鼠心肌梗塞面积、心肌细胞凋亡和促炎基因表

达增加^[15]。上述研究说明,CTRP1 对冠心病病情进展的影响可能是双向的。

相关研究显示,CTRP1 敲除小鼠在损伤后具有促进血管新内膜增厚和新内膜中细胞增殖的作用^[16]。SUA 是体内嘌呤代谢终产物,冠心病患者 SUA 水平更高,考虑与其不良饮食习惯相关。本研究结果说明可优先推荐 CTRP1、SUA 联合诊断方案。

本研究结果还显示,不同冠心病病变支数患者的 CTRP1、SUA 水平也存在差异。上述结果提示,CTRP1、SUA 水平变化不仅与冠心病发生相关,还参与其病情进展。动物实验显示,CTRP1 在体内起积极的分解代谢作用,通过磷酸化抑制乙酰辅酶 A 羧化酶,并刺激 C2C12 肌管中的脂肪酸氧化^[17]。因此低水平 CTRP1 会导致更严重的脂质沉积。故 CTRP1、SUA 可通过抑制脂代谢、诱导血管内皮功能损伤、促进炎症反应来参与动脉粥样硬化进程,加快冠心病病情进展。

综上所述,血清 CTRP1、SUA 水平与冠心病发生发展均存在关联,且均是诊断冠心病的有效指标,两者联合可提高诊断效能。

参考文献

- [1] 覃策,胡敏.重庆江北区居民冠心病流行病学调查及危险因素分析[J].医学临床研究,2018,35(8):1653-1655.
- [2] 许丞莹,李瑞.逆针灸在冠心病一级预防的浅析[J].环球中医药,2018,11(1):117-119.
- [3] 钟节雄,杨宏华.循环 C1q/TNF 相关蛋白 1 的水平与男性冠心病的关系[J].山西医科大学学报,2018,49(1):36-39.
- [4] 吕赛,周玉杰,刘巍.高尿酸血症、代谢综合征与冠心病的研究进展[J].心肺血管病杂志,2018,37(1):76-78.
- [5] 中国医师协会急诊医师分会,国家卫健委能力建设与继续教育中心急诊学专家委员会,中国医疗保健国际交流促进会急诊急救分会.急性冠脉综合征急诊快速诊治指南(2019)[S].中国急救医学,2019,39(4):301-308.
- [6] 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.慢性稳定性心绞痛诊断与治疗指南[J].中华心血管病杂志,2007,35(3):195-206.
- [7] 宋跃,吴立松,刘冬,等.阿托伐他汀钙片联合心血管药物对冠心病患者血脂联素及脂代谢异常的影响[J].实用药物与临床,2019,22(5):504-507.
- [8] 张诗晗,杜芸辉,于海存,等.补体 C1q/肿瘤坏死因子相关蛋白家族对心血管代谢紊乱及相关危险因素调控的研究进展[J].生理学报,2018,70(3):310-318.
- [9] 张德龙,殷莉,姜芳,等.血浆肾素活性、补体 C1q/肿瘤坏死因子相关蛋白 3 与高血压合并糖尿病患者颈动脉粥样硬化的相关性[J].中华高血压杂志,2019,27(4):368-371.

(下转第 1362 页)

ASF1B 对子宫内膜癌细胞恶性行为的影响及相关机制

白驹^{1*} 斗泽加²

[摘要] **目的** 探究 ASF1B 在子宫内膜癌中的表达情况及其与细胞恶性行为的关系。**方法** 收集 68 例子宫内膜癌患者的肿瘤组织及癌旁组织, qPCR 检测组织中 ASF1B 的表达水平。培养人子宫内膜癌细胞 HEC-151 及 KLE, 通过细胞转染技术将 HEC-151 细胞分为对照组、过表达组及回复组; KLE 细胞分为无意义组及干扰组; Transwell 实验检测各组细胞侵袭迁移能力; CCK-8 法检测各组细胞增殖能力; Western Blotting 及 qPCR 检测各组细胞中 ASF1B、FOXM1、CDK6 及 VEGFB 的表达含量。**结果** qPCR 结果提示 ASF1B 在子宫内膜癌组织中表达水平显著升高, 并与患者高临床分期、淋巴结转移及预后不良相关, 相关性分析发现 ASF1B 与 FOXM1 表达正相关($P<0.05$); 相比对照组, 过表达组细胞体外增殖及转移能力显著增强, FOXM1、CDK6 及 VEGFB 的蛋白表达水平显著上升, 差异有统计学意义($P<0.05$); 而相比过表达组, 回复组细胞体外增殖及转移能力显著减弱, FOXM1、CDK6 及 VEGFB 的蛋白表达水平显著降低, 差异有统计学意义($P<0.05$)。相比无意义组, 干扰组细胞体外增殖及转移能力显著减弱, 差异有统计学意义($P<0.05$)。FOXM1、CDK6 及 VEGFB 的表达水平显著降低, 差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** ASF1B 可促进 FOXM1 的表达, 并促进子宫内膜癌细胞的增殖及转移能力, 增强其恶性表型。

[关键词] 子宫内膜癌; ASF1B; FOXM1; 恶性表型

Effect of ASF1B on the malignant behavior of endometrial carcinoma cells and its mechanism

BAI Ju^{1*}, DOU Zejia²

(1. Changde Maternal and Child Health-Care Hospital, Changde, Hunan, China, 415000; 2. Department of laboratory medicine, People's Hospital of Longzi County, Shannan, Xizang, China, 856600)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the expression of ASF1B in endometrial cancer and its relationship with the malignant behavior of cells. **Methods** The tumor tissues and adjacent tissues of 68 patients with endometrial cancer diagnosed were collected. The real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR) was used to detect the expression of ASF1B in these tissues. Human endometrial cancer cells HEC-151 and KLE were cultured and HEC-151 cells were divided into the control group, the overexpression group and the recovery group by cell transfection. KLE cells were divided into the non-sense group and the interference group. Transwell test was used to detect the invasion and migration ability of each groups of cells; plate cloning experiment and CCK-8 method were used to detect the proliferation ability of each groups of cells. Western-Blotting and qRT-PCR detected the expression levels of FOXM1, CDK6, and VEGFB in each groups of cells. **Results** qRT-PCR results indicate that the expression level of ASF1B in endometrial cancer tissue is significantly increased, and is related to the high clinical stage of the patient, lymph node metastasis, and poor prognosis. Correlation analysis shows that ASF1B and FOXM1 expression are positively correlated. Compared with the control group, the overexpression group of cells significantly increased in vitro proliferation and metastasis ability, and FOXM1, CDK6 and VEGFB protein expression levels increased significantly. Compared with the

作者单位: 1. 常德市妇幼保健院遗传优生科, 湖南, 常德 415000

2. 西藏山南市隆子县人民医院检验科, 西藏, 山南 856600

*通信作者: 白驹, E-mail: 857775419@qq.com

overexpression group, the recovery group significantly decreased in vitro proliferation and metastasis ability, and the levels of FOXM1, CDK6 and VEGFB were significantly reduced. Compared with the non-sense group, the proliferation and metastasis ability of cells in the interference group were significantly reduced, and the expression levels of FOXM1, CDK6 and VEGFB were significantly decreased ($P < 0.01$). Conclusion ASF1B can promote the expression of FOXM1, promote the proliferation and metastasis of endometrial cancer cells, and enhance their malignant phenotype.

[KEY WORDS] Endometrial cancer; ASF1B; FOXM1; Malignant phenotype

据2018年数据显示,全球子宫内膜癌新发病例约38.2万,死亡9.0万^[1],是女性高发的恶性肿瘤之一。肿瘤细胞的恶性表型是决定肿瘤进展及转归的关键因素,明确子宫内膜癌细胞的恶性行为的分子机制对于子宫内膜癌的临床诊治具有重要意义^[2]。ASF1类蛋白作为组蛋白的伴侣蛋白,在调节染色质核小体结构中发挥促进组蛋白沉积和组蛋白交换的关键作用^[3],是重要的表观调控因子。有研究指出,抗沉默功能1B(Anti-Silencing Function 1B, ASF1B)蛋白参与乳腺癌、前列腺癌及肾透明细胞癌等恶性肿瘤的发生发展^[4-6],但其在子宫内膜癌中的生物学功能及作用机制仍不明确。本研究通过生物信息技术及分子生物学方法,分析了ASF1B与子宫内膜癌细胞恶性表型的关系及相关机制。

1 材料与方法

1.1 一般资料

收集2019年01月至2019年12月本院68例子宫内膜癌手术患者,根据临床和病理标准取肿瘤组织及癌旁组织,手术患者一般信息(年龄、BMI及分型):平均年龄(52.73 ± 6.48)岁;BMI指数(25.08 ± 5.15);雌激素依赖型38例,非雌激素依赖型30例。本方案通过了本院伦理委员会,患者或家属均已签署知情同意书。

1.2 材料与试剂

HEC-151、KLE人子宫内膜癌细胞系及人胚胎肾细胞293T(美国ATCC)。CCK-8试剂盒:Hyclone(美国)。转染脂质体Lipofectamine-RNAiMAX Reagent:Thermo Scientific(美国)。ASF1B过表达载体及空白载体、siFOXM1、siASF1B及siRNA对照载体:吉凯基因(上海)。RNA提取试剂RNAiso Reagent、RNA逆转录试剂盒及SYBR Green核酸荧光染料:Takara(日本)。一抗FOXM1(ab207298, 100 μ L)、CDK6(ab124821, 100 μ L)及VEGFB(ab51867, 100 μ L):Abcam(美国)等。多孔

酶标仪(Molecular Devices,型号:SpectraMax Paradigm)、凝胶成像仪(Bio-Rad,型号:GelDocEZ)、Real-time PCR仪(Bio-Rad,型号:CFX96)。

1.3 子宫内膜癌细胞的培养及传代

培养子宫内膜癌HEC-151细胞在25 cm^2 培养瓶中,采用DMEM/F12培养基+10%FBS+1%青霉素-链霉素溶液培养,于37 $^{\circ}\text{C}$ +5% CO_2 培养箱中培养。传代时使用胰蛋白酶消化,1:3传代并继续培养,选取对数生长期的细胞用作后续实验。

1.4 实验设计分组

HEC-151细胞分为:对照组、过表达组及回复组。对照组转染空白对照载体+siRNA对照载体;过表达组转染ASF1B过表达载体+siRNA对照载体,回复组共转染ASF1B+siFOXM1。KLE细胞分为:无意义组及干扰组,无意义组转染siRNA对照载体,干扰组转染siRNA靶向ASF1B载体。

1.5 Transwell检测各组细胞侵袭迁移能力

取Matrigel胶铺于Transwell上室面,DMEM/F12无血清培养基水化。铺Matrigel胶的Transwell小室作为侵袭模型,未铺胶的作为迁移模型。100 μ L的各组细胞悬液接种于上室面。24 h后棉签轻轻擦掉上室面的细胞,4%多聚甲醛固定15 min,0.1%结晶紫染色,进行细胞计数并进行统计学分析。

1.6 CCK-8检测各组细胞增殖能力

各组细胞均以每孔2 000个接种至96孔板中,用DMEM/F12培养基+10%FBS+1%青霉素-链霉素溶液培养,在培养0、24、48、72及96 h时,每孔加入10 μ L CCK-8,孵育2 h,酶标仪检测450 nm处吸光度(OD)。各时间点与0 h吸光度的比值表示细胞的相对增殖能力。24 h计算公式: $[(\text{OD}_{24\text{h}} - \text{OD}_{24\text{h 空白}}) / (\text{OD}_{0\text{h}} - \text{OD}_{0\text{h 空白}})] \times 100\%$,48、72和96 h计算方法同24 h。

1.7 Western Blot检测各组细胞中FOXM1、CDK6及VEGFB蛋白的表达水平

RIPA裂解液与蛋白酶抑制剂混合后冰上裂解

各组细胞,加上样缓冲液煮沸 10 min。选用 β -actin 作为内参。BCA 试剂盒测定蛋白浓度,同时选取 20 μ L 的目的蛋白先进行 β -actin 抗体的电泳(一抗浓度 1:400),比较各组之间的灰度值,调整后进行 FOXM1、CDK6 及 VEGFB 的电泳。200 mA 90 min 湿转至 PVDF 膜, TBSTw 封闭液封闭 1 h,一抗 4 $^{\circ}$ C 过夜,二抗 37 $^{\circ}$ C 1 h,发光液曝光显影。

1.8 qPCR 检测各组组织或细胞中 ASF1B、FOXM1、CDK6 及 VEGFB 的表达含量

使用 TRIzol 提取各组细胞或组织中的 Total-RNA,提取完成后检测 RNA 纯度后。参考逆转录试剂盒说明书(Roche),将提取后的 RNA 进行逆转录,得到 cDNA 产物。根据 SYBR GREEN 试剂盒说明(Roche),进行 PCR 反应, β -actin 作为内参,并进行定量分析,目的基因的引物如表 1 所示。

表 1 β -actin、ASF1B、FOXM1、CDK6 及 VEGFB 引物序列
Table 1 Primer sequences of β -actin, ASF1B, FOXM1, CDK6 and VEGFB

Gene	Primer(5'-3')
ASF1B(sense)	GTG ACC ATG GTC ACC GTA
ASF1B(Anti-sense)	CGC ATG AAC TGC AAG CC
FOXM1(sense)	TAC AAG ATC GTC CAT GCA TTC
FOXM1(Anti-sense)	CAA TCG GTA ACG TCC GCA
CDK6(sense)	CAT GAC TAG CTT TTA GAC
CDK6(Anti-sense)	TAC GTT ATC ACC GGT CG
VEGFB(sense)	TTC AGG CTG TAA CTC TG
VEGFB(Anti-sense)	CGT AGT CGG ATT CGT TT
β -actin(sense)	CTC CAT CCT GGC CTC GCT GT
β -actin(Anti-sense)	GCT GTC ACC TTC ACC GTT CC

1.9 统计学方法

采用 SPSS 23.0 软件进行统计学分析;计量资料采用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,两组间比较采用单因素方差分析及 Student-Newman-Keuls (SNK);计数资料比较采用卡方检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 生物信息学分析 ASF1B 在子宫内膜癌中的表达情况及与患者病理资料的关系

利用 UALCAN 数据库发现,ASF1B 基因在子宫内膜癌中表达显著增高(图 1A、B),且 ASF1B 表达随着患者 TNM 分期增高而增加(图 1C),高表达 ASF1B 与患者浆液性宫颈癌亚型及 TP53 突变密切相关(图 1D、E)。

2.2 生物信息学分析 ASF1B 与 FOXM1 及子宫内膜癌患者预后的关系

ASF1B 的表达与 TP53 下游分子 FOXM1 的表达正相关(图 2A、B),预后分析发现 ASF1B 的高表达不利于患者预后(图 2C)。

2.3 ASF1B 在 68 例子宫内膜癌患者的肿瘤组织及癌旁组织中的比较及其与患者临床资料的关系

ASF1B 高表达与肿瘤分期及淋巴结转移的发生显著正相关($P < 0.05$),而与病理类型及分化程度无显著相关($P > 0.05$)。ASF1B 在子宫内膜癌组织中呈高表达趋势,与其在癌旁正常组织的表达水平相比,差异有统计学意义($P < 0.01$),见表 2,图 3。

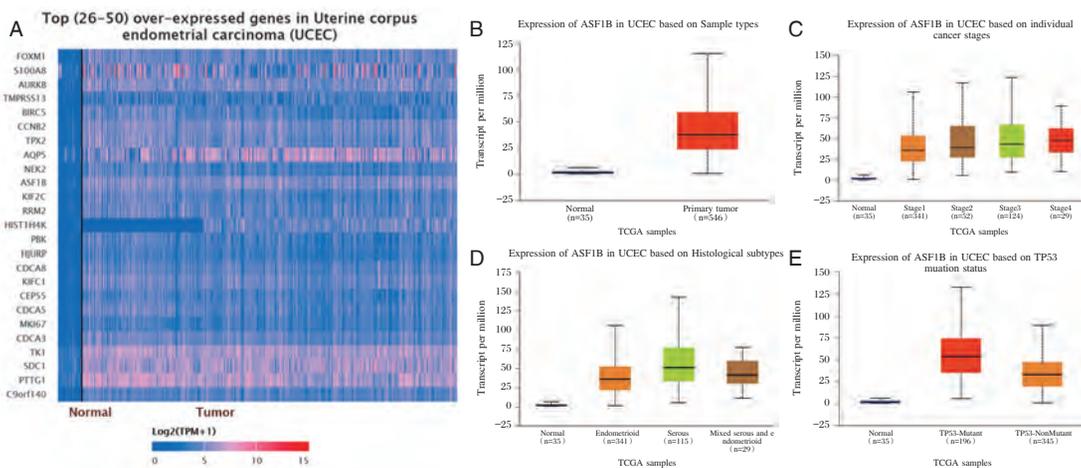


图 1 ASF1B 在子宫内膜癌中的表达情况及临床意义的生物信息分析

Figure 1 Expression of ASF1B in endometrial cancer and the biological information analysis of its clinical significance

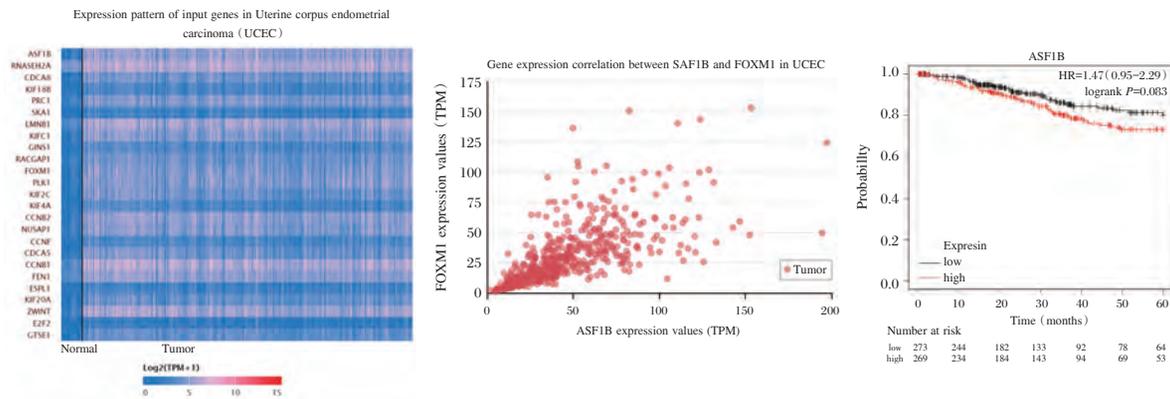


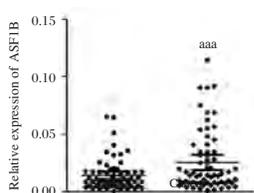
图2 ASF1B在子宫内膜癌中的表达情况及临床意义的生物信息分析

Figure 2 Expression of ASF1B in endometrial cancer and the biological information analysis of its clinical significance

表2 ASF1B mRNA表达与患者临床资料的关系 [n(%)]

Table 2 The relationship between asf1b mRNA expression and clinical data of patients [n(%)]

参数	n	ASF1B mRNA 表达水平及统计指标				
		高表达	低表达	χ^2 值	P值	
病理类型(n=68)	子宫内膜样腺癌	32	15(22.0)	17(25.0)	0.720	0.868
	浆液性腺癌	19	9(13.2)	10(14.7)		
	透明细胞癌	10	6(8.8)	4(5.9)		
	其他类型	7	4(5.9)	3(4.4)		
FIGO分期(n=68)	I~II	51	21(30.9)	30(44.1)	6.353	0.012
	III~IV	17	13(19.1)	4(5.9)		
分化程度(n=68)	高分化	23	11(16.2)	12(17.6)	2.734	0.255
	中分化	21	8(11.8)	13(19.1)		
	低分化	24	15(22.1)	9(13.2)		
淋巴结转移(n=68)	-	53	22(32.4)	31(45.6)	6.928	0.008
	+	15	12(17.6)	3(4.4)		



注: $^{aaa}P < 0.001$, 差异有统计学意义。

图3 ASF1B在子宫内膜癌患者的肿瘤组织及癌旁组织中的表达

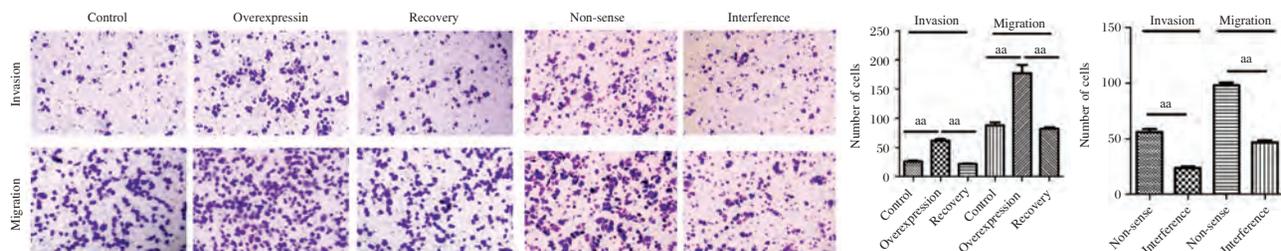
Figure 3 Expression of ASF1B in tumor tissues and adjacent tissues of patients with endometrial cancer

2.4 各组细胞侵袭迁移能力及其比较

相比对照组,过表达组细胞体外转移能力显著增强;而相比过表达组,回复组细胞体外转移能力显著减弱;相比无意义组,干扰组细胞体外转移能力显著减弱。差异有统计学意义($P < 0.05$),见图4。

2.5 各组细胞增殖能力及其比较

相比对照组,过表达组细胞体外增殖能力在48~96 h显著增强;而相比过表达组,回复组细胞



注: $^{aa}P < 0.01$, 差异有统计学意义。

图4 各组细胞侵袭迁移能力及其比较(结晶紫染色, $\times 400$)

Figure 4 The invasion and migration capabilities of each groups of cells and their comparison (crystal violet staining, $\times 400$)

体外增殖能力在 48~96 h 显著减弱;相比无意义组,干扰组细胞体外增殖能力在 48~96 h 显著减弱。差异有统计学意义($P<0.05$),见图 5。

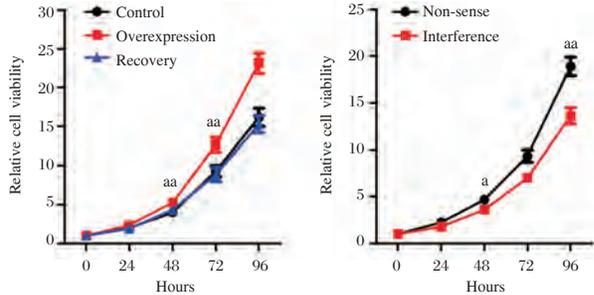
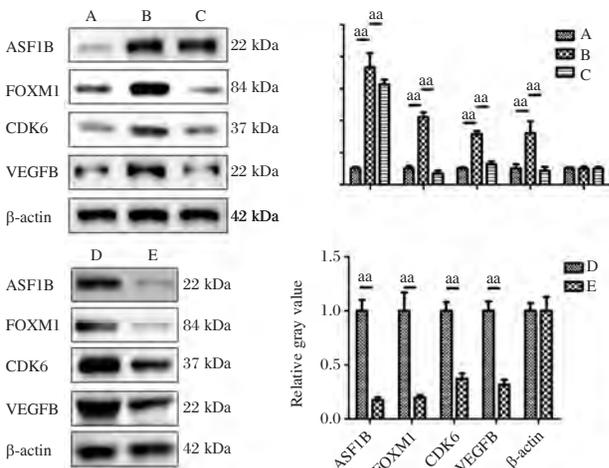


图 5 各组细胞增殖能力及其比较

Figure 5 The proliferation ability of each groups of cells and their comparison

2.6 各组细胞 ASF1B、FOXM1、CDK6 及 VEGFB 的表达及其比较

过表达组细胞 ASF1B、FOXM1、CDK6 及 VEGFB 的蛋白表达均显著高于对照组;而回复组细胞 FOXM1、CDK6 及 VEGFB 的蛋白表达均显著低于过表达组;干扰组细胞 FOXM1、CDK6 及 VEGFB 的蛋白表达均显著低于无意义组。差异有统计学意义($P<0.05$),见图 6。



注: A:对照组; B:过表达组; C:回复组; D:无意义组; E:干扰组, $^{aa}P<0.01$,差异有统计学意义。

图 6 各组细胞 ASF1B、FOXM1、CDK6 及 VEGFB 蛋白印记及灰度比较

Figure 6 The protein level of ASF1B, FOXM1, CDK6 and VEGFB in each groups of cells and their comparison

2.7 各组细胞 FOXM1、CDK6 及 VEGFB 的基因表达含量

过表达组细胞 FOXM1、CDK6 及 VEGFB 的

mRNA 表达显著高于对照组;而回复组细胞 FOXM1、CDK6 及 VEGFB 的 mRNA 表达均显著低于过表达组,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 3;干扰组细胞 FOXM1、CDK6 及 VEGFB 的 mRNA 表达均显著低于无意义组,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 4。

表 3 HEC-151 细胞 FOXM1、CDK6 及 VEGFB 的基因表达含量

Table 3 Gene expression levels of FOXM1, CDK6 and VEGFB in HEC-151 cells

分组	FOXM1	CDK6	VEGFB
对照组	1.00±0.07	1.00±0.10	1.00±0.12
过表达组	3.12±0.33	2.59±0.12	2.35±0.21
回复组	1.11±0.12	0.80±0.11	0.75±0.16
F 值	11.75	7.92	7.26
P 值	<0.05	<0.05	<0.05

表 4 KLE 细胞 FOXM1、CDK6 及 VEGFB 的基因表达含量

Table 4 Gene expression levels of FOXM1, CDK6 and VEGFB in KLE cells

分组	FOXM1	CDK6	VEGFB
无意义组	1.00±0.09	1.00±0.07	1.00±0.09
干扰组	0.19±0.02	0.26±0.04	0.35±0.04
t 值	24.80	16.23	8.95
P 值	<0.05	<0.05	<0.05

3 讨论

抗沉默功能 1 (ASF1) 作为 H3/H4 组蛋白伴侣蛋白,参与细胞分裂过程中染色质重塑,并被报道与多种疾病密切相关^[7]。有研究指出,过表达 ASF1B 可促进肾透明细胞癌细胞的增殖与迁移,与 AKT/P70 S6K1 通路的调控密切相关^[6];下调 ASF1B 可抑制 PI3K/AKT 通路,从而诱导癌细胞凋亡^[5];ASF1B 和组蛋白 H3.3A 相互作用可刺激肿瘤细胞增殖^[8]。因此,ASF1B 可能作为潜在的肿瘤靶标参与多种恶性肿瘤的发生发展。前期通过生物信息手段发现 ASF1B 与已知的原癌基因 FOXM1 在子宫内膜癌中表达显著相关,而 FOXM1 的表达是肿瘤组织复发和耐药的关键因素^[9],下调 FOXM1 的表达可降低肿瘤细胞的活性^[10]。这提示 ASF1B 可能通过调控 FOXM1 在子宫内膜癌中发挥生物学作用。

考虑到 ASF1B 在子宫内膜癌中可能的生物学价值,研究通过生物信息技术及临床组织验证发现,ASF1B 在子宫内膜癌组织中高表达,且与患者

高临床分期、淋巴结转移及预后不良相关,这提示ASF1B可能参与子宫内膜癌的发生发展。同时,生物信息学技术分析显示原癌基因FOXMI与ASF1B表达在子宫内膜癌中高度正相关,提示ASF1B可能通过调控原癌基因FOXMI在子宫内膜癌中发挥生物学作用,进一步的体外研究显示,ASF1B对FOXMI及其下游分子CDK6及VEGFB存在正调控作用,且可显著促进细胞增殖及转移能力,回复性干扰FOXMI则显著抑制ASF1B过表达后的生物学效应,干扰ASF1B则可抑制FOXMI及其下游通路,并减弱细胞增殖及转移能力,这些证据表明ASF1B能有效介导FOXMI的表达,从而促进子宫内膜癌细胞的恶性表型。

综上所述,ASF1B在子宫内膜癌的发生与发展中发挥着重要作用,其可通过增强FOXMI的表达促进子宫内膜癌细胞的恶性表型。本研究结论为子宫内膜癌的治疗提供了新的干预靶点。虽然本研究在细胞水平证实ASF1B与FOXMI在子宫内膜癌细胞恶性表型中的作用,但干扰ASF1B与FOXMI可以作为子宫内膜癌的治疗策略仍需通过动物实验进一步明确,最终可推广于临床诊断与治疗中^[11]。

参考文献

[1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6):394-424.

[2] Townsend MH, Ence ZE, Felsted AM, et al. Potential new biomarkers for endometrial cancer [J]. Cancer Cell Int, 2019, 19(1):19.

[3] Natsume R, Eitoku M, Akai Y, et al. Structure and function of the histone chaperone CIA/ASF1 complexed with histones H3 and H4 [J]. Nature, 2007, 446(7133):338-341.

[4] Corpet A, De Koning L, Toedling J, et al. Asf1b, the necessary Asf1 isoform for proliferation, is predictive of outcome in breast cancer [J]. EMBO J, 2011, 30(3):480-493.

[5] Han G, Zhang X, Liu P, et al. Knockdown of anti-silencing function 1B histone chaperone induces cell apoptosis via repressing PI3K/Akt pathway in prostate cancer [J]. Int J Oncol, 2018, 53(5):2056-2066.

[6] Zhou JQ, Qiu T, Chen ZB, et al. Anti-silencing function 1B histone chaperone promotes cell proliferation and migration via activation of the AKT pathway in clear cell renal cell carcinoma [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2019, 26, 511(1):165-172.

[7] Min Y, Frost JM, Choi Y. Nuclear Chaperone ASF1 is Required for Gametogenesis in Arabidopsis thaliana [J]. Sci Rep, 2019, 9(1):13959.

[8] Paul PK, Rabagia ME, Wang CY, et al. Histone chaperone ASF1B promotes human β -cell proliferation via recruitment of histone H3.3 [J]. Cell Cycle, 2016, 15(23):3191-3202.

[9] Roh YG, Mun JY, Kim SK, et al. Fanconi Anemia Pathway Activation by FOXM1 Is Critical to Bladder Cancer Recurrence and Anticancer Drug Resistance [J]. Cancers, 2020, 12(6):1417.

[10] Jeong JH, Ryg JH. Brousoflavonol B from Broussonetia kazinoki Siebold Exerts Anti-Pancreatic Cancer Activity through Downregulating FoxM1 [J]. Molecules, 2020, 25(10):2328.

[11] 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.

(上接第1356页)

[10] 林文婷, 曾敏, 陈积雄, 等. 血清C1q、CTRP1与冠状动脉粥样硬化性心脏病的相关性研究 [J]. 中国循证心血管医学杂志, 2019, 11(5):534-536+540.

[11] 刘善宽, 尹俊明. PCT、CRP、血清胆红素、尿酸及载脂蛋白A1、B对冠心病的诊断价值 [J]. 广东医学, 2019, 40(15):2246-2248, 2253.

[12] 贾磊, 高钊. 冠心病不稳定型心绞痛合并冠脉狭窄患者CRP、Angptl2、CTRP1水平变化及临床意义 [J]. 海南医学, 2020, 31(8):966-968.

[13] 牛潇晗, 买丹, 邱霜, 等. 冠状动脉粥样硬化性心脏病患者血清C1q与CTRP1水平监测的临床价值初探 [J]. 中华检验医学杂志, 2019, 42(10):864-868.

[14] 种肖宇, 张红, 牟娜, 等. 冠心病患者血清硫氧还蛋白还原酶与炎症因子的相关性分析 [J]. 医学临床研究, 2019, 36(4):776-778.

[15] Yuasa D, Ohashi K, Shibata R, et al. C1q/TNF-related protein-1 functions to protect against acute ischemic injury in the heart [J]. FASEB J, 2016, 30(3):1065-1075.

[16] Kanemura N, Shibata R, Ohashi K, et al. C1q/TNF-related protein 1 prevents neointimal formation after arterial injury [J]. Atherosclerosis, 2017, 257(11):138-145.

[17] Shen L, Wang S, Ling Y, et al. Association of C1q/TNF-related protein-1 (CTRP1) serum levels with coronary artery disease [J]. J Int Med Res, 2019, 47(6):2571-2579.

CD56 表达与甲状腺乳头状癌临床病理特征的关系及对远处转移的预测价值

许超 盛以泉 葛丽卫 沈海英*

[摘要] **目的** CD56 表达与甲状腺乳头状癌(PTC)临床病理特征的关系及对远处转移的预测价值。**方法** 选择2014年1月至2015年3月期间在本院接受手术切除的PTC患者184例作为PTC组,同期在本院接受手术切除的结节性甲状腺肿患者78例作为对照组,检测CD56的阳性率。随访PTC患者的无远处转移生存情况,采用Kaplan-Meier曲线分析CD56对无远处转移生存的预测价值,采用COX模型分析无远处转移生存的影响因素。**结果** PTC组患者PTC组织中CD56的阳性率低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);TNM分期Ⅲ~Ⅳ期、有淋巴结转移、有包膜浸润的PTC组织中CD56的阳性率低于Ⅰ~Ⅱ期、无淋巴结转移、无包膜浸润的PTC组织,差异有统计学意义($P<0.05$);经Kaplan-Meier曲线分析,CD56阳性的PTC患者无远处转移生存率高于CD56阴性的PTC患者,差异有统计学意义($P<0.05$);经COX分析,CD56表达、淋巴结转移、包膜侵犯是PTC患者无远处转移生存的影响因素。**结论** PTC中CD56表达增加与病理特征的恶化、远处转移的发生密切相关。

[关键词] 甲状腺乳头状癌;CD56;远处转移;预测;影响因素

Relationship between the expression of CD56 and the clinicopathological features of papillary thyroid carcinoma and its predictive value for distant metastasis

XU Chao, SHENG Yiquan, GE Liwei, SHEN Haiying*

(Department of Laboratory Pathology, 72nd Army Hospital of the Chinese people's Liberation Army, Huzhou, Zhejiang, China, 313000)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the relationship between the expression of CD56 and the clinicopathological features of thyroid papillary carcinoma (PTC) and its predictive value for distant metastasis. **Methods** From January 2014 to March 2015, 184 PTC patients who underwent surgical resection in our hospital were selected as the PTC group, while 78 nodular goiter patients who underwent surgical resection in our hospital at the same time were selected as the control group, and the positive rate of CD56 was detected. Distant metastasis of PTC patients was followed up. Kaplan Meier curve was used to analyze the predictive value of CD56 on survival without distant metastasis, COX model was used to analyze the influencing factors of survival without distant metastasis. **Result** The positive rate of CD56 in PTC tissue of the PTC group was lower than that of the control group, the difference had statistical significance ($P<0.05$), and the positive rate of CD56 in PTC tissue with TNM stage Ⅲ~Ⅳ, lymph node metastasis and capsule infiltration were lower than those of PTC tissue with TNM stage Ⅰ~Ⅱ, non-lymph node metastasis and non-capsule infiltration, the difference had statistical significance ($P<0.05$). According to Kaplan Meier curve analysis, the survival rate without distant metastasis of PTC patients with positive CD56 expression was higher than that of PTC patients with negative CD56 expression ($P<0.05$); according to COX analysis, CD56 expression, lymph node

基金项目:湖州市基金项目(HZYF2018-23)

作者单位:中国人民解放军陆军第72集团军医院检验病理科,浙江,湖州 313000

*通信作者:沈海英, E-mail:duanzhe8629391@163.com

metastasis and capsule invasion were the influencing factors for the survival without distant metastasis of PTC patients. Conclusion The increase of CD56 expression in PTC is closely related to the deterioration of pathological characteristics and the occurrence of distant metastasis.

[KEY WORDS] Papillary thyroid carcinoma; CD56; Distant metastasis; Prediction; Influencing factors

甲状腺癌是临床常见的头颈部恶性肿瘤,其中甲状腺乳头状癌(papillary thyroid carcinoma, PTC)最为常见、约占甲状腺癌的70%~80%。PTC具有相对懒惰的生物学特性,10年生存率在90%以上^[1-2]。但是,PTC容易早期出现颈淋巴结转移^[3],有研究报道,淋巴结转移是造成PTC患者远处转移的重要危险因素^[4]。近些年,越来越多的学者开始关注PTC患者术后远处转移的影响因素及预测方法,早期筛查可能发生远处转移的PTC患者并进行严格的促甲状腺激素(Thyroid Stimulating Hormone, TSH)抑制治疗及严密的随访,进而及时发现远处转移并进行治疗。免疫球蛋白超家族成员CD56是新发现的PTC标志分子,对PTC具有一定诊断价值,该分子具有黏附分子活性、能够促进癌细胞转移及新生淋巴管形成,但CD56与PTC远处转移的关系尚不明确。基于此,本研究将分析CD56表达与PTC临床病理特征的关系及对远处转移的预测价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选择2014年1月至2015年3月期间在本院接受手术切除的PTC患者184例作为PTC组,包括男性71例、女性113例,年龄37~61岁、平均(45.28±8.28)岁,另取同期在本院接受手术切除的结节性甲状腺肿患者78例作为对照组,其中男性31例、女性47例,年龄33~58岁、平均(43.49±9.58)岁,均经术后病理诊断为结节性甲状腺肿。两组间一般资料的比较,无统计学意义($P>0.05$),有可比性。

入组标准:①经术后病理诊断为PTC;②临床病理资料完整;③未发生失访;④患者签署知情同意书。排除标准:①既往有其他恶性肿瘤病史;②合并糖尿病、感染、自身免疫性疾病。

1.2 方法

1.2.1 CD56 表达的检测

取PTC组和对照组的病理切片,采用SP免疫组化染色试剂盒(北京中杉金桥生物公司)对CD56进行染色,按照试剂盒的说明书进行操作,苏木素复染后脱水、透明、封片,在显微镜下观察染色情

况。CD56阳性染色位于细胞膜,按照染色强度计分:未染色为0分、淡黄色为1分、棕黄色为2分、棕褐色为3分;按阳性细胞染色比例计分:未染色为0分、阳性细胞<25%为1分、25-50%为2分、>50%为3分。两项积分相乘,0分为阴性、≥1分为阳性。

1.2.2 临床病理特征的收集

查询PTC组患者的病历资料,收集以下临床病理特征:性别、年龄、肿瘤大小、肿瘤病灶数目、TNM分期、淋巴结转移情况、包膜浸润情况。

1.2.3 无转移生存的随访

随访起始时间为手术后第一天,随访截止时间为2020年3月。随访方式包括门诊复查、电话或网络软件回访,随访内容为无转移生存情况,确认转移的辅助检查依据包括放射性碘扫描、¹⁸F-FDG-PET扫描、病理学活检。

1.3 统计学方法

采用SPSS 21.0软件进行数据分析,计数资料以 $n(\%)$ 表示、采用 χ^2 检验,无转移生存的比较采用Kaplan-Meier曲线分析,无转移生存的影响因素采用COX回归模型分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PTC组与对照组肿瘤组织中CD56表达的比较

PTC组患者PTC组织中CD56阳性表达24例(13.04%);对照组患者结节性甲状腺肿组织中CD56阳性表达71例(91.03%)。PTC组患者PTC组织的CD56阳性率明显低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见图1。

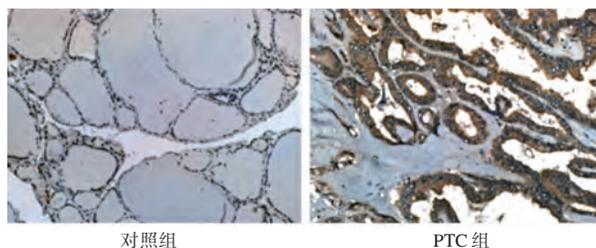


图1 PTC组织及结节性甲状腺肿组织典型的CD56免疫组化图(SP, ×200)

Figure 1 Typical CD56 immunohistochemistry of PTC and nodular goiter (SP, ×200)

2.2 不同临床病理特征 PTC 中 CD56 表达的比较

CD56 的阳性率在不同年龄、性别、肿瘤大小、肿瘤病灶的 PTC 比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); TNM 分期 III~IV 期、有淋巴结转移、有包膜浸润的 PTC 中 CD56 阳性率低于 I~II 期、无淋巴结转移、无包膜浸润的 PTC, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 不同临床病理特征 PTC 中 CD56 表达的比较
[n(%)]

Table 1 Comparison of CD56 expression in PTC with different clinicopathological features [n(%)]

临床病理特征	分类	n	CD56 阳性率	χ^2 值	P 值
性别	男	71	11(15.49)	0.612	0.434
	女	113	13(11.50)		
年龄	<45 岁	95	11(11.58)	0.371	0.542
	≥45 岁	89	13(14.61)		
肿瘤大小	最大径 <1 cm	115	12(10.43)	1.840	0.175
	最大径 ≥1 cm	69	12(17.39)		
肿瘤病灶	单发	117	14(11.97)	0.320	0.566
	多发	67	10(14.93)		
TNM 分期	I~II	120	20(16.67)	3.993	0.046
	III~IV	64	4(6.25)		
淋巴结转移	否	98	19(19.39)	7.441	0.006
	是	86	5(5.81)		
包膜侵犯	否	103	18(17.48)	4.502	0.044
	是	81	6(7.41)		

2.3 CD56 阳性与阴性表达患者无远处转移生存率的比较

经 Kaplan-Meier 曲线分析, CD56 阳性的 PTC 患者的无远处转移生存率明显高于 CD56 阴性的甲状腺乳头状癌患者, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 2。

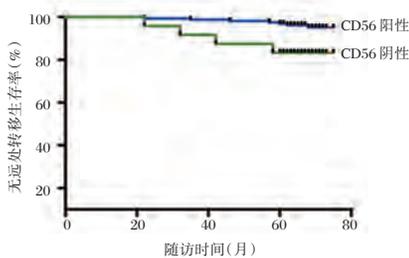


图 2 CD56 阳性与阴性表达患者无远处转移生存率的 Kaplan-Meier 曲线

Figure 2 Kaplan Meier curve of distant metastasis free survival in patients with CD56 positive and negative expression

2.4 PTC 患者无远处转移生存影响因素的单因素分析

以无远处转移生存为应变量, 以临床病理特

征、CD56 表达为自变量进行 COX 回归分析, 结果显示: CD56 表达、肿瘤大小、肿瘤病灶、TNM 分期、淋巴结转移、包膜侵犯是无远处转移生存的影响因素。见表 2。

表 2 PTC 患者无远处转移生存影响因素的 COX 单因素分析

Table 2 Cox univariate analysis of influencing factors of distant metastasis free survival in PTC patients

因素	S.E.	RR	95%CI	χ^2 值	P 值
性别	0.172	0.924	0.551~2.383	0.894	0.325
年龄	0.084	1.089	0.614~2.559	1.039	0.285
肿瘤大小	-0.295	0.773	0.504~0.935	5.571	0.020
肿瘤病灶	-0.271	0.823	0.523~0.946	4.585	0.025
TNM 分期	-0.347	0.737	0.495~0.914	6.029	0.014
淋巴结转移	-0.585	0.709	0.459~0.887	8.684	0.003
包膜侵犯	-0.214	0.842	0.571~0.958	4.283	0.034
CD56	0.384	1.334	1.093~2.958	7.182	0.007

2.5 PTC 患者无远处转移生存影响因素的多因素分析

COX 回归分析: CD56 表达、淋巴结转移、包膜侵犯是无远处转移生存的影响因素。见表 3。

表 3 PTC 患者无远处转移生存影响因素的多因素分析
Table 3 Cox multivariate analysis of influencing factors of distant metastasis free survival in PTC patients

因素	S.E.	RR	95%CI	χ^2 值	P 值
肿瘤大小	-0.109	0.834	0.579~1.535	1.371	0.185
肿瘤病灶	-0.093	0.898	0.523~0.946	4.585	0.025
TNM 分期	-0.347	0.737	0.495~0.914	6.029	0.014
淋巴结转移	-0.585	0.709	0.459~0.887	8.684	0.003
包膜侵犯	-0.214	0.842	0.571~0.958	4.283	0.034
CD56	0.384	1.334	1.093~2.958	7.182	0.007

3 讨论

PTC 的预后良好, 10 年生存率在 90% 以上。但是, PTC 是典型的亲淋巴型恶性肿瘤, 容易早期出现颈淋巴结转移, 进而增加远期发生远处转移的风险^[5-8]。近些年, PTC 术后远处转移的相关影响因素及预测手段成为了头颈部恶性肿瘤研究的热点。

CD56 是免疫球蛋白超家族中的一种神经细胞黏附分子, 神经外胚层肿瘤、非小细胞肺癌、小细胞肺癌的相关研究发现, CD56 在神经肿瘤中表达降低^[9-11]。新近国内外的多项研究发现, CD56 可以作为 PTC 诊断的分子标志物, 在 PTC 中表达减少且用于 PTC 的诊断能够提高准确性、特异性^[12-13]。本研究对 PTC 组织中 CD56 的检测发现: PTC 组织中 CD56 的阳性率低于结节性甲状腺肿组织, 与既

往其他研究报道的 PTC 中 CD56 低表达的结果一致,表明 CD56 低表达与 PTC 的发病密切相关。

CD56 作为黏附分子,在恶性肿瘤发生发展中的作用包括抑制癌细胞迁移、侵袭以及减少新生淋巴管形成^[14]。随着癌细胞的迁移、侵袭以及新生淋巴管的形成,肿瘤的病理特征也会发生相应变化,表现为体积增大、淋巴结转移、包膜浸润等。本研究进一步分析不同病理特征 PTC 中 CD56 表达的差异可知:随着 TNM 分期增加、淋巴结转移及包膜浸润的发生,PTC 中 CD56 的阳性率明显减少,表明 CD56 低表达与 PTC 多项病理特征的恶化有关,低表达的 CD56 可能通过促进癌细胞迁移、侵袭以及增加新生淋巴管形成的生物学作用来造成 PTC 淋巴结转移及包膜浸润的发生。

CD56 低表达与 PTC 病理特征的恶化有关,但对 PTC 远处转移的预测及评估价值尚不清楚。宫颈神经内分泌癌、白血病、多发性骨髓瘤的相关研究表明,CD56 对上述恶性肿瘤的预后具有预测价值^[15-18]。本研究对 PTC 患者术后的远处转移进行了随访,绘制无远处转移生存的 Kaplan-Meier 曲线结果表明 CD56 表达对 PTC 术后远处转移具有预测价值。进一步在 COX 模型中分析无远处转移生存的影响因素可知:CD56 表达、淋巴结转移、包膜侵犯是影响因素。淋巴结转移、包膜侵犯影响无远处转移生存的结果与既往其他学者的研究结果^[4, 7]一致;而 CD56 表达影响无远处转移生存的结果与本研究中 Kaplan-Meier 曲线的分析结果一致,由此也进一步确认了 CD56 表达对 PTC 术后远处转移的预测价值。

综上所述,PTC 中 CD56 的表达明显降低,低表达的 CD56 不仅与 TNM 分期增加、淋巴结转移、包膜浸润等病理特征的恶化有关,还对远处转移具有预测价值。

参考文献

[1] 张洁, 闫贻忠, 王丹, 等. 2005-2014 年中国肿瘤登记地区甲状腺癌发病的时间趋势分析[J]. 现代预防医学, 2020, 47(4): 577-582, 591.

[2] 任艳军, 刘庆敏, 葛明华, 等. 2010-2014 年浙江省肿瘤登记地区甲状腺癌发病和死亡情况分析[J]. 中华预防医学杂志, 2019, 53(10): 1062-1065.

[3] Zhang J, Cheng X, Shen L, et al. The Association Between Lymph Node Stage and Clinical Prognosis in Thyroid Cancer [J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2020, 27(11):90.

[4] 肖婧, 杨昱. 甲状腺乳头状癌患者的预后及相关因素分析[J]. 中国卫生统计, 2019, 36(5): 740-742.

[5] Lu Y, Jiang L, Chen C, et al. Clinicopathologic characteristics and outcomes of papillary thyroid carcinoma in younger patients[J]. Medicine (Baltimore), 2020, 99(15): e19795.

[6] 马小开, 黄建康, 朱博, 等. 228 例甲状腺微小乳头状癌临床特征及颈部淋巴结转移危险因素分析[J]. 中国癌症杂志, 2019, 29(8): 590-594.

[7] 温晓玲, 谢建平, 林师宇, 等. 血清癌胚抗原、甲状腺球蛋白及半乳凝集素-3 水平在甲状腺癌鉴别诊断中的价值[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2019, 11(1): 58-62.

[8] 朱有志, 郭弘堃, 陈玲, 等. 甲状腺乳头状癌颈部淋巴结转移特征对远处转移的预测价值[J]. 中华普通外科杂志, 2018, 33(4): 288-292.

[9] Crossland DL, Denning WL, Ang S, et al. Antitumor activity of CD56-chimeric antigen receptor T cells in neuroblastoma and SCLC models[J]. Oncogene, 2018, 37(27):3686-3697.

[10] Huang Z, Yu H, Zhang J, et al. Correlation of cancer stem cell markers and immune cell markers in resected non-small cell lung cancer[J]. J Cancer, 2017, 8(16): 3190-3197.

[11] 王鑫, 张毅, 胡牧, 等. TTF-1、CD56、P40 免疫组化标志物及其他临床特征与小细胞肺癌预后相关性研究[J]. 中国肺癌杂志, 2017, 20(8): 522-527.

[12] Cho H, Kim JY, Oh YL. Diagnostic value of HBME-1, CK19, Galectin 3, and CD56 in the subtypes of follicular variant of papillary thyroid carcinoma [J]. Pathol Int, 2018, 68(11):605-613.

[13] 卢平, 胡婕, 程双华, 等. 甲状腺乳头状癌患者 TPO 与 CD56 表达的诊断价值[J]. 诊断病理学杂志, 2020, 27(3): 172-175.

[14] Hsieh YH, Hsu YH, Lien CY, et al. Retroperitoneal extraosseous peripheral primitive neuroectodermal tumor in a Formosan serow: case report and literature review [J]. J Vet Diagn Invest, 2019, 31(6):883-888.

[15] 杨美琴, 牟靖祎, 王轶英, 等. 宫颈神经内分泌癌的临床病理特征及预后因素分析[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2018, 32(8): 797-799.

[16] Aref S, Abousamra N, El-Helaly E, et al. Clinical Significance of CD200 and CD56 Expression in Patients with Acute Myeloid Leukemia [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2020, 21(3): 743-748.

[17] Ibrahim A, Zahran AM, Aly SS, et al. CD56 and CD11b Positivity with Low Smac/DIABLO Expression as Predictors of Chemoresistance in Acute Myeloid Leukaemia: Flow Cytometric Analysis [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2018, 19(11): 3187-3192.

[18] Skerget M, Skopec B, Zadnik V, et al. CD56 Expression Is an Important Prognostic Factor in Multiple Myeloma Even with Bortezomib Induction [J]. Acta Haematol, 2018, 139(4):228-234.

HIF-1 α 、VEGF及TIMP与心脏瓣膜置换术后并发压力性损伤的相关性研究

申荣华¹ 谢静² 刘燕³ 李秀莉⁴ 封俊艳^{1*}

[摘要] 目的 研究缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)、血管内皮生长因子(VEGF)及组织金属蛋白酶抑制剂(TIMP)与心脏瓣膜置换术后并发压力性损伤的相关性。方法 选取2019年2月至2020年1月本院ICU收治的161例心脏瓣膜置换术后患者作为研究对象。将患者根据是否并发压力性损伤分为并发压力性损伤者54(33.54%)以及未并发压力性损伤者107(66.46%)。比较患者HIF-1 α 、VEGF、TIMP表达水平及与压力性损伤分期的相关性;计算HIF-1 α 、VEGF及TIMP单独检测和联合检测对术后压力性损伤预测的敏感性、特异性、准确性。结果 并发压力损伤者HIF-1 α 、VEGF及TIMP水平均显著高于未并发压力损伤者,差异具有统计学意义($P<0.05$);1、2期压力性损伤者HIF-1 α 、VEGF及TIMP水平明显高于3、4期,差异具有统计学意义($P<0.05$),分期越高损伤越严重,其HIF-1 α 、VEGF及TIMP水平表达越高,上述因子与压力性损伤分期程度呈明显正相关($P<0.05$);HIF-1 α 、VEGF及TIMP联合检测预测术后压力性损伤灵敏度、特异度及准确度显著高于单一检测。结论 HIF-1 α 、VEGF及TIMP与心脏瓣膜置换术后并发压力性损伤具有一定相关性,上述因子联合监测可有效预测压力性损伤。

[关键词] 缺氧诱导因子-1 α ; 血管内皮生长因子; 组织金属蛋白酶抑制剂; 压力性损伤

Correlation between HIF - 1 α , VEGF, TIMP and pressure injury after heart valve replacement

SHEN Ronghua¹, XIE Jing², LIU Yan³, LI Xiuli⁴, FENG Junyan^{1*}

(1. Department of Cardiology, the First Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei, China, 050031; 2. Department of Cardiothoracic Surgery, Chengde Central Hospital, Chengde, Hebei, China, 050000; 3. Department of Cardiothoracic Surgery, the First Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei, China, 050031; 4. Department of Nursing, the First Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei, China, 050031)

[ABSTRACT] Objective To study the correlation between hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α), vascular endothelial growth factor (VEGF), and tissue inhibitor of matrix metalloproteinases (TIMP) and pressure injury after heart valve replacement. Methods 161 patients after heart valve replacement in our hospital from February 2019 to January 2020 were selected. The levels of HIF-1 α , VEGF, TIMP and their correlation with the stage of pressure injury were compared in different patients. The sensitivity, specificity, and accuracy of HIF-1 α , VEGF, and TIMP alone and combined detection for the prediction of postoperative

基金项目:河北省2018年度医学科学研究重点课题计划(20180253)

作者单位:1. 河北医科大学第一医院心外科监护室,河北,石家庄 050031

2. 承德市中心医院心胸外科,河北,承德 050000

3. 河北医科大学第一医院心胸外科,河北,石家庄 050031

4. 河北医科大学第一医院护理部,河北,石家庄 050031

*通信作者:封俊艳, E-mail:44506861@qq.com

pressure injury were calculated. **Results** The levels of HIF-1 α , VEGF and TIMP in patients with pressure injury were significantly higher than those of patients without pressure injury, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). The levels of HIF-1 α , VEGF and TIMP in patients with stages 1 and 2 pressure injury were significantly higher than those with stages 3 and 4, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). The higher the stage, the more severe the injury, and the higher the expression of HIF-1 α , VEGF and TIMP. The above factors are significantly positively correlated with the stage of pressure injury ($P<0.05$); The sensitivity, specificity and accuracy of combined detection of HIF-1 α , VEGF and TIMP for predicting postoperative pressure injury were significantly higher than that of single detection. **Conclusion** HIF-1 α , VEGF and TIMP have a certain correlation with pressure injury after heart valve replacement. Combined monitoring of these three factors can effectively predict pressure injury.

[KEY WORDS] Hypoxia inducible factor-1 α ; Vascular endothelial growth factor; Tissue inhibitor of matrix metalloproteinases; Pressure injury

压力性损伤是发生在皮肤或潜在皮下软组织的局限性损伤,可表现为完整皮肤或开放性溃疡,可伴有疼痛感^[1]。压力性损伤不仅会增加患者痛苦,还会使其病情加重,经济负担加重,严重者可危及生命,同时也使得护理人员工作量加大。因病情危重、活动受限及长期卧床等原因心脏瓣膜置换术后并发压力性损伤的风险较高,是普通患者的2~3倍^[2]。缺氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)作为一种核转录因子,可通过调控下游多种靶基因参与机体血管生成、细胞增殖和迁移、细胞凋亡等病理生理过程。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是一种特异性的促进血管内皮生长和血管形成的多肽类糖蛋白^[3],已被证实会在激活后的神经细胞中表达。组织金属蛋白酶抑制剂(tissue inhibitor of matrix metalloproteinases, TIMP)是一种天然基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)抑制剂,与MMP之间的协同作用共同维护着机体的动态平衡^[4]。既往研究显示, HIF-1 α 、VEGF及TIMP与压力性损伤的形成密切相关^[5]。故本实验研究HIF-1 α 、VEGF及TIMP与心脏瓣膜置换术后并发压力性损伤的相关性,以期降低术后压力性损伤风险、改善患者预后提供参考。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2019年2月至2020年1月本院ICU收治的161例心脏瓣膜置换术后患者作为研究对象。其中男性110例,女性51例,平均年龄(47.54 \pm 10.66)岁。根据是否并发压力性损伤分为并发压力性损伤者54(33.54%)以及未并发压力性损伤者

107(66.46%);并发压力性损伤者根据《美国国家压疮咨询委员会2016年压力性损伤的定义和分期解读》^[6]进行分组:1期:患者皮肤完整,局部出现红斑,指压不变白;2期:可见部分皮层缺失,真皮暴露;3期:全皮层缺失,溃疡可见皮下脂肪;4期:患者全层皮肤及组织缺失。

纳入标准:①年龄 \geq 18岁,性别不限;②临床资料无缺损或丢失;③无既往心脏手术史;④未合并其他脏器恶性疾病者。排除标准:①哺乳期或妊娠期孕妇;②合并精神疾病史、痴呆病史者;③合并心脑血管、肝、肾等功能异常者;④凝血功能障碍者。

1.2 方法

检查前叮嘱患者不能进食,进行空腹检查,抽取3 mL外周静脉血。VEGF采用酶联免疫吸附法检测,试剂盒:美国R&D公司的VEGF单克隆抗体酶标试剂盒。HIF-1 α 、TIMP采用双抗体夹心酶联免疫吸附法检测,试剂盒购自上海卓康生物科技有限公司。严格按照说明书进行操作。

1.3 观察指标

比较并发和未并发压力损伤患者以及不同分期压力性损伤患者HIF-1 α 、VEGF、TIMP水平表达情况及上述因子水平与压力性损伤分期的相关性;分析HIF-1 α 、VEGF及TIMP单独检测和联合检测对术后压力性损伤预测的敏感性、特异性和准确性。

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;不同分期压力性损伤患者HIF-1 α 、VEGF、TIMP水平比较采用方差分析;计数资料 $n(\%)$ 表示;相关性采用Spearman相

关性分析法,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

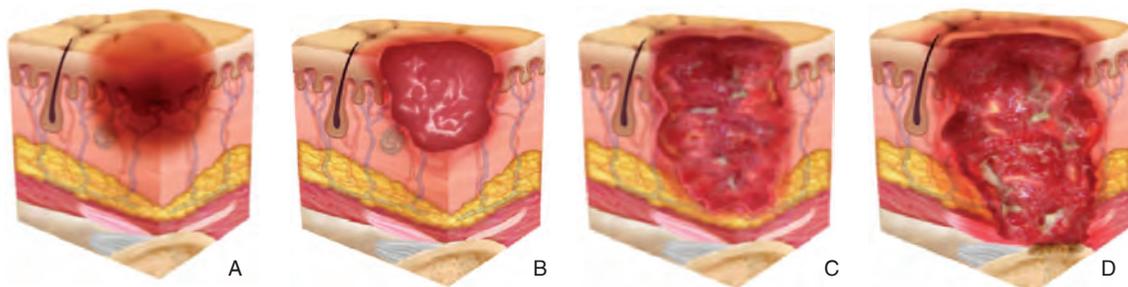
2.1 心脏瓣膜置换术后患者压力性损伤情况

压力性损伤分期:1期14例(图1A);2期22例

(图1B);3期13例(图1C);4期5例(图1D)。

2.2 两组 HIF-1 α 、VEGF 及 TIMP 水平比较

并发压力损伤者 HIF-1 α 、VEGF 及 TIMP 水平均显著高于未并发压力损伤者,差异具有统计学意义($P < 0.05$),见表1。



注:A为1期压力性损伤,创面局部水肿;B为2期压力性损伤,部分皮层缺损;C为3期压力性损伤,皮肤全层缺损;D为4期压力性损伤,创面深达筋膜、肌肉等组织。

图1 压力性损伤各期图像

Figure 1 Image of pressure damage

表1 两组 HIF-1 α 、VEGF 及 TIMP 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of HIF-1 α , VEGF and TIMP levels in 2 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	HIF-1 α (ng/L)	VEGF(ng/L)	TIMP(μ g/L)
并发组	54	3.15 \pm 1.98	8.11 \pm 2.65	55.29 \pm 8.46
未并发组	107	1.64 \pm 0.34	3.55 \pm 1.63	33.54 \pm 6.55
t值		7.690	13.471	17.990
P值		0.001	0.001	0.001

2.3 不同分期压力性损伤患者 HIF-1 α 、VEGF、TIMP 水平比较

不同分期压力性损伤患者 HIF-1 α 、VEGF 及 TIMP 水平比较结果:4期>3期>2期>1期,差异具有统计学意义($P < 0.05$),见表2。

表2 不同分期压力性损伤患者 HIF-1 α 、VEGF、TIMP 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of HIF-1 α , VEGF and TIMP levels in patients with different stages of pressure injury ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	HIF-1 α (ng/L)	VEGF(ng/L)	TIMP(μ g/L)
1期	14	1.74 \pm 0.41	4.41 \pm 1.05	35.32 \pm 5.17
2期	22	1.97 \pm 0.52	5.13 \pm 2.64	37.51 \pm 5.82
3期	13	2.96 \pm 1.01	7.15 \pm 2.66	52.64 \pm 6.24
4期	5	3.08 \pm 1.25	8.29 \pm 2.93	54.69 \pm 7.53
F值		8.94	5.44	31.79
P值		0.001	0.003	0.001

2.4 HIF-1 α 、VEGF 及 TIMP 检测对术后压力性损伤预测效能比较

HIF-1 α 、VEGF 及 TIMP 联合检测预测术后压力性损伤灵敏度、特异度及准确度显著高于单一

的 HIF-1 α 、VEGF 及 TIMP 检测。见表3。

表3 HIF-1 α 、VEGF 及 TIMP 检测预测术后压力性损伤灵敏度、特异度及准确度

Table 34 Sensitivity, specificity and accuracy of HIF-1 α , VEGF and TIMP in predicting postoperative pressure injury

检查方法	类型	临床诊断(例)		灵敏度 (%)	特异度 (%)	准确度 (%)
		并发	未并发			
HIF-1 α	并发	38	19	70.37	82.24	78.26
	未并发	16	88			
VEGF	并发	37	22	68.52	79.44	75.78
	未并发	17	85			
TIMP	并发	36	23	66.67	78.50	74.53
	未并发	18	84			
三者联合	并发	48	10	88.89	90.64	90.06
	未并发	6	97			

2.5 HIF-1 α 、VEGF 及 TIMP 水平与压力性损伤分期相关性分析

压力性损伤分期程度与 HIF-1 α ($r=0.564, P=0.003$)、VEGF($r=0.432, P=0.024$)及 TIMP($r=0.506, P=0.012$)水平呈明显正相关。

3 讨论

压力性损伤是临床重症手术治疗后较为常见的一种并发症,也是全球医疗卫生机构面临的重大问题,对患者和医护人员均可造成一定的影响,如会增加患者经济负担及身心痛苦,同时还会导致患者死亡风险增加^[7]。既往有文献显示,发生压力性损伤患者死亡率是普通患者的4倍^[8]。目前

有关压力性损伤发病机制尚未明确,而探究其发病机制,找到预防该病的靶点,是降低术后并发压力性损伤风险的关键。

VEGF 又称为血管通透因子,Chloe 等^[9]研究显示,VEGF 家族参与了多种生理病理过程,如炎症、伤口愈合、供血及供氧不足、肿瘤生成、胚胎发育等。目前研究认为,VEGF 还可通过一个独立机制直接保护神经细胞,属于一种神经保护因子,不仅仅只依赖于血管再生^[10]。Fan 等^[11]研究报道发现,供血、供氧不足可诱导 VEGF 的表达,进而促进新血管生成。于杰等^[12]报道指出,压力性损伤出现后,创面组织中 VEGF 表达水平较正常组织呈高表达状态。本组研究结果与上述文献报道相符,原因可能是损伤出现后创面局部处于缺血缺氧状态,导致 VEGF 蛋白应激性升高。

HIF-1 α 属于一种转录因子,当组织细胞处于缺氧状况时,各种缺氧应答基因的刺激会迅速激活 HIF-1 α ,使其水平逐渐升高^[13]。在不缺氧的情况下,HIF-1 α 因降解增加和转录抑制处于低浓度状态^[14]。向伟等^[15]研究发现,在急性脑梗死患者中,HIF-1 α 水平越高,梗死面积越大,是影响患者预后恢复进展慢的重要原因。王晓慧等^[16]分析 HIF-1 α 在不同受压时间点大鼠压力性损伤局部皮肤组织中的表达及相互关系,结果提示,HIF-1 α 介导的 VEGF 表达减少引起组织血管生成减少可能是 3 期压力性损伤慢性难愈的重要原因之一。由此可推测,HIF-1 α 水平表达过高可能是压力性损伤发生机制的重要因素。

时红梅等^[17]研究发现,压疮形成的 I 期、II 期、III 期中,TIMP 的活性会随之降低,而压疮分期越高,伤口愈合会更加困难,进而推测 TIMP 水平可作为压疮早期预防和诊断的重要因素。张亚楠等^[18]研究分析 TIMP-1 在各期大鼠压力性损伤模型中的表达及意义,结果发现,随着压力性损伤程度的加深,TIMP-1 表达先上升后下降。此外本组研究还比较了 HIF-1 α 、VEGF 及 TIMP 检测对术后压力性损伤预测效能,结果提示三者联合预测可信度更高。

综上所述,HIF-1 α 、VEGF 及 TIMP 与心脏瓣膜置换术后并发压力性损伤具有一定相关性,HIF-1 α 、VEGF 及 TIMP 水平越高,压力性损伤程度越深;上述因子联合监测可有效预测压力性损伤。

参考文献

[1] 张金立,肖芳,白艳辉,等.羟考酮超前镇痛对腹部闭合

性损伤患者术后镇痛效果及炎性因子的影响[J].临床误诊误治,2018,31(7):37-41.

[2] Jacqueline FL, Gray TA, Dumville JC, et al. Preventing pressure injury in nursing homes: developing a care bundle using the Behaviour Change Wheel[J]. BMJ Open, 2019, 9(6):639.

[3] 常亚伟,李赛,琚绍坦.血管内皮生长因子基因 936C/T 位点多态性与急性心肌梗死的关系[J].分子诊断与治疗杂志,2020,12(2):151-155.

[4] 万登峰,汪盛玉,黄涛,等.针灸治疗脊髓损伤神经源性膀胱有效性的 Meta 分析[J].保健医学研究与实践,2018,15(5):43-48.

[5] 褚万立,郝岱峰.美国国家压疮咨询委员会 2016 年压力性损伤的定义和分期解读[J].中华损伤与修复杂志:电子版,2018,13(1):64-68.

[6] 许宝胜,刘洪涛,冶国栋,等.基于 Keap1/Nfr2/ARE 信号通路研究机械相关性肺损伤分子机制[J].四川大学学报(医学版),2019,50(3):317-322.

[7] Witsch T, Martinod K, Sorvillo N, et al. Recombinant human ADAMTS13 treatment improves myocardial remodeling and functionality after pressure overload injury in mice [J]. J Am Heart Assoc, 2018, 7(3):7004.

[8] Curley MAQ, Hasbani NR, Quigley SM, et al. Predicting pressure injury risk in pediatric patients: the braden QD scale [J]. J Pediatrics, 2018, 192(24):189-195.

[9] Chloe P, Viviane M, Maria A, et al. Molecular pharmacology of VEGF-A isoforms: binding and signalling at VEGFR2 [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(4):1264.

[10] Peach CJ, Mignone VW, Arruda MA, et al. Molecular Pharmacology of VEGF-A Isoforms: Binding and Signalling at VEGFR2 [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(4):1264.

[11] Fan J, Lv H, Li J, et al. Roles of Nrf2/HO-1 and HIF-1 α /VEGF in lung tissue injury and repair following cerebral ischemia/reperfusion injury [J]. J Cell Physiol, 2019, 234(6):664-666.

[12] 于杰,孙忠人,李洪玲,等.艾灸促进压力性损伤组织血管新生的机制研究[J].中国全科医学,2019,22(12):80-87.

[13] 王玲华,蒋燕红,刘晓霞.循证艾灸在老年患者 II、III 期压力性损伤中的应用效果[J].中华现代护理杂志,2018,24(31):3790.

[14] 宋辉,刘春英,王悦,等.手术患者压力性损伤风险评估工具的应用及护理研究进展[J].护士进修杂志,2019,33(16):1485-1488.

[15] 向伟,魏新宇,余彪.急性脑梗死患者血清 miR-21 和 HIF-1 α 、VEGF-A 的表达关系及临床意义[J].医学研究杂志,2019,48(02):111-116.

[16] 王晓慧,陈孝萍,王红萍,等.缺氧诱导因子-1 α 与血管内皮生长因子及其受体 2 在大鼠 3 期压力性损伤皮肤组织中的表达及意义[J].中国应用生理学杂志,2019,35(3):1364-1366.

[17] 时红梅,陈翠屏.血清 MMP-9、TIMP-1 与压疮分期、治疗的相关研究[J].河南大学学报(医学版),2018,37(04):46-49.

[18] 张亚楠,李贤.MMP-9 和 TIMP-1 在各期大鼠压力性损伤模型中的表达及意义[J].中国老年学杂志,2019,38(20):5078-5081.

SD/CRL 比值联合血 β -HCG、E2 水平对 IVF/ICSI-ET 早期流产的预测价值

芦爱华^{1*} 赵永新¹ 李洁² 刘瑞¹

[摘要] **目的** 观察孕囊直径/胚胎头臀长(SD/CRL)比值联合血 β -人绒毛膜促性腺激素(β -HCG)、雌二醇(E2)水平对体外受精/卵胞质内单精子注射-胚胎移植(IVF/ICSI-ET)早期流产的预测价值。**方法** 对本院328个IVF/ICSI-ET周期患者进行分析,比较早期流产组与非早期流产组血清 β -HCG水平、E2水平、SD/CRL比值及不同临床资料,进行早期流产影响因素分析,探讨SD/CRL联合血 β -HCG、E2水平对早期流产的预测价值。**结果** 早期流产组血清 β -HCG、E2水平显著低于非早期流产组,差异具有统计学意义($P<0.05$),SD/CRL比值显著高于非早期流产组,差异具有统计学意义($P<0.05$); >35 岁者早期流产率显著高于30~35岁者与 <30 岁者,且30~35岁者显著高于 <30 岁者,差异具有统计学意义($P<0.05$);年龄、SD/CRL比值属于患者早期流产独立危险因素($P<0.05$),移植后14d血清 β -HCG、E2为早期流产保护因素($P<0.05$);E2预测早期流产敏感度81.7%,特异度71.5%; β -HCG敏感度82.8%,特异度79.3%;SD/CRL敏感度86.9%,特异度73.1%;三者联合敏感度91.7%,特异度89.2%。**结论** SD/CRL比值联合血 β -HCG、E2可为IVF/ICSI-ET早期流产预测提供重要依据,对临床工作开展具有指导意义。

[关键词] 孕囊直径/胚胎头臀长; β -人绒毛膜促性腺激素;雌二醇;体外受精/卵胞质内单精子注射-胚胎移植

Predictive value of SD/CRL ratio combined with serum β -HCG and E2 levels in early abortion of patients undergoing IVF/ICSI-ET

LU Aihua^{1*}, ZHAO Yongxin¹, LI Jie², LIU Rui¹

(1. Department of Women Health Care, Qinghai Maternal and Child Health Hospital, Xining, Qinghai, China, 810007; 2. Department of Gynecology, Qinghai Red Cross Hospital, Xining, Qinghai, China, 810007)

[ABSTRACT] **Objective** To observe the predictive value of gestational sac diameter/crown-rump length (SD/CRL) ratio combined with serum β -human chorionic gonadotropin (β -HCG) and estradiol (E2) levels in early abortion of patients undergoing in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection-embryo transfer (IVF/ICSI-ET). **Methods** A retrospective analysis was performed among 328 patients receiving IVF/ICSI-ET in the hospital. The levels of serum β -HCG and E2, SD/CRL ratio and clinical data were compared between the early abortion group and the non-early abortion group. Influencing factors of early abortion were analyzed. The predictive value of SD/CRL ratio combined with serum β -HCG and E2 levels for early abortion was discussed. **Results** The serum β -HCG and E2 levels of the early abortion group were significantly lower than those of the non-early abortion group ($P<0.05$), while SD/CRL ratio was significantly higher than that of

基金项目:青海省(应用)基础研究计划项目(2019-ZJ-189)

作者单位:1. 青海省妇幼保健院妇女保健科,青海,西宁 810007

2. 青海省红十字医院妇三科,青海,西宁 810007

*通信作者:芦爱华, E-mail: bijvw7johi@sina.cn

the non-early abortion group ($P<0.05$). The early abortion rate in >35 years old group was significantly higher than that in 30~35 years old and <30 years old groups, and the 30~35 years old group was significantly higher than those under 30 years old group ($P<0.05$). Age and SD/CRL ratio were independent risk factors for early abortion ($P<0.05$), while serum β -HCG and E2 at 14d after transplantation are protective factors ($P<0.05$). The sensitivity and specificity of E2, β -HCG, SD/CRL ratio and their combination for predicting early abortion were (81.7%, 71.5%), (82.8%, 79.3%), (86.9%, 73.1%) and (91.7%, 89.2%), respectively. **Conclusion** The SD/CRL ratio combined with serum β -HCG and E2 can provide an important basis for the prediction of early abortion of patients undergoing IVF/ICSI-ET, which is of great significance for clinical practice.

[KEY WORDS] Gestational sac diameter/crown-rump length; β -human chorionic gonadotropin; Estradiol; In vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection-embryo transfer

在我国二胎生育政策全面开放背景下,生育辅助技术已经在不孕症治疗中得到广泛应用。有调查显示,体外受精/卵胞质内单精子注射-胚胎移植(in vitro fertilization/Intracytoplasmic sperm injection-embryo transfer, IVF/ICSI-ET)将以往 15%~20%临床妊娠率有效提高到了 40%~50%,然而单胎产活率只有 35%左右,多胎产活率则更低(大约 25%),且 12 周前自然流产风险更高(大约 27%),引起了广泛重视^[1-2]。准确预测 IVF/ICSI-ET 早期流产,对指导临床治疗具有重要意义。以往研究表明, β -人绒毛膜促性腺激素(beta human chorionic gonadotrophin, β -HCG)、雌二醇(estradiol, E2)检测对早期妊娠结局预测具有一定价值^[3]。在 IVF/ICSI-ET 患者术后早期流产相关预测方法中, β -HCG 的研究是较早并且较多的,其一般和其他激素水平检测或超声联合预测产妇正常妊娠以及异位妊娠结局,属于产前筛查主要指标^[4]。尽管二维或者三维阴道超声技术能有效用于早期流产监测,但是关于其定量预测产妇早期流产的相关研究较少。本文主要探究孕囊直径/胚胎头臀长(sac diameter/crown-rump length, SD/CRL)比值联合 β -HCG、E2 对 IVF/ICSI-ET 早期流产的预测价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2018 年 1 月至 2019 年 2 月青海省妇幼保健院 328 例 IVF/ICSI-ET 周期患者。患者年龄 25~42 岁,平均(33.46 \pm 6.01)岁。328 例患者按照是否发生早期流产,分为早期流产组($n=64$)与非早期流产组($n=264$)。

纳入标准:①接受 IVF/ICSI-ET,且为单胎妊娠;②临床资料完整;③具有正常智力与沟通能力;④签署研究知情同意书。排除标准:①单侧卵

巢或者子宫畸形;②由于各种原因(比如卵巢过度刺激综合征)导致新鲜胚胎移植不得不取消。本研究符合医院伦理委员会有关审批要求。

1.2 方法

进行常规 IVF/ICSI-ET 治疗,并在移植后 30 d 予以阴道超声监测:通过 XARIO SSA-660A 型彩超诊断仪(购自日本东芝)全面检查患者宫内外情况,选择 PVT-661VT 6MHZ 探头,进行 SD、CRL、卵黄囊平均直径(yolk sac diameter, YSD)、胎心率(heart rate, HR)等监测,取膀胱截石位,其中 CRL 值是胚芽头臀长(选择正中矢状切面,对其头顶到臀尾之间的直线长度进行测量),SD 值为(长径+横径)/2。采集患者晨起空腹静脉血,进行离心处理后分离血清,并以磁性分离酶联免疫法进行移植后 14 d 血清 β -HCG 与 E2 水平检测,仪器为 DNM-9606 型酶标仪(普朗医疗器械公司)。

1.3 早期流产判定^[5]

移植后 14 d 患者血清 β -HCG 水平超过 5 IU/L,移植后 30 d 通过阴道超声检查证实宫内妊娠,但是随访至 13 周期间未见胚芽;或者移植后 14 d 患者血清 β -HCG 水平超过 5 IU/L,发现胚芽但是未见胎心或者显示有胎心但是在 12 周内胎心消失。

1.4 观察指标

比较早期流产组与非早期流产组血清 β -HCG 水平、E2 水平、SD/CRL 比值,比较不同临床资料如年龄、体质指数(body Mass Index, BMI)、不孕年限等,进行早期流产影响因素分析,并分析 SD/CRL 联合血 β -HCG、E2 水平对患者早期流产预测价值。其中, β -HCG、E2、SD/CRL 分别以 IVF/ICSI-ET 患者中位数为分界。

1.5 统计学处理

采取 SPSS 19.0 软件进行数据处理,计数资料以 $n(\%)$ 描述,使用 χ^2 检验;计量资料以($\bar{x} \pm s$)描

述,使用 *t* 检验;采取 COX 回归分析法予以影响因素分析;并以受试者工作特征(ROC)曲线对指标预测早期流产价值进行分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组血清 β -HCG 水平、E2 水平、SD/CRL 比值比较

早期流产组血清 β -HCG、E2 水平显著低于非早期流产组,差异具有统计学意义($P < 0.05$),SD/CRL 比值显著高于非早期流产组,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 两组血清 β -HCG 水平、E2 水平、SD/CRL 比值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	β -HCG (IU/L)	E2 (pg/mL)	SD/CRL 比值
早期流产组	64	1380.18±206.37	260.46±40.95	6.23±8.75
非早期流产组	264	2305.74±382.95	546.14±42.38	4.06±6.38
<i>t</i> 值		18.674	48.694	2.257
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	0.025

2.2 不同临床资料与血清 β -HCG 水平、E2 水平、SD/CRL 比值患者早期流产率比较

不同 BMI、不孕年限患者早期流产率比较差异无统计学意义($P > 0.05$);早期流产率在年龄、 β -HCG、E2 水平及 SD/CRL 比值等资料上比较差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

2.3 COX 回归分析

年龄、SD/CRL 比值是早期流产的独立危险因素($P < 0.05$),移植后 14 d 血清 β -HCG、E2 为早期流产的保护因素($P < 0.05$)。见表 3。

2.4 SD/CRL 联合血 β -HCG、E2 水平对早期流产预测价值分析

早期流产赋值为 1,非早期流产赋值为 0,将“SD/CRL”、“ β -HCG”、“E2”放入“检验变量”框,进行 ROC 分析。E2 预测敏感度 81.7%,特异度 71.5%;

表 2 不同临床资料与血清 β -HCG 水平、E2 水平、SD/CRL 比值患者早期流产率比较 [$n(\%)$]

Table 2 Comparison of early abortion rate among patients with different clinical data, different serum-HCG levels, E2 levels and SD/CRL ratios [$n(\%)$]

项目	<i>n</i>	早期流产率	χ^2 值	<i>P</i> 值
年龄(岁)	<30	98	7(7.14)	19.465 <0.001
	30~35	110	20(18.18)	
	>35	120	37(30.83)	
BMI(kg/m ²)	<18.5	52	12(23.08)	3.845 0.146
	18.5~24.0	208	34(16.35)	
	>24.0	68	18(26.47)	
不孕年限(年)	1~5	106	16(15.09)	2.658 0.265
	6~10	118	28(23.73)	
	>10	104	20(19.23)	
β -HCG(IU/L)	≤1800	109	34(31.19)	14.182 <0.001
	>1800	219	30(13.70)	
E2(pg/mL)	≤400	126	38(30.16)	14.766 <0.001
	>400	202	26(12.87)	
SD/CRL 比值	<5	286	34(11.89)	82.667 <0.001
	≥5	42	30(71.43)	

β -HCG 预测敏感度 82.8%,特异度 79.3%; SD/CRL 预测敏感度 86.9%,特异度 73.1%;经过线性模型拟合,绘制出线性模型联合诊断模型,三者联合预测敏感度 91.7%,特异度 89.2%。见表 4 和图 1。

表 4 SD/CRL 联合血 β -HCG、E2 水平预测早期流产 ROC 曲线下面积

Table 4 Areas under ROC curves of SD/CRL ratio combined with serum β -HCG and E2 levels for prediction of early abortion

变量	面积	标准误	95%CI	<i>P</i> 值
E2	0.762	0.078	0.614~0.935	0.007
β -HCG	0.771	0.080	0.609~0.942	0.005
SD/CRL	0.794	0.082	0.675~0.951	0.002
三者联合	0.825	0.063	0.736~0.982	<0.001

3 讨论

HCG 为女性妊娠过程中胎盘滋养细胞所产生的糖蛋白激素,其主要由 α 和 β 亚基通过非共价键结合,由于 β -HCG 特异性强,因此临床进行血清

表 3 早期流产影响因素 COX 回归分析

Table 3 COX regression analysis of influencing factors of early abortion

变量	<i>B</i> 值	<i>S.E.</i> 值	<i>Wald</i> 值	<i>Exp(B)</i> 值	95%CI	<i>P</i> 值
年龄	6.043	3.785	6.402	2.736	1.650~3.879	<0.001
β -HCG	0.734	2.368	4.271	2.062	1.347~3.584	<0.001
E2	0.602	2.258	4.369	2.014	1.286~3.475	<0.001
SD/CRL 比值	7.453	3.968	7.684	3.065	1.543~5.782	<0.001

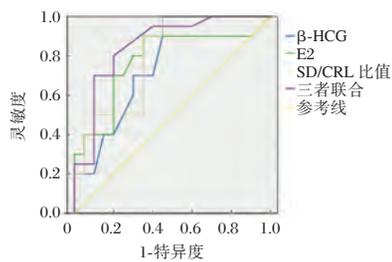


图1 SD/CRL联合血 β -HCG、E2水平预测早期流产ROC曲线

Figure 1 ROC curves of SD/CRL ratio combined with serum β -HCG and E2 levels for prediction of early abortion

β -HCG水平检测能够准确反映人体HCG水平。有报道称,IVF/ICSI-ET后14d患者血清 β -HCG水平越高,则其早期流产风险越低^[6]。血清E2水平被视为反应卵巢储备功能情况直接指标,能够加快子宫内膜上皮细胞以及腺体增生,提高宫颈黏液分泌水平,适量E2可以确保卵泡正常发育与成熟,同时保证卵母细胞所具有的受精能力。临床认为,卵巢储备功能减弱为生育力降低根本原因。有研究指出,E2下降可能主要通过影响白介素1(interleukin-1, IL-1)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)以及干扰素(interferon, IFN)等分泌的方式对子宫内膜容受性造成影响^[7]。相关研究表明,E2分泌水平显著下降可能造成子宫内膜容受性方面的损伤,从而对胚胎种植率以及临床妊娠率产生影响^[8]。本研究中,早期流产组血清 β -HCG与E2水平显著低于非早期流产组,与熊甜甜等^[9]研究观点一致。本研究经因素分析发现,移植后14d血清 β -HCG、E2为IVF/ICSI-ET后早期流产独立保护因素,其水平降低与早期流产存在紧密联系。

现阶段,阴道超声已于早期妊娠检查中得到广泛应用。多项研究指出,流产率的提升和年龄、黄体大小与形态、阴道流血、胎心偏慢、孕囊过小、胚胎生长慢、卵黄囊异常等有关^[10-11]。通过经阴道超声测量SD、CRL、HR、YSD等指标,能够了解胚胎发育状态,其为无创检查技术,在生殖辅助技术中发挥着不可替代作用。有研究表明,当胚胎没有测到心管搏动时,选择CRL临界值为4mm或5mm,早期流产率高达8.3%,选择临界值5.3mm时,假阳性率为0.0%^[12]。Rodgers等^[13]研究发现,经阴道超声测量CRL等于7mm且没有心跳时,假阳性率为0.0%;MSD等于25mm,且未检测到胚

芽时,假阳性率为0.0%,CRL与MSD可用于流产预测。本研究结果提示IVF/ICSI-ET后早期流产患者SD/CRL比值显著升高,其与早期流产关系密切,与上述研究观点一致。随着年龄增大,女性卵巢储备功能减弱,生殖细胞进行减数分裂时很容易出现染色体不分离现象,因此年龄属于染色体异常主要高危因素^[14]。胚胎形态过程中,滋养细胞(trophoblast, TE)逐渐发育变为胎盘组织,同时分泌HCG维持正常黄体功能。有报道称,TE增殖、分化如果异常,将造成HCG分泌障碍(不足或过量),引发不良妊娠结局^[15]。亦有研究表明,结合 β -HCG检测水平与MSD/CRL定量预测IVF/ICSI-ET早期妊娠结局,具有快速简便的优点,其诊断符合率高达87.57%^[16]。本文创新性探究E2、 β -HCG、SD/CRL联合诊断价值,通过ROC曲线分析发现这些指标均对早期流产具有一定预测价值,且三者联合预测价值较各单项指标高。

综上,SD/CRL比值联合血 β -HCG、E2对IVF/ICSI-ET后早期流产具有较高预测价值。

参考文献

- [1] Lazaravičute G, Kauser M, Bhattacharya S, et al. A systematic review and meta-analysis of DNA methylation levels and imprinting disorders in children conceived by IVF/ICSI compared with children conceived spontaneously [J]. Hum Reprod Update, 2014, 20(6):840-852.
- [2] Yang XL, Chen F, Yang XY, et al. Efficacy of low-molecular-weight heparin on the outcomes of IVF/ICSI pregnancy in non-thrombophilic women: a meta-analysis [J]. Acta Obstet Gynecol Scand, 2018, 97(9):1061-1072.
- [3] 颜雪萍,田圆,吴青京.血清 β -HCG、P及阴道超声评估在未破裂宫外孕诊断中的应用[J].分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(3):353-357.
- [4] 凌娜.胎动不安患者不同妊娠时间体内雌、孕激素变化对妊娠结局的影响[J].中华中医药学刊, 2016, 34(5):100-102.
- [5] 陈薪,郭萍萍,刘玉东,等.冻融胚胎移植后12天的孕母血清 β -HCG水平对早孕期妊娠结局的预测作用[J].实用医学杂志, 2016, 32(9):1415-1418.
- [6] Toftager M, Bogstad J, Bryndorf T, et al. Risk of severe ovarian hyperstimulation syndrome in GnRH antagonist versus GnRH agonist protocol: RCT including 1050 first IVF/ICSI cycles [J]. Hum Reprod, 2016, 31(6):1253-1264.
- [7] Bhusane K, Bhutada S, Chaudhari U, et al. Secrets of Endometrial Receptivity: Some Are Hidden in Uterine Secretome [J]. Am J Rep Immunol, 2016, 75(3):226-236.

(下转第1379页)

下调 miR-4262 抑制肺癌细胞 A549 转移潜能的机制

朱丽 龚波*

【摘要】 目的 探讨下调 miR-4262 对肺癌细胞 A549 转移潜能的影响及机制。方法 qRT-PCR 检测肺癌细胞中 miR-4262 表达变化。在肺癌细胞 A549 中转染 miR-4262 inhibitor, MTT 测定细胞增殖能力, Transwell 小室测定细胞侵袭和迁移能力, Western blot 测定 E-cadherin、vimentin 蛋白表达。生物信息学软件预测 miR-4262 和 KLF3 的 3'-UTR 端有结合位点, 荧光素酶系统鉴定靶向关系。qRT-PCR 检测肺癌组织中 KLF3 mRNA 表达变化, 分析其表达水平与 miR-4262 的相关性。在肺癌细胞 A549 中转染 miR-4262 inhibitor、KLF3 siRNA, 检测细胞增殖、侵袭、迁移变化。**结果** 肺癌 A549 细胞中 miR-4262 表达水平升高。转染 miR-4262 inhibitor 后的肺癌细胞 A549 增殖、侵袭和迁移能力降低, 细胞中 E-cadherin 蛋白表达水平升高, vimentin 蛋白表达水平下降。明确 miR-4262 与 KLF3 的靶向关系。下调 miR-4262 上调肺癌细胞 A549 中 KLF3 表达。KLF3 siRNA 可以逆转 miR-4262 inhibitor 对肺癌细胞 A549 增殖、侵袭和迁移的抑制功能。**结论** 下调 miR-4262 抑制肺癌细胞 A549 转移潜能, 作用机制与靶向上调 KLF3 的表达有关。

【关键词】 肺癌; KLF3; miR-4262; 迁移

Mechanism of down - regulation of miR - 4262 in inhibiting the metastatic potential of lung cancer cell A549

ZHU Li, GONG Bo*

(Clinical Laboratory, Changning District Maternal and Child Health Hospital, Shanghai, China, 200051)

【ABSTRACT】 Objective To explore the effect and mechanism of down-regulation of miR-4262 on the metastatic potential of lung cancer cell A549. Methods qRT-PCR was used to detect miR-4262 expression in lung cancer cells. Lung cancer cell A549 were transfected with miR-4262 inhibitor, MTT was used to measure proliferation, transwell cells were used to measure invasion and migration, and western blot analysis was used to measure E-cadherin and vimentin protein expression. Bioinformatics software predicts that miR-4262 and KLF3 have binding sites at the 3', UTR end, and the luciferase system identifies the targeting relationship. qRT-PCR was used to detect changes in the expression of KLF3 mRNA in lung cancer tissues, and to analyze the correlation between its expression level and miR-4262. Lung cancer cells A549 were transfected with miR-4262 inhibitor and KLF3 siRNA to detect cell proliferation, invasion, and migration changes. Results The expression level of miR-4262 was increased in lung cancer tissues and lung cancer cells. After transfection with miR-4262 inhibitor, lung cancer cell A549 had reduced proliferation, invasion and migration ability, and the expression level of E-cadherin protein in the cells increased, while the level of vimentin decreased. Down-regulation of miR-4262 up-regulated the expression of KLF3 in lung cancer cell A549. KLF3 siRNA can reverse the inhibitory function of miR-4262 inhibitor on the proliferation, invasion and migration of lung cancer cell A549. Conclusion Down-regulation of miR-4262 inhibits the metastatic potential of lung cancer cell A549, and the mechanism of action is related to the targeted up-regulation of KLF3 expression.

【KEY WORDS】 Lung cancer; KLF3; miR-4262; Migration

基金名称:上海市黄浦区科技项目(2011HGG28)

作者单位:上海市长宁区妇幼保健院检验科,上海 200051

*通信作者:龚波, E-mail:biu_dodo@163.com

肺癌具有早期临床特征不明显、恶性程度高等特点,很多肺癌患者在确诊时已经发生了转移,并且很多肺癌患者死于肺癌转移^[1]。肿瘤细胞侵袭、迁移和上皮间质转化(epithelial mesenchymal transition, EMT)能力的大小与肿瘤转移水平有关,降低肿瘤细胞的转移潜能、抑制肿瘤进展和转移是目前抗肿瘤研究的重点。微小RNA(miRNA, miRNA)是一个人体内普遍表达的非编码RNA分子,具有很多生物学作用,如细胞生长、胚胎发育、疾病发生、免疫调控等,miRNA通过复杂的调控机制影响生命进程^[2]。随着人们对miRNA的不断深入研究发现,疾病的发生与多种miRNA的表达关系密切,miRNA可能是疾病诊断、治疗的分子靶标^[3]。在肿瘤中的研究显示,miRNA参与肿瘤细胞的生长和转移,分子靶向miRNA有望成为肿瘤治疗重要途径^[4]。目前对于miR-4262在肺癌细胞侵袭、迁移和EMT中的作用还未明确。本次实验探讨miR-4262对肺癌细胞转移潜能的影响和机制,以期寻找有效的分子标记物治疗肺癌提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

miRcute增强型miRNA cDNA第一链合成试剂盒、miRcute增强型miRNA荧光定量检测试剂盒(SYBR Green)、Quant one step qRT-PCR Kit(SYBR Green)均购自天根生化科技(北京)有限公司;vimentin抗体、KLF3抗体购自美国Abcam;E-cadherin抗体和HRP标记的二抗均购自美国Santa Cruz Biotechnology;inhibitor control、miR-4262 inhibitor购自上海吉玛制药技术有限公司;WT(野生型)和MUT(突变型)荧光素酶报告载体由吉满生物科技(上海)有限公司构建;KLF3 siRNA和siRNA control由天津赛尔生物技术有限公司构建合成;肺癌细胞NCI-H446、A549、NL9980购自美国ATCC;正常支气管上皮细胞HBE购自上海铭博生物科技有限公司。

1.2 qRT-PCR方法测定miR-4262和KLF3 mRNA表达

分别用Trizol试剂提取收集的NCI-466, A549, NL9980,同时提取肺癌细胞NCI-H446、A549、NL9980和正常支气管上皮细胞HBE的总RNA。miR-4262检测用miRcute增强型miRNA

cDNA第一链合成试剂盒反转录合成cDNA,然后以miRcute增强型miRNA荧光定量检测试剂盒(SYBR Green)进行PCR反应,结果以U6作为内参, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算。KLF3 mRNA检测用Quant one step qRT-PCR Kit(SYBR Green)进行RT-PCR反应,结果以GAPDH为内参, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算。

1.3 细胞转染分组

肺癌细胞A549分成3组,分别为Control、Anti-NC、Anti-miR-4262组, Anti-NC、Anti-miR-4262组分别为转染inhibitor control、miR-4262 inhibitor的肺癌细胞,Control为空白对照细胞。细胞转染操作方法完全按照转染试剂Lipofectamine 2000操作说明进行。细胞转染后48 h,用qRT-PCR方法测定miR-4262和KLF3 mRNA表达变化,步骤同1.2。

1.4 MTT方法测定增殖

分别按照Control、Anti-NC、Anti-miR-4262分组方法将细胞按照每个孔内4 000个细胞接种至96孔板中,培养48 h后取出培养板,加MTT,于37℃条件下孵育4 h。添加150 μ L的二甲基亚砜溶液,10 min,检测每个孔的OD值,OD值越高,细胞增殖能力也就越强。

1.5 Transwell小室测定侵袭和迁移

在细胞侵袭实验之前需要基质胶包被小室,迁移实验前省去包被步骤,其余相同甲醇固定,结晶紫染色。显微镜下计数细胞穿膜数目。

1.6 Western blot测定E-cadherin、vimentin蛋白表达

常规方法提取Control、Anti-NC、Anti-miR-4262组细胞总蛋白,SDS-PAGE凝胶用5%的浓缩胶和10%的分离胶;电泳电压为90 V恒压电泳0.5 h(观察染料即将进入分离胶),然后以120 V恒压电泳2 h。在60 V恒压条件下转膜。将NC膜浸泡在含有5%脱脂奶粉的封闭液中封闭;把NC膜置于一抗中,4℃过夜;NC膜放在二抗中结合2 h。ECL显色。Image J分析条带的OD值,把GAPDH作为内参。E-cadherin、vimentin一抗以1:1 000稀释,二抗以1:2 000稀释。

1.7 靶基因预测和鉴定

生物信息学软件(Targetscan)预测发现miR-4262和KLF3的3'UTR端有互补结合位点,利用荧光素酶报告系统鉴定二者的靶向关系。将WT和MUT荧光素酶报告载体分别与inhibitor control、miR-4262 inhibitor共转染后肺癌细胞A549

中。用荧光素酶活性测定试剂盒检测细胞荧光素酶活性变化。同时收集 Control、Anti-NC、Anti-miR-4262 组细胞,用 qRT-PCR 和 Western blot 方法分别检测细胞中 *KLF3* mRNA 和蛋白表达变化,步骤同 1.2 和 1.6。

1.8 KLF3 siRNA 对下调 miR-4262 逆转功能检测
 分别在肺癌细胞 A549 中将 miR-4262 inhibitor、siRNA control 和 miR-4262 inhibitor、KLF3 siRNA 共转染,记为 Anti-miR-4262+si-NC 和 Anti-miR-4262+si-KLF3 组,细胞培养 48h 以后,MTT 测定增殖、Transwell 小室测定侵袭迁移、Western blot 测定 E-cadherin、vimentin、KLF3 蛋白表达。

1.9 统计学分析

采用 SPSS 21.0 软件进行数据统计分析,计量资料用($\bar{x} \pm s$)表示,两组数据之间的比较用 *t* 检验,多组间比较用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-4262 在肺癌细胞中高表达

肺癌细胞 NCI-H446、A549、NL9980 中 miR-4262 表达水平明显高于正常支气管上皮细胞 HBE ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 肺癌细胞和正常支气管上皮细胞中 miR-4262 表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

细胞	miR-4262 水平
HBE	1.00±0.12
NCI-H446	1.76±0.13
A549	2.65±0.23
NL9980	2.02±0.15
F 值	157.42
P 值	<0.001

2.2 下调 miR-4262 对肺癌细胞增殖、侵袭、迁移和 EMT 影响

转染 miR-4262 inhibitor 后的肺癌细胞中 miR-

表 2 肺癌细胞 OD 值、侵袭数目、迁移数目和 E-cadherin、vimentin 蛋白水平 ($\bar{x} \pm s$)

组别	miR-4262	OD 值	侵袭数目	迁移数目	E-cadherin	vimentin
Control	1.00±0.09	0.43±0.04	98.45±9.33	125.30±10.35	0.22±0.02	0.56±0.05
Anti-NC 组	0.97±0.12	0.44±0.03	99.24±7.25	126.83±11.20	0.21±0.03	0.54±0.04
Anti-miR-42 组 62	0.45±0.05	0.32±0.02	64.36±4.21	85.34±7.29	0.35±0.05	0.33±0.02
F 值	103.29	41.28	68.05	52.30	43.34	97.40
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

4262 表达水平明显降低,细胞 OD 值、侵袭数目、迁移数目以及细胞中 vimentin 蛋白表达水平均下降, E-cadherin 蛋白表达水平升高 ($P < 0.05$),图 1 和表 2。

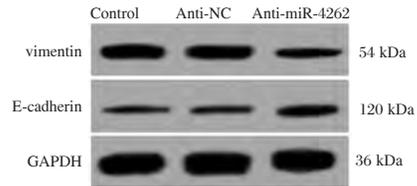


图 1 Western blot 方法测定 E-cadherin、vimentin 蛋白表达
 Figure 1 Western blot method to measure E-cadherin and vimentin protein expression

2.3 miR-4262 和 KLF3 互为靶向关系

生物信息学软件发现 miR-4262 和 KLF3 的 3'UTR 端有互补结合位点,并且 WT-KLF3 和 miR-4262 inhibitor 共转染后的细胞荧光素酶活性升高 ($P < 0.05$),图 2 和表 3。

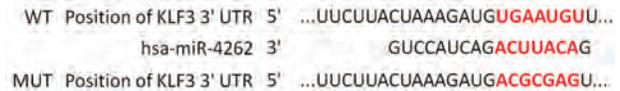


图 2 miR-4262 和 KLF3 的 3, UTR 端结合位点

Figure 2 MiR-4262 and KLF3 3, UTR end binding site

表 3 细胞荧光素酶活性比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of cell luciferase activity ($\bar{x} \pm s$)

组别	MUT	WT
Anti-NC	1.00±0.11	1.00±0.12
Anti-miR-426	0.98±0.08	1.45±0.13
t 值	0.67	7.63
P 值	0.44	<0.001

2.4 下调 miR-4262 对肺癌细胞中 KLF3 表达影响

转染 miR-4262 inhibitor 后的肺癌细胞中 KLF3 蛋白和 mRNA 水平明显升高 ($P < 0.05$),图 3 和表 4。

2.5 KLF3 siRNA 逆转下调 miR-4262 抑制肺癌细胞增殖、侵袭、迁移、EMT 功能

与共转染 siRNA control 和 miR-4262 inhibitor

的肺癌细胞比较,共转染 KLF3 siRNA 和 miR-4262 inhibitor 后的肺癌细胞 OD 值、侵袭数目、迁移数目和 vimentin 蛋白水平均升高,细胞中 KLF3、E-cadherin 蛋白表达水平降低 ($P<0.05$)。图 4 和表 5。

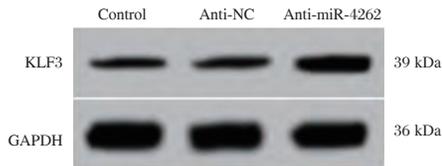


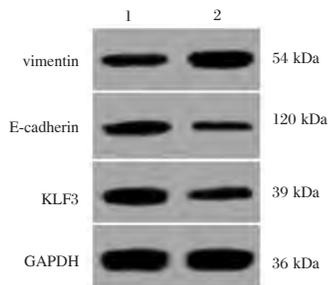
图 3 Western blot 检测转染 miR-4262 inhibitor 后的肺癌细胞中 KLF3 蛋白表达水平

Figure 3 Western blot detection of KLF3 protein expression in lung cancer cells transfected with miR-4262 inhibitor

表 4 转染 miR-4262 inhibitor 后的肺癌细胞中 KLF3 蛋白和 mRNA 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Comparison of KLF3 protein and mRNA levels in lung cancer cells transfected with miR-4262 inhibitor ($\bar{x} \pm s$)

组别	KLF3 蛋白	KLF3 mRNA
Control	0.28±0.03	1.00±0.08
Anti-NC	0.29±0.05	0.99±0.13
Anti-miR-4262	0.67±0.07	2.24±0.21
F 值	160.89	207.00
P 值	<0.001	<0.001



注: 1. Anti-miR-4262+si-NC; 2. Anti-miR-4262+si-kLF3

图 4 Western blot 检测转染细胞中 KLF3、E-cadherin、vimentin 蛋白表达水平

Figure 4 Western blot detection of KLF3, E-cadherin, vimentin protein expression levels in transfected cells

表 5 肺癌细胞 OD 值、侵袭数目、迁移数目和 KLF3、E-cadherin、vimentin 蛋白水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Lung cancer cell OD value, invasion number, migration number and KLF3, E-cadherin, vimentin protein level comparison ($\bar{x} \pm s$)

组别	OD 值	侵袭数目	迁移数目	E-cadherin	vimentin	KLF3
Anti-miR-426 组 2+si-NC 组	0.33±0.03	65.67±5.75	86.32±5.76	0.39±0.06	0.34±0.04	0.63±0.08
Anti-miR-4262+si 组-KLF3 组	0.42±0.04	86.43±6.87	110.54±9.04	0.23±0.04	0.58±0.07	0.32±0.04
t 值	5.40	6.95	6.78	6.67	8.93	10.40
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

3 讨论

miRNA 在真核生命体中存在,并且具有十分广泛的生物功能,miRNA 与细胞分化、氧化应激、细胞增殖等有关。研究显示,miRNA 虽然没有编码蛋白质的功能,但是其可以通过调控靶基因的表达发挥多种作用,广泛的参与到机体新陈代谢、组织修复、免疫功能维持等生命活动中^[5]。miRNA 还参与疾病如心肌梗死、肾组织损伤等进展,miRNA 能够通过影响细胞的生物学行为而发挥作用^[6]。肿瘤细胞的恶性增殖和转移同样也受到 miRNA 的调节作用,这些与肿瘤有关的 miRNA 在肿瘤进展中发挥类似癌基因或抑癌基因的作用,影响细胞的增殖和侵袭过程^[7]。研究报道表明,miR-4262 在乳腺癌、肝癌等多种肿瘤中高表达,其可以促进肿瘤的进展和转移^[8]。在结肠癌中的研究认为,miR-4262 抑制肿瘤细胞的增殖^[9]。本次实验结果提示 miR-4262 可能在肺癌进展和转移中发挥促进作用。

研究认为,肿瘤的转移除了与肿瘤细胞的侵袭和迁移能力有关以外,还与肿瘤细胞 EMT 水平密切相关^[10]。EMT 是广泛存在于机体内的正常生理过程,其在胚胎发育、组织生长过程中扮演关键角色。EMT 发生时,上皮细胞表型逐渐减弱而间质细胞表型逐渐增加。E-cadherin 是上皮细胞标志蛋白,vimentin 是间质细胞标志蛋白^[11]。发生 EMT 的肿瘤细胞的转移概率大大增加,也就是说,EMT 水平越高,肿瘤细胞转移潜能也就越高^[12]。本次的实验显示,下调 miR-4262 后的肺癌细胞中的 E-cadherin 蛋白表达水平升高,vimentin 蛋白表达水平降低,提示下调 miR-4262 可以降低肺癌细胞的转移潜能,这与细胞侵袭和迁移检测结果相符合,均说明下调 miR-4262 具有抑制肺癌转移的作用。

miRNA 作用机制与靶向调控靶基因的表达有关,并且 miRNA 的靶基因可能同时有多个,在不

同的病理或生理进程中的靶基因可能不同^[13]。本次实验表明,下调 KLF3 可以逆转下调 miR-4262 对肺癌细胞增殖、迁移、侵袭和 EMT 的抑制作用,提示 miR-4262 可能通过 KLF3 影响肺癌细胞的生长和转移。

总之,miR-4262 在肺癌中可能发挥促进作用,下调其表达可以通过靶向促进 KLF3 的表达降低肺癌细胞转移潜能,这为研究 miR-4262 在肺癌中的作用提供了参考,为靶向基因治疗肺癌提供了思路。以后实验会在多株肺癌细胞中进行验证,并且会对其在肺癌患者中的表达变化与临床病理特征的关系进行具体分析。

参考文献

- [1] Yang F, Xu J, Li H, et al. FBXW2 suppresses migration and invasion of lung cancer cells via promoting β -catenin ubiquitylation and degradation [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 1-16.
- [2] Kyuno D, Zhao K, Bauer N, et al. Therapeutic targeting cancer-initiating cell markers by exosome miRNA: efficacy and functional consequences exemplified for claudin7 and EpCAM [J]. *Transl Oncol*, 2019, 12(2): 191-199.
- [3] Qin L, Liu Y, Li M, et al. The landscape of miRNA-related ceRNA networks for marking different renal cell carcinoma subtypes[J]. *Brief Bioinf*, 2020, 21(1): 73-84.
- [4] Zhang J, Li D, Zhang Y, et al. Integrative analysis of mRNA and miRNA expression profiles reveals seven potential diagnostic biomarkers for non-small cell lung cancer [J]. *Oncol Rep*, 2020, 43(1): 99-112.
- [5] Jacinta-Fernandes A, Xavier J M, Magno R, et al. Allele-specific miRNA-binding analysis identifies candidate target genes for breast cancer risk [J]. *npj Genomic Med*, 2020, 5(1): 1-9.
- [6] 赵小奎, 邹勇, 王建刚, 等. 外周血清 MicroRNA-208a 检测诊断急性心肌梗死及评估其预后的价值[J]. *医学临床研究*, 2018, 35(5): 1017-1019.
- [7] 徐榕蔓, 朱伟. 微小 RNA(microRNA)调节 PD-L1 表达在胃癌中的研究进展[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2020, 36(03): 271-275.
- [8] Lu S, Wu J, Gao Y, et al. MicroRNA-4262 activates the NF- κ B and enhances the proliferation of hepatocellular carcinoma cells[J]. *Int J Biol Macromol*, 2016, 86(5): 43-49.
- [9] Qu JJ, Qu XY, Zhou DZ. miR-4262 inhibits colon cancer cell proliferation via targeting of GALNT4[J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(4): 3731-3736.
- [10] 杜彦丹, 牛艺卿, 郑海军, 等. Snail 基因甲基化与 TGF β 1 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(6): 451-456.
- [11] Galle E, Thienpont B, Cappuyns S, et al. DNA methylation-driven EMT is a common mechanism of resistance to various therapeutic agents in cancer [J]. *Clin Epigenet*, 2020, 12(1): 1-19.
- [12] Sheng W, Shi X, Lin Y, et al. Musashi2 promotes EGF-induced EMT in pancreatic cancer via ZEB1-ERK/MAPK signaling[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2020, 39(1): 1-15.
- [13] Mansoori B, Mohammadi A, Naghizadeh S, et al. miR-330 suppresses EMT and induces apoptosis by downregulating HMGA2 in human colorectal cancer [J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(2): 920-931.

(上接第 1374 页)

- [8] 崔艳芳, 刘彬, 关源源. 短方案降调节 hCG 注射日前后血清雌孕激素水平变化及其比值对 WF/ICSI 结局的影响[J]. *生殖与避孕*, 2012, 32(7): 494-499.
- [9] 熊甜甜, 魏兆莲, 李君, 等. IVF/ICSI-ET 后血 β -HCG 结合孕囊胚芽对早期流产的预测[J]. *安徽医科大学学报*, 2018, 53(5): 789-792.
- [10] 武彩云, 张文香, 倪丰, 等. 体外受精-胚胎移植后早期妊娠丢失的相关因素分析[J]. *中华疾病控制杂志*, 2016, 20(05): 516-519, 529.
- [11] 沈鉴东, 孙方西, 瞿殿云, 等. 妊娠早期自然流产组织染色体异常情况及其相关因素分析[J]. *中华妇产科杂志*, 2019, 54(12): 797-802.
- [12] Duncan WC. Limitations of current definitions of miscarriage using mean gestational sac diameter and crown-rump length measurements: a multicenterobservational study [J]. *Ultrasound Obst Gyn*, 2011, 38(5): 497-502.
- [13] Rodgers SK, Chang C, Debardeleben JT, et al. Normal and Abnormal US Findings in Early First-Trimester Pregnancy: Review of the Society of Radiologists in Ultrasound 2012 Consensus Panel Recommendations[J]. *Radiographics*, 2015, 35(7): 2135.
- [14] 王文华, 王晨阳, 姜李乐, 等. 复发性流产染色体异常及影响因素分析[J]. *中国妇产科临床杂志*, 2018, 19(4): 303-306.
- [15] 陈雨骤, 朱家安, 沈理, 等. 早期不明位置妊娠经阴道彩色多普勒超声检测妊娠黄体临床价值探讨[J]. *中国超声医学杂志*, 2015, 31(2): 66-69.
- [16] 刘芸, 杨莹, 胡兵, 等. 经阴道三维能量多普勒超声评估早孕绒毛滋养动脉以预测先兆流产结局的临床研究[J]. *现代妇产科进展*, 2016, 25(8): 596-599.

先天性甲状腺功能减低症患儿 IGF-1、IGFBP-3 及 Hcy 水平变化及临床意义

唐容华 李琴* 陈晓蓉 唐忠俊

[摘要] **目的** 研究先天性甲状腺功能减低症(CH)患儿胰岛素样生长因子-1(IGF-1)、胰岛素样生长因子结合蛋白(IGFBP-3)及同型半胱氨酸(Hcy)水平变化及其与生长发育的关系。**方法** 选取本院2017年7月至2020年7月收治的90例CH患儿的临床资料为研究组;同期选取85例健康儿童为对照组,测量两组儿童身高、体重、智商等,评估其生长发育情况;采用免疫放射分析法、荧光偏振免疫法检测两组血清IGF-1、IGFBP-3及Hcy水平,分析其与生长发育的相关性。**结果** 两组儿童年龄、出生体重、爬行月龄、独走月龄、萌牙月龄、身高、体重指数(BMI)比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。研究组儿童语言智商、操作智商、总智商显著低于对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$);在顺背与倒背项目中,研究组儿童背出数字显著低于对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$);IGF-1、IGFBP-3水平亦显著低于对照组,Hcy水平显著高于对照组,差异均具有统计学意义($P<0.05$)。**结论** IGF-1、IGFBP-3及Hcy水平与儿童智商、身高及体重具有一定相关性;CH患儿经早期诊治,其生长发育可恢复正常水平。

[关键词] 先天性甲状腺功能减低症;胰岛素样生长因子结合蛋白;胰岛素样生长因子-1;同型半胱氨酸

Changes and clinical significance of IGF - 1, IGFBP - 3 and Hcy levels in children with congenital hypothyroidism

TANG Ronghua, LI Qin*, CHEN Xiaorong, TANG Zhongjun

(Department of Pediatrics, Suining Central Hospital, Suining, Sichuan, China, 629000)

[ABSTRACT] **Objective** To study the changes in levels of insulin-like growth factor-1 (IGF-1), insulin-like growth factor binding protein (IGFBP-3) and homocysteine (Hcy) in children with congenital hypothyroidism (CH) and its correlation with growth and development. **Methods** The clinical data of 90 CH children admitted to this hospital from July 2017 to July 2020 were selected as the study group. 85 healthy children were selected as the control group during the same period. The height, weight, IQ, etc. of the two groups of children were measured to assess their growth and development status. Immunoradioassay and fluorescence polarization immunoassay were used to detect serum IGF-1, IGFBP-3 and Hcy levels in the two groups and analyze the correlation with growth and development. **Results** There was no statistically significant difference between the two groups in age, birth weight, months of crawling, months of walking alone, months of teething, height, and body mass index (BMI) ($P>0.05$). The language IQ, operational IQ, and total IQ of the children in the study group were significantly lower than those in the control group and the difference was statistically significant ($P<0.05$). In the recitation forward and backward, the number recited by children in the study group was significantly lower than that in the control group, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). The levels of IGF-1 and IGFBP-3 were significantly lower than those of the

基金项目:四川省卫生和计划生育委员会科研课题(19PJ516)

作者单位:遂宁市中心医院儿科,四川,遂宁 629000

*通信作者:李琴, E-mail:2673887936@qq.com

control group, and the level of Hcy was significantly higher than that of the control group, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusions** The levels of IGF-1, IGFBP-3 and Hcy have a certain correlation with children's IQ, height and weight. Children with CH can return to normal levels after early diagnosis and treatment.

[KEY WORDS] Congenital hypothyroidism; Insulin-like growth factor binding protein; Insulin-like growth factor-1; Homocysteine

先天性甲状腺功能减低症(congenital hypothyroidism, CH)是由于甲状腺激素的合成及分泌不足,以代谢水平低下、体格和智能发育障碍为主要特征的一种疾病^[1]。CH是儿科最常见的内分泌疾病之一。新生儿期由于缺乏典型的临床症状,常易被忽略,错过最佳的治疗时间,进而导致患儿体格、智力生长发育出现障碍^[2]。临床上主要表现为患儿身材矮小、智力发育落后,对患儿的生活造成严重的影响。近年来,有研究显示,下丘脑-生长激素-胰岛素样生长因子轴对人体生长有调控作用,可见甲状腺与其轴间关系密切^[3]。同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)是蛋氨酸代谢产生的一种含硫氨基酸,在细胞内蛋氨酸脱甲基生成。Hcy被医学界认为是心血管疾病新的独立的致病因子。甲状腺功能低下,新陈代谢缓慢会导致全身多个脏器结构功能异常,特别是心血管系统^[4]。本组研究通过检测CH患儿胰岛素样生长因子-1(Insulin like growth factor, IGF-1)、胰岛素样生长因子结合蛋白-3(Insulin like growth factor binding protein, IGFBP-3)及Hcy水平,分析其变化及与CH患儿生长发育的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取本院2017年7月至2020年7月收治的90例CH患儿纳入研究组,其中男性34例,女性56例,平均年龄(5.11 ± 2.17)岁。选取同期85例健康儿童作为对照组,其中男性31例,女性54例,平均年龄(4.74 ± 1.58)岁。

纳入标准:①研究组患儿均经临床确诊为CH[血清游离甲状腺素(serum free T₄, FT₄)降低(低于相应年龄的正常值)、促甲状腺激素(thyroid stimulating hormone, TSH)增高(≥ 20 mU/L)];②病例资料完整;③未合并其他内分泌疾病;排除标准:①临床资料丢失或缺损者;②合并早产、出生窒息或新生儿缺血缺氧病史;③研究组患儿合并感染性疾病者;④合并肝、肾等主要器官先天畸

形。两组研究对象一般资料比较差异无统计学意义,具有可比性($P > 0.05$)。本研究通过医院伦理委员会批准,受试者家属签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 研究组患儿随访治疗

患儿确诊后开始口服左旋甲状腺素片(默克制药(江苏)有限公司,国药准字J20160065)治疗,治疗期间根据患儿临床情况及甲状腺功能监测结果调整药量,持续使TSH维持正常范围,同时FT₄在正常偏高范围。

1.2.2 IGF-1、IGFBP-3及Hcy水平检测

试验对象均在接受检查的早晨空腹采取6 mL静脉血,立即注入促凝剂加分离胶试管中400 r/min离心,分离出血清,随后低温保存,集中检测。IGF-1、IGFBP-3水平采用免疫放射分析法检测,检查仪器:合肥众成机电技术公司生产,试剂盒(IGF-1试剂盒批准文号:国械注进20142405760,IGFBP-3试剂盒批准文号:国械注进20162404085)为北京北方生物技术研究所提供。Hcy采用自动化的荧光偏振免疫法,检测仪器:美国雅培公司AbbotIMx自动免疫分析仪,试剂盒(Hcy试剂盒批准文号:川食药监械(准)字2011第2400126号)由四川迈克生物有限公司提供。具体操作方法严格按照说明书进行,且所有标本测定均一次完成,避免反复冻融。

1.3 观察指标

分析两组儿童的生长发育状况、智力情况,比较两组患儿IGF-1、IGFBP-3及Hcy水平变化情况,并分析上述因子水平变化与CH患儿体格发育、智力发育的相关性。

生长发育测评与质量控制:生长发育情况根据《中国7岁以下儿童生长发育参照标准》^[5]进行评估,指标包括有患儿身高、体重及其标准差计分(standard deviation scoring, SDS)、体重指数(body mass index, BMI)。

智力测试:采用修订的中国-韦氏幼儿智力量(Chinese Wechsler Young Children scale of Intelli-

gence, C-WYCSI)方法^[6],并记录语言和操作项目的完成时间。评估指标:智商<70分为智力低下,≥90分为正常。均由同一名经过专业培训的专人进行测定。

1.4 统计学方法

采用SPSS 20.0软件进行统计分析,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用*t*检验;计数资料以*n*(%)表示,采用 χ^2 检验;相关性使用Pearson相关性分析,多元回归分析,*P*<0.05为差异统计学意义。

2 结果

2.1 两组儿童生长发育情况比较

两组儿童生长发育情况比较差异无统计学意义(*P*>0.05),见表1。

2.2 两组儿童智力情况比较

研究组儿童语言智商、操作智商、总智商、顺背与倒背项目中显著低于对照组,差异具有统计学意义(*P*<0.05);但两组语言及操作时间比较差异无统计学意义(*P*>0.05),见表2。

表1 两组儿童生长发育情况比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of children's growth and development between the two groups ($\bar{x} \pm s$)

指标	研究组(<i>n</i> =90)	对照组(<i>n</i> =85)	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
年龄(岁)	5.11±2.17	4.74±1.58	1.283	0.201
出生体重(g)	3486.97±487.77	3403.11±392.67	1.248	0.214
母亲生育年龄(岁)	25.82±3.81	25.49±1.75	0.729	0.467
爬行月龄(月)	7.14±1.66	7.06±1.75	0.310	0.757
独走月龄(月)	12.62±1.54	12.41±1.32	0.966	0.335
萌芽月龄(月)	7.45±2.31	6.84±2.01	1.859	0.065
体重SDS	0.52±0.65	0.83±1.47	1.821	0.070
身高SDS	0.57±0.81	0.55±0.97	0.148	0.882
BMI(kg/m ²)	14.90±1.06	15.21±1.66	1.481	0.141

表2 两组儿童智力情况比较($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of intelligence between the two groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	语言智商	语言时间	操作智商	操作时间	总智商	顺背	倒背
研究组	90	88.26±12.41	18.37±3.12	103.77±12.43	19.32±3.17	95.05±11.32	4.67±1.31	1.04±1.14
对照组	85	109.03±12.85	19.12±2.45	112.90±9.75	20.12±3.01	111.27±10.66	5.89±1.04	2.32±1.17
<i>t</i> 值		10.877	1.762	5.385	1.710	9.745	6.798	7.329
<i>P</i> 值		0.001	0.080	0.001	0.089	0.001	0.001	0.001

2.3 两组儿童IGF-1、IGFBP-3及Hcy水平比较

研究组IGF-1、IGFBP-3水平显著低于对照组,Hcy水平显著高于对照组,差异均具有统计学意义(*P*<0.05),见表3。

表3 两组儿童IGF-1、IGFBP-3及Hcy水平比较($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of IGF-1, IGFBP-3 and Hcy levels

between 2 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	IGF-1 (ng/mL)	IGFBP-3 (ng/mL)	Hcy (μmol/L)
研究组	90	89.54±20.34	1893.13±517.11	18.47±1.84
对照组	85	167.53±20.87	2443.48±898.33	14.03±1.62
<i>t</i> 值		25.033	5.001	16.904
<i>P</i> 值		0.001	0.001	0.001

2.4 CH患儿智力情况与IGF-1、IGFBP-3及Hcy水平的相关性

知识、图片词汇、倒背、视觉分析项目与IGF-1、

IGFBP-3水平呈正相关,与Hcy水平呈负相关(*P*<0.05),而算数、图片概括、顺背及图画填充与IGF-1、IGFBP-3及Hcy水平无明显相关性(*P*>0.05),见表4。

表4 儿童智力情况与IGF-1、IGFBP-3及Hcy水平的相关性

Table 4 Correlation between children's intelligence and IGF-1, IGFBP-3 and Hcy levels

相关因子	IGF-1		IGFBP-3		Hcy	
	<i>r</i> 值	<i>P</i> 值	<i>r</i> 值	<i>P</i> 值	<i>r</i> 值	<i>P</i> 值
知识	0.587	0.001	0.263	0.029	-0.231	0.034
图片词汇	0.641	0.006	0.485	0.009	-0.501	0.008
算术	0.114	0.764	0.223	0.305	-0.211	0.361
图片概括	0.158	0.643	0.147	0.654	-0.136	0.668
顺背	0.207	0.521	0.195	0.547	-0.159	0.632
倒背	0.319	0.024	0.338	0.021	-0.417	0.011
视觉分析	0.256	0.031	0.292	0.027	-0.362	0.021
图画填充	0.216	0.314	0.186	0.594	-0.101	0.811

2.5 CH患儿与IGF-1、IGFBP-3及Hcy水平相关智能因素多元逐步回归分析

以IGF-1、IGFBP-3及Hcy值为因变量,以儿童韦氏各项分测验得分(共8变量,包括顺背、倒背项)为自变量,进行多元逐步回归分析,结果发现智力因素中对IGF-1、IGFBP-3及Hcy水平影响较大的前3为因子分别是图片词汇、倒背、视觉分析($P<0.05$),见表5。

表5 CH患儿与IGF-1、IGFBP-3及Hcy水平相关智能因素多元逐步回归分析

Table 5 Multiple stepwise regression analysis of intelligence factors related to IGF-1, IGFBP-3 and Hcy levels in CH children

相关因素	回归系数	标准误	OR值	95%CI	P值
图片词汇	0.647	0.227	1.224	1.224~2.980	<0.001
倒背	0.625	0.201	1.868	1.260~2.770	<0.001
视觉分析	0.534	0.264	1.706	1.017~2.862	<0.001

3 讨论

CH患儿经新生儿疾病筛查早期确诊治疗可很好避免其生长发育异常。CH是临床儿科常见的一种内分泌疾病,是由于胚胎期和出生前甲状腺轴发生改变,导致发育、功能代谢异常,引起出生后甲状腺功能减退,血液循环中血清甲状腺激素水平降低而引起各种症状、体征的疾病^[7]。本组研究结果表明CH患儿在胎儿期的生长发育与正常新生儿无差别,分析其原因可能是因为在胎儿时期,母体的血清甲状腺激素保证了胎儿的正常发育^[8]。胎盘屏障、羊膜腔总羊水循环是母体与胎儿血清甲状腺激素交换的两条通道。来自羊水及胎盘运转的 FT_4 可有效预防胎儿中枢神经系统发生损伤及骨骼异常发育,同时也是CH在新生儿时期缺乏特异性临床症状的原因^[9]。CH患儿若早期未经诊治,会由于缺乏血清甲状腺激素,进而导致脑发育障碍、智力低下、身材矮小。Mazahir等^[10]报道指出,早期诊治的CH患儿生长发育情况显著优于开始治疗年龄均在6个月以上的非筛查组儿童。本组研究结果显示,经早期诊治的CH患儿生长发育情况与正常儿童比较无差异。

Mehran等^[11]研究发现,IGF-1变异范围较大,在血液循环中,95%的IGF-1与IGFBP-3相结合,两个因子水平呈正相关,具有协同作用,与身高增长、年龄有一定关系。IGF-1对正常组织细胞的增

殖、分化、再塑及维护十分重要,在中枢神经系统疾病中具有重要作用^[12]。韩春玲等^[13]研究指出,CH患儿IGF-1、IGFBP-3水平显著低于正常健康儿童,与本组研究报道一致。

目前已有大量研究证实,IGF-1主要肝脏合成的多肽物质,其主要功能与胰岛素相似,参与人体的生长发育^[14]。而IGFBP-3主要在肝脏中合成并经肾脏代谢清除,其中血清中的水平主要受生长激素(growth hormone, GH)的调节。Wassner^[15]等研究认为, GH mRNA表达会随甲状腺功能减退而降低,循环血液中GH水平下降,进而导致IGFBP-3合成与分泌受到影响。本组研究结果与上述报道基本相符。表明IGF-1、IGFBP-3水平变化可作为观察CH患儿生长发育的指标。

Hcy是一种人体内的含硫氨基酸,为蛋氨酸和半胱氨酸代谢过程中的重要中间产物。许多学者认为血液Hcy是心脑血管发病的一个独立危险因素,该因子已成为基础医学和临床医学研究的新热点^[16]。Tanaka等^[17]研究发现,机体内血Hcy水平高低除了受遗传、药物、性别等因素影响外,与体内营养因素及代谢状态密切相关。本组研究与上述文献报道相符,说明Hcy水平是影响CH患儿生长发育的因素之一。

综上所述,IGF-1、IGFBP-3及Hcy水平与儿童智商、身高及体重具有一定相关性。CH患儿经早期诊治,其生长发育可达正常水平。

参考文献

- [1] 邢红宇, 卢瑞丽, 梁宁, 等. 遗传性轻度认知功能障碍与MTHFR C677T基因多态性及血浆同型半胱氨酸水平研究[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2019, 11(1):22-27.
- [2] 景蓉, 李秀琴. 妊娠期甲状腺功能减退与妊娠期糖尿病对妊娠结局的影响及相关性分析[J]. 解放军医药杂志, 2017, 29(8):66-71.
- [3] Ozdemir A, Korkut S, Kurtoglu S, et al. Neonatal Endocrinologic Problems in Collodion Babies [J]. Pediatric Dermatology, 2017, 34(3):290-294.
- [4] 于华, 杜影. 循证护理在甲状腺肿瘤合并高血压患者围手术期中的应用[J]. 保健医学研究与实践, 2017, 14(3):92-93.
- [5] 张亚钦, 曹中强, 林穗方, 等. 中国九市七岁以下儿童生长迟缓状况调查研究[J]. 中华儿科杂志, 2020, 58(3):194-200.
- [6] 丁怡, 肖非, 范中豪, 等. 关于美国《韦氏儿童智力量表-五版》的性能简介[J]. 中国特殊教育, 2016, 10(7):18-25.

CD64 结合血常规在重症患者感染性发热与非感染性发热诊断及鉴别诊断中的应用

杜向阳^{1,2*} 张文英³ 闫琳¹

[摘要] 目的 研究中性粒细胞 CD64 结合血常规在重症患者感染性发热与非感染性发热的诊断及鉴别诊断中的意义。方法 选取 2015 年 1 月至 2019 年 1 月于本院治疗的发热患者 155 例,并根据发热原因分为感染发热组 75 例和非感染发热组 80 例。采用流式细胞仪检测所有受试者外周血中性粒细胞 CD64 指数的水平;采用血液分析仪分别检测所有受试者外周血白细胞(WBC)、降钙素原(PCT)、C-反应蛋白(CRP)水平;采用 ROC 曲线比较血常规指标的诊断效能。结果 感染发热组入院 24 h CD64 指数和 1 周 CD64 指数显著高于非感染发热组,差异具有统计学意义($P<0.05$);CD64 指数和 WBC 诊断感染性发热和非感染性发热的敏感度显著高于 PCT 及 CRP,差异具有统计学意义($P<0.05$);CD64 指数和 WBC 诊断感染性发热和非感染性发热的特异度显著高于 PCT 及 CRP,差异具有统计学意义($P<0.05$)。结论 感染性发热患者 CD64 指数和 WBC 水平显著升高,且这两种指标在诊断感染性发热与非感染性发热中特异度与敏感度较高,具有较高的诊断价值。

[关键词] 感染性发热;非感染性发热;中性粒细胞 CD64;血常规

Application of neutrophil CD64 combined with blood routine in the diagnosis and differential diagnosis of infectious and non - infectious fever in severe patients

DU Xiangyang^{1,2*}, ZHANG Wenying³, YAN Lin¹

(1. Department of Infectious Diseases, Shandong Provincial Third Hospital, Jinan, Shandong, China, 250031; 2. Department Of Emergency, Shandong Provincial Third Hospital, Jinan, Shandong, China, 250031; 3. Medical Insurance Office, Shandong Provincial Third Hospital, Jinan, Shandong, China, 250031)

[ABSTRACT] Objective To study the significance of neutrophil CD64 combined with blood routine in diagnosis and differential diagnosis of infectious and non-infectious fever in severe patients. Methods A total of 155 fever patients who were treated in the hospital from between January 2015 and January 2019 were enrolled. According to different fever causes, they were divided into the infectious fever group (75 cases) and the non-infectious fever group (80 cases). The levels of neutrophil CD64 indexes in peripheral blood were detected by flow cytometry. The levels of white blood cells (WBC), procalcitonin (PCT) and C-reactive protein (CRP) in peripheral blood were detected by blood analyzer. The diagnostic efficiency of blood routine indexes was compared by ROC curves. Results After admission, the 24-hour CD64 index and 1-week CD64 index of the infected fever group were significantly higher than those of the non-infected fever group, the difference was statistically significant ($P<0.05$). The sensitivity of CD64 index and WBC to diagnose

基金项目:山东省自然科学基金项目(ZR2017HL159)

作者单位:1. 山东省立第三医院感染性疾病科,山东,济南 250031

2. 山东省立第三医院急诊科,山东,济南 250031

3. 山东省立第三医院医保办,山东,济南 250031

*通信作者:杜向阳, E-mail:baojx189129@sina.cn

infectious and non-infectious fever was significantly higher than that of PCT and CRP, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The specificity of CD64 index and WBC in diagnosing infectious fever and non-infectious fever was significantly higher than that of PCT and CRP, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** The CD64 index and WBC levels of patients with infectious fever are significantly increased, and these two indicators are highly specific and sensitive in the diagnosis of infectious fever and non-infectious fever, and have high diagnostic value.

[KEY WORDS] Infectious fever; Non-infectious fever; Neutrophil CD64; Blood routine

血液病患者常常出现不明原因的发热,通常发热为唯一体征使得鉴别是否为感染性发热较为困难^[1]。若不能正确区分患者是感染性发热还是非感染性发热,会导致抗生素的误用或滥用^[2-3]。白细胞分化抗原 64 (cluster of differentiation 64, CD64) 是常见的诊断患者发热的指标之一,CD64 是连接体液免疫和细胞免疫的纽带,主要表达在巨噬细胞、单核细胞和树突细胞等抗原呈递细胞表面,当中性粒细胞接触微生物细胞壁成份时面 CD64 表达会上调,CD64 指数会上升^[4-5],白细胞数目 (white blood cell, WBC)、C-反应蛋白 (C-reactive protein, CRP) 和降钙素原 (procalcitonin, PCT) 也是常见的细菌感染的重要指标^[6]。但目前对这几种指标在感染性发热与非感染性发热的诊断及鉴别的敏感度、特异度存在一定的争议。本研究旨在研究中性粒细胞 CD64 结合血常规在重症患者感染性发热与非感染性发热诊断及鉴别诊断中的意义,现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取 2015 年 1 月至 2019 年 1 月于本院治疗的发热病例 155 例,并根据发热原因分为感染发热组 75 例和非感染发热组 80 例。其中感染发热组:男 40 例,女 35 例;平均年龄 (45.13 ± 7.83) 岁;入院前发热持续时间平均 (10.19 ± 2.09) d;发热体温平均 (38.88 ± 0.31) °C;非感染发热组:男 42 例,女 38 例;平均年龄 (46.27 ± 6.97) 岁;入院前发热持续时间平均 (10.36 ± 2.36) d;发热体温平均 (38.75 ± 0.29) °C;两组患者性别、年龄、身高、体重等一般资料比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

两组患者的纳入标准:①所有患者均发热,且体温在 37.5~40.0°C 之间;②发热原因不明;③发热持续时间超过 24 h;④患者病历资料完整;排除标准:①合并心、肝、肾等器质性疾

病;②存在精神疾病;③哺乳期或妊娠期妇女。本研究获得本院医学伦理委员会批准,受检者及其家属均知情了解

1.2 方法

所有患者入院 24 h 内和入院治疗一周后分别早晨空腹静脉采血 6 mL。采用流式细胞仪 (型号: FACS Calibur, 美国 BD 公司) 检测 CD64 含量,CD64 指数 = 中性粒细胞 CD64 平均荧光强度 / 淋巴细胞 CD64 平均荧光强度。采用免疫比浊法测定 CRP 含量水平 (CRP 试剂盒购自武汉明德生物科技股份有限公司;批号 20190809);采用本院常规检测外周血 WBC、PCT。

1.3 观察指标及评价标准

感染组患者均经过血培养、痰培养、尿培养确认为感染性发热;WBC 参考正常范围 ($3.5 \sim 9.5$) $\times 10^9/L$ ^[7]、PCT 参考正常范围 0~0.05 ng/mL^[8]、CRP 参考正常范围 0~12 mg/L^[9]。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 12.0 软件进行数据分析,计量资料采用 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较用 t 检验。使用 ROC 计算下面积以各感染指标单一检测的敏感性和特异性,以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者入院时 CD64 指数情况

感染发热组入院 24 h 中性粒细胞 CD64 平均荧光强度显著高于非感染发热组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),两组患者淋巴细胞 CD64 平均荧光强度比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

2.2 两组患者入院治疗一周后 CD64 指数情况

两组患者入院治疗一周后,相比入院治疗时中性粒细胞 CD64 平均荧光强度、CD64 指数均显著降低,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$);感染发热组中性粒细胞 CD64 平均荧光强度和 CD64 指数均显著高于非感染发热组,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$),两组患者淋巴细胞 CD64 平均荧光强度比较差异无统计学意义 ($P < 0.05$),见表 2。

表1 两组患者入院时 CD64 指数 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 CD64 indexes at admission in both groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	中性粒细胞 CD64 平均荧光强度	淋巴细胞 CD64 平均荧光强度	24 h CD64 指数
感染发热组	75	3.21±0.81	0.97±0.35	3.54±0.25
非感染发热组	80	2.01±0.90	0.91±0.30	1.78±0.19
t 值		8.705	1.142	47.001
P 值		0.000	0.255	0.000

表2 两组患者入院后治疗 1 周 CD64 指数 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 CD64 indexes after 1 week of admission treatment in both groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	中性粒细胞 CD64 平均荧光强度	淋巴细胞 CD64 平均荧光强度	1 周 CD64 指数
感染发热组	75	2.61±0.12	1.01±0.12	2.56±0.21
非感染发热组	80	1.31±0.11	0.98±0.20	1.41±0.20
t 值		70.364	1.695	34.919
P 值		0.000	0.092	0.000

2.3 两组患者血常规检测结果

WBC、PCT、CRP 显著高于非感染发热组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 3。

表3 两组患者血常规检测结果 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Test results of blood routine in both groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	WBC (10^9 个/L)	PCT (ng/mL)	CRP (mg/L)
感染发热组	75	12.25±1.20	0.78±0.04	28.98±1.36
非感染发热组	80	8.36±0.79	0.45±0.02	14.02±0.89
t 值		23.979	65.573	81.522
P 值		0.000	0.000	0.000

2.4 血常规各指标诊断效能比较

WBC、PCT、CRP 和 CD64 联合诊断预测感染类型敏感度、特异度均高于单一诊断值。见表 4。

表4 CD64 和血常规检测感染类型的 ROC 分析

Table 4 ROC analysis on infection types detected by CD64 and blood routine

组别	AUC	敏感度	特异度	cutoff 值	95%CI
WBC	0.832	0.801	0.889	10.231	0.737~0.923
PCT	0.783	0.718	0.694	0.585	0.675~0.892
CRP	0.752	0.773	0.667	15.698	0.369~0.865
CD64	0.781	0.814	0.798	2.018	0.687~0.954
联合	0.835	0.818	0.758	0.832	0.751~0.933

3 讨论

李蕊等^[10]研究表明 CD64 可以作为感染性发热的重要指标, 患者出现感染性发热后 CD64 会显著升高。本研究检测了发热患者的 CD64 指数发现, 感染发热组入院 24 h CD64 指数和 1 周 CD64 指数显著高于非感染发热组。这可能是因为两组患者发热原因不同, 感染患者发热是因为有细菌

或其他微生物感染, 中性粒细胞接触细菌细胞壁, 使得一些细胞因子例如 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6、CRP 等水平升高, 同时在巨噬细胞、单核细胞和树突细胞等抗原呈递细胞表面的 CD64 表达也会升高。当治疗一周后, 两组患者 CD64 指数均显著降低, 说明感染得到了显著改善。同时感染发热组的 CD64 指数仍然高于非感染发热组, 这可能是因为感染性发热治疗周期较长, 一周时间部分患者还未完全康复, 但细菌感染已得到了显著改善。

Xing 等^[11]研究表明 PCT、CRP、IL-6 含量水平与发热患者是否感染关系密切。血常规是发热患者最常见的检查项目, 医师需要通过血常规指标判定患者为感染性发热还是非感染性发热, 防止治疗时抗生素滥用^[12]。血常规中判定是否为感染性发热的指标包括 WBC、CRP 和 PCT 等。WBC、CRP 和 PCT 是传统常规感染指标, 其检测方法简便经济, 是临床鉴别感染的主要指标, 具有一定的临床应用价值^[13]。王文佳等^[14]研究表明: 患者受到细菌感染时, 感染程度越重, PCT 含量越高。本研究发现, 感染发热组 WBC、PCT、CRP 均显著高于非发热组。说明感染患者被微生物入侵触发了体液免疫和细胞免疫, 使得 WBC、PCT、CRP 均升高。黄克明^[15]研究表明血清 PCT、CRP 和 WBC 联合检测可以对感染性发热进行有效预警, 本研究得出的结论与其具有一致性。

马彩燕等^[16]研究表明 PCT、CD64 及 WBC 计数均可以作为判定感染性发热的有效因素。本研究使用通过 ROC 预测各种指标对感染发热诊断的特异度及灵敏度进行了探讨, CD64 指数和 WBC 诊断感染性发热和非感染性发热的敏感性和特异

度较高,这可能是因为微生物入侵后触发了患者的细胞免疫,CD64和WBC是细胞免疫的主要指标,当有微生物入侵,中性粒细胞接触微生物细胞壁大量分泌CD64和WBC,使其显著升高,而非感染发热患者没有微生物触发体液免疫,WBC不会显著升高,使得WBC作为鉴定是否为感染性发热的有效指标。

综上所述,感染性发热患者CD64指数和WBC水平显著升高,且这两种指标在诊断感染性发热与非感染性发热中特异性与敏感度较高,具有较高的诊断价值。

参考文献

- [1] 杨慧敏. 中医辨治内伤发热验案四则[J]. 国际中医中药杂志, 2018, 40(4): 375-376.
- [2] 赵志芳, 李旭泽, 赵云霞, 等. 降钙素原、C反应蛋白鉴别肺癌患者肿瘤热与感染性发热的价值[J]. 河北医科大学学报, 2018, 39(5): 500-503.
- [3] 张娜, 孙耕耘. 降钙素原对鉴别肿瘤患者感染与肿瘤热的价值[J]. 中华全科医师杂志, 2018, 17(9): 709-713.
- [4] 陈芳芳, 张群燕, 邢婕, 等. SLE患者外周血中性粒细胞CD64指数在鉴别并发细菌感染与疾病活动期的临床价值[J]. 现代检验医学杂志, 2018, 5(3): 14-17.
- [5] 韩伟平, 肖洋, 李瑞华. 中性粒细胞CD64指数、PCT及NLR在感染性疾病诊断中的价值[J]. 中国微生态学杂志, 2018, 30(3): 304-307, 311.
- [6] 纵雪峰, 种丽芳, 刘道路, 等. PCT、CRP在肺炎支原体肺炎患儿中的表达及与MP-IgM抗体的关系[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(7): 964-967+973.
- [7] 王晓慧, 张晓春, 王淑侠. 继发性肺泡蛋白沉着症^{18F}-FDG PET/CT显像一例[J]. 中华核医学与分子影像杂志, 2017, 37(2): 95-96.
- [8] 刘新秀. 血清炎症因子IL-32、Hs-CRP、PCT与COPD表型的相关分析[D]. 河北: 河北医科大学, 2015.
- [9] 钟仕卿. CRP检测在外科手术中的临床应用[J]. 中华现代临床医学杂志, 2010.
- [10] 李蕊, 常亮, 李金洁, 等. CD64在危重疾病合并感染诊断中的应用进展[J]. 临床检验杂志, 2019, 5(7): 531-534.
- [11] Xingjun LI, Mingjian Q, Guisheng D, et al. Clinical evaluation of serum PCT, CRP, IL-6 and endotoxin in fever patients with bloodstream infection [J]. Int J Lab Med, 2018, 39(22): 2782-2785, 2789.
- [12] 杨峰, 张景皓, 方毅, 等. 常规检验及治疗与急性感染性腹泻病原学诊断的关系[J]. 检验医学, 2018, 33(5): 379-383.
- [13] 周振忠, 汪永强, 袁平宗, 等. 外周血CRP, WBC与Nst比值单独及联合检测在儿科细菌感染性疾病中的应用价值[J]. 现代检验医学杂志, 2018, 33(3): 117-119.
- [14] 王文佳, 陈小岸, 郭娜, 等. 降钙素原在新生儿感染体内的水平变化及临床意义[J]. 内蒙古医学杂志, 2018, 5(1): 73-74.
- [15] 黄克明. PCT、CRP、WBC检测预警经皮肾术后感染性发热的临床价值[J]. 长江大学学报(自科版), 2018, 15(12): 26-27.
- [16] 马彩燕, 赖文强, 陈小平. PCT、HNL和CD64水平对细菌性感染的诊断价值[J]. 检验医学, 2019, 34(5): 433-436.

(上接第1383页)

- [7] Yamaguchi T, Nakamura A, Nakayama K, et al. Targeted Next-Generation Sequencing for Congenital Hypothyroidism With Positive Neonatal TSH Screening [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2020, 114(8): 8.
- [8] Silvestrin SM, Leone C, Cléa RL. Detecting congenital hypothyroidism with newborn screening: the relevance of thyroid-stimulating hormone cutoff values [J]. J Pediatr, 2017, 74(6): 1548-1549.
- [9] 张卓曲, 杨成会. 先天性甲状腺功能减低儿童血清IGFBP-3水平与骨骼、体格、智能发育的关系[J]. 中国优生与遗传杂志, 2018, 26(3): 109-111.
- [10] Mazahir FA, Khadora MM. P285 The association of congenital anomalies in patients with congenital hypothyroidism in government tertiary care centers under dubai health authority, UAE: 2000-2015, a retrospective cross-sectional study [J]. Arch Dis Chil, 2019, 104(3): 271.
- [11] Mehran L, Khalili D, Yarahmadi S, et al. Evaluation of the congenital hypothyroidism screening programme in Iran: a 3-year retrospective cohort study [J]. Heart, 2019, 104(2): 176.
- [12] 严学勤, 曾洁, 上官予梅, 等. 先天性甲状腺功能减退症患儿生长发育相关因素研究[J]. 中国妇幼保健, 2018, 33(3): 612-614.
- [13] 韩春玲, 穆亚宁, 赵锁林. 大剂量重组人生长激素对特发性矮小症患儿血清IGF-1、IGFBP-3水平的影响及其安全性分析[J]. 中国妇幼保健, 2018, 33(23): 5512-5514.
- [14] 梁新萍, 蔡仁梅, 刘文森, 等. 先天性甲状腺功能减退症患儿GLIS3基因突变研究[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2018, 33(8): 585-588.
- [15] Wassner AJ. Congenital Hypothyroidism [J]. Clin Perinatol, 2018, 45(1): 1-18.
- [16] 段文冰, 刘芸, 刘义刚, 等. 亚临床甲状腺功能减退症与血脂和同型半胱氨酸及血常规指标水平的相关性分析[J]. 中国医药, 2017, 12(12): 1840-1844.
- [17] Tanaka T, Aoyama K, Suzuki A, et al. Clinical and genetic investigation of 136 Japanese patients with congenital hypothyroidism [J]. J Pediatr Endocrinol Metab, 2020, 33(6): 691-701.

血清 AT-Ⅲ、Lp-PLA2 水平与急性冠脉综合征患者冠脉狭窄程度的关系分析

李燕平 李雪 王珍*

[摘要] **目的** 探讨血清抗凝血酶Ⅲ(AT-Ⅲ)、脂蛋白相关磷脂酶A2(Lp-PLA2)水平与急性冠脉综合征患者冠脉狭窄程度的关系。**方法** 分析2018年1月至2020年1月本院收治的92例急性冠脉综合征患者(疾病组)的临床资料,根据入院后冠状动脉病变支数和Gensini评分评估疾病组患者冠脉狭窄程度,将其划分为轻度组($n=41$)、中度组($n=27$)、重度组($n=24$),另外选择同期冠脉造影检查为阴性者作为对照组($n=90$)。比较各组AT-Ⅲ、Lp-PLA2、Gensini评分情况,利用ROC曲线评估AT-Ⅲ、Lp-PLA2对急性冠脉综合征患者冠脉狭窄程度的价值。**结果** 疾病组患者血清Lp-PLA2水平高于对照组,AT-Ⅲ水平低于对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$);冠脉狭窄轻度、中度、重度组血清Lp-PLA2、AT-Ⅲ水平和Gensini评分比较,差异均有统计学意义($P<0.05$);经Spearman相关分析,急性冠脉综合征患者血清中Lp-PLA2与Gensini评分呈正相关($r=0.283, P=0.040$);AT-Ⅲ与Gensini评分呈负相关($r=-0.331, P=0.016$);ROC曲线分析显示Lp-PLA2、AT-Ⅲ联合预测急性冠脉综合征患者出现严重冠脉狭窄的曲线下面积(AUC)为0.872,高于单一指标检测。**结论** 急性冠脉综合征患者随着冠脉狭窄程度加深,患者Gensini评分、血清Lp-PLA2逐渐升高,血清AT-Ⅲ水平降低,Lp-PLA2、AT-Ⅲ联合检测可以为急性冠脉综合征患者冠脉狭窄程度提供更准确的判断。

[关键词] 急性冠脉综合征;抗凝血酶Ⅲ;冠脉狭窄程度;脂蛋白相关磷脂酶A2;冠脉造影

Relationship between serum AT-Ⅲ, Lp-PLA2 levels and severity of coronary artery stenosis in patients with acute coronary syndrome

LI Yanping, LI Xue, WANG Zhen*

(Department of Cardiovascular Medicine, Western War General Hospital, Chengdu, Sichuan, China, 610000)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the relationship between serum antithrombin Ⅲ (AT-Ⅲ), lipoprotein-associated phospholipase A2 (Lp-PLA2) levels and severity of coronary artery stenosis in patients with acute coronary syndrome (ACS). **Methods** The clinical data of 92 ACS patients (disease group) who were admitted to the hospital from January 2018 and January 2020 were retrospectively analyzed. According to the number of coronary artery lesions and Gensini score after admission, the severity of coronary artery stenosis in the disease group was evaluated. And they were divided into the mild group ($n=41$), the moderate group ($n=27$) and the severe group ($n=24$). Meanwhile, those with negative coronary arteriography results were enrolled as the control group ($n=90$). AT-Ⅲ, Lp-PLA2 and Gensini score were compared among all groups. The value of AT-Ⅲ and Lp-PLA2 in the severity of coronary artery stenosis in ACS patients was evaluated by ROC curves. **Results** The level of serum Lp-PLA2 in the disease group was higher than that in the control group, while AT-Ⅲ level was lower than that in the control group ($P<0.05$). There were significant differences in

基金项目:四川省卫计委科学研究项目(16PJ093)

作者单位:西部战区总医院心血管内科,四川,成都 610000

*通信作者:王珍, E-mail: ruotian-1025@163.com

serum Lp-PLA2 and AT-Ⅲ levels, and Gensini scores among the mild, moderate, and severe groups ($P < 0.05$). Spearman correlation analysis showed that serum Lp-PLA2 was positively correlated with Gensini score in ACS patients ($r=0.283, P=0.040$), while AT-Ⅲ was negatively correlated with Gensini score ($r=-0.331, P=0.016$). ROC curve analysis showed that the area under the curve (AUC) of Lp-PLA2 combined with AT-Ⅲ (0.872) for predicting severe coronary artery stenosis in ACS patients was higher than that of single indicator detection. **Conclusion** With the aggravation of coronary artery stenosis, the Gensini scores and serum Lp-PLA2 level are increased, while serum AT-Ⅲ level is decreased in ACS patients. The combined detection of Lp-PLA2 and AT-Ⅲ can provide a more accurate judgment for the degree of coronary stenosis in patients with acute coronary syndrome.

[KEY WORDS] Acute coronary syndrome; Antithrombin Ⅲ; Coronary artery stenosis; Lipoprotein-associated phospholipase A2; Coronary angiography

急性冠脉综合征是冠状动脉粥样硬化破裂导致血栓而引发的缺血性心脏病,常见的发病形式包括不稳定性心绞痛、心源性猝死、心肌梗死等^[1-3]。急性冠脉综合征患者病情进展迅速,仅仅依靠临床症状难以对其治疗效果和预后情况进行评估^[4]。冠脉造影被认为是诊断冠心病的金标准,但属于有创检查,不利于实时监控病情;除此之外,Gensini评分等多种评分工具操作较为繁琐,在应用上有一定的局限性^[5-6]。因此,寻找一种可以准确、简便评估急性冠脉综合征患者病情的方法,对急性冠脉综合征治疗具有指导意义^[7]。本研究讨论了血清抗凝血酶Ⅲ(antithrombin Ⅲ, AT-Ⅲ)、脂蛋白相关磷脂酶A2(lipoprotein-associated phospholipase A2, Lp-PLA2)水平与急性冠脉综合征患者冠脉狭窄程度的关系,为患者治疗方案的选择提供参考,报告如下。

1 资料和方法

1.1 一般资料

选择2018年1月至2020年1月医院收治的92例急性冠脉综合征患者作为疾病组,其中男58例,女34例,年龄48~84岁,平均(65.21±4.13)岁;另外选择同期90例冠脉造影检查为阴性者作为对照组,其中男60例,女30例,年龄46~87岁,平均(65.31±3.98)岁。两组一般资料比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

纳入标准:①急性心肌梗死患者经急诊冠脉造影确诊为急性冠脉综合征,不稳定型和稳定型心绞痛患者经门诊冠脉造影检查确诊为急性冠脉综合征;②年龄≥45岁;③患者及其家属对本研究知情同意,本研究经医院伦理委员会批准。排除标准:①合并肺源性、风湿性心脏病,或心肌

炎;②合并血液系统疾病;③严重免疫抑制状态;④合并进展性恶性肿瘤;⑤合并自身免疫性疾病;⑥精神疾病患者;⑦合并肺结核。

1.2 冠状动脉狭窄程度判定标准

利用冠状动脉硬化程度(Gensini)评分将疾病组患者根据冠脉狭窄程度进行分组^[4]:①血管狭窄≤25%,1分;血管狭窄26%~50%,2分;血管狭窄51%~75%,4分;血管狭窄76%~90%,8分;血管狭窄91%~99%,16分;狭窄100%为32分;②病变血管包括4类,病变位于左主干(left main, LM),血管狭窄得分×5;病变位于左前降支(left anterior descending, LAD)近段、中段、心尖支、第一对角支、第二对角支时,血管狭窄得分×2.5、1.5、1、1、0.5;病变位于回旋支(left circumflex, LCX)近段、钝缘、中段、远段、后降支、后侧支时,血管狭窄得分×2.5、1、1.5、1、1、0.5;病变位于右冠状动脉(right coronary artery, RCA)近段、中段、远段、后降支、后侧室支时,血管狭窄得分×1,位于后降支得分×0.5。每位患者根据累计总得分,总分≤24分为轻度组($n=41$)、24<总分<49分为中度组($n=27$)、总分≥49分为重度组($n=24$)。

1.3 观察指标

①对照组和疾病组血清Lp-PLA2、AT-Ⅲ水平比较:收集全部入组者进行冠脉造影检查前的空腹静脉血5 mL,取2 mL分离血清,利用酶联免疫吸附法检测Lp-PLA2、AT-Ⅲ水平,试剂盒均由深圳市新产业生物医学工程股份有限公司提供;②冠脉狭窄轻度、中度、重度组血清Lp-PLA2、AT-Ⅲ水平和Gensini评分比较;③疾病组患者血清Lp-PLA2、AT-Ⅲ水平与Gensini评分的相关性分析;④血清Lp-PLA2、AT-Ⅲ水平对急性冠脉综合征患者冠脉狭窄情况的预测。

1.4 统计学处理

采用统计学软件 SPSS 13.0 中处理数据, 计量资料采用($\bar{x} \pm s$)表示, 两两比较行 LSD-t 检验, 多组间用方差分析, 诊断效能的评估采用 ROC 曲线, 相关性分析利用 Spearman 进行, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组血清 Lp-PLA2、AT-III 水平比较

疾病组血清 Lp-PLA2 水平高于对照组, AT-III 水平低于对照组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 1。

表 1 对照组和疾病组血清 Lp-PLA2、AT-III 水平比较
Table 1 Comparison of serum Lp-PLA2 and AT-III levels between control group and disease group

类型	n	AT-III(mmol/L)	Lp-PLA2(ng/mL)
疾病组	92	85.85±9.52	182.31±28.38
对照组	90	92.46±5.31	161.47±30.25
t 值		5.767	4.772
P 值		0.000	0.000

2.2 冠脉狭窄轻度、中度、重度组血清 Lp-PLA2、AT-III 水平和 Gensini 评分比较

冠脉狭窄重度组血清 Lp-PLA2、Gensini 评分显著高于轻度组和中度组, AT-III 水平低于轻度组和中度组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 中度组血清 Lp-PLA2、Gensini 评分显著高于轻度组, AT-III 水平低于轻度组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 2。

表 2 冠脉狭窄轻度、中度、重度组血清 Lp-PLA2、AT-III 水平和 Gensini 评分比较

Table 2 Comparison of Lp-PLA2, AT-III and Gensini scores in mild, moderate and severe coronary stenosis groups

类型	n	AT-III (mmol/L)	Lp-PLA2 (ng/mL)	Gensini 评分(分)
轻度组	41	87.88±5.49 ^{ab}	179.86±4.66 ^{ab}	22.71±3.57 ^{ab}
中度组	27	85.07±4.36 ^a	182.49±5.54 ^a	42.36±8.54 ^a
重度组	24	81.85±2.52	186.31±6.38	49.71±2.24
F 值		13.426	10.788	239.871
P 值		0.000	0.000	0.000

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

2.3 疾病组患者血清 Lp-PLA2、AT-III 水平与 Gensini 评分的相关性分析

经 Spearman 相关分析, 急性冠脉综合征患者血清中 Lp-PLA2 与 Gensini 评分呈正相关 ($r =$

0.283, $P = 0.040$); AT-III 与 Gensini 评分呈负相关 ($r = -0.331, P = 0.016$)。

2.4 Lp-PLA2、AT-III 及二者联合预测急性冠脉综合征患者冠脉狭窄情况的结果分析

ROC 曲线分析显示, Lp-PLA2、AT-III 联合预测急性冠脉综合征患者出现严重冠脉狭窄的曲线下面积 (area under curve, AUC) 为 0.872, 高于单一指标检测。见表 3, 图 1。

表 3 Lp-PLA2、AT-III 及二者联合预测急性冠脉综合征患者冠脉狭窄情况的结果分析

Table 3 Analysis of results of Lp-PLA2, AT-III and their combination in predicting coronary stenosis in patients with acute coronary syndrome

血清指标	预测界值	AUC	特异度 (%)	敏感度 (%)
AT-III (mmol/L)	86.14	0.715	70.7	65.9
Lp-PLA2(ng/mL)	182.47	0.769	68.2	77.6
二者联合	-	0.872	78.2	89.4

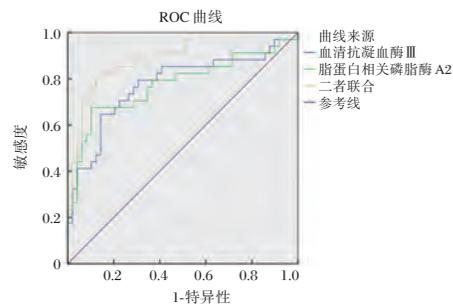


图 1 Lp-PLA2、AT-III 及二者联合预测急性冠脉综合征患者冠脉狭窄情况的 ROC 曲线

Figure 1 ROC curve of Lp-PLA2, AT-III and their combination in predicting coronary stenosis in patients with acute coronary syndrome

3 讨论

动脉粥样硬化的主要病因在于血管炎症, 炎症与凝血系统之间交互紧密, 血小板等凝血因子在抑制动脉粥样硬化中的作用已经得到证实^[8-10]。既往研究有过许多关于 C 反应蛋白、纤维蛋白原等常规炎症因子预测急性冠脉综合征患者预后情况的报道, 但对患者冠脉狭窄程度的诊断价值较低^[11-12]。因此, 寻找一种可以准确、简便评估患者冠脉狭窄程度的方法, 对急性冠脉综合征患者治疗具有指导意义。本研究拟采用 Lp-PLA2、AT-III 相结合的方式, 分析二者与急性冠脉综合征患者冠脉狭窄程度的关系。

Lp-PLA2 以脂蛋白颗粒结合体形式存在于血

液中,由动脉粥样斑块中的巨噬细胞产生,受各类炎症因子的调节,可以水解氧化磷脂产生促炎因子,发挥化学趋向效应,参与动脉粥样硬化的发生发展^[13]。邝唯铭等^[14]通过统计不同中医证型的冠心病患者血清 Lp-PLA2、肾小球滤过率(glomerular filtration rate, GFR)水平,发现冠心病患者血清 Lp-PLA2、GFR 水平均与冠状动脉病变程度相关,推测是因为 Lp-PLA2 在易损、破裂斑块附近大量聚集,斑块破裂的风险增加。本研究结果验证了 Lp-PLA2 与冠脉狭窄程度的关系。AT-Ⅲ为单链糖蛋白,主要由血管内皮细胞产生,是一种重要的抗凝因子,在正常人血浆中占抗凝活性的 50%以上,其活性下降提示机体有形成血栓的风险^[15-16]。田焯等^[17]的通过研究出血性脑卒中的发生的危险因素,发现患者血清 AT-Ⅲ水平降低对缺血性脑卒中发生有一定的预测价值。本研究结果说明 AT-Ⅲ在急性冠脉综合征患者体内呈低表达,推测是因为患者体内免疫复合物介导产生促炎因子,损害血管内皮细胞,进而影响 AT-Ⅲ的合成。

经 Spearman 相关分析结果说明二者在急性冠脉综合征患者体内有一定的协同作用,推测机制是患者动脉粥样硬化斑块破裂之前,Lp-PLA2 大量聚集于斑块周围,使斑块不稳定性增加;不稳定性斑块破裂之后,促炎因子大量的产生,使血管内皮细胞进一步被损害,AT-Ⅲ活性下降;患者冠脉狭窄程度影响其血清 Lp-PLA2、AT-Ⅲ水平。由本研究通过 ROC 曲线分析 Lp-PLA2、AT-Ⅲ对急性冠脉综合征患者的冠脉狭窄程度可知,二者联合预测急性冠脉综合征患者出现严重冠脉狭窄的 AUC 为 0.872,高于单一指标。由于本文研究在病例选取上有一定的偏倚,有待进行多中心的前瞻性研究,以验证二者对患者冠脉狭窄程度评估的价值。

综上所述,急性冠脉综合征患者 Gensini 评分、血清 Lp-PLA2 均显著高于对照组,血清 AT-Ⅲ水平低于对照组,血清 Lp-PLA2、AT-Ⅲ与 Gensini 评分均具有相关性,二者联合检测可以为急性冠脉综合征患者冠脉狭窄程度提供更准确的判断。

参考文献

[1] Niu X, Liu G, Huo L, et al. Risk stratification based on components of the complete blood count in patients with acute coronary syndrome: A classification and regression tree analysis [J]. *Sci Rep*, 2018, 8 (18):2838-2850.

[2] 郭灵承,王栋,鄢高亮,等. 铁调素与急性冠状动脉综合征相关性分析[J]. *江苏医药*, 2020, 46(2):167-170.

[3] Vaidya K, Arnott C, Martínez GJ, et al. Colchicine Therapy and plaque stabilization in patients with acute coronary syndrome: a CT coronary angiography study [J]. *JACC. Cardiovascular imaging*, 2018, 11(2):305-316.

[4] 阳泽文,于波. 基于斑块侵蚀的急性冠状动脉综合征治疗新策略[J]. *中国介入心脏病学杂志*, 2020, 28(1):35-38.

[5] 金凤. 氨氯地平阿托伐他汀钙片对冠心病患者 QT 离散度与冠脉病变程度的影响[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2018, 55(3): 51-57.

[6] 郭宝亮,李占鲁. 老年急性冠状动脉综合征患者生长分化因子 15 与冠状动脉病变程度和预后关系[J]. *中华老年医学杂志*, 2019, 38(11):1229-1231.

[7] 穆利英,吴昱,孟帅,等. 纤维蛋白原与急性冠脉综合征患者冠状动脉病变严重程度的关系研究[J]. *实用心脑血管病杂志*, 2020, 28(2):23-26.

[8] Hossain MS, Rahaman S, Mustafa R, et al. A belief rule-based expert system to assess suspicion of acute coronary syndrome (ACS) under uncertainty [J]. *Soft Computing*, 2018, 22(22):7571-7586.

[9] 陆兆华,叶少武,赖俊龙. 急性冠状动脉综合征患者 PCI 术后院内主要不良血管事件发生率与血清 TG/HDLc 的关系[J]. *解放军预防医学杂志*, 2019, 37(11):65-66.

[10] 丁慧,李朱萌,王寅,等. 急性冠状动脉综合征患者血清脂蛋白(a)及同型半胱氨酸水平分析[J]. *检验医学*, 2019, 34(12):1082-1087.

[11] 徐姝,张彦红,刘子菲,等. 中性粒细胞与淋巴细胞比值联合 GRACE 评分对急性冠状动脉综合征患者近期内不良心血管事件的预测价值[J]. *中国心血管病研究*, 2020, 18(1):73-77, 92.

[12] 范婷婷,何非,王晓晨. 高密度脂蛋白 3 与急性冠状动脉综合征相关性临床分析[J]. *蚌埠医学院学报*, 2019, 44(10):1319-1321.

[13] 王新成,郭游行,惠会婷,等. 血浆 Lp-pLA2、cTnI、HCY 水平与冠心病合并高脂血症患者冠脉病变程度的相关性研究[J]. *实用预防医学*, 2019, 26(2): 86-88.

[14] 邝唯铭,魏崢. 90 例冠心病不同中医证型病人 Lp-PLA2、eGFR 与冠状动脉病变的相关性分析[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2020, 18(2):267-270.

[15] 韩海莉,刘东升,贾子雷,等. 血清 Lp-PLA2、Hcy 及 hs-CRP 与围绝经期冠心病患者冠状动脉病变严重程度的关系[J]. *河北医科大学学报*, 2019, 40(3): 26-29.

[16] 姜鹏,张福海,李玉凤,等. 血小板计数、血浆 D-二聚体、抗凝血酶Ⅲ水平与 UCr 比值对 2 型糖尿病微血管病变的诊断价值[J]. *心血管康复医学杂志*, 2019, 28(6):82-85.

[17] 田焯,蒋扬清,王丽丽,等. 出血性脑卒中患者危险因素分析及血清抗凝血酶Ⅲ、纤维蛋白原、同型半胱氨酸预测价值研究[J]. *创伤与急危重病医学*, 2020, 8(2): 75-77, 80.

盐酸羟考酮负调控 LncRNA LINC01857 抑制宫颈癌细胞 Siha 增殖、迁移及侵袭

张秀双 徐铭军 车向明 曹秀玲 李晓光*

[摘要] 目的 探讨盐酸羟考酮是否通过负向调控 LncRNA LINC01857 而抑制宫颈癌细胞 Siha 增殖、迁移及侵袭。方法 采用不同浓度的盐酸羟考酮处理人宫颈癌细胞 Siha, 分别将 si-NC、si-LINC01857 转染至 Siha 细胞, 分别将 pcDNA、pcDNA-LINC01857 转染至 Siha 细胞后使用盐酸羟考酮处理; 采用 qRT-PCR 法检测 LINC01857 的表达量; 采用 MTT 实验检测细胞增殖; 采用平板克隆形成实验检测克隆形成数; Transwell 小室实验检测细胞迁移及侵袭; Western blot 法检测 E-cadherin、N-cadherin 蛋白表达量。结果 与对照组比较, 盐酸羟考酮处理后可明显降低 LINC01857 的表达水平、OD 值及 N-cadherin 蛋白水平, 提高 E-cadherin 蛋白水平, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与转染 si-NC 比较, 转染 si-LINC01857 后 OD 值及 N-cadherin 蛋白水平降低, 克隆形成数、迁移及侵袭细胞数减少, E-cadherin 蛋白水平升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 盐酸羟考酮通过下调 LINC01857 的表达从而减弱宫颈癌细胞增殖、迁移及侵袭能力。

[关键词] 盐酸羟考酮; LncRNA LINC01857; 宫颈癌; 增殖; 迁移; 侵袭

Oxycodone hydrochloride negatively regulated LncRNA LINC01857 to inhibit the proliferation, migration and invasion of cervical cancer cell Siha

ZHANG Xiushuang, XU Mingjun, CHE Xiangming, CAO Xiuling, LI Xiaoguang*

(Anesthesiology Dept, Beijing Obstetrics and Gynecology Hospital, Capital Medical University, Beijing, China, 100006)

[ABSTRACT] **Objective** To explore whether oxycodone hydrochloride could inhibit the proliferation, migration and invasion of cervical cancer cell Siha through negative regulation of LncRNA LINC01857. **Methods** Different concentrations of oxycodone hydrochloride were used to treat human cervical cancer cell Siha, and si-NC, si-LINC01857 were respectively transfected into Siha cells. After transfecting pcDNA and pcDNA-LINC01857 into Siha cells, they were treated with oxycodone hydrochloride. The qRT-PCR method was used to detect the expression of LINC01857. MTT assay was used to detect cell proliferation. The plate colony formation experiment was used to detect the number of colonies formed. The Transwell chamber test was used to detect cell migration and invasion. Western blot method was used to detect the expression of E-cadherin and N-cadherin protein. **Results** Compared with the control group, oxycodone hydrochloride treatment could significantly reduce the expression level of LINC01857, OD value and the protein level of N-cadherin, and increase the protein level of E-cadherin, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Compared with the transfection of si-NC, the OD value and the protein level of N-cadherin were decreased after si-LINC01857 transfection, the number of clone formation, migration and invasion cells were decreased, and the protein level of E-cadherin was increased, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** Oxycodone

基金项目:北京市卫生和计划生育委员会科技成果和适宜技术推广项目(2018-TG-21)

作者单位:首都医科大学附属北京妇产医院麻醉科,北京 100006

*通信作者:李晓光, E-mail: xg8753200@163.com

hydrochloride reduced the proliferation, migration and invasion of cervical cancer cells by down-regulating the expression of LINC01857.

[KEY WORDS] Oxycodone hydrochloride; LncRNA LINC01857; Cervical cancer; proliferation; Migration; Invasion

宫颈癌是威胁女性生命安全的恶性肿瘤之一,近年来,我国宫颈癌发病率逐年上升,已严重影响患者生活质量,临床常采用手术、放化疗结合等方式进行治疗^[1]。丙泊酚可通过EGFR/JAK2/STAT3途径增强顺铂诱导的宫颈癌细胞凋亡,可作为治疗宫颈癌的潜在药物^[2]。丙泊酚通过抑制HOTAIR而抑制宫颈癌细胞活力并促进细胞凋亡^[3]。盐酸羟考酮是一种半合成的蒂巴因衍生物,属于麻醉药物,可明显减轻肿瘤患者疼痛感^[4]。但盐酸羟考酮对宫颈癌细胞生物学行为的影响尚未阐明。特定的长链非编码RNA(LncRNA)在宫颈癌中表达异常,可调节细胞增殖、迁移及侵袭等生物学行为^[5]。长链非编码RNA LINC01857(LncRNA LINC01857)在乳腺癌中表达水平升高,并可能发挥类癌基因作用^[6]。但LINC01857是否可作为盐酸羟考酮治疗宫颈癌的潜在靶点尚未阐明。因此,本研究主要探讨盐酸羟考酮联合LINC01857对宫颈癌细胞Siha增殖、迁移及侵袭的影响及其潜在作用机制,为进一步阐释盐酸羟考酮治疗宫颈癌的分子机制奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

盐酸羟考酮购自北京华素制药股份有限公司;人宫颈癌细胞Siha购自上海信裕生物科技有限公司;DMEM培养基购自北京迈瑞达科技有限公司;胎牛血清购自上海传秋生物科技有限公司;Lipofectamine2000购自上海北诺生物科技有限公司;si-NC、si-LINC01857购自广州锐博生物科技有限公司;pcDNA、pcDNA-LINC01857购自武汉森灵生物科技有限公司;Trizol试剂购自北京全式金生物技术有限公司;cDNA合成试剂盒与qRT-PCR试剂盒购自北京天根生化科技有限公司;MTT试剂购自北京索莱宝科技有限公司;Transwell小室、Matrigel基质胶购自上海泽迈生物技术有限公司;兔抗人E-cadherin、N-cadherin抗体购自美国CST公司;HRP标记的山羊抗兔二抗购自美国Abcam公司。

1.2 方法

1.2.1 实验分组

Siha细胞接种于96孔板(5×10^3 个/孔),分别加入含有不同浓度(20、40、60 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的盐酸羟考酮的培养液培养24 h^[7],分别记作盐酸羟考酮低剂量组、盐酸羟考酮中剂量组、盐酸羟考酮高剂量组。同时将正常培养的细胞作为对照组。参照Lipofectamine2000试剂盒说明书分别将si-NC、si-LINC01857转染至Siha细胞,分别记作si-NC组、si-LINC01857组。分别将pcDNA、pcDNA-LINC01857转染至Siha细胞,加入含有60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 盐酸羟考酮的培养液培养24 h,分别记作盐酸羟考酮高剂量+pcDNA组、盐酸羟考酮高剂量+pcDNA-LINC01857组。

1.2.2 qRT-PCR检测细胞中LINC01857的表达水平

采用Trizol法提取Siha细胞总RNA,应用Nanodrop2000c超微量分光光度计检测RNA浓度后置于 -80°C 超低温冰箱内保存,按照cDNA合成试剂盒将总RNA逆转录为cDNA,以cDNA为模板进行qRT-PCR反应,反应体系:10 \times PCR Buffer 2.5 μL , MgSO_4 2.5 μL , dNTPs 2.5 μL , 正反向引物各0.5 μL , cDNA 2 μL , RNase-Free ddH₂O补足体系至25 μL ;反应条件:95 $^\circ\text{C}$ 2 min, 95 $^\circ\text{C}$ 30 s, 59 $^\circ\text{C}$ 30 s, 72 $^\circ\text{C}$ 30 s,共36次循环。应用罗氏LightCycler480荧光定量PCR仪检测LINC01857(内参GAPDH)相对表达量。

1.2.3 MTT检测细胞增殖

取对数生长期Siha细胞(2.5×10^5 个/mL)接种于96孔板(100 $\mu\text{L}/$ 孔),按照“1.2.1”分组处理后加入MTT溶液(20 $\mu\text{L}/$ 孔),继续培养4 h后弃上清,加入DMSO(150 $\mu\text{L}/$ 孔),室温振荡孵育5 min后应用酶标仪检测各孔光密度值(OD值)。

1.2.4 平板克隆形成实验

取各组Siha细胞接种于6孔板(1×10^3 个/孔),继续培养14 d后弃旧培养基,加入预冷PBS洗涤后加入甲醇(500 $\mu\text{L}/$ 孔),置于 -20°C 冰箱内孵育20 min,弃甲醇,加入1%结晶紫染色液染色(400 $\mu\text{L}/$ 孔,15 min),蒸馏水洗涤后晾干,观察克隆形成数。

1.2.5 Transwell 实验检测细胞迁移与侵袭

各组 SiHa 细胞 (2.5×10^5 个/mL) 接种于上室 (200 μ L/孔), 下室加入含有 10% 胎牛血清的培养液 (600 μ L/孔), 继续培养 24 h 后使用 PBS 洗涤, 分别加入多聚甲醛 (20 min) 与结晶紫染液 (10 min), 观察迁移细胞数。预冷培养基被用于稀释 Matrigel 基质胶后加入上室 (40 μ L/孔), 继续培养 5 h, 后续实验步骤同细胞迁移实验, 观察侵袭细胞数。

1.2.6 Western blot 检测 E-cadherin、N-cadherin 蛋白表达

各组 SiHa 细胞加入 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白 (500 μ L), 使用 BCA 试剂盒检测蛋白浓度, 取蛋白样品进行 SDS-PAGE, 转膜、封闭, 分别孵育一抗稀释液 (1:1 000, 4 $^{\circ}$ C 孵育 24 h) 与二抗稀释液 (1:5 000, 室温孵育 1 h) 后应用 ImageJ 软件分析各条带灰度值。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 21.0 统计学软件分析数据, 计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示且均符合正态分布, 两组间比较采用独立样本 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 盐酸羟考酮对 SiHa 增殖及 LINC01857 表达的影响

4 组 LINC01857 的表达水平、OD 值、克隆形成数的比较结果显示: 盐酸羟考酮低剂量组 > 盐酸羟考酮中剂量组 > 盐酸羟考酮高剂量组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 盐酸羟考酮对 SiHa 迁移、侵袭的影响

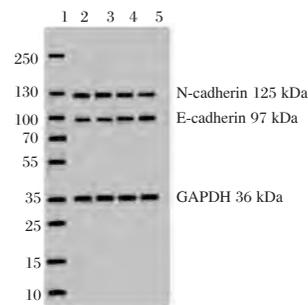
4 组 N-cadherin、迁移细胞数 (个)、侵袭细胞数 (个) 比较结果: 盐酸羟考酮低剂量组 > 盐酸羟考酮中剂量组 > 盐酸羟考酮高剂量组; E-cadherin 结果比较: 盐酸羟考酮低剂量组 < 盐酸羟考酮中剂量组

表 1 盐酸羟考酮对 SiHa 细胞活性、克隆形成及 LINC01857 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 Effects of oxycodone hydrochloride on the activity, clone formation and LINC01857 expression of SiHa cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

分组	LINC01857	OD 值	克隆形成数 (个)
对照组	0.98 \pm 0.05	1.30 \pm 0.07	115.00 \pm 3.27
盐酸羟考酮低剂量组	0.95 \pm 0.04	1.27 \pm 0.07	111.33 \pm 2.87
盐酸羟考酮中剂量组	0.68 \pm 0.04	0.92 \pm 0.05	87.33 \pm 2.62
盐酸羟考酮高剂量组	0.35 \pm 0.02	0.70 \pm 0.04	64.00 \pm 2.16
<i>F</i> 值	168.787	72.022	221.292
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000

< 盐酸羟考酮高剂量组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 1、表 2。



注: 1. Marker; 2. 对照组; 3. 盐酸羟考酮低剂量组; 4. 盐酸羟考酮中剂量组; 5. 盐酸羟考酮高剂量组。

图 1 盐酸羟考酮对 SiHa 中 E-cadherin、N-cadherin 蛋白表达的影响

Figure 1 Effect of oxycodone hydrochloride on the expression of E-cadherin and N-cadherin in SiHa

2.3 干扰 LINC01857 对 SiHa 增殖、迁移、侵袭的影响

与 si-NC 组比较, si-LINC01857 组 OD 值降低, 克隆形成数减少, 迁移及侵袭细胞数减少, N-cadherin 蛋白水平降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), E-cadherin 蛋白水平升高差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 3、图 2。

表 2 盐酸羟考酮对 SiHa 迁移侵袭的影响 ($\bar{x} \pm s$)

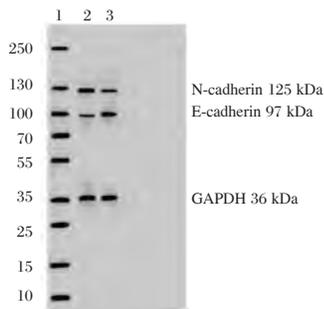
Table 2 Effect of oxycodone hydrochloride on migration and invasion of SiHa ($\bar{x} \pm s$)

分组	<i>n</i>	E-cadherin	N-cadherin	迁移细胞数 (个)	侵袭细胞数 (个)
对照组	3	0.18 \pm 0.01	0.68 \pm 0.04	235.33 \pm 4.19	135.33 \pm 4.19
盐酸羟考酮低剂量组	3	0.19 \pm 0.01	0.66 \pm 0.04	230.67 \pm 4.71	131.67 \pm 3.77
盐酸羟考酮中剂量组	3	0.37 \pm 0.02	0.39 \pm 0.03	194.33 \pm 3.86	98.00 \pm 2.45
盐酸羟考酮高剂量组	3	0.64 \pm 0.04	0.25 \pm 0.02	152.00 \pm 3.27	70.67 \pm 2.05
<i>F</i> 值		252.545	117.778	274.717	266.580
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000	0.000

表3 干扰LINC01857对SiHa增殖迁移侵袭的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effects of interference with LINC01857 on proliferation, migration and invasion of SiHa ($\bar{x} \pm s$)

分组	n	LINC01857	E-cadherin	N-cadherin	OD值	克隆形成数(个)	迁移细胞数(个)	侵袭细胞数(个)
si-NC	3	0.99±0.05	0.17±0.01	0.69±0.04	1.32±0.08	117.00±3.27	236.33±4.03	137.33±4.11
si-LINC01857	3	0.19±0.02	0.73±0.04	0.14±0.01	0.54±0.03	54.33±2.05	127.67±2.49	61.33±2.87
t值		25.731	23.525	23.105	15.812	28.125	39.729	26.260
P值		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000



注: 1. Marker; 2. si-NC; 3. si-LINC01857。

图2 干扰LINC01857对SiHa中E-cadherin、E-cadherin蛋白表达的影响

Figure 2 Effect of LINC01857 on the expression of E-cadherin and E-cadherin in SiHa

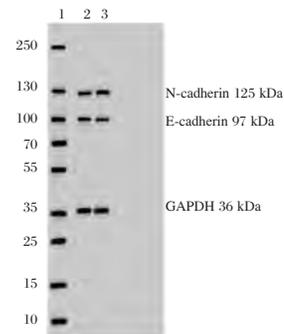
2.4 过表达LINC01857能减轻盐酸羟考酮对SiHa增殖的影响

与盐酸羟考酮高剂量+pcDNA组比较,盐酸羟考酮高剂量+pcDNA-LINC01857组OD值升高,克隆形成数增多,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表4。

2.5 过表达LINC01857能减轻盐酸羟考酮对SiHa迁移、侵袭的影响

与盐酸羟考酮高剂量+pcDNA组比较,盐酸羟考酮高剂量+pcDNA-LINC01857组迁移及侵袭细

胞数增多,E-cadherin蛋白水平降低,N-cadherin蛋白水平升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图3、表5。



注: 1. Marker; 2. 盐酸羟考酮高剂量组 + pcDNA; 3. 盐酸羟考酮高剂量组 + pcDNA-linc01857。

图3 过表达LINC01857能减轻盐酸羟考酮对SiHa中E-cadherin、E-cadherin蛋白表达的影响

Figure 1 Overexpression of LINC01857 can reduce the effect of oxycodone hydrochloride on the expression of E-cadherin and E-cadherin in SiHa

3 讨论

丙泊酚通过激活AMPK及促进内质网应激而抑制宫颈癌细胞增殖及促进细胞凋亡^[8]。利多卡

表4 过表达LINC01857能减轻盐酸羟考酮对SiHa增殖的抑制作用($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Overexpression of LINC01857 can reduce the inhibitory effect of oxycodone hydrochloride on the proliferation of SiHa ($\bar{x} \pm s, n=3$)

分组	LINC01857	OD值	克隆形成数(个)
盐酸羟考酮高剂量+pcDNA	0.34±0.02	0.71±0.03	65.00±2.45
盐酸羟考酮高剂量+pcDNA-LINC01857	0.89±0.05	1.13±0.07	104.67±3.30
t值	17.690	9.552	16.718
P值	0.000	0.000	0.000

表5 过表达LINC01857能减轻盐酸羟考酮对SiHa迁移、侵袭的抑制作用($\bar{x} \pm s$)

Table 5 overexpression of LINC01857 can reduce the inhibition of oxycodone hydrochloride on migration and invasion of SiHa ($\bar{x} \pm s$)

分组	n	E-cadherin	N-cadherin	迁移细胞数(个)	侵袭细胞数(个)
盐酸羟考酮高剂量+pcDNA	3	0.62±0.04	0.25±0.02	151.33±3.86	71.00±2.16
盐酸羟考酮高剂量+pcDNA-LINC01857	3	0.26±0.02	0.53±0.04	221.67±4.19	118.67±3.86
t值		13.943	10.844	21.385	18.667
P值		0.000	0.000	0.000	0.000

因通过调节 LncRNA-MEG3/miR-421/BTG1 途径抑制宫颈癌细胞增殖并诱导细胞凋亡^[9]。麻醉药物可调控宫颈癌等肿瘤细胞增殖、分化等生物学过程,但关于其作用机制尚未阐明^[10]。因而本研究积极探寻麻醉药物对宫颈癌细胞生物学行为的影响及其可能作用机制,为提高宫颈癌治疗效果及改善患者预后提供新方向。

羟考酮是一种阿片类药物,用于治疗癌症患者的疼痛,关于羟考酮对癌细胞的作用知之甚少^[11-13]。本研究结果显示,不同剂量的盐酸羟考酮处理后可降低宫颈癌细胞活力,减少克隆形成数、迁移及侵袭细胞数,并可促进 E-cadherin 的表达及抑制 N-cadherin 的表达,且呈剂量依赖性。研究表明 E-cadherin 与 N-cadherin 属于上皮-间质转化(EMT)的标志物,E-cadherin 表达水平升高可抑制 EMT 转化,而 N-cadherin 表达水平升高可促进 EMT 转化,EMT 转化后可促进肿瘤细胞转移^[14]。提示盐酸羟考酮可抑制宫颈癌细胞增殖、迁移及侵袭,其作用机制可能与调控 EMT 转化有关。

本研究结果显示,不同剂量的盐酸羟考酮处理后可明显降低 LINC01857 的表达水平,且呈剂量依赖性。研究表明 LINC01857 在胰腺癌中表达水平升高,并可能作为诊断胰腺癌的潜在生物标志物^[15]。LINC01857 通过调节 miR-1281/TRIM65 轴促进神经胶质瘤的生长、迁移和侵袭^[16]。LINC01857 通过调节 miR-200b 促进胃癌的发展^[17]。提示盐酸羟考酮可能通过下调 LINC01857 的表达从而发挥作用。本研究结果提示干扰 LINC01857 表达可降低宫颈癌细胞增殖、迁移及侵袭能力。

综上所述,盐酸羟考酮通过下调 LINC01857 的表达从而抑制宫颈癌细胞增殖、迁移及侵袭,LINC01857 可能作为宫颈癌治疗的潜在靶点,还可为进一步揭示盐酸羟考酮抗宫颈癌的分子机制奠定实验基础。

参考文献

[1] 额尔德木图,贾玉玲,秦晓玲,等. 宫颈鳞癌组织中 Survivin 的表达及其与患者临床病理特征的关系[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(4): 478-482.

[2] Li H, Lu Y, Pang Y, et al. Propofol enhances the cisplatin-induced apoptosis on cervical cancer cells via EGFR/JAK2/STAT3 pathway[J]. Biomed Pharmacother, 2017, 86(1): 324-333.

[3] Zhang D, Zhou XH, Zhang J, et al. Propofol promotes cell

apoptosis via inhibiting HOTAIR mediated mTOR pathway in cervical cancer[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015, 468(4): 561-567.

[4] Patel J, Lucas CJ, Margalit M, et al. Laxative Use in Inpatients on Oxycodone/Naloxone Prolonged Release and Oxycodone Prolonged Release for Cancer and Non-cancer Pain[J]. J Pain Palliat Care Pharmacother, 2018, 32(2-3): 116-123.

[5] Ma TT, Zhou LQ, Xia JH, et al. LncRNA PCAT-1 regulates the proliferation, metastasis and invasion of cervical cancer cells[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018, 22(7): 1907-1913.

[6] Xiong Y, Gu Y, Wang F, et al. LINC01857 as an oncogene regulates CREB1 activation by interacting with CREBBP in breast cancer[J]. J Cell Physiol, 2019, 234(8): 14031-14039.

[7] Tian M, Jin L, Li R, et al. Comparison of oxycodone and morphine on the proliferation, apoptosis and expression of related molecules in the A549 human lung adenocarcinoma cell line[J]. Exp Ther Med, 2016, 12(2): 559-566.

[8] Chen X, Li K, Zhao G. Propofol Inhibits HeLa Cells by Impairing Autophagic Flux via AMP - Activated Protein Kinase (AMPK) Activation and Endoplasmic Reticulum Stress Regulated by Calcium[J]. Med Sci Monit, 2018, 24(1): 2339-2349.

[9] Zhu J, Han S. Lidocaine inhibits cervical cancer cell proliferation and induces cell apoptosis by modulating the lncRNA-MEG3/miR-421/BTG1 pathway[J]. Am J Transl Res, 2019, 11(9): 5404-5416.

[10] Liu S, Gu X, Zhu L, et al. Effects of propofol and sevoflurane on perioperative immune response in patients undergoing laparoscopic radical hysterectomy for cervical cancer[J]. Medicine (Baltimore), 2016, 95(49): e5479-e5489.

[11] Yu Y, Li D, Duan J, et al. The pro- and anti-cancer effects of oxycodone are associated with epithelial growth factor receptor level in cancer cells[J]. Biosci Rep, 2020, 40(2): 41-49.

[12] Nakamura A, Hasegawa M, Minami K, et al. Differential activation of the μ -opioid receptor by oxycodone and morphine in pain-related brain regions in a bone cancer pain model[J]. Br J Pharmacol, 2013, 168(2): 375-388.

[13] 高艳丽, 张宝奇. 瑞舒伐他汀对盐酸羟考酮缓释片治疗晚期非小细胞肺癌患者癌痛的增效作用和安全性研究[J]. 中国全科医学, 2016, 19(27): 3265-3269.

[14] Zeng YT, Liu XF, Yang WT, et al. REX1 promotes EMT-induced cell metastasis by activating the JAK2/STAT3-signaling pathway by targeting SOCS1 in cervical cancer[J]. Oncogene, 2019, 38(43): 6940-6957.

[15] Giuliotti M, Righetti A, Principato G, et al. LncRNA co-expression network analysis reveals novel biomarkers for pancreatic cancer[J]. Carcinogenesis, 2018, 39(8): 1016-1025.

[16] Hu G, Liu N, Wang H, et al. LncRNA LINC01857 promotes growth, migration, and invasion of glioma by modulating miR-1281/TRIM65 axis[J]. J Cell Physiol, 2019, 234(12): 22009-22016.

[17] Chen GR, Sun W, Zheng K, et al. LINC01857 promotes the development of gastric cancer by regulating microRNA-200b[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2020, 24(7): 3648-3656.

基于血清NAG、NGAL、LFABP的风险评分模型对老年重度乙肝患者肝肾综合症的预测价值

杨鑫 刘小静* 陈云茹 张曦 许娟

[摘要] 目的 探讨N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶(NAG)、中性粒细胞明胶酶相关脂质转运蛋白(NGAL)及肝型脂肪酸结合蛋白(LFABP)对老年重度乙肝患者肝肾综合症的预测价值。方法 选取2018年8月至2019年12月在本科就诊的重型乙肝患者150名,将其分为肝肾综合症患者44名及重度乙肝患者106名。分别ELISA检测患者血NAG、NGAL、LFABP的水平,采用二分类logistic回归对三者构建回归模型及风险评分。通过受试者工作特征(ROC)曲线及敏感度、特异度、准确度分析诊断效能。结果 肝肾综合症组患者的血肌酐、总胆红素、胱抑素C、NAG、NGAL、LFABP均高于重度肝炎组,肝肾综合症组患者的血白蛋白、凝血酶原活动度均低于重度肝炎组,差异有统计学意义($P < 0.001$);基于三者构建多因素风险评分得到公式:风险评分= $14.35 + 0.56 \times \text{NGAL水平} + 0.50 \times \text{LFABP水平} + 0.46 \times \text{NAG水平}$; NGAL、LFABP、NAG诊断肝肾综合症的AUC值分别为0.703(95%CI: 0.606~0.799)、0.775(95%CI: 0.688~0.861)、0.728(95%CI: 0.643~0.812),而风险评分诊断肝肾综合症的AUC值为0.817(95%CI: 0.747~0.887), P 值均小于0.001; NGAL、LFABP、NAG及风险评分模型诊断肝肾综合症的灵敏度分别为84.1%、81.8%、75.0%、81.8%,特异度分别为47.2%、72.6%、67.0%、74.5%,准确度分别为31.3%、54.4%、42.0%、56.3%。结论 基于血清NAG、NGAL、LFABP的风险评分模型对老年重度乙肝患者肝肾综合症有较好诊断效能。

[关键词] N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶; 中性粒细胞明胶酶相关脂质转运蛋白; 肝型脂肪酸结合蛋白; 老年重度乙肝; 肝肾综合症

Predictive value of risk scoring model based on serum NAG, NGAL and LFABP for hepato-renal syndrome in elderly patients with severe hepatitis B

YANG Xin, LIU Xiaojing*, CHEN Yunru, ZHANG Xi, XU Juan

(Department of Infectious Diseases, the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University; Shanxi Clinical Research Center of Infectious Diseases, Xi'an, Shanxi, China, 710061)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the predictive value of N-acetyl-β-D-glucosaminidase (NAG), Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) and liver-type fatty acid binding protein (LFABP) in hepato-renal syndrome in elderly patients with severe hepatitis B. **Methods** 150 patients with severe hepatitis B in our department from August 2018 to December 2019 were selected and divided into 44 patients with hepatorenal syndrome and 106 patients with severe hepatitis B. The levels of NAG, NGAL and LFABP in patients' blood were detected by ELISA, and the regression model and risk score were constructed by binary logistic regression. Diagnosis efficiency was analyzed by receiver operating characteristic (ROC) curve, sensitivity, specificity, and accuracy. **Results** The serum creatinine, total bilirubin, cystatin C, NAG, NGAL, and LFABP were higher in the hepatorenal syndrome group than in the severe hepatitis group, and the

基金项目:陕西省科技厅自然科学基金基础研究计划(2017JM8083)

作者单位:西安交通大学第一附属医院,陕西省感染性疾病临床研究中心,陕西,西安710061

*通信作者:刘小静, E-mail: xiaojing406@163.com

serum albumin and prothrombin activity in the hepatorenal syndrome group were all lower than the severe hepatitis group, the difference was statistically significant ($P < 0.01$). Based on the three factors to construct a multi-factor risk score to get the formula: risk score = $14.35 + 0.56 \times \text{NGAL level} + 0.50 \times \text{LFABP level} + 0.46 \times \text{NAG level}$; NGAL, The AUC values of LFABP and NAG for the diagnosis of hepatorenal syndrome are 0.703 (95% confidence interval 0.606-0.799), 0.775 (95% confidence interval 0.688-0.861), 0.728 (95% confidence interval 0.643-0.812), and The AUC value for the diagnosis of hepatorenal syndrome by risk score was 0.817 (95% confidence interval 0.747-0.887), and the P values were all < 0.001 ; the sensitivity of NGAL, LFABP, NAG and risk scoring models for the diagnosis of hepatorenal syndrome were 84.1%, 81.8%, 75.0%, and 81.8%, with specificities of 47.2%, 72.6%, 67.0%, and 74.5%, and accuracy of 31.3%, 54.4%, 42.0%, and 56.3%, respectively. **Conclusion** The risk scoring model based on serum NAG, NGAL and LFABP has satisfactory diagnostic efficacy for hepato-renal syndrome in elderly patients with severe hepatitis B.

[KEY WORDS] N-acetyl- β -D-glucosaminidase; Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin; Liver-type fatty acid binding protein; Elderly severe hepatitis B; Hepatorenal syndrome

尽管我国乙肝患病率呈逐年下降趋势,但其整体流行状况仍然不容乐观,2009至2013年我国乙肝发病率仍高达80/10万,死亡率达0.05/10万,其中肝炎引起的并发症是其主要致死原因^[1]。肝肾综合征是重度肝炎发展到肝硬化阶段时出现的以肾功能损伤为主要表现的晚期并发症,在重症肝炎患者中发病率为35~40%,且其病死率高达41.5%^[2-3]。而老年患者的肝肾综合征尤为需要警惕,这主要由于老年人感染乙肝病毒后更易发展为重度肝炎,且老年人由于其肾脏生理功能的下降,在重度肝炎中更易受到损害^[4-5],此外,有研究显示老年人在抗乙肝病毒治疗过程中更易受到药物引起的肾功能损害^[6]。尽管目前已有许多研究报道了肝肾综合征早期诊断标志物的研发进展,但这些指标还有待进一步验证,且对老年人肝肾综合征的预测指标尚未见报道。鉴于此,本研究拟探讨三种新型血清标志物N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶(N-acetyl- β -D glucosaminidase, NAG)、中性粒细胞明胶酶相关脂质转运蛋白(Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin, NGAL)及肝型脂肪酸结合蛋白(liver-type fatty acid binding protein, LFABP)对老年重度乙肝患者肝肾综合征的预测价值。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取2018年8月至2019年12月在本科就诊的重型乙肝患者150名,且根据国际腹水俱乐部制定的诊断指南将其分为肝肾综合征患者44名及重型乙肝患者106名,重型肝炎患者纳入标

准^[7]:①根据我国慢性乙肝防治指南诊断为病毒性肝炎慢性乙型重度;②年龄 > 60 岁;③肝功能child-Pugh分级B以上。排除标准:①其他原因肝炎如胆汁淤积性肝炎或自身免疫性肝炎;②已出现肾功能不全;③使用影响肾功能的药物;④存在其他急慢性感染;⑤合并恶性肿瘤。该研究经医院伦理委员会批准,所有者均签署书面知情同意。

1.2 方法

1.2.1 血清分离及临床资料采集

所有受试者于入院次日清晨空腹采血5 mL,1 500转/min离心20 min分离血清待检。采集患者临床资料包括性别、年龄、血常规、肝肾功能等。

1.2.2 ELISA检测血清标志物

采用人血清NAG ELISA试剂盒(上海康朗生物科技有限公司,批号B275503),人血清NGAL ELISA试剂盒(Bio-Techne公司,批号:F190418,产地中国上海,生产国美国),人血清LFABP ELISA试剂盒(Hycult公司,批号:7629389,产地中国上海,生产国新西兰)及Multiskan™ FC酶标仪(美国赛默飞公司,产地中国上海)检测血清NAG、NGAL及LFABP水平,每个样品重复三次实验取其平均值。

1.3 统计学方法

使用SPSS 18.0及GraphPad Prism6.0软件进行统计学处理,计数资料以 $n(\%)$ 表示,采用 χ^2 检验;计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,两组间用 t 检验,多组间采用方差分析。采用二分类logistic回归对候选诊断标志物构建回归模型及综合评分。采用受试者工作特征(Receiver operating characteristic, ROC)曲线分析诊

断效能。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者临床资料比较

肝肾综合征组患者的血肌酐、总胆红素、胱抑素C、NAG、NGAL、LFABP均高于重度肝炎组,肝肾综合征组患者的血白蛋白、凝血酶原活动度均低于重度肝炎组,差异有统计学意义($P<0.05$),两组患者年龄、性别比例、白细胞计数、血小板计数、球蛋白、丙氨酸转氨酶、天冬氨酸转氨酶比较,差异无统计学意义($P<0.05$)。见表1。

表1 两组患者临床资料比较($\bar{x}\pm s$)

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

资料	重度肝炎组	肝肾综合征组	t/χ^2 值	P值
年龄(岁)	66.3±5.8	65.5±4.3	0.93	0.353
性别(男/女)	74/32	27/18	1.37	0.240
白细胞计数($\times 10^9/L$)	6.7±1.4	6.4±1.2	1.24	0.217
血小板计数($\times 10^9/L$)	87.0±8.4	88.5±7.9	1.01	0.314
血肌酐($\mu\text{mol/L}$)	88.3±5.1	92.5±4.4	4.77	<0.001
白蛋白(g/L)	28.4±2.3	25.9±3.5	4.36	<0.001
球蛋白(g/L)	38.6±2.0	39.2±2.4	1.58	0.116
总胆红素($\mu\text{mol/L}$)	84.6±9.2	97.1±8.8	7.67	<0.001
丙氨酸转氨酶(U/L)	73.6±6.2	75.1±6.7	1.32	0.189
天冬氨酸转氨酶(U/L)	85.4±6.5	87.3±6.1	1.66	0.099
凝血酶原活动度(%)	51.2±5.5	44.3±6.5	6.62	<0.001
胱抑素C(mg/L)	1.12±0.22	1.37±0.65	2.49	0.014
NAG(U/L)	11.5±3.7	18.8±2.9	12.90	<0.001
NGAL($\mu\text{g/L}$)	84.1±9.7	101.4±13.3	7.81	<0.001
LFABP($\mu\text{g/L}$)	5.8±1.7	14.6±3.8	14.76	<0.001

2.2 各因素与肝肾综合征的logistic回归分析

血白蛋白、凝血酶原活动度、胱抑素C、NAG、NGAL和LFABP与肝肾综合征相关,NAG、NGAL和LFABP为肝肾综合征的危险因素($P<0.05$)。见表2。

2.3 风险评分模型诊断肝肾综合征的ROC曲线

基于三者构建多因素风险评分得到公式: 风险评分=14.35+0.56×NGAL水平+0.50×LFABP水平+0.46×NAG水平,NGAL、LFABP、NAG诊断肝肾综合征的AUC值分别为0.703(95%CI: 0.606~0.799)、0.775(95%CI: 0.688~0.861)、0.728(95%CI: 0.643~0.812),而风险评分诊断肝肾综合征的AUC值为0.817(95%CI: 0.747~0.887), $P<0.005$ 。见图1。

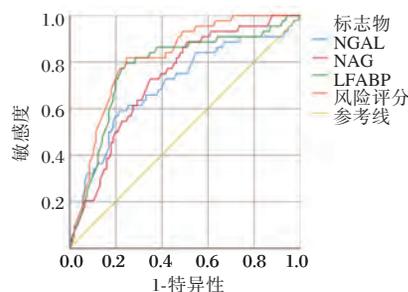


图1 风险评分模型诊断肝肾综合征的ROC曲线

Figure 1 ROC curve of hepatorenal syndrome diagnosed by risk scoring model

2.4 风险评分模型对肝肾综合征的诊断效能

根据ROC曲线确定的NGAL、LFABP、NAG及风险评分模型最佳灵敏度和特异度下载断值分别为93.76 $\mu\text{g/L}$ 、8.19 $\mu\text{g/L}$ 、14.19 U/L和73.24。NGAL、LFABP、NAG及风险评分模型诊断肝肾综合征的灵敏度、准确度。见表3。

表2 各因素与肝肾综合征的logistic回归分析

Table 2 Logistic regression analysis of candidate factors and hepatorenal syndrome

相关因素	单因素 logistic 回归分析			多因素 logistic 回归分析		
	OR 值	95%CI	P 值	OR 值	95%CI	P 值
血肌酐	1.24	0.96~1.45	<0.001	-	-	-
白蛋白	0.74	0.68~0.85	0.012	0.71	0.54~0.83	0.058
总胆红素	1.38	1.14~1.52	0.123	-	-	-
凝血酶原活动度	0.66	0.43~0.73	0.020	0.65	0.41~0.75	0.077
胱抑素C	1.15	1.08~1.32	0.011	1.40	1.16~1.44	0.051
NAG	1.28	1.15~1.88	<0.001	1.59	1.35~1.96	<0.001
NGAL	1.44	1.32~1.85	0.014	1.75	1.42~2.13	<0.001
LFABP	1.32	1.23~1.66	<0.001	1.65	1.28~1.82	<0.001

表3 风险评分模型对肝肾综合症的诊断效能

Table 3 The diagnostic efficacy of risk scoring model for hepatorenal syndrome

标志物	重度肝炎患者		肝肾综合征患者		灵敏度 (%)	特异度 (%)	准确度 (%)
	阳性	阴性	阳性	阴性			
NAG	35	71	33	11	75.0	67.0	42.0
LFABP	29	77	36	8	81.8	72.6	54.4
NGAL	56	50	37	7	84.1	47.2	31.3
风险评分	27	79	36	8	81.8	74.5	56.3

注:准确度=灵敏度+特异度-1。

3 讨论

重症肝炎患者体内血管舒张因子灭活减少,周围及内脏动脉扩张而肾血管收缩,肾血流量下降造成肾小球滤过率降低是引起肝肾综合征的主要原因。而与此同时,外周循环阻力下降引起有效循环血量减少也是造成肾血流量下降的原因之一。此外,肝病造成的贫血也会加重肾脏微循环缺血缺氧^[8]。老年人有效循环血量降低,加之心脏泵血能力下降,肾血流量进一步减少,使得其更易发生肝肾综合征^[9]。而当前针对肝肾综合征的发病机制已寻找到多种可能的预测指标,包括胱抑素C、 β 2-微球蛋白、高敏C反应蛋白及肾脏损伤因子等^[10-11]。

在本研究结果提示患者肝炎严重程度的指标,分别代表了患者肝细胞合成功能及凝血因子灭活功能^[12],而血肌酐是提示患者肾功能敏感而特异的指标,尤其值得注意的是本研究纳入的三个新型诊断指标NAG、NGAL、LFABP,NAG是种人体肾小管上皮细胞特有的一种酸性水解酶,当肾小管上皮细胞受到损害时,细胞内溶酶体膜破裂,大量NAG释放入血^[13]。而NGAL及LFABP是分别由远曲肾小管和近端肾小管分泌的微量蛋白,在肾脏损伤时血清NGAL及LFABP显著升高,因此可用于评估肾功能损伤程度^[14-15]。本研究首次通过构建风险评分来诊断肝肾综合征,结果发现NAG、NGAL、LFABP三者对于肝肾综合征的诊断均有一定价值,而风险评分诊断肝肾综合征的AUC值高于三个独立指标,可见我们的构建的模型相比三个独立指标而言明显有更高的诊断效能,进一步的诊断试验结果显示,三者对于肝肾综合征诊断的灵敏度均较在70%以上,但特异度欠佳,尤其是NGAL仅有不足50%的特异度,而本研究构建的风险评分模型在最大限度保证敏感度的基础上较好地提高了诊断的特异度,大大提升了三个新型标志物的临床应用价值。

本研究的不足之处主要在于样本量仍显不足,后续需要进一步扩充样本量得到更为确凿的结论。其次,本研究为单中心研究,存在选择偏移,将来有待多中心合作验证本研究结论。再次,本研究由于样本量较小,未进一步设置验证集,有待扩充样本量后对该模型进行验证。

综上,基于血清NAG、NGAL、LFABP的风险评分模型对老年重度乙肝患者肝肾综合征有较好诊断效能,有一定临床应用前景。

参考文献

- [1] 王祖煜,刘熠赫,张芮,等. 2004-2013年中国乙型肝炎病毒性肝炎的流行病学特征研究[J]. 中国全科医学, 2017, 20(23):2879-2883.
- [2] 张军昌,牟劲松,林芳,等. 肝肾综合征诊断及治疗研究进展[J]. 肝脏, 2020, 25(1):86-88.
- [3] Bashir MH, Iqbal S, Miller R, et al. Management and outcomes of hepatorenal syndrome at an urban academic medical center: a retrospective study [J]. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2019, 31(12):1545-1549.
- [4] 李贲,程丹颖,纪世博,等. 慢性乙型肝炎抗病毒治疗10年预后及其影响因素[J]. 胃肠病学和肝病杂志, 2020, 29(4):438-441.
- [5] Bonavia A, Singbartl K. Kidney Injury and Electrolyte Abnormalities in Liver Failure [J]. Semin Respir Crit Care Med, 2018, 39(5):556-565.
- [6] 李桂霞,陈富明,彭武建,等. 抗乙肝病毒药物对慢性乙型肝炎患者肾功能的影响及其危险因素分析[J]. 解放军预防医学杂志, 2019, 37(8):14-16.
- [7] Angeli P, Ginès P, Wong F, et al. Diagnosis and management of acute kidney injury in patients with cirrhosis: revised consensus recommendations of the International Club of Ascites[J]. Gut, 2015, 62(4):968-974.
- [8] 熊号峰,刘景院. 肝肾综合征研究进展[J]. 中国肝脏病杂志(电子版), 2017, 9(1):1-6.
- [9] Rice JB, White AG, Galebach P, et al. The burden of hepatorenal syndrome among commercially insured and Medicare patients in the United States [J]. Curr Med Res Opin, 2017, 33(8):1473-1480.

(下转第1410页)

miRNA-320a、*hTcf-4*、 β -catenin 在肝癌组织的表达及临床意义

祁蕙燕^{1*} 郭剑² 程燕莉³

[摘要] **目的** 探讨肝癌组织微小RNA(miRNA-320a)、人T细胞因子4基因(*hTcf-4*)、 β 联蛋白(β -catenin)表达及与患者病理特征、预后的关系。**方法** 选取2017年6月至2019年8月本院收治的122例肝癌患者进行回顾性研究,比较miRNA-320a、*hTcf-4* mRNA、 β -catenin在肝癌组织与癌旁组织中表达,并比较各指标阳性与阴性表达患者病理特征,对数据进行统计学分析。**结果** miRNA-320a表达水平与分化程度呈正相关($r=6.894, P<0.05$),与肿瘤T分期、肿瘤大小、淋巴结转移呈负相关($r=-5.771, -6.351, -7.086, P<0.05$);*hTcf-4* mRNA($r=-0.608, P<0.05$)、 β -catenin表达水平($r=-0.626, P<0.05$)与分化程度呈负相关,与肿瘤T分期($r=0.617, 0.449, P<0.05$)、肿瘤大小($r=0.544, 0.351, P<0.05$)、淋巴结转移呈正相关($r=0.589, 0.539, P<0.05$)。**结论** 肝癌组织miRNA-320a呈低表达,*hTcf-4*、 β -catenin呈高表达,均与分化程度、肿瘤T分期、肿瘤大小、淋巴结转移有关,并能预测患者预后。

[关键词] 肝癌组织; miRNA-320a; *hTcf-4*; β 联蛋白; 病理特征

Expression and clinical significance of miRNA-320a, *hTcf-4* and β -catenin in hepatocellular carcinoma

QI Huiyan^{1*}, Guo Jian², Cheng Yan Li³

(1. Clinical Laboratory, Xining First People's Hospital, Xining, Qinghai 810000; 2. Clinical Laboratory, Third People's Hospital, Xining, Qinghai, 810007; 3. Qinglin Hospital of Datong County, Xining, Qinghai, 810100)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the expression of microRNA (miRNA - 320a), human T cytokine 4 gene (*hTcf-4*), and β -catenin in liver cancer tissues and their relationship with pathological characteristics and prognosis of patients. **Methods** A retrospective study was conducted on 122 patients with liver cancer treated in our hospital from June 2017 to August 2019, comparing the expression of miRNA-320a, *hTcf-4* mRNA, β -catenin in liver cancer tissues and adjacent tissues, and comparing the pathological characteristics of patients with positive and negative expression of each indicator. Spearman was used to analyze the correlation between each indicator and clinical characteristics, and the receiver operating characteristic (ROC) curve and the area under the ROC (AUC) were used to analyze the value of each indicator to predict prognosis, and Kaplan-Meier curve (K-M) survival curve was used to analyze the survival curves of high-risk and low-risk patients. **Results** The expression level of miRNA-320a in liver cancer tissues was lower than that in adjacent tissues, the expression level of *hTcf-4* mRNA and the positive rate of β -catenin in liver cancer tissues were higher than those in adjacent tissues ($P<0.05$); the expression level of miRNA-320a was positively

基金项目:青海省应用基础研究计划项目(2018-ZJ-216)

作者单位:1. 青海省西宁市第一人民医院检验科,青海,西宁 810000

2. 青海省第三人民医院检验科,青海,西宁 810007

3. 青海省大通县青林卫生院,青海,西宁 810100

*通信作者:祁蕙燕, E-mail:hy67825@163.com

correlated with the degree of differentiation, and negatively correlated with tumor T stage, tumor size, and lymph node metastasis ($P<0.05$). The expression level of *hTcf-4* mRNA and β -catenin were negatively correlated with the degree of differentiation, and positively correlated with tumor T stage, tumor size and lymph node metastasis ($P<0.05$). The expression level of miRNA-320a in the survivors was higher than that in the dead, and the expression level of *hTcf-4* mRNA and β -catenin was lower than that in the dead ($P<0.05$); there were significant differences in the survival curves of miRNA-320a, *hTcf-4* mRNA, β -catenin expression level between high-risk and low-risk patients ($P<0.05$). There was a negative correlation between the expression level of miRNA-320 and *hTcf-4* mRNA and β -catenin ($P<0.05$). **Conclusion** The expression of miRNA-320a in liver cancer tissue is low, and the expression of *hTcf-4* and β -catenin are high, which are related to the degree of differentiation, tumor T stage, tumor size, and lymph node metastasis, and can predict patient prognosis.

[KEY WORDS] Liver cancer tissue; miRNA-320a; *hTcf-4*; β -catenin; Pathological characteristics

既往资料显示,肝癌患者分化程度、肿瘤T分期等临床病理资料与患者的预后密切相关,但影响患者病理特征、预后的机制尚未完全阐明^[1]。微小RNA(MicroRNA, miRNA-320a)位于染色体8q21.3,与前列腺癌发生与复发息息相关,提示miRNA-320a可能与恶性肿瘤有关,但在肝癌领域的研究较少^[2]。 β 联蛋白(β -catenin)、人T细胞因子4基因(Human T cell factor 4 gene, *hTcf-4*)是Wnt/ β -catenin信号通路重要因子,其中 β -catenin与前列腺癌放疗抵抗相关,*hTcf-4*在胶质瘤的侵袭和转移中扮演重要角色^[3-4]。鉴于此本研究探讨肝癌组织miRNA-320a、*hTcf-4*、 β -catenin表达及与患者病理特征、预后的关系,报告如下。

1 资料和方法

1.1 一般资料

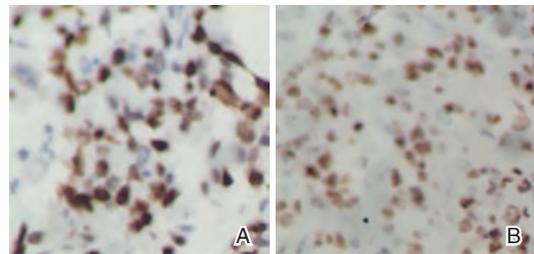
选取2017年6月至2019年8月本院收治的122例肝癌患者进行回顾性研究,其中女65例,男57例,年龄41~75岁,平均(55.97 \pm 7.36)岁。纳入标准:①符合原发性肝癌诊断标准^[5];②临床资料完整;③首次明确诊断;④无其他系统原发性恶性肿瘤;⑤入组前无放疗化疗等相关治疗史。排除标准:①肝癌复发患者;②以往有恶性肿瘤史者。本研究获本院伦理委员会审核通过,患者均知晓本研究,自愿签署知情同意书。

1.2 方法

采用逆转录-聚合酶链反应(Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)检测肝癌组织与癌旁组织miRNA-320a、*hTcf-4* mRNA表达,以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 进行分析;采用免疫组化二步法检测

β -catenin表达,根据胞质染色强度和阳性细胞数进行评分。

结果判读^[6]:阳性细胞数11%~50%为1分,51%~80%为2分,>80%为3分,染色强度弱染色为1分,中等染色为2分,强染色为3分, β -catenin表达为染色强度与阳性细胞数之积,>3分为阳性。分值越高表达量越高。见图1。



注:A为肝癌组织;B为癌旁组织。

图1 β -catenin免疫组化图(生物素-抗生物素染色法, $\times 200$)

Figure 1 β -catenin immunohistochemistry (Biotin-Avidin staining method, $\times 200$)

1.3 观察指标

①比较miRNA-320a、*hTcf-4* mRNA、 β -catenin在肝癌组织与癌旁组织中表达。②比较miRNA-320a低表达与高表达、*hTcf-4*阳性与阴性、 β -catenin阳性与阴性患者临床资料、病理特征。③分析各指标与临床特征的相关性。④比较不同预后患者各指标表达。⑤分析各指标预测预后的价值。⑥比较各指标高危与低危患者的生存曲线。⑦分析各指标间的相关性。

1.4 统计学方法

采用SPSS 22.0软件进行数据分析,计量资料以($\bar{x}\pm s$)表示,两两比较采用 t 检验;计数资料用 n

(%)表示,行 χ^2 检验;采用Spearman分析各指标与临床特征的相关性;采用受试者工作特征曲线(Receiver operating characteristic, ROC)曲线及ROC下面积(Area under the curve, AUC)分析各指标预测预后的价值;采用卡普兰-迈耶曲线(Kaplan-Meier, K-M)生存曲线分析;Log Rank (Mantel-Cox)检验各指标高危者、低危者生存曲线;采用Pearson分析miRNA-320 mRNA与hTcf-4 mRNA、 β -catenin的相关性。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miRNA-320a、hTcf-4 mRNA、 β -catenin在肝癌组织中表达

肝癌组织miRNA-320a表达水平低于癌旁组织,hTcf-4 mRNA表达水平高于癌旁组织, β -catenin阳性率高于癌旁组织,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表1。

表1 miRNA-320a、hTcf-4 mRNA、 β -catenin在肝癌组织中表达 [$n(\%)$, ($\bar{x} \pm s$)]

Table 1 miRNA-320a, hTcf-4 mRNA, β -catenin expression in liver cancer tissues [$n(\%)$, ($\bar{x} \pm s$)]

组织类型	<i>n</i>	miRNA-320a	hTcf-4 mRNA	β -catenin 阳性率
肝癌组织	122	4.62±0.89	0.78±0.16	96(78.69)
癌旁组织	122	6.48±1.17	0.37±0.10	28(22.95)
<i>t</i> / χ^2 值		13.975	24.002	75.824
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001

2.2 miRNA-320a、hTcf-4 mRNA、 β -catenin不同表达患者临床资料比较

肝组织miRNA-320a、hTcf-4 mRNA高表达者与低表达者、 β -catenin阳性与阴性患者在分化程度、肿瘤T分期、肿瘤大小、淋巴结转移比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表2。

2.3 miRNA-320a、hTcf-4 mRNA、 β -catenin与临床特征的相关性

miRNA-320a与分化程度呈正相关,与肿瘤T

表2 miRNA-320a、hTcf-4 mRNA、 β -catenin不同表达患者临床资料比较 [$n(\%)$]

Table 2 Comparison of clinical data of patients with different expressions of miRNA-320a, hTcf-4 mRNA, and β -catenin [$n(\%)$]

资料	miRNA-320a				hTcf-4 mRNA				β -catenin			
	高表达	低表达	χ^2 值	<i>P</i> 值	高表达	低表达	χ^2 值	<i>P</i> 值	阳性	阴性	χ^2 值	<i>P</i> 值
年龄												
<60岁	16(51.61)	49(53.85)	0.046	0.830	47(54.02)	18(51.43)	0.068	0.795	50(52.08)	15(57.69)	0.259	0.611
≥60岁	15(48.39)	42(46.15)			40(45.98)	17(48.57)			46(47.92)	11(42.31)		
性别												
男	13(41.94)	44(48.35)	0.382	0.536	44(50.57)	13(37.14)	1.809	0.179	44(45.83)	13(50.00)	0.143	0.706
女	18(58.06)	47(51.65)			43(49.43)	22(62.86)			52(54.17)	13(50.00)		
肝硬化												
无	14(45.16)	43(47.25)	0.041	0.840	39(44.83)	18(51.43)	0.437	0.509	46(47.92)	11(42.31)	0.259	0.611
有	17(54.84)	48(52.75)			48(55.17)	17(48.57)			50(52.08)	15(57.69)		
肝功分级												
A	6(19.35)	14(15.38)	0.309	0.857	17(19.54)	3(8.57)	5.067	0.079	14(14.58)	6(23.08)	1.108	0.575
B	15(48.39)	48(52.75)			47(54.02)	16(45.71)			51(53.13)	12(46.15)		
C	10(32.26)	29(31.87)			23(26.44)	16(45.71)			31(32.29)	8(30.77)		
分化程度												
低	6(19.35)	37(40.66)	27.925	<0.001	33(37.93)	10(28.57)	6.343	0.042	36(37.50)	7(26.92)	9.114	0.011
中	11(35.48)	49(53.85)			45(51.72)	15(42.86)			50(52.08)	10(38.46)		
高	14(45.16)	5(5.49)			9(10.34)	10(28.57)			10(10.42)	9(34.62)		
肿瘤T分期												
I	11(35.48)	10(10.99)	16.634	0.001	5(5.75)	16(45.71)	38.155	<0.001	4(4.17)	17(65.38)	54.738	<0.001
II	10(32.26)	16(17.58)			15(17.24)	11(31.43)			22(22.92)	4(15.38)		
III	8(25.81)	43(47.25)			44(50.57)	7(20.00)			48(50.00)	3(11.54)		
IV	2(6.45)	22(24.18)			23(26.44)	1(2.86)			22(22.92)	2(7.69)		
肿瘤大小												
<5 cm	17(54.84)	22(24.18)	9.997	0.002	16(18.39)	23(65.71)	25.702	<0.001	18(18.75)	21(80.77)	36.184	<0.001
≥5 cm	14(45.16)	69(75.82)			71(81.61)	12(34.29)			78(81.25)	5(19.23)		
淋巴结转移												
无	8(25.81)	51(56.04)	8.467	0.004	28(32.18)	31(88.57)	31.778	<0.001	39(40.63)	20(76.92)	10.794	0.001
有	23(74.19)	40(43.96)			59(67.82)	4(11.43)			57(59.38)	6(23.08)		

分期、肿瘤大小、淋巴结转移呈负相关($P<0.05$)；*hTcf-4* mRNA、 β -catenin 与分化程度呈负相关，与肿瘤 T 分期、肿瘤大小、淋巴结转移呈正相关($P<0.05$)。见表 3。

表 3 miRNA-320a、*hTcf-4* mRNA、 β -catenin 与临床特征的相关性

Table 3 Correlation between miRNA-320a, *hTcf-4* mRNA, β -catenin and clinical characteristics

临床病理特征	miRNA-320a		<i>hTcf-4</i> mRNA		β -catenin	
	r 值	P 值	r 值	P 值	r 值	P 值
分化程度	6.894	<0.001	-0.608	0.006	-0.626	<0.001
肿瘤 T 分期	-5.771	<0.001	0.617	<0.001	0.449	<0.001
肿瘤大小	-6.351	<0.001	0.544	<0.001	0.351	0.017
淋巴结转移	-7.086	<0.001	0.589	<0.001	0.539	<0.001

2.4 不同预后患者 miRNA-320a、*hTcf-4* mRNA、 β -catenin 表达比较

生存者 miRNA-320a 表达水平高于病死者，*hTcf-4* mRNA、 β -catenin 表达水平低于病死者，差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 4。

表 4 不同预后患者 miRNA-320a、*hTcf-4* mRNA、 β -catenin 表达比较 ($\bar{x}\pm s$)

Table 4 Comparison of miRNA-320a, *hTcf-4* mRNA, β -catenin expression in patients with different prognosis ($\bar{x}\pm s$)

预后	n	miRNA-320a	<i>hTcf-4</i> mRNA	β -catenin(分)
生存	87	4.95±1.02	0.63±0.13	1.87±0.58
病死	35	3.81±0.56	1.15±0.22	2.93±0.90
t 值		6.235	16.166	7.720
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

2.5 ROC 分析各指标预测预后的价值

miRNA-320a 预测预后的 AUC 为 0.799(95%CI: 0.717~0.866)，截断值 ≤ 4.5 ，敏感度为 82.86%，特异度为 63.22%；*hTcf-4* mRNA 预测预后的 AUC 为 0.761(95%CI: 0.676~0.834)，截断值 >0.98 ，敏感度为 54.29%，特异度为 93.10%； β -catenin 预测预后的 AUC 为 0.730(95%CI: 0.642~0.806)，截断值 >2 分，敏感度为 65.71%，特异度为 73.56% ($P<0.05$)。见图 2。

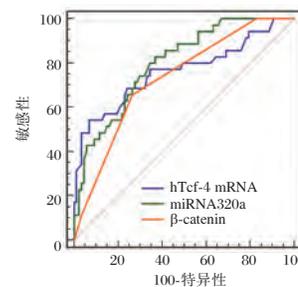
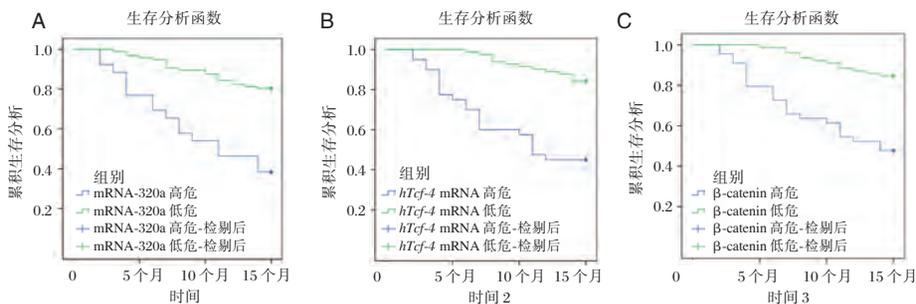


图 2 各指标预测预后的价值

Figure 2 Prognostic value of each indicator

2.6 各指标的生存曲线

以 ROC 分析截断值为分界，分为 miRNA-320a、*hTcf-4* mRNA、 β -catenin 高危与低危患者，采用 K-M 曲线分析发现，miRNA-320a($\chi^2=22.400$)、*hTcf-4*($\chi^2=26.292$)、 β -catenin($\chi^2=22.267$) 高危与低危患者的生存曲线比较，差异有统计学意义($P<0.05$)。见图 3。



注：图 a 为 miRNA-320a 的 K-M 曲线；图 b 为 *hTcf-4* 的 K-M 曲线；图 c 为 β -catenin 的 K-M 曲线。

图 3 K-M 曲线

Figure 3 K-M curve

2.7 miRNA-320a 与 *hTcf-4* mRNA、 β -catenin 的相关性

miRNA-320a 与 *hTcf-4* mRNA 呈负相关($r=-0.524$, $P<0.05$)，与 β -catenin 呈负相关($r=-0.509$, $P<0.05$)。

3 讨论

miRNA-320a 是 miRNA-320 家族成员之一，过表达的 miRNA-320a 可抑制胃癌细胞的增殖、侵袭与迁移^[7]。本研究显示，肝癌组织 miRNA-320a

表5 miRNA-320a与*hTcf-4* mRNA、 β -catenin的相关性
Table 5 Correlation between miRNA-320a and *hTcf-4* mRNA and β -catenin

项目	hTcf-4 mRNA		β -catenin	
	r值	P值	r值	P值
miRNA-320a	-0.524	<0.05	-0.509	<0.05

mRNA高表达率低于癌旁组织,与分化程度呈正相关,与肿瘤T分期、肿瘤大小、淋巴结转移呈负相关,且生存者miRNA-320a mRNA高于病死者,提示miRNA-320a可影响肝癌分化程度、T分期、肿瘤大小、淋巴结转移、预后,可能扮演抑癌基因角色,故上调miRNA-320a表达可能有助于改善肝癌病理特征与患者预后,这为临床防治肝癌提供了一个新思路。Xiong W等^[8]指出,神经胶质瘤患者miRNA-320a的水平显著降低,且miRNA-320a表达的升高与预后较好相关。余俊等^[9]报道显示,miRNA-320a在上皮性卵巢癌组织中呈低表达,并与肿瘤分期、分化程度、淋巴结转移有关。本研究观点与之相似。miRNA-320a能通过靶向 β -catenin信号通路,上调促凋亡基因表达,抑制肝癌细胞的增殖,从而影响肝癌患者病理特征与预后^[10]。同时miRNA-320a具有较高的预后评估价值。

Wnt/ β -catenin信号通路成员包括细胞外因子Wnt、 β -catenin、转录因子T细胞因子等,*hTcf-4*属于转录因子T细胞因子家族^[11-12]。本研究显示,*hTcf-4* mRNA与分化程度呈负相关,与肿瘤T分期、肿瘤大小、淋巴结转移呈正相关,提示肝癌组织*hTcf-4*与患者病理特征和预后相关,从基因水平沉默*hTcf-4*的表达可能有助于抑制肝癌细胞的恶性行为。研究发现,*hTcf-4*与恶性肿瘤包膜完整性、是否转移有关,上调其表达,会促使骨肉瘤细胞的增殖和侵袭,提示*hTcf-4*是一种促癌基因^[13-14]。*hTcf-4*能通过基质金属蛋白酶作用于细胞外基质,为癌细胞转移提供便利,并能激活靶基因c-myc,发挥诱癌作用^[15]。

β -catenin是Wnt/ β -catenin信号通路重要组成部分,可介导细胞间黏附与肿瘤细胞的增殖,并能调控肿瘤增殖、侵袭途径相关基因的表达,抑制 β -catenin能抑制结肠癌细胞侵袭转移,提示 β -catenin是一种促癌基因^[16]。本研究显示,肝癌组织 β -catenin阳性率高于癌旁组织,与分化程度呈负相关,与肿瘤T分期、肿瘤大小、淋巴结转移呈正相关,在生存者中表达低于病死者,可影响患

者预后。范奕红等^[17]指出,肝癌组织中 β -catenin表达与临床分期、肿瘤分化程度、肝外转移相关,支持本研究结论,但其指出 β -catenin表达与肿瘤直径无关,与本研究观点不同,可能与纳入病例数、病例的病情不同有关,有待后续进一步验证。同时本研究还发现,miRNA-320a与*hTcf-4* mRNA、 β -catenin呈负相关,提示各指标间可相关影响,但其详细作用途径尚不清晰。受限于实际情况,本实验样本量较少,有待后续扩大病例数进行深入的探讨。

综上所述,肝癌组织miRNA-320a呈低表达,*hTcf-4*、 β -catenin呈高表达,均与分化程度、肿瘤T分期、肿瘤大小、淋巴结转移有关,并能预测患者预后。

参考文献

- [1] 王凯,高帅.原发性肝癌的分子诊断标记物研究进展[J].分子诊断与治疗杂志,2020,12(1):1-5+38.
- [2] Lieb V, Weigelt K, Scheinost L, et al. Serum levels of miR-320 family members are associated with clinical parameters and diagnosis in prostate cancer patients[J]. *Oncotarget*, 2017, 9(12):10402-10416.
- [3] Sun J, Li B, Jia Z, et al. RUNX3 inhibits glioma survival and invasion via suppression of the β -catenin/TCF-4 signaling pathway[J]. *J Neurooncol*, 2018, 140(1):15-26.
- [4] 罗勇,李明川,赵佳晖,等. HIF-1 α / β -catenin信号通路参与介导人前列腺癌放疗抵抗现象的实验观察[J]. *中华医学杂志*, 2018, 98(32):2552-2558.
- [5] 中华人民共和国卫生和计划生育委员会医政医管局.原发性肝癌诊疗规范(2017年版)[J]. *中华消化外科杂志*, 2017, 16(7):705-720.
- [6] 余文婷,李代龙. HGF和MMP-9在妊娠期高血压患者中的临床意义[J]. *中国性科学*, 2018, 27(12):74-77.
- [7] Li YS, Zou Y, Dai DQ. MicroRNA-320a suppresses tumor progression by targeting PBX3 in gastric cancer and is down-regulated by DNA methylation [J]. *World J Gastrointest Oncol*, 2019, 11(10):842-856.
- [8] Xiong W, Ran J, Jiang R, et al. miRNA-320a inhibits glioma cell invasion and migration by directly targeting aquaporin 4 [J]. *Oncol Rep*, 2018, 39(4):1939-1947.
- [9] 余俊,李晓兰,张青冬. 上皮性卵巢癌组织 miR-320a 表达对 SKOV3 细胞增殖和侵袭性影响[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2019, 26(14):1026-1030+1035.
- [10] Wu F, Li J, Guo N, et al. MiRNA-27a promotes the proliferation and invasion of human gastric cancer MGC803 cells by targeting SFRP1 via Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. *Am J Cancer Res*, 2017, 7(3):405-416.
- [11] Su H, Qiao Y, Xi Z, et al. The Impact of High-mobility Group Box Mutation of T-cell Factor 4 on Its Genomic Binding Pattern in Non-small Cell Lung Cancer [J]. *Transl Oncol*, 2020, 13(1):79-85.

胱抑素 C 和肾积液 CT 值在尿路结石梗阻性肾积脓患者中的临床意义

郭亮^{1*} 徐鹏程¹ 胡恒龙²

[摘要] **目的** 探究胱抑素 C(Cys C)和肾积液 CT 值在尿路结石梗阻性肾积脓患者中的临床意义。**方法** 选取本院尿路结石梗阻性肾积液患者 138 例,其中肾积脓患者 87 例作为研究组,肾积水患者 51 例作为对照组。统计比较两组一般资料,检测对比两组肾功能指标[血液尿素氮(BUN)、肌酐(Cr)]、血清 Cys C 水平、肾积液 CT 值,分析血清 Cys C 水平与肾积液 CT 值相关性及两者与肾功能指标的关系,探究血清 Cys C、肾积液 CT 值对尿路结石梗阻性肾积脓与肾积水的鉴别诊断价值。**结果** 研究组血清 BUN、Cr 水平高于对照组($P<0.05$);研究组血清 Cys C 水平、肾积液 CT 值高于对照组($P<0.05$);血清 Cys C 水平与肾积液 CT 值呈正相关($P<0.05$);血清 Cys C 水平、肾积液 CT 值与血清 BUN、Cr 水平呈正相关($P<0.05$);血清 Cys C 水平、肾积液 CT 值联合鉴别诊断尿路结石梗阻性肾积脓与肾积水的曲线下面积(AUC)为 0.841,大于二者单一诊断鉴别,联合诊断最佳诊断敏感度为 68.63%,特异度为 86.21%。**结论** 尿路结石梗阻性肾积脓患者的血清 Cys C 表达水平及肾积液 CT 值异常升高,且与患者肾功能呈正相关关系,可辅助临床鉴别诊断尿路结石梗阻性肾积脓与肾积水,指导临床评估患者肾功能、制定针对性治疗方案。

[关键词] 尿路结石梗阻性肾积脓;胱抑素 C;肾积液 CT 值

The clinical significance of cystatin C and CT value of renal effusion in patients with obstructive empyema of urinary tract stones

GUO Liang^{1*}, XU Pengcheng¹, HU Henglong²

(1. Department of Urology, Lu'an Hospital, Anhui Medical University, Liuan, Anhui, China, 237000;
2. Department of Urology, Tongji Hospital, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei, China, 430000)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the clinical significance of Cystatin C (Cys C) and CT value of renal effusion in patients with obstructive empyema of urinary tract stones. **Methods** A total of 138 patients with obstructive hydronephrosis of urinary tract stones in our hospital were selected, including 87 patients with renal empyema as the study group and 51 patients with hydronephrosis as the control group. The general data of the two groups were statistically compared. The renal function indexes [blood urea nitrogen (BUN), creatinine (CR)], serum Cys C and CT value of renal effusion of the two groups were detected and compared. The correlation between serum Cys C and CT value of renal effusion and the relationship between the two and renal function indexes was analyzed, and the diagnostic value was analyzed, and the diagnostic value of serum Cys C and CT value of hydronephrosis on urinary tract stone obstructive empyema and hydronephrosis was explored. **Results** The serum BUN and Cr levels of the research group were higher than those of the control

基金项目:国家自然科学基金会(81800626)

作者单位:1. 安徽医科大学附属六安医院泌尿外科,安徽,六安 237000

2. 华中科技大学附属同济医院泌尿外科,湖北,武汉 430000

*通信作者:郭亮, E-mail:GL18756415019@126.com

group ($P<0.05$); the CT values of the serum Cys C and renal effusion in the research group were higher than those in the control group ($P<0.05$). Serum Cys C was positively correlated with CT value of renal effusion ($P<0.05$); serum Cys C and CT value of renal effusion were positively correlated with serum BUN and Cr levels ($P<0.05$). The area under the curve (AUC) of the combined diagnosis of serum Cys C and CT value of renal effusion combined with the differential diagnosis of urinary tract stone obstructive empyema and hydronephrosis was 0.841, which was greater than the single diagnosis of the two, the best diagnostic sensitivity of combined diagnosis was 68.63% and specificity was 86.21%. **Conclusion** Serum Cys C level and CT value of hydronephrosis in patients with urinary tract stone obstructive empyema are abnormally increased, and are positively correlated with the patient's renal function, which can assist in the clinical differential diagnosis of urinary tract stone obstructive empyema and hydronephrosis, guide clinical evaluation of patients' renal function, and develop targeted treatment plans.

[KEY WORDS] Urinary tract stone obstructive empyema; Cystatin C; Renal effusion CT value

尿路结石梗阻为泌尿系统常见疾病,患者易合并肾积水,当发生感染时可进展至肾积脓^[1-2]。肾积脓是一种较为严重的化脓性感染疾病,病理表现为肾实质广泛性损坏,肾脏内充斥大量脓液,严重者可致患侧肾功能丧失,部分患者细菌经血行播散可致全身感染,严重影响患者身体健康,甚至危及生命^[3]。因此,早识别和诊断尿路结石梗阻性肾积脓,对抑制肾脏损伤加重、改善患者预后至关重要。近年来研究指出,胱抑素C(Cystatin C, Cys C)在反映肾功能方面具有重要应用价值^[4]。此外,国外相关研究认为,脓液中含有大量细胞碎片、微生物、感染性物质等,使得脓液密度较正常尿液升高,导致肾积脓CT值较高^[5]。国内也有学者认为通过肾积脓CT值能评估肾损伤情况^[6]。为此,本研究初次尝试联合检测Cys C、肾积脓CT值,探讨两者在尿路结石梗阻性肾积脓患者中的临床意义,旨在为临床提供数据支持。报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取本院2017年4月至2019年9月尿路结石梗阻性肾积脓患者138例,年龄20~79岁,平均(47.41±19.59)岁;男90例,女48例;体质量指数(Body mass index, BMI)(19.2~26.1)kg/m²,平均(23.06±1.51)kg/m²;结石部位:输尿管中上段108例,输尿管下段30例;合并症:高血压29例,糖尿病24例。根据肾穿刺造瘘、或经皮肾镜取石术中引流肾盂尿液是否为脓液,确诊肾积水和肾积脓^[7]。其中肾积水患者51例作为对照组,肾积脓患者87例作为研究组。

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,同侧伴有梗阻性肾积液;②年龄≤70岁;③无泌尿生殖系统手术史;④无血液系统疾病;⑤认知功能良好,能正常沟通交流;⑥患者知晓本研究,已签署同意书。排除标准:①严重心脑血管疾病患者;②近期接受药物排石、体外冲击波碎石等治疗者;③肝肾功能严重障碍者;④不能配合完成相关检查者;⑤传染性疾病患者;⑥肾脏缺失者;⑦恶性肿瘤患者;⑧合并前列腺炎、肾小球炎等其他泌尿系统疾病者。

1.2 方法

实验室指标检测:入组12h内,采集所有研究对象空腹静脉血5mL,取其中2mL静脉血标本,采用全自动生化分析仪(沈阳万泰医疗设备有限责任公司,型号:OTA-400)检测血液尿素氮(Blood urea nitrogen, BUN)、肌酐(Creatinine, Cr)水平,剩余静脉血标本以3 500 r/min转速离心处理5 min,取血清置于-70℃冷藏室内待检,采用酶标仪(深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司,型号:MR-96T),以双抗体夹心酶联免疫吸附试验检测血清Cys C水平,试剂盒购自武汉海吉力生物科技有限公司。

肾积脓CT值测量:采用64排螺旋CT机(荷兰皇家飞利浦电子公司生产,型号:Brilliance nanoCT)常规行双肾扫描,将扫描图像资料进行多层面重组,上传至医学影像信息系统工作站进行处理,由两名资深影像学医师共同阅片,选取肾盂积水平面为感兴趣区,圈选最大肾积液范围,由软件自动测定肾积液CT值。

1.3 观察指标

两组一般资料(年龄、性别、BMI、结石直径、结石部位、合并高血压、糖尿病)、肾功能指标

(BUN、Cr)及血清Cys C水平、肾积液CT值。探究血清Cys C水平与肾积液CT值相关性,及血清Cys C水平、肾积液CT值与肾功能指标的相关性。探究血清Cys C水平、肾积液CT值对尿路结石梗阻性肾积脓与肾积水的鉴别诊断价值。

1.4 统计学方法

数据处理采用SPSS 22.0软件,计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,两两比较采用t检验计数资料以n(%)表示,采用 χ^2 检验;采用Pearson进行相关性分析,采用受试者工作特征(Receiver operating characteristic, ROC)曲线分析诊断鉴别价值,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

研究组血清BUN、Cr表达水平高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表1。

表1 两组一般资料比较 [n(%), ($\bar{x} \pm s$)]

资料	对照组 (n=51)	研究组 (n=87)	t/ χ^2 值	P值
年龄(岁)	47.71±10.05	47.10±9.44	0.358	0.721
性别(例)				
男	33(64.71)	57(65.52)	0.009	0.923
女	18(35.29)	30(34.48)		
BMI(kg/m ²)	22.86±1.21	23.25±1.42	1.642	0.103
结石直径(cm)	3.46±0.68	3.52±0.66	0.510	0.611
结石部位(例)				
输尿管中上段	40(78.43)	68(78.16)	0.004	0.970
输尿管下段	11(21.57)	19(21.84)		
合并高血压(例)				
有	11(21.57)	18(20.69)	0.015	0.903
无	40(78.43)	69(79.31)		
合并糖尿病(例)				
有	9(17.65)	15(17.24)	0.004	0.952
无	42(82.35)	72(82.76)		
肾功能指标				
血清BUN (mmol/L)	5.26±1.53	7.02±1.84	5.760	<0.001
血清Cr (μ mol/L)	84.43±25.60	157.79±41.18	11.479	<0.001

2.2 两组血清Cys C水平、肾积液CT值比较

研究组血清Cys C水平、肾积液CT值高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表2。两组CT影像结果见图1。

2.3 血清Cys C水平与肾积液CT值相关性

血清Cys C水平与肾积液CT值呈正相关($r = 0.800, P < 0.05$),见图2。

表2 两组血清Cys C、肾积液CT值比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of CT value of serum Cys C and renal effusion between 2 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	血清Cys C(mg/L)	肾积液CT值(Hu)
研究组	87	1.42±0.37	13.46±3.29
对照组	51	1.01±0.30	5.71±1.77
t值		6.721	15.540
P值		<0.001	<0.001

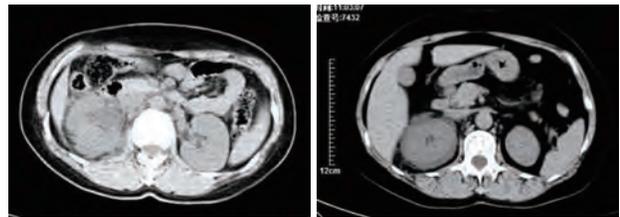


图1 肾积脓患者和肾积水患者CT影像结果

Figure 1 Imaging findings of patients with renal abscess and CT hydronephrosis

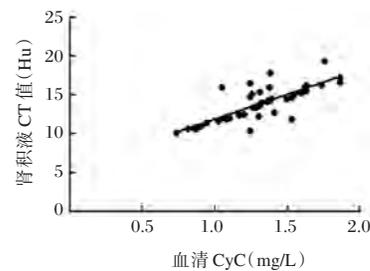


图2 血清Cys C与肾积液CT值相关性

Figure 2 Relationship between serum Cys C and CT of renal effusion

2.4 血清Cys C水平、肾积液CT值与肾功能的关系
血清Cys C水平、肾积液CT值与血清BUN、Cr水平呈正相关($P < 0.05$),见表3、图3。

表3 血清Cys C水平、肾积液CT值与肾功能的关系

Table 3 Relationship between serum Cys C, CT value of renal effusion and renal function

项目	血清Cys C		肾积液CT值	
	r值	P值	r值	P值
BUN	0.759	<0.001	0.583	<0.001
Cr	0.674	<0.001	0.644	<0.001

2.5 血清Cys C、肾积液CT值鉴别诊断价值

ROC曲线显示,血清Cys C、肾积液CT值联合鉴别诊断的曲线下面积(Area under the curve, AUC)大于血清Cys C、肾积液CT值单独鉴别诊断,联合鉴别诊断的最佳敏感度为68.63%,特异度为86.21%。见表4、图4。

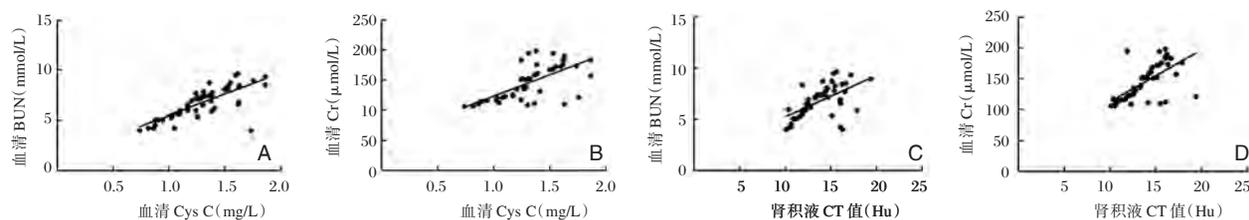


图3 血清 Cys C 水平、肾积液 CT 值肾功能关系

Figure 3 Relationship between serum Cys C and CT value of renal effusion and renal function

表4 血清 Cys C、肾积液 CT 值鉴别诊断价值

Table 4 Differential diagnosis value of serum Cys C and CT value of renal effusion

指标	AUC	95%CI	Z 统计	截断值	敏感度 (%)	特异度 (%)	P 值
血清 Cys C	0.758	0.678~0.827	5.973	>1.34 mg/L	64.71	77.01	<0.001
肾积液 CT 值	0.770	0.690~0.837	6.362	>8.39 Hu	82.35	66.67	<0.001
两者联合	0.841	0.769~0.898	9.648	-	68.63	86.21	<0.001

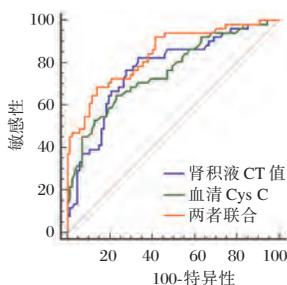


图4 血清 Cys C、肾积液 CT 值鉴别诊断价值

Figure 4 Differential diagnosis value of serum Cys C and CT value of renal effusion

3 讨论

目前,血清学检测广泛应用于临床多种疾病的诊断、病情评估、疗效判定等方面,具有操作简单、创伤小、可重复检查等优势。积极探索诊断尿路结石梗阻性肾积脓的血清生物学指标将有助于本病的早期诊断和治疗。

Cys C 是一种只在肾脏中代谢的半胱氨酸蛋白酶抑制剂 γ -微量蛋白,由体内有核细胞恒定产生,其分子量仅为 13.3 KD,能够自由通过肾小球滤过,不被肾小管上皮细胞重新吸入血液和分泌系统,且仅能经肾小球滤过而被清除,Cys C 在近曲小管被重吸收,重吸收后被完全代谢分解,不返回血液循环系统^[8]。因此,血液中 Cys C 浓度由肾小球滤过率决定,不依赖任何外部因素(性别、年龄、饮食等)的影响,是一种反映肾小球滤过率变化的理想内源性标志物。本研究发现,尿路结石梗阻性肾积脓患者的血清 Cys C 表达水平显著高于尿路结石梗阻性肾积水患者。与尿路结石梗阻

性肾积水不同,尿路结石梗阻性肾积脓患者存在肾实质性损伤,肾小球滤过率发生障碍,Cys C 的清除作用降低,导致 Cys C 重返血液,最终引起血清 Cys C 水平升高^[9]。本研究提示,血清 Cys C 在鉴别诊断尿路结石梗阻性肾积脓与肾积水方面具有一定价值。

目前,CT 检查在泌尿系统疾病、外伤、尿路梗阻性病变等诊断中发挥着极其重要作用,尤其是对泌尿系统结石的诊断,准确度高达 95% 以上,临床应用十分广泛^[10]。近年来,CT 检查在泌尿系统感染诊断方面的价值越来越受临床重视。吴江等^[11]研究发现,当肾积水合并感染时,尿液密度高于单纯肾积水,随着感染加重,CT 值呈逐渐升高趋势,当形成肾积脓时,CT 图像显示肾盂尿液与肾实质的界限不清,部分肾积脓患者的尿液 CT 值甚至高于肾实质。尿路结石梗阻性肾积脓患者存在感染,致病菌及其代谢产物增加尿液浓度,且细菌局部大量繁殖,不易随尿液排出,加之肾实质损伤形成的坏死细胞碎片、白细胞聚集等,均可导致肾盂内尿液密度增高,最终导致尿路结石梗阻性肾积脓患者的肾积液 CT 值增高^[12-13]。且随着肾损伤加重,肾积液 CT 值逐渐增加,表现为肾积液 CT 值与血清 BUN、Cr 水平呈正相关。因此肾积液 CT 值可较好地评估肾脏内感染及肾损伤情况,从而指导治疗。本研究发现肾积液 CT 值鉴别诊断尿路结石梗阻性肾积脓与肾积水的敏感度高达 82.35%,但存在特异度偏低的不足。本研究发现血清 Cys C、肾积液 CT 值联合疾病诊断肾积脓与肾积水疾病,诊断效能得到进一步改善,有助于尿

路结石梗阻性肾积脓的早期检出,指导临床开展针对性治疗,以抑制肾损伤发展,改善患者预后。

综上所述,尿路结石梗阻性肾积脓患者存在肾内感染及肾实质损伤,导致血清Cys C表达水平及肾积液CT值异常升高,可辅助临床鉴别诊断尿路结石梗阻性肾积脓与肾积水,且与患者肾功能呈正相关关系,可指导临床评估患者肾功能、制定针对性治疗方案。

参考文献

- [1] 郑燕,谢薄,刁海花,等. 揸针埋针联合导赤散治疗肝火上炎型突发性耳聋伴睡眠障碍的效果观察[J]. 中西医结合护理(中英文), 2019,5(4):50-53.
- [2] Ji DS. Effect observation of minimally invasive percutaneous nephrolithotomy in the treatment of upper ureteral calculi combined with pyonephrosis[J]. Acta Med Sin, 2018,31(2):68-72.
- [3] Wang YB, He DH, Zhang H, et al. Diagnosis and treatment of upper urinary tract obstructive pyonephrosis[J]. Chin Comm Doct, 2016,32(11):51+53.
- [4] 李海燕. CysC、 α 1-MG及 β 2-MG在慢性阻塞性肺疾病患者的检测价值及与缺氧所致肾损伤的相关性[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020,12(4):516-519.
- [5] Yuruk E, Tuken M, Sulejman S, et al. Computerized tomography attenuation values can be used to differentiate hydronephrosis from pyonephrosis [J]. World J Urol, 2017, 35(3): 437-442.
- [6] 吴江. CT值在结石成分及肾内感染的临床应用[D]. 遵义医学院, 2018.
- [7] 王宽,王朝明,杨芒庄. 一期经皮肾镜取石治疗上尿路结石合并肾积脓33例[J]. 中国综合临床, 2017,33(7):628-631.
- [8] 李海燕. CysC、 α 1-MG及 β 2-MG在慢性阻塞性肺疾病患者的检测价值及与缺氧所致肾损伤的相关性[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020,12(4):124-127.
- [9] 张媛,周瑾. 胱抑素C在早期诊断尿路结石梗阻性肾积脓中应用价值观察[J]. 医学信息, 2016,29(11):366-366,367.
- [10] Cheng M, Xiao XG, Chen WJ, et al. Value of spectral CT imaging on identifying hydronephrosis and simple renal cysts [J]. J Harbin yike daxue xuebao, 2017,51(1):35-40.
- [11] 吴江,李道兵,赵长永,等. CT值对肾积水合并感染的诊断价值[J]. 中华泌尿外科杂志, 2018,39(1):54-57.
- [12] 胡明,徐勋,张湛英,等. 肾积液CT值对结石梗阻性肾积脓的诊断价值[J]. 新医学, 2018,49(6):449-452.
- [13] Aurégan C, Berteloot L, Pierrepont S, et al. Xanthogranulomatous pyelonephritis with pyonephrosis in a 4-year-old child [J]. Arch Pediatr, 2015,22(3):287-291.

(上接第1400页)

- [10] Yap DY, Seto WK, Fung J, et al. Serum and urinary biomarkers that predict hepatorenal syndrome in patients with advanced cirrhosis[J]. Dig Liver Dis, 2017,49(2):202-206.
- [11] 易元杰,徐远久,周金华,等. 尿NGAL、KIM-1对晚期肝硬化肝肾综合征患者的预测价值[J]. 现代医学, 2017,45(6):771-776.
- [12] Terrault NA, Lok ASF, McMahon BJ, et al. Update on prevention, diagnosis, and treatment of chronic hepatitis B: AASLD 2018 hepatitis B guidance[J]. Hepatology, 2018,67(4):1560-1599.
- [13] 王小华,王伟,张妮,等. 血清NGAL联合肌酐早期判断乙型肝炎肝硬化患者并发肝肾综合征的临床价值分析[J]. 实用肝脏病杂志, 2018,21(5):685-688.
- [14] 何爽,黄萍,范明娟. 血浆miR-192、miR-29c水平对2型糖尿病肾病诊断的临床意义[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2019,11(6):522-526.
- [15] Rossios C, Pavlidis S, Hoda U, et al. Sputum transcriptomics reveal upregulation of IL-1 receptor family members in patients with severe asthma [J]. J Allergy Clin Immunol, 2018,141(2):560-570.

(上接第1405页)

- [12] 吴闽,侯慧珍,司廷林. 过表达miR-138抑制TCF-4对甲状腺癌细胞CAL-62增殖、凋亡和运动的调节作用[J]. 中国临床解剖学杂志, 2019,37(4):425-430.
- [13] Li R, Liu S, Li Y, et al. Long noncoding RNA AFAP1-AS1 enhances cell proliferation and invasion in osteosarcoma through regulating miR-4695-5p/TCF4- β -catenin signaling [J]. Mol Med Rep, 2018,18(2):1616-1622.
- [14] 曹锦慧,思美丽. miR-204-5p靶向TCF-4对宫颈癌Siha细胞增殖、侵袭和迁移的调节作用[J]. 医学分子生物学杂志, 2018,15(6):373-378.
- [15] Yang B, Xu Y, Wang X, et al. A serine in exon 11 determines the full transcriptional activity of TCF-4 in lung carcinoma cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2019,508(3):675-681.
- [16] 朱素华,孙亚峰,王雷,等. 敲减LncRNA AFAP1-AS1通过抑制Wnt信号通路对结肠癌细胞增殖侵袭迁移及凋亡的影响[J]. 中华生物医学工程杂志, 2019,25(4):444-449.
- [17] 范奕红. STAT3和 β -catenin在肝癌组织高表达并增加肝癌细胞凋亡[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2018,34(1):65-69.

北京市海淀区女性人乳头瘤病毒感染结果分析

王海滨* 张冬青 赵娇

【摘要】目的 调查北京市海淀区妇女人乳头状瘤病毒(HPV)感染率、感染亚型及感染年龄分布情况,为预防 HPV 感染提供依据。方法 采用荧光定量 PCR 方法对 2017 年 7 月至 2019 年 7 月 3 650 例就诊于解放军总医院第四医学中心的女性进行 HPV 基因亚型检测,17 种型别包括 15 种高危型和 2 种低危型,分析比较感染年龄、感染程度、感染型别。结果 3 650 例受检者阳性 825 例,总检出率为 22.60%;其中 HPV 高危型 745 例,占 90.30%(745/825),低危型 172 例,占 20.85%(172/825),高低亚型混合感染 92 例,占 11.15%(92/825);女性 HPV 感染以单一感染为主,共 553 例,占 67.03%(533/825),多重感染 272 例,占 32.97%(272/825);不同年龄组女性感染 HPV 的亚型各不相同;总体感染率高的五种亚型从高到底依次为 HPV 52、HPV 6+11、HPV 16、HPV 58、HPV 51 型。结论 北京市海淀区女性 HPV 感染以 HPV 52、HPV 6+11、HPV 16 型亚型为主,发病趋势呈年轻化,应采取有效措施,降低 HPV 感染。

【关键词】 HPV; 基因分型; 北京

Analysis of Female Human Papillomavirus infection in Haidian District, Beijing

WANG Haibin*, ZHANG Dongqing, ZHAO Jiao

(Department of Clinical Laboratory, the Fourth Medical Center, Chinese PLA General Hospital, Beijing, China, 100048)

【ABSTRACT】 Objective To investigate the infection rate, subtypes, and age distribution of human papillomavirus (HPV) among women in Haidian District, Beijing, and to provide evidence for preventing HPV infection. Method A total of 3650 outpatient women from the Fourth Medical Center of Chinese PLA General Hospital, were checked for 17 HPV DNA types by fluorescence quantitative PCR assay. The HPV infection age distribution of the subjects, HPV infection rate and HPV subtypes were analyzed. Result Among 3650 women, there were 825 cases of HPV infection and the infection rate was 22.60%, including 745 cases of high-risk subtypes and 172 cases of low-risk subtypes, and 92 cases of mixed infection of high and low subtypes, accounting for 11.15% (92/825). Female HPV infection is dominated by single infection, a total of 553 cases, accounting for 67.03% (533/825), and 272 cases of multiple infection, accounting for 32.97% (272/825). Women in different age groups show different subtypes of HPV infection. The top five high-risk HPV infection subtypes were 52, 6+11, 16, 58 and 51 subtypes. Conclusion Female HPV infections in Haidian District of Beijing are mainly HPV 52, HPV 6+11, and HPV 16 subtypes. The incidence trend is younger. Effective measures should be taken to reduce HPV infection.

【KEY WORDS】 Human papillomavirus, Genotype, Beijing

乳头瘤病毒(papillomavirus)属于乳多空病毒科(papovaviridae)的乳头瘤病毒属,包括多种动物乳头瘤病毒和人乳头瘤病毒(human papillomavi-

rus, HPV), HPV 主要通过直接或间接接触污染物品或性传播感染人类。HPV 不但具有宿主特异性,而且具有组织特异性,只能感染人的皮肤和黏

作者单位:解放军总医院第四医学中心检验科,北京 100048

*通信作者:王海滨, E-mail:1197131586@qq.com

膜上皮细胞,至今已鉴定出100多种HPV基因型^[1]。HPV可分为高危型和低危型,持续性高危型HPV与宫颈上皮内瘤、宫颈癌密切相关,而低危型HPV与生殖道外生性湿疣类、扁平湿疣类病变相关,不同HPV的亚型具有不同的致病能力,多重HPV感染是加重宫颈病变的重要因素^[2-3]。因此,了解不同HPV感染情况及亚型的分布对早期诊断和预防宫颈病变具有重要意义。本文对北京市海淀区3650例妇女的宫颈脱落细胞进行了17种HPV亚型检测,分析HPV感染情况、亚型分布及感染年龄情况等特点,为本地区女性预防HPV感染和宫颈疾病防治提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集2017年7月至2019年7月期间在解放军总医院第四医学中心妇科、皮肤科和体检中心就诊的3650例妇女,年龄15~80岁,平均为(43.9±11.8)岁,其中<20岁22例、20岁~381例、30岁~989例、40岁~1141例、50岁~745例、60岁~296例、70岁~76例。所有人群均为初次检查,排除第二次复查结果。

1.2 仪器和试剂

基因扩增仪为上海宏石医疗科技有限公司生产的全自动医用PCR分析仪SLAN-96P型,HPV基因检测试剂盒为上海之江人乳头瘤病毒基因分型核酸测定试剂盒,可检测HPV-DNA高危型15种:16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、66、68、82,HPV-DNA低危型2种:6、11。

1.3 方法

1.3.1 标本的采集

用窥阴器暴露宫颈,宫颈取样器刷取上皮细胞,然后将宫颈刷置于3 mL细胞保存液中,沿宫颈刷柄折痕处将其折断,旋紧管盖并做好标本标识,将细胞保存液直立放置于4℃保存,在48 h内检测完毕。

1.3.2 DNA的提取

严格按照上海之江生物科技股份有限公司的人乳头瘤病毒分型核酸测定试剂盒操作说明书提取DNA。

1.3.3 PCR扩增

将配制好的PCR混合液(含有dNTP、Taq DNA聚合酶、引物和荧光探针)36 μL置于反应管

中,分别加入4 μL已提取的DNA样品、阴性对照(H₂O)和阳性对照(含目的基因片段的缺陷性病毒),反应体系总体积40 μL,3 000 r/min离心4 s,上机扩增。扩增条件为94℃ 2 min;93℃ 10 s,62℃ 31 s,循环40次;单点荧光检测在62℃。

1.3.4 结果判定

根据厂家说明书判读实验结果,当待检样本HPV的Ct值≤38,且扩增曲线呈典型的S型,则判断为阳性;若待检样本Ct栏都显示“No Ct”,检测样本判定为阴性;如果待检样本Ct值在38~40之间,需重复测定,如仍在38~40之间,且扩增曲线呈典型的S型,则判断为阳性,若非典型S型曲线,则判为阴性;当待检样本HPV(IC)核酸荧光PCR检测混合液的VIC通道Ct值>32,且在其他混合液中均为阴性,则无法判读结果,说明提取存在问题或者PCR检测存在问题,需重复试验。

1.4 统计学方法

采用SPSS 19.0统计学软件分析,计数资料用%表示,采用χ²检验,P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HPV感染总体情况

3650例受检者中共检测到HPV感染阳性患者825例,总检出率为22.60%(825/3650)。HPV阳性患者中,HPV高危型745例,占90.30%,低危型172例,占20.85%,既感染高危型又感染低危型92例,占11.15%;多重感染情况见表1。

表1 北京市海淀区女性HPV阳性检测中多重感染情况
Table 1 Multiplex HPV infection results of women from Haidian District of Beijing

感染重数	阳性例数	阳性率(%)
单一感染	553	67.03
二重感染	178	21.85
三重感染	64	7.76
四重感染	17	2.06
五重感染	8	0.97
六重感染	2	0.24
七重感染	2	0.24
八重感染	1	0.12
合计	825	22.60

2.2 不同年龄段HPV感染情况及亚型情况分析

3650例受检人群以40~49岁人群为主,<20岁组和20岁~年龄组感染率较高(59.09%,45.67%),显著高于其他年龄组患者,差异具有统计学意义,见表2。

表2 北京市海淀区不同年龄段女性 HPV 感染情况 [n(%)]

Table 2 HPV positive rate of each group of women from Haidian District of Beijing [n(%)]

年龄(岁)	n	阳性率	单一感染	多重感染	χ^2 值	P值
<20	22	13(59.09)	6(27.27)	7(31.82)	15.925	<0.001
20~	381	174(45.67)	88(23.10)	86(22.57)	70.7146	<0.001
30~	989	224(22.65)	155(15.67)	69(6.98)		
40~	1 141	227(19.89)	176(15.42)	51(4.47)		
50~	745	127(17.05)	94(12.62)	33(4.43)		
60~	296	53(17.91)	30(10.14)	23(7.77)		
70~	76	7(9.21)	4(5.26)	3(3.95)		

2.3 不同 HPV 亚型检出情况

对 825 例 HPV 感染阳性患者进行分析, 总体感染率高的五种亚型从高到底依次为 HPV 52、HPV 6+11、HPV 16、HPV 58、HPV 51 型, 单一感染和多重感染率高的三种亚型从高到底依次为 HPV 52、HPV 6+11、HPV 16 型, 见表 3。

2.4 不同年龄段 HPV 感染亚型情况分析

不同年龄组女性感染 HPV 的亚型各不相同, 但是基本以 HPV 52、HPV 6+11、HPV 16 型为主, 与总感染率基本一致, 见表 4。

3 讨论

宫颈癌是威胁女性健康的最常见恶性肿瘤之一, 虽然近年来我国积极推进宫颈癌的筛查与防治工作, 但是新发宫颈癌病例仍然呈逐年增加趋势, 发病年龄日益年轻化。HPV 感染, 特别是持续的高危型 HPV 感染是导致宫颈癌的最重要因素^[4-5]。研究发现, 宫颈癌患者的宫颈脱落细胞标本几乎都可以检测到 HPV 的感染, 并且随着宫颈

表3 北京市海淀区女性 HPV 感染亚型情况 [n(%)]

Table 3 HPV positive rate of each group of women from Haidian District of Beijing [n(%)]

HPV 亚型	总体感染 (n=825)	单一感染 (n=553)	多重感染 (n=272)
HPV 16	139(16.85)	70(12.66)	69(25.37)
HPV 18	55(6.67)	28(5.06)	27(9.93)
HPV 31	37(4.48)	13(2.35)	24(8.82)
HPV 33	32(3.88)	13(2.35)	19(6.99)
HPV 35	26(3.15)	6(1.08)	20(7.35)
HPV 39	84(10.18)	24(4.34)	60(22.06)
HPV 45	22(2.67)	5(0.90)	17(6.25)
HPV 51	95(11.51)	44(7.96)	51(18.75)
HPV 52	193(23.39)	93(16.82)	100(36.76)
HPV 56	77(9.33)	35(6.33)	42(15.44)
HPV 58	113(13.70)	54(9.76)	59(21.69)
HPV 59	67(8.12)	29(5.24)	38(13.97)
HPV 66	49(5.94)	21(3.80)	28(10.29)
HPV 68	52(6.30)	25(4.52)	27(9.93)
HPV 82	27(3.27)	8(1.44)	19(6.99)
HPV 6+11	171(20.73)	80(14.47)	91(33.46)

病变的加重而提高, 且 HPV 感染类型的不同对患者产生的影响也不同^[2]。

表4 北京市海淀区不同年龄段女性 HPV 感染分布情况 [n(%)]

Table 4 HPV infection distribution of each age group of women from Haidian District of Beijing [n(%)]

HPV 亚型	总人数	<20	20~	30~	40~	50~	60~	70~
HPV 16	139(16.85)	5(0.61)	47(5.70)	35(4.24)	34(4.12)	12(1.45)	5(0.61)	1(0.12)
HPV 18	55(6.67)	5(0.61)	14(1.70)	11(1.33)	14(1.70)	7(0.85)	3(0.36)	1(0.12)
HPV 31	37(4.48)	3(0.36)	5(0.61)	12(1.45)	9(1.09)	3(0.36)	3(0.36)	2(0.24)
HPV 33	32(3.88)	0(0.00)	11(1.33)	10(1.21)	7(0.85)	3(0.36)	1(0.12)	0(0.00)
HPV 35	26(3.15)	0(0.00)	7(0.85)	3(0.36)	4(0.48)	8(0.97)	3(0.36)	1(0.12)
HPV 39	84(10.18)	6(0.72)	16(1.94)	23(2.79)	20(2.42)	13(1.58)	6(0.72)	0(0.00)
HPV 45	22(2.67)	0(0.00)	3(0.36)	5(0.61)	10(1.21)	3(0.36)	1(0.12)	0(0.00)
HPV 51	95(11.51)	1(0.12)	26(3.15)	17(2.06)	26(3.15)	16(1.94)	8(0.97)	1(0.12)
HPV 52	193(23.39)	5(0.61)	36(4.36)	58(7.03)	44(5.33)	30(3.64)	18(2.18)	2(0.24)
HPV 56	77(9.33)	3(0.36)	14(1.70)	16(1.94)	23(2.79)	11(1.33)	8(0.97)	2(0.24)
HPV 58	113(13.70)	2(0.24)	28(3.39)	25(3.03)	25(3.03)	19(2.30)	13(1.58)	1(0.12)
HPV 59	67(8.12)	4(0.48)	18(2.18)	18(2.18)	14(1.70)	8(0.97)	5(0.61)	0(0.00)
HPV 66	49(5.94)	0(0.00)	12(1.45)	14(1.70)	14(1.70)	7(0.85)	2(0.24)	0(0.00)
HPV 68	52(6.30)	1(0.12)	9(1.09)	12(1.45)	11(1.33)	15(1.82)	4(0.48)	0(0.00)
HPV 82	27(3.27)	0(0.00)	3(0.36)	11(1.33)	9(1.09)	2(0.24)	2(0.24)	0(0.00)
HPV 6+11	171(20.73)	6(0.73)	62(7.52)	58(7.03)	26(3.15)	16(1.94)	4(0.48)	0(0.00)

HPV 的感染率会因地区和人群而有所不同,报道的范围为 1.4%~25.6%,分析认为形成差异的主要原因,应该是我国地域辽阔、民族众多,各地区间经济发展不平衡所导致的生化活水平和条件不同造成的^[6]。不少省市发表了各地区 HPV 感染情况的报告,如南京地区为 33.47%^[7],上海浦东地区为 23.43%^[8],连云港地区为 25.31%^[9],福建省南平市为 22.64%^[10],山东地区为 29.38%^[11],西安地区为 30.45%^[12]。本研究 HPV 的总感染率略低于其他地区,高危型 HPV 感染的比例高于低危型 HPV 感染的比例。Garg 等^[13]研究结果显示 HPV 亚型的分布与种族、年龄、地域有关,全世界范围内共同最常见的感染亚型为 16、18、31 型。本文研究结果与我国常见的 HPV 优势型别类型基本一致,苏州地区报道的是 HPV 52、HPV 81、HPV 16 型^[14],贵阳地区是 HPV 52、HPV 16、HPV 58 型^[15],南京地区是 HPV 16、HPV 58、HPV 52 型^[7],安徽地区是 HPV16、HPV 52、HPV 58 型^[16],上海浦东地区是 HPV 52、HPV 16、HPV 58 型^[17],北京地区天坛医院报道的是 HPV 52、HPV 58、HPV 16 型^[6]。但是各地区检出频次构成比略有差异,这与全世界范围内共同的最常见感染为 HPV 16、HPV 18 型位居第二位有差异,HPV 52、HPV 58 型的感染率在国内其他地区是否也远超 HPV 18 型,这有待于进一步研究确定。HPV 感染的型别具有人群地域的特点,造成亚型分布差异的原因可能研究对象不同、检测试剂不同有关,但也可能与地理环境、社会生物因素或者遗传免疫因素有关,这也提示各地区在筛查和预防 HPV、进行 HPV 疫苗研究时,应针对本地区的高致病亚型开展相关工作^[6]。

本文研究显示<20 岁组感染率最高,为 59.09% (13/22),排除<20 岁组收集数据过少的原因,可能与女性宫颈发育不成熟,机体免疫系统在特殊时期变化调节,自身防御功能差有关,导致感染概率增高。HPV 感染是一个漫长的过程,初次感染高危 HPV 病毒后可长期潜伏在细胞内,而当机体免疫低下时 HPV 病毒恢复活性^[18],持续感染高危型 HPV 感染时会诱发宫颈癌^[19-20]。目前宫颈 HPV 单一感染与多重感染对宫颈病变的影响尚无一致性结论,还需要更深入、更大样本量以及更多地区的研究探讨。

综上所述,北京市海淀区解放军总医院第四医学中心就诊女性 HPV 感染趋向低龄化,以单一感染为主,不同年龄组女性感染 HPV 的亚型各不

相同,总体感染率高的五种亚型从高到底依次为 HPV 52、HPV6+11、HPV16、HPV58、HPV51 型,<20 岁组和 20~29 岁组感染率较高。应该加强对年轻女性 HPV 感染的监测力度,通过引入和推广 HPV 疫苗,并制定综合合适的防治措施并有效应用于特定人群,降低 HPV 感染。

参考文献

- [1] 洪秀华,刘运德.临床微生物学检验[M].2版.北京:中国医药科技出版社,2010,490-492.
- [2] 单玮,张涛,张铁军,等.我国女性人乳头瘤病毒(HPV)感染的流行病学现状[J].中华疾病控制杂志,2017,21(1):89-93.
- [3] 刘彬,吴泽妮,刘潇阳,等.人乳头瘤病毒与子宫腺癌病因关系研究[J].中华肿瘤杂志,2016,38(4):277-282.
- [4] 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.
- [5] Maggino T, Sciarone R, Murer B, et al. Screening women for cervical cancer carcinoma with a HPV mRNA test: first results from the Venic pilot program [J]. Br J Cancer, 2016, 115(5):525-532.
- [6] 史从宁,陈珂霖,王雅杰,等.北京天坛医院 5512 例女性 HPV 感染基因型分析[J].标记免疫分析与临床,2016,23(10):1158-1162.
- [7] 丁卉,申艳,阙延静,等.南京部分地区女性宫颈 HPV 感染状况与分析[J].现代生物医学进展,2012,29(39):5686-5707.
- [8] 刘华,李青,曹磊,等.上海浦东地区宫颈 HPV 感染状况的流行病学调查分析[J].中国现代医生,2019,57(33):136-139.
- [9] 许天龙,王媛,江平,等.连云港地区女性 HPV 感染状况分析[J].实用妇科内分泌电子杂志,2019,6(32):12-14.
- [10] 林蓉金,池细弟,戴晓凤.南平市女性 HPV 感染特征调查分析[J].湖北民族大学学报·医学版,2020,37(1):58-61.
- [11] 王睿,卜范峰,田欣欣,等.山东地区女性人乳头瘤病毒感染亚型、多重感染情况及年龄分布差异[J].中国生物制品学杂志,2016,29(1):57-60.
- [12] 冀静,张海满,李娜,等.西安地区门诊机会筛查妇女 HPV 感染状况分析[J].海南医学,2017,28(18):3004-3006.
- [13] Garg A, Suri V, Nijhawan R. Prevalence of human papilloma virus infection in young primiparous women during postpartum period: study from a tertiary care center in northern india[J]. J Clin Diagn Res, 2016,10(10):6-9.
- [14] 李伟,王燕华,杨如,等.苏州地区不同年龄女性 HPV 感染的流行病学调查[J].现代肿瘤医学,2020,28(10):1753-1756.
- [15] 杨丹,韩然,罗振元,等.贵阳地区 5151 例医院就诊女性 HPV 感染亚型分析[J].国际检验医学杂志,2019,40(23):2827-2831.

(下转第 1418 页)

急性心梗后心功能预后与血尿酸及肌酸肌酶同工酶水平的相关性

胡超勇^{1*} 邹华伟² 高鹏芝¹

[摘要] 目的 探讨急性心梗后心功能预后与血尿酸(SUA)及肌酸肌酶同工酶(CK-MB)水平的关系。方法 选取2018年1月至2019年12月于本科室住院的急性心肌梗死患者173例,分别对患者进行SUA及CK-MB检测,评估患者舒张末期左室内径(LVEDd),收缩末期左室内径(LVEDs),左室射血分数(LVEF)和Gensini冠状动脉病变积分,根据是否患有高尿酸血症分组进行对比。结果 两组患者的一般临床资料均衡可比,差异无统计学意义($P>0.05$);合并高尿酸血症的心肌梗死患者的CK-MB峰值水平较其他患者明显升高($P<0.05$),且出现峰值的时间更早;不同心功能Killip分级的患者SUA值与CK-MB峰值不同,差异有统计学意义($P<0.05$),Killip分级越高的患者,SUA值与CK-MB峰值越高;ST段抬高型心梗(STEMI)患者SUA值与CK-MB峰值较非ST段抬高型心梗(NSTEMI)患者水平显著升高,差异有统计学意义($P<0.05$);急性心肌梗死患者的SUA值与CK-MB峰值水平与LVEF呈负相关;与LVEDs、LVEDd、Gensini积分呈正相关;差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 可以通过SUA及CK-MB值间接评估急性心肌梗死患者的心功能及预后。

[关键词] 急性心肌梗死;心功能;血尿酸;肌酸激酶同工酶

Correlation between the prognosis of cardiac function and serum uric acid and CK-MB levels after acute myocardial infarction

HU Chaoyong^{1*}, ZOU Huawei², GAO Pengzhi¹

(1. Department of Cardiology, Taihe County People's Hospital, Fuyang, Anhui, China, 236600; 2. Department of Cardiology, Fuyang Hospital of Anhui Medical University, Fuyang, Anhui, China, 236000)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the relationship between the prognosis of cardiac function and the level of serum uric acid and CK-MB after acute myocardial infarction. **Methods** 173 patients with acute myocardial infarction who were hospitalized in our department from January 2018 to December 2019 were selected. All patients were tested for blood uric acid and CK-MB, and the patients were assessed for end-diastolic left ventricular diameter (LVEDd), end-systolic left ventricular diameter (LVEDs), left ventricular ejection fraction (LVEF), and Gensini coronary artery disease score, depending on whether they had the hyperuricemia group was compared. **Results** The general clinical data of the two groups of patients were balanced and comparable, and the difference was not statistically significant ($P>0.05$). The peak level of CK-MB in patients with myocardial infarction combined with hyperuricemia was significantly higher than that of other patients ($P<0.05$). The peak time is earlier; the SUA value of patients with different cardiac function Killip grades is different from the peak CK-MB, and the difference is statistically significant ($P<0.05$). The higher the Killip grade, the higher the SUA value and the peak CK-MB. The levels of SUA and CK-MB peak

基金项目:安徽省科技计划项目(12010402c193)

作者单位:1. 安徽省阜阳市太和县人民医院心血管内科,安徽,阜阳 236600

2. 安徽医科大学附属阜阳医院心血管内科,安徽,阜阳 236000

*通信作者:胡超勇, E-mail: shinei44936859@163.com

in patients with ST-segment elevation myocardial infarction (STEMI) were significantly higher than those in patients with non-ST-segment elevation myocardial infarction (NSTEMI) ($P<0.05$) The SUA value of patients with acute myocardial infarction was negatively correlated with the peak level of CK-MB and LVEF; it was positively correlated with LVEDs, LVEDd, and Gensini score; the difference was statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** The cardiac function and prognosis of patients with acute myocardial infarction can be assessed indirectly through SUA and CK-MB values.

[KEY WORDS] Acute myocardial infarction; Cardiac function; Serum uric acid; Creatine kinase isoenzymes-MB

当前,随着人们生活方式的改变,心血管疾病的发病率也在不断升高,急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)是一种具有发病急、病情变化快、死亡率高等特点的冠心病^[1-2]。虽然医疗工作者对于急性心肌梗死的诊断、治疗的方法不断进行改进,也取得了一定的效果,但是急性心梗的发病率依旧在逐年上升^[3]。急性心肌梗死后心功能及预后的预测是提高其治疗效果及患者存活率至关重要的方法。血尿酸及肌酸激酶同工酶(creatine kinase isoenzymes-MB, CK-MB)对判断AMI的心功能状态及预后具有重要的临床意义。本研究将分析急性心肌梗死患者血尿酸及CK-MB水平与其心功能及预后的关系。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选择2018年1月至2019年12月于本科室住院的急性心肌梗死患者173例为研究对象,其中男性96例,女性77例,平均年龄(59.6±9.2)岁;有高血压病史97例,糖尿病史41例;ST段抬高型心肌梗死(STEMI)101例,非ST段抬高型心肌梗死(NSTEMI)72例。根据患者入院后血尿酸水平:男性血尿酸水平>420 μmol/L,女性血尿酸水平>360 μmol/L为高尿酸血症,将患者分为高尿酸血症组(91例)和正常尿酸组(82例)。

纳入标准:①符合中华医学会心血管病学分会关于急性心肌梗死的诊断标准^[4];②发病24 h内入院。排除标准:合并有急性肺水肿、休克、合并急性脑血管疾病、严重肝肾功能损害等对结果有影响的疾病^[5]。所有患者皆签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 临床检查

入选患者于入院后24 h之内抽空腹血,用全自动生化分析仪(日本日立公司,Hitachi 7600-020

型)检测患者血糖、血脂、肝肾功能、尿酸等项目,行床边心电图检查,并于发病后6 h、12 h、18 h、1 d、2 d、3 d采静脉血检测患者CK-MB。记录患者性别、年龄、吸烟饮酒史、伴随疾病、心功能分级(Killip分级)等。入选患者于住院期间在身体情况允许条件下,由专人负责行心脏超声检查,检查设备为多功能彩色多普勒超声仪(荷兰皇家飞利浦电子公司,iE33型)检测项目为舒张末期左心室内径(LVEDd)、收缩末期左心室内径(LVEDs)、左室舒张末期容积(LVEDV)和左室收缩末期容积(LVESV),根据公式 $LVEF=(LVEDV-LVESV)/LVEDV\times 100\%$ 求得左室射血分数(LVEF)^[6];测量3次取平均值。给予对照组相同检查。

1.2.2 Gensini冠状动脉病变积分评分

采用Seldinger穿刺法对患者行冠状动脉造影,由3名有经验的专科医生进行冠脉管腔直径评估,取3次结果平均值作为最终结果。采用Gensini积分系统对冠状动脉狭窄程度进行定量评分,各冠脉血管的管腔狭窄程度积分×病变部位系数之和为Gensini积分(简称G积分)^[7]。

1.3 统计学处理

使用SPSS 19.0统计学软件进行数据处理,计数资料以 $n(\%)$ 表示,采用 χ^2 检验;计量资料以 $(\bar{x}\pm s)$ 表示,组间比较采用 t 检验;多组间比较采用单因素方差分析。相关分析采用Pearson直线相关分析法。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者一般资料比较

两组患者在性别、年龄、吸烟饮酒、高血压、糖尿病等方面,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表1。

2.2 两组患者不同时刻CK-MB比较

高尿酸血症的急性心肌梗死患者于12 h、1 d、2 d、3 d的CK-MB水平显著高于正常尿酸组,差异

表1 两组病人一般资料比较 [n(%), ($\bar{x} \pm s$)]

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

项目	高尿酸血症组 (n=91)	正常尿酸组 (n=82)	t/ χ^2 值	P值
男性	78(85.7)	75(91.5)	1.394	0.238
年龄(岁)	59.6±9.2	60.3±10.1	-0.477	0.634
BMI(kg/m ²)	24.3±3.2	23.9±3.8	0.751	0.453
吸烟	83(91.2)	79(96.3)	1.908	0.167
饮酒	84(92.3)	77(93.9)	0.170	0.680
高血压病	50(54.9)	47(57.3)	0.099	0.754
糖尿病	23(25.3)	18(22.0)	0.264	0.608
收缩压(mmHg)	133.4±18.4	131.9±16.7	0.559	0.577
舒张压(mmHg)	78.2±6.8	77.6±7.1	0.567	0.571
血红蛋白(g/L)	145.3±10.6	146.8±9.2	-0.989	0.324

表2 两组患者不同时刻CK-MB比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Two groups of patients at different times CK-MB comparison ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	6 h	12 h	18 h	1 d	2 d	3 d
高尿酸血症组	91	93.2±10.7	247.8±23.2	208.9±21.8	150.2±18.6	35.6±5.7	15.8±3.1
正常尿酸组	82	91.8±11.2	176.3±19.4	210.4±20.9	142.9±15.1	24.9±3.1	12.3±2.7
t值		0.840	21.857	-0.460	2.814	15.102	7.879
P值		0.401	<0.001	0.645	0.005	<0.001	<0.001

表3 不同Killip分级患者SUA值与CK-MB峰值比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab 3 Different Killip grading patients with serum uric acid and CK-MB peak value ($\bar{x} \pm s$)

Killip 分级	n	血尿酸值 ($\mu\text{mol/L}$)	CK-MB 峰值 (ng/mL)
I	68	357.1±40.2	175.9±18.4
II	52	386.3±38.1	194.2±17.6
III	38	420.9±41.8	237.4±20.5
IV	15	453.7±42.4	256.8±23.2
F值		132.54	77.85
P值		<0.001	<0.001

表4 STEMI与NSTEMI患者SUA值与CK-MB峰值比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 STEMI and NSTEMI patients with serum uric acid and CK-MB peak value comparison ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	血尿酸值 ($\mu\text{mol/L}$)	CK-MB 峰值 (ng/mL)
ST段抬高型心梗组	101	428.7±36.5	214.7±19.6
非ST段抬高型心梗组	72	375.2±33.0	184.3±15.3
t值		9.885	10.986
P值		<0.001	<0.001

2.5 SUA值与CK-MB峰值与相关指标的关系

急性心肌梗死患者的SUA值与CK-MB峰值水平与LVEF呈负相关;与LVEDs、LVEDd、Gensini积分呈正相关($P<0.05$)。见表5。

有统计学意义($P<0.05$),且高尿酸血症组的CK-MB峰水平显著高于正常尿酸组,差异有统计学意义($P<0.01$)。见表2。

2.3 不同Killip分级患者SUA值与CK-MB峰值比较

急性心肌梗死患者Killip分级I~IV级亚组间SUA与CK-MB峰值水平依次递增,且差异有统计学意义($P<0.05$)。见表3。

2.4 STEMI与NSTEMI患者血尿酸值与CK-MB峰值比较

STEMI患者的SUA值与CK-MB峰值要明显高于NSTEMI患者SUA值与CK-MB峰值,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表4。

表5 SUA值与CK-MB峰值与相关指标的关系

Table 5 Relationship between serum uric acid value and the peak value of CK-MB and degree of coronary artery disease

项目	血尿酸		CK-MB	
	r值	P值	r值	P值
LVEF	-0.689	<0.001	-0.723	<0.001
LVEDs	0.358	0.019	0.845	<0.001
LVEDd	0.388	0.016	0.037	0.013
Gensini 积分	0.867	<0.001	0.694	<0.001

3 讨论

急性心肌梗死是在冠状动脉不稳定斑块破裂、糜烂基础上继发血栓形成导致冠状动脉血管持续、完全闭塞,严重可导致患者死亡^[8]。因此,对急性心肌梗死的早诊断早治疗至关重要。同时,明确急性心肌梗死预后的相关检查也可大大降低患者的死亡率^[9]。血尿酸(SUA)影响急性心肌梗死预后是通过促进低密度脂蛋白胆固醇的氧化^[10],增加氧自由基的生成,增加血小板聚集以及尿酸盐结晶损伤动脉内膜,促进冠状动脉内斑块的形成^[11]。肌酸激酶同工酶(CK-MB)与心肌梗死患者的心肌损伤程度密切相关^[12],同时与心功能也有一定联系。

本研究通过观察急性心肌梗死患者的血尿酸(SUA)及肌酸激酶同工酶(CK-MB)水平,探讨它们与急性心肌梗死的预后关系。结果表明心梗

死患者的SUA值与CK-MB值存在一定的关联,二者可能共同影响着心肌梗死患者的预后。SUA值与CK-MB值可反映心梗后患者的心功能状态,ST段抬高型心梗(STEMI)患者SUA值与CK-MB峰值水平较非ST段抬高型心梗(NSTEMI)组更高,而STEMI患者心功能较NSTEMI患者更差^[13],说明SUA值与CK-MB峰值水平可以作为反映急性心梗患者病情轻重的指标。

本研究显示SUA值和CK-MB峰值与患者左室射血分数(LVEF)呈负相关,与舒张末期左室内径(LVEDd)、收缩末期左室内径(LVEDs)呈正相关,说明SUA值与CK-MB峰值水平越高,左室收缩、舒张功能改变越明显^[14],心功能预后越差。通过对患者的SUA值与CK-MB峰值与Gensini冠状动脉病变积分进行相关性分析,发现二者呈正相关。G积分是对冠状动脉血管的病变程度的量化评价,分值越高,提示冠状动脉的病变程度越重,心脏的收缩或舒张功能就越容易受到影响^[15]。这就说明高尿酸血症和高CK-MB峰值患者冠状动脉的病变程度越重,预后越差。

SUA与CK-MB是急性心肌梗死患者常规检查指标,检查费用较低且方便操作^[16],可间接评估患者心功能以及预后。此外,心肌梗死患者尿酸及肌酸肌酶同工酶的水平变化可能对研究改善心功能和预后提供思路。但本研究样本量有限,还需要更大样本进一步深入研究。

参考文献

[1] 李昭,李南,马丽,等.青年急性心肌梗死患者流行病学特征分析[J].中国医药,2017,12(4):486-490.
[2] 李刚,朱春凯,郑培明.miR-499、miR-16、肌红蛋白与常规心肌损伤标志物的关系及在急性心肌梗死早期诊断中的价值[J].分子诊断与治疗杂志,2020,12(6):728-732.
[3] 郑淑瑛,蒋戈利,李俊峡.急性心肌梗死后康复运动研究

的进展与趋势[J].中国循证心血管医学杂志,2017,9(4):502-503.

[4] 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(2019)[J].中华心血管病杂志,2019,47(10):766-783.
[5] Schaitza GA, Faria Neto JR, Francisco JC, et al. Surgical treatment of a giant left ventricular aneurysm - a case report [J]. Rev Bras Cir Cardiovasc, 2014, 29(4):663-666.
[6] 梁菲菲,冀美佳,武俊华.重组人脑利钠肽对慢性心力衰竭患者心功能及心室重构的影响[J].海南医学,2017,28(1):20-23.
[7] 周霞,周少勃,李国庆,等.急性非ST段抬高型心肌梗死患者左室舒张末压的临床相关因素研究[J].中国循证心血管医学杂志,2015(6):780-783.
[8] 邓伏雪,王小娟,胡云凤,等.急性心肌梗死并发首次心力衰竭患者在院死亡率及临床预后分析[J].西安交通大学学报(医学版),2015,36(1):135-140.
[9] 苏小妹,贺珊,吴志红,等.急诊全程优化护理在抢救急性心肌梗死患者中的应用[J].护理实践与研究,2015(10):130-131.
[10] Edwards NL. The role of hyperuricemia in vascular disorders [J]. Curr Opin Rheumatol, 2009, 21(2):132.
[11] Kaya EB, Yorgun H, Canpolat U, et al. Serum uric acid levels predict the severity and morphology of coronary atherosclerosis detected by multidetector computed tomography [J]. Atherosclerosis, 2010, 213(1):178.
[12] 常琳,常佩云,刘娟.CK-MB、cTn I、冠脉造影及心电图联合诊断急性心肌梗死价值研究[J].分子诊断与治疗杂志,2020,12(8):1018-1021.
[13] 季亚玮,张岭楠,吴翔,等.急性心肌梗死患者血浆B型利钠肽水平与其相关因素的临床研究[J].交通医学,2016,30(5):426-429.
[14] 楼定进.艾司洛尔联合真武汤加味治疗急性心肌梗死后急性左心衰竭的疗效观察[J].中国中医急症,2015,24(3):530-532.
[15] 江冠颖,赵玉兰,董静,等.左室射血分数正常的急性ST段抬高型心肌梗死患者氨基末端B型利钠肽原水平与冠状动脉病变的关系[J].中国循环杂志,2017,32(2):137-140.
[16] 曾小会,张邑.IMA、H-FABP联合CK-MB在急性心肌梗死中的临床意义[J].海南医学院学报,2016,22(1):27-29.

(上接第1414页)

[16] 叶红,常中宝,童琳,等.8744例安徽地区女性人乳头瘤病毒亚型感染状况分析[J].中华疾病控制杂志,2019,23(10):1273-1278.
[17] 陆少艳,胡青坡.上海市浦东地区11822例女性HPV感染及亚型分布特征调查[J].中国妇幼保健,2019,34(19):4523-4526.
[18] Haegglblom L, Ursu RG, Mirzaie L, et al. No evidence for human papillomavirus having a causal role in salivary gland tumors[J]. BMC Infect Dis, 2018, 18(1):338-342.

[19] Lechner M, Vassie C, Kavasogullari C, et al. A cross-sectional survey of awareness of human papillomavirus-associated oropharyngeal cancers among general practitioners in the UK[J]. BMJ Open, 2018, 8(7):e023339.
[20] Zhang D, Li T, Chen L, et al. Epidemiological investigation of the relationship between common lower genital tract infections and high-risk human papillomavirus infections among women in Beijing, China [J]. Plos One, 2017, 12(5):e0178033.

miR-22-3p 对 IL-1 β 诱导软骨细胞损伤的影响及其机制研究

李巍 冯胜华 赵景明*

[摘要] 目的 探讨 miR-22-3p 对 IL-1 β 诱导软骨细胞损伤的影响及其作用机制。方法 分离培养大鼠软骨细胞, IL-1 β 处理细胞 48 h 构建细胞损伤模型。qRT-PCR 与 Western blot 检测 Con 组、IL-1 β 组、IL-1 β +miR-NC 组、IL-1 β +miR-22-3p 组、IL-1 β +si-NC 组、IL-1 β +si-TRIM8 组、IL-1 β +miR-22-3p+pcDNA 组、IL-1 β +miR-22-3p+pcDNA-TRIM8 组细胞中 miR-22-3p、TRIM8 的表达水平; ELISA 检测各组细胞 IL-6、IFN- γ 、TNF- α 的水平; 流式细胞术检测各组细胞凋亡率; 双荧光素酶报告实验验证 miR-22-3p 与 TRIM8 的靶向调控作用; Western blot 检测各组 Bcl-2、Bax 的表达量。结果 与对照组比较, IL-1 β 组细胞中 miR-22-3p 的表达水平、Bcl-2 蛋白水平显著降低 ($P<0.05$), 凋亡率显著升高 ($P<0.05$), TRIM8、Bax 的表达水平与 IL-6、IFN- γ 、TNF- α 的水平显著升高 ($P<0.05$); 转染 miR-22-3p mimics 或转染 si-TRIM8 可明显降低 IL-6、IFN- γ 、TNF- α 的水平与细胞凋亡率及 Bax 蛋白水平 ($P<0.05$), 增加 Bcl-2 蛋白水平 ($P<0.05$); 双荧光素酶报告实验证实 miR-22-3p 可靶向结合 TRIM8; 共转染 miR-22-3p mimics 与 pcDNA-TRIM8 可明显降低转染 miR-22-3p mimics 对细胞凋亡及炎症反应的抑制作用。结论 miR-22-3p 可靶向抑制 TRIM8 表达从而减轻 IL-1 β 诱导的软骨细胞炎症损伤及抑制细胞凋亡。

[关键词] miR-22-3p; TRIM8; IL-1 β ; 软骨细胞; 炎症; 凋亡

Effect of miR-22-3p on IL-1 β -induced chondrocyte damage by regulating the expression of TRIM8

LI Wei, FENG Shenghua, ZHAO Jingming*

(Spinal Surgery, Trauma Center, Qingdao Haici Medical Group, Qingdao, Shandong, China, 266033)

[ABSTRACT] Objective To investigate the effect of miR-22-3p on IL-1 β -induced chondrocyte injury and its mechanism. Methods Rat chondrocytes were isolated and cultured, and IL-1 β treated the cells for 48 h to construct a cell injury model. qRT-PCR and Western blotting were used to detect the expression levels of miR-22-3p and TRIM8 in Con group, IL-1 β group, IL-1 β +miR-NC group, IL-1 β +miR-22-3p group, IL-1 β +si-NC group, IL-1 β +si-TRIM8 group, IL-1 β +miR-22-3p+pcDNA group, IL-1 β +miR-22-3p+pcDNA-TRIM8 group. The levels of IL-6, IFN- γ and TNF- α in each group were detected by ELISA. Flow cytometry was used to detect the apoptosis rate of each group. The dual luciferase report assay was used to verify the targeted regulation of miR-22-3p and TRIM8. Western blotting was used to detect the expression of Bcl-2 and Bax in each group. Results Compared with the control group, the expression levels of miR-22-3p and Bcl-2 protein in IL-1 β treated cells were significantly reduced ($P<0.05$). The apoptosis rate was significantly increased ($P<0.05$), and the expression levels of TRIM8 and Bax and the levels of IL-6, IFN- γ , and TNF- α were significantly increased ($P<0.05$). Transfection of miR-22-3p mimics or transfection of si-TRIM8 can significantly reduce the levels of IL-6, IFN- γ , TNF- α , apoptosis rate and the protein level of Bax ($P<0.05$),

基金项目:山东省中医药科技发展计划项目(2019-0599)

作者单位:青岛市海慈医疗集团创伤中心脊柱外科,山东,青岛 266033

*通信作者:赵景明, E-mail:13678895761@yeah.net

and increase the protein Level of Bcl-2 ($P<0.05$). The dual luciferase report experiment confirmed that miR-22-3p could target TRIM8. Co-transfection of miR-22-3p mimics and pcDNA-TRIM8 can significantly reduce the inhibitory effect of miR-22-3p mimics on cell apoptosis and inflammation. Conclusion miR-22-3p overexpression can target the inhibition of TRIM8 expression to reduce IL-1 β -induced chondrocyte inflammatory damage and inhibit cell apoptosis.

[KEY WORDS] miR-22-3p; TRIM8; IL-1 β ; Chondrocytes; Inflammation; Apoptosis

骨关节炎是临床常见的一种疾病,软骨细胞凋亡率升高是骨关节炎发生的重要原因^[1-3]。miR-22-3p在氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)诱导的内皮细胞损伤中表达下调,上调miR-22-3p表达可保护ox-LDL诱导的内皮细胞损伤^[4]。通过生物学信息分析显示TRIM8可能是miR-22-3p的靶基因,TRIM8在缺血再灌注脑损伤中上调表达,沉默其表达可减轻缺血再灌注诱导的脑损伤^[5]。但miR-22-3p是否可靶向TRIM8从而影响软骨细胞损伤尚未可知。既往研究显示IL-1 β 属于促炎因子并可促进软骨细胞凋亡从而促进骨关节炎的发展^[6]。因此,本研究采用IL-1 β 处理软骨细胞构建骨关节炎模型,观察miR-22-3p与TRIM8的表达变化,探讨miR-22-3p对IL-1 β 诱导软骨细胞凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

9只SD大鼠,SPF级,购自南京君科生物工程有限公司,动物许可证号SCXK(宁):2016-0003。IL-1 β 购自美国Sigma公司;miR-22-3p mimics、miR-NC、si-TRIM8、si-NC、anti-miR-22-3p、anti-miR-NC购自上海吉玛制药技术有限公司;pcDNA3.1购自上海远慕生物科技有限公司;IL-6、IFN- γ 、TNF- α ELISA检测试剂盒购自上海酶联生物科技有限公司;Lipofectamine2000购自美国Invitrogen公司;Trizol试剂购自上海联迈生物工程有限公司;反转录试剂盒与荧光定量PCR试剂盒购自日本TaKaRa公司;细胞凋亡试剂盒购自北京博尔迈生物技术有限公司;荧光素酶报告基因载体购自南京中洪博元生物技术有限公司;双荧光素酶报告基因检测试剂盒购自美国Promega公司;兔抗鼠TRIM8抗体购自美国Abcam公司;兔抗鼠Bcl-2、Bax抗体购自美国CST公司;RIPA裂解液与BCA蛋白定量检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;HRP标记的山羊抗兔IgG二抗购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.2 方法

1.2.1 软骨细胞分离培养及实验分组

软骨细胞分离及培养方法^[7-8]。同时将正常培养的细胞作为Con组。分别将miR-NC、miR-22-3p mimics、si-NC、si-TRIM8、miR-22-3p mimics与pcDNA、miR-22-3p mimics与pcDNA-TRIM8转染至软骨细胞,加入浓度为10 ng/mL IL-1 β 处理48 h,分别记作IL-1 β +miR-NC组、IL-1 β +miR-22-3p组、IL-1 β +si-NC组、IL-1 β +si-TRIM8组、IL-1 β +miR-22-3p+pcDNA组、IL-1 β +miR-22-3p+pcDNA-TRIM8组。

1.2.2 实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测miR-22-3p、TRIM8 mRNA的表达水平

采用Trizol法提取细胞总RNA,应用紫外分光光度计测定RNA浓度。按照反转录试剂盒说明书将总RNA反转录为cDNA。qRT-PCR反应体系:cDNA 2 μ L,Real-Time Master Mix 10 μ L,正反向引物各1 μ L,RNase-Free ddH₂O补足体系至20 μ L;反应条件:95 $^{\circ}$ C 2 min,95 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 30 s(循环40次)。miR-22-3p以U6为内参,TRIM8以GAPDH为内参,采用2- $\Delta\Delta C_t$ 法计算miR-22-3p、TRIM8 mRNA的表达水平。

1.2.3 酶联免疫吸附法(ELISA)检测IL-6、IFN- γ 、TNF- α 含量

收集各组细胞培养上清液,检测IL-6、IFN- γ 、TNF- α 水平,严格按照试剂盒说明书进行操作。

1.2.4 流式细胞术检测细胞凋亡率

收集各组细胞,预冷PBS清洗,4 $^{\circ}$ C条件下经1 000 r/min离心10 min,加入500 μ L Binding Buffer悬浮细胞,依次加入5 μ L Annexin V-FITC,充分混匀,加入5 μ L PI,充分混匀,室温避光孵育10 min,利用流式细胞仪检测各组软骨细胞凋亡率。

1.2.5 双荧光素酶报告基因检测miR-22-3p的靶基因

StarBase预测显示miR-22-3p与miR-149-5p存在靶向关系,构建野生型载体WT-TRIM8、突变型

载体 MUT-TRIM8,取对数生长期软骨细胞,分别将 miR-NC、miR-22-3p mimics 与 WT-TRIM8、MUT-TRIM8 共转染至软骨细胞,检测各组荧光素酶活性。

1.2.6 蛋白免疫印迹(Western blot)检测 TRIM8、Bcl-2、Bax 蛋白表达

收集各组细胞,加入 RIPA 蛋白裂解液,提取细胞总蛋白,检测蛋白浓度,SDS-PAGE 分离蛋白,反应结束后转膜、封闭,加入 TRIM8(1:500)、Bcl-2(1:1 000)、Bax(1:1 000)一抗稀释液,4℃孵育过夜, TBST 洗涤,加入二抗稀释液(1:2 000),暗室内曝光显影,置于自动凝胶成像系统分析各蛋白条带。

1.3 统计学处理

应用 SPSS 21.0 统计学软件分析数据,计量资料均符合正态分布,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,以 *P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-22-3p 和 TRIM8 在 IL-1β 诱导软骨细胞损伤中的表达

与 Con 组比较,IL-1β 组细胞中 miR-22-3p 的表达水平显著降低,差异有统计学意义 (*P* < 0.05), TRIM8 mRNA 及蛋白表达水平显著升高,差异有统计学意义 (*P* < 0.05),见表 1。

表 1 miR-22-3p 和 TRIM8 在 IL-1β 诱导软骨细胞损伤中的表达 $(\bar{x} \pm s)$

Table 1 Expression of miR-22-3p and TRIM8 in IL-1β-induced chondrocyte injury $(\bar{x} \pm s)$

分组	<i>n</i>	miR-22-3p	TRIM8 mRNA	TRIM8 蛋白
Con	9	1.00±0.06	0.99±0.05	0.39±0.04
IL-1β	9	0.41±0.05	3.11±0.29	0.78±0.07
<i>t</i> 值		22.663	21.612	14.512
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000

2.2 miR-22-3p 过表达对 IL-1β 诱导软骨细胞损伤的影响

与 Con 组比较,IL-1β 组细胞 IL-6、IFN-γ、TNF-α 水平、细胞凋亡率及 Bax 蛋白水平显著升高,差异有统计学意义 (*P* < 0.05), Bcl-2 蛋白水平显著降低,差异有统计学意义 (*P* < 0.05),与 IL-1β+miR-NC 组比较,IL-1β+miR-22-3p 组细胞 IL-6、IFN-γ、TNF-α 水平、Bax 蛋白水平、细胞凋亡率显著降低,差异有统计学意义 (*P* < 0.05), Bcl-2 蛋白水平显著升高,差异有统计学意义 (*P* < 0.05),见表 2。

2.3 抑制 TRIM8 表达对 IL-1β 诱导软骨细胞损伤的影响

与 IL-1β+si-NC 组比较,IL-1β+si-TRIM8 组细胞 IL-6、IFN-γ、TNF-α 水平显著降低 (*P* < 0.05),细胞凋亡率显著降低 (*P* < 0.05), Bcl-2 蛋白水平显著升高 (*P* < 0.05), Bax 蛋白水平显著降低 (*P* < 0.05),见表 3。

表 2 miR-22-3p 过表达对 IL-1β 诱导软骨细胞损伤的影响 $(\bar{x} \pm s)$

Table 2 The effect of miR-22-3p overexpression on chondrocyte injury induced by IL-1β $(\bar{x} \pm s)$

分组	<i>n</i>	miR-22-3p	IL-6 (ng/L)	IFN-γ (ng/L)	TNF-α (ng/L)	凋亡率 (%)	Bcl-2 蛋白	Bax 蛋白
Con	9	1.01±0.06	2.45±0.25	11.54±1.12	7.22±0.71	6.32±0.61	0.73±0.07	0.22±0.03
IL-1β	9	0.46±0.04 ^a	7.55±0.71 ^a	62.33±6.14 ^a	31.65±3.11 ^a	24.13±2.11 ^a	0.30±0.03 ^a	0.63±0.06 ^a
IL-1β+miR-NC	9	0.44±0.04	7.61±0.72	64.28±6.32	33.27±3.35	25.36±2.32	0.28±0.03	0.65±0.05
IL-1β+miR-22-3p	9	0.82±0.08 ^b	3.56±0.35 ^b	17.25±1.54 ^b	10.87±1.01 ^b	11.25±1.14 ^b	0.64±0.05 ^b	0.33±0.03 ^b
<i>F</i> 值		213.159	214.146	355.917	297.734	279.116	209.054	211.861
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注:与 Con 组比较,^a*P* < 0.05;与 IL-1β+miR-NC 组比较,^b*P* < 0.05。

表 3 抑制 TRIM8 表达对 IL-1β 诱导软骨细胞损伤的影响 $(\bar{x} \pm s)$

Table 3 The effect of inhibiting TRIM8 expression on IL-1β-induced chondrocyte injury $(\bar{x} \pm s)$

分组	<i>n</i>	TRIM8 蛋白	IL-6 (ng/L)	IFN-γ (ng/L)	TNF-α (ng/L)	凋亡率 (%)	Bcl-2 蛋白	Bax 蛋白
Con	9	0.36±0.03	2.67±0.26	10.32±1.04	7.01±0.69	7.36±0.71	0.72±0.06	0.21±0.03
IL-1β	9	0.77±0.07 ^a	7.84±0.77 ^a	61.39±6.11 ^a	32.45±3.22 ^a	23.66±2.31 ^a	0.31±0.03 ^a	0.62±0.06 ^a
IL-1β+si-NC	9	0.79±0.08	7.91±0.76	63.54±6.21	34.67±3.41	24.87±2.43	0.30±0.03	0.63±0.06
IL-1β+si-TRIM8	9	0.43±0.04 ^b	3.86±0.38 ^b	24.15±2.44 ^b	15.28±1.52 ^b	13.58±1.36 ^b	0.59±0.05 ^b	0.39±0.04 ^b
<i>F</i> 值		131.196	190.634	220.852	261.030	185.700	198.987	150.773
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注:与 Con 组比较,^a*P* < 0.05;与 IL-1β+si-NC 组比较,^b*P* < 0.05。

2.4 miR-22-3p 靶向调控 TRIM8 的表达

StarBase 预测显示 TRIM8 的 3'UTR 中含有与 miR-22-3p 互补的核苷酸序列,见图 1。双荧光素酶报告实验结果显示,共转染野生型载体 WT-TRIM8 的细胞实验中,与 miR-NC 组比较,miR-22-3p 组荧光素酶活性显著降低 ($P<0.05$);共转染突变型载体 MUT-TRIM8 的细胞实验中,miR-22-3p 组荧光素酶活性与 miR-NC 组比较差异无统计学意义 ($P>0.05$),见表 4。与 miR-NC 组比较,miR-22-3p 组细胞中 TRIM8 蛋白水平显著降低 ($P<0.05$);与 anti-miR-NC 组比较,anti-miR-22-3p 组细胞中 TRIM8 蛋白水平显著升高 ($P<0.05$)。见表 5。

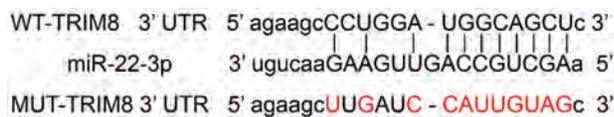


图 1 TRIM8 的 3'UTR 中含有与 miR-22-3p 互补的核苷酸序列

Figure 1 TRIM8 3'UTR contains a nucleotide sequence complementary to miR-22-3p

表 4 双荧光素酶报告实验检测 miR-22-3p 与 TRIM8 的靶向关系 ($\bar{x}\pm s$)

分组	n	WT-TRIM8	MUT-TRIM8
miR-NC	9	1.02±0.06	0.99±0.05
miR-22-3p	9	0.48±0.04 ^a	1.00±0.05
t 值		22.465	0.424
P 值		0.000	0.677

注:与 miR-NC 组比较,^a $P<0.05$ 。

2.5 TRIM8 过表达逆转了 miR-22-3p 过表达对 IL-1 β 诱导软骨细胞损伤的作用

与 IL-1 β +miR-22-3p+pcDNA 组比较,IL-1 β +

表 5 敲除或过表达 miR-22-3p 对 TRIM8 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$)

Table 5 Effect of knockout or overexpression of miR-22-3p on TRIM8 protein expression ($\bar{x}\pm s$)

分组	n	TRIM8 蛋白
miR-NC	9	0.41±0.04
miR-22-3p	9	0.20±0.02 ^a
anti-miR-NC	9	0.38±0.03
anti-miR-22-3p	9	0.83±0.07 ^b
F 值		328.154
P 值		0.000

注:与 miR-NC 组比较,^a $P<0.05$;与 anti-miR-NC 组比较,^b $P<0.05$ 。

miR-22-3p+pcDNA-TRIM8 组细胞 IL-6、IFN- γ 、TNF- α 水平显著升高 ($P<0.05$),细胞凋亡率显著升高 ($P<0.05$),Bcl-2 蛋白水平显著降低 ($P<0.05$),Bax 蛋白水平显著升高 ($P<0.05$)。见表 6。

3 讨论

miR-22-3p 在视网膜病变中表达降低,抑制视网膜色素上皮细胞损伤^[9]。miR-22-3p 过表达可减轻阿尔茨海默症细胞模型损伤^[10]。miR-22-3p 可减轻牙周膜干细胞炎症反应并可调控细胞分化^[11]。本研究结果提示 miR-22-3p 表达量降低可能促进细胞损伤的发生。为探究 miR-22-3p 在软骨细胞损伤中的作用机制,已有报道指出 IL-6、IFN- γ 、TNF- α 水平升高可加重炎症反应从而促进多种疾病发生^[12]。本研究结果提示 miR-22-3p 过表达可减轻 IL-1 β 诱导的软骨细胞炎症损伤。同时本研究结果显示 IL-1 β 处理后软骨细胞凋亡率显著增加,而 miR-22-3p 过表达后软骨细胞凋亡率显著降低,提示 miR-22-3p 过表达可抑制 IL-1 β 诱导的软骨细胞凋亡。为进一步验证其可能调控机制,本研究检测抗细胞凋亡蛋白 Bcl-2 和促细胞凋亡蛋白 Bax 的表达。已有研究表明当细胞接收调

表 6 TRIM8 过表达逆转了 miR-22-3p 过表达对 IL-1 β 诱导软骨细胞损伤的作用 ($\bar{x}\pm s$)

Table 6 TRIM8 overexpression reverses the effect of miR-22-3p overexpression on IL-1 β -induced chondrocyte injury ($\bar{x}\pm s$)

分组	n	TRIM8 蛋白	IL-6 (ng/L)	IFN- γ (ng/L)	TNF- α (ng/L)	凋亡率 (%)	Bcl-2 蛋白	Bax 蛋白
IL-1 β +miR-NC	9	0.76±0.07	7.71±0.69	63.54±6.33	32.48±3.22	26.14±2.63	0.29±0.03	0.64±0.06
IL-1 β +miR-22-3p	9	0.33±0.03 ^a	3.42±0.34 ^a	16.47±1.65 ^a	11.25±1.13 ^a	12.36±1.23 ^a	0.66±0.05 ^a	0.31±0.03 ^a
IL-1 β +miR-22-3p+pcDNA	9	0.32±0.03	3.40±0.33	16.24±1.62	10.52±1.06	11.47±1.15	0.67±0.04	0.29±0.03
IL-1 β +miR-22-3p+pcDNA-TRIM8	9	0.65±0.06 ^b	7.12±0.71 ^b	52.13±5.21 ^b	26.33±2.61 ^b	20.33±2.13 ^b	0.41±0.04 ^b	0.53±0.05 ^b
F 值		175.340	161.510	295.322	234.315	122.120	193.591	132.873
P 值		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注:与 IL-1 β +miR-NC 组比较,^a $P<0.05$;与 IL-1 β +miR-22-3p+pcDNA 组比较,^b $P<0.05$ 。

亡信号时, Bcl-2 表达下调, Bax 表达上调, 并可激活 caspase 联级反应从而诱导细胞凋亡^[13]。本研究结果显示 IL-1 β 处理后软骨细胞中 Bcl-2 表达下调, Bax 表达上调, 而 miR-22-3p 过表达后软骨细胞中 Bcl-2 表达上调, Bax 表达下调, 提示 miR-22-3p 过表达可能通过调控 Bcl-2、Bax 蛋白表达从而抑制软骨细胞凋亡。

TRIM8 在 OGD/R 诱导的神经元细胞损伤中表达上调, 敲低其表达可升高 OGD/R 诱导的神经元细胞活性, 降低细胞凋亡, 减少 ROS 的产生^[14]。TRIM8 在肝缺血再灌注损伤小鼠模型中高表达, 沉默其表达可抑制缺血再灌注诱导的肝炎症损伤和细胞凋亡^[15]。本研究结果显示 IL-1 β 处理后软骨细胞中 TRIM8 的表达量显著升高, 进一步研究显示抑制 TRIM8 表达后可显著降低 IL-1 β 诱导软骨细胞中 IL-6、IFN- γ 、TNF- α 的水平, 并可降低软骨细胞凋亡率, 还可促进 Bcl-2 表达及抑制 Bax 表达, 提示抑制 TRIM8 表达可减轻 IL-1 β 诱导软骨细胞损伤。本研究通过双荧光素酶报告实验与 Western blot 实验证实 miR-22-3p 可靶向结合 TRIM8, 并可负向调控 TRIM8 的表达及活性, 为探究 miR-22-3p 是否可通过靶向 TRIM8 从而参与软骨细胞损伤过程, 本研究将 pcDNA-TRIM8 与 miR-22-3p mimics 共转染至软骨细胞, 随后使用 IL-1 β 处理, 结果显示 IL-6、IFN- γ 、TNF- α 水平显著升高, 细胞凋亡率显著升高, Bcl-2 蛋白水平显著降低, Bax 蛋白水平显著升高, 提示 miR-22-3p 过表达可能通过下调 TRIM8 表达而降低炎症反应及抑制软骨细胞凋亡。

综上所述, IL-1 β 诱导的软骨细胞中 miR-22-3p 的表达下调, TRIM8 的表达上调, miR-22-3p 过表达可能通过调控 TRIM8 表达从而减轻 IL-1 β 诱导的软骨细胞炎症损伤, 并可抑制软骨细胞凋亡, 可为骨关节炎的治疗提供理论依据。

参考文献

[1] Chen J, Gu YT, Xie JJ, et al. Gastrodin reduces IL-1 β -induced apoptosis, inflammation, and matrix catabolism in osteoarthritis chondrocytes and attenuates rat cartilage degeneration, in vivo[J]. Biomed Pharmacother, 2017, 97(1): 642-651.

[2] Huang Z, Zhou M, Wang Q, et al. Mechanical And Hypoxia Stress Can Cause Chondrocytes Apoptosis through Over-acti-

vation of Endoplasmic Reticulum Stress[J]. Arch Oral Biol, 2017, 84(1): 125-135.

[3] Wang J, Chen L, Jin S, et al. Altered expression of microRNA-98 in IL-1 β -induced cartilage degradation and its role in chondrocyte apoptosis [J]. Mol Med Rep, 2017, 16 (3) : 3208-3216.

[4] Tang Y, Jin X, Xiang Y, et al. The lncRNA MALAT1 protects the endothelium against ox-LDL-induced dysfunction via upregulating the expression of the miR-22-3p target genes CXCR2 and AKT[J]. FEBS Lett, 2015, 589(20): 3189-3196.

[5] Bai X, Zhang YL, Liu LN. Inhibition of TRIM8 restrains ischaemia-reperfusion-mediated cerebral injury by regulation of NF- κ B activation associated inflammation and apoptosis [J]. Exp Cell Res, 2020, 7(1): 111818-111828.

[6] 章国银, 章礼炜, 范少华, 等. 槲皮苷对 IL-1 β 诱导的软骨细胞凋亡的影响及其机制[J]. 武汉大学学报(医学版), 2018, 39(5): 745-749.

[7] 夏韶疆, 王俊文, 程文俊, 等. 藜本内酯对白细胞介素-1 β 诱导大鼠软骨细胞凋亡的保护作用及其机制[J]. 中华实验外科杂志, 2019, 36(9): 1630-1633.

[8] 林燕云, 游纯秋, 蒋擎, 等. 独活寄生汤抑制白细胞介素-1 β 诱导的软骨细胞凋亡的作用机制[J]. 中国老年学杂志, 2019, 39(7): 172-175.

[9] Hu Z, Lv X, Chen L, et al. Protective effects of microRNA-22-3p against retinal pigment epithelial inflammatory damage by targeting NLRP3 inflammasome [J]. J Cell Physiol, 2019, 234(10): 18879-18857.

[10] Ji Q, Wang X, Cai J, et al. MiR-22-3p Regulates Amyloid β Deposit in Mice Model of Alzheimer's Disease by Targeting Mitogen-activated Protein Kinase 14[J]. Curr Neurovasc Res, 2019, 16(5): 473-480.

[11] Zheng M, Guo J. Nicotinamide-induced silencing of SIRT1 by miR-22-3p increases periodontal ligament stem cell proliferation and differentiation[J]. Cell Biol Int, 2019, 26(1): 1-10.

[12] 张信鸽, 刘新, 赵丹晖. IFN- γ 、IL-6、sIL-2R 在初治型肺结核患者血清中的变化意义研究[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(6): 777-780.

[13] 崔勇, 王艳杰, 赵丹玉, 等. 藏花素对 H₂O₂ 诱导 PC12 细胞 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 的影响[J]. 天然产物研究与开发, 2015, 27(3): 411-415.

[14] Zhao W, Zhang X, Chen Y, et al. Downregulation of TRIM8 protects neurons from oxygen-glucose deprivation/re-oxygenation-induced injury through reinforcement of the AMPK/Nrf2/ARE antioxidant signaling pathway [J]. Brain Res, 2020, 1728(1): 146590-146598.

[15] Tao Q, Tianyu W, Jiangqiao Z, et al. Tripartite Motif 8 Deficiency Relieves Hepatic Ischaemia/reperfusion Injury via TAK1-dependent Signalling Pathways [J]. Int J Biol Sci, 2019, 15(8): 1618-1629.

瞬时感受器电位香草酸受体1抑制剂在神经病理性疼痛中的研究进展

盛树悦¹ 田映红² 张兴梅^{3*}

[摘要] 神经病理性疼痛(NPP)是当今社会中十分常见的一种症状,引起神经病理性疼痛的具体机制还不清楚,且尚未出现能够有效治疗神经病理性疼痛的药物。近年来研究者发现瞬时感受器电位(TRP)通道参与细胞内多种反应,其中瞬时感受器电位香草酸受体1(TRPV1)与神经病理性疼痛关系最为密切,可能是治疗神经病理性疼痛的重要靶点之一。文章综述了神经病理性疼痛的概况与TRP通道家族的组成与功能,重点阐述了TRPV1抑制剂作为靶向药物在神经病理性疼痛中的研究进展,旨在为神经病理性疼痛的药物治疗提供新的研究方向。

[关键词] 神经病理性疼痛;瞬时感受器电位香草酸受体1;抑制剂

Research progress of transient Receptor Potential Vanilloid 1 inhibitors in neuropathic pain

SHENG Shuyue¹, TIAN Yinghong², ZHANG Xingmei^{3*}

(1. The First Affiliated Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong, China, 510515; 2. Experimental teaching management center, School of Basic Medical Science, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong, China, 510515; 3. Department of Neurobiology, School of Basic Medical Science, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong, China, 510515)

[ABSTRACT] Neuropathic pain (NPP) is a very common symptom in current society. However, the mechanism of NPP is still unclear, and there are no effective drugs which can effectively treat NPP. In recent years, Transient Receptor Potential (TRP) channels are found to be involved in multiple intracellular responses. Transient Receptor Potential Vanilloid 1, TRPV1 is closely related to NPP, which makes its inhibitors as important drugs targeted for NPP. This article summarizes the overview of NPP and the composition and function of the TRP channel family. The focus is on the research progress of TRPV1 inhibitors as targeted drugs in neuropathic pain, and provides a new research direction for drug therapy of neuropathic pain.

[KEY WORDS] neuropathic pain; transient Receptor Potential Vanilloid 1; inhibitor

神经病理性疼痛(neuropathic pain, NPP)是指由躯体感觉系统的损害或疾病导致的疼痛^[1],常见症状是机械性异常性疼痛和痛觉过敏,还包括糖尿病性神经病变、化疗后引起的神经病变、带状疱疹后神经痛、脊髓损伤和幻肢痛等^[2]。

引起神经病理性疼痛的具体机制尚未明确,包括外周机制和中枢机制^[3]。外周机制包括外周敏化、交感神经高兴奋性相关疼痛,可由炎症因子如降钙素基因相关肽和P物质等引起^[3]。中枢机制包括脊髓机制和脊髓上中枢机制。细胞水平的

基金项目:国家自然科学基金(81771484);广东省自然科学基金(2018A030313835)

作者单位:1. 南方医科大学第一临床医学院,广东,广州 510515

2. 南方医科大学基础医学院实验教学管理中心,广东,广州 510515

3. 南方医科大学基础医学院神经生物学教研室,广东,广州 510515

*通讯作者:张兴梅, E-mail: zxmray@hotmail.com

机制涉及离子通道,如 Na^+ 、 Ca^{2+} 、 K^+ ,离子型和代谢型受体,如血清素受体、肾上腺素能受体、神经肽和香草素受体;多种炎症因子等^[3]。

近年来研究提示瞬时感受器电位(transient receptor potential, TRP)与神经病理性疼痛相关,尤其是TRP家族中TRPV1(transient receptor potential vanilloid 1)。已在神经病理性疼痛模型动物中观察到TRPV1表达增加^[4],并且在药理学研究中发现TRPV1能下调多种疼痛刺激物质的产生^[5]。本文将综述与神经病理性疼痛机制相关的瞬时感受器电位作用机制,总结其抑制剂在治疗神经病理性疼痛中的研究进展,为神经病理性疼痛的治疗提供一种新方向。

1 瞬时感受器电位

瞬时感受器电位(transient receptor potential, TRP)通道最初在分析果蝇的视觉突变体时发现,与野生型果蝇中的持续受体电位相反,该突变体显示出对光的短暂响应^[6]。TRP通道分为七个亚群:TRPC,TRPV,TRPM,TRPP,TRPML,TRPA和TRPN^[7]。TRPC、TRPM、TRPA和TRPV亚家族中存在一段由6个氨基酸构成的保守序列,位于羧基末端,称为TRP盒(TRP box)。有研究表明TRP盒对TRP通道的通道门控有重要作用^[8]。TRP通道涉及人体内多种感觉功能^[9]。TRP通道的突变会引起多种疾病,如肾病(TRPC6)、自发性疼痛综合征(TRPA1)、低镁血症(TRPM6)、夜盲症(TRPM1)^[5]。

TRPV1(transient receptor potential vanilloid 1)又称辣椒素受体,是一种非选择性阳离子通道,位于细胞膜上和许多细胞器膜上,对 Ca^{2+} 有高度选择性,对其他阳离子也有一定的选择透过性。TRPV1可以被多种物质激活,内源性激动剂包括花生四烯乙醇胺、2-花生四烯酸酰甘油和溶血磷脂酸,外源性激动剂包括多种节肢动物的毒素。对该受体有效的刺激有温度、辣椒素、PH值。目前研究提示TRPV1调控神经病理性疼痛可能的机制之一是当有刺激激活TRP通道,导致大量 Ca^{2+} 穿过胞膜内流,导致膜去极化,进而触发电压门控离子通道依赖性动作电位^[10],引起痛觉向神经中枢传递。TRPV1在中枢神经系统和周围神经系统均有表达,主要表达在背根神经节和三叉神经上^[11-12]。

2 TRPV1抑制剂治疗神经病理性疼痛的研究进展

目前治疗神经病理性疼痛的药物较局限,一线推荐用药为抗癫痫药(如普瑞巴林、加巴喷丁)、三环类抗抑郁药、选择性5-羟色胺和去甲肾上腺素再摄取抑制剂^[13]。

从1989年TRP家族通道被发现以来,TRPV1参与神经病理性疼痛的作用是近几年研究的热点。下文将综述TRPV1抑制剂用于治疗神经病理性疼痛的研究进展。

2.1 辣椒平(capsazepine)

1994年,辣椒平第一个被证实是辣椒素的竞争性拮抗剂^[14]。辣椒平能够竞争TRPV1上的辣椒素结合位点,阻断辣椒素诱导的大鼠背根神经节上的离子通道激活。虽然辣椒平在实验室研究中作用显著,但是目前还未将其应用于临床,主要是存在以下几个局限性:首先是因为实验用的动物基本都是啮齿动物,啮齿动物的代谢稳定性差,药代动力学不稳定^[15]。另一个原因是辣椒平的选择性不高,除了拮抗TRPV1,还抑制烟碱型乙酰胆碱受体、电压门控 Ca^{2+} 通道和TRPM8,引起相应的副作用,如肌无力等。

2.2 AS1928370

(R)-N-(1-甲基-2-氧代-1,2,3,4-四氢-7-喹啉基)-2-[(2-甲基吡咯烷-1-基)甲基]联苯-4-甲酰胺(AS1928370)是一种新型TRPV1拮抗剂,能够与TRPV1受体上的树脂毒素结合位点结合并抑制辣椒素介导的内向电流^[16]。

在小鼠L5/L6脊神经结扎模型中,研究人员采用了口服和鞘内注射AS1928370研究其镇痛作用。结果显示,口服AS1928370能显著改善机械异常性疼痛;鞘内注射AS1928370能上调脊神经结扎小鼠模型的机械疼痛阈值^[17]。对实验大鼠进行旋转仪测试AS1928370相关副作用,发现服用AS1928370对此没有显著影响。相比较现今治疗神经病理性疼痛的一线药物常常会引起中枢系统副作用,AS1928370在治疗剂量下产生中枢副作用可能性较小^[16],由此可见,AS1928370在神经病理性疼痛治疗中有潜在研究价值。

2.3 二烯酰胺(dimeramide)

5,5-二苯基戊二烯酰胺是一系列能够靶向拮抗体外和体内TRPV1的化合物^[18]。为了达到更好

药代动力学目标,有研究显示,在5号位上用苯环加烷氧基取代的替代物(2E,4Z)-N-[(3R)-3-hydroxy-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydro-5-quinolyl]-5-(4-isopropoxyphenyl)-5-(4-trifluoromethylphenyl)-2,4-pentadienamide((R)-36b)通过血脑屏障的能力显著提高。体内实验证实该化合物能够有效抑制由辣椒素诱导的Ca²⁺通道开放作用,并且能够以剂量依赖的方式逆转大鼠的机械性异常性疼痛,并且能够在坐骨神经损伤诱导的神经病理性疼痛模型中显著逆转热痛觉过敏^[18]。

2.4 α-菠菜甾醇(α-spinasterol)

α-菠菜甾醇是一种具有抗炎、抗氧化和抗伤害感受的作用的TRPV1的拮抗剂,同时也是一种环氧酶(cyclooxygenase, COX)抑制剂。在神经病理性疼痛的产生机制中,COX反应的终产物前列腺素E2(PGE2)可以作为内源性物质激活TRPV1。因此α-菠菜甾醇不仅通过抑制COX减少PGE2的产生,还能拮抗TRPV1,能够作为镇痛药的新靶点^[19]。

在小鼠实验中,口服α-菠菜甾醇减少了术后疼痛,并减少损伤组织中的细胞浸润^[20]。此外,还观察到α-菠菜甾醇在不改变动物体温的情况下能够显著抑制COX-1和COX-2的活性。α-菠菜甾醇是一种有效且安全的TRPV1拮抗剂和COX抑制剂,在术后疼痛和神经病理性疼痛模型中具有镇痛作用^[20]。

2.5 SZV 1287([3-(4,5-diphenyl-1,3-oxazol-2-yl)propanal oxime])

SZV 1287[3-(4,5-二苯基-1,3-恶唑-2-基)丙醛肟]([3-(4,5-diphenyl-1,3-oxazol-2-yl)propanal oxime])是一种新型氨苄西林敏感的胺氧化酶(semicarbazide-sensitive amine oxidase, SSAO)抑制剂。SSAO分解伯胺(如甲胺,氨基丙酮)生成相应的醛、氨和过氧化氢^[21],可作用于TRPV1受体并使之活性降低。体内实验证实,在创伤性神经病理性疼痛的小鼠模型中,SZV1287显著抑制了由TRPV1活化诱导的急性化学感受性痛觉过敏。在野生型小鼠和TRPV1基因敲除小鼠的对照实验中,野生型坐骨神经结扎的小鼠在SZV1287给药7天后,有半数小鼠神经性痛阈显著降低,而在基因敲除小鼠中未观察到该现象。上述研究结果说明SZV1287不仅通过抑制SSAO减少组织激活物的产生,同时也可抑制TRPV1的作用,使之成为新型

镇痛药的热门研究对象^[22]。

2.6 针对TRPV1的小分子RNA

小干扰RNA(small interfering RNA, siRNA)是一类长度在20-50个核苷酸的RNA链,通过RNA干扰,与宿主细胞的mRNA互补结合并使之降解,抑制宿主基因的表达。在神经病理性疼痛大鼠模型实验中,与对照组对比,单侧坐骨神经慢性压迫损伤(CCI: Chronic constriction injury)诱导的大鼠对机械刺激和热刺激的敏感性均明显升高。并通过蛋白质检测发现TRPV1蛋白在前扣带回皮质、背角和背根节的表达明显增强。给大鼠鞘内注射靶向TRPV1的siRNA载体,结果表明,实验组大鼠的冷刺激诱导的痛觉明显减少。同时,研究者同时检测了脊髓背角中细胞外信号调节激(Extracellular signal-regulated kinases, ERK)、钙调素依赖性激酶(CaM-dependent kinases, CaMKs)水平。先前已经有证据证实ERK磷酸化后在神经元可塑性和痛觉加工过程中起着重要的作用,而CaMKs参与ERK激活^[4],从而参与疼痛产生的过程。在CCI大鼠模型中,CaMKII、ERK磷酸化作用两者均升高,通过TRPV1siRNA下调脊髓TRPV1蛋白的表达后,脊髓TRPV1和CaMKII的表达减低,ERK的磷酸化作用也减少,提示TRPV1siRNA介导的止痛作用可能与下调CaMKII表达和减少ERK的磷酸化有关^[23]。

短发夹RNA(short-hairpin RNA, shRNA)是一类形成发夹结构的非编码小RNA分子,可通过RNA干扰来抑制基因的表达。Hirai等^[24]将靶向TRPV1的AAV9载体(AAV9-shTRPV1)向神经选择性神经损伤(spared nerve injury, SNI)模型小鼠鞘内给药,实验结果显示AAV9-shTRPV1处理组在治疗后第10天至第28天对50℃温度刺激的痛觉潜伏期显著增加,其他两种刺激两组无显著差别。在注射4周后,AAV9-shTRPV1处理组小鼠的DRG中的TRPV1表达水平降低约55%,在脊髓中降低约95%。该研究结果既证实TRPV1在神经病理性疼痛中起着关键作用,也表明AAV9-shTRPV1的热镇痛作用,在实验过程中未观察到明显副作用。

除了靶向TRPV1的siRNA、shRNA有较明显的镇痛作用,也有研究证明靶向长链非编码RNA(long noncoding RNAs, lncRNA)可以通过TRPV1产生镇痛的作用^[25]。Lnc RNAs是RNA聚合酶II

转录的副产物,目前对 lnc RNA 的研究还不清楚,可能在细胞内许多重要调控过程中发挥作用。lnc RNA BC168687 是 lnc RNAs 分子之一,具体作用还不清楚,但有 Liu 等^[25]通过实验发现在糖尿病性神经性疼痛(Diabetic neuropathic pain, DNP)的大鼠 DRG 中,lnc RNA BC168687 的表达水平明显增高。Liu 等^[26]通过动物实验发现,lnc RNA BC168687 siRNA 能够明显提高 DNP 大鼠的机械刺激缩足阈值(mechanical withdrawal thresholds, MWT)和延长热刺激缩足潜伏期(thermal withdrawal latencies, TWL),能够抑制大鼠 DRG 中 TRPV1 mRNA 的表达,同时也明显降低大鼠 DRG 中 TRPV1 受体。

3 结论与展望

神经病理性疼痛是指由躯体感觉系统的损害或疾病导致的疼痛,主要症状是异常自发性疼痛、痛觉过敏和痛觉过敏等。目前用于神经病理性疼痛治疗的药物有限,作用局限,很多患者为此忍受痛苦进而影响生活质量。研究出靶向神经病理性疼痛的药物迫在眉睫。TRPV1 是一种非选择性阳离子通道,可以被多种内源性或外源性物质激活。该通道的激活与炎症和疼痛相关,尽管 TRPV1 参与疼痛产生的具体机制尚未阐明,有实验证据表明 TRPV1 通过激活钙调素依赖性激酶,引起细胞中细胞外信号调节磷酸化作用增强,进而参与神经病理性疼痛发生和维持的过程。但是这些发现也不排除其他信号分子参与这一过程。一系列 TRPV1 抑制剂如 2-(3-氟-4-甲基磺酰氨基苯基)丙酰胺、二烯酰胺、 α -菠菜甾醇、SZV 1287、针对 TRPV1 的小分子 RNA(包括 siRNA、shRNA、lncRNA)、zinc 在细胞水平和动物模型上显示出较好的神经病理性疼痛治疗的作用。然而真正进入临床阶段的药物还是很少。因为现有研究结果证实 TRPV1 抑制剂也有局限性,主要在于两个副作用:意外烧伤和高温。许多 TRPV1 抑制剂因为引起患者高体温而被终止临床试验,有研究者建议通过服用普通退热药如对乙酰氨基酚来控制体温,但更有效的方法应该是我们医学工作者通过化学修饰来减少这些化合物产生的高温的副作用,表明通过进一步优化 TRPV1 抑制剂的物理性质、化学结构,对于 TRPV1 抑制剂用于靶向治疗神经病理性疼痛具有重大意义。

参考文献

- [1] Jensen TS, Baron R, Haanpää M, et al. A new definition of neuropathic pain[J]. *Pain*, 2011, 152(10):2204-2205.
- [2] Aghazadeh TM, Baraldi PG, Baraldi S, et al. Medicinal Chemistry, Pharmacology, and Clinical Implications of TRPV1 Receptor Antagonists[J]. *Med Res Rev*, 2017, 37(4):936-983.
- [3] Cohen SP, Mao J. Neuropathic pain: mechanisms and their clinical implications[J]. *BMJ*, 2014, 348:f7656.
- [4] Leo M, Schmitt LI, Erkel M, et al. Cisplatin-induced neuropathic pain is mediated by upregulation of N-type voltage-gated calcium channels in dorsal root ganglion neurons[J]. *Exp Neurol*, 2017, 288:62-74.
- [5] Carnevale V, Rohacs T. TRPV1: A Target for Rational Drug Design[J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2016, 9(3).
- [6] Montell C, Rubin GM. Molecular characterization of the *Drosophila* trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction[J]. *Neuron*, 1989, 2(4):1313-1323.
- [7] Li M, Yu Y, Yang J. Structural biology of TRP channels[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2011, 704:1-23.
- [8] Valente P, García-Sanz N, Gomis A, et al. Identification of molecular determinants of channel gating in the transient receptor potential box of vanilloid receptor I[J]. *FASEB J*, 2008, 22(9):3298-3309.
- [9] Vriens J, Nilius B, Voets T. Peripheral thermosensation in mammals[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2014, 15(9):573-589.
- [10] Bölskei K, Helyes Z, Szabó A, et al. Investigation of the role of TRPV1 receptors in acute and chronic nociceptive processes using gene-deficient mice[J]. *Pain*, 2005, 117(3):368-376.
- [11] Carnevale V, Rohacs T. TRPV1: A Target for Rational Drug Design[J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2016, 9(3).
- [12] E T. *Neurobiology of TRP Channels*[M]. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis, 2017.
- [13] 张静泽, 王宇飞, 武剑. 神经病理性疼痛药物治疗史[J]. *临床药物治疗杂志*, 2017, 15(12):70-75.
- [14] Walpole CS, Bevan S, Bovermann G, et al. The discovery of capsaizepine, the first competitive antagonist of the sensory neuron excitants capsaicin and resiniferatoxin[J]. *J Med Chem*, 1994, 37(13):1942-1954.
- [15] Vriens J, Appendino G, Nilius B. Pharmacology of vanilloid transient receptor potential cation channels[J]. *Mol Pharmacol*, 2009, 75(6):1262-1279.
- [16] Watabiki T, Kiso T, Kuramochi T, et al. Amelioration of neuropathic pain by novel transient receptor potential vanilloid 1 antagonist AS1928370 in rats without hyperthermic effect[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2011, 336(3):743-750.
- [17] Watabiki T, Kiso T, Tsukamoto M, et al. Intrathecal administration of AS1928370, a transient receptor potential vanil-

- loid 1 antagonist, attenuates mechanical allodynia in a mouse model of neuropathic pain [J]. *Biol Pharm Bull*, 2011, 34(7):1105-1108.
- [18] Saku O, Ishida H, Atsumi E, et al. Discovery of novel 5,5-diarylpentadienamides as orally available transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) antagonists [J]. *J Med Chem*, 2012, 55(7):3436-3451.
- [19] Marwaha L, Bansal Y, Singh R, et al. TRP channels: potential drug target for neuropathic pain [J]. *Inflammopharmacology*, 2016, 24(6):305-317.
- [20] Brusco I, Camponogara C, Carvalho FB, et al. α -Spinasterol: a COX inhibitor and a transient receptor potential vanilloid 1 antagonist presents an antinociceptive effect in clinically relevant models of pain in mice [J]. *Br J Pharmacol*, 2017, 174(23):4247-4262.
- [21] Payrits M, Sághy É, Mátyus P, et al. A novel 3-(4,5-diphenyl-1,3-oxazol-2-yl)propanal oxime compound is a potent Transient Receptor Potential Ankyrin 1 and Vanilloid 1 (TRPA1 and V1) receptor antagonist [J]. *Neuroscience*, 2016, 324:151-162.
- [22] Horváth Á, Tékus V, Bencze N, et al. Analgesic effects of the novel semicarbazide-sensitive amine oxidase inhibitor SZV 1287 in mouse pain models with neuropathic mechanisms: Involvement of transient receptor potential vanilloid 1 and ankyrin 1 receptors [J]. *Pharmacol Res*, 2018, 131:231-243.
- [23] Guo SH, Lin JP, Huang LE, et al. Silencing of spinal Trpv1 attenuates neuropathic pain in rats by inhibiting CAMKII expression and ERK2 phosphorylation [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1):2769.
- [24] Hirai T, Enomoto M, Kaburagi H, et al. Intrathecal AAV serotype 9-mediated delivery of shRNA against TRPV1 attenuates thermal hyperalgesia in a mouse model of peripheral nerve injury [J]. *Mol Ther*, 2014, 22(2):409-419.
- [25] Liu C, Tao J, Wu H, et al. Effects of LncRNA BC168687 siRNA on Diabetic Neuropathic Pain Mediated by P2X (7) Receptor on SGCs in DRG of Rats [J]. *Biomed Res Int*, 2017, 2017:7831251.
- [26] Liu C, Li C, Deng Z, et al. Long Non-coding RNA BC168687 is Involved in TRPV1-mediated Diabetic Neuropathic Pain in Rats [J]. *Neuroscience*, 2018, 374:214-222.

勘误声明

对2020年第8、9期出现的3处错误,现纠正如下:

1. 2020年第8期正文1018页(题目:CK-MB、cTnI、冠脉造影及心电图联合诊断急性心肌梗死研究价值,作者:常琳,常佩云,刘娟)摘要第七行中“占52.44%”应改为“占33.33%”;第八行“43例(84.31%)”应改为“43例(52.44%)”

2. 2020年第8期正文1026页(题目:RDW对高血压并发房颤的诊断预测研究,作者:裘存新,胡剑平,余琳,周恩平)摘要第三行中“阵发性房颤患者61例(A组),持续性房颤患者53例(B组),永久性房颤患者29例(C组)”应改为“阵发性房颤患者96例(A组),持续性房颤患者28例(B组),永久性房颤患者19例(C组)”英文摘要中第四行“61”改为“96”第五行中“53”改为“28”,第五行中“29”改为“19”;通信作者邮箱:zhi56223390@163.com应改为:qiu cx200508hs@163.com

3. 2020年第9期正文1257页(题目:强直性脊柱炎患者检测HLA-B27、ASO及免疫球蛋白表达的临床意义,作者:陆锡平,王科,张庆祥,闫文千)表1中例数“85”和“35”对换位置,性别列中“48/37”和“20/15”对换位置

《分子诊断与治疗杂志编辑部》

2020年10月14日

实验室巡礼

广州市妇女儿童医疗中心病毒研究室(原中心实验室)

广州市妇女儿童医疗中心病毒研究室(原中心实验室),以病毒检测及研究为主要方向。实验室成立于上世纪60年代,下设细胞、病毒分离培养、病毒血清学、临床基因扩增、流式细胞等专业实验室。现有技术人员26名,其中正高1名,副高12名,中级8名,初级5名。承担实习、规培、轮转及进修人员分子诊断的带教工作。

实验室从事病毒检测及研究40余年,是国内少数以临床病毒学基础研究为主要内容的医学实验室之一。具有从事病毒学、免疫学、生化及分子生物学的实验条件和仪器设备。每年常规分离培养并保存儿童常见呼吸道病毒株(流感病毒、肠道病毒、呼吸道合胞病毒、呼吸道腺病毒等),建立了较为完善的常见呼吸道病毒样本库。1997年被指定为WHO流感监测哨点单位,1999年在国内率先从呼吸道感染患儿咽拭子标本中分离出H9N2病毒,2005年被评为国家流感监测工作先进单位,2003年在广州市率先通过了国家卫生部临床检验中心的临床基因扩增实验室(PCR室)认证。常年对临床开展数十种病毒及其亚型的快速基因和血清学诊断项目,病毒检测种类及样本量居全国前列,为临床开展病毒相关疾病的诊断、治疗、预后、院感防控及科研工作提供了有力的支撑。

经过40余年的发展,实验室在临床病毒诊断和研究方面积累了丰富的经验,在儿科临床病毒学研究方面奠定了坚实的基础、形成了自己的特色,在国内儿科病毒实验室诊断领域具有一定的影响力。在国内历次突发传染病如SARS、手足口病、H1N1甲流、H7N9禽流感、登革热、新冠肺炎等疫情中,均有突出表现,面对疫情均能第一时间建立快速核酸检测方法,及时协助临床诊断、隔离及治疗。2020年新冠疫情中,国家1月11日公布了新冠病毒的全基因组序列,病毒研究室在1月14日就建立了新冠病毒核酸检测方法,并培训检测技术人员做好随时应对疫情的准备,是广东省第一家开展新冠病毒核酸检测的医院科室,并于1月23日检测出广州市第一例儿童新冠病毒感染患者。

病毒研究室在服务临床的同时,也十分注重加强科研工作和团队建设,团队核心技术成员分别由具有病毒学、分子生物学、细胞生物学、免疫学、传染病学、病原生物学等基础学科专业背景的资深高层次专业技术人员组成。与广州医科大学、中山大学、暨南大学等高校保持着良好的科研合作关系。在手足口病毒、腺病毒、流感病毒、呼吸道合胞病毒等方面有较深入的研究。病毒研究室先后主持2项国家自然科学基金面上项目、40余项省市级课题,获市级的科技成果奖多项,近五年发表SCI论文40余篇,合计影响因子超过180。获一项发明专利及一项实用新型专利授权。2020年抗击新冠肺炎疫情中,与临床合作研究了十名感染新冠病毒并通过胃肠道和呼吸道进行病毒排泄的儿童流行病学和临床特征。



联盟简介：

广州产学研协同创新联盟体外诊断产学研技术创新联盟于2016年3月18日正式成立，是以中山大学达安基因股份有限公司为牵头单位，联合6家国内IVD产业知名企业，并与广州市内著名的高科院校强强联合，沿着“产学研牵引—关键技术突破—共性平台构建—体外诊断高新技术产品—用户”的主线展开，共同组建而成的产学研协同创新联盟。联盟在充分发挥高校的科研优势与企业的市场技术优势、实现资源共享、技术交流与共同进步的基础上，致力于解决广州市在IVD高新技术及产品开发研究方面的关键技术、核心技术和共性技术瓶颈，促进广州市IVD高新技术产业的发展。

联盟欢迎体外诊断领域各企业、高校、科研单位的加入，欲加入本联盟，请发送入盟申请书至 gzivdleague@163.com。

