



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

分子诊断与治疗杂志

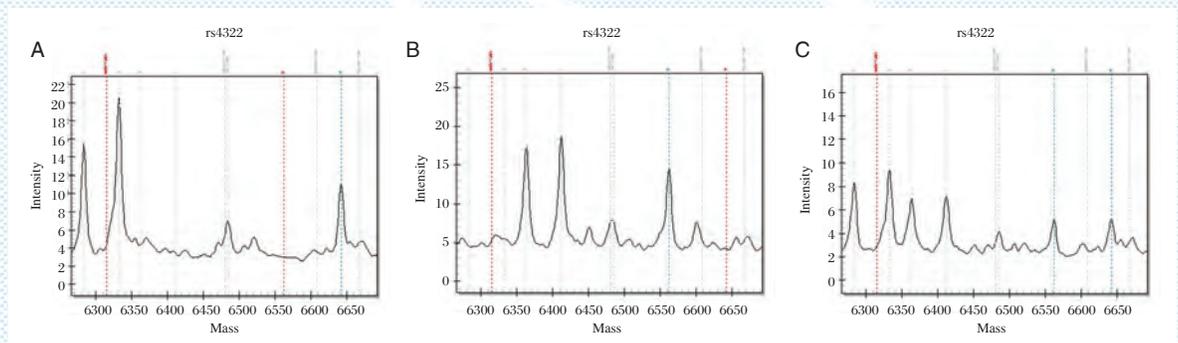
FENZI ZHENDUAN YU ZHILIAO ZAZHI

2020年9月 第12卷 第9期 总第73期

JOURNAL OF

MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Volume 12 Number 9 September 2020



注:A为AA基因型, B为GG基因型, C为GA基因型。

图(P1176) ACE基因rs4344位点分型图

Figure (P1176) Genotype of rs4344 for ACE gene

中山大学 主管

中国科技核心期刊(中国科技论文统计源期刊)

中国核心期刊(遴选)数据库收录期刊

中国期刊全文数据库全文必录期刊

中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊

中文生物医学期刊全文数据库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



张诠



张诠，男，1964年7月出生。1987年毕业于中山医学院医学系获学士学位，1994年获得中山医科大学肿瘤学专业硕士学位，同年转博，于1997年获得中山医科大学肿瘤学专业博士学位。

现任中山大学肿瘤防治中心头颈科副主任，科党支部书记，主任医师，教授，博士生导师。广东省精准应用协会头颈专业委员会主任委员；

广东省抗癌协会甲状腺癌专业委员会副主任委员、候任主任委员；中国医疗保健国际交流促进会甲状腺疾病分会常务委员；广东省抗癌协会头颈肿瘤专业委员会常务委员；广东省医师协会甲状腺专业医师分会常务委员；广东省医学会肿瘤学分会常务委员；广东省药学会耳鼻咽喉头颈外科用药专家委员会常务委员；中国医师协会甲状腺专业医师分会委员；中国抗癌协会头颈肿瘤专业委员会委员，甲状腺癌专业委员会委员。

张诠教授长期从事头颈肿瘤(喉癌、甲状腺癌等)的诊断及综合治疗及相关基础研究。承担及完成广东省科技计划多项，作为主要项目成员参加国家自然科学基金项目及5 010重大项目多项。发表第一作者或通讯作者SCI论文20余篇。培养研究生10余名。

分子诊断与治疗杂志

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

月刊 2020年9月 第12卷 第9期 总第73期 Bimonthly Volume 12 Number 9 September 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9月18日
定价 RMB 15.00元

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

Add 11 Fl., Xianglong Building, 179# Tian he bei Lu, Guangzhou, China 510620
Tel (020) 32290789-206, 32290789-201
E-mail jmdt@vip.163.com
CSSN ISSN 1674-6929
CN 44-1656/R
Printing TianYi Yofus Technology Co., Ltd.
Publish Date 2020.9.18
Price RMB 15.00



扫码订购《分子诊断与治疗杂志》



中国科技核心期刊

(中国科技论文统计源期刊)

收录证书

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

分子诊断与治疗杂志

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

特颁发此证书。

中国科学院技术信息研究所

Institute of Scientific and Technical Information of China

北京复兴路15号 100038

www.istic.ac.cn

2019年11月



分子诊断与治疗杂志

月刊 2020年9月 第12卷 第9期

目次

述评

甲状腺髓样癌分子标志物研究现状 陈艳峰 张詮(1133)

论著

- 人类白细胞抗原 B5801/5701/1502 核酸检测国家参考品的建立
..... 胡泽斌 孙彬裕 高飞 等(1137)
- lncRNA MCM3AP-AS1 靶向 miR-524-5p 在 CIK 细胞诱导肺癌细胞 A549 凋亡中作用机制研究
..... 肖永平 李庆科 王兴昌 等(1142)
- 佛山市 9 236 例孕产妇 301 型地中海贫血基因检测结果分析
..... 杨发达 高维鸿 梁丽笙 等(1147)
- 肾病综合征患者血清 IgG、IgM、IgA 水平变化及临床意义 杨全 赵蓉苑 李跃昌 等(1152)
- 血清 Anti-CCP 抗体、RF 和 hs-CRP 检测对 RA 的诊断价值分析
..... 卜文君 邵从军 胡恒贵(1155)
- 血清 miR-370-5p、tPSA、fPSA 联合检测对前列腺癌的诊断价值 王金乐 张蓉 宋梦 等(1159)
- 弥漫大 B 细胞淋巴瘤患者 PD-L1/PD-L2 表达水平与临床病理及预后的关系 禹环 符丽梅(1163)
- IL-6、肿瘤坏死因子 α 及 CRP 对下肢创伤患者合并感染的预测价值分析
..... 吴俊学 李毓灵 陈路(1167)
- 高频超声、血清 TPO-Ab 对不同性质甲状腺结节诊断的价值分析
..... 马纯华 黄畅 郑丹慧(1171)
- ACE 基因 rs4344 多态性及环境因素与海口市汉族人群脑梗死关联研究
..... 侯丹 余丹 杨国帅 等(1175)
- 肺癌患者手术前后血清 Lp-PLA2、CYfra21-1、VEGF-C 变化及临床意义
..... 茹玉航 王林 宋焕(1179)
- 单核细胞高密度脂蛋白比值、血清尿酸水平与冠心病患者冠脉狭窄程度的相关性
..... 郎勇 冉迅 屈模英(1184)
- 慢性自发性荨麻疹患者斑贴试验结果分析 张振东 范苗静 王伟 等(1187)
- 血清胎盘生长因子水平与子痫前期胎儿生长受限的关联性 万雪华 马爱娟(1192)
- L-选择素、降钙素原、波状蛋白在脓毒症患者中表达及意义 胡仕静 潘爱军 梅清(1195)
- 绿色环保型血清补体抑制剂聚天冬氨酸(钠)在免疫检测试剂中的应用
..... 陈立勇 刘仁源 张瑜(1200)
- 血清 TLR2、TLR4 水平与 2 型糖尿病肾病患者肾功能及炎症状态的关系分析
..... 华燕 武金文 刘欣(1204)

肝癌切除术前后患者血清 sP-selectin、sICAM-1 水平变化及其临床意义
 肖奇贵 王铮 杨勤玲 等(1208)

调节性 B 细胞和转铁蛋白受体 1 在子宫内膜癌中的表达及其临床价值分析
 蒋莹 戴军霞(1213)

彩色多普勒超声联合血清 CA15-3、CYFRA21-1、miR-20b-5p 在早期乳腺癌诊断中的应用
 吴强 谭蜀川 向伦祥 等(1217)

胃癌患者手术前后血清 VEGF、MMP-2、MMP-9 水平变化及其临床意义
 董磊 夏猛 尚康兴 等(1221)

血清 CYfra21-1、LDH、NSE 水平检测在肺癌患者辅助诊断中的应用
 王宇琛 章春芝 王大伟 等(1226)

血清 HbA1c、INS 在 T2DM 并发高尿酸血症的表达意义及相关性 吴斌 许婧(1230)

乳腺癌组织中 LAPTM4B、dCTP 焦磷酸酶的表达水平及临床意义
 李辉 潘武 黄有成(1234)

H 型高血压患者血清 Hcy、Cyst-C 与血管内皮功能的相关性
 罗婉丽 赵秋平 刘荣梅 等(1238)

多模态超声对于乳腺癌不同 BI-RADS 分类诊断的价值及与分子分型的关系
 任少杰 姜菊 吕洪兵(1242)

TPG 对 HaCaT 细胞增殖、凋亡、细胞周期及 miR-320/RASA1 表达的影响
 陈怡 朱颜俊 树瑜(1246)

miR-155、miR-26a 对 T2DM 患者脂代谢、血管并发症的影响
 严宇 操炎庆 程锦(1251)

强直性脊柱炎患者检测 HLA-B27、ASO 及免疫球蛋白表达的临床意义
 陆锡平 王科 张庆祥 等(1256)

乳腺癌组织中 VWCE、MEKK3 的表达水平与临床病理、预后的关系分析
 李远平 刘勋 祝琴(1260)

乳腺癌中 lncRNA ITGA9-AS1 表达与病理特征及新辅助化疗疗效的关系
 孙少甫 潘亚军 栾春(1264)

Hp 感染对强直性脊柱炎患者 α 1-AG、CRP、ESR 水平及胃肠道功能的影响
 刘永华 季爱玉(1268)

FDC 联合左氧氟沙星治疗复治涂阳肺结核的疗效分析
 魏华生 潘虹池 冉梅 等(1272)

综 述

恶性肿瘤中 Hedgehog 信号通路的表观遗传调控研究进展 高倩雯 刘陶文(1276)

专家风采

张 诤 (封二)

实验室巡礼

华南肿瘤学国家重点实验室 (封三)

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Monthly Volume 12 Number 9 September 2020

CONTENTS

COMMENTS

Research on molecular markers of medullary thyroid carcinoma

CHEN Yanfeng, ZHANG Quan (1133)

ORIGINAL ARTICLES

Establishment of the national reference materials for HLA-B5801/5701/1502 nucleic acid detection

HU Zebin, SUN Binyu, GAO Fei, SUN Nan, Li Lili, SUN Jing, HUANG Jie, QU Shoufang (1137)

Study on the mechanism of lncRNA MCM3AP-AS1 targeting miR-524-5p in CIK cell-induced apoptosis of lung cancer cell A549

XIAO Yongping, LI Qingke, WANG Xingchang, WANG Fan, YUAN Huijun (1142)

Analysis of gene detection results of type 301 thalassemia in 9 236 pregnant women in Foshan

YANG Fada, GAO Weihong, LIANG Lisheng, XIE Yunan, XIA Liuhe, HUANG Guangqiang, LV Fengbing (1147)

Changes of serum IgG, IgM, IgA levels in patients with nephrotic syndrome and their clinical significance

YANG Quan, ZHAO Rongyuan, LI Yuechang, ZENG Yupeng (1152)

Analysis of the diagnostic value of serum anti-CCP antibody, RF and hs-CRP detection in rheumatoid arthritis

BU Wenjun, SHAO Congjun, HU Henggui (1155)

The diagnostic value of combined detection of serum miR-370-5p, tPSA, and fPSA for prostate cancer

WANG Jinle, ZHANG Rong, SONG Meng, WU Qiong (1159)

Relationship between PD-L1/PD-L2 and clinical pathology, prognosis in patients with diffuse large B cell lymphoma

YU Huan, FU Limei (1163)

Analysis of the predictive value of IL-6, tumor necrosis factor alpha and CRP in patients with lower limb trauma combined with infection

WU Junxue, LI Yuling, CHEN Lu (1167)

Analysis of the value of high-frequency ultrasound and serum TPO-Ab in the diagnosis of thyroid nodules with different properties

MA Chunhua, HUANG Chang, ZHENG Danhui (1171)

Association of ACE gene rs4344 polymorphism and gene-environment interaction with the risk of cerebral infarction in Han population in Haikou city

HOU Dan, YU Dan, YANG Guoshuai, ZHOU Feng (1175)

Changes of serum Lp-PLA2, CYfra21-1, VEGF-C before and after surgery in patients with lung cancer and their clinical significance

RU Yuhang, WANG Lin, SONG Huan (1179)

Correlation between the ratio of monocyte high-density lipoprotein, serum uric acid level and coronary artery stenosis in patients with coronary heart disease

LANG Yong, RAN Xun, QU Moying (1184)

Analysis of patch test in the patients with chronic idiopathic urticaria

ZHANG Zhendong, FAN Miaoqing, WANG Wei, GAO Ruidi (1187)

Correlation between serum placental growth factor level and fetal growth restriction in preeclampsia

WAN XueHua, MA AiJuan (1192)

Expression and significance of L-selectin, procalcitonin and Vimentin in patients with sepsis

HU ShiJing, PAN AiJun, MEI Qing (1195)

Application of an environmental protection and pollution-free serum complement inhibitor polyaspartic acid sodium in immunoassay reagents <i>CHEN Liyong, LIU Renyuan, ZHANG Yu</i>	(1200)
Analysis of the relationship between serum TLR2 and TLR4 levels and renal function and inflammatory status in patients with type 2 diabetic nephropathy <i>HUA Yan, WU Jinwen, LIU Xin</i>	(1204)
Changes of serum sP-selectin and sICAM-1 levels before and after liver cancer resection and their clinical significance <i>XIAO Qigui, WANG Zheng, YANG Qinling, ZHANG Yulin, ZHANG Pingli, YANG Jun, LANG Lan</i>	(1208)
Expression of transferrin receptor 1 and regulatory B cells in endometrial carcinoma and analysis of their clinical value <i>JIANG Ying, DAI Junxia</i>	(1213)
Application of color Doppler ultrasound combined with serum CA15-3, CYFRA21-1 and miR-20b-5p in the diagnosis of early breast cancer <i>WU Qiang, TAN Shuchuan, XIANG Lunxiang, WANG Mengyuan, YOU Xi</i>	(1217)
Changes and clinical significance of serum VEGF, MMP-2 and MMP-9 levels in patients with gastric cancer before and after surgery <i>DONG Lei, XIA Meng, SHANG Kangxing, WU Qing</i>	(1221)
Application of serum CYfra21-1, LDH and NSE levels in the auxiliary diagnosis of lung cancer <i>WANG Yuchen, ZHANG Chunzhi, WANG Dawei, LIU Na, YUAN Wei, JIA Junzhi</i>	(1226)
The expression significance and correlation of serum HbA1c and INS in type 2 diabetes complicated with hyperuricemia <i>WU Bin, XU Jing</i>	(1230)
The expression level and clinical significance of LAPTM4B and dCTP pyrophosphatase in breast cancer tissues <i>LI Hui, PAN Wu, HUANG Youcheng</i>	(1234)
Correlation between serum Hcy and Cyst-C and vascular endothelial function in patients with H-type hypertension <i>LUO Wanli, ZHAO Qiuping, LIU Rongmei, BAI Minfu</i>	(1238)
The value of multimodal ultrasound in the diagnosis of breast cancer with different BI-RADS classification and its relationship with molecular typing <i>REN Shaojie, JIANG Ju, LV Hongbing</i>	(1242)
Effects of total paeony glycosides on HaCaT cell proliferation, apoptosis, cell cycle and miR-320/RASA1 expression <i>CHEN Yi, ZHU Yanjun, SHU Yu</i>	(1246)
Effects of miR-155 and miR-26a on lipid metabolism and vascular complications in T2DM patients <i>YAN Yu, CAO Yanqing, CHENG Jin</i>	(1251)
Clinical significance of detecting HLA-B27, ASO and immunoglobulin expression in patients with ankylosing spondylitis <i>LU Xiping, WANG Ke, ZHANG Qingxiang, YAN Wenqian</i>	(1256)
Analysis of the relationship between the expression levels of VWCE and MEKK3 in breast cancer tissues and clinicopathology and prognosis <i>LI Yuanping, LIU Xun, ZHU Qin</i>	(1260)
The relationship between the expression of lncRNA ITGA9-AS1 in breast cancer and the pathological characteristics, neoadjuvant chemotherapy <i>SUN Shaofu, PAN Yajun, LUAN Chun</i>	(1264)
Effects of Hp infection on levels of α 1-AG, CRP and ESR and gastrointestinal function in patients with ankylosing spondylitis <i>LIU Yonghua, JI Aiyu</i>	(1268)
Curative effect of FDC combined with levofloxacin on re-treatment smear-positive tuberculosis <i>WEI Huasheng, PAN Hongchi, RAN Mei, WANG Pingfei</i>	(1272)

REVIEWS

Progress of research on epigenetic regulation of <i>Hedgehog</i> signaling pathway in malignant tumors <i>GAO Qianwen, LIU Taowen</i>	(1276)
--	--------

甲状腺髓样癌分子标志物研究现状

陈艳峰 张詮*

[摘要] 甲状腺髓样癌(MTC)是起源于甲状腺滤泡旁C细胞的神经内分泌肿瘤,发病率较低,临床表现无特殊,治疗效果较差,易发生复发转移,早期诊断,监测复发和转移,及靶向治疗是现阶段关注热点。近年来,对甲状腺髓样癌分子标志物的研究越来越多,已将其应用于诊断,协助甲状腺髓样癌术前、术后的评估、靶向治疗以及疾病监控等方面。本文归纳总结了临床常用的几种特异性分子标志物,对其分子结构、临床研究及临床应用方面的优劣性进行探讨,以期对分子标志物在甲状腺髓样癌临床诊断、靶向治疗、监控复发方面的应用提供理论依据,对甲状腺髓样癌治疗方案的进一步优化、改善预后及提高生存质量提供重要的科学证据。

[关键词] 甲状腺髓样癌;分子标志物;诊断

Research on molecular markers of medullary thyroid carcinoma

CHEN Yanfeng, ZHANG Quan*

(1. Department of Head & Neck, Sun Yat-sen University Cancer Center, Guangzhou, Guangdong, China, 510060; 2. State Key Laboratory of Oncology in South China, Guangzhou, Guangdong, China, 510060)

[ABSTRACT] Medullary thyroid carcinoma (MTC) is a neuroendocrine tumor originated from thyroid follicular C cells, with low incidence, no special clinical manifestations, poor therapeutic effect, and easy to relapse and metastasis. Early diagnosis, monitoring of recurrence and metastasis, and targeted therapy are the hot spots at present. In recent years, more and more studies have been conducted on molecular markers of medullary thyroid cancer, which have been applied in diagnosis, assisting preoperative and postoperative evaluation, targeted therapy and surveillance. This article summarized the clinical commonly used several kinds of specific molecular markers, including the molecular structure, the superiority and inferiority of clinical research and clinical application were discussed, in order to provide theoretical basis for molecular markers in the medullary thyroid carcinoma clinical diagnosis, targeted therapy, monitoring recurrence and metastasis, at the same time, provide important scientific evidence in optimized treatment of medullary thyroid carcinoma and improve prognosis and quality of life.

[KEY WORDS] Thyroid medullary carcinoma; Molecular markers; Diagnosis

甲状腺髓样癌起源于甲状腺滤泡旁C细胞,美国国立癌症研究所数据库(The Surveillance, Epidemiology, and End Results, SEER)报道,2007~2014年病理证实为甲状腺癌患者93 607例,88.1%为乳头状甲状腺癌,7.2%为滤泡状甲状腺癌,1.8%

为甲状腺髓样癌,0.8%为未分化型甲状腺癌,其它类型为2.1%^[1]。甲状腺髓样癌(Medullary thyroid carcinoma, MTC)分为散发型和遗传型,其中散发型约80%,遗传型约20%。遗传型分为MEN2A型和MEN2B型,其中MEN2A型是最常见的类型,家

基金项目:广东省食管癌研究所科技计划面上项目(M201811)

作者单位:1. 中山大学肿瘤防治中心头颈外科,广东,广州 510060

2. 华南国家重点实验室,广东,广州 510060

通信作者:张詮, E-mail: zhangquan@sysucc.org.cn

族型 MTC 属于 MEN2A 型;散发型 MTC 高发年龄为 50~60 岁,遗传型发生年龄较年轻^[2-3]。5 年生存率约 75%,10 年生存率约 64%^[4]。因为 MTC 发病率不高,预后较差,传统的影像学检查难以早期诊断。随着分子诊断水平提高,为早期诊断 MTC 提供可能。

1 MTC 诊断预后有关的血清学指标

1.1 血清降钙素(serum calcitonin, sCT)

降钙素是有甲状腺滤泡旁细胞 C 细胞相关编码基因调控的多肽激素,血清降钙素(sCT)的含量与 C 细胞的数量密切相关,因此有学者认为 sCT 可作为 MTC 诊断的特异性标志物^[5-6]。降钙素还可以作为检测复发预后的指标,术后 1 个月时降钙素正常的患者肿瘤复发率为 8.6%,而此时升高的患者复发的明显较多,所以检测术后降钙素的水平可以对手术的治疗效果作出初步判断。如果术后降钙素降为正常,但是在随访过程中发现降钙素再次升高则提示肿瘤复发或转移可能^[7]。

部分甲状腺髓样癌患者术前降钙素水平正常可能是由于此时肿瘤处于早期阶段,肿瘤负荷较小,病情相对较轻,降钙素的合成及分泌入血较少。这种情况下患者无颈淋巴结转移或转移范围较小,此时外科治疗效果较好,原发灶及转移灶易完整切除,术后复发率小。反之,术前降钙素水平升高较多,尤其是高于 1 000 Pg/mL 时,肿瘤负荷较大,此时手术治疗效果较差,术后需密切观察。对于该类患者除行甲状腺癌根治术外,还应辅以其它治疗以避免肿瘤复发,减少远处转移^[7-8]。

1.2 癌胚抗原(carcino-embryonic antigen, CEA)

癌胚抗原(CEA)是我们临床上常见的或者说常用的一个肿瘤标志物,在很多肿瘤中 CEA 均升高,所以该指标特异性不高,但是敏感性高,被用来协助诊断。降钙素和癌胚抗原联合检测能提高甲状腺髓样癌的敏感性,利于早期治疗和早期检测,同时还能判断患者肿瘤复发和手术效果^[9-10]。

1.3 降钙素原(procalcitonin, PCT)

降钙素原(PCT)由降钙蛋白、降钙素和 N 端残基片段组成的糖蛋白,在正常生理情况下,PCT 仅有甲状腺 C 细胞少量分泌,一般浓度低于 0.05 ng/mL。近年来,研究表明 PCT 与机体感染密切相关,因此常被作为检测感染指标。有学者提出降钙素原可作为 MTC 的一个诊断指标及早期发现

复发转移的重要指标^[11]。Trimboli P 等^[12]学者归纳总结了 39 篇血清降钙素原与降钙素诊断甲状腺髓样癌的文章,发现降钙素原在诊断 MTC 方面敏感度高,尤其对血清降钙素阴性的患者,降钙素原敏感性更高。Machens A 等^[13]学者回顾性分析收集 457 例 MTC 患者进行分析,发现血清 PCT 诊断 MTC 准确性高,可以替代血清降钙素。因此认为 PCT 可作为 MTC 诊断的重要指标,而不是单纯作为感染性疾病的指标^[9]。

1.4 降钙素基因相关肽(calcitonin gene-related peptide, CGRP)

CGRP 是人类用分子生物学方法发现的第一个活性多肽,由 37 个氨基酸组成,广泛存在于中枢、外周和其它系统中。Camacho CP 等^[14]学者收集 26 例 MTC 患者和 23 例健康成人作为对照,发现血清 CGRP 表现出更高的临床敏感性(100.0%);特异性为 97.06%,阳性预测值为 97.06%,阴性预测值为 100.0%。而血清 CT 敏感性为 73.33%,特异性 82.35%,阳性预测值 64.71%,阴性预测值为 87.5%。因此认为血清中检测 CGRP 有助于诊断 MTC 患者及 RET 突变携带者的家属。

1.5 胃泌素释放肽前体(progastrin releasing peptide, ProGRP)

胃泌素释放肽(GRP)是哺乳动物同源的两栖动物蛙皮素,属于胃肠激素,刺激胃的 G 细胞分泌胃泌素,广泛分布于哺乳动物的神经系统、胃肠道和呼吸道。目前认为,GRP 通过自分泌或细胞间相互作用参与肿瘤的生长、转移过程。ProGRP 是胃泌素释放肽的前体结构,其半衰期长,较 GRP 更为稳定且易检测。研究证实,ProGRP 可代表 GRP 水平和基因表达,因此可作为肿瘤标志物^[15]。

Parra-Robert M 等^[16]学者收集 22 例 MTC 和 16 例非 MTC 患者的血清学标本,发现晚期 MTC 血清中 ProGRP 明显高于非 MTC 患者,中位值达 1 398.4 pg/mL,而非 MTC 患者血清 ProGRP 低于正常值(50 pg/mL)。Liang X 等^[17]学者调查了 2 446 名健康成人和 212 例患者(共 235 个甲状腺结节,包括炎症,增生结节,乳头状癌,滤泡状癌和甲状腺髓样癌)。发现血清 ProGRP 在 MTC 患者组中中位值,显著高于其它组。而做 MTC 结节 FNA 穿刺时,中位浓度显著高于其他组从而提出 FNA-ProGRP 可作为 MTC 诊断的手段。

2 RET基因(RET proto-oncogene, RET 原癌基因)

RET基因是目前大家公认的MTC最常见的基因异常。Elisei R等^[18]学者发现RET基因突变率在遗传型MTC中达到98.3%(115/117),而在散发型MTC中突变率只有6.2%(78/1264),发现有42种基因变异,其中最常见的是V804M突变,而M918T突变只发生于MEN2B型。如果同一患者发生多个RET基因变异,提示预后差^[19]。

MEN2A型RET基因突变主要位于外显子10,11,13;MEN2B和部分家族型MTC的RET基因突变主要位于外显子14和16^[2-3],外显子16突变,无论是散发型还是MEN2B均伴随侵袭性病变^[20]。散发型MTC约有25%患者伴随RET基因外显子11,13,16突变,尤其是密码子918突变激活络氨酸激酶受体功能,从而预后更差^[21]。其中大约6%的散发型MTC患者伴随生殖细胞系RET基因突变,从而导致新的家族型MTC^[22]。因此建议对新诊断的散发型MTC进行RET基因检测,从而筛查可能的遗传型MTC^[23]。

3 与MTC诊断治疗预后有关的MicroRNA

MicroRNA(miRNA)是一类由内源基因编码的约为20~24个核苷酸组成的RNA,其在细胞内有多种重要的调节作用,包括细胞增值、细胞凋亡、细胞死亡等相关,与肿瘤发生发展可能相关,而且有可能作为新的靶点,为肿瘤治疗提供新的手段。

3.1 miR-21

miR-21与多种肿瘤的发生发展有关^[24-25]。Chu YH等^[26]学者采用原位杂交的方法检测miR-21,miR-21在MTC组织中高表达,通过抑制miR-21表达的MTC细胞株,导致MTC肿瘤细胞的增生减弱及侵袭力下降,提出miR-21可能与MTC肿瘤的发展密切相关。Aubert S等^[27]学者证实miR-21表达与MTC淋巴结转移密切相关,miR-21表达是淋巴结转移的独立预后因素,因此提出miR-21表达可作为CN0患者术前评估淋巴结清扫的指标。

3.2 miR-34a和miR-144

Shabani N等^[28]学者对25例RET基因阳性和25例RET基因阴性的MTC血标本采用RT-qPCR方法检测miR-144和miR-34a,发现miR-144和miR-34a表达在MTC患者中较正常组显著提高,

而且RET基因阳性组较阴性组高,但是未发现其与MTC预后相关,尚需进一步探讨。

3.3 miR-31-3p

Jiang M等^[29]学者对两个GEO MicroRNA数据库GSE40807和GSE97070进行生信分析发现有十个MicroRNA异常调节与MTC有关,体内外实验证实miR-31-3p抑制MTC细胞增殖,其中miR-31-3p表达在MTC中显著下调,而且miR-31-3p低表达较高表达者预后差,从而提出miR-31-3p可能在MTC肿瘤发生发展中有重要作用。

3.4 miR-153

miR-153在多种肿瘤中发挥抑癌作用^[30-31]。Joo LJS等学者证实在MTC中miR-153同样具有抑制肿瘤的作用,而且联合卡博替尼对MTC有更好的治疗效果^[32]。

3.5 miR-375

miR-375位于人染色体2q35区上,与多种肿瘤生长和转移有关^[33]。有研究证实miR-375与MTC预后差相关。Romeo P等^[34]学者通过微阵列芯片(microarray)方法,证实51个miRNAs在MTC中有不同程度表达,其中miR-375过表达显著,在MTC患者miR-375显著高于健康对照组和无肿瘤残留组,而且高表达患者预后差Galuppini F等^[35]学者分析了130例MTC(104例散发型,26例家族型)miR-375表达,发现miR-375在MTC组织中显著上调,而且miR-375表达与肿瘤大小,包膜侵犯,淋巴结转移及肿瘤临床分期密切相关,是肿瘤预后差的指标。

3.6 miR-182

miR-182是首次在小鼠眼中发现的一种miRNA,其定位于人的第7号染色体上(7q32.2),与多种肿瘤增生、侵袭及转移相关^[36-37]。miR-182在RET基因突变的MTC中明显上调,而抑制RET基因信号通路减少了miR-182表达,而过表达的RET M918T的NThy-ori 3.1细胞株中miR-182水平明显提高,而且过表达的miR-182促进细胞侵袭和转移^[38]。

4 小结

甲状腺髓样癌发生率低,RET基因突变是最主要的基因改变类型,临床上通过血清学检测及穿刺涂片等方式行早期诊断并监测复发及预后,MicroRNA可能成为MTC新的治疗靶点。但是关于MTC病因还有很多未知数,目前的靶向治疗效果依然不满意,期待更多的基础和理论研究以期

早发现、早诊断、早治疗,提高局控率,减少复发转移风险,提高生存率。

参考文献

- [1] Weeks KS, Kahl AR, Lynch CF, et al. Racial/ethnic differences in thyroid cancer incidence in the United States [J]. 2007-2014. *Cancer*, 2018, 124(7):1483-1491.
- [2] Wells SA, Asa SL, Dralle H, et al. Revised american thyroid association guidelines for the management of medullary thyroid carcinoma[J]. *Thyroid*, 2015, 25(6):567-610.
- [3] Kloos RT, Eng C, Evans DB, et al. Medullary thyroid cancer: management guidelines of the American Thyroid Association[J]. *Thyroid*, 2009, 19:565-612.
- [4] Mathiesen JS, Kroustrup JP, Vestergaard P, et al. Survival and Long - Term Biochemical Cure in Medullary Thyroid Carcinoma in Denmark 1997-2014: A Nationwide Study. *Thyroid*, 2019, 29(3):368-377.
- [5] Pazaitou-Panayiotou K, Chrisoulidou A, Mandanas S, et al. Predictive factors that influence the course of medullary thyroid carcinoma[J]. *Int J Clin Oncol*, 2014, 19(3):445-451.
- [6] Karagiannis AK, Girio-Fragkoulakis C, Nakouti T. Procalcitonin: A New Biomarker for Medullary Thyroid Cancer? A Systematic Review [J]. *Anticancer Res*, 2016, 36(8):3803-3810.
- [7] 高明,于洋,李树玲,等. 58例甲状腺髓样癌降钙素及其基因相关肽检测的临床意义[J]. *中国肿瘤临床*, 2004, 31(14):784-787.
- [8] Yamazaki M, Straus FH, Messina M, et al. Adenovirus-mediated tumor-specific combined gene therapy using Herpes simplex virus thymidine/ganciclovir system and murine interleukin-12 induces effective antitumor activity against medullary thyroid carcinoma. [J]. *Cancer Gene Ther*, 2004, 11(1):8-15.
- [9] Woliński K, Kaznowski J, Klimowicz A, et al. Diagnostic value of selected biochemical markers in the detection of recurrence of medullary thyroid cancer - comparison of calcitonin, procalcitonin, chromogranin A, and carcinoembryonic antigen[J]. *Endokrynol Pol*, 2017, 68(4):434-437.
- [10] 陈明光. 降钙素和癌胚抗原联合检测在甲状腺髓样癌诊治中的意义[J]. *中外医疗*, 2017, 17:7-9.
- [11] Trimboli P, Laurretta R, Barnabei A, et al. Procalcitonin as a postoperative marker in the follow-up of patients affected by medullary thyroid carcinoma[J]. *Int J Biol Markers*, 2018, 33(2):156-160.
- [12] Trimboli P, Seregni E, Treglia G, et al. Procalcitonin for detecting medullary thyroid carcinoma: a systematic review[J]. *Endocr Relat Cancer*, 2015, 22(3):R157-64.
- [13] Machens A, Lorenz K, Dralle H. Utility of serum procalcitonin for screening and risk stratification of medullary thyroid cancer [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2014, 99(8):2986-2994.
- [14] Camacho CP, Lindsey SC, Melo MC, et al. Measurement of calcitonin and calcitonin gene - related peptide mRNA refines the management of patients with medullary thyroid cancer and may replace calcitonin-stimulation tests [J]. *Thyroid*, 2013, 23(3):308-316.
- [15] Korse CM, Taal BG, Vincent A, et al. Choice of tumour markers in patients with neuroendocrine tumours is dependent on the histological grade. A marker study of Chromogranin A, Neuron specific enolase, Progastrin-releasing peptide and cytokeratin fragments [J]. *Eur J Cancer*, 2012, 48:662-671.
- [16] Parra-Robert M, Orois A, Augé JM, et al. Utility of proGRP as a tumor marker in the medullary thyroid carcinoma [J]. *Clin Chem Lab Med*, 2017, 55(3):441-446.
- [17] Liang X, Zhu J, Cai M, et al. ProGRP as a novel biomarker for the differential diagnosis of medullary thyroid carcinoma in patients with thyroid nodules [J]. *Endocr Pract*, 2020, 26(5):514-522.
- [18] Elisei R, Tacito A, Ramone T, et al. Twenty-five years experience on RET genetic screening on hereditary MTC: An update on the prevalence of germline RET mutations [J]. *Genes (Basel)*, 2019, 10(9):698.
- [19] Romei C, Casella F, Tacito A, et al. New insights in the molecular signature of advanced medullary thyroid cancer: evidence of a bad outcome of cases with double RET mutations [J]. *J Med Genet*, 2016, 53(11):729-734.
- [20] Romei C, Elisei R, Pinchera A, et al. Somatic mutations of the ret protooncogene in sporadic medullary thyroid carcinoma are not restricted to exon 16 and are associated with tumor recurrence [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1996, 81:1619-1622.
- [21] Wohllk N, Cote GJ, Bugalho MM, et al. Relevance of RET proto-oncogene mutations in sporadic medullary thyroid carcinoma [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1996, 81:3740-3745.
- [22] Elisei R, Romei C, Cosci B, et al. RET genetic screening in patients with medullary thyroid cancer and their relatives: experience with 807 individuals at one center [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2007, 92:4725-4729.
- [23] Elisei R, Alevizaki M, Conte-Devolx B, et al. 2012 European thyroid association guidelines for genetic testing and its clinical consequences in medullary thyroid cancer [J]. *Eur Thyroid J*, 2013, 1:216-231.
- [24] Eriksen AHM, Sørensen FB, Andersen RF, et al. Association between the expression of microRNAs and the response of patients with locally advanced rectal cancer to preoperative chemoradiotherapy [J]. *Oncology letters*, 2017, 14(1):201-209.
- [25] Zhao H, Yan P, Wang J, et al. Clinical significance of tumor miR-21, miR-221, miR-143, and miR-106a as biomarkers in patients with osteosarcoma [J]. *Int J Biol Markers*, 2019, 34(2):184-193.

(下转第 1141 页)

人类白细胞抗原 B5801/5701/1502 核酸检测国家参考品的建立

胡泽斌 孙彬裕 高飞 孙楠 李丽莉 孙晶 黄杰* 曲守方*

[摘要] **目的** 建立人类白细胞抗原 B5801/5701/1502 核酸检测国家参考品。**方法** 采集 HLA-B5801/5701/1502 阳性和阴性志愿者的新鲜外周血,经 EB 病毒转化,培养建立永生化细胞系。细胞扩增培养,提取基因组 DNA,制备成国家参考品并经高通量测序验证。4 家协作标定单位采用荧光 PCR 法、高通量测序(NGS)、基因测序分型(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℃ and 20~25℃ 之间反复冻融 3 次)稳定性和均匀性研究。**结果** HLA-B5801/5701/1502 核酸检测国家参考品成功制备,包含 5 例 HLA-B5801 阳性、3 例 HLA-B5701 阳性、3 例 HLA-B1502 阳性和 9 例阴性样本。该参考品定值准确,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 B5801/5701/1502 核酸检测国家参考品的各项指标均符合要求,可用于 HLA-B5801 核酸检测试剂盒、HLA-B5701 核酸检测试剂盒、HLA-B1502 核酸检测试剂盒的性能评价。

[关键词] 人类白细胞抗原; B5801; B5701; B1502; SBT 测序法; 国家参考品; 协作标定

Establishment of the national reference materials for HLA-B5801/5701/1502 nucleic acid detection

HU Zebin, SUN Binyu, GAO Fei, SUN Nan, Li Lili, SUN Jing, HUANG Jie*, QU Shoufang*
(National Institute for Food and Drug Control, Beijing, China, 100050)

[ABSTRACT] **Objective** To Establish a national reference material for human leukocyte antigen B5801/5701/1502 nucleic acid detection. **Methods** Fresh peripheral blood samples of HLA-B5801/5701/1502 positive and negative volunteers were collected, and then transformed by EB virus to establish immortalized cell lines. The genomic DNA was extracted from the cells, and the national reference material was prepared and verified by next generation sequencing technology. Moreover, the accuracy of the national reference was verified by fluorescence PCR, NGS and SBT sequencing method from four collaborative manufacturers, the stability after 3 cycles of freeze and thaw between -20℃ and 20~25℃ and homogeneity of the national reference materials were studied as well. **Results** The national reference materials of HLA-B5801/5701/1502 were successfully developed, including 5 HLA-B5801 positive and 3 HLA-B5701 positive and 3 HLA-B1502 positive samples and 9 negative samples. The reference materials were accurately valued by SBT sequencing and other methods, and the homogeneity of reference material was consistent. The reference material was still stable after 3 cycles of freeze-thaw, which met the requirements of national reference material. **Conclusion** All indexes of the national reference material for human leukocyte antigen B5801/5701/1502 nucleic acid detection meet the requirements, and can be used for the performance evaluation of HLA-B5801 and HLA-5701 and HLA-1502 nucleic acid detection kits.

[KEY WORDS] Human leukocyte antigen; B5801; B5701; B1502; 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:胡泽斌和孙彬裕同为第一作者

人类白细胞抗原分子(Human Leukocyte Antigen, HLA)位于人类的第六条染色体短臂上,共分成两大类,第一类有A、B、C三种,第二类有DP、DQ、DR。研究表明,一类HLA的B位点,对于一些临床疾病的用药判断扮演着重要角色^[1]。其中,HLA-B*5801和治疗痛风的常用药别嘌醇药物过敏相关^[2-4],对HLA-B*5801的基因检测具有重要前瞻性意义,可降低服用别嘌醇所致重症皮肤不良反应发病率^[5];阿巴卡韦是一种抗艾滋病经典药物,但是服用阿巴卡韦药物后,大约有5%~8%的人会出现超敏反应,HLA-B*5701基因被推测为重要的危险因素,欧美一些国家已经将HLA-B*5701基因筛查应用于临床常规检测^[6-8];HLA-B*1502也被证实与汉族人群因服用抗癫痫药卡马西平引起的史蒂芬琼森症候群有高度的关联性^[9-11]。

随着基因检测技术的发展,基于聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)的HLA-B5801、HLA-B5701、HLA-B1502核酸检测已成为临床上的常用检测手段,包括荧光PCR法、聚合酶链反应-序列特异性引物法(polymerase chain reaction-sequence specific primer, PCR-SSP法)、聚合酶链反应-序列特异性寡核苷酸探针法(polymerase chain reaction-sequence specific oligonucleotide, PCR-SSO法)、PCR熔解曲线法等。

目前,已有多个获得医疗器械注册证的HLA-B核酸分型检测试剂盒、HLA-B5801基因检测试剂盒上市,并且还有不少企业正在申报此类核酸检测试剂盒的注册审批。由于不同厂家的产品在生产工艺、原材料、引物探针设计、方法原理等多方面均不尽相同,导致各家试剂盒的准确性、特异性、检测限等性能有所差异,急需建立一套HLA-B5801/5701/1502核酸检测国家参考品,对此类试剂盒进行统一的质量评估,以确保试剂检测结果可靠,为临床诊断提供准确证据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂

RPMI 1540培养基、胎牛血清(FBS)和青霉素链霉素双抗购自美国GIBCO公司;人外周血淋巴细胞分离液、环孢霉素A和二甲基亚砷(DMSO)购自北京索莱宝科技有限公司;供;基因组DNA

提取试剂盒(磁珠法)由深圳华大智造科技有限公司提供;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(HLA)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;SeCore HLA-B位点测序分型试剂盒(ONE LAMBDA),由北京旌准医疗科技有限公司提供;人类白细胞抗原B*5801核酸检测试剂盒(荧光PCR法),人类白细胞抗原B*1502核酸检测试剂盒(荧光PCR法),由江苏伟禾生物科技有限公司提供。

1.1.2 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(美国Bio-Rad)、基因分析仪3730xL(美国ThermoFisher),由北京博奥晶典生物技术有限公司提供;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, ABI Real-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。拟选取HLA-B5801阳性、HLA-B5701阳性、HLA-B1502阳性志愿者样本各至少3例,选取至少5例与以上3个位点均不相关的阴性样本。志愿者样本HLA-B基因型别筛选采用金标准SBT测序法确认。截止2019年5月共收集到6例HLA-B5801阳性、4例HLA-B5701阳性、3例HLA-B1502阳性、10例阴性样本。采用EB病毒转化外周血单个核细胞,培养建立永生B淋巴细胞系,最终获得20例建系成功,将种子细胞保种并扩大培养,扩增培养后提取各细胞系DNA。

1.2.2 细胞系基因组DNA提取、质检及定量

按基因组DNA提取试剂盒(磁珠法)(深圳华大智造科技有限公司)步骤提取细胞系样本基因组DNA,安捷伦NanoDorp测定OD260/OD280值,琼脂糖凝胶电泳胶检验DNA的完整性,Qubit Fluorometer 3.0对DNA进行精确定量。

1.2.3 国家参考品的制备与验证

将20个样本的基因组DNA溶液稀释至20 ng/ μ L的浓度,采用高通量测序技术(Next genera-

tion sequencing technology, NGS)对每个样本进行实验验证。然后将稀释后的DNA溶液取30 μL 分装在1.5 mL的冻存管中,每套国家参考品包括5例HLA-B5801阳性、3例HLA-B5701阳性、3例HLA-B1502阳性和9例阴性样本。

1.2.4 国家参考品的协作标定

邀请4家协作标定单位,采用荧光PCR法、聚合酶链反应-基因测序分型法(polymerase chain reaction- sequence based genotyping, PCR-SBT)、NGS法三种方法对国家参考品进行协作标定。在不同的实验室及平台上独立进行测定,按照试剂盒说明书进行操作。国家参考品20支样本全部需要检测,测序法每个样本测定1次,PCR法每个样本测定3次。根据企业自己试剂盒的检测范围进行样本处理并测定,并按照企业说明书声称的检测限浓度将参考品样本稀释之后进行再次检测。

1.2.5 国家参考品稳定性和均匀性验证

DNA样本常规均在 -20°C 以下保存,且运输过程中均使用干冰保存。为了验证国家参考品的复溶稳定性,随机选取一套国家参考品,在 -20°C 与室温($20\sim 25^{\circ}\text{C}$)之间反复冻融3次(每隔1天一次)之后采用荧光PCR法和SBT测序法进行验证。同时随机取出三套国家参考品,采用SBT测序法进行均匀性验证。

2 结果

2.1 国家参考品的制备及验证

对采集到的23例外周血进行永生化B淋巴细胞的建系,结果3例细胞培养失败。对建系成功的20例细胞系扩增培养,获得足量细胞后进行基因组DNA的提取并定量分析。20例样本提取的基因组DNA进行琼脂糖凝胶电泳分析,结果显示DNA条带完整和锐利,没有拖带或弥散带,符合实验室对基因组DNA完整性的要求。DNA样品的OD260/OD280值均在1.80~2.15之间,表明DNA的纯度较高满足试剂检测要求,经NGS测序技术对每个样本的HLA-B位点进行检测,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,浓度为20 $\text{ng}/\mu\text{L}$,贴标签,20例样本组成一套HLA-B5801/5701/1502核酸检测国家参考品盘,见表1。

2.2 国家参考品的协作标定

北京博奥晶典生物技术有限公司、北京旌准医疗科技有限公司、深圳华大智造科技有限公司、江苏伟禾生物科技有限公司等4家协作标定单位(分别用A、B、C、D代表)分别采用了SBT法、SBT法、NGS法、荧光PCR法,对20支参考品进行了协作标定,A、B、C三家均可报告出2条染色体的HLA-B位点的4位分型信息,D公司可报告出

表1 参考品盘20例样本DNA的检测结果

Table 1 DNA test results of 20 samples in the reference panel

样本编号	A260/A280	B位点基因分型信息	参考品分类
CNGB030299/HLA19061-01	1.94	B*15:27 B*38:02	阴性
CNGB030307/HLA19069-02	1.82	B*13:01 B*35:03	阴性
CNGB030295/HLA19057-03	1.89	B*15:11 B*51:01	阴性
CNGB030306/HLA19068-04	1.89	B*08:01 B*40:06	阴性
CNGB030290/HLA19052-05	1.84	B*52:01 B*58:01	B*58:01 阳性
CNGB030125/HLA18005-06	1.88	B*13:02 B*15:02	B*15:02 阳性
CNGB030151/HLA18022-07	1.85	B*15:02 B*40:01	B*15:02 阳性
CNGB030154/HLA18025-08	1.89	B*14:02 B*40:06	阴性
CNGB030292/HLA19054-09	1.9	B*44:03 B*57:01	B*57:01 阳性
CNGB030297/HLA19059-10	1.86	B*35:03 B*44:02	阴性
CNGB030294/HLA19056-11	1.93	B*37:01 B*58:01	B*58:01 阳性
CNGB030308/HLA19070-12	1.88	B*18:01 B*46:01	阴性
CNGB030300/HLA19062-13	1.92	B*15:02 B*55:02	B*15:02 阳性
CNGB030305/HLA19067-14	1.89	B*07:02 B*54:01	阴性
CNGB030273/HLA19035-15	1.87	B*58:01 B*67:01	B*58:01 阳性
CNGB030311/HLA19073-16	1.93	B*13:02 B*67:01	阴性
CNGB030316/HLA19078-17	1.92	B*51:01 B*58:01	B*58:01 阳性
CNGB030147/HLA18018-18	1.9	B*46:01 B*57:01	B*57:01 阳性
CNGB030303/HLA19065-19	1.93	B*15:18 B*57:01	B*57:01 阳性
CNGB030138/HLA18009-20	1.94	B*39:01 B*58:01	B*58:01 阳性

B1502和B5801的阴性或阳性结果。结果表明,在制造商宣称的分辨率水平上,4家的标定结果与参考品已知基因分型结果(表1)均相符合。B公司将参考品稀释到其检测限水平10 ng/ μ L之后进行SBT法分型检测仍可检出且与已知基因分型结果相符合。D公司将参考品稀释到B1502试剂盒检测限10 ng/ μ L之后进行荧光PCR法检测,将B5801试剂盒检测限2.5 ng/ μ L之后进行荧光PCR法,结果均能够检出,且均与预期B1502和B5801的阴性、阳性全部相符。

2.3 国家参考品的稳定性和均匀性验证

HLA-B5801/5701/1502核酸检测国家参考品的性质是DNA样本,要求日常储存条件为 -20°C 以下,同时要求采用干冰或 -20°C 冷链运输,且要求用户不宜反复冻融使用。DNA样本在 -20°C 保存是非常稳定的,本科室既往研制的DNA参考品在 37°C 加热4周之后仍然稳定^[12]。考虑到用户可能一次使用不完,将本参考品在 -20°C 与室温($20\sim 25^{\circ}\text{C}$)之间反复冻融3次,之后进行了SBT测序法、PCR法两种方法学的验证,检测结果均与正常条件下保存(-20°C)的参考品完全一致,研究表明反复冻融3次之后参考品仍然是稳定的。本研究还将对该国家参考品进行长期稳定性考察以及期间核查,以确保长期放置后依然满足要求。

另外取出3套参考品,每个样本各检测1次,使用北京博奥晶典生物技术有限公司的HLA-B位点基因高分辨分型试剂盒(SBT测序法)进行检测,结果均与表1中的已知基因分型结果一致。

本参考品为首批研制的定性基因分型参考品,参考品原料系人全血转化的永生化细胞系,参考品性质为DNA样本。以上研究数据表明,人类白细胞抗原BB5801/5701/1502核酸检测国家参考品的量值准确性、均一性和稳定性均符合要求,适用于对HLA-B5801核酸检测试剂盒、HLA-B5701核酸检测试剂盒、HLA-B1502核酸检测试剂盒的准确性、特异性及检测限性能指标进行质量控制和评价。

3 讨论

标准物质是具有准确量值的测量标准,具有一种或多种足够均匀且稳定特性的材料,标准物质的定值是对标准物质特性量赋值的过程。定值准确、稳定、均匀是标准物质的三大基本特性。均匀性可保证一批原料所制备的标准物质均匀一

致,稳定性可使一批标准物质长期分发使用,以保持特性值的连续性^[13-15]。本研究采用4家公司联合对国家参考品进行协作标定的定值方式,并且其中2家均采用目前世界卫生组织推荐的“金标准”HLA分型方法即SBT测序法,1家采用了NGS测序法,另1家采用了单基因位点分型临床检测常用的荧光PCR法,4家公司3种方法学的结果均一致,充分保障了参考品的定值准确;参考品的均匀性与复溶稳定性考察中也采用了SBT金标准测序法,充分保障了研究结果的准确可信。为保障国家参考品的持续供应以及换批连续性,本次研制采用EB病毒转化人外周血淋巴细胞从而获得建立永生化细胞系方式^[16-17],以便获得足量和持久的细胞基因组DNA,同时有也解决了人体大量血液样本难以获得的现实困难。本研究也表明永生化淋巴细胞系基因组DNA的检测结果与临床血液样本DNA的HLA-B分型结果一致,也表明了该永生化淋巴细胞系的遗传信息稳定,可作为国家参考品的遗传资源。

综上所述,本实验室成功建立了人类白细胞抗原B5801/5701/1502核酸检测国家参考品,包括5例HLA-B5801阳性、3例HLA-B5701阳性、3例HLA-B1502阳性和9例阴性样本,共20例DNA样本。该参考品具有良好的稳定性和均匀性,且定值准确,能够用于HLA-B5801核酸检测试剂盒、HLA-B5701核酸检测试剂盒、HLA-B1502核酸检测试剂盒的准确性、特异性及检测限性能指标的质量控制和评价。

参考文献

- [1] Yacoub MR, Berti A, Campochiaro C, et al. Drug induced exfoliative dermatitis: state of the art[J]. Clin Mol Allergy, 2016, 14(1):9.
- [2] Park DJ, Kang JH, Lee JW, et al. Cost-effectiveness analysis of HLA-B5801 genotyping in the treatment of gout patients with chronic renal insufficiency in Korea[J]. Arthritis Care Res (Hoboken), 2015, 67(2):280-287.
- [3] Saokaew S, Tassaneeyakul W, Maenthaisong R, et al. Cost-effectiveness analysis of HLA-B*5801 testing in preventing allopurinol-induced SJS/TEN in Thai population[J]. PLoS One, 2014, 9(4):e94294.
- [4] Cheng H, Yan D, Zuo X, et al. A retrospective investigation of HLA-B*5801 in hyperuricemia patients in a Han population of China[J]. Pharmacogenet Genomics, 2018, 28(5): 117-124.

- [5] 张琳,周迎生,魏娟娟,等. 高尿酸血症患者降尿酸药物的应用及 HLA-B*5801 基因检测的合理性分析[J]. 中国医药, 2020, 15(6):886-889.
- [6] Shah R, Nabiswa H, Okinda N, et al. Prevalence of HLA-B*5701 in a Kenyan population with HIV infection [J]. J Inf, 2018, 76(2):212-214.
- [7] Stainsby CM, Perger TM, Vannappagari V, et al. Abacavir Hypersensitivity Reaction Reporting Rates During a Decade of HLA-B*5701 Screening as a Risk-Mitigation Measure [J]. Pharmacotherapy, 2019, 39(1):40-54.
- [8] 孙坚萍,孙焕芹,刘宁. 中国北京男男同性恋艾滋病感染者 HLA 分型及与疾病进展分析[J]. 中国免疫学杂志, 2016, 32(8):1183-1191.
- [9] Chung WH, Hung SI. Recent advances in the genetics and immunology of Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrosis[J]. J DermatolSci, 2012, 66(3):190-196.
- [10] Chen P, Lin JJ, Lu CS, et al. Carbamazepine-induced toxic effects and HLA-B*1502 screening in Taiwan [J]. N Engl J Med, 2011, 364(12):1126-1133.
- [11] 普明,苏琴,李昌凤,等. 3例 HLA-B*1502 基因阴性患儿使用奥卡西平致药疹的病例分析及用药建议[J]. 海峡药学, 2020, 32(4):209-212.
- [12] 贾峥,张文新,李丽莉,等. 染色体拷贝数变异国家参考品的制备及标定[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2019, 11(4):256-262.
- [13] 国家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.
- [14] 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.
- [15] 国家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.
- [16] 贾峥,张艳艳,孙楠,等. 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶基因突变永生淋巴细胞的建立[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(4):428-432.
- [17] 高飞,胡泽斌,孙楠,等. 脆性 X 综合征外周血淋巴细胞永生细胞系的建立与验证[J]. 中国医药生物技术, 2019, 14(5):470-473.

(上接第 1136 页)

- [26] Chu YH, Hardin H, Schneider DF, et al. MicroRNA-21 and long non-coding RNA MALAT1 are overexpressed markers in medullary thyroid carcinoma [J]. Exp Mol Pathol, 2017, 103(2):229-236.
- [27] Aubert S, Berdelou A, Gnemmi V, et al. Large sporadic thyroid medullary carcinomas: predictive factors for lymph node involvement [J]. Virchows Arch, 2018, 472(3):461-468.
- [28] Shabani N, Sheikholeslami S, Paryan M, et al. An investigation on the expression of miRNAs including miR-144 and miR-34a in plasma samples of RET-positive and RET-negative medullary thyroid carcinoma patients [J]. J Cell Physiol, 2020, 235(2):1366-1373.
- [29] Jiang M, Shi X, Zhu H, et al. Two GEO MicroRNA Expression Profile Based High-Throughput Screen to Identify MicroRNA-31-3p Regulating Growth of Medullary Thyroid Carcinoma Cell by Targeting RASA2 [J]. Med Sci Monit, 2019, 25:5170-5180.
- [30] Fkih M'hamed I, Privat M, Trimeche M, Penault-Llorca F, Bignon YJ, Kenani A. miR-10b, miR-26a, miR-146a And miR-153 Expression in Triple Negative Vs Non Triple Negative Breast Cancer: Potential Biomarkers [J]. Pathol Oncol Res, 2017, 23(4):815-827.
- [31] Wang L, Lv X, Fu X, et al. MiR-153 inhibits the resistance of lung cancer to gefitinib via modulating expression of ABCE1 [J]. Cancer Biomark, 2019, 25(4):361-369.
- [32] Joo LJS, Weiss J, Gill AJ, et al. RET Kinase-Regulated MicroRNA-153-3p Improves Therapeutic Efficacy in Medullary Thyroid Carcinoma [J]. Thyroid, 2019, 29(6):830-844.
- [33] Hong S, Noh H, Teng Y, et al. SHOX2 is a direct miR-375 target and a novel epithelial-to-mesenchymal transition inducer in breast cancer cells [J]. Neoplasia, 2014, 16(4):279-90.e1-5.
- [34] Romeo P, Colombo C, Granata R, et al. Circulating miR-375 as a novel prognostic marker for metastatic medullary thyroid cancer patients [J]. Endocr Relat Cancer, 2018, 25(3):217-231.
- [35] Galuppini F, Bertazza L, Barollo S, et al. MiR-375 and YAP1 expression profiling in medullary thyroid carcinoma and their correlation with clinical-pathological features and outcome [J]. Virchows Arch, 2017, 471(5):651-658.
- [36] Seidl C, Panzitt K, Bertsch A, et al. MicroRNA-182-5p regulates hedgehog signaling pathway and chemosensitivity of cisplatin-resistant lung adenocarcinoma cells via targeting GLI2. Cancer Lett, 2020, 469:266-276.
- [37] Lv Y, Ye D, Qiu S, et al. MiR-182 regulates cell proliferation and apoptosis in laryngeal squamous cell carcinoma by targeting the CRR9. Biosci Rep, 2019, 39(10):BSR20191348.
- [38] Spitschak A, Meier C, Kowtharapu B, et al. MiR-182 promotes cancer invasion by linking RET oncogene activated NF- κ B to loss of the HES1/Notch1 regulatory circuit [J]. Mol Cancer, 2017, 16(1):24.

lncRNA MCM3AP-AS1 靶向 miR-524-5p 在 CIK 细胞诱导肺癌细胞 A549 凋亡中作用机制研究

肖永平 李庆科 王兴昌 王帆 袁会军*

[摘要] **目的** 探讨长链非编码 RNA 微小染色体维系蛋白 3 结合蛋白反义 1 (lncRNA MCM3AP-AS1) 参与细胞因子诱导杀伤 (CIK) 细胞杀伤肺癌细胞过程中的调控作用, 并确定 MCM3AP-AS1 的发挥功能的靶基因和分子机制。**方法** 细胞计数试剂盒 (CCK-8) 法测定 CIK 细胞对 A549 细胞的杀伤效应。实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 检测与 CIK 细胞共培养前后 A549 细胞中 MCM3AP-AS1 和 miR-524-5p 的表达水平。流式细胞术检测 CIK 细胞共培养前后 A549 细胞凋亡情况。将 MCM3AP-AS1 过表达载体、miR-524-5p 抑制剂、pcDNA-MCM3AP-AS1+miR-524-5p 分别转染 A549 细胞, 与 CIK 细胞共培养后, 流式细胞术检测 A549 细胞凋亡变化。双荧光素酶报告基因实验和 RT-qPCR 验证 MCM3AP-AS1 对 miR-524-5p 的靶向作用。**结果** CIK 细胞大体以时间、浓度依赖性方式杀伤肺癌细胞, 选择效靶比 20:1 作用 12 h 进行后续研究。与 CIK 细胞共培养后, A549 细胞 MCM3AP-AS1 的表达显著降低, miR-524-5p 的表达显著升高, A549 细胞凋亡率显著增加 ($P < 0.05$)。过表达 MCM3AP-AS1 或干扰 miR-524-5p 表达后, CIK 细胞对 A549 细胞的凋亡促进作用显著降低 ($P < 0.05$)。MCM3AP-AS1 靶向负性调控 miR-524-5p 表达。过表达 miR-524-5p 可以逆转过表达 MCM3AP-AS1 对 CIK 细胞诱导的 A549 细胞凋亡的影响 ($P < 0.05$)。**结论** CIK 细胞通过调控 MCM3AP-AS1/miR-524-5p 通路促进肺癌细胞凋亡, 为 CIK 细胞治疗肺癌提供新的依据。

[关键词] 肺癌; CIK 细胞; MCM3AP-AS1; miR-524-5p; 细胞凋亡

Study on the mechanism of lncRNA MCM3AP-AS1 targeting miR-524-5p in CIK cell-induced apoptosis of lung cancer cell A549

XIAO Yongping, LI Qingke, WANG Xingchang, WANG Fan, YUAN Huijun*

(Department of Pharmacy, Gansu Wuwei Tumor Hospital, Wuwei, Gansu, China, 730000)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the role of long-chain non-coding RNA Micro-chromosome maintenance protein 3-associated protein antisense 1 (lncRNA MCM3AP-AS1) in the regulation of cytokine-induced killer cells (CIK) killing lung cancer cells, and to determine the target genes of MCM3AP-AS1 and its molecular mechanisms. **Methods** Cell Counting Kit 8 (CCK-8) was used to determine the killing effect of CIK cells on A549 cells. Real-time fluorescent quantitative PCR (RT-qPCR) was used to detect the expression levels of MCM3AP-AS1 and miR-524-5p in A549 cells before and after co-culture with CIK cells. Flow cytometry was used to detect the apoptosis of A549 cells before and after co-culture with CIK cells. MCM3AP-AS1 overexpression vector, miR-524-5p inhibitor, pcDNA-MCM3AP-AS1 + miR-524-5p were transfected into A549 cells, and co-cultured with CIK cells, flow cytometry was used to detect A549 cell apoptosis. Double luciferase reporter gene experiment and RT-qPCR were used to verify the targeting effect of MCM3AP-AS1 on miR-524-5p. **Results** CIK cells generally killed lung cancer cells in a time-dependent and concentration-dependent manner, and effect-target ratio 20:1 and 12 h was selected for subsequent experiments. After co-

项目基金:武威市市列科技计划项目 (WW180256)

作者单位:甘肃省武威肿瘤医院,甘肃,武威 733000

*通信作者:袁会军, E-mail:81106396@qq.com

culture with CIK cells, the expression of MCM3AP-AS1 in A549 cells was significantly reduced, the expression of miR-524-5p was significantly increased, and the apoptosis rate of A549 cells was significantly increased ($P<0.05$). After over-expressing MCM3AP-AS1 or interfering with miR-524-5p, the apoptosis-promoting effect of CIK cells on A549 cells was significantly decreased ($P<0.05$). MCM3AP-AS1 targets and negatively regulates miR-524-5p expression. Over-expressing miR-524-5p could reverse the effect of over-expressing MCM3AP-AS1 on A549 cell apoptosis induced by CIK cells ($P<0.05$). **Conclusions** CIK cells promote the apoptosis of A549 cells by regulating the molecular axis of MCM3AP-AS1/miR-524-5p, which provides a new basis for the treatment of lung cancer by CIK cells.

[KEY WORDS] Lung cancer; CIK cells; MCM3AP-AS1; MiR-524-5p; Apoptosis

近年来,全球肺癌发病率和死亡率迅速增加。手术切除是早期肺癌患者的主要治疗手段,但由于发病隐匿,多数患者确诊时已处于晚期或合并转移,此时主要进行化学治疗,然而由于较大的毒副作用和耐药性,肺癌患者的预后并未得到显著改善^[1]。因此,开发新的治疗策略对改善肺癌治疗现状意义重大。细胞因子诱导的杀伤(cytokine induced killer cell, CIK)细胞是不受MHC限制的细胞毒性淋巴细胞,近年来基于CIK细胞的过继免疫疗法在包括肺癌、结肠癌在内的多种肿瘤的临床治疗中表现出潜在优势,但诱导癌细胞凋亡的机制尚未完全阐明^[2-3]。长链非编码RNA微小染色体维系蛋白3结合蛋白反义1(long non-coding RNA Micro-chromosome maintenance protein 3-associated protein antisense 1, lncRNA MCM3AP-AS1)是一种新发现的致癌基因,研究显示^[4]肺癌中MCM3AP-AS1高表达,干扰MCM3AP-AS1可抑制肺癌细胞的增殖、迁移和血管生成,抑制肺癌进展。本研究拟通过探讨MCM3AP-AS1在CIK细胞诱导肺癌细胞凋亡中的作用,确定其下游靶基因,揭示MCM3AP-AS1参与CIK细胞杀伤肺癌细胞的作用机制,以期为CIK细胞免疫疗法在肺癌辅助治疗中的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

人肺腺癌细胞株 A549(上海信裕生物公司); anti-CD3 抗体购于北京博奥森生物技术有限公司; anti CD3 PE Cy5、anti CD56 FITC(美国 PeproTech 公司); CCK-8 试剂盒、Annexin V-FITC/PI 双染法细胞凋亡检测试剂盒(上海碧云天生物); cDNA 第一链合成试剂盒、SYBR Green Fast qPCR Mix(大连宝生物公司); Cleaved-caspase-3 抗体、 β -actin 以及山羊抗兔 IgG1(美国 CST 公司); 流式细胞仪(美

国 Thermo 公司); 荧光定量 PCR 仪(美国 BIO-RAD 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 CIK 细胞诱导

参考文献^[5]方法制备 CIK 细胞,诱导第 14 d 时收集细胞备用。

1.2.2 CCK-8 法测定 CIK 细胞对肺癌细胞的杀伤作用

取 1×10^4 个 A549 细胞接种到 96 孔板,按照效靶比 10:1、20:1、40:1 加入 CIK 细胞。共培养 0、6、12、24 h 时,加入 CCK-8 试剂,酶标仪检测各孔吸光度(OD)值。CIK 细胞杀伤活性(%)=(1-实验孔 OD 值/靶细胞 OD) \times 100%。

1.2.3 RT-qPCR 检测与 CIK 细胞共培养前后 A549 细胞中 MCM3AP-AS1 和 miR-524-5p 的表达

取 1×10^5 个 A549 细胞接种到 6 孔板,在 6 孔板上放置孔径为 0.4 μ m 聚酯膜,按照效靶比 20:1 加入 CIK 细胞。收集共培养前和共培养 12 h 的 A549 细胞,提取细胞总 RNA,按照 cDNA 第一链合成试剂盒合成 cDNA,按照 SYBR Green Fast qPCR Mix 使用说明进行 RT-qPCR。2^{- $\Delta\Delta$ CT} 法分析 MCM3AP-AS1 和 miR-524-5p 的表达水平。

1.2.4 流式细胞术测定 CIK 细胞对肺癌细胞的凋亡诱导作用

共同培养 12 h 后,收集细胞。每个样品加入 400 μ L 的结合缓冲液重悬细胞,混匀后,分别加入 5 μ L 的 Annexin V-FITC 和 PI。流式细胞仪检测细胞凋亡。

1.2.5 Western blot 检测与 CIK 细胞共培养前后 A549 细胞 Cleaved-caspase-3 蛋白的表达

共培养 12 h 后,采用 RIPA 裂解法提取细胞总蛋白。按照聚丙烯酰胺凝胶电泳-转膜-膜的封闭-一抗孵育-二抗孵育-化学发光显色-灰度值分析步骤进行。

1.2.6 流式细胞术检测肺癌细胞凋亡

利用 Lipofectamine™ 2000 将 pcDNA-NC、pcDNA-MCM3AP-AS1、anti-miR-NC、anti-miR-524-5p、pcDNA-MCM3AP-AS1+miR-NC、pcDNA-MCM3AP-AS1+miR-524-5p 分别转染 A549 细胞,转染 48 h,测定转染效率合格后按照效靶比为 20:1 加入 CIK 细胞共培养 12 h,随后按照 1.2.5 和 1.2.6 步骤测定 A549 细胞凋亡率和 Cleaved-caspase-3 蛋白的表达水平。

1.2.7 双荧光素酶报告基因实验验证 MCM3AP-AS1 对 miR-524-5p 的靶向调控

将含有 miR-524-5p 结合位点的野生型(WT-MCM3AP-AS1)或含有 miR-524-5p 结合位点突变序列的突变型(MUT-MCM3AP-AS1)荧光素酶报告基因载体分别与 miR-524-5p mimics、miR-NC 共转染 A549 细胞,转染 48 h,测定各组细胞的荧光素酶活性。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 20.0 软件进行分析,计量资料用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验进行分析,多组间比较采用单因素方差分析;计数资料用 *n*(%) 表示,行 χ^2 检验。*P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CIK 细胞表型鉴定及杀伤活性

CIK 细胞诱导培养 14 d 后,流式细胞术检测 CIK 细胞免疫表型,结果显示 CIK 细胞大体以时间、浓度依赖性方式杀伤肺癌细胞,差异有统计学意义(*P* < 0.05),见表 1。

表 1 CIK 细胞对肺癌细胞的杀伤作用 $(\bar{x} \pm s)$
Table 1 The killing effect of CIK cells on lung cancer cells $(\bar{x} \pm s)$

组别	杀伤率(%)		
	10:1	20:1	40:1
0 h	0.05±0.001	0.04±0.001	0.01±0.001
6 h	2.13±0.21	3.96±0.40	5.21±0.52
12 h	2.22±0.22	30.23±3.02	36.12±3.51
24 h	2.24±0.23	32.29±3.23	31.27±3.13
<i>F</i> 值	285.805	527.128	529.744
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000

2.2 CIK 细胞对肺癌细胞 A549 细胞中 lncRNA MCM3AP-AS1 和 miR-524-5p 表达水平的影响

CIK 细胞作用 12 h 后,A549 细胞中 lncRNA MCM3AP-AS1 的表达水平显著降低,miR-524-5p

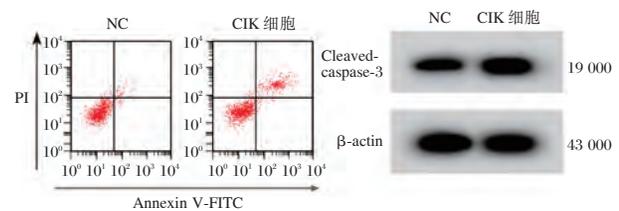
的表达水平显著升高,差异有统计学意义(*P* < 0.05)。见表 2。

表 2 qRT-PCR 检测 lncRNA MCM3AP-AS1 和 miR-524-5p $(\bar{x} \pm s)$
Table 2 qRT-PCR detects the expression of lncRNA MCM3AP-AS1 and miR-524-5p $(\bar{x} \pm s)$

组别	lncRNA MCM3AP-AS1	miR-524-5p
NC	1.01±0.10	1.03±0.11
CIK 细胞	0.33±0.03	3.69±0.38
<i>t</i> 值	19.540	20.172
<i>P</i> 值	0.000	0.000

2.3 CIK 细胞对肺癌细胞 A549 细胞凋亡的影响

与 NC 组比较,CIK 细胞组 A549 细胞 Cleaved-caspase-3 蛋白的表达显著升高,细胞凋亡率显著升高,差异有统计学意义(*P* < 0.05)。见图 1。



注:A.流式细胞仪检测细胞凋亡;B. Western blot 检测 Cleaved-caspase-3 蛋白的表达。

图 1 CIK 细胞对肺癌细胞 A549 细胞凋亡的影响

Figure 1 The effect of CIK cells on apoptosis of lung cancer cell A549

2.4 过表达 MCM3AP-AS1 可以逆转 CIK 细胞诱导的 A549 凋亡

与 pcDNA-NC+CIK 细胞组比较,pcDNA-MCM3AP-AS1+CIK 细胞组 A549 细胞 MCM3AP-AS1 的表达显著升高,Cleaved-caspase-3 蛋白的表达显著降低,细胞凋亡率显著降低,差异有统计学意义(*P* < 0.05)。见表 3。

表 3 过表达 MCM3AP-AS1 可以逆转 CIK 细胞诱导的 A549 凋亡 $(\bar{x} \pm s)$

组别	MCM3AP-AS1	Cleaved-caspase-3	凋亡率 (%)
pcDNA-NC+CIK 细胞	1.02±0.11	0.92±0.09	25.88±2.59
pcDNA-MCM3AP-AS1+CIK 细胞	3.22±0.32	0.52±0.05	12.01±1.20
<i>t</i> 值	19.505	11.655	14.577
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000

2.5 干扰 miR-524-5p 可以逆转 CIK 细胞诱导的 A549 凋亡

与 anti-miR-NC+CIK 细胞组比较, anti-miR-524-5p+CIK 细胞组 A549 细胞 miR-524-5p 的表达显著降低, Cleaved-caspase-3 蛋白的表达显著降低, 细胞凋亡率显著降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 4。

表 4 干扰 miR-524-5p 可以逆转 CIK 细胞诱导的 A549 凋亡 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Interfering miR-524-5p can reverse the apoptosis of A549 induced by CIK cells ($\bar{x} \pm s$)

组别	miR-524-5p	Cleaved-caspase-3	细胞凋亡率 (%)
anti-miR-NC+CIK 细胞	1.00±0.11	0.95±0.11	24.38±2.44
anti-miR-524-5p+CIK 细胞	0.35±0.04	0.56±0.06	11.02±1.10
<i>t</i> 值	16.660	9.338	14.975
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000

2.6 MCM3AP-AS1 靶向调控 miR-524-5p 的表达

TargetScan 预测显示, MCM3AP-AS1 和 miR-524-5p 之间存在部分连续特异性结合位点。与 miR-NC 和 WT-MCM3AP-AS1 共转染组比较, miR-524-5p 和 WT-MCM3AP-AS1 共转染组 A549 细胞的荧光素酶活性显著降低 ($P < 0.05$); 与 miR-NC 和 MUT-MCM3AP-AS1 共转染组比较, miR-524-5p 和 MUT-MCM3AP-AS1 共转染组 A549 细胞的荧光素酶活性无明显变化。与 si-NC 组比较, si-MCM3AP-AS1 组 A549 细胞 miR-524-5p 的表达水平显著升高; 与 pcDNA-NC 组比较, pcDNA-MCM3AP-AS1 组 A549 细胞 miR-524-5p 的表达水平显著降低 ($P < 0.05$), 见图 2、表 5、6。

2.7 过表达 miR-524-5p 可以逆转过表达 MCM3AP-AS1 对 CIK 细胞诱导的 A549 凋亡的影响

与 pcDNA-MCM3AP-AS1+miR-NC+CIK 细胞

表 7 过表达 miR-524-5p 可以逆转过表达 MCM3AP-AS1 对 CIK 细胞诱导的 A549 凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 7 Overexpression of miR-524-5p can reverse the effect of overexpression of MCM3AP-AS1 on A549 apoptosis induced by CIK cells ($\bar{x} \pm s$)

组别	miR-524-5p	Cleaved-caspase-3	凋亡率 (%)
pcDNA-MCM3AP-AS1+miR-NC+CIK 细胞	1.01±0.10	0.50±0.05	12.35±1.24
pcDNA-MCM3AP-AS1+miR-524-5p+CIK 细胞	2.66±0.26	0.85±0.09	21.08±2.11
<i>t</i> 值	17.769	10.199	10.701
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000

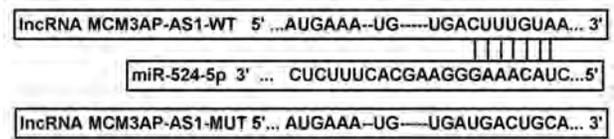


图 2 通过 TargetScan 对 MCM3AP-AS1 和 miR-524-5p 结合进行预测示意图

Figure 2 Schematic diagram of predicting the combination of MCM3AP-AS1 and miR-524-5p through TargetScan

表 5 miR-NC 或 miR-524-5p 与报告质粒共转染 A549 细胞后双荧光素酶活性检测 ($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Detection of dual luciferase activity after co-transfection of miR-NC or miR-524-5p with the reporter plasmid in A549 cells ($\bar{x} \pm s$)

组别	荧光素酶活性	
	WT-MCM3AP-AS1	MUT-MCM3AP-AS1
miR-NC	1.01±0.11	1.04±0.12
miR-524-5p	0.30±0.03	1.02±0.10
<i>t</i> 值	18.681	0.384
<i>P</i> 值	0.000	0.706

表 6 RT-qPCR 检测 miR-524-5p 的表达 ($\bar{x} \pm s$)

Table 6 RT-qPCR detection of miR-524-5p expression ($\bar{x} \pm s$)

组别	miR-524-5p
si-NC	1.00±0.11
si-MCM3AP-AS1	2.63±0.26
pcDNA-NC	1.03±0.10
pcDNA-MCM3AP-AS1	0.40±0.04
<i>F</i> 值	359.724
<i>P</i> 值	0.000

组比较, pcDNA-MCM3AP-AS1+miR-524-5p+CIK 细胞组 A549 细胞 miR-524-5p 的表达显著升高, Cleaved-caspase-3 蛋白的表达显著升高, 细胞凋亡率显著增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 7。

3 讨论

近年来,随着肿瘤免疫学和分子生物学的发展,肿瘤免疫治疗已成为除手术、化疗和放疗之外的第四肿瘤治疗技术。肿瘤免疫治疗包括过继免疫治疗、以T淋巴细胞为基础的细胞工程治疗和免疫调节药物等治疗方式^[6]。过继免疫治疗是重建宿主免疫的一种潜在的替代方法,其主要通过体外扩增和激活的CIK细胞等免疫细胞来消除癌细胞。CIK细胞又叫NKT细胞,是人外周血单核细胞在CD3抗体和细胞因子(IFN- γ , IL-1 α 和IL-2)诱导下产生的一组以分化簇CD3⁺CD56⁺阳性T细胞为主的淋巴细胞群,对多种肿瘤细胞系和荷瘤动物模型表现出较强的细胞毒活性^[7]。将CIK细胞和A549细胞共培养检测A549细胞活性改变显示,CIK细胞大体以时间、浓度依赖性方式杀伤肺癌细胞,在12h效靶比为20:1时显著上升。选用12h效靶比20:1进一步研究发现CIK细胞有效的诱导A549细胞凋亡并促进Cleaved-caspase-3表达。此外,多项临床研究^[8]表明CIK细胞治疗对晚期肺癌患者是安全有效的,化疗联合CIK细胞治疗可显著改善晚期非小细胞肺癌患者的生存期。

MCM3AP-AS1是MCM3AP的反义lncRNA,与甲状腺癌^[9]、肝癌^[10]等多种肿瘤的恶性进展相关。Wang等^[11]研究发现MCM3AP-AS1高表达与肝癌患者的肿瘤体积大、肿瘤分级高、肿瘤晚期、预后差呈正相关,敲除MCM3AP-AS1可抑制肝癌细胞的增殖、集落形成和细胞周期的进展,并在体外诱导细胞凋亡。Yang等^[12]指出MCM3AP-AS1沉默对胰腺癌细胞以及小鼠肿瘤的生长具有抑制作用。此外,Li等^[4]研究表明MCM3AP-AS1高表达是加速肺癌血管生成和进展的重要原因。生物信息学分析显示,miR-524-5p是MCM3AP-AS1的潜在靶基因之一。miR-524-5p作为一种抑癌基因,既往研究证实过表达miR-524-5p可抑制胃癌^[13]、胶质瘤^[14]等恶性肿瘤进展。此外,有研究指出lncRNA TUG1通过靶向miR-524-5p可增加OSCC细胞的增殖和迁移潜能^[15]。基于以上理论基础,本研究提出假设CIK细胞通过下调MCM3AP-AS1表达,进而上调miR-524-5p表达,从而诱导A549细胞凋亡。A549细胞与CIK细胞共培养12h后,RT-qPCR检测MCM3AP-AS1和miR-524-5p的表达水平显示,MCM3AP-AS1的表达显著降低,而miR-524-5p的

表达显著升高。进一步研究发现A549细胞转染MCM3AP-AS1过表达质粒或miR-524-5p抑制物后再与CIK细胞共培养,CIK细胞对A549细胞的凋亡诱导作用显著降低。提示MCM3AP-AS1和miR-524-5p在CIK细胞诱导A549细胞凋亡中具有一定作用。此外,本研究通过双荧光素酶报告基因实验和RT-qPCR证实MCM3AP-AS1靶向miR-524-5p并负调控其表达。提示,CIK细胞通过下调MCM3AP-AS1表达,靶向上调miR-524-5p表达,从而对A549细胞具有凋亡诱导作用。

总之,本研究显示CIK细胞通过调控MCM3AP-AS1/miR-524-5p通路对肺癌细胞具有较强的凋亡诱导作用,为CIK细胞免疫疗法在肺癌辅助治疗中的应用奠定理论基础。

参考文献

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A et al. Cancer statistics, 2015 [J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(1): 5-29.
- [2] 许立国,冯广森,林亚超,等.细胞免疫联合手术对结直肠癌肝转移患者生存质量的影响[J].分子诊断与治疗杂志,2019,11(4):295-302.
- [3] Chen D, Sha H, Hu T, et al. Cytokine-induced killer cells as a feasible adoptive immunotherapy for the treatment of lung cancer[J]. Cell Death Dis, 2018, 9(3): 366.
- [4] Li X, Yu M, Yang C. YY1-mediated overexpression of long noncoding RNA MCM3AP-AS1 accelerates angiogenesis and progression in lung cancer by targeting miR-340-5p/KPNA4 axis[J]. J Cell Biochem, 2019.
- [5] 杜宪红,邢召全,焦晋山. miR-200c在CIK细胞诱导胃癌细胞凋亡中的作用[J].山东大学学报(医学版),2013,51(6):49-52.
- [6] Du L, Herbst RS, Morgensztern D, et al. Immunotherapy in Lung Cancer [J]. Hematol Oncol Clin North Am, 2017, 31(1): 131-141.
- [7] Mata-Molanes JJ, Sureda González M, Valenzuela Jiménez B, et al. Cancer Immunotherapy with Cytokine-Induced Killer Cells[J]. Target Oncol, 2017, 12(3): 289-299.
- [8] Luo H, Gong L, Zhu B, et al. Therapeutic outcomes of autologous CIK cells as a maintenance therapy in the treatment of lung cancer patients: A retrospective study [J]. Biomed Pharmacother, 2016, 84: 987-993.
- [9] Liang M, Jia J, Chen L, et al. LncRNA MCM3AP-AS1 promotes proliferation and invasion through regulating miR-211-5p/SPARC axis in papillary thyroid cancer [J]. Endocrine, 2019, 65(2): 318-326.
- [10] Zhang H, Luo C, Zhang G. LncRNA MCM3AP-AS1 Regulates Epidermal Growth Factor Receptor and Autophagy to Promote Hepatocellular Carcinoma Metastasis by Interacting with miR-455[J]. DNA Cell Biol, 2019, 38(8): 857-864.

(下转第1151页)

佛山市9 236例孕产妇301型地中海贫血基因检测结果分析

杨发达* 高维鸿 梁丽笙 谢煜楠 夏六和 黄广强 吕凤冰

[摘要] **目的** 了解佛山市南海区孕产妇地中海贫血基因类型及其分布特征,探讨301型地中海贫血基因检测在产前筛查中的临床意义。**方法** 对2017年6月至2019年3月在佛山市南海区妇幼保健院就诊的孕产妇进行301型地贫基因检测,缺失型 α 地贫基因突变采用gap-PCR方法,非缺失型 α 地贫基因突变和 β 地贫基因突变采用NGS测序的方法。**结果** 在9 236例样本中,共1 736例(18.80%)检测出地贫基因突变,其中 α 地贫基因突变1 256例(13.60%), β 地贫基因突变426例(4.61%), α 合并 β 地贫基因突变54例(0.58%),异常血红蛋白86例(0.93%)。除了常见的23型 α 和 β 地贫基因突变外,发现了27例罕见地贫基因突变、18类共40例新发现目前尚未清楚是否致病的突变和19类共86例异常血红蛋白基因。**结论** 佛山市南海区妇幼保健院孕产妇的地中海贫血基因类型较多,存在较多的罕见地贫基因突变及新发现目前尚未清楚是否致病的突变,301型地中海分血基因检测的产前筛查中具有重要意义。

[关键词] 地中海贫血; 罕见基因突变; NGS测序; 孕产妇

Analysis of gene detection results of type 301 thalassemia in 9 236 pregnant women in Foshan

YANG Fada*, GAO Weihong, LIANG Lisheng, XIE Yunan, XIA Liuhe, HUANG Guangqiang, LV Fengbing (Clinical Laboratory of Nanhai Maternity & Child Healthcare Hospital of Foshan, Foshan, Guangdong, China, 528200)

[ABSTRACT] **Objective** To identify genotypes of Maternal thalassemia and mutation spectrum in the Nanhai district of Foshan city, thereby to further explore the clinical significance of gene detection of type 301 thalassemia in prenatal screening. **Methods** The pregnant women in the obstetric clinic of Nanhai Maternity & Child Healthcare Hospital of Foshan during the period from Jun., 2017 to Mar., 2019 were screened by gene detection of type 301 thalassemia. The α -thalassemia deletion defects were screen by gap-PCR, non-deletion alpha -thalassemia gene mutation and beta -thalassemia gene mutation were sequenced by next - generation sequencing technology (NGS). **Results** In the 9236 cases, a total of 1736 cases (18.80%) was detected thalassemia gene mutations, including 1256 cases (13.60%) of alpha thalassemia gene mutations, 426 cases (4.61%) of beta thalassemia gene mutations, 54 cases (0.58%) of alpha combined with beta thalassemia gene mutations, and 86 cases (0.93%) of abnormal hemoglobin. In addition to the common mutations of type 23 alpha and beta thalassemia genes, 27 rare mutations of thalassemia gene, 18 new types of thalassemia gene and 19 types of abnormal hemoglobin genes were identified. **Conclusion** There are many genotypes of thalassemia among pregnant women in Nanhai Maternal and Child Health Hospital of Foshan City, and there are rarer thalassaemia gene mutations and new discoveries. It is not clear whether it is a disease-causing mutation. The 301 type Mediterranean blood separation genetic test is of great significance in prenatal screening.

[KEY WORDS] Thalassemia; Rare genetic mutation; Next-generation sequencing; Pregnant women

基金项目:佛山市医学类科技攻关项目(2015AB000532)

作者单位:佛山市南海区妇幼保健院检验科,广东,佛山 528200

*通信作者:杨发达, E-mail:nhfyjk@163.com

地中海贫血是一种单基因遗传性疾病,是由于珠蛋白基因缺失或突变导致 α 和 β 珠蛋白生成障碍引起的遗传性溶血性疾病^[1]。地中海贫血主要分布在地中海沿岸,非洲,中东,印度和东南亚。在我国主要好发于广西,广东和海南^[2]。妊娠合并地中海贫血,可导致胎儿生长受限,早产,胎死宫内等不良妊娠结局,也可引起心脏病变,血栓栓塞,内分泌功能异常等严重并发症^[3],因此对来我院就诊的孕产妇进行地中海贫血筛查尤为重要。本实验为了进一步了解佛山市南海区孕产妇地中海贫血基因类型及其分布特征,应用不仅能检测出常见的23型地中海基因突变,而且能发现罕见的地贫基因突变和异常血红蛋白的gap-PCR联合NGS测序的方法进行301型地中海贫血基因检测,探讨该方法在产前筛查中的意义。

1 对象与方法

1.1 研究对象

2017年6月至2019年3月在本院建卡产检的并知情同意的孕产妇共9236例,纳入标准:年龄不限;是否进行过地贫基因筛查与基因诊断不限。

1.2 方法

1.2.1 gap-PCR法

按照亚能生物技术(深圳)有限公司的操作说明书进行标本采集、DNA提取、扩增、电泳及结果判断。

1.2.2 NGS测序法

采集EDTA-K2抗凝全血标本2 mL,4℃保存。

采用Magen试剂盒应用磁珠法提取DNA,核酸纯化,采用NanoDrop 8000对DNA进行定量检测。

加入引物进行PCR扩增,扩增后的产物在1.5%琼脂糖凝胶进行电泳检测,判断PCR扩增实验是否成功。

对鉴定后的扩增产物进行混合,从96孔PCR产物板中每孔各取10 μ L产物等体积Pooling于1个新的EP管中,即为一个文库。将已混合好的地贫文库,进行适合Illumina测序分型的index PCR-free DNA文库的构建。

使用Agilent 2100 Bioanalyzer检测文库质量以及Q-PCR定量检测文库产量,判定文库制备是否成功。检测合格的样本经反应生成DNA簇群,

每个文库在Illumina HiSeq2500测序仪上按照测序说明进行PE100测序,产生原始数据。

1.3 数据分析

获得的原始数据直接传送到大型机,数据下机后进入信息分析流程,首先对下机的原始数据(Raw reads)进行测序质量评估,去除低质量以及被接头污染的reads,然后根据index和primer分类至不同样品中做后续分析;使用BWA软件将reads比对到参考基因序列,使用SOAPSnp软件和Samtools软件分别进行SNP和Indel的查询,生成目标区域碱基多态性结果。

2 结果

2.1 α 地贫基因缺失或突变检出及分布情况

在9236例孕产妇检测样本中,共1256例检测出 α 地贫基因缺失或突变, α 地贫基因缺失或突变的携带率为13.60%。其中 α 地贫基因缺失或突变中以 $\alpha\alpha/--^{SEA}$ 基因型为主。见表1。

表1 1256例 α 地贫基因缺失或突变分布情况 [$n(\%)$]

Table 1 Distribution of deletion or mutation of alpha thalassemia gene in 1256 cases [$n(\%)$]

α 地贫基因缺失或突变类型	构成比
$\alpha\alpha/--^{SEA}$	613(48.81)
$\alpha\alpha/-\alpha^{3.7}$	360(28.66)
$\alpha\alpha/-\alpha^{4.2}$	94(7.48)
Hb Westmead 杂合	81(6.45)
Hb Constant Spring (Hb CS)杂合	40(3.18)
Hb Quong Sze 杂合	20(1.59)
$-\alpha^{3.7}/--^{SEA}$	11(0.88)
$-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$	4(0.32)
$\alpha\alpha/--^{SEA}$ 复合Hb Westmead 突变	4(0.32)
Hb Dapu 杂合	4(0.32)
$\alpha\alpha/--^{THAI}$	4(0.32)
$\alpha 2$ Codon 31 (AGG>AAG)杂合	3(0.24)
Alpha2 Codon 30 del GAG 杂合	2(0.16)
IVS-I-117 (G>A)杂合	2(0.16)
$-\alpha^{4.2}/--^{SEA}$	2(0.16)
$\alpha\alpha/-\alpha^{3.7}$ 复合Hb Westmead 突变	2(0.16)
Hb Westmead 杂合复合Hb Constant Spring (Hb CS)杂合	1(0.08)
Codon 40 AAG>AA-杂合	1(0.08)
Fusion gene/ $\alpha\alpha$	1(0.08)
Hb Constant Spring (Hb CS)纯合	1(0.08)
$-\alpha^{3.7}/-\alpha^{4.2}$	1(0.08)
$-\alpha^{4.2}/-\alpha^{4.2}$	1(0.08)
$\alpha\alpha/--^{SEA}$ 复合Hb Constant Spring (Hb CS)突变	1(0.08)
$\alpha\alpha/-\alpha^{3.7}$ 复合Hb Quong Sze 突变	1(0.08)
$\alpha\alpha/-\alpha^{4.2}$ 复合Hb Constant Spring (Hb CS)突变	1(0.08)
$\alpha\alpha/-\alpha^{4.2}$ 复合 $\alpha 2$ Codon 31 (AGG>AAG)突变	1(0.08)

2.2 β地贫基因突变检出及分布情况

在9 236例孕产妇检测样本中,共426例检测出β地贫基因突变,β地贫基因突变的携带率为4.61%。其中β地贫基因突变中以Codons 41/42(-TTCT) beta⁰杂合基因型为主。见表2。

表2 426例β地贫基因突变分布情况 [n(%)]
Table 2 Distribution of mutations in beta thalassemia gene in 426 cases [n(%)]

地贫基因突变类型	构成比
Codons 41/42 (-TTCT) beta ⁰ 杂合	145(34.04)
IVS-II-654 (C>T) beta ⁺ 杂合	102(23.94)
Codon 17 (A>T) beta ⁰ 杂合	49(11.50)
-28 (A>G) beta ⁺ 杂合	46(10.80)
-50 (G>A) beta ⁺ 杂合	18(4.23)
Hb E杂合	16(3.76)
Codons 71/72 (+A) beta ⁰ 杂合	11(2.58)
Codon 43 (G>T) beta ⁰ 杂合	8(1.88)
Codons 27/28 (+C) beta ⁰ 杂合	8(1.88)
-29 (A>G) beta ⁺ 杂合	4(0.94)
Chinese Ggamma(Agammadeltabeta) ⁰ 缺失杂合	4(0.94)
Codon 37 (TGG>TAG) beta ⁰ 杂合	2(0.47)
Codons 14/15 (+G) beta ⁰ 杂合	2(0.47)
IVS-I-1 (G>T) beta ⁰ 杂合	2(0.47)
IVS-II-5 (G>C) beta ⁺ 杂合	2(0.47)
-28 (A>G) beta ⁺ 杂合复合 Codons 41/42 (-TTCT) beta ⁰ 杂合	1(0.23)
5'UTR +43 to +40(-AAAC) beta ⁺ 杂合	1(0.23)
-90(C>T) beta ⁺ 杂合	1(0.23)
beta-176 (C>T)杂合	1(0.23)
CAP +8 (C>T)杂合	1(0.23)
Initiation codon ATG>AGG beta ⁰ 杂合	1(0.23)
IVS II-761 (A>G) beta (0 or +unclear)杂合	1(0.23)

2.3 α复合β地贫基因突变检出及分布情况

在9 236例孕产妇检测样本中,共54例检测出α复合β地贫基因突变,α复合β地贫基因突变的携带率为0.58%。其中αα/-α^{3.7}复合 Codons 41/42(-TTCT) beta⁰杂合基因型最多。见表3。

2.4 罕见型地贫基因突变检出及分布情况

在9 236例孕产妇检测样本中,共27例检测出罕见型地贫基因突变,其携带率为0.29%。见表4。

2.5 目前尚未清楚是否致病的地贫基因突变检出及分布情况

在9 236例孕产妇检测样本中,新发现18类共40例(0.43%)目前尚未清楚是否致病的地贫基因突变。见表5。

表3 54例α复合β地贫基因突变分布情况 [n(%)]
Table 3 Distribution of mutations of alpha complex beta thalassemia gene in 54 cases [n(%)]

地贫基因突变类型	构成比
αα/-α ^{3.7} 复合 Codons 41/42(-TTCT)beta ⁰ 杂合	8(14.81)
αα/-- ^{SEA} 复合-28(A>G)beta ⁺ 杂合	7(12.96)
αα/-- ^{SEA} 复合 Codons 41/42(-TTCT)beta ⁰ 杂合	4(7.41)
αα/-α ^{4.2} 复合 Codons 41/42(-TTCT)beta ⁰ 杂合	3(5.56)
αα/-- ^{SEA} 复合 Hb E杂合	3(5.56)
αα/-- ^{SEA} 复合 IVS-II-654(C>T)beta ⁺ 杂合	3(5.56)
Hb Westmead 杂合复合-28(A>G)beta ⁺ 杂合	2(3.70)
αα/-- ^{SEA} 复合 Codon 17(A>T)beta ⁰ 杂合	2(3.70)
αα/-- ^{SEA} 复合 Codon 43(G>T)beta ⁰ 杂合	2(3.70)
Hb Westmead 杂合复合 IVS-I-1(G>T)beta ⁰ 杂合	2(3.70)
αα/-α ^{3.7} 复合 IVS-II-654(C>T)beta ⁺ 杂合	2(3.70)
αα/-- ^{SEA} 复合-28(A>G)beta ⁺ 纯合	1(1.85)
αα/-α ^{3.7} 复合-28(A>G)beta ⁺ 杂合	1(1.85)
αα/-α ^{4.2} 复合-28(A>G)beta ⁺ 杂合	1(1.85)
αα/-- ^{SEA} 复合-29(A>G)beta ⁺ 杂合	1(1.85)
αα/-α ^{3.7} 复合-50(A>G)beta ⁺ 杂合	1(1.85)
αα/-α ^{3.7} 复合 5'UTR +43 to +40(-AAAC)beta ⁺ 杂合	1(1.85)
Hb Constant Spring(Hb CS)杂合复合 Codon 17(A>T)beta ⁰ 杂合	1(1.85)
Hb Westmead 杂合复合 Codon 43(G>T)beta ⁰ 杂合	1(1.85)
αα/-α ^{3.7} 复合 Codon 43(G>T)beta ⁰ 杂合	1(1.85)
Hb Constant Spring(Hb CS)杂合复合 Codons 41/42(-TTCT)beta ⁰ 杂合	1(1.85)
Hb Westmead 杂合复合 Codons 41/42(-TTCT)beta ⁰ 杂合	1(1.85)
αα/-- ^{THAI} 复合 Codons 41/42(-TTCT)beta ⁰ 杂合	1(1.85)
Hb Westmead 杂合复合 Codons 71/72(+A)beta ⁰ 杂合	1(1.85)
Hb Constant Spring(Hb CS)杂合复合 Hb E杂合	1(1.85)
Hb Westmead 杂合复合 IVS-II-654(C>T)beta ⁺ 杂合	1(1.85)
αα/-α ^{4.2} 复合 IVS-II-654(C>T)beta ⁺ 杂合	1(1.85)

2.6 异常血红蛋白基因检出及分布情况

在9 236例孕产妇检测样本中,发现19类异常血红蛋白基因共86例(0.93%)。见表6。

3 讨论

传统检测地中海贫血通常用MCV或者MCH加血红蛋白电泳来筛查,再使用常见23型地中海贫血基因检测进行诊断,这种方法比较费时费力,对于静止型的α地贫基因携带者及罕见型地贫基因携带者容易造成漏检。采用Gap-PCR法联合NGS测序法进行301型地贫基因检测,不仅可以一次性检测出301型地贫基因类型,还能检测出异常

表4 27例罕见型地贫基因突变分布情况 [n(%)]

Table 4 Distribution of gene mutations in 27 rare cases of thalassemia [n(%)]

罕见地贫基因突变类型	构成比
Hb Dapu 杂合	4(14.81)
$\alpha\alpha/^{-THAI}$	4(14.81)
ChineseGgamma(Agammadelatbeta) ⁰ 缺失杂合	4(14.81)
$\alpha 2$ Codon 31(AGG>AAG)杂合	3(11.11)
Alpha2 Codon 30 del GAG 杂合	2(7.41)
IVS-I-117(G>A)杂合	2(7.41)
Codon 37(TGG>TAG)beta ⁰ 杂合	2(7.41)
Codon 40 AAG>AA-杂合	1(3.70)
Fusion gene/ $\alpha\alpha$	1(3.70)
5'UTR+43 to+40(-AAAC)beta ⁺ 杂合	1(3.70)
-90(C>T)beta ⁺ 杂合	1(3.70)
beta-176(C>T)杂合	1(3.70)
CAP+8(C>T)杂合	1(3.70)
Initiation codon ATG>AGG beta ⁰ 杂合	1(3.70)
IVS II-761(A>G) beta(0 or+unclear)杂合	1(3.70)

表5 40例目前尚未清楚是否致病的地贫基因突变分布情况 [n(%)]

Table 5 Distribution of mutations in 40 cases of thalassemia with unknown pathogenicity [n(%)]

新发现的地贫基因突变类型	构成比
HBB:c.*+129T>A 杂合	10(25.0)
HBA2:c.46G>A(Gly>Ser)杂合	7(17.5)
HBB:c.-23A>G 杂合	4(10.0)
HBB:c.-113A>G 杂合	3(7.5)
HBA2:c.190G>A(Ala>Thr)杂合	2(5.0)
HBB:c.-146G>T 杂合	2(5.0)
HBA1:c.334G>T(Ala>Ser)杂合	1(2.5)
HBA2:c.*+127delG 杂合	1(2.5)
HBA2:c.*23_*31delCTCCTGCCC 杂合	1(2.5)
HBB:c.-110A>G 杂合	1(2.5)
HBB:c.-111G>C 杂合	1(2.5)
HBB:c.-123A>G 杂合	1(2.5)
HBB:c.-149G>C 杂合	1(2.5)
HBB:c.166A>C(Met>Leu)杂合	1(2.5)
HBB:c.170G>T(Gly>Val)杂合	1(2.5)
HBB:c.-174G>T 杂合	1(2.5)
HBB:c.-184G>A 杂合	1(2.5)
HBB:c.316-23_316-4delTACCTCT TATCTTCCTCCCA 杂合	1(2.5)

血红蛋白,从而可以降低地贫基因携带者的漏检率^[4],是一种相对高效的地中海贫血检测的新方法。

申莞子^[5]等统计了佛山市南海区35 980例新婚育龄人群以平均红细胞体积(MCV)<80fl为血液学表型初筛阳性指标的3 003例表型阳性样品进行3种常见缺失型 α -地贫基因型分析,发现常见 α -地贫基因携带率为8.85%,检出常见 α -地贫基因型频率依次为5.431%($--^{SEA}/\alpha\alpha$)、2.475%

表6 86例异常血红蛋白基因分布情况 [n(%)]

Table 6 Distribution of Abnormal Hemoglobin Genes in 86 Cases [n(%)]

异常血红蛋白基因型	例数(n)	构成比
Hb Hekinan II 杂合	33	38.37
Hb New York 杂合	17	19.77
Hb Owari 杂合	9	10.47
Hb J-Bangkok 杂合	4	4.65
Hb Q-Thailand 杂合	4	4.65
Hb Zengcheng 杂合	3	3.49
Hb Hekinan II 纯合	2	2.32
Hb Port Phillip 杂合	2	2.32
Hb Q-Thailand 纯合	2	2.32
Hb Broomhill 杂合	1	1.16
Hb G-Honolulu 杂合	1	1.16
Hb G-Taimei 杂合	1	1.16
Hb G-Waimanalo 杂合	1	1.16
Hb Hamilton 杂合	1	1.16
Hb Handsworth 杂合	1	1.16
Hb Maputo 杂合	1	1.16
Hb New York 纯合	1	1.16
Hb Port Phillip 纯合	1	1.16
Hb Prato 杂合	1	1.16

($-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$)、0.807% ($-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$)。潘干华^[6]等对1 642例新婚待孕夫妇以平均红细胞体积(MCV)<80fl为地贫筛查血液学阳性指征,对筛查出的1 399例阳性样品进一步进行 α 珠蛋白基因和 β 珠蛋白基因型分析发现育龄人群中地贫基因总携带率为9.91%,其中 α -地贫基因携带率为6.45%, β -地贫基因携带率为3.46%, α 复合 β 地贫基因携带率为0.33%。蔡晓晖^[7]研究对12 092例经MCV筛查阳性的1 679例佛山市南海区户籍的成人婚检对象进行地贫基因分型,发现 α 地贫基因携带率为7.53%, β -地贫基因携带率为3.73%。本研究人群中的地贫基因携带率明显高于上述学者的研究数据,其原因可能为上述的研究均是通过了平均红细胞体积(MCV)进行初筛,初筛阳性标本只做了3种常见缺失型 α -地贫基因型分析,非缺失型 α -地贫及有一部分基因型为 $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ 、 $-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$ 的静止型 α 、罕见型 α 地贫基因存在漏检的情况。采用MCV作为轻型地贫血液学筛查的敏感度为98.9%,存在一定漏诊率,主要是静止性 α -地贫,这是目前为止所有筛查方法都难以避免的^[8]。

本研究结果中的 α 地贫基因与 β 地贫基因构成的排序与潘干华^[6]、蔡晓晖^[7]的研究基本相似,只是构成比前三位的比率均低于上述学者,可能与本研究没有经过平均红细胞体积(MCV)<80fl为地贫筛查,直接进行301型地贫基因检测的检测策略

有关,因为本研究检测的基因型明显多于上述两学者,而上述学者的检测策略存在漏诊的情况。

异常血红蛋白基因的检出率为0.93%,均高于相关学者的报道^[8-11],这可能与所使用的检测方法及相关策略有关,本研究直接使用NGS测序的方法来检测异常血红蛋白基因,而相关学者使用的是血红蛋白电泳或高压液相色谱,或者经电泳初筛后用一代测序的方法进行验证。Hb-hekinan的分子损伤是 $\alpha 1$ -珠蛋白基因密码子27处G→T的替代,取消了一个血红素限制酶位点。这种变异可以通过高效液相色谱(HPLC)检测,但不能通过毛细管或纤维素电泳检测,当此类突变合并 α^0 型地贫时可加重贫血程度,其病理生理机制仍不清楚^[12-13]。Hb New York自1967年首次被发现是在纽约的一个祖籍广东的华裔美国人的家庭中,随后陆续在中国和东南亚也被发现并报道。Hb New York是一种血红蛋白的变异体[$\beta 113$ (G15) Val→Glu, GTG>GAG], β 链113号位的缬氨酸位于螺旋G15位,处于 β 链分子内部,是疏水性氨基酸,被酸性氨基酸谷氨酸取代后,影响了分子内部的疏水性,所以Hb New York的稳定性不如HbA,易于降解^[14]。

综上所述,佛山地区血红蛋白病具有明显的遗传多态性及异质性的特点。gap-PCR联合NGS测序的方法具有检测面广,准确率高,在符合条件的地区可使用gap-PCR联合NGS测序的方法作为血红蛋白病分子一线筛查手段,这样对丰富地中海贫血基因谱、高效筛查地中海贫血及发现异常血红蛋白基因均具有重要的临床应用价值。

参考文献

[1] 彭杨. 地中海贫血基因诊断指导优生优育的价值研究[J]. 中国医药科学, 2018, 8(23): 218-220.

[2] 张文新,于婷,孙楠,等. 地中海贫血基因检测试剂盒抽验质量分析[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(3): 279-282+304.

[3] 何文,王晓东,余海燕. 妊娠合并地中海贫血研究现状[J]. 中华妇幼临床医学杂志(电子版), 2017, 13(1):14-19.

[4] He J, Song W, Yang JL, et al. Next-generation sequencing improves thalassemia carrier screening among premarital adults in a high prevalence population: the Dai nationality, China. [J]. Genet med, 2017, 19(9).

[5] 申莞子,李哲刚,潘干华,等. 广东省佛山市新婚育龄人群 α 地中海贫血的分子流行病学调查[J]. 中国计划生育学杂志, 2010, 18(1):31-33.

[6] 潘干华,李哲刚,申莞子,等. 佛山市南海区育龄人群地中海贫血分子流行病学调查[J]. 中国计划生育学杂志, 2011, 19(2):98-100.

[7] 蔡晓晖. 佛山市南海地区育龄人群 α 和 β 地中海贫血的分子流行病学调查[J]. 中国优生与遗传杂志, 2016, 24(8):24-26.

[8] 温应方,林敏,刘桂荣,等. 广东梅州地区的异常血红蛋白的分子流行病学调查[J]. 重庆医科大学学报, 2011, 36(12):1496-1499.

[9] 马占忠,杨辉,林敏,等. 广东韶关地区异常血红蛋白的分子流行病学调查[J]. 实用检验医师杂志, 2014, 6(3):179-181.

[10] 彭兰芬,汤惠华,付文金,等. 东莞市地中海贫血基因类型与异常血红蛋白种类调查分析[J]. 检验医学与临床, 2011, 8(2):142-144.

[11] 莫宗平,张玲,喻长顺,等. 异常血红蛋白81例基因分析[J]. 广东医学, 2012, 33(3):338-341.

[12] Zhao W, Wilson JB, Webber BB, et al. Hb Hekinan observed in three Chinese from Macau; identification of the GAG-GAT mutation in the alpha 1-globin gene[J]. Hemoglobin, 1990, 14(6):627-635.

[13] Shih HC, Shih MC, Chang YC, et al. Hb Hekinan in a Taiwanese Subject: A G → T Substitution at Codon 27 of the $\alpha 1$ -Globin Gene Abolishes an Hae III Site [J]. Hemoglobin, 2007, 31(4):495-498.

[14] 曾溢滔,黄淑贞,周霞娣,等. 中国人血红蛋白New York的研究[J]. 遗传学报, 1982(2):125-134.

(上接第1146页)

[11] Wang Y, Yang L, Chen T, et al. A novel lncRNA MCM3AP-AS1 promotes the growth of hepatocellular carcinoma by targeting miR-194-5p/FOXA1 axis[J]. Mol Cancer, 2019, 18(1): 28.

[12] Yang M, Sun S, Guo Y, et al. Long non-coding RNA MCM3AP-AS1 promotes growth and migration through modulating FOXK1 by sponging miR-138-5p in pancreatic cancer [J]. Mol Med, 2019, 25(1): 55.

[13] Liu GH, Liu YH, Yang Z, et al. MicroRNA-524-5p suppresses the growth and invasive abilities of gastric cancer cells[J].

Oncol Lett, 2016, 11(3): 1926-1932.

[14] Chen L, Zhang W, Yan W, et al. The putative tumor suppressor miR-524-5p directly targets Jagged-1 and Hes-1 in glioma [J]. Carcinogenesis, 2012, 33(11): 2276-2282.

[15] Liu S, Liu LH, Hu WW, et al. Long noncoding RNA TUG1 regulates the development of oral squamous cell carcinoma through sponging miR-524-5p to mediate DLX1 expression as a competitive endogenous RNA[J]. J Cell Physiol, 2019, 234(11): 20206-20216.

肾病综合征患者血清IgG、IgM、IgA水平变化及临床意义

杨全* 赵蓉苑 李跃昌 曾宇鹏

[摘要] **目的** 探讨肾病综合征(NS)患者血清免疫球蛋白G(IgG)、免疫球蛋白M(IgM)、免疫球蛋白A(IgA)水平变化及临床意义。**方法** 分析2018年3月到2020年3月本院收治的120例NS患者(NS组)的病例资料,另选取120例同期体检健康者作为健康组,比较两组血清IgG、IgM、IgA水平,分析NS患者血清IgG、IgM、IgA水平与年龄、性别、病理类型的相关性。**结果** NS组血清的IgG、IgA水平低于健康组的,IgM水平显著高于健康组,差异均有统计学意义($P<0.05$);NS组的女性患者的IgG、IgM水平明显高于男性患者,差异有统计学意义($P<0.05$),不同性别患者的血清IgA水平比较差异无统计学意义($P>0.05$);不同年龄层NS患者血清IgG、IgM、IgA水平比较差异无统计学意义($P>0.05$);IgA肾病组患者血清IgG、IgA水平高于膜性肾病组和其他肾病组,差异均有统计学意义($P<0.05$),不同病理类型NS患者血清IgM水平比较差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** NS患者血清IgG、IgA水平显著降低,IgM水平显著增高,血清免疫球蛋白分类检测对于NS诊断具有重要的潜在应用价值。

[关键词] 肾病综合征;免疫球蛋白;膜性肾病;IgG

Changes of serum IgG, IgM, IgA levels in patients with nephrotic syndrome and their clinical significance

YANG Quan*, ZHAO Rongyuan, LI Yuechang, ZENG Yupeng

(Department of Nephrology, Langzhong People's Hospital, Langzhong, Sichuan, China, 637400)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the changes serum levels of serum immunoglobulin G (IgG), immunoglobulin M (IgM) and immunoglobulin A (IgA) in patients with nephrotic syndrome (NS) and clinical significance. **Methods** The clinical data of 120 NS patients (NS group) who were admitted to the hospital from March 2018 to March 2020 were analyzed. Another 120 healthy people who underwent physical examination during the same period were enrolled as the healthy group. The serum levels of IgG, IgM and IgA were compared between the two groups. The correlation between the levels of serum IgG, IgM, IgA and age, gender, pathological types in NS patients was analyzed. **Results** The levels of serum IgG and IgA in the NS group were lower than those in the healthy group, while IgM was higher than that in the healthy group ($P<0.05$). In the NS group, the levels of IgG and IgM in females were significantly higher than those in males ($P<0.05$), while there was no difference in serum IgA level in patients with different genders ($P>0.05$). There were no significant differences in the levels of serum IgG, IgM and IgA among NS patients at the different age groups ($P>0.05$). The levels of serum IgG and IgA in the IgA nephropathy group were higher than those in the membranous nephropathy group and other nephropathy groups ($P<0.05$). There was no significant difference in serum IgM level among NS patients with different pathological types ($P>0.05$). **Conclusion** Serum IgG and IgA levels in NS patients are significantly reduced, and IgM levels are significantly increased. Serum immunoglobulin classification detection has important potential application value for the diagnosis of NS.

[KEY WORDS] Nephrotic syndrome; Immunoglobulin; Membrane nephropathy; IgG

基金项目:四川省卫生厅科研基金(170190)

作者单位:四川省阆中市人民医院肾病内科,四川,阆中 637400

*通信作者:杨全, E-mail:67951084@qq.com

肾病综合征(nephrotic Syndrome, NS)是由于肾小球通透性改变,大量血浆蛋白进入尿液,导致一系列病理生理改变的肾脏疾病,临床特点为水肿、蛋白尿、低白蛋白血症等^[1-2]。NS作为常见的泌尿系统疾病,分为先天、原发、继发性三种,原发性患者占比最高,其病因和发病机制尚未定论,一般认为与机体免疫功能紊乱相关^[3-5]。体液免疫过程中,抗体结合抗原形成的复合物在肾脏沉积,产生炎症反应破坏肾脏正常细胞结构及功能,引发NS^[6]。本研究选取了与体液免疫密切相关的血清免疫球蛋白G(Immunoglobulin G, IgG)、免疫球蛋白M(Immunoglobulin M, IgM)、免疫球蛋白A(Immunoglobulin A, IgA),观察其在NS患者体内的水平变化及潜在的临床意义,报告如下。

1 资料和方法

1.1 一般资料

分析2018年3月到2020年3月医院收治的120例NS患者(NS组)的病例资料,NS组120例患者,其中男74例,女46例,年龄18~74岁,平均(42.81±8.18)岁,另选取120例同期体检健康者作为健康组。男78例,女42例,年龄18~75岁,平均(43.29±7.98)岁。健康组纳入标准:①体检各指标均正常;②体检资料完整;排除标准:合并心肝肾等重要器官疾患、家族中有肿瘤史。两组受试者一般资料比较差异无统计学意义($P>0.05$),且均对本研究知情同意,并签署知情同意书。

纳入标准:①参考《原发性肾病综合征的诊断、辨证分型及疗效评定》^[7]中的诊断标准;②本研究经医院伦理委员会批准。排除标准:①合并免疫系统疾病;②合并血液系统疾病;③合并术后感染;④合并恶性肿瘤;⑤合并精神疾病;⑥肾脏活检病理光镜下肾小球数量少于5个。

1.2 方法

1.2.1 基本资料收集

分析所有受试者的基本资料,内容包括:性别、年龄、既往病史、服药情况、血清指标等。

1.2.2 实验室检验

NS组于入院后即时采血,健康组采清晨空腹静脉血,均采集3 mL,使用AU5800自动生化分析仪(美国贝克曼库尔特有限公司)测定两组血清免疫球蛋白水平。

1.3 观察指标

NS组和健康组血清IgG、IgM、IgA水平比较;NS组患者血清IgG、IgM、IgA水平与性别的关系;将NS组的患者根据年龄层次不同,划分为≤60岁组($n=75$)、>60岁组($n=45$),分析NS组患者血清IgG、IgM、IgA水平与年龄的关系;将NS患者根据病理类型分为膜性肾病($n=76$)、IgA肾病($n=33$)和其他型肾病($n=11$),其他型肾病包括微小病变型肾病、局灶节段性肾小球硬化、膜增生型肾病三种,分析患者血清IgG、IgM、IgA水平与病理类型的关系。

1.4 统计学处理

采用统计学软件SPSS 19.0处理数据,计量资料采用($\bar{x} \pm s$)表示,采用独立样本 t 检验;多组间比较采用 F 检验,组间两两比较采用SNK- q 法, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组血清IgG、IgM、IgA水平比较

NS组血清的IgG、IgA水平均低于健康组,IgM水平高于健康组,差异有统计学意义($P<0.05$),见表1。

表1 两组血清IgG、IgM、IgA水平比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of serum IgG, IgM and IgA levels between 2 groups ($\bar{x} \pm s$)

类型	n	IgG(g/L)	IgM(g/L)	IgA(g/L)
NS组	120	8.62±2.64	2.15±0.38	1.37±0.35
健康组	120	12.41±2.22	1.67±0.27	1.62±0.24
t 值		12.036	14.880	6.453
P 值		0.000	0.000	0.000

2.2 NS组患者血清IgG、IgM、IgA水平与性别的关系

NS组的女性患者的IgG、IgM水平明显高于男性患者,差异有统计学意义($P<0.05$),男性患者和女性患者血清IgA水平比较差异无统计学意义($P>0.05$),见表2。

表2 NS组患者血清IgG、IgM、IgA水平与性别的关系($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Relationship between serum IgG, IgM, IgA and gender in NS group ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	IgG(g/L)	IgM(g/L)	IgA(g/L)
女性	46	8.92±1.58	2.32±0.34	1.43±0.21
男性	74	7.84±1.39	2.03±0.29	1.34±0.27
t 值		3.925	4.982	1.926
P 值		0.000	0.000	0.056

2.3 NS组患者血清IgG、IgM、IgA水平与年龄的关系

两组患者血清IgG、IgM、IgA水平在不同年龄比较差异无统计学意义($P>0.05$),见表3。

表3 NS组患者血清IgG、IgM、IgA水平与年龄的关系($\bar{x}\pm s$)
Table 3 Relationship between serum IgG, IgM, IgA and age in NS group ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	IgG(g/L)	IgM(g/L)	IgA(g/L)
≤60岁组	75	8.52±0.46	2.24±0.37	1.39±0.21
>60岁组	45	8.66±0.39	2.12±0.29	1.43±0.27
t值		1.706	1.859	0.906
P值		0.091	0.066	0.367

2.4 NS组患者血清IgG、IgM、IgA水平与病理类型的关系

NS组的不同病理类型患者血清IgG、IgA水平比较差异有统计学意义($P<0.05$),血清IgM水平比较差异无统计学意义($P>0.05$),见表4。

表4 NS组患者血清IgG、IgM、IgA水平与病理类型的关系($\bar{x}\pm s$)
Table 4 Relationship between serum IgG, IgM, IgA levels and pathological types in NS group ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	IgG(g/L)	IgM(g/L)	IgA(g/L)
膜性肾病	76	6.92±1.58	2.21±0.34	1.26±0.41
IgA肾病	33	8.82±1.64	2.13±0.26	1.58±0.46
其他型肾病	11	7.54±1.39	2.08±0.29	1.28±0.27
F值		16.610	1.298	6.876
P值		0.000	0.277	0.002

3 讨论

NS发病率高且起病隐匿,随着疾病发展到慢性肾衰竭,患者将依赖透析维持生命,严重影响患者生活质量^[8-9]。本研究选取原发性NS患者进行研究,避免了继发性NS患者体内免疫球蛋白的表达受红斑狼疮等疾病的影响^[10]。有研究指出,原发性NS主要类型包括膜性肾病、IgA肾病微小病变型肾病、局灶节段性肾小球硬化、膜增生型肾病4种,患者年龄、性别不同,发病类型也不一致^[11-13]。本研究选择了IgG、IgM、IgA三种免疫球蛋白,分析其在不同性别、年龄、病理类型的NS患者体内的表达情况。

范卉等^[14]研究指出,免疫球蛋白占血浆蛋白20%左右,是反映人体免疫功能的重要指标,主要包含IgG、IgM、IgA、IgD、IgE五种类型。IgG是人体最基础也是含量最高的一种免疫球蛋白,约占

总免疫球蛋白的71%~75%,是参与机体免疫反应的主要物质;IgM是分子量最大、免疫反应最先产生的免疫球蛋白,在早期免疫防御中起到关键作用,但保护作用低于IgG;IgA是合成最多的球蛋白,广泛分布于黏膜表面,主要针对经呼吸道、泌尿道等黏膜的病原体感染^[15]。凌晨等^[16]观察了激素敏感型肾病综合征患儿体内IgG、IgE水平,认为二者联合可以为患儿提供更准确的治疗反馈,及时为激素耐药性患儿更改治疗方案,可以避免病情恶化,提高患者免疫力。

在本研究中,NS患者体内IgG、IgA降低而IgM水平升高,推测是因为NS患者肾小球通透性增加、淋巴细胞合成减少、免疫抑制药物,引起IgG水平下降;除此之外,患者B淋巴细胞增殖能力降低将阻碍IgM向IgG转化,导致IgM水平上升;NS患者体内IgA发生异常糖基化,形成的循环免疫复合物沉积于肾小球,促进炎症反应的发生。既往研究指出,肾小球肾炎伴乙型肝炎病毒、肺炎、癫痫等多种与炎症反应相关的疾病均与IgG、IgA、IgM水平变化联系密切^[17-18]。本研究结果提示:①男性IgG水平更低,病情进展更快,这与其生活习惯、饮食习惯有一定关系;②不同病理类型的患者免疫复合沉积物的不同造成了免疫球蛋白水平差异,例如免疫复合物IgG的沉积以膜性肾病为主,免疫复合物IgA的沉积以IgA肾病为主。

综上所述,NS患者血清IgG、IgA水平显著降低,IgM水平显著增高,男性NS患者血清IgG水平低于女性患者,不同病理类型的NS患者血清IgG、IgA水平存在差异,血清免疫球蛋白分类检测对于NS诊断具有重要的潜在应用价值。

参考文献

- [1] Watanabe S, Aizawa T, Tsukaguchi H, et al. Long-term clinicopathologic observation in a case of steroid-resistant nephrotic syndrome caused by a novel Crumbs homolog 2 mutation[J]. Nephrology, 2018, 23(7):697-702.
- [2] Van de Lest NA, Zandbergen M, Ijpeelaar DHT, et al. Nephron loss can be used to predict remission and long-term renal outcome in patients with minimal change disease[J]. Kidney Int Rep, 2018, 3(1):168-177.
- [3] 王宪耀, 蔡巧雯, 林浩铨, 等. 粤东地区散发性肾病综合征患儿NPHS2基因多态性分析[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2013, 5(2):107-110.
- [4] 马天娇. 细胞因子与原发肾病综合征发病机制研究进展[J]. 国际儿科学杂志, 2019, 46(11):815-818.

(下转第1162页)

血清 Anti-CCP 抗体、RF 和 hs-CRP 检测对 RA 的诊断价值分析

卜文君* 邵从军 胡恒贵

[摘要] 目的 探讨检测血清抗环瓜氨酸肽(Anti-CCP)抗体、类风湿因子(RF)、超敏C反应蛋白(hs-CRP)含量对类风湿关节炎(RA)的诊断价值。方法 随机选取2018年1月至2019年11月在本院就诊的RA患者30例(RA组),同时选取其它免疫性疾病患者22例(非RA组),采用全自动生化分析仪分别检测两组患者的血清Anti-CCP抗体、RF、hs-CRP水平含量,并进行统计分析。运用SPSS 21.0软件绘制受试者工作特征(ROC)曲线,计算其曲线下面积(AUC),并分析其吻合度。结果 非RA组的Anti-CCP抗体、RF含量水平明显低于RA组,而在非RA组与RA组中,hs-CRP含量差异无统计学意义($P>0.05$);Anti-CCP抗体、RF的阳性率在RA组中明显高于非RA组,其差异有统计学意义($P<0.05$);吻合度分析Anti-CCP抗体、RF对应的Kappa系数分别为0.80和0.59,差异有统计学意义($P<0.05$)。在诊断RA的灵敏度和特异度方面,Anti-CCP抗体高于RF,其中Anti-CCP抗体诊断RA的灵敏性高达92.3%。相关性分析显示,血清Anti-CCP抗体含量与血清RF、hs-CRP的含量呈正相关,相关系数 r 分别为0.930和0.523,且有较好的相关性,差异有统计学意义($P<0.05$)。采用SPSS 21.0统计软件分析发现,当Anti-CCP抗体cut off值为41.05 U/mL时,其对应曲线下面积(AUC)高达0.918,约登指数为0.762。当RF cut off值为28.6 IU/mL时,对应AUC为0.815,约登指数为0.598。结论 在RA的诊断指标中,Anti-CCP抗体比RF和hs-CRP具有更高的灵敏度和特异性。

[关键词] 抗环瓜氨酸肽抗体;类风湿因子;超敏C反应蛋白;类风湿关节炎

Analysis of the diagnostic value of serum anti-CCP antibody, RF and hs-CRP detection in rheumatoid arthritis

BU Wenjun*, SHAO Congjun, HU Henggui

(Department of Clinical Laboratory, General Hospital of Wanbei Coal-electric Group, Suzhou, Anhui, China, 234011)

[ABSTRACT] Objective To evaluate the diagnostic value of serum anti-CCP antibody, rheumatoid factor (RF) and hypersensitive c-reactive protein (hs-CRP) in rheumatoid arthritis (RA). Methods 30 RA patients (RA group) who visited our hospital from January 2018 to November 2019 were randomly select, and 22 patients with other immune diseases (non-RA group) were also recruited. The automatic biochemical analyzer was used to detect the serum anti-CCP antibody, RF, and hs-CRP levels of the two groups of patients, and perform statistical analysis. The SPSS 21.0 software was used to draw receiver operating characteristic (ROC) curve, calculate its area under the curve (AUC), and analyze its coincidence. Results Anti-CCP antibody and RF levels in the non-RA group were significantly lower than those in the RA group, while there was no significant difference in hs-CRP content between the non-RA group and the RA group ($P>0.05$). The positive rate of anti-CCP antibody and RF was significantly higher in the RA group than in the non-RA group,

基金项目:安徽省宿州市科技局科研基金资助项目(SZ2012017)

作者单位:皖北煤电集团总医院检验科,安徽,宿州 234011

*通信作者:卜文君, E-mail:63566607@qq.com

and the difference was statistically significant ($P<0.05$). The Kappa coefficients corresponding to anti-CCP antibody and RF were 0.80 and 0.59 in the analysis of the degree of agreement, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). In terms of the sensitivity and specificity of diagnosing RA, anti-CCP antibody is higher than RF, and the sensitivity of anti-CCP antibody for diagnosing RA is as high as 92.3%. Correlation analysis showed that serum anti-CCP antibody content was positively correlated with serum RF and hs-CRP content, and the correlation coefficient r was 0.930 and 0.523 respectively, and there was a good correlation, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). Analysis with SPSS 21.0 statistical software found that when the cut off value of anti-CCP antibody was 41.05 U/mL, the corresponding area under the curve (AUC) was as high as 0.918, and the Youden index was 0.762. The RF cut off value is 28.6 IU/mL, the corresponding AUC is 0.815 and the Youden index is 0.598. **Conclusion** Among the diagnostic indicators of RA, anti-ccp antibody has higher sensitivity and specificity than RF and hs-CRP.

[KEY WORDS] Anti-ccp antibody; Rheumatoid factor; Hypersensitive c-reactive protein; Rheumatoid arthritis

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种比较常见的系统性自身免疫性疾病,类风湿关节炎的全球发病率大约在0.5%左右,而在我国发病率约为0.4%^[1]。临床表现主要以侵蚀性、对称性多关节炎为主,其会使关节出现进展性功能障碍^[2-3]。病理学上主要表现为关节滑膜的慢性炎症,并出现关节软骨或骨破坏,最终导致关节畸形或功能性丧失。目前,该病病因尚未明确,既往研究显示免疫、感染、遗传、环境等与其发病相关^[4]。目前,在我国基层医疗机构还主要以凝集法检测血清RF和放射学检查作为类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)的主要诊断方法,RF具有一定的敏感度,但其特异度较差^[5],而放射学检查只能在关节受损以后才有所表现^[6]。超敏C反应蛋白(hypersensitive c-reactive protein, hs-CRP)作为一种急性时相反应蛋白,在机体炎症反应状态下增高。本文将探讨Anti-CCP抗体对早期RA临床诊断价值。

1 材料与方法

1.1 研究对象

选择本院2018年1月至2019年11月住院患者,并从中筛选出RA患者30例,其中女28例,男2例,年龄33~76岁;临床诊断均符合《ACR/EULAR 2010年类风湿因子分类标准和评分系统》^[7]规定。非RA患者22例,其中男4例,女18例,年龄在26~77岁;包括5例系统性红斑狼疮,6例干燥综合征,以及混合性结缔组织病、痛性关节炎、系统性硬化症等。纳入标准:①存在3个以上关节炎区域;②腕、掌指或近端之间关节至少1处肿胀;

③晨僵超过30 min;④RF阳性;⑤Anti-CCP抗体阳性;⑥病程3~12个月;⑦满足以上6项中至少3项。排除标准:①严重肝肾功能不全;②内分泌疾病;③重症感染;④恶性肿瘤及其它自身免疫性疾病。该研究经本院伦理委员会批准,所有受试者均签署知情同意书。

1.2 实验方法

1.2.1 标本采集

所有研究对象于入院后,空腹采集静脉血3 mL,3 000 r/min,离心15 min,分离血清(排除脂血、溶血的标本),生化仪进行Anti-CCP抗体、RF、hs-CRP检测。

1.2.2 检测仪器及方法

Anti-CCP抗体检测采用乳胶免疫比浊法定,采用抗环瓜氨酸肽抗体测定试剂盒(杭州中翰盛泰生物股份有限公司,批号:13218101,规格:R1:40 mL×1 R 210 mL×1);RF检测运用免疫透射比浊法检测,采用类风湿因子测定试剂盒(北京万泰德瑞生物股份有限公司,批号:18062010,规格:R1:60 mL×2 R2:12 mL×2);hs-CRP检测运用免疫比浊法(超敏C-反应蛋白,规格:R1:60 mL×1 R2:60 mL×1,批号:17110203,北京利德曼生化股份有限公司);使用日立7600-120全自动生化分析仪(日本株式会社日立高新技术公司)按说明书进行检测,按规定开展室内质控。

1.2.3 检测指标和结果判断

Anti-CCP抗体临界值为46.0 U/mL,RF临界值为20.0 IU/mL,hs-CRP临界值为6.0 mg/L,超过此临界值判定为阳性。判定严格按照试剂盒说明书进行。

1.3 统计学分析

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,运用中位数(四分位数)表达呈偏态分布的定量资料,组间比较运用 Mann-Whitney U 检验;采用配对计数资料的 NcMemar 检验以及 k 检验对诊断的吻合度进行分析。当 $0.59 < Kappa < 0.80$ 时,证明 Anti-CCP 抗体、RF 对诊断 RA 具有中度一致性^[8];绘制受试者工作特征曲线,并计

算曲线下面积;以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组 Anti-CCP 抗体、RF 和 hs-CRP 的水平比较

RA 组中 Anti-CCP 抗体、RF、和 hs-CRP 的水平均高于非 RA 组,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 Anti-CCP 抗体、RF 和 hs-CRP 在不同组别中的水平比较
Table 1 Comparison of anti CCP antibody, RF and hs CRP levels in different groups

组别	n	Anti-CCP 抗体(U/mL)			RF(IU/mL)			hs-CRP(mg/L)		
		M	P25	P75	M	P25	P75	M	P25	P75
RA 组	30	78.70	51.30	99.10	97.00	19.70	184.20	1.45	1.00	1.55
非 RA 组	22	23.10	11.50	38.10	16.60	11.50	19.40	1.36	0.98	1.49
Z 值			-5.422			-4.738			-1.034	
P 值			0.000			0.000			0.301	

2.2 Anti-CCP 抗体和 RF 检测对 RA 诊断阳性数以及 Kappa 一致性分析

抗 CCP 抗体、RF 的阳性数在 RA 组明显高于非 RA 组,差异有统计学意义 ($P < 0.005$);抗 CCP 抗体对诊断 RA 具有中度一致性。见表 2。

表 2 Anti-CCP 抗体、RF 检测对 RA 诊断阳性数及 Kappa 一致性分析 [$n(\%)$]

Table 2 The positive rate of anti-ccp antibody and RF detection for RA diagnosis and consistency analysis of Kappan [$n(\%)$]

组别	n	Anti-CCP 抗体		RF	
		+	-	+	-
RA 组	30	24(80.0)	6(20.0)	22(73.3)	8(26.7)
非 RA 组	22	2(9.1)	20(90.9)	7(31.8)	15(68.2)
χ^2 值			40.05		31.03
P 值			0.000		0.000
Kappa 系数			0.80		0.59

2.3 Anti-CCP 抗体和 RF 在诊断早期类风湿关节炎中的性能评价

RF 诊断 RA 的灵敏度、特异度都低于 Anti-CCP 抗体, Anti-CCP 抗体诊断 RA 的灵敏度达 92.3%,实际使用中可以减少漏诊。见表 3。

2.4 血清 Anti-CCP 抗体和 RF 的 ROC 曲线分析

当 Anti-CCP 抗体 cut off 值为 41.05 U/mL 时,对应曲线下面积(AUC)最高,高达 0.918,约登指数为 0.762。当 RF 的 cut off 值为 28.6 IU/mL 时,对应 AUC 为 0.815,约登指数为 0.598。见图 1、表 4。

表 3 Anti-CCP 抗体、RF 在 RA 中灵敏度及特异度比较
Table 3 The sensitivity and specificity of anti-CCP antibody and RF were compared in RA

检测项目	Anti-CCP 抗体(+)	RF(+)
RA 组	24	22
非 RA 组	2	7
灵敏度(%)	92.3	75.8
特异度(%)	76.9	65.2
S.E. 值	0.042	0.060
95%CI	0.821~0.995	0.698~0.943
P 值	0.000	0.000

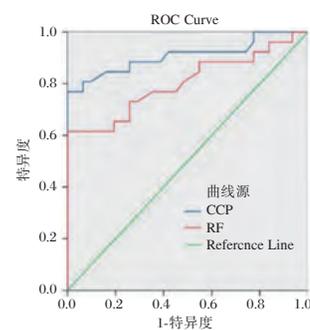


图 1 Anti-CCP 抗体、RF 检测结果诊断 RA 的 ROC 曲线图
Figure 1 ROC curve of anti-ccp antibody and RF test results in the diagnosis of RA

2.5 相关性分析

患者血清 Anti-CCP 抗体含量水平与 RF 及 hs-CRP 均呈正相关,相关系数 r 分别为 0.93 和 0.523,有较好的相关性。差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表4 Anti-CCP抗体和RF诊断RA的性能评价

Table 4 Performance evaluation of anti-ccp antibody and RF diagnostic in RA

诊断类型	cut off 值	约登指数	灵敏度(%)	AUC	S.E. 值	95%CI
Anti-CCP 抗体	41.05 U/mL	0.762	92.3	0.918	0.042	0.821~0.995
RF	28.6 IU/mL	0.598	75.8	0.815	0.060	0.698~0.943

注:约登指数=特异度+灵敏度-1。

3 讨论

目前,对RA临床诊断主要依靠临床症状,X射线以及RF浓度检测,不能早期诊断。各种血清学检测中,RF是较早运用于诊断RA的检测指标。但由于RF在很多其它免疫性疾病中也会存在,所以在RA的诊断中容易导致漏诊、误诊。且在RA患者早期,其RF检出率较低,而持续的RF阳性,临床上出现骨侵蚀性机会增多,导致预后较差^[9]。Anti-CCP抗体存在于早期RA患者血清中,对诊断RA具有较好的敏感度和特异度,协助RA诊断,可提高诊断率^[10]。但由于国家无统一的参考区间标准,按厂家试剂盒说明书执行,可能会对本地区人群存在一定误诊风险。

本研究结果表明hs-CRP对诊断类风湿关节炎效果不理想。hs-CRP与机体炎症及自身免疫性疾病均有交叉反应,其特异性不强^[11]。本研究选择非RA是其他风湿免疫性疾病患者,这样可以减少指标的特异度,造成不同研究对象之间可能会存在差异。从某种意义上讲,Anti-CCP抗体含量变化能够反映RA病情活动变化,具有一定的临床价值。

此外,ROC曲线分析显示,当Anti-CCP抗体cut off值为41.05 U/mL时,对应曲线下面积(AUC)最高,其诊断灵敏度最高。而RF的灵敏度、曲线形面积和约登指数都低于Anti-CCP抗体,表明Anti-CCP抗体诊断早期RA具有一定诊断价值。本研究Anti-CCP抗体对RA的特异度为76.9%,与冯婧^[12]等人研究结果一致;Anti-CCP抗体对于临床症状不典型或者X线片未出现异常的患者可能会起到早期诊断的作用^[13-14]。但因本文选择实验组(RA组)标本数量有限,可能会导致实验特异度和灵敏度存在一定偏差。在往后的研究中,将扩大样本容量和加强与临床医生沟通,以期进一步提高早期诊断RA的临床价值。

综上所述,在RA的诊断指标中,Anti-CCP抗体比RF和hs-CRP具有更高的灵敏度和特异度。

参考文献

- [1] 高学祥,汪六庆.血清抗CCP抗体、RF、CRP、ESR水平联合检测在类风湿性关节炎患者早期诊断中的应用价值[J].检验医学与临床,2018,15(14):2156-2159.
- [2] 王波,牛莉莉,常波.联合检测RF、AKA、抗CCP抗体和CRP对RA的诊断价值[J].中国实验诊断学,2016,20(3):425-428.
- [3] Al-Shukaili A, Al-Ghafri S, Al-Marhoobi S, et al. Evaluation of anti-mutated citrullinated vimentin antibodies anti-cyclic citrullinated peptide antibodies and rheumatoid factor in Omani patients with rheumatoid arthritis[J]. Int J Rheumatol, 2012, 2012:25854.
- [4] 祝辉.联合检测抗CCP抗体RF在诊断类风湿性关节炎中的意义[J].实验与检验医学,2017,35(3):398-399.
- [5] 杨娟娟.血清RF、抗CCP抗体和抗MCV抗体水平对早期类风湿关节炎的诊断价值[J].中国实验诊断学,2015,7(11):1847-1849.
- [6] 张静.联合检测类风湿因子、抗CCP抗体、免疫球蛋白对辅助诊断类风湿性关节炎的作用[J].中国实用医药,2016,11(11):32-33.
- [7] Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, et al. 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative[J]. Arthritis Rheum, 2010, 62(9):2569-2581.
- [8] 高向阳,杨春显,伍玉,等.抗CCP抗体、抗MCV抗体和类风湿因子在早期类风湿关节炎中的诊断价值[J].标记免疫分析与临床,2019,26(6):945-948.
- [9] 张琼,罗以勤,汪元,等.4种血清标志物在类风湿关节炎的诊断、疾病活动度的判断及骨侵蚀的预测的应用价值[J].安徽医科大学学报,2015,50(12):1791-1794.
- [10] 李伟青,王海东.GPI、抗-CCP和RF联合检测对诊断类风湿性关节炎的临床意义[J].国外医学(医学地理分册),2017,38(2):179-181.
- [11] 杨波,徐磊,贾伟,王霜.RDW、DD联合抗CCP抗体检测对RA诊断及病情活动的价值分析[J].分子诊断与治疗杂志,2020,12(7):952-955.
- [12] 冯婧,喻晓雯,吴斌,等.血清多项自身抗体检测对类风湿关节炎的诊断价值[J].现代检验医学杂志,2019,34(5):9-11+15.
- [13] 杨雅琼,杨宏伟,白雪,等.血清RF、anti-CCP及14-3-3η蛋白联合检测对类风湿关节炎的诊断价值[J].天津医药,2019,47(2):174-178.
- [14] 马方伟,刘敏,孙燕玲等.血清RF与抗-CCP抗体浓度指标在类风湿性关节炎患者诊断和治疗中的临床价值[J].昆明医科大学学报,2017,38(5):120-124.

血清 miR-370-5p、tPSA、fPSA 联合检测对前列腺癌的诊断价值

王金乐¹ 张蓉¹ 宋梦² 吴琼^{3*}

[摘要] 目的 观察血清 miR-370-5p、总前列腺特异性抗原(tPSA)、游离前列腺特异性抗原(fPSA)联合检测对前列腺癌的诊断价值。方法 选取本院收治的前列腺癌(观察组)与前列腺增生(BPH)(对照组)患者各60例,比较两组患者血清 miR-370-5p、tPSA、fPSA 表达,且经由受试者工作曲线(ROC)评估上述指标对前列腺癌的鉴别诊断效能。结果 观察组血清 miR-370-5p 相对表达量、tPSA、fPSA 水平均显著高于对照组($P<0.05$),且Ⅲ~Ⅳ期前列腺癌患者血清 miR-370-5p 相对表达量、tPSA、fPSA 水平均显著高于Ⅰ~Ⅱ期患者($P<0.05$)。ROC 曲线得出,miR-370-5p 相对表达量截断值=0.60 时,曲线下面积(AUC)=0.825,敏感度为 78.33%,特异度为 91.67%;tPSA 截断值=5.06 ng/mL 时,AUC=0.879,敏感度为 88.33%,特异度为 80.00%;fPSA 截断值=3.03 ng/mL 时,AUC=0.790,敏感度为 66.67%,特异度为 91.67%;3 者联合诊断敏感度、特异度分别为 90.00%、93.33%。结论 血清 miR-370-5p、tPSA、fPSA 联合检测可提高前列腺癌临床诊断准确性、灵敏度及特异度,从而为患者临床诊治提供有效指导。

[关键词] miR-370-5p; 总前列腺特异性抗原; 游离前列腺特异性抗原; 前列腺癌

The diagnostic value of combined detection of serum miR-370-5p, tPSA, and fPSA for prostate cancer

WANG Jinle¹, ZHANG Rong¹, SONG Meng², WU Qiong^{3*}

(1. Department of laboratory Medicine, Qingdao Central Hospital, Qingdao, Shandong, China, 266000; 2. Department of Pharmacy, Qingdao Central Hospital, Qingdao, Shandong, China, 266000; 3. Department of laboratory Medicine, Qingdao Haici Hospital, Qingdao, Shandong, China 266000)

[ABSTRACT] Objective To observe the diagnostic value of combined detection of serum miR-370-5p, total prostate specific antigen (tPSA), and free prostate specific antigen (fPSA) for prostate cancer. Methods 60 patients with prostate cancer (the observation group) and 60 patients with benign prostatic hyperplasia (BPH) (the control group) were selected from the hospital. The expression of serum miR-370-5p, tPSA and fPSA was measured and compared between the two groups. The efficiency of above indexes in the differential diagnosis of prostate cancer was evaluated by the receiver operating characteristic (ROC) curve. Results The relative expression level of miR-370-5p, tPSA and fPSA in the observation group were significantly higher than those in the control group ($P<0.05$). Besides, they were significantly higher in patients with stage III-IV prostate cancer than those with stage I-II ($P<0.05$). The ROC curve shows that when the cutoff value of the relative expression level of miR-370-5p was 0.60, the area under the curve (AUC),

基金项目:青岛市医疗卫生重点学科建设项目(青卫科教学[2017]9号)

作者单位:1. 青岛市中心医院检验科,山东,青岛 266000

2. 青岛市中心医院药学部,山东,青岛 266000

3. 青岛市海慈医院检验科,山东,青岛 266000

*通信作者:吴琼, E-mail: 116636696@qq.com

sensitivity and specificity were 0.825, 78.33% and 91.67%, respectively. When the cutoff value of tPSA was 5.06 ng/mL, the AUC, sensitivity and specificity were 0.879, 88.33% and 80.00%, respectively. When the cutoff value of fPSA was 3.03 ng/mL, the AUC, sensitivity and specificity were 0.790, 66.67% and 91.67%, respectively. The sensitivity and specificity of the combined diagnosis of the three indexes were 90.00% and 93.33%, respectively. **Conclusion** The combined detection of serum miR-370-5p, tPSA, and fPSA can improve the accuracy, sensitivity and specificity of clinical diagnosis of prostate cancer, thereby providing effective guidance for clinical diagnosis and treatment of patients.

[KEY WORDS] MiR-370-5p; Total prostate specific antigen; Free prostate specific antigen; Prostate cancer

前列腺癌属于老年男性高发恶性肿瘤,有调查表明,前列腺癌临床发病率高达74.1/10万,并表现出逐年升高趋势^[1]。前列腺癌自然病史较为独特,大部分病程进展缓慢,发病早期没有明显症状,临床就诊时多数已为癌症晚期,甚至出现转移,失去最佳治疗时机^[2]。因而早期发现与诊断,予以及时有效治疗,对改善前列腺癌患者预后具有重要意义。总前列腺特异性抗原(total prostate specific Antigen, tPSA)为当前临床公认最有价值的一种前列腺肿瘤标志物,但其由前列腺分泌,不是前列腺癌特有,在前列腺增生与前列腺梗死中亦可测得^[3]。故tPSA在诊断前列腺癌上存在灰区,需要联合其他指标提高前列腺癌诊断特异性以及灵敏度。以往报道称,在tPSA升高同时进行游离前列腺特异性抗原(free prostate specific antigen, fPSA)检测,能为前列腺病变良恶性鉴别提供有效依据^[4]。有研究表明,miR-370-5p可以产生抑制肿瘤生长效果^[5]。本文将探讨血清miR-370-5p、tPSA、fPSA联合检测对前列腺癌的诊断价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2018年1月至2018年12月本院收治的前列腺癌(观察组)与前列腺增生(对照组)患者各60例,均经病理证实,排除有药物或激素治疗史、合并其他肿瘤、伴随其他泌尿系统疾病等患者。观察组年龄43~78(60.73±5.28)岁;体重指数22~28(24.67±1.00)kg/m²;TNM分期:I期6例,II期20例,III期25例,IV期9例。对照组年龄40~80(61.18±6.02)岁;体重指数21~28(25.00±1.23)kg/m²。两组在年龄、体重指数比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。本研究经患者及家属同意并签署知情同意书。本实验已通过医院伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 试剂/仪器

miRcute miRNA提取分离试剂盒(购自北京TIANGEN科技有限公司),紫外分光仪(上海元析仪器有限公司),反转录试剂盒(购自美国Ambion公司),E17发光仪(购自罗氏公司)。

1.2.2 检测方法

提取血清miR-370-5p与其反转录:依据miRcute miRNA提取分离试剂盒进行血清miR-370-5p的提取;以紫外分光仪进行RNA浓度与纯度检测;依据反转录试剂盒进行反转录操作,各反转录体系之内包括10 ngRNA模板,控制反转录温度:16℃ 30 min,42℃ 30 min以及85℃ 5 min。实时荧光定量PCR(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)反应条件设置为:95℃ 3 min, 95℃ 12 s, 60℃ 35 s以及72℃ 35 s,并且循环40次。U6为内参,相对定量法算出患者血清之中miR-370-5p相对表达量(F),公式为: $F=2^{-\Delta ct}$, $\Delta ct=ct_{miR-370-5p}-ct_{U6}$, ct代表各反应管荧光信号正好为设定阈值时需要的循环数。血清tPSA、fPSA检测:以E17发光仪与配套试剂盒进行血清tPSA、fPSA的检测,严格依据试剂说明书操作。

1.3 统计学处理

采取SPSS 19.0软件进行统计分析,计数资料用n(%)表示,计量资料($\bar{x}\pm s$)表示,t检验;受试者工作特征(receiver operating characteristic, ROC)曲线分析诊断价值。 $P<0.05$ 表示为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 两组血清指标比较

观察组血清miR-370-5p相对表达量、tPSA、fPSA水平均明显高于对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。见表1。

表1 两组血清 miR-370-5p 相对表达量、tPSA、fPSA 水平对比 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 The relative expression level of miR-370-5p, levels of tPSA and fPSA in the 2 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	miR-370-5p 相对表达量	tPSA (ng/mL)	fPSA (ng/mL)
观察组	60	0.89±0.25	10.38±3.15	4.60±1.58
对照组	60	0.30±0.11	4.61±1.37	1.68±0.43
t 值		16.732	13.011	13.813
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

2.2 不同分期前列腺癌患者血清指标比较

Ⅲ~Ⅳ期前列腺癌患者血清 miR-370-5p 相对表达量、tPSA、fPSA 水平均明显高于 I~Ⅱ期患者 ($P<0.05$)。见表2。

表2 前列腺癌患者不同分期血清 miR-370-5p 相对表达量、tPSA、fPSA 水平对比 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 The relative expression level of miR-370-5p, levels of tPSA and fPSA in patients with different stages of prostate cancer ($\bar{x} \pm s$)

TNM 分期	n	miR-370-5p 相对表达量	tPSA (ng/mL)	fPSA (ng/mL)
I~Ⅱ期	26	0.58±0.12	6.14±2.04	2.42±0.64
Ⅲ~Ⅳ期	34	1.13±0.31	13.63±4.63	6.27±2.18
t 值		8.556	7.686	8.707
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

2.3 诊断效能

miR-370-5p 相对表达量诊断效能。见表3、图1。

表3 血清 miR-370-5p 相对表达量、tPSA、fPSA 水平鉴别诊断前列腺癌效能 (ng/mL)

Table 3 Efficiency of the relative expression level of miR-370-5p, levels of tPSA and fPSA in the differential diagnosis of prostate cancer (ng/mL)

指标	约登指数	AUC	截断值	敏感度 (%)	特异度 (%)
miR-370-5p	0.700	0.825	0.60	78.33	91.67
tPSA	0.683	0.879	5.06	88.33	80.00
fPSA	0.583	0.790	3.03	66.67	91.67

3 讨论

有研究发现,人体 miRNA 可以于转录水平调控中激活靶基因,提高其表达水平^[6-7]。有报道指出,人体 miRNA 介导的 RNA 激活,一般产生于转录后大约 48 h,该类激活作用时间甚至可长达两

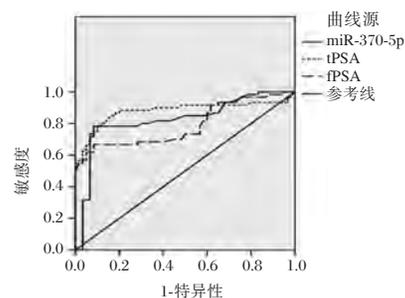


图1 ROC 曲线

Figure 1 ROC curve

周^[8-9]。人体 miRNA 激活作用的产生并不要求与相应靶基因启动子序列达到完全互补配对状态,比如 miR-370-5p 和 p21 基因启动子序列。其中, p21 蛋白广泛参与人体内各类细胞功能调节,包括细胞衰老、增殖与分化等。相关研究表明,检测前列腺癌组织标本发现, p21 蛋白表达水平较低,同时 p21 蛋白表达水平高低与前列腺癌的发生及患者临床预后存在紧密联系^[10]。而 miR-370-5p 可发挥 p21 蛋白激活效应,通过检测 miR-370-5p 可为前列腺癌患者临床诊治提供一定指导。本研究显示相对 BPH,前列腺癌患者血清 miR-370-5p 相对表达量显著高,且与 TNM 分期相关。提示血清 miR-370-5p 可能参与前列腺癌发病。

前列腺特异性抗原 (prostate specific Antigen, PSA) 仅对人体前列腺组织具有特异性,但是无肿瘤特异性,临床发现良性前列腺疾病患者血清里面 tPSA 含量亦有升高趋势。对于良性前列腺疾病与前列腺癌患者而言,血清 tPSA 水平均能够处于灰区,导致临床无法区分。相关研究指出,血清 tPSA 水平处于 4~10 ng/mL 范围内时,为前列腺癌临床诊断灰区,这时血清 PSA 诊断特异性将降低^[11]。于该诊断灰区中,良性前列腺疾病与前列腺癌患者血清之中 tPSA 检测值存在明显交叉重叠现象,单纯通过检测血清 tPSA 水平鉴别前列腺癌与部分良性前列腺疾病存在一定难度,该方式对于前列腺癌的临床诊断具有较低特异性。此外,受患者年龄、种族等各类因素影响,也会增加前列腺癌早期筛查与诊断难度。有报道指出, tPSA 联合其他指标诊断前列腺癌,诊断效能要比单项检测指标更好^[12-13]。故联合其他指标进行前列腺癌的诊断,可起到互补作用,对提高诊断准确性具有重要意义。PSA 存在形式之一为自由分子形式 (即 fPSA)。有研究发现,联合检测血清 tPSA、

fPSA、fPSA/tPSA,能够更有效指导前列腺疾病的诊断与鉴别^[14-16]。本组研究结果表明血清tPSA、fPSA在前列腺癌患者中存在更明显升高趋势;ROC曲线分析发现,tPSA相对fPSA诊断前列腺癌敏感度高,而特异度低,将血清miR-370-5p、tPSA、fPSA联合检测,敏感度、特异度均得到提升,提示血清miR-370-5p、tPSA、fPSA联合检测能够提高前列腺癌诊断敏感度与特异度。

综上,临床上通过联合检测血清miR-370-5p、tPSA、fPSA的方式诊断前列腺癌,可提高单独检测各指标的准确性、特异度以及灵敏度,具有较高应用价值,可有效指导患者疾病的诊治。

参考文献

- [1] Li X, Peterson YK, Inks ES, et al. Class I HDAC inhibitors display different anti-tumor mechanism in leukemia and prostatic cancer cells depended on their p53 status [J]. *J Med Chem*, 2018, 61(6):2589-2603.
- [2] Yuan P, Song D. MRI tracing non-invasive TiO₂-based nanoparticles motivated by ultrasound for multi-mechanism therapy of prostatic cancer [J]. *Nanotechnology*, 2018, 29(12):125101.
- [3] 方婉仙,李志雄,董志宁,等.总前列腺特异性抗原定量测定试剂盒(化学发光免疫分析法)的性能验证[J].*分子诊断与治疗杂志*, 2015, 7(5):323-327.
- [4] 朱旋,张忠民,胡少炜,等.中老年男性非前列腺癌住院患者血清PSA及其相关指标的特点分析[J].*现代泌尿生殖肿瘤杂志*, 2018, 10(2):38-41.
- [5] 黄耿,姜卫东,毛青,等.miR-370-5p对前列腺癌细胞周期及增殖的影响[J].*医学研究杂志*, 2017, 46(8):180-184.
- [6] 郭彦琨,武鑫,刘玮.核酸适配体修饰的前列腺癌靶向载体的体内外评价[J].*药学服务与研究*, 2017, 17(3):174-178.
- [7] 严张仁,陈琦.前列腺疾病相关miRNA表达的研究进展[J].*中华男科学杂志*, 2018, 24(9):824-828.
- [8] 刘洪璐,王熙才.外周血miRNA应用于肿瘤早期诊断的研究进展[J].*中国肿瘤生物治疗杂志*, 2018, 25(2):109-117.
- [9] Tan J, Jiang X, Yin G, et al. Anacardic acid induces cell apoptosis of prostatic cancer through autophagy by ER stress/DAPK3/Akt signaling pathway [J]. *Oncol Rep*, 2017, 38(3):1373-1382.
- [10] 李森茂,胡焜,余斌,等.微小核糖核酸miR-370-5p对前列腺癌细胞增殖影响的研究[J].*现代泌尿生殖肿瘤杂志*, 2017, 9(5):289-293.
- [11] 徐辉,王志勇,常辉,等.性激素、前列腺特异性抗原及其相关参数对前列腺癌的诊断价值[J].*中国医药导报*, 2017, 14(15):76-79.
- [12] 王志粉,王书中,杨士军,等.探讨血清tPSA、fPSA及其比值在淮安地区进行前列腺疾病筛查以及前列腺癌鉴别的合理运用[J].*标记免疫分析与临床*, 2018, 25(3):329-332.
- [13] 王力,李纲,谢赣生,等.四种预测前列腺穿刺阳性风险模型的准确性的外部验证与比较[J].*中华泌尿外科杂志*, 2016, 37(7):507-510.
- [14] 高自颖,甄拴平.血清总前列腺特异性抗原表达的随龄变化及其在前列腺癌鉴别诊断中的意义[J].*肿瘤研究与临床*, 2017, 29(1):39-41.
- [15] 李林,阎成全,翟玉普,等.血清总前列腺特异性抗原、血清游离前列腺特异性抗原与总特异性抗原的比值在前列腺癌中的诊断价值[J].*中国煤炭工业医学杂志*, 2017, 20(9):1035-1038.
- [16] 苏强,李莉,张曼,等.SI、TPSA及FPSA检测对前列腺癌的诊断价值[J].*标记免疫分析与临床*, 2018, 25(4):445-449.
- [5] 刘坤,刘洁,余晓艳,等.肾病综合征患者合并严重肺部感染3例报告[J].*临床肾脏病杂志*, 2019, 19(11):865-866.
- [6] 李欣艺,刘蕊,刘湘源.SAPHO综合征合并IgA肾病一例[J].*中华风湿病学杂志*, 2019, 23(10):681-683.
- [7] 中华中医药学会肾病分会.原发性肾病综合征的诊断、辨证分型及疗效评定(试行方案)[J].*上海中医药杂志*, 2006, 40(10):51-52.
- [8] Patnaik SK, Kumar P, Bamal M, et al. Cardiovascular outcomes of nephrotic syndrome in childhood (CVONS) study: a protocol for prospective cohort study [J]. *BMC Nephrol*, 2018, 19(1):81-85.
- [9] 叶峥嵘,吴琳,王娟.他克莫司缓释剂对肾病综合征患者肾功能和免疫功能的影响[J].*中国临床药理学杂志*, 2019, 35(22):2801-2803.
- [10] 徐晋祥,何常,胡斌.肾素原受体在IgA肾病中的表达及意义[J].*贵州医科大学学报*, 2019, 44(10):1210-1214.
- [11] 周燕梅,肖厚勤.特发性肾病综合征特异性标志物的研究进展[J].*医学综述*, 2019, 25(14):2850-2857.
- [12] 郑绍同,付启云,杨士军,等.糖尿病患者炎症及免疫学指标水平与其肾脏病变的相关性研究[J].*检验医学与临床*, 2018, 15(1):44-46+50.
- [13] 刘晓霞,王琳.特发性膜性肾病发生的免疫机制及免疫抑制剂治疗研究进展[J].*山东医药*, 2018, 58(14):94-97.
- [14] 范卉,于晶,张芝平,等.Fcγ受体与特发性膜性肾病相关性研究进展[J].*中国实验诊断学*, 2018, 22(3):546-548.
- [15] 李丽婧,王竹颖,徐娟玉,等.支原体肺炎患儿血清IgM、IgG、IgA、T细胞亚群及炎症因子水平观察[J].*传染病信息*, 2019, 32(3):239-241.
- [16] 凌晨,陈植,樊剑锋,等.血清IgG联合IgE预测儿童原发性肾病综合征激素治疗反应的价值[J].*中华肾脏病杂志*, 2019, 35(11):835-840.
- [17] 郑晖,曹仕琼.HBV-ECPGN患者IgG、IgA、IgM、C3d的水平变化及其临床意义[J].*肝脏*, 2018, 23(8):709-711.
- [18] 张静,张冠,李倩,等.血清补体与IgA、IgM、IgG联合检测在肺炎支原体肺炎诊断中的价值研究[J].*河北医药*, 2019, 41(19):2990-2992, 2996.

(上接第1154页)

弥漫大 B 细胞淋巴瘤患者 PD-L1/PD-L2 表达水平与临床病理及预后的关系

禹环* 符丽梅

[摘要] 目的 探讨弥漫大 B 细胞淋巴瘤(DLBCL)患者细胞程式死亡配体-1/细胞程式死亡配体-2(PD-L1/PD-L2)表达水平与临床病理及预后的关系。方法 选取2013年1月至2017年1月在本院治疗的DLBCL患者97例为研究组,检测其PD-L1、PD-L2表达水平,分析PD-L1/PD-L2表达水平与临床病理的关系;统计患者术后3年生存情况,分析PD-L1/PD-L2表达水平与术后生存期的关系。结果 PD-L1表达阳性者肿瘤部位在结内、肿瘤分期Ⅲ~Ⅳ期、病理分级ABC、存在靶器官受损的人数比例高于PD-L1表达阴性者,差异有统计学意义($P<0.05$),PD-L2表达阳性者肿瘤部位在结内、肿瘤分期Ⅲ~Ⅳ期、存在靶器官受损的人数比例高于PD-L2表达阴性者,差异有统计学意义($P<0.05$);经多元logistic回归分析,肿瘤部位在结内、肿瘤分期为Ⅲ~Ⅳ期、病理类型为ABC、靶器官受损是影响PD-L1、PD-L2阳性表达的危险因素($P<0.05$),PD-L1阳性组3年生存率低于PD-L1阴性组,3年死亡率及3年复发率高于PD-L1阴性组($P<0.05$),PD-L2阳性组3年生存率低于PD-L2阴性组,3年死亡率及3年复发率高于PD-L2阴性组($P<0.05$);PD-L1阳性组中位生存时间为34.75个月,PD-L2阳性组中位生存时间为33.5个月。结论 DLBCL患者PD-L1、PD-L2表达水平与肿瘤部位、肿瘤分期、病理分级、靶器官受损有关,并且PD-L1、PD-L2阳性表达者3年死亡率、复发率高于PD-L1、PD-L2阴性表达者。

[关键词] 弥漫大 B 细胞淋巴瘤;细胞程式死亡配体-1;细胞程式死亡配体-2;临床病理;预后

Relationship between PD - L1/PD - L2 and clinical pathology, prognosis in patients with diffuse large B cell lymphoma

YU Huan*, FU Limei

(Department of Hematology, Chenzhou first people's Hospital, Chenzhou, Hunan, China, 423000)

[ABSTRACT] Objective To explore the relationship between expression of programmed death ligand-1/programmed death ligand-2 (PD-L1/PD-L2) and clinical pathology, prognosis in patients with diffuse large B cell lymphoma (DLBCL). Methods A total of 97 DLBCL patients who were treated in the hospital from January 2013 to January 2017 were enrolled as the research subjects. The expression levels of PD-L1 and PD-L2 were detected. The relationship between PD - L1/PD - L2 and clinical pathology was analyzed. The survival situations of patients at 3 years after surgery were statistically analyzed. The relationship between PD-L1/PD-L2 and postoperative survival was analyzed. Results The proportion of PD-L1 positive patients whose tumor site is in the nodal, tumor stage Ⅲ - Ⅳ, pathological grade ABC, and target organ damage is higher than that of PD-L1 negative patients, the difference is statistically significant ($P<0.05$). The proportion of PD-L2 positive patients whose tumor site is in the nodal, tumor stage Ⅲ - Ⅳ, and target organ damage is higher than that of PD-L2 negative patients ($P<0.05$). The multiple Logistic regression analysis showed that tumors inside nodules, tumor staging at stage Ⅲ - Ⅳ, pathological grading at grade ABC and target organ damage were risk factors affecting

基金项目:湖南省自然科学基金(2018JJ6035)

作者单位:郴州市第一人民医院血液科,湖南,郴州 423000

*通信作者:禹环, E-mail: kffy17333@sina.com

the positive expression of PD-L1 ($P<0.05$), while tumors inside nodules, tumor staging at stage III-IV and target organ damage were risk factors affecting the positive expression of PD-L2 ($P<0.05$). The 3-year survival rate in the PD-L1 positive group was lower than that in the PD-L1 negative group, while 3-year mortality rate and recurrence rate were higher than those in the PD-L1 negative group ($P<0.05$). The 3-year survival rate in the PD-L2 positive group was lower than that in the PD-L2 negative group, while 3-year mortality rate and recurrence rate were higher than those in the PD-L2 negative group ($P<0.05$). The median survival time in the PD-L1 positive group and the PD-L2 positive group was 34.75 months and 33.5 months, respectively.

Conclusion The expression levels of PD-L1 and PD-L2 in DLBCL patients are related to tumor sites, tumor stage, pathological grade and target organ damage. The 3-year mortality and recurrence rate in patients with positive expression of PD-L1 and PD-L2 are higher than those with negative expression of PD-L1 and PD-L2.

[KEY WORDS] Diffuse large B cell lymphoma; Programmed death ligand-1; Programmed death ligand-2; Clinical pathology; Prognosis

弥漫大B细胞淋巴瘤(Diffuse large B cell lymphoma, DLBCL)是血液系统的一种恶性肿瘤,是成人最常见的淋巴系统肿瘤,患者常表现为无痛性、进行性的淋巴结肿大,且常伴有发热、乏力、盗汗等症状。有报道指出,多数DLBCL患者以传统手段治疗后,疾病虽能得到缓解,但经随访来看只有少于半数患者的生存质量较好^[1]。人类机体的免疫系统对肿瘤患者治疗后生存质量的改善有着至关重要的作用,较多报道表明,DLBCL患者在治疗后免疫功能有明显下降趋势,且细胞程序死亡-配体1(Programmed cell death 1 ligand 1, PD-L1)、细胞程序死亡-配体2(Programmed cell death ligand 2, PD-L2)参与了T淋巴细胞的生成,与DLBCL患者免疫系统下调存在密切联系,并PD-L1、PD-L2表达水平可影响患者的术后恢复^[2],这表明PD-L1、PD-L2表达水平与DLBCL患者的预后有关。本研究通过分析DLBCL患者PD-L1、PD-L2表达水平,旨在探究PD-L1、PD-L2表达水平与临床病理及预后的关系,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2013年1月至2017年1月在本院治疗的DLBCL患者97例为研究对象,其中男59例,女38例;年龄45~79岁,平均(62.97±5.13)岁;肿瘤分期^[3]: I期31例、II期25例、III期22例、IV期19例;肿瘤部位:结内61例、结外36例;靶器官受损45例,无靶器官受损52例。

纳入标准:①符合《中国临床肿瘤学会淋巴瘤诊疗指南解读之弥漫性大B细胞淋巴瘤的规范治疗》^[4]中关于DLBCL的诊断标准;②经病理学检查

确诊为DLBCL患者;③预计存活时间≥3个月;④均行肿瘤切除术治疗。排除标准:①合并其他恶性肿瘤或转移性肿瘤患者;②临床病理资料不完整者;③在术前已行放化疗及靶向治疗者;④已感染人类免疫缺陷病毒者。所有患者及家属均已签署知情同意书。本实验经医院伦理委员会通过批准。

1.2 方法

PD-L1、PD-L2表达水平测定:取患者肿瘤标本用10%缓冲甲醛固定、石蜡包埋,将5 μm已固定的切片置于载玻片上,在微波炉中用二甲苯进行脱蜡处理,用乙醇进行清洗、蒸馏水洗涤,然后用柠檬酸钠缓冲液进行热诱导抗原恢复。应用美国Cell Signaling Technology公司的PD-L1、PD-L2图单克隆抗体,在37℃环境下用抗体将病理切片孵育50 min,然后用苏木精复染。PD-L1、PD-L2阳性标准^[5]为PD-L1、PD-L2细胞占所有细胞的10%以上。

1.3 观察指标

①根据检测结果将患者分为PD-L1阳性表达组、阴性表达组及PD-L2阳性表达组、阴性表达组。②统计患者临床资料,采用多元logistics回归分析PD-L1、PD-L2表达水平与临床病理的关系。③随访:采用电话或门诊复诊的方式对患者生存及复发情况进行随访,随访时间为术后3个月、6个月、1年、3年。④采用生存曲线分析PD-L1、PD-L2表达水平与术后生存期的关系。

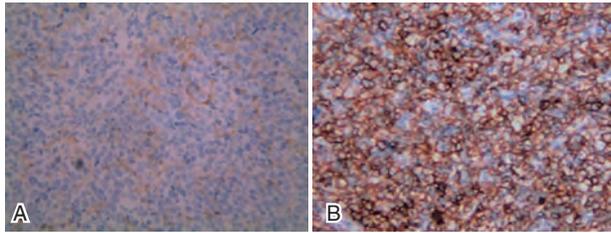
1.4 统计学方法

应用SPSS软件分析数据,计数资料用 $n(\%)$ 表示,采用 χ^2 检验;计数资料用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,采用 t 检验;采用多元logistic回归分析PD-L1、PD-L2表达水平与临床病理的关系;log-rank检验进行生存分析。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 患者病理检查结果

97例DLBCL患者中,PD-L1表达阳性者64例,阳性表达率为65.98%;PD-L2表达阳性者33例,阳性表达率为40.21%。见图1。



注:A为PD-L2阳性表达;B为PD-L1阳性表达。

图1 PD-L1、PD-L2阳性表达者的病理图(HE, ×400)

Figure 1 Pathology of PD-L1、PD-L2 positive expression (HE, ×400)

2.2 患者的一般资料比较

PD-L1表达阳性者肿瘤部位在结内、肿瘤分期Ⅲ~Ⅳ期、病理分级ABC、存在靶器官受损的人数比例高于PD-L1表达阴性者,差异有统计学意义($P<0.05$);PD-L2表达阳性者肿瘤部位在结内、肿瘤分期Ⅲ~Ⅳ期、存在靶器官受损的人数比例高于PD-L2表达阴性者,差异有统计学意义($P<0.05$),见表1。

2.3 患者PD-L1、PD-L2表达水平与临床病理的关系

经多元logistic回归分析,肿瘤部位在结内、肿瘤分期为Ⅲ~Ⅳ期、病理类型为ABC、靶器官受损是影响PD-L1阳性表达的危险因素($P<0.05$);肿瘤部位在结内、肿瘤分期为Ⅲ~Ⅳ期、靶器官受损是影响PD-L2阳性表达的危险因素($P<0.05$),见表2。

表1 患者的一般资料比较

Table 1 Comparison of general data of the patients

资料	n	PD-L1		χ^2 值	P值	PD-L2		χ^2 值	P值	
		阳性(n=64)	阴性(n=33)			阳性(n=39)	阴性(n=58)			
年龄	≤60岁	36	21	15	1.800	0.180	18	18	2.284	0.131
	>60岁	61	43	17			21	40		
性别	男	59	38	21	0.278	0.598	23	36	0.094	0.759
	女	38	17	12			16	22		
部位	结内	61	44	15	4.959	0.026	31	30	7.701	0.006
	结外	36	20	18			8	28		
肿瘤分期	I~II期	56	29	27	11.891	0.001	10	46	27.526	0.000
	III~IV期	41	35	6			29	12		
病理分型	ABC	63	52	11	21.959	0.000	28	35	1.343	0.247
	GCB	34	12	22			11	23		
靶器官受损	有	45	39	6	16.004	0.000	31	14	24.726	0.000
	无	52	25	27			8	44		

表2 患者PD-L1、PD-L2阳性表达与临床病理的多元logistics回归分析

Table 2 Multiple logistic regression analysis of PD-L1、PD-L2 positive expression and clinical pathology in the patients

因素	因素	OR值	P值	95%CI
PD-L1	部位(结内 vs 结外)	2.253	0.000	1.397~2.652
	肿瘤分期(I~II期 vs III~IV期)	3.084	0.000	1.642~3.254
	病理类型(ABC vs GCB)	2.972	0.000	1.498~3.059
	靶器官受损(有 vs 无)	3.287	0.000	1.724~3.397
PD-L2	部位(结内 vs 结外)	2.954	0.000	1.872~3.942
	肿瘤分期(I~II期 vs III~IV期)	3.295	0.000	1.972~3.298
	靶器官受损(有 vs 无)	3.108	0.000	2.198~3.574

2.4 患者PD-L1、PD-L2表达水平与预后的关系

PD-L1阳性组3年生存率低于PD-L1阴性组,3年死亡率及3年复发率高于PD-L1阴性组($P<$

0.05);PD-L2阳性组3年生存率低于PD-L2阴性组,3年死亡率及3年复发率高于PD-L2阴性组($P<0.05$),见表3、见图2。

表3 患者PD-L1、PD-L2表达水平与预后的关系 [n(%)]

Table 3 Relationship between the expression level of PD-L1, PD-L2 and prognosis in the patients [n(%)]

组别	PD-L1		χ^2 值	P值	PD-L2		χ^2 值	P值
	阳性(n=64)	阴性(n=33)			阳性(n=39)	阴性(n=58)		
3年生存率	45.31(29)	81.81(27)	11.891	0.001	43.59(17)	67.24(39)	5.346	0.021
3年死亡率	54.69(35)	18.18(6)	11.891	0.001	56.41(22)	32.76(19)	5.346	0.021
3年复发率	65.63(42)	30.30(10)	10.923	0.001	76.92(30)	41.38(24)	11.938	0.001

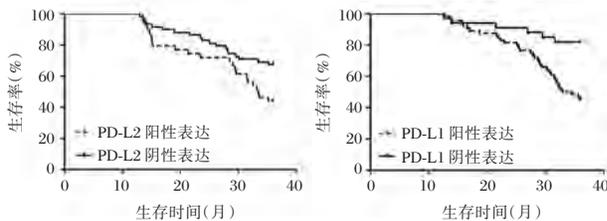


图2 PD-L1、PD-L2阳性表达及阴性表达患者的生存曲线分析

Figure 2 Survival curve analysis of patients with positive and negative expression of PD-L1 and PD-L2

3 讨论

DLBCL是一种常见的非霍奇淋巴瘤,患者常伴有发热、盗汗、淋巴结增大的症状,且有些许患者表现为骨髓侵犯^[5-6],有报道指出,DLBCL患者常伴有免疫系统紊乱的现象^[7]。PD-L1为B7家族成员在巨噬细胞、树突状细胞、成纤维细胞和T细胞表面表达的抑制性配体,PD-L1的阳性细胞的大量存在可保护肿瘤细胞免受TILs的攻击,进而可抑制T细胞的诱导作用,进而促进肿瘤的进一步发展^[8]。本研究结果表明PD-L1表达水平与肿瘤部位、肿瘤分期等有关。Bassyoni O Y等^[9-10]研究指出,PD-L1的适应性免疫应答与癌症复发有关,这表明PD-L1的表达可能与肿瘤患者的预后相关。PD-L1与其受体结合可抑制T细胞中细胞因子释放,参与细胞和体液免疫反应,并且其在各种免疫效应物的浸润和转移性疾病的发展中具有促进作用^[11],这表明PD-L1的过表达可促进不良预后的发生。本研究结果发现患者生存情况与PD-L1的表达水平有关,这主要是因为PD-L1受体结合物参与免疫应答的负调节,导致肿瘤细胞逃避宿主细胞的监视,促进其生长和转移,进而导致不良预后的发生。

PD-L2是活化巨噬细胞和树突状细胞结合T细胞PD-1分析后产生的抑制免疫应答的细胞表面蛋白,王玲玲等^[12]研究发现,多种肿瘤疾病及自身免疫性疾病中存在PD-L2过度表达的现象,这

提示PD-L2的阳性表达可能参与肿瘤细胞的发生发展过程。PD-L2过表达会抑制T细胞活化增殖和细胞因子分泌,有利于肿瘤特异性T细胞的激发。有研究指出,PD-L2的过度表达可抑制LCs的成熟,进而介导了DLBCL患者肿瘤细胞的免疫逃逸,促进肿瘤的进一步发展或转移,可能会累计肝脏、肾脏,从而出现靶器官受损现象^[13-14]。本研究结果表明可通过抑制PD-L2过表达来延缓肿瘤细胞的进一步发展。PD-L2可诱导T细胞凋亡,影响机体抗肿瘤免疫反应,发挥免疫负调节作用,破坏免疫系统的稳态,不利于患者预后^[15-16]。本研究结果说明表面PD-L2阳性表达者预后较差,这主要是因为PD-L2与配体PD-1受体结合,下调巨噬细胞和树突状细胞活性,使p51ck失活向T细胞内传递免疫抑制信号,进而限制T细胞的激活,进而使患者免疫力降低,导致不良预后的发生。

综上所述,DLBCL患者PD-L1、PD-L2表达水平与肿瘤部位、肿瘤分期、病理分级、靶器官受损有关,并且PD-L1、PD-L2阳性表达者3年死亡率、复发率高于PD-L1、PD-L2阴性表达者,这表明可通过检测患者PD-L1、PD-L2表达水平来预测患者复发及生存情况。

参考文献

- [1] 金静霞,郑翠苹,陈丽雅,等. PD-1、PD-L1在弥漫大B细胞淋巴瘤组织中的差异性表达及其临床意义[J]. 临床血液学杂志, 2018, 31(1):34-37.
- [2] Xin H, Weiyue Z, Zhicai Z, et al. Prognostic Value of Programmed Cell Death 1 Ligand-1 (PD-L1) or PD-1 Expression in Patients with Osteosarcoma: A Meta-Analysis [J]. J Cancer, 2018, 9(14):2525-2531.
- [3] Cao LJ, Wang XY, Li SY, et al. PD-L1 is a Prognostic Biomarker in Resected NSCLC Patients with Moderate/high Smoking History and Elevated Serum SCCA Level [J]. J Cancer, 2017, 8(16):3251-3260.
- [4] 许彭鹏,赵维莅. 中国临床肿瘤学会淋巴瘤诊疗指南解读之弥漫性大B细胞淋巴瘤的规范治疗 [J]. 华西医学, 2019, 34(4):7-10. (下转第1170页)

IL-6、肿瘤坏死因子 α 及CRP对下肢创伤患者合并感染的预测价值分析

吴俊学 李毓灵 陈路*

[摘要] 目的 分析白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、C反应蛋白(CRP)在下肢创伤合并感染患者中的表达水平,并研究其临床病情预测价值。方法 分析本院2017年10月至2019年10月收治的96例下肢创伤患者与同期在本院96例体检人群临床资料,比较不同人群中IL-6、TNF- α 、CRP表达水平,下肢创伤患者不同时间(入院初诊、伤后6 h、3 d、7 d)IL-6、TNF- α 、CRP表达水平,并分析下肢创伤患者出现感染的危险因素。结果 不同分组间IL-6、TNF- α 、CRP表达水平存在明显差异,正常对照组明显低于下肢创伤组,差异有统计学意义($P<0.05$);下肢创伤患者在受伤后不同时间中IL-6、TNF- α 、CRP表达存在差异,在3 d时患者IL-6、TNF- α 、CRP表达水平达到高峰,在7 d时降低,但仍高于初诊($P<0.05$);本研究96例下肢创伤患者合并感染31例,感染组IL-6、TNF- α 、CRP表达水平明显高于未感染组,差异有统计学意义($P<0.05$);通过单因素分析和多因素分析,结果显示IL-6、TNF- α 、CRP表达水平为下肢创伤患者出现感染的独立危险因素($P<0.05$)。结论 动态监测下肢创伤患者外周血中IL-6、TNF- α 、CRP水平变化,可为患者病情评估、感染预测提供重要参考依据。

[关键词] IL-6; 肿瘤坏死因子 α ; CRP; 下肢创伤; 合并感染

Analysis of the predictive value of IL-6, tumor necrosis factor alpha and CRP in patients with lower limb trauma combined with infection

WU Junxue, LI Yuling, CHEN Lu*

(Department of Orthopaedics, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan, China, 637000)

[ABSTRACT] Objective To analyze the expression levels of interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α), C-reactive protein (CRP) in patients with trauma of lower limb combined with infection, and to study its predictive value for clinical condition. Methods The clinical data of 96 patients with trauma of lower limb admitted in our hospital from October 2017 to October 2019 and the clinical data of 96 people with medical examination in our hospital at the same time were analyzed retrospectively. The levels of IL-6, TNF- α , and CRP between different groups were compared, the levels of IL-6, TNF- α , and CRP in patients with trauma of lower extremity at different times (preliminary diagnosis on admission, 6 h, 3 d, and 7 d after injury) were analyzed, and the risk factors of infection of patients with trauma of lower limb were analyzed. Results There were significant differences in the expression levels of IL-6, TNF- α , and CRP among different groups. The normal control group was significantly lower than the lower limb trauma group, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). There are differences in the expression of IL-6, TNF- α , and CRP in patients with lower limb trauma at different times after injury. The expression levels of IL-6, TNF- α , and CRP in the patients reached a peak on the 3rd day, and decreased on the 7th day, but still high at the first visit ($P<0.05$).

基金项目:四川省科技计划项目(2018jy0250)

作者单位:川北医学院附属医院骨科,四川,南充 637000

*通信作者:陈路, E-mail: nsmccl@aliyun.com

In this study, 96 patients with lower extremity trauma were co-infected. The expression levels of IL-6, TNF- α and CRP in the infected group were significantly higher than those in the uninfected group, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). The univariate analysis and multivariate analysis showed that the expression levels of IL-6, TNF- α , and CRP were independent risk factors for infection in patients with lower limb trauma ($P<0.05$). Conclusion Dynamic monitoring of the changes of IL-6, TNF- α and CRP levels in the peripheral blood of patients with lower extremity trauma can provide an important reference for the assessment of the patient's condition and the prediction of injury and infection.

[KEY WORDS] IL-6; Tumor necrosis factor alpha; CRP; Lower extremity trauma; Combined with infection

下肢创伤为临床骨科中常见问题,对病情严重者如何救治是临床中关注重点,如未进行及时有效治疗会导致患者下肢功能丧失,最终截肢造成患者终身残废,严重影响患者的预后和生活质量^[1]。在机体遭受严重打击的基础上,患者会出现应激反应,而创伤所致的疼痛、渗出液等也可作为应激源,导致患者内源性炎症介质释放,患者可能会出现全身炎症反应综合征,严重者会出现多器官衰竭^[2]。重视患者全身情况,对患者创伤严重程度、预后情况作出可靠评估是目前医学创伤领域中的重要课题之一^[3]。白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)和肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor alpha, TNF- α)属于炎症介质,也是纤维增生刺激因子;C反应蛋白(C-reactive protein, CRP)是一种急性时相蛋白,在组织受到损伤、炎症、感染时可增高,为下肢静脉血栓发展中重要因素之一^[4-5]。本研究拟分析讨论 IL-6、TNF- α 、CRP 对下肢创伤患者合并感染的预测价值,为患者预后评估提供参考。

1 资料与方法

1.1 一般资料

分析本院 2017 年 10 月至 2019 年 10 月收治的 96 例下肢创伤患者临床资料,其中男 62 例,女 34 例,平均年龄为(36.26 \pm 12.79)岁,受伤原因:车祸、坠落、撞击、摔倒等。选取同期在本院体检人群 96 例作为正常对照组,其中男 63 例,女 33 例,平均年龄为(37.11 \pm 12.42)岁,入选者择身体健康,无外伤。

纳入标准:①所有研究对象临床资料、实验室资料完整;②均为下肢创伤者;③患者及其家属对本研究知情同意。排除标准:①合并全身性感染疾病者;②精神障碍患者;③存在凝血功能障碍者。两组研究对象一般资料比较差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。

1.2 方法

1.2.1 IL-6、TNF- α 、CRP 检测方法

对照组抽血时间为清晨,下肢创伤患者则在入院初诊、伤后 6 h、3 d、7 d。所有研究对象均抽取 5 mL 血液,以乙二胺四乙酸抗凝,3 000 r/min 离心 10 min,取血浆备用。使用酶联免疫吸附法检查血清中 IL-6、TNF- α 表达情况,试剂盒购自欣博盛生物科技有限公司;使用德国罗氏公司提供的 E601 电化学发光自动免疫分析仪测定 CRP。所有操作均按试剂或仪器所配套说明书进行,由专业人员操作。

1.2.2 感染情况

根据下肢创伤后是否出现感染分为感染组和未感染组,感染诊断按疾病预防控制中心感染诊断标准进行评估^[6]。

1.3 观察指标

比较不同分组间 IL-6、TNF- α 、CRP 表达水平,以及下肢创伤患者在入院初诊、伤后 6 h、3 d、7 d 后 IL-6、TNF- α 、CRP 表达水平,并分析下肢创伤患者出现感染的危险因素。

1.4 统计学方法

采用 SPSS18.0 软件进行数据分析,计量资料采用($\bar{x}\pm s$)描述;多组比较采用方差检验,两组比较采用 t 检验;下肢创伤患者出现感染的危险因素采用 logistic 回归分析,以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 两组间 IL-6、TNF- α 、CRP 表达水平

正常对照组 IL-6、TNF- α 、CRP 表达水平明显低于下肢创伤组,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 1。

2.2 下肢创伤患者不同时间段 IL-6、TNF- α 、CRP 表达水平

下肢创伤患者在不同时间段 IL-6、TNF- α 、

表1 两组间IL-6、TNF-α、CRP表达水平

Table 1 expression levels of IL-6, TNF-α and CRP in the 2 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	IL-6 (ng/mL)	TNF-α (ng/mL)	CRP (mg/L)
正常对照组	96	21.45±10.71	0.73±0.36	4.73±0.49
下肢创伤组	96	216.98±15.69	1.11±0.01	65.87±2.85
t值	-	100.848	10.338	207.152
P值	-	0.000	0.000	0.000

CRP表达存在差异,在3d时患者IL-6、TNF-α、CRP表达水平达到高峰,在7d时降低,但仍高于初诊,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表2。

表2 下肢创伤患者不同时间段IL-6、TNF-α、CRP表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 expression levels of IL-6, TNF-α and CRP in patients with lower extremity trauma in different time periods ($\bar{x} \pm s$)

组别	IL-6 (ng/mL)	TNF-α (ng/mL)	CRP (mg/L)
初诊	115.45±4.71	0.79±0.36	7.73±1.22
6h	136.20±15.69 ^a	0.98±0.69 ^a	15.87±2.05 ^a
3d	399.95±110.36 ^{ab}	1.87±0.86 ^{ab}	21.73±3.48 ^{ab}
7d	253.98±90.69 ^{abc}	1.21±0.38 ^{abc}	12.37±2.05 ^{abc}
F值	317.80	57.13	607.88
P值	0.000	0.000	0.000

注:a为与初诊比较,b为与6h比较,c为与3d比较, $P < 0.05$ 。

表4 影响下肢创伤患者发生感染的危险因素分析

Table 4 Analysis of risk factors for infection in patients with lower extremity trauma

变量	单因素分析					多因素分析				
	回归系数	标准误	OR值	95%CI	P值	回归系数	标准误	OR值	95%CI	P值
年龄	0.451	0.334	1.569	0.603~2.242	0.813	-	-	-	-	-
性别	0.236	0.124	1.266	0.992~1.614	0.970	-	-	-	-	-
受伤原因	0.379	0.257	1.460	0.882~2.471	0.745	-	-	-	-	-
IL-6	0.557	0.154	1.745	1.290~2.360	0.011	0.369	0.110	1.446	1.165~1.794	<0.005
TNF-α	0.623	0.183	1.864	1.302~2.668	<0.05	0.462	0.112	1.587	1.274~1.976	<0.05
CRP	0.661	0.316	1.936	1.042~3.597	0.005	0.162	0.033	1.175	1.102~1.254	0.003

机体受到创伤后,其创伤部位器官组织碎片、坏死组织存在细胞缺氧、应激反应、感染等情况,会导致机体出现一系列协调有序的急性反应,在此反应过程中导致大量的炎症细胞释放^[8]。炎症因子中以IL-6、TNF-α常见,TNF-α作为重要的炎症反应介质,有激活细胞因子级联反应的作用,诱导IL-6、IL-8释放^[9]。IL-6在T细胞、单核细胞中产生,具有诱导B细胞、肝细胞生产免疫球蛋白、急性期蛋白功能,无直接细胞损害作用,在此基础上促进了中性细胞聚集、活化等,可反映出机体炎症、组织损伤情况^[10-11]。CRP在肝脏内分泌合成,为急性时

2.3 感染组与未感染组IL-6、TNF-α、CRP表达水平

感染组IL-6、TNF-α、CRP指标表达水平明显高于未感染组,比较差异有统计学意义($P < 0.05$),见表3。

表3 感染组与未感染组IL-6、TNF-α、CRP表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 expression levels of IL-6, TNF-α and CRP in infected and uninfected groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	IL-6 (ng/mL)	TNF-α (ng/mL)	CRP (mg/L)
未感染组	31	256.88±85.96	0.96±0.06	14.73±2.49
感染组	65	521.19±133.11	1.34±0.21	25.17±3.11
t值	-	11.714	13.542	17.692
P值	-	0.000	0.000	0.000

2.4 下肢创伤患者发生感染的危险因素分析

通过单因素分析和多因素分析,发现IL-6、TNF-α、CRP为下肢创伤患者发生感染的独立危险因素($P < 0.05$),见表4。

3 讨论

下肢创伤多由外力所致,常见有交通事故、意外跌倒、摔伤等,较为严重患者除引起多个部位创伤外还会影响到单个或多个器官损伤,下肢创伤患者常见出血、休克、生理更能紊乱等情况^[7]。在

相反蛋白,常在12h内在血清中的浓度急剧升高,待患者病情好转或会快速下降,直至回归正常浓度,属于全身炎症反应的敏感指标,且抗炎药物、激素、抑制剂等均不会对其造成影响^[12]。结合以往文献研究,提示IL-6、TNF-α、CRP在下肢创伤患者血清中有不同程度升高,通过检测上述因子水平可评估患者病情^[13]。

下肢创伤患者病情较为严重时,会出现机体免疫力紊乱、不良应激反应等,而创伤后出现炎症反应,增加了患者并发感染的机率,这也是导致创伤患者死亡的主要原因。在创伤导致炎症反应后,会导致

机体相关炎症指标改变。在樊雪梅等人^[14]文献中证实,在创伤部位缺血再灌注后其血管内皮、实质组织损伤会将巨噬细胞、单核细胞、中性粒细胞等激活相关的炎症细胞因子也随之释放出来启动了全身炎症反应。通过结合以往文献分析结果对下肢创伤后合并感染发生、发展等情况有预测价值^[15]。

综上所述,动态监测下肢创伤患者外周血中IL-6、TNF- α 、CRP水平变化,可为患者病情评估、感染预测提供重要参考依据。

参考文献

- [1] 全军麻醉与复苏专业委员会,中华医学会麻醉学分会. 低温环境战创伤麻醉指南[J]. 解放军医学杂志, 2019, 44(9): 88-89.
- [2] 魏晓岩,李迎婕,赵学慧,等. 不同剂量非布司他治疗高尿酸血症伴痛风的效果观察及对机体炎症因子、血管内皮损伤因子的影响[J]. 临床误诊误治, 2019, 22(10):27-32.
- [3] 林丽霞,高陈林,顾峻菱,等. 短链脂肪酸对氧化应激-炎症的影响研究进展[J]. 医学分子生物学杂志, 2019, 22(1):93-98.
- [4] 高洁,王莉,郭宇,等. 创伤后应激障碍诊治研究新进展[J]. 保健医学研究与实践, 2019, 16(3):77-80.
- [5] 岳凌峰,仲照希,马敬,等. 奥氮平通过抑制NLRP3炎症小体激活对抑郁模型大鼠海马神经元的保护作用[J]. 四川大学学报(医学版), 2019, 33(5):55-56.
- [6] 陈锦峰,熊自超,陈继安. 市级医院医务人员医院感染诊断认知现状调查分析[J]. 医学理论与实践, 2018, 28(11):1712-1715.
- [7] 汪牛,赵宇,朱兆红,等. 骨质疏松椎体压缩性骨折PKP术后肺部感染患者血清IL-6、CRP水平及预后分析[J]. 临床和实验医学杂志, 2019, 30(6):44-46.
- [8] 庞亚飞,司炎辉,孔瑞娜. CD64指数、白介素、肿瘤坏死因子- α 与类风湿关节炎病情活动和继发感染的关系[J]. 世界临床药物, 2018, 16(4):81-82.
- [9] 冷燕奎,王强,金斌,等. 不同肿瘤坏死因子- α 拮抗剂治疗强直性脊柱炎的早期疗效及对炎症指标的影响[J]. 中国临床药学杂志, 2019, 36(5):333-336.
- [10] 黄朋,方恋,陈波,等. 重症肺炎患者血清降钙素原、C-反应蛋白、D二聚体及炎症因子水平变化及其临床意义[J]. 安徽医药, 2018, 22(3):478-482.
- [11] 范晓蕾,刘中华,岳涛,等. 血清TNF- α 、IL-1 β 、IL-6和IL-17表达水平在阿达木单抗治疗活动性类风湿关节炎中的疗效预测作用[J]. 中国医科大学学报, 2018, 47(6):33-35.
- [12] 吴瑞丽. 未成熟粒细胞计数预测脊柱手术后早期感染的应用价值[J]. 中国骨伤, 2019, 32(10):898-903.
- [13] 张建杰,郝长春,黄勇,等. 超声动态监测联合中医结合治疗ASO疗效及对双下肢峰值血流速度的影响[J]. 河北医药, 2018, 13(2):232-234.
- [14] 樊雪梅,容松. 蛋白激酶C β 抑制剂对肾缺血-再灌注损伤模型及其巨噬细胞亚型表达的影响[J]. 器官移植, 2019, 10(4):423-428.
- [15] 尚彬,云德波,罗波,等. 标准大骨瓣减压手术对颅脑损伤患者单核细胞趋化蛋白-1、超敏C反应蛋白水平的影响及其因素分析[J]. 创伤外科杂志, 2019, 21(6):13-16.

(上接第1166页)

- [5] Qiu L, Zheng H, Zhao X. The prognostic and clinicopathological significance of PD-L1 expression in patients with diffuse large B-cell lymphoma: a meta-analysis[J]. BMC Cancer, 2019, 19(1):273-275.
- [6] Kim MY, Koh J, Kim S, et al. Clinicopathological analysis of PD-L1 and PD-L2 expression in pulmonary squamous cell carcinoma: Comparison with tumor-infiltrating T cells and the status of oncogenic drivers [J]. Lung Cancer, 2015, 88(1):24-33.
- [7] 廖已函,王星月,魏小红,等. 弥漫大B细胞淋巴瘤患者的预后及其影响因素[J]. 实用癌症杂志, 2020, 35(8):1386-1389.
- [8] 杨雯,康佳蕊,金贻铎,等. PD-1及PD-L1在宫颈上皮内瘤变及鳞癌中表达差异性的临床研究[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2018, 10(2):78-84.
- [9] Bassyoni OY, Rashad HM. Expression of PD-1/PD-L1 and P53 in hepatocellular carcinoma: relationship with clinicopathological parameters[J]. Egyptian J Pathol, 2018, 38(5):1-10.
- [10] Lee YS, Han J, Hong YK. MPTH-33. PD-L1 EXPRESSION AND COMBINED PATTERN OF PD-L1/PD-1+TIMC DEN-SITY PREDICT PROGNOSIS IN GLIOBLASTOMA PATIENTS[J]. Neuro-Oncology, 2016, 18(6):113-113.
- [11] 尹海兵,吴雅珣,蔡南南,等. 弥漫大B细胞淋巴瘤中PD-1、PD-L1的表达[J]. 临床与实验病理学杂志, 2019, 35(4):6-9.
- [12] 王玲玲,高颖,沈冰,等. 肺鳞癌组织PD-L1表达变化及其与患者临床病理参数和预后的关系[J]. 山东医药, 2017, 57(8):25-28.
- [13] Chen YM, Zhang YP, Chai XL, et al. Correlation between the Expression of PD-L1 and Clinicopathological Features in Patients with Thymic Epithelial Tumors[J]. Biomed Res Int, 2018, 18(6):1-7.
- [14] 谷俊杰,邵亚娟,孙昭,等. PD-L1表达与食管癌患者临床特征及预后关系的Meta分析[J]. 癌症进展, 2019, 17(6):41-46+121.
- [15] 赵越,卜庆. PD-L1和PD-1在外周T细胞淋巴瘤中的表达及临床意义[J]. 天津医药, 2016, 44(3):349-352.
- [16] 林晓骥,孙妮,周晓海,等. PD-1在弥漫性大B细胞淋巴瘤患者外周血CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞上的表达和临床意义[J]. 中国卫生检验杂志, 2018, 28(3):556-558.

高频超声、血清 TPO-Ab 对不同性质甲状腺结节诊断的价值分析

马纯华* 黄畅 郑丹慧

[摘要] **目的** 探究高频超声(HFU)、血清甲状腺过氧化物酶抗体(TPO-Ab)对不同性质甲状腺结节诊断的价值。**方法** 选取2019年5月至2020年1月本院122例甲状腺结节(122个结节)患者作为研究对象,根据结节性质分为良性组($n=57$)和恶性组($n=65$),同期选取60例健康体检者作为对照组。比较三组HFU参数[阻力指数(RI)、搏动指数(PI)、舒张期最低血流速度(D)]、血清TPO-Ab,分析HFU参数及血清TPO-Ab单一及联合诊断价值,并探讨甲状腺结节病理性质的HFU危险因素。**结果** 恶性组D、RI、PI、血清TPO-Ab水平高于良性组、对照组($P<0.05$);HFU参数、血清TPO-Ab联合诊断恶性甲状腺结节曲线下面积AUC为0.852,敏感度为73.85%,特异度为84.21%;微钙化、血流信号、似圆度、声晕是恶性甲状腺结节危险因素($P<0.05$)。**结论** 微钙化、血流信号>I级、似圆度>15、声晕是恶性甲状腺结节发生的独立危险因素,早期采用HFU、血清TPO-Ab联合检查,有助于提高甲状腺结节性质诊断价值。

[关键词] HFU; 甲状腺结节; 危险因素

Analysis of the value of high-frequency ultrasound and serum TPO-Ab in the diagnosis of thyroid nodules with different properties

MA Chunhua*, HUANG Chang, ZHENG Danhui

(Department of Ultrasound, Dafeng hospital, Chaoyang District, Shantou, Guangdong, China, 515154)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the value of high-frequency ultrasound (HFU) and serum thyroid peroxidase antibody (TPO-Ab) in the diagnosis of thyroid nodules with different properties. **Methods** From May 2019 to January 2020, 122 patients with thyroid nodules (122 nodules) in our hospital were selected as the research object, and they were divided into the benign group ($n=57$) and the malignant group ($n=65$) according to the nature of nodules, during the same period, 60 healthy people were selected as the control group. Comparing the HFU parameters [resistance index (RI), pulsatility index (PI), minimum diastolic blood flow velocity (D)], serum TPO-Ab of three groups, analyzing the HFU parameters and serum TPO-Ab single and combined diagnostic value, and exploring the risk factors of HFU in the pathological nature of thyroid nodules. **Results** The levels of D, RI, PI and serum TPO-Ab in the malignant group were higher than those in the benign group and the control group ($P<0.05$). The AUC of the area under the curve of the combined diagnosis of HFU parameters and serum TPO-Ab for malignant thyroid nodules was 0.852, the sensitivity was 73.85%, and the specificity was 84.21%. Microcalcification, blood flow signal, roundness, and halo were risk factors for malignant thyroid nodules ($P<0.05$). **Conclusion** Microcalcification, blood flow signal > grade I, roundness >15, halo are independent risk factors for malignant thyroid nodules. Early combined examination of HFU and serum TPO-Ab was used to improve the diagnostic value of the nature of thyroid nodules.

[KEY WORDS] HFU; Thyroid nodules; Risk factors

基金项目:汕头市科技计划医疗卫生类别项目(190419205263457)

作者单位:汕头市潮阳区大峰医院超声科,广东,汕头 515154

*通信作者:马纯华, E-mail:13433840862@163.com

据不完全统计,恶性结节约占甲状腺结节5.0%~15.0%,严重威胁患者生命安全^[1-3]。因此尽早明确甲状腺结节性质,并给予相应治疗对降低恶性结节发病率具有积极意义。超声为当前甲状腺结节影像学检查手段,对于基层医院甲状腺结节诊断具有较大便利性,数据显示,超声可将甲状腺结节检出率提高至19%~67%^[4-5]。同时,相关研究显示^[6],恶性肿瘤细胞可释放血管内皮生长因子,刺激血管新生,超声主要表现为血流丰富,血流形态不规则等。另外^[7],甲状腺过氧化物酶抗体(Thyroid Peroxidase-Ab, TPO-Ab)是催化甲状腺激素的重要酶,可作为反映自身免疫性甲状腺疾病的标志物。本研究将分析恶性甲状腺结节发生影响因素及相关超声参数对不同性质甲状腺结节诊断价值。

1 资料和方法

1.1 一般资料

选取2019年5月至2020年1月本院122例甲状腺结节患者作为研究对象,根据结节性质分为良性组($n=57$)和恶性组($n=65$),同期选取60例健康体检者作为对照组。纳入标准:①均经手术及穿刺活检组织病理检查证实;②患者及家属均签署知情同意书。排除标准①既往有甲状腺手术史者;②存在超声检查禁忌证者;③合并颈部局部或全身感染性疾病者;④颈动脉斑块、继发性高血压病者;⑤精神行为异常者。

1.2 方法

①一般资料收集:仔细查阅患者病历资料,设计临床研究表(CRF),调查内容包括年龄、性别、体质指数(body mass index, BMI)。②HFU检查:采用彩色多普勒超声诊断仪(型号:GELOGI E9,购自美国GE公司)进行检查,选取线阵探头,探头频率设置为6~13 MHz。行仰卧位,完全显露颈部,对颈前部甲状腺实施常规超声检查,明确结节位置,对结节实施二维超声检查,观察结节大小、内部回声、形态、边界、周围声晕、内部钙化情况等,后实施彩色多普勒血流显像,探查结节周边及内部血流情况,并对结节所在侧叶上动脉实施检查,观察阻力指数(RI)、搏动指数(PI)、舒张期最低血流速度(D),同一侧叶RI值需重复测量3次,并取平均值。

1.3 观察指标

①比较三组HFU参数及血清TPO-Ab。②分

析HFU参数及血清TPO-Ab单一及联合对不同性质甲状腺结节的诊断价值。③分析甲状腺结节病理性质的HFU危险因素。

1.4 统计学方法

采用SPSS 22.0软件分析处理数据,计量资料采用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,组间比较用 t 检验,多组间比较用单因素方差分析,计数资料用 $n(\%)$ 表示,组间比较采用 χ^2 检验,采用Logistic进行多因素回归分析,采用Pearson进行线性相关性分析,采用受试者工作特征曲线(ROC)分析诊断价值, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3组一般资料比较

3组基本资料(年龄、性别、BMI)均衡可比,差异无统计学意义($P > 0.05$);3组结节边界、内部回声、钙化情况、有无声晕、血流信号、似圆度比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表1。

表1 3组一般资料比较 [$n(\%), (\bar{x} \pm s)$]

Table 1 3 groups of general information [$n(\%), (\bar{x} \pm s)$]	恶性组 ($n=65$)	良性组 ($n=57$)	对照组 ($n=60$)	F/χ^2 值	P 值
一般资料					
性别(男/女)	13/52	11/46	12/48	0.012	0.994
年龄(岁)	48.75±6.44	47.82±7.25	48.33±6.80	0.282	0.754
BMI(kg/m ²)	22.49±1.60	21.98±2.02	22.20±1.77	1.242	0.291
血流信号					
> I级	47(72.31)	31(57.39)	26(43.33)	10.953	0.004
≤ I级	18(27.69)	26(45.61)	34(56.67)		
结节边界					
模糊	52(80.00)	27(47.37)	21(35.00)	27.446	<0.001
清晰	13(20.00)	30(52.63)	39(65.00)		
内部回声					
低回声	50(76.92)	28(49.12)	23(38.33)	20.176	<0.001
非低回声	15(23.08)	29(50.88)	37(61.67)		
钙化情况					
微钙化	42(64.62)	22(38.60)	18(30.00)	16.500	<0.001
无微钙化	23(35.38)	35(61.40)	42(70.00)		
声晕					
有	45(69.23)	24(42.11)	19(31.67)	18.926	<0.001
无	20(30.77)	33(57.89)	41(68.33)		
似圆度					
>15	48(73.85)	25(43.86)	17(28.33)	26.892	<0.001
≤15	17(26.15)	32(56.14)	43(71.67)		

2.2 3组HFU参数及血清TPO-Ab比较

3组D、RI、PI、血清TPO-Ab水平比较结果:恶性组>良性组>对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表2。

表2 3组HFU参数及血清TPO-Ab ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 high frequency ultrasound parameters and ti-rads scores of the 3 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	D(cm/s)	RI	PI	TPO-Ab (KIU/L)
恶性组	65	4.01±1.20	0.81±0.24	1.35±0.41	30.05±9.02
良性组	57	2.81±0.84	0.57±0.17	0.94±0.28	21.03±6.31
对照组	60	2.05±0.61	0.32±0.11	0.78±0.24	11.04±3.32
F值		71.359	111.409	52.431	124.786
P值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

2.4 诊断价值

ROC显示, HFU参数D诊断恶性甲状腺结节价值的AUC最大, 依次为RI、TPO-Ab、PI。见表3, 图1。

表3 ROC分析各指标单一诊断价值

Table 3 single diagnostic value of ROC analysis indicators

指标	AUC	95%CI	临界值	敏感度 (%)	特异度 (%)
TPO-Ab	0.752	0.666~0.826	>27.73	61.54	77.19
D	0.816	0.736~0.881	>3.61 cm/s	75.38	78.95
RI	0.748	0.662~0.823	>0.76	55.38	88.72
PI	0.762	0.676~0.834	>1.36	53.85	92.98

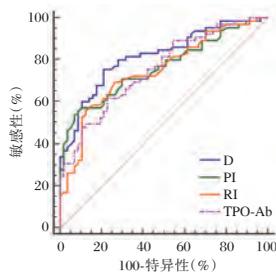


图1 HFU参数单一诊断价值的ROC曲线

Figure 1 ROC curve of single diagnostic value of high frequency ultrasound parameters

2.5 HFU参数、血清TPO-Ab联合诊断价值

HFU参数、血清TPO-Ab联合诊断恶性甲状腺结节, AUC为0.852 (95%CI: 0.736~0.881), 诊断敏感度及特异度分别为73.85%、84.21%。见图2。

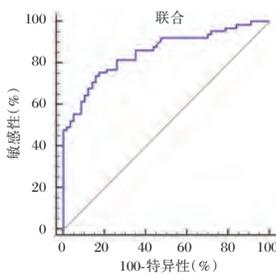


图2 HFU参数、血清TPO-Ab联合诊断价值的ROC曲线

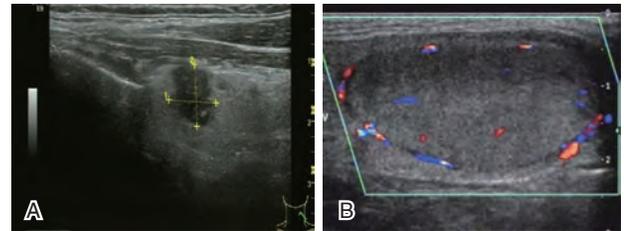
Figure 2 ROC curve of combined diagnosis value of HFU parameter and serum TPO-Ab

2.6 甲状腺结节病理性质的HFU危险因素分析

以HFU参数为自变量, 病理检查结果为因变量, 建立Logistic模型进行回归分析, 结果发现, 微钙化、血流信号、似圆度、声晕是恶性甲状腺结节危险因素 ($P < 0.05$)。见表4。

2.7 典型案例

刘XX, 女, 主诉咽喉部异物感、呼吸困难、声音嘶哑、消瘦, 经HFU检查确诊为恶性结节, 表现为结节内部回声不均匀, 形态不规则, 边界模糊, 内部钙化不足2mm, RI水平在0.7以上, 见图3A; 周XX, 男, 伴有甲状腺结节家族史, 表示能触摸到颈部前方结节, 但无其他不适症状, 经HFU检查确诊为良性结节, 可见结节呈规则状, 内部回声均匀、边界清晰, 无钙化或钙化超过2mm, 见图3B。



注: A为恶性结节HFU表现; B为良性结节HFU表现。

图3 不同结节HFU表现

Figure 3 High frequency ultrasound manifestations of each nodules

3 讨论

HFU是临床广泛应用于诊断甲状腺疾病的影像技术, 可大大提高甲状腺结节检出率^[8], 但由于甲状腺结节超声图像较为复杂, 常常出现同病异像、异病同像等, 故HFU对甲状腺结节性质鉴别价值有限。

史学莲等^[9]观点认为, 血管生成是影响肿瘤生物学行为的重要因素。研究发现^[10], 甲状腺癌变后, 癌细胞分泌的血管活性因子及新生癌细胞的血供需求, 一定程度会诱导主要供血动脉血流动力学发生改变。本研究发现, 甲状腺恶性结节患者甲状腺结节血流动力学紊乱, 与陈萍等^[11]研究基本一致, 分析机制在于: 一方面甲状腺恶性结节血管管径粗细不均、走行迂曲不规则, 加之恶性肿瘤生长迅速、生长过程中无限制性及无序, 进而导致血管受压, 阻力升高; 另一方面, 过量内皮细胞参与肿瘤血管构建, 致使肿瘤血管结构混乱, 同时甲状腺恶性结节血管壁平滑肌层匮乏, 弹性较弱, 肿瘤细胞异常增殖或血管内癌栓形成等, 一定程度均可引发血管腔狭窄或闭塞, 降低结节内血管平均血流速

表4 甲状腺结节病理性质的HFU危险因素分析

Table 4 Analysis of high frequency ultrasound risk factors for pathological properties of thyroid nodules

因变量	β 值	S.E. 值	Wald/ χ^2 值	OR 值	95%CI	P 值
边界	0.804	0.452	3.163	2.234	0.865~5.770	>0.05
回声	0.348	0.207	2.825	1.416	0.584~3.434	>0.05
声晕	2.034	0.761	7.143	7.643	4.598~12.705	<0.001
似圆度	2.105	0.794	7.031	8.210	5.034~13.389	<0.001
微钙化	1.801	0.655	7.559	6.055	3.369~10.881	<0.001
血流信号	1.857	0.706	6.918	6.404	4.121~9.952	<0.001

注:赋值说明:边界清晰=0,模糊=1;非低回声=0,低回声=1;无微钙化=0,微钙化=1;无声晕=0,有声晕=1;似圆度 $\leq 15=0$,似圆度 $>15=1$;血流信号 $\leq I$ 级=0, $> I$ 级=1。

度,增加甲状腺动脉血供,从而引起D、RI、PI值升高。另外,国外研究显示,自身免疫性甲状腺疾病通过炎症可能参与甲状腺癌的发生、发展^[12]。本研究结果显示,血清TPO-Ab水平升高可能增加甲状腺恶性结节发生率,与张瀚月等^[13]研究结果相似。进一步经ROC曲线分析可知,HFU参数、血清TPO-Ab联合诊断恶性甲状腺结节AUC均大于单一诊断,可见二者联合有望成为鉴别诊断甲状腺结节性质的辅助手段,为临床实施对症处理提供参考。

同时,据报道,血管形成与血液供应是肿瘤生长必不可少条件,Ⅲ级血流恶性概率是0级血流的16.146倍^[14]。进一步研究表明,HFU检查过程中若出现微钙化、血流信号 $> I$ 级情况,应高度警惕甲状腺结节恶变风险。也有研究表明^[15],没有声晕及声晕不完整结节恶性概率是具有完整声晕者的10.421倍,与本研究观点不一致,可能受声晕主要表现为环绕结节的低回声带影响,提示HFU检查中需多切面观察声晕是否存在及其完整性。

综上所述,微钙化、血流信号 $> I$ 级、似圆度 >15 、声晕是恶性甲状腺结节发生的独立危险因素,早期采用HFU、血清TPO-Ab联合检查,明确甲状腺结节血流动力学变化,有助于提高甲状腺结节性质诊断价值。

参考文献

[1] 韩英,赵博文,李世岩,等. BRAFV600E检测和Bethesda甲状腺细胞病理报告系统在TIRADS 4-5类甲状腺结节良恶性诊断中的应用[J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2017, 52(9):686-691.

[2] 洪文斌,胡玟韡. NLR、PLR在甲状腺良恶性结节及自身免疫性甲状腺炎诊断中的应用价值[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(5):643-646+655.

[3] 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.

[4] Chi J, Walia E, Babyn P, et al. Thyroid Nodule Classifica-

tion in Ultrasound Images by Fine-Tuning Deep Convolutional Neural Network[J]. J Digit Imaging, 2017, 30(3):477-486.

[5] Cerit M, Yücel C, Göçün PU, et al. Ultrasound-guided thyroid nodule fine-needle biopsies-comparison of sample adequacy with different sampling techniques, different needle sizes, and with/without onsite cytological analysis [J]. Endokrynol Pol, 2015, 66(4):295-300.

[6] 王淑文,王燕翔,张硕,等. 甲状腺癌超声血管化指数血流指数与肿瘤恶性程度的相关性分析[J]. 安徽医学, 2016, 38(10):813-815.

[7] 程田,唐振林. TK1、TPOAb和TgAb对甲状腺结节良恶性的诊断价值[J]. 实用医学杂志, 2018, 34(22):110-112.

[8] Hodax JK, Bowerman K, Quintos JB. Benign thyroid nodules in pediatric patients: determining best practices for repeat ultrasound evaluations[J]. J Ped End Met, 2019, 32(8):895-901.

[9] 史学莲,时高峰. 磁共振动态增强扫描在肿瘤诊断与治疗中的应用现状与展望[J]. 中华核医学与分子影像杂志, 2018, 38(3):210-213.

[10] 祝青,杨世艳,辛超,等. 甲状腺癌患者超声弹性成像参数应变率比值与癌细胞生长及血管新生的关系[J]. 中国超声医学杂志, 2019, 35(8):676-679.

[11] 陈萍,朱连华,方可敬,等. 超声造影结合定量分析技术在鉴别诊断甲状腺良恶性结节中的应用价值[J]. 第三军医大学学报, 2019, 41(6):587-593.

[12] Hwang S, Shin DY, Kim EK, et al. Focal Lymphocytic Thyroiditis Nodules Share the Features of Papillary Thyroid Cancer on Ultrasound[J]. Yonsei Med J, 2015, 56(5):1338-1344.

[13] 张瀚月,段文冰,张璐璐,等. 血清促甲状腺激素和甲状腺过氧化物酶抗体及甲状腺球蛋白抗体在良恶性甲状腺结节鉴别诊断中的临床意义[J]. 中国医药, 2019, 14(7):999-1003.

[14] Qiao J, Li C, Zhang Y, et al. HBME-1 expression in differentiated thyroid carcinoma and its correlation with the ultrasonic manifestation of thyroid[J]. Oncol Lett, 2017, 14(6):6505-6510.

[15] 蒋小燕,朱家宝,陶林波,等. 彩色多普勒超声联合血清P53、VEGF、Galectin-3对甲状腺结节的诊断价值[J]. 中国超声医学杂志, 2019, 35(10):873-876.

·论 著·

ACE 基因 rs4344 多态性及环境因素与海口市汉族人群脑梗死关联研究

侯丹¹ 余丹^{1*} 杨国帅¹ 周锋²

[摘要] 目的 探讨 ACE 基因 rs4344 多态性与脑梗死发病风险。方法 纳入急性脑梗死患者 400 例,非卒中对照人群 399 例,采用 MassARRAY 分子量阵列技术对 rs4344 分型,利用 SPSS 软件分析等位基因频率和五种遗传模型下脑梗死发病风险,利用 MDR 软件分析基因-环境交互作用。结果 调整年龄和性别,在总人群、高血压人群和正常血压人群分析 rs4344 变异在等位基因及五种遗传模型下与脑梗死风险差异均无统计学意义(均 $P>0.05$)。基因-环境交互作用分析发现 rs4344、年龄、吸烟和收缩压组成脑梗死风险的最佳模型($\chi^2=6.1877$; $P<0.05$)。结论 ACE 基因 rs4344 多态性与脑梗死风险无直接关联,但通过基因-环境交互作用增加脑梗死发病风险。

[关键词] 脑梗死; ACE 基因; 单核苷酸多态性; 基因-环境交互作用

Association of ACE gene rs4344 polymorphism and gene - environm - ent interaction with the risk of cerebral infarction in Han population in Haikou city

HOU Dan¹, YU Dan^{1*}, YANG Guoshuai¹, ZHOU Feng²

(1. Department of Neurology, Central South University Xiangya School of Medicine Affiliated Haikou Hospital. Haikou, Hainan, China, 570208; 2. Department of Neurology, First People's Hospital of Foshan. Foshan, Guangdong, China, 528000)

[ABSTRACT] Objective To investigate the association of ischemic stroke risk with rs4344 polymorphism of ACE gene. Methods A total of 400 patients with acute ischemic stroke and 399 normal controls were collected in the study. MassARRAY arrays were used to genotyping rs4344. Allele frequencies and ischemic stroke risk in five genetic models were analyzed by SPSS software. Gene-environment interaction was analyzed by multifactor dimensionality reduction. Results After adjusted for age and gender confounding factors, there was no statistical difference between rs4344 variant and ischemic stroke risk neither in general population, hypertensive population nor normal blood pressure population under allele genotype and five genetic models. Gene-environment interaction analysis showed that rs4344, age, smoking, and systolic blood pressure constituted the best model for ischemic stroke risk ($\chi^2=6.1877$; $P<0.05$). Conclusion The rs4344 polymorphism of ACE gene is not directly related to ischemic stroke risk; however, it increases ischemic stroke risk through gene-environment interaction.

[KEY WORDS] Ischemic stroke; ACE gene; Single nucleotide polymorphism; Gene-environment interaction

脑梗死是多基因遗传且受多种环境因素影响的复杂疾病。血管紧张素转换酶(angiotensin converting enzyme, ACE)抑制剂能有效预防脑梗死^[1],改善脑梗死后神经症状严重程度评分,减少

脑梗死体积^[2],降低脑梗死复发率和死亡率^[3]。5种遗传模型分别为共显性模型、显性模型、隐性模型、超显性模型和加性模型。rs4344的两个等位基因(A, G),可能出现三种基因型(AA, AG, GG),产生

基金项目:海南省国际科技合作专项(GJXM201107);广东省医学科研基金(B2019062)

作者单位:1. 中南大学湘雅医学院附属海口医院神经内科,海南,海口 570208

2. 佛山市第一人民医院神经内科,广东,佛山 528000

*通信作者:余丹, E-mail: yudanyuyue@163.com

不同的遗传模型。本研究采用病例-对照研究方法,探讨 rs4344 单核苷酸多态性与中国海口市汉族人群脑梗死发病风险的关系。

1 材料和方法

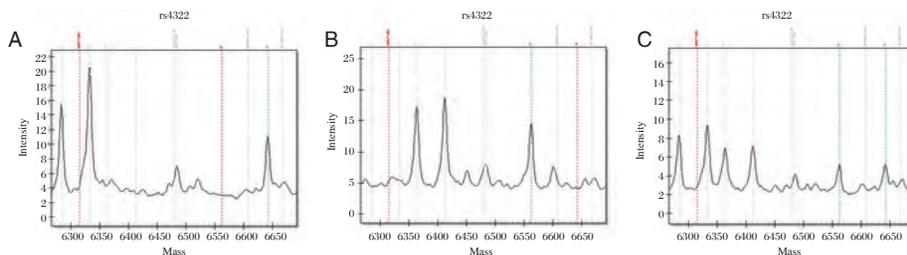
1.1 研究对象和观察指标

从2016年1月至2017年3月,连续收集本院神经内科住院的急性脑梗死患者400例。入组标准:长期居住在当地的汉族人群,首次发病,病程在1周内;颅脑影像学检查符合脑梗死诊断,住院期间完善血压、血糖、甘油血脂、胆固醇、肝肾功能等检测;记录年龄、性别、身高、体重;急性卒中Org10172治疗试验(trial of org10172 in acute stroke treatment,

TOAST)分型符合大动脉粥样硬化性脑梗死。排除标准:短暂性脑缺血发作,脑栓塞,心律失常,脑肿瘤,癫痫发作,伴随急性冠脉综合征、肝肾疾病、血液系统疾病等。非卒中对照组人群来自于同时期同一所医院健康体检者399例。本研究得到海口市人民医院伦理委员会审查批准,所有受试者均签订知情同意书。

1.2 引物合成和基因分型

参照文献^[4]对ACE基因rs4344位点进行引物及单碱基延伸引物设计。采用MassARRAYiPLEX平台(美国,Sequenom公司)进行基因分型。使用Sequenom Typer 4.0软件计算分析物在光谱图中出现峰的正确位置,读出分型结果。见图1。



注:A为AA基因型,B为GG基因型,C为GA基因型。

图1 ACE基因rs4344位点分型图

Figure 1 Genotype of rs4344 for ACE gene

1.3 统计分析

采用SPSS 17.0软件进行统计分析。以对照组最小等位基因计算相对风险。采用卡方检验或精确Fisher法计算对照组哈迪-温伯格平衡(hardy-weinberg equilibrium, HWE),采用多因子降维法(multi-factor dimensionality reduction, MDR)软件分析基因-环境交互作用。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 两组人群总体情况比较

两组性别比例、BMI>24 kg/m²者比例、高脂血症、糖尿病比例等差异无统计学意义($P > 0.05$);两组在年龄、吸烟、饮酒、高血压等差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表1。

表1 本研究人群危险因素分布情况 [n (%)]

Table 1 Clinical characteristics of the study participants [n (%)]

n	男性	年龄,岁	BMI>24 kg/m ²	吸烟	饮酒	高血压	高脂血症	糖尿病	
病例组	400	263(65.8)	66.83±11.64	209(52.3)	131(32.8)	69(17.3)	275(68.8)	135(33.8)	76(19.0)
对照组	399	246(61.7)	48.65±11.06	181(45.4)	55(13.8)	42(10.5)	121(30.3)	140(35.1)	63(15.8)
P值		>0.05	<0.05	>0.05	<0.05	<0.05	<0.05	>0.05	>0.05

2.2 总人群及亚组中rs4344 SNP与脑梗死关联分析

在等位基因模型下,最小等位频率(minor allele frequency, MAF)在脑梗死和对照组人群之间没有显著性差异,无统计学意义($P > 0.05$)。对照组人群HWE检验的 $P = 0.67$ (见表2)校正年龄和性别后,rs4344位点在五种遗传模型下与脑梗死发病风险均无统计学意义($P > 0.05$)。见表3。

在高血压亚组中,对照组HWE的 $P = 0.9$;校正年龄和性别后,rs4344位点在五种遗传模型下与脑梗死发病风险均无统计学意义($P > 0.05$)(见表4)。在非高血压亚组中,对照组HWE检验的 $P = 0.56$;校正年龄和性别后,rs4344位点在五种遗传模型下与脑梗死发病风险均无统计学意义($P > 0.05$)。见表5。

表2 基因型频数及哈迪-温伯格平衡检验

Table 2 Genotype frequency and Hardy-Weinberg Equilibrium Test in this study

	AA 基因型		GA 基因型		GG 基因型		A 等位基因		G 等位基因		OR	95%CI	P 值	P-HWE 对照
	病例	对照	病例	对照	病例	对照	病例	对照	病例	对照				
总人群	157	148	184	190	59	61	498	486	302	312	1.06	0.86~1.29	0.58	0.67
高血压	103	39	130	59	42	23	336	137	214	105	1.20	0.88~1.63	0.24	0.9
非高血压	54	109	54	131	17	38	162	349	88	207	1.09	0.79~1.49	0.58	0.56

MAF:最小等位基因频率;HWE:哈迪温伯格检验。

表3 总体人群 rs4344 多态性与脑梗死发病风险(校正年龄和性别)

Table 3 Rs4344 polymorphism and the risk of ischemic stroke in general population (adjusted for age and sex)

遗传模型	基因型	病例组	对照组	OR	95%CI	AIC	BIC	P 值
共显性	AA	157(39.2)	148(37.1)	1.00		741.2	764.7	0.55
	GA	184(46.0)	190(47.6)	1.23	0.83~1.82			
	GG	59(14.8)	61(15.3)	1.25	0.72~2.18			
显性	AA	157(39.2)	148(37.1)	1.00		739.2	758	0.27
	GA-GG	243(60.8)	251(62.9)	1.23	0.85~1.79			
隐性	AA-GA	341(85.2)	338(84.7)	1.00	0.67~1.86	740.3	759	0.68
	GG	59(14.8)	61(15.3)	1.12				
超显性	AA-GG	216(54.0)	209(52.4)	1.00		739.9	758.6	0.44
	GA	184(46.0)	190(47.6)	1.15	0.80~1.66			
加性	-	-	-	1.14	0.88~1.49	739.5	758.2	0.32

OR:相对优势比;CI:置信区间;AIC: Akaike 信息量准则;BIC: Bayesian 信息量准则。

表4 高血压人群 rs4344 多态性与脑梗死发病风险(校正年龄和性别)

Table 4 Rs4344 polymorphism and the risk of ischemic stroke in hypertensive population (adjusted for age and sex)

遗传模型	基因型	病例组	对照组	OR	95%CI	AIC	BIC	P 值
共显性	AA	103(37.5)	39(32.2)	1		391.1	411	0.8
	GA	130(47.3)	59(48.8)	1.01	0.58~1.76			
	GG	42(15.3)	23(19.0)	0.80	0.38~1.69			
显性	AA	103(37.5)	39(32.2)	1.00		389.5	405.5	0.86
	GA-GG	172(62.5)	82(67.8)	0.95	0.56~1.61			
隐性	AA-GA	233(84.7)	98(81.0)	1.00		389.1	405.0	0.51
	GG	42(15.3)	23(19.0)	0.80	0.41~1.55			
超显性	AA-GG	145(52.7)	62(51.2)	1.00		389.5	405.4	0.74
	GA	130(47.3)	59(48.8)	1.09	0.66~1.78			
加性	-	-	-	0.92	0.64~1.32	389.3	405.3	0.63

OR:相对优势比;CI:置信区间;AIC: Akaike 信息量准则;BIC: Bayesian 信息量准则。

表5 非高血压人群 rs4344 多态性与脑梗死发病风险(校正年龄和性别)

Table 5 Rs4344 polymorphism and the risk of ischemic stroke in non-hypertensive population (adjusted for age and sex)

遗传模型	基因型	病例组	对照组	OR	95%CI	AIC	BIC	P 值
共显性	AA	54(43.2)	109(39.2)	1.00		322.8	342.8	0.41
	GA	54(43.2)	131(47.1)	1.26	0.68~2.32			
	GG	17(13.6)	38(13.7)	1.78	0.75~4.24			
显性	AA	54(43.2)	109(39.2)	1.00		321.4	337.4	0.28
	GA-GG	71(56.8)	169(60.8)	1.37	0.77~2.43			
隐性	AA-GA	108(86.4)	240(86.3)	1.00		321.3	337.3	0.26
	GG	17(13.6)	38(13.7)	1.59	0.71~3.53			
超显性	AA-GG	71(56.8)	147(52.9)	1.00		322.5	338.5	0.77
	GA	54(43.2)	131(47.1)	1.09	0.62~1.92			
加性	-	-	-	1.32	0.88~1.98	320.8	336.8	0.19

OR:相对优势比;CI:置信区间;AIC: Akaike 信息量准则;BIC: Bayesian 信息量准则。

2.3 总人群中基因-环境交互作用分析

基因-环境交互作用的最佳模型组合(检验精度>0.5的模型),选择交叉验证一致性最高、检验

准确度最大者作为最佳模型。在总人群中,构成最佳模型的因子包括 rs4344、年龄、收缩压和吸烟。见表6。

表6 多因子降维法分析基因-环境交互作用对脑梗死的影响

Table 6 Multifactor dimensionality reduction analysis of gene-environment interaction on ischemic stroke

模型	训练准确度	检验准确度	交叉验证一致性	χ^2 值	P值
年龄,收缩压	0.8283	0.7609	6/10	21.7691	<0.0001
rs4344,年龄,收缩压	0.8626	0.7046	6/10	13.4024	0.0003
rs4344,年龄,收缩压,吸烟	0.9016	0.7208	10/10	16.1877	<0.0001
rs4344,年龄,收缩压,吸烟,舒张压	0.9305	0.6481	4/10	7.921	0.0049
rs4344,年龄,收缩压,吸烟,舒张压,BMI	0.9539	0.6605	9/10	10.5006	0.0012
rs4344,年龄,收缩压,吸烟,舒张压,BMI,性别	0.9672	0.6267	9/10	8.1967	0.0042
rs4344,年龄,收缩压,吸烟,舒张压,BMI,性别,饮酒	0.9728	0.6166	8/10	7.6478	0.0057
rs4344,年龄,收缩压,吸烟,舒张压,BMI,性别,饮酒,LDL	0.9771	0.6116	10/10	7.5385	0.006
rs4344,年龄,收缩压,吸烟,舒张压,BMI,性别,饮酒,LDL,TC	0.9783	0.6016	10/10	6.5935	0.0102
rs4344,年龄,收缩压,吸烟,舒张压,BMI,性别,饮酒,LDL,TC,TG	0.9783	0.5953	10/10	6.0201	0.0141

LDL:低密度脂蛋白;TC:总胆固醇;TG:甘油三酯。

3 讨论

已有研究发现ACE基因影响脑梗死发病^[6-8]。在基因-环境交互作用分析中,rs4344、年龄、收缩压和吸烟构成最佳模型,显著增加脑梗死发病风险。

肾素-血管紧张素-醛固酮系统(renin-angiotensin-aldosterone system, RAAS)研究最多的SNP位于ACE基因DNA内含子一段287个碱基序列的插入或缺失。该SNP影响血浆ACE水平,并调节ACE酶活性^[4]。研究^[9]表明,ACE基因多个SNP与高血压的发生及ACE酶表达量升高密切相关。血管紧张素(Angiotensin, Ang)II调节血管收缩、水盐潴留并升高血压^[10],以及对炎症、血栓形成和斑块破裂有影响。ACE是一种膜前蛋白,在细胞外表面具有催化结构域,是肾素-血管紧张素系统(renin-angiotensin system, RAS)的关键酶,在动脉粥样硬化和脑梗死中起重要作用。ACE基因rs4344位点突变,导致ACE、Ang II水平升高,促进水钠潴留,从而升高血压并促进动脉粥样硬化,增加脑梗死发病风险;促进急性脑梗死患者的脑水肿和氧化应激,从而降低皮层可塑性和延缓其恢复进程,影响脑梗死患者的功能结局^[11]。

Assareh等^[8]研究表明ACE基因rs4362位点SNP与非高血压人群脑白质损伤显著相关。ACE基因多个位点的多态性与广西壮族人群脑梗死^[7]及英国白种人群腔隙性脑梗死或脑白质疏松症^[8]中均无相关性,这可能是脑梗死不同亚型的病因不完全一

致。张振昶等^[12]发现兰州市汉族人群D/D型携带者脑梗死风险分别是I/D型与I/I型携带者的2.38倍和2.79倍。rs4344位点G等位基因参与构成的单倍体型与墨西哥白种人群高血压风险密切相关^[13]。至今尚未见中国人rs4344基因多态性与脑梗死关联研究的报道。本研究只纳入大动脉粥样硬化性脑梗死,使研究人群的血管危险因素相近,以便于更精确地判断遗传背景对脑梗死的影响,但是,rs4344位点多态性在本研究人群中与脑梗死无关联。与国外研究^[14]相比,其差异的可能原因是由于其样本量不够大,或群体间遗传背景的差异,以及使用不同DNA提取技术所致选择偏倚。本研究说明脑梗死是一种多因素疾病,其中遗传和环境因素都起着重要作用,其作用机制有待深入研究。

本研究有一定局限性,本研究可能存在特定地域人群选择的偏倚,研究对象限定在长期居住海口市的汉族人群,全面的环境因素分析有待于进一步研究,包括心脏病、糖尿病等因素和地域的影响。

综上所述,本研究发现中国海口市汉族人群rs4344基因多态性与脑梗死患病风险无直接相关性,但是,rs4344与年龄、收缩压和吸烟通过基因-环境交互作用,增加脑梗死的发病风险。

参考文献

- [1] Iyengar AJ, Winlaw DS, Galati JC, et al. The extracardiac conduit fontan procedure in Australia and New Zealand: hypoplastic left heart syndrome predicts worse early and late outcomes[J]. Eur J Cardiothorac Surg, (下转第1183页)

· 论 著 ·

肺癌患者手术前后血清 Lp-PLA2、CYfra21-1、VEGF-C 变化及临床意义

茹玉航 王林 宋焕*

[摘要] 目的 探究肺癌患者手术前后血清脂蛋白相关磷脂酶 A2(Lp-PLA2)、细胞角蛋白 19 片段(CYfra21-1)、血管内皮生长因子 C(VEGF-C)变化及临床意义。方法 选取本院 2016 年 1 月至 2019 年 1 月肺癌患者 106 例作为观察组,另选取同期健康体检者 52 例作为对照组,观察组均行手术治疗,观察组手术前后血清 Lp-PLA2、CYfra21-1、VEGF-C 水平。随访 1 年,统计预后情况,比较不同预后患者临床资料及手术前后血清 Lp-PLA2、CYfra21-1、VEGF-C 水平,采用 COX 回归分析各指标与预后的关系,以 Kaplan-Meier 曲线进行生存分析。结果 观察组术前血清 Lp-PLA2、CYfra21-1、VEGF-C 水平高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);术后 7、30 d 血清 Lp-PLA2、CYfra21-1、VEGF-C 低于术前,且呈逐渐降低趋势,且低于死亡患者,差异有统计学意义($P<0.05$);生存患者与死亡患者临床分期、分化程度、淋巴结转移、肿瘤管侵犯、淋巴管侵犯相比,差异有统计学意义($P<0.05$);COX 回归分析,术后 7、30 d 血清 Lp-PLA2、CYfra21-1、VEGF-C 与预后显著相关($P<0.05$);Kaplan-Meier 曲线分析,术后 7、30 d 血清 Lp-PLA2、CYfra21-1、VEGF-C 高水平患者 1 年生存率低于低水平患者($P<0.05$)。结论 血清 Lp-PLA2、CYfra21-1、VEGF-C 在肺癌患者术前呈高水平状态,术后呈逐渐降低趋势,与预后密切相关,有助于为临床预测生存状况提供可靠信息。

[关键词] 肺癌;手术;Lp-PLA2;CYfra21-1;VEGF-C;生存状况

Changes of serum Lp-PLA2, CYfra21-1, VEGF-C before and after surgery in patients with lung cancer and their clinical significance

RU Yuhang, WANG Lin, SONG Huan*

(Department of Thoracic Surgery, Bozhou People's Hospital, Bozhou, Anhui, China, 236800)

[ABSTRACT] Objective To investigate the changes and clinical significance of serum lipoprotein-related phospholipase A2 (Lp-PLA2), cytokeratin 19 fragment (CYfra21-1), and vascular endothelial growth factor C (VEGF-C) before and after surgery in patients with lung cancer. Methods 106 patients with lung cancer from January 2016 to January 2019 in our hospital were selected as the observation group, and 52 healthy people in the same period were selected as the control group. The observation group was treated with surgery. The levels of serum Lp-PLA2, CYfra21-1 and VEGF-C were compared between the two groups and the observation group before and after surgery. Follow-up for 1 year, the prognosis was counted, the clinical data of patients with different prognosis and serum Lp-PLA2, CYfra21-1, VEGF-C levels before and after surgery were compared. COX regression was used to analyze the relationship between each indicator and prognosis, and Kaplan-Meier curve was used for survival analysis. Results The preoperative serum Lp-PLA2, CYfra21-1, VEGF-C levels in the observation group were higher than those in the control group ($P<0.05$). Serum Lp-PLA2, CYfra21-1, and VEGF-C at 7 and 30 days after surgery were lower than those before

基金项目:安徽省自然科学基金资助项目(1508085MA96)

作者单位:亳州市人民医院胸外科,安徽,亳州 236800

*通信作者:宋焕, E-mail:15805673829@163.com

surgery, and showed a gradually decreasing trend, and were lower than those of dead patients ($P<0.05$). There were statistically significant differences in clinical stage, degree of differentiation, lymph node metastasis, tumor vascular invasion, and lymphatic invasion between surviving patients and dead patients ($P<0.05$). COX regression analysis showed that serum Lp-PLA2, CYfra21-1, and VEGF-C were significantly correlated with prognosis at 7 and 30 days after surgery ($P<0.05$). Kaplan-Meier curve analysis showed that the 1-year survival rate of patients with high levels of serum Lp-PLA2, CYfra21-1, and VEGF-C was lower than that of patients with low levels at 7 and 30 days after surgery ($P<0.05$). **Conclusion** Serum Lp-PLA2, CYfra21-1, and VEGF-C are high levels in lung cancer patients before surgery, and gradually decrease after surgery. They are closely related to the prognosis and help provide reliable information for clinical prediction of survival.

[KEY WORDS] Lung cancer; Surgery; Lp-PLA2; CYfra21-1; VEGF-C; Survival status

目前,手术是治疗肺癌主要方式,但患者预后及生存期差别明显^[1]。实践证实,肿瘤相关因子与肺癌患者预后联系紧密^[2-3]。脂蛋白相关磷脂酶 A2(Lipoprotein associated phospholipase A2, Lp-PLA2)属于具有血管特异性的炎症标志物,是恶性肿瘤发展的重要参与者^[4]。细胞角蛋白 19 片段(Cytokeratin fragment 21-1, CYfra21-1)与多种恶性肿瘤发生发展密切相关^[5]。血管内皮生长因子 C(Vascular endothelial growth factor C, VEGF-C)是淋巴管生长因子,可加快肿瘤新生血管形成,促进细胞侵袭、转移^[6]。本研究分析肺癌患者手术前后血清 Lp-PLA2、CYfra21-1、VEGF-C 变化及临床意义。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取本院 2016 年 1 月至 2019 年 1 月肺癌患者 106 例作为观察组,男性 75 例,女性 31 例,年龄 38~72 岁,平均年龄(61.17±4.03)岁。另选取同期健康体检者 52 例作为对照组,男性 37 例,女性 15 例,年龄 40~70 岁,平均年龄(60.56±4.28)岁。两组年龄、性别等一般资料均衡可比($P>0.05$)。且本研究经本院伦理委员会审批通过。

纳入标准:①观察组均首次经病理检查证实为肺癌,均属于非小细胞肺癌;②临床分期为 I~III A 期;预计生存期>6 个月;③均具备手术适应证;④对照组体检各项指标检查显示正常;⑤两组均知情本研究,自愿签订知情同意书。排除标准:①合并重要脏器转移者;②术前伴有感染性疾病者;③术后出现严重并发症者;④存在免疫功能缺陷、肝炎、糖尿病等合并症者;⑤无法耐受手术或存在手术禁忌者;⑥伴有其他恶性肿瘤者。

1.2 方法

手术方法:观察组均根据患者肿瘤部位、临床分期、病变程度等选择合理术式实施手术治疗。术后给予常规抗感染处理。

检测方法:于观察组术前 1 d、术后 7、30 d 及对照组入院当日清晨采集空腹静脉血 4 mL,离心处理,离心速率为 3 000 r/min,离心时间为 10 min,取上清液,保存于-20℃恒温冰箱内,待检。采用酶联免疫吸附法检测血清 Lp-PLA2、CYfra21-1、VEGF-C 水平,试剂盒购自美国雅培公司,操作符合规范。

1.3 观察指标

观察组术前与对照组血清 Lp-PLA2、CYfra21-1、VEGF-C 水平。观察组手术前后血清 Lp-PLA2、CYfra21-1、VEGF-C 水平。不同预后患者临床资料。不同预后患者手术前后血清 Lp-PLA2、CYfra21-1、VEGF-C 水平。术后 7、30 d 血清 Lp-PLA2、CYfra21-1、VEGF-C 与预后的关系。生存分析。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件进行数据处理,计量资料采用($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用独立样本 t 检验对比,多组间比较采用单因素方差分析,计数资料以 $n(\%)$ 表示, χ^2 检验,COX 回归分析各指标与预后的关系,Kaplan-Meier 曲线进行生存分析,采用 Log-rank 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 观察组术前与对照组血清 Lp-PLA2、CYfra21-1、VEGF-C 水平比较

观察组术前血清 Lp-PLA2、CYfra21-1、VEGF-C 水平高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 1。

表1 两组术前血清 Lp-PLA2、CYfra21-1、VEGF-C 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of serum Lp-PLA2, CYFRA21-1 and VEGF-C levels between 2 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Lp-PLA2 (ng/mL)	CYfra21-1 (μg/L)	VEGF-C (ng/mL)
观察组	106	158.43±31.16	7.51±1.63	35.09±7.36
对照组	52	92.27±20.04	1.88±0.49	9.42±2.87
t 值		13.949	24.338	24.231
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

2.2 观察组手术前后血清 Lp-PLA2、CYfra21-1、VEGF-C 水平比较

术后 7、30 d 血清 Lp-PLA2、CYfra21-1、VEGF-C 低于术前,且呈逐渐降低趋势,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见表 2。

表2 观察组手术前后血清 Lp-PLA2、CYfra21-1、VEGF-C 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of serum Lp-PLA2, CYFRA21-1 and VEGF-C levels before and after operation in the observation group ($\bar{x} \pm s$)

时间	n	Lp-PLA2 (ng/mL)	CYfra21-1 (μg/L)	VEGF-C (ng/mL)
术前	106	158.43±31.16	7.51±1.63	35.09±7.36
术后 7 d	106	126.19±22.47	5.08±1.24	26.81±5.63
术后 30 d	106	98.37±17.75	3.10±0.72	17.05±3.29
F 值		160.416	329.201	268.182
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

2.3 不同预后患者的临床资料

随访 1 年,脱落 9 例。生存患者与死亡患者临床分期、分化程度、淋巴结转移、肿瘤脉管侵犯、淋巴管侵犯相比,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见表 3。

2.4 COX 回归分析

COX 回归分析,术后 7、30 d 血清 Lp-PLA2、CYfra21-1、VEGF-C 与预后显著相关 ($P < 0.05$),见表 4。

2.5 生存分析

根据术后 7、30 d 血清 Lp-PLA2、CYfra21-1、VEGF-C 水平平均数分为高水平、低水平患者。Kaplan-Meier 曲线分析,术后 7、30 d 血清 Lp-PLA2 ($\chi^2=5.603、7.063$)、CYfra21-1 ($\chi^2=4.513、11.365$)、VEGF-C ($\chi^2=5.189、9.808$) 高水平患者 1 年生存率低于低水平患者 ($P < 0.05$),见图 1。

表3 不同预后患者的临床资料比较 [$n(\%)$]

Table 3 Comparison of clinical data of patients with different prognosis [$n(\%)$]

资料	n	生存患者 (n=70)	死亡患者 (n=27)	χ^2 值	P 值
年龄(岁)					
≥60	61	42(60.00)	19(70.37)	0.898	0.343
<60	36	28(40.00)	8(29.63)		
性别				0.068	0.794
男	70	50(71.43)	20(74.07)		
女	27	20(28.57)	7(25.93)		
病理类型				0.437	0.662
鳞状细胞癌	49	36(51.43)	13(48.15)		
腺癌	37	27(38.57)	10(37.04)		
腺鳞癌	8	5(7.14)	3(11.11)		
粘液表皮样癌	3	2(2.86)	1(3.70)		
肿瘤部位				0.072	0.789
中央型	38	28(40.00)	10(37.04)		
周围型	59	42(60.00)	17(62.96)		
肿瘤直径(cm)				2.705	0.100
<5	63	42(60.00)	21(77.78)		
≥5	34	28(40.00)	6(22.22)		
手术方式				0.384	0.701
肺叶切除术	34	25(35.71)	9(33.33)		
肺楔形切除术	41	30(42.86)	11(40.74)		
亚肺叶切除术	22	15(21.43)	7(25.93)		
临床分期				3.200	0.001
I 期	15	13(18.57)	2(7.41)		
II 期	56	46(65.71)	10(37.04)		
III A 期	26	11(15.71)	15(55.56)		
分化程度				9.768	0.002
中高分化	60	50(71.43)	10(37.04)		
低分化	37	20(28.57)	17(62.96)		
淋巴结转移				15.846	<0.001
有	34	9(12.86)	25(92.59)		
无	63	61(87.14)	2(7.41)		
肿瘤脉管侵犯				41.013	<0.001
有	18	2(2.86)	16(59.26)		
无	79	68(97.14)	11(40.74)		
肿瘤淋巴管侵犯				56.149	<0.001
有	36	10(14.29)	26(96.30)		
无	61	60(85.71)	1(3.70)		
合并心血管疾病				0.006	0.937
有	13	9(12.86)	4(14.81)		
无	84	61(87.14)	23(85.19)		

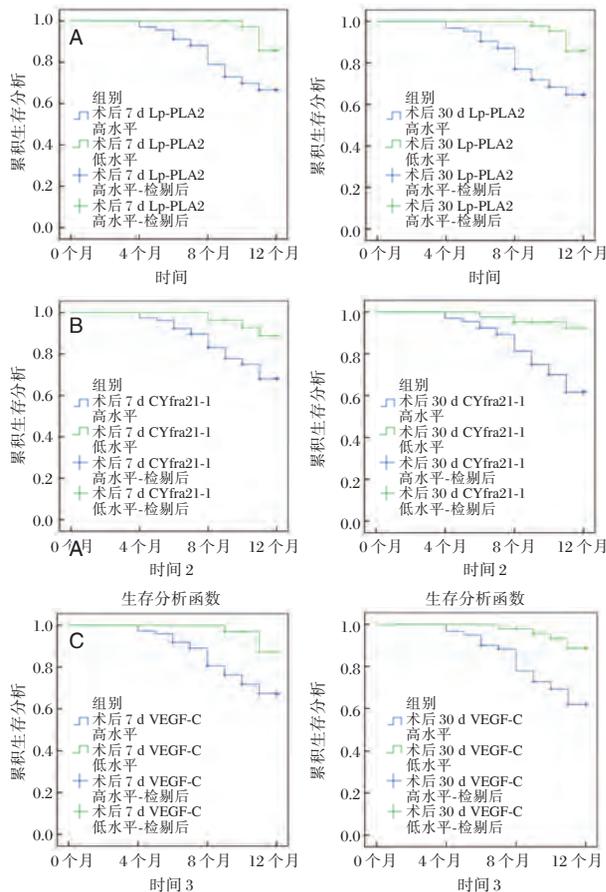
3 讨论

据相关报道显示, I A 期肺癌患者 5 年生存率在 71%~77% 左右, I B 期患者约为 60%, 对患者生命健康造成极大威胁^[7]。目前, 如何预测部分肺癌患者术后预后较差, 进而给予积极治疗提高生存率成为临床面临的重要课题。研究表明, 肿瘤相关因子在肺癌患者手术前后会发生明显改变, 可预测预后情况^[8]。

表4 COX 回归分析

Table 4 Cox regression analysis

因变量	自变量	回归系数	标准误差	Z值	P值	95%CI
预后	术后7d血清Lp-PLA2	0.537	0.037	6.158	<0.001	1.783~3.462
	术后7d血清CYfra21-1	0.584	0.040	7.034	<0.001	2.569~6.114
	术后7d血清VEGF-C	0.649	0.029	7.885	<0.001	3.025~8.297
	术后30d血清Lp-PLA2	0.611	0.031	8.009	<0.001	2.127~5.842
	术后30d血清CYfra21-1	0.650	0.026	8.013	<0.001	3.756~9.108
	术后30d血清VEGF-C	0.806	0.017	8.565	<0.001	4.103~12.049



注:A:血清Lp-PLA2生存分析;B:血清CYfra21-1生存分析;C:血清VEGF-C生存分析

图1 生存分析

Figure 1 survival analysis

Lp-PLA2属于特异性纤溶标志物,在健康人群体内含量较低。杨帆等^[9]观点认为,血浆Lp-PLA2水平显著升高是肺癌患者的重要致病因素。本研究结果,在病变得以解除后逐渐恢复。进一步研究发现,血清Lp-PLA2与预后显著相关,且有助于预测生存状况。推测原因,肺癌发生发展过程中,机体内大量释放巨噬细胞、中性粒细胞等多种炎性细胞因子,从而刺激Lp-PLA2释放,促使其含量异常升高。手术切除癌变组织后,病情得到控制,

炎性细胞因子释放减少,故血清Lp-PLA2水平降低。故临床检测手术前后血清Lp-PLA2水平变化能为预测预后提供有效信息。

VEGF-C是特异性淋巴管生长因子,可在细胞外结合其受体,促进酪氨酸磷酸化作用,进而产生一系列生物学效应^[10]。临床报道证实,VEGF-C在食管癌、胃癌、宫颈癌等恶性肿瘤发生中发挥重要作用,与肿瘤恶性程度密切相关^[11]。本研究数据提示VEGF-C与肺癌发生、病情进展或控制联系紧密。本研究还发现,血清VEGF-C与预后密切相关。可见VEGF-C手术前后水平变化情况对预后有明显影响,可作为预测预后及生存状况的重要因素。分析原因,VEGF-C与淋巴管上皮具有较高亲和力,可选择性地诱导淋巴管新生、淋巴上皮增殖,在淋巴管丰富区域呈现高含量现象,还可加快淋巴管内皮细胞有丝分裂,参与肿瘤侵袭、转移及间质液引流,从而对肿瘤发生产生重要影响^[12]。

CYfra21-1是形成上皮细胞的结构蛋白,主要由I类、II类角蛋白组成,通常分布于正常层状组织表面或鳞状上皮组织,属于临床常见恶性肿瘤标志物^[13]。本研究表明,肺癌患者术前血清CYfra21-1水平显著高于健康人群,主要是由于恶性病变发生后,大量CYfra21-1会被激活的蛋白酶降解、释放进入血液,并特异性结合单克隆抗体,故在肺癌患者血清内呈高水平状态^[14]。高洋等^[15]学者报道显示,血清CYfra21-1含量在肺癌患者术后明显下降。本研究则进一步证实,血清CYfra21-1水平与预后显著相关。故术后采取合理抗肿瘤治疗降低并维持血清CYfra21-1水平稳定可能是提高生存率的重要途径。

综上所述,血清Lp-PLA2、CYfra21-1、VEGF-C在肺癌患者术前呈高水平状态,术后呈逐渐降低趋势,与预后密切相关,有助于为临床预测生存状况提供可靠信息。但本研究纳入样本量少,需作进一步分析与探究,以获取更可靠数据支持。

参考文献

- [1] Mazzone PJ, Silvestri GA, Patel S, et al. Screening for Lung Cancer: CHEST Guideline and Expert Panel Report [J]. *Chest*, 2018, 153(4):954-985.
- [2] 田翠孟,张旭,夏广荣,等. pN₂-ⅢA期非小细胞肺癌患者的术后生存状况和预后因素分析[J]. *临床肿瘤学杂志*, 2018, 23(12):57-63.
- [3] 何刚,王洪斌,刘海林,等. I期非小细胞肺癌组织血管内皮生长因子C、细胞角蛋白19表达与患者预后的相关性[J]. *现代生物医学进展*, 2019, 19(8):81-85.
- [4] 屠珏,周卫民,蔡月琴. 不同的人瘤裸鼠移植瘤模型中磷脂酶A2的表达[J]. *实验动物与比较医学*, 2019, 39(4):298-304.
- [5] 钱俊峰,徐芳,王洪源,等. 血清CYFRA21-1、MMP-9及TTF-1水平在诊断肺恶性肿瘤患者中的临床价值[J]. *中华全科医学*, 2019, 17(6):951-954.
- [6] 冯瑶瑶,冯继红,周航. VEGF-A、VEGF-C在宫颈癌侵袭转移中的作用机制研究进展[J]. *山东医药*, 2018, 58(3):104-107.
- [7] 段新春,崔永,龚民,等. 手术前后血清CEA和CYFRA21-1水平的变化有助于预测非小细胞肺癌患者的预后[J]. *中国肺癌杂志*, 2015, 18(6):358-364.
- [8] 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与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.
- [9] 杨帆,朱明珍,赵长新,等. 血浆Lp-PLA₂及D-二聚体检测对肺癌患者的临床意义[J]. *中国实用医刊*, 2018, 45(23):4-6.
- [10] 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.
- [11] Ma CQ, Luo CH, Yin HF, et al. Kallistatin inhibits lymphangiogenesis and lymphatic metastasis of gastric cancer by downregulating VEGF-C expression and secretion [J]. *Gastric Cancer*, 2018, 21(4):617-631.
- [12] Duan LC, Ye LH, Li Z, et al. VEGFC/VEGFR3 axis mediates TGFβ₁-induced epithelial-to-mesenchymal transition in non-small cell lung cancer cells [J]. *PLoS One*, 2018, 13(7):e0200452.
- [13] Meng XY, Chen X, Wu WH, et al. Electrochemiluminescent immunoassay for the lung cancer biomarker CYFRA21-1 using MoOx quantum dots [J]. *Microchim Acta*, 2019, 186(12):855.
- [14] Li B, Yuan Q, Zou YT, et al. CA-125, CA-153, and CYFRA21-1 as clinical indicators in male lung cancer with ocular metastasis [J]. *J Cancer*, 2020, 11(10):2730-2736.
- [15] 高洋,张启知,凌建华,等. 非小细胞肺癌患者血清CY-fra21-1、CEA、NSE手术前后的水平变化及意义[J]. *检验医学与临床*, 2018, 15(2):75-78.

(上接第1178页)

- 2014, 46(3):465-473.
- [2] Pai PY, Muo CH, Sung FC, et al. Angiotensin receptor blockers (ARB) outperform angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors on ischemic stroke prevention in patients with hypertension and diabetes-A real-world population study in Taiwan [J]. *Int J Cardiol*, 2016, 215(1):114-119.
- [3] 李杨,刘俊法,郝亚逢,等. 血管紧张素转化酶抑制剂用于高血压的疗效及对合并冠心病和脑卒中的二级预防效果[J]. *南方医科大学学报*, 2017, 37(7):988-992.
- [4] Malueka RG, Dwianingsih EK, Sutarni S, et al. The D allele of the angiotensin-converting enzyme (ACE) insertion/deletion (I/D) polymorphism is associated with worse functional outcome of ischemic stroke [J]. *Int J Neurosc*, 2018, 128(8):697-704.
- [5] 中华医学会糖尿病学分会. 中国2型糖尿病防治指南(2017年版)[J]. *中华糖尿病杂志*, 2018; 10(1):4-67.
- [6] Assareh A, Mather KA, Crawford JD, et al. Renin-angiotensin system genetic polymorphisms and brain white matter lesions in older Australians [J]. *Am J Hypertens*, 2014, 27(9):1191-1198.
- [7] 蒙兰青,黄俊芳,简崇东,等. 桂西壮族人群ACE、APOE和MTHFR基因多态性与缺血性脑卒中的相关性[J]. *实用医学杂志*, 2016, 32(13):2083-2086.
- [8] Gormley K, Bevan S, Markus HS. Polymorphisms in genes of the renin angiotensin system and cerebral small vessel disease [J]. *Cerebrovasc Dis*, 2007, 23:148-155.
- [9] Martínez-RN, Carlos PR, Teresa VM, et al. Single nucleotide polymorphisms of the angiotensin-converting enzyme (ACE) gene are associated with essential hypertension and increased ACE enzyme levels in mexican individuals [J]. *PLoS One*, 2013, 8(5):e65700.
- [10] Scurrah KJ, Lamantia A, Ellis JA, et al. Familial analysis of epistatic and sex-dependent association of genes of the renin-angiotensin-aldosterone system and blood pressure [J]. *Circ Cardiovasc Genet*, 2017, 10(3):e001595.
- [11] Husain K, Hernandez W, Ansari RA, et al. Inflammation, oxidative stress and renin angiotensin system in atherosclerosis [J]. *World J Biol Chem*, 2015, 6:209-217.
- [12] 张振昶,陈丽霞,武国德,等. ACE基因多态性与缺血性脑卒中易感性关系[J]. *中国公共卫生*, 2014, 30(9):1205-1207.
- [13] Tocci G, Cicero AF, Salvetti M, et al. Attitudes and preferences for the clinical management of hypertension and hypertension-related cerebrovascular disease in the general practice: results of the Italian hypertension and brain survey [J]. *J Hum Hypertens*, 2015, 29(7):409-416.
- [14] Mostafa MA, El-Nabiel LM, Fahmy NA, et al. ACE Gene in Egyptian Ischemic Stroke Patients [J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2016, 25(9):2167-2171.

单核细胞高密度脂蛋白比值、血清尿酸水平与冠心病患者冠脉狭窄程度的相关性

郎勇* 冉迅 屈模英

[摘要] **目的** 研究单核细胞高密度脂蛋白比值、血清尿酸水平与冠心病患者冠脉狭窄程度的相关性。**方法** 选取2017年1月至2018年1月于本院接冠心病患者122例,根据Gensini评分将122例分为轻度组(Gensini评分<40)59例和重度组63例(Gensini评分≥40)分别比较两组患者甘油三酯(TG)总胆固醇(TC)低密度脂蛋白-胆固醇(LDL)高密度脂蛋白-胆固醇(HDL)水平;分别比较两组患者单核细胞(MONO)数目、白细胞数目(WBC)和淋巴细胞计数(LYMP)并比较两组单核细胞高密度脂蛋白比值(MHR);分别比较两组患者MHR、血清UA水平;分析Gensini评分与MHR、血清UA水平的相关性。**结果** 相比轻度组,重度组LDL水平、MONO水平、WBC水平、MHR、血清UA水平均显著升高($P<0.05$);相比轻度组,重度组HDL水平显著降低($P<0.05$);相比轻度组,重度组TG水平、TC水平和LYMP差异无统计学意义($P>0.05$);MHR和血清UA均与冠状动脉狭窄程度呈正相关($r=0.557, P<0.001; r=0.341, P<0.001$)。**结论** MHR和血清UA水平会随着冠心病患者冠脉狭窄程度升高而升高且呈正相关。

[关键词] 冠心病; 高密度脂蛋白; 血清尿酸; 单核细胞

Correlation between the ratio of monocyte high-density lipoprotein, serum uric acid level and coronary artery stenosis in patients with coronary heart disease

LANG Yong*, RAN Xun, QU Moying

(Department of Cardiology, Shangjin hospital, West China Hospital Of Sichuan University, Sichuan, Chengdu, China, 610000)

[ABSTRACT] **Objective** To study the correlation between monocyte to high-density lipoprotein ratio (MHR), serum uric acid (UA) level and coronary stenosis in patients with coronary heart disease (CHD). **Methods** From January 2017 to January 2018, 122 CHD patients who were admitted to the hospital were enrolled. According to different Gensini scores, they were divided into the mild group (Gensini score lower than 40 points, 59 cases) and the severe group (Gensini score not lower than 40 points, 63 cases). The levels of triglyceride (TG), total cholesterol (TC), low-density lipoprotein-cholesterol (LDLC) and high-density lipoprotein-cholesterol (HDL) were measured and compared between the two groups. The monocyte (MONO) count, white blood cell count (WBC), lymphocyte count (LYMP) and monocyte to high-density lipoprotein ratio (MHR) were compared between the two groups. MHR and serum UA level were compared between the two groups. The correlation between Gensini score and MHR, serum UA level was analyzed. **Results** Compared with the mild group, LDL, MONO, WBC, MHR and serum UA level were significantly increased ($P<0.05$), while HDL level was significantly decreased in the severe group ($P<0.05$). Compared with the mild group, the differences in TG, TC and LYMP were not significantly significant in the severe group ($P>0.05$). MHR and serum UA were positively correlated with coronary stenosis ($r=0.557, P<0.001. r=0.341,$

基金项目:四川省卫生和计划生育委员会科研课题(16PJ305)

作者单位:四川大学华西医院上锦医院心内科,四川,成都610000

*通信作者:郎勇, E-mail: uporw727619@sina.cn

$P < 0.001$). **Conclusion** MHR and serum UA levels will increase with the increase of coronary artery stenosis in patients with coronary heart disease and are positively correlated.

[KEY WORDS] Coronary heart disease; High-density lipoprotein; Serum uric acid; Monocytes

近年来,随着人们生活方式的改变,心血管疾病的发病率逐年升高,其中冠心病(Coronary Heart Disease, CHD)是最主要的心血管疾病冠心病之一^[1-2]。CHD的发病率、致死率均较高严重威胁人们身体健康。CHD的患者会伴有粥样动脉硬化并引起炎症反应^[3]。同时CHD患者体内的高密度脂蛋白胆固醇(High Density Lipoprotein cholesterol, HDLC)会介导逆转运总胆固醇、抑制低密度脂蛋白胆固醇氧化、阻止单核细胞活化影响CHD的发展^[4]。杨瑞凤等^[5]研究表明:高尿酸血症患者多伴有高血压、肥胖、高血脂、胰岛素抵抗等并发症,因此尿酸过高也与CHD有着密切的联系。本研究观察了单核细胞高密度脂蛋白比值、血清尿酸水平与冠心病患者冠脉狭窄程度的相关性,现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取2017年1月至2018年1月于医院接冠心病患者122例,将122例冠心病患者根据Gensini评分为轻度组(Gensini评分 < 40 分)59例和重度组(Gensini评分 ≥ 40 分)63例。两组年龄、体重比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表1 两组一般资料比较($\bar{x} \pm s$)

组别	男性/女性	年龄(岁)	体重(kg)
轻度组($n=59$)	30/29	55.69 \pm 11.50	61.02 \pm 9.47
重度组($n=63$)	31/32	54.89 \pm 13.07	60.13 \pm 10.07
t/χ^2 值	0.033	0.358	0.502
P 值	0.856	0.721	0.617

纳入标准:①所有冠心病患者均确诊;②所有患者病历资料均完整;③近期末接受免疫治疗;④肝肾功能均正常。排除标准:①合并各种血液类疾病;②近三个月发生过急性感染、创伤;③合并心肌梗死等心脏类疾病;④患有自身免疫疾病。本研究经医学伦理委员会批准同意执行。

1.2 方法

患者均由心内科专业医师使用冠状动脉造影,采用数字减影机(Philip公司,型号:Allura

Xper FD 10)用经桡动脉或股动脉径路,选取右前斜位、左前斜位或正足位等投照体位显示左冠脉走行;所有患者均空腹肘静脉血5 mL,用日立全自动生化分析仪(日本株式会社日立高新技术有限公司,型号:7170)对患者甘油三酯(triglyceride, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、低密度脂蛋白-胆固醇(Low Density Lipoprotein, LDL)、高密度脂蛋白(High Density Lipoprotein, HDL)、尿酸(Uric Acid, UA)等进行检测;统计各组患者单核细胞(monocyte, MONO)数目、白细胞数目(white blood cell count, WBC)和淋巴细胞计数(lymphocyte count, LYMP)并比较单核细胞高密度脂蛋白比值(monocyte to high-density lipoprotein ratio, MHR),具体操作严格按照说明书进行。

1.3 观察指标及评价标准

冠状动脉狭窄程度评分,采用Gensini积分系统进行定量评定^[6],按冠状动脉狭窄程度,分别2分、4分、8分、16分和32分。不同冠状动脉乘以相应的系数,左主干为5;前降支近段为:2.5,左前降支中段为:1.5,左前降支远段为:1,左回旋近段为:2.5;左回旋远段/后降支为:1,后侧支为:0.5,第一对角支为:1,第二对角支为:0.5,右冠近/中/后段位:0.5,狭窄程度为各积分之和。

1.4 统计学分析

采用SPSS 22.0统计学软件进行数据分析,计量资料采用($\bar{x} \pm s$)表示,采用 t 检验;计数资料采用 $n(\%)$ 表示,采用 χ^2 检验;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 两组患者TG、TC、LDL、HDL水平比较

轻度组TG、TC水平与重度组差异无统计学意义($P > 0.05$);轻度组LDL水平显著低于重度组;轻度组HDL水平显著高于重度组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表2。

2.2 两组患者MONO、WBC和LYMP水平比较

轻度组MONO和WBC水平显著低于重度组,差异有统计学意义($P < 0.05$);轻度组LYMP水平与重度组,差异无统计学意义($P > 0.05$),见表3。

表2 两组患者TG、TC、LDL、HDL水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of TG, TC, LDL and HDL levels between the two groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TG (mmol/L)	TC (mmol/L)	LDL (mmol/L)	HDL (mmol/L)
轻度组	59	4.36±1.02	1.95±0.87	2.36±0.51	1.20±0.18
重度组	63	4.33±0.97	2.00±0.94	2.78±0.49	1.00±0.14
t值		0.167	0.304	4.639	6.875
P值		0.868	0.761	<0.001	<0.001

表3 两组患者MONO、WBC和LYMP水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of the levels of MONO, WBC and LYMP between 2 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	MONO ($\times 10^9/L$)	WBC ($\times 10^9/L$)	LYMP ($\times 10^9/L$)
轻度组	59	0.48±0.11	6.98±0.78	1.75±0.78
重度组	63	0.61±0.14	7.91±0.70	1.64±0.97
t值		5.677	6.939	0.687
P值		<0.001	<0.001	0.493

2.3 两组患者MHR、血清UA水平比较

轻度组MHR、血清UA水平均显著低于重度组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表4。

表4 两组患者MHR、血清UA水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Comparison of MHR and serum UA between 2 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	MHR	UA (mmol/L)
轻度组	59	0.41±0.10	347.20±40.98
重度组	63	0.62±0.11	387.47±31.25
t值		11.062	6.127
P值		<0.001	<0.001

2.4 MHR、血清UA与冠状动脉狭窄程度(Gensh-ni)相关性分析

MHR与冠状动脉狭窄程度呈正相关($r = 0.557, P < 0.001$);血清UA与冠状动脉狭窄程度呈正相关($r = 0.341, P < 0.001$)。

3 讨论

随着人们生活方式的改变,冠心病的发病率逐年升高,而影响冠心病发生和发展的因素较多。冠心病患者的动脉粥样硬化不稳定斑块破裂、糜烂、血管收缩并形成血栓导致血管堵塞,使得动脉狭窄^[7]。在此过程中HDL起到重要的作用,HDL可以促进细胞内胆固醇的外排,尤其是巨噬细胞内胆固醇的外排,从而促使动脉血管壁中的胆固醇逆向转运至肝脏,抑制粥样动脉硬化过程^[8]。除此之外HDL可介导逆转运TC并抑制LDL的氧化、同时阻

止单核细胞活化和扩展等作用,因此目前MHR可以作为一项新指标评估和预测冠心病患者动脉狭窄程度及冠心病进展情况^[9-10]。本研究结果发现MHR与冠状动脉狭窄程度呈正相关。说明随着冠心病患者动脉狭窄程度的发展患者血清内单核细胞数目增加,高密度蛋白下降,使得MHR值显著升高。

目前大多数学者认为血清尿酸水平的变化与冠心病有着密切的关系^[11]。庄永泽等^[12]认为:尿酸症患者多伴有高血压、肥胖、高血脂、胰岛素抵抗等并发症,这些并发症因素是心血管疾病的传统致病因素。除此之外尿酸为人体内嘌呤代谢产物,具有清除人体内自由基的作用,同时能够刺激粒细胞产生超氧化自由基、过氧化自由基^[13]。张晓洁等^[14]认为尿酸微结晶极易析出并在血管壁上沉积,使得血管内皮细胞损伤,导致内膜炎症反应的发生并激活血小板,刺激血小板聚集粘附,并诱导血小板血栓的发生。高密度脂蛋白的主要蛋白质组份为apo-A1, apo-A1可以抑制人单核细胞表面CD11b的活化,从而发挥着抗炎作用。因此联合检测MONO和HDL对冠心病的病情发展有着重大的意义。本研究说明随着冠状动脉狭窄的发展,患者体内的炎症反应受到促进,单核细胞数目也显著升高。尿酸能够促进低密度脂蛋白过氧化,使机体内氧自由基水平明显增加,而高密度脂蛋白可以一定程度上抑制密度脂蛋白过氧化减缓粥样斑块的发生及发展。于是本研究还发现随着冠状动脉狭窄的进展,血清UA增加,这可能是因为UA含量升高结晶极易析出并附着在血管壁上,使得血管狭窄。徐萍等^[15]研究表明:尿酸水平检测对冠心病诊断和鉴别均有重要意义,本研究与其结论相一致。

综上所述,MHR和血清UA水平会随着冠心病患者冠脉狭窄程度升高而升高且呈正相关。

参考文献

- [1] 彭胡,唐克彬,颜彪,等. 泸州地区冠心病PCI治疗患者CYP2C19基因多态性分布的研究[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2019, 11(2):41-44.
- [2] Murray MIK, Bode K, Whittaker P. Gender-specific associations between coronary heart disease and other chronic diseases: cross-sectional evaluation of national survey data from adult residents of Germany[J]. J Geriatr Cardiol, 2019, 16(9):663-670.
- [3] AN Ning, ZOU Deling. 小而密低密度脂蛋白与冠心病的研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 2019, 27(7):639-644.

慢性自发性荨麻疹患者斑贴试验结果分析

张振东¹ 范苗静^{2*} 王伟¹ 高睿迪¹

[摘要] **目的** 探讨常见接触性致敏物在慢性自发性荨麻疹患者中的致敏情况,评估其风险及采取相关干预措施后患者病情的改善情况。**方法** 收集2017年1月至2019年1月安徽省阜阳市人民医院皮肤科收治的362例应用瑞敏斑贴试验中国筛查系列检测的慢性自发性荨麻疹患者的资料,分析其致敏情况及影响因素,对27例荨麻疹症状加重的患者采取干预措施后6个月内观察荨麻疹病情改善程度。**结果** 慢性自发性荨麻疹患者常见接触性致敏成分包括对苯二胺、重铬酸钾、硫酸镍等,不同接触性致敏物的阳性率随性别、年龄、职业而变化,差异有统计学意义($P<0.05$)。荨麻疹症状加重的患者在采取干预措施后病情评分下降。**结论** 少数慢性自发性荨麻疹患者常合并接触性致敏物致敏,采取相关干预措施,有利于疾病的诊断与治疗。斑贴试验有助于评估病因不明的慢性自发性荨麻疹患者。

[关键词] 斑贴试验;慢性自发性荨麻疹;荨麻疹活动度评分;接触性致敏物

Analysis of patch test in the patients with chronic idiopathic urticaria

ZHANG Zhendong¹, FAN Miaojing^{2*}, WANG Wei¹, GAO Ruidi¹

(1. Department of Dermatology, Fuyang City People's Hospital, Fuyang, Anhui, China, 236000;

2. Department of Pathology, Fuyang City People's Hospital, Fuyang, Anhui, China, 236000)

[ABSTRACT] **Objective** To evaluate the sensitization of the common contact sensitizers in the patients with chronic idiopathic urticaria, to assess their risk and the improving conditions of the patients after relevant interventions. **Methods** From January 2017 to January 2019, the results detected by using China screening series test for reniniscent paste test in 362 patients with chronic idiopathic urticaria were collected from Department of Dermatology of Fuyang City People's Hospital in Anhui Province. The sensitization and the influencing factors were analyzed. Observe the improvement of urticaria within 6 months after intervention measures were taken on 27 patients with worsening urticaria symptoms. **Results** The patients with chronic idiopathic urticaria commonly contact sensitization ingredients including para-phenylenediamine, potassium dichromate, nickel sulfate, etc. The positive rate of different contact allergens varies with gender, age and occupation. The score of patients with aggravated urticaria symptoms decreased after intervention. **Conclusion** A small number of the patients with chronic idiopathic urticaria can be sensitized by contact sensitizers. Taking relevant intervention measures is conducive to the diagnosis and treatment of the diseases. The patch test help to assess the patients with chronic idiopathic urticaria of unknown etiology.

[KEY WORDS] Patch test; Chronic idiopathic urticaria; Urticaria Activity Score; Contact sensitizer

慢性自发性荨麻疹(Chronic idiopathic urticaria, CIU)是指持续不少于6周反复出现伴或不伴血管性水肿的荨麻疹^[1]。众多研究已经表明接触

后致敏化可能与慢性自发性荨麻疹有关,Ⅳ型超敏反应也可能参与其中,接触后致敏化可能诱发本病^[2-3]。本研究旨在调查皖北地区的常见接触性

作者单位:1. 安徽省阜阳市人民医院皮肤科,安徽,阜阳 236000

2. 安徽省阜阳市人民医院病理科,安徽,阜阳 236000

*通信作者:范苗静, E-mail:fmj_123456@163.com

致敏物在慢性自发性荨麻疹患者中的斑贴试验结果、发生率和分布特征,并评估采取干预措施后的疗效。

1 资料与方法

1.1 临床资料

收集2017年1月至2019年1月安徽省阜阳市人民医院皮肤科的慢性自发性荨麻疹病例362例,其中男性177例,女性185例,平均年龄(32.38±16.36)岁,按年龄分为儿童组(<15岁)19例、青少年组(15~18岁)54例、青年组(19~35岁)116例、中年组(36~60岁)125例和老年组(>60岁)48例;患者病程2月至13年;按职业分为:农业98例、商业服务77例、办事人员65例、医务人员47例、居家人员45例、教育人员30例。

入选标准:①所有患者每天均有风团发作或间歇发作(每周至少发作2次),持续时间≥6周;②所有患者及家属均签署知情同意书。排除标准:①诱导性荨麻疹;②药物性荨麻疹;③常规检查异常者;④其他自身免疫性疾病有关的荨麻疹;⑤孕妇和哺乳期妇女;⑥测试部位有毛囊炎、红肿、糜烂等症状或皮炎处于急性发作期。

1.2 方法

1.2.1 试剂

采用瑞敏斑贴试验中国筛查系列(CH-1000S)(北京元康医学实用技术有限责任公司)20种常见接触性化合物过敏原试剂进行检测。

1.2.2 操作过程

检测前3天停用抗组胺药和2W前停用糖皮质激素。受试者在检测过程中勿洗澡,48h后除去斑贴试验物,72h后检查有无皮损。依据北美接触性皮炎组(North American Contact Dermatitis Group, NACDG)分级系统记录分级,在收集斑贴检测结果后的4W内根据7d荨麻疹活动度评分(Urticaria Activity Score 7, UAS7)进行记录^[1]。将采取干预措施后的荨麻疹患者分为缓解者(即症状完全或部分缓解的患者)和无缓解者(即无临床改善的患者)。

1.3 干预措施

检测出接触致敏物阳性反应后,立即告知患者,6个月内通过电话进行追踪,观察这种干预是否改善荨麻疹症状,并量化改善的程度。

1.4 统计学分析

运用SPSS 22.0软件进行数据统计,计数资料用n(%)表示,行 χ^2 检验和Mann-Whitney检验。用Student's t检验评估研究组中人口统计学和基线特征的可比性, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况结果

斑贴试验中对1种及以上接触性致敏物出现阳性反应的为278种,总阳性率为76.80%(278/362)。其中166例对1种致敏物过敏,22例对2种致敏物过敏,10例对3种致敏物过敏,7例对4种致敏物过敏,2例对5种致敏物过敏。

2.2 不同性别的接触性致敏物阳性率比较

男性(47.46%, 84/177)与女性(56.76%, 105/185)间接接触性致敏物的阳性率的差异无统计学意义($\chi^2=3.130, P>0.05$),男女间其他致敏物的阳性率比较差异无统计学意义($P>0.05$)。见表1。

表1 362例CIU患者不同性别的接触性致敏物阳性率比较及接触性致敏原的分布[n(%)]

Table 1 Comparison of the positive rate of contact allergens in 362 CIU patients with different genders and the distribution of contact allergens [n(%)]

接触性致敏物	n	男	女	χ^2 值
氯化钴	16	4.52	4.32	0.010
巯基混合物	5	1.69	1.08	0.000
咪唑烷基脲	7	2.26	1.62	0.000
对苯二胺	60	13.56	19.46	2.280
N-环己环基硫酞内酯	3	0.85	1.08	0.000
重铬酸钾	38	15.25	5.95	8.340
亚乙基二胺	2	0.85	0.54	0.460
松香	4	1.70	1.08	0.210
甲醛	13	3.39	3.78	0.040
环氧树脂	14	3.95	3.78	0.010
溴硝丙醇	5	1.69	1.08	0.000
秋兰姆混合物	3	0.85	1.08	0.000
对苯类(混合物)	7	2.26	1.62	0.000
硫酸镍	33	5.65	12.43	5.020
倍半萜烯内酯混合物	2	0.85	0.54	0.460
芳香混合物	26	5.08	9.18	4.889
Cl+Me-异噻唑(卡松CG)	8	1.69	2.70	0.090
黑橡胶混合物	10	3.39	2.16	0.150
卡巴混合物	7	1.69	2.16	0.000
夸特15	15	3.95	4.32	0.030

2.3 接触性致敏物类型间的阳性率比较

对苯二胺是最常见的芳香族化合物致敏物(16.57%, 60/362),其次是芳香混合物(7.18%, 26/362),金属致敏物中重铬酸钾、硫酸镍、氯化钴较常见。

2.4 接触性致敏物在不同年龄组间的阳性率比较

重铬酸钾、甲醛、环氧树脂及夸特15比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。氯化钴、巯基混合物、咪唑烷基脲、对苯二胺、N-环己基硫酞内酯、亚乙基二胺、松香等比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表2。

2.5 接触性致敏物在不同职业间的阳性率比较

对苯二胺在教育人员中阳性率最高,重铬酸钾在商业服务者中阳性率最高,甲醛在农业人员中阳性率最高,芳香混合物在居家人员中阳性率最高($P < 0.05$)。见表3。

表2 接触性致敏物在362例CIU患者不同年龄组间的阳性率比较 [n(%)]

Table 2 Comparison of positive rates of contact sensitizers among 362 CIU patients in different age groups [n(%)]

接触性致敏物	总阳性例数(n)	儿童组	青少年组	青年组	中年组	老年组	χ^2 值	P值
氯化钴	16	0.00	3.70	3.45	7.20	2.08	8.451	0.076
巯基混合物	5	0.00	1.85	2.59	0.80	0.00	5.037	0.284
咪唑烷基脲	7	0.00	1.85	2.59	1.60	2.08	2.358	0.670
对苯二胺	60	10.52	14.80	20.64	16.00	12.48	3.977	0.409
N-环己基硫酞内酯	3	0.00	0.00	0.86	1.60	0.00	4.247	0.374
重铬酸钾	38	0.00	3.70	12.93	15.20	4.16	23.641	0.000
亚乙基二胺	2	0.00	0.00	0.00	1.60	0.00	6.400	0.171
松香	4	0.00	0.00	1.72	0.80	2.08	4.014	0.404
甲醛	13	0.00	1.85	1.72	8.00	0.00	20.440	0.000
环氧树脂	14	0.00	1.85	2.58	4.00	10.40	16.815	0.002
溴硝丙醇	5	0.00	1.85	1.72	0.80	2.08	2.346	0.672
秋兰姆混合物	3	0	1.86	0.86	0.80	0.00	3.354	0.500
对苯类(混合物)	7	5.26	3.70	0.86	2.40	0.00	7.362	0.118
硫酸镍	33	5.26	5.55	8.60	12.00	8.32	3.770	0.438
倍半萜烯内酯混合物	2	0.00	1.85	0.86	0.00	0.00	4.969	0.290
芳香混合物	26	5.26	5.55	6.89	8.00	8.32	1.131	0.889
Cl+Me-异噻唑(卡松CG)	8	0.00	1.85	1.72	2.40	4.16	4.404	0.354
黑橡胶混合物	10	0.00	3.70	2.58	3.20	2.08	3.541	0.472
卡巴混合物	7	0.00	1.85	1.72	2.40	2.08	2.178	0.703
夸特15	15	0.00	3.70	3.45	7.20	12.50	16.666	0.002

表3 362例慢性自发性荨麻疹患者接触性致敏物在不同职业间的阳性率比较 [n(%)]

Table 3 Comparison of positive rates of contact allergens among 362 patients with chronic idiopathic urticaria in different occupations [n(%)]

接触性致敏物	总阳性例数(n)	农业	商业服务	办事人员	医务人员	居家人员	教育人员	χ^2 值	P值
氯化钴	16	5.10	5.19	4.62	4.26	2.22	3.33	1.604	0.901
巯基混合物	5	2.04	1.30	1.54	0.00	2.22	0.00	4.014	0.547
咪唑烷基脲	7	2.04	3.90	3.07	0.00	0.00	0.00	10.166	0.071
对苯二胺	60	12.24	15.58	15.38	17.02	17.78	33.33	15.000	0.017
N-环己基硫酞内酯	3	1.02	1.30	1.54	0.00	0.00	0.00	4.003	0.549
重铬酸钾	38	9.18	18.18	10.77	6.38	4.44	10.00	11.401	0.044
亚乙基二胺	2	1.02	0.00	0.00	2.13	0.00	0.00	7.473	0.188
松香	4	1.02	2.60	0.00	2.13	0.00	0.00	7.124	0.212
甲醛	13	8.16	2.60	1.54	2.13	2.22	0.00	14.046	0.015
环氧树脂	14	3.06	5.19	3.07	4.26	4.44	3.33	0.978	0.964
溴硝丙醇	5	2.04	2.60	1.54	0.00	0.00	0.00	6.726	0.242
秋兰姆混合物	3	0.00	1.30	1.54	0.00	2.22	0.00	5.600	0.347
对苯类(混合物)	7	2.04	3.90	1.54	0.00	0.00	3.33	7.413	0.192
硫酸镍	33	7.14	10.40	7.69	8.52	8.89	16.67	6.222	0.285
倍半萜烯内酯混合物	2	0.00	1.30	1.54	0.00	0.00	0.00	5.741	0.332
芳香混合物	26	5.10	6.49	3.07	8.52	15.54	10.00	11.826	0.037
Cl+Me-异噻唑(卡松CG)	8	2.04	1.30	1.54	4.26	4.44	0.00	5.171	0.395
黑橡胶混合物	10	4.08	2.60	1.54	4.26	2.22	0.00	5.240	0.387
卡巴混合物	7	2.04	1.30	0.00	4.26	4.44	3.33	6.023	0.304
夸特15	15	5.10	3.90	3.07	4.26	4.44	0.00	4.797	0.441

2.6 干预结果

斑贴试验期间有 27 例出现荨麻疹的症状加重, 22 例同意采取干预措施, 2 例失访, 3 例不依从; 有 10 例症状改善, 5 例症状完全缓解, 3 例不依从者症状未改善。干预后第 1 周避免致敏物组和对照组的中位(四分位间距)严重程度分值为 20 (14~21) 和 15 (14~27), 两者之间的差异无统计学意义 ($P>0.05$); 第 4 周两者评分值分别为 12 (7~15) 和 14 (12~17), 两者之间的差异有统计学意义 ($P<0.05$)。在避免致敏物前, 完全缓解者的中位疾病持续时间为 25 月 (范围为 10 月~120 月), 部分反应者的中位疾病持续时间为 20 月 (范围为 18 月~96 月), 两者之间差异无统计学意义 ($P=0.260$)。见图 1。

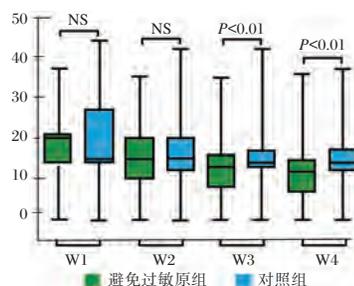


图 1 两组的 UAS7 评分比较

Figure 1 The compares of UAS7 scores between 2 groups

3 讨论

慢性荨麻疹患者(每周至少发作 2 次, 持续时间 ≥ 6 周)可反复发作甚至累及深部脏器, 其中部分患者的病因复杂, 药物治疗效果较差。研究表明, 这部分患者除 I 型超敏反应相关机制外, IV 型超敏反应也可能参与其中^[3], 因此进行斑贴试验并对致敏的接触性化合物过敏原进行避免后, 部分患者症状明显缓解。肥大细胞被认为是荨麻疹发病的关键效应细胞, 但慢性自发性荨麻疹很少由 I 型变态反应所致, 其发病可能不完全依赖肥大细胞^[1,4]。Huang X 等^[5]发现 CIU 患者组血清中肥大细胞的免疫激活剂组胺释放因子(HRF)和 HRF 反应性 IgE 的浓度显著高于正常组, 两者呈线性相关, 且 HRF 反应性 IgE 浓度与疾病活动程度显著相关, 阻断其激活可能有助于治疗。T 细胞介导的 HRF 释放需要较高变应原阈值或需激活较高阈值数量的 HRF 受体, 可以解释接触变应原后所致荨麻疹的少见性和脱敏后缓解程度的不一致^[6]。

相当多的 CIU 患者即使没有明确的临床病史或接触性皮炎的体征, 仍对斑贴试验呈阳性反应, 接触性致敏物可能在 CIU 的发病机制中起作用^[3,7]。

本研究结果表明接触性变应原可能在 CIU 的致病机制中起作用。本研究中 CIU 患者最常见的接触性致敏物包括对苯二胺、重铬酸钾、硫酸镍, 可能与以下因素有关: ①研究表明人群中普遍对对苯二胺敏感, 欧洲、北美和亚洲的所有皮炎患者中有 1% 至 6% 对对苯二胺敏感^[8], 亚洲人致敏率的中位数为 4.3%^[9]。Han JH 等^[10]在韩国 105 位患者中使用含对苯二胺的染发剂后, 有 15 名患者出现荨麻疹, 停用染发剂后出现临床症状改善。皖北地区当地人口结构较为年轻、年轻人观念时尚, 与染发及美甲需求增多有关; ②重铬酸盐常用于皮革、水泥等加工业, 瑞典自 1983 年起在水泥中添加硫酸铁以减少致敏, 欧盟自 2005 年规定水泥中的水溶性铬的最大浓度不超过 2 ppm^[11], 目前国内重视程度不足, 铬过敏的频率仍然较高^[12]。皖北地区大量外出务工人员从事国内基建及金属加工, 自我保护意识差, 易暴露于高铬环境后致敏; ③镍常通过口服摄入、接触镍合金及电镀产品而暴露^[12], 个体之间的差异与诱发阈值有关^[13], 大约 20% 女性和 6% 男性对镍敏感^[14]。欧盟于 2001 年 6 月施行镍管制后镍相关性皮炎明显减少^[15], 丹麦、意大利、德国和英国的年轻女性镍过敏率至少降低 10%^[16]。中国目前执行镍的国家标准 GB11887, 镍过敏的中位患病率为 17.7%, 仍高于欧洲国家^[17]。皖北地区经济落后, 年轻女性喜爱购买含镍廉价首饰, 因而易接触各种含镍饰物后致敏。

需指出本研究存在局限性, 许多过敏原在环境中无处不在, 难以完全避免, 部分患者拒绝斑贴试验及采取干预, 患者依从性差, 则难以缓解。另外本研究样本少, 不能全面反映本地区 CIU 患者病因与接触性致敏物间的相关性, 需要更多样本量的研究补充。但简单易行的斑贴试验对 CIU 的病因寻找和干预仍然是行之有效的, 有助于评估病因不明的 CIU 患者。

参考文献

- [1] Zuberbier T, Aberer W, Asero R, et al. The EAACI/GA²LEN/EDF/WAO guideline for the definition, classification, diagnosis and management of urticaria [J]. Allergy, 2018, 73(7): 1393-1414.

- [2] Palgan K, Bartuzi Z. Platelet activating factor in allergies [J]. *Int J Imm Pharm*, 2015, 28(4):584-589.
- [3] AlGhamdi KM, Khurram H, Gad Al Rab MO. Evaluation of patch test reactivities in patients with chronic idiopathic urticaria [J]. *Cutis*, 2017, 99(6):E27-E32.
- [4] 中华医学会皮肤性病学分会荨麻疹研究中心. 中国荨麻疹诊疗指南(2018版) [J]. *中华皮肤科杂志*, 2019, 52(1):1-5.
- [5] Huang X, Li Z, Sun R. Synergistic Actions of Histamine-Releasing Factor and Histamine Releasing Factor-Reactive IgE in Chronic Urticaria [J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2017, 172(1):27-32.
- [6] Hession MT, Scheinman PL. The Role of Contact Allergens in Chronic Idiopathic Urticaria [J]. *Dermatitis*, 2012, 23(3):110-116.
- [7] 黄南, 张思, 王晓龙, 等. 荨麻疹患者斑贴试验结果分析 [J]. *检验医学与临床*, 2017, 14(19):2871-2873.
- [8] Pot LM, Scheitza SM, Coenraads PJ, et al. Penetration and haptentation of p-phenylenediamine [J]. *Contact Dermatitis*, 2013, 68(4):193-207.
- [9] Lee JY, Kim CW, Kim SS. Analysis of the Results from the Patch Test to Para-Phenylenediamine in the TRUE Test in Patients with a Hair Dye Contact Allergy [J]. *Ann Dermatol*, 2015, 27(2):171-177.
- [10] Han JH, Lee HJ, Bang CH, et al. P-Phenylenediamine Hair Dye Allergy and Its Clinical Characteristics [J]. *Ann Dermatol*, 2018, 30(3):316-321.
- [11] Lejding T, Engfeldt M, Bruze M, et al. Skin application of glutathione and iron sulfate can inhibit elicitation of allergic contact dermatitis from hexavalent chromium [J]. *Contact Dermatitis*, 2020, 82(1):45-53.
- [12] 李炳旻, 唐浩文, 王文娟, 等. 1484例过敏性疾病患者化学物质斑贴试验分析 [J]. *解放军医学院学报*, 2016, 37(2):137-140.
- [13] Uter W, Werfel T, White IR, et al. Contact Allergy: A Review of Current Problems from a Clinical Perspective [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2018, 15(6):1108.
- [14] Rustemeyer T, von Blomberg BM, van Hoogstraten IM, et al. Analysis of effector and regulatory immune reactivity to nickel [J]. *Clin Exp Allergy*, 2004, 34(9):1458-1466.
- [15] Silverberg NB, Pelletier JL, Jacob SE, et al. Nickel Allergic Contact Dermatitis: Identification, Treatment, and Prevention [J]. *Pediatrics*, 2020, 145(5):e20200628.
- [16] Garg S, Thyssen JP, Uter W, et al. Nickel allergy following European Union regulation in Denmark, Germany, Italy and the U.K. [J]. *Br J Dermatol*, 2013, 169(4):854-858.
- [17] Hamann CR, Hamann DJ, Hamann QJ, et al. Assessment of nickel release from earrings randomly purchased in China and Thailand using the dimethylglyoxime test [J]. *Contact Dermatitis*, 2010, 62(4):232-240.

(上接第1186页)

- [4] 李超, 白明, 彭瑜, 等. 非高密度脂蛋白胆固醇与冠状动脉病变严重程度相关性 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2019, 27(4):344-348.
- [5] 杨瑞凤, 郭永平, 魏丽, 等. 高尿酸血症患者糖、脂代谢异常的临床研究 [J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2018, 9(2):121-124.
- [6] 闵敏, 贾楠, 任莉. 血浆脂蛋白a与冠状动脉 Gensini 积分的相关性 [J]. *岭南心血管病杂志*, 2018, 24(2):17-19+27.
- [7] 任金锐, 杨耀国, 陈忠. 颈动脉粥样硬化斑块易损性相关循环标志物的研究进展 [J]. *心肺血管病杂志*, 2018, 37(11):22-25.
- [8] 辛苏萍, 李波. 中青年与老年2型糖尿病患者非高密度脂蛋白胆固醇、动脉硬化指数的对比分析 [J]. *实用心脑血管病杂志*, 2018, 26(4):104-106+109.
- [9] 金雷, 王晓宇, 陈忠锐. 冠心病患者血清 non-HDL-C、动脉粥样硬化指数与冠状动脉狭窄程度的关系研究 [J]. *中国循证心血管医学杂志*, 2019, 11(2):53-55+61.
- [10] 董昭杰, 徐西子, 李广平. 单核细胞/高密度脂蛋白胆固醇比值与冠状动脉 Gensini 评分的关系 [J]. *天津医科大学学报*, 2017, 4(2):71-74.
- [11] 徐萃, 刘宏斌, 王娟, 等. 血清尿酸水平与冠心病患者远期预后分析 [J]. *解放军医学院学报*, 2018, 39(2):102-105+109.
- [12] 庄永泽. 重视代谢综合征肾损害的诊治 [J]. *肾脏病与透析肾移植杂志*, 2018, 7(4):344-345.
- [13] 王铮, 袁建军. 肌肉骨骼超声在无症状高尿酸血症及痛风中的应用 [J]. *中国医学影像学杂志*, 2018, 181(6):68-70+72.
- [14] 张晓洁, 姜林娣. 尿酸代谢异常与慢性炎症的新认识 [J]. *中华医学杂志*, 2018, 98(13):963-964.
- [15] 徐萍. 血清胆红素与尿酸检测在冠心病诊断中的价值 [J]. *检验医学与临床*, 2019, 5(20):21-23.

血清胎盘生长因子水平与子痫前期胎儿生长受限的关联性

万雪华* 马爱娟

[摘要] 目的 探讨血清胎盘生长因子(PLGF)水平与子痫前期胎儿生长受限的关联性。方法 分析2016年5月至2019年5月期间于本院分娩的子痫前期孕妇228例,按分娩的新生儿体重分为观察组(体重小于胎龄儿)与对照组(体重正常)。抽母血及脐血测定血清胎盘生长因子水平,单变量及多变量回归分析血清PLGF水平与子痫前期胎儿生长受限的关联性。结果 观察组孕妇血清PLGF水平为(40.41±1.04)ng/L,而对照组为(36.48±1.12)ng/L,观察组明显高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);观察组新生儿脐血PLGF水平为(40.48±1.53)ng/L,明显高于对照组的(35.62±0.89)ng/L,差异有统计学意义($P<0.05$)。单变量分析的结果显示高血压、吸烟、孕妇血清及新生儿脐血PLGF水平均与子痫前期胎儿生长受限正相关($P<0.05$);而多变量分析的结果表明高血压、孕妇血清及新生儿脐血PLGF水平均与子痫前期胎儿生长受限正相关($P<0.05$)。结论 孕妇血清及新生儿脐血PLGF水平与子痫前期胎儿生长受限呈正相关,可作为诊断子痫前期胎儿生长受限的指标。

[关键词] 血清胎盘生长因子;子痫前期;胎儿生长受限;关联性

Correlation between serum placental growth factor level and fetal growth restriction in preeclampsia

WAN XueHua*, MA AiJuan

(Department of Obstetrics and Gynecology, Heze Second People's Hospital, Heze, Shandong, China, 274000)

[ABSTRACT] Objective To investigate the relationship between serum placenta growth factor (PLGF) level and fetal growth restriction in preeclampsia. Methods A retrospective analysis of 228 preeclampsia pregnant women who were delivered to our hospital from May 2016 to May 2019 was divided into the observation group (weight less than gestational age) and the control group (normal weight). Serum placental growth factor level was measured by maternal blood and cord blood, and univariate and multivariate regression analysis was used to judge the correlation between serum PLGF level with fetal growth restriction in preeclampsia. Results The serum PLGF level of the pregnant women in the observation group was 40.41±1.04 ng/L, 36.48±1.12 ng/L in the control group. The observation group was significantly higher than the control group, the difference was statistically significant ($P<0.05$). The level of PLGF in cord blood was 40.48±1.53 ng/L, which was significantly higher than that in the control group (35.62±0.89 ng/L). The difference was statistically significant ($P<0.05$). The results of univariate analysis showed that hypertension, smoking, maternal serum and neonatal cord blood PLGF level were positively correlated with preeclamptic fetal growth restriction ($P<0.05$); multivariate analysis showed high blood pressure, maternal serum and the PLGF level of cord blood in neonates was positively correlated with fetal growth restriction in preeclampsia ($P<0.05$). Conclusion The level of PLGF in pregnant women's serum and neonatal cord blood is positively correlated with fetal growth restriction in preeclampsia, and can be used as an indicator to diagnose fetal growth restriction in preeclampsia.

[KEY WORDS] Serum placental growth factor; Preeclampsia; Fetal growth restriction; Correlation

基金课题:吴阶平医学基金会临床科研专项资助基金(320.6750.18565)

作者单位:菏泽市第二人民医院妇产科,山东,菏泽 274000

*通信作者:万雪华, E-mail:gdym0429@163.com

子痫前期指妊娠20周以后,出现血压升高和蛋白尿,并可出现头痛、眼花、恶心、呕吐、上腹不适等症状^[1]。其病因至今尚不清楚,且会使围产期胎儿的发病率和死亡率明显升高,包括胎儿生长受限及胎儿窘迫等^[2-3]。血清胎盘生长因子(placental growth factor, PLGF)主要由合体滋养层细胞合成,可与位于滋养层细胞和血管内皮细胞的酪氨酸酶受体结合,对滋养层细胞功能有自分泌作用和对血管生长有旁分泌作用^[4],虽然有大量的研究指出围产期血清 PLGF 水平与子痫前期发病率明显相关,但并非所有的子痫前期产妇分娩的胎儿会并发胎儿生长受限^[5-6]。早期识别子痫前期胎儿生长受限的危险因素,可为临床工作提供指导依据,从而改善母婴的结局及预后,具有重要的意义。

1 资料和方法

1.1 研究对象

选取本院分娩的228例子痫前期孕妇,根据新生儿出生体重进行分组,其中72例孕妇分娩的新生儿体重小于胎龄儿(观察组),余156例分娩的新生儿体重正常(对照组)。观察组孕周36~40周,平均(38.6±1.5)周,顺产40例,剖宫产32例;对照组孕周38~41周,平均(39.1±1.2)周,顺产76例,剖宫产80例。

纳入标准:①符合子痫前期的诊断和分类标准;②单胎初产妇。排除标准:①存在心、脑、肝、肾等重要脏器疾病或原发性肺癌等严重疾病;②产妇依从性差或临床资料不完整等。本研究产妇及家属均知情同意并签署知情同意书,并获得医院伦理委员会批准。

1.2 测量 PLGF 水平

每个产妇分娩前采集空腹外周静脉血5 mL及分娩断脐后采集脐血5 mL,将其收集在肝素管中,将标本送到医院中心实验室冷冻保存,采用ELISA法检测血清 PLGF 水平,试剂盒购自上海钰博生物科技有限公司,检测步骤严格按照说明书进行。

1.3 诊断标准^[7]

胎儿生长受限的标准为孕周大于37周胎儿出生体质量小于2 500 g,或胎儿出生体质量低于同孕龄平均体质量的两个标准差,或低于同孕龄正常体质量的第10百分位数^[7]。

1.4 统计学分析

使用SPSS 20.0软件进行统计分析。计量资

料以($\bar{x} \pm s$)表示,方差齐性的计量资料比较采用 t 检验,计数资料用 $n(\%)$ 表示,采用 χ^2 检验或Fisher确切概率法进行比较。采用单因素及多因素回归分析血清 PLGF 水平与子痫前期胎儿生长受限的关系。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 产妇的人口统计学特征

228例子痫前期孕妇中72例孕妇分娩的新生儿体重小于胎龄儿,余156例分娩的新生儿体重正常。两组孕妇间的人口统计学数据差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表1。

表1 研究对象的的人口统计学数据 [$n(\%), (\bar{x} \pm s)$]
Table 1 Demographic data regarding the study participants [$n(\%), (\bar{x} \pm s)$]

项目	观察组 ($n=72$)	对照组 ($n=156$)	t/χ^2 值	P 值
年龄(岁)	28.1±1.9	27.6±2.0	0.864	0.461
MI (kg/m ²)	26.2±1.4	25.5±2.1	1.856	0.126
孕周(周)	38.6±1.5	39.1±1.2	0.925	0.365
羊水指数(cm)	13.6±2.6	14.1±3.1	2.512	0.091
脐动脉血流异常	4(5.6)	6(3.8)	0.057	0.812
分娩方式				
顺产	40	76	0.461	0.4997
剖宫产	32	80		
高血压	6	22	0.320	0.572
糖尿病	8	30	1.169	0.280
吸烟	6	18	0.036	0.849

2.2 血清 PLGF 水平的检测结果

两组新生儿母血 PLGF 水平比较,观察组明显高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$);两组新生儿脐血 PLGF 水平比较,观察组明显高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表2。

表2 孕妇血清及新生儿脐血 PLGF 水平的检测结果
($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Test results of maternal serum and neonatal cord blood PLGF levels ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	母血 PLGF (ng/L)	脐血 PLGF (ng/L)
观察组	72	40.41±1.04	36.48±1.12
对照组	156	40.48±1.53	35.62±0.89
t 值		5.45	8.52
P 值		<0.001	<0.001

2.3 子痫前期胎儿生长受限的影响因素

单变量分析的结果显示高血压、吸烟、孕妇血清及新生儿脐血 PLGF 水平均与子痫前期胎儿生长受限正相关($P < 0.05$);而多变量分析的结果表明高

血压、孕妇血清及新生儿脐血 PLGF 水平均与子痫前期胎儿生长受限正相关($P < 0.05$)。见表 3、表 4。

表 3 子痫前期胎儿生长受限的单变量分析结果

单变量	OR 值	95%CI	P 值
BMI	1.24	0.91~1.36	0.242
年龄	1.08	0.93~1.12	0.163
孕周	1.26	0.69~4.12	0.204
羊水指数	0.81	0.51~1.93	0.770
脐动脉血流异常	1.38	0.66~6.31	0.141
分娩方式	1.56	0.75~5.70	0.230

表 4 子痫前期胎儿生长受限的多变量分析结果

多变量	OR 值	95%CI	P 值
高血压	2.88	1.84~7.62	0.006
吸烟	2.69	1.66~5.78	0.008
糖尿病	1.23	0.71~4.29	0.191
母血 PLGF 水平	23.25	4.71~81.22	<0.001
脐血 PLGF 水平	24.12	5.62~85.61	<0.001

3 讨论

胎儿生长受限是产科常见的严重并发症之一,也是引起新生儿预后不良甚至死亡的重要原因之一^[5]。实际上早期妊娠过程中,母体内胎儿的生长发育受到多种因素的共同影响,例如母体营养失衡、妊娠期高血压病以及胎盘血液供应不足等,均会导致胎儿生长受限^[6]。

子痫前期是妊娠期妇女常见的并发症之一,也是胎儿生长受限的病因^[8]。其病理生理学基础是发生子痫时,孕妇血压升高,胎盘的血容量供应减少,胎儿对氧气及营养的摄取发生障碍,进而导致宫内生长受限,甚至引发新生儿不良出生结局^[9]。而 PLGF 是血管内皮生长因子家族成员之一,在妊娠期子宫胎盘循环血管生成过程发挥重要的作用^[10]。而在妊娠过程中,胎儿滋养细胞是血清中 PLGF 的主要来源^[11],研究发现,在孕早期和孕中期,孕妇血清中 PLGF 的水平逐渐增加,在妊娠 30 周左右达到峰值,然后逐渐减少直至分娩^[12]。有研究指出孕妇 PLGF 变化的规律主要受到绒毛间隙中的氧含量的调节,氧含量上升,则 PLGF 表达水平增加;若氧含量降低,则 PLGF 表达水平下降^[13]。

本研究多变量分析的结果表明新生儿脐血 PLGF 水平均与子痫前期胎儿生长受限正相关,而

PLGF 对滋养细胞、内皮细胞增殖、分化有一定的调节作用,同时可提高血管通透性^[10],其异常表达可能与损伤胎盘致使功能降低有关,进而引发胎儿生长受限。而之前有研究指出低蛋白血症、羊水过少或过多、吸烟及胎盘异常也是初产孕妇分娩新生儿的危险因素^[14]。有研究指出子痫前期相应临床症状发生的越早,不仅在母体内对胎盘血供造成的影响较大,同时也会导致胎儿宫内缺氧情况加重,新生儿合并胎儿生长受限的可能性越大,并且患儿往往合并发育障碍、智力发展缓慢低下等并发症^[15]。有研究指出妊娠周数与胎儿生长受限的发生密切相关,在保证安全生育的前提下,极可能的延长孕周会降低新生儿合并胎儿生长受限的可能性,进而改善患儿的预后^[16]。

本研究也存在一些局限性,研究对象的样本量相对较少,且影响子痫前期胎儿生长受限的因素并不全面,可能存在偏倚,需要大样本多中心的研究来进一步验证。

综上所述,孕妇血清及新生儿脐血 PLGF 水平与子痫前期胎儿生长受限呈正相关,可作为诊断子痫前期胎儿生长受限的指标。

参考文献

- [1] Duhig KE, Myers J, Seed PT, et al. Placental growth factor testing to assess women with suspected pre-eclampsia: a multicentre, pragmatic, stepped-wedge cluster-randomised controlled trial[J]. Lancet, 2019, 393(10183): 1807-1818.
- [2] 王侦,陈嘉昌,陈华云,等. 基于游离 RNA 的无创性产前诊断研究进展[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2011, 3(5): 356-360.
- [3] Hayes-Ryan D, Hemming K, Breathnach F, et al. PARROT Ireland: Placental growth factor in Assessment of women with suspected pre-eclampsia to reduce maternal morbidity: a Stepped Wedge Cluster Randomised Control Trial Research Study Protocol[J]. BMJ open, 2019, 9(2): e023562.
- [4] Albers RE, Kaufman MR, Natale BV, et al. Trophoblast-Specific Expression of Hif-1 α Results in Preeclampsia-Like Symptoms and Fetal Growth Restriction[J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 2742-2745.
- [5] Dunn L. Changes in intrapartum maternal placental growth factor levels in pregnancies complicated by fetal compromise at term[J]. Placenta, 2018, 74(3): 9-13.
- [6] Herraiz I, Simón E, Gómez-Arriaga PI, et al. Clinical implementation of the sFlt-1/PlGF ratio to identify preeclampsia and fetal growth restriction: A prospective cohort study[J]. Pregnan hypertension, 2018, 13(4): 279-285.

L-选择素、降钙素原、波状蛋白在脓毒症患者中表达及意义

胡仕静 潘爱军* 梅清

【摘要】目的 探讨L-选择素(L-Selectin)、降钙素原(PCT)、波状蛋白(VIM)在脓毒症患者中表达及意义。方法 选取2018年1月至2019年12月本院收治的102例脓毒症患者,其中35例脓毒症(脓毒症组)、36例严重脓毒症(严重脓毒症组)及31例脓毒症休克(脓毒症休克组),并选取35例健康体检者作为对照组。比较各组、不同预后患者L-Selectin、PCT、VIM表达及急性生理和慢性健康状况评分(APACHE II)、序贯器官衰竭估计评分(SOFA)。结果 L-Selectin与PCT、VIM呈正相关,PCT与VIM呈正相关,差异有统计学意义($P<0.05$);L-Selectin、PCT、VIM表达与APACHE II、SOFA评分均呈正相关($P<0.05$);三指标联合预测死亡的AUC为0.890,敏感度为81.48%,特异度为84.00%($P<0.05$)。结论 脓毒症患者L-Selectin、PCT、VIM表达随病情加重逐渐升高,与患者病情、预后密切相关,有望成为预测预后的血清学标志物。

【关键词】 L-选择素;降钙素原;波状蛋白;脓毒症;APACHE II评分;SOFA评分;ROC

Expression and significance of L - selectin, procalcitonin and Vimentin in patients with sepsis

HU ShiJing, PAN AiJun*, MEI Qing

[Department of Critical Care Medicine, the First Affiliated Hospital of University of Science and Technology of China (Anhui Provincial Hospital), Hefei, Anhui, China, 230001]

【ABSTRACT】 Objective To explore the expression and significance of L - Selectin, procalcitonin (PCT) and Vimentin (VIM) in patients with sepsis. Methods 102 patients with sepsis admitted to our hospital from January 2018 to December 2019 were selected, among them, 35 cases of sepsis (septic group), 36 cases of severe sepsis (severe sepsis group) and 31 cases of septic shock (septic shock group), and 35 healthy people were selected as the control group. The expressions of L - Selectin, PCT, VIM, Acute Physiological and Chronic Health Status Score (APACHE II), Sequential Organ Failure Assessment Score (SOFA) of each group and patients with different prognosis were compared. Results L - Selectin was positively correlated with PCT and VIM, and PCT was positively correlated with VIM ($P<0.05$); the expressions of L-Selectin, PCT and VIM were positively correlated with APACHE II and SOFA scores ($P<0.05$). The AUC of the combined prediction of the three indicators for death was 0.890, the sensitivity was 81.48%, and the specificity was 84.00% ($P<0.05$) compared with the survival curves of patients with high expression of L-Selectin, PCT, and VIM. Conclusion The expressions of L-Selectin, PCT, and VIM in sepsis patients gradually increase with the severity of the disease, and are closely related to the patient's condition and prognosis, and are expected to become serological markers for predicting prognosis.

【KEY WORDS】 L-selectin; Procalcitonin; Vimentin; Sepsis; APACHE II score; SOFA score; ROC

基金项目:2018年度安徽省自然科学基金项目(1808085MH300)

作者单位:中国科学技术大学附属第一医院(安徽省立医院)重症医学科,安徽,合肥230001

*通信作者:潘爱军, E-mail: aijunpan@fsyy.ustc.edu.cn

全球每年脓毒症患者数超过1 900万,其中有600万患者死亡,病死率超过25%,因此早期评估患者病情变化,预测预后,并给予恰当处理对改善患者预后意义重大^[1-2]。L-选择素(L-Selectin)是一种选择素黏附分子,主要由淋巴细胞表达,在重度感染患者中表达高于健康体检者^[3]。降钙素原(Procalcitonin, PCT)是诊断和监测细菌炎性疾病感染的一个参数,在脓症患者中表达明显增加^[4]。波形蛋白(Vimentin, VIM)是间质细胞中最主要的中间纤维结构,以往在恶性肿瘤领域研究较多,近年来报道显示, VIM参与感染后免疫炎症反应等过程^[5]。目前关于L-Selectin、PCT、VIM之间关系及在脓毒症病情评估、预后预测中报道较少,本研究对此进行探讨,为疾病的诊治等提供参考,报告如下。

1 资料和方法

1.1 一般资料

选取2018年1月至2019年12月本院收治的102例脓症患者,其中35例脓毒症(脓毒症组)、36例严重脓毒症(严重脓毒症组)及31例脓毒症休克(脓毒症休克组),并选取35例健康体检者作为对照组。

纳入标准:①病例符合对应的脓毒症、严重脓毒症、脓毒症休克诊断标准^[6];②对照组无感染类疾病;③年龄 ≥ 18 岁;④无自身免疫疾病;凝血4项检测无明显异常。⑤所有患者均已签署知情同意书,并经医院伦理委员会批准。排除标准:①酒精依赖症者;②有滥用药物史者;③合并恶性肿瘤者;④有不易压迫止血的穿刺史者;⑤合并白血病、艾滋病者;⑥妊娠期、哺乳期者;⑦认知功能障碍者;有精神病史者。

1.2 方法

1.2.1 各指标检测

①主要试剂:L-Selectin、VIM试剂盒(上海恪敏生物科技有限公司);PCT试剂盒(武汉明德生物科技股份有限公司)。②检测方法:脓毒症组、严重脓毒症组均在确诊后,对照组在入院后次日清晨,采集肘部静脉血5 mL, 3 000 r/min离心10 min,保存于0℃条件下,2 h内送检,采用酶联免疫吸附法试剂盒检测血清L-Selectin、VIM,采用化学法光免疫分析法检测PCT,所有标本采集均遵循相同的操作,遵循相同的时间收集标本,由同一组

检验医师进行检测。

1.2.2 病情评估

采用急性生理和慢性健康状况评分(Acute physiology and chronic health evaluation, APACHE II评分)^[7]、序贯器官衰竭估计评分(Sequential organ failure assessment score, SOFA)^[8]评估,其中APACHE II评分最高71分,分值越高病情越重;SOFA采用0~4分评分法,分值越高,器官衰竭越严重。

1.3 观察指标

比较各组L-Selectin、PCT、VIM表达及APACHE II、SOFA评分。分析L-Selectin、PCT、VIM之间的相关性。分析L-Selectin、PCT、VIM表达与APACHE II、SOFA评分的相关性。比较不同预后患者L-Selectin、PCT、VIM表达。分析L-Selectin、PCT、VIM预测预后的效能。比较不同L-Selectin、PCT、VIM表达患者的生存曲线。

1.4 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,多组间比较以单因素方差分析,两两比较以LSD-t检验,计数资料用 $n(\%)$ 表示、 χ^2 检验,采用Pearson分析L-Selectin、PCT、VIM之间的相关性及各指标与APACHE II、SOFA评分的相关性,采用受试者工作特征曲线(Receiver operating characteristic, ROC)及ROC下面积(Area under the curve, AUC)分析各指标预测预后的效能,采用卡普兰-迈耶曲线(Kaplan-Meier, KM)生存曲线分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般资料比较

4组间年龄、性别、体质量指数等资料比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),均衡可比。见表1。

2.2 各组L-Selectin、PCT、VIM表达及APACHE II、SOFA评分比较

脓毒症各组L-Selectin、PCT、VIM表达均高于对照组,且L-Selectin、PCT、VIM、APACHE II、SOFA评分脓毒症休克组 $>$ 严重脓毒症组 $>$ 脓毒症组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表2。

2.3 分析L-Selectin、PCT、VIM之间的相关性

L-Selectin与PCT($r=0.732, P < 0.001$)、VIM($r=0.833, P < 0.001$)呈正相关,PCT与VIM呈正相关($r=0.717, P < 0.001$)。见图1。

表1 各组一般资料比较 [n(%), ($\bar{x} \pm s$)]
Table 1 Comparison of general information of each group [n(%), ($\bar{x} \pm s$)]

资料	脓毒症休克组 (n=31)	严重脓毒症组 (n=36)	脓毒症组 (n=35)	对照组 (n=35)	χ^2/F 值	P 值	
年龄(岁)	58.78±10.02	59.24±9.80	58.26±10.19	59.05±9.82	0.065	0.979	
性别(男/女)	16/15	20/16	17/18	19/16	0.406	0.939	
体质量指数(kg/m ²)	22.29±2.15	22.34±2.08	22.27±2.11	22.36±1.98	0.014	0.998	
发病至入院时间(h)	36.59±11.24	36.18±10.82	35.89±12.47	-	0.030	0.970	
采集距入院时间(h)	3.16±0.33	3.09±0.35	3.12±0.38	-	0.325	0.724	
采集前抗生素应用史	有	5(16.13)	3(8.33)	1(2.86)	-	3.616	0.164
	无	26(83.87)	33(91.67)	34(97.14)	-		
饮酒史	有	18(58.06)	17(47.22)	19(54.29)	15(42.86)	1.882	0.597
	无	14(45.16)	16(44.44)	15(42.86)	17(48.57)	0.246	0.970
发病诱因	急性胰腺炎	8(25.81)	7(19.44)	6(17.14)	-	0.799	0.671
	外伤	4(12.90)	2(5.56)	5(14.29)	-	1.614	0.446
	肺炎	9(29.03)	10(27.78)	9(25.71)	-	0.094	0.954
	腹膜炎	6(19.35)	9(25.00)	8(22.86)	-	0.307	0.858
合并疾病	泌尿系统感染	4(12.90)	8(22.22)	7(20.00)	-	1.021	0.600
	高脂血症	6(19.35)	4(11.11)	8(22.86)	5(14.29)	2.056	0.561
	糖尿病	7(22.58)	9(25.00)	5(14.29)	4(11.43)	2.950	0.400
	心脏病	4(12.90)	3(8.33)	4(11.43)	1(2.86)	2.512	0.473
高血压	3(9.68)	5(13.89)	2(5.71)	3(8.57)	1.428	0.699	

注：“-”表示无此项资料。

表2 各组 L-Selectin、PCT、VIM 表达及 APACHE II、SOFA 评分比较 ($\bar{x} \pm s$)
Table 2 Comparison of L-Selectin, PCT, VIM expression and APACHE II, SOFA scores of each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	L-Selectin(ng/mL)	PCT(μ g/mL)	VIM(pg/mL)	APACHE II 评分(分)	SOFA 评分(分)
脓毒症休克组	31	215.47±15.33 ^a	13.74±2.15 ^a	594.52±17.23 ^a	30.68±4.23	12.75±1.62
严重脓毒症组	36	120.03±12.76 ^{ab}	5.61±1.04 ^{ab}	258.87±15.69 ^{ab}	24.35±3.71 ^b	8.83±1.36 ^b
脓毒症组	35	46.97±8.29 ^{abc}	1.81±0.52 ^{abc}	112.23±11.14 ^{abc}	19.15±3.64 ^{bc}	4.11±1.15 ^{bc}
对照组	35	7.83±3.06	0.11±0.03	20.43±6.59	-	-
F 值		2357.372	852.931	11773.575	73.678	325.005
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注：“-”表示未进行评定，与对照组相比，^aP<0.05；与脓毒症休克组相比，^bP<0.05；与严重脓毒症组相比，^cP<0.05。

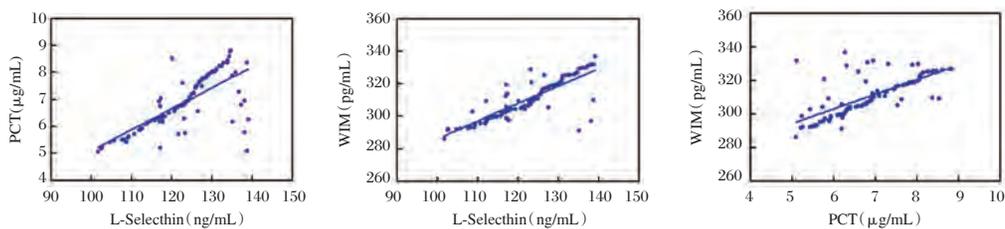


图1 L-Selectin、PCT、VIM 之间的相关性

Figure 1 Correlation between L-Selectin, PCT and VIM

2.4 分析 L-Selectin、PCT、VIM 表达与 APACHE II、SOFA 评分的相关性

L-Selectin、PCT、VIM 表达与 APACHE II、SOFA 评分均呈显著正相关 ($P < 0.05$)。见表 3。

2.5 比较不同预后患者 L-Selectin、PCT、VIM 表达

入组患者 28 d 内，病死 27 例，存活 75 例。病死者 L-Selectin、PCT、VIM 表达高于存活者 ($P < 0.05$)。见表 4。

2.6 分析 L-Selectin、PCT、VIM 预测预后的效能

三指标联合预测病死的 AUC 为 0.890，高于单一指标，敏感度为 81.48%，特异度为 84.00% ($P < 0.05$)。见图 2、表 5。

3 讨论

L-Selectin 是细胞黏附分子选择素家族成员，可活化白细胞，且能通过与抗体或配体的交联作

表3 分析L-Selectin、PCT、VIM表达与APACHE II、SOFA评分的相关性

Table 3 Analysis of the correlation between L-Selectin, PCT, VIM expression and APACHE II, SOFA score

指标	APACHE II评分		SOFA评分	
	r值	P值	r值	P值
L-Selectin	5.769	<0.001	5.839	<0.001
PCT	6.112	<0.001	6.076	<0.001
VIM	5.264	<0.001	4.007	0.008

表4 比较不同预后患者L-Selectin、PCT、VIM表达 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Comparison of expression of L-Selectin, PCT and VIM in patients with different prognosis ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	L-Selectin (ng/mL)	PCT (μ g/mL)	VIM (pg/mL)
病死者	27	188.36 \pm 23.42	11.29 \pm 2.16	356.89 \pm 19.36
存活者	75	100.79 \pm 20.15	5.16 \pm 1.58	293.88 \pm 17.15
t值		18.537	15.613	15.816
P值		<0.001	<0.001	<0.001

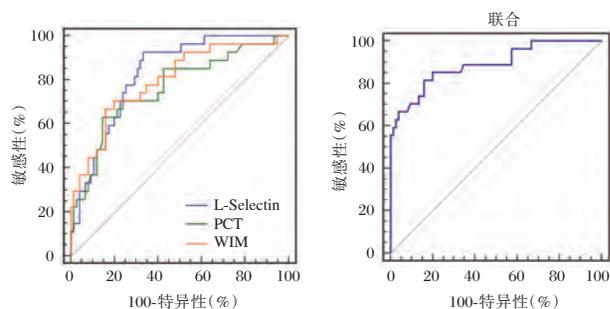


图2 预测病死的ROC曲线

Figure 2 ROC to predict mortality

表5 ROC分析结果

Table 5 ROC analysis results

指标	AUC	95%CI	Z统计	cut-off值	敏感度(%)	特异度(%)	P值
L-Selectin	0.827	0.739~0.894	7.886	>140.96 ng/mL	92.59	66.67	<0.001
PCT	0.761	0.667~0.840	4.601	>9.39 μ g/mL	62.96	85.33	<0.001
VIM	0.796	0.704~0.869	5.697	>333.63 pg/mL	66.67	84.00	<0.001
联合	0.890	0.813~0.943	9.705		81.48	84.00	<0.001

VIM是一种具有多重效应的物质:参与细胞信号转导、调控基因组DNA表达、参与构成细胞衔接、调节细胞迁移、黏附及凋亡^[13]。在体外脂多糖试验中,VIM的过表达可阻止细胞引起的脂多糖凋亡,抑制VIM则导致凋亡分子表达上调,通过调节促炎和抗炎细胞因子的平衡,调节感染后先天免疫过程^[14]。Su L等^[15]报道显示,血清VIM在败血症患者中表达明显升高,本研究观点与之相似。VIM能与细菌相互作用,产生免疫炎症反应,并能在炎症介质刺激下,直接参与炎症反应,在脓

毒,释放炎症介质,参与细菌清除、炎症反应、创伤等^[9-10]。与正常人群相比,脓毒症患者L-Selectin表达升高,并随脓毒症病情加重,呈显著递增趋势。其原因可能是脓毒症发生后,炎症介质激活了血管内皮细胞,使其表达黏附分子相应配体,刺激L-Selectin合成,以与相应的配体结合,增强血管内皮细胞黏附作用,使白细胞活化变形,穿越血管内皮细胞至炎症区域;L-Selectin是体内无氧代谢的中间产物,能反映机体组织氧供、灌注量、代谢状态,脓毒症患者常因休克、呼吸衰竭等,引起组织缺血缺氧,无氧代谢增加,使L-Selectin明显增加^[10]。不同预后患者中,病死者L-Selectin较存活者高,说明高L-Selectin与不良预后有关。

PCT是降钙素的前肽物质,其诱导受严格调节,是细菌感染的特异性指标,在外周中表达与炎症反应的严重程度有关。脓毒症患者PCT高于正常人群,且随着病情加重,PCT呈显著递增趋势,与Kleinbrahm K等^[11]报道一致。PCT在正常情况下,主要由甲状腺C细胞产生,并被剪切,外周血含量甚微,但脓毒症患者存在明显感染、机体免疫系统的激活、炎症反应,可刺激PCT大量表达,因此检测PCT水平可为临床评估脓毒症病情、指导抗生素应用、管理脓毒症等提供重要的参考信息^[12]。且与存活者相比,病死者PCT水平较高,与不良预后有关,证实PCT可为临床预测脓毒症患者预后提供一定参考。

毒症发病中起到重要作用。本研究不足之处在于,尚不明确L-Selectin、PCT、VIM是否可用于不同类型脓毒症的诊断,仍有待后续进一步探讨。

综上所述,脓毒症患者L-Selectin、PCT、VIM表达随病情加重逐渐升高,与患者病情、预后密切相关,有望成为预测预后的血清学标志物。

参考文献

[1] 贾启明,张涛,贺娜娜,等.脓毒症患者循环miR-21、miR-155变化与炎症细胞因子和心功能障碍的相关性[J].分子

- 诊断与治疗杂志, 2020, 12(4):433-436, 449.
- [2] 中国医师协会急诊医师分会, 中国研究型医院学会休克与脓毒症专业委员会. 中国脓毒症/脓毒性休克急诊治疗指南(2018)[J]. 感染、炎症、修复, 2019, 20(1):3-22.
- [3] 刘振江, 李世蓉. L-选择素及血乳酸清除率在重症感染患者预后评价中的意义[J]. 中国药物与临床, 2019, 19(9):84-86.
- [4] 刘蕾蕾, 华玮, 居培红, 等. 脓毒症患者血清中白细胞介素-6和降钙素原表达及其临床意义[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2019, 11(06):527-530.
- [5] 肖汉森, 谢茜, 钟家禹, 等. 波形蛋白对EV71感染小鼠脑组织引起NLRP3炎性小体活化的影响[J]. 南方医科大学学报, 2018, 38(6):704-710.
- [6] 中国医师协会急诊医师分会, 中国研究型医院学会休克与脓毒症专业委员会. 中国脓毒症/脓毒性休克急诊治疗指南(2018)[J]. 中国急救医学, 2018, 38(9):741-756.
- [7] Cheng Z, Yang YJ, Jing XG, et al. Diagnostic value of HBP, PCT combined with APACHE II score respectively in ventilator-associated pneumonia [J]. Natl Med J China, 2019, 99(22):1698-1702.
- [8] Yaghoubian A, Batter T, Mozafarpour S, et al. Use of the Quick Sequential Organ Failure Assessment Score for Prediction of Intensive Care Unit Admission Due to Septic Shock after Percutaneous Nephrolithotomy: A Multicenter Study [J]. J Urol, 2019, 202(2):314-318.
- [9] Cappenberg A, Margraf A, Thomas K, et al. L-selectin shedding affects bacterial clearance in the lung: a new regulatory pathway for integrin outside-in signaling [J]. Blood, 2019, 134(17):1445-1457.
- [10] Dong Y, Lagarde J, Xicota L, et al. Neutrophil hyperactivation correlates with Alzheimer's disease progression [J]. Ann Neurol, 2018, 83(2):387-405.
- [11] Kleinbrahm K, Wappler F, Sakka SG. Role of Procalcitonin as a Sepsis Marker [J]. Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther, 2019, 54(6):424-433.
- [12] Iankova I, Thompson-Leduc P, Kirson NY, et al. Efficacy and Safety of Procalcitonin Guidance in Patients With Suspected or Confirmed Sepsis: A Systematic Review and Meta-Analysis [J]. Crit Care Med, 2018, 46(5):691-698.
- [13] Sallustio F, Stasi A, Curci C, et al. Renal progenitor cells revert LPS-induced endothelial-to-mesenchymal transition by secreting CXCL6, SAA4, and BPIFA2 antiseptic peptides [J]. FASEB J, 2019, 33(10):10753-10766.
- [14] Su LX, Pan P, Wang XT, et al. Vimentin modulates apoptosis and inflammatory cytokine release by a human monocytic cell line (THP-1) in response to lipopolysaccharides in vitro [J]. Chin Med J (Engl), 2019, 132(11):1336-1343.
- [15] Su L, Pan P, Yan P, et al. Role of vimentin in modulating immune cell apoptosis and inflammatory responses in sepsis [J]. Sci Rep, 2019, 9(1):5747.

(上接第 1194 页)

- [7] 段然, 孙路明, 漆洪波. 《胎儿生长受限专家共识(2019版)》发布[J]. 中华医学信息导报, 2019(13):12-12.
- [8] MacDonald TM, Tran C, Kaitu'u-Lino TJ, et al. Assessing the sensitivity of placental growth factor and soluble fms-like tyrosine kinase 1 at 36 weeks' gestation to predict small-for-gestational-age infants or late-onset preeclampsia: a prospective nested case-control study [J]. BMC Pregnanc Chil, 2018, 18(1):354-358.
- [9] Sano T, Terai Y, Daimon A, et al. Recombinant human soluble thrombomodulin as an anticoagulation therapy improves recurrent miscarriage and fetal growth restriction due to placental insufficiency - The leading cause of preeclampsia [J]. Placenta, 2018, 65(2):1-6.
- [10] Sharp A, Chappell LC, Dekker G, et al. Placental Growth Factor informed management of suspected pre-eclampsia or fetal growth restriction: The MAPPLE cohort study [J]. Pregnanc hypertens, 2018, 14(5):228-233.
- [11] 程惠, 周曙光. PLGF、IL-6 与妊娠期高血压病情程度及母婴结局的相关性[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(5):674-677.
- [12] Takahashi N, Li F, Fushima T, et al. Vitamin B Nicotinamide: A Promising Candidate for Treating Preeclampsia and Improving Fetal Growth [J]. Tohoku J Exp Med, 2018, 244(3):243-248.
- [13] Ormsher L, Johnstone ED, Shawkat E, et al. A clinical evaluation of placental growth factor in routine practice in high-risk women presenting with suspected pre-eclampsia and/or fetal growth restriction [J]. Pregnanc hypertens, 2018, 14(8):234-239.
- [14] Manriquez Rocha B, Mbofana F, Loquiha O, et al. Early diagnosis of preeclampsia using placental growth factor: An operational pilot study in Maputo, Mozambique [J]. Pregnanc hypertens, 2018, 11(7):26-31.
- [15] Zur RL, Kingdom JC, Parks WT. The Placental Basis of Fetal Growth Restriction [J]. Obstet Gynecol Clin North Am, 2020, 47(1):81-98.
- [16] Kooiman J, Terstappen F, van Wagenveld L, et al. Conflicting Effects of Fetal Growth Restriction on Blood Pressure Between Human and Rat Offspring: A Meta-Analysis [J]. Hypertension, 2020, 75(3):806-818.

绿色环保型血清补体抑制剂聚天冬氨酸(钠)在免疫检测试剂中的应用

陈立勇* 刘仁源 张瑜

[摘要] **目的** 鉴定一种用于抗血清补体干扰的绿色环保型免疫检测阻断剂。**方法** 用抗体抗原反应缓冲液将聚天冬氨酸(钠)配制成系列浓度;再用聚天冬氨酸钠溶液处理临床血清样本;接着用制备的癌胚抗原(CEA)检测试剂检测处理后的血清样本;最后与商业化罗氏试剂对比检测结果,并评价聚天冬氨酸钠抗血清补体干扰的效果。**结果** 临床血清样本经聚天冬氨酸(钠)溶液处理后,可以提高免疫检测试剂抗血清补体干扰作用。与罗氏试剂对比,阻断剂添加前后相关性 R^2 值从0.937 5提高到0.954 5。优于EDTA的处理效果(r^2 值为0.943 0)。**结论** 聚天冬氨酸(钠)作为绿色环保型除垢剂,可以用于免疫检测试剂中。聚天冬氨酸(钠)的加入有利于增强试剂抗血清干扰能力,提高检测结果的准确性。

[关键词] 聚天冬氨酸(钠);免疫检测干扰;阻断剂

Application of an environmental protection and pollution - free serum complement inhibitor polyaspartic acid sodium in immunoassay reagents

CHEN Liyong*, LIU Renyuan, ZHANG Yu

(Dongguan Dongyangguang Diagnostic Products Co., Ltd, Dongguan, Guangdong, China, 523867)

[ABSTRACT] **Objective** To identify a green environmental friendly immunoassay blocker against serum complement interference. **Methods** A series of concentrations of polyaspartic acid (sodium) were prepared with antibody and antigen reaction buffer. The serum samples were treated with polyaspartic acid sodium solution, and then the pretreated serum samples were detected with the prepared CEA reagent. Finally, the results were compared with commercial Roche reagent, and the effect of anti-interference of polyaspartic acid sodium was evaluated. **Results** After clinical serum samples are treated with polyaspartic acid (sodium) solution, the anti-serum complement interference effect of immunoassay reagents can be improved. Compared with Roche's reagent, the correlation R^2 value before and after the addition of the blocking agent increased from 0.937 5 to 0.954 5. The treatment effect is better than EDTA (R^2 value is 0.943 0). **Conclusion** Polyaspartic acid (sodium), as a green environmentally friendly detergent, can be used in immunoassay reagents. The addition of polyaspartic acid (sodium) is beneficial to enhance the reagent's anti-serum interference ability and improve the accuracy of detection results.

[KEY WORDS] PASP; Immunoassay interference; Blocker

基于抗体抗原的夹心免疫检测中血清补体是一个重要的干扰因素,常常会造成检测结果的假阳性或假阴性^[1]。对血清干扰物的消减程度是检验试剂盒质量的重要指标,也是目前国内试剂与

进口试剂质量的差距之一。普通金属螯合剂(Ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)在一定程度上能够消减血清中补体对免疫检测的干扰作用,但是生物降解性极差,易造成环境污染^[2],而且

作者单位:东莞市东阳光诊断产品有限公司,东莞,广东 523867

*通信作者:陈立勇, E-mail: chenliyong@hec.cn

注:刘仁源和陈立勇为并列第一作者

EDTA可使血小板聚集^[3],影响检测结果。因此,寻找一种绿色环保型血清补体抑制剂对提升免疫检测试剂盒的质量,同时又保护环境显得非常重要。本研究采用双抗体夹心化学发光法,通过检测临床病人血清样本中抗原含量,同时与罗氏试剂盒做对比研究,鉴定了一种绿色环保型血清补体抑制剂--聚天冬氨酸钠(polyaspartic acid, PASP),该试剂可用于免疫检测中,并提高免疫检测试剂与罗氏试剂检测结果的相关性。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA) 配对抗体购自菲鹏生物股份有限公司(货号:3CEA-23和CEA-100),分别作为酶标记抗体和捕获抗体。碱性磷酸酶购自瑞士罗氏公司(货号:03535452103)。生物素、蛋白交联剂、链霉亲和素磁珠均购自美国 Thermo Fisher 公司(货号分别是:21343,23456,65601)。聚天冬氨酸钠购自上海源叶生物科技有限公司(货号:S25535)化学发光底物购自深圳市美凯特科技有限公司(货号:Tntlus-A03)。美国 Molecular Devices SpectraMax i3X 多功能酶标仪,瑞士 Tecan HydroFlex™ 多功能洗板机,德国 BMG LABTECH SPECTROstar Nano 超微量分光光度计

1.2 样本收集

医院收集的 CEA 阳性血清样本经罗氏 e411 分析仪及其配套 CEA 检测试剂盒测定。

1.3 方法

1.3.1 缓冲液配制

抗原、生物素化抗体稀释液及抗体抗原反应缓冲液:20 mM 磷酸盐缓冲液(phosphate buffer, PB, pH8.0)+0.9% NaCl+0.5%牛血清白蛋白(Bovine Serum Albumin, BSA)+0.05% ProClin 300。

酶标抗体稀释液:20 mM PB(pH8.0)+5 mM MgCl₂+10 μM ZnCl₂+0.9% NaCl+0.5% BSA+0.05% ProClin 300。

1.3.2 生物素标记抗体

取 2 mg/mL IgG(免疫球蛋白 G, immunoglobulin G)/PBS(磷酸盐缓冲液, phosphate buffered solution) 1 mL,加入 27 μL 10 mM 活化生物素,室温反应 30 min,用脱盐柱去除未反应的生物素。280 nm 吸光度测蛋白浓度。用生物素化抗体稀释液

调整浓度为 4 mg/L。

1.3.3 酶标记抗体

取 2 mg/mL 酶/PBS 1 mL,加入 1 mg/mL Sulfo-SMCC(4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸磺酰基琥珀酰亚胺酯钠盐, 4-(N-Maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylic acid 3-sulfo-N-hydroxysuccinimide ester sodium salt) 22 μL,室温反应 30 min,用脱盐柱去除未反应的 Sulfo-SMCC。取 2 mg/mL IgG/PBS 1 mL,加入 4 mg/mL SATA(N-丁二酸 S-乙酰基巯基乙二醇酯, N-Succinimidyl-S-Acetyl-Thioacetate)/DMF(N,N-二甲基甲酰胺, N,N-Dimethylformamide) 7 μL,室温反应 30 min,加入 100 μL 偶联缓冲液(含有 5 mg 的 Hydroxylamine·HCl),室温反应 2 h。用脱盐柱去除未反应的试剂。280 nm 吸光度测蛋白浓度。用酶标抗体稀释液调整浓度为 4 mg/L。

1.3.4 CEA 抗原标准液配制

用抗原稀释液将 CEA 标准品稀释成 675.0 ng/mL、337.5 ng/mL、84.4 ng/mL、42.2 ng/mL、21.1 ng/mL、10.5 ng/mL、5.3 ng/mL 及 0.0 ng/mL。

1.3.5 含 PASP 阻断剂反应缓冲液配制

用抗体抗原反应缓冲液将 PASP 配制成各种浓度:0.00 mg/L、4.19 mg/L、8.38 mg/L、16.75 mg/L、33.50 mg/L。

1.3.6 双抗体夹心化学发光法检测无血清抗原稀释液稀释的 CEA

反应:10 μL CEA 抗原,10 μL 含阻断剂反应缓冲液,混匀;10 μL 链霉亲和素磁珠(4 mg/mL),50 μL 生物素化抗体和 50 μL 酶标抗体;混匀,37℃ 孵育 5 min;洗涤:磁吸 2 min,去上清;加入 200 μL 洗涤液(50 mM 7.4 Tris[三(羟甲基)氨基甲烷缓冲液, Tris(hydroxymethyl)aminomethane]+0.9% NaCl+0.5% Triton-X100(聚乙二醇辛基苯基醚, 2-(2-[4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)phenoxy]ethoxy)eth) + 0.1% TW20(聚氧乙烯(20)山梨醇单月桂酸酯, Polyoxyethylene(20) Sorbitan Monolaurate) + 0.025% ProClin 300 防腐剂,磁吸 2 min,去上清。重复洗涤三次。发光:加入 150 μL AMPPD(3-(2-螺旋金刚烷)-4-甲氧基-4-(3-磷氧酰)-苯基-1,2-二氧环乙烷二钠盐, 3-[2-spiroadamantane]-4-methoxy-4-[3-phosphoryloxy]-phenyl-1,2-dioxetane)底物液,混匀,37℃ 孵育 3 min。检测:使用酶标仪测发光。

1.3.7 双抗体夹心化学发光法检测 CEA 阳性临床血清样本

反应:向 96 孔板分别加入 10 μL CEA 阳性临床血清, 10 μL 各浓度的 PASP 阻断剂, 混匀; 加入 10 μL 链霉亲和素磁珠(4 mg/mL), 50 μL 生物素化抗体和 50 μL 酶标抗体; 混匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 5 min。洗涤:磁吸 2 min, 去上清; 加入 200 μL 洗涤液(50 mM 7.4 Tris+0.9% NaCl+0.5% Triton-X100+0.1% TW20+0.025%ProClin 300), 磁吸 2 min, 去上清。重复洗涤三次。

发光:加入 150 μL AMPPD 底物液, 混匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 3 min。检测:使用酶标仪检测发光。以上为

实验组,同时设置对照组,对照组与实验组的区别在于不采用 PASP 阻断剂而采用 15 mM EDTA 作为阻断剂。

1.3.8 数据统计学分析

标准差 SD, 变异系数 CV, 皮尔逊相关系数 R^2 均采用 Microsoft Excel 表分析。

2 结果

2.1 聚天冬氨酸或其盐对抗体抗原反应的影响

反应试剂中不同浓度阻断剂对同一浓度 CEA 检测结果影响不大, 变异系数(Coefficient of Variation, CV)均在 5%以内, 见表 1。

表 1 PASP 对 CEA 检测结果的影响

Table 1 The effect of PASP on detection of CEA in buffer solution

CEA 抗原浓度 (ng/mL)	PASP 加入量(mg/L)					平均值	SD	CV(%)
	0	4.19	8.38	16.75	33.50			
675	2 162 176	2 222 028	2 177 057	2 151 109	2 062 651	2 155 004	58 254	2.70
337.5	1 221 977	1 291 192	1 278 793	1 214 832	1 206 803	1 242 719	39 207	3.15
84.4	436 484	449 120	451 637	425 863	418 522	436 325	14 358	3.29
42.2	248 375	247 671	255 169	241 936	236 354	245 901	7 107	2.89
21.1	132 178	138 807	138 729	132 301	130 028	134 409	4 081	3.04
10.5	72 281	72 984	75 419	73 966	73 127	73 555	1 202	1.63
5.3	38 565	40 443	39 486	39 988	38 565	39 409	842	2.14
0	1 219	1 002	1 691	1 139	1 586			

2.2 含有聚天冬氨酸或其盐的免疫试剂检测 CEA 临床阳性血清样本与罗氏试剂检测结果的相关性分析

不加 PASP 条件下, 检测值与临床标示值相关性 R^2 为 0.937 5。15 mM 的 EDTA 加入将 R^2 值提高到 0.943 0。加入 8.38 mg/L 的 PASP 可以将 R^2 值提高到 0.954 5。见图 1、表 2。

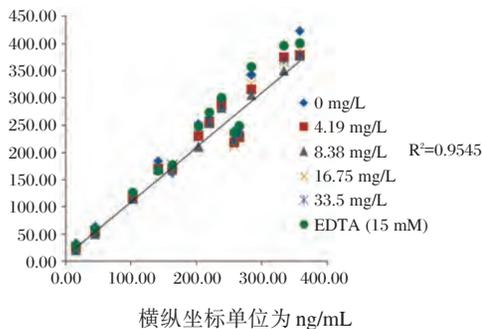


图 1 含 PASP 试剂检测临床血清中 CEA 与罗氏试剂检测值相关性

Figure 1 Correlation of detection CEA in serum between the reagent added PASP and Roche

表 2 含 PASP 试剂检测临床血清中 CEA 与罗氏试剂检测值相关性分析

Table 2 Correlation of detection CEA in serum between the reagent added PASP and Roche

样品浓度 (ng/mL)	PASP(mg/L)					EDTA 对照 (15 M)
	0.00	4.19	8.38	16.75	33.50	
15.22	33.65	25.75	19.89	25.16	24.33	29.54
44.77	63.63	54.61	49.63	55.33	55.77	59.18
102.70	125.83	117.75	115.26	118.05	118.37	126.14
142.10	184.81	170.71	168.94	171.44	170.11	167.15
219.70	262.23	253.22	252.95	256.53	256.94	273.64
238.10	296.03	287.62	281.34	288.27	285.94	299.86
163.30	162.73	171.07	168.46	177.37	177.70	177.17
203.20	252.26	229.84	210.64	227.01	246.71	247.12
258.00	238.40	217.10	220.80	211.15	223.59	235.01
265.30	237.99	227.29	232.76	238.17	237.56	248.32
284.00	342.00	315.62	304.57	325.84	351.13	357.54
334.10	397.69	374.27	350.41	365.47	369.74	396.63
358.10	422.88	378.19	377.43	387.82	379.34	401.14
相关性 R^2	0.937 5	0.938 9	0.954 5	0.940 4	0.937 6	0.943 0

3 讨论

血清干扰物分为内源性干扰和外源性干扰,内源性干扰包括人抗动物抗体(如人抗鼠抗体(human antimouse antibody, HAMA))、类风湿因子(rheumatoid factor, RF)、嗜异性抗体、补体、自身抗体、黄疸、高脂等^[1,4]。外源性干扰包括溶血、标本染菌、保持时间过长、血液凝固不彻底、离心不充分等。其中血清补体是一个重要的干扰因素^[1,5-6]。在磁微粒化学发光反应中,抗体固相磁珠、生物素化抗体与链霉亲和素磁珠反应或抗体与抗原结合后,抗体构型会发生改变,暴露其Fc段补体C1q结合位点。激活的补体复合物C1由18聚体C1q、两个C1r和两个C1s分子组成:C1q(C1qA-C1qB-C1qC)₆-(C1r-C1s)₂,因此一个补体分子可以结合多个抗体。在直接双抗体夹心反应中,又分为一步法及二步法。一步法是俘获抗体、抗原及检测抗体一起反应二步法是俘获抗体先与抗原反应,在此反应过程中在间接免疫反应中,激活的补体C1与多个被检抗体结合,也可能阻碍检测二抗与被检抗体的结合,造成假阴性反应。因此,为了更准确的获得免疫检测结果,在检测抗原或抗体的免疫反应试剂中添加一些阻断剂阻碍补体激活,就能够减少补体对检测结果的干扰。

成人血清钙含量约2.1~2.8 mmol/L。补体C1激活及其复合物的形成需要Ca²⁺离子^[7-8],金属离子阻断剂可以螯合血清中的钙、镁等离子,能够阻断C1复合物形成,阻止补体激活级联反应。因此,在抗原抗体免疫反应中添加一定量金属离子阻断剂,能够消除或减弱补体对免疫反应的干扰。金属离子阻断剂可以通过阻断剂分子与金属离子的强结合作用,将金属离子包合到阻断剂内部,变成稳定的,分子量更大的化合物,从而阻止金属离子起作用。常用的阻断剂包括:乙二胺四乙酸(EDTA)、二亚乙基三胺五乙酸(diethylenetriamine-pentaacetic acid, DTPA)、氨基三乙酸(nitrilotriacetic acid, NTA)、三聚磷酸钠(sodium tripolyphosphate, STPP)等。这些传统阻断剂使用广泛,但是存在环保问题。如:EDTA、DTPA及盐等生物降解性极差,欧洲一些国家禁止或限制使用EDTA、DTPA。STPP含磷丰富,会加剧湖泊和河流的营养化,严重的影响了生态环境的平衡^[9]。还有一

些阻断剂,本身无毒,但是可以长期存在于环境中,无法被微生物降解,比如聚丙烯酸类,也不符合“绿色化学”理念。因此,从绿色环保角度选择合适的阻断剂至关重要。

聚天冬氨酸盐(PASP)是绿色金属离子阻断剂的代表^[10]。PASP天然存在于蜗牛和软体动物壳内,其结构类似蛋白质,含有肽键和羧基等活性基团的结构特点,具有极强的螯合、分散、吸附等作用。它能够被微生物分解成二氧化碳、水等对环境无害的物质,具有良好的生物降解性,是目前国际公认的无毒、对环境无污染的绿色阻断剂^[11]。美国 donlar 公司因化工合成聚天冬氨酸荣获“总统绿色化学挑战奖”。

采用样本比对的测值相关性分析是评价检测试剂性能的常用方法^[12]。本研究在抗体抗原免疫检测中发现聚天冬氨酸盐(PASP)作为一种绿色环保型金属离子螯合剂,其能够抑制补体激活,且对双抗体夹心免疫反应中抗原的检测没有显著影响,PASP的加入能够提高检测试剂对临床阳性血清样本中抗原检测结果与进口试剂检测结果的相关性。PASP用量少、无污染、绿色环保,且能够提高试剂盒的质量,其在免疫检测中具有重要的应用价值。

参考文献

- [1] 李瑾. 免疫检测的干扰因素分析和控制措施研究[J]. 中国卫生产业, 2017, 14(12):49-50.
- [2] 蒋连,陈杨武,王龙辉,等. 乙二胺四乙酸(EDTA)生物处理研究进展[J]. 绵阳师范学院学报, 2019, 38(5):80-88.
- [3] 于明,靳海龙,张宝秋,等. 27例乙二胺四乙酸依赖性假性血小板减少特点及临床分析[J]. 国际检验医学杂志, 2016, 37(9):1200-1204.
- [4] Ward G, Simpson A, Boscato L. The investigation of interferences in immunoassay[J]. Clin Biochem, 2017, 50(18):1306-1311.
- [5] Wang J, Meade J, Brown N. EDTA is superior to DTT treatment for overcoming the prozone effect in HLA antibody testing[J]. HLA, 2017, 89(2):82-89.
- [6] Weinstock C, Schnaidt M. The complement-mediated prozone effect in the Luminex single-antigen bead assay and its impact on HLA antibody determination in patient sera[J]. Int J Immun, 2013, 40(3):171-177.
- [7] Kojouharova M, Reid K, Gadjeva M. New insights into the molecular mechanisms of classical complement activation[J]. Mol Imm, 2010, 47(13):2154-2160.

血清 TLR2、TLR4 水平与 2 型糖尿病肾病患者肾功能及炎症状态的关系分析

华燕* 武金文 刘欣

[摘要] 目的 分析血清 toll 样受体 2 (TLR2)、toll 样受体 4 (TLR4) 水平与 2 型糖尿病肾病 (DKD) 患者肾功能及炎症状态的关系。方法 选取 2017 年 1 月至 2020 年 1 月本院收治的 120 例 2 型糖尿病 (T2DM) 患者为研究对象, 根据尿白蛋白排泄率 (UAER) 分为单纯 T2DM 组 (UAER < 20 $\mu\text{g}/\text{min}$, $n=40$)、早期 DKD 组 ($20 \mu\text{g}/\text{min} \leq \text{UAER} < 200 \mu\text{g}/\text{min}$, $n=50$) 和临床 DKD 组 (UAER $\geq 200 \mu\text{g}/\text{min}$, $n=30$), 同时选取同期于本院进行体检的 40 例健康者作为对照组, 检测各组血清 TLR2、TLR4 水平、肾功能指标 [肌酐 (Scr)、24 h 尿微量白蛋白尿 (24 h UMA)、尿素氮 (BUN)] 和炎症状态 [超敏 C 反应蛋白 (hs-CRP)、肿瘤坏死因子 (TNF- α)、白介素-6 (IL-6)、白介素-8 (IL-8)], 分析血清 TLR2、TLR4 水平与 Scr、24 h UMA、BUN、hs-CRP、TNF- α 、IL-6 及 IL-8 水平的相关性。结果 单纯 T2DM 组、早期 DKD 组、临床 DKD 组及对照组的性别、年龄、病程及体重指数比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。血清 TLR2、TLR4、Scr、24 h UMA、BUN 水平比较结果: 临床 DKD 组 > 早期 DKD 组 > 单纯 T2DM 组 > 对照组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。血清 hs-CRP、TNF- α 、IL-6 及 IL-8 水平比较结果: 临床 DKD 组 > 早期 DKD 组 > 单纯 T2DM 组 > 对照组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。Spearman 相关分析显示, 血清 TLR2、TLR4 水平与 Scr、24 h UMA、BUN、4h UMA、BUN、hs-CRP、TNF- α 、IL-6 及 IL-8 水平呈正相关 ($P < 0.05$)。结论 DKD 患者血清 TLR2、TLR4 水平升高, 肾功能指标和炎症因子升高, 且血清 TLR2、TLR4 水平与肾功能及炎症状态呈正相关性。

[关键词] 2 型糖尿病肾病; TLR2; TLR4; 肾功能

Analysis of the relationship between serum TLR2 and TLR4 levels and renal function and inflammatory status in patients with type 2 diabetic nephropathy

HUA Yan*, WU Jinwen, LIU Xin

(Department of Endocrinology, the Second People's Hospital of Yibin, Yibin, Sichuan, China, 644000)

[ABSTRACT] Objective To analyze the relationship between serum TLR2 and TLR4 levels and renal function and inflammatory status in patients with type 2 diabetic nephropathy (DKD). Methods A total of 120 patients with type 2 diabetes (T2DM) who were admitted to our hospital from January 2017 to January 2020 were selected as the research subjects. According to the urine albumin excretion rate (UAER), they were divided into the simple T2DM group (UAER < 20 $\mu\text{g}/\text{min}$, $n=40$), the early DKD group ($20 \mu\text{g}/\text{min} \leq \text{UAER} < 200 \mu\text{g}/\text{min}$, $n=50$) and the clinical DKD group (UAER $\geq 200 \mu\text{g}/\text{min}$, $n=30$). At the same time, select those who have undergone physical examination in our hospital during the same period 40 healthy people served as the control group to detect serum TLR2, TLR4 levels, renal function indicators [serum creatinine (Scr), 24 h urine microalbuminuria (24 h UMA), urea nitrogen (BUN)] and inflammation status [High-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP), tumor necrosis factor (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8)]. The

基金项目: 四川省卫生和计划生育委员会科研基金资助项目 (18PJ109)

作者单位: 宜宾市第二人民医院内分泌科, 四川, 宜宾 644000

*通信作者: 华燕, E-mail: yhjzphz9206@sina.com

correlation between serum TLR2 and TLR4 levels and Scr, 24 h UMA, BUN, hs-CRP, TNF- α , IL-6 and IL-8 levels were analyzed. **Results** There was no statistically significant difference in gender, age, course of disease and body mass index between the T2DM group alone, the early DKD group, the clinical DKD group and the control group ($P>0.05$). Serum TLR2, TLR4, Scr, 24 h UMA, BUN level comparison results: clinical DKD group > early DKD group > T2DM group > control group, the difference was statistically significant ($P<0.05$). Comparison of serum hs-CRP, TNF- α , IL-6 and IL-8 levels: clinical DKD group > early DKD group > T2DM group > control group, the difference was statistically significant ($P<0.05$). Spearman correlation analysis showed that serum TLR2 and TLR4 levels were positively correlated with Scr, 24 h UMA, BUN, 4h UMA, BUN, hs-CRP, TNF- α , IL-6 and IL-8 levels ($P<0.05$). **Conclusion** Serum TLR2 and TLR4 levels in patients with DKD increased, renal function indicators and inflammatory factors increased, and serum TLR2 and TLR4 levels were positively correlated with renal function and inflammation.

[KEY WORDS] Type 2 diabetic nephropathy; TLR2; TLR4; Renal function

2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)是临床常见慢性疾病,长期高血糖会诱发一系列并发症,其中糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是常见微血管并发症,随着糖尿病发病率的逐渐升高, DN发病率亦呈上升趋势,严重威胁患者生命安全^[1-2]。2型糖尿病肾病(diabetic kidney diabetic, DKD)受多种因素影响,而炎症因子在DKD患者肾脏损伤中的机制已成为人们关注重点^[3]。血清 toll 样受体 2(toll like receptor 2, TLR2)和 toll 样受体 4(toll like receptor 4, TLR4)是细胞炎性因子,均参与DKD发生、发展过程,其能够特异性识别病原成分并启动天然免疫,并通过刺激免疫细胞分泌大量细胞因子和趋化因子,进而诱导获得性免疫^[4]。超敏C反应蛋白(high sensitivity C-reaction protein, hs-CRP)、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF- α)、白介素-6(interleukin-6, IL-6)、白介素-8(interleukin-8, IL-8)是经典炎性因子,参与DKD发生发展进程^[5]。本研究旨在探讨血清TLR2、TLR4水平与肾功能及炎症状态的关系,为临床诊治提供参考,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2017年1月至2020年1月本院收治的120例T2DM患者为研究对象,将120例T2DM患者根据UAER分为单纯T2DM组(UAER<20 $\mu\text{g}/\text{min}$, $n=40$)、早期DKD组($20\leq\text{UAER}<200$ $\mu\text{g}/\text{min}$, $n=50$)和临床DKD组(UAER ≥ 200 $\mu\text{g}/\text{min}$, $n=30$)^[7],同时选取同期于本院进行体检的40例健康者作为对照组。

纳入标准:①均符合《中国2型糖尿病防治指南》中DKD诊断标准^[6]:6个月内连续2次以上尿白蛋白排泄率(urinary albumin excretion rates, UAER)为20~200 $\mu\text{g}/\text{min}$,糖化血红蛋白(hemoglobin A1C, HbA1C)>7.0%;②年龄50~80岁;③签署本院伦理委员会出具的知情同意书。排除标准:①严重肝肾功能不全者;②合并自身免疫系统疾病及其他恶性肿瘤者;③合并其他精神障碍者;④3个月内服用过糖皮质激素、利尿药及血管紧张素转换酶抑制剂药物;⑤合并明显大血管并发症者;⑥糖尿病急性并发症者。

1.2 方法

1.2.1 临床资料

记录两组性别、年龄、病程及体重指数。

1.2.2 血清TLR2、TLR4水平测定

取外周静脉血4 mL,其中2 mL分装于EDTA抗凝管中, -80 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻备用,剩余2 mL在3 000 rpm/min下离心5 min,进行离心沉淀细胞,分离上清液, -80 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻备用。使用血液基因组柱式提取试剂盒(康为世纪生物科技有限公司)提取DNA,步骤严格按照说明书操作。

1.2.3 肾功能指标测定

取晨起空腹静脉血4 mL,保存于EDTA抗凝管中,在3 000 rpm/min下离心10 min,进行离心沉淀细胞,分离上清液,采用全自动生化仪(贝克曼库尔特公司AU5800及配套试剂)检测血肌酐(serum creatinine, Scr)、24 h尿微量白蛋白尿(24 h urine microalbuminuria, 24 h UMA)、尿素氮(urea nitrogen, BUN)水平。

1.2.4 炎症状态测定

采用酶联免疫吸附法(美国Bio-Tek ELX-800

酶标仪及配套试剂)检测 hs-CRP、TNF- α 、IL-6 及 IL-8 水平。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 18.0 软件处理数据,计量资料以 ($\bar{x} \pm s$)表示,多组比较采用 F 检验,两两比较采用 t 检验,相关性采用 Spearman 相关分析,以相关系数 r 表示两资料间的相关性, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 4组间临床资料比较

单纯 T2DM 组、早期 DKD 组、临床 DKD 组及对照组的性别、年龄、病程及体重指数比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 4组临床资料比较 ($\bar{x} \pm s$)

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

组别	<i>n</i>	男/女	年龄 (岁)	病程 (年)	体重指数 (g/m ²)
单纯 T2DM 组	30	17/13	61.54±6.23	10.62±3.05	24.10±5.51
早期 DKD 组	50	26/24	62.10±6.28	9.95±3.01	23.98±5.48
临床 DKD 组	40	21/19	62.88±6.30	11.28±3.10	24.33±5.57
对照组	40	17/13	61.63±6.26	-	23.79±5.44
χ^2/F 值	0.181	0.407	2.120	0.045	
P 值	0.914	0.667	0.125	0.856	

2.2 血清 TLR2、TLR4、Scr、24 h UMA、BUN 比较

血清 TLR2、TLR4、Scr、24 h UMA、BUN 水平

比较结果:临床 DKD 组 > 早期 DKD 组 > 单纯 T2DM 组 > 对照组,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

2.3 血清炎症因子水平比较

血清 hs-CRP、TNF- α 、IL-6 及 IL-8 水平比较结果:临床 DKD 组 > 早期 DKD 组 > 单纯 T2DM 组 > 对照组,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见表 3。

2.4 血清 TLR2、TLR4 水平与 Scr、24 h UMA、BUN 水平和 hs-CRP、TNF- α 、IL-6、IL-8 水平的相关性

Spearman 相关分析显示,血清 TLR2、TLR4 水平与 Scr、24 h UMA、BUN、4 h UMA、BUN、hs-CRP、TNF- α 、IL-6 及 IL-8 水平呈正相关($P < 0.05$)。见表 4。

表 4 血清 TLR2、TLR4 水平与 Scr、24 h UMA、BUN 水平和 MCP-1、CRP、TNF- α 、IL-6、IL-8 水平的相关性

Table 4 Correlation between serum TLR2, TLR4 and levels of Scr, 24 h UMA, BUN, MCP-1, CRP, TNF- α , IL-6, IL-8

指标	TLR2		TLR4	
	r 值	P 值	r 值	P 值
Scr	0.352	0.019	0.362	0.021
24h UMA	0.367	0.028	0.330	0.018
BUN	0.350	0.039	0.343	0.022
hs-CRP	0.341	0.021	0.341	0.014
TNF- α	0.338	0.017	0.351	0.011
IL-6	0.357	0.022	0.360	0.017
IL-8	0.361	0.011	0.339	0.015

表 2 肾功能指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of renal function indexes ($\bar{x} \pm s$)

项目	单纯 T2DM 组 ($n=30$)	早期 DKD 组 ($n=50$)	临床 DKD 组 ($n=40$)	对照组 ($n=30$)	F 值	P 值
血清 TLR2	56.79±12.62 ^{abc}	60.55±14.03 ^{ab}	67.82±18.65 ^a	53.32±10.11	4.788	0.010
血清 TLR4	54.05±12.87 ^{abc}	59.05±15.50 ^{ab}	65.99±17.17 ^a	50.88±10.37	5.253	0.007
Scr (umol/L)	99.56±16.77 ^{abc}	115.69±20.96 ^{ab}	158.26±31.10 ^a	89.13±12.04	58.948	0.000
24h UMA (mg/24 h)	31.26±10.03 ^{abc}	92.20±13.46 ^{ab}	128.46±30.40 ^a	14.56±3.20	335.041	0.000
BUN (mmol/L)	5.34±1.27 ^{abc}	8.65±3.10 ^{ab}	12.75±5.24 ^a	3.20±1.14	35.582	0.000

注:与临床 DKD 组比较,^b $P < 0.05$;与对照组比较,^a $P < 0.05$,与早期 DKD 组比较,^c $P < 0.05$ 。

表 3 血清炎症因子水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

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

组别	<i>n</i>	hs-CRP (mg/L)	TNF- α (ng/L)	IL-6 (ng/L)	IL-8 (ng/L)
单纯 T2DM 组	30	4.38±1.19 ^{abc}	12.81±4.05 ^{abc}	42.36±7.24 ^{abc}	42.36±7.24 ^{abc}
早期 DKD 组	50	10.35±3.77 ^{ab}	15.74±5.51 ^{ab}	44.51±9.76 ^{ab}	60.11±8.53 ^{ab}
临床 DKD 组	40	20.05±6.74 ^a	20.38±7.12 ^a	124.55±12.63 ^a	108.54±10.71 ^a
对照组	30	1.14±0.10	6.33±2.04	18.85±4.13	21.33±6.14
F 值		104.196	15.428	1.546	531.381
P 值		0.000	0.000	0.217	0.000

3 讨论

据相关资料显示,糖尿病患病率在全球范围内以10%的速度增长,已成为危及人类健康的严重疾病^[8]。随着临床对糖尿病治疗方案的不断改进,糖尿病急性并发症发生率降低,而糖尿病所致的慢性并发症逐渐升高,以DN最为常见^[9]。目前认为,糖尿病与遗传易感性、免疫功能紊乱及炎症反应和氧化应激等有关^[10]。Toll样受体(toll like receptors, TLRs)是天然免疫受体,参与多种免疫应答,在细胞吞噬作用、细胞信号传导及细胞凋亡中发挥着重要作用。其中TLR4是toll样蛋白受体家族的重要成员,主要分布于中性粒细胞和单核巨噬细胞中,能够结合启动髓样分化因子88信号级联反应,并通过激活核因子 κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)促进炎症因子释放,进而激发炎症信号通路引起肾小管间质纤维化及肾小球硬化,导致肾功能障碍^[11-12]。相关报道显示,DKD患者血清TLR2、TLR4水平高于健康患者,且大量尿蛋白组血清TLR2、TLR4水平高于微量尿蛋白组和正常尿蛋白组^[13]。本研究结果说明TLR2、TLR4在T2DM发病机制中具有重要作用。

炎症状态在T2DM肾病发生、发展中具有重要作用,血清hs-CRP、TNF- α 、IL-6及IL-8是经典炎症因子。IL-8可使中性粒细胞趋化,增强炎症反应^[14]。相关研究显示,临床DKD组血清hs-CRP、TNF- α 、IL-6及IL-8水平均高于早期DKD组和单纯T2DM组^[15]。本研究也证实了这一观点。提示T2DM和DKD患者体内均存在微炎症状态,且炎症因子水平越高病情越严重。分析其可能原因为:胰岛素抵抗导致胰岛素生理作用下降,增加血清hs-CRP、TNF- α 、IL-6及IL-8合成并作用于肝脏,同时通过抑制胰岛素受体酪氨酸激酶活性,加重胰岛素抵抗,导致炎症细胞因子产生。与其他研究不同的是,本研究进一步分析了各组肾功能的影响,结果显示早期DKD组高于单纯T2DM组。分析其原因可能为:当肾脏发生损伤时其重吸收率降低,进而导致血清Scr、24 h UMA、BUN水平升高。本研究结果提示DKD患者血清TLR2、TLR4水平的增加与肾功能指标和炎症因子具有相关性^[16]。

综上所述,DKD患者血清TLR2、TLR4水平与肾功能指标和炎症因子呈正相关。但本研究还存在一定不足,纳入例数较少,对结果可存在一定差异,将在下一步研究中扩大纳入例数。

参考文献

- [1] 韩晨鹏,徐清芳,张美华,等. 2型糖尿病患者血清抵抗素、VEGF、糖化白蛋白联合检测在糖尿病肾病早期诊断中的价值分析[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2019, 11(2): 128-131+151.
- [2] 孙冠媛,于辉田,宁宁,等. 不同剂量阿托伐他汀对糖尿病肾病患者免疫及全身微炎症状态的影响[J]. 实用药物与临床, 2019, 22(7): 693-696.
- [3] 王宇铎. 二仙地黄汤对改善2型糖尿病肾病患者胰岛素抵抗及肾功能代谢指标的作用研究[J]. 陕西中医, 2016, 37(5): 564-566.
- [4] 马英杰. 肝硬化患者小肠细菌过度生长与外周血内毒素水平、TLR2、TLR4表达的关系[J]. 医学研究杂志, 2018, 47(4): 130-133.
- [5] Wang XM, Zhang YG, Li AL, et al. Expressions of serum inflammatory cytokines and their relationship with cerebral edema in patients with acute basal ganglia hemorrhage [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2016, 20(13): 2868.
- [6] 中华医学会糖尿病学分会. 中国2型糖尿病防治指南(2010年版)[J]. 中国糖尿病杂志, 2012, 20(1): 54-109.
- [7] 潘佳秋,徐微微,张超. 新诊断2型糖尿病患者血清高迁移率族蛋白1和Toll样受体4水平变化及其与胰岛素抵抗的关系研究[J]. 中国全科医学, 2013, 16(3): 252-254.
- [8] 常沁涛. 糖尿病肾病患者心血管疾病患病率及其危险因素分析[J]. 中国药物与临床, 2017, 17(11): 1606-1608.
- [9] Zhang SW, Xu HL, Yu XF, et al. Simvastatin ameliorates low-dose streptozotocin-induced type 2 diabetic nephropathy in an experimental rat model [J]. Int J Clin Exp Med 2015, 8(4): 6388-6396.
- [10] Khandare SA, Chittawar S, Nahar N, et al. Study of neutrophil-lymphocyte ratio as novel marker for diabetic nephropathy in type 2 diabetes [J]. J endocrinol metabolism, 2017, 21(3): 387-392.
- [11] 田鲁,杨榭,王琦,等. 槐木总皂苷对2型糖尿病模型小鼠肾组织Toll样受体的影响[J]. 国际中医中药杂志, 2018, 40(3): 236-241.
- [12] 宋菲. TLR2、TLR4在糖尿病肾病炎症状态中的作用及药物干预研究进展[J]. 右江医学, 2015, 43(5): 614-617.
- [13] 韩丽萍,孙蓓,李春君,等. 雷公藤多苷对糖尿病大鼠肝脏Toll样受体4介导免疫炎症信号通路的干预研究[J]. 中华糖尿病杂志, 2016, 8(3): 152-156.
- [14] 吴晓艳,沈清,孙燕妮,等. 益气养阴活血化痰法联合缬沙坦对糖尿病肾病微炎症状态和氧化应激状态的影响[J]. 现代中西医结合杂志, 2017, 26(22): 2408-2410.
- [15] 孙哲,徐丹丹,于萍,等. 2型糖尿病肾病患者血清toll样受体4及髓样分化蛋白-2与其相关性研究[J]. 黑龙江医药科学, 2014, 37(6): 34-36.
- [16] Yan PJ, Zhang ZH, Xu Y, et al. Relationship between serum cystatin-C levels and vibrating perception threshold in patients with Type 2 diabetes mellitus [J]. J Central South University, 2016, 41(1): 58.

肝癌切除术前后患者血清 sP-selectin、sICAM-1 水平变化及其临床意义

肖奇贵 王铮* 杨勤玲 张玉琳 张萍丽 杨俊 朗澜

【摘要】 目的 观察原发性肝癌患者肝切除术前术后血清可溶性P-选择素(sP-selectin)、可溶性细胞间粘附分子-1(sICAM-1)水平变化及其临床意义。方法 选择2015年1月至2018年12月74例肝癌切除术患者为研究对象(肝癌组),另选择同期40例肝硬化患者(肝硬化组)、40例健康体检者(对照组),比较3组入院时血清sP-selectin、sICAM-1,观察肝癌患者手术前、术后1、3、6、9、12月血清sP-selectin、sICAM-1水平变化,记录患者术后12个月内复发率,并比较复发组与未复发组不同时间点sP-selectin、sICAM-1水平,绘制受试者工作特征曲线(ROC)曲线分析血清sP-selectin、sICAM-1水平对患者术后复发预测价值。结果 入院时,血清sP-selectin、sICAM-1水平肝癌组肝硬化组、对照组差异有统计学意义($P<0.05$),肝硬化组上述指标均显著高于对照组($P<0.05$);患者术后1、3、6、9、12月血清sP-selectin、sICAM-1水平均均显著低于术前($P<0.05$),其中术后1、3、6月血清sP-selectin、sICAM-1水平整体呈下降趋势,术后9、12月有上升趋势($P<0.05$);术后进行12个月随访,共出现19例复发病例,复发率25.68%;复发组术后1月、3月血清sP-selectin、sICAM-1呈下降趋势,术后6、9、12月呈上升趋势,且均显著高于术后3月水平($P<0.05$),未复发组术后1、3、6月血清sP-selectin、sICAM-1均呈下降趋势,术后9、12月呈上升趋势,且与术后6月比较差异不显著($P>0.05$),但两组各时间点血清sP-selectin、sICAM-1水平均显著低于该组术前($P<0.05$),且复发组术前、术后1、3、6、9、12月血清sP-selectin、sICAM-1水平均显著高于未复发组同时间点($P<0.05$);绘制ROC曲线显示,sP-selectin、sICAM-1及联合预测术后复发的ROC曲线下面积分别为0.789、0.860、0.913($P<0.05$)。结论 肝癌患者血清sP-selectin、sICAM-1水平表达显著上升,经肝切除术后其水平可明显降低,且血清sP-selectin、sICAM-1水平对患者术后早期复发有一定预测价值。

【关键词】 原发性肝癌;肝癌切除;可溶性P-选择素;可溶性细胞间粘附分子-1

Changes of serum sP-selectin and sICAM-1 levels before and after liver cancer resection and their clinical significance

XIAO Qigui, WANG Zheng*, YANG Qinling, ZHANG Yulin, ZHANG Pingli, YANG Jun, LANG Lan
(Department of Hepatobiliary Surgery, The First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi, China, 710061)

【ABSTRACT】 Objective To observe the changes and clinical significance of serum soluble P-selectin (sP-selectin) and soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1) levels in patients with primary liver cancer before and after liver resection. Methods From January 2015 to December 2018, 74 patients with liver cancer resection were selected as the research subjects (liver cancer group), and another 40 patients with liver cirrhosis (cirrhosis group) and 40 healthy examiners (control group) were selected during the same period. The levels of serum sP-selectin and sICAM-1 at admission were compared among the three groups. Changes in serum sP-selectin and sICAM-1 levels before surgery and at 1 month, 3 months, 6 months, 9 months and 12

基金项目:陕西省科技厅社会发展科技攻关项目(2016SF-235)

作者单位:西安交通大学第一附属医院肝胆外科,陕西,西安 710061

*通信作者:王铮, E-mail: bpcbri@163.com

months after surgery were observed among patients with liver cancer. The recurrence rate within 12 months after surgery was recorded, and the levels of sP-selectin and sICAM-1 at different time points were compared between recurrence group and non-recurrence group. The receiver operator characteristic curve (ROC curve) was plotted to analyze the predictive value of serum sP-selectin and sICAM-1 levels on postoperative recurrence of patients. **Results** At admission, the levels of serum sP-selectin and sICAM-1 in the liver cancer group were significantly higher than those in the cirrhosis group and the control group ($P<0.05$), and the above indexes in the cirrhosis group were significantly higher than those in the control group ($P<0.05$). The levels of serum sP-selectin and sICAM-1 at 1 month, 3 months, 6 months, 9 months and 12 months after surgery were significantly lower than those before surgery ($P<0.05$), and the serum sP-selectin and sICAM-1 levels at 1 month, 3 months and 6 months after surgery showed a downward trend as a whole, and showed an upward trend at 9 months and 12 months after surgery ($P<0.05$). 12 months of follow-up was performed after surgery, and there were 19 cases of recurrence, with the recurrence rate of 25.68%. The levels of serum sP-selectin and sICAM-1 in the recurrence group showed a downward trend at 1 month and 3 months after surgery, and showed an upward trend at 6 months, 9 months and 12 months after surgery, and were significantly higher than those at 3 months after surgery ($P<0.05$). The levels of serum sP-selectin and sICAM-1 in the non-recurrence group showed a downward trend at 1 month, 3 months and 6 months after surgery, and showed an upward trend at 9 months and 12 months after surgery, and there were no significant differences compared with those at 6 months after surgery ($P>0.05$), but the levels of serum sP-selectin and sICAM-1 at each time point in the two groups were significantly lower than those in the same group before surgery ($P<0.05$), and the levels of serum sP-selectin and sICAM-1 at 1 month, 3 months, 6 months, 9 months and 12 months after surgery in the recurrence group were significantly higher than those in the non-recurrence group at the same time point ($P<0.05$). The plotted ROC curves showed the values of area under the ROC curves of sP-selectin, sICAM-1 and combined prediction of postoperative recurrence were 0.789, 0.860 and 0.913 respectively ($P<0.05$). **Conclusion** Serum levels of sP-selectin and sICAM-1 in patients with liver cancer increased significantly, and their levels could be significantly reduced after hepatectomy. Serum levels of sP-selectin and sICAM-1 have certain predictive value for early postoperative recurrence.

[KEY WORDS] Primary liver cancer; Liver cancer resection; Soluble P-selectin; Soluble intercellular adhesion molecule-1

肝癌是我国常见四大恶性肿瘤之一,手术切除是其主要治疗手段,但患者术后存在较高的复发率,直接影响其预后,有数据显示,肝癌术后5年复发率可高达70%以上^[1]。血清标志物检查作为一项检测方便、可重复性好的诊断技术,是肝癌术前诊断、术后评估的重要内容,除常见的甲胎蛋白及各种血清酶外,可溶性P-选择素(Soluble P-selectin, sP-selectin)、可溶性细胞间粘附分子-1(Soluble intercellular adhesion molecule-1, sICAM-1)均被认为在加重肝细胞坏死程度、促进肝纤维化进程等方面起重要作用,是目前报道相对较多的有利于肝癌诊断的血清标志物^[2-3]。既往研究显示^[4],检测术后血清标志物变化不仅可反映肝癌术后病灶清除效果,对患者术后复发风险也具有一定预测价值。但当前关于sP-selectin、sICAM-1用于肝癌术后复发预测的报道并不多见。本研究通过分析肝癌切除术

前后患者血清sP-selectin、sICAM-1变化,探究二者对患者术后复发的预测价值,为临床该类患者术后监测及干预提供依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选择2015年1月至2018年12月于本院接受肝癌切除术74例患者为研究对象,纳入标准:①术前经肝病史、临床症状、影像检查、血清标志物等初步诊断肝癌,临床分期^[5]I a期~II b期,均行腹腔镜肝切除术;②术后经病理检查明确诊断原发性肝癌;③术前未见腹腔及远处转移,随访资料完整;④所有患者及家属均已签署知情同意。排除标准:①既往其他恶性肿瘤病史、腹部手术史,弥漫性肝癌;②术前已发生远处转移,预期生存时间不足12个月;③无法耐受手术,随访记录不全。另选择同期

40例肝硬化患者(肝硬化组)、40例健康体检者(对照组),3组性别构成、年龄比较,差异无统计学意义($P>0.05$),但有可比性。见表1。

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

组别	n	性别 (男/女)	年龄 (岁)	Child-Pugh 分级(A/B/C)	-临床分期 (I a/ I b/ II a/ II b)
肝癌组	74	44/30	48.86±7.91	41/21/12	9/23/27/15
肝硬化组	40	24/16	50.18±8.24	27/10/3	-
对照组	40	23/17	47.79±10.81	-	-
χ^2/F 值		0.060	0.736	2.245	-
P值		0.971	0.118	0.325	-

1.2 检测方法

采用双抗体夹心 ABC-ELISA 法检测血清 sP-selectin(试剂盒出自上海信帆生物科技有限公司)、sICAM-1 水平(试剂盒出自上海贤绵生物科技有限公司),均严格按试剂盒说明书操作。其中肝癌组于术后1、3、6、9、12月各测1次。

1.3 观察指标

①比较3组入院时血清 sP-selectin、sICAM-1 水平。②比较肝癌组术前、术后1、3、6、9、12月血清 sP-selectin、sICAM-1 水平。③患者均于术后12个月经超声、腹部CT或MRI评估有无复发转移灶,记录患者12个月内复发情况,并比较复发组与未复发组手术前、术后1、3、6、9、12月血清 sP-selectin、sICAM-1 水平。④以1-特异度为横坐标,以灵敏度为纵坐标,绘制受试者工作特征曲线(Receiver operator characteristic curve, ROC 曲线)分析血清 sP-selectin、sICAM-1 水平对患者术后复发转移的预测价值,计算曲线下面积(Area under curve, AUC)。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 17.0 软件进行数据分析,呈正态分布,计量资料用($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间比较采用 SNK-q 检验,组内不同时间点比较采用重复测量方差分析,两两比较行 LSD-t 检验;计数资料用 n(%)表示,行 χ^2 检验;绘制 ROC 曲线分析 sP-selectin、sICAM-1 对患者复发的预测价值, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3组血清 sP-selectin、sICAM-1 水平比较

入院时,3组血清 sP-selectin、sICAM-1 水平比

较结果:肝癌组>肝硬化组>对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。见表2。

表2 3组血清 sP-selectin、sICAM-1 水平比较($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Comparison of levels of serum sP-selectin and sICAM-1 among 3 groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	sP-selectin($\mu\text{g/L}$)	sICAM-1($\mu\text{g/L}$)
肝癌组	74	24.82±6.21 ^{ab}	823.62±155.13 ^{ab}
肝硬化组	40	11.15±3.69 ^a	441.47±94.96 ^a
对照组	40	5.87±2.24	315.87±79.24
F值		291.080	457.481
P值		0.000	0.000

注:与对照组比较, $P<0.05$,与肝硬化组比较,^a $P<0.05$ 。

2.2 肝癌患者手术前后血清 sP-selectin、sICAM-1 水平比较

患者术后1、3、6月血清 sP-selectin、sICAM-1 水平均呈下降趋势,且水平均显著低于术前($P<0.05$),术后9、12月,患者血清 sP-selectin、sICAM-1 水平有上升趋势,但仍显著低于术前($P<0.05$),且术后9月与6月血清 sP-selectin、sICAM-1 水平比较差异无统计学意义($P>0.05$),但术后12月血清 sP-selectin、sICAM-1 水平显著高于9月($P<0.05$)。见表3。

表3 肝癌患者手术前后血清 sP-selectin、sICAM-1 水平比较($\bar{x}\pm s$)

Table 3 Comparison of levels of serum sP-selectin and sICAM-1 before and after surgery among patients with liver cancer ($\bar{x}\pm s$)

时间点	n	sP-selectin($\mu\text{g/L}$)	sICAM-1($\mu\text{g/L}$)
术前	74	24.82±6.21	823.62±155.13
术后1月	74	14.54±3.21 ^a	408.15±82.69 ^a
术后3月	74	10.62±2.13 ^{ab}	323.47±84.96 ^{ab}
术后6月	74	8.78±2.56 ^{abc}	312.25±73.41 ^{ab}
术后9月	74	9.32±3.18 ^{abc}	338.69±86.52 ^{ab}
术后12月	74	10.64±3.57 ^{abcde}	437.43±104.82 ^{acde}
F值		233.922	341.614
P值		0.000	0.000

注:与术前比较,^a $P<0.05$,与术后1月比较,^b $P<0.05$,与术后3月比较,^c $P<0.05$,与术后6月比较,^d $P<0.05$,与术后9月比较,^e $P<0.05$ 。

2.3 术后12个月内患者复发情况

术后进行12个月随访,共出现19例复发病例,复发率25.68%,其中1例发生在术后1~3个月内,5例发生在术后4~6个月内,7例发生在术后7~9个月内,6例发生在术后10~12个月内。

2.4 复发组与未复发组不同时间点血清 sP-selectin、sICAM-1 水平比较

复发组术后 1、3 月血清 sP-selectin、sICAM-1 呈下降趋势,术后 6、9、12 月呈上升趋势,且均显著高于术后 3 月水平($P<0.05$)。未复发组术后 1、3、6 月血清 sP-selectin、sICAM-1 均呈下降趋势,术

后 9、12 月呈上升趋势,且与术后 6 月比较差异不显著($P>0.05$)。两组各时间点血清 sP-selectin、sICAM-1 水平均显著低于该组术前($P<0.05$);复发组术前、术后 1、3、6、9、12 月血清 sP-selectin、sICAM-1 水平均显著高于未复发组同时间点($P<0.05$)。见表 4。

表 4 复发组与未复发组不同时间点血清 sP-selectin、sICAM-1 水平比较

Table 4 Comparison of levels of serum sP-selectin and sICAM-1 levels at different time points between recurrence group and non-recurrence group

项目	时间点	复发组(n=19)	未复发组(n=55)	t 值	P 值
sP-selectin(μg/L)	术前	29.28±5.12	21.75±5.48	5.248	0.000
	术后 1 月	17.31±4.03 ^a	13.55±3.56 ^a	3.836	0.000
	术后 3 月	12.88±3.46 ^{ab}	9.54±2.51 ^{ab}	4.518	0.000
	术后 6 月	14.31±3.34 ^{abc}	6.96±2.03 ^{abc}	11.546	0.000
	术后 9 月	16.16±3.38 ^{abcd}	7.34±2.08 ^{abc}	13.267	0.000
	术后 12 月	19.21±4.14 ^{abcde}	7.57±2.51 ^{abc}	14.447	0.000
sICAM-1(μg/L)	术前	929.43±142.62	787.01±134.82	3.500	0.001
	术后 1 月	521.18±81.32 ^a	369.78±76.54 ^a	7.316	0.000
	术后 3 月	370.91±62.84 ^{ab}	307.19±63.01 ^{ab}	3.803	0.000
	术后 6 月	401.42±70.08 ^{abc}	286.46±65.92 ^{ab}	6.744	0.000
	术后 9 月	468.65±72.76 ^{abcd}	293.72±69.81 ^{ab}	9.317	0.000
	术后 12 月	651.45±88.14 ^{abcde}	314.04±90.21 ^{ab}	7.433	0.000

注:与术前比较,^a $P<0.05$,与术后 1 月比较,^b $P<0.05$,与术后 3 月比较,^c $P<0.05$,与术后 6 月比较,^d $P<0.05$,与术后 9 月比较,^e $P<0.05$ 。

2.5 血清 sP-selectin、sICAM-1 水平预测肝癌患者复发的 ROC 曲线

以入院时血清 sP-selectin、sICAM-1 及二者联合预测概率为检验变量,以是否复发为状态变量绘制 ROC 曲线,结果显示 sP-selectin、sICAM-1 及联合预测曲线分布。见表 5、图 1。

表 5 血清 sP-selectin、sICAM-1 水平预测肝癌患者复发的 ROC 曲线下面积

Table 5 The areas under ROC curves of serum sP-selectin and sICAM-1 in predicting the recurrence in patients with liver cancer

指标	AUC	标准误	95%CI	P 值
sP-selectin	0.789	0.058	0.676~0.902	0.000
sICAM-1	0.860	0.056	0.757~0.964	0.000
二项联合	0.913	0.043	0.828~0.998	0.000

3 讨论

P-selectin 为主要表达于活化血小板及内皮细胞的颗粒膜蛋白,正常情况下其在血小板或内皮细胞表面表达很少或无表达,当血小板或内皮细胞受炎症介质、补体系统、过氧化物等侵害时,P-selectin 可大量表达,部分可进入血液脱落部

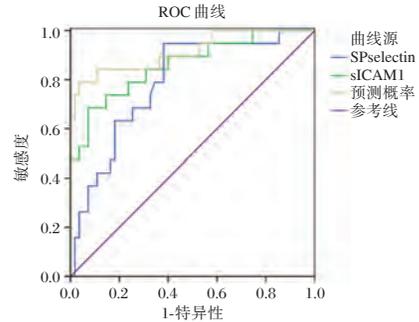


图 1 血清 sP-selectin、sICAM-1 水平预测肝癌患者复发的 ROC 曲线

Figure 1 ROC curves of serum sP-selectin and sICAM-1 in predicting recurrence in patients with liver cancer

分酶解形成 sP-selectin^[6]。研究显示,乙肝病毒所致肝炎、肝硬化或肝癌者,其血清 sP-selectin 水平表达明显上升,且与肝细胞损伤程度呈正相关^[7]。ICAM-1 为细胞膜单链糖蛋白,参与内皮细胞间的细胞黏附、调节抗原呈递功能、激活 T、B 淋巴细胞等免疫过程,其在正常肝细胞表达呈阴性,但肝癌细胞中 ICAM-1 呈明显高表达,有数据显示,80%~96.2%原发性肝癌患者肝组织中 ICAM-1 表达明显升高,且血清 sICAM-1 表达水平与组织 ICAM-1 表达高度一致^[8]。

既往报道^[9]显示,肝硬化、肝癌患者血清 sP-selectin、sICAM-1 水平表达上升,与本研究一致。分析原因,肝癌患者因肝细胞损伤,对组胺等刺激物灭活能力下降,导致机体血小板、内皮细胞活化程度上升,可促使 P-selectin 表达,且肝细胞疯狂增长可导致肝内强烈炎症反应,进一步促使血小板、内皮细胞活化,形成恶性循环,最终血清 sP-selectin 表达明显上升^[10]。肝癌患者血清 sICAM-1 表达升高一方面因为乙肝病毒感染可激活肝窦内皮细胞、门脉细胞合成、释放 sICAM-1;另一方面,癌细胞可合成并分泌 sICAM-1,且受癌细胞 mRNA 调控,并通过合成并分泌活性 sICAM-1 与淋巴细胞功能抗原结合,阻断激活淋巴细胞信号通路,避免肿瘤细胞被机体正常免疫识别及清除;此外,大量肝细胞坏死致细胞碎裂溶解或病毒释放,可进一步促进血清 sICAM-1 升高,故肝癌患者血清 sICAM-1 水平也升高^[11]。

陈域等^[12]报道显示,肝癌外科治疗前后监测血清甲胎蛋白及 sICAM-1 水平变化,有助于监测肿瘤复发、预测生存情况,与本研究相似。

综上所述,原发性肝癌患者血清 sP-selectin、sICAM-1 均呈高表达状态,而经手术治疗后二者水平明显降低,且动态监测血清 sP-selectin、sICAM-1 水平可预测术后复发,有利于临床尽早干预。

参考文献

- [1] 史俊英,王晔,陈文,等. GeXP 多重分析技术检测肝癌组织长链非编码 RNA 表达的实验研究[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2018, 10(1): 9-16.
- [2] 何佳,肖斌,杭建峰,等. 血清 miR-122-5p 和 miR-486-5p 在肝癌诊断中的临床应用[J]. 中华检验医学杂志, 2018, 41(1): 41-46.
- [3] 李春香,李忠原,李显彬,等. 免疫球蛋白联合血清 sP-selectin、sICAM-1 对肝癌的辅助诊断意义[J]. 现代免疫学, 2018, 38(2): 145-150.
- [4] 孙启峰,赵志强,周童,等. 腹腔镜肝部分切除术治疗肝癌患者血清肿瘤标志物的变化[J]. 实用肝脏病杂志, 2018, 21(1): 121-122.
- [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]. 中华肝脏病杂志, 2017, 25(12): 886-895.
- [6] Gross PL. Soluble P-selectin is the smoke, not the fire[J]. Blood, 2017, 130(2): 101-102.
- [7] Manthe RL, Muro S. ICAM-1-Targeted Nanocarriers Attenuate Endothelial Release of Soluble ICAM-1, an Inflammatory Regulator[J]. Bioeng Transl Med, 2017, 2(1): 109-119.
- [8] Graf ME, Sookthai D, Johnson T, et al. Pre-diagnostic plasma concentrations of Fibrinogen, sGPIIb/IIIa, sP-selectin, sThrombomodulin, Thrombopoietin in relation to cancer risk: Findings from a large prospective study [J]. Int J Cancer, 2018, 143(11): 2659-2667.
- [9] 李玲丽,刘代忠. 不同程度乙肝肝硬化患者 Ig、血清 sP-selectin、sICAM-1 水平的变化及意义[J]. 国际免疫学杂志, 2019, 42(4): 387-390.
- [10] 蒋强,张燕军,张倩,等. 凝血及纤溶功能变化在原发性肝癌介入治疗中的临床意义[J]. 临床放射学杂志, 2016, 35(10): 1590-1592.
- [11] Wadkin JCR, Patten DA, Kamarajah SK. CD151 supports VCAM-1-mediated lymphocyte adhesion to liver endothelium and is upregulated in chronic liver disease and hepatocellular carcinoma [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2017, 313(2): G138-G149.
- [12] 陈域,曹大勇,李霄. 肝癌外科治疗前后 AFP 和 sICAM-1 的变化对生存预测的价值[J]. 中国普外基础与临床杂志, 2014, 21(7): 832-840.

(上接第 1203 页)

- [8] Roumenina L, Kantardjiev A, Atanasov B, et al. Role of Ca²⁺ in the Electrostatic Stability and the Functional Activity of the Globular Domain of Human Clq [J]. Biochemistry, 2005, 44(43): 14097-14109.
- [9] 陈叶亨. 绿色螯合剂谷氨酸二乙酸四钠和 N,N-二羧甲基丙氨酸三钠盐的相对安全性与其应用[J]. 中国洗涤用品工业, 2017, (5): 40-44.
- [10] Hasson D, Shemer H, Sher A. State of the Art of Friendly "Green" Scale Control Inhibitors: A Review Article [J]. Ind Eng Chem Res, 2011, 50(12): 7601-7607.
- [11] 丁惠平,石澍晨,单慧婷,等. 改性聚天冬氨酸阻垢剂研究进展[J]. 化学研究, 2016, 27(2): 260-263.
- [12] 林健聪,王红翠,吴英松,等. 乙肝标志物定量测定试剂盒的性能验证及临床应用评价[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2018, 10(1): 47-55.

· 论 著 ·

调节性B细胞和转铁蛋白受体1在子宫内膜癌中的表达及其临床价值分析

蒋莹^{1*} 戴军霞²

[摘要] **目的** 分析调节性B细胞、转铁蛋白受体1在子宫内膜癌中的表达及其临床价值。**方法** 分析2014年1月至2015年1月本院收治的86例子宫内膜癌患者临床资料,对所有患者的年龄、临床分期、病理类型、组织分化程度、预后评分、Bregs细胞和TfR1表达情况及其预后情况进行记录,分析子宫内膜癌与Bregs细胞和TfR1表达间的关系。**结果** Bregs细胞和TfR1在子宫内膜癌细胞中阳性表达率明显高于癌旁组织,差异具有统计学意义($P<0.05$)。Ⅲ~Ⅳ期和低分化患者Bregs细胞水平、TfR1高表达率较Ⅰ~Ⅱ期和高分化患者显著升高,差异具有统计学意义($P<0.05$)。86例子宫内膜癌患者5年总生存率为53.48%(46/86)。经非条件单因素Logistic回归模型分析得出,不同临床分期、组织分化程度、预后评分、Bregs细胞和TfR1表达与子宫内膜癌患者5年生存率比较均存在差异($P<0.05$)。经非条件多因素Logistic回归模型分析可知,影响子宫内膜癌患者预后的独立危险因素为临床Ⅲ~Ⅳ期、低分化组织、预后评分 ≥ 7 分以及Bregs细胞升高和TfR1高表达($P<0.05$)。**结论** 患者临床Ⅲ~Ⅳ期、低分化组织、预后评分 ≥ 7 分以及Bregs细胞升高和TfR1高表达均为影响子宫内膜癌患者病情及预后的独立危险因素,Bregs细胞和TfR1可作为判断子宫内膜癌患者判断病情及预后的标志物,具有一定的临床意义。

[关键词] 子宫内膜癌;转铁蛋白受体1;调节性B细胞

Expression of transferrin receptor 1 and regulatory B cells in endometrial carcinoma and analysis of their clinical value

JIANG Ying^{1*}, DAI Junxia²

(1. Department of Gynecology, the Fourth People's Hospital of Yibin, Yibin, Sichuan, China, 644000;

2. Department of Gynecology, Shahe Central Hospital, Gaoxian County, Yibin, Sichuan, China, 644000)

[ABSTRACT] **Objective** To analyze the clinical value of regulatory B cells and transferrin receptor 1 in endometrial carcinoma. **Methods** The clinical data of 86 cases with endometrial cancer admitted to our hospital from January 2014 to January 2015 were retrospectively analyzed. The age, clinical stage, pathological type, degree of tissue differentiation, prognostic score, Bregs cell and TfR1 expression and prognosis of all patients were recorded, and the relationship between endometrial cancer and Bregs cells and TfR1 expression was analyzed. **Results** The expression level of TfR1 and Bregs cell number in endometrial cancer tissues were significantly higher than those in adjacent tissues, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). The number of Bregs cells and the level of TfR1 in stage Ⅲ-Ⅳ and poorly differentiated patients were significantly higher than those in stage Ⅰ-Ⅱ and well-differentiated patients, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). The 5-year overall survival rate of 86 patients with endometrial cancer was 53.48% (46/86). The unconditional single factor Logistic regression model analysis showed that there were differences in the

基金项目:2016四川省卫生厅科研课题(160237)

作者单位:1. 宜宾第四人民医院妇科,四川,宜宾 644000

2. 宜宾市高县沙河中心医院妇科,四川,宜宾 644000

*通信作者:蒋莹, E-mail: dxzto999150@sina.cn

5-year survival rate of patients with endometrial cancer in different clinical stages, tissue differentiation levels, prognostic scores, Bregs cells and TfR1 expression ($P<0.05$). The analysis of the unconditional multivariate logistic regression model shows that the independent risk factors affecting the prognosis of endometrial cancer patients are clinical stage III~IV, poorly differentiated tissue, prognostic score ≥ 7 , elevated Bregs cells and high TfR1 expression ($P<0.05$). **Conclusion** Patients with clinical stage III~IV, poorly differentiated tissue, prognostic score ≥ 7 , elevated Bregs cells and high TfR1 expression are independent risk factors that affect the condition and prognosis of endometrial cancer patients. Bregs cells and TfR1 can be used as markers for judging the condition and prognosis of patients with endometrial cancer, and have certain clinical significance.

[KEY WORDS] Endometrial cancer; Transferrin receptor 1; Regulatory B cells

子宫内膜癌发生于子宫体的内膜层,又称为子宫体癌,是女性生殖道常见的恶性肿瘤^[1]。据流行病学显示,我国子宫内膜癌的发病率逐渐上升,且以年轻化趋势发展,对患者身体健康造成极大影响^[2]。目前早期诊断评估子宫内膜癌患者病情进展而采取治疗措施是提升该疾病诊疗率的关键。曹作增等^[3]研究显示,子宫内膜癌的发生与铁细胞及调节免疫的细胞密切相关。也有相关研究显示,调节性B细胞(regulatory B cells, Bregs)可产生抗体,具有增进炎性因子生成及抗原提呈等作用;而转铁蛋白受体1(transferrin receptor type 1, TfR1)的高表达与肿瘤细胞有关。本研究对Bregs和TfR1在子宫内膜癌患者中的表达及临床价值予以分析,旨在探讨子宫内膜癌患者与Bregs和TfR1的相关性,具体报道如下:

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取2014年1月至2015年1月宜宾第四人民医院妇科收治的86例子宫内膜癌患者作为研究对象。年龄为35~74岁,平均年龄(57.12 \pm 5.11)岁。根据国际妇产科联盟修订的手术病理分期^[4]分为I期10例,II期19例,III期31例和IV期26例。

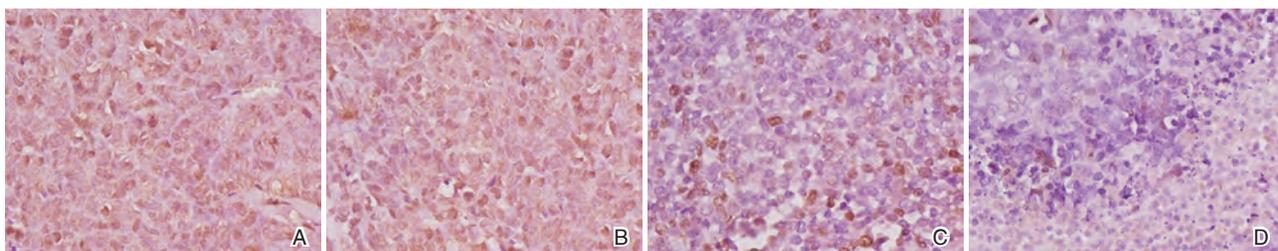
纳入标准:①所有患者均病理学检查确诊,术

前没有化疗和放疗;②本研究患者及家属均知情同意并签署知情同意书。排除标准:①手术禁忌症者;②患者临床资料及随访资料不完整者。

1.2 样本采集及Bregs和TfR1水平检测方法

①观察组为术中收集切取的86份子宫内膜癌组织,对照组为86份癌旁正常组织。予以瑞典GE公司Ficoll-Paque PLUS对外周血单个核细胞进行提取,放置于RPMI 1640培养液中,调至 2.0×10^6 个/mL,将细胞培养液置入Falcon流式管内,Bregs细胞予以多色荧光法标记。

②TfR1通过石蜡切片标本厚4 μ m,烘烤60 $^{\circ}$ C,二甲苯脱蜡,浸泡3次。3次离子水中浸泡抗原修复切片,磷酸盐缓冲液(PBST)洗3次,予以5%羊血清封闭。切片予以兔抗CD71多克隆抗体(上海基兔实业有限公司)检测TfR1。采用双盲法评定TfR1^[5]:随机选择每张切片5个视野,根据染色深浅和视野中阳性细胞比例评分:0分为无着色;1分为浅黄色;2分为棕黄色;3分为棕褐色。免疫反应评分以两者积分相乘^[6]:阴性(-)为0~1分,弱阳性(+)为2~4分,中等阳性(++)为5~8分,强阳性(+++)为9~12分。低表达状态为阴性和弱阳性(-,+),高表达状态为中等阳性和强阳性(++,+ +)。所有患者治疗结束后均予以电话随访至为2020年1月30日或其死亡为止。见图1。



注:A表示阴性;B表示弱阳性;C表示中等阳性;D表示强阳性。

图1 TfR1蛋白不同表达水平的免疫染色表现(HE, $\times 200$)

Figure 1 Immunostaining of different expression levels of TfR1 protein (HE, $\times 200$)

1.3 评价指标

对所有患者年龄、病理类型、临床分期、组织分化程度、预后评分、Bregs细胞和TfR1表达和预后情况予以记录,比较Bregs细胞和TfR1表示水平在不同患者间其上述资料间的差异。

1.4 统计分析

采用SPSS18.0统计软件包处理,计量资料以($\bar{x} \pm s$)描述,采用t检验;计数资料采用n(%)进行描述,采用卡方检验;患者预后的相关因素采用Logistic回归模型分析, $P < 0.05$ 表示差异间具有统计学意义。

2 结果

2.1 两组子宫内膜癌组织和癌旁正常组织中Bregs细胞和TfR1表达水平比较

Bregs细胞和TfR1表达在子宫内膜癌细胞中阳性表达率明显高于癌旁组织,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见表1。

表1 两组子宫内膜癌组织和癌旁正常组织中Bregs细胞和TfR1表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of expression levels of Bregs cells and TfR1 in endometrial carcinoma and normal tissues adjacent to carcinoma between the 2 groups ($\bar{x} \pm s$)

分组	n	Bregs细胞	TfR1				高表达率(%)
			-	+	++	+++	
对照组	86	7.12±2.01	49	28	5	4	10.46
观察组	86	10.51±2.30	9	10	39	28	77.90
χ^2/t 值	-	10.292	-	-	-	-	79.305
P值	-	0.000	-	-	-	-	0.000

2.2 不同临床病理特征子宫内膜癌患者其Bregs细胞和TfR1表达水平比较

不同年龄和病理类型患者Bregs细胞水平和TfR1表达情况比较差异无统计学意义($P > 0.05$), III~IV期和低分化患者Bregs细胞水平、TfR1高表达率较I~II期和高中分化患者显著升高,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见表2。

表2 不同临床病理特征子宫内膜癌患者其Bregs细胞和TfR1表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of expression levels of bregs cells and TfR1 in endometrial carcinoma patients with different clinicopathological characteristics ($\bar{x} \pm s$)

临床特征	n	Bregs细胞	t值	P值	TfR1		χ^2 值	P值	
					高表达(n=67)	低表达(n=19)			
年龄(岁)	≥55	34	2.11±0.13	1.287	0.071	24	10	1.750	0.186
	<55	52	2.16±0.12			43	9		
病理类型	子宫内膜样内膜癌	45	2.56±0.46	0.419	0.675	32	13	2.533	0.112
	浆乳癌或透明细胞癌	41	2.60±0.42			35	6		
临床分期	I~II期	29	2.23±0.36	21.153	0.000	18	11	6.377	0.012 ^a
	III~IV期	57	3.78±0.30			49	8		
组织分化程度	高中分化	53	2.60±0.35	2.106	0.038	46	7	6.336	0.012 ^a
	低分化	33	2.76±0.33			21	12		

注:^a $P < 0.05$,表示差异具有统计学意义。

2.3 86例子宫内膜癌患者预后情况

5年随访结束后,86例子宫内膜癌患者5年总生存率为53.48%(46/86)。

2.4 影响子宫内膜癌患者预后的单因素分析

经非条件单因素结果显示,临床III~IV期、低分化组织、预后评分≥7分以及Bregs细胞升高和TfR1高表达的患者其5年生存率显著降低,临床分期、组织分化程度、预后评分、Bregs细胞和TfR1表达子宫内膜癌患者是影响子宫内膜癌患者预后的单因素($P < 0.05$)。见表3。

2.5 影响子宫内膜癌患者预后死亡的多因素分析

经非条件多因素Logistic回归模型分析可知,

临床III~IV期、低分化组织、预后评分≥7分以及Bregs细胞升高和TfR1高表达为影响子宫内膜癌患者预后死亡的独立危险因素($P < 0.05$)。见表4。

3 讨论

据统计,子宫内膜癌的发病率仅次于宫颈癌,每年发病人数约四千万人,死亡人数占新发人数的三分之一,且每年发病率呈上升趋势^[7]。目前,临床上对于子宫内膜癌的诊治以手术治疗为主。但研究显示,子宫内膜癌术后预后差,五年内出现复发及转移率约为50%,故及时明确诊断并进行预后是目前临床研究热点^[8]。

表3 影响子宫内膜癌患者预后的单因素分析

Table 3 Single factor analysis of prognosis in patients with endometrial cancer

临床特征	n	5年总生存 (n=46)	χ^2 值	P值
年龄 (岁)	≥55	34	16	0.934 0.334
	<55	52	30	
病理类型	子宫内膜样内膜癌	45	22	0.803 0.370
	浆乳癌或透明细胞癌	41	24	
临床分期	I期~II期	29	8	11.800 0.001*
	III~IV期	57	38	
组织分化程度	高中分化	53	10	11.570 0.001*
	低分化	33	36	
预后评分 (分)	≥7	42	30	10.620 0.001*
	<7	44	16	
Bregs细胞	升高	47	32	8.876 0.003*
	降低	39	14	
TfR1	低表达	67	6	4.706 0.030*
	高表达	19	40	

注: *P<0.05, 表示差异具有统计学意义。

随着生物学研究的进展, 相关研究学者发现生物学蛋白与免疫细胞在子宫内膜癌的发生和进展中具有重要作用^[9]。随着深入研究发现, B淋巴细胞参与免疫调节, Bregs细胞作为B淋巴细胞中的一种, 参与人体感染、自身免疫、恶性肿瘤等发生、进展过程, 其免疫调节作用越来越受到关注^[10]。林丽媛等学者^[11]对多种肿瘤细胞与小鼠培养发现, 当受肿瘤抗体刺激时, 可诱导Bregs细胞产生刺激肿瘤细胞的生长。也有相关学者予以免疫组化技术研究Bregs细胞在宫颈癌中的表达情况, 显示在宫颈癌组织中Bregs细胞较癌旁细胞高, 肿瘤分化程度越低, Bregs细胞程度也增高^[12]; 而TfR1与所有细胞表达及生命体存活相关, 近年来研究报道TfR1在肿瘤中表达失调^[13]。本研究结果与上述结果相似, 提示Bregs细胞和TfR1与子宫内膜癌患者疾病发生与进展具有密切关系。

相关研究显示, *TfR1*基因可致小鼠死亡^[14]。而

表4 影响子宫内膜癌患者预后死亡的多因素分析

Table 4 Multivariate analysis of prognosis and death in patients with endometrial cancer

影响因素	回归系数	标准误	Wald/ χ^2 值	OR	95%CI	P值
临床分期(参照组: I~II期)	0.658	0.308	6.494	1.93	1.06~3.53	0.011
组织分化程度(参照组: 中高分化)	0.724	0.248	6.970	2.06	1.15~3.69	0.008
预后评分(参照组: <7分)	0.618	0.284	4.444	1.86	1.06~3.24	0.035
Bregs细胞(参照组: 降低)	0.602	0.264	7.367	1.83	1.09~3.06	0.007
TfR1(参照组: 低表达)	0.562	0.248	5.742	1.75	1.08~2.85	0.017

在肿瘤细胞中, 铁代谢易发生改变, 可引起TfR1表达增高, 说明TfR1高表达与肿瘤细胞快速增长相关^[15]。本研究结果提示Bregs与TfR1与子宫内膜癌具有相关性。此外, 临床III~IV期、低分化组织、预后评分≥7分以及TfR1高表达和Bregs细胞升高均为影响子宫内膜癌患者病情及预后的独立危险因素。这可能与临床分期增高, 患者病情加重, 疾病进展严重, 影响预后有关^[16]。

综上所述, TfR1和Bregs细胞在子宫内膜癌患者中呈高表达, 其表达水平与患者病理特征及预后呈显著相关性, 可作为临床判断子宫内膜癌患者病情及预后的标志物。

参考文献

[1] 刘明珠, 樊锐太, 顾浩, 等. 吴茱萸碱对子宫内膜癌细胞放射敏感性的影响[J]. 中华放射医学与防护杂志, 2018, 38(1):6-11.
[2] 晋薇, 王利群, 刘有, 等. 子宫内膜癌组织中MMR蛋白表达及MLH1基因甲基化的临床意义[J]. 中华妇产科杂志,

2018, 53(12):823-830.
[3] 曹作增, 艾志宏, 滕银成. 生长因子受体结合蛋白7和人表皮生长因子受体2在子宫内膜癌中的表达及其意义[J]. 肿瘤研究与临床, 2019, 31(1):1-5.
[4] 莫劲思, 苏宝兰, 梁晓明, 等. 宫腔镜电切术联合孕激素治疗早期孕激素受体阳性子宫内膜癌青年患者的疗效及复发研究[J]. 中国实用医刊, 2019, 46(12):58-60.
[5] 龚月宾, 程丹, 周丽, 等. 子宫内膜ER、PR表达在宫腔粘连治疗预后的分析[J]. 医学分子生物学杂志, 2018, 18(3):158-159.
[6] 吴雯君. 子宫内膜癌组织中丛生蛋白的表达及其与雌激素受体、孕激素受体的关系[J]. 中国基层医药, 2019, 26(20):2479-2482.
[7] 王恺, 吕琪, 张婷, 等. 基于iTRAQ技术的大鼠挤压伤血清蛋白质组学分析[J]. 解放军医药杂志, 2019, 30(3):246-248.
[8] 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):213-215.
[9] 肖庆, 刘莉, 胡雅君, 等. IL-17通过抑制miR-195-5p表达促进子宫内膜癌细胞生长和转移[J]. 中国病理生理杂志, 2019, 34(6):1063-1068. (下转第1225页)

· 论 著 ·

彩色多普勒超声联合血清 CA15-3、CYFRA21-1、miR-20b-5p 在早期乳腺癌诊断中的应用

吴强¹ 谭蜀川¹ 向伦祥¹ 王梦远² 游希^{1*}

[摘要] 目的 评价彩色多普勒超声联合血清糖类抗原 15-3(CA15-3)、C角蛋白 19 片段抗 21-1 (CYFRA21-1)及 miR-20b-5p 对早期乳腺癌的诊断价值。方法 选取 2017 年 1 月至 2019 年 12 月本院收取的 82 例早期乳腺癌患者,为观察组,另按年龄分层抽样选取 50 例良性乳腺病变患者为对照组,比较观察组与对照组彩色多普勒超声影像特征、血清 CA15-3、CYFRA21-1 及 miR-20b-5p 表达水平,以病理结果为金标准,评价各检查方式及联合检查诊断早期乳腺癌的诊断效能。结果 观察组彩色多普勒超声中,肿块形状不规则、边缘不清、毛刺征、血流分级 II 级和 III 级、后方回声衰减、有微小钙化灶、纵横比 ≥ 1 比例均显著高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$);观察组血清 CA15-3、CYFRA21-1、miR-20b-5p 表达水平均显著高于对照组($P < 0.05$);以病理诊断结果为金标准,彩色多普勒超声、血清 CA15-3+CYFRA21-1、miR-20b-5p 及三者联合诊断早期乳腺癌的灵敏度、特异度、准确度、Kappa 值分别为(0.720、0.820、0.758、0.512)、(0.878、0.860、0.871、0.730)、(0.829、0.920、0.879、0.750)、(0.988、0.800、0.917、0.816)。结论 彩色多普勒超声联合血清 CA15-3、CYFRA21-1、miR-20b-5p 检测较单一检查能提高早期乳腺癌诊断灵敏度及准确度,具有临床应用价值。

[关键词] 早期乳腺癌;彩色多普勒超声;血清肿瘤标志物;循环 microRNA;诊断

Application of color Doppler ultrasound combined with serum CA15-3, CYFRA21-1 and miR-20b-5p in the diagnosis of early breast cancer

WU Qiang¹, TAN Shuchuan¹, XIANG Lunxiang¹, WANG Mengyuan², YOU Xi^{1*}

(1. Department of Ultrasound, Chongqing Three Gorges Central Hospital, Chongqing, China, 404000;

2. Department of Breast surgery, Chongqing Three Gorges Central Hospital, Chongqing, China, 404000)

[ABSTRACT] **Objective** To evaluate the diagnostic value of color Doppler ultrasound combined with serum carbohydrate antigen 15-3 (CA15-3), C-keratin 19 fragment anti-21-1 (CYFRA21-1) and miR-20b-5p in early breast cancer. **Methods** From January 2017 to December 2019, 82 patients with early breast cancer were selected as the observation group, and another 50 patients with benign breast lesions were selected by age stratification as the control group. The color Doppler ultrasound imaging characteristics and the expression levels of serum CA15-3, CYFRA21-1 and miR-20b-5p were compared between the observation group and the control group, and the pathological results were used as the gold standard to evaluate the diagnostic efficacy of various examination methods and combined examinations in the diagnosis of early breast cancer. **Results** In the observation group of color Doppler ultrasound, the proportions of irregular mass shape, unclear edge, spicule sign, blood flow grade II and grade III, posterior echo attenuation, microcalcification and aspect ratio ≥ 1 were significantly higher than those in the control group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The expression levels of serum CA15-3, CYFRA21-1 and miR-20b-5p in the observation group were significantly

基金项目:重庆市万州区社会发展领域科技计划指导性项目(wzstc-z201705)

作者单位:1. 重庆三峡中心医院超声科,重庆 404000

2. 重庆三峡中心医院乳腺外科,重庆 404000

*通信作者:游希, E-mail:583361478@qq.com

higher than those in the control group ($P < 0.05$). Taking pathological diagnosis results as the gold standard, the sensitivity, specificity, accuracy, and Kappa values of color Doppler ultrasound, serum CA15-3+CYFRA21-1, miR-20b-5p, and the three combined diagnosis of early breast cancer are (0.720, 0.820, 0.758, 0.512), (0.878, 0.860, 0.871, 0.730), (0.829, 0.920, 0.879, 0.750), (0.988, 0.800, 0.917, 0.816). Conclusion Color Doppler ultrasound combined with serum CA15-3, CYFRA21-1, miR-20b-5p detection can improve the sensitivity and accuracy of early breast cancer diagnosis compared with single examination, and has clinical application value.

[KEY WORDS] Early breast cancer; Color Doppler ultrasound; Serum tumor markers; Circulating microRNA; Diagnosis

乳腺癌是全世界女性发病率及死亡率最高的恶性肿瘤之一,且随着环境及人民生活方式改变,其发病率呈上升、年轻化趋势,早发现、早诊断、早干预是改善乳腺癌预后关键^[1]。早期乳腺癌因临床症状不典型,患者多在体检时发现。彩色多普勒超声因其检查高效、无创、简便及价格便宜等优势,在乳腺癌早期诊断中应用越来越多。既往有报道显示,单独应用超声检查早期乳腺癌准确率在85.2%左右^[2],临床为进一步提高早期乳腺癌准确率,常联合其他检测方式。随着分子生物学研究深入,糖类抗原15-3(CA15-3)、C角蛋白19片段抗21-1(CYFRA21-1)等血清肿瘤标志物因与乳腺癌发生、发展关联密切,临床检测越来越广泛^[3]。近年来,微小RNA与肿瘤发生、发展、耐药性等联系越来越受临床关注。miR-20b-5p是由miR-106a-363 cluster剪切加工而来的miRNA,在多种恶性肿瘤中呈高表达状态,与肿瘤增殖、侵袭、迁移等关系密切,但目前关于其与乳腺癌关系报道并不多^[4]。本研究将彩色多普勒超声、血清肿瘤标志物(CA15-3、CYFRA21-1)及miR-20b-5p检测用于乳腺癌早期诊断中,旨在分析其应用价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料

研究选取2017年1月至2019年12月收治的82例乳腺癌患者,均为女性,年龄27~68岁,平均(46.84±6.92)岁,体重指数(22.52±2.86)kg/m²,病理分型:浸润性导管癌33例,浸润性原位癌22例,导管原位癌17例,小叶原位癌10例,TNM分期:I期19例,IIa期42例,IIb(T2N1)期21例;另通过年龄段分层抽样,选取同期50例自愿接受相关检查或检测、经病理证实为乳腺良性病变的患者设为对照组,均为女性,年龄25~70岁,平均(48.02±8.26)岁,体重指数(23.07±3.14)kg/m²,疾病

诊断:乳腺增生22例,乳腺囊肿12例,纤维腺瘤9例,乳腺炎7例。两组性别、年龄、体重指数比较差异无统计学意义($P > 0.05$),有可比性。

纳入标准:患者因乳房症状或健康体检可疑乳腺病变入院,均接受彩色多普勒超声检查、血清肿瘤标志物及微小RNA检测,入组前未接受放化疗,精神认知正常,最终均经术后病理诊断明确乳腺癌,且TNM分期位为I期、IIa期或IIb(T2N1)期。排除标准:乳腺癌复发患者,合并其他部位恶性肿瘤,伴严重脏器功能不全、心脑血管疾病、内分泌疾病,入组前于外院行过抗癌治疗。

1.2 方法

1.2.1 彩色多普勒超声检查

彩色多普勒超声诊断仪型号飞利浦EPIQ 7, eL18-4探头,频率4-18MHz。患者处仰卧位,双臂上抬以将双侧乳房充分暴露,以乳头为中心,依次于外上、外下、内上、内下象限行纵切、横切、斜切扫查,仔细观察并记录肿物位置、数目、大小、形态、边界、血流信号、后方回声、钙化、纵横比等。

1.2.2 血清肿瘤标志物检测

采集患者空腹外周静脉血5 mL,室温静置15 min,离心(3 000 r/min, 10 min)取上清液于-80℃保存待测,采用电化学发光法检测血清CA15-3、CYFRA21-1水平,仪器及配套试剂盒均出自德国罗氏公司。

1.2.3 血清miR-20b-5p检测

EDTA试管采集患者空腹外周静脉血5 mL,4℃下先以4 000 r/min转速离心10 min,再以12 000 r/min离心15 min,分离血清于-80℃保存备用;根据mir Vana PARIS Kit试剂盒说明提取血清总RNA,采用Bulge-Loop™ miRNA qRT-PCR Primer Set行miRNA扩增,miR-20b-5p引物出自广州锐博生物,以U6为内参照,校正PCR模板拷贝数,相对表达量采用2^{-ΔΔCt}法计算。

1.3 诊断标准^[5-6]

彩色多普勒诊断乳腺癌阳性标准参考文献^[5],即肿块为无规则性团块状、分叶状,呈浸润性生长,边界模糊,边缘毛刺改变,无包膜,实质回声非均匀分布,内部见血流信号,淋巴结血流紊乱,内部点状强回声、后方弱回声,纵横比 ≥ 1 。血清肿瘤标志物阳性判断标准:CA15-3 >25 kU/L、CYFRA21-1 >3.3 $\mu\text{g/L}$ ^[6]。miR-20b-5p 诊断先绘制受试者工作特征曲线(ROC 曲线),以约登指数最大时对应值为临界值,大于临界值视为阳性结果。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 19.0 软件进行数据分析,计数资料用 $n(\%)$ 表示,行 χ^2 检验,符合正态分布计量资料用 $(\bar{x} \pm s)$ 描述,采用独立样本 t 检验,miR-20b-5p 诊断早期乳腺癌临界值确定以 ROC 曲线最佳截断值为准; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组彩色多普勒超声影像特征比较

观察组肿块形状不规则、边缘不清、毛刺征、血流分级 II 级和 III 级、后方回声衰减、有微小钙化灶、纵横比 ≥ 1 比例高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 两组彩色多普勒超声影像特征比较 [$n(\%)$]

Table 1 Comparison of color Doppler ultrasound image characteristics between the 2 groups [$n(\%)$]

影像特征	观察组($n=82$)	对照组($n=50$)	χ^2 值	P 值
形状				
规则	11(13.41)	26(52.00)	22.923	0.000
不规则	71(86.59)	24(48.00)		
边缘				
清晰	27(32.93)	31(62.00)	10.658	0.001
不清	55(67.07)	19(38.00)		
毛刺征				
有	57(69.51)	16(26.67)	25.462	0.000
无	25(30.49)	44(73.33)		
血流分级				
0 级和 I 级	20(24.39)	29(58.00)	15.032	0.000
II 级和 III 级	62(75.61)	21(42.00)		
后方回声				
衰减	58(70.73)	22(44.00)	9.296	0.002
不变或增强	24(29.27)	28(56.00)		
微小钙化灶				
有	51(62.20)	14(28.00)	14.531	0.000
无	31(37.80)	36(72.00)		
纵横比				
≥ 1	64(78.05)	15(30.00)	29.841	0.000
< 1	18(21.95)	35(70.00)		

2.2 两组血清 CA15-3、CYFRA21-1、miR-20b-5p 水平比较

观察组血清 CA15-3、CYFRA21-1、miR-20b-5p 表达水平高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 两组血清 CA15-3、CYFRA21-1、miR-20b-5p 表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Expression levels of serum CA15-3, CYFRA21-1 and miR-20b-5p in the 2 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	CA15-3 (kU/L)	CYFRA21-1 ($\mu\text{g/L}$)	miR-20b-5p
观察组	82	33.41 \pm 6.38	5.12 \pm 2.08	4.31 \pm 1.16
对照组	50	11.05 \pm 2.43	1.55 \pm 0.49	2.28 \pm 0.76
t 值		23.726	11.920	11.009
P 值		0.000	0.000	0.000

2.3 miR-20b-5p 诊断早期乳腺癌的 ROC 曲线及最佳截断值

miR-20b-5p 诊断早期乳腺癌的 ROC 曲线下面积为 0.919(95%CI:0.868-0.971),约登指数最大值为 0.761,灵敏度、特异度分别为 0.841、0.920,此时对应 miR-20b-5p 相对表达值为 3.12。见图 1。

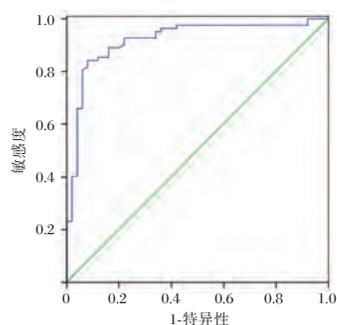


图 1 miR-20b-5p 诊断早期乳腺癌的 ROC 曲线

Figure 1 ROC curve of mir-20b-5p in the diagnosis of early breast cancer

2.4 单一检测及联合检测诊断早期乳腺癌的诊断效能分析

以病理结果为金标准,根据各检测方法的阳性评价标准,超声、血清标志物、miR-20b-5p 及三者联合与病理结果的一致。见表 3、表 4。

3 讨论

早期诊断是改善乳腺癌预后关键,既往数据指出^[7],乳腺癌患者早期精确诊断,可将 5 年生存率自 25%提升自 99%。钼靶 X 线是目前乳腺癌早期筛查最常见影像技术,但该方法对致密腺体显

表3 单一检测及联合检测诊断早期乳腺癌的诊断结果 [n(%)]

Table 3 Analysis of diagnostic results of single detection and combined detection for early breast cancer [n(%)]

病理结果	n	超声		血清标志物		miR-20b-5p		三者联合	
		阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性
阳性	82	59(71.95)	23(28.05)	72(87.80)	10(12.20)	70(85.37)	12(14.63)	81(98.78)	1(1.22)
阴性	50	9(18.00)	41(82.00)	7(14.00)	43(86.00)	4(8.00)	46(92.00)	10(2.00)	40(80.00)

表4 单一检测及联合检测诊断早期乳腺癌的诊断效能

Table 4 Diagnostic efficacy of single detection and combined detection in the diagnosis of early breast cancer

诊断方式	灵敏度(%)	特异度(%)	准确度(%)	Kappa
超声	0.720	0.820	0.758	0.512
血清标志物	0.878	0.860	0.871	0.730
miR-20b-5p	0.854	0.920	0.879	0.750
三者联合	0.988	0.800	0.917	0.816

影不佳,难以检出较小乳腺癌肿块,且本身存在一定电离辐射,而彩色多普勒超声则可弥补这一缺陷,但超声检查多依赖于医生主观判断,也存在一定漏诊、误诊,如何进一步提高早期乳腺癌诊断效率仍是临床关注重点^[8]。本研究将彩色多普勒超声结合与乳腺癌发生发展关系密切的肿瘤标志物 CA15-3、CYFRA21-1 及 miRNA(miR-20b-5p)联合诊断早期乳腺癌,发现可进一步提高诊断效能。

CA15-3 是一种黏液糖蛋白,是目前已知的乳腺癌最重要特异性标志物,据报道,30%~50%乳腺癌患者血清 CA15-3 表达可明显上升^[9]。CYFRA21-1 是细胞角蛋白 19 片段,后者是构成细胞骨架的一类中间丝状物,当细胞癌变、坏死溶解时,血液中 CYFRA21-1 水平可明显升高,但 CYFRA21-1 为非器官特异性肿瘤标志物,其表达上升在肺癌、肝癌等均可见,因此常与其他特异性标志物联合诊断^[10]。本研究结果与既往报道接近^[11]。随着 miRNA 可在血清中稳定而方便检出,血清 miRNA 检测用于肿瘤诊断、分类、预后判断等研究也越来越多^[12]。miR-20b-5p 是由 miR-106a-363 cluster 剪切加工而来的 miRNA,后者位于人类 X 染色体上,是一类高度保守 miRNA 簇,因其在某些恶性肿瘤如肺癌、Burkitt's 淋巴瘤、乳腺癌等恶性肿瘤中呈过表达状态,被认为是最具有潜力的肿瘤基因^[13]。miR-20b-5p 是调控维度最高的 miRNAs 之一,既往有研究发现,miR-20b-5p 有促进乳腺癌细胞侵袭、迁移作用^[14]。本研究发现,观察组 miR-20b-5p 血清表达水平显著高于对照组,与周

燕^[15]报道类似。绘制 ROC 曲线提示 miR-20b-5p 对早期乳腺癌有较好价值。本研究将三者进行联合诊断,发现灵敏度、特异度、准确度相较单一诊断,联合诊断灵敏度、准确度均升高,与病理结果一致性更好,提示彩色多普勒超声联合血清 CA15-3、CYFRA21-1、miR-20b-5p 检测可提高早期乳腺癌诊断效能。

综上所述,彩色多普勒超声联合血清 CA15-3、CYFRA21-1、miR-20b-5p 检测早期乳腺癌,可提高诊断灵敏度及准确度,具有较高的应用价值,值得临床参考借鉴。

参考文献

- [1] 许家瑞,胡剑,刘冬冬,等.长链非编码 RNA 在乳腺癌中的研究进展[J].分子诊断与治疗杂志,2018,10(1):61-66.
- [2] 沈丽丽,黄鹏.血清 Angptl2、TK1 在乳腺癌患者中的表达及其与彩色多普勒超声联合检测的价值[J].广西医科大学学报,2018,35(11):1539-1542.
- [3] Di Meglio A, Lin NU, Freedman RA, et al. Patterns of Utilization of Imaging Studies and Serum Tumor Markers Among Patients With De Novo Metastatic Breast Cancer[J]. J Natl Compr Canc Netw, 2017, 15(3):316-324.
- [4] Papageorgiou S G, Kontos C K, Tsiakanikas P, et al. Elevated miR-20b-5p expression in peripheral blood mononuclear cells: A novel, independent molecular biomarker of favorable prognosis in chronic lymphocytic leukemia [J]. Leuk Res, 2018, 70: 1-7.
- [5] 张婧姝,郑慧.彩色多普勒超声诊断乳腺癌的价值[J].安徽医药,2018,22(8):1475-1476.
- [6] 裴生新,张中. UE 技术联合血清 CA15-3、CYFRA21-1、PSA 水平检测在乳腺癌患者诊断中的应用价值[J].中国医师杂志,2019,21(7):1062-1065.
- [7] 孙应实,曲玉虹.重视乳腺影像学技术的发展,提升乳腺癌影像学诊断水平[J].中国医学影像技术,2019,35(4):6-8.
- [8] 徐静,努尔兰·吐尔逊,王士光,等. MicroRNA-9 和 microRNA-210 检测联合彩色多普勒超声诊断乳腺癌的价值[J].中国现代医学杂志,2018,28(34):38-42.
- [9] Imamura M, Morimoto T, Nomura T, et al. Independent prognostic impact of preoperative serum carcinoembryonic antigen and cancer antigen 15-3 levels for early breast cancer subtypes[J]. World J Surg Oncol, 2018, 16(1):26.

(下转第 1225 页)

胃癌患者手术前后血清 VEGF、MMP-2、MMP-9 水平变化及其临床意义

董磊* 夏猛 尚康兴 吴情

【摘要】 目的 探讨胃癌患者手术前后血清血管内皮生长因子(VEGF)、基质金属蛋白酶-2(MMP-2)、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)水平变化及其临床意义。方法 选取84例胃癌患者资料作为胃癌组,另择同期56例健康志愿者作为对照组,对比胃癌组术前和对照组的血清VEGF、MMP-2、MMP-9水平变化;对比胃癌组术前及术后7d的血清VEGF、MMP-2、MMP-9水平变化。根据淋巴结转移情况将胃癌组分为胃癌组淋巴结转移组38例,胃癌淋巴结非转移组46例,对比转移组和非转移组的血清VEGF、MMP-2、MMP-9水平,分析单个指标及三者联合指标诊断胃癌患者淋巴结转移的灵敏度及特异性。结果 胃癌组术前血清VEGF、MMP-2、MMP-9水平显著高于对照组,差异具有统计学意义($P < 0.05$);胃癌组术后7d的血清VEGF、MMP-2、MMP-9水平显著低于术前,差异具有统计学意义($P < 0.05$);胃癌淋巴结转移组的血清VEGF、MMP-2、MMP-9水平显著高于非淋巴结转移组,差异具有统计学意义($P < 0.05$);对血清VEGF、MMP-2、MMP-9相对表达水平及三者联合检测做ROC曲线分析,AUC分别为0.896、0.744、0.847及0.994时,95%CI分别为0.810~0.952、0.637~0.833、0.752~0.816及0.945~1.000,临界值分别取180.90、5.63、415.91及0.36时,诊断胃癌患者淋巴结转移的灵敏度分别为78.95%、63.16%、73.68%及97.37%,特异度分别为95.65%、91.30%、93.48%及97.83%,最大约登指数为0.76、0.54、0.67及0.95。结论 术前血清VEGF、MMP-2、MMP-9水平可作为诊断胃癌患者淋巴结转移的肿瘤标志物,其中将三种血清因子联合检测用于胃癌患者淋巴结转移的诊断价值最高,临床动态检测上述血清因子水平可利于患者预后判断,为其术后治疗策略提供依据。

【关键词】 胃癌;淋巴结转移;血管内皮生长因子(VEGF);基质金属蛋白酶-2(MMP-2);基质金属蛋白酶-9(MMP-9)

Changes and clinical significance of serum VEGF, MMP-2 and MMP-9 levels in patients with gastric cancer before and after surgery

DONG Lei*, XIA Meng, SHANG Kangxing, WU Qing

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

【ABSTRACT】 Objective To explore the changes and clinical significance of serum vascular endothelial growth factor (VEGF), matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) levels in patients with gastric cancer before and after surgery. Methods A retrospective cohort study method was used in this study, and the data of 84 patients with gastric cancer (gastric cancer group) were retrospectively analyzed, and another 56 healthy volunteers (control group) were selected during the same period. The changes of serum VEGF, MMP-2 and MMP-9 levels were compared in gastric cancer group before surgery and at 7 d after surgery and in control group before surgery. There were 38 cases in gastric cancer lymph node metastasis group and 46 cases in lymph node non-metastasis group in gastric cancer group. The levels of

基金项目:安徽省卫生厅科研项目(2019LB0058)

作者单位:皖北煤电集团总医院胃肠外科,安徽,宿州 234000

*通信作者:董磊, E-mail: huakongjiao6@163.com

serum VEGF, MMP-2 and MMP-9 were compared between metastasis group and non-metastasis group. The sensitivity and specificity of single indicator and combination of the three in the diagnosis of lymph node metastasis in patients with gastric cancer were analyzed. **Results** The levels of serum VEGF, MMP-2 and MMP-9 in gastric cancer group before surgery were significantly higher than those in control group ($P<0.05$). The levels of serum VEGF, MMP-2 and MMP-9 in gastric cancer group at 7d after surgery were significantly lower than those before surgery ($P<0.05$). The levels of serum VEGF, MMP-2 and MMP-9 in gastric cancer lymph node metastasis group were significantly higher than those in lymph node non-metastasis group ($P<0.05$). ROC curve analysis of relative expression level of serum VEGF or MMP-2 or MMP-9 and combination of the three showed when AUC values were 0.896, 0.744, 0.847 and 0.994, the 95% CI values were 0.810 to 0.952, 0.637 to 0.833, 0.752 to 0.816 and 0.945 to 1.000. When the critical values were 180.90, 5.63, 415.91 and 0.36, the sensitivities in the diagnosis of lymph node metastases in patients with gastric cancer were 78.95%, 63.16%, 73.68% and 97.37%, and the specificities were 95.65%, 91.30%, 93.48% and 97.83% respectively, and the maximum Youden indexes were 0.76, 0.54, 0.67 and 0.95. **Conclusion** Preoperative serum VEGF, MMP-2 and MMP-9 levels can be used as tumor markers for the diagnosis of lymph node metastasis in gastric cancer patients, and combined detection of three serum factors has the highest diagnostic value on lymph node metastasis in gastric cancer patients. Clinical dynamic detection of the serum factors levels can be beneficial for prognosis judgement, and provide the basis for the postoperative treatment strategies.

[KEY WORDS] Gastric cancer; Lymph node metastasis; Vascular endothelial growth factor (VEGF); Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2); Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9)

胃癌系所有肿瘤中致死率位居第二名的消化系统恶性肿瘤,其死亡原因与肿瘤复发和转移有关,其中淋巴结转移是影响患者预后的独立危险因素^[1]。目前,外科手术仍列为早期胃癌的首选治疗手段,但进展期胃癌根治性术的术后复发率仍高达54%,其中影响术后疗效的关键因素在于早期转移,而淋巴结转移可为胃癌诊断、治疗及预后评估的提供临床指导^[2]。血管内皮生长因子(vascularendothelialgrowthfactor, VEGF)作为一种血管生成因子,可通过旁分泌机制特异性作用邻近血管内皮细胞,以介导新生血管生成。既往研究认为,VEGF高水平表达与胃癌细胞的生殖、转移及浸润存在密切关联性^[3]。基质金属蛋白酶(matrixmetalloproteinases, MMPs)属于一组能降解细胞外基质所有成分的蛋白水解酶,其中基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinase-2, MMP-2)和基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)系MMPs家族中最为重要的明胶酶,可通过细胞外基质降解作用以强化肿瘤细胞侵袭能力。但上述血清生化标志物在胃癌手术前后的变化及对淋巴结转移的诊断价值的报道相对少见。本研究旨在探讨三种血清因子对胃癌手术疗效评估及术后预后判断提供指导价值。

1 资料与方法

1.1 临床资料

遴选2015年8月至2018年8月期间在本院就诊的胃癌患者84例的临床资料为胃癌组,男53例、女31例,年龄在40~68岁,平均(57.85±10.56)岁,体质量在21.75~28.85 kg/m²,平均(24.26±2.08) kg/m²,术前肿瘤TNM分期为I期18例、II期51例、III期15例。其中,淋巴结转移38例(胃癌淋巴结转移组),淋巴结非转移46例(胃癌淋巴结非转移组)。另选择同期在本院进行体检的健康志愿者56例为对照组,男32例、女24例,平均年龄(58.12±10.56)岁,体质量在21.47~28.69 kg/m²,平均年龄(24.57±2.14) kg/m²。各组研究对象性别、年龄等基线资料比较差异无统计学意义($P>0.05$)。本研究获得本院医学伦理委员会批准,所有家属均签署了知情同意书。

纳入标准:术前经腹部增强CT、活组织检查及胃镜确诊为胃体早期腺体癌,符合相关手术适应证接受手术治疗,术后病理证实为胃腺癌者;经国际抗癌联盟(International Union Against Cancer, UICC)颁布的第8版胃癌TNM分期系统评估在III期及以下者;预计生存期在6个月及以上者;临床资料完整,能接受随访观察者。排除标准:存在手

术治疗禁忌症或手术耐受性不良者;合并其他恶性肿瘤者;心脑血管疾病者;术前接受放疗、化疗及免疫治疗等确定性治疗方案者;合并严重基础疾病者;肝内、双肺及其他器官发现癌转移灶者;凝血功能障碍者;精神系统疾病者;妊娠、哺乳期者;临床病例资料不完整者。

1.2 方法

选择胃癌组术前及术后7 d的时间点,收集胃癌组和对照组患者的清晨空腹外周静脉血送检,经3 000 r/min 转速以 $r=10\text{ cm}$ 离心15 min,分离取上清液,冷藏于 -80°C 备检。选用购自北京中杉金桥生物技术有限公司的酶联免疫吸附法(ELISA)试剂盒及配套说明测定血清 VEGF、MMP-2、MMP-9 水平。检测仪器为美国 THERMO FISHER Multiskan FC 酶标仪,当日室内质量控制保证结果的有效性。

1.3 观察指标

对比胃癌组术前和对照组的血清 VEGF、MMP-2、MMP-9 水平变化;对比胃癌组术前及术后7 d的血清 VEGF、MMP-2、MMP-9 水平变化;对比胃癌淋巴结转移组和胃癌淋巴结非转移组的血清 VEGF、MMP-2、MMP-9 水平;对血清 VEGF、MMP-2、MMP-9 水平及三者联合检测诊断胃癌患者淋巴结转移的作受试者工作特征(receiver operator characteristic, ROC)曲线,计算曲线下面积(area under curve, AUC)分析、最佳阈值、最大约登指数、灵敏度、特异度、SE 及 95%置信区间(95%CI)。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 20.0 软件进行分析,计量资料采用 $(\bar{x}\pm s)$ 表示,两组间比较采用配对 t 检验。对术后血清 VEGF、MMP-2、MMP-9 水平及三者联合检测作 ROC 曲线分析。统计检验采用双侧检验,以 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 胃癌组术前和对照组血清 VEGF、MMP-2、MMP-9 水平对比

胃癌组术前血清 VEGF、MMP-2、MMP-9 水平显著高于对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。见表1。

2.2 胃癌组手术前后的血清 VEGF、MMP-2、MMP-9 水平对比

胃癌组术后7 d的血清 VEGF、MMP-2、MMP-9 水平显著低于术前,差异具有统计学意义($P<0.05$)。见表2。

表1 胃癌组和对照组术前血清 VEGF、MMP-2、MMP-9 水平对比 $(\bar{x}\pm s)$

Table 1 Comparison of serum VEGF, MMP-2 and MMP-9 levels between the gastric cancer group and the control group before surgery $(\bar{x}\pm s)$

组别	<i>n</i>	VEGF (pg/mL)	MMP-2 (ng/mL)	MMP-9 (ng/mL)
胃癌组	84	213.26±93.33	6.89±3.35	483.34±121.23
对照组	56	65.39±28.56	2.33±1.03	141.36±45.56
<i>t</i> 值		10.195	8.754	17.697
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001

表2 胃癌组手术前后的血清 VEGF、MMP-2、MMP-9 水平对比

Table 2 Comparison of serum VEGF, MMP-2 and MMP-9 levels in gastric cancer group before and after operation

组别	<i>n</i>	VEGF (pg/mL)	MMP-2 (ng/mL)	MMP-9 (ng/mL)
术前	84	213.26±93.33	6.89±3.35	483.34±121.23
术后7 d	84	148.36±54.72	3.92±1.21	351.23±98.64
<i>t</i> 值		3.966	5.593	5.508
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001

2.3 胃癌组术前血清 VEGF、MMP-2、MMP-9 水平和淋巴结转移的关系

胃癌淋巴结转移组的血清 VEGF、MMP-2、MMP-9 水平显著高于非淋巴结转移组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。见表3。

表3 胃癌组术前血清 VEGF、MMP-2、MMP-9 水平和淋巴结转移的关系

Table 3 The relationship between serum VEGF, MMP-2 and MMP-9 levels and lymph node metastasis in gastric cancer group before operation $(\bar{x}\pm s)$

组别	<i>n</i>	VEGF (pg/mL)	MMP-2 (ng/mL)	MMP-9 (ng/mL)
胃癌淋巴结转移组	38	283.33±98.33	7.61±3.54	531.33±146.03
胃癌非淋巴结转移组	46	121.14±51.85	3.14±1.16	308.36±92.76
<i>t</i> 值		9.683	8.065	8.493
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001

2.4 术前 VEGF、MMP-2、MMP-9 检测胃癌患者淋巴结转移的诊断价值

三者联合诊断胃癌患者淋巴结转移的诊断效能显著优于术前血清 VEGF、MMP-2、MMP-9 水平单独诊断。见表4、图1。

表4 术前血清 VEGF、MMP-2、MMP-9 水平诊断胃癌患者淋巴结转移的的 ROC 曲线分析表

Table 4 ROC curve analysis of preoperative serum VEGF, MMP-2 and MMP-9 levels in the diagnosis of lymph node metastasis in gastric cancer patients

参数	最佳阈值	约登指数	灵敏度(%)	特异度(%)	AUC	SE	95%CI
VEGF	180.90	0.76	78.95	95.65	0.896	0.0357	0.810~0.952
MMP-2	5.63	0.54	63.16	91.30	0.744	0.0569	0.637~0.833
MMP-9	415.91	0.67	73.68	93.48	0.847	0.0468	0.752~0.916
三者联合诊断	0.36	0.95	97.37	97.83	0.994	0.0060	0.945~1.000

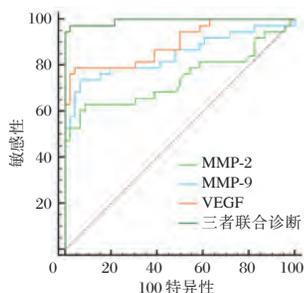


图1 术前血清 VEGF、MMP-2、MMP-9 水平诊断胃癌患者淋巴结转移的的 ROC 曲线分析图

Figure 1 ROC curve analysis of preoperative serum VEGF, MMP-2 and MMP-9 levels in the diagnosis of lymph node metastasis in gastric cancer patients

3 讨论

胃癌系一种发病率和病死率较高的消化道肿瘤疾病,其主要表现特征为肿瘤细胞生长的无限性和浸润转移的失控性^[4]。由于胃癌早期症状不具有特异性,可增加误诊、漏诊风险,导致患者延误早期手术治疗。胃癌筛查工作普及重视程度不足,内窥镜等检查不适用于普查^[5]。因此,临床采取血清肿瘤标志物对胃癌患者进行筛查、临床诊断、疗效评价和预后监测具有十分重要意义。Araujo Jr 等^[6]研究发现,血清 VEGF-a、MMP-2 和 MMP-9 在结直肠肿瘤的发生、进展及转移中起到一定作用,可能与患者的生存率密切相关。罗俊波等^[7]研究指出,血清 MMP-2 和 MMP-9 水平在乳腺癌患者中呈高水平表达,与患者的生存时间存在密切关联。以上研究均提示,血清 VEGF、MMP-2、MMP-9 水平与肿瘤细胞的表达和侵袭转移有密切关联。本文研究结果提示血清 VEGF、MMP-2、MMP-9 水平有利于胃癌患者预后判断和为其术后治疗提供临床指导。

既往研究认为,淋巴结转移与胃癌病理生物学特点有直接关联,是影响胃癌手术根治程度和预后的重要因素之一^[8]。胃癌细胞侵袭、转移要经

历一系列病理过程,包括基底膜蛋白质被多种蛋白水解酶降解、黏附基底膜生长、转移侵入毛细血管和淋巴管及侵袭临近和远端组织器官^[9]。多项研究表明,胃癌组织及血清中 VEGF 呈高水平表达,且此因子表达程度与胃癌病理和临床分期呈正相关性^[10]。王世东等^[11]研究指出,胃癌患者血清 VEGF 水平呈高表达状态,与肿瘤进展密切相关。杨录魁等^[12]研究也表明,VEGF 的高水平参与恶性肿瘤发生、发展及转移过程中,与肿瘤细胞侵袭程度和淋巴转移有密切关联,可作为判断恶性肿瘤转移和预后的重要生化标志物。本研究结果说明术前血清 VEGF 水平可能作为诊断胃癌淋巴结转移的预测因子。

胃癌细胞浸润转移的关键因素取决于基底膜的完整性,而蛋白降解酶的活性表达和高效能破坏基底膜的完整性^[13]。多项研究表明,作为蛋白水解酶的 MMPs 在肿瘤细胞的侵袭、转移中发挥重要作用^[14]。MMP-2 是一种由多种细胞以酶原形式分泌而成蛋白水解酶,其活性依赖锌离子,经激活后可作用于细胞外基质和基底膜的蛋白成分,以发挥降解功效,进而破坏局部结构完整性,并诱导肿瘤新生血管形成,以强化胃癌淋巴结细胞的浸润、侵袭能力^[15]。邵瑞颖等^[16]研究表明,组织蛋白中 MMP-2 相对表达水平增加与胃癌侵袭、淋巴结转移能力和分化程度存在正相关性。李利义等^[17]报道也证实,组织蛋白中 MMP-9 呈高水平表达,可促进肿瘤细胞的浸润转移。本文说明术前血清 VEGF、MMP-2、MMP-9 水平联合检测诊断胃癌患者淋巴结转移的诊断价值最高。

综上所述,术前血清 VEGF、MMP-2、MMP-9 水平可作为诊断胃癌患者淋巴结转移的肿瘤标志物,其中将三种血清因子联合检测用于胃癌患者淋巴结转移的诊断价值最高,临床动态检测上述血清因子水平可利于患者预后判断,为其术后治疗策略提供依据。

参考文献

- [1] Xudong Z, Aizhen C, Hongqing X, et al. Predictive factors for lymph node metastasis in early gastric cancer with signet ring cell histology: a meta-analysis[J]. ANZ J Surg, 2017, 87(12):981-986.
- [2] 梁寒. 腹腔热灌注化疗技术临床应用专家共识(2016版)解读——胃癌腹膜转移的防治[J]. 临床外科杂志, 2017, 25(1):20-23.
- [3] 沈源, 保丽玲, 吴桂霞, 等. 淋巴管密度、微血管密度与VEGF在胃癌中的生物学意义[J]. 暨南大学学报(自然科学与医学版), 2018, 39(3):223-228.
- [4] 赵凌云. 血清MMP-9和LCN-2水平在乳腺癌患者中表达意义及相关性分析[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(6):756-759.
- [5] 冷雪梅, 李元宽. 联合检测血清PGR、HIF-1 α 和CEA在胃癌诊断中的价值[J]. 检验医学与临床, 2017, 14(9):1331-1332.
- [6] Araújo Jr RF, Lira GA, Vilaça JA, et al. Prognostic and diagnostic implications of MMP-2, MMP-9, and VEGF-a expressions in colorectal cancer[J]. Pathol Res Practice, 2015, 211(1):71-77.
- [7] 罗俊波, 郑瑞锋, 王彦威, 等. 血清MMP-2、MMP-9和CA15-3水平在乳腺癌中的临床病理学意义及预后价值[J]. 实用癌症杂志, 2019, 34(2):195-199.
- [8] 周魁平, 丁祥飞, 吴云阳, 等. 早期胃癌淋巴结转移与临床病理特征相关危险因素分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2018, 37(2):618-623.
- [9] Qiao WH, Cao N, Yang L. MicroRNA - 154 inhibits the growth and metastasis of gastric cancer cells by directly targeting MTDH[J]. Oncol Lett, 2017, 14(9):3268-3274.
- [10] 于韦韦, 王海, 张捷, 等. 骨桥蛋白、基质金属蛋白酶2和血管内皮生长因子在胃癌组织中的表达及其预后价值[J]. 肿瘤研究与临床, 2019, 31(6):390-394.
- [11] 王世东. 胃癌患者血清VEGF、MMP-9、内皮抑素水平变化及意义[J]. 山东医药, 2011, 51(038):67-68.
- [12] 杨录魁, 崔向玉, 杨大雷, 等. 组织多肽特异性抗原、血清抗原153和血管内皮生长因子联合检测在乳腺癌诊断和治疗中的价值[J]. 医学检查与临床, 2015, 26(4):28-31.
- [13] 杨云鹏, 刘莉, 李慧. MMP-2、MMP-3和MMP-9在胃癌患者中的表达及意义[J]. 局解手术学杂志, 2016, 25(9):625-628.
- [14] 李文军, 康红兵, 杨立, 等. 延龄草皂苷通过NF- κ B/MAPK信号通路调控MMPs表达并抑制骨肉瘤Saos-2细胞的迁移和侵袭[J]. 肿瘤, 2016, 36(9):968-976.
- [15] 王一波, 汤黎明. MMP-2、MMP-7和MMP-14在胃癌患者组织中表达的临床意义[J]. 实用临床医药杂志, 2015, 19(15):44-48.
- [16] 邵瑞颖, 赵清喜, 赵景润, 等. 胃癌组织claudin-3、claudin-5与MMP-2表达及意义[J]. 齐鲁医学杂志, 2016, 31(1):1-3.
- [17] 李利义, 罗越, 刘海斌, 等. CXCR4、VEGF-C和MMP-9在胃癌淋巴结转移中的作用及意义[J]. 浙江医学, 2015, 37(2):107-110.

(上接第1216页)

- [10] 黄宇, 谢尧. 子宫内腺癌患者组织中lncRNA PVT1、H19和TUG1表达水平及临床意义[J]. 中国妇幼保健, 2019, 33(16):462-464.
- [11] 林丽媛, 高丽, 徐凤莲, 等. 宫颈癌组织中Bregs、IL-10及TGF- β 表达的相关性及其临床意义[J]. 中国医学前沿杂志(电子版), 2019, 11(5):156-157.
- [12] Cui Y, Xu HF, Liu MY, et al. Mechanism of exosomal miRNA-224 in development of hepatocellular carcinoma and its diagnostic and prognostic value [J]. World J Gastroenterol, 2019, 25(15):1890-1898.
- [13] 李美月, 田文艳, 闫晔, 等. Rab35蛋白在子宫内腺癌中的表达及其临床意义[J]. 中国妇产科临床杂志, 2019, 19(4):162-163.
- [14] Fadare O, Shaker N, Alghamdi A, et al. Endometrial tumors with yolk sac tumor-like morphologic patterns or immunophenotypes: an expanded appraisal [J]. Mod Pathol, 2019, 31(7):276-279.
- [15] 金艳荣, 陈隰陟, 马唯, 等. 纳米炭及亚甲蓝淋巴绘图在腹腔镜早期子宫内腺癌分期术中的比较观察[J]. 中华全科医师杂志, 2019, 18(6):583-586.
- [16] 林莉, 江庆萍, 林丹, 等. 子宫内腺癌组织中PGK1的表达及其与预后的关系[J]. 南方医科大学学报, 2018, 38(4):471-476.

(上接第1220页)

- [10] Samia AE, Wafaa MEA, Sanaa AE, et al. Serum CYFRA 21-1 in Egyptian women with breast cancer [J]. Alexandria J Med, 2017, 53:41-47.
- [11] 高华, 李玉柱, 韩龙才, 等. Logistic回归和ROC工作曲线评价联合检测血清CA153、TPS、CYFRA21-1在乳腺癌诊断中的临床价值[J]. 现代检验医学杂志, 2018, 33(3):60-64.
- [12] Cardoso AR, Moreira FTC, Fernandes R, et al. Novel and simple electrochemical biosensor monitoring attomolar levels of miRNA - 155 in breast cancer [J]. Biosens Bioelectron, 2016, 80:621-630.
- [13] 夏丽琴. MiR-20b-5p调控乳腺癌干细胞增殖和凋亡的作用和机制研究[D]. 第三军医大学, 2017.
- [14] Sueta A, Yamamoto Y, Tomiguchi M, et al. Differential expression of exosomal miRNAs between breast cancer patients with and without recurrence [J]. Oncotarget, 2017, 8(41):69934-69944.
- [15] 周燕. X染色体miR-106a~363簇的循环MicroRNA作为乳腺癌新型诊断标志物的研究[D]. 南京医科大学, 2019.

血清CYfra21-1、LDH、NSE水平检测在肺癌患者辅助诊断中的应用

王宇琛¹ 章春芝¹ 王大伟¹ 刘娜¹ 袁伟¹ 贾俊枝^{2*}

[摘要] **目的** 探究血清细胞角蛋白19片段(CYfra21-1)、乳酸脱氢酶(LDH)、神经元特异性烯醇化酶(NSE)水平检测在肺癌患者辅助诊断中的应用。**方法** 以2018年7月-2019年7月在河北北方学院附属第一医院心胸外科诊治的58例肺癌患者(肺癌组)和35例肺部良性病变患者(良性病变组)及35名同期健康体检者(健康组)为对象,检测各组血清CYfra21-1、LDH、NSE水平,ROC曲线分析CYfra21-1、LDH、NSE水平在肺癌诊断中的价值,同时分析不同病理特征肺癌患者血清CYfra21-1、LDH、NSE水平变化。**结果** 肺癌组血清CYfra21-1、LDH、NSE水平显著高于肺部良性病变组、对照组,肺部良性病变组显著高于对照组,差异均具有统计学意义($P<0.05$);ROC曲线分析提示血清CYfra21-1、LDH、NSE联合检测诊断肺癌的曲线下面积、敏感度、特异度显著高于各指标单独检测,差异具有统计学意义($P<0.05$)。TNM分期为Ⅲ、Ⅳ期、病理类型为鳞癌、分化程度为低分化、淋巴结有转移的肺癌患者CYfra21-1、LDH、NSE水平显著高于TNM分期为Ⅰ、Ⅱ期、病理类型为腺癌、分化程度为中、高分化的,差异具有统计学意义($P<0.05$);Spearman相关性分析显示血清CYfra21-1、LDH、NSE水平与肺癌淋巴结转移率呈明显正相关($P<0.05$)。**结论** 肺癌患者血清CYfra21-1、LDH、NSE水平呈明显增高趋势,三者联合检测利于肺癌的早期诊断,且血清CYfra21-1、LDH、NSE水平与肺癌患者淋巴结转移风险密切相关。

[关键词] 肺癌; CYfra21-1; LDH; NSE

Application of serum CYfra21 - 1, LDH and NSE levels in the auxiliary diagnosis of lung cancer

WANG Yuchen¹, ZHANG Chunzhi¹, WANG Dawei¹, LIU Na¹, YUAN Wei¹, JIA Junzhi^{2*}

(1. Cardiothoracic Surgery, the First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou, Hebei, China, 075000; 2. Day Ward of Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot, Inner Mongolia, China, 010050)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the application of serum cytokeratin 19 fragment (CYfra21-1), lactate dehydrogenase (LDH) and neuron-specific enolase (NSE) levels in the auxiliary diagnosis of lung cancer. **Methods** 58 patients with lung cancer (lung cancer group) and 35 patients with benign lung lesions (benign lesion group) who were diagnosed and treated in The First Affiliated Hospital of Hebei North University between July 2018 and July 2019 were selected as the subjects. 35 health people (health group) who completed health checkups in the hospital during the same period were also enrolled in the study. The serum CYfra21-1, LDH and NSE levels in each group were detected. The ROC curve was used to analyze the value of CYfra21-1, LDH and NSE levels in the diagnosis of lung cancer, and serum CYfra21-1, LDH and NSE levels in lung cancer patients with different pathological characteristics were analyzed. **Results** The serum CYfra21-1, LDH and NSE levels were significantly higher in the lung cancer group than in the benign lesion group and the

基金项目:河北省医学科学研究课题计划(20180961)

作者单位:1. 河北北方学院附属第一医院心胸外科,河北,张家口 075000

2. 内蒙古医科大学附属医院日间病房,内蒙古,呼和浩特 010050

*通信作者:贾俊枝, E-mail: jiajunzhi666@163.com

control group, and the benign lung disease group was significantly higher than the control group, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). ROC curve analysis showed that area under the curve, sensitivity and specificity of the combined detection of serum CYfra21-1, LDH and NSE in the diagnosis of lung cancer were significantly higher than those of the individual indicators ($P<0.05$). The serum CYfra21-1, LDH and NSE levels were significantly higher in lung cancer patients at TNM stage III, with squamous, low differentiation and lymph node metastasis than the TNM stages I and II stage, and pathological type adenocarcinoma ($P<0.05$). Spearman correlation analysis showed that serum CYfra21-1, LDH and NSE levels were significantly positively correlated with lymph node metastasis rate of lung cancer ($P<0.05$). Conclusion Serum CYfra21-1, LDH and NSE levels are significantly higher in patients with lung cancer. The combined detection of the three is beneficial for the early diagnosis of lung cancer, and serum CYfra21-1, LDH, and NSE levels are closely related to the risk of lymph node metastasis in lung cancer patients.

[KEY WORDS] Lung cancer; CYfra21-1; LDH; NSE

肺癌系指起源于支气管黏膜上皮的恶性肿瘤,是全球范围内发病率及死亡率较高的恶性肿瘤之一。由于肺癌患者早期症状不典型,早期诊断率低,绝大多数确诊时处于中晚期,患者5年生存率较低^[1],如何提高肺癌患者早期诊断率成为临床关注焦点。近年来血清学标志物广泛应用于恶性肿瘤早期辅助诊断中,乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)为临床常用的肿瘤标志物,研究表明肺癌患者血清LDH水平明显升高^[2]。神经元特异性烯醇化酶(neuron specific enolase, NES)被证实存在于小细胞肺癌以及肺鳞癌鉴别诊断中有明确价值^[3]。细胞角蛋白19片段(cytokeratin 19 fragment, CYfra21-1)广泛存在于上皮起源的肿瘤细胞中,在肺癌、食管癌等辅助诊断中有积极意义^[4]。本文通过探究血清CYfra21-1、LDH、NSE水平检测在肺癌患者辅助诊断中的价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料

以2018年7月至2019年7月在本院心胸外科诊治的58例肺癌患者(肺癌组)和35例肺部良性病变患者(良性病变组)及35名同期健康体检者(健康组)为对象。纳入标准:临床资料完整,均为非小细胞肺癌;肺癌符合《原发性肝癌规范化诊治的专家共识》诊断标准^[5];影像学检查和组织病理学检查确诊。排除标准:并发骨转移;合并其他系统疾病;处于妊娠期或哺乳期女性;合并脑血管疾病;合并慢性肝病和肾病。③肺部良性病变患者入选标准:经组织病理学检查确诊为肺部炎症性疾病,既往无肺部肿瘤史。④健康体检者入选标准:身心健康,既往无肺部疾病史。肺癌组男31

例、女27例,年龄41-68岁,平均(61.04±6.16)岁;良性病变组男20例、女15例,年龄40-69岁,平均(60.99±6.21)岁;健康组男19例、女16例,年龄40~68岁,平均(61.15±6.18)岁。三组基线资料比较差异无统计学意义($P>0.05$),具可比性。

1.2 研究方法

1.2.1 血清CYfra21-1、LDH、NSE水平检测

采集患者晨起空腹静脉血,常规离心分离血清后-80℃保存待测,采用电化学发光法(仪器和试剂盒由德国罗氏诊断试剂公司提供)检测血清CYfra21-1、NSE水平,采用速率法(仪器为美国产的Beckman-Coulter LX-20)检测血清LDH水平,所有操作步骤严格按说明书进行。

1.2.2 肺癌患者临床资料收集

采集肺癌患者性别、年龄、临床分期、病理类型、分化程度、淋巴结转移情况等。

1.3 分析指标

①3组血清CYfra21-1、LDH、NSE水平、一般资料比较。②血清CYfra21-1、LDH、NSE水平对肺癌的诊断价值分析。③不同临床特征肺癌患者CYfra21-1、LDH、NSE水平比较。④血清CYfra21-1、LDH、NSE水平与肺癌病理特征的相关性分析。

1.4 统计学方法

采用SPSS 19.0软件分析数据,计数资料以 n (%)表示,行 χ^2 检验。计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用独立样本 t 检验或单因素方差分析,多组间两两比较采用LSD- t 检验。ROC曲线分析血清CYfra21-1、LDH、NSE水平在肺癌中诊断价值。Spearman相关性分析血清CYfra21-1、LDH、NSE水平与肺癌病理特征的相关性。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3组血清CYfra21-1、LDH、NSE水平比较

肺癌组血清CYfra21-1、LDH、NSE水平较肺部良性病变组、对照组显著高,肺部良性病变组亦明显高于对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$),3组性别、年龄比较差异无统计学意义($P>0.05$),见表1。

表1 3组血清CYfra21-1、LDH、NSE水平比较($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Comparison of serum CYFRA21-1, LDH, NSE levels in the 3 groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	CYfra21-1 (ng/mL)	LDH (U/L)	NSE (ng/mL)
肺癌组	58	10.63±1.07 ^{ab}	206.19±20.63 ^{ab}	14.63±1.49 ^{ab}
肺部良性病变组	35	6.09±0.61 ^a	159.08±16.79 ^a	11.18±1.12 ^a
对照组	35	3.12±0.39	95.64±9.66	7.06±0.71
<i>F</i> 值		79.645	106.319	26.592
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001

与对照组比较,均^a $P<0.05$;与肺部良性病变组比较,均^b $P<0.05$ 。

表2 血清CYfra21-1、LDH、NSE水平对肺癌的诊断价值分析

Table 2 Analysis of the diagnostic value of serum CYFRA21-1, LDH and NSE levels for lung cancer

指标	曲线下面积	敏感度(%)	特异度(%)	95%CI	临界值
CYfra21-1	0.876	70.1	83.2	0.836~0.902	9.45 (ng/mL)
LDH	0.864	76.7	79.8	0.810~0.897	196.18 (U/L)
NSE	0.885	79.5	71.4	0.823~0.946	12.46 (ng/mL)
联合检测	0.916	90.6	90.1	0.834~0.934	-

2.3 不同临床特征肺癌患者CYfra21-1、LDH、NSE水平比较

TNM分期为Ⅲ、Ⅳ期、病理类型为鳞癌、分化程度为低分化、淋巴结有转移肺癌患者CYfra21-1、

2.2 血清CYfra21-1、LDH、NSE水平对肺癌的诊断价值分析

ROC曲线分析提示血清CYfra21-1、LDH、NSE联合检测诊断肺癌的曲线下面积、敏感度、特异度较各指标单独检测显著高,差异具有统计学意义($P<0.05$)。见图1、表2。

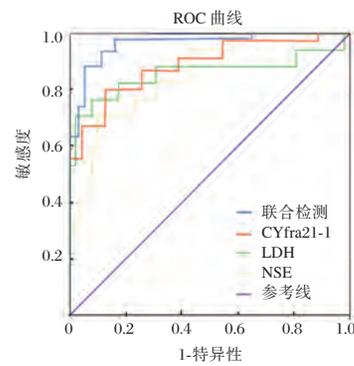


图1 血清CYfra21-1、LDH、NSE水平诊断肺癌的ROC曲线

Figure 1 ROC curve of serum CYFRA21-1, LDH and NSE levels in the diagnosis of lung cancer

LDH、NSE水平较TNM分期为Ⅰ、Ⅱ期、病理类型为腺癌、分化程度为中、高分化、淋巴结无转移的显著高,差异具有统计学意义($P<0.05$),见表3。

表3 不同临床特征肺癌患者CYfra21-1、LDH、NSE水平比较($\bar{x}\pm s$)

Table 3 Comparison of CYFRA21-1, LDH and NSE levels in lung cancer patients with different clinical characteristics ($\bar{x}\pm s$)

病理特征	例数(<i>n</i>)	CYfra21-1 (ng/mL)	<i>t/F</i> 值	<i>P</i> 值	LDH (U/L)	<i>t/F</i> 值	<i>P</i> 值	NSE (ng/mL)	<i>t/F</i> 值	<i>P</i> 值
TNM分期	Ⅰ期(21)	8.04±0.82			191.25±19.50			11.43±1.09		
	Ⅱ期(22)	10.19±1.02 ^a			207.16±20.72 ^a			13.14±1.23 ^a		
	Ⅲ期(12)	11.87±1.17 ^{ab}	7.926	0.003	215.11±21.45 ^{ab}	11.695	0.000	15.28±1.39 ^{ab}	21.347	0.000
	Ⅳ期(3)	12.58±1.25 ^{abc}			234.19±24.89 ^{ab}			17.88±1.59 ^{abc}		
病理类型	腺癌(32)	9.02±0.91			186.05±18.73			13.28±1.39		
	鳞癌(26)	12.63±1.29	12.034	0.000	224.23±22.46	6.926	0.000	15.75±1.59	6.220	0.000
分化程度	低分化(21)	14.61±1.22 ^{dc}			269.18±27.05 ^d			16.63±1.69 ^{dc}		
	中分化(26)	9.09±1.10 ^d	12.319	0.000	211.17±21.09 ^d	12.327	0.000	13.28±1.33 ^d	15.028	0.000
	高分化(11)	7.20±1.01			180.16±18.02			10.06±0.92		
淋巴结转移	有(10)	11.73±1.15			241.09±24.09			15.63±1.69		
	无(48)	9.01±0.92	8.145	0.000	180.17±18.02	9.163	0.000	13.09±1.32	5.271	0.000

与Ⅰ期比较,均^a $P<0.05$;与Ⅱ期比较,均^b $P<0.05$;与Ⅲ期比较,均^c $P<0.05$;与高分化的比较,均^d $P<0.05$;与中分化比较,均^e $P<0.05$ 。

2.4 血清 CYfra21-1、LDH、NSE 水平与肺癌病理特征的相关性分析

Spearman 相关性分析显示血清 CYfra21-1、LDH、NSE 水平与肺癌淋巴结转移率呈明显正相关($P<0.05$),见表4。

表4 血清 CYfra21-1、LDH、NSE 水平与肺癌病理特征的相关性分析

Table 4 Correlation Analysis of serum CYFRA21-1, LDH and NSE levels with pathological characteristics of lung cancer

	CYfra21-1		LDH		NSE	
	r值	P值	r值	P值	r值	P值
淋巴结转移率	0.698	<0.001	0.623	<0.001	0.695	<0.001

3 讨论

研究表明肿瘤细胞常可合成特殊的蛋白和酶类,引起肿瘤患者血清学标志物异常变化^[6]。血清学标志物因有操作方便、无创伤、检测灵敏等优势,广泛应用于肿瘤早期辅助诊断中。目前多种肿瘤标志物联合检测成为普遍应用的检测方法。早期相关研究证实 CYfra21-1、NSE 联合 CEA 等肿瘤标记物检测可有效诊断肺癌,为肺癌患者病情严重程度评估提供重要参考^[7]。研究表明血小板与淋巴细胞比值、LDH 联合检测在肺腺癌诊断中价值较高^[8]。进一步明确血清 CYfra21-1、LDH、NSE 水平检测在肺癌患者辅助诊断中的应用价值可能为肺癌诊治提供更多的临床参考。

本研究结果初步推测血清 CYfra21-1、LDH、NSE 联合检测可提高肺癌的诊断价值。NSE 是一种神经细胞的蛋白标志物,广泛存在于神经元及神经内分泌细胞中,为目前诊断肺癌敏感度最高的肿瘤标志物之一^[9-10]。正常肺组织中 NSE 含量较低,而于肺癌组织中呈高表达,但 NSE 在肺良性疾病中同样会明显升高,于肺癌诊断中的假阳性率高^[11]。CYfra21-1 为细胞角蛋白 19 的可溶性片段,研究表明在肿瘤细胞凋亡时,CYfra21-1 会释放入人体血液循环中,而肺癌患者血清中 CYfra21-1 水平较高^[12],但其在肺癌病理分型中的诊断价值有限。LDH 为糖酵解途径中的重要酶类,受肿瘤细胞坏死、代谢转换率加快、细胞膜通透性增加等因素影响。癌组织中参与代谢的酶大量释放入血液^[13-14],这也是肺癌患者血清 LDH 水平明显升高

的主要原因之一,但三项指标单独检测对肺癌诊断的价值不高。而血清 CYfra21-1、LDH、NSE 水平联合检测可提高对肺癌诊断价值,与早期巩强进等^[15]研究指出的 CYfra21-1、LDH、NSE 水平联合检测在良恶性胸腔积液鉴别诊断中有明确价值的结论大体相符,说明 CYfra21-1、LDH、NSE 水平联合检测有望为肺癌有效诊断提供参考。

此外,本结果还显示 TNM 分期为 III、IV 期、病理类型为鳞癌、分化程度为低分化、淋巴结有转移肺癌患者 CYfra21-1、LDH、NSE 水平显著高,血清 CYfra21-1、LDH、NSE 水平与肺癌淋巴结转移率呈明显正相关。早期高洋等^[16]研究表明血清 CYfra21-1、CEA、NSE 水平联合检测利于 NSCLC 患者手术疗效、患者病情的监测和预后的判断,而本结果提示肺癌恶性程度越高血清 CYfra21-1、LDH、NSE 水平越高,且肺癌患者淋巴结转移风险与血清 CYfra21-1、LDH、NSE 水平密切相关。临床工作中仍需积极监测肺癌患者血清 CYfra21-1、LDH、NSE 水平,以有效评估肺癌患者病情进展情况,对合理治疗方案的制定提供参考。

综上,血清 CYfra21-1、LDH、NSE 水平联合监测在肺癌患者早期诊断、病情评估中有积极作用。但本研究仍存在样本量较小且随访时间较短等不足,未来还需进一步完善研究,避免结果出现偏倚。

参考文献

- [1] 刘雪花,杨荣荣.血清肿瘤标志物检测在肺癌诊断中的应用价值分析[J].山西医药杂志,2019,48(18):2283-2284.
- [2] 王媛媛,刘婉,王萍,等.血清 CYFRA21-1、SCC-Ag、LDH 联合检测对肺鳞癌与肺部感染鉴别诊断的价值初探[J].现代肿瘤医学,2018,42(13):2033-2036.
- [3] 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.
- [4] Kulpa J, Wójcik E, Reinfuss M, et al. Carcinoembryonic antigen, squamous cell carcinoma antigen, CYFRA 21-1, and neuron-specific enolase in squamous cell lung cancer patients [J]. Clin Chem, 2020, 48(11):1931-1937.
- [5] 汤乔雅,宫郡茗,马艳凌. CEA、NSE、SCCA 联合 miR-21 检测与肺癌患者临床病理特征、疗效及预后的相关性研究 [J]. 分子诊断与治疗杂志, 2019, 11(6):508-512.
- [6] 李诚,伍小平,陈仲,等.血清肿瘤标志物在肺癌诊断及预后评估中的应用价值[J].江苏医药,2019,27(10):981-985.
- [7] 方高洁,胡娟.肿瘤标记物 CEA、SCCA、CYFRA21-1 联合 NSE 检测对肺癌的诊断价值分析[J].实用癌症杂志,2019,34(7):1161-1163. (下转第 1233 页)

血清HbA1c、INS在T2DM并发高尿酸血症的表达意义及相关性

吴斌^{1*} 许婧²

【摘要】目的 研究血清糖化血红蛋白(HbA1c)、血清胰岛素(INS)水平在2型糖尿病(T2DM)并发高尿酸血症患者中的表达意义。方法 选择本院2013年8月至2020年3月100例T2DM患者的资料,根据判断患者是否合并高尿酸血症后,分成T2DM+HUA组50例和T2DM组50例,观察两组患者HbA1c、INS表达水平。结果 两组患者的性别、年龄、糖尿病病程等一般资料比较,差异无统计学意义($P>0.05$);T2DM+HUA组患者体质指数、胰岛素抵抗指数高于T2DM组,TG、TC、LDL-C等血脂水平及SBP、DBP等血压水平均显著高于T2DM组,差异有统计学意义($P<0.05$);经Logistic回归分析,体质指数、胰岛素抵抗指数、血脂及血压水平均与高尿酸血症之间存在相关性。结论 T2DM合并高尿酸血症患者中HbA1c与INS水平均上升,与胰岛素抵抗和肾功能障碍存在相关性。

【关键词】 2型糖尿病;糖化血红蛋白;血清胰岛素;胰岛素抵抗;肾功能

The expression significance and correlation of serum HbA1c and INS in type 2 diabetes complicated with hyperuricemia

WU Bin^{1*}, XU Jing²

(1. Department of Nephrology, Wuhu Traditional Chinese Medicine Hospital, Wuhu, Anhui, China, 241000;

2. Department of Endocrinology, Wuhu Traditional Chinese Medicine Hospital, Wuhu, Anhui, China, 241000)

【ABSTRACT】 Objective To investigate the expression significance of serum glycosylated hemoglobin (HbA1c) and serum insulin (INS) levels in patients with type 2 diabetes (T2DM) complicated with hyperuricemia. Methods The data of 100 patients with T2DM from August, 2013 to March, 2020 in our hospital were selected. They were divided into the T2DM+HUA group with 50 cases and the T2DM group with 50 cases according to whether the patients had hyperuricemia. The expression levels of HbA1c and INS in the two groups were observed. Results There was no statistically significant difference between the two groups of patients in general data such as gender, age, and diabetes course ($P>0.05$). The body mass index and insulin resistance index of patients in the T2DM+HUA group were higher than those in the T2DM group. The blood lipid levels of TG, TC, LDL-C and blood pressure levels such as SBP and DBP were significantly higher than those in the T2DM group. The difference was statistically significant ($P<0.05$). Logistic regression analysis showed that there was a correlation between body mass index, insulin resistance index, blood lipid and blood pressure levels and hyperuricemia. Conclusion The levels of HbA1c and INS in patients with type 2 diabetes complicated with hyperuricemia are increased, which is correlated with insulin resistance and renal dysfunction.

【KEY WORDS】 T2DM; HbA1c; INS; Insulin resistance; Renal function

基金项目:芜湖市科学技术发展项目(2018WHC-B06)

作者单位:1. 芜湖市中医院肾病科, 芜湖, 安徽 241000

2. 芜湖市中医院内分泌科, 芜湖, 安徽 241000

*通信作者:吴斌, E-mail: rangxu841@163.com

糖尿病是临床常见的慢性代谢性疾病,其以机体内血糖持续异常升高作为明显的特点,主要原因是患者胰岛功能障碍致使胰岛素分泌异常,其中2型糖尿病(type 2 diabetes, T2DM)在老年及肥胖人群中较为多见^[1]。近年来,生活压力增大是T2DM合并高尿酸血症(hyperuricemia, HUA)发病率呈现上升趋势的主要原因之一。据相关研究报告,HUA是T2DM的主要并发症及独立且重要危险因素之一,当机体血清中尿酸水平上调1mg/dL,患者患T2DM的机会就会增加6%^[2]。在正常机体状态下,尿酸是嘌呤的最终代谢物,当其生成与代谢失衡后血清中尿酸会明显上调。HUA会加重脂代谢紊乱以及胰岛素抵抗,并且可以促进糖尿病慢性并发症的发生与发展^[3]。本研究从血脂指标、肾功能指标、胰岛功能指标三个方面评估血清HbA1c、INS在T2DM并发HUA的表达水平及意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取在2013年8月至2020年3月期间到治疗的T2DM患者100例,根据判断患者是否合并HUA后,分成T2DM+HUA组50例和T2DM组50例。T2DM+HUA组中男26例,女24例;平均年龄(59.8±4.8)岁。T2DM组中男23例,女27例;平均年龄(61.3±3.4)岁。两组患者在性别、年龄等因素均衡可比,差异无统计学意义($P>0.05$)。所有患者采用标准降糖治疗。

纳入标准:符合WHO在1999年发布的T2DM诊断标准^[4];此外T2DM+HUA组:尿酸(Uric Acid, UA)水平男性 $>420\ \mu\text{mol/L}$,女性 $>360\ \mu\text{mol/L}$ 。两组排除标准:①患有其他的类型的糖尿病者;②肾衰竭、肾移植和透析、尿路感染者、发热、充血性心力衰竭、肾血管疾病、使用降尿酸剂或利尿剂者、恶性肿瘤者。本研究由本院伦理委员会审核并通过,并且已获得患者知情同意。

1.2 方法

1.2.1 资料收集

所有受试者入院后进行详细的一般临床资料采集,主要包括身高、体重、血压、腰围、臀围、计算体重指数(body mass index, BMI)和腰臀比(waist hip rate, WHR)。

1.2.2 生化指标的检测

受试者空腹抽取外周静脉血5 mL于EDTA抗凝管内,室温静置1 h后以3 000 r/min转速离心5 min,取上清液采用全自动生化仪(日本日立高新技术公司,日立7600-010型)检测血脂指标,主要项目为:三酰甘油(TG)、总胆固醇(TC)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)。糖化血红蛋白(glycosylated hemoglobin, HbA1c)测定采用离子交换高效液相色谱法。取血清进行肾功能指标检测,包括血清肌酐(serum creatinine, Scr)、尿素氮(urea nitrogen, BUN)、血尿酸。肌酐(Scr)和血尿酸采用酶联比色法,酶联免疫吸附(ELISA)法检测尿素氮(BUN)。另收集患者晨尿,稀释10倍,酶联比色法检测尿尿酸。胰岛功能指标检测包括:超敏C-反应蛋白(hypersensitive C-reactive protein, hs-CRP)、空腹血糖(fasting blood-glucose, FPG)、胰岛素(insulin, INS)。全自动生化仪检测患者空腹血糖,ELISA法检测hs-CRP、INS。用HOMA1-IR法计算胰岛素抵抗指数(homeostasis model assessment of insulin resistance, HOMA-IR), $\text{HOMA1-IR}=\text{空腹血糖水平}\times\text{空腹胰岛素水平}/22.5$)

1.3 统计学方法

采用SPSS 20.0统计软件处理数据,计量资料以($\bar{x}\pm s$)表示,采用 t 检验;T2DM伴HUA影响因素分析采用多因素logistic回归分析,相关性分析采取Spearman秩相关性分析。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组一般资料和临床指标比较

两组数据在年龄、SBP、HDL-C均衡可比,差异无统计学意义($P>0.05$)。与T2DM组相比,T2DM+HUA组LDL-C、Scr、FPG的水平明显下降,差异有统计学意义($P<0.05$),BMI、WHR、TC、TG、BUN、血尿酸、尿尿酸、hs-CRP、INS、HOMA-IR均显著升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表1。

2.2 HbA1c和INS分别与各项指标的相关性

HbA1c水平与TC、TG、血尿酸、尿尿酸、hs-CRP、FPG、Scr、BUN、HOMA-IR呈正相关,但与HDL-C却呈负相关($P<0.05$);INS水平与TC、TG、HDL-C、血尿酸、尿尿酸、hs-CRP、Scr、BUN、HOMA-IR呈正相关,与FPG呈负相关($P<0.05$)。见表2。

表1 两组一般资料和临床指标比较 ($\bar{x} \pm s$)Table 1 Comparison of general data and clinical indicators between 2 groups ($\bar{x} \pm s$)

项目	T2DM组	T2DM+HUA组	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
年龄(岁)	61.3±3.4	59.8±4.8	1.80	0.07
BMI(kg/m ²)	25.19±2.18	28.87±3.07	-6.91	<0.001
WHR	0.81±0.03	0.96±0.12	-8.57	<0.001
HbA1c(%)	7.17±1.04	10.68±2.3	-9.83	<0.001
SBP(mmHG)	137.02±21.45	138.45±22.84	-0.32	0.75
DBP(mmHG)	79.53±12.74	84.63±11.36	-2.11	0.04
TG(mmol/L)	1.46±0.56	1.91±0.52	-4.16	<0.001
TC(mmol/L)	5.12±1.4	6.53±1.62	-4.66	<0.001
LDL-C(mmol/L)	3.62±1.05	2.12±1.23	6.56	<0.001
HDL-C(mmol/L)	1.49±1.04	1.56±1.4	-0.28	0.78
Scr(mmol/L)	88.40±6.3	71.8±7.2	12.27	<0.001
BUN(mmol/L)	5.02±1.23	5.73±1.35	-2.75	0.007
血尿酸(mol/L)	414.20±31.46	462.72±34.26	-7.38	<0.001
尿尿酸(mol/L)	1936.27±583.29	2284.24±619.30	-2.89	0.005
hs-CRP(mg/L)	1.58±0.07	2.46±0.16	-35.63	<0.001
FPG(mmol/L)	5.18±0.26	4.96±0.36	3.50	0.0007
INS(mIU/L)	9.39±2.28	17.23±4.23	-11.54	<0.001
HOMA-IR指数	1.15±0.14	1.78±0.56	-7.72	<0.001

表2 HbA1c和INS分别与各项指标的相关性分析

Table 2 Correlation analysis between HbA1c and INS and various indicators

项目	HbA1c		INS	
	<i>r</i> 值	<i>P</i> 值	<i>r</i> 值	<i>P</i> 值
TC(mmol/L)	1.586	0.008	1.836	0.005
TG(mmol/L)	0.047	0.016	0.064	0.026
LDL-C(mmol/L)	0.858	0.165	0.184	0.008
HDL-C(mmol/L)	-0.085	0.048	1.073	0.256
血尿酸(mol/L)	2.594	0.000	2.594	0.000
尿尿酸(mol/L)	1.948	0.008	1.948	0.084
hs-CRP(mg/L)	0.965	0.049	0.965	0.049
FPG(mmol/L)	2.945	0.046	-2.945	0.006
Scr(mmol/L)	0.170	0.000	0.170	0.000
BUN(mmol/L)	2.384	0.003	2.384	0.003
HOMA-IR	1.259	0.000	2.873	0.000

3 讨论

生活压力的增大及方式的改变,会明显增大了糖尿病的患病率。尿酸(uric acid, UA)为机体嘌呤代谢终产物,具有强效的抗氧化和清除自由基作用,但若UA水平升高,抗氧化作用逆转为氧化作用,会引起并加重体内炎症反应及氧化应激状态,增加血管损伤的风险^[5-6]。大量国内外文献表明在不同糖代谢状态下UA水平存在差异,T2DM患者明显高于糖代谢正常者。HUA是痛风发病的基础,常合并肥胖、高胰岛素血症、糖脂代谢紊乱,加重动脉硬化及减少内皮细胞释放一氧化氮从而损害内皮细胞。在众多因素中,血脂、血

压与UA直接相互作用产生影响,因此HUA与血脂、血压密切相关。本结果再次证实了这一结果。UA水平的上升使胰岛B细胞中大量堆积尿酸盐,影响了其生理功能,促进了胰岛素抵抗使机体的血糖水平难以得到有效控制^[7-9]。

在人体中,血红蛋白与葡萄糖相互结合促进非酶促蛋白糖基化反应的发生,进而产生糖化血红蛋白(HbA1c),其可以作为测定患者血糖是否平稳的重要指标^[10-11]。HbA1c的水平在3个月内较为稳定,测定时不需要患者空腹,减轻患者不适感也可以保证检测的准确性^[12]。相关研究结果表明,伴随着HbA1c水平升高,糖尿病患者的各种组织器官也会发生硬化和衰老。美国糖尿病学会治疗指南说明T2DM患者的HbA1c水平应维持在7%以下,会减轻甚至不对各器官功能产生影响^[13]。在本次的研究结果与以往研究的一致。

胰岛素(INS)由胰岛B细胞分泌,作用于肾近端小管的上皮细胞刷状缘的附近部位,促进吸收尿酸盐中的阴离子及代谢钠离子,破坏尿酸在体内的平衡状态,导致胰岛素抵抗和高胰岛素血症等症的发展^[14]。INS是胰岛功能的重要指标,T2DM患者易发生胰岛素抵抗现象,使体内INS水平上升,影响患者肾脏功能^[15]。本研究结果说明及时检测T2DM患者INS水平,可以监测疾病的进展。

综上所述,HbA1c和INS水平与血脂代谢异常、胰岛素抵抗和肾脏代谢异常显著相关,所以

两者作为 T2DM 患者检测的重要实验室指标。结合血脂、肾功能、胰岛功能指标等检测,可以更加准确地治疗和预防 T2DM 患者合并发生 HUA,为临床制定对应的治疗策略提供有力的依据。

参考文献

- [1] Pearson ER. Type 2 Diabetes: A Multifaceted Disease[J]. *Diabetologia*, 2019, 62(7):1107-1112.
- [2] Mortada I. Hyperuricemia, Type 2 Diabetes Mellitus, and Hypertension: an Emerging Association[J]. *Curr Hypertens Rep*, 2017, 19(9):69.
- [3] Aung T, Myung G, FitzGerald JD. Treatment approaches and adherence to urate-lowering therapy for patients with gout[J]. *Patient Prefer Adherence*, 2017, 11:795-800.
- [4] Xin YK, Guo Y, Li YL, et al. Effects of Sodium Glucose cotransporter-2 Inhibitors on Serum Uric Acid in Type 2 Diabetes Mellitus: A Systematic Review With an Indirect Comparison Meta-Analysis[J]. *Saudi J Biol Sci*, 2019, 26(2):421-426.
- [5] Lin X, Xu L, Zhao D, et al. Correlation between serum uric acid and diabetic peripheral neuropathy in T2DM patients[J]. *J Neurol Sci*, 2018, 385:78-82.
- [6] Bellou V, Belbasis L, Tzoulaki I, Evangelou E. Risk factors for type 2 diabetes mellitus: An exposure-wide umbrella review of meta-analyses[J]. *PLoS One*, 2018, 13(3):e0194127.
- [7] 闻海丰,宋春蒙,石豪妍等. 三磷酸腺苷结合盒转运蛋白 G2 基因单核苷酸多态性与痛风发病的相关性[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2017, 9(2):137-146.
- [8] Yang Q, Vijayakumar A, Kahn BB. Metabolites as regulators of insulin sensitivity and metabolism[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2018, 19(10):654-672.
- [9] Arnold SE, Arvanitakis Z, Macauley-Rambach SL, et al. Brain insulin resistance in type 2 diabetes and Alzheimer disease: concepts and conundrums[J]. *Nat Rev Neurol*, 2018; 14(3):168-181.
- [10] Su JB, Zhao LH, Zhang XL, et al. HbA1c Variability and Diabetic Peripheral Neuropathy in Type 2 Diabetic Patients[J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2018, 17(1):47.
- [11] Merton K, Davies MJ, Vijapurkar U, et al. Achieving the composite endpoint of HbA1c, body weight, and systolic blood pressure reduction with canagliflozin in patients with type 2 diabetes[J]. *Curr Med Res Opin*, 2018, 34(2):313-318.
- [12] Huang JX, Liao YF, Li YM. Clinical Features and Microvascular Complications Risk Factors of Early-onset Type 2 Diabetes Mellitus[J]. *Curr Med Sci*, 2019, 39(5):754-758.
- [13] Liu WJ, Zhang HW, Han XD, et al. Uric Acid Level Changes After Bariatric Surgery in Obese Subjects With Type 2 Diabetes Mellitus[J]. *Ann Transl Med*, 2019, 7(14):332.
- [14] 李长岭,张东铭,王崇贤,等. 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.
- [15] Ahmadieh H, Azar S. Effects of Sodium Glucose Cotransporter-2 Inhibitors on Serum Uric Acid in Type 2 Diabetes Mellitus[J]. *Diabetes Technol Ther*, 2017, 19(9):507-512.
- [8] 许颖,王冬莲,郭浩翔. 血小板与淋巴细胞比值、乳酸脱氢酶联合肺肿瘤标志物检测在肺腺癌中的诊断价值[J]. *中国卫生检验杂志*, 2019, 29(6):763-765.
- [9] 倪然,黄永杰. 血清 CA125、Cyfra21-1、SCCAg、NSE 水平监测在非小细胞肺癌晚期患者靶向治疗疗效评估中的应用价值[J]. *中国卫生工程学*, 2018, 26(3):410-412.
- [10] 江海涛,阮磊,杨建涛,等. 小细胞肺癌的 CT 表现与肿瘤标志物 NSE、CYF21-1、CEA 的相关性研究[J]. *中国现代医生*, 2018, 36(12):16-19.
- [11] Zhong XQ, Liang Q, Géraldine S, et al. On-chip spray ionization mass spectrometry for sensitive biomarker detection in small volumes[J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2018, 29(7):1538-1545.
- [12] Ren SX, Zhang SC, Jiang T, et al. Early detection of lung cancer by using an autoantibody panel in Chinese population[J]. *Oncoimmunology*, 2018, 7(2):e1384108.
- [13] 郑礼平,陈艺丹,张楠,等. 血清 LDH 在 EGFR-TKI 治疗晚期非小细胞肺癌中的应用价值[J]. *国际肿瘤学杂志*, 2019, 46(6):337-341.
- [14] 彭伟,陈津,魏伟,等. 血清 KL-6 预测肺癌患者放疗后发生放射性肺炎风险的研究[J]. *中华放射医学与防护杂志*, 2017, 37(12):891-895.
- [15] 巩强进,吕志,吴丹,等. CEA、CYFRA21-1、NSE、LDH 在良恶性胸腔积液中的鉴别诊断价值[J]. *临床肺科杂志*, 2012, 17(5):878-880.
- [16] 高洋,张启知,凌建华,等. 非小细胞肺癌患者血清 Cyfra21-1、CEA、NSE 手术前后的水平变化及意义[J]. *检验医学与临床*, 2018, 15(2):75-78.

(上接第 1229 页)

乳腺癌组织中 LAPTM4B、dCTP 焦磷酸酶的表达水平及临床意义

李辉 潘武 黄有成*

[摘要] 目的 研究乳腺癌组织中溶酶体四次跨膜蛋白质 B(LAPTM4B)、dCTP 焦磷酸酶(DCTPP1)的表达水平及临床意义。方法 选取2014年3月至2016年6月本院收治的乳腺癌患者93例作为研究对象,收集患者手术切除的肿瘤组织以及癌旁正常组织,采用免疫组化法(SP)检测两组组织中LAPTM4B、DCTPP1的表达情况,分析其临床意义。结果 乳腺癌组织部位LAPTM4B、DCTPP1阳性表达率明显高于癌旁组织,差异具有统计学意义($P<0.05$);TNM分期为Ⅱ期的乳腺癌患者LAPTM4B、DCTPP1阳性率显著高于TNMⅠ期(LAPTM4B、DCTPP1阳性率和Ⅱ期患者(LAPTM4B、DCTPP1阳性率、淋巴结转移的乳腺癌患者LAPTM4B、DCTPP1阳性表达率低于无淋巴结转移患者(LAPTM4B、DCTPP1阳性率,差异均具有统计学意义($P<0.05$);随访时间36个月,LAPTM4B、DCTPP1表达阳性患者3年生存率和生存时间均低于阴性患者的生存率和生存时间,差异具有统计学意义($P<0.05$);LAPTM4B和DCTPP1同时表达阳性患者3年生存率显著低于两者均阴性患者以及仅LAPTM4B表达阴性或者仅DCTPP1表达阴性患者生存率和生存时间,差异均具有统计学意义($P<0.05$)。结论 乳腺癌患者LAPTM4B和DCTPP1水平呈高表达状态,且其表达阳性率与患者的TNM分期、淋巴结转移以及预后均存在密切联系,有望成为乳腺癌诊断和预后的评估指标。

[关键词] 乳腺癌;溶酶体四次跨膜蛋白质B;dCTP焦磷酸酶

The expression level and clinical significance of LAPTM4B and dCTP pyrophosphatase in breast cancer tissues

LI Hui, PAN Wu, HUANG Youcheng*

(The Third Department of General Surgery, Chengdu Second People's Hospital, Chengdu, Sichuan, China, 610017)

[ABSTRACT] Objective To study the expression levels of lysosome-associated protein transmembrane 4 beta (LAPTM4B) and dCTP pyrophosphatase 1 (DCTPP1) in breast cancer tissues and their clinical significance. Methods Ninety-three breast cancer patients who were admitted and treated in the hospital between March 2014 and June 2016 were selected as the study subjects. The tumor tissues and normal adjacent tissues surgically removed were collected to detect the expression of LAPTM4B and DCTPP1 by immunohistochemical method (SP), and their clinical significance was analyzed. Results The positive expression rates of LAPTM4B and DCTPP1 in breast cancer tissues were significantly higher than those in adjacent tissues ($P<0.05$). The positive expression rates of LAPTM4B and DCTPP1 in patients with breast cancer at TNM stage II were significantly higher than those at TNM stage I and stage II. The positive expression rates of LAPTM4B and DCTPP1 in breast cancer patients with lymph node metastasis were lower than those without lymph node metastasis ($P<0.05$). The follow-up time was 36 months. The 3-year survival rate

基金项目:四川省卫生和计划生育委员会科研课题(15PJ137)

作者单位:成都市第二人民医院普外三科,四川,成都 610017

*通信作者:黄有成, E-mail: Hycyt@163.com

and survival time of LAPTM4B or DCTPP1 positive patients were lower/shorter than those of LAPTM4B or DCTPP1 negative ones ($P < 0.05$). The 3-year survival rate and the survival time of both LAPTM4B and DCTPP1 positive patients were significantly lower/shorter than those of neither LAPTM4B nor DCTPP1 negative patients ($P < 0.05$). **Conclusion** The levels of LAPTM4B and DCTPP1 in breast cancer patients are highly expressed, and their positive expression rates are closely related to the TNM staging, lymph node metastasis and prognosis of the patients, and they are expected to become indicators of breast cancer diagnosis and prognosis.

[KEY WORDS] Breast cancer; Lysosome-associated protein transmembrane 4 beta; DCTP pyrophosphatase

乳腺癌是现阶段导致女性死亡的常见疾病, 该病致死的原因主要与病情发现不及时、治疗措施不得当、出现淋巴结转移等有关^[1]。早期及时治疗可提高患者预后, 研究显示早期乳腺癌患者五年生存率可达到95%以上^[2]。溶酶体四次跨膜蛋白质B (lysosome associated protein transmembrane 4B, LAPTM4B) 是近年来发现的新型癌蛋白, 其参与细胞增殖、分化甚至恶性转化的调节, 在肿瘤的发生发展中具有重要作用^[3]。dCTP焦磷酸酶(dCTP pyrophosphatase 1, DCTPP1) 是人体发现的第一个焦磷酸水解酶, 研究表明DCTPP1水平与肿瘤组织学亚型、淋巴结转移等具有一定的相关性^[4-5]。目前关于乳腺癌癌组织中LAPTM4B和DCTPP1临床意义的研究较为少见, 因此本研究分析乳腺癌患者不同临床样本中LAPTM4B、DCTPP1的表达差异, 探讨其在肿瘤发生发展中的作用, 以期对乳腺癌的预后评估提供新的生物标志物。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2014年3月至2016年6月本院收治的乳腺癌患者93例作为研究对象, 患者年龄34~65岁, 平均年龄(49.52±4.28)岁, TNM分期: I期16例, II期52例, III期25例; 病理类型: 浸润性导管癌68例, 其他25例; 淋巴结转移情况: 有转移30例, 无转移63例。

1.2 纳入及排除标准

纳入标准: ①所有患者均符合《中国抗癌协会乳腺癌诊治指南与规范》中乳腺癌相关诊断标准^[6]; ②知情并自愿参与本研究; ③无严重免疫功能缺陷; ④均为首次发病, 且在本院进行手术治疗; ⑤均签署本院伦理委员会出具的知情同意书。排除标准: ①不符合以上诊断标准; ②合并严重心肝肾功能不全者; ③术前给予放化疗等抗肿瘤治疗者。

1.3 方法

1.3.1 试剂耗材

北京中杉金桥生物技术有限公司提供的兔抗人LAPTM4B单克隆抗体、兔抗人DCTPP1多克隆抗体, 福州迈新生物技术开发公司提供的快捷型酶标羊抗鼠/兔IgG聚合物; 广州深达生物试剂公司提供的磷酸盐缓冲液(PBS)、SP法免疫组化检测试剂盒。

1.3.2 检测方法

对所有患者乳腺癌组织以及癌旁组织进行石蜡切片处理, 每片厚度约为4 μm, 采用PBS浸泡5 min, 经65℃恒温箱烘烤30 min, 然后在二甲苯内浸泡10 min脱蜡, 分别采用乙醇、自来水、蒸馏水冲洗后, 用3%过氧化氢处理10 min, 并进行抗原热修复15 min后采用SP法检测患者乳腺癌组织以及癌旁组织中LAPTM4B、DCTPP1的表达情况。

1.4 观察指标

阳性反应为细胞浆出现棕黄色颗粒, 阴性对照为乳腺癌阳性组织切片, 采用沃尔评分法^[6]进行判定: 按染色强度评分: 不着色或浅着色、中等着色、强着色分别记0、1、2分; 按阳性占比评分: >50%记2分, 25%~50%记1分, <25%记0分。两项评分总和0~2分记阴性(即为低表达), >2分计为阳性(即为高表达)。比较乳腺癌癌组织和癌旁组织LAPTM4B、DCTPP1表达阳性率情况, 并分析上述因子阳性表达与乳腺癌患者临床病理指标间的关系。所有患者均接受乳腺癌根治术治疗, 术后通过复诊、电话随访、上门检查等形式进行随访, 随访时间为36个月, 随访内容包括症状、病理学检查等, 统计患者术后复发和死亡情况, 分析LAPTM4B、DCTPP1表达与乳腺癌患者预后的关系。

1.5 统计学方法

采用SPSS 19.0软件处理数据, 计数资料以 n (%)表示, 采取 χ^2 检验, 计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 两

组间行 *t* 检验。生存分析采用 Kaplan Meier 法, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

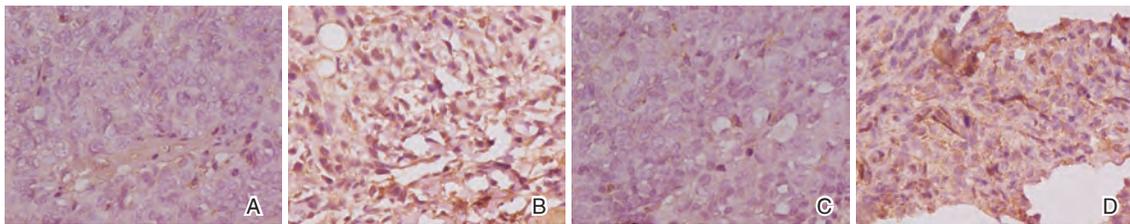
2.1 乳腺癌患者 LAPT M4B、DCTPP1 表达情况

乳腺癌组织部位 LAPT M4B、DCTPP1 阳性表达率明显高于癌旁组织, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1 和图 1。

表 1 乳腺癌患者 LAPT M4B、DCTPP1 表达情况 [$n(\%)$]

Table 1 Expression of LAPT M4B and DCTPP1 in breast cancer patients [$n(\%)$]

组织部位	LAPT M4B		DCTPP1	
	阳性	阴性	阳性	阴性
癌组织	73(78.49)	20(21.51)	80(86.02)	13(13.98)
癌旁组织	18(19.35)	75(80.65)	21(22.58)	72(77.42)
χ^2 值	65.084		75.418	
<i>P</i> 值	0.000		0.000	



注: A 为 LAPT M4B 在乳腺癌组织中呈阴性表达; B 为 LAPT M4B 在乳腺癌组织中呈阳性表达; C 为 DCTPP1 在乳腺癌组织中呈阴性表达; D 为 DCTPP1 在乳腺癌组织中呈阳性表达。

图 1 乳腺癌组织 LAPT M4B 及 DCTPP1 的表达 (SP, $\times 400$)

Figure 1 Negative and positive expression of both LAPT M4B and DCTPP1 in breast cancer tissues (SP, $\times 400$)

2.2 LAPT M4B、DCTPP1 与乳腺癌患者临床病理指标间的关系

不同 TNM 分期、淋巴结转移情况的乳腺癌患者

LAPT M4B、DCTPP1 阳性表达率比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 不同年龄、病理类型的患者上述因子阳性表达率比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 2。

表 2 LAPT M4B、DCTPP1 与乳腺癌患者临床病理指标间的关系 [$n(\%)$]

Table 2 Relationship between LAPT M4B, DCTPP1 and clinicopathological indexes of breast cancer patients [$n(\%)$]

病理指标		<i>n</i>	LAPT M4B 阳性率	<i>P</i> 值	DCTPP1 阳性率	<i>P</i> 值
年龄	≤ 50 岁	38	27(29.03)	0.147	29(31.18)	0.275
	> 50 岁	55	46(49.46)		51(54.84)	
TNM 分期	I 期	16	10(10.75)	0.0046	11(11.83)	0.017
	II 期	52 ^{ab}	38(40.86)		44 ^{ab} (47.31)	
	III 期	25	25(26.88)		25(26.88)	
病理类型	浸润性导管癌	68	54(58.06)	0.723	59(63.44)	0.733
	其他类型	25	19(20.43)		21(22.58)	
淋巴结转移	有	30	28(30.11)	0.016	30(32.26)	0.007
	无	63	45(48.39)		50(53.76)	

注: 与 TNM I 期比较, ^a $P < 0.05$; 与 TNM III 期比较 ^b $P < 0.05$ 。

2.3 LAPT M4B、DCTPP1 表达与患者预后的关系

随访时间 36 个月, LAPT M4B 表达阳性和阴性患者 3 年生存率比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。DCTPP1 表达阳性和阴性患者 3 年生存率比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。LAPT M4B 和 DCTPP1 同时表达阳性患者显著低于两者均阴性患者 [生存率为 100.00% (10/10), 生存时间为 (34.63 ± 3.55) 个月] 以及仅 LAPT M4B 表达阴性或者仅 DCTPP1 表达阴性患者生存率和生存时间 ($P < 0.05$)。见图 2。

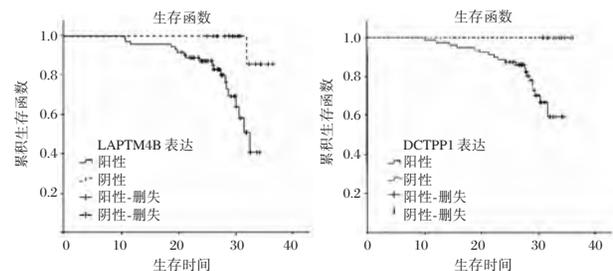


图 2 LAPT M4B、DCTPP1 表达与患者预后的关系

Figure 2 Relationship between the expression of LAPT M4B, DCTPP1 and the prognosis of patients

3 讨论

乳腺癌的发病率在女性癌症疾病中占据首位,其发生主要是由多种致癌因素共同作用于乳腺,从而对乳腺上皮组织的增殖产生影响所致^[7]。早发现、早诊断对于乳腺癌治疗方案的制定和效果的提高极其重要。乳腺癌的发生和进展过程涉及多个基因的缺失、突变和扩增,与基因组的变化密切相关^[8]。近年来,肿瘤标志物在癌症早期诊断和预后评估方面的研究日益增多,血清癌胚抗原(carcino-embryonic antigen, CEA)和糖链抗原 153(carbohydrate antigen 153, CA153)被认为是检测乳腺癌的可靠因子^[9],但是对于早期乳腺癌敏感度还不够理想,有效的乳腺癌标志物仍有待发掘。

LAPTM4B 是一种新型肿瘤相关蛋白,有研究显示该蛋白在正常组织中的表达以子宫最高,在实体恶性肿瘤中,以肝癌组织最高,其次在肺癌、结肠癌、乳腺癌、胃癌等均发现其表达水平较高^[10]。LAPTM4B 的高表达可促进细胞的恶性转化,增强细胞组织的粘附和增殖,最终导致瘤的形成。DCTPP1 属于核苷三磷酸焦磷酸酶(nucleotide triphosphates pyrophosphatase, NTP-PPase)的一种,而后者是维持核苷三磷酸平衡和清除细胞毒物、确保 DNA 准确复制的重要因子,DCTPP1 也具有相似的作用,其水平的高表达可能会促进癌细胞的分裂、增殖^[11]。本研究显示乳腺癌组织 LAPTM4B、DCTPP1 阳性表达率明显高于癌旁组织,这与以往乳腺癌中研究报道相一致^[12-13],进一步证实 LAPTM4B 和 DCTPP1 主要在乳腺癌组织中高表达。乳腺癌患者病情的逐渐恶化,会伴随着细胞内 DNA 损伤逐渐增加,从而使细胞内部异常核苷酸的比例增加。本研究结果提示上述因子在乳腺癌的病情进展中可能具有一定的调控作用。张谷等人^[14]研究也显示 LAPTM4B 高表达可促进乳腺癌患者病情进展,与本研究结果相一致,推测可能是因为 LAPTM4B 的高表达可启动 PI3K/AKT 信号通路,从而促进癌组织细胞的生长增殖,促使病情恶化;从而出现核聚集现象,为肿瘤细胞的快速增殖提供保障,从而促进病情恶化^[15]。但目前临床关于 DCTPP1 在乳腺癌的侵袭和转移中的相关研究还甚少,故其研究结论仍有待于进一步验证。

综上所述,乳腺癌患者中 LAPTM4B 和 DCTPP1 水平呈高表达状态,且其表达阳性率与患

者的 TNM 分期、淋巴结转移以及预后均存在密切联系,有望成为乳腺癌诊断和预后的评估指标。为此,后续研究可进一步延长病历随访时间,明确上述因子对肿瘤预后的价值。

参考文献

- [1] 邢海霞,赵明燕,郭勇. 乳腺癌患者血清性激素、IGF-1、VEGF 和组织 LOX 水平与淋巴结转移的相关性分析[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2019, 11(2):122-127.
- [2] 陈万青,郑荣寿. 中国女性乳腺癌发病死亡和生存状况[J]. 中国肿瘤临床, 2015, 42(13):668-674.
- [3] 赵岗,张哲莹,杜宝顺,等. LAPTM4B 在胶质瘤组织中表达及对细胞增殖和侵袭力的影响[J]. 第三军医大学学报, 2019, 41(15):1431-1437.
- [4] Lu J, Dong W, He H, et al. Autophagy induced by overexpression of DCTPP1 promotes tumor progression and predicts poor clinical outcome in prostate cancer[J]. Int J Biol Macromol, 2018, 118(Pt A):599-609.
- [5] 徐苓,夏立亮,宋飞飞,等. dCTP 焦磷酸酶在胃癌组织中的表达和分布及其临床相关性研究[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2016, 36(2):172-177.
- [6] 中国抗癌协会乳腺癌专业委员会. 中国抗癌协会乳腺癌诊治指南与规范(2007 版)[J]. 中国癌症杂志, 2007, 17(5):410-428.
- [7] 刘风华,胡艳,沈培佩,等. 乳腺癌相关淋巴水肿发病情况及危险因素前瞻性队列研究[J]. 中华放射肿瘤学杂志, 2016, 25(6):593-597.
- [8] 黄育北,宋丰举,陈可欣. 全基因组关联研究在乳腺癌筛查中的应用价值初探[J]. 中华流行病学杂志, 2019, 40(6):713-718.
- [9] 周静,朱宇熹. 多肿瘤标志物蛋白芯片检测对乳腺癌新辅助化疗的临床价值[J]. 重庆医学, 2015, 44(5):665-666.
- [10] 梁栋,李维茹,钟沛文,等. 子宫内膜癌组织 LAPTM4B-35 和 LRG1 表达变化及其临床意义[J]. 山东医药, 2018, 58(36):77-79.
- [11] Martínez-Arribas B, Requena CE, Pérez-Moreno G, et al. DCTPP1 prevents a mutator phenotype through the modulation of dCTP, dTTP and dUTP pools[J]. Cell Mol Life Sci, 2020, 77(8):1645-1660.
- [12] 杨仙荷. DCTPP1 在乳腺癌组织中的表达及意义的初步探索[D]. 2019.
- [13] Tao D, Liang J, Pan Y, et al. In vitro and in vivo study on the effect of lysosome-associated protein transmembrane 4 beta on the progression of breast cancer[J]. J Breast Cancer, 2019, 22(3):375-386.
- [14] 张谷,吴昂,高贇. 组织芯片检测 LAPTM4B 与乳腺癌临床病理因素的相关性与生存分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2013, 23(17):3348-3350.
- [15] Li X, Song C, Wang K, et al. Prognostic significance of LAPTM4B and p27kip1 expression in triple-negative breast cancer[J]. Cancer Biomark, 2019, 25(1):19-27.

H型高血压患者血清Hcy、Cyst-C与血管内皮功能的相关性

罗婉丽¹ 赵秋平^{1*} 刘荣梅² 白民富¹

[摘要] **目的** 探讨H型高血压患者血清同型半胱氨酸(Hcy)、胱抑素C(Cyst-C)与血管内皮功能的相关性。**方法** 选取2018年4月至2019年6月本院收治的180例H型高血压患者为研究对象。检测肱动脉血流介导的血管舒张功能(FMD),根据FMD将患者分为内皮功能正常组(FMD \geq 6.0%, $n=78$)和内皮功能受损组(FMD $<$ 6.0%, $n=102$),选择同时期健康体检者92例。检测患者空腹血糖、肌酐(Scr)、三酰甘油(TG)、总胆固醇(TC)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、Hcy、Cyst-C,分析其与FMD的相关性。采用非条件Logistic回归分析内皮功能受损影响因素,用受试者工作曲线(ROC)和曲线下面积(AUC)评估血清Hcy、Cyst-C预测内皮功能受损的价值。**结果** 内皮功能受损组患者年龄高于正常组和健康体检组($P<0.05$);血清Hcy、Cyst-C水平比较,内皮功能受损组 $>$ 内皮功能正常组 $>$ 健康体检组($P<0.05$);FMD与年龄、Hcy、Cyst-C呈负相关($r=-2.106$ 、 -3.125 、 -2.943 , $P<0.05$);Logistic回归分析结果显示,年龄、Hcy、Cyst-C为内皮功能受损的独立危险因素($P<0.05$);血清Hcy、Cyst-C预测内皮功能受损的截断值分别为 $\geq 15.52 \mu\text{mol/L}$ 、 $\geq 1.28 \text{mg/L}$,AUC值分别为0.756、0.732。**结论** H型高血压患者血清Hcy、Cyst-C与血管内皮功能呈负相关,是内皮功能受损的独立危险因素,可作为早期预测指标应用于临床。

[关键词] H型高血压;同型半胱氨酸;胱抑素C;内皮功能

Correlation between serum Hcy and Cyst-C and vascular endothelial function in patients with H-type hypertension

LUO Wanli¹, ZHAO Qiuping^{1*}, LIU Rongmei², BAI Minfu¹

(1. Department of Hypertension, Fuwai Hospital of Central, Zhengzhou, Henan, China, 450000;

2. Henan Hypertension Control Center, Zhengzhou, Henan, China, 450000)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the correlation between serum homocysteine (Hcy) and Cystatin C (Cyst-C) and vascular endothelial function in patients with H-type hypertension. **Methods** A total of 180 patients with H-type hypertension treated in our hospital from April 2018 to June 2019 were selected as the study subjects. The brachial artery blood flow-mediated dilatation (FMD) was detected, and patients were divided into normal endothelial function group (FMD \geq 6.0%, $n=78$) and impaired endothelial function group (FMD $<$ 6.0%, $n=102$) according to FMD, and another 92 cases of healthy examiners at the same time period were selected. The fasting blood glucose, creatinine (Scr), triacylglycerol (TG), total cholesterol (TC), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), Hcy and Cyst-C were detected among the patients, and their correlation with FMD was analyzed. Unconditional Logistic regression analysis was used to analyze the influencing factors of endothelial function impairment, and the receiver

基金项目:河南医学科技攻关计划项目(2018020466)

作者单位:1. 华中阜外医院高血压科,河南,郑州 450000

2. 河南省高血压防治中心,河南,郑州 450000

*通信作者:赵秋平, E-mail: hnzhenzhoushi88@163.com

operating characteristic curve (ROC) and area under the curve (AUC) were used to evaluate the value of serum Hcy and Cyst-C in predicting endothelial function impairment. **Results** The age in impaired endothelial function group was higher than that in the normal group and health examination group ($P<0.05$). Comparison of serum Hcy and Cyst-C showed impaired endothelial function group > normal endothelial function group > health examination group. FMD was negatively correlated with age, Hcy and Cyst-C ($r=-2.106, -3.125, -2.943, P<0.05$). Logistic regression analysis showed that age, Hcy and Cyst-C were independent risk factors for endothelial function impairment ($P<0.05$). The cutoff values of serum Hcy and Cyst-C in predicting endothelial function impairment were $\geq 15.52 \mu\text{mol/L}$ and $\geq 1.28 \text{ mg/L}$, and the AUC values were 0.756 and 0.732 respectively. **Conclusion** Serum Hcy and Cyst-C in patients with H-type hypertension are negatively correlated with vascular endothelial function. They are independent risk factors for endothelial function impairment and can be used as early predictive indicators for clinical application.

[KEY WORDS] H-type hypertension; Homocysteine; Cystatin C; Endothelial function

高血压是促进机体动脉粥样硬化发生发展的危险因素,在老年人群中发病率较高,H型高血压指伴血浆同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy) $\geq 10 \mu\text{mol/L}$ 的原发性高血压^[1]。Hcy是机体氨基酸代谢过程中产生的一种中间产物,其在血清的高水平表达与心脑血管疾病、神经退行性疾病等存在相关性^[2]。既往研究报道称^[3],H型高血压可增加不良心脑血管事件的发生风险,尤其对动脉粥样硬化的发生有较大影响。胱抑素C(Cystatin C, Cyst-C)在人体内产生较为恒定,已有研究证实,高血压患者血清Cyst-C与颈动脉内膜中层厚度呈正相关,对颈动脉粥样硬化有一定预测作用^[4]。目前临床认为血管内皮功能损伤是动脉粥样硬化发生发展的主要病理环节之一,而不同分级的高血压患者其内皮功能损伤程度也不同,检测内皮功能对高血压防治有重要意义^[5]。本研究旨在探讨H型高血压患者血清Hcy、Cyst-C与血管内皮功能的相关性,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2018年4月至2019年6月本院收治的180例H型高血压患者为研究对象。诊断标准参考《中国高血压防治指南2010》^[6]。纳入标准:①均为新发高血压且未服用相关降压药物;②患者均签署知情同意书。排除标准:①继发性高血压;②合并肾炎、肾功能不全、泌尿系统感染等泌尿系统疾病者;③合并糖尿病、外周血管疾病、先天性心脏病、急性心力衰竭、心脑血管并发症等疾病;④合并自身免疫性疾病、恶性肿瘤或血脂异常者;⑤入组前1个月内服用叶酸、氨甲蝶呤、抗癫痫药物等影响

Hcy代谢的药物者;⑥合并精神意识障碍者。选择同时期健康体检者92例,血压正常,均自愿参与研究。本研究经本院医学伦理委员会批准。

1.2 内皮功能检测方法

检测仪器为GE公司LOGIQ7彩超诊断系统,二维超声显像显示肱动脉内径;心室舒张末期测量股动脉血管内径,记录为D1;袖带充气加压使之 $\geq 250 \text{ mmHg}$,阻断肱动脉血流,维持施压状态5 min后立即放气,1 min后记录肱动脉内径D2,记录3个心动周期取均值。肱动脉血流介导的血管舒张功能(FMD) $= (D2-D1)/D1 \times 100\%$, FMD $\geq 6.0\%$ 提示内皮功能正常, FMD $< 6.0\%$ 怀疑内皮功能受损^[7]。根据FMD将180例患者分为内皮功能正常组($n=78$)和内皮功能受损组($n=102$)。

1.3 生化指标检测方法

患者于入组第2 d清晨采集空腹肘静脉血3 mL,常规离心分离血清。采用迈瑞BS-450全自动生化分析仪检测空腹血糖、肌酐(Scr)、三酰甘油(TG)、总胆固醇(TC)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)。用酶联免疫吸附法测定Hcy,用胶乳增强免疫比浊法测定Cyst-C。

1.4 统计学处理

采用SPSS 21.0软件进行分析。计数资料以(%)表示,组间比较采用 χ^2 检验;计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,3组间比采取单因素方差分析;两变量间相关性分析采用Pearson直线相关分析;内皮功能受损的影响因素分析采用非条件Logistic回归分析;用受试者工作曲线(ROC)和曲线下面积(AUC)评估血清Hcy、Cyst-C预测内皮功能受损的价值。以 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 3组受检者一般资料比较

3组受检者性别、BMI指数、心率、吸烟等一

般资料比较差异无统计学意义($P>0.05$),内皮功能受损组患者年龄高于内皮功能正常组和健康体检组,差异具有统计学意义($P<0.05$),见表1。

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

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

组别	n	男性	年龄(岁)	BMI(kg/m^2)	心率(次/min)	吸烟
内皮功能正常组	78	41(52.56)	53.24 \pm 10.67 ^a	24.10 \pm 3.27	69.11 \pm 9.23	22(28.21)
内皮功能受损组	102	59(57.84)	59.16 \pm 11.05	24.52 \pm 3.34	70.04 \pm 9.12	37(36.27)
健康体检组	92	49(53.26)	54.12 \pm 11.24 ^a	24.09 \pm 3.18	70.11 \pm 9.37	21(22.83)
χ^2/F 值		0.627	7.677	0.514	0.331	4.291
P 值		0.731	0.001	0.599	0.718	0.117

注: BMI为体重指数;与内皮功能受损组比较,^a $P<0.05$ 。

2.2 3组受检者生化指标比较

3组受检者空腹血糖、Scr、TG、TC、HDL-C、LDL-C水平,比较差异无统计学意义($P>0.05$),血

清Hcy、Cyst-C水平比较,内皮功能受损组>内皮功能正常组>健康体检组差异有统计学意义($P<0.05$),见表2。

表2 3组受检者生化指标比较 [n , ($\bar{x}\pm s$)]

Table 2 Comparison of biochemical indicators among the 3 groups [n , ($\bar{x}\pm s$)]

组别	n	空腹血糖 (mmol/L)	Scr ($\mu\text{mol}/\text{L}$)	TG (mmol/L)	TC (mmol/L)	HDL-C (mmol/L)	LDL-C (mmol/L)	Hcy ($\mu\text{mol}/\text{L}$)	Cyst-C (mg/L)
内皮功能正常组	78	5.26 \pm 1.04	80.15 \pm 15.61	1.89 \pm 0.96	4.78 \pm 1.13	1.15 \pm 0.34	3.05 \pm 0.75	14.82 \pm 2.26 ^a	1.01 \pm 0.27 ^a
内皮功能受损组	102	5.49 \pm 1.09	83.26 \pm 16.89	1.97 \pm 0.90	4.92 \pm 1.10	1.21 \pm 0.32	3.11 \pm 0.72	17.94 \pm 3.60 ^{ab}	1.31 \pm 0.42 ^{ab}
健康体检组	92	5.21 \pm 1.12	81.47 \pm 16.24	1.91 \pm 0.95	4.65 \pm 1.16	1.20 \pm 0.35	3.01 \pm 0.67	12.10 \pm 2.19	0.64 \pm 0.21
F 值		1.724	0.838	0.179	1.296	0.827	0.451	101.778	104.608
P 值		0.180	0.434	0.836	0.275	0.438	0.637	0.000	0.000

注:与健康体检组比较,^a $P<0.05$;与内皮功能正常组比较,^b $P<0.05$ 。

2.3 内皮功能受损的影响因素分析

以内皮功能有无损伤为因变量(内皮功能正常赋值为0,内皮功能损伤赋值为1),以年龄、Hcy、Cyst-C为自变量,进行非条件Logistic回归分析,结果显示,年龄、Hcy、Cyst-C为内皮功能受损的独立危险因素($P<0.05$),见表3。

2.4 相关性分析

Pearson相关性分析结果显示,FMD与年龄、Hcy、Cyst-C呈负相关($r=-2.106$ 、 -3.125 、 -2.943 , $P<0.05$),与BMI指数、心率、空腹血糖、Scr、TG、TC、HDL-C、LDL-C无显著相关性($P>0.05$)。

表3 内皮功能受损的影响因素分析

Table 3 Analysis of influencing factors of endothelial function impairment

指标	β 值	SE 值	Wald/ χ^2 值	OR 值	95%CI	P 值
年龄	0.671	0.312	4.631	1.957	1.062~3.607	0.031
Hcy	1.327	0.437	9.215	3.768	1.600~8.873	0.002
Cyst-C	1.213	0.458	7.009	3.362	1.370~8.250	0.008

2.5 血清Hcy、Cyst-C预测内皮功能受损的价值分析

血清Hcy、Cyst-C预测内皮功能受损的截断值分别为 $\geq 15.52 \mu\text{mol}/\text{L}$ 、 $\geq 1.28 \text{mg}/\text{L}$,AUC值分别为0.756、0.732,此时约登指数越大分别0.450 2、

0.481 9,见表4。

3 讨论

高血压患者血管内皮功能较健康人群有一定损伤,降压治疗可改善内皮功能,分析认为高血压

表4 血清Hcy、Cyst-C预测内皮功能受损的价值分析(%)

Table 4 Analysis of value of serum Hcy and Cyst-C in predicting endothelial function impairment (%)

指标	截断值	AUC	敏感度	特异度	约登指数	95%CI
Hcy	15.52	0.756	74.51	70.51	0.4502	0.686-0.817
Cyst-C	1.28	0.732	55.88	92.31	0.4819	0.661-0.795

的发生发展与血管内皮功能障碍紧密相关,保护内皮功能对防治高血压有积极意义^[8]。

Hcy是机体内蛋氨酸循环过程中产生的一种含硫氨基酸的代谢中间产物,主要通过甲基化替代、重甲基化、与丝氨酸的缩合反应、直接释放至细胞外液等途径生成,Hcy转化受阻、代谢缓慢并在体内蓄积,血浆中含量超过10 μmol/L则为高同型半胱氨酸血症(HHcy)^[9]。国外相关研究表明^[10],HHcy也是导致不良心血管事件的危险因素,和高血压的协同作用会极大增加心脑血管疾病的发生率。机体血Hcy和血管内皮功能变化均为H型高血压发生、进展的重要因素,两者表达是否存在关联需要进一步研究。本研究结果表明Hcy可能参与了血管内皮功能损伤过程。既往有研究报道称^[11-12],HHcy会刺激血管平滑肌细胞分裂增殖,导致血管管壁增厚和舒张功能衰退,严重时血管结构破坏重构,进一步增加体循环血管阻力,促进血压升高。袁坚宾学者^[13]的研究认为,HHcy会促进高血压患者的氧化应激和炎症反应,导致颈动脉粥样硬化,因此氧化应激也是Hcy影响血管内皮功能的重要机制之一。

Cyst-C是一种半胱氨酸蛋白酶抑制剂,在体内参与细胞内外蛋白水解的调控,保护细胞免受不适当的蛋白酶水解。黎思等学者^[14]的研究表明,原发性高血压患者血清Cyst-C与颈动脉内膜中层厚度呈正相关,是导致颈动脉粥样硬化的危险因素。血管内皮细胞受损可激活巨噬细胞和平滑肌细胞,促进组织蛋白酶释放以降解细胞外基质,而Cyst-C因抑制组织蛋白酶的过度表达被消耗,因此斑块处Cyst-C水平下降,机体为达到局部平衡需合成更多的Cyst-C以调节细胞内外蛋白酶的降解,最终使得血清中Cyst-C水平升高,因而血清Cyst-C水平可间接反映血管内皮损伤情况。本研究结果与赵敏等学者^[7]的研究结果类似。

进一步对血管内皮功能损伤的影响因素进行回归分析,结果表明,Hcy、Cyst-C为内皮功能受损的独立危险因素,与张勇^[15]、赵敏等学者^[7]的研究结果一致,提示高血压患者在降压治疗的同时也应降低血Hcy、Cyst-C,以保护血管内皮功能,减少心脑血管疾病的发生。ROC曲线分析结果则表明,检测血清Hcy、Cyst-C水平对预测血管内皮功能损伤有一定价值,有利于颈动脉粥样硬化的防治。此外,本研究还发现年龄是内皮功能受损的独立危险因素之一。分析原因认为,高龄患者血脂异常可能性较年轻人高,高血压严重程度也相对较高,加上老年人机体调节能力变差,因而血管内皮功能损伤更严重^[16]。

综上所述,H型高血压患者血清Hcy、Cyst-C与血管内皮功能呈负相关,是内皮功能受损的独立危险因素,在降压治疗的同时需降低血Hcy、Cyst-C,以减少心脑血管疾病的发生。

参考文献

- [1] 段凌菱,孙向阳,冯达应.依那普利叶酸片与依那普利治疗H型高血压伴慢性心力衰竭疗效比较[J].热带医学杂志,2018,18(6):803-806.
- [2] 陆冰,潘晓东,周林赞,等.老年高血压患者同型半胱氨酸水平与脑白质病变分级及认知功能的相关性研究[J].中华老年医学杂志,2019,38(3):251-254.
- [3] 吕海权,雷敏,陆敏,等.H型高血压对冠心病患者预后的影响[J].中国动脉硬化杂志,2016,24(4):396-400.
- [4] 莫新玲,杨锡恒,谢婷,等.H型高血压合并2型糖尿病患者血浆Hcy、Cyst-C水平与颈动脉内膜中层厚度的关系[J].广东医学,2017,38(6):855-858.
- [5] 梁文坚,王清海.复方芪麻胶囊对颈动脉粥样硬化斑块干预作用的机制[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(19):189-194.
- [6] 中国高血压防治指南修订委员会.中国高血压防治指南2010[J].中华心血管病杂志,2011,39(7):579-616.
- [7] 赵敏,沈小梅,张红灵,等.原发性高血压患者血清胱抑素C与血管内皮功能的相关性[J].中华高血压杂志,2015,23(9):832-835.
- [8] 赫连曼,蒋玲,王浩,等.原发性高血压患者25羟基维生素D水平与血管内皮功能及血浆肾素活性的相关性[J].中华高血压杂志,2019,27(1):48-52.
- [9] 杨国涛,赵红英,董爱勤.血清尿酸水平对无神经症状颈动脉粥样硬化患者长期预后的影响研究[J].中国全科医学,2017,20(30):3731-3735.
- [10] Ru JP, Yang QH, Jia XD. Study on the correlation of carotid IMT with Hcy, Cyst-C, UA, and Lp(a) in middle-aged patients with H-type hypertension[J]. J Hainan Med University, 2017,23(2):6-8.

多模态超声对于乳腺癌不同 BI-RADS 分类诊断的价值及与分子分型的关系

任少杰¹ 姜菊^{2*} 吕洪兵³

[摘要] 目的 探究多模态超声技术在不同超声 BI-RADS 分类乳腺良恶性结节诊断中的价值及与乳腺癌分子分型的关系。方法 纳入本院 2017 年 12 月至 2019 年 12 月 165 例疑似乳腺癌患者,以病理检查结果为金标准,对比多模态超声诊断的准确率、敏感性和特异性;依据超声影像进行 BI-RADS 分级,对比不同 BI-RADS 分级的诊断准确率,并分析超声征象与乳腺癌分型的相关性。结果 病理诊断结果显示良性 104 例(63.0%),恶性 61 例(37.0%)。多模态超声联合诊断的敏感度为 93.4%,特异度为 94.2%,阳性预测值为 90.5%,阴性预测值为 96.1%,均显著高于常规超声、超声造影及超声弹性成像($P < 0.05$)。乳腺癌不同 BI-RADS 分级患者病灶直径、良恶性比例、恶性诊断准确率比较差异具有统计学意义($P < 0.05$);不同 BI-RADS 分级患者病理分型比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。Luminal A 型、Luminal B 型、HER-2 过表达及三阴性病灶直径、高回声晕比较差异无统计学意义($P > 0.05$);纵横比、内部回声是否均匀、微钙化比比较差异具有统计学意义($P < 0.05$)。结论 联合多模态超声检测并结合 BI-RADS 分类可显著提升乳腺癌的诊断准确率,通过超声征象可初步判断乳腺癌分子分型,对乳腺癌患者的临床诊疗具有良好价值。

[关键词] 乳腺癌;多模态超声;BI-RADS 分类;分子分型

The value of multimodal ultrasound in the diagnosis of breast cancer with different BI-RADS classification and its relationship with molecular typing

REN Shaojie¹, JIANG Ju², LV Hongbing³

(1. Department of Ultrasound, the Third People's Hospital of Langfang, Langfang, Hebei, China, 065000;
2. Department of Ultrasound, Langfang Traditional Chinese Medicine Hospital, Langfang, Hebei, China, 065000; 3. Department of Ultrasound, Guang'an Hospital of Langfang City, Langfang, Hebei, China, 065000)

[ABSTRACT] Objective To explore the value of multimodal ultrasound technology in the diagnosis of benign and malignant breast nodules with different ultrasound BI-RADS and its relationship with breast cancer molecular typing. Methods Including 165 patients with suspected breast cancer in our hospital from December 2017 to December 2019. The pathological examination results were used as the gold standard to compare the accuracy, sensitivity and specificity of multimodal ultrasound diagnosis. Based on the ultrasound images, BI-RADS classification was performed, the diagnostic accuracy of different BI-RADS classifications was compared, and the correlation between ultrasound signs and breast cancer classification was analyzed. Results Pathological diagnosis showed that 104 cases were benign (63.0%) and 61 cases were malignant (37.0%). The sensitivity of multimodal ultrasound combined diagnosis was 93.4%, specificity was 94.2%,

基金项目:河北省廊坊市科学技术研究与发展计划项目(2016013033)

作者单位:1. 廊坊市第三人民医院超声科,河北,廊坊 065000

2. 廊坊市中医院超声科,河北,廊坊 065000

3. 廊坊市广安医院超声科,河北,廊坊 065000

*通信作者:姜菊, E-mail: doukanchuangtui@163.com

positive predictive value was 90.5%, negative predictive value was 96.1%, which were significantly higher than conventional ultrasound, ultrasound contrast, and ultrasound elastography ($P < 0.05$). There were statistically significant differences in lesion diameter, benign and malignant ratio, and accuracy of malignant diagnosis among breast cancer patients with different BI-RADS grades ($P < 0.05$); there was no significant difference in pathological classification between patients with different BI-RADS grades ($P > 0.05$). Luminal A type, Luminal B type, HER-2 overexpression and triple-negative lesion diameter, high echo halo were not significantly different ($P > 0.05$); aspect ratio, internal echo are uniform, and microcalcification ratio was statistically different Significance ($P < 0.05$). **Conclusion** Combined multi-modality ultrasound detection and BI-RADS classification can significantly improve the diagnostic accuracy of breast cancer. The molecular classification of breast cancer can be preliminarily judged by ultrasound signs, which has good value for clinical diagnosis and treatment of breast cancer patients.

[KEY WORDS] Breast cancer; Multimodal ultrasound; BI-RADS classification; Molecular typing

乳腺癌是女性发病率最高的恶性肿瘤之一,近年来乳腺癌的发病率逐渐升高,严重威胁了女性的身体健康,对乳腺癌及时的诊断和治疗是延长患者生存率和降低病死率的主要手段。超声弹性成像及超声造影技术作为迅速发展的高新技术为乳腺癌的诊断提供了越来越多的影像学信息补充,在乳腺癌的诊断中具有独特优势^[1]。美国放射学会超声乳腺影像报告和数据系统(BI-RADS)对乳腺结节进行量化风险评估,以提高诊断的准确率^[2]。乳腺癌分子分型对于肿瘤的生物学活性和个体化治疗具有重要意义。分子分型中的分子生物学因素决定了乳腺癌患者组织病理学改变和生物学行为,进而对肿瘤的影像学表现造成影响^[3]。目前,对于乳腺癌超声征象与分子分型的相关性研究尚不多见。因此,本研究对多模态超声对于乳腺癌不同BI-RADS分类诊断的价值及与分子分型的相关性进行了探究,以期提升乳腺癌患者的超声诊断、治疗及预后判断等相关认知提供有效依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

纳入本院2017年12月~2019年12月165例疑似乳腺癌患者,年龄29~77岁,平均(51.4±3.8)岁,病灶直径0.8~4.2 cm,平均(1.9±0.7)cm。所有患者均行穿刺活检或手术病理明确,作为乳腺癌超声诊断结果评估的依据。

纳入标准:①超声BI-RADS分级3~5级;②临床存在乳腺肿块疑似乳腺癌病变;③均自愿参与本研究并签署知情同意书;④临床资料、病理学资料及影像学资料完整。排除标准:①肝、肾、心、肺等脏器功能障碍者;②造影剂过敏者;③合并其

他部位恶性肿瘤者;④乳腺炎症性疾病者;⑤妊娠及哺乳期妇女;⑥存在沟通交流障碍者。本研究获得院伦理委员会批准通过。

1.2 方法

所有疑似患者均采用日立HV900型彩色多普勒超声诊断仪进行检查,探头频率6~13 MHz,根据病灶调整增益、深度和聚焦部位,均由同一超声医生采集图像,图像分析由2位高资历医师进行评估,意见不一致时,以2人讨论结果作为最终结果。

1.2.1 常规超声

取侧卧位或平卧位,对乳腺病灶的形态、大小、内部回声、数量、有无包膜、钙化、衰减等进行探查。

1.2.2 超声造影

患者均平静呼吸,意大利Bracco公司声诺维行超声造影,以结节血供丰富切面行实时超声造影模式,于肘静脉快速注入5.0 mL的SonoVue和5 mL的0.9%氯化钠注射液。动态观测并实时存储180 s动态图像,并对造影增强模式进行分析评价。

1.2.3 超声弹性成像

患者在显示结节后屏气,选定取样框大小,固定探头位置和力度3 s以上,调整图像清晰度已获得可重复的、稳定的图像。对图像进行冻结回放,选择较好的图像进行分析。超声弹性成像采用日本Tsukuba大学的UE5分法进行评分^[4],<4分为良性,≥4分为恶性。

1.3 观测指标

1.3.1 诊断效能分析

以穿刺活检或手术病理为金标准,分析常规超声、超声造影、超声弹性成像及联合诊断的敏感

度、特异度、阳性预测值、阴性预测值。

1.3.2 超声 BI-RADS 分类标准^[2]

超声 BI-RADS 分类分为 0~5 级:0 级影像学评估不完善,需要进一步进行影像学检查;1 级:阴性;2 级为良性;3 级为良性概率较大;4 级为恶性概率较大;5 级为高度提示恶性。

1.3.3 乳腺癌分子分型标准

根据 PR、ER、HER-2 及 Ki-67 表达情况对乳腺癌进行分型,分为 Luminal A 型、Luminal B 型、HER-2 过表达及三阴性。其中 PR、ER 阳性细胞数 ≤10% 为阴性, >10% 为阳性;HER-2 阴性: CerB-2 (-)、(+), HER-2 阳性: CerB-2 (+++); CerB-2 (++) 患者行荧光原位杂交实验检测 HER-2 基因扩增状态为阳性, 否则为阴性。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 20.0 软件进行数据分析,计数资料以 n(%) 表示,组间比较采用 χ^2 检验; $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 多模态超声对乳腺良恶性结节的诊断价值

联合诊断的各项指标显著优于单一检测,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 不同 BI-RADS 分类结果比较

乳腺癌不同 BI-RADS 分级患者病灶直径、良

表 1 多模态超声对乳腺良恶性结节的诊断价值 [n(%)]

Table 1 Diagnostic value of multimodal ultrasound for benign and malignant breast nodules [n(%)]

方法	n	敏感度	特异度	阳性预测值	阴性预测值
常规超声	61	39(63.9)	72(69.2)	39(52.7)	78(85.7)
超声造影	61	48(78.7)	83(79.8)	48(70.6)	89(91.7)
超声弹性成像	61	49(80.3)	80(76.9)	49(74.2)	89(89.9)
联合诊断	61	57(93.4)	98(94.2)	57(90.5)	98(96.1)
χ^2 值		16.138	65.730	24.082	6.532
P 值		0.001	0.000	0.000	0.000

恶性比例、恶性诊断准确率比较差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 不同 BI-RADS 分类结果比较 [n(%)]

Table 2 Comparison of different BI-RADS classification results [n(%)]

分类	n	比率 (%)	病灶直径 (cm)	良性	恶性	恶性诊断准确率 (%)
3 级	3	4.8	1.4±0.4	6(3.8)	2(1.3)	2(66.7)
4 级	8	26.7	1.6±0.7	34(21.2)	10(6.2)	6(75.0)
5 级	49	68.5	1.9±0.8	64(40.0)	47(29.4)	47(95.1)
χ^2 值		157.756	2.795	61.964	66.824	6.523
P 值		0.000	0.008	0.000	0.000	0.000

2.3 不同 BI-RADS 分类乳腺癌患者病理分型比较

浸润性导管癌是乳腺癌的主要病理类型,不同 BI-RADS 分类乳腺癌患者浸润性导管癌、浸润性小叶癌、导管内癌、乳头状癌、粘液腺癌及鳞癌比例比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 3。

表 3 不同 BI-RADS 分类乳腺癌患者病理分型比较 [n(%)]

Table 3 Comparison of pathological types of breast cancer patients with different BI-RADS classifications [n(%)]

分类	n	浸润性导管癌	浸润性小叶癌	导管内癌	乳头状癌	粘液腺癌	鳞癌
3 级	3	2(3.3)	0	1(1.6)	0	0	0
4 级	8	3(4.9)	2(3.3)	1(1.6)	1(1.6)	0	1(1.6)
5 级	49	35(57.4)	4(6.6)	4(6.6)	2(3.3)	3(4.9)	1(1.6)
χ^2 值				7.372			
P 值				0.497			

2.4 多模态超声对于不同 BI-RADS 分级乳腺癌诊断的准确率

多模态超声联合检测对于不同 BI-RADS 分级乳腺癌的诊断准确率显著高于常规超声、超声造影及超声弹性成像单一检测,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 4。

2.5 超声征象与乳腺癌分子分型的相关性

不同分子分型乳腺癌患者病灶直径、高回声晕比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$);纵横比、内部回声是否均匀、微钙化比较差异具有统计学意义

表 4 多模态超声对于不同 BI-RADS 分级乳腺癌诊断比较

Table 4 The accuracy of multimodal ultrasound in the diagnosis of breast cancer with different BI-RADS grades

方法	3 级	4 级	5 级
常规超声	3.3(1/3)	37.5(3/8)	71.4(35/49)
超声造影	6.7(2/3)	62.5(5/8)	83.7(41/49)
超声弹性成像	6.7(2/3)	50.0(4/8)	87.8(43/49)
联合检测	6.7(2/3)	75.0(6/8)	95.9(47/49)
χ^2 值		10.541	
P 值		0.011	

($P < 0.05$)。见表 5。

表5 超声征象与乳腺癌分子分型的相关性 [n (%)]
Table 5 Correlation between ultrasound signs and molecular typing of breast cancer [n (%)]

超声征象		Luminal A 型 (n=18)	Luminal B 型 (n=22)	HER-2 过表达 (n=12)	三阴性 (n=9)	χ^2 值	P 值
病灶直径	≤2 cm	15(83.3)	17(77.3)	10(83.3)	7(77.8)	0.338	0.953
	>2 cm	3(16.7)	5(22.7)	2(16.7)	2(22.2)		
内部回声	均匀	4(22.2)	2(9.1)	6(50.0)	4(44.4)	8.536	0.036
	不均匀	14(77.8)	20(90.9)	6(50.0)	5(55.6)		
纵横比	≤1	17(94.4)	20(90.9)	10(83.3)	5(55.6)	8.115	0.044
	>1	1(5.6)	2(9.1)	2(16.7)	4(44.4)		
高回声晕	无	9(50)	12(54.5)	5(41.7)	4(44.4)	0.610	0.894
	有	9(50)	10(45.5)	7(58.3)	5(55.6)		
微钙化	无	4(22.2)	4(18.2)	10(83.3)	4(44.4)	16.449	0.001
	有	14(77.8)	18(81.8)	2(16.7)	5(55.6)		

3 讨论

超声造影技术可实时动态反应乳腺肿瘤病灶的血供情况,清楚显示肿瘤病灶的活跃程度和侵蚀范围^[5-6]。本研究中,超声造影技术相对于常规超声提高了乳腺肿瘤诊断的敏感度和特异度。这是由于彩色多普勒超声对于较大的滋养血管具有较好的显示能力,但对于微小血管显示不足。研究显示^[7-8],弹性成像在微小钙化及微小乳腺癌的诊断中具有显著优势。本研究结果显示采用多模态超声联合诊断乳腺癌进一步提升了诊断敏感度、特异度、阳性预测值和阴性预测值,这与国内的一些报道相一致^[9-10]。

BI-RADS 分级主要根据乳腺肿块形状、肿块边界、肿块内部血供血流情况及周围组织回声等进行综合评估^[11]。本研究结果提示多模态超声可提高 BI-RADS 分级评估的准确性,在乳腺肿块检查过程中,通过多切面的、多次的各项扫查,保障图像质量,才能降低乳腺癌的误诊和漏诊,提升诊断的准确性。

不同分子亚型乳腺癌分子生物学不同,通过 ER、PR、HER-2 及 Ki-67 表达可从不同角度反映乳腺癌的生物学行为及患者预后。不同分子亚型的乳腺癌的发病率各有差异,Luminal A 型为最常见的乳腺癌分子亚型,其对内分泌治疗敏感较高,复发风险低,预后较好^[12];Luminal B 型在老年乳腺癌患者中更为常见,化疗敏感性较低,但内分泌治疗较为敏感。HER-2 分子分型乳腺癌恶性程度较高,有转移倾向,预后较差;三阴性乳腺癌对化疗敏感,容易复发转移^[13-14]。因而,通过多模态超声征象与分子分型的关系评估对于乳腺癌患

者的诊断及治疗方案选择具有重要意义。Luminal A 型和 Luminal B 型内部血管密度高,纤维化程度高,三阴性乳腺癌多边界清晰,边缘光滑,纵横比更准确。因此,不同分子分型乳腺癌患者超声征象存在一定差异,临床上应加以重视,以做好乳腺癌的诊断和针对性治疗。本研究存在一定的局限性,本研究纳入乳腺癌患者例数较少,可能在结果上存在一定的偏倚;同时,BI-RADS 分级对于乳腺肿块血流划分较为粗略,仅针对划分了乳腺肿块内有无血流情况,因此在后续的研究将扩大样本数并关注乳腺癌患者血管数量及血流分布等与分子分型的关系。

综上所述,联合多模态超声检测并结合 BI-RADS 分类可显著提升乳腺癌的诊断准确率,通过超声征象可初步判断乳腺癌分子分型,对乳腺癌患者的临床诊疗具有良好价值。

参考文献

- [1] 毛玉瑶,周元全,文欢,等.多模态超声技术在乳腺癌诊断中的新进展[J].中国普通外科杂志,2017,26(11):1478-1484.
- [2] American college of Radiology. Breast Imaging Reporting and Data System (BIRADS) [DB/OL]. <https://www.acr.org/Clinical-Resources/Reporting-and-Data-Systems>.
- [3] 杨欢,彭玉兰.乳腺癌超声、MRI、X线征象与分子分型的相关性[J].中国医学影像技术,2017,33(5):675-678.
- [4] Covey AM, Sofocleous CT. Rfrefrequency ablation as a treatment strategy for liver metastases from breast cancer [J]. Sem Int Rad, 2008, 25(4): 406-412.
- [5] 苏彤,赵燕妹,张玲,等.多模态超声评估乳腺癌新辅助化疗的价值[J].南京医科大学学报(自然科学版),2019,39(3):414-417.
- [6] 吕文豪,聂芳,张雪云,等.超声造影评价乳腺癌病灶增强区域扩大程度与免疫指标的相关性分析[J].中国超声医学杂志,2018,34(6):485-487. (下转第1250页)

TPG对HaCaT细胞增殖、凋亡、细胞周期及miR-320/RASA1表达的影响

陈怡* 朱颜俊 树瑜

[摘要] 目的 观察赤芍总苷(TPG)对HaCaT细胞增殖、凋亡、细胞周期分布、miR-320和Ras p21蛋白活化子1(RASA1)表达的影响。方法 TPG处理HaCaT细胞后,细胞计数试剂盒(CCK-8)检测细胞活力。流式细胞术检测细胞凋亡和周期分布;实时荧光定量PCR(RT-qPCR)和蛋白质印记(Western blot)检测miR-320和RASA1表达。双荧光素酶报告实验和western blot确定miR-320和RASA1之间调控关系。检测抑制miR-320表达后HaCaT细胞增殖、凋亡和细胞周期分布情况。结果 TPG可降低HaCaT细胞的活力,促进HaCaT细胞凋亡,诱导G₀/G₁期阻滞,抑制miR-320表达,促进RASA1表达,差异有统计学意义($P<0.05$)。miR-320靶向负性调控RASA1表达。干扰miR-320可抑制HaCaT细胞增殖,诱导细胞凋亡和G₀/G₁期阻滞,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 TPG可抑制HaCaT细胞增殖,诱导细胞凋亡和细胞周期G₀/G₁期阻滞,其机制可能与下调miR-320/RASA1通路有关。

[关键词] 赤芍总苷;银屑病;增殖和凋亡;细胞周期;miR-320;RASA1

Effects of total paeony glycosides on HaCaT cell proliferation, apoptosis, cell cycle and miR-320/RASA1 expression

CHEN Yi *, ZHU Yanjun, SHU Yu

(Department of Dermatology, Chengdu Second People's Hospital, Chengdu, Sichuan, China, 610000)

[ABSTRACT] Objective To investigate the effects of total paeony glycosides (TPG) on the proliferation, apoptosis, cell cycle distribution, miR-320 and Ras p21 protein activator 1 (RASA1) expression of HaCaT cells, Methods HaCaT cells were treated with TPG. Cell Counting Kit 8 (CCK-8) assay was used to detect cell viability. Flow cytometry detected apoptosis and cycle distribution; real-time fluorescent quantitative PCR (RT-qPCR) and Western blot were applied to detect the expression of miR-320 and RASA1. The dual luciferase reporting experiment and western blot were used to confirm the regulatory relationship between miR-320 and RASA1. The effect of miR-320 inhibition on proliferation, apoptosis, and cell cycle distribution of HaCaT cells was also observed. Results TPG can reduce the viability of HaCaT cells, promote HaCaT cell apoptosis, induce G₀/G₁ phase arrest, inhibit the expression of miR-320, and promote the expression of RASA1. The difference was statistically significant ($P<0.05$). MiR-320 targets and negatively regulates RASA1 expression. Interfering miR-320 can inhibit the proliferation of HaCaT cells, induce apoptosis and G₀/G₁ phase arrest, and the difference is statistically significant ($P<0.05$). Conclusions TPG can inhibit the proliferation of HaCaT cells, induce apoptosis and cell cycle G₀/G₁ arrest. The mechanism may be related to down-regulation of miR-320/RASA1 pathway.

[KEY WORDS] Total glycosides of paeony; Psoriasis; Proliferation and apoptosis; Cell cycle; MiR-320; RASA1

基金项目:2012年四川省卫生厅基金项目(150548)

作者单位:成都市第二人民医院皮肤科,四川,成都610000

*通信作者:陈怡, E-mail:chenyi1964@163.com

银屑病是一种慢性皮肤炎症性疾病,寻常型银屑病最为常见。全球银屑病患病率为2%~3%,主要发生在39岁以上的成年人,严重影响患者身心健康和生活质量^[1]。研究显示具有清热解毒、凉血祛风等功效的复方中成药、单方、单体中成药可用于控制银屑病病情^[2]。赤芍总苷(Total glucosides of paeony, TPG)为赤芍主要活性成分,因其抗氧化、抗肿瘤、保肝、心脏和神经保护作用成为近年研究热点^[3]。然而TPG在银屑病中的作用并不明确。研究显示,Ras p21蛋白活化子1(Ras p21 activator 1, RASA1)低表达促进表皮角质形成细胞过度增殖,参与寻常型银屑病进展^[4]。序列分析发现,RASA1是miR-320的潜在靶基因。miR-320已被证实参与角质形成细胞的恶性进化有关^[5]。人永生角质细胞HaCaT与银屑病表皮角质细胞的快速增殖特点类似,是研究银屑病的常用体外细胞模型^[6]。本研究通过观察TPG对HaCaT细胞增殖、凋亡、周期分布以及miR-320/RASA1表达的影响,探讨TPG对银屑病的治疗作用和分子机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

采用HaCaT(武汉普诺赛生命科技公司)、DMEM高糖培养基、胎牛血清、青链霉素双抗溶液(美国Hyclone)、赤芍总苷($\leq 0.1\%$ 的二甲基亚砜和生理盐水溶解,经滤膜过滤后,制备一定浓度的溶液备用)(西安斯诺特生物技术有限公司);采用miR-320抑制物,及其阴性对照、荧光素酶报告载体(南京金斯瑞生物科技有限公司);采用细胞计数试剂盒(CCK-8)、膜联蛋白-异硫氰酸荧光素/碘化丙啶(Annexin V-FITC/PI)细胞凋亡检测试剂盒(上海碧云天生物公司)、核糖核酸酶A(RNase A)、Trizol试剂、细胞裂解液(北京索莱宝生物公司);采用逆转录酶试剂盒、SYBR Premix Ex TaqTM(日本Takara公司)。

1.2 细胞培养、处理和实验分组

HaCaT用添加15%胎牛血清、1%青链霉素双抗的DMEM高糖培养基于37℃、含5% CO₂的培养箱中培养。细胞80%融合时消化传代。稳定传代3次,将对数生长期HaCaT细胞分为TPG 0、50、100、200 mg/mL组,即采用TPG终浓度为0、50、100、200 mg/mL的培养液干预细胞48 h。

1.3 CCK-8法检测细胞活力

按照 1×10^4 cells/孔,100 μ L/孔将各组细胞接种到96孔板,置于细胞培养箱孵育24、48、72 h时,每孔加入10 μ L的CCK-8试剂,酶标仪检测450 nm波长处吸光度(OD)值。

1.4 流式细胞术检测细胞凋亡和周期分布

结合缓冲液调整为 1×10^6 cells/mL的单细胞悬液。取100 μ L细胞悬液,分别加入Annexin V-FITC和PI,避光孵育30 min,补加结合缓冲液至500 μ L,流式细胞仪检测细胞凋亡率。PBS液洗涤细胞2次,加入预冷的70%酒精-20℃固定过夜。PBS液洗涤细胞1次,离心后加入RNase A孵育30 min,PBS液洗涤1次。加入PI溶液避光反应30 min。

1.5 RT-qPCR检测miR-320和RASA1 mRNA表达

Trizol法提取皮损组织、皮损旁组织和各组HaCaT细胞的总RNA,利用逆转录酶、SYBR Premix Ex TaqTM试剂盒进行逆转录和qPCR,2^{- $\Delta\Delta$ Ct}法检测miR-320、RASA1 mRNA表达水平。

1.6 Western blot检测

细胞裂解后,使用二喹啉甲酸蛋白检测试剂盒测定提取蛋白浓度。分离细胞蛋白,转至聚偏二氟乙烯膜。按照5%脱脂牛奶室温封闭1 h,一抗4℃孵育过夜。二抗室温孵育1 h。化学发光显色检测蛋白。内参使用 β -actin抗体。

1.7 双荧光素酶报告基因实验

利用Lipofectamine 2000试剂将WT-RASA1、MUT-RASA1分别与miR-320 mimics或miR-NC转染到HaCaT细胞,转染48 h使用双荧光素酶报告基因检测系统检测HaCaT细胞荧光素酶活性。

1.8 统计学分析

采用SPSS 20.0进行统计分析,计量资料符合正态分布以($\bar{x} \pm s$)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,组间两两比较采用SNK- q 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 赤芍总苷抑制HaCaT的增殖

与0 mg/mL组比较,TPG(50、100、200 mg/mL)组HaCaT细胞活力降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表1。

2.2 赤芍总苷诱导HaCaT凋亡

与0 mg/mL组比较,TPG(50、100、200 mg/

表1 赤芍总苷抑制 HaCaT 细胞活力 ($n=9, \bar{x} \pm s$)

Table 1 Total paeony glycosides inhibit HaCaT cell viability ($n=9, \bar{x} \pm s$)

分组	细胞活力(%)		
	24 h	48 h	72 h
TPG 0 mg/mL	0.36±0.04	0.82±0.07	1.42±0.11
TPG 50 mg/mL	0.29±0.04 ^a	0.63±0.05 ^a	1.09±0.06 ^a
TPG 100 mg/mL	0.28±0.03 ^a	0.59±0.06 ^a	0.93±0.05 ^a
TPG 200 mg/mL	0.26±0.03 ^a	0.54±0.04 ^a	0.86±0.06 ^a
F 值	13.620	42.762	102.661
P 值	0.000	0.000	0.000

注:与 TPG 0 mg/mL 组比较, ^a $P<0.05$ 。

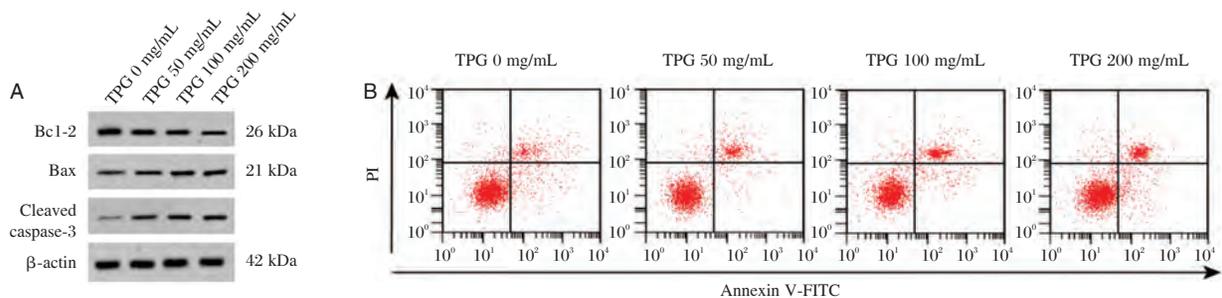


图1 HaCaT 细胞凋亡及 Bcl-2、Bax 和 Cleaved caspase-3 的表达

Figure 1 Apoptosis of HaCaT cells and expression of Bcl-2, Bax and Cleaved caspase-3

表2 赤芍总苷干预对 HaCaT 细胞凋亡、Bcl-2、Bax 和 Cleaved caspase-3 表达的影响 ($n=9, \bar{x} \pm s$)

Table 2 Effects of total paeony glycoside intervention on HaCaT cell apoptosis, Bcl-2, Bax and Cleaved caspase-3 expression ($n=9, \bar{x} \pm s$)

分组	Bcl-2	Bax	Cleaved caspase-3	细胞凋亡率(%)
TPG 0 mg/mL	0.67±0.06	0.17±0.02	0.08±0.02	4.11±0.65
TPG 50 mg/mL	0.51±0.04 ^a	0.25±0.03 ^a	0.19±0.03 ^a	6.49±1.03 ^a
TPG 100 mg/mL	0.38±0.04 ^a	0.38±0.04 ^a	0.32±0.04 ^a	9.26±1.70 ^a
TPG 200 mg/mL	0.33±0.05 ^a	0.43±0.05 ^a	0.39±0.04 ^a	11.87±1.95 ^a
F 值	89.387	94.389	131.308	49.842
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000

注:与 TPG 0 mg/mL 组比较, ^a $P<0.05$ 。

表3 赤芍总苷对 HaCaT 细胞周期、p21 和 CyclinD1 表达 ($n=9, \bar{x} \pm s$)

Table 3 Effect of Total paeony glycosides on cell cycle, p21 and CyclinD1 expression in HaCaT cells ($n=9, \bar{x} \pm s$)

分组	p21	CyclinD1	细胞周期(%)		
			G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
TPG 0mg/mL	0.21±0.04	0.68±0.03	53.51±2.39	33.24±1.54	14.29±1.47
TPG 50mg/mL	0.28±0.03 ^a	0.54±0.05 ^a	57.47±2.24 ^a	29.47±1.53 ^a	15.32±1.36
TPG 100mg/mL	0.38±0.05 ^a	0.43±0.06 ^a	62.66±3.31 ^a	23.77±1.80 ^a	14.06±1.23
TPG 200mg/mL	0.53±0.06 ^a	0.37±0.04 ^a	66.73±3.54 ^a	21.62±1.75 ^a	14.27±1.18
F 值	80.651	77.721	35.370	91.962	1.669
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注:与 TPG 0 mg/mL 组比较, ^a $P<0.05$ 。

2.4 赤芍总苷对 HaCaT 的 miR-320/RASA1 表达的影响

与 0 mg/mL 组比较, TPG (50、100、200 mg/

mL)组 HaCaT 细胞凋亡率、Bax 和 Cleaved caspase-3 蛋白表达升高, Bcl-2 蛋白表达降低, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。见图 1、表 2。

2.3 赤芍总苷对 HaCaT 细胞周期的影响

与 0 mg/mL 组比较, TPG (50、100、200 mg/mL)组 HaCaT 细胞 CyclinD1 蛋白表达、S 期细胞比例降低, p21 蛋白表达、G₀/G₁ 期细胞比例升高, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), G₂/M 期细胞比例变化差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见表 3。

mL)组 HaCaT 细胞 miR-320 的表达降低, RASA1 mRNA 和 RASA1 蛋白的表达升高, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。见表 4。

表4 赤芍总苷对 HaCaT 的 miR-320/RASA1 表达的影响 (n=9, $\bar{x} \pm s$)

Table 4 The effect of total paenony glycoside on the expression of miR-320/RASA1 in HaCaT (n=9, $\bar{x} \pm s$)

分组	miR-320	RASA1 mRNA	RASA1 蛋白
TPG 0 mg/mL	0.97±0.07	0.99±0.05	0.35±0.04
TPG 50 mg/mL	0.72±0.06 ^a	1.43±0.08 ^a	0.45±0.04 ^a
TPG 100 mg/mL	0.58±0.06 ^a	2.38±0.12 ^a	0.52±0.04 ^a
TPG 200 mg/mL	0.53±0.05 ^a	2.84±0.13 ^a	0.69±0.04 ^a
F 值	95.836	645.552	115.266
P 值	0.000	0.000	0.000

注:与 TPG 0 mg/mL 组比较, ^aP<0.05。

2.5 miR-320 靶向 RASA1

TargetsScan 预测发现 RASA1 的 3'-UTR 区域与 miR-320 之间存在结合位点,见图 2。与转染 miR-con 比较,转染 miR-320 mimics 可降低 RASA1-WT 的荧光素酶活性,差异有统计学意义(P<0.05);而 RASA1-MUT 的荧光素酶活性无显著变化,见表 5。

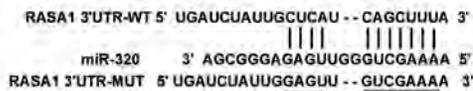


图2 miR-320 与 RASA1 的结合位点

Figure 2 The binding site of miR-320 and RASA1

表5 双荧光素酶报告实验 (n=9, $\bar{x} \pm s$)

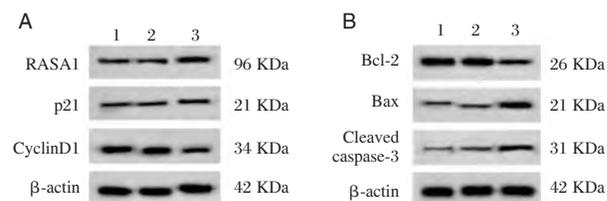
Table 5 Dual luciferase report experiment (n=9, $\bar{x} \pm s$)

分组	荧光素酶活性	
	RASA1(WT)	RASA1(MUT)
miR-con	1.04±0.08	1.23±0.08
miR-320	0.38±0.06 ^a	1.19±0.09
t 值	32.336	1.530
P 值	0.000	0.133

注:与 miR-con 组比较, ^aP<0.05。

2.6 干扰 miR-320 对 HaCaT 细胞周期分布、增殖和凋亡的影响

与 anti-miR-con 组比较, anti-miR-320 组 Ha-



注:1. NC; 2. anti-miR-con; 3. anti-miR-320。

图3 干扰 miR-320 对 HaCaT 细胞周期分布、增殖和凋亡的影响

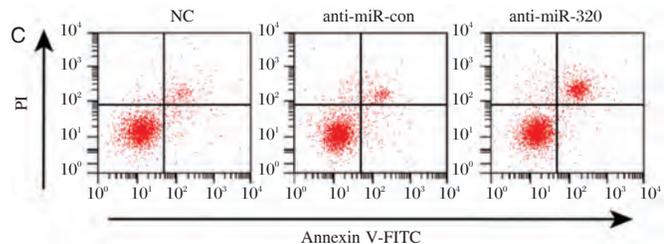
Figure 3 The effect of interference with miR-320 on cell cycle distribution, proliferation and apoptosis of HaCaT cells

CaT 细胞 RASA1 蛋白表达、G₀/G₁ 期细胞比例、细胞凋亡率、p21、Bax 和 Cleaved caspase-3 蛋白表达升高, S 期细胞比例、细胞活力、CyclinD1 和 Bcl-2 蛋白表达降低(P<0.05)。见图 3。

3 讨论

TPG 具有广泛的生物和药理活性,以其抗肿瘤作用最为显著。本研究发现,TPG 处理可显著抑制 HaCaT 细胞的增殖活力、诱导细胞周期的 G₀/G₁ 期阻滞和细胞凋亡,并呈一定的剂量依赖性。研究发现,TPG 可能通过上调 P21、P27、P53 表达抑制黑色素瘤 A375 细胞的增殖^[7]。TPG 还可诱导人白血病细胞 G₀/G₁ 期阻滞,抑制细胞增殖,促进细胞凋亡^[8]。细胞周期从 G₁ 向 S 期过渡受到 CyclinD1 的调控,CyclinD1 通过激活周期素依赖性蛋白激酶(CDK),促进周期抑制蛋白(Rb)磷酸化,促进周期从 G₁ 向 S 期转化,其过度表达可导致细胞增殖失控,而 P21 则通过抑制 CDK 复合物活性发挥抗增殖作用^[9]。Bax 和 Bcl-2 是调控细胞凋亡的重要蛋白,Bax 表达增加、Bcl-2 表达降低可促进细胞色素 C 释放、caspase-3 活化,促进细胞凋亡^[10]。本研究结果与功能分析结果吻合。以上研究表明,TPG 可抑制 HaCaT 细胞增殖,诱导细胞凋亡。

近年来,随着对 miRNA 的全面遗传分析,发现多种特异性 miRNA 与银屑病病理进展有关。例如,银屑病患者血清中 miR-1266 水平明显升高,且 miR-1266 水平与银屑病区域严重程度指数评分呈一定负相关关系^[11];miR-31 在银屑病角质形成细胞中起促增殖、促分化和促炎症作用,是银屑病的潜在生物标志物^[12]。本研究发现 TPG 处理后 HaCaT 细胞中 miR-320 表达降低,RASA1 表达显著升高。RASA1 是细胞增殖、凋亡等生理过程的调控者,miR-31 可能通过下调 RASA1 参与皮肤鳞状细胞癌发生发展^[13]。本研究证实 miR-320 对



RASA1 具有靶向负调控作用。干扰 miR-320 表达也可抑制 HaCaT 细胞活力、诱导 G₀/G₁ 期阻滞和凋亡,影响增殖、凋亡相关蛋白的表达水平。提示,TPG 对 HaCaT 细胞增殖和凋亡的影响与下调 miR-320/RASA1 通路有关。

综上,本研究证实赤芍总苷可抑制 HaCaT 细胞增殖、促进细胞凋亡,其机制与下调 miR-320/RASA1 通路有关。因此,TPG 对银屑病具有潜在治疗作用,本研究发现为 TPG 在银屑病中的应用奠定理论基础。

参考文献

- [1] Enamandram M, Kimball AB. Psoriasis epidemiology: the interplay of genes and the environment [J]. *J Invest Dermatol*, 2013, 133(2): 287-289.
- [2] 刘欢苇,王燕,李萍,等. 中医药治疗银屑病临床研究进展[J]. *中医临床研究*, 2019, 11(9): 89-90.
- [3] 陆小华,马骁,王建,等. 赤芍的化学成分和药理作用研究进展[J]. *中草药*, 2015, 46(4): 595-602.
- [4] 王慧琴,唐承波,唐红,等. miR-21 及其靶蛋白 RASA1 在寻常型银屑病患者皮肤组织中的表达及意义[J]. *中华全科医学*, 2017, 15(7): 1141-1143+1180.
- [5] Mizrahi A, Barzilai A, Gur-Wahnon D, et al. Alterations of microRNAs throughout the malignant evolution of cutaneous squamous cell carcinoma: the role of miR-497 in epithelial to mesenchymal transition of keratinocytes [J]. *Oncogene*, 2018, 37(2): 218-230.
- [6] 王祎琳,丁香玉,胡琨,等. miR-199a 靶向 HIF-1 α 调控表皮细胞的增殖参与银屑病的发病机制[J]. *中国煤炭工业医学杂志*, 2018, 21(6): 637-640.
- [7] 王亚珍,吕品田,王凤红,等. 赤芍总苷抑制人黑色素瘤 A375 细胞株增殖作用的研究[J]. *中国全科医学*, 2011, 14(36): 4173-4175.
- [8] Xu HY, Chen ZW, Wu YM. Antitumor activity of total paeony glycoside against human chronic myelocytic leukemia K562 cell lines in vitro and in vivo [J]. *Med Oncol*, 2012, 29(2): 1137-1147.
- [9] 年士艳,冯磊. miR-548c-3p 通过调控 TRIM59 表达对肝癌细胞增殖、侵袭和迁移的影响[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2019, 11(4): 283-289.
- [10] 魏建昌,张通,杨平,等. 藤黄酸对人结肠癌细胞凋亡及 Bax、Bcl-2 和 Caspase-3 表达的影响[J]. *实用医学杂志*, 2016, 32(11): 1745-1748.
- [11] Ichihara A, Jinnin M, Oyama R, et al. Increased serum levels of miR-1266 in patients with psoriasis vulgaris [J]. *Eur J Dermatol*, 2012, 22(1): 68-71.
- [12] Borska L, Andrys C, Chmelarova M, et al. Roles of miR-31 and endothelin - 1 in psoriasis vulgaris: pathophysiological functions and potential biomarkers [J]. *Physiol Res*, 2017, 66(6): 987-992.
- [13] 顾雪芹,董正邦,吴海红,等. 皮肤鳞状细胞癌组织中 miR-21、miR-31、Ras GTP 酶激活蛋白 1 表达与人乳头瘤病毒的相关性研究[J]. *临床皮肤科杂志*, 2017, 46(8): 544-548.
- [7] 吴文瑛,王晓岩,赵丽,聂等. 超声弹性成像、X线钼靶与超声引导下穿刺活检在 BI-RADS4 类乳腺肿块鉴别诊断中的价值评估[J]. *中国普通外科杂志*, 2019, 28(3): 377-382.
- [8] 张瑛. 超声弹性成像与常规超声在乳腺癌诊断中的价值比较[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2018, 25(S1): 46.
- [9] Zheng X, Huang Y, Liu Y, et al. Shear-Wave Elastography of the Breast: Added Value of a Quality Map in Diagnosis and Prediction of the Biological Characteristics of Breast Cancer [J]. *Korean J radiol*, 2020, 21(2): 172-180.
- [10] Dogan BE, Menezes GLG, Butler RS, et al. 乳腺癌光声超声成像及灰度超声成像特征与其分子亚型相关[J]. *国际医学放射学杂志*, 2019, 42(6): 725-726.
- [11] 冷晓玲,黄国福,马富成. BI-RADS 分级 4 级以上乳腺病灶边缘带的多模态超声观察[J]. *中国临床医学影像杂志*, 2016, 27(1): 14-18.
- [12] Menezes GLG, Mann RM, Meeuwis C, et al. Optoacoustic imaging of the breast: correlation with histopathology and histopathologic biomarkers [J]. *Eur radiol*, 2019, 29(12): 6728-6740.
- [13] 成玉霞,赫淑倩,董贺,等. 非特殊型浸润性乳腺癌 HER-2 检测方法的对比研究[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2016, 8(5): 308-315.
- [14] Wu T, Li J, Wang D, et al. Identification of a correlation between the sonographic appearance and molecular subtype of invasive breast cancer: A review of 311 cases [J]. *Clin Imaging*, 2019, 53(1): 179-185.

(上接第 1245 页)

· 论 著 ·

miR-155、miR-26a对T2DM患者脂代谢、血管并发症的影响

严宇* 操炎庆 程锦

【摘要】目的 探究 miR-155、miR-26a 对 2 型糖尿病 (T2DM) 患者脂代谢、血管并发症的影响。方法 选取本院 2014 年 1 月至 2019 年 1 月 T2DM 患者 116 例作为观察组,分为合并血管并发症亚组 (81 例) 与未合并血管并发症亚组 (35 例),另选择同期健康体检者 55 例作为对照组。比较两组外周血 miR-155、miR-26a 水平,采用 Logistic 回归分析 T2DM 血管并发症的危险因素, Pearson 相关性分析 miR-155、miR-26a 与脂代谢指标相关性,受试者工作特征 (ROC) 曲线评价 miR-155、miR-26a 预测价值。结果 观察组 miR-155、miR-26a 高于对照组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$); Logistic 回归分析,病程、合并高血压、血清 LDL-C、TC、TG、miR-155、miR-26a 是 T2DM 患者合并血管并发症的重要危险因素 ($P < 0.05$); Pearson 相关性分析, miR-155、miR-26a 与 LDL-C ($r_1 = 0.717$ 、 $r_2 = 0.731$)、TG ($r_1 = 0.783$ 、 $r_2 = 0.745$)、TC ($r_1 = 0.537$ 、 $r_2 = 0.520$) 呈正相关 ($P < 0.05$); ROC 曲线分析, miR-155、miR-26a 联合预测 T2DM 血管并发症的 AUC 为 0.872, 95% CI 为 0.797~0.927, $P < 0.001$, 诊断敏感度为 72.84%, 特异度为 91.43%, 显著优于两者单独预测。**结论** miR-155、miR-26a 与 T2DM 患者脂代谢密切相关,均为合并血管并发症的危险因素,两者联合检测能为预测血管并发症提供可靠依据。

【关键词】 2 型糖尿病; miR-155; miR-26a; 脂代谢; 血管并发症

Effects of miR - 155 and miR - 26a on lipid metabolism and vascular complications in T2DM patients

YAN Yu*, CAO Yanqing, CHENG Jin

(Department of Endocrinology, Huainan Xinhua Hospital, Huainan, Anhui, China, 232052)

【ABSTRACT】 Objective To investigate the effects of miR-155 and miR-26a on lipid metabolism and vascular complications in patients with type 2 diabetes mellitus (T2DM). **Methods** A total of 116 patients with T2DM from January 2014 to January 2019 in our hospital were selected as the observation group, which were divided into a subgroup with vascular complications (81 cases) and a subgroup without vascular complications (35 cases). In addition, 55 healthy people were selected as the control group during the same period. The peripheral blood miR-155 and miR-26a levels were compared between the two groups. Logistic regression was used to analyze the risk factors of T2DM vascular complications. Pearson correlation analysis was used to analyze the correlation between miR-155, miR-26a and lipid metabolism indexes. The receiver operating characteristic (ROC) curve was used to evaluate the predictive value of miR-155 and miR-26a. **Results** The miR-155 and miR-26a in the observation group were higher than those in the control group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Logistic regression analysis showed that the disease course, hypertension, serum LDL-C, TC, TG, miR-155, miR-26a were important risk factors for vascular complications in T2DM patients ($P < 0.05$). Pearson correlation analysis showed that miR-155 and miR-26a were positively correlated

基金项目:2019安徽省自然科学基金项目(1908085MH292)

作者单位:安徽省淮南市新华医院内分泌科,安徽,淮南 232052

*通信作者:严宇, E-mail:yanxinyi780706@163.com

with LDL-C ($r_1=0.717$, $r_2=0.731$), TG ($r_1=0.783$, $r_2=0.745$), TC ($r_1=0.537$, $r_2=0.520$) ($P<0.05$). ROC curve analysis showed that miR-155 and miR-26a jointly predicted AUC for T2DM vascular complications was 0.872, 95% CI was 0.797~0.927, $P<0.001$, the diagnostic sensitivity was 72.84%, and the specificity was 91.43%, which was significantly higher than the two predictions alone. Conclusion miR-155 and miR-26a are closely related to lipid metabolism in patients with T2DM, and are all risk factors for vascular complications. The combined detection of the two can provide a reliable basis for predicting vascular complications.

[KEY WORDS] Type 2 diabetes mellitus; miR - 155; miR - 26a; Lipid metabolism; Vascular complications

2型糖尿病(Type 2 diabetes Mellitus, T2DM)是临床常见内分泌代谢性疾病,据资料数据统计,目前我国成人糖尿病患病率高达9.7%,血管并发症是其致残、致死的主要原因,严重影响患者生活质量及威胁生命安全^[1]。大量临床实践证实,炎症反应、脂代谢异常与T2DM发生血管并发症联系紧密^[2-3]。临床表明, MicroRNA分子在T2DM、血管细胞增殖、免疫炎症反应等致病过程中发挥重要作用^[4]。其中, MicroRNA-155(miR-155)是一种多功能miRNA分子,在免疫、炎症反应调控中扮演重要角色^[5]。MicroRNA-26a(miR-26a)属于高度保守的miRNA,对血管细胞增殖、迁移、凋亡有明显影响,是动脉粥样硬化发病机制的重要危险因素^[6]。本研究尝试分析miR-155、miR-26a对T2DM患者脂代谢、血管并发症的影响,旨在为临床提供数据支持。现报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取本院2014年1月至2019年1月T2DM患者116例作为观察组,其中男78例,女38例,年龄47~68岁,平均年龄(62.24 ± 2.71)岁,分为合并血管并发症亚组81例,未合并血管并发症亚组35例。另选择同期健康体检者55例作为对照组,其中男37例,女18例,年龄45~69岁,平均年龄(62.61 ± 3.07)岁。两组年龄、性别等一般资料均衡可比,差异无统计学意义($P>0.05$),且本研究经本院伦理委员会审批通过。

1.2 选取标准

纳入标准:①观察组均确诊为T2DM,符合《中国2型糖尿病防治指南(2013年版)》相关诊断标准^[7];②对照组体检各项指标均正常;③两组临床资料完整,均知情本研究,自愿签订知情同意书。

排除标准:①合并甲状腺及其他内分泌腺体疾病;②存在急性感染、糖尿病酮症酸中毒者;③伴有高血糖高渗性昏迷者;④存在自身免疫系统疾病、急性心血管疾病者;⑤伴有库欣综合征、肢端肥大症等其他影响糖脂代谢的疾病者。

1.3 方法

血糖、血脂指标检测方法:采集清晨空腹静脉血3 mL,采用葡萄糖氧化酶法检测空腹血糖(Fasting plasma glucose, FPG)、糖化血红蛋白(Glycosylated hemoglobin, HbA1c)水平,采用全自动生化分析仪(购自美国贝克曼库尔特公司,型号:AU5800型)检测血脂指标[低密度脂蛋白胆固醇(Low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(High density lipoprotein cholesterol, HDL-C)、甘油三酯(Triglyceride, TG)、总胆固醇(Total cholesterol, TC)]水平。

外周血miR-155、miR-26a检测方法:采集清晨空腹静脉血3 mL,置于ED-K2抗凝管内,按照TRIzol法提取外周血总RNA,进行逆转录,制备eDNA,采取实时荧光定量聚合酶链反应(Real time fluorescence quantitative - Polymerase chain reaction, RT-PCR), miR-155、miR-26a和内参U6引物购自美国雅培公司。将荧光信号达到设定阈值时PCR所经过的循环数定义为CT值,所有样品均设3个副孔,取平均CT值,各样本中目的miR平均CT值与内参基因平均CT值之差定义为 ΔC_t 值, $2^{-\Delta C_t}$ 判定为目的基因相对表达量。

1.4 观察指标

①两组外周血miR-155、miR-26a。②观察组血管并发症亚组间临床资料。③观察组血管并发症亚组间外周血miR-155、miR-26a。④T2DM血管并发症的多因素分析。⑤外周血miR-155、miR-26a与脂代谢指标相关性。⑥外周血miR-155、miR-26a

预测价值。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 22.0 进行数据处理, 计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验, 计数资料以 *n* (%) 表示, χ^2 检验, 采用 Pearson 进行相关性分析, 影响因素以 Logistic 回归分析, 预测价值以 ROC 曲线分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组外周血 miR-155、miR-26a 表达水平比较

观察组 miR-155、miR-26a 表达水平高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 1。

表 1 两组外周血 miR-155、miR-26a 表达水平比较 $(\bar{x} \pm s)$

Table 1 Comparison of expression levels of miR-155 and miR-26a in peripheral blood between 2 groups $(\bar{x} \pm s)$

组别	<i>n</i>	miR-155	miR-26a
观察组	116	1.84±0.52	7.79±2.02
对照组	55	1.02±0.31	2.15±0.45
<i>t</i> 值		10.809	20.438
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001

2.2 T2DM 合并血管并发症的单因素分析

年龄、性别、体质量指数、FPG、HbA1c、HDL-C、

吸烟史、饮酒史不是 T2DM 合并血管并发症的影响因素, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 病程、合并高血压、LDL-C、TG、TC、miR-155、miR-26 是 T2DM 合并血管并发症的影响因素, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 2。

2.3 T2DM 血管并发症的多因素分析

以 T2DM 患者合并血管并发症为因变量, 将病程、合并高血压、血清 LDL-C、TG、TC、miR-155、miR-26a 作为自变量, Logistic 回归分析, 病程、合并高血压、血清 LDL-C、TG、TC、miR-155、miR-26a 是 T2DM 患者合并血管并发症的重要危险因素 ($P < 0.05$), 见表 3。

2.4 miR-155、miR-26a 与脂代谢指标相关性

Pearson 相关性分析, miR-155、miR-26a 与 LDL-C ($r_1=0.717$ 、 $r_2=0.731$)、TG ($r_1=0.783$ 、 $r_2=0.745$)、TC ($r_1=0.537$ 、 $r_2=0.520$) 呈正相关, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 1。

2.5 miR-155、miR-26a 对 T2DM 血管并发症的预测价值

ROC 曲线分析 miR-155 和 miR-26a 两都联合预测其敏感度、特异度、AUC 值等均高于单一预测值。见表 4、图 2。

表 2 观察组血管并发症亚组间临床资料 [$n(\%)$, $(\bar{x} \pm s)$]

Table 2 Clinical data of vascular complications in the observation group [$n(\%)$, $(\bar{x} \pm s)$]

资料		合并血管并发症亚组 (<i>n</i> =81)	未合并血管并发症亚组 (<i>n</i> =35)	<i>t</i> / χ^2 值	<i>P</i> 值
年龄(岁)	≥60	58(71.60)	24(68.57)	0.109	0.742
	<60	23(28.40)	11(31.43)		
性别	男	54(66.67)	25(71.43)	0.255	0.614
	女	27(33.33)	10(28.57)		
体质量指数(kg/m ²)	>28	20(24.69)	8(22.86)	0.045	0.832
	≤28	61(75.31)	27(77.14)		
病程(年)	≥5	67(82.72)	21(60.00)	6.887	0.009
	<5	14(17.28)	14(40.00)		
合并高血压	是	24(29.63)	4(11.43)	4.421	0.036
	否	57(70.37)	31(88.57)		
吸烟史	有	27(33.33)	11(31.43)	0.040	0.841
	无	54(66.67)	24(68.57)		
饮酒史	有	24(29.63)	10(28.57)	0.013	0.909
	无	57(70.37)	25(71.43)		
FPG(mmol/L)		11.04±3.49	10.56±3.12	0.701	0.485
HbA1c(%)		11.27±2.27	10.73±2.06	1.208	0.230
LDL-C(mmol/L)		3.67±0.71	2.84±0.65	5.924	<0.001
HDL-C(mmol/L)		1.23±0.41	1.35±0.43	1.426	0.157
TC(mmol/L)		5.72±0.74	4.91±0.62	5.669	<0.001
TG(mmol/L)		1.96±0.35	1.48±0.37	6.664	<0.001
miR-155		2.04±0.63	1.38±0.37	5.774	<0.001
miR-26a		9.36±2.45	4.16±1.03	12.080	<0.001

表3 T2DM 血管并发症的多因素分析

Table 3 Multivariate analysis of T2DM vascular complications

变量	β 值	S.E. 值	Wald/ χ^2 值	OR 值	95%CI	P 值
病程	1.373	0.511	7.214	3.945	2.498~6.231	<0.001
合并高血压	1.343	0.467	8.269	3.830	1.942~7.554	<0.001
LDL-C	1.661	0.528	9.900	5.266	3.047~9.102	<0.001
TC	1.120	0.355	9.948	3.064	1.730~5.426	<0.001
TG	1.175	0.401	8.582	3.237	2.048~5.117	<0.001
miR-155	1.619	0.507	10.197	5.048	3.009~8.469	<0.001
miR-26a	1.167	0.404	8.349	3.213	1.538~6.714	<0.001

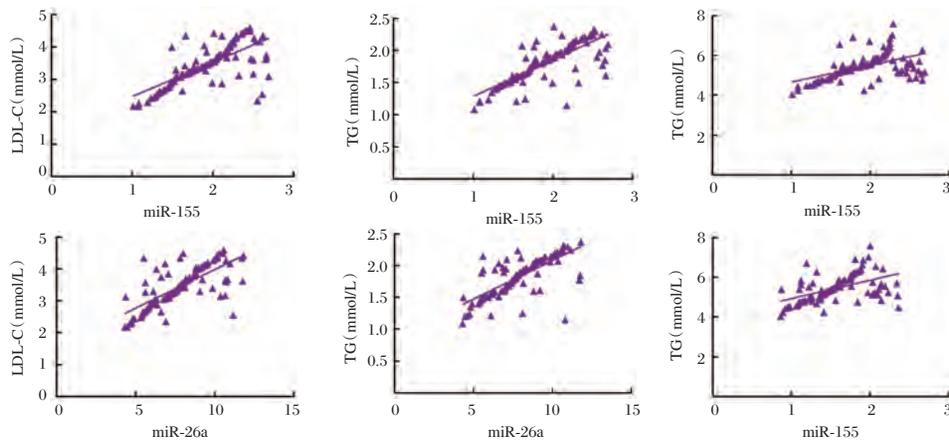


图1 miR-155、miR-26a 与 LDL-C、TG、TC 相关性

Figure 1 Correlation between miR-155, miR-26a and LDL-C、TG、TC

表4 ROC 曲线预测值

Table 4 ROC Curve Prediction value

项目	AUC	Z 值	截断值	敏感度 (%)	特异度 (%)	95%CI	P 值
miR-155	0.782	6.592	>1.92	54.32	91.43	0.696~0.854	<0.001
miR-26a	0.807	7.636	>7.09	62.96	94.29	0.723~0.874	<0.001
两者联合	0.872	11.648	-	72.84	91.43	0.797~0.927	<0.001

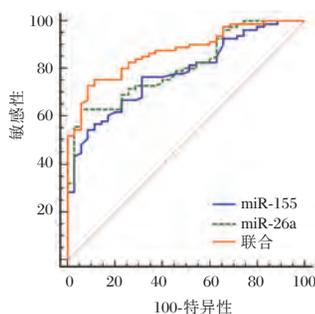


图2 miR-155、miR-26a 对 T2DM 血管并发症的预测价值

Figure 2 The predictive value of miR-155 and miR-26a for T2DM vascular complications

3 讨论

近年来,随着人口老龄化、居民生活水平提高、饮食结构与习惯改变,T2DM 发生率呈逐年升高趋势,日益成为威胁人类生命安全的主要公共卫

生问题之一^[8]。研究表明,T2DM 患者中约 50%患者合并冠心病等血管并发症,显著增加死亡风险^[9]。本研究发现,病程、合并高血压、血清 LDL-C、TG、TC 是 T2DM 合并血管并发症的危险因素,提示临床应重视上述因素,采取对应干预措施,降低血管并发症发生风险。此外,miRNA 属于转录后调控基因,在多种病理生理过程中发挥关键作用^[10]。

miR-155 是目前靶基因最多的炎性 miRNA 之一,参与炎症反应、免疫紊乱发生过程。有文献指出,高血糖可诱导 miR-155 表达增加^[11]。在此基础上,本研究发现,T2DM 患者外周血 miR-155 高于正常健康人群,T2DM 合并血管并发症患者外周血 miR-155 高于未合并血管并发症患者。但 Assmann T S 等^[12]观点认为,miR-155 在糖尿病患者及血管病变中呈下调表达,是 T2DM 患者血管病变的保护因素,而本研究发现 miR-155 是

T2DM 患者合并血管并发症的危险因素,结果不一致,可能是由于选取对象个体差异性、糖尿病病情、糖脂代谢情况不同等因素所致。故检测外周血 miR-155 水平具有重要临床价值。

miR-26a 是一种高度保守的成熟 miRNA,其参与调控 T2DM 及多种并发症病理生理活动,与胰岛素敏感性、糖脂代谢密切相关^[13]。任妍等^[14]观点认为,高葡萄糖可诱导 miR-26a 表达上调。相关文献指出,T2DM 患者由于各种原因产生糖脂代谢异常、胰岛素抵抗现象,造成 miR-26a 代偿性升高,miR-26a 升高后可一定程度改善糖脂代谢及胰岛素敏感性,而随着病情不断进展,miR-26a 的保护作用逐渐无法满足代偿性调节糖脂代谢及胰岛素敏感性,便导致 T2DM 发生,并加快血管并发症发生^[15]。且本研究数据表明,miR-26a 与 LDL-C、TC、TG 等血脂指标具有正相关关系,与上述理论相符。因此,临床可通过检测外周血 miR-26a 水平为判断糖脂代谢紊乱、预测血管并发症发生提供有效信息。

此外,本研究初次发现,外周血 miR-155、miR-26a 联合预测合并血管并发症的 AUC 高达 0.872,明显优于两者单独预测,提示两者联合检测具有重要预测价值。但本研究未详细探讨两者在 T2DM 合并不同血管并发症患者的表达变化,需作进一步分析,以获取更可靠数据支持。

综上所述,miR-155、miR-26a 与 T2DM 患者脂代谢密切相关,均为合并血管并发症的危险因素,两者联合检测能为预测血管并发症提供可靠依据。

参考文献

[1] 王秀霞.二甲双胍联合重组甘精胰岛素治疗 2 型糖尿病疗效及安全性观察[J].中国药物与临床,2019,19(5):806-808.
 [2] Zhong N, Zhang YY, Pu XL, et al. Microangiopathy is asso-

ciated with bone loss in female type 2 diabetes mellitus patients[J]. Diab Vasc Dis Res, 2018, 15(5):433-441.
 [3] Chen T, Tu M, Huang L, et al. Association of Serum Adiponectin with Intima Media Thickness of Dorsalis Pedis Artery and Macroangiopathy in Type 2 Diabetes[J]. J Diabetes Res, 2020, 2020(6):1-10.
 [4] 王西亮,蔡志明,牟丽莎. MicroRNA 在糖尿病诊断和胰岛移植监测中的研究进展[J].器官移植,2018,9(1):79-82.
 [5] 沈毅会.血清 miR-155 和糖化血红蛋白在妊娠期糖尿病诊断中的价值分析[J].中国妇幼保健,2018,33(24):123-127.
 [6] 袁璞珺,张竞超.冠心病患者 PCI 术后血小板 miR-26a、miR-223 表达与氯吡格雷抵抗的关系[J].中国循证心血管医学杂志,2018,10(10):1250-1253+1268.
 [7] 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].中华内分泌代谢杂志,2014,30(10):26-89.
 [8] 李长岭,张东铭,王崇贤,等.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.
 [9] Uruska A, Michalska A, Ostrowska J, et al. Is cathelicidin a novel marker of diabetic microangiopathy in patients with type 1 diabetes[J]. Clin Biochem, 2017, 50(18):1110-1114.
 [10] Ma JP, Wang JF, Liu YF, et al. Comparisons of serum miRNA expression profiles in patients with diabetic retinopathy and type 2 diabetes mellitus[J]. Clinics (Sao Paulo), 2017, 72(2):111-115.
 [11] 罗维,付超,徐倩.外周血 miR-155 水平与 HCV 导致的胰岛素抵抗合并 2 型糖尿病的相关性分析[J].临床和实验医学杂志,2020,19(4):373-376.
 [12] Assmann TS, Duarte GCK, Brondani L A, et al. Polymorphisms in genes encoding miR-155 and miR-146a are associated with protection to type 1 diabetes mellitus[J]. Acta Diabetol, 2017, 54(5):433-441.
 [13] Icli B, Nabzyk CS, Hernandez JL, et al. Abstract 18933: Regulation of Impaired Angiogenesis in Diabetes by MicroRNA26a[J]. J Mol Cell Cardiol, 2016, 51(91):151-159.
 [14] 任妍,张京玲.外周血 miR-26a 与 2 型糖尿病及大血管病变的相关性[J].中国临床研究,2019,32(3):309-312.
 [15] 陈斌,邴兆伟.冠心病合并糖尿病病人血清 miR-26a、miR-26b 表达特征观察[J].中西医结合心脑血管病杂志,2019,17(22):3563-3566.

(上接第 1241 页)

[11] Zhang Y, Wang G, Liu J, et al. Impact of hyperhomocysteinemia on insulin resistance in patients with H-type hypertension[J]. Clin Exp Hypertension, 2017, 40(12):1-4.
 [12] Wang Y, Zhang J, Qian YSH, et al. Association of Homocysteine with Aysmptomatic Intracranial and Extracranial Arterial Stenosis in Hypertension Patients[J]. Sci Rep, 2018, 8(1):595.
 [13] 袁坚宾.原发性高血压患者血清同型半胱氨酸含量与颈动脉粥样硬化、左心室舒张功能的相关性[J].海南医学院学报,2016,22(23):2804-2807.

[14] 黎思,郭琰,赵新元,等.老年原发性高血压患者血清 SF、hs-CRP、Hcy、Cys C 水平及血脂指标与颈动脉内膜中层厚度的相关性研究[J].现代生物医学进展,2018,18(20):3892-3895,3900.
 [15] 张勇.H 型高血压患者血管内皮功能变化及与血浆同型半胱氨酸水平的关系[J].河北医药,2017,39(17):2593-2596.
 [16] 潘洁,刘安楠,曹素艳,等.健康人群年龄与血管内皮功能、氧化应激水平的相关性分析[J].中华现代护理杂志,2018,24(21):2551-2553.

强直性脊柱炎患者检测 HLA-B27、ASO 及免疫球蛋白表达的临床意义

陆锡平* 王科 张庆祥 闫文千

[摘要] 目的 分析强直性脊柱炎(AS)患者检测人类白细胞抗原 B27(HLA-B27)、抗链球菌溶血素 O(ASO)及相关免疫球蛋白亚型表达检测的临床意义。方法 85 例 AS 患者作为研究组,同期正常健康体检人员 35 例作为对照组,比较两组 HLA-B27、ASO 及免疫球蛋白亚型(IgG、IgA、SIgA、IgM)水平,并评价两组炎症指数(BASDAI)和功能指数(BASFI),Spearman 相关性分析各指标的相关性,受试者工作特征曲线(ROC)分析各指标诊断 AS 的价值。结果 研究组 HLA-27、ASO 水平及阳性率均显著高于对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。研究组 IgG、IgA、IgM 水平显著高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),两组 SIgA 水平比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。研究组 BASDAI、BASFI 评分显著高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。相关性分析结果显示,HLA-27、ASO 分别与 IgG、IgA、IgM 存在显著正相关性($P<0.05$),与 SIgA 无显著相关性($P>0.05$)。HLA-27、ASO、IgG、IgA、IgM 分别与 BASDAI、BASFI 存在显著正相关性($P<0.05$),SIgA、BASDAI 与 BASFI 无显著相关性。ROC 曲线结果显示,HLA-B27、ASO、IgG、IgA、SIgA、IgM 诊断 AS 的曲线下面积分别为 0.725 (95% CI: 0.645~0.804)、0.826 (95% CI: 0.762~0.889)、0.798 (95% CI: 0.732~0.864)、0.872 (95% CI: 0.822~0.923)、0.682 (95% CI: 0.604~0.760)、0.671 (95% CI: 0.586~0.757)。结论 AS 患者 HLA-B27、ASO 阳性率较高,免疫球蛋白水平异常,对这些指标进行检测有利于 AS 的诊断及病理探究。

[关键词] 强直性脊柱炎;人类白细胞抗原 B27;抗链球菌溶血素 O;免疫球蛋白

Clinical significance of detecting HLA-B27, ASO and immunoglobulin expression in patients with ankylosing spondylitis

LU Xiping*, WANG Ke, ZHANG Qingxiang, YAN Wenqian

(Department of Orthopedics, Zibo Campus, No. 960 Hospital of the PLA, Zibo, Shandong, China, 255300)

[ABSTRACT] Objective To analyze the clinical significance of detecting human leukocyte antigen B27 (HLA-B27), anti-streptolysin O (ASO) and related immunoglobulin subtypes in patients with ankylosing spondylitis (AS). Methods 85 AS patients served as the study group, and 35 normal health checkups served as the control group. The levels of HLA-B27, ASO and immunoglobulin subtypes (IgG, IgA, SIgA, IgM) were compared between the two groups and evaluated the inflammation index (BASDAI) and functional index (BASFI) of two groups, Spearman correlation analysis of the correlation of each index, and receiver operating characteristic curve (ROC) was analyzed for the value of each index in diagnosing AS. Results The levels of HLA-27, ASO and the positive rate in the study group were significantly higher than those in the control group, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). The levels of IgG, IgA, and IgM in the study group were significantly higher than those in the control group ($P<0.05$). There was no significant difference in the levels of SIgA between the two groups ($P>0.05$). The BASDAI and BASFI scores in the study group were

基金项目:无锡市卫生计生委面上项目(W32518280)

作者单位:解放军第960医院淄博院区骨一科,山东,淄博255300

*通信作者:陆锡平, E-mail: Lxp1203@sina.com

significantly higher than those in the control group, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). The results of correlation analysis showed that HLA-B27 and ASO had significant positive correlations with IgG, IgA, and IgM ($P < 0.05$), but no significant correlation with IgG2 and SIgA ($P > 0.05$). HLA-B27, ASO, IgG, IgA, and IgM had significant positive correlations with BASDAI and BASFI, respectively, while SIgA had no significant correlation with BASDAI and BASFI. The ROC curve results showed that the area under the curve for HLA-B27, ASO, IgG, IgA, SIgA, and IgM to diagnose AS were 0.725 (95% CI 0.645 to 0.804), 0.826 (95% CI 0.762 to 0.889), 0.798 (95% CI 0.732~0.864), 0.872 (95% CI 0.822~0.923), 0.682 (95% CI 0.604~0.760), 0.671 (95% CI 0.586~0.757). **Conclusion** The positive rate of HLA-B27 and ASO in AS patients is relatively high, and the level of immunoglobulin is abnormal. The detection of these indicators is beneficial to the diagnosis and pathological exploration of AS.

[KEY WORDS] Ankylosing spondylitis; Human leukocyte antigen B27; Anti - streptolysin O; Immunoglobulin

强直性脊柱炎(ankylosing spondylitis, AS)为脊柱关节和骶髂关节发生的慢性进展性自身免疫性炎症病变,患者多表现为骶髂关节受累及附着点炎症发展。AS往往发病时间较长、病情进展缓慢,早期无明显组织性病变,因而早期确诊较为困难。患者出现自觉症状或组织病变往往在病程的中后期,此时损伤不可逆,因此对AS的早期诊断至关重要^[1]。人类白细胞抗原 B27(human leukocyte antigen-B27, HLA-B27)在免疫学领域受到广泛关注,其在淋巴细胞中高表达且与多种疾病的发生存在关联。研究认为^[2],HLA-B27是AS发病机制中的关键分子。抗链球菌溶血素 O(anti-streptolysin O, ASO)为链球菌感染产生的抗体,链球菌感染与风湿热、猩红热、肾小球肾炎、扁桃体炎等有关^[3]。AS的发病是遗传、环境等因素共同作用的结果,并有研究指出链球菌感染与关节炎表现存在密切关系^[4]。因此,本研究强直性脊柱炎患者检测 HLA-B27、ASO 及免疫球蛋白表达进行了探究,以期对 AS 的早期诊断提供指导。

1 资料与方法

1.1 一般资料

随机选取本院 2013 年 12 月至 2018 年 12 月收治的 85 例 AS 患者,其中男 48 例,女 37 例,年龄 19~66 岁,平均(34.3±3.6)岁,病程 2 个月~20 年,平均(6.3±1.3)年。另随机选择同期于本院进行体检的正常健康人员 35 例作为对照组,均无关节疼痛及其他急慢性病史,其中男 20 例,女 15 例,年龄 18~70 岁,平均(33.7±3.9)岁。两组研究对象在性别、年龄上均衡可比,差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 1。

表 1 两组临床一般资料比较($\bar{x} \pm s$)

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

组别	n	年龄(岁)	性别(男/女)	病程(年)
对照组	85	33.7±3.9	48/37	-
研究组	35	34.3±3.6	20/15	6.3±1.3
t/χ ² 值		0.783	0.005	-
P值		0.435	0.946	-

纳入标准:符合 AS 的诊断标准^[5];存在久坐、久站或晨起腰背部僵直、关节疼痛等症状,并经影像学等检查确诊;均自愿参与本研究并签署知情同意书;近期无相关治疗史。排除标准:肝肾功能异常、造血系统疾病、神经病变者及恶性肿瘤者;合并其他自身免疫性疾病者;合并严重关节畸形者;无法配合完成此研究者。本研究经院伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 血清指标检测

所有受检者均于清晨抽取 5 mL 空腹静脉血,HLA-B27 试剂盒(美国 One Lambda 公司)行酶联免疫吸附法(ELISA)检测,采用速率散射比浊法检测 ASO 水平,试剂盒购自德国 Siemens 公司(批号:110730)。免疫球蛋白亚型 IgG、IgA、SIgA、IgM 采用 ELISA 法检测,试剂盒购自南京建成生物科技有限公司(批号:E027)。严格依照试剂盒说明书进行各项检测。

1.2.1 问卷调查

Bath 强直性脊柱炎炎症指数(BASDAI)^[6]及 Bath 强直性脊柱炎功能指数(BASFI)^[7]测定均由专业医护人员通过调查问卷量表进行评估,保障问卷的准确性、有效性和完整性。其中,BASDAI 包括晨僵、脊柱痛、疲乏、关节肿痛、局部触痛及时间 6

个问题,采用视觉模拟评分法(VAS)^[8]对每个问题进行评分,总分0~10分,分数越高,炎症越严重。BASFI包括高处取物、弯腰拾物、站立、向后看、体力活动等10项,0分最佳,分数越高,功能越差。

1.3 统计学分析

采用SPSS 20.0软件进行数据分析,计数资料以 $n(\%)$ 表示,行 χ^2 检验;计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,两两比较采用 t 检验;Spearman相关性分析各指标的相关性;受试者工作特征曲线(Receiver operating characteristic curve, ROC)分析各指标诊断AS的价值。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组研究对象HLA-B27、ASO表达水平及阳性率比较

研究组AS患者HLA0B27及ASO表达水平显著高于对照组健康人员,差异有统计学意义($P < 0.05$)。研究组AS患者HLA0B27及ASO阳性率显著高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表2。

表2 两组研究对象HLA-B27、ASO表达水平及阳性率比较 [$n(\%)$, $(\bar{x} \pm s)$]

Table 2 Comparison of HLA-B27, ASO expression levels and positive rates in two groups of subjects [$n(\%)$, $(\bar{x} \pm s)$]

组别	n	HLA-B27		ASO	
		表达水平(U/mL)	阳性率	表达水平(IU/mL)	阳性率
对照组	35	254.3±29.2	2(5.7)	41.2±5.3	3(8.6)
研究组	85	18.3±4.4	78(91.8)	48.9±7.1	26(30.6)
t/χ^2 值		47.593	82.608	5.781	5.214
P值		0.000	0.000	0.000	0.022

2.2 两组研究对象免疫球蛋白亚型水平、BASDAI、BASFI评分比较

研究组AS患者IgG、IgA、IgM水平显著高于对照组健康人员,差异有统计学意义($P < 0.05$)。研究组和对照组SIgA水平比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。研究组AS患者BASDAI、BASFI评分均显著高于对照组健康人员,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表3。

2.3 HLA-B27、ASO与免疫球蛋白亚型相关性分析

HLA-27、ASO分别与IgA、IgM存在显著正相关性($P < 0.05$),与SIgA无显著相关性($P > 0.05$)。见表4。

表3 两组研究对象免疫球蛋白亚型水平、BASDAI、BASFI评分比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of immunoglobulin subtype levels, BASDAI and BASFI scores between 2 groups ($\bar{x} \pm s$)

项目	对照组	研究组	t值	P值
IgG($\mu\text{g/mL}$)	11.9±3.1	20.4±3.5	12.486	0.000
IgA($\mu\text{g/mL}$)	8.1±1.6	14.5±3.7	13.225	0.000
SIgA($\mu\text{g/mL}$)	29.8±4.7	31.2±5.1	1.397	0.165
IgM($\mu\text{g/mL}$)	12.4±2.4	16.8±2.9	7.923	0.000
BASDAI(分)	2.2±0.8	4.4±1.1	12.199	0.000
BASFI(分)	2.6±0.5	4.3±1.3	10.341	0.000

表4 HLA-B27、ASO与免疫球蛋白亚型的相关性

Table 4 Correlation between HLA-B27, ASO and immunoglobulin subtypes

项目	HLA-B27		ASO	
	r值	P值	r值	P值
IgG	0.401	0.002	0.337	0.009
IgA	0.317	0.014	0.277	0.032
SIgA	0.209	0.109	0.213	0.102
IgM	0.412	0.001	0.290	0.025

2.4 HLA-B27、ASO及免疫球蛋白亚型与BASDAI、BASFI相关性分析

HLA-27、ASO、IgG、IgA、IgM分别与BASDAI、BASFI存在显著正相关性($P < 0.05$),SIgA与BASDAI、BASFI无显著相关性($P > 0.05$)。见表5。

表5 BASDAI、BASFI与HLA-B27、ASO及免疫球蛋白亚型的相关性

Table 5 Correlation between BASDAI, BASFI and HLA-B27, ASO and immunoglobulin subtypes

项目	BASDAI		BASFI	
	r值	P值	r值	P值
HLA-B27	0.278	0.032	0.340	0.008
ASO	0.308	0.017	0.265	0.041
IgG	0.401	0.002	0.303	0.019
IgA	0.409	0.001	0.311	0.016
SIgA	0.204	0.118	0.225	0.084
IgM	0.297	0.02	0.397	0.002

2.5 HLA-B27、ASO及免疫球蛋白亚型诊断AS的ROC曲线

ROC曲线结果显示,HLA-B27、ASO、IgG、IgA、SIgA、IgM诊断AS的曲线下面积分别为0.725(95%CI:0.645~0.804)、0.826(95%CI:0.762~0.889)、0.798(95%CI:0.732~0.864)、0.872(95%CI:0.822~0.923)、0.682(95%CI:0.604~0.760)、0.671(95%CI:0.586~0.757)。见图1。

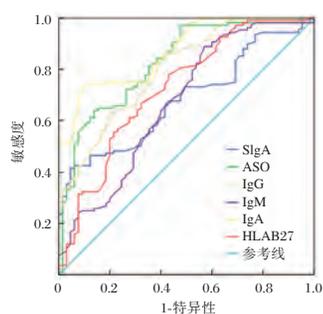


图1 HLA-B27、ASO及免疫球蛋白亚型诊断AS的ROC曲线

Figure 1 ROC curve of HLA-B27, ASO and immunoglobulin subtypes in the diagnosis of AS

3 讨论

AS的临床表现有脊柱活动受限、晨僵、腰痛、驼背畸形等,其主要的病理标志为滑膜炎、肌腱韧带骨附着点和中轴骨骼炎症,具有较高的致残率。症状体征的改变与AS的疾病发展存在密切关系,AS初期往往症状较轻无法自查,随着疾病加剧逐渐影响患者的脊柱功能。研究显示^[9],AS患者的BASDAI、BASFI评分均显著高于正常人,这与本研究结果相符合。AS为一种慢性自身免疫性疾病,在青壮年尤其男性中发病率较高,对于AS的早期诊断尤为重要。

HLA-B27为人类白细胞抗原I类分子,研究发现^[7]HLA-B27的同源二聚体能够与粒细胞、NK细胞及淋巴细胞受体结合,参与多种细胞调控及一系列的信息传递,从而在自身免疫性疾病的发生发展中发挥作用。HLA-B27在有核细胞上均有表达,可作为感染因子的受体,是免疫应答基因的标志物^[10]。HLA-B27对于环境激发因素具有易感性,可与外来抗原发生交叉反应,从而增强中性粒细胞活动性。多项研究证实^[11-13],HLA-B27可作为AS临床诊断和治疗的重要实验室指标,HLA-B27检测对于AS的病情进展和临床分期预测具有显著价值。

研究认为环境因素是AS发病的重要影响因素之一,其中感染在AS发病中存在显著作用^[14]。在一项研究中^[15],AS患者滑液存在细菌DNA,并与疾病活动度存在密切关系。本研究结果显示与BASDAI、BASFI及相关免疫球蛋白水平存在显著相关性。ASO为反应患者近期是否存在A群溶血型链球菌感染的指标,其在感染发生一周内开始

升高,并在3~6周达到高峰。链球菌感染促进抗原呈递细胞(APC)活化,引发机体免疫激活,诱导多种超抗原产生,并可激活T、B淋巴细胞,促进白细胞介素(IL)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)及干扰素- γ (IFN- γ)等炎性因子或促炎细胞因子的释放,介导和加重关节组织损伤,从而诱导AS疾病进展^[16]。并有研究表明^[17],细菌感染会刺激骨髓发生,促进破骨细胞数目增加,骨吸收加重,加剧骨的破坏。因此,检测对于了解AS病情程度具有显著价值。

免疫球蛋白为活化B细胞表达的具有重要作用的免疫抗体,参与了机体体液免疫过程。IgG为血清含量最高的一类免疫球蛋白,是机体免疫应答的主要抗体。研究认为^[18]IgA与AS患者疾病活动密切相关,在AS患者中存在IgA增高,这是因为IgA为微生物抗原,并与C反应蛋白(CRP)等炎性细胞因子水平关系密切。IgM为体液免疫应答中最早出现的抗体,也是存留时间最短的急性免疫性炎症反应指标。本研究结果证实,免疫球蛋白升高是AS的重要临床表现。相关性结果显示,三者存在正相关性,并与AS患者疾病活动存在密切关系。HLA-27、ASO与BASDAI、BASFI存在显著正相关性,检测二者水平可作为AS疾病活动度评估的有效指标,并与免疫球蛋白紊乱存在密切关系。免疫球蛋白有利于维持AS患者自身免疫功能,在AS的疾病发病中也有重要作用,同时,免疫球蛋白还有助于抑制AS患者机体炎症反应水平、抵抗入侵病原体。

综上所述,AS患者HLA-B27、ASO阳性率较高,免疫球蛋白水平异常,对于这些指标进行检测有利于AS的诊断及病理探究。

参考文献

- [1] 白世杰,托娅,张保平,等.强直性脊柱炎及其相关基因HLA-B27检测的研究现状[J].分子诊断与治疗杂志,2016,8(3):206-211.
- [2] Clarke J. HLA-B27-related pathway mediates syndesmophyte formation in AS[J]. Nat Rev Rheumatol, 2020,16(1):3.
- [3] 王润,沈惠良,徐新美,等.结节性红斑患者白细胞计数、C-反应蛋白、血沉及抗链球菌溶血素O的测定及临床意义[J].中国卫生检验杂志,2019,29(24):3032-3034.
- [4] Sahin MS, Yalcin MU, Kocyigit D. Prevalence of rheumatic heart disease in patients with recurrent tonsillitis and elevated anti-streptolysin O titers[J]. Int J Pediatr Otorhinolaryngol, 2016,89(1):133-135.

乳腺癌组织中 VWCE、MEKK3 的表达水平与临床病理、预后的关系分析

李远平^{1*} 刘勋² 祝琴¹

[摘要] 目的 研究乳腺癌组织中结构域蛋白(VWCE)、有丝分裂原活化蛋白激酶激酶激酶(MEKK3)的表达水平与临床病理、预后的关系。方法 选取2015年1月至2016年1月于本院接受治疗的乳腺癌患者130例,分别检测患者癌组织及癌旁组织中VWCE、MEKK3的表达水平;根据患者VWCE/GADPH灰度值>2为高表达,VWCE/GADPH灰度值≤2为低表达将患者分为VWCE高表达组和VWCE低表达组,根据MEKK3/GADPH灰度值>2为高表达,MEKK3/GADPH灰度值≤2为低表达将患者分为MEKK3高表达组和MEKK3低表达组,分析乳腺癌组织中VWCE、MEKK3的表达水平与病理特征关系;分析VWCE、MEKK3的表达水平与患者生存率的关系。结果 根据患者VWCE表达和MEKK3的表达将患者分为VWCE高表达组75例、VWCE低表达组55例以及MEKK3高表达组70例、MEKK3低表达组60例;癌组织中VWCE相对表达水平显著低于癌旁组织,差异具有统计学意义($P<0.05$);癌组织中MEKK3相对表达水平显著高于癌旁组织,差异具有统计学意义($P<0.05$);MEKK3和VWCE的表达水平与患者年龄、病理类型、雌激素受体、孕激素受体无明显的相关性($P>0.05$);VWCE低表达与肿瘤直径、临床分期和淋巴结有显著的相关性($P<0.05$);MEKK3高表达与肿瘤直径、临床分期和淋巴结是否转移有显著的相关性($P<0.05$);VWCE高表达组3年生存率为85.33%,显著高于VWCE低表达组的61.82%,差异具有统计学意义($P<0.05$);MEKK3高表达组3年生存率为68.57%,显著低于MEKK3低表达组的88.33%,差异具有统计学意义($P<0.05$)。结论 乳腺癌组织中VWCE呈低表达,MEKK3呈高表达;VWCE的高表达和MEKK3的低表达与乳腺癌患者的肿瘤直径、临床分期、淋巴结是否转移及预后有明显的相关性。

[关键词] 乳腺癌;结构域蛋白VWCE;有丝分裂原活化蛋白激酶

Analysis of the relationship between the expression levels of VWCE and MEKK3 in breast cancer tissues and clinicopathology and prognosis

LI Yuanping^{1*}, LIU Xun², ZHU Qin¹

(1. Department of Nail and Breast Surgery, Leshan people's Hospital, Leshan, Sichuan, China, 614000;

2. Department of Pathology, Leshan People's Hospital, Leshan, Sichuan, China, 614000)

[ABSTRACT] Objective To study the relationship between the expression levels of von Willebrand factor C and epidermal growth factor domains (VWCE) and mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase kinase kinase 3 (MEKK3) in breast cancer tissues and clinicopathology, prognosis. Methods A total of 130 breast cancer patients who were treated in our hospital from January 2015 to January 2016 were selected to detect the expression levels of VWCE and MEKK3 in the cancer tissues and adjacent tissues of the patients. The expression levels of VWCE and MEKK3 in cancer tissues and adjacent tissues were detected.

基金项目:四川省科研课题项目(16PJ158)

作者单位:1. 乐山市人民医院甲乳外科,四川,乐山 614000

2. 乐山市人民医院病理科,四川,乐山 614000

*通信作者:李远平, E-mail: opniedc7828@sina.com

VWCE/GADPH gray value greater than 2 was defined as high expression, while VWCE/GADPH gray value not greater than 2 was defined as low expression. The patients are divided into VWCE high-expression group and VWCE low-expression group. MEKK3/GADPH gray value greater than 2 was defined as high expression, while MEKK3/GADPH gray value not greater than 2 was defined as low expression. The patients are divided into MEKK3 high-expression group and MEKK3-low expression group. The relationship between the expression levels of VWCE and MEKK3 in adenocarcinoma tissues and pathological features was analyzed. The relationship between the expression levels of VWCE and MEKK3 and the survival rate was analyzed. **Results** According to the expression of VWCE and MEKK3, patients were divided into VWCE high-expression group (75 cases), VWCE low-expression group (55 cases), MEKK3 high-expression group (70 cases) and MEKK3 low-expression group (60 cases). The relative expression level of VWCE in cancer tissue was significantly lower than that in adjacent tissues ($P<0.05$), while the relative expression level of MEKK3 was significantly higher than that in adjacent tissues ($P<0.05$). The expression levels of MEKK3 and VWCE were not significantly related to age, pathological types, estrogen receptor or progesterone receptor ($P>0.05$). The low expression of VWCE and high expression of MEKK3 were related to tumor diameter, clinical stage and lymph node metastasis ($P<0.05$). The 3-year survival rate in VWCE high-expression group was significantly higher than that in VWCE low-expression group (85.33% vs 61.82%) ($P<0.05$). The 3-year survival rate in MEKK3 high-expression group was significantly lower than that in MEKK3 low-expression group (68.57% vs 88.33%) ($P<0.05$). **Conclusion** Breast cancer tissues have low expression of VWCE and high expression of MEKK3. The high expression of VWCE and the low expression of MEKK3 are significantly related to the tumor diameter, clinical stage, lymph node metastasis and prognosis of breast cancer patients.

[KEY WORDS] Breast cancer; Domain protein VWCE; MEKK3

乳腺癌是一种严重危害女性健康的常见恶性肿瘤,近年来的临床数据显示,我国的乳腺癌患者逐年递增,并表现出明显的年轻化发展趋势^[1-2]。目前对于乳腺癌的治疗主要以手术切除为主,再辅助化疗能够显著提高患者的治疗效果^[3]。乳腺癌组织中结构域蛋白(von willebrand factor C and epidermal growth factor domains, VWCE)是EGF家族的成员之一,含有2个VWC结构域,在N末端VWC结构域能与骨形态蛋白结合影响肿瘤细胞的上皮-间充质转化过程从而影响细胞的侵袭和迁移能力^[4]。目前研究表明VWCE在肝癌、胃癌中发挥重要作用^[5],但在乳腺癌中的机制和效果均尚不明确。有丝分裂原活化蛋白激酶激酶3(mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase kinase 3, MEKK3)是MAP3K超家族MEKK/STE11亚群中的一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,与恶性肿瘤的发生发展密切相关^[6],但目前与乳腺癌的发生和发展关系尚不明确。本研究观察了乳腺癌组织中VWCE、MEKK3的表达水平与临床病理、预后的关系,以期为乳腺癌的治疗提供一定的理论基础。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取2015年1月至2016年1月于本院接受治疗的乳腺癌患者130例,均为女性。年龄28~58岁,平均(45.21±10.25)岁;体重39~79 kg,平均(60.32±8.39)kg。

纳入标准:①均经过手术确诊为乳腺癌;②均有完整的病历资料;③所有患者均对本研究知情同意且研究经本院伦理委员会批准。排除标准:①严重肝肾功能不全;②哺乳期或妊娠期妇女;③合并其他恶性肿瘤;④入院前使用过化疗、放疗治疗者。

1.2 方法

取患者癌组织和癌旁组织(距离肿瘤边缘≥2 cm),采用蛋白质印记法(蛋白电泳仪及转膜仪购自美国Bio-Rad公司)检测样本中VWCE和MEKK3表达水平,以GADPH为内参,计算各蛋白相对表达水平;所需抗体购自美国Santa Cruze Biotechnology公司。

观察癌组织及癌旁组织样本中VWCE和MEKK3表达水平,根据VWCE/GADPH灰度值>2为高表达、VWCE/GADPH灰度值≤2为低表达,将患

者分为 VWCE 高表达组和 VWCE 低表达组;根据 MEKK3/GADPH 灰度值 >2 为高表达、MEKK3/GADPH 灰度值 ≤2 为低表达,将患者分为 MEKK3 高表达组和 MEKK3 低表达组^[7]。分析 VWCE 和 MEKK3 表达水平与临床病理参数间关系,临床病理参数包括:年龄、肿瘤直径、病理类型、临床分期、淋巴结转移、雌激素受体、孕激素受体。

记录患者的临床资料和实验室检查信息,以患者住院确诊为乳腺癌时的临床及生化资料为研究资料,对研究对象进行电话随访,直至患者死亡或研究结束。随访时间为2016年1月至2019年1月。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 12.0 统计学软件进行数据分析,计数资料采用 $n(\%)$ 表示,采用 χ^2 检验;计量资料采用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,采用 t 检验;生存曲线采用 KM 法,采用 Log Rank 检验。以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

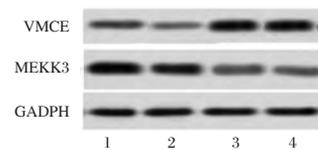
2.1 患者癌组织及癌旁组织中 VWCE 和 MEKK3 表达水平

癌组织中 VWCE 相对表达水平显著低于癌旁组织,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$);癌组织中 MEKK3 相对表达水平显著高于癌旁组织,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$),见表 1 和图 1。

表 1 患者癌组织及癌旁组织中 VWCE 和 MEKK3 表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 The expression levels of VWCE and MEKK3 in cancer tissues and adjacent tissues of patients ($\bar{x} \pm s$)

位置	n	VWCE/GADPH 灰度值	MEKK3/GADPH 灰度值
乳腺癌癌组织	130	1.18±0.11	2.98±0.47
癌旁组织	130	2.07±0.29	0.78±0.17
t 值		32.717	50.188
P 值		0.000	0.000



注:1、2为乳腺癌癌组织;3、4为癌旁组织。

图 1 患者癌组织及癌旁组织中 VWCE 和 MEKK3 表达水平

Figure 1 Expression levels of VWCE and MEKK3 in cancer tissues and adjacent tissues

2.2 VWCE、MEKK3 的表达水平与乳腺癌患者临床病理特征关系

各组间年龄、体重等一般资料比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。VWCE、MEKK3 的表达水平与患者年龄、病理类型、雌激素受体、孕激素受体无明显的相关性 ($P > 0.05$);VWCE、MEKK3 低表达与肿瘤直径、临床分期和淋巴结有明显的相关性 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 VWCE、MEKK3 的表达水平与乳腺癌患者临床病理特征关系

Table 2 The relationship between expression level of VWCE, MEKK3 and clinicopathological characteristics of breast cancer patients

临床特征	n	VWCE 蛋白相对表达量		χ^2 值	P 值	MEKK3 蛋白相对表达量		χ^2 值	P 值	
		高表达 (n=75)	低表达 (n=55)			高表达 (n=70)	低表达 (n=60)			
年龄(岁)	≤50	69	40	29	0.000	0.945	37	32	0.002	0.957
	>50	61	35	26			33	28		
肿瘤直径(cm)	≤5	60	46	14	16.436	0.000	25	35	6.561	0.001
	>5	70	29	41			45	25		
病理类型	导管癌	66	37	29	0.523	0.769	36	30	0.141	0.932
	小叶癌	44	25	19			24	20		
	囊内乳头状癌	20	13	7			10	10		
临床分期	I	20	18	2	44.761	0.000	5	15	58.069	0.000
	II	48	40	8			10	38		
	III	62	17	45			55	7		
淋巴结是否转移	是	60	10	50	76.837	0.000	50	10	38.958	0.000
	否	70	65	5			20	50		
雌激素受体	阴性	73	41	32	0.159	0.690	43	30	0.100	0.752
	阳性	57	34	23			32	25		
孕激素受体	阴性	77	44	33	0.023	0.879	40	37	0.274	0.601
	阳性	53	31	22			30	23		

2.3 VWCE、MEKK3 的表达水平与预后关系

VWCE 高表达组 3 年生存率显著高于 VWCE 低表达组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$);

MEKK3 高表达组 3 年生存率显著低于 MEKK3 低表达组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 3、图 2。

表 3 VWCE、MEKK3 的表达水平与预后关系 [n(%)]

Table 3 The relationship between expression level of VWCE、MEKK3 and prognosis [n(%)]

组别	n	3 年生存率	组别	n	3 年生存率
VWCE 高表达组	75	64(85.33)	MEKK3 高表达组	70	48(68.57)
VWCE 低表达组	55	34(61.82)	MEKK3 低表达组	60	53(88.33)
χ^2 值		9.426			7.280
P 值		0.002			0.006

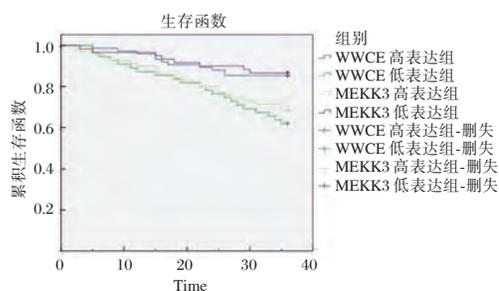


图 2 各组患者生存曲线分析

Figure 2 Analysis of survival curve of patients in each group

3 讨论

VWCE 是乳腺癌组织中结构域蛋白为 VWC 蛋白家族的重要转录因子之一, 又被称为 VWCE1 和上调基因 11。目前研究表明 VWCE 在癌细胞中可以通过 N 末端 VWC 结构域与癌细胞中化生长因子 β 家族中的 BMP 结合, 抑制肿瘤细胞的侵袭和迁移能力^[8-9]。饶茜等^[10]研究表明, 乳腺癌组织中 VWCE 表达水平低于正常组织, 与本研究结果一致。Wan 等^[11]研究表明, VWCE 在乳腺癌中表达要低于正常组织, VWCE 的过表达可以抑制乳腺癌细胞的增殖和迁移, 与本研究得出的结论相类似。VWCE 低表达患者生存率较低可能与肿瘤的上皮间质转化相关, VWCE 低表达会抑制 E-钙粘蛋白的表达, 降低细胞间的黏附能力, 使得肿瘤细胞的运动能力增强, 导致肿瘤更易于扩散和转移, 降低了患者的生存率。

MEKK3 是 MAP3K 超家族 MEKK/STE11 亚群中的一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶^[12]。MAPK 家族蛋白可以调控细胞存活和增殖相关通路, 同时对细胞增殖蛋白 Ki67 及 PCNA 有一定的影响^[13]。孙琳等^[14]研究表明, MEKK3 可以通过 MAPK 级联系统调节肿瘤细胞的增殖。刘寿

贵^[17]研究表明, 抑制 MEKK3 的表达可以有效抑制肿瘤细胞的增殖并促进其凋亡, 与本研究得出的结论相一致。

综上所述, 乳腺癌组织中 VWCE 呈低表达, MEKK3 呈高表达; VWCE 的高表达和 MEKK3 的低表达与乳腺癌患者的肿瘤直径、临床分期、淋巴结转移及预后有明显的相关性。临床上可以通过检测患者乳腺癌组织中 VWCE 和 MEKK3 的表达情况对患者的预后进行初步推断。

参考文献

- [1] 左婷婷, 陈万青. 中国乳腺癌全人群生存率分析研究进展 [J]. 中国肿瘤临床, 2016, 43(14):639-642.
- [2] 邢海霞, 赵明燕, 郭勇. 乳腺癌患者血清性激素、IGF-1、VEGF 和组织 LOX 水平与淋巴结转移的相关性分析 [J]. 分子诊断与治疗杂志, 2019, 11(2):122-127.
- [3] 黄焰, 曾敏. 乳腺癌新辅助化疗再认识 [J]. 中国肿瘤临床, 2016, 43(15):643-645.
- [4] Rider CC, Mulloy B. Heparin, heparin sulphate and the TGF- β cytokine superfamily [J]. Molecules, 2017, 22(5): E713.
- [5] Tong GD, Zhang X, Zhou DQ, et al. Efficacy of early treatment on 52 patients with preneoplastic hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma by compound Phyllanthus Urinaria L [J]. Chin J Integr Med, 2014, 20(4):263-271.
- [6] Legrand JMD, Roy E, Baz B, et al. Genetic variation in the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway affects contact hypersensitivity responses [J]. J Allergy Clin Immunol, 2018, 142(3):22-23.
- [7] 张丹. VWCE 的表达水平及功能在乳腺癌转移中的作用机制研究 [D]. 2019:35-36.
- [8] Zhou YF, Eng ET, Zhu J, et al. Sequence and structure relationships within von Willebrand factor [J]. Blood, 2012, 120(2):449-458.
- [9] 万丽丽, 刘洋, 刘丽桃, 等. 人乳腺癌中 VWCE 基因的表达及其功能研究 [J]. 肿瘤, 2017, 37(7):742-749.

(下转第 1267 页)

乳腺癌中 lncRNA ITGA9-AS1 表达与病理特征及新辅助化疗疗效的关系

孙少甫¹ 潘亚军¹ 栾春^{2*}

[摘要] 目的 研究乳腺癌中长链非编码 RNA (lncRNA) ITGA9-AS1 表达与病理特征及新辅助化疗疗效的关系。方法 选择 2015 年 5 月至 2019 年 5 月期间在本院接受新辅助化疗的 124 例乳腺癌患者作为乳腺癌组, 同期接受手术切除的 42 例乳腺良性肿瘤患者作为对照组, 检测乳腺癌组织及乳腺良性肿瘤组织中 lncRNA ITGA9-AS1 的表达水平; 根据术后病理评价乳腺癌新辅助化疗的病理完全缓解 (pCR) 情况, 采用 ROC 分析 lncRNA ITGA9-AS1 与 pCR 的预测价值。结果 乳腺癌组织中 lncRNA ITGA9-AS1 的表达水平明显低于乳腺良性肿瘤组织 ($P < 0.05$) 且不同肿瘤大小、淋巴结转移、临床分期、Ki-67 表达的乳腺癌比较, lncRNA ITGA9-AS1 的表达水平有统计学差异 ($P < 0.05$); 非 pCR 乳腺癌组织中 lncRNA ITGA9-AS1 的表达水平低于 pCR 乳腺癌组织 ($P < 0.05$) 且 lncRNA ITGA9-AS1 对 pCR 具有预测价值, 最佳截断值为 0.704 5。结论 乳腺癌中 lncRNA ITGA9-AS1 低表达且与病理特征、新辅助化疗疗效有关。

[关键词] 乳腺癌; 新辅助化疗; 病理完全缓解; lncRNA ITGA9-AS1; 预测

The relationship between the expression of lncRNA ITGA9 - AS1 in breast cancer and the pathological characteristics, neoadjuvant chemotherapy

SUN Shaofu¹, PAN Yajun¹, LUAN Chun^{2*}

(1. Haikou Fourth People's Hospital General Surgery, Haikou, Hainan, China, 571100; 2. Hainan Provincial Tumor Hospital, General Surgery, Haikou, Hainan, China, 570100)

[ABSTRACT] Objective To investigate the relationship between the expression of lncRNA ITGA9-AS1 and the pathological characteristics, neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. Methods From May 2015 to may 2019, 124 breast cancer patients who received neoadjuvant chemotherapy in our hospital were selected as the breast cancer group, and 42 breast benign tumor patients who received surgical resection at the same time were selected as the control group. The expression levels of lncRNA ITGA9-AS1 in breast cancer tissue and breast benign tumor tissue were detected. Pathological complete remission (pCR) of neoadjuvant chemotherapy was evaluated according to the postoperative pathological evaluation, and ROC curve was used to analyze the predictive value of lncRNA ITGA9-AS1 on pCR. Results The expression level of lncRNA ITGA9-AS1 in breast cancer was significantly lower than that in benign breast cancer ($P < 0.05$), and the expression level of lncRNA ITGA9-AS1 in breast cancer with different tumor size, lymph node metastasis, clinical stage and Ki-67 were statistically different ($P < 0.05$). The expression level of lncRNA ITGA9-AS1 in non pCR breast cancer was lower than that in pCR breast cancer ($P < 0.05$), and the lncRNA ITGA9-AS1 had predictive value

基金项目: 海南省卫健委(1301000310A2012)

作者单位: 1. 海口市第四人民医院普外科, 海南, 海口 571100

2. 海南省肿瘤医院普外科, 海南, 海口 570100

*通信作者: 栾春, E-mail: g4053477fanglan90@163.com

for pCR. **Conclusion** The low expression of lncRNA ITGA9-AS1 in breast cancer is related to pathological characteristics and the efficacy of neoadjuvant chemotherapy.

[KEY WORDS] Breast cancer; Neoadjuvant chemotherapy; Pathological complete remission; LncRNA ITGA9-AS1; Prediction

乳腺癌是全球范围内发病率和病死率居首位的女性恶性肿瘤,我国约20%的乳腺癌患者确诊时已经发展为局部晚期^[1-2],此时进行新辅助化疗对于改善预后具有积极意义。新辅助化疗后获得病理完全缓解(pathologic complete response, pCR)在远期预后中的获益受到了越来越多关注,纳入了8项研究的Meta分析表明,新辅助化疗后获得pCR患者的5年总生存率和无病生存率均明显高于未获得pCR患者^[3]。

长链非编码RNA(Long noncoding RNA, lncRNA)是近些年乳腺癌研究的热点,多种lncRNA在乳腺癌中异常表达且对乳腺癌细胞的增殖、迁移、侵袭、化疗敏感性具有调控作用^[4-6]。但乳腺癌中lncRNA ITGA9-AS1表达的变化及意义尚不十分明确。因此,本研究将具体分析乳腺癌中lncRNA ITGA9-AS1表达与病理特征及新辅助化疗疗效的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选择2015年5月至2019年5月期间在本院诊断为乳腺癌的124例患者作为乳腺癌组,年龄37~62岁、平均(50.28±8.84)岁;另取同期接受手术切除且经术后病理诊断为乳腺良性肿瘤的42例患者作为对照组,年龄33~59岁、平均(48.95±11.32)岁。两组间一般资料的比较,差异无统计学意义($P>0.05$),有可比性。

纳入标准:①经穿刺活检诊断为浸润性乳腺癌;②接受TEC方案新辅助化疗3~6周期;③新辅助化疗后进行根治性手术;④术后病理资料完整。⑤所有患者及家属签署知情同意书。排除标准:①穿刺前接受过抗肿瘤治疗;②既往有其他恶性肿瘤病史。本实验经医院伦理委员会批准。

1.2 试剂与仪器

组织总RNA提取试剂盒、lncRNA cDNA第一链合成试剂盒、lncRNA荧光定量检测试剂盒为北京天根公司,荧光定量PCR仪为美国Bio-rad公司。

1.3 新辅助化疗方法及疗效评价

根据《中国乳腺癌新辅助治疗专家共识(2019年版)》^[7]进行TEC方案新辅助化疗,21d为1个周期;化疗2个周期后,进行磁共振检查并根据RECIST1.1标准判断疗效,稳定(SD)、进展(PD)、完全(CR)的患者进行根治性手术,部分缓解(PR)继续行2个周期TEC方案新辅助化疗后进行根治性手术。手术后,根据病理检查评价pCR,具体定义为乳腺原发灶和转移区域淋巴结未找到恶性肿瘤的组织学证据。

1.4 lncRNA ITGA9-AS1表达水平的检测

取化疗前经穿刺活检获得的乳腺癌组织及手术切除的乳腺良性肿瘤组织,采用组织总RNA提取试剂盒提取组织中的总RNA,采用lncRNA cDNA第一链合成试剂盒将总RNA中的lncRNA反转录为cDNA,采用lncRNA荧光定量检测试剂盒配置PCR反应体系,分别使用目的基因lncRNA ITGA9-AS1和内参基因GAPDH的引物,完成PCR反应后得到反应的循环曲线和阈值(Ct),根据 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算lncRNA ITGA9-AS1的表达水平。

1.5 统计学方法

采用SPSS 21.0软件录入数据,计量资料以($\bar{x}\pm s$)表示,两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用方差分析,lncRNA ITGA9-AS1预测pCR采用ROC曲线分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组lncRNA ITGA9-AS1表达的比较

与对照组比较,乳腺癌组患者lncRNA ITGA9-AS1的表达水平明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表1。

表1 两组lncRNA ITGA9-AS1表达的比较($\bar{x}\pm s$)
Table 1 comparison of lncRNA ITGA9-AS1 expression between groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	lncRNA ITGA9-AS1
乳腺癌组	124	0.69±0.19
对照组	42	0.93±0.26
<i>t</i> 值		6.410
<i>P</i> 值		0.000

2.2 乳腺癌组中不同病理特征患者 lncRNA ITGA9-AS1 表达的比较

不同病理分型、分子分型的乳腺癌比较, lncRNA ITGA9-AS1 的表达水平无显著性差异($P>0.05$); 不同肿瘤大小、淋巴结转移、临床分期、Ki-67 表达的乳腺癌比较, lncRNA ITGA9-AS1 的表达水平有统计学差异($P<0.05$)。见表 2。

表 2 不同病理特征乳腺癌中 lncRNA ITGA9-AS1 表达的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 comparison of lncRNA ITGA9-AS1 expression in breast cancer with different pathological features ($\bar{x} \pm s$)

病理特征	分类	n	lncRNA ITGA9-AS1	t/F 值	P 值
肿瘤大小	T1-2	41	0.85±0.18	7.836	0.000
	T3-4	83	0.61±0.15		
淋巴结转移	否	44	0.76±0.14	3.509	0.001
	是	80	0.65±0.18		
临床分期	II	78	0.75±0.15	5.513	0.000
	III	46	0.58±0.19		
Ki-67	阴性	41	0.81±0.20	5.816	0.000
	阳性	83	0.63±0.14		
病理分型	导管型	97	0.69±0.15	0.938	0.215
	小叶型	9	0.66±0.22		
	其他	18	0.67±0.25		
分子分型	Luminal 型	78	0.68±0.16	1.474	0.108
	HER2 型	24	0.74±0.18		
	三阴型	22	0.67±0.21		

2.3 乳腺癌组中新辅助化疗 pCR 患者与非 pCR 患者 lncRNA ITGA9-AS1 表达的比较

与乳腺癌组中新辅助化疗 pCR 患者比较, 非 pCR 患者乳腺癌组织中 lncRNA ITGA9-AS1 的表达水平明显降低, 差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 3。

表 3 乳腺癌组中 pCR 患者与非 pCR 患者 lncRNA ITGA9-AS1 表达的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 comparison of lncRNA ITGA9-AS1 expression between pCR patient and non-pCR patient in breast cancer group ($\bar{x} \pm s$)

新辅助化疗疗效	n	lncRNA ITGA9-AS1
pCR	52	0.80±0.15
非 pCR	72	0.61±0.17
t 值		6.447
P 值		0.000

2.4 lncRNA ITGA9-AS1 表达预测新辅助化疗疗效的 ROC 曲线分析

绘制 lncRNA ITGA9-AS1 表达预测新辅助化

疗疗效的 ROC 曲线, 曲线下面积为 0.800 6 (95%CI: 0.721 3~0.880 0, $P<0.001$), 根据约登指数最大值确定 lncRNA ITGA9-AS1 表达预测 pCR 的最佳截断值为 0.704 5, 该截断值预测 pCR 的灵敏度和特异性分别为 80.77% 和 70.83%。见图 1。

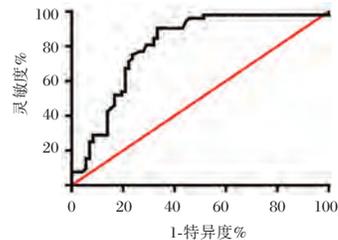


图 1 lncRNA ITGA9-AS1 表达预测新辅助化疗疗效的 ROC 曲线

Figure 1 ROC curve of lncRNA ITGA9-AS1 expression in predicting the efficacy of neoadjuvant chemotherapy

3 讨论

乳腺癌的发病机制复杂且未完全阐明。lncRNA 是一类长度大于 200 nt 且没有编码蛋白质功能的 RNA, 是近些年恶性肿瘤发病机制研究的热点。lncRNA 起到内源性竞争性 RNA 的作用, 以类似分子海绵的方式吸附多种微小 RNA, 影响微小 RNA 对下游癌基因表达的调控作用, 进而实现对癌细胞增殖、迁移、侵袭等的调控^[8-11]。

lncRNA ITGA9-AS1 是新发现的一种具有抑癌活性的 lncRNA, 根据国内贾小婷^[7]的报道, 该 lncRNA 在多种乳腺癌细胞中的表达均明显降低, 过表达 lncRNA ITGA9-AS1 显著抑制乳腺癌细胞的增殖及克隆形成。在此基础上, 本研究在乳腺癌临床样本中对 lncRNA ITGA9-AS1 的表达进行了验证, 与乳腺良性肿瘤比较, 乳腺癌中 lncRNA ITGA9-AS1 的表达水平明显降低, 与该 lncRNA 在乳腺癌细胞中表达降低的变化趋势一致。lncRNA ITGA9-AS1 具有抑制乳腺癌细胞生长的作用, 乳腺癌中低表达的 lncRNA ITGA9-AS1 会使其抑癌作用削弱, 进而促进肿瘤发展。本研究进一步分析, 表明 lncRNA ITGA9-AS1 的低表达能够使乳腺癌的多项病理特征恶化, 与其低表达后抑癌作用减弱、促癌作用增强的生物学效应吻合, 进一步验证了 lncRNA ITGA9-AS1 低表达在乳腺癌发生发展中的作用。

贾小婷^[12]的研究不仅发现了 lncRNA ITGA9-AS1 在乳腺癌细胞中表达降低,还发现了该 lncRNA 在多药耐药乳腺癌细胞中的表达低于化疗敏感的乳腺癌细胞,且过表达 lncRNA ITGA9-AS1 能够增加多药耐药乳腺癌细胞对化疗药物的敏感性,提示 lncRNA ITGA9-AS1 参与乳腺癌细胞化疗敏感性的调控。术前新辅助化疗是局部晚期乳腺癌重要的治疗手段,但乳腺癌患者的新辅助化疗存在个体差异,获得新辅助化疗 pCR 患者的预后明显优于未获得 pCR 的患者。基于此,近些年越来越多研究开始关注新辅助化疗 pCR 的早期评价手段,通过分子指标在新辅助化疗前筛查可能取得 pCR 的患者能够为临床选择适合进行新辅助化疗的患者提供依据^[13]。本研究分析发现 lncRNA ITGA9-AS1 的表达水平对新辅助化疗 pCR 具有预测价值。由此证实 lncRNA ITGA9-AS1 的低表达影响乳腺癌新辅助化疗的疗效、与患者未能获得 pCR 有关。

综上所述,乳腺癌中 lncRNA ITGA9-AS1 的表达明显降低且与多项病理特征恶化有关;此外, lncRNA ITGA9-AS1 的低表达还会影响新辅助化疗的疗效、与患者未能获得 pCR 有关。

参考文献

[1] 何明艳,朱碧琪,钟媛,等. 2005-2013年中国女性乳腺癌发病及死亡趋势分析[J]. 中华疾病控制杂志, 2019, 23(1): 10-14.

[2] 孙可欣,郑荣寿,顾秀瑛,等. 2000-2014年中国肿瘤登记地区女性乳腺癌发病趋势及年龄变化情况分析[J]. 中华预防医学杂志, 2018, 52(6): 567-572.

[3] 乔伟强,潘淋淋,寇长贵,等. 局部晚期乳腺癌新辅助化

疗病理完全缓解与预后相关性的 Meta 分析[J]. 中国老年学杂志, 2016, 36(16): 3982-3985.

[4] Sun Z, Liu J, Liu J. The expression of lncRNA-MALAT1 in breast cancer patients and its influences on prognosis[J]. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2020, 66(3):72-78.

[5] Jiang D, Wang C, He J. Long non-coding RNA DGCR5 induces tumorigenesis of triple-negative breast cancer by affecting Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. J BUON, 2020, 25(2):702-708.

[6] Lu C, Li HL, Zhang X, et al. Long non-coding RNA PCAT29 regulates the growth, migration and invasion of human triple-negative breast cancer cells[J]. J BUON, 2020, 25(2):621-626.

[7] 中国乳腺癌新辅助治疗专家组. 中国乳腺癌新辅助治疗专家共识(2019年版)[J]. 中国癌症杂志, 2019, 29(5): 390-400.

[8] Da CM, Gong CY, Nan W, et al. The role of long non-coding RNA MIAT in cancers[J]. Biomed Pharmacother, 2020, 11(129): 110359.

[9] Ashrafizadeh M, Zarrabi A, Hushmandi K, et al. PD-1/PD-L1 axis regulation in cancer therapy: The role of long non-coding RNAs and microRNAs[J]. Life Sci, 2020, 3(256): 117899.

[10] Wang HS, Zhang W, Zhu HL, et al. Long noncoding RNA SNHG6 mainly functions as a competing endogenous RNA in human tumors[J]. Cancer Cell Int, 2020, 6(20): 219.

[11] 许家瑞,胡剑,刘冬冬,等. 长链非编码RNA在乳腺癌中的研究进展[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2018, 10(1): 61-66.

[12] Lv Y, Li Y, Mu W, et al. Factors Affecting Pathological Complete Response After Neoadjuvant Chemotherapy in Operable Primary Breast Cancer[J]. J Coll Physicians Surg Pak, 2020, 30(4):389-393.

[13] Su H, Liu Y, Zhang C, et al. PRMT5 and FOXPI expression profile in invasive breast cancer patients undergoing neoadjuvant chemotherapy[J]. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2020, 66(2):142-145.

(上接第 1263 页)

[10] 饶茜. VWCE、DPT、SCUBE3 蛋白表达与乳腺癌临床预后的预测研究[D]. 2018:38-40.

[11] Wan LL, Liu Y, Liu LT, et al. Expression and function of VWCE gene in human breast cancer[J]. Tumour, 2017, 37(7):742-749.

[12] 薄秀梅,於露,贺玲. 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶突变体 MEKK3KI 的构建及功能鉴定[J]. 科学技术与工程,

2019, 19(17): 114-120.

[13] 张海丹,李培武,张玲. 五味子乙素通过调控 p38MAPK 信号通路对 IL-1 β 诱导的髓核细胞凋亡的影响[J]. 医学分子生物学杂志, 2019, 4(2): 119-124.

[14] 孙琳,李侠. 环境因素经 MAPK 信号通路介导细胞凋亡的研究进展[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2018, 36(10):796.

Hp感染对强直性脊柱炎患者 $\alpha 1$ -AG、CRP、ESR水平及胃肠道功能的影响

刘永华 季爱玉*

[摘要] 目的 探究幽门螺杆菌(Hp)感染对强直性脊柱炎(AS)患者 $\alpha 1$ 酸性糖蛋白($\alpha 1$ -AG)、C反应蛋白(CRP)、红细胞沉降率(ESR)水平及胃肠道功能的影响。方法 选取104例AS患者为研究对象,根据患者空腹 ^{14}C 尿素呼气试验分为Hp感染组59(56.73%)与非45(43.27%),并纳入32例同期健康体检者作为健康对照组。比较3组外周血 $\alpha 1$ -AG、CRP、ESR水平及胃肠道功能差异,使用受试者工作特征曲线(ROC曲线)评估AS患者外周血 $\alpha 1$ -AG、CRP、ESR水平及FDDQL评分对其Hp感染情况的诊断价值。结果 3组性别、年龄、吸烟史比较,差异均无统计学意义($P>0.05$);Hp感染组病程及强直性脊柱炎病情活动性指数(BASDAI)评分均高于非Hp感染组,差异有统计学意义($P<0.05$)。3组外周血 $\alpha 1$ -AG、CRP、ESR表达水平进行比较,结果均为Hp感染组>非Hp感染组>健康对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);AS患者FDDQL评分比较结果为Hp感染组<非Hp感染组<健康对照组($P<0.05$)。经ROC曲线分析,外周血 $\alpha 1$ -AG、CRP、ESR水平及FDDQL评分对AS患者Hp感染均有较高诊断价值($\text{AUC}=0.839、0.764、0.863、0.787, P<0.05$),其cut-off值分别为1992.105 mg/L、22.135 mg/L、21.825 mm/h、62.500分。结论 Hp感染能增加AS患者炎性水平,并降低胃肠道功能,影响外周血 $\alpha 1$ -AG、CRP、ESR水平和FDDQL评分,临床应予以重视。

[关键词] 强直性脊柱炎; Hp感染; $\alpha 1$ -AG; CRP; ESR; 消化不良

Effects of Hp infection on levels of $\alpha 1$ -AG, CRP and ESR and gastrointestinal function in patients with ankylosing spondylitis

LIU Yonghua, JI Aiyu*

(Department of Medicine, Qingdao University, Qingdao, Shandong, China, 266000)

[ABSTRACT] Objective To explore the Helicobacter pylori (Hp) infection on levels of $\alpha 1$ acid glycoprotein ($\alpha 1$ -AG), C-reactive protein (CRP) and erythrocyte sedimentation rate (ESR) and gastrointestinal function in patients with ankylosing spondylitis (AS). Methods A total of 104 AS patients were selected as the research subjects. According to the fasting ^{14}C urea breath test, the patients were divided into Hp infection group and non-Hp infection group, and another 32 healthy subjects for physical examination at the same time period were selected as the healthy control group. The levels of peripheral blood $\alpha 1$ -AG, CRP and ESR and gastrointestinal function [functional dyspepsia quality of life scale (FDDQL)] were compared among the three groups, and the receiver operating characteristic curve (ROC curve) was used to evaluate the diagnostic value of peripheral blood $\alpha 1$ -AG, CRP and ESR and FDDQL score on Hp infection. Results Among the 104 AS patients, 59 cases (56.73%) diagnosed with Hp infection were set as the Hp infection group, and 45 cases (43.27%) without Hp infection (43.27%) were included in the non-Hp infection group.

基金项目:山东省自然科学基金项目(ZR2017BH112)

作者单位:青岛大学医学部,山东,青岛266000

*通信作者:季爱玉, E-mail:ltkmmq@163.com

There were no significant differences in the gender, age and smoking history among the three groups ($P>0.05$). The course of disease and Bath ankylosing spondylitis disease activity index (BASDAI) score in the Hp infection group were higher than those in the non-Hp infection group ($P<0.05$). Comparison of levels of peripheral blood $\alpha 1$ -AG, CRP and ESR in the three groups all showed: Hp infection group $>$ non-Hp infection group $>$ healthy control group ($P<0.05$). FDDQL score comparison showed Hp infection group $<$ non-Hp infection group $<$ healthy control group ($P<0.05$). According to ROC curve analysis, Peripheral blood $\alpha 1$ -AG, CRP, ESR levels and FDDQL scores have high diagnostic value for Hp infection in AS patients (AUC=0.839, 0.764, 0.863, 0.787, $P<0.05$), and its cut-off value are 1992.105 mg/L, 22.135 mg/L, 21.825 mm/h and 62.500 points. **Conclusion** Hp infection can increase the inflammatory level and reduce the gastrointestinal function in patients with AS, and affect the levels of peripheral blood $\alpha 1$ -AG, CRP and ESR and FDDQL score. The clinic should pay attention to it.

[KEY WORDS] Ankylosing spondylitis; Hp infection; $\alpha 1$ -AG; CRP; ESR; Dyspepsia

强直性脊柱炎(Ankylosing spondylitis, AS)为一种慢性进展性风湿性疾病,好发于青年男性,可影响关节功能,最终造成患者劳动力丧失,严重危害青壮年生活质量^[1]。近年来,临床研究发现,幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)感染与风湿性疾病进程密切相关, Hp感染可激活B淋巴细胞活性,并引起慢性免疫炎症反应,加速AS等风湿性疾病发生发展^[2]。 $\alpha 1$ 酸性糖蛋白($\alpha 1$ acid glycoprotein, $\alpha 1$ -AG)、C反应蛋白(C-reactive protein, CRP)、红细胞沉降率(erythrocyte sedimentation rate, ESR)作为临床评估AS病情严重程度及进展的常用指标,具有客观、灵敏度高等优点^[3]。AS患者的胃肠道功能也是学术界关注的重点,长期服用非甾体类抗炎药对患者胃肠道的损害是AS患者消化不良的重要因素,而Hp感染又能加速胃肠道疾病进展,进一步影响患者胃肠道功能^[4]。基于此,本研究将探讨Hp感染是否能增加AS患者炎性水平,进而临床医生可以根据这些指标对AS患者疾病进程做出准确的诊断和治疗决策。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2017年4月至2019年4月本院104例AS患者为研究对象,根据患者空腹 ^{14}C 尿素呼气试验分为Hp感染组与非Hp感染组,其中确诊Hp感染59例(56.73%)为Hp感染组;无Hp感染45例(43.27%)为非Hp感染组,并纳入32例同期健康体检者作为健康对照组。

纳入标准:①符合美国风湿病学会2015年制定的AS诊断标准^[5];②类风湿因子及抗核抗体检测阴性;③年龄 ≥ 18 岁;④受教育程度为小学及以

上。排除标准:①合并肺结核、类风湿关节炎、炎症性肠炎、系统性红斑狼疮等疾病;②伴肝、肾、肺等器质性病变;③合并恶性肿瘤、脑血管疾病;④既往神经精神疾病。本研究受检者均签署知情同意书并经本院医学伦理委员会审批。

1.2 方法

所有AS患者在入院次日,行空腹 ^{14}C 尿素呼气试验,同时采集空腹外周静脉血,健康对照组则采集体检时空腹外周静脉血;采用免疫透射比浊法(试剂盒由北京北方生物技术研究所生产)检测血清 $\alpha 1$ -AG、CRP水平;使用全自动血沉仪(芬兰DRAGONMED)检测ESR水平。

1.3 观察指标

采用FDDQL量表^[6]评估受检者胃肠道功能,量表总分0~100分,分数越高,胃肠道功能越好。

1.4 统计学方法

应用SPSS 21.0软件进行统计学分析;计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用独立样本 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析;计数资料以 $n(\%)$ 表示,采用 χ^2 检验或Fisher精确检验;采用受试者工作特征曲线(ROC曲线)评估,计算曲线下面积(AUC);以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3组一般资料比较

3组性别、年龄、吸烟史比较,差异无统计学意义($P>0.05$);Hp感染组病程及Bath强直性脊柱炎病情活动性指数(Bath ankylosing spondylitis disease activity index, BASDAI)评分均高于非Hp感染组($P<0.05$)。见表1。

表1 3组一般资料比较 [n(%), ($\bar{x}\pm s$)]

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

组别	n	性别		年龄 (岁)	吸烟史	病程 (年)	BASDAI 评分 (分)
		男	女				
Hp 感染组	59	39(66.10)	20(33.90)	37.45±10.36	32(54.24)	7.21±1.05	4.58±0.72
非 Hp 感染组	45	29(64.44)	16(35.56)	36.49±9.78	23(51.11)	6.59±1.12	3.34±0.56
健康对照组	32	17(53.13)	15(46.87)	38.22±10.25	14(43.75)	-	-
$\chi^2/F/t$ 值		1.599		2.785	0.917	2.899	9.554
P 值		0.450		0.063	0.632	0.005	<0.001

2.2 3组外周血 $\alpha 1$ -AG、CRP、ESR 水平及 FDDQL 评分比较

3组外周血 $\alpha 1$ -AG、CRP、ESR 水平比较结果, Hp 感染组>非 Hp 感染组>健康对照组差异具有统

计学意义 ($P<0.05$); FDDQL 评分比较结果: Hp 感染组<非 Hp 感染组<健康对照组, 差异具有统计学意义 ($P<0.05$); 见表 2。

表2 3组外周血 $\alpha 1$ -AG、CRP、ESR 水平及 FDDQL 评分比较 ($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Comparison of $\alpha 1$ -AG, CRP, ESR and FDDQL scores in peripheral blood of the 3 groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	$\alpha 1$ -AG(mg/L)	CRP(mg/L)	ESR(mm/h)	FDDQL 评分(分)
Hp 感染组	59	2016.38±515.20	23.82±6.77	24.81±6.09	59.34±11.71
非 Hp 感染组	45	1358.43±467.46	18.40±3.49	16.98±3.68	70.13±6.80
健康对照组	32	502.14±105.39	7.05±0.92*	8.11±1.35	96.58±2.05
F 值		78.511	52.289	49.367	68.263
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

2.3 外周血 $\alpha 1$ -AG、CRP、ESR 水平及 FDDQL 评分对 AS 患者 Hp 感染情况的诊断价值分析

经 ROC 曲线分析, 发现外周血 $\alpha 1$ -AG、CRP、ESR 水平及 FDDQL 评分对 AS 患者 Hp 感染均有较高诊断价值 (AUC=0.839、0.764、0.863、0.787, $P<0.05$), 其 cut-off 值分别为 1992.105 mg/L、22.135 mg/L、21.825 mm/h、62.500 分, 见图 1。

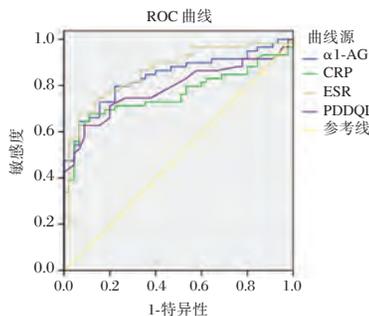


图1 外周血 $\alpha 1$ -AG、CRP、ESR 水平及 FDDQL 评分对 AS 患者 Hp 感染情况的诊断价值分析

Figure 1 Analysis of the diagnostic value of peripheral blood $\alpha 1$ -AG, CRP, ESR and FDDQL score for HP infection in AS patients

3 讨论

AS 病因尚未阐明, 但病情呈进行性发展, 活

动期 AS 病情发展迅速, 故控制炎症、延缓病情进展对 AS 预后非常重要^[7]。 $\alpha 1$ -AG、CRP 均为急性时相反应物, 在反映炎性水平方面具有较高敏感性, 也常用于评估 AS 病情严重程度及进展^[8]。ESR 也是一种评估炎症反应的常用指标, 炎症反应增强时, 血液中急性时相反应物分泌增加, 造成 ESR 水平升高^[9]。故外周血 $\alpha 1$ -AG、CRP、ESR 水平与 AS 病情发展密切相关。AS 作为一种系统性疾病, 发病后消化系统也易出现病理性变化, 且受服用抗风湿药物等胃肠道刺激性药物的影响, 患者常伴不同程度胃肠道功能损伤^[10]。对此, 本研究就 Hp 感染对 AS 患者外周血 $\alpha 1$ -AG、CRP、ESR 水平及胃肠道功能的影响展开分析, 以评估 Hp 感染对 AS 病情进展的影响, 取得一定成果。

既往研究报道^[11], AS 患者 Hp 感染率可达 58.14%。这也说明, Hp 感染在 AS 患者中仍较为常见。另外, $\alpha 1$ -AG 及 CRP 作为急性时相反应物, ESR 作为红细胞间聚集性指标, 均能反映机体炎性水平^[12]。本研究结果提示, AS 患者合并 Hp 感染者炎性水平最高。考虑该结果与 Hp 持续感染不仅形成慢性炎症反应, 还损伤内皮细胞, 造成炎性水平进一步升高有关^[13]。近年, 有学者指出^[14], CRP 等炎症指标虽然能辅助评估风湿性疾病炎症程度, 但

在评估疾病活动性方面存在缺陷。也有学者提出^[15], CRP、ESR 等指标对 AS 活动性诊断价值不高。故本研究以 BASDAI 评分评估患者疾病活动度, 以保证结果更为准确, 也提示, Hp 感染不仅与 AS 患者炎症反应相关, 还与疾病活动度有关, 参与病情进程。

据文献报道^[16], AS 患者中伴明显炎症性肠病者占 10%, 并发末端回肠炎者可达 70%, 且在基因免疫学角度上, AS 与克罗恩病存在一定联系。故 AS 患者胃肠道功能也受到学术界广泛关注。而 Hp 感染与胃排空障碍有关, 影响患者消化功能, 还与消化性溃疡、活动性胃炎等胃肠道疾病密切相关^[17]。因此, 及时检测 AS 患者 Hp 感染情况, 并及时予以治疗, 对患者生存质量非常重要。

除上述结论外, 本研究还发现, 外周血 $\alpha 1$ -AG、CRP、ESR 水平及 FDDQL 评分对 AS 患者 Hp 感染均有较高诊断价值。也证实, AS 患者外周血 $\alpha 1$ -AG、CRP、ESR 水平、胃肠道功能与 Hp 感染显著相关。因此, 对于外周血 $\alpha 1$ -AG、CRP、ESR 水平较高、胃肠道功能较差的 AS 患者, 临床经及时予以空腹 ¹⁴C 尿素呼气检测, 明确 Hp 感染情况, 并尽早调整治疗方案, 改善患者生活质量。但本研究纳入样本量较小, 为保证本结果的科学性与严谨性, 还需后续大样本量的前瞻性研究进一步验证。

综上所述, Hp 感染能影响 AS 患者外周血 $\alpha 1$ -AG、CRP、ESR 水平及胃肠道功能, 临床应积极监测 AS 患者 Hp 感染状况, 并及时予以治疗, 以改善 AS 生存质量。

参考文献

[1] 白世杰, 托娅, 张保平, 等. 强直性脊柱炎及其相关基因 HLA-B27 检测的研究现状[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2016, 8(3):206-211.

[2] Wen C, Zheng Z, Shao T, et al. Quantitative metagenomics reveals unique gut microbiome biomarkers in ankylosing spondylitis[J]. Genome Biol, 2017, 18(1):142-154.

[3] 杨继红, 曾文, 王俊. 艾瑞昔布和塞来昔布对强直性脊柱炎患者血清 VEGF、BMP-2、ESR、CRP 及相关功能指标的影响[J]. 医学分子生物学杂志, 2018, 15(4):232-235, 241.

[4] Zhu X, Liu F. Probiotics as an adjuvant treatment in Helicobacter pylori eradication therapy: Probiotics in H.pylori eradication[J]. J Dig Dis, 2017, 18(4):195-202.

[5] Ward MM, Deodhar A, Akl EA, et al. American College of Rheumatology/Spondylitis Association of America/Spondyloarthritis Research and Treatment Network 2015 Recommendations for the Treatment of Ankylosing Spondylitis and Nonradiographic Axial Spondyloarthritis [J]. Arthritis Rheumatol, 2016, 68(2):282-298.

[6] 梁美均, 余世锋, 谭梅傲, 等. 疏肝和胃方治疗肝胃不和型功能性消化不良的临床研究[J]. 广州中医药大学学报, 2019, 36(8):1121-1126.

[7] Hebeisen M, Neuenschwander R, Scherer A, et al. Response to Tumor Necrosis Factor Inhibition in Male and Female Patients with Ankylosing Spondylitis: Data from a Swiss Cohort [J]. J of Rheumatol, 2018, 45(3):506-512.

[8] 刘大栋. 强直性脊柱炎患者血清 DKK-1、VEGF-A、IL-17 水平变化及其临床意义[J]. 中国骨质疏松杂志, 2019, 25(7):980-982, 1014.

[9] Yang Z, Zhang Z, Lin F, et al. Comparisons of neutrophil monocyte eosinophil and basophilymphocyte ratios among various systemic autoimmune rheumatic diseases [J]. Apmis, 2017, 125(10):863-871.

[10] Chen HH, Chen DY, Chen YM, et al. Health-related quality of life and utility: comparison of ankylosing spondylitis, rheumatoid arthritis, and systemic lupus erythematosus patients in Taiwan [J]. Clin Rheumatol, 2017, 36(1):133-142.

[11] 柳贵梅, 周雪莲, 赵巧凤, 等. 幽门螺杆菌感染与风湿性疾病的关系初探[J]. 内科急危重症杂志, 2015, 21(4):304, 311.

[12] Schmitz EMH, Boekema PJ, Straathof JWA, et al. Switching from infliximab innovator to biosimilar in patients with inflammatory bowel disease: a 12-month multicentre observational prospective cohort study [J]. Aliment Pharmacol Ther, 2018, 47(3):356-363.

[13] Link A, Langner C, Schirrmeister W, et al. Helicobacter pylori vacA genotype is a predominant determinant of immune response to Helicobacter pylori CagA [J]. World J Gastroenterol, 2017, 23(26):4712-4723.

[14] Moerman RV, Arends S, Meiners PM, et al. Detailed Analysis of the Articular Domain in Patients with Primary Sjögren Syndrome [J]. J Rheumatol, 2017, 44(3):292-296.

[15] Ng ALK, Choy BNK, Chan TCY, et al. Comparison of Tear Osmolarity in Rheumatoid Arthritis Patients With and Without Secondary Sjogren Syndrome [J]. Cornea, 2017, 36(7):805-809.

[16] Jang AR, Jang KS. Structural Equation Modeling on Health-related Quality of Life of Patients with Ankylosing Spondylitis [J]. Iran J Public Health, 2017, 46(10):1338-1346.

[17] 叶剑芳, 洪军波, 胡奕, 等. 幽门螺杆菌感染的复发及其影响因素 [J]. 中华内科杂志, 2018, 57(3):223-225.

FDC联合左氧氟沙星治疗复治涂阳肺结核的疗效分析

魏华生* 潘虹池 冉梅 王平飞

[摘要] **目的** 探讨固定剂量复合制剂(FDC)联合左氧氟沙星治疗复治涂阳肺结核的疗效。**方法** 选取2018年9月至2019年9月本院收治的74例复治涂阳肺结核患者作为研究对象,按照随机数字表法分为观察组($n=37$)和对照组($n=37$),对照组使用FDC治疗,观察组采用FDC联合左氧氟沙星治疗。比较两组痰菌阴转率、病灶吸收率、治疗前后血清白蛋白/球蛋白(A/G)比值、白细胞介素-10(IL-10)、白细胞介素-18(IL-18)、免疫功能、不良反应发生率。**结果** 观察组痰菌阴转率、病灶吸收率分别为81.08%、86.49%,均高于对照组的59.46%、64.86%,差异具有统计学意义($P<0.05$);观察组治疗后血清蛋白A/G比值高于对照组,IL-10、IL-18水平均低于对照组,差异均具有统计学意义($P<0.05$);观察组治疗后 CD_4^+ 、 CD_8^+ 、 CD_4^+/CD_8^+ 均高于对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$);两组不良发应发生率的比较差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** FDC联合左氧氟沙星能够提升痰菌阴转率、病灶吸收率,改善血清蛋白A/G比值、IL-10、IL-18水平,调节免疫功能。

[关键词] 左氧氟沙星;复治涂阳肺结核;固定复合制剂;免疫功能;血清蛋白

Curative effect of FDC combined with levofloxacin on re-treatment smear-positive tuberculosis

WEI Huasheng*, PAN Hongchi, RAN Mei, WANG Pingfei

(Department of Respiratory Medicine, Dazhou Central Hospital, Dazhou, Sichuan, China, 635000)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the curative effect of fixed-dose combination (FDC) combined with levofloxacin on re-treatment smear-positive tuberculosis. **Methods** Seventy-four patients with re-treatment smear-positive tuberculosis who were admitted to the hospital from September 2018 to September 2019 were enrolled as the research objects. They were divided into the observation group ($n=37$) and the control group ($n=37$) by random number table method. The control group was treated with FDC, while the observation group was treated with FDC and levofloxacin. The negative conversion rate of sputum bacteria, absorption rate of lesions, serum albumin/globulin (A/G), interleukin-10 (IL-10) and interleukin-18 (IL-18) before and after treatment, immune function and incidence of adverse reactions were compared between the two groups. **Results** The negative conversion rate of sputum bacteria and absorption rate of lesions in the observation group were 81.08% and 86.49%, higher than those in the control group (59.46%, 64.86%), the differences were statistically significant ($P<0.05$). After treatment, serum A/G in the observation group was higher than that in the control group, while the levels of IL-10 and IL-18 were lower than those in the control group, the differences were statistically significant ($P<0.05$). After treatment, CD_4^+ , CD_8^+ and CD_4^+/CD_8^+ in the observation group were all higher than those in the control group, the differences were statistically significant ($P<0.05$). There was no significant difference in the incidence of adverse reactions between the two groups ($P>0.05$). **Conclusion** FDC combined with levofloxacin can increase negative conversion rate of sputum bacteria and absorption rate of lesions, improve levels of serum A/G, IL-10 and IL-18, and regulate immune function.

[KEY WORDS] Levofloxacin; Re-treatment smear-positive tuberculosis; Fixed-dose combination; Immune function; Serum protein

基金项目:四川省卫生厅科学研究项目(190428)

作者单位:达州市中心医院呼吸内科,四川,达州 635000

*通信作者:魏华生, E-mail:jinmouna6854@163.com

复治涂阳肺结核是临床常见的肺结核疾病,细菌感染是发病的重要原因,结核分枝杆菌是主要的感染病菌^[1]。复治涂阳肺结核患者存在不同程度的免疫力降低及免疫应答紊乱,严重危害患者的身体健康^[2]。固定剂量复合制剂(fixed-dose combination, FDC)是治疗复治涂阳肺结核的常用方案,但治疗效果不理想^[3]。临床研究发现,FDC联合左氧氟沙星治疗复治涂阳肺结核具有较高的治疗效果^[4]。因此,本研究探讨FDC联合左氧氟沙星对复治涂阳肺结核患者血清白蛋白/球蛋白(serum albumin/globulin, A/G)比值、白细胞介素-10

(interleukin-10, IL-10)和白细胞介素-18(interleukin-18, IL-18)水平的影响,现将结果报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2018年9月至2019年9月本院收治的74例复治涂阳肺结核患者作为研究对象。所有患者按照随机数字表法分为观察组($n=37$)和对照组($n=37$),两组一般资料比较差异无统计学意义($P>0.05$),见表1。本研究获得本院医学伦理委员会批准。

表1 两组一般资料的比较($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Comparison of eneral data between the two groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	性别(例)		年龄(岁)	体质量指数(kg/m ²)	病程(年)	伴空洞数(个)	并发症(例)	
		男	女					有	无
观察组	37	20	17	46.85±6.41	23.16±2.87	4.37±1.02	2.04±0.31	15	22
对照组	37	22	15	47.16±6.79	23.54±2.34	4.02±1.18	2.12±0.36	18	19
t/ χ^2 值		0.220		0.202	0.624	1.365	1.025	1.295	
P值		0.639		0.841	0.535	0.177	0.309	0.255	

纳入标准:①符合《WS 196-2017 结核病分类》卫生行业标准^[5];②初治失败;③不规律化疗时间>1个月;④规则用药满疗程后痰菌又复阳;⑤经影像学检查确诊;⑥3个月内未接受免疫调节剂治疗;⑦药敏实验证明对左氧氟沙星不耐药;⑧患者签署知情同意书。排除标准:①对本研究药物过敏者;②合并矽肺、支气管结核、结核性胸膜炎及其他肺外结核者;③合并肾肝功能障碍、胃肠道疾病者;④合并精神、认知功能损伤者;⑤临床资料不全者。

1.2 方法

对照组采用FDC治疗:使用2HRZE/4HRE(H:异烟肼,R:利福平,Z:吡嗪酰胺,E:乙胺丁醇)常规治疗方案,2个月强化期使用异烟肼、利福平、吡嗪酰胺、乙胺丁醇治疗,4个月巩固期使用异烟肼、利福平、乙胺丁醇治疗。其中,异烟肼(生产公司:永康药业有限公司,国药准字H11020585),0.3 g/d;利福平(生产公司:湖南九典制药股份有限公司,国药准字H43020915),0.45 g/d;吡嗪酰胺(生产公司:河南省福林制药厂,国药准字H41022614),1.5 g/d;乙胺丁醇(生产公司:湖南景民制药有限公司,国药准字H43022180),0.75 g/d。观察组在此基础上联合左氧氟沙星治疗:使用2HRZEV/4HREV方案,2个月强化期使用异烟肼、利福平、吡嗪酰胺、乙胺丁醇、左氧氟沙星治疗,4个月巩固期使用异

烟肼、利福平、乙胺丁醇、左氧氟沙星治疗,左氧氟沙星(生产公司:福建省三爱药业股份有限公司,H20113333),0.2 g/d。

1.3 观察指标

①在治疗后6个月对患者进行痰菌涂片和影像学检查,计算痰菌阴转率、病灶吸收率。判定标准^[6]:痰菌阴转;病灶吸收率。病灶吸收率=(吸收+明显吸收)/总例数×100%。②两组治疗前后血清蛋白A/G、IL-10、IL-18的比较;③两组治疗前后免疫功能的比较;④两组不良反应发生率的比较。

1.4 统计学方法

应用SPSS 21.0软件进行数据分析。计数资料用 $n(\%)$ 表示,组间比较采用 χ^2 检验;计量资料采用($\bar{x}\pm s$)表示,两组间比较采用 t 检验组内采用SNK-q检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组痰菌阴转率、病灶吸收率的比较

观察组痰菌阴转率、病灶吸收率均高于对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。见表2。

2.2 两组治疗前后血清蛋白A/G、IL-10、IL-18的比较

两组治疗后血清蛋白A/G较治疗前升高,且观察组高于对照组,差异有统计学意义($P<$

表2 两组痰菌阴转率、病灶吸收率的比较 [n(%)]

Table 2 Comparison on negative conversion rate of sputum bacteria and absorption rate of lesions between the two groups [n(%)]

组别	n	痰菌阴转率	病灶吸收率
观察组	37	30(81.08)	32(86.49)
对照组	37	22(59.46)	24(64.86)
χ^2 值		4.140	4.698
P值		0.042	0.030

0.05)。两组治疗后 IL-10、IL-18 水平较干预前均降低,且观察组低于对照组,差异有统计学意义 ($P<0.05$)。见表3。

2.3 两组治疗前后免疫功能的比较

两组治疗前 CD_4^+ 、 CD_8^+ 、 CD_4^+/CD_8^+ 比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。两组治疗后 CD_4^+ 、 CD_8^+ 、 CD_4^+/CD_8^+ 较治疗前均升高,且观察组高于对照组,差异均具有统计学意义 ($P<0.05$)。见表4。

表3 两组治疗前后血清蛋白 A/G、IL-10、IL-18 的比较 ($\bar{x}\pm s$)

Table 3 Comparison of serum A/G, IL-10 and IL-18 between the two groups before and after treatment ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	血清蛋白 A/G		IL-10(ng/mL)		IL-18(ng/mL)	
		治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
观察组	37	1.09±0.31	1.34±0.18 ^a	34.52±4.16	16.96±3.04 ^a	274.85±21.87	102.63±17.45 ^a
对照组	37	1.11±0.35	1.22±0.21 ^a	34.01±4.38	23.35±3.87 ^a	271.49±23.98	184.85±21.68 ^a
t值		0.260	2.639	0.514	7.898	0.630	17.971
P值		0.796	0.010	0.609	0.000	0.531	0.000

注:与同组治疗前比较,^a $P<0.05$ 。

表4 两组治疗前后免疫功能的比较 ($\bar{x}\pm s$)

Table 4 Comparison of immune function between the two groups before and after treatment ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	CD_4^+ (%)		CD_8^+ (%)		CD_4^+/CD_8^+	
		治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
观察组	37	402.63±63.59	689.21±72.95 ^a	286.52±27.84	398.85±34.21 ^a	1.42±0.32	1.75±0.27 ^a
对照组	37	406.89±61.34	593.47±66.49 ^a	284.92±28.37	367.51±31.52 ^a	1.44±0.35	1.59±0.29 ^a
t值		0.293	5.900	0.245	4.098	0.257	2.456
P值		0.770	0.000	0.807	0.000	0.798	0.017

注:与同组治疗前比较,^a $P<0.05$ 。

2.4 两组不良反应发生率的比较

两组皮疹、肠道不适、头晕、肝功能异常、恶心

不良发生率,比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

见表5。

表5 两组不良反应发生率的比较 [n(%)]

Table 5 Comparison on incidence of adverse reactions between the 2 groups [n(%)]

组别	n	皮疹	肠道不适	头晕	肝功能异常	恶心	合计
观察组	37	2(5.41)	4(10.81)	1(2.70)	3(8.11)	1(2.70)	11(29.73)
对照组	37	1(2.70)	2(5.41)	2(5.41)	1(2.70)	2(5.41)	8(21.62)
χ^2 值							0.637
P值							0.425

3 讨论

肺结核是感染结核分枝杆菌所致的消耗性传染病^[7]。复治涂阳肺结核具有传染性强、病程迁延等特点,其发生会影响机体其他器官,对患者健康造成严重威胁^[8]。复治涂阳肺结核患者存在潜在的耐药风险,是重要的传染源^[9]。现阶段临床治疗复治涂阳肺结核常使用吡嗪酰胺、乙胺丁醇、利

福平、异烟肼等进行治疗,但临床疗效并未达到预期^[10]。因此,采取有效的方案治疗复治涂阳肺结核对肺结核的防治有着重要的临床价值。

左氧氟沙星是氧氟沙星的光学异构体,具有半衰期长、吸收快、组织穿透性强、血药浓度高等特点,其抗菌活性是氧氟沙星的两倍,是临床常用的氟喹诺酮类抗生素^[11]。临床研究发现,左氧氟沙星可以能够抑制结核分枝杆菌旋转酶的活性,

有效阻断结核分枝杆菌的增殖,清除肺部结核分枝杆菌,发挥灭菌作用^[12]。褚天奎等^[13]研究发现,左氧氟沙星可以改善复治肺结核患者病情,提高病灶吸收率及痰菌转阴率,具有良好的临床疗效。本研究中结果提示 FDC 联合左氧氟沙星治疗能够提升痰菌阴转率、病灶吸收率,具有良好的临床疗效。分析原因为,左氧氟沙星联合 FDC 治疗不仅无交叉耐药性,而且能发挥协同作用,左氧氟沙星与结核杆菌胞壁中的蛋白结合,导致核杆菌局部细胞壁结构发生改变,有利于 FDC 穿透,发挥作用。此外,血浆蛋白和左氧氟沙星的结合率偏低,使左氧氟沙星具有较强的穿透性,可以渗入细胞内,在机体组织中广泛存在,进而发挥灭杀结核杆菌的作用^[14]。

血清蛋白 A/G 值是血清白蛋白与球蛋白的比值,白蛋白与炎症反应相关,白蛋白的合成在机体相关炎症细胞的作用下受到抑制,导致水平下降。临床研究发现,肺结核患者球蛋白水平随病情好转而逐渐升高^[15]。国内外研究报道,正常状态下,机体 Th1/Th2 保持动态平衡,机体感染结核分枝杆菌后,动态平衡被打破^[16]。Th1 细胞在结核菌的作用下会释放大促炎因子 IL-18,使血清 IL-18 水平异常升高,Th2 细胞也会失偿性释放 IL-10,反馈提升 IL-18 水平,进而加重肺部炎症反应。陈岚兰等^[17]研究发现,左氧氟沙星能调节肺结核患者的炎症因子表达,促进 Th1/Th2 恢复动态平衡。本研究结果与上述研究结果一致,表明 FDC 联合左氧氟沙星能够调节血清 A/G、IL-10、IL-18 的表达,改善机体炎症反应。可能原因为在左氧氟沙星的作用下,结核分支杆菌的增殖过程受到抑制,使机体炎症反应得到缓解,白蛋白水平升高,血清 A/G 值逐渐升高;促炎因子 IL-18 水平逐渐下降,为了确保机体 Th1/Th2 的动态平衡,抑炎因子 IL-10 水平也开始降低。

综上所述,在复治涂阳肺结核的治疗中,FDC 联合左氧氟沙星能够提升痰菌阴转率、病灶吸收率,改善炎症反应,调节免疫功能。

参考文献

[1] 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.

[2] 罗瑾,张杰. 强化营养支持辅助胸腺五肽治疗复治涂阳重症肺结核患者的近期疗效和对炎性细胞因子及免疫功能的影响[J]. 临床和实验医学杂志, 2019, 18(23): 2524-2527.

[3] 秦绚,陈春红. 胸腺五肽注射液联合 3DTZE/9DTZ 方案对复治涂阳肺结核患者症状改善及血清 T 细胞亚群水平的影响[J]. 中国药物与临床, 2019, 19(9): 1488-1490.

[4] 高伟. 左氧氟沙星治疗复治涂阳肺结核患者的临床疗效和安全性评价[J]. 中国地方病防治杂志, 2019, 34(6): 704-706.

[5] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. WS 196-2017 结核病分类[EB/OL]. 2017-11-09.

[6] 杨才勇,李奎,江自成,等. 胸腺五肽联合抗结核药治疗复治涂阳肺结核疗效观察[J]. 海南医学, 2019, 30(19): 2539-2541.

[7] Dangisso MH, Woldeesemayat EM, Datiko DG, et al. Long-term outcome of smear-positive tuberculosis patients after initiation and completion of treatment: A ten-year retrospective cohort study[J]. Plos One, 2018, 13(4): e0196432.

[8] 丁月荷,李秀萍,王家红. 卷曲霉素联合左氧氟沙星治疗复治涂阳肺结核的疗效分析[J]. 临床和实验医学杂志, 2018, 17(17): 1875-1878.

[9] 王晓英,刘洁,余锋平,等. 重庆市复治涂阳肺结核患者耐药分析[J]. 中国热带医学, 2018, 18(6): 572-575.

[10] 邱磊,张少言,郭晓燕,等. 化疗方案加苄星丹片治疗复治涂阳肺结核患者的临床价值[J]. 中国防痨杂志, 2020, 42(2): 108-114.

[11] 张萌涛,许优,马进宝. 利奈唑胺联合环丝氨酸胶囊和左氧氟沙星治疗耐药肺结核的疗效及机制分析[J]. 河北医学, 2018, 24(8): 1304-1307.

[12] Garcia-Prats AJ, Draper HR, Finlayson H, et al. Clinical and cardiac safety of long-term levofloxacin in children treated for multidrug-resistant tuberculosis [J]. Clin Infect Dis, 2018, 67(11): 1777-1780.

[13] 褚天奎,姚鸿娟,芮美玲. 含左氧氟沙星化疗方案治疗复治痰涂片阳性肺结核的临床价值[J]. 检验医学与临床, 2019, 16(10): 1425-1427.

[14] Li HC, Guo HX, Chen T, et al. Potential genes related to levofloxacin resistance in mycobacterium tuberculosis based on transcriptome and methylome overlap analysis[J]. J Mol Evolution, 2020, 88(2): 202-209.

[15] 李生平,周业江. 手术前后白蛋白与球蛋白比值变化对结肠癌预后的评估价值[J]. 实用医学杂志, 2019, 35(5): 783-788.

[16] 叶静,吴琦,杜钟珍,等. 耐多药结核患者外周血 Th1、Th2、Th17 细胞及其细胞因子水平变化[J]. 山东医药, 2019, 59(26): 76-78.

[17] 陈岚兰,庄其宏. 左氧氟沙星对老年肺结核患者血清 IL-6 及 IFN- γ 水平的影响[J]. 中国生化药物杂志, 2016, 36(11): 91-93, 97.

恶性肿瘤中 *Hedgehog* 信号通路的表观遗传调控研究进展

高倩雯 刘陶文*

[摘要] *Hedgehog* (HH) 信号通路是促进胚胎分化、系统发育和组织调控的重要信号传导系统, 突变、非经典转录调控及表观遗传变化可引起该通路的异常激活。已证实, 该通路异常激活可导致发育障碍及各种恶性肿瘤。目前认为, 该通路对发育和某些恶性肿瘤(如基底细胞癌、髓母细胞瘤及横纹肌肉瘤等)的发生及进展发挥着不可替代的作用。鉴于 HH 通路成员的表观遗传异常在恶性肿瘤发病机制的特殊性及其可作为某些恶性肿瘤(如白血病、胃癌)潜在的治疗靶点, 其已成为 HH 通路的研究热点。为对恶性肿瘤发病机制及潜在治疗靶点提供新的认识, 本文综述了 HH 信号通路成员的表观遗传异常及其对恶性肿瘤发生调控方面的研究进展。

[关键词] *Hedgehog* 信号通路; 肿瘤; 甲基化; 表观遗传

Progress of research on epigenetic regulation of *Hedgehog* signaling pathway in malignant tumors

GAO Qianwen, LIU Taowen*

(Institute of Oncology, Department of Oncology, Nanxishan Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Affiliated Nanxishan Hospital of Guilin Medical University, Guilin, Guangxi, China, 541002)

[ABSTRACT] The *Hedgehog* (HH) signaling pathway is a vital signaling system that promotes embryonic differentiation, phylogeny, and tissue regulation. Mutations, non - canonical transcriptional regulation, and epigenetic changes can cause aberrant activation of this pathway. It has been confirmed that abnormal activation of this pathway can lead to developmental disorders and various malignant tumors. This pathway plays an irreplaceable role in the development, occurrence and progression of certain malignant tumors, such as basal cell carcinoma, medulloblastoma, and rhabdomyosarcoma. Considering the particularity of the mechanism of the epigenetic abnormality of HH pathway members, and the potential for therapeutic targets, in certain malignant tumors, such as leukemia and gastric cancer, the HH pathway has become an important research topic. In order to provide a new understanding of the pathogenesis of malignant tumors and potential therapeutic targets, this article reviews the epigenetic abnormalities of members of the HH signaling pathway and the research progress in the regulation of malignant tumors.

[KEY WORDS] *Hedgehog* signaling pathway; tumor; methylation; epigenetic

Hedgehog (HH) 信号通路是调控胚胎分化、系统发育和组织塑形的重要信号传导系统。该信号通路成员众多, 包含正、负反馈调节环, 主要由 HH

配体(含 *SHH*、*DHH* 及 *IHH* 等三种同源物)、跨膜受体 *Patched* (*PTCH*, 含 *PTCH1* 和 *PTCH2* 等两种同源物) 及 *Smoothed* (*SMO*)、神经胶质瘤相关癌

基金项目: 广西医疗卫生适宜技术与开发项目(S201507、S201608-01 及 S2018057)

作者单位: 广西壮族自治区南溪山医院/桂林医学院附属南溪山医院肿瘤科、肿瘤研究所, 广西, 桂林 541002

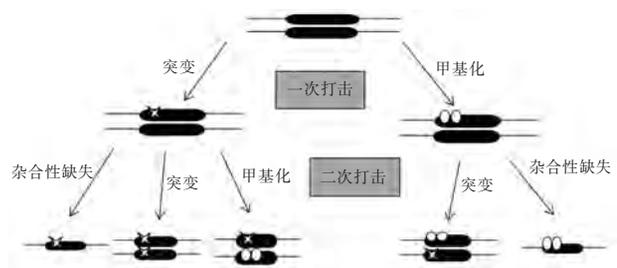
*通信作者: 刘陶文, E-mail: liu80838689@126.com

基因(*Glioma-associated oncogene, GLI*)家族转录因子(含 *GLI1*、*GLI2* 及 *GLI3* 等三种同源物)及有关调控分子组成。缺乏 *HH* 配体时, *PTCH* 通过抑制 *SMO* 活性而阻遏 *HH* 信号通路;存在 *HH* 配体时,该配体通过结合 *PTCH* 而解除 *PTCH* 对 *SMO* 的抑制,启动 *HH* 信号通路,继而激活下游转录因子 *GLI* 对靶基因的转录。*PTCH* 或 *SMO* 等基因的突变、非经典转录调控及表观遗传变化均可引起该通路的异常激活^[1-2],此对恶性肿瘤的发生发展和发育发挥着不可替代的作用。近年,针对阻断 *HH* 通路治疗 *HH* 配体驱动的恶性肿瘤已成为分子靶向治疗研究的热点之一。该通路的分子成员 *SMO* 及 *GLI* 可作为有效治疗恶性肿瘤的靶点,对某些肿瘤的治疗已获得突破^[3-4]。然而,该治疗方法最终会发生对 *HH* 通路靶向药物的耐受^[5]。新近,引发 *HH* 通路异常激活的表观遗传因素已成为该通路新的研究焦点^[6],可为该通路提供新的更有效的治疗靶点^[7]。本文拟就恶性肿瘤中 *HH* 信号通路的表观遗传学研究进展作一综述。

1 *HH* 信号通路的表观遗传学机制

表观遗传学是通过 DNA 序列变化以外(不改变 DNA 序列)的方式调节基因表达,可影响 DNA 甲基化模式和修饰不同胚胎阶段的组蛋白密码的转录-表观遗传调控机制,并介导细胞内多种信号通路如 *HH* 途径的调控,此对机体发育不可或缺,并涉及恶性肿瘤的发生发展。目前认为存在三种不同的表观遗传学机制,即 DNA 甲基化、组蛋白修饰和不同长度的非编码 RNA(*noncoding strands of RNA, ncR*)如微小 RNA(*micro-RNA, miRNA* 或 *miR*)和长非编码 RNA(*long non-coding RNA, LnRNA*)的干扰^[8]。

已知 *HH* 通路和人类疾病关联的分子基础包括基因突变、杂合性缺失、启动子超甲基化和 Knudson 的基因双击理论(学说)^[9](图 1)。启动子超甲基化可以代表第一次或第二次打击,其中以一系列 *PTCH1* 改变谱为代表^[10]。当此打击并存有基因点突变或因功能性等位基因缺失而丧失杂合体等情况,则可导致肿瘤发生。然而,甲基化缺失(低甲基化)可以激活正常沉默的基因组区域,这些区域包含沉默基因、插入的病毒基因或重复和逆转座子元件,这些沉默基因的异常表达可导致恶性肿瘤。在基因区域以外的甲基化缺失则可影响恶性肿瘤的染色体稳定性^[11],并可激活癌基因。



注: X、OO 分别表示一对同源染色体上相同基因座位的两个等位基因中的一个发生突变或甲基化。在受到第一次打击时,两个等位基因之一发生突变或甲基化。而第二次打击导致两个等位基因的另一基因发生突变、甲基化或杂合性缺失。

图 1 Knudson 提出的灭活肿瘤抑制因子的两次打击模型^[6]
Figure 1 Knudson's two hit model for inactivation of tumor suppressors^[6]

2 *HH* 通路成员的表现遗传学改变

通常情况下, *HH* 信号通路在机体发育成熟后处于失活状态^[12-13]。但通路成员的突变或错误表达可引起该通路异常激活,导致多种肿瘤的发生发展^[2-4]。*HH* 通路的表现遗传学改变主要发生在细胞外(*HH*、*PTCH*)、细胞内分子(*SMO*、*GLI*)及其靶基因。

2.1 *HH* 配体

HH 配体以前体方式在内质网产生。在内质网内部, *HH* 配体前体蛋白经自身蛋白酶裂解,通过胆固醇基团和棕榈酸酯基团修饰,被转运到质膜。在跨膜蛋白 *Dispatched/Scube (DISP/SCUBE)* 的帮助下, *HH* 配体可以作为单体分泌及通过外泌体形式释放^[14]。

肺癌、消化道癌症、前列腺癌、胶质瘤及恶性黑色素瘤等多种肿瘤的发生是由于 *HH* 配体异常产生导致^[2]。*HH* 配体可以作用于肿瘤(胃癌)细胞本身(自分泌信号传导)或肿瘤(胰腺癌)细胞周围的非转化细胞(旁分泌信号传导),这取决于恶性肿瘤的类型^[15]。

虽然这些研究证明配体依赖性致癌信号的存在,但对驱动配体产生的表观遗传因素的研究却甚少。已知,活化的核因子- κ B(*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, NF- κ B*)可以驱动主要的 *HH* 旁系同源 *Sonic Hedgehog (SHH)* 表达^[16],胃癌和基底细胞癌中 *SHH* 表达上调与含有 *NF- κ B* 结合位点的 *SHH* 启动子区低甲基化有关。*SHH* 低度甲基化可能对 *NF- κ B* 具有更高亲和力,从而导致 *SHH* 产生增加^[17],而基底细胞癌细胞系的体外实验发现,当 *SHH* 启动子高度甲基化时,可

导致该分子的异常产生^[18]。此矛盾结果的出现是由于 *SHH* 基因启动子区域中存在两个转录起始位点 (*transcription start site, TSS*), 起决定作用的 *TSS* 启动子甲基化导致 *SHH* 转录机制改变, 造成 *SHH* 配体前体的延长。另外, *SHH* 基因尚可通过组蛋白修饰而进行表观遗传调控^[18]。

2.2 膜受体成员(*PTCH1*、*SMO*)

HH 配体的主要受体是膜受体成员 *PTCH1*, 已发现因 *PTCH1* 基因第一个外显子的差异而存在 5 种异构体, 即 *PTCH-1A*、*PTCH-1B*、*PTCH-1C*、*PTCH-1D* 及 *PTCH-1E*^[19], 均含有 *PTCH1* 基因的 *GLI* 结合位点, 可作为 *HH* 信号传导途径本身的靶分子。鉴于 *PTCH1* 对分裂失控的细胞具有直接抑制作用, 被认为是肿瘤抑制因子, 通过表观遗传机制下调 *PTCH1* 可能致癌。最近, 关于 *PTCH1* 基因甲基化状态的研究发现 *PTCH-1C* 启动子发生甲基化^[20], 而基底细胞癌中 *PTCH-1B* 启动子甲基化水平较低^[20-21], 可能与胚胎发生过程中其表达差异有关。据报道, *PTCH1* 较高频率的甲基化见于慢性淋巴细胞性白血病细胞^[22]; 同时减少甲基转移酶和组蛋白去乙酰化酶后, 髓母细胞瘤中 *PTCH1* 的表达获得再激活, 间接证明 *PTCH1* 基因的表观遗传调控^[23]。

虽然 *SMO* 基因突变有利于肿瘤形成, 但目前关于 *SMO* 的表观遗传学未明。尽管髓母细胞瘤细胞系中 *SMO* 的启动子高甲基化, 但并不影响其转录活性。此外, 健康组织中 *SMO* 的表达受到几种 *miR* 表观遗传学调节, 位于染色体 17p 的髓母细胞瘤相关基因缺乏导致这些 *miR* 丧失, 致使 *SMO* 表达上调^[24]。*SMO* 蛋白类似于真正的 G 蛋白偶联受体, 虽然较早有实验证明 *SMO* 信号可活化 $G\alpha$ 蛋白 i 亚基 ($G\alpha i$)^[25], 但后续研究尚未证实这种信号传导的作用, 也未明确 *SMO* 的表观遗传学调控。

2.3 细胞内信号传导

HH 信号经由膜结合受体感知后通过几种细胞内蛋白进一步转导至细胞核, 细胞内信号转导依赖于 *GLI* 家族转录因子 *GLI1*、*GLI2* 和 *GLI3* 的激活和阻遏物作用之间的平衡转变^[26]。*GLI* 家族三个成员都含有 DNA 结合位点和 C 末端激活结构域。另外, *GLI2* 和 *GLI3* 含有 N-末端抑制结构域^[27]。在缺乏 *HH* 信号时, 全长 *GLI2* 和 *GLI3* 蛋白的 C 末端激活结构域被磷酸化和泛素化, 并在驱动蛋白家族成员 7 (*Kinesin family member 7, KIF7*) 作用下, 导致蛋白酶体部分降解 *GLI2* 和 *GLI3*^[28]。

剩余的阻遏蛋白 (*GLI2 repressor* 及 *GLI3 repressor, GLI2R* 和 *GLI3R*), 由 DNA 结合位点和 N 末端抑制结构域组成, 易位至细胞核抑制 *HH* 靶基因的转录。然而, 因为 *GLI2* 及 *GLI3* 两者基因中承负加工处理的结构域之间存在微小差异, 造成对 *GLI2* 的加工处理效率明显低于 *GLI3*。因此, *GLI3R* 是 *HH* 途径的主要阻遏分子。尽管 *GLI* 蛋白对绝大多数 *HH* 途径的生物学效应至关重要, 但对其表观遗传调控了解甚少。已知几种 *miR* 调控一种或多种 *GLI* 家族成员, 例如 *miR 218* 和 *miR324-5p* 可使 *GLI1* 表达下调; *GLI2* 在 *miR218* 作用下表达下调, 但受 *miR106b* 影响则表达上调; 由于缺失 *miR378*, *GLI3* 在基底细胞癌中表达上调^[29]。新近一项对急性髓性白血病的临床及基础研究表明, 因 *GLI3* 启动子甲基化而使其转录失活, 而导致 *HH* 通路异常激活, 这是耐受 *SMO* 抑制剂的分子基础, 应用去甲基化药物可产生显著效果^[30]。

除 *GLI* 加工外, 细胞 *HH* 信号传导还受到抑制因子 *SuFu* (*Suppressor of Fused, SuFu*) 负调节。*SuFu* 与未加工的 *GLI* 蛋白形成复合物, 阻止后者进入细胞核。髓母细胞瘤中 *SuFu* 的表达似乎不受其启动子异常甲基化的调控, 但在基底细胞癌中通过 *miR455-5p* 调控可使 *SuFu* 表达下调^[31], 因此, *SuFu* 的表观遗传沉默可导致 *GLI* 蛋白水平上调, 激活 *HH* 途径。

2.4 靶基因

HH 信号传导途径主要通过靶基因的表达发挥其生物学作用, 促进细胞生长和分化。该信号通路的某些成员通过反馈作用而严密调控通路的活性。其中, *GLI1* 仅作为 *HH* 通路的转录激活因子, 属于 *GLI1*、*GLI2* 及 *GLI3* 的共同靶基因, 其通过正调控反馈环使其自身在转录水平的功能获得进一步加强^[26]。然而, *PTCH1* 及 *HH* 结合蛋白 (*Hedgehog interacting protein, HHIP*) 参与负反馈环而抑制 *HH* 信号传导。*GLI* 转录因子家族成员的靶基因含有激活性 (如 *H3K4me3*) 和抑制性 (如 *H3K27me3*) 组蛋白标记的二价结构域, 由多梳抑制复合物 2 (*polycomb repressive complex 2, PRC2*) 维持抑制作用, 此为 *HH* 配体非依赖性激活。此外, *GLI* 转录因子通过募集赖氨酸乙酰转移酶 2B (*KAT2B*) 而增加活化的 *H3K9* 标记, 从而增强靶基因转录^[31]。*HH* 信号通路的异常激活也可能导致靶 *miR* 的表达下调。例如, 基底细胞癌中 *HH* 通路激

活导致 *miR203* 表达下调,而正常组织中 *JUN* 是 *miR203* 的靶基因^[32]。*JUN* 作为转录因子 *AP-1* 家族的一个成员,而且是调控细胞周期的几种正调节因子的转录因子,故其对细胞增殖具有促进作用。

3 小结及展望

综上,基于 *HH* 通路成员启动子超甲基化引起肿瘤抑制基因 (*GLI3*、*PTCH* 和 *HHIP* 等) 的失活、启动子去甲基化诱发癌基因活化以及翻译后修饰均可驱动恶性肿瘤发生。通过高通量测序技术可高效获得常见恶性肿瘤的表观遗传学信息,可望发现新的肿瘤标志物及生物治疗靶点。至今,针对阻遏 *HH* 信号通路的靶向制剂的分子靶标仍仅为 *SMO* 及 *GLI*, 容易出现耐药导致恶性肿瘤复发,临床上仅适用于多数几种恶性肿瘤。*HH* 通路的靶向抑制剂联合该通路的表观遗传介导,或在此基础上并用传统化疗方案而实施多靶点治疗,此可有助于降低治疗毒性、克服耐药,这无疑是治疗某些难治性恶性肿瘤的新策略。尽管对 *HH* 途径的表观遗传学研究已取得进展,但尚缺乏可用于临床针对 *HH* 表观遗传学异常导致恶性肿瘤的理想治疗方法。因此,*HH* 通路的表观遗传调控,以及与该通路交联的其他非经典通路的表观遗传调控机制可作为恶性肿瘤未来研究的重点。

参考文献

[1] Pietrobono S, Gagliardi S, Stecca B. Non-canonical Hedgehog Signaling Pathway in Cancer: Activation of GLI Transcription Factors Beyond Smoothed[J]. *Front Genet*, 2019, 10(556): 1-20.

[2] Sabol M, Trnski D, Musani V, et al. Role of GLI transcription factors in pathogenesis and their potential as new therapeutic targets[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(9):2562-2599.

[3] Didiasova M, Schaefer L, Wygrecka M. Targeting GLI Transcription Factors in Cancer [J]. *Molecules*, 2018, 23 (5) : 1003-1022.

[4] Ghirga F, Mori M, Infante P. Current trends in Hedgehog signaling pathway inhibition by small molecules [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2018, 28(19) :3131-3140.

[5] Raleigh DR, Reiter JF. Misactivation of Hedgehog signaling causes inherited and sporadic cancers[J]. *J Clin Invest*, 2019, 129(2):465-475.

[6] Levanat S, Sabol M, Musani V, et al. Hedgehog Signaling Pathway as Genetic and Epigenetic Target in Ovarian Tumors [J]. *Curr Pharm Des*, 2017, 23(1) : 73-94.

[7] Di Magno L, Coni S, Di Marcotullio L, et al. Digging a hole un-

der Hedgehog: downstream inhibition as an emerging anticancer strategy[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1856(1):62-72.

[8] Dawson MA, Kouzarides T. Cancer epigenetics: from mechanism to therapy[J]. *Cell*, 2012, 150 (1) :12-27.

[9] Knudson AG Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1971, 68(4):820-823.

[10] Musani V, Sabol M, Car D, et al. PTCH1 gene polymorphisms in ovarian tumors: potential protective role of c.3944T allele[J]. *Gene*, 2013, 517(1) :55-59.

[11] Seppala M, Fraser GJ, Birjandi AA, et al. Sonic Hedgehog Signaling and Development of the Dentition [J]. *J Dev Biol*, 2017, 5(2) :1-15.

[12] Wicking C, Smyth I, Bale A. The Hedgehog signalling pathway in tumorigenesis and development [J]. *Oncogene*, 1999, 18(55) :7844-7851.

[13] Hahn H, Wicking C, Zaphiropoulos PG, et al. Mutations of the human homolog of drosophila patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome [J]. *Cell*, 1996, 85(6) :841-851.

[14] Tukachinsky H, Kuzmickas RP, Jao CY, et al. Dispatched and Scube mediate the efficient secretion of the cholesterol-modified hedgehog ligand [J]. *Cell Rep*, 2012, 2(2) :308-320.

[15] Yauch RL, Gould SE, Scales SJ, et al. A paracrine requirement for hedgehog signalling in cancer [J]. *Nature*, 2008, 455 (7211) :406-410.

[16] Nakashima H, Nakamura M, Yamaguchi H, et al. Nuclear factor-kappaB contributes to hedgehog signaling pathway activation through sonic hedgehog induction in pancreatic cancer [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(14) :7041-7049.

[17] Duan ZH, Wang HC, Zhao DM, et al. Cooperatively transcriptional and epigenetic regulation of sonic hedgehog overexpression drives malignant potential of breast cancer [J]. *Cancer Sci*, 2015, 106(8) :1084-1091.

[18] ten Haaf A, Franken L, Heymann C, et al. Paradox of sonic hedgehog (SHH) transcriptional regulation: Alternative transcription initiation overrides the effect of downstream promoter DNA methylation [J]. *Epigenetics*, 2011, 6(4) :465-477.

[19] Gielen RCAM, Reinders MGHC, Koillinen HK, et al. PTCH1 isoform 1b is the major transcript in the development of basal cell nevus syndrome [J]. *J Hum Genet*, 2018, 63(9) : 965-969.

[20] Diede SJ, Guenthoer J, Geng LN, et al. DNA methylation of developmental genes in pediatric medulloblastomas identified by denaturation analysis of methylation differences [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(1) :234-239.

[21] Heitzer E, Bambach I, Dandachi N, et al. PTCH promoter methylation at low level in sporadic basal cell carcinoma analysed by three different approaches [J]. *Exp Dermatol*, 2010, 19(10) :926-928.

[22] Schmidt-Wolf IG, Plass C, Byrd JC, et al. Assessment of Promoter Methylation Identifies PTCH as a Putative Tumor-suppressor Gene in Human CLL [J]. *Anticancer Res*, 2016,

- 36(9):4515-4519.
- [23] Ecke I, Petry F, Rosenberger A, et al. Antitumor effects of a combined 5-aza-2'-deoxycytidine and valproic acid treatment on rhabdomyosarcoma and medulloblastoma in Ptch mutant mice[J]. *Cancer Res*, 2009,69(3):887-895.
- [24] Ferretti E, De Smaele E, Miele E, et al. Concerted microRNA control of Hedgehog signalling in cerebellar neuronal progenitor and tumour cells[J]. *EMBO J*, 2008,27(19):2616-27.
- [25] Riobo NA, Saucy B, Dilizio C, et al. Activation of heterotrimeric G proteins by Smoothed[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006,103(33):12607-12612.
- [26] Niewiadomski P, Niedziółka SM, Markiewicz Ł, et al. Gli Proteins: Regulation in Development and Cancer [J]. *Cells*. 2019,8(2):147-183.
- [27] Sasaki H, Nishizaki Y, Hui C, et al. Regulation of Gli2 and Gli3 activities by an amino-terminal repression domain: implication of Gli2 and Gli3 as primary mediators of Shh signaling [J]. *Development*, 1999,126(17):3915-24.
- [28] Li ZJ, Nieuwenhuis E, Nien W, et al. Kif7 regulates Gli2 through Sufu - dependent and - independent functions during skin development and tumorigenesis[J]. *Development*, 2012,139(22):4152-4161.
- [29] Hyun J, Wang S, Kim J, et al. MicroRNA-378 limits activation of hepatic stellate cells and liver fibrosis by suppressing Gli3 expression[J]. *Nat Commun*, 2016,7(10993):1-16.
- [30] Chaudhry P, Singh M, Triche TJ, et al. GLI3 repressor determines Hedgehog pathway activation and is required for response to SMO antagonist glasdegib in AML [J]. *Blood*, 2017,129(26):3465-3475.
- [31] Wils LJ, Bijlsma MF. Epigenetic regulation of the Hedgehog and Wnt pathways in cancer [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2018,121:23-44.
- [32] Sonkoly E, Lové NJ, Xu N, et al. MicroRNA-203 functions as a tumor suppressor in basal cell carcinoma [J]. *Oncogenesis*, 2012,1(3):e3.

(上接第 1259 页)

- [5] Van der Linden S, Valkenburg HA, Cats A. Evaluation of diagnostic criteria for ankylosing spondylitis. A proposal for modification of the New York criteria [J]. *Arthritis Rheum*, 1984,27:361.
- [6] Garrett SL, Jenkinson TR, Kennedy LG, et al. A new approach to defining disease status in AS: the Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index (BASDAI)[J]. *J Rheumatol*, 1994,21(12):2286-2291.
- [7] Calin A, Garrett S, Whitelock HC, et al. A new approach to defining functional ability in ankylosing spondylitis: the Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index (BASFI) [J]. *J Rheumatol*, 1994,21(12):2281.
- [8] 宗行万之助. 疼痛的估价——用特殊的视觉模拟评分法作参考(VAS)[J]. *实用疼痛学杂志*, 1994(4):153-153.
- [9] 焦阿金,何川疆,许爱敏. 强直性脊柱炎患者血清MMP-9、DKK-1水平与疾病活动度的关系[J]. *国际检验医学杂志*, 2019,40(8):935-938.
- [10] Lim Kam Sian TCC, Indumathy S, Halim H, et al. Allelic association with ankylosing spondylitis fails to correlate with human leukocyte antigen B27 homodimer formation [J]. *J Biol Chem*, 2019,294(52):20185-20195.
- [11] Paladini F, Fiorillo MT, Tedeschi V, et al. Ankylosing Spondylitis: A Trade Off of HLA-B27, ERAP, and Pathogen Interconnections? Focus on Sardinia [J]. *Front Immunol*, 2019,10(1):35.
- [12] 熊春翔,卫小春,尹东,等. 强直性脊柱炎早发髋关节强直与HLA-B27基因亚型的易感性研究[J]. *中国组织工程研究*, 2019,23(23):3710-3715.
- [13] 杨霄鹏,惠玲. 人类白细胞抗原B27的实验室诊断[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2015,7(4):276-280.
- [14] Gönüllü E, Bilge NŞ, Cansu DU, et al. Risk factors for urolithiasis in patients with ankylosing spondylitis: a prospective case-control study[J]. *Urolithiasis*, 2016,45(4):1-5.
- [15] 刘勤,陶金辉,马艳,等. 血清抗链球菌溶血素O效价与强直性脊柱炎病情及不同药物治疗影响的关联性研究[J]. *中华疾病控制杂志*, 2018,22(10):1055-1058.
- [16] 张琦. 血清抗链球菌溶血素O检测在强直性脊柱炎中的临床研究[J]. *中外医疗*, 2015,34(4):72-73.
- [17] 王超,相宏飞,马学晓,等. 布氏杆菌性脊柱炎临床与治疗观察[J]. *中国矫形外科杂志*, 2018,26(2):174-177.
- [18] Yang Z, Zhang Z, Lin F, et al. Comparisons of neutrophil monocyte eosinophil and basophil/lymphocyte ratios among various systemic autoimmune rheumatic diseases [J]. *APMIS*, 2017,125(10):863-871.

华南肿瘤学国家重点实验室

中山大学肿瘤防治中心是教育部直属单位,是华南地区最大的肿瘤防治机构,其中鼻咽癌的基础研究水平和临床诊治水平处于国际先进水平,依托的重点实验室有鼻咽癌广东省重点实验室(99B07703S)、教育部肿瘤相关基因与抗肿瘤药物研究重点实验室及“华南肿瘤学”国家重点实验室(2004DA105074),本中心还是肿瘤学国家重点学科依托单位。先后承担国家863、973、CMB、国家自然科学基金重大项目及广东省自然科学基金重大项目资助,并取得了突出的研究成果。

本中心现有10 080平方米的现代化实验室(自动物流、自动制氧、智能化管理、全封闭式中央空调),内设公共服务区和20个独立实验套间。公共服务区包括大型离心机房、超低温冰箱室、冷房、纯化水供应室、洗涤房、暗房、实验动物中心(设于中山大学北校区动物中心七楼I-IV级动物实验室及提供小白鼠及裸鼠)以及公共仪器室。1998年以实行科研基金配套政策,管理到位,保证为项目实施提供良好的条件。本实验中心的公共服务区提供多种公共实验技术服务如病理切片制作、基因测序、比较基因组杂交、电子显微镜观察、荧光显微镜使用、核酸蛋白定量分析、流式细胞仪分析、高效液相色谱分析、荧光共聚焦显微镜及激光显微切割装备等。具有的大型仪器有流式细胞仪, PE377A和373A全自动DNA测序仪,冷冻离心干燥仪,同位素或荧光凝胶分析系统,超速冷冻离心机,高速大容量冷冻离心机,电子显微镜,CGH/FISH系统,高效液相色谱仪等。



杂志简介：

《分子诊断与治疗杂志》于 2009 年 5 月创刊，是由中山大学主管，《中国家庭医生》杂志社有限公司主办，中山大学达安基因股份有限公司承办的面向国内外公开发行的分子医学权威性刊物，也是我国第一份以分子诊断与治疗学科为主要内容的分子医学专业学术期刊。本刊以传播分子医学理念、报道分子医学前沿、倡导分子医学创新、促进分子医学进步为办刊宗旨。主要刊登我国医学分子诊断和分子治疗相关领域中的基础理论研究、临床实践和技术方法的最新研究成果以及国内分子医学新技术、新理论和新进展等方面的文章。目前有编委及审稿专家 80 余人。在编委会和审稿专家及编辑部的共同努力下，于 2016 年被收录为“中国科技核心期刊”（中国科技论文统计源期刊）。

目前有“述评”、“论著”、“综述”、“前沿进展”、“专家笔谈”、“讲座”、“动态”和“专栏”等栏目。涵盖基因诊断、免疫诊断、核酸分子诊断、蛋白分子诊断、信号分子诊断、分子影像诊断、诊断仪器应用、基因治疗、核酸分子治疗、蛋白分子治疗等内容。

