



ISSN 1674-6929

CN 44-1656/R

邮发代号: 46-283

分子诊断与治疗杂志

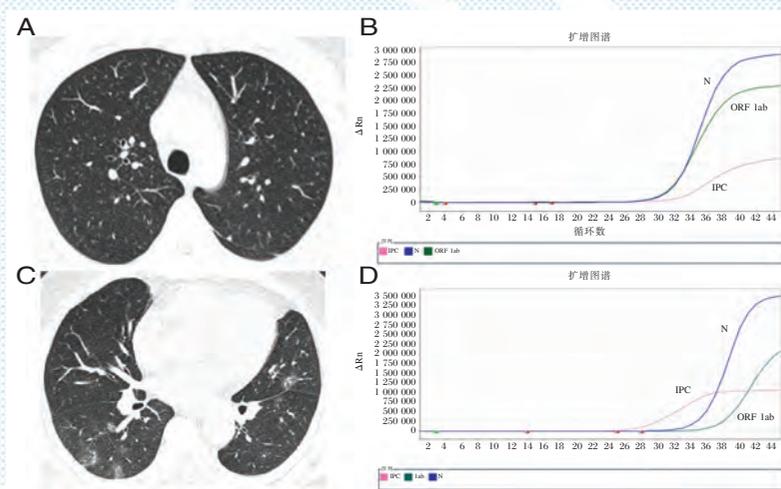
FENZI ZHENDUAN YU ZHILIAO ZAZHI

2020年3月 第12卷 第3期 总第67期

JOURNAL OF

MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Volume 12 Number 3 March 2020



注:图 A、B 为同一 COVID-19 患者, SARS-CoV-2 核酸阳性, 但 CT 双肺未见异常; 图 C、D 为另一患者, 双肺外周带多发磨玻璃样结节影及“网格状”改变, 但图 D ORF1a/b、N 基因扩增曲线 Ct 值大于图 B (后者病毒载量低于前者)

图(P272) COVID-19 胸部影像学与 SARS-CoV-2 核酸结果对照

Figure(P272) Comparison of the results of COVID-19 Patients chest imaging and SARS-CoV-2 nucleic acid

中山大学 主管

中国科技核心期刊 (中国科技论文统计源期刊)
 中国核心期刊 (遴选) 数据库收录期刊
 中国期刊全文数据库全文必录期刊
 中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊
 中文生物医学期刊文献数据库 CMCC 收录期刊
 中国生物医学期刊引文数据库 CMCI 收录期刊
 中国学术期刊影响因子年报统计源期刊

ISSN 1674-6929



9 771674 692204



李艳秋



李艳秋是广州市番禺区何贤纪念医院孕产保健部副部长，产科副主任，妇产科教研室副主任，副主任医师。

1977年8月出生，2001年毕业于大连医科大学，获得学士学位；2006年在南方医科大学南方医院，师从余艳红老师，获得妇产科医学硕士学位。2014年到北京协和医院妇产科进修一年，2015年到澳门镜湖医院作为客座妇产科医生工作一年。

李艳秋主任从事围产医学的临床，教学及科研工作19年。对高危妊娠的诊断和处理具有丰富的临床经验，能熟练处理各种妊娠合并症及并发症，掌握产科危、急、重病案的救治，擅长各种难产的处理。对于妊娠期高血压疾病发病机制有较深入的研究，尤其是妊娠期高血压疾病的早期诊断标志物的研究；在早产的发病机制，临床治疗，综合防治效果评价方面也有深入的研究。

发表论文10篇，第一作者5篇，同时完成番禺区科技局科研立项2项，在研广州市卫生和计划生育科技项目1项。现担任广州市医师协会母胎医学医师分会第一届委员会委员，广东省基层医药学会妇科专业委员会第一届委员，广东省医学会围产医学分会第七届委员会产科急救组成员，广东省妇幼保健协会高危妊娠管理专业（专家）委员会第一届委员会常务委员，广州地区妇女儿童医疗保健专家库专家，广东省女医师协会产科专业委员会第二届委员，广州市番禺区临床用血质量控制中心专家，广州市番禺区医学会妇产科分会第二届委员会委员，广州市番禺区医学会健康管理学分会第一届委员会委员。

分子诊断与治疗杂志

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

月刊 2020年3月 第12卷 第3期 总第67期 Bimonthly Volume 12 Number 3 March 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
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
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3月18日
定价	RMB 15.00元
Responsible Institution	<i>Sun Yat-sen University</i>
Sponsor	<i>China Family Doctors Magazine Publisher Co., Ltd.</i>
Organizer	<i>DaAn Gene Co., Ltd. of Sun Yat-sen University</i>
Consultant	<i>SHEN Ziyu</i>
Editor in Chief	<i>LI Ming</i>
Managing Director	<i>JIANG Xiwen</i>
Associate Editor	<i>LIU Yue</i>
Editorial Office	<i><JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY> Editorial Office</i>
Editors	<i>LI Xiaolan LI Caizhen</i>
Editing	<i>China Family Doctors Magazine Publisher Co., Ltd.</i>
Add	<i>11 Fl., Xianglong Building, 179# Tian he bei Lu, Guangzhou, China 510620</i>
Tel	<i>(020) 32290789-206, 32290789-201</i>
E-mail	<i>jmdt@vip.163.com</i>
CSSN	<i>ISSN 1674-6929 CN 44-1656/R</i>
Printing	<i>TianYi Yofus Technology Co., Ltd.</i>
Publish Date	<i>2020.3.18</i>
Price	<i>RMB 15.00</i>



扫码订购《分子诊断与治疗杂志》

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



中国科技核心期刊

(中国科技论文统计源期刊)

收录证书

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

分子诊断与治疗杂志

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

特颁发此证书。

中国科学院信息研究所

Institute of Scientific and Technical Information of China

北京复兴路 15 号 100038 www.istic.ac.cn

2019年11月

证书编号：2018-G556-0387
有效期至：2020年12月



分子诊断与治疗杂志

月刊 2020年3月 第12卷 第3期

目次

述评

CircRNA 在妇科肿瘤中的研究进展 郝辰璐 李智 陈彦竹 等(259)

COVID-19 专栏

新型冠状病毒实验室诊断技术进展 席婧媛 于广鑫 钱相君 等(265)

新型冠状病毒 SARS-CoV-2 基因检测及其影像学对照 雷松菁 王刚平 周刚 等(270)

2 种国产新型冠状病毒核酸检测试剂检测结果的比较与分析
..... 丁晓燕 柯志意 朱秀云 等(275)

论著

地中海贫血基因检测试剂盒抽验质量分析 张文新 于婷 孙楠 等(279)

一种 PCR 检测耐甲氧西林金黄色葡萄球菌株新方法的建立 邢楣 符林琳(283)

血清 VEGF、pro-ADM 水平与老年呼吸机相关性肺炎病情严重程度及预后的关系
..... 袁娟 白义春(287)

TB-DNA 和 IGRAs 对川西高原地区肺结核诊断的适用性分析
..... 苟甜甜 向章朋 柳梦君 等(292)

老年血液透析患者血清 hs-CRP、Fetuin-A 水平与心脏瓣膜钙化和血管钙化的关系
..... 张曼 张京慧 温小军(296)

血尿酸和胰岛功能与 2 型糖尿病患者血液流变学相关性分析
..... 杜金红 王中正 郭亚娜(300)

重症 COPD 患者 IL-33/ST2 比值与血气指标、氧化应激反应程度的相关性分析
..... 尹晶 陈文涛 郁毅刚(305)

miR-26b-3p 靶向调控 *TRA2B* 表达抑制神经胶质瘤细胞的增殖和转移
..... 隋锐 张烨 姚冰 等(309)

β 溶血表型摩根摩根菌的鉴定及系统发育树构建 贾琴妹 满宝华(314)

敲低 lncRNA DILC 对胶质瘤细胞体外生物学特性的影响
..... 刘泉 王新军 王建业 等(319)

孕晚期亚临床甲状腺功能异常对孕妇糖代谢及妊娠并发症的影响
..... 路春梅 赵云刚 杨旭 等(323)

IGF-IR 与前列腺癌发生发展及预后的关系 冯国亮 张建伟 徐泉泉 等(327)

miR-421 靶向 PDCD4 促进前列腺癌 DU145 细胞增殖的实验研究
..... 李作为 郭航 邓超 等(332)

分子诊断与治疗杂志

月刊 2020年3月 第12卷 第3期

目次

血清 IL-1 β 、IL-10、IFN- γ 在乳腺肿瘤定性诊断中价值及与预后相关性研究	郭琪 姚昶 郭宇飞(336)
CD3 ⁺ HLA-DR 细胞与早发性卵巢功能不全患者免疫紊乱及卵巢功能的关系	郭蜜甜 张继 王素梅(340)
RA 患者免疫功能失衡与疾病活动情况的关系研究	孟庆防(345)
CysC、Hcy、MPV、NT-proBNP 对 STEMI 术后再狭窄的影响	邹延新 李妮妮 张月华(349)
血清 β -HCG、P 及阴道超声评估在未破裂宫外孕诊断中的应用	颜雪萍 田圆 吴青京(353)
狼疮性肾炎血清 MMP9、IFN- γ 与 HMGB1、TLR4 mRNA 的临床意义	鲁冰 任东升 陶雅非 等(358)
膜性肾病患者 Angptl4、CTLA-4 及维生素 D 检测与凝血功能的相关性	贾利敏 赵翠 魏迪 等(362)
血清 BUN、D-D、Lac、sCHE 水平对重症肺炎生存预测价值	张健昌 赖燕波 李盘石 等(366)
热休克蛋白 A2、IGFBP-2 在胰腺癌患者的表达及与临床病理特征相关性	于洋 薛莹 仓顺东(371)
氧化修饰高密度脂蛋白对大鼠颗粒细胞激素分泌的影响及相关机制	马金平 李红娟 李艳敏(376)
结肠癌血清 IGF-1 水平及肿瘤组织中 VEGF-C、VEGFR-3 表达与淋巴结转移的相关性研究	杨秀成 于琼 巩林强 等(381)
云南省婴儿期不同民族高非结合性胆红素血症 UGT1A1 基因多态性研究	奎莉越 王明英 周百灵 等(386)
综 述	
血清 HBeAg 定量检测技术新进展	陈秀丽 张学东 戴二黑(391)
肿瘤微环境中外泌体在肿瘤发生发展中作用及机制.....	杨硕 杨清玲 陈昌杰(396)
专家风采	
李艳秋	(封二)
实验室巡礼	
广州市番禺区妇幼保健院(番禺区何贤纪念医院)	(封三)

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Monthly Volume 12 Number 2 March 2020

CONTENTS

COMMENTS

- Research progress in Circular RNAs in gynecological cancers
HAO Chenjun, LI Zhi, CHEN Yanzhu, LIANG Weiguo, LI Yanqiu, HUANG Chaoyou (259)

COVID-19 Column

- Advances in the laboratory diagnosis for COVID-19 virus
XI Jingyuan, YU Guangxin, QIAN Xiangjun, LU Fengmin (265)
- Comparative observation between SARS-CoV-2 gene detection and CT imaging of patients with COVID-19
LEI Songjing, WANG Gangping, ZHOU Gang, SONG Xu, ZHOU Zhihou, WANG Weiguang, LI Jingjing (270)
- Comparative analysis of detection performance between two domestic new coronavirus nucleic acid detection reagents
DING Xiaoyan, KE Zhiyi, ZHU Xiuyun, ZHENG Haixia, YUAN Jing, PAN Yanchao, ZHANG Mingxia (275)

ORIGINAL ARTICLES

- Quality analysis of thalassemia gene detection kit sampling
ZHANG Wenxin, YU Ting, SUN Nan, GAO Fei, HUANG Jie, QU Shoufang (279)
- Establishment of a new method for detecting methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by PCR
XING Mei, FU Linlin (283)
- Relationship between serum VEGF and pro-ADM levels and the severity and prognosis of elderly patients with ventilator-associated pneumonia
YUAN Juan, BAI Yichun (287)
- Applicability of TB-DNA and IGRAs to diagnosis of pulmonary tuberculosis in the western Sichuan Plateau
GOU Tiantian, XIANG Zhangpeng, LIU Mengjun, LI Longyong, ZHOU Weidong (292)
- Relationship between serum hs-CRP and Fetuin-A levels and cardiac valve calcification and vascular calcification in elderly patients with hemodialysis
ZHANG Man, ZHANG Jinghui, WEN Xiaojun (296)
- Correlation between serum uric acid, islet function and hemorheology in patients with type 2 diabetes
DU Jinhong, WANG Zhongzheng, GUO Yana (300)
- Correlation analysis of IL-33/ST2 ratio with blood gas index and degree of oxidative stress response in patients with severe COPD
YIN Jing, CHEN Wentao, YU Yigang (305)
- MiR-26b-3p targeted regulation of *TRA2B* expression inhibits proliferation and metastasis of glioma cells
SUI Rui, ZHANG Ye, YAO Bing, SUN Peixin, PIAO Haozhe (309)
- Identification and phylogenetic tree construction of beta hemolytic *Morganella morganii*
JIA Qinmei, MAN Baohua (314)
- Effects of knocking down of lncRNA DILC on the biological characteristics of glioma cells in vitro
LIU Quan, WANG Xinjun, WANG Jianye, WU Jing (319)
- Effects of subclinical thyroid dysfunction in late pregnancy on glucose metabolism and maternal prognosis in pregnant women
LU Chunmei, ZHAO Yungang, YANG Xu, FAN Chunyan (323)
- Relationship between IGF-1R and occurrence, development and prognosis of prostate cancer
FENG Guoliang, ZHANG Jianwei, XU Quanquan, FENG Wei (327)

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Monthly Volume 12 Number 3 March 2020

CONTENTS

- Experimental study of miR-421 promotes the proliferation of prostate cancer cell line DU145 by targeting PDCD4
LI Zuowei, GUO Hang, DENG Chao, YAN Dongliang, TIAN Binqiang (332)
- Serum IL-1 β , IL-10 and IFN- γ in the qualitative diagnosis of breast tumors and their correlation with prognosis
GUO Qi, YAO Chang, GUO Yufei (336)
- Relationship between CD3⁺HLA-DR cells and immune disorders and ovarian function in patients with early-onset ovarian insufficiency
GUO Mitian, ZHANG Ji, WANG Sumei (340)
- Study on the relationship between immune function imbalance and disease activity in patients with rheumatoid arthritis
MENG Qingfang (345)
- Effects of CysC, Hcy, MPV, NT-proBNP on restenosis after STEMI
ZOU Yanxin, LI Ni Ni, ZHANG Yuehua, ZHANG Xiuzhen (349)
- Evaluation of serum β -HCG, progesterone and vaginal ultrasound in the diagnosis and treatment of unruptured ectopic pregnancy
YAN Xueping, TIAN Yuan, WU Qingjing (353)
- Clinical Significance of Serum MMP9, IFN- γ and HMGB1, TLR4 mRNA in Lupus Nephritis
LU Bing, REN Dongsheng, TAO Yafei, LI Ming (358)
- Correlation between detection of Angptl4, CTLA-4 and vitamin D and coagulation function in patients with membranous nephropathy
JIA Limin, ZHAO Cui, WEI Di, FANG Xiaofang (362)
- The predictive value of serum BUN, D-D, Lac, sCHE levels in the survival of severe pneumonia
ZHANG Jianchang, LAI Yanbo, LI Panshi, TAN Bingjun (366)
- Expression of heat shock protein A2 and IGFBP-2 in patients with pancreatic cancer and its correlation with clinical pathological features
YU Yang, XUE Ying, CANG Shundong (371)
- Effects of oxidized high-density lipoprotein on the secretion of granulosa cells and related mechanisms in rats
MA Jinping, LI Hongjuan, LI Yanmin (376)
- Correlation between serum IGF-1 level in colon cancer, expression levels of VEGF-C and VEGFR-3 in tumor tissues and lymph node metastasis
YANG Xiucheng, YU Qiong, GONG Linqiang, YANG Yan (381)
- Study on the Polymorphism of *UGT1A1* Gene in Unconjugated Hyperbilirubinemia of Different Nationalities in Yunnan Province during Infancy
KUI Liyue, WANG Mingying, ZHOU Bailing, LI Li, HE Xiaoli, SHI Shulan, SHEN Ru (386)
- REVIEWS**
- Advances in the quantitative of serum HBeAg and its clinical significance
CHEN Xiuli, ZHANG Xuedong, DAI Erhei (391)
- Role and mechanism of exosomes in tumor microenvironment in tumorigenesis and development
YANG Shuo, YANG Qingling, CHEN Changjie (396)

CircRNA 在妇科肿瘤中的研究进展

郝辰珺¹ 李智¹ 陈彦竹¹ 梁伟国¹ 李艳秋^{1*} 黄超友^{2*}

[摘要] CircRNA 是非编码 RNA 中最为稳定的 RNA 分子,其稳定存在于各种生物体中并参与生物体的代谢功能调节。近年来,大量研究从基因组学及信号通路方向深入研究,发现 CircRNA 可与 miRNA 通过复杂调控参与机体各种疾病的发生及发展,其中 CircRNA 在肿瘤细胞的增殖、凋亡及转移中的作用备受瞩目。妇科肿瘤是妇科疾病中危害最大的疾病。本文主要从 CircRNA 的特征功能认知、在肿瘤发生及发展中途径、以及其在妇科肿瘤中的致病机理和未来诊断方向上,综合国内外相关研究进展进行整理,总结 CircRNA 在妇科肿瘤中的临床应用。

[关键词] CircRNA; 妇科肿瘤; 研究进展

Research progress in Circular RNAs in gynecological cancers

HAO Chenjun¹, LI Zhi¹, CHEN Yanzhu¹, LIANG Weiguo¹, LI Yanqiu^{1*}, HUANG Chaoyou^{2*}

(1. Department of obstetrics and gynecology Hexian Memorial Hospital of Panyu District, Guangzhou, Guangdong, China, 511400; 2. Department of Breast Hexian Memorial Hospital of Panyu District, Guangzhou, Guangdong, China, 511400)

[ABSTRACT] Circular RNAs (CircRNAs) is the most stable non-coding RNAs (ncRNAs). They are stable in various organisms and participate in the regulation of metabolic functions of the organisms. In recent years, there have been many researches on the genomics and signaling pathways. Some researchers have found that CircRNAs and miRNAs participate in the occurrence and development of various diseases through complex regulation, such as proliferation, apoptosis and metastasis. Gynecological cancers are harmful diseases. Among them, Ovarian cancer and cervical cancer are the highest incidence. This review summarizes the cognition of CircRNAs' features and functions, the pathway of CircRNAs in tumorigenesis and development, and its pathogenic mechanism and future diagnosis direction in gynecological cancers.

[KEY WORDS] CircRNAs; Gynecology cancer; Research progress

近年来,随着分子生物学技术在临床疾病诊断和生物制品的研发需求的不断加深,研究者对肿瘤的作用机理、细胞层面、分子水平的变化进行了深入挖掘。CircRNA 是一种非编码 RNA,其发现改变了传统的非编码 RNA(non-coding RNA,

ncRNA) 在机体蛋白编码的认知观点^[1]。CircRNA 与传统的 mRNA 最大的区别在于其存在的闭环可抵抗 RNA 酶的降解,这个闭环是由 RNA 分子的 3' 和 5' 端的磷酸基团共价偶联而成,从而保障了 CircRNA 分子的稳定性和进化保

基金项目:广东省科技计划项目(2017ZC0433)

作者单位:1. 广州市番禺区何贤纪念医院妇产科,广东,广州 511400

2. 广州市番禺区何贤纪念医院乳腺科,广东,广州 511400

*通信作者:李艳秋, E-mail: liyanqiu1977@163.com, 黄超友, E-mail: cjbabay@126.com

注:李艳秋和黄超友为共同通信作者

护^[2]。随着 CircRNA 分子在不同生物体中不断发现,研究者对其进行了相应的信息网络构建,截止目前国际上已经完成了近 20 万种不同 CircRNA 的信息库,由此进一步证明 CircRNA 是生物界广泛存在的,但是由于 CircRNA 分子的发现较晚导致目前其对各种细胞的作用机理及作用途径了解较少。通过 CircRNA 分子的生物学特征及分类研究发现,CircRNA 分子广泛参与蛋白质的翻译和表达,同时其还具有 miRNA 海绵分子功能以及 RNA 连接蛋白(RNA banding protein, RBP)功能^[3]。同时大量研究发现,CircRNA 参与了表观遗传学的调控,对生殖干细胞定向发育以及胚胎的成熟均起到重要影响^[4]。在疾病诊断上目前大量研究证实 CircRNA 可以与 miRNA 产生复杂的相互作用从而影响肿瘤细胞的发育、转移及凋亡等^[5]。本研究以 CircRNA 在妇科肿瘤中的变化为研究思路,综合国内外研究报道,深入总结 CircRNA 的生物学特征以及其对妇科肿瘤的发生及在诊断中的价值。

1 CircRNA 的概述

1.1 CircRNA 简介

CircRNA 是 RNA 家族中发现的最新成员,属于非编码 RNA,其主要存在于转录的拼接过程中,由单链 RNA 的 3' 和 5' 通过共价键连接形成稳定的环状结构,此环状共价环有效保障了 CircRNA 对 RNA 核酸外切酶高度耐受性特性,因此相比线性 RNA 更具有稳定性。

1.2 CircRNA 的来源

CircRNA 主要来自于蛋白质编码基因,目前已经在于人类基因转录产物、病毒及细菌中^[6]。CircRNA 是 tRNA 和 lncRNA 之间的基因间隔子或反转录本,其不含有线性 RNA 的 5' 和 3' 的 poly (A) 结构。根据其 RNA 序列的来源不同将其分为外显子 CircRNA (ecRNA)、内含子 CircRNA (ciRNA) 和外显子-内含子 CircRNA 3 种,其中外显子 CircRNA 占比最高。除外显子 CircRNA 存在于细胞质中外,其余两种均存在于细胞核中,3 种 CircRNA 在细胞中的结合位点均为 2'-5' 磷酸二酯键^[7]。外显子 CircRNA 除具有 miRNA 海绵作用外,还起到 RNA 连接蛋白 RBP 作用,以调控 RNA

的选择性拼接、运输及翻译,从而调控细胞增殖、分化及凋亡等生理过程,内含子 CircRNA 和外显子-内含子 CircRNA 主要参与调整基因转录过程^[8]。

1.3 CircRNA 的特征及生物学功能

CircRNA 是近年来新发现的非编码 RNA,研究者对其生物学特征的研究主要通过线性 RNA 对比而获得,目前对 CircRNA 的分子学特征总结主要包括:①CircRNA 主要产生于外显子,且主要在细胞质中表达,少量参与细胞核中表达的主要为内含子 CircRNA 或其片段;②外显子 CircRNA 可参与内生非编码 RNA 的表达调控,其对 RNA 转录前后的变化起到重要调节作用;③CircRNA 可以与 miRNA 相互作用从而调节目标蛋白表达;④CircRNA 具有对 RNA 核酸外切酶高度耐受的共价闭环,从而保障了其结构功能的稳定性,这种性质对物种进化过程中起到重要保护作用,这种保护作用间接决定了组织特异性;⑤CircRNA 通常被发现存在于细胞外液(唾液、血液及尿液等)中,且其表达水平是线性 RNA 的十倍以上^[9-11]。CircRNA 的上述特征保障了其具有稳定的生物学特征,因此有研究发现多数物种中的 CircRNA 的半衰期比线性 RNA 长近 10 h 左右。

基于 CircRNA 的分子特征,研究者发现了 CircRNA 许多潜在的生物学功能,主要包括:①CircRNA 起到 miRNA 海绵分子功能。Hansen 等^[12-13]研究发现 CircRNA 含有多个可以与 miRNA-138 连接的位点,同时有研究也进一步证实了小脑变异蛋白(CDR1)的反义链 CircRNA (CDR1as/CiRS-7) 存在人和鼠的脑组织中,CiRS-7 (circular RNA sponge for miR-7) 含有 73 个 miR-7 结合位点,当其与 miR-7 结合后可以抑制 miR-7 的生物学功能,从而激活 miR-7 的下游基因。Thomas B H 等^[14]研究发现 SRY-CircRNA (SRY-9) 可以作为 miR-138 的分子海绵,而 SRY-9 是小鼠 Y 染色体上决定性别的基因,因此生物体中 CircRNA 作为 miRNA 的分子海绵可能性较为普遍。同时研究者们^[15]还发现绝大多数 CircRNA 均可作为 miRNAs 的分子海绵,就如 miRNA 作为 mRNA 一样。②CircRNA 起到 RBP 功能,RBP 主要通过对 RNA 转录后调控影响细胞代谢过程(细胞增殖、分化、

凋亡及衰老等),如 RNA 连接蛋白 circ-Foxo3 可通过与细胞蛋白依赖性蛋白激酶 2(cyclin-dependent kinases, CKD2)相互作用以抑制细胞周期维持在 G1/S 阶段^[16]。由 CircRNA 海绵分子通过与精氨酸蛋白(AGOP)、RNA-QKI MBL 蛋白、RNA 聚合酶 II (pol II)及真核启动子 4A-III 组成的 RNA 蛋白复合物(RNA-protein complexes, RPCs)起到了 RBP 作用,并可以与线性 RNAs 结合发挥转录后调控功能^[17]。但是,目前对 CircRNA 连接蛋白调控 RNA 转录机理尚不清楚,但是可以初步确认 circRNA 调控基因转录过程主要发生于细胞核中,而其起到 RNA 海绵分子作用主要发生在细胞质中。③ CircRNA 可参与蛋白编码过程。CircRNA 属于非编码 RNA 的一条链,当其被插入到细胞内核糖体结合位点(IRES)时,就会产生与线性 RNA 不同的蛋白编码转录,之后真核细胞核糖体中 40s 亚基与含有 IRES 的 CircRNA 发生病翻译^[18]。截止目前仅发现病毒 CircRNA 具备这种可编码翻译蛋白的功能,如 HBV 的卫星病毒 HDV,同时这种病毒 CircRNA 在真核细胞中的翻译机理尚不清楚^[19]。④ CircRNA 协同 miRNA 参与机体不同器官细胞的生理功能调节。Chen 等^[20]研究中发现进行体外受精治疗期间,CircRNA 水平(circ103827, circ104816)与女性高质量胚胎数呈现负相关,Dong 等^[21]研究发现 CircRNA 水平与精子的运动及受精也具有相关性。除上述生物学功能外,CircRNA 水平也与相关疾病有一定相关性,Zhang 等^[22]发现 CircRNA101222 表达水平在子癲前期(PE)女性与正常女性之间存在显著差异。同时,Qian 等^[23]发现 PE 女性和早产女性胎盘组织中有 3 种 CircRNA 表达水平存在显著差异。

1.4 CircRNA 在肿瘤发生中的作用机理

随着 CircRNA 的深入研究,研究者发现 CircRNA 的水平变化不仅对机体相关生理功能调节作用,同样对肿瘤的发生及起到重要影响。大量的研究证实了 CircRNA 可参与肿瘤细胞的增殖、侵袭、转移及凋亡。Ma 等^[24]研究发现 CircRNA-000284 可以与 miR-506 作用调节宫颈癌细胞的增殖及侵袭,Xing 等^[25]发现 CircRNA 可通过调节 AKT/mTOR 信号路径影响肿瘤细胞增殖及

转移。Liu 等^[26]发现 Circ-ZFR 可以通过调节 PTEN 和 mir-130a/mir-107 促进肿瘤细胞凋亡及抑制肿瘤细胞扩增,Wang 等^[27]发现 has-Circ-0014717 可以通过调节 p16 的表达影响肿瘤细胞周期。综合近年来研究可知,CircRNA 主要通过调节肿瘤细胞生长过程中相关信号通路途径调节促进和抑制肿瘤的变化,但是其如何作用信号通路中特定蛋白的机理目前仍需要深入研究。

1.5 CircRNA 的临床检测

随着近年来深入研究,研究者发现 CircRNA 是一种普遍存在 nRNA,其参与细胞中各种不同基因的表达调控,但是目前对其的研究较少且其潜在的一些功能仍未被揭露。传统的 CircRNA 检测主要通过 CircSeq 技术,这种方法对于低丰度 CircRNA 的检测有效率较低,同时对区别反向剪接产生的 CircRNA 和细胞中本身存在的 CircRNA 功能较差,随着生物学信息技术的不断改进高通量测序技术有效的改善了 RNA-seq 上述缺陷。基于高通量测序方法,目前 CircRNA 的测序工具也相应增多如 Mapslice、CIRI 及 CIRCexplorer 等。除此之外,为便于有效探知 CircRNA 的功能,目前全球已建立了关于 CircRNA 的基因组和序列数据库(如 www.circbase.org)中包含了 150 000 个 CircRNA 的信息^[28]。

2 CircRNA 在妇科肿瘤疾病的相关性研究进展

妇科肿瘤是目前妇科疾病中对女性健康危害性最大的一类疾病。妇科肿瘤种类较多,包括宫颈癌、卵巢癌、乳腺癌、子宫内膜癌等,据报道,宫颈癌和卵巢癌的致死率及发病率最高。

2.1 CircRNA 与宫颈癌

Abdelmohsen 等^[3]通过使用宫颈癌 HeLa 细胞研究证明 CircPABPN1 可以竞争性的连接到 HuR 上,这样就可以抑制 HuR's 的连接位点连接到 PABPN1 mRNA 上进行翻译,从而抑制肿瘤细胞增殖。Bachmayr-Heyda 等^[29]发现在 13 种人类组织中 CircRNA 的整体峰度与肿瘤细胞增值率呈现负相关。除此之外,有研究发现,CDRIAs 在宫颈癌组织中的表达水平远高于癌旁组织,而 miR-7 与其相反^[30]。Lee 等^[31]通过对宫颈癌的 Hela 和 C33A

细胞研究发现,CDRIAs的超表达可以通过抑制miR-7的活力而增加FAK(粘着斑激酶,miR-7的靶标)的表达,FAK的超表达可促进宫颈癌细胞的扩增、侵袭及迁移,此结果进一步证实CDRIAs与miR-7在宫颈癌的调节中具有相关性。因此建立基于CDRIAs的检测方法对宫颈癌的早期诊断具有重要作用,除此之外以CDRIAs进行分子靶标进行靶向治疗潜力巨大。

2.2 CircRNA与卵巢癌

卵巢癌,目前妇科肿瘤中致死率最高的疾病,其不仅影响卵巢部位卵母细胞的正常发育,同时对卵巢激素分泌也造成很大影响。Zhou等^[32]研究发现,当mRNA上调或CircRNA下调时,与其相关的NFkB、PI3k/AKT和TGF(这两个含有多种miR-24/let-7结合位点)就会在转移癌中被上调。此结果说明CircRNA与mRNA在卵巢癌的发生中具有相关性,并且可以通过与卵巢细胞上miR-24/let-7结合位点结合竞争性抑制miRNA的线性剪切和海绵功能,调节转移-诱发基因的表达,从而有利于卵巢癌的转移。因此以NFkB、PI3k/AKT和TGF作为靶点既可以对卵巢癌的发生及进展的监测具有重要的指导作用。

2.3 CircRNA与乳腺癌

乳腺癌同样是困扰女性健康的重要疾病。有研究发现CDRIAs可以起到的miR-7的海绵分子作用,从而可以反向调节miR-7活性并降低其对ECF,IRS-1,IRS-2,ak1,Raf1,ACK1和PIK3CD的抑制作用,从而反过来促进包括乳腺癌在内的肿瘤的发展,当miR-671连接到CDRIAs上,由AGO介导的分裂就会被启动从而降低CDRIAs的表达水平,从而减弱CDRIAs的表达,间接调整miR-7的活性水平^[33]。miR-7的表达水平主要被其上游基因HOXD10正向调节,其低表达水平可以提升癌症的侵袭性能,当PAK1水平上升、miR-7或HOXD10水平下降时,乳腺癌细胞的侵袭力就会增强^[34]。发现miR-7还可靶向REG γ 抑制乳腺癌小的扩增,同时可促进乳腺癌细胞凋亡^[35]。因此,miR-7的表达水平与癌症的上皮分化密切相关:表达水平越低,转移潜能越弱。

Karla等^[36]发现miR-7可以抑制p21激酶的表达(PAK1),这种酶在多种肿瘤中水平均呈现

上调,同时有研究发现miR-7在哺乳动物乳腺癌组织中低水平表达,且其表达水平与癌细胞的转移能力能负相关性。Tang等^[37]发现作为miR-7的海绵分子,CDRIAs可以反向调节其活性并降低其对ECF,IRS-1,IRS-2,ak1,Raf1,ACK1和PIK3CD的抑制作用,从而反过来促进乳腺癌的恶化。

2.4 CircRNA与子宫内膜癌

在其他妇科肿瘤研究中,Yang等^[38]发现Circ-ITCH可以竞争性的连接到miR-17和miR-224,从而影响p21和PTEN的不同表达,PTEN的突变或缺失可使其酶活性失活,然后PTEN失去抑制细胞增殖的能力,PTEN位于10号染色体上,其可以参与磷酸酶和肌张力蛋白的表达,磷酸酶和肌张力蛋白同源物是一种具有磷酸酶活性的癌症抑制物,因为它可以抑制分裂、增殖、侵袭、迁移及并加速癌细胞的凋亡。因此,当PTEN的突变或缺失可使其酶活性失活,细胞倾向于恶性肿瘤,可能会引起子宫内膜癌。同时Chen等^[39]研究发现,正常人子宫内膜癌组织中CircRNAs表达水平较低,因此CircRNAs水平的变化对子宫内膜癌的发生具有一定的诊断价值。

3 CircRNA在妇科肿瘤疾病的诊疗中面临的挑战

综合上述研究分析可知,CircRNA已经越来越备受科学界所关注,其参与机体细胞分子生物学调控的机理也不断被揭露,然而这些研究都是处于初步研究阶段。CircRNA在生物体内广泛存在,但是各种潜在CircRNA分子信息库的构建目前还待完成,同时这些CircRNA在不同疾病的信号通路调控路径还需要进一步研究。通过对妇科肿瘤疾病相关CircRNA分子调控的近些年研究总结可知,CircRNA在妇科肿瘤疾病的诊断、病程发展判断和靶向分子治疗药物的研究具有重要指导意义。但是,在不同类型妇科肿瘤发生相关CircRNA之间的关联性研究方面较少,仍需要进一步深入挖掘。同时,不同CircRNA在调节肿瘤的发生及抑制过程中角色研究目前还不清楚。特别是在癌症不同阶段,CircRNA分子之间、CircRNA分子与miRNA

分子之间复杂协作机理的研究均是未来科学认知的挑战。

4 展望

妇科恶性肿瘤是妇科疾病中对患者伤害最大的疾病,目前对恶性肿瘤的治疗无特效的药物,主要通过早期诊断及早期治疗方式改善预后。为了有效提升早期诊断准确性,分子生物学诊断技术在妇科肿瘤疾病的诊疗中越来越受到关注。CircRNA 是非编码 RNA 家族后起之秀,越来越多的研究证实其在生物体中种类丰富多样,结构较为稳定,在细胞或组织中特定表达。因此,基于不同 CircRNA 分子建立调控网络,为后期妇科肿瘤在疾病预防及治疗药物的研发提供了重要的指导思路。除此之外,CircRNA 分子在临床疾病诊断中新型快速检测技术的研发同样是未来发展的一种趋势。

参考文献

- [1] Reut Ashwal-Fluss, Markus Meyer, Nagarjuna Reddy Pamudurti, et al. circRNA biogenesis competes with pre-mRNA splicing[J]. *Molecular cell*, 2014, 1(159): 13-14.
- [2] Lasda, Erika, Parker, Roy. Circular RNAs: diversity of form and function[J]. 2014, 12(12): 1829-1842.
- [3] Abdelmohsen K, Panda AC, Munk R, et al. Identification of HuR target circular RNAs uncovers suppression of PABPN1 translation by circPABPN1[J]. *RNA Biol*, 2017, 14(3): 361-369.
- [4] Lin X, Han M, Cheng L, Chen J, Zhang Z, et al. Expression dynamics, relationships, and transcriptional regulations of diverse transcripts in mouse spermatogenic cells[J]. *RNA Biol*, 2016, 13(10): 1011-1124.
- [5] Liu YC, Li JR, Sun CH, Andrews E. A database of circular RNAs derived from transcriptome sequencing data[J]. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(1): 209-215.
- [6] Garcia-Garcia E, Little J C, Kalderon D. The exon junction complexed and Srp54 contribute to hedgehog signaling via ciRNA splicing in *Drosophila melanogaster*[J]. *Genetics*, 2017, 206(4): 2053-2068.
- [7] Priedigkeit N, Watters RJ, Lucas PC, Basudan A, et al. Exome-capture RNA sequencing of decade-old breast cancers and matched decalcified bone metastases[J]. *JCI insight*, 2017, 2(17): 7-7.
- [8] Qu S, Yang X, Li X, et al. Circular RNA: a new star of noncoding RNAs[J]. *Cancer Lett*, 2015, 365(2): 141-148.
- [9] Zhu P, Ge N, Liu D, Yang F, et al. Preliminary investigation of the function of has-circ-0006215 in pancreatic cancer[J]. *Oncol Lett*, 2018, 16(1): 603-611.
- [10] Rybak-Wolf A, Stottmeister C, Glazar P, Jens M, Pino N, et al. Circular RNAs in the mammalian brain are highly abundant, conserved, and dynamically expressed[J]. *Mol Cell*, 2015, 58(5): 870-885.
- [11] Jessica Kalra, Keith Laderoute, Daniel Renouf, David Shaefner, and Marcel Bally. Developing circRNA signatures as a biomarker for the early diagnosis of pancreatic carcinoma[J]. *Cancer Research*, 2016, 76(6): 4-7.
- [12] Hansen TB, Wiklund ED, Bramsen JB, Villadsen SB, et al. miRNA-dependent gene silencing involving Ago2-mediated cleavage of a circular antisense RNA[J]. *EMBO*, 2011, 30(21): 4414-4422.
- [13] Xiaofei Zhang, Danfen Yang, and Yaqiang Wei. Overexpressed CDR1as functions as an oncogene to promote the tumor progression via miR-7 in non-small-cell lung cancer[J]. *Onco Targets Ther*, 2018, 11: 3979-3987.
- [14] Thomas B H, Trine IJ, Bettina HC, Jesper BB. Nature RNA circles function as efficient miRNA sponge[J]. *Nature*, 2013, 495: 7441.
- [15] Peng-Fei Zhang, Chuan-Yuan Wei, Xiao-Yong Huang, et al. Circular RNA circTRIM33-12 acts the sponge of MicroRNA-191 to suppress hepatocellular carcinoma progression[J]. *Molecular Cancer*, 2019, 18(1): 105-105.
- [16] Valerie Brid O'Leary, Jan Smida, Martina Matjanovski, et al. The circRNA interactome-innovative hallmarks of the intra- and extracellular radiation response[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(45): 78397-78409.
- [17] Du WW, Yang W, Liu E, Yang Z, et al. Foxo3 circular RNA retards cell cycle progression via forming ternary complexes with p21 and CDK2[J]. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(6): 2846-2858.
- [18] Legnini I, Ditmoteo G, Rossi F, Morlando M, et al. Circ ZNF609 is a circular RNA that can be translated and functions in myogenesis[J]. *Mol Cell*, 2017, 66(1): 22-37.
- [19] Eloi RV, Amelie W, Charlotte B, Laura H, et al. Combined small molecule and loss-of-function screen uncovers estrogen receptor alpha and CAD as host factors for HDV infection and antiviral targets[J]. *Hepatology*, 2020, 69(1): 158-167.
- [20] Chen L, Huang C, Wang XL, Shan G. Circular RNAs in eukaryotic cells[J]. *Curr Genomics*, 2015, 16(5): 312-318.
- [21] Dong WW, Li HM, Qing X R, Huang DH, Li HG. Identification and characterization of human testis derived circular RNAs and their existence in seminal plasma[J]. *Sci Rep* 2016, 6(1): 390800.

- [22] Zhang Y, Yang H, Long Y, Li W. Circular RNA in blood corpuscles combined with plasma protein factor for early prediction of preeclampsia[J]. *Blog*, 2016, 123:2113-2118.
- [23] Qian Y, Lu Y, Rui C, Qian Y, Cai M. Potential significance of circular RNA in human placental tissue of patients with preeclampsia [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 39(4): 1380.
- [24] Ma HB, Yao YN, Yu JJ, Chen XX, Li HF. Extensive profiling of circular RNAs and the potential regulatory role of circRNA-000284 in cell proliferation and invasion of cervical cancer via sponging miR-506 [J]. *Am J Transl Res*, 2018, 10(2):592-604.
- [25] Xing L, Zhang L, Feng Y, et al. Downregulation of circular RNA has-circ-0001649 indicates poor prognosis for retinoblastoma and regulates cell proliferation and apoptosis via AKT/mTOR signaling pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 105:326-333.
- [26] Liu T, Liu S, Xu Y, et al. Circular RNA-ZFR inhibited cell proliferation and promoted apoptosis in gastric cancer by sponging miR-130a/miR-107 and modulating PTEN [J]. *Cancer Res Treat*, 2018, 50(4):1396-1417.
- [27] Wang F, Wang J, Gao X, et al. Has-circ-0014717 is down-regulated in colorectal cancer and inhibits tumor growth by promoting p16 expression [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 88:775-782.
- [28] Zheng L L, Li JH, Wu J, Sun WJ, et al. Identification, expression, evolution and function of small RNAs, lncRNAs and circular RNAs from deep-sequencing data [J]. *Nucleic Acid Res*, 2016, 44(1):196-202.
- [29] Bachmayr-heyda A, Reiner A T, Auer K, et al. Correlation of circular RNA abundance with proliferation exemplified with colorectal and ovarian cancer, idiopathic lung fibrosis, and normal human tissue [J]. *Sci Rep*, 2015, 5(1):8057-8057.
- [30] Thomas B H, Trine IJ, Bettina HC, Jesper BB. Nature RNA circles function as efficient miRNA sponge [J]. *Nature*, 2013, 495:7441.
- [31] Lee BY, Timpson P, Horvath LG, Daly R J. FAK signaling in human cancer as a target for therapeutics [J]. *Pharmacol Ther*, 2015, 146:132-149.
- [32] Zhou X, Xu Y, Dai L, Wang Y, Zhou J, et al. MicroRNA-7 inhibits tumor metastasis and reverses epithelial-mesenchymal transition through AKT/ERK1/2 inactivation by targeting EGFR in epithelial Ovarian Cancer [J]. *PLoS one*, 2014, 9(5): e96718.
- [33] Lu L, Sun J, Shi P, Kong W, et al. Identification of circular RNAs as a promising new class of diagnostic biomarkers for human breast cancer [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(27):44096-44107.
- [34] Zhang H, Cai K, Wang J, Wang X, et al. MiR-7 inhibited indirectly by lincRNA hotair, directly inhibits STEDB1 and reverses the EMT of breast cancer stem cells by downregulating the STAT3 pathway [J]. *Stem cells*, 2014, 32(11):2858-2868.
- [35] 石远. miR-7-5p 靶向 REG γ 抑制人乳腺癌细胞增殖及促进细胞凋亡研究 [D]. 重庆医科大学, 2014.
- [36] Karla F, Meza-sosa, Erick I, Perez Garcia, Nohemi, et al. MiR-7 promotes epithelial cell transformation by targeting the tumor suppressor KLF4. *PLOS ONE*, 9(9), e103987.
- [37] Tang YY, Zhao P, Zou TN, Duan JJ, Zhi R. Circular RNA has-circ-0001982 promotes breast cancer cell carcinogenesis through decreasing miR-143 [J]. *DNA cell Biol*, 2017, 36: 901.
- [38] Yang X, Li P, Wang J, Han J, Tao J, et al. Circular RNA circ-ITCH inhibits bladder cancer progression by sponging miR17/miR-224 and regulating p21, PTEN expression [J]. *Mol Cancer*, 2018, 17(1):19-31.
- [39] Chen BJ, Byrne FL, Takenaka K, Modesitt SC, et al. Analysis of the circular RNA transcriptome in endometrial Cancer [J]. *Oncotarget*, 2017, 9(5):5786-5796.

• COVID-19 专栏 •

新型冠状病毒实验室诊断技术进展

席婧媛¹ 于广鑫¹ 钱相君¹ 鲁凤民^{1,2*}

[摘要] 2019年12月,一种可引起人呼吸道感染的新型冠状病毒(SARS-CoV-2)开始在我国武汉地区感染流行,并在短时间内蔓延至全国及世界其他国家。面对新发传染病,及早发现已感染病毒的携带者或患者对于控制传染源、切断传播途径、保护易感人群至关重要。因此,我国迅速推出了基于实时RT-PCR技术的新型冠状病毒RNA检测技术,病毒核酸检测阳性成为现行新型冠状病毒肺炎(COVID-19)诊疗方案对疑似病例确诊的主要依据。但由于SARS-CoV-2的感染特性,核酸检测的阳性率不足50%。在感染性疾病中,特异性抗体的产生是判断感染发生的重要标准之一,目前基于免疫学检测技术的抗-SARS-CoV-2特异性抗体检测也受到越来越多的重视,并被纳入了最新版诊疗方案中。现回顾COVID-19疫情爆发以来诊断标准的变迁,并在对各种检测方法的优缺点进行概述的基础上,对确诊和患者治愈出院相关标准的制定提出了新的见解。

[关键词] 新型冠状病毒; 临床诊断; 核酸检测; 血清学检测

Advances in the laboratory diagnosis for COVID-19 virus

XI Jingyuan¹, YU Guangxin¹, QIAN Xiangjun¹, LU Fengmin^{1,2*}

(1. Department of Microbiology & Infectious Disease Center, School of Basic Medical Sciences, Peking University Health Science Center, Beijing, China, 100191; 2. Hepatology Institute, Peking University People's Hospital, Beijing, China, 100044)

[ABSTRACT] In December 2019, a new type of coronavirus (SARS-CoV-2) that can cause human respiratory infections began to spread in Wuhan and spread to the whole country, China and other countries in the world within a short period of time. In the face of new infectious diseases, early detection of carriers or patients who have been infected with the virus is essential to control the source of infection, cut off the route of transmission, and protect vulnerable populations. Therefore, China has quickly introduced a new coronavirus RNA detection technology based on real-time fluorescence quantitative PCR (RT-PCR) technology. Positive detection of viral nucleic acids has become the main basis for the diagnosis of suspected cases in the current new coronavirus pneumonia (COVID-19) diagnosis and treatment program. However, due to the infection characteristics of SARS-CoV-2, the positive rate of nucleic acid detection is less than 50%. In infectious diseases, the production of specific antibodies is one of the important criteria for judging the occurrence of infections. At present, the detection of anti-SARS-CoV-2 specific antibodies based on immunological testing technology has also received more and more attention and has been included in the latest version of the diagnosis and treatment strategy. The changes in diagnostic criteria since the outbreak of the COVID-19 epidemic are reviewed. Based on an overview of the advantages and disadvantages of various detection methods, new insights are provided on the formulation of relevant standards for diagnosis and patient discharge.

[KEY WORDS] SARS-CoV-2; Clinical diagnosis; Nucleic acid detection; Serological detection

基金项目:北京大学抗击新冠病毒感染专项课题“新型冠状病毒感染的肺炎防控攻关专项”;国家科技重大专项计划(2017ZX10302201)

作者单位:1. 北京大学基础医学院病原生物学系暨感染病中心,北京 100191

2. 北京大学人民医院肝病研究所,北京 100044

*通信作者:鲁凤民, E-mail: lu.fengmin@hsc.pku.edu.cn

冠状病毒曾在人间引起多次流行,其中最为严重的就是21世纪初暴发的严重急性呼吸综合征冠状病毒(SARS-CoV)和中东呼吸综合征冠状病毒(MERS-CoV)感染^[1]。新型冠状病毒(SARS-CoV-2)是迄今为止被发现的第7种可感染人的冠状病毒。生物信息学及形态学分析表明,SARS-CoV-2属于 β -冠状病毒,具有冠状病毒的典型特征,全基因组序列分析显示,该病毒与蝙蝠携带的SARS样冠状病毒RaTG13株亲缘关系最近,同源性达到96%;近日有研究发现,SARS-CoV-2已经演化出L和S两个亚型,二者之间在传播和致病能力上可能存在较大区别^[2-4]。SARS-CoV-2在人间传染性极强,且发病后存在发展为重症、甚至死亡的可能。因此,对感染者早发现、早隔离、早治疗十分关键。

1 诊断方案变迁及仍存在的问题

1.1 诊断标准

随着对新型冠状病毒肺炎(Corona virus Disease 2019, COVID-19)认识的不断加深,新型冠状病毒肺炎诊疗方案(简称诊疗方案)及其中的诊断标准也在不断进行着更新和完善。在诊疗方案(第一版)中,疑似病例主要根据患者的流行病学史和临床表现进行判断,并主要依靠对其标本的病毒全基因组测序进行确诊。随着核酸测试剂盒的面世,在随后的诊疗方案(第二版)至诊疗方案(第六版)中,疑似病例的病原学检查确诊标准更新为:实时荧光RT-PCR检测病毒核酸阳性或病毒基因测序结果与已知的新型冠状病毒高度同源;而最新的诊疗方案(第七版)则在前版的基础上增加了对疑似病例血清学检查确诊的选项:血清新型冠状病毒特异性IgM抗体和IgG抗体阳性;血清新型冠状病毒特异性IgG抗体由阴性转为阳性或恢复期较急性期4倍及以上升高。值得一提的是,在诊疗方案(第五版)及其修订版中对于湖北省内还特别增加了“临床诊断病例”,该诊断主要基于疑似病例合并肺炎影像学特征做出,这一改变在短期内使当地大量待收治的患者得到了诊断和及时收治;但对“确诊病例”的诊断,不论是对湖北省内还是省外,仍规定应进行相关的病原学检测方能确诊。在诊疗方案(第六版)和诊疗方案(第七版)中,对湖北省内外的诊断标准已无区别^[5]。

确诊标准中另一个主要变化是病毒检测标本的取样方式和位置。诊疗方案(第一版)规定采集痰液、咽拭子等呼吸道标本;在第二至第三版中增加了下呼吸道分泌物;第四至第五版中在增加了血液和粪便标本后,又特别强调了呼吸道和血液标本的检测;在最新的第六和第七版中则指出检测下呼吸道标本(痰或气道抽取物)更加准确。这些变化提示,随着对SARS-CoV-2及其所引起肺炎的临床和基础研究不断加深,诊疗方案仍有必要根据形势及时进行更新与修订。

1.2 疑似病例的排除和出院标准

目前最新的诊疗方案(第七版)对疑似病例的排除做出了规定:疑似病例连续两次SARS-CoV-2核酸检测阴性(采样时间至少间隔24小时)且发病7天后SARS-CoV-2特异性抗体IgM和IgG仍为阴性可排除疑似病例诊断。在患者出院标准的规定中,除了要求体温恢复正常3天以上、呼吸道症状明显好转和肺部影像学显示急性渗出性病变明显改善外,还要求连续两次痰、鼻咽拭子等呼吸道标本核酸检测阴性,且规定采样间隔时间至少24小时^[5]。然而,最近徐海波等^[6]在其研究中发现有4例已经符合出院或解除隔离标准的COVID-19患者在5至13天后RT-PCR复检结果却为阳性。这进一步引起了人们对少部分康复患者是否仍可能是病毒携带者和潜在传染源的担忧。随着临床治愈患者的不断增加,思考并尝试回答这一问题尤为重要。

2 核酸检测

新型冠状病毒作为一种新出现的病原体,很难用病毒分离培养方法在较短时间进行临床检测。因此,基于病毒基因组测序和实时荧光定量RT-PCR法等的核酸检测技术成为最早用于确诊新型冠状病毒感染的病原学手段。

2.1 病毒基因组测序

基因组测序以其在新发病原体检测方面的优势,在疫情早期病原学诊断及病毒基因组序列的鉴定上做出了巨大贡献。疫情爆发之初,我国科研团队最早在5天内就完成了对新型冠状病毒基因组的鉴定分析,并公开了基因组序列^[7-9],为接下来的临床筛查、诊断和治疗赢得了宝贵的时间。

2.2 基于扩增技术的病毒核酸检测

随着新型冠状病毒基因组序列的公布,国内外多个团队迅速据此设计出了基于 RT-PCR 技术的检测方法,这些技术多采用 TaqMan 探针法,其引物探针设计主要集中在 ORF1ab、E 基因和 N 基因^[10,11]。这为及时发现感染者并进行隔离治疗提供了可靠的实验室手段,为疫情控制提供了依靠。与常规 PCR 技术相比,恒温扩增技术的优势在于整个反应可在一个温度下完成,规避了频繁的升降温过程,使检测耗时更短、操作安全性增加,更适合不具备 PCR 实验设备及条件的基层医疗机构用于开展病毒检测和诊断。目前,国家药品监督管理局(National Medical Products Administration, NMPA)已经应急批准了 10 个可用于临床检测的新型冠状病毒核酸检测试剂,有效缓解了实验室诊断能力不足的问题。

2.3 CRISPR 技术

除了上述检测方法之外,张峰团队^[12]研制了一种基于 CRISPR 技术检测新型冠状病毒 RNA 的方法,并将其开发成了一种即时检验(point-of-care testing, POCT)产品,其特点在于不依赖复杂仪器,一小时内即可在试纸条上呈现检测结果。目前该方法尚处于验证阶段,还不能直接应用于临床。

2.4 局限性

病毒核酸假阴性是基于扩增技术的检测方法在临床应用中遇到的最大挑战。即使是在确诊病例中,SARS-CoV-2 核酸检测阳性率也仅有 30%~50%。从病程角度考虑,患者从感染到症状出现,潜伏期平均为 5.2 天^[13],因此在感染极早期阶段,患者样本中病毒载量低于试剂检测下限是有可能的,此时需要连续数次采集标本进行检测才能降低假阴性率。此外,近日公布的对新型冠状病毒感染患者的微创组织活检和尸体解剖结果均显示,SARS-CoV-2 主要感染部位在人体下呼吸道及肺部^[14-15]。但采集肺泡灌洗液由于操作复杂、操作者的暴露风险大,临床应用受限。尽管指南强调留取痰液对提高检出率的重要性,然而部分病患仅有干咳或无咳嗽症状,痰液采集较为困难,因此临床仍以上呼吸道的鼻咽拭子采集为主,而鼻咽拭子采集随机性较高,受采样技术影响较大。一项对 18 例患者的 72 个鼻咽拭子的检测结果分析提示,在上呼吸道样本中鼻拭子的病毒载量高于咽拭子^[16]。可见,采样部位的复杂性以及采样不

精准是造成假阴性的重要原因之一。据 Yang 等^[17]报道,有些患者在出现症状后约 5~6 d,咽拭子和痰液样本中的病毒载量达到峰值,而另有部分患者在住院期间,痰液样本中病毒载量会发生波动,结合部分患者达到出院标准后核酸复检阳性这一事实,推测 SARS-CoV-2 很可能有间歇性排毒现象,这对于病毒核酸的检测十分不利,如能在当前政策的基础上,适当严格疑似病例的排除和出院标准,例如增加采样部位或检测次数,将有利于控制疫情传播^[6]。考虑到 SARS-CoV-2 是 RNA 病毒,多数医院由于条件受限,需要将样本运送到当地疾病预防控制中心或第三方实验室进行检测,而运输过程中的降解可能是造成假阴性的另一个原因。另外,就试剂质量而言,早期的引物设计参考序列有限,加上应急审批流程,不少试剂并未得到足够数量的临床标本进行验证^[18]。而且,往往只有在出现症状 5 天内从咽拭子中分离出的病毒才具有复制活性^[19]。因此,感染后不同时间、不同部位病毒核酸检出的实际临床意义仍有待进一步研究。

引物和探针选取靶点的不同会影响扩增效率和检测灵敏度,进而影响弱阳性样本的检出。因此有必要通过全国协作获得尽可能多时间和地理上无关的 SARS-CoV-2 临床分离株,通过二代测序分析,进一步评估病毒突变的程度,提高对病毒变异规律的认识,以促进更为保守序列的确定和兼容引物、探针的设计,实现检测试剂的更新换代。同时,大力研发高敏核酸检测试剂,及早发现处于低病毒潜伏期的感染者,将有利于疫情控制。

3 抗-SARS-CoV-2 特异性抗体检测

机体发生感染性疾病后也可通过抗体检测进行快速诊断,检测的靶标主要是针对不同病原体产生的特异性抗体。IgM 被认为是初次体液免疫应答中最早出现的抗体,通过检测病毒特异性 IgM 可早期诊断病毒感染;IgG 在血清中略晚于 IgM 出现,但其对病毒感染仍具有辅助诊断价值,而且,因在血清中维持时间较长,IgG 还可应用于流行病学调查^[20]。目前临床上常用于抗体检测的方法主要有免疫胶体金技术和酶联免疫吸附测定。

3.1 免疫胶体金技术

免疫胶体金诊断技术起源于上世纪 80 年代,它是一种以胶体金为标记物,在免疫分析中对样

本中蛋白等生物大分子进行定性检测的免疫学技术。最近,多家单位共同研发出了 SARS-CoV-2 IgM 和 IgG 抗体胶体金检测试剂盒,并以核酸检测结果作为参考,对已知样本进行了检测。结果发现,以核酸检测阳性人群为阳性对照,健康人群为阴性对照,IgM 或 IgG 单独检测时的灵敏度分别为 79% 和 73%,特异度分别为 98% 和 99%;而二者联合检测时,灵敏度和特异度分别达到了 88% 和 98%。进一步检测核酸阴性的疑似患者样本,结果发现 IgM 和 IgG 联检时,该人群中阳性检出率高达 66%^[21]。这说明,抗体检测对 COVID-19 有很好的辅助诊断价值。胶体金法抗体检测具有操作简便、耗时短、灵敏度高等优点,但其缺点是无法进行定量,临床上往往只用于快检初筛。

3.2 酶联免疫吸附测定

与胶体金快速检测法相比,酶联免疫吸附法以其精确定量能力在抗体检测中有独特的优势。近日一项小样本调查研究发现,COVID-19 患者入院时,使用酶免法检测血清中 SARS 相关冠状病毒 (SARSr-CoV) IgM 和 IgG 滴度往往较低或呈阴性,而到第 5 天时,几乎所有患者都出现了抗体阳转或水平升高。其中 IgM 阳性率从 50% 提高到了 81%,IgG 阳性率则从 81% 提高到了 100%,而这些患者并非全部可检出核酸阳性^[22]。这说明,使用酶免法对 SARSr-CoV IgM 和 IgG 进行检测,可有效提高感染患者检出率,使可能感染新型冠状病毒的人群能被更早鉴别出来。近日,也有基于磁微粒化学发光法的 SARS-CoV-2 IgM 或 IgG 检测试剂通过 NMPA 应急审批。

3.3 抗-SARS-CoV-2 特异性抗体检测的潜在应用价值

根据既往有关 SARS-CoV 的文献报道,患者在出现症状后大约一周时血清中即可检测到针对 SARS-CoV 的特异性抗体,其中 IgM 在感染后数周迅速达到峰值,之后逐渐下降,而 IgG 则可在更长时间内维持高水平状态^[23-25]。在最近更新的诊疗方案(第七版)中,抗-SARS-CoV-2 IgM 和 IgG 检测已被纳入,该举措可以弥补单核酸检测假阴性带来的漏诊,使更多患者尽早被筛检出来,实现早诊治、早隔离,避免感染扩散。而且,鉴于 SARS-CoV-2 为新发病原体,目前对它了解不足,后续的血清流行病学调查仍需进行,抗-SARS-CoV-2 IgG 的检测对于明确其传播途径、流行病学规律和感染转归

等具有非常关键的作用。

截至目前,尚未见报道称有患者在急性感染 SARS-CoV-2 后发生了慢性化,尽管感染 SARS-CoV-2 所致的危重患者病死率较高,但危重患者在所有感染者中所占比例并不高,还有相当比例的确证感染者(病毒核酸检测阳性)无症状或为轻症病例。由此可以推测,COVID-19 很可能属于自限性的感染性疾病,对于这类疾病,建立有效的特异性免疫是机体清除病原体的主要方式,虽然这种免疫反应也很可能引起继发的病理损伤,进而导致患者病情加重。中和抗体是指能消除病毒感染性或细菌毒素生物学效应的抗体,对于 SARS-CoV-2 来说,中和抗体很可能通过封闭 S 刺突蛋白的受体结合区域来阻断病毒感染。Alexandra 等^[26]的最新研究发现,SARS-CoV S 小鼠多克隆血清可有效抑制 SARS-CoV-2 病毒进入靶细胞,结合 COVID-19 康复者血清对患者具有显著疗效的临床事实,初步推测机体在暴露于 SARS-CoV-2 后的确有可能自发产生中和抗体。如果能通过进一步的临床和流行病学研究确证 SARS-CoV-2 感染的自限性,那么 SARS-CoV-2 中和抗体的产生是否能够提示病毒已发生清除,这是一个亟需探讨的问题。综上所述,目前将抗-SARS-CoV-2 抗体检测纳入疑似病例排除和确诊标准中是及时且必要的,未来抗-SARS-CoV-2 IgG 能否作为判定治愈的实验室检测指标亦值得考虑。

4 展望

近期 NMPA 在批准了基于测序和 RT-PCR 技术的核酸检测试剂用于临床诊断后,又批准了 2 个基于胶体金法和 2 个基于磁微粒化学发光法的 SARS-CoV-2 抗体检测试剂盒。抗体检测试剂的推出方便了社区卫生服务中心及基层医院的早筛早诊,增加了检测和诊疗的时效性,进一步满足了疫情高发区对新型冠状病毒感染的实验室诊断需求。考虑到 SARS-CoV-2 此前从未在人间流行的事实,诊疗方案(第七版)中加入血清学抗体诊断的内容非常及时,但前提是要保证抗体试剂与其它病原体特别是在人间季节性流行的引起普通感冒的病原体抗体无交叉反应。抗体检测的纳入将有助于减少漏诊,避免疫情进一步扩散,而对这类人群的早诊断早隔离将对当地疫情控制起到极大的积极作用。此外在疫情高发区,针对抗-SARS-

CoV-2 IgG 的检测是否需要坚持遵守间隔一定时间抗体滴度 4 倍升高的限制仍值得商榷;最后,在持续开展疫情防控工作的同时,建议及早开展新型冠状病毒感染流行病学调查,这将有利于更好地认识疫情的发生、发展过程,对今后的防疫工作将具有极大的现实意义。

参考文献

- [1] 段昭君,谭文杰,鲁凤民. 中东呼吸综合征冠状病毒感染[J]. 中国病毒病杂志, 2013, 3(4): 245-249.
- [2] 中国-世界卫生组织新型冠状病毒肺炎联合考察组. 中国-世界卫生组织新型冠状病毒肺炎(COVID-19)联合考察报告. 2020.02.16-24. <http://www.nhc.gov.cn/jkj/s3578/202002/87fd92510d094e4b9bad597608f5cc2c.shtml>
- [3] Tang X, Wu C, Li X, et al. On the origin and continuing evolution of SARS-CoV-2[J]. Natl Science Rev 2020.
- [4] Jiang S, Shi ZL. The First Disease X is Caused by a Highly Transmissible Acute Respiratory Syndrome Coronavirus [J]. Virol Sin, 2020.
- [5] 国家卫生健康委员会. 新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第一到七版). 2020. http://www.nhc.gov.cn/yzygj/ggwsylglc/new_list.shtml
- [6] Lan L, Xu D, Ye G, et al. Positive RT-PCR Test Results in Patients Recovered From COVID-19[J]. JAMA, 2020.
- [7] Wu F, Zhao S, Yu B, et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China[J]. Nature, 2020.
- [8] Zhu N, Zhang D, Wang W, et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019 [J]. N Engl J Med, 2020, 382(8): 727-733.
- [9] Zhou P, Yang XL, Wang XG, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin [J]. Nature, 2020.
- [10] Chu DKW, Pan Y, Cheng S M S, et al. Molecular Diagnosis of a Novel Coronavirus (2019-nCoV) Causing an Outbreak of Pneumonia [J]. Clinical Chemistry, 2020.
- [11] Corman VM, Landt O, Kaiser M, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR [J]. Euro Surveill, 2020, 25(3):2000045.
- [12] Zhang F, Gootenberg JS, Abudayyeh OO. A protocol for detection of COVID - 19 using CRISPR diagnostics. <https://broad.io/herlockprotocol>
- [13] Li Q, Guan X, Wu P, et al. Early Transmission Dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus - Infected Pneumonia [J]. N Engl J Med. 2020; 10.1056/NEJMoa2001316.
- [14] Xu Z, Shi L, Wang Y, et al. Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome [J]. Lancet Respir Med, 2020, S2213-2600(20)30076-X.
- [15] 刘茜,王荣帅,屈国强,等. 新型冠状病毒肺炎死亡尸体系统解剖大体观察报告. 法医学杂志[J]. 2020, 36(1): 19-21.
- [16] Zou L, Ruan F, Huang M, et al. SARS-CoV-2 Viral Load in Upper Respiratory Specimens of Infected Patients [J]. N Engl J Med, 2020; 10.1056/NEJMc2001737.
- [17] Pan Y, Zhang D, Yang P, et al. Viral load of SARS-CoV-2 in clinical samples [J]. Lancet Infect Dis, 2020; S1473-3099(20): 30113-30114.
- [18] 郭元元,王昆,张宇,等. 6种国产新型冠状病毒核酸检测试剂检测性能比较与分析[J/OL]. 重庆医学: 1-10[2020-03-04].
- [19] Roman W, Victor MC, Wolfgang G, et al. Virological assessment of hospitalized cases of coronavirus disease 2019 [J]. medRxiv preprint doi: <https://doi.org/10.1101/2020.03.05.20030502>.
- [20] 刘运德,楼永良. 临床微生物学检验技术[M]. 人民卫生出版社:北京, 2015:40-42.
- [21] 李晖,李咏茵,张志高,等. 新型冠状病毒(2019-nCoV)抗体胶体金检测方法的建立与临床性能评价[J]. 中华传染病杂志, 2020, 38.
- [22] Zhang W, Du RH, Li B, et al. Molecular and serological investigation of 2019-nCoV infected patients: implication of multiple shedding routes [J]. Emerg Microbes Infect, 2020, 9(1):386-389.
- [23] 李刚,陈雪娟,陈文思,等. 20例 SARS 患者特异性抗体变化规律[J]. 中国免疫学杂志, 2003(6):372-374.
- [24] Shi Y, Wan Z, Li L, et al. Antibody responses against SARS-coronavirus and its nucleocapsid in SARS patients [J]. J Clin Virol, 2004, 31(1):66-68.
- [25] Li G, Chen X, Xu A. Profile of specific antibodies to the SARS-associated coronavirus [J]. N Engl J Med, 2003, 349(5):508-509.
- [26] Walls AC, Park YJ, Tortorici MA, et al. Structure, function and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein [J]. Cell, 2020.

新型冠状病毒 SARS-CoV-2 基因检测及其影像学对照

雷松菁¹ 王刚平^{2*} 周刚³ 宋旭² 周志厚² 王伟光³ 李晶晶²

[摘要] **目的** 研究新型冠状病毒(SARS-CoV-2)核酸基因检测及其影像学对照。**方法** 实时荧光 RT-PCR 方法检测 SARS-CoV-2 ORF1a/b 和 N 基因,分析 23 例 SARS-CoV-2 核酸阳性患者临床及影像学资料。**结果** ①无症状感染者 3 例,COVID-19 确诊 20 例,潜伏期 2~24 天,成人轻型 5 例,儿童轻型 1 例,青年轻型 1 例,成年普通型 13 例。②23 例 SARS-CoV-2 基因阳性患者,痰标本的病毒含量和检测效果高于鼻咽拭子标本,N 基因粪便比痰和鼻咽拭子阳性持续时间长。③20 例 COVID-19 中,30.0%(6/20) CT 扫描未见异常。病毒载量与影像学无正比对应关系。④发病部位以外周带(13/14)和下叶后基底段(11/14)多见,两个或多个肺叶受累(11/14),双侧病变(11/14)。⑤14 例 CT 异常 COVID-19 中,影像学主要表现为毛玻璃影(10/14)、双肺斑片状阴影(10/14)、晕征(8/14)、细网格征(5/14),以及伴发小叶间隔增厚(5/14)、支气管充气征(5/14)和小血管增粗影(5/14)。**结论** 病毒载量与影像学无正比对应关系,SARS-CoV-2 核酸检测联合 CT 扫描、流行病学史可以提高 COVID-19 的检出率,不能孤立仅仅依靠核酸 PCR 检查或 CT 检查。

[关键词] 严重急性呼吸综合征冠状病毒 2;新型冠状病毒肺炎;实时荧光定量 PCR

Comparative observation between SARS-CoV-2 gene detection and CT imaging of patients with COVID-19

LEI Songjing¹, WANG Gangping^{2*}, ZHOU Gang³, SONG Xu², ZHOU Zhihou², WANG Weiguang³, LI Jingjing²

(1. Department of medical imaging, Weihaiwei People's Hospital, Weihai, Shandong, China, 264200; 2. Rizhao People's Hospital Affiliated to Jining Medical University & Rizhao clinical medicine research center of Molecular Medicine, Rizhao, Shandong, China, 276826; 3. Rizhao Center for Disease Control and Prevention, Rizhao, Shandong, China, 276826.)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the relationship between novel severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) nucleic acid detection and imaging data. **Methods** Real-time fluorescent RT-PCR was used to detect the SARS-CoV-2 ORF1a/b and nucleocapsid (N) genes, and the clinical and imaging data from 23 patients with SARS-CoV-2 nucleic acid positive were analyzed. **Results** ① There were 3 cases of asymptomatic infection, 20 cases of COVID-19 confirmed with incubation period from 2 to 24 days, 5 cases of adult and 1 case of children are mild type. One mild case was young, 13 cases of adult general type. ②Twenty-three SARS-CoV-2 gene-positive patients had higher virus content and detection

基金项目:日照市科技研发项目(2019KJYF319)

作者单位:1.威海卫人民医院影像科,山东,威海 264200

2.日照市人民医院中心实验室&临床分子诊断中心,日照市精准医学重点实验室,日照市分子临床医学研究中心,山东,日照 276826

3.日照市疾病预防控制中心,山东,日照 276826

*通信作者:王刚平, E-mail: wgprph93@126.com

effect in sputum specimens than in nasopharyngeal swab specimens, and N-gene feces had a longer duration of positive than sputum and nasopharyngeal swabs. ③ Among 20 cases of COVID-19, 30.0% (6/20) CT scans showed no abnormalities, and 70.0% (14/20) were abnormal. There is no proportional relationship between viral load and imaging. ④ It is more common in the peripheral zone (13/14) and posterior basal segment (11/14) of the inferior lobe, involving two or more lung lobes (11/14), and bilateral lesions (11/14). (5) In 14 cases of CT abnormality COVID-19, the imaging findings mainly include ground glass shadow (10/14), patchy shadows of lungs (10/14), halo sign (8/14), and fine mesh sign (5/14), accompanied by thickening of lobular septum, bronchial inflation signs, and coarse blood vessels (5/14, respectively). **Conclusion** There is no positive correlation between viral load and CT imaging changes. SARS-CoV-2 nucleic acid detection combined with CT scanning, epidemiological history can improve the detection rate of COVID-19.

[KEY WORDS] SARS-CoV-2; COVID-19; Viral nucleic acid testing; Real-time fluorescence quantitative PCR

全球暴发流行的新型冠状病毒肺炎(Corona virus disease 2019, COVID-19),其病原体是严重急性呼吸综合征冠状病毒2(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)^[1],是近年来发现的第7种能感染人的冠状病毒^[1,2],传染性强,人群普遍对其缺乏免疫力,WHO已经将此疫情列为国际关注的突发公共卫生事件^[3]。目前对其研究尚处于起步阶段,COVID-19病例RT-PCR呼吸道或血液标本检测SARS-CoV-2核酸阳性^[4],或测序与已知SARS-CoV-2高度同源。核酸PCR检测时间长在一定程度上影响了大范围疑似人群的快速预检分诊,可能导致漏诊;薄层CT扫描普及性高,检查快速,对筛查和初步诊断有重要作用^[5]。本组对收集的23例SARS-CoV-2阳性患者核酸检测、临床及影像学资料回顾性分析,以期对COVID-19防治及后续研究提供参考。

1 资料与方法

1.1 一般资料

2020年1月25日~2020年3月18日期间实时荧光RT-PCR方法检测样本6578人份,以23例SARS-CoV-2核酸阳性患者作为研究对象,日照市人民医院19例,其中无症状感染者3例,威海卫人民医院4例,COVID-19确诊20例,均有流行病学史,核酸检测302次,CT检查57次。

1.2 核酸提取及产物扩增

新型冠状病毒2019-nCoV核酸提取或纯化试剂盒(磁珠法)、Smart32全自动核酸提取仪、核酸检测试剂盒(荧光PCR法)购自中山大学达安基因股份有限公司,检测SARS-CoV-2开放读码框1a/b

(Open reading frame 1a/b, ORF1a/b)、核衣壳蛋白(Nucleocapsid protein, N)基因,取200 μL液态样本核酸提取,扩增采用ABI7500荧光定量PCR仪,(美国ThermoFisher公司)。

1.3 核酸检测质量控制及结果判读

质量控制采用每批次样本同时检测广州邦德盛生物科技有限公司2019-nCoV RNA第三方液体内质控品低值S1、检测试剂盒内源性检测系统(内标,IPC)、阴性质控品和阳性质控品检测。单个样本结果循环阈值(Cycle threshold, Ct值)参考值参照试剂盒要求:①当IPC曲线S型扩增,且ORF1a/b和N基因同时扩增阳性时($Ct \leq 40$),可判断样本SARS-CoV-2核酸阳性;②当IPC曲线S型扩增,且ORF1a/b和N基因均无明显扩增时($Ct > 40$),可判断样本SARS-CoV-2核酸阴性;③当IPC曲线S型扩增,ORF1a/b或N基因单通道扩增阳性时($Ct \leq 40$),重新采集标本复核,复核结果一致时,可判断为样本SARS-CoV-2核酸阳性,报告ORF1a/b或N单基因阳性;复核结果为双基因均阴性时,可判断为样本SARS-CoV-2核酸阴性。④当IPC曲线无明显S型扩增时,提示核酸提取失败,需重测该样本;若重测后IPC曲线仍无明显扩增,需重新采集标本进行检测。

1.4 影像学

CT扫描采用德国西门子Sensation 16排螺旋胸部薄层平扫,深吸气后屏气扫描,120 KV,层厚5 mm(薄层1 mm),仰卧位横断面螺旋扫描,自胸腔入口到肺下界膈面,扫描机架倾斜角度 0° ,扫描层厚5 mm,分析胸部CT影像学特征及动态变化。

1.5 统计学方法

通过 SPSS 23.0 版 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 统计软件进行数据分析, 计数资料采用例数或百分比表示, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 临床特征

检测样本 6578 人次, 23 例 SARS-CoV-2 感染核酸阳性, 年龄 5~63 岁, 男性: 女性 13: 10, 均有流行病学史, 其中无症状感染者 3 例 (13.0%), 确诊 COVID-19 患者 20 例 (87.0%)。确诊 COVID-19 患者 20 例中, 发热 20 例, 体温 $37.3^{\circ}\text{C} \sim 39^{\circ}\text{C}$, 咳嗽 14 例, 胸闷 7 例, 乏力 9 例, 腹泻 2 例。潜伏期 2~24 天, 轻症型 7 例 (成人轻型 5 例, 儿童轻型 1 例, 青年轻型 1 例); 普通型 13 例, 均为成年型, 无重型和危重型。

2.2 SARS-CoV-2 核酸检测结果

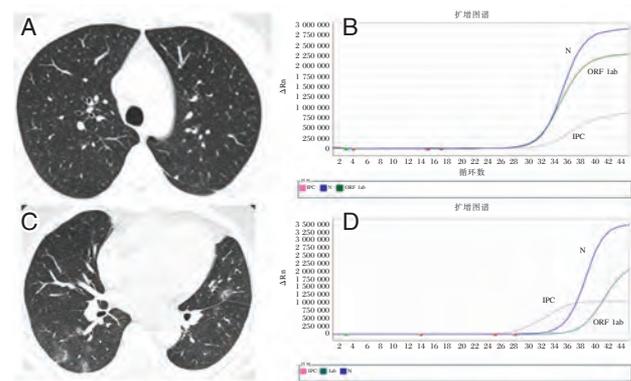
SARS-CoV-2 阳性 23 例核酸检测同时满足 4 重质量控制均合格, ORF1a/b、N 基因检测试剂盒内标 IPC 和阴性、阳性质控品检测及第三方 S1 低值室内质控品质控均合格。本组 23 例均动态检测咽拭子、鼻拭子、痰液或粪便液态样本 SARS-CoV-2 核酸, ORF1a/b、N 基因阳性, 痰标本的病毒含量和检测效果高于鼻咽拭子标本, ORF1a/b、N 基因阳性持续时间 6~35 天, 粪便 N 基因比痰和鼻咽拭子持续时间长。

2.3 COVID-19 患者影像学及核酸结果对照

23 例 SARS-CoV-2 阳性 CT 扫描显示, 9 例 (39.1%) CT 扫描无异常, 14 例 (60.9%) CT 扫描发现病变。20 例 COVID-19 中 30.0% (6/20) 临床有呼吸道症状, 但 CT 扫描未见异常, 70.0% (14/20) 肺脏影像学改变, 1 例密切接触史 11 天、出现症状第 9 天、CT 在影像学改变 7 天 SARS-CoV-2 核酸检测方才阳性。本组结果显示, 不同患者 SARS-CoV-2 核酸检测 ORF1a/b、N 基因阳性与 CT 影像学无明显正相关, SARS-CoV-2 阳性但可双肺未见明显异常 (图 1A、B), 而双肺典型 COVID-19 影像学改变但 SARS-CoV-2 病毒载量可低于影像学无明显异常者 (SARS-CoV-2 之 ORF1a/b、N 基因扩增曲线 Ct 值数值大) (图 1C、D)。

2.4 COVID-19 影像学表现及动态随访

14 例 CT 异常者中 71.4% (10/14) 表现为毛玻璃影, 71.4% (10/14) 双肺斑片状阴影, 14.3% (2/14)



注: 图 A、B 为同一 COVID-19 患者, SARS-CoV-2 核酸阳性, 但 CT 双肺未见异常; 图 C、D 为另一患者, 双肺外周带多发磨玻璃样结节影及“网格状”改变, 但图 D ORF1a/b、N 基因扩增曲线 Ct 值大于图 B (后者病毒载量低于前者)

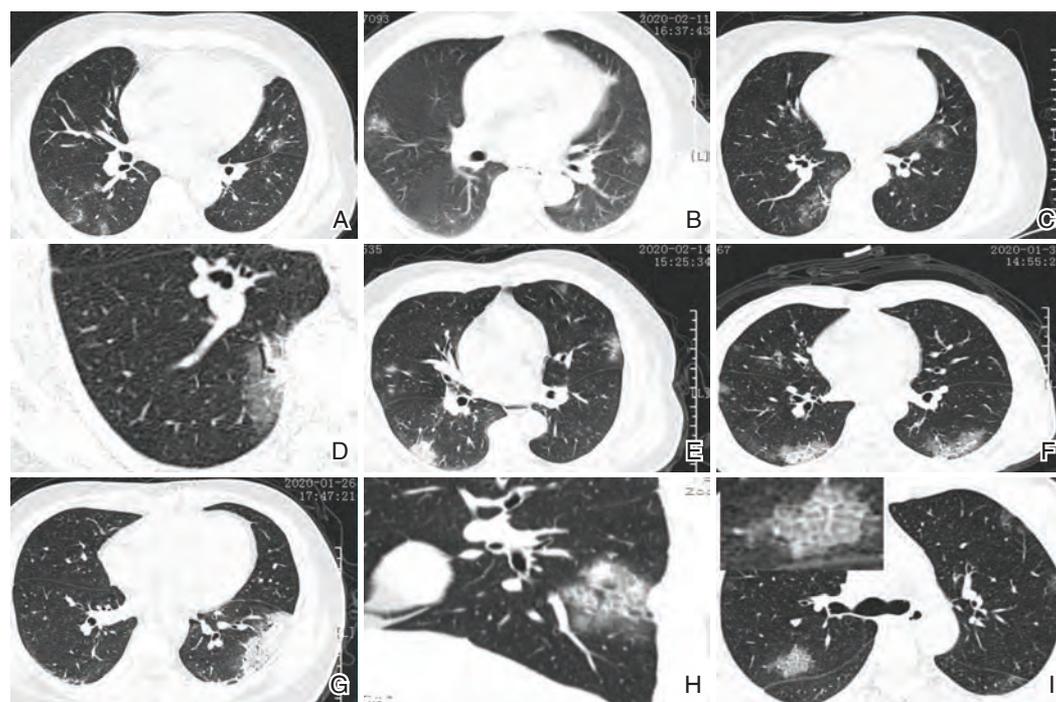
图 1 COVID-19 胸部影像学及 SARS-CoV-2 核酸结果对照

Figure 1 Comparison of the results of COVID-19 Patients chest imaging and SARS-CoV-2 nucleic acid

铺路石征, 35.7% (5/14) 细网格征, 28.6% (4/14) 实变, 7.1% (1/14) 双肺片状 GGO 伴节段性肺实变 1 例, 57.1% (8/14) 晕征, 7.1% (1/14) 小结节成呈反晕征; 35.7% 毛玻璃影伴小叶间隔增厚 (5/14); 35.7% (5/14) 支气管扩张 (充气征), 14.3% (2/14) 双肺弥漫性毛玻璃影伴支气管充气征; 35.7% (5/14) 小血管增粗影。92.8% (13/14) 位于外周带, 78.6% (11/14) 下叶后基底段, 78.6% (11/14) 有两个或多个肺叶受累, 78.6% (11/14) 有双侧病变。20 例 COVID-19 患者均行多次重复 CT 扫描动态观察, CT 随访 2~5 次, 3~14 d, 平均 8.7 d, 60% (12/20) 进展轻或中度, 表现为肺混浊程度和密度增加, 早期多发小斑片影及间质改变, 肺外带明显; 后进一步发展为双肺多发磨玻璃影、浸润影, 节段性肺实变。见图 2。

3 讨论

SARS-CoV-2 是一种新型 β 属冠状病毒, 是继 α -冠状病毒的 HCoV-229E 和 HCoV-NL63, β -冠状病毒的 HCoV-OC43、HCoV-HKU1、SARS-CoV 和 MERS-CoV 之后, 冠状病毒科中的第七个感染人类成员^[2]。我国将新型冠状病毒肺炎纳入法定乙类传染病, 并采取甲类传染病的防控措施^[6]。本组病例潜伏期 2~24 天, 其中 1 例解除 14 天隔离观察期后 10 天发病, 对 COVID-19 和 SARS-CoV-2 认识随着病例的增多而深入。



注:A、B 双肺外周带斑片状磨玻璃影; C、D 左肺上叶舌段、右肺下叶后基底段斑片状磨玻璃密度影,右肺下叶充气支气管征及伴行增粗的迂曲血管(图D为图C放大图像); E 双肺多发斑片状密度增高影,右肺下叶外带实变病灶内支气管征; F 双肺外带斑片状增高影,下叶为重,部分实变,周围呈晕征,小叶间隔增厚呈网格状影,胸膜局部增厚; G 左肺下叶外基底段斑片状实变影合并支气管充气征,胸膜增厚; H 矢状位显示,右肺下叶后基底段片状密度增高影,边缘“晕征”,小叶间隔增厚“网格状”改变; I 双肺磨玻璃影,右肺上叶铺路石征(角图为放大图片)。

图2 COVID-19 影像学表现

Figure 2 Image manifestation of COVID-19

CT 等影像学技术在 COVID-19 早期诊断、疾病分期分级、治疗指导、疗效评价及动态观察中具有重要价值,主要以胸部高分辨率 CT(HRCT)为主,层厚可 ≤ 1 mm,是当前筛查与诊断 COVID-19 的主要手段之一^[6]。部分患者早期胸部 CT 就表现出典型的肺炎特征,双肺多发磨玻璃影,伴支气管充气征、部分实变和小叶间隔增厚,“铺路石征”及血管影增粗。急性期病变密度相对均匀,吸收期不均匀致密影多见,文献报道约 30%~40% 患者 CT 影像特征符合 COVID-19 表现,但核酸检测阴性。SARS-CoV-2 核酸检测技术影响因素较多,包括受检测试剂、判读标准、病毒感染病程病毒载量不同以及拭子取样方法等,不同厂家产品质量和稳定性差别也会影响检测效果。

SARS-CoV-2 核酸检测阳性病人,本组高达 39.1% HRCT 扫描阴性,这是由于 SARS-CoV-2 潜伏期长,感染患者可以呈现完全正常的 CT 扫描。本组 COVID-19 患者一般 1~5 天 CT 扫描才显示病变,需动态随访 HRCT。而影像学异常,SARS-

CoV-2 核酸检出的时间也不一样,本组 1 例 9 天后鼻拭子、咽拭子、痰和粪便多样本核酸检测才检出。本组结果显示 SARS-CoV-2 核酸结合 HRCT 能明显提高确诊率。SARS-CoV-2 的攻击目标主要是 II 型肺泡上皮细胞因此患者下呼吸道症状和影像学明显^[7],这也解释了本组痰比鼻咽拭子核酸更易检出。SARS-CoV-2 也可攻击消化道,引起腹泻、恶心、呕吐等症状^[8-10],但较少见,也可神经系统损害出现相应症状^[10]。建议 SARS-CoV-2 核酸检测的样本多样,多次动态检测。核酸检测阳性往往滞后,本组 1 例 CT 异常后 7 天核酸检测才阳性,1 例潜伏期 24 天核酸检测才阳性,故,COVID-19 应遵循临床症状、影像学 and 核酸分子学诊断三结合。

解剖病理学显示双侧弥漫性肺泡损伤伴纤维粘液性渗出,肺透明膜形成,肺水肿,间质淋巴单核细胞浸润^[11-12]。SARS-CoV-2 通过受体 ACE2 进入细胞,并利用丝氨酸蛋白酶 TMPRSS2 激活 S 蛋白^[13],进入细支气管上皮细胞引起肺间质改变,包

括肺小叶内、肺小叶间及小叶中心间隔改变,胸膜下间质增生,血管周围水肿,进而累及肺泡,上皮脱落和肺透明膜形成^[12,14]。本组 CT 薄层扫描显示 COVID-19 最常见的表现为双侧磨玻璃影以及伴发影像学改变,如伴发支气管充气征、小血管增粗影,伴实变影,伴小叶间隔增厚网状改变,在双肺外带,以下肺多见,主要分布在肺的后部和周围。实变可作为疾病进展标志。影像学 COVID-19 随访首选胸部 HRCT^[14-15]。本组 CT 显示由磨玻璃影向斑片影及实性进展,密度增加,范围增大,吸收与新发病变混合,“此起彼伏”征象,新发与吸收混杂。本组无重症期危重症病例。

SARS-CoV-2 核酸检测联合 CT 扫描、流行病学史可以提高 COVID-19 的检出率,病毒载量与影像学不成正相关,COVID-19 和 SARS-CoV-2 发现时间较短,目前尚缺乏无动物模型进行相关验证性实验,本组病例较少,这需要多中心研究者贡献样本量继续深入研究。

参考文献

- [1] 国际病毒分类委员会将新型冠状病毒命名为 SARS-CoV-2 [OL]. <http://www.chinanews.com/gj/2020/02-12/9088314.shtml>.
- [2] Zhu N, Zhang D, Wang W, et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019 [J]. *N Engl J Med*, 2020, Jan. DOI: 10.1056/NEJMoa2001017.
- [3] 中华人民共和国国家卫生健康委员会宣传司. 世卫: 新型冠状病毒感染的肺炎疫情构成国际关注的突发公共卫生事件 [EB/OL]. (2020-01-31) [2020-02-05]. <http://www.nhc.gov.cn/xcs/s3574/202002/3fdf885083e5470090728ede3c7f7e4b.shtml>.
- [4] 匡慧慧, 于梅, 于帅, 等. 新型冠状病毒实验室核酸检测方法及实践. *中华医院感染学杂志*, 2020, 30(6): 806-809.
- [5] 中国研究型医院学会感染与炎症放射学专业委员会, 等. 新型冠状病毒肺炎影像学辅助诊断指南 [J/OL]. *中国医学影像技术*: 1-11 [2020-03-12]. <https://doi.org/10.13929/j.issn.1003-3289.2020.03.001>.
- [6] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 新型冠状病毒感染的肺炎纳入法定传染病管理 [EB/OL]. (2020-01-20) [2020-02-05]. <http://www.nhc.gov.cn/jkj/s7916/202001/44a3b8245e8049d2837a4f27529cd386.shtml>.
- [7] Benvenuto D, Giovannetti M, Ciccozzi A, et al. The 2019-new coronavirus epidemic: Evidence for virus evolution [J]. *J Med Virol*, 2020. doi: 10.1002/jmv.25688.
- [8] Chen N, Zhou M, Dong X, et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: A descriptive study [J]. *Lancet*, 2020.
- [9] Zhang H, Kang Z, Gong H, et al. The digestive system is a potential route of 2019-nCoV infection: a bioinformatics analysis based on single-cell transcriptomes [J/OL]. *BioRxiv* (2020-01-31) [2020-02-25]. <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.01.30.927806v1>.
- [10] 中国疾病预防控制中心. 新型冠状病毒感染的肺炎公众防护指南 [EB/OL]. (2020-01-28) [2020-02-25]. <http://www.nhc.gov.cn/jkj/s7915/202001/c661e49b5bc487ba182f5c49ac445b.shtml>.
- [11] Xu Z, Shi L, Wang Y, et al. Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. *The Lancet Respiratory Medicine*. doi: 10.1016/s2213-2600(20)30076-x
- [12] Tian S, Hu W, Niu L, et al. Pulmonary pathology of early phase 2019 novel coronavirus (COVID-19) pneumonia in two patients with lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2020 Feb 27. pii: S1556-0864(20)30132-35. doi: 10.1016/j.jtho.2020.02.010. [Epub ahead of print]
- [13] SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically-proven protease inhibitor. DOI: 10.1016/j.cell.2020.02.052.
- [14] 汪翊, 刘曦娇, 宋彬, 等. 新型冠状病毒肺炎胸部 CT 影像表现 [J]. *西部医学*, 32(4): 469-475.
- [15] Xie X, Zhong Z, Zhao W, et al. Chest CT for Typical 2019-nCoV Pneumonia: Relationship to Negative RT-PCR Testing. [J]. *Radiology*, 2020.

• COVID-19 专栏 •

2种国产新型冠状病毒核酸检测试剂检测结果的比较与分析

丁晓燕 柯志意 朱秀云 郑海霞 袁静 潘延超 张明霞*

[摘要] **目的** 对不同的新型冠状病毒(SARS-CoV-2)核酸检测试剂的检测结果进行比较和分析,以供实验室参考。**方法** 收集本院2月9日至2月11日期间共101例检测SARS-CoV-2核酸的临床样本,用两种国产试剂盒进行平行检测,根据检测结果比较试剂盒差异。**结果** 101例样本中试剂A阳性32例(阳性率31.68%),阴性56例(阴性率55.45%),试剂B阳性35例(阳性率34.65%),阴性53例(阴性率52.48%),两组对比,差异无统计学意义($\chi^2=0.2169, P=0.8972$)。试剂单通道结果统计发现两种试剂盒N检测位点检出率较ORF1a/b检测位点检出率高,其中试剂A两个通道的检出率分别为ORF1a/b:31.68%,N:44.55%;试剂B为ORF1a/b:35.64%,N:40.59%且14例确诊患者检测结果显示两种试剂盒对于N位点检出的Ct值非常接近。**结论** 本研究中两种SARS-CoV-2核酸检测试剂的检出率无明显差异,两种试剂盒的N位点检出率都较ORF1a/b高,且两种试剂盒对于N基因检测结果相似。

[关键词] 新型冠状病毒;核酸检测;试剂盒

Comparative analysis of detection performance between two domestic new coronavirus nucleic acid detection reagents

DING Xiaoyan, KE Zhiyi, ZHU Xiuyun, ZHENG Haixia, YUAN Jing, PAN Yanchao, ZHANG Mingxia*
(The Third people's Hospital of Shenzhen Institute of Hepatology, Shenzhen, Guangdong, China, 518112)

[ABSTRACT] **Objective** To compare and analyze the detection results of different novel coronavirus (SARS-CoV-2) nucleic acid detection reagents for reference in the laboratory. **Methods** A total of 101 remaining nucleic acid samples were collected for clinical testing in our hospital on February 9 and 11, and two domestic kits were used for parallel testing to perform nucleic acid amplification. The performance of the samples was compared according to the test results of each reagent. **Results** Among the 101 samples, 32 were positive for reagent A (positive rate 31.68%), 56 were negative (negative rate 55.45%), 35 were positive for reagent B (positive rate 34.65%), and 53 were negative (negative rate 52.48%). The difference was not statistically significant ($\chi^2=0.2169, P=0.8972$). According to the single channel results of the kit, the detection rate of the N detection site of the two kits was higher than that of ORF1a/b, the detection rates of two channels of reagent A were ORF1a/b: 31.68%, N: 44.55%, respectively. Reagent B were ORF1a/B: 35.64%, N: 40.59%. The detection results of the N detection site of the two kits were very similar in the samples of 14 confirmed patients. **Conclusion** There is no significant difference in the detection rates of the two 2019-ncov nucleic acid detection reagents. The detection rates of the N sites of the two kits are higher than those of ORF1a/b, and the results of the two kits for the N gene detection are similar.

[KEY WORDS] SARS-CoV-2; Nucleic acid detection; Reagent

基金项目:深圳市第三人民医院三名工程团队(SZSM201512005)

作者单位:深圳市第三人民医院肝病研究所,广东,深圳 518112

*通信作者:张明霞, E-mail: zmxmby@outlook.com

2019年12月,在中国武汉市爆发了由新型冠状病毒(Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2, SARS-CoV-2, 此前称2019-nCoV)引起的肺炎疫情,随后在全中国乃至全世界引起流行。2019-nCoV传染性强,主要经过呼吸道飞沫传播或者接触传播^[1],短期内造成了大量人群的感染,严重危害了人类健康。

当前新型冠状病毒肺炎(Corona Virus Disease 2019, COVID-19)的确诊一般需要结合流行病学、临床表现和病原学证据,并且目前病毒病原学检测对新型冠状病毒肺炎的诊断起决定性作用。病毒病原学检测主要针对病毒的核酸进行检测分析,现2019-nCoV的核酸检测主要有两种方法^[2],一种是对患者呼吸道、血液或粪便等标本中病毒颗粒的核酸进行实时荧光定量聚合酶链式反应(Quantitative Real-time PCR, qPCR)分析;另一种是进行基因测序,由于基因测序耗时长,成本较高,所以对病毒核酸进行qPCR是当前阶段的主要检测方法。核酸检测具有早期、敏感、特异性高、易操作等优势^[3],但是对于核酸检测结果的准确性还需要考虑样本类型、样本质量、实验因素、试剂盒性能和患者病程等方面,所以在以病毒核酸检测阳性是新型冠状病毒肺炎诊断金标准的情况下,试剂盒的准确性和灵敏性凸显其重要性。

本研究对深圳市定点收治医院(深圳市第三人民医院)2020年2月9日到2月11日期间用两种国产核酸检测试剂盒检测的101份样本结果进行了对比,评价不同试剂盒检测性能有无差异,从而发现和提出目前2019-nCoV核酸检测试剂盒需要改进之处,提高临床检测的准确性。

1 资料与方法

1.1 临床资料与试剂

1.1.1 临床资料

经医院伦理委员会批准同意(批件号[2020-061]号),采集2020年2月9日和2月11日期间深圳市第三人民医院疑似和确诊的新型冠状病毒肺炎患者的鼻咽拭子和痰液,共101例,其中男性48例,女性53例,平均年龄(42.02±19.25)岁,提取核酸进行检测。

1.1.2 主要试剂与仪器

本研究中所有样本核酸提取采用磁珠法RNA提取试剂盒及其配套的核酸纯化仪(杭州博日科

技有限公司),q-PCR系统均为ABI 7500(美国Thermo Fisher);选取2个不同企业生产的试剂盒,分为A、B两个实验组,其中A组试剂[A试剂购自达安基因,新型冠状病毒2019-nCoV核酸检测试剂盒(荧光PCR法),批号:2020007为本院在用的临床诊断COVID-19的实验室参考试剂,即本院判断临床样本结果以A试剂结果为参考]。B组试剂[B试剂购自泰乐德,新型冠状病毒(2019-nCoV)核酸检测试剂盒(PCR-荧光探针),批号:20200102]。

1.2 方法

1.2.1 检测方法

实验及相关医护人员均严格按照《医疗机构临床基因扩增检验实验室管理办法》(卫办医政发[2010]194号)^[4]、《国家卫生健康委办公厅关于印发新型冠状病毒实验室生物安全指南(第二版)的通知》(国卫办科教函[2020]70号)^[5]及《新型冠状病毒感染的肺炎实验室检测技术指南(第二版)》^[6]等相关文件进行实验操作和生物安全防护。

每份样本同时使用A组和B组试剂进行平行检测,操作过程严格按照说明书进行。核酸扩增:使用ABI 7500 PCR仪根据不同厂家试剂说明书设置反应程序、扩增检测并对结果进行阴性、阳性判定。质量控制:每批实验均带阴性和阳性对照,阴性和阳性对照检测结果在控,则该批次实验有效,反之无效。

1.2.2 数据处理

采用GraphPad Prism 7.00软件进行数据分析。计数资料用 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两种试剂的基本情况的比较

两种核酸检测试剂盒均使用PCR-荧光探针法,且均为双靶标检测,检测基因类型均为ORF1a/b和N基因。其中试剂A包含内源性检测系统(内标基因探针采用Cy5标记),其检测灵敏度为500 copies/mL;而试剂B检测灵敏度为3 000 copies/mL。两种试剂盒体系配制、RNA上样量、荧光检测和扩增程序及结果判读方面稍有差异。本研究采用的标本类型包括鼻拭子、咽拭子和痰液,均包含在这两种试剂盒用途范围内。见表1。

2.2 两种试剂检测结果比较

根据试剂盒说明书,将本次实验结果无法判

表1 两种试剂基本情况比较

Table 1 Compare the basic case of the two reagents

试剂	检测基因	荧光采集温度和扩增循环数	结果判断			最低检测限 (copies/mL)	PCR反应上样量 (μL)	是否含内标
			阳性	阴性	可疑			
A组	ORF1a/b、N	55°C, 45cycles	双通道CT值 ≤40	双通道CT值 ≥40或无CT值	单一通道CT值 ≤40	500	5	是
B组	ORF1a/b、N	60°C, 45cycles	双通道CT值 ≤38	双通道CT值 ≥45或无CT值	单一通道CT值 ≤38	3000	4	否

断阴阳性记为可疑,即A组中仅有单一通道≤40的样本记为可疑;B组中单一通道<38或者两个通道Ct值均在38到45之间的记为可疑。试剂A阳性率为31.68%,阴性率为55.45%;B试剂阳性率为34.65%,阴性率为52.48%。差异无统计学意义(P<0.05),见表2及图1。

表2 两种试剂检测结果比较

Table 2 The result of the 2 reagents

A组	B组			合计	χ²值	P值
	阳性	阴性	可疑*			
阳性	31	0	1	32	0.2169	0.897
阴性	0	52	4	56		
可疑	4	1	8	13		
合计	35	53	13	101		

2.3 两种试剂盒对两个基因的检测效果比较

为分析试剂盒对检测位点ORF1a/b基因和N基因的检测效果,分别对检测的101例样本进行了

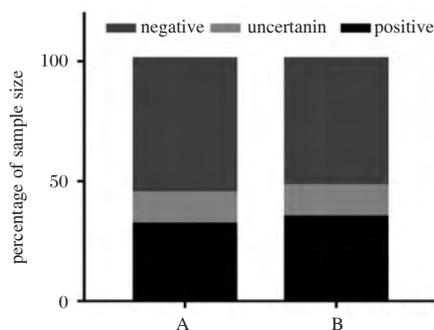


图1 两种试剂检测结果图

Figure 1 The test results of the two reagents

单个基因的检出结果统计,根据各试剂盒说明书,将无法判断阴阳的记为无效,即将A组中检测出Ct值但是Ct值大于或等于40记为无效;将B组中Ct值范围在38~45(包括端点值)之间的记为无效。分析发现,A、B两种试剂盒对N片段检出率均大于对ORF1a/b的检出率见表3。

表3 两种试剂单通道检测率分析[n(%)]

Table 3 Single-channel detection rate analysis of 2 reage [n(%)]

基因	A组(n=101)			B组(n=101)		
	阳性率	阴性率	无效率	阳性率	阴性率	无效率
ORF1a/b	32(31.68)	56(55.45)	13(12.87)	36(35.64)	58(57.43)	7(6.93)
N	45(44.55)	52(51.49)	4(3.96)	41(40.59)	56(55.45)	4(3.96)

2.4 两种试剂检测结果的相关性分析

为比较两种试剂盒检出Ct值的相关性,本研究在101例样本选取其中符合《国家卫生健康委办公厅关于印发新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第六版)的通知》(国卫办医函[2020]145号)^[7]相关标准的14例临床确诊为COVID-19患者样本,比较其qPCR Ct值,随后进行相关性分析。可知在确诊患者的检测结果中A试剂盒的Ct值在ORF1a/b位点的数值较B试剂盒偏高,而在N位点两种试剂盒检测结果非常相近。见表4和图2。

3 讨论

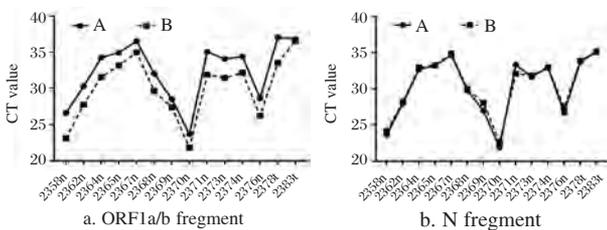
新型冠状病毒是属于网巢病毒目(Nidovirales)下的冠状病毒科(Coronaviridae),病毒颗粒由基因组和结构蛋白组成,其基因组是线性单股正链RNA^[8],包含7~14个开放阅读框(Open reading frame, ORFs),从5'端开始,基因1包含基因组的三分之二,长度为20~22 kb,由两个重叠的开放阅读框1a和1b组成,共同起着病毒RNA聚合酶(Pol)的作用。而结构蛋白一般有3种:核衣壳

表4 两种试剂盒对14例阳性样本检测Ct值

Table 4 Ct values of 14 positive samples

样本编号	A组		B组	
	ORF1a/b	N	ORF1a/b	N
2358n	26.57	23.72	23.15	24.22
2362n	30.25	28.02	27.72	28.21
2364n	34.24	32.71	31.55	32.97
2365n	34.92	33.23	33.15	33.29
2367n	36.54	34.69	34.97	34.93
2368n	32.02	29.80	29.60	30.01
2369n	28.45	27.01	27.34	28.10
2370n	23.72	21.94	21.84	22.61
2371n	35.02	33.37	31.85	32.13
2373s	34.06	31.65	31.45	31.88
2374n	34.39	33.02	32.16	32.99
2376n	28.62	26.74	26.18	27.47
2378t	37.05	33.70	33.51	33.91
2383t	36.80	35.25	36.59	35.12

注:本研究中样本编号均由四位数字+字母构成,其中数字为样本号码,字母为样本类型(n:nose 鼻拭子;t:throat 咽拭子;s:sputum 痰液)



注:a. ORF1a/b 基因; b. N 基因

图2 两种试剂检测14例阳性样本检测结果图

Figure 2 The results of 14 positive samples tested by 2 reagents

(Nucleocapsid, N)蛋白、突刺(Spike, S)蛋白、跨膜(Membrane, M)蛋白^[9]。

qPCR 检测新型冠状病毒核酸阳性是新冠肺炎诊断的金标准,该方法是将 2019-nCoV 的全基因组 RNA 序列上高度保守的序列片段作为目标序列,现行的 2019-nCoV 核酸检测基本都是采用该病毒的开放阅读框 1a/b 和核衣壳蛋白基因区域为检测位点^[8]。本实验中使用的两种试剂盒的靶点也是 2019-nCoV 的 ORF1a/b 位点和 N 位点,同时检测两种靶标,可以提高临床诊断效率。

本研究用两种国产试剂对 101 例样本进行了检测,结果显示本研究现使用的试剂盒性能相近,但是其具体效果如何仍需要继续分析,并且两个试剂盒的可疑率均为 12.87%,因为在实验室检查中对可疑的样本需要进行复测,在面对大量样本时这无疑会加大检验人员的工作量,所以如何降

低可疑率也是值得探讨的问题。

统计 101 例样本中,试剂 A 和试剂 B 各自的单通道检测结果,发现两种试剂对 N 片段的检出率均大于 ORF1a/b 片段的检出率,推测两种试剂盒中 N 片段的敏感性较 ORF1a/b 片段灵敏,一般而言,敏感性与特异性呈负相关,所以本实验中两种试剂盒的 N 片段特异性较 ORF1a/b 片段低,但是是否当前 2019 nCoV 检测试剂盒中 N 片段特异性都较 ORF1a/b 片段低,还需要进行深入分析。

本研究在 101 例样本中选出 14 例确诊病人的结果进行两种试剂盒检出的 Ct 值进行相关性分析,发现两种试剂盒对于两个通道的结果相关性较强,对于 ORF1a/b 位点试剂 A 检出的 Ct 值较试剂 B 高,而对于 N 位点的检出结果非常相近,推测两种试剂盒 N 片段的检测性能较 ORF1a/b 更接近。

参考文献

- [1] 詹菁,刘倩,张雨竹,等. 新型冠状病毒 2019-nCoV 的一些初步认识[J/OL]. 环境化学:1-9[2020-02-26].
- [2] 国家卫生健康委办公厅,中医药局办公室. 新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第五版 修正版)[EB/OL]:2020-02-09. http://www.gov.cn/zhengce/zhengceku/2020-02/09/content_5476407.htm
- [3] 郭元元,王昆,张宇,等. 6 种国产新型冠状病毒核酸检测试剂检测性能比较与分析[J/OL]. 重庆医学:1-10[2020-02-26].
- [4] 贾明,王虹,宋春利,王坤. 新型冠状病毒肺炎文献整理及研究概述[J/OL]. 陕西医学杂志, 2020(3):259-260-261-262-263-266[2020-02-26].
- [5] 国家卫生部办公厅,国家卫生健康委员会医政医管局办公室. 医疗机构临床基因扩增检验实验室管理办法[DB/OL].(2010-12-06)[2010-12-10]. <https://www.51mch.com/uploadfiles/2016/11/201611151432113211.pdf>
- [6] 国家卫生健康委办公厅,科技教育司办公室. 新型冠状病毒实验室生物安全指南(第二版)[DB/OL].(2020-01-23)[2020-02-06]. <http://news.sciencenet.cn/htmlnews/2020/1/435132.shtm>
- [7] 国家卫生健康委办公厅,科技教育司办公室. 新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第六版)[DB/OL].(2020-02-18)[2020-02-20]. http://www.gov.cn/zhengce/zhengceku/2020-02/19/content_5480948.htm
- [8] 中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所. 新型冠状病毒国家科技资源服务系统[EB/OL]:1,2020-02-08. <http://nmcdc.cn/nCoV>.
- [9] 刘昌孝,王玉丽,闫风英. 认识新型冠状病毒肺炎关注疫情防控药物研发[Z]. [J]:中国抗生素杂志, 2020, 45(2):1-10.

地中海贫血基因检测试剂盒抽验质量分析

张文新 于婷 孙楠 高飞 黄杰* 曲守方*

[摘要] 目的 按照国家体外诊断试剂抽验工作方案,从6家企业共抽检18批次试剂盒,评价地中海贫血基因突变检测试剂盒的质量。方法 依据企业各自的注册产品标准或产品技术要求,使用企业参考品或国家参考品对准确性、特异性、检测限和重复性4个项目进行检验,同时依据YY/T 1527-2017《 α/β -地中海贫血基因分型检测试剂盒》行业标准,使用统一的地中海贫血核酸检测国家参考品,对准确性、特异性和检测限3个项目进行探索研究。结果 18批次试剂均符合各自注册产品标准或产品技术要求,但与行业标准的要求比较,部分企业产品标准或产品技术要求存在缺项的现象。依据推荐性的行业标准,使用统一的国家参考品进行检测,有1批次试剂的检测限不符合行业标准的要求,其它批次试剂的结果均符合要求。结论 企业应根据发布的行业标准要求,及时补充完善自己的产品技术要求,并建议统一使用国家参考品进行检测,使试剂盒的质量评价具有可比性。

[关键词] 地中海贫血; 质量分析; 缺失型别; 突变型别

Quality analysis of thalassemia gene detection kit sampling

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

(Division of In Vitro Diagnostic for Non-Infectious Diseases, Institute for In Vitro Diagnostics Control, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing, China, 100050)

[ABSTRACT] **Objective** According to the National In vitro Diagnostic (IVD) Reagent Sampling Work Program, a total of 18 batches of kits were sampled from 6 companies to evaluate the quality of thalassemia gene mutation detection kits. **Methods** The accuracy, specificity, limit of detection and repeatability were verified in accordance with the product technical requirements by using the enterprise reference or national reference. Exploratory study for the accuracy, specificity, limit of detection was also conducted by using the national reference and referring to the industry standard of α/β -thalassemia gene typing detection kit. **Results** All 18 batches of testing reagents meet the product technical requirements, but the technical requirements of some enterprises have the phenomenon of missing item compared with the requirements of the industry standards. Based on the recommended industry standard, the unified national reference was used for testing. The detection limit of 1 batch of reagents does not meet the requirements of industry standards, and the results of other batches of reagents meet the requirements. **Conclusion** Enterprises should timely complete and improve their own product technical requirements according to the published industry standard requirements and recommend the uniform use of national reference products for testing to make the quality evaluation of the kits comparable.

[KEY WORDS] Thalassemia; Quality analysis; Deletion types; Mutation types

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非传染病诊断试剂室,北京 100050

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

注:张文新和于婷为并列第一作者,黄杰和曲守方为并列通信作者

地中海贫血(简称地贫)是最常见的一种常染色体单基因遗传病,它是由于人体珠蛋白基因突变或缺失,导致珠蛋白肽链生成障碍而引起一种或几种珠蛋白肽链生物合成不足或完全缺乏,从而引发的一种遗传性溶血性贫血^[1]。根据缺陷的珠蛋白类型,地贫可分为 α 、 β 、 δ 、 γ 等几种类型,其中 α -地贫和 β -地贫是最常见的地贫类型。 α -地贫(α -thalassemia)是一种由于 α 珠蛋白链的合成减少或者缺失所导致的常染色体隐性遗传疾病。大多数的 α -地贫是由于 α 珠蛋白基因的缺失所致,少数由基因点突变造成,常见类型有SEA、 $\alpha^{3.7}$ 、 $\alpha^{4.2}$ 、Constant Spring (Hb CS)和Hb Quong Sze (Hb QS)等^[2-3]。 β -地贫(β -thalassaemias)是一种由于 β 珠蛋白合成异常所导致的常染色体隐性遗传性疾病。 β -地贫最常见的突变类型是 β -珠蛋白基因点突变,少数为基因缺失,常见类型为CD41-42、IVS-II-654、CD17、CD71-72等^[4-5]。在我国常见于广东、广西、福建、海南、贵州、云南、四川、香港、台湾等地区,其中两广地区(广东和广西)乃地贫高发区。国家药品监督管理局批准的地中海贫血基因检测试剂盒,包括PCR-反向点杂交法^[6]、荧光PCR熔解曲线法^[7]、

PCR-导流杂交法^[8]、裂口PCR法(Gap-PCR)^[9]、PCR-流式荧光杂交法^[10]、PCR-荧光探针法和微阵列芯片法^[11]等。地中海贫血基因检测试剂盒属于三类体外诊断试剂,漏检、假阳性、交叉反应、检测限不合理、适用样本类型不明确及缺少内控为该类试剂的最大的风险点。因此按照国家医疗器械抽验项目计划,对抽样的6家企业18批次地中海贫血基因检测试剂盒进行监督检测和质量情况评估。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 抽样试剂盒及国家参考品

各省(区、市)食品药品监管部门结合体外诊断试剂国家监督抽验工作统筹安排,在规定期限内完成抽样、样品寄送和信息录入等工作。本次抽验共收到18个批次地中海贫血基因检测试剂盒,在生产环节(含进口总代理单位)抽到样品14批次,在使用环节抽到样品4批次,涉及6家生产企业。地中海贫血核酸检测国家参考品(批次:360014-201701),由中国食品药品检定研究院提供。抽验产品的相关信息,见表1。

表1 抽样试剂盒

Table 1 Sampling kits

序号	检品名称	生产单位
1	缺失型 α -地中海贫血基因检测试剂盒(Gap-PCR法)	深圳市亿立方生物技术有限公司
2	β 地中海贫血基因检测试剂盒(PCR探针法)	深圳益生堂生物企业有限公司
3	地中海贫血(α/β 型)基因检测试剂盒(PCR-流式荧光杂交法)	中山大学达安基因股份有限公司
4	非缺失型 α -地中海贫血基因检测试剂盒(荧光PCR熔解曲线法)	厦门致善生物科技股份有限公司
5	缺失型 α -地中海贫血基因检测试剂盒(荧光PCR熔解曲线法)	厦门致善生物科技股份有限公司
6	β -地中海贫血基因检测试剂盒(荧光PCR熔解曲线法)	厦门致善生物科技股份有限公司
7	α -地中海贫血基因突变检测试剂盒(gap-PCR法)	亚能生物技术(深圳)有限公司
8	非缺失型 α -地中海贫血基因突变检测试剂盒(PCR-反向点杂交法)	亚能生物技术(深圳)有限公司
9	β -地中海贫血基因检测试剂盒(PCR-反向点杂交法)	亚能生物技术(深圳)有限公司
10	地中海贫血基因检测试剂盒(PCR-反向点杂交法)	亚能生物技术(深圳)有限公司
11	α -地中海贫血基因检测试剂盒(PCR+导流杂交法)	广州凯普医药科技有限公司
12	β -地中海贫血基因检测试剂盒(PCR+导流杂交法)	广州凯普医药科技有限公司
13	α -和 β -地中海贫血基因检测试剂盒(PCR+膜杂交法)	广州凯普医药科技有限公司
14	α -、 β -地中海贫血基因检测试剂盒(PCR+导流杂交法)	广州凯普医药科技有限公司

1.1.2 仪器

医用核酸分子杂交仪(厂家及型号:广州凯普,HB-2012A)、恒温杂交仪(厂家及型号:深圳亚能,YN-H16)、全自动医用PCR分析系统(厂家及

型号:上海宏石,SLAN-96S)、实时荧光定量PCR扩增仪(厂家及型号:美国Bio-Rad,CFX96)、液相芯片悬浮检测仪(厂家及型号:美国Luminex,MAGPIX)、凝胶成像系统(厂家及型号:美国

Bio-Rad, Gel Doc XR+)。

1.2 方法

1.2.1 法定检验

按照企业注册产品标准/产品技术要求检验采用各企业提供参考品,分别检测对应抽检的检测试剂盒,检验项目包括准确性(阳性参考品符合率)、特异性(阴性参考品符合率)、检测限和重复性。按照各企业试剂盒说明书的操作步骤进行检测,最后对实验结果进行判定。为了验证抽验试剂盒的有效性,要求从生产环节和使用环节抽取相同批号的试剂进行测定。

1.2.2 探索性研究

YY/T 1527-2017《 α/β -地中海贫血基因分型检测试剂盒》行业标准于2018年4月1日正式实施。地中海贫血核酸检测国家参考品(批次:360014-201701),包括32份样本,均为基因组DNA,由临床样本建立的永生化细胞系提取获得,其中有3份正常样本,其余29份全部为地中海贫血基因突变的样本,涉及到9种 α -地中海贫血基因突变类型和20种 β -地中海贫血基因突变类型。依据行业标准,采用国家参考品,针对准确性、特异性、检测限3个项目开展探索性研究。

2 结果

2.1 法定检验结果

本次抽检共抽到18批次的地中海贫血基因检测试剂盒,使用企业参考品,按照各自的企业注册产品标准/产品技术要求进行检测,合格产品数量为18批次,占比为100%;不合格产品数量为0批次。

以缺失型 α -地中海贫血基因检测试剂盒(Gap-PCR法)为例,结果表明P1、PL1和R1均为 $\alpha\alpha/\alpha^{3.7}$ 型别,P2和PL2均为 $\alpha\alpha/\alpha^{4.2}$ 型别,P3和PL3均为 $\alpha\alpha/--^{THAI}$ 型别,P4、PL4和R2均为 $-\alpha^{4.2}/--^{SEA}$ 型别,N1-N4均为 $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ 型别;均符合相应的基因型别,见图1。

2.2 探索性研究结果

18个批次的试剂盒均符合行业标准中准确性和特异性规定;但是有1个批次产品的检测限设置为20 ng/ μ L(说明书规定的样本上样量为3 μ L或6 μ L),不符合行业标准中“检测限:不高于25 ng或4 000拷贝”,不适用于探索性研究的实验设计,而其它17个批次的试剂盒均符合行业标准中检测限规定。以缺失型 α -地中海贫血基因检测试剂盒

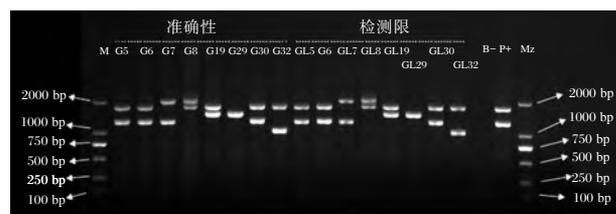


注:1. $-\alpha^{3.7}$ 片段大小为2.0 kb; $-\alpha^{4.2}$ 片段大小为1.4 kb, $--^{SEA}$ 片段大小为1.2 kb; $--^{THAI}$ 片段大小为0.9 kb; $\alpha\alpha$ 片段大小为1.7 kb; M为DNA Marker 2000; 2. P1P4为企业阳性参考品;PL1 PL4为企业检测限参考品;R1R2为企业重复性参考品;N1N4为企业阴性参考品。

图1 企业参考品实验结果

Figure 1 The results of the enterprise reference

(Gap-PCR法)为例,结果表明使用试剂盒检测范围内的国家阳性参考品进行检测,同时将这些参考品DNA稀释至企业声称的2 ng/ μ L检测限浓度进行检测,也都检出相应的基因型别,符合国家参考品的要求,即G5、G6、G30均为 $\alpha\alpha/--^{SEA}$,G7为 $-\alpha^{3.7}/--^{SEA}$,G8为 $\alpha\alpha/\alpha^{3.7}$,G19为 $\alpha\alpha/\alpha^{4.2}$,G29为 $-\alpha^{4.2}/\alpha^{4.2}$,G32为 $\alpha\alpha/--^{THAI}$,见图2。另外对试剂盒检测范围外的国家阳性参考品和国家阴性参考品进行检测,均为 $\alpha\alpha/\alpha\alpha$,没有交叉反应,符合国家参考品特异性要求,见图3和图4。



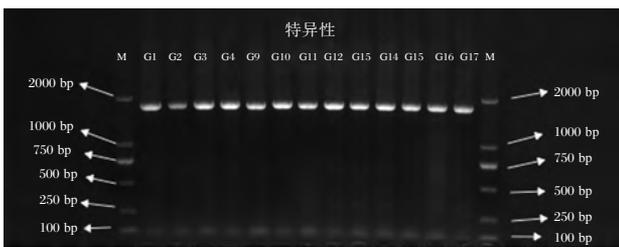
注:1. $-\alpha^{3.7}$ 片段大小为2.0 kb; $-\alpha^{4.2}$ 片段大小为1.4 kb, $--^{SEA}$ 片段大小为1.2 kb; $--^{THAI}$ 片段大小为0.9 kb; $\alpha\alpha$ 片段大小为1.7 kb; M为DNA Marker 2000; 2. G表示国家参考品,GL表示国家参考品检测限浓度

图2 国家参考品准确性和检测限实验结果

Figure 2 The results of the national reference for accuracy and detection limit

3 讨论

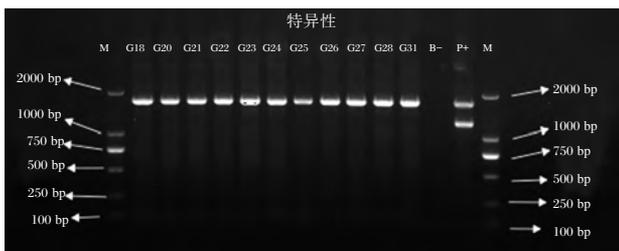
本次监督抽验工作是根据地中海贫血基因检测试剂盒的抽验方案,按照企业的注册产品标准或者技术要求,使用企业参考品或国家参考品进行检验,并出具检测报告。但是由于缺乏统一的评判标准,并不能对抽验的试剂盒质量做出客观的评价。目前国内现行有效的行业标准是YY/T 1527-2017《 α/β -地中海贫血基因分型检测试剂盒》,该标准于2017年3月28日发布,于2018年4



注:1. $-\alpha^{37}$ 片段大小为2.0 kb; $-\alpha^{42}$ 片段大小为1.4 kb, $-\alpha^{SEA}$ 片段大小为1.2 kb; $-\alpha^{THAI}$ 片段大小为0.9 kb; $\alpha\alpha$ 片段大小为1.7 kb; M为DNA Marker 2000; 2. G表示国家参考品。

图3 国家参考品特异性实验结果

Figure 3 The results of the national reference for specificity



注:1. $-\alpha^{37}$ 片段大小为2.0 kb; $-\alpha^{42}$ 片段大小为1.4 kb, $-\alpha^{SEA}$ 片段大小为1.2 kb; $-\alpha^{THAI}$ 片段大小为0.9 kb; $\alpha\alpha$ 片段大小为1.7 kb; M为DNA Marker 2000; 2. G表示国家参考品

图4 国家参考品特异性实验结果

Figure 4 The results of the national reference for specificity

月1日正式实施,属于推荐性行业标准。中国食品药品检定研究院在2017年发布了地中海贫血核酸检测国家参考品。在该标准实施之前申报的试剂盒,均按照各企业制定的注册产品标准或者技术要求为依据进行检验,因此检测指标差异较大,试剂盒的质量参差不齐。而且注册申报的企业均采用自制参考品进行检测,其真实有效性无法保障。所以在监督抽验的探索性研究中,同时按照行业标准的要求和采用国家参考品检验,作为统一的尺度,用于评价不同试剂盒的质量^[12]。

通过监督抽验工作,发现部分企业的产品标准或产品技术要求中的技术指标未按照行业标准的要求进行设置,有缺项或者内容不全的情况,例如未设置检测限项目,特异性项目中未设置对试剂盒检测范围外相应型别样本的检测;也发现部分企业的产品标准或产品技术要求中的技术指标低于行业标准的要求,例如重复性项目中重复检测的次数少于行业标准要求的次数,检测限项目检测的样本量高于行业标准要求的25 ng或4 000拷贝。因为行业标准的最低要求,建议企业应加强与实施的行业标准的一致性,而且应不低于

行业标准的要求^[13];同时建议标准管理部门应加强对实施的行业标准的宣贯工作。

另外发现部分企业的自制参考品全部为质粒或部分为质粒,并未采用临床样本或临床样本提取的基因组DNA,因此不能反映临床真实样本的结果,也无法正确评估试剂盒的临床适用性。在检测地中海贫血检测试剂盒(PCR-导流杂交法)时,发现企业在技术要求和说明书的结果判定中均没有给出质粒参考品的结果示意图,导致对于质粒来源的企业阳性参考品无法进行判读,需要企业另外提供补充资料才能进行结果判读。抽验中还发现企业提供的说明书存在着其它很多问题:①首先企业说明书中没有提供试剂盒检测范围内的所有类型的结果示意图,对纯合突变或复合突变的部分国家参考品和企业参考品无法进行判读;②某些产品在后期产品注册审批的过程中,有些突变位点并未获得批准,这些突变位点并不在试剂盒说明书预期用途的检测范围内,但试剂盒本身具备检测相应突变的能力。这些突变的参考品均需要企业另外提供补充资料才能进行判读,使检测人员在监督抽验和注册检测中缺乏可操作性。

本次监督抽验涉及的抽样企业数量不多,涉及6家生产企业(覆盖率为60%)的14个试剂盒(覆盖率为48%),建议今后应加大抽验力度和抽验范围,完善和优化抽样模式,使抽验结果可以反映该类产品的真实质量情况。建议将试剂盒的抽验结果作为有效的参考数据,将监督抽验作为一项延续性的工作,在不同年度通过连续跟踪的方式动态评价试剂盒的质量变化,督促企业不断改进产品质量。

参考文献

[1] 徐湘民,张新华,陈荔丽.地中海贫血预防控制操作指南[M].北京:人民军医出版社,2011:9-10.
 [2] 石明芳,杨兰,余夏,等.6545例 α -地中海贫血基因检测结果分析[J].检验医学,2019,34(1):8-10.
 [3] 王莉,王雄,鲁艳军,等.二代测序技术诊断1例杂合型血红蛋白Quong Sze[J].临床儿科杂志,2019,37(12):924-926.
 [4] 陈梅环,陈灵基,黄海龙,等.22 750例福建地区 β 地中海贫血基因检测结果及频率分析[J].中华检验医学杂志,2018,41(12):928-933.
 [5] 林雨虹,林伟,王晓贤.中国福建地区1474例地中海贫血基因检测结果分析[J].中国实验血液学杂志,2019,27(3):899-903.

(下转第304页)

· 论 著 ·

一种PCR检测耐甲氧西林金黄色葡萄球菌株新方法的建立

邢楣 符林琳*

[摘要] **目的** 建立一种PCR检测耐甲氧西林金黄色葡萄球菌株新方法。**方法** 收集2016年1月至2018年12月入住本院ICU的重症患者的脓液、分泌物、血液等标本中分离培养病原菌株,共43个样本,且均为初次分离所得。以*mecA*基因检测呈阳性为“金标准”,对样本分别进行实时荧光PCR检测和纸片扩散法检测。**结果** 实时荧光PCR方法检测法准确度高于头孢西丁及苯唑西林纸片扩散法;所有耐甲氧西林葡萄球菌对青霉素和苯唑西林药耐药性最强,对红霉素和克林霉素次之,对万古霉素、利奈唑胺、替加环素、利福平均表现为敏感,对四环素、庆大霉素等具备一定的敏感性。**结论** 新建立的荧光PCR检测法相比头孢西丁纸片扩散法和苯唑西林纸片扩散法不仅准确度高,而且特异性好,能够准确检测出耐甲氧西林金黄色葡萄球菌。

[关键词] PCR;耐甲氧西林金黄色葡萄球菌;*mecA*基因;头孢西丁;头孢西丁纸片扩散法

Establishment of a new method for detecting methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by PCR

XING Mei, FU Linlin*

(Department of Laboratory Medicine, Wenchang General Hospital, Wenchang, Hainan, China, 571321)

[ABSTRACT] **Objective** To establish a new PCR method for the detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. **Methods** Pathogenic bacteria strains were isolated and cultured from pus, secretions, blood and other specimens of severe patients admitted to ICU of our hospital from January 2016 to December, 2018. A total of 43 samples were collected. All strains originated from different patients and were obtained from initial isolation. Samples were detected by real-time fluorescence PCR and disk diffusion methods, respectively. **Results** The accuracy of real-time fluorescence PCR method was higher than that of cefoxitin and oxacillin disk diffusion method. All methicillin-resistant staphylococci are resistant to oxacillin and penicillin and more resistant to erythromycin and clindamycin. They are sensitive to vancomycin, linezolid, tigecycline, rifampicin, tetracycline, gentamicin. **Conclusion** Compared with cefoxitin and oxacillin disk diffusion methods, the newly established fluorescent PCR method not only has high accuracy, but also has good specificity, and can accurately detect methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.

[KEY WORDS] PCR; Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; *mecA* gene; Cefoxitin; Cefoxitin disk diffusion method

重症患者多为免疫力低下,抵抗细菌能力较低,长时间的住院治疗,易出现院内感染的问题,尤其是耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌的感染^[1]。金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, SA)具有

坚实的细胞壁,其对高温及干燥具有很强的抵抗力的一种革兰阳性球菌,80℃的条件下持续加热30 min才可能被杀灭^[2]。19世纪60年代,世界第一例耐甲氧西林金黄色葡萄球菌感染的患者在英

作者单位:文昌市人民医院检验科,海南,文昌 571321

*通信作者:符林琳, E-mail: fu.lin.lin@163.com

国被发现^[3]。在甲氧西林金黄色葡萄球菌中存在一种与 β -内酰胺类抗生素低亲和力结合蛋白PBP2a,而甲氧西林敏感葡萄球菌中并不具有这一蛋白^[4]。研究发现,这种蛋白是由*mecA*基因编码表达的存在于甲氧西林敏感葡萄球菌细胞的表面,对 β -内酰胺类抗生素有极低的亲和力^[5]。而*mecA*基因对于SA耐药性的产生具有至关重要的作用,细菌细胞之所以会产生耐受是由于PBPs会被这种*mecA*基因编码表达的蛋白抑制,从而使细菌在 β -内酰胺类抗生素存在时不能发挥正常生理功能。PBP2a可代替被抑制的PBPs发挥作用,进而促使细菌得以生存。根据2011年美国临床实验室标准化协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)推荐,可通过*mecA*基因的检测确认甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)^[6]。而既往比较常用的MRSA检测方法主要为纸片扩散法,但随着研究的深入,有研究发现,由于金黄色葡萄球菌表达情况的各不相同,纸片扩散法存在较大误差^[7]。基因聚合酶链反应(PCR)法被公认为临床金黄色葡萄球菌检测的标准^[8],但关于该实验方法与纸片扩散检查法的临床综合价值比较尚未明确。本试验主要通过分析不同检测方法对MRSA的检出情况,旨在探讨一种适合医院检测MRSA的简便而可靠方法。

1 材料和方法

1.1 标本来源

收集2016年1月至2018年12月入住本院重症加强护理病房(intensive care unit, ICU)的重症患者的脓液、分泌物、血液等标本中分离培养病原菌株,且均为初次分离所得,所有菌株均来源于不同患者。

1.2 实时荧光PCR检测

取样本液体1 mL, 10 000 rpm离心后去除上清液后,将事先配制好20 μ g/mL的溶葡萄球菌酶加入到刚离心后的菌体沉淀中,震荡器中震荡后,待混合均匀后放置在水浴箱中静置1 h,保持水温在37 $^{\circ}$ C,并注意随时观察离心管中的菌液是否会出现浑浊。待浑浊后,分别加入20 μ L Proteinase K溶液和220 μ L的GB缓冲液,放在微型混合器上进行充分震荡后,将其置于70 $^{\circ}$ C的干式金属浴恒温器中,10 min后,待溶液澄清透亮后,再加入

220 μ L的无水乙醇,在微型混合器上充分震荡后,待管内出现浑浊并伴随着絮状样沉淀物出现后进行离心,将上清液保存于-20 $^{\circ}$ C备用^[5]。然后根据耐甲氧西林*mecA*基因及*NUC*基因的保守区域来进行引物和TaqMan探针的设计由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,引物序列为上游引物:5'-TAGTTGTAGTTGTCGGGT-3',下游引物:5'-TATCGACGTTTCAGTCAT-3')并经BLAST来检验引物和探针的特异性。最后将提取的核酸进行PCR荧光检测,并将荧光进行收集,扩增条件为94 $^{\circ}$ C 3 min 1个循环,93 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 45 s,40个循环^[9]。耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌鉴定的标准^[10]见表1。

表1 快速检测MRSA结果判读标准

Table 1 Rapid detection of MRSA results interpretation criteria

金黄色葡萄球菌特异性核酸片段	耐药基因	结果判断
阳性	阳性	检测到MRSA
阳性	阴性	检测到MSSA
阴性	阳性	仅检测到 <i>mecA</i> 基因
阴性	阴性	未检测到金黄色葡萄球菌

1.3 纸片扩散法

头孢西丁及苯唑西林纸片扩散法(Kirby-Bauer, K-B法)均根据CLSI的标准来进行试验^[10]。质控菌株为ATCC26859,苯唑西林琼脂稀释法质控菌株为ATCC25399。MH及羊血培养基规格9 cm(江门凯林生产)。头孢西丁扩散纸片及苯唑西林扩散纸片的规格均为30 μ g(OXOID生产)。纸片扩散法步骤:选取纯培养的菌落将其配制成0.5麦氏单位的菌悬液,15 min内将校正过浓度的菌液接种完毕^[11]。判断标准^[8,12]:金黄色葡萄球菌:头孢西丁纸片上的抑菌圈>22为敏感,否则为耐药。苯唑西林纸片,抑菌圈的直径>12 mm为敏感,否则为耐药。它的凝固酶阴性葡萄球菌,头孢西丁纸片抑菌圈>25 mm为敏感,否则即为耐药,唑西林纸片抑菌圈直径>15 mm为敏感,否则为耐药。微量琼脂稀释法:用Microscan细菌鉴定仪测定苯唑西林最低抑制浓度(minimal inhibitory concentration, MIC),判断标准遵循临床实验室标准化委员会制定^[13]:MIC>4 μ g/mL为MRSA。

1.4 药敏试验及耐药性分析

采用API或全自动微生物分析仪(VITEK)鉴定系统(法国生物梅里埃公司)鉴定^[14]。细菌敏感性测定采用纸片扩散法(K-B法)。药敏试验:参照《全国临床检验操作规程》(第三版)^[15]进行。

2 结果

2.1 实时荧光PCR检测 *mecA* 方法和纸片扩散法检测结果的比较

43株金黄色葡萄球菌中实时荧光定量PCR方法检测到11例耐药金黄色葡萄球菌阳性,其中头孢西丁K-B法与苯唑西林K-B法中检测出的耐药金黄色葡萄球菌病例均在实时荧光PCR检测的结果中,见表2、图1。

表2 实时荧光PCR检测 *mecA* 方法和纸片扩散法检测结果的比较

方法	耐药例数	敏感例数
实时荧光PCR法	11	32
纸片扩散法		
头孢西丁K-B法	7	36
苯唑西林K-B法	8	35

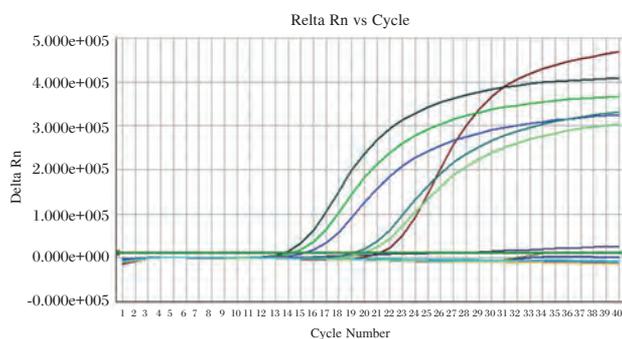


图1 样本中 *mecA* 基因实时荧光PCR检测结果
Figure 1 Results of real-time fluorescent PCR detection of *mecA* gene in the sample

2.2 耐甲氧西林菌株样本中耐甲氧西林金葡萄菌的检测结果

11例耐甲氧西林 *mecA* 基因阳性的样本中 *NUC* 基因阳性2例,这样不仅具有耐甲氧西林 *mecA* 基因还具有 *NUC* 基因的即为耐甲氧西林金黄色葡萄球菌。见表3、图2。

表3 耐甲氧西林菌株样本中耐甲氧西林金葡萄菌的检测结果

Table 3 Test results of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in methicillin-resistant strain samples

	凝固酶实验	头孢西丁K-B法	苯唑西林K-B法	<i>mecA</i> 基因	<i>NUC</i> 基因
1	-	>25	>12	+	-
2	-	<25	>12	+	-
3	+	>25	>12	+	+
4	-	>25	>12	+	-
5	-	>25	<12	+	-
6	-	>25	<12	+	-
7	-	<25	>12	+	-
8	+	>25	>12	+	+
9	-	>25	>12	+	-
10	-	>25	<12	+	-
11	-	>25	<12	+	-

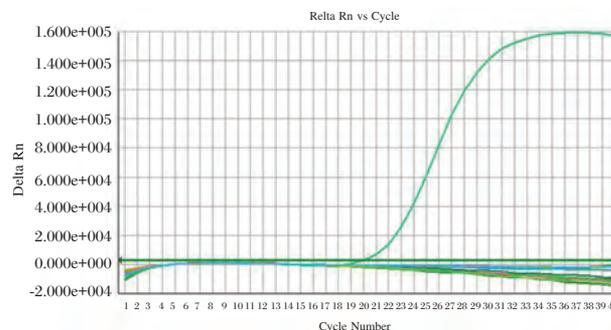


图2 样本中 *NUC* 基因实时荧光PCR检测结果
Figure 2 Results of real-time fluorescent PCR detection of *NUC* gene in the sample

2.3 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌耐药性分析

以 *mecA* 基因检测呈阳性为“金标准”,所有耐甲氧西林金葡萄球菌对青霉素和苯唑西林均表现出极强的耐药性,而在红霉素和克林霉素中耐药性较青霉素稍弱,对万古霉素、替加环素、利奈唑胺、利福平均表现为敏感,对四环素、庆大霉素等具备一定的敏感性,见表4。

3 讨论

金葡萄菌容易引起乳腺炎、疔、感染性休克、脓毒血症等常见疾病^[16]。耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的产生主要是由于金黄色葡萄球菌获得了一种外源性插入到MRSA的基因片段-*mecA*基因,这种基因片段能够编码产生低亲和力的青霉素结合蛋白(PBP)2a^[17]。传统的耐甲氧西林金黄色葡萄球

表4 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌耐药性分析
Table 4 Analysis of drug resistance of methicillin-resistant
Staphylococcus aureus

抗生素	MRSA
苯唑西林	100.00
青霉素	100.00
红霉素	79.65
环丙沙星	68.52
克林霉素	52.30
呋喃妥因	36.59
四环素	35.68
左氟氧沙星	30.10
莫西沙星	29.68
复方新诺明	19.85
庆大霉素	19.68
利福平	0.00
万古霉素	0.00
替加环素	0.00
利奈唑胺	0.00

菌的检测方法为苯唑西林纸片扩散法及MRSA筛选试验等,这些方法只能筛选出部分耐甲氧西林金黄色葡萄球菌,其准确度不能达到100%^[18]。*mecA*基因对于SA耐药性的产生有着至关重要的作用,同时*mecA*的表达会受到遗传背景等很多相关因素的影响,因此获得性*mecA*葡萄球菌的耐药水平从敏感到耐药具有很大差异^[19]。检测金黄色葡萄球菌上的*mecA*基因,可作为MRSA感染观测的一项分子标记^[20]。

根据以往的研究^[21]可知,PBP2a表达量的降低苛刻解除mecl蛋白对*mecA*基因的抑制作用,从而促使*mecA*活化,进而对苯唑西林耐药。故患者在治疗中应避免使用一内酰胺类抗生素,减少其耐药机会。而在本研究中,采用实时荧光PCR方法检测法准确度高于头孢西丁及苯唑西林纸片扩散法,且所有耐甲氧西林金黄色葡萄球菌对青霉素和苯唑西林均表现出极强的耐药性,而对红霉素和克林霉素中的耐药性较青霉素稍有降低,对利奈唑胺、替加环素、万古霉素、利福平均表现为敏感。由此可见,及时明确耐甲氧西林金黄色葡萄球菌存在并分析其药敏情况制定正确的治疗方案对患者具有极为重。结合以往研究^[22]和本组资料认为,实时荧光定量PCR较传统检查方法检测具有更加快速和准确的特点,且本组研究中所使用的利用实时荧光定量PCR的方法设计了针对*mecA*基因的引物和Taqman探

针,以快速而特异的检测,引起金黄色葡萄球菌对甲氧西林等 β -内酰胺类抗菌药物耐药的基因*mecA*。通过对各指标和条件的优化使检测过程中的反应体系和反应条件均达到最佳。且有研究^[23-24]显示,在实时荧光定量PCR检测过程中,实时荧光定量PCR可以在PCR反应过程中直接检测荧光信号,无需配胶、电泳等步骤,可以更加快速有效地鉴别出MRSA,且可以对靶位基因进行定量检测,由此更高程度地提高了检测结果的准确性。

综上所述,在采用*mecA*基因作为目标基因检测出的耐甲氧西林葡萄球菌基础上,再以金黄色葡萄球菌特异性凝固酶基因*NUC*基因特异性引物探针检测来测定。与头孢西丁纸片扩散法和苯唑西林纸片扩散法相比较而言,前者检测其是否为耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的准确度更高,特异性更好,能够更准确检测出耐甲氧西林金黄色葡萄球菌,值得进一步研究推广。

参考文献

- [1] Ray GT, Suaya JA, Baxter R. Incidence, microbiology and patient characteristics of skin and soft-tissue infections in a U.S. Population: a retrospective population-based study [J]. BMC Infect Dis, 2013, 30(13):252.
- [2] 李晓梅,耿艺介.金黄色葡萄球菌及其肠毒素B的生物学特性[J].中国热带医学,2007,7(4):206-208.
- [3] 姚岚,马琳,惠艳.社区获得性耐甲氧西林金黄色葡萄球菌感染的研究现状[J].中华医院感染学杂志,2011,21(22):306-308.
- [4] 中华医学会甲氧西林耐药金黄色葡萄球菌感染治疗策略专家组.中华医学会感染与抗微生物治疗策略高峰论坛:甲氧西林耐药金黄色葡萄球菌感染的治疗策略-专家共识[J].中国感染与化疗杂志,2017,11(6):401-416.
- [5] 高秀杰,李杰,刘红军.耐甲氧西林金黄色葡萄球菌实时荧光PCR检测方法的建立和评价[J].分子诊断与治疗杂志,2009,1(1):6.
- [6] 陈旭,肖淑珍,董丹凤,等.实时荧光定量PCR在快速检测耐甲氧西林金黄色葡萄球菌中的应用评估[J].检验医学,2012,27(12):1035-1039.
- [7] 黎文君.耐甲氧西林金葡萄菌检测方法比较[J].现代仪器与医疗,2015,20(1):74-75.
- [8] 杨波.MecA基因聚合酶链反应扩增法与细菌鉴定仪法对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的鉴定比较及药敏分析[J].实用医技杂志,2017,23(2):146-148.
- [9] 王俊瑞,杜小莉,塔拉,等.甲氧西林耐药/敏感金黄色葡萄球菌基因分型和毒力基因检测[J].中国感染与化疗杂志,2015,15(1):70-75.

(下转第291页)

· 论 著 ·

血清 VEGF、pro-ADM 水平与老年呼吸机相关性肺炎病情严重程度及预后的关系

袁娟^{*} 白义春²

[摘要] 目的 研究血清血管内皮生长因子(VEGF)、前肾上腺髓质素(pro-ADM)水平对老年呼吸机相关性肺炎(VAP)病情严重程度与预后的关系。方法 选择本院2015年7月至2018年7月住院患者中机械通气的时间>2天的410例患者资料,有76例为VAP。按患者病情的严重程度分成低危组(26例)、中危组(30例)及高危组(20例),根据患者的临床结局分成存活组(57例)和死亡组(19例),采取ELISA方法测定各组血清VEGF及pro-ADM的水平,对各组的VEGF和pro-ADM水平差异以及两者之间的相关性进行比较,并评价血清VEGF、pro-ADM水平对VAP病情严重程度与预后的关系。结果 VAP组的血清VEGF含量、pro-ADM较非VAP组显著升高($P<0.05$);3组间血清的VEGF、pro-ADM水平比较结果:低危组<中危组<高危组,差异有统计学意义($P<0.05$)。相关分析示:在VAP组中,患者的血清VEGF含量与pro-ADM含量呈正相关($r=0.864, P=0.000$)。ROC曲线的分析显示:血清VEGF曲线下面积(ACU):0.804(95%CI: 0.752~0.856),最佳工作点:130.8 pg/mL,此时则判定VAP患者的预后不良特异性为62.90%及敏感度为73.70%;pro-ADM ACU:0.748(95%CI: 0.693~0.804),最佳工作点:3.12 nmol/L,此时则判定VAP患者的预后不良特异性为93.70%及敏感度为86.80%。结论 在老年呼吸机相关性肺炎患者中,血清VEGF含量与pro-ADM含量呈正相关,VEGF含量越高,pro-ADM含量越高,患者的病情越重,其预后越差,通过联合检测血清VEGF与pro-ADM含量可有效预测老年呼吸机相关肺炎患者病情的严重程度和临床预后,有较高的实用价值。

[关键词] 血管内皮生长因子;前肾上腺髓质素;老年;呼吸机相关性肺炎;预后

Relationship between serum VEGF and pro-ADM levels and the severity and prognosis of elderly patients with ventilator-associated pneumonia

YUAN Juan^{1*}, BAI Yichun²

(1. Department of Respiratory Medicine, the Third Affiliated Hospital of Xinxiang Medical College, Xinxiang, Henan, China, 453000; 2. Xinxiang Medical College, Xinxiang, Henan, China 453000)

[ABSTRACT] Objective To investigate the relationship between serum vascular endothelial growth factor (VEGF) and preadrenomedullin (pro-ADM) levels and the severity and prognosis of elderly ventilator-associated pneumonia (VAP). Methods A total of 410 patients were recruited for this study. They were admitted to our hospital from July 2015 to July 2018 for a period of mechanical ventilation >2 days, of which 76 were VAP. According to the severity of the disease, patients were divided into low-risk group (26 cases), intermediate-risk group (30 cases) and high-risk group (20 cases). Based on the clinical outcome, patients were divided into survival group (57 cases) and death group (19 cases). ELISA method was used to determine

基金项目:国家自然科学基金(31802024)

作者单位:1. 新乡医学院第三附属医院呼吸内科,河南,新乡453000

2. 新乡医学院,河南,新乡453000

*通信作者:袁娟, E-mail: jiaodonghuang@163.com

the serum VEGF and pro-ADM levels in each group. The differences in VEGF and pro-ADM levels in each group and the correlation between them were compared. The relationship between serum VEGF, pro-ADM levels and the severity of VAP and prognosis was evaluated. **Results** The serum VEGF and pro-ADM levels in the VAP group were significantly higher than those in the non-VAP group ($P<0.05$); among the three groups: low-risk group <medium-risk group <high-risk group ($P<0.05$). Correlation analysis showed that in the VAP group, the serum VEGF level was positively correlated with the pro-ADM ($r=0.864$, $P=0.000$). Analysis of the ROC curve showed that the area under the serum VEGF curve (ACU): 0.804 (95% CI: 0.752~0.856), and the best operating point: 130.8 pg/mL. Under this condition, the specificity of the poor prognosis of VAP patients was determined to be 62.90%. And sensitivity was 73.70%; pro-ADM ACU: 0.748 (95% CI: 0.693~0.804), the best working point: 3.12 nmol/L, the specificity of poor prognosis of VAP patients was determined to be 93.70% and sensitivity is 86.80%. **Conclusion** In elderly patients with ventilator-associated pneumonia, the serum VEGF level is positively correlated with the pro-ADM. The higher the VEGF and pro-ADM levels, the heavier the patient's condition, and the worse the prognosis. The combined detection of serum VEGF and Pro-ADM can effectively predict the severity and clinical prognosis of elderly patients with ventilator-associated pneumonia, having high practical value.

[KEY WORDS] Vascular endothelial growth factor; pro-adrenomedullin; The elderly; Ventilator-associated pneumonia; Prognosis

呼吸机相关性肺炎(ventilator associated pneumonia, VAP)是指患者在气管插管或者气管切开后接受机械通气呼吸支持,于48 h之后或者拔管48 h之内,肺部所发生的感染,为医院获得性肺炎(Hospital acquired pneumonia, HAP)最主要类型之一^[1]。由于临床上广泛运用机械通气作为一种呼吸支持治疗方法,VAP的发病率明显上升。发生VAP后,不但延长了患者的住院时间,而且明显增加患者的病死率,尤其对于老年人,其合并的多种基础病及低下的免疫力,可导致其预后不佳^[2]。因此,临床上选择合适的指标早期评估VAP严重程度及判断预后对降低VAP老年患者的病死率有重要意义。血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)作为血管通透因子中作用最强的一种,通过对中性粒细胞的趋化,参与呼吸机相关性肺炎发生发展,从而促使肺部炎症反应^[3]。相关研究^[4]显示急性肺损伤中可出现血清VEGF含量明显升高。前肾上腺髓质素(Pro-adrenomedullin, pro-ADM)属于一种可对感染预测的新型炎症指标^[5],血清里含量的高低和感染的严重程度密切相关^[6]。本次研究通过回顾分析本院VAP老年患者中血清VEGF含量与pro-ADM含量的相关性和变化情况,对两者在老年VAP患者中病情严重程度及其临床预后的评估运用价值进行探讨。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选择2015年7月至2018年7月本院重症监护室实施机械通气>2天的410例老年患者当作研究对象。患者的入院年龄在60~84岁,其平均年龄为(71.1±8.3)岁,男240例、女170例。按其是否出现VAP分成两组:VAP组(76例)、非VAP组(334例);按急性生理和慢性的健康状况进行评分APACHE II (Acute Physiology and Chronic Health Evaluation)评分,分成3组:低危组 评分<10分(26例)、中危组 10<评分<20分(30例)、高危组 评分>20分(20例);按住院28天之内的临床转归分成两组:存活组(57例)、死亡组(19例)。各组间在性别、年龄、基础疾病和机械通气的时间等差异无统计学意义($P>0.05$)。本次研究经本院的伦理委员会批准同意。

参照中华医学会在2013年的指南制定VAP诊断标准^[7]:呼吸机的使用时间≥2天后且以下选项>2项:①患者出现发热:体温>38℃;②肺部听诊闻及湿啰音,且呼吸道分泌大量的脓性物质;③外周血象示白细胞<4.0×10⁹/L或>10.0×10⁹/L;④胸部X片示肺部进展性或新发的浸润阴影;⑤于呼吸道的分泌物新培养出病原菌。病例排除标准:①机械通气前伴肺部感染者;②无法耐受机械通气,终止治疗者;③合并免疫疾病及恶性肿瘤者。

1.2 方法

①记录患者的临床资料:对所有患者均气管插管并予机械通气,除此之外予祛痰、营养支持及补液等治疗。对各组患者的年龄、性别、基础疾病、血常规、机械通气的时间及天数等资料均详细记录。同时通过急性生理和慢性的健康状况对患者病情的严重程度进行评分。②血清 VEGF、pro-ADM 测定:确诊 VAP 后采集患者空腹肘静脉血 3.0 mL,以 1 500 r/min 的速度离心 5 min,分离血清之后于-80.0℃冰箱中保存备用,采取双抗体夹心的 ELISA 法测定 VEGF、pro-ADM 含量,试剂盒购自华美生物科技公司。

1.3 统计学方法

通过 SPSS 19.0 软件进行数据分析,计量资料用($\bar{x} \pm s$)表示,两组间的比较使用 *t* 检验,多组间的比较使用单因素的方差分析进行;比较组间的计数资料用 χ^2 ,采取 Pearson 相关的分析法进行相关分析,用 Graphpad 软件制作 ROC 曲线,并计算曲线下的面积和最佳的工作点,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组的临床指标相比

VAP 组血清 VEGF、pro-ADM 水平及 APACHE II 评分均明显高于非 VAP 组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$); VAP 组病死率明显高于非 VAP 组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见表 1。

表 1 两组间临床指标比较 [$n(\%)$, ($\bar{x} \pm s$)]

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

组别	<i>n</i>	VEGF (pg/mL)	APACHE II (分)	Pro-ADM (nmol/L)	病死率
VAP组	76	150.10±75.03	17.2±4.6	4.19±1.73	18(25.0)
非VAP组	334	110.60±44.45	11.3±3.8	3.20±1.38	54(16.2)
<i>t</i> / χ^2 值	-	4.417	10.403	4.663	4.617
<i>P</i> 值	-	0.000	0.000	0.000	0.032

2.2 VAP 组轻中重度组间的血清 VEGF、pro-ADM 水平比较

3 组间血清的 VEGF、pro-ADM 水平及病死率,从低危组、中危组至高危组的血清 VEGF、pro-

ADM 含量依次升高,差异具有统计学差异 ($P < 0.05$),见表 2。

表 2 不同严重程度 VAP 组间临床指标比较

[$n(\%)$, ($\bar{x} \pm s$)]

Table 2 Comparison of clinical indexes among groups with different severity of VAP [$n(\%)$, ($\bar{x} \pm s$)]

组别	<i>n</i>	VEGF (pg/mL)	APACHE II (分)	Pro-ADM (nmol/L)	病死率
低危组	26	150.2±44.38	7.8±1.8	4.08±1.77	2(11.1)
中危组	30	181.1±42.56	14.1±3.1	4.52±1.87	7(38.9)
高危组	20	220.3±43.23	23.3±3.0	6.16±1.88	9(50.0)
<i>F</i> 值	-	14.771	187.034	7.809	8.708
<i>P</i> 值	-	<0.001	<0.001	0.001	0.013

2.3 VAP 组不同预后组的血清 VEGF、pro-ADM 水平比较

死亡组的血清 VEGF、pro-ADM 含量较存活组明显升高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见表 3。

表 3 不同预后 VAP 组间临床指标比较 [n , ($\bar{x} \pm s$)]

Table 3 Comparison of clinical indexes between groups with different prognosis of VAP [n , ($\bar{x} \pm s$)]

组别	<i>n</i>	VEGF (pg/mL)	Pro-ADM (nmol/L)
存活组	57	179.2±40.35	4.58±1.79
死亡组	19	240.5±39.36	6.42±1.67
<i>t</i> 值	-	5.769	3.943
<i>P</i> 值	-	0.000	0.000

2.4 血清 VEGF 含量和 pro-ADM 含量 ROC 曲线分析

VAP 组中 ROC 曲线分析,血清 VEGF 曲线下面积下,最佳工作点 (Optimal operating point, OOP): 130.8 pg/mL, VAP 患者的 pro-ADM ACU 下,最佳工作点: 3.12 nmol/L。见表 4、表 5、图 1。

表 4 血清 VEGF 含量与 pro-ADM 含量 ROC 曲线的 AUC

Table 4 AUC OF ROC curve of serum VEGF and pro-ADM levels

指标	AUC	SE 值	95%CI	<i>P</i> 值
VEGF	0.804	0.26	0.752~0.856	0.000
Pro-ADM	0.748	0.28	0.693~0.804	0.000
联合诊断	0.868	0.20	0.828~0.907	0.000

表5 血清 VEGF 含量与 pro-ADM 含量的 OOP

Table 5 OOP of serum VEGF and pro-ADM levels

指标	OOP	特异性 (%)	敏感度 (%)	+LR	-LR	约登指数
VEGF	>130.8	62.90	73.70	1.985	0.419	0.386
Pro-ADM	>3.12	93.7	86.80	13.812	0.140	0.793

注: +LR: 阳性似然比; -LR: 阴性似然比。

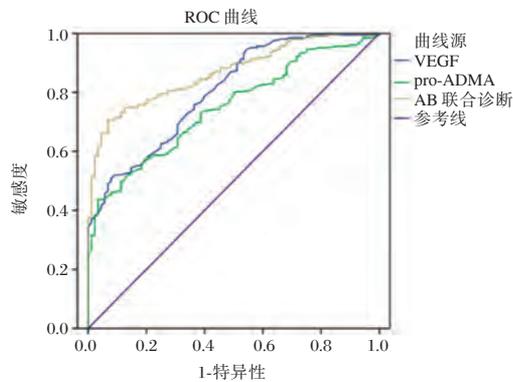


图1 血清 VEGF 与 pro-ADM 的 ROC 曲线

Figure 1 ROC curve of Serum Vegf and pro-ADM

2.5 血清 VEGF 含量和 pro-ADM 含量相关分析

在 VAP 组中, 患者的血清 VEGF 含量与 pro-ADM 含量呈正相关($r=0.864, P=0.000$)。

3 讨论

VAP 是患者行机械通气治疗中最常见的一种感染性疾病, 尤其是重症监护室, 发病率明显升高, 对患者的健康造成严重威胁^[8]。尽管临床上在诊断及治疗 VAP 获得较大进展, 但是病死率仍然高至 14%~40%, 尤其是老年和多重耐药的患者, 病死率更是高达 60%^[9]。目前临床上对于诊断 VAP 有较大争议, 活检组织并培养虽作为“金标准”诊断肺炎, 但限于是一种有创检查且取材困难, 同时也不利于初始经验用药^[10]。目前, 在临床上常采用降钙素原、C 反应蛋白判断感染^[11], 但降钙素原尽管和肺部感染有关, 却仅局限在细菌的感染, 对于真菌和病毒的感染诊断有限; C 反应蛋白诊断感染性的疾病特异性低, 非感染性的疾病也常常升高^[12]。因此, 选择强有力的指标检测 VAP 发生并且评估预后刻不容缓。

VEGF 是 2 条 24 kD 的单链通过二硫键连接而成的二聚体, 属于一种高度保守糖蛋白, 包含了 VEGF145、VEGF121、VEGF185、VEGF206、VEGF165

等至少有 5 种亚型。它可促使内皮细胞的生长、移位和血管渗漏, 从而增加血管的通透性, 是至今发现血管通透性因子中效应最强的一种^[13-14]。相关研究^[15]发现呼吸机相关肺损伤的模型里出现血清 VEGF 含量升高, 与此同时肺泡的毛细血管也出现通透性升高。研究表明, VAP 患者肺部感染严重程度可特异反映患者病情和预后情况。

肾上腺髓质素有抗菌、扩张血管、利钠利尿及降低血压等多种作用, 具有调节机体自稳态的作用^[16]。但其降解迅速, 而前肾上腺髓质素为肾上腺髓质素前体物质, 其稳定性高、半衰期长且测定简便, 可直接反映肾上腺髓质素活性肽的水平。目前, 在多种感染性疾病中, 临床上常选择测定血清 pro-ADM 的含量, 研究显示 pro-ADM 在诊断及评估脓毒症、肺部感染等疾病预后有较大实用价值^[17]。此次结果显示, 与非 VAP 组比较, VAP 组患者的血清 pro-ADM 含量明显升高, 且其病情越重, pro-ADM 的含量升高越明显, 表示 pro-ADM 也可有效反应患者病情的严重程度。同时观察 pro-ADM 与 VAP 患者的临床预后时发现在 VAP 患者死亡组的血清 pro-ADM 的含量较存活组明显升高, 说明其在预后不佳的诊断时有较高准确性。研究表明, VAP 患者肺部感染严重程度可特异反映患者病情和预后情况。

综上所述, 在老年呼吸机相关性肺炎患者中联合检测血清 VEGF 和 pro-ADM 的含量可有效其病情的严重程度和临床预后, 可为老年 VAP 患者个体化的治疗进一步提供临床参考。但本次研究尚存一定局限性: ①部分患者原发基础疾病较重, 有可能对其疗效和预后产生影响; ②此次研究删除入住 ICU 时就有感染以及入住 ICU 之后并发其他感染的病患, 对于这类患者, 此次研究对 VAP 则不能起到预测作用; ③本次研究是单中心的研究, 针对实验所得的截断值等相关指标尚需大样本、多中心的研究证实。

参考文献

- [1] 刘笑珂, 刘德新. 呼吸机相关性肺炎的研究进展[J]. 中华全科医师杂志, 2016, 15(6): 478-482.
- [2] 许贵如, 卢敬梅, 王炎, 等. 老年患者呼吸机相关性肺炎高危因素 meta 分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2016, 26(23): 5418-5420.
- [3] 宋晓军, 刘龙, 是若春, 等. 血清 VEGF 水平与呼吸机相关性肺炎的关系[J]. 山东医药, 2015, 55(13): 75-76.

- [4] 王志华,杨焕章,傅晓燕,等. 血管内皮细胞生长因子在急性肺损伤大鼠中的表达及意义[J]. 临床肺科杂志, 2016, 21(12):2230-2233.
- [5] 倪菊平,瞿洪平,孙英杰,等. 动态监测血清前肾上腺髓质素对呼吸机相关性肺炎预后的评估价值[J]. 中国急救医学, 2016, 36(7):605-608.
- [6] 王力鹏,陈军,罗穆玲,等. 肾上腺髓质素原联合降钙素原对老年重症社区获得性肺炎患者预后的预测价值[J]. 中华老年多器官疾病杂志, 2018, 7(3):202-206.
- [7] 管向东,刘紫钰. 2013年《呼吸机相关性肺炎诊断、预防和治疗指南》—目标性治疗的解读[J]. 中华医学杂志, 2014, 94(5): 333-334.
- [8] 李淑媛,盖鑫,张建,等. ICU机械通气患者呼吸机相关性肺炎危险因素与干预措施[J]. 中华医院感染学杂志, 2016, 26(1):76-78.
- [9] 张之阳,王光英,赵浩天,等. 呼吸机相关性肺炎的流行病学[J]. 中华医院感染学杂志, 2017, 27(7): 1677-1680.
- [10] 房艳红. 呼吸机相关性肺炎的流行病学和诊断进展[J]. 医学理论与实践, 2017, 30(2):185-186.
- [11] 艾学才. 血清PCT、CRP联合检测对老年肺炎病情诊疗及预后的价值探究[J]. 临床肺科杂志, 2016, 21(6):1045-1048.
- [12] 张萌,郑慧峰,张劼,等. 降钙素原与C反应蛋白对危重症患者呼吸机相关性肺炎的预后评价[J]. 中国综合临床, 2016, 32(8):732-735.
- [13] 刘朝辉,高晓虹. 血管内皮生长因子及其受体的研究进展[J]. 中国药物与临床, 2017, 17(8):1162-1164.
- [14] 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):154.
- [15] 常明,卢红艳,相虹,等. 机械通气联合肺表面活性剂对新生儿ALI/ARDS血管内皮生长因子、巨噬细胞移动抑制因子表达的影响[J]. 实用医学杂志, 2016, 32(21):3543-3546.
- [16] 雷艳梅,周潇,马建国,等. 降钙素原联合肾上腺髓质素前体中段肽在脓毒症诊断中的应用[J]. 广东医学, 2017, 38(9):1383-1385.
- [17] 倪菊平,瞿洪平,刘嘉琳,等. 血清前肾上腺髓质素在呼吸机相关性肺炎中的诊断价值[J]. 中国呼吸与危重监护杂志, 2016, 15(1):17-21.

(上接第286页)

- [10] 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌临床分布及耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2017, 26(7):304-306.
- [11] 朱兆宇,池勇. 苯唑西林纸片扩散法检测耐甲氧西林葡萄球菌[J]. 医学理论与实践, 2017, 20(10):148-150.
- [12] 程涛涛,吴为民,常青,等. 社区获得性耐甲氧西林金黄色葡萄球菌儿童分离株功能基因分型[J]. 中华医院感染学杂志, 2014, 24(19):4967-4969.
- [13] 邓向斌,蔡博涛,蒲彰雅,等. 苯唑西林和头孢西丁敏感金黄色葡萄球菌MecA基因检测研究[J]. 深圳中西医结合杂志, 2017, 26(16):5-7.
- [14] 陈开森,廖晚珍,彭卫华,等. 葡萄球菌属mecA基因检测与药敏结果分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2009, 18(1):21-23.
- [14] 宁兴旺,姜思宇,朱惠斌,等. 4142份血培养病原菌分布及其耐药性分析[J]. 海南医学院学报, 2018, 24(5):6-9.
- [15] 许根友. 学习《全国临床检验操作规程》(第3版)第一篇对检验工作的实际意义[J]. 临床血液学杂志(输血与检验), 2010, 23(6):759-760.
- [16] Grace D, Fetsch A. Staphylococcus aureus - A foodborne pathogen: Epidemiology, detection, characterization, prevention, and control: An overview[J]. Staphylococcus Aureus, 2018, 3-10.
- [17] 胡雪飞,胡科翱,彭卫华,等. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌不同菌株基因系列与耐药表型的关系[J]. 世界最新医学信息文摘, 2018, 18(95):8-10, 25.
- [18] 应建飞,俞燕红,鲁勇,等. 医院耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的SCCmec基因分型及耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2018, 28(23):65-68.
- [19] 裴双,苏建荣. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌耐药性分析及mecA和PVL基因检测[J]. 临床和实验医学杂志, 2017, 15(1):168-170.
- [20] 陈怡丽,罗敏,郭鹏豪,等. mecA基因与耐甲氧西林金黄色葡萄球菌感染临床特点的相关性研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2017, 26(3):141-145.
- [21] Soffietti R, Abacioglu U, Baumert B, et al. Diagnosis and treatment of brain metastases from solid tumors: guidelines from the European Association of Neuro-Oncology (EANO) [J]. Neuro-Oncology, 2017, 19(2):162-174.
- [22] 谢闰娥,徐霞,杨能. mecA基因PCR扩增法检测耐甲氧西林金黄色葡萄球菌[J]. 中国微生物学杂志, 2005, 17(6):438-438.
- [23] 高鑫,朱武洋,卢学新. 实时荧光定量PCR在病毒检测中的应用[J]. 中国人兽共患病学报, 2018, 34(7):84-91.
- [24] 郑丽兰,冯海欢,陈鑫华,等. CHIKV Real-time PCR检测方法的建立及试剂盒研发[J]. 中国热带医学, 2018, 18(4):345-350.

TB-DNA 和 IGRAs 对川西高原地区肺结核诊断的适用性分析

苟甜甜 向章朋 柳梦君 李隆勇 周卫东*

[摘要] **目的** 探讨结核分枝杆菌 DNA(TB-DNA)和 γ -干扰素释放试验(IGRAs)对川西高原地区肺结核诊断中的适用性。**方法** 选取2018年4月至2019年5月在本院住院的510例肺结核疑似患者,其中肺结核154例,非肺结核组356例,同时行TB-DNA(荧光定量PCR法)和IGRAs(ELISA法)检查,比较两种方法在不同类型肺结核和不同类型标本中的检出率。**结果** TB-DNA和IGRAs对川西高原地区肺结核的诊断灵敏度分别为42.9%、73.4%,特异度分别为98.3%、70.2%,TB-DNA在结核性胸膜炎和继发性肺结核中的检出率为21.6%和52.5%,IGRAs在结核性胸膜炎和继发性肺结核中的检出率为58.8%和80.2%,两者联合在结核性胸膜炎和继发性肺结核中的检出率为70.6%和95.0%。3者在继发性肺结核中的检出率均明显高于结核性胸膜炎($P<0.05$)。TB-DNA在肺泡灌洗液中检出率最高(66.0%),其次为自然咳痰(33.8%),胸水检出率最低(11.1%),且差异有统计学意义($P<0.05$)。肺泡灌洗液TB-DNA与IGRAs结果一致性最好。**结论** TB-DNA和IGRAs单独用于川西高原地区肺结核的诊断均不够灵敏,选择合适的标本和共同联合检测可以提高肺结核的检出率,有利于川西高原地区肺结核的早期诊断。

[关键词] 肺结核; TB-DNA; γ -干扰素释放试验; 川西高原地区

Applicability of TB-DNA and IGRAs to diagnosis of pulmonary tuberculosis in the western Sichuan Plateau

GOU Tiantian, XIANG Zhangpeng, LIU Mengjun, LI Longyong, ZHOU Weidong*

(Laboratory Department of 363 Hospital, Chengdu, Sichuan, China, 610041)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the applicability of TB-DNA and IGRAs to the diagnosis of pulmonary tuberculosis in the western Sichuan plateau. **Methods** 510 patients from the plateau area of the western Sichuan from April 2018 to May 2019 in the 363 Hospital were selected, including 154 cases of tuberculosis and 356 cases of non-tuberculosis. TB-DNA (FQ-PCR) and IGRAs (ELISA) were performed simultaneously. The sensitivity and specificity of the two methods were compared and analyzed by SPSS 21.0 statistical software. The detection rates of the two methods in different types of tuberculosis and different types of specimens were compared. χ^2 test was used to compare the rate between groups, $P<0.05$, the difference was statistically significant. **Results** The diagnostic sensitivity of TB-DNA and IGRAs for tuberculosis in the western Sichuan plateau was 42.9% and 73.4%, and the specificity was 98.3% and 70.2%, respectively. The detection rate of TB-DNA in tuberculous pleurisy and secondary tuberculosis was 21.6% and 52.5%, and the detection rates of IGRAs in tuberculous pleurisy and secondary tuberculosis were 58.8% and 80.2%. The combined detection rates of tuberculous pleurisy and secondary tuberculosis were 70.6% and 95.0%. The detection rates of the three different samples (alveolar lavage fluid, sputum and pleural fluid) in secondary pulmonary tuberculosis were significantly higher than those in tuberculous pleurisy ($P<0.05$). The detection rate of TB-DNA in alveolar lavage fluid was the highest (66.0%), followed by natural sputum (33.8%), and

作者单位:三六三医院检验科,四川,成都 610041

*通信作者:周卫东, E-mail: a650525@126.com

the detection rate of pleural fluid was the lowest (11.1%), and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Alveolar lavage fluid TB-DNA and IGRAs had the best consistency. Conclusion TB-DNA and IGRAs alone are not sensitive in the diagnosis of pulmonary tuberculosis in the western Sichuan Plateau. The selection of appropriate specimens and combined detection can improve the detection rate of pulmonary tuberculosis and facilitate the early diagnosis of tuberculosis in the western Sichuan plateau.

[KEY WORDS] Pulmonary tuberculosis; TB-DNA; IGRAs; Western Sichuan Plateau

结核病以肺结核为主,是严重危害人民群众身体健康的重大传染病之一,目前我国仍是全球30个结核病高负担国家之一,每年新发结核病患者约90万例,位居全球第3位。结核病发病人数仍然较多,中西部地区、农村地区结核病防治形式严峻^[1]。最新实施的肺结核诊断(WS 288-2017)^[2]在2008版基础上增加了 γ -干扰素释放试验(interferon-gamma release assays, IGRAs)和分子生物学检查,为肺结核的早期诊断提供了帮助,但肺结核发病存在明显的地区差异和空间聚集性,且川西高原地区是肺结核的好发区域^[3],这两项检查对该地区肺结核诊断价值是否与其他地区一致,尚未见相关报道,为此本研究对来自川西高原地区的510例肺结核疑似病例进行了研究,以期对肺结核的早期诊断提供指导。

1 对象与方法

1.1 研究对象

选取2018年4月至2019年5月在本院住院的肺结核疑似患者510例,平均年龄(48.5±18.8)岁。入选标准:长期居住地为川西高原地区,断层扫描(Computed Tomography, CT)检查提示肺部感染,住院期间检测了 γ -干扰素释放试验和结核分枝杆菌(*M.tuberculosis*, TB)DNA试验。肺结核临床诊断标准^[2]:有典型肺结核临床症状和胸部X线或CT表现,抗结核治疗有效,或结核涂片或培养阳性。根据临床诊断作为“金标准”,将研究人群分为肺结核组和非肺结核组。肺结核组154例,平均年龄(39.6±18.4)岁,其中结核性胸膜炎51例,气管、支气管结核2例,继发性肺结核(包含并发胸腔积液)101例;非肺结核组356例,年龄(52.3±17.7)岁,主要以细菌性肺炎、真菌性肺炎和慢性阻塞性肺炎为主。

1.2 仪器和试剂

仪器采用美国应用生物系统公司 Applied Biosystems ABI 7500 实时荧光定量 PCR 仪和艾德康

生物的 ADC ELII SA400 全自动酶免分析仪,试剂使用中山大学达安基因股份有限公司的结核分枝杆菌核酸检测试剂盒和北京万泰生物药业股份有限公司的 γ -干扰素释放试验检测试剂盒。

1.3 标本采集及处理

血液标本用美国 BD 公司的肝素钠抗凝真空管采集 5 mL 静脉血。痰液嘱患者漱口后咳深部痰液,肺泡灌洗液由行纤维支气管镜检查时采集,胸水由专业医生采集,标本采集后,1 h 内送检。痰液和肺泡灌洗液经 4% NaOH 液化后使用,胸水低速离心富集沉淀。

1.4 TB-DNA 检测及结果判定

经处理后的标本,按照试剂说明书提取核酸,加 5 μ L 到反应管,8 000 r 瞬离数秒,设置扩增程序后,上机扩增,每批实验均带有阴性和阳性对照。病人痰液、肺泡灌洗液或胸水中任一个 TB-DNA 结果为阳性即判定为该患者 TB-DNA 阳性。

1.5 γ -干扰素释放试验(IGRAs)

血液采集后,1 h 内混匀分装到检测管、阴性和阳性结核感染 T 细胞培养管中,孵育 24 h,通过结核分枝杆菌特异性重组抗原刺激感染者的特异性 T 淋巴细胞,并使其增殖、释放 γ -干扰素(interferon, IFN- γ),然后用 ELISA 法检测 IFN- γ 。

1.6 统计学处理

应用 SPSS 21.0 软件进行统计分析,计数资料采用 $n(\%)$ 表示,计量资料用 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间显著性检验比较用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TB-DNA 和 IGRAs 在肺结核中的诊断价值

按照“金标准”,将研究人群分为肺结核组和非肺结核组,分别统计 TB-DNA 和 IGRAs 两种诊断方法的灵敏度、特异度、阳性预测值和阴性预测值,结果见表 1。

表1 TB-DNA和IGRAs在肺结核中的诊断价值

Table 1 Diagnostic value of TB-DNA and IGRAs in pulmonary tuberculosis

方法	肺结核组(n=154)			非肺结核组(n=356)			阳性预测值	阴性预测值
	阳性	阴性	灵敏度(%)	阳性	阴性	特异度(%)		
TB-DNA	66	88	42.9	6	350	98.3	91.7	79.9
IGRAs	113	41	73.4	106	250	70.2	51.6	85.9

2.2 TB-DNA和IGRAs在不同类型肺结核中的阳性率

将肺结核患者分为结核性胸膜炎和继发性肺结核,分别分析TB-DNA、IGRAs以及两者联合在这两种类型肺结核中的阳性率,3种检测方法在继发性肺结核中的阳性率均高于结核性胸膜炎,且差异有统计学意义($P<0.05$)。见表2。

表2 TB-DNA和IGRAs在结核性胸膜炎和继发性肺结核中的阳性率比较[n(%)]

Table 2 Comparison of positive rates of TB-DNA and IGRAs in tuberculous pleurisy and secondary tuberculosis [n(%)]

	结核性胸膜炎 中阳性率 (n=51)	继发性肺结核 中阳性率 (n=101)	χ^2 值	P值
TB-DNA	11(21.6)	53(52.5)	13.28	0.00
IGRAs	30(58.8)	81(80.2)	7.86	0.01
二者联合	36(70.6)	96(95.0)	17.75	0.00

注:另外2例为气管、支气管结核。

2.3 肺结核患者不同标本类型的TB-DNA检测阳性率

肺结核患者不同标本类型的TB-DNA阳性率不同,肺泡灌洗液最高,其次为自然咳痰,胸水最低,3种标本之间差异有统计学意义($P<0.05$)。见表3。

表3 肺结核患者不同标本类型的TB-DNA阳性率[n(%)]

Table 3 Positive Rate of TB-DNA in Different Specimens of Tuberculosis Patients [n(%)]

标本类型	n	阳性	阴性	χ^2 值	P值
肺泡灌洗液	53	35(66.0)	18(34.0)	154.90	0.00
自然咳痰	80	27(33.8)	53(66.2)		
胸水	45	5(11.1)	40(88.9)		

2.4 不同标本类型TB-DNA与IGRAs结果一致性分析

在非肺结核患者和肺结核患者中,肺泡灌洗液、自然咳痰和胸水的TB-DNA的检测结果与IGRAs结果不一致。见表4。

表4 不同标本类型TB-DNA与IGRAs一致性

Table 4 Consistency of TB-DNA in different specimen types and IGRAs

不同标本 TB-DNA	n	非肺结核患者				肺结核患者					
		IGRAs 阳性	IGRAs 阴性	阴性 符合率(%)	阳性 符合率(%)	n	IGRAs 阳性	IGRAs 阴性	阴性 符合率(%)	阳性 符合率(%)	
肺泡灌洗液	阳性	6	2	4	94.9	7.4	35	23	12	20.0	60.5
	阴性	99	25	74			18	15	3		
自然咳痰	阳性	0	0	0	100.0	0.0	27	18	9	55.0	30.0
	阴性	233	73	160			53	42	11		
胸水	阳性	0	0	0	100.0	0.0	5	4	1	94.4	14.8
	阴性	18	7	11			40	23	17		

3 讨论

四川西部地区属于高海拔地区,公共卫生条件较差,肺结核是当地常见的传染性疾病之一,但因肺结核临床症状不明显,涂阴肺结核所占比例越来越大^[4],传统的实验室检查如结核抗体、结核菌素试验、抗酸染色等,灵敏度和特异性低,结核培养

周期太长等原因,造成肺结核早期诊断困难,往往被误诊为细菌性肺炎,造成抗生素滥用,延误疾病的治疗和愈合,增加国家和病人的负担。

近年来,大量的文献报道,TB-DNA在肺结核诊断中有非常重要的价值,唐婧等^[5]人的报道显示肺泡灌洗液TB-DNA的灵敏度为80.3%,特异性为97.7%,李春梅等^[6]人报道肺泡灌洗液TB-DNA在

肺结核中的诊断灵敏度高于TB培养法。也有一些文献报道的数据与之差异较大,如周前选等^[7]报道TB-DNA对肺结核诊断的灵敏度为54.8%,秦庆等^[8]人的研究结果显示灵敏度仅有38.54%,这可能与标本类型的选择有关。因此,TB-DNA对鉴别是否为肺结核有较为重要的意义,但不适宜用于肺结核的筛查,尤其是结核性胸膜炎,这样可能会造成肺结核的漏诊。

国内外关于IGRAs的一些研究^[9-11]显示,IGRAs对肺结核的诊断灵敏度有较大优势。但IGRAs要受病人免疫功能影响,同时也不能区分陈旧性肺结核和活动性肺结核,而川西高原地区肺结核形势严峻,陈旧性肺结核较为常见,造成该方法对该地区肺结核的诊断特异性较差,仅为70.2%,该数据低于傅志辉等^[11]报道的82.1%,所以IGRAs不适宜单独用于川西高原地区肺结核的诊断,这样可能会造成肺结核的误诊。

根据TB-DNA和IGRAs的优缺点,若将二者联合,可将结核性胸膜炎和继发性肺结核的检出率提高到70.6%和95.0%,减少临床肺结核的漏诊和误诊。同时我们还发现TB-DNA在不同类型标本中检出率不同,以肺泡灌洗液阳性率最高(66.0%),与李振声等^[12]报道的62.77%接近,略低于唐婧等人的研究结果(80.3%)。但肺泡灌洗液需用纤支镜才能采集,采集过程较为痛苦,部分患者不能接受,另外我们也在105例非肺结核患者肺泡灌洗液中检测到了6例阳性(CT均在20以上),我们认为是陈旧性结核引起的,所以建议有条件者最好送检肺泡灌洗液。我们的研究中发现有3例肺结核患者是通过多次送检痰液TB-DNA检查出来的,对于不能进行纤支镜检查的病人,建议可多次送检深部痰液,以提高检出率。阳性率最低的是胸水(11.1%),对结核性胸膜炎的诊断价值非常有限,周华等^[13]建议结合胸水ADA,可提高诊断准确性。

当同一患者出现TB-DNA与IGRAs结果不一致时,临床医生常常感到疑惑,我们就两者一致性进行了分析。在非肺结核组中,肺泡灌洗液、自然咳痰和胸水TB-DNA与IGRAs阴性符合率较高,因此我们认为IGRAs用于排除肺结核感染有一定优势。在非肺结核组中,除了肺泡灌洗液TB-DNA检测出了2例弱阳性,其余标本TB-DNA均未检测出阳性例数,但IGRAs检测出了106例阳性,我们认为两者不一致的主要原因可能是IGRAs不能区

分陈旧性肺结核,造成部分IGRAs结果为假阳性。因此,当两者出现结果不一致时,应综合分析,并结合其他检测手段综合判断。

对于肺结核诊断方法和技术仍处于不断发展和完善的过程中,临床实际工作中仍需要诊断价值更高的实验室检查项目,尤其是还缺乏肺结核治疗效果监测的指标,不过已有部分文献^[14-15]报道TB-RNA在诊断肺结核方面有更加高的灵敏度,也有部分学者^[16-17]报道血液中外泌体miRNA与活动性肺结核有关,有望成为新的肺结核血清标志物。

TB-DNA和IGRAs单独用于川西高原地区肺结核的诊断均不够灵敏,选择合适的标本和运用联合检测可以提高肺结核的检出率,有利于川西高原地区肺结核的早期诊断。

参考文献

- [1] 中华人民共和国国务院. 国务院办公厅关于印发“十三五”全国结核病防治规划的通知[EB/OL]. http://www.gov.cn/zhengce/content/2017-02/16/content_5168491.htm, 2017.
- [2] 中华人民共和国卫生部. 肺结核诊断WS 288-2017[EB/OL]. <http://www.nhc.gov.cn/ewebeditor/uploadfile/2017/11/201711128164254246.pdf>, 2018.
- [3] 喻国旗,雷明智,魏怡,等. 2004-2015年中国大陆地区肺结核流行的时空分布特征[J]. 现代预防医学, 2017, 44(20): 3649-3654.
- [4] Tao NN, Li YF, Wang SS, et al. Epidemiological characteristics of pulmonary tuberculosis in Shandong, China, 2005-2017: A retrospective study[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2019, 98(21): e15778.
- [5] 唐婧,王庆,徐东芳,等. 肺泡灌洗液不同检测方法在肺结核诊断中的临床价值[J]. 临床肺科杂志, 2019, 24(1): 133-134, 182.
- [6] 李春梅,施旭东,邵吉宝,等. 支气管肺泡灌洗液FQ-PCR检测TB-DNA与TB培养在肺结核诊断中的价值[J]. 临床肺科杂志, 2018, 23(3): 396-398.
- [7] 周前选,王婷,王雷,等. 三种方法联合检测对菌阴肺结核的诊断价值分析[J]. 湖南师范大学学报(医学版), 2018, 15(4): 72-75.
- [8] 秦庆,胡瑛,吕永强. 痰涂片抗酸染色、结核抗体试验、荧光PCR、T-SPOT.TB在肺结核诊断中的临床意义[J]. 中国医药科学, 2017, 7(21): 130-133.
- [9] Painter JA, Graviss EA, Hai HH, et al. Tuberculosis screening by tuberculosis skin test or QuantiFERON-TB Gold In-Tube Assay among an immigrant population with a high prevalence of tuberculosis and BCG vaccination[J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e82727.

(下转第313页)

老年血液透析患者血清 hs-CRP、Fetuin-A 水平与心脏瓣膜钙化和血管钙化的关系

张曼* 张京慧 温小军

[摘要] 目的 研究老年维持性血液透析(MHD)患者心脏瓣膜钙化(CVC)和血管钙化(VC)发生情况并分析血清超敏C反应蛋白(hs-CRP)和Fetuin-A水平诊断价值和与钙化程度的相关性。方法 选取2016年2月至2019年3月于本院接受治疗的老年MHD患者104例进行横断面研究,采用心脏彩超和腹部侧位X线检查CVC和VC发生情况并评估严重程度,同时检测患者血清hs-CRP和Fetuin-A水平,作受试者工作特征曲线(ROC)并计算曲线下面积(AUC)分析二者对CVC和VC诊断价值,然后分别研究hs-CRP和Fetuin-A与CVC和VC钙化程度的相关性。结果 104例老年MHD患者经心脏彩超确诊为CVC者47例(45.19%),合并CVC的患者血清hs-CRP水平高于非CVC患者,血清Fetuin-A水平低于非CVC患者,差异均有统计学意义($P<0.05$);104例患者AACS评分为0~21分,平均(5.73±1.32)分,其中发生VC者41例(39.42%),合并VC的患者血清hs-CRP水平高于非VC患者,血清Fetuin-A水平低于非VC患者,差异具有统计学意义($P<0.05$);老年MHD患者血清hs-CRP、Fetuin-A水平及两者联合诊断CVC的AUC分别为0.847、0.715和0.874,诊断VC的AUC分别为0.895、0.840和0.951;血清hs-CRP水平与CVC严重程度和AACS评分均呈明显正相关性($P<0.05$),Fetuin-A水平与二者均呈明显负相关性($P<0.05$)。结论 老年MHD患者常合并CVC或VC,其中hs-CRP和Fetuin-A可能在钙化发生和进展过程中发挥重要作用,且对CVC或VC诊断和严重程度评估均具有良好参考价值。

[关键词] 血液透析;心脏瓣膜钙化;血管钙化;超敏-C反应蛋白;胎球蛋白A

Relationship between serum hs-CRP and Fetuin-A levels and cardiac valve calcification and vascular calcification in elderly patients with hemodialysis

ZHANG Man*, ZHANG Jinghui, WEN Xiaojun

(Department, Beijing Shijitan Hospital, Capital Medical University, Beijing, China, 100038)

[ABSTRACT] **Objective** To study the occurrence of cardiac valve calcification (CVC) and vascular calcification (VC) in elderly patients with maintenance hemodialysis (MHD), and to analyze the diagnostic value of serum hypersensitive C-reactive protein (hs-CRP) and Fetuin-A and the correlation with the degree of calcification. **Methods** A total of 104 elderly patients with MHD who were treated in the hospital from February 2016 to March 2019 were selected for cross-sectional study. The occurrence of CVC and VC were assessed using cardiac color Doppler ultrasound and abdominal lateral X-rays, and the severity was evaluated. The serum hs-CRP and Fetuin-A levels of patients were measured, and the receiver operating characteristic curve (ROC) was drawn and the area under the curve (AUC) was calculated to analyze the diagnostic value of the two on CVC and VC. The correlation between hs-CRP and Fetuin-A and calcification degree of CVC and VC was studied. **Results** Among the 104 elderly MHD patients, 47 cases (45.19%) were diagnosed with CVC by color Doppler ultrasound, and the serum hs-CRP level of patients with CVC was higher than that

基金项目:北京市自然科学基金(7184225)

作者单位:首都医科大学附属北京世纪坛医院干部综合科,北京 100038

*通信作者:张曼, E-mail:xtce514572@sina.cn

in non-CVC patients while the serum Fetuin-A level was lower than that in non-CVC patients ($P<0.05$). The AACS score of 104 patients with MHD was 0-21 points with an average of 5.73 ± 1.32 points, and there were 41 cases (39.42%) with VC, and the serum hs-CRP level in patients with VC was higher than that in non-VC patients while the serum Fetuin-A level of VC patients was lower than that of non-VC patients ($P<0.05$). The AUC values of serum hs-CRP, Fetuin-A and the combination of the two of elderly patients with MHD for CVC diagnosis were 0.847, 0.715 and 0.874 respectively, and the AUC values for diagnosis of VC were 0.895, 0.840 and 0.951 respectively. Serum hs-CRP level was significantly positively correlated with CVC severity and AACS score ($P<0.05$), and Fetuin-A level was significantly negatively correlated with the two ($P<0.05$). **Conclusion** Elderly patients with MHD often have CVC or VC. Among them, hs-CRP and Fetuin-A may play an important role in the occurrence and progression of calcification and have good reference value for the diagnosis and severity assessment of CVC or VC.

[KEY WORDS] Hemodialysis; Cardiac valve calcification; Vascular calcification; Hypersensitive-C reactive protein; Fetuin A

慢性肾功能衰竭(chronic renal failure, CRF)指各种疾病引起的肾小球结构和功能损害,随病情进展可造成水电解质和酸碱平衡紊乱,最终发展为终末期肾病(end stage renal disease, ESRD)并可严重威胁患者生命安全^[1]。维持性血液透析(maintenance hemodialysis, MHD)可有效清除患者体内蓄积的代谢产物,对延长患者生存时间和改善生活质量具有积极作用^[2]。近年来MHD长期治疗可能导致心血管疾病(cardiovascular disease, CVD)发病率较高的问题逐渐引起临床重视,文献报道MHD患者透析效果、炎症反应和营养代谢等因素也可能在CVD发生过程中占有重要地位^[3-4]。超敏-C反应蛋白(hypersensitive -C reactive protein, hs-CRP)和胎球蛋白A(Fetuin-A)分别为机体炎症反应和钙磷代谢的重要标志物,可能在CVD发病和进展过程中发挥重要作用^[5-6]。本文主要分析老年MHD患者血清hs-CRP和Fetuin-A水平与心血管钙化的关系,为明确MHD合并CVD发病机制提高参考依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2016年2月至2019年3月于本院接受治疗的老年MHD患者104例进行横断面研究,其中男性61例、女性43例,年龄65~92岁,平均(73.86 ± 9.25)岁, MHD时间6个月至13年,平均(5.17 ± 1.38)年,其中慢性肾小球肾炎61例、糖尿病肾病18例、高血压肾病13例、梗阻性肾病7例及慢性肾盂肾炎5例。纳入标准:①均接受规律MHD治疗且时间 ≥ 6 个月;②年龄 ≥ 65 岁;③均完善相关检查

且临床资料保存完整。排除标准:①合并严重感染或恶性肿瘤者;②伴CVD病史并接受相关治疗;③伴心脏瓣膜置或甲状腺切除换者;④伴急性血管炎或肝脏病变;⑤伴吸烟或肾移植病史。本研究获得患者以及家属知情同意并经本院伦理委员会批准。

1.2 研究方法

1.2.1 仪器和试剂

4008S透析机(德国Fresenius); AV600S透析器(德国Fresenius);碳酸盐溶液(天津肾友达医疗设备技术有限公司); SD800型超声扫描仪(英国PHILIPS)及7.5MHz配套探头; R-500B型医用X射线机(美国GE); AU5400型全自动生化分析仪(日本OLYMPUS); hs-CRP和Fetuin-A试剂盒(上海将来实业股份有限公司); 3K15高速冷冻离心机(德国Sigma); -80°C 超低稳冰箱(美国Thermo); 移液器(百得Biohit)及吸头和EP管(美国Axygen)。

1.2.2 治疗和检测方法

所有入选患者均接受碳酸氢盐透析, 3次/周, 每次4 h, 血流量220~280 mL/min, 透析液流量500 mL/min, 嘱患者每日摄入蛋白量(1.0~1.2) g/kg。采用心脏彩超观察心脏瓣膜钙化(cardiac valve calcificat, CVC)发生情况, 以发现1个及以上 ≥ 1 mm的明亮回声为诊断标准^[7], 同时根据回声特征对CVC严重程度进行分级, 按由轻到重分别计1~3分^[7]。采用X线检查对患者进行空腹状态腹主动脉钙化评分(abdominal aortic calcification score, AACS), 扫描范围为 T_{12} ~ L_1 至 L_4 ~ L_5 椎间隙, 根据Kauppila评分标准^[8]对 L_1 ~ L_4 每个阶段主动脉前壁和后壁分别进行钙化程度评分, 其中未见钙化计0

分;钙化累及范围<1/3、1/3~2/3及>2/3分别计1~3分,总分0~24分,AACS评分 ≥ 1 分为血管钙化(vascular calcification, VC),其中1~4分为轻度钙化;5~15分为中度钙化;>15分为重度钙化。每位患者均由两名经验丰富的医师采用盲法进行评估并取平均值。采集入选患者本周首次透析前空腹静脉血5 mL,以4 000 r/min离心10 min后取血清-80℃保存备用,采用ELISA法检测血清hs-CRP和Fetuin-A水平,所有操作严格按照说明书要求完成。

1.2 统计学方法

应用SPSS 22.0软件分析,计数资料以 $n(\%)$ 表示,采用 χ^2 检验,符合正态分布的计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,组间比较采用独立样本 t 检验,作ROC曲线分析hs-CRP和Fetuin-A对老年MHD患者合并CVC和VC诊断价值,采用Pearson积差或Spearman系数进行相关性检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组血清hs-CRP和Fetuin-A水平比较

104例老年MHD患者经心脏彩超确诊为CVC者血清hs-CRP水平高于非CVC患者,Fetuin-A水平低于非CVC患者,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表1。

表1 2组血清hs-CRP和Fetuin-A水平比较
[$n(\%), (\bar{x} \pm s)$]

Table 1 Comparison of serum hs-CRP and Fetuin-A levels between 2 groups [$n(\%), (\bar{x} \pm s)$]

分组	占比率	hs-CRP (mg/L)	Fetuin-A (g/L)
CVC组($n=104$)	47(45.19)	6.82 \pm 2.09	0.31 \pm 0.09
非CVC组($n=104$)	57(54.81)	4.13 \pm 1.25	0.42 \pm 0.13
t 值		8.119	4.910
P 值		<0.001	<0.001

2.2 两组血清hs-CRP和Fetuin-A水平比较

104例老年MHD患者AACS评分为0~21分,平均(5.73 \pm 1.32)分,VC患者血清hs-CRP水平高于非VC患者,血清Fetuin-A水平低于非VC患者,差异均有统计学意义($P < 0.05$),见表2。

2.3 hs-CRP和Fetuin-A对CVC和VC诊断价值分析

老年MHD患者血清hs-CRP、Fetuin-A水平及两者联合诊断CVC的AUC分别为0.847、0.715和

表2 两组血清hs-CRP和Fetuin-A水平比较
[$n(\%), (\bar{x} \pm s)$]

Table 2 Comparison of serum hs-CRP and Fetuin-A levels between 2 group [$n(\%), (\bar{x} \pm s)$]

分组	占比率	hs-CRP	Fetuin-A
VC组	41(39.42)	7.34 \pm 1.98	0.27 \pm 0.08
非VC组	63(60.58)	4.26 \pm 1.07	0.43 \pm 0.14
t 值		10.271	6.639
P 值		<0.001	<0.001

0.874,诊断VC的AUC分别为0.895、0.840和0.951,见表3,图1。

表3 hs-CRP和Fetuin-A对CVC和VC诊断价值分析
Table 3 Analysis of diagnostic value of hs-CRP and Fetuin-A on CVC and VC

检测指标	AUC	SE值	95%CI	临界值	灵敏度 (%)	特异度 (%)
CVC诊断						
hs-CRP	0.847	0.043	0.763~0.910	5.82	70.21	91.23
Fetuin-A	0.715	0.050	0.618~0.799	0.38	82.98	54.39
联合检测	0.874	0.037	0.794~0.931	0.48	80.49	84.13
VC诊断						
hs-CRP	0.895	0.041	0.820~0.947	5.99	80.49	93.65
Fetuin-A	0.840	0.039	0.755~0.904	0.35	85.37	76.19
联合检测	0.951	0.023	0.890~0.984	0.61	85.37	96.83

2.4 hs-CRP和Fetuin-A与CVC和VC严重程度的相关性分析

老年MHD患者血清hs-CRP水平与CVC($r=0.308$)严重程度和AACS($r=0.347$)评分均呈明显正相关性($P < 0.05$),Fetuin-A水平与CVC严重程度($r=-0.291$)和AACS评分($r=-0.316$)评分均呈明显负相关性($P < 0.05$)。

3 讨论

我国慢性肾脏病患者数量现已高达1.2亿,患病率约为10.8%,其中约30%可缓慢进展为ESRD,导致MHD治疗的应用大幅度增加,也对患者身心健康造成不利影响^[9]。文献报道慢性肾脏病患者CVD发生率较普通人群明显升高,且接受MHD治疗的ESRD患者中约50%因此死亡,而心血管钙化是导致CVD发生的重要原因,故积极研究MHD患者心血管钙化发生机制和危险因素具有重要意义^[10]。

改善全球肾脏病预后组织(Kidney Disease: Improving Global Outcomes, KDIGO)指南建议分别采用腹部侧位平片和心脏彩超获取患者CVC和

VC发生情况,具有准确可靠和经济简便等优势^[7]。文献报道MHD患者心血管不同部位发生钙化的风险存在一定差异,CVC发生率约为34.2%~73.1%,VC约为58%~79.8%,且CVC中通常以主动脉瓣钙化更为常见^[11]。本研究结果显示老年MHD患者CVC和VC均轻中度改变为主提示检测MHD患者血清hs-CRP和Fetuin-A表达水平对CVC和VC诊断和病情评估可能具有重要参考价值。另ROC曲线分析结果显示hs-CRP灵敏度较高,而Fetuin-A特异度更具优势,两者联合检测可进一步提升诊断价值。

Fetuin-A是对钙磷沉积具有强效抑制作用的负急性时相反应蛋白,主要由肝细胞合成并广泛分布于各种细胞液中,可与高磷酸钙等矿物质盐结合并沉积与动脉粥样斑块等病理组织^[12]。Sciolla等^[13]报道显示骨桥蛋白和Fetuin-A可能参与VC发生,是ESRD患者心血管死亡和全因死亡的重要危险因素。本研究结果显示老年MHD合并CVC或VC的患者血清hs-CRP水平明显升高,Fetuin-A水平明显降低,且二者与钙化严重程度均存在明显相关性,可见血清hs-CRP和Fetuin-A水平对评估MHD患者CVC或VC严重程度也具有一定参考价值。刘凌等^[14]等报道显示肾脏病5期末透析患者Fetuin-A与hs-CRP具有明显负相关性,提示Fetuin-A可能通过影响MHD患者机体炎症状态而导致VC发生。张菲菲等^[15]研究表明透析患者血清Fetuin-A水平与hs-CRP和心脏瓣膜钙化数量呈明显负相关性,证实血清Fetuin-A水平可作为评估CVC严重程度的有效指标,其中CVC发病率稍低于本研究结果,可能与本研究样为老年人群有关,提示年龄可能与MHD患者CVC发生密切相关,但具体关系尚未明确。另外老年MHD患者CVC与VC常合并存在,本研究中由于数量偏小,本研究未给予深入分析,因此hs-CRP和Fetuin-A对两者同时发生的影响还有待后续更多研究进行探讨证实。

综上所述,老年MHD患者常合并CVC或VC,其中hs-CRP和Fetuin-A可能在钙化发生和进展过程中发挥重要作用,且对CVC或VC诊断和严重程度评估均具有良好参考价值。

参考文献

[1] Ketteler M, Block GA, Evenepoel P, et al. Executive summary of the 2017 KDIGO Chronic Kidney Disease- Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD) Guideline Update: what's

changed and why it matters[J]. *Kidney Int*, 2017, 92(1):26-36.

- [2] Li X, Xu H, Xiao XC, et al. Prognostic effect of high-flux hemodialysis in patients with chronic kidney disease[J]. *Braz Jo Med Biol Res*, 2016, 49(1):e4708.
- [3] Ogata H, Kumasawa J, Fukuma S, et al. The cardiothoracic ratio and all-cause and cardiovascular disease mortality in patients undergoing maintenance hemodialysis: results of the MBD-5D study[J]. *Clin Exp Nephrol*, 2017, 21(5):807-808.
- [4] Jimbo R, Kawakami-Mori F, Mu S, et al. Fibroblast growth factor 23 accelerates phosphate-induced vascular calcification in the absence of Klotho deficiency[J]. *Kidney Int*, 2014, 85(5):1103-1111.
- [5] Hod K, Ringel-Kulka T, Martin CF, et al. High Sensitive C-Reactive Protein as a Marker for Inflammation in Irritable Bowel Syndrome[J]. *J Clin Gastroenterol*, 2016, 50(3):227-232.
- [6] Hashemi J, Joshaghani HR, Akaberi A, et al. Potential Correlation Between Circulating Fetuin-A and Pentraxin-3 With Biochemical Parameters of Calcification in Hemodialysis Patients[J]. *Arch Iran Med*, 2017, 20(12):752-755.
- [7] Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD - MBD Work Group. KDIGO 2017 Clinical Practice Guideline Update for the Diagnosis, Evaluation, Prevention, and Treatment of Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD)[J]. *Kidney Int Suppl* (2011), 2017, 7(1):1-59.
- [8] 张琢,吴雪莹,徐天华,等. 维持性血液透析30例血清骨形成蛋白7与腹主动脉钙化相关性研究[J]. *中国实用内科杂志*, 2018, 38(12):1165-1168.
- [9] 陈香美,孙雪峰,蔡广研. 我国慢性肾脏病防治的公共健康政策思考[J]. *中华医学杂志*, 2014, 94(4):241-243.
- [10] Rogan A, McCarthy K, McGregor G, et al. Quality of life measures predict cardiovascular health and physical performance in chronic renal failure patients[J]. *PLoS One*, 2017, 12(9):e0183926.
- [11] Brandenburg VM, Kramann R, Koos R, et al. Relationship between sclerostin and cardiovascular calcification in hemodialysis patients: a cross-sectional study[J]. *BMC Nephrol*, 2013, 14(1):219-235.
- [12] 陈建华,徐玉琴,杨晋辉,等. 间充质干细胞移植治疗终末期肝病前后血清甲胎球蛋白的变化[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2015, 7(2):110-113.
- [13] Sciolla JJ, Kao WH, Crainiceanu C, et al. Biomarkers of vascular calcification and mortality in patients with ESRD[J]. 2014, 9(4):745-755.
- [14] 刘凌,陈瑶,杨英,等. 血清胎球蛋白A水平与慢性肾脏病5期末透析患者血管钙化的相关性[J]. *中国医药导报*, 2016, 13(29):24-27.
- [15] 张菲菲,高延霞,张雪晶,等. 维持性血液透析患者胎球蛋白A和炎症水平与心脏瓣膜钙化的相关性[J]. *临床肾脏病杂志*, 2015, 15(3):142-146.

血尿酸和胰岛功能与2型糖尿病患者血液流变学相关性分析

杜金红^{1*} 王中正² 郭亚娜¹

[摘要] 目的 探究血尿酸(UA)、胰岛功能与2型糖尿病(T2DM)患者血液流变学相关性。方法 选取2018年1月至2018年12月在本院收治的176例T2DM患者作为研究对象,根据血液流变学分为血液黏度正常组(72例)、血液黏度升高组(104例)。检测、对比2组血清UA、胰岛功能[空腹胰岛素(FINS)、空腹C肽(FCP)]水平,采用Logistic回归分析探究T2DM患者血液流变学改变影响因素, Pearson相关性分析血清UA、FINS、CP与血液流变学相关性。以是否发生微血管病变分为微血管病变者、无微血管病变者,对比2组血清UA、FINS、FCP水平, Pearson相关性分析血清UA、FINS、FCP水平与微血管病变关联性。结果 ①血液黏度升高组血清UA、FINS、FCP水平高于血液黏度正常组($P < 0.05$);②病程、血清UA、FINS、FCP水平是T2DM血液流变学改变的重要影响因素($P < 0.05$);③血清UA、FINS、FCP水平与血液流变学呈正相关($P < 0.05$);④微血管病变者血清UA、FINS、CP水平高于无微血管病变者($P < 0.05$);⑤血清UA、FINS、FCP水平与微血管病变呈正相关($P < 0.05$)。结论 血清UA、FINS、FCP水平是T2DM患者血液流变学改变危险因素,与血液流变学改变、微血管病变呈正相关,动态监测上述血清指标水平,可为临床评估预后提供科学指导。

[关键词] 血尿酸;胰岛功能;2型糖尿病;血液流变学;微血管病变;血液黏度

Correlation between serum uric acid, islet function and hemorheology in patients with type 2 diabetes

DU Jinhong^{1*}, WANG Zhongzheng², GUO Yana¹

(1. Clinical laboratory, zhengzhou 7th people's hospital, Zhengzhou, Hennan, China, 45000; 2. Clinical laboratory, zhengzhou first people's hospital, Zhengzhou, Hennan, China, 45000)

[ABSTRACT] Objective To investigate the relationship between serum uric acid (UA), islet function and hemorheology in patients with type 2 diabetes mellitus (T2DM). Methods 176 T2DM patients admitted to our hospital from January 2018 to December 2018 were selected as research objects, according to hemorheology, they were divided into normal blood viscosity group (72 cases) and blood viscosity increased group (104 cases). The levels of serum UA and islet function [fasting insulin (FINS) and fasting C-peptide (FCP)] were detected and compared. Logistic regression analysis was used to investigate the influencing factors of hemorheology in patients with T2DM. Pearson correlation analysis was performed on the correlation between serum UA, FINS, CP and hemorheology. The microvascular lesions were divided into those with microangiopathy and those without microangiopathy. The serum levels of UA, FINS and FCP were compared between the two groups. The correlation between serum UA, FINS and FCP levels and microangiopathy was analyzed by Pearson correlation. Results ①Serum UA, FINS and FCP levels in the blood viscosity increased

基金项目:河南省医学科技攻关项目(2016C014025)

作者单位:1. 郑州市第七人民医院检验科,河南,郑州 45000

2. 郑州市第一人民医院检验科,河南,郑州 45000

*通信作者:杜金红, E-mail: drnt71968555@163.com

group were higher than those in the normal blood viscosity group ($P<0.05$). ② Course of disease, serum UA, FINS and FCP levels are important influencing factors of T2DM hemorheological changes ($P<0.05$). ③ Serum UA, FINS, FCP levels were positively correlated with hemorheology ($P<0.05$). ④ Serum UA, FINS, CP levels were higher in microvascular lesions than those without microvascular disease ($P<0.05$). ⑤ Serum UA, FINS and FCP levels were positively correlated with microangiopathy ($P<0.05$). Conclusion Serum levels of UA, FINS and FCP are risk factors for hemorheological changes in patients with T2DM. They are positively correlated with changes in hemorheology and microvascular diseases. Dynamic monitoring of the above serum indicators can provide scientific guidance for clinical assessment of prognosis.

[KEY WORDS] Serum uric acid; Islet function; Type 2 diabetes mellitus; Hemorheology; Microangiopathy; Blood viscosity

2型糖尿病(Type 2 diabetes mellitus, T2DM)主要特征为慢性血糖水平呈进行性升高,流行病学调查显示,目前全球约有糖尿病患者1.8亿,预测到2030年将增加>1倍^[1-2]。相关研究发现,糖尿病患者普遍存在血液流变学障碍,可增高血液黏度,提高血细胞聚集性,引发糖尿病微血管病变,增加致残致死风险^[3]。另外,研究还指出,高血糖、胰岛素功能紊乱一定程度上可影响胰岛素控制血管内皮细胞、平滑肌细胞及肾小球系膜细胞对葡萄糖的摄取,增加细胞内血糖水平,从而诱发细胞病理性改变,促使微血管病变发生发展^[4]。同时,学者认为,初诊T2DM患者在控制血糖、血压、血脂及体质量的同时,更应调控血尿酸(Uric acid, UA)水平、改善血液流变学,进一步抑制或延缓病情进展^[5]。基于此,本研究以UA、空腹胰岛素(Fasting plasma insulin, FINS)、空腹C肽(Fasting C-peptide, FCP)作为观察指标,通过观察其与T2DM患者血液流变学相关性,旨在为临床预防微血管病变发生提供更多循证依据。具体分析如下。

1 资料和方法

1.1 一般资料

选取2018年1月至2018年12月在本院收治的176例T2DM患者作为研究对象,其中微血管病变84例、无微血管病变92例。根据血液流变学分为血液黏度正常组(72例)、血液黏度升高组(104例)。2组年龄、性别、体质量指数、糖化血红蛋白(HbA1c)、腰围等基本资料比较,差异无统计学意义($P>0.05$),但具有可比性。两组病程、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、总胆固醇(TC)、全血黏度200、全血黏度30、全血黏度5、全血黏度1、血浆黏度200相比,差异具有统计

学意义($P<0.05$),见表1。所有患者及家属均已签署知情同意书。研究经我院医学伦理委员会批准。

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

一般资料	血液黏度升高组 (n=104)	血液黏度正常组 (n=72)	t/ χ^2 值	P值
性别(男/女)	76/28	53/19	0.006	0.937
年龄(岁)	59.74±4.05	60.18±3.72	0.732	0.465
体质量指数(kg/m ²)	23.05±1.47	22.97±1.53	0.349	0.727
腰围(cm)	93.65±13.49	92.23±17.73	0.814	0.417
T2DM病程(年)	9.84±2.01	6.47±1.05	13.040	<0.001
全血黏度200(ma/s)	4.66±0.65	3.87±0.62	8.078	<0.001
全血黏度30(ma/s)	6.10±0.83	4.91±0.77	9.630	<0.001
全血黏度5(ma/s)	9.04±0.72	7.84±0.69	11.057	<0.001
全血黏度1(ma/s)	17.98±1.76	15.06±1.22	12.191	<0.001
血浆黏度200(ma/s)	1.72±0.35	1.31±0.28	8.273	<0.001
HDL-C(mmol/L)	1.63±0.28	1.05±0.31	12.929	<0.001
LDL-C(mmol/L)	3.72±0.59	1.11±0.47	31.281	<0.001
TC(mmol/L)	6.21±1.20	4.79±1.35	17.032	<0.001
HbA1c(%)	9.84±2.25	7.48±2.19	1.055	0.293

1.2 选取标准

纳入标准:①均符合《2017 VA/DoD 临床实践指南:2型糖尿病的管理》^[6]中T2DM诊断标准;②空腹血糖(FPG)≥7.0 mmol/L或餐后2h血糖(2hFPG)≥11.1 mmol/L;③临床资料完整者;④全血黏度200>4.32 ma/s、全血黏度30>5.45 ma/s、全血黏度5>8.53、全血黏度1>17.91 ma/s、血浆黏度200>1.70 ma/s中2项及以上存在则判定为血液黏度升高;⑤患者及家属知情并签署同意书。排除标准:①1型糖尿病患者;②肝肾等重要脏器器质性病变者;③血压>160/100 mmHg者;④感染、外伤、

胰腺炎等应激状态者;⑤合并糖尿病酮症酸中毒、高渗状态或其他糖尿病急性并发症者;⑥严重心脑血管疾病者;⑦既往有甲状腺、呼吸睡眠暂停综合征、风湿免疫系统疾病、肿瘤者;⑧近期存在糖皮质激素治疗史者;⑨继发性或原发性失语症、认知功能障碍、意识不清或精神行为异常者。

1.3 方法

入院后晨起空腹取 3 mL 静脉血,离心 15 min, 3 000 r/min,分离取血清,置于-20℃冰箱低温保存,以全自动电化学发光免疫仪(型号:MODULAR P800)以电化学发光免疫法检测血清 UA、FINS、FCP 水平,仪器与试剂盒均购自德国罗氏公司,严格按照仪器与试剂盒说明书操作。

1.4 观察指标

①对比 2 组血清 UA、FINS、FCP 水平。②T2DM 血液流变学改变的影响因素。③血清 UA、FINS、FCP 水平与血液流变学相关性。④根据 T2DM 患者有无微血管病变分为 84 例微血管病变者、92 例无微血管病变者。对比微血管病变与无微血管病变者血清 UA、FINS、FCP 水平。⑤血清 UA、FINS、FCP 水平与微血管病变相关性。

1.5 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,通过 Logistic 进行多因素回归分析,采用 Person 进行相关性分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2 组血清 UA、FINS、FCP 水平

血液黏度升高组血清 UA、FINS、FCP 水平高

于血液黏度正常组,差异具有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。

表 2 2 组血清 UA、FINS、FCP 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of serum UA, fins and FCP levels in 2 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	UA(μmol/L)	FINS(mU/L)	FCP(μg/L)
血液黏度升高组	104	364.40±75.12	14.86±2.07	1.84±0.42
血液黏度正常组	72	302.36±61.59	11.82±1.49	1.37±0.35
<i>t</i> 值		5.788	10.687	7.802
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001

2.2 T2DM 血液流变学改变的影响因素

以 T2DM 血液流变学(血液黏度正常赋值为 1,血液黏度升高赋值为 2,高黏血症赋值为 3)作为因变量,将病程、血清 UA、FINS、FCP 水平作为自变量,纳入 Logistic 回归分析,结果显示,病程、血清 UA、FINS、FCP 水平是 T2DM 血液流变学改变的重要影响因素($P < 0.05$),见表 3。

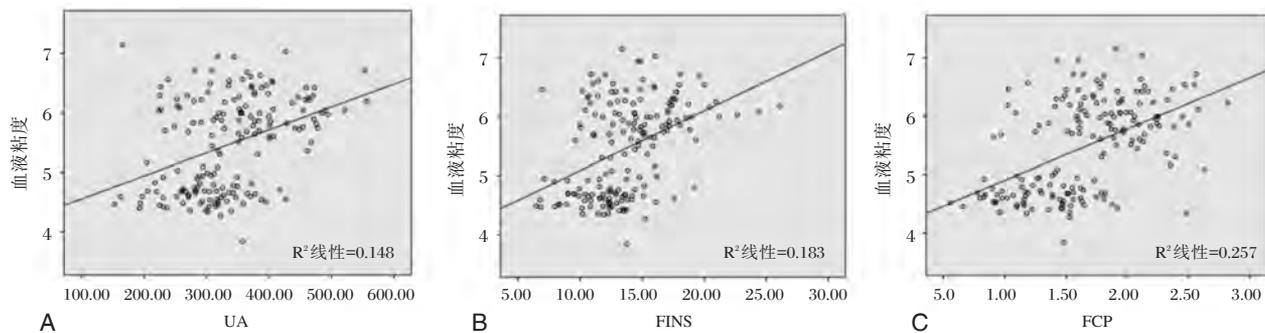
表 3 T2DM 血液流变学改变的影响因素

Table 3 Influencing factors of hemorheology changes in T2DM

变量	β 值	SE 值	Wald/χ ² 值	<i>P</i> 值	OR 值	95%CI 值
病程	0.749	0.442	2.873	0.012	2.115	1.421~3.149
血清 UA	0.787	0.396	3.947	0.025	2.196	1.175~4.105
FINS	0.560	0.304	3.399	0.031	1.751	1.064~2.883
FCP	0.784	0.411	3.637	0.028	2.190	1.278~3.752

2.3 血清 UA、FINS、FCP 水平与血液流变学相关性

经 Person 相关系数分析,血清 UA($r=0.385$)、FINS($r=0.428$)、FCP($r=0.507$)水平与血液流变学呈正相关($P < 0.05$),见图 1。



注:A 为血清 UA 水平与血液流变学相关性;B 血清 FINS 水平与血液流变学相关性;C 血清 FCP 水平与血液流变学相关性。

图 1 血清与血液流变学相关性分析图

Figure 1 Correlation analysis of serum and hemorheology

2.4 微血管病变与无微血管病变者血清 UA、FINS、FCP 水平

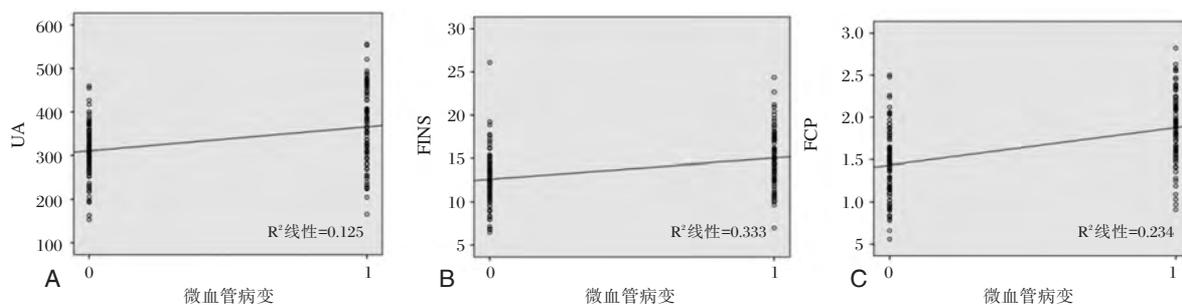
微血管病变者血清 UA、FINS、CP 水平高于无微血管病变者,差异具有统计学意义($P<0.05$),见表 4。

2.5 血清 UA、FINS、FCP 水平与微血管病变相关性

微血管病变赋值“0”=无,“1”=有,经 Person 相关系数分析,血清 UA($r=0.353$)、FINS($r=0.364$)、FCP($r=0.484$)与微血管病变呈正相关($P<0.05$),见图 2。

表 4 血清 UA、FINS、FCP 水平与微血管病变比较
($\bar{x}\pm s$)

组别	n	UA	FINS(mU/L)	FCP($\mu\text{g/L}$)
微血管病变者	84	381.75 \pm 85.09	15.32 \pm 2.55	2.11 \pm 0.56
无微血管病变者	92	300.01 \pm 79.73	12.06 \pm 1.87	1.23 \pm 0.48
t 值		6.579	9.729	11.220
P 值		<0.001	<0.001	<0.001



注:A 为血清 UA 水平与微血管病变相关性; B 为血清 FINS 水平与微血管病变相关性; C 为血清 FCP 水平与微血管病变相关性。

图 2 血清与微血管病变相关性分析图

Figure 2 Correlation analysis of serum and microangiopathy

3 讨论

近年来,随我国人口老龄化趋势加剧,T2DM 患病人数呈逐年递增态势^[7-8]。相关研究表明,糖尿病患者血液处于高凝、高黏状态,易造成局部组织缺血、缺氧,增加微血管病变发生率^[9]。因此及时明确血液流变学改变因素,对延缓 T2DM 病情、预防微血管病变发生具有积极作用。

UA 属人体嘌呤代谢产物,经由机体核酸代谢形成,资料显示,代谢紊乱时,血液中 UA 水平增高,可提高心血管发病率,引发肾脏损伤。同时,彭喜涛等^[10]研究发现,UA 水平异常是 T2DM 患者颈动脉硬化病变的危险因素。本研究结果表明,血清 UA 水平在血液黏度升高患者中呈异常表达状态,与楼标雷等^[11]、张秀萍等^[12]研究相似。表明 UA 在 T2DM 患者血液流变学改变发生、发展中具有重要作用。结合文献分析机制可能为:T2DM 患者具有高水平胰岛素及胰岛素前体物质,可刺激肾小管 $\text{Na}^+\text{-K}^+$ 交换,增加 H^+ 排泄,促使 UA 等阴离子重吸收,提高 UA 水平,且胰岛素抵抗状态下,3-磷酸甘油脱氢酶活性削弱、糖酵解过程中间产物 5-磷酸核糖转移、嘌呤代谢紊乱均可增加 UA 水平^[13]。另外,经 Logistic 回归性分析结果显示,血

清 UA 水平是 T2DM 血液流变学改变的重要影响因素,并在微血管病变者中呈高表达状态,与刘艳萍^[14]研究相似。李双等^[15]研究也证实,高尿酸血症可促进糖尿病大血管病变、微血管病变、神经病变、糖尿病足等的发生发展,提示临床应警惕血清 UA 水平升高,以防微血管病变发生。

资料显示,高胰岛素血症可损伤血管内皮细胞,刺激产生纤溶酶原激活物抑制剂,加重血液高凝状态,诱发血管疾病^[16-17]。同时,相关研究认为,血液黏度是影响糖尿病微血管病变发生发展的重要因素^[18]。本研究数据表明,血清 FINS、FCP 水平在血液黏度升高中呈异常表达,并与血液流变学异常呈正相关。纪秋媛^[19]研究也证实 T2DM 患者 FCP 水平及其所反映胰岛素抵抗程度可能是血浆纤维蛋白原水平升高的危险因素。基于上述研究经 Person 相关系数进一步发现,血清 UA、FINS、FCP 与微血管病变呈正相关。充分表明血清 UA、FINS、FCP 水平可作为 T2DM 患者预后的预测因子,警惕微血管病变发生。

综上所述,血清 UA、FINS、FCP 是 T2DM 患者血液流变学改变的危险因素,与血液流变学改变、微血管病变呈正相关,动态监测上述血清指标水平,可为临床评估预后提供科学循证指导。

参考文献

- [1] Brito JP, Montori VM, Davis AM. Metabolic Surgery in the Treatment Algorithm for Type 2 Diabetes: A Joint Statement by International Diabetes Organizations [J]. JAMA, 2017, 317(6):635-636.
- [2] Luo P, Yu H, Zhao X, et al. Metabolomics Study of Roux-en-Y Gastric Bypass Surgery (RYGB) to Treat Type 2 Diabetes Patients Based on Ultraperformance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry [J]. J Proteome Res, 2016, 15(4):1288-1299.
- [3] 刘天,魏爱生,麦伟华,等.降糖一方联合西药治疗2型糖尿病疗效及对相关代谢指标、凝血功能和血液流变学的影响[J].中华中医药学刊,2018,36(5):1193-1195.
- [4] 刘真真,刘金波,刘传谦,等.2型糖尿病微血管病变患者血浆内脂素水平变化及意义[J].山东医药,2018,58(14):47-49.
- [5] 刘冰,洪旭.尿酸水平与初诊2型糖尿病患者游离脂肪酸及糖基化终末产物的相关性分析[J].中国实验诊断学,2018,22(5):28-31.
- [6] Conlin P R, Colburn J, Aron D, et al. Synopsis of the 2017 U.S. Department of Veterans Affairs / U.S. Department of Defense Clinical Practice Guideline: Management of Type 2 Diabetes Mellitus [J]. Ann Intern Med, 2017, 167(9):655-663.
- [7] 梁爽,王伟伟,孙力,等.PPAR γ C1启动子甲基化与II型糖尿病发病相关性分析[J].分子诊断与治疗杂志,2019,11(2):91-95.
- [8] 程静,吴涛,向明,等.南苜蓿总皂苷对2型糖尿病大鼠血液流变学及胰岛素抵抗作用的研究[J].辽宁中医杂志,2017,44(2):389-392.
- [9] Diaw M, Pialoux V, Martin C, et al. Sick Cell Trait Worsens Oxidative Stress, Abnormal Blood Rheology, and Vascular Dysfunction in Type 2 Diabetes [J]. Diabetes Care, 2015, 38(11):2120-2127.
- [10] 彭喜涛,方宏超,崔明哲,等.2型糖尿病合并颈动脉粥样硬化患者尿酸水平与颈动脉内膜中层厚度的相关性[J].宁夏医科大学学报,2016,38(7):805-807.
- [11] 楼标雷,魏巍,周颖奇,等.初诊2型糖尿病合并代谢综合征患者血清尿酸水平与血液流变学相关性分析[J].检验医学与临床,2013,10(12):1520-1522.
- [12] 张秀萍,钟诚.血清同型半胱氨酸、糖化血红蛋白和尿酸与2型糖尿病合并冠心病患者冠状动脉病变的相关性分析[J].解放军医药杂志,2018,30(3):35-38.
- [13] 刘国敏,李志红,张学艳,等.2型糖尿病合并急性脑梗死中血清hs-CRP、UA水平以及血液流变学指标的联合诊断评价[J].中国医药导刊,2017,19(1):31-32.
- [14] 刘艳萍.T2DM合并METS患者UA水平及血液流变学指标相关性分析[J].热带医学杂志,2016,16(12):1521-1523.
- [15] 李双,李艳波.尿酸与2型糖尿病及其慢性并发症的关系[J].中国医药导报,2017,14(11):26-29.
- [16] 陈勇,李晓琴,李燕.丹红注射液对糖尿病伴高凝状态的疗效观察研究[J].西南国防医药,2017,27(12):1259-1262.
- [17] 刘鑫,郭占胜.祛痰抵方联合西药治疗T2DM疗效及对患者血液高凝状态、血PAI-1、APN的影响[J].四川中医,2019,37(2):114-117.
- [18] 牟健.2型糖尿病血管病变的血小板凝血酶敏感蛋白表达及抗凝治疗观察[J].血栓与止血学,2016,22(5):533-535.
- [19] 纪秋媛.2型糖尿病病人胰岛素抵抗与血浆纤维蛋白原的相关性[D].大连医科大学,2017:1-32.

(上接第282页)

- [6] 涂志华,周知,吴维学,等.海南省陵水黎族自治县育龄夫妇地中海贫血基因检测结果分析[J].中国实验血液学杂志,2019,27(4):1227-1231.
- [7] 严提珍,罗世强,唐宁,等.实时荧光PCR熔解曲线法在 β -地中海贫血基因诊断和产前诊断中的临床应用评价[J].中华检验医学杂志,2012,35(5):407-412.
- [8] 傅芬蕊,彭云娟,钟文福,等.建宁地区孕妇地中海贫血基因检测结果分析[J].中华地方病学杂志,2019,38(8):619-622.
- [9] 庄建龙,王元白,庄倩梅,等.福建省泉州市41026对育龄夫妇地中海贫血筛查及基因检测结果分析[J].中华地方病学杂志,2019,38(8):623-627.
- [10] 蔡文倩,胡晞江,戴翔,等.中国武汉地区孕妇地中海贫血基因检测及产前诊断[J].中国实验血液学杂志,2019,27(6):1919-1924.
- [11] 李继慧,覃运荣,梁毅.地中海贫血的实验室分子诊断技术研究进展[J].分子诊断与治疗杂志,2018,10(3):202-205.
- [12] 杨振,黄杰,于婷,等.我国体外诊断试剂国家标准物质现状及对策分析[J].中国生物制品学杂志,2015,28(7):765-771.
- [13] 张欣涛,郝擎,石现,等.2013-2016年国家医疗器械监督抽检产品质量状况分析[J].中国医疗器械杂志,2017,3(41):216-219.

重症 COPD 患者 IL-33/ST2 比值与血气指标、氧化应激反应程度的相关性分析

尹晶 陈文涛 郝毅刚*

[摘要] 目的 探讨重症慢性阻塞性肺疾病(COPD)患者 IL-33/ST2 比值与血气指标、氧化应激反应程度的相关性。方法 2017年5月至2019年5月期间在本院ICU接受治疗的重症COPD患者90例作为重症COPD组,同期在本院进行体检的健康志愿者100例作为正常对照组,对比两组血清IL-33/ST2比值,并根据重症COPD组中位数将其分为高IL-33/ST2比值组、低IL-33/ST2比值组各45例。对比两组研究对象动脉血气指标[氧分压(PaO_2)、二氧化碳分压(PaCO_2)、PH]、血清氧化应激指标[超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、活性氧(ROS)、丙二醛(MDA)]水平的差异。评估重症COPD患者血清IL-33/ST2比值与血气指标、氧化应激反应程度的相关性。结果 重症COPD组患者血清IL-33、ST2的水平均高于正常对照组,而IL-33/ST2比值低于正常对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。重症COPD患者的 PaO_2 、PH水平、血清中SOD、CAT的水平均低于正常对照组,且随着IL-33/ST2比值的降低, PaO_2 、PH水平不断的降低;重症COPD患者的 PaCO_2 水平,ROS及MDA的水平高于均正常对照组($P<0.05$),且随着IL-33/ST2比值的降低, PaCO_2 水平,ROS及MDA的水平在不断的升高,差异具有统计学意义($P<0.05$)。结论 IL-33、ST2在重症COPD患者中表达较高,参与了COPD的发病过程,可在一定程度上反应病情,但比值异常降低,且具体比值与病情相关指标水平直接相关,可能是反映疾病严重程度及转归的有效指标之一。

[关键词] 重症COPD; IL-33/ST2比值; 血气指标; 氧化应激

Correlation analysis of IL - 33/ST2 ratio with blood gas index and degree of oxidative stress response in patients with severe COPD

YIN Jing, CHEN Wentao, YU Yigang*

(909th Hospital of the Joint Service of the People's Liberation Army, Zhangzhou, Fujian, China, 363000)

[ABSTRACT] Objective To investigate the correlation between IL - 33/ST2 ratio and blood gas indexes the degree of oxidative stress in patients with severe COPD. Methods 90 cases of severe COPD patients in our hospital during May 2017 to May 2019 were chosen as severe COPD group, 100 cases of healthy volunteers who underwent physical examination in our hospital were recruited as normal control group. Serum IL-33/ST2 ratio of two groups was compared, they were divided into high IL-33/ST2 ratio group, low IL - 33/ST2 ratio group based on the median of IL - 33/ST2 ratio in severe COPD group. The differences of arterial blood gas indicators [Partial pressure of oxygen (PaO_2), partial pressure of carbon dioxide (PaCO_2), PH], serum oxidative stress indicators [Superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), reactive oxygen species (ROS), malondialdehyde (MDA)] in each group were compared. To evaluate the correlation between serum IL-33/ST2 ratio and blood gas indicators and the degree of oxidative stress response in severe COPD patients. Results Serum levels of IL-33 and ST2 in severe COPD group were higher than those in normal control group, IL-33/ST2 ratio was lower than that in normal control group ($P<0.05$). The levels of PaO_2 , PH

基金项目:军队后勤科研重大项目(BLB18J006)

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

*通信作者:郝毅刚, E-mail: 769097433@qq.com

and SOD and CAT in serum of patients with severe COPD were all lower than those in the normal control group, and with the decrease of IL-33/ST2 ratio, the levels of PaO₂ and PH continued to decrease. The levels of PaCO₂, ROS and MDA in patients with severe COPD were higher than those in the normal control group, and as the IL-33/ST2 ratio decreased, the levels of PaCO₂, ROS and MDA continued to increase, the difference was statistically significant ($P < 0.01$). **Conclusion** IL-33 and ST2 are highly expressed in patients with severe COPD and participate in the pathogenesis of COPD, and can reflect the disease condition to a certain extent. However, the ratio is abnormally reduced, and the specific ratio is directly related to the level of disease-related indicators, which may be one of the effective indicators to reflect the disease severity and outcome.

[KEY WORDS] Severe COPD; IL-33/ST2 ratio; Blood gas index; Oxidative stress

慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)是临床最多见的肺部慢性炎症性疾病,其在吸烟人群中的患病率已达50%以上,是全球致残及致死率较高的疾病之一^[1-2]。重症COPD患者多伴有不同程度呼吸衰竭,需采取积极有效的救治手段以提高患者的存活率,故寻找简便、准确、可重复的病情评估指标对此类患者的治疗及最终结局优化等具有重要意义。白介素33(Interleukin-33, IL-33)是白介素-1家族的成员,生长刺激表达基因2蛋白(growth stimulation expressed gene 2, ST2)是IL-33的一种受体,基础研究^[3-4]发现IL-33可通过ST2激活单核巨噬细胞并扩大炎症反应,且ST2可能发挥更直接的作用。目前关于IL-33/ST2比值对COPD患者的病情评估价值研究涉及不多,文中以此为切入点探讨本院重症COPD患者的血清IL-33/ST2比值及其与病情相关指标水平的内在联系,旨在为COPD患者的病情评估、治疗指导、结局预测等提供新手段。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2017年5月至2019年5月间在本院ICU接受治疗的重症COPD患者90例作为重症COPD组,取同期在本院进行体检的健康志愿者100例作为正常对照组,年龄18~80周岁、各项检查结果均在正常范围内、所有参与实验者均签署知情同意书。纳入标准:①符合中华医学会呼吸病学分会慢性阻塞性肺疾病学组制定的《慢性阻塞性肺疾病诊治指南(2007年修订版)》^[5]中对重症COPD的定义,此次因COPD急性加重入院;②入院前动脉血气分析提示呼吸衰竭;③患者年龄18~80周岁;④本人或直系亲属签署知情同意书。排除标

准:①合并哮喘、尘肺、肺癌等其他呼吸系统疾患;②合并肾炎等活动性感染;③长期糖皮质激素服用史;④既往上气道或者肺部手术史。两组资料中重症COPD组中男性49例、女性41例,年龄48~79(64.27±11.53)周岁,体质指数(23.19±3.20) kg/m²;正常对照组中男性54例、女性46例,年龄46~78(64.10±10.96)周岁,体质指数(23.09±3.14) kg/m²。两组间上述基础资料的分布情况比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。实验经本院伦理委员会商讨后获批。

1.2 IL-33/ST2 比值测定

入组即刻(重症COPD患者尚未开始针对性治疗),留取两组研究对象的外周静脉血标本3.0~5.0 mL,分离血清后采用酶联免疫吸附法检测其中IL-33、ST2的水平,计算IL-33/ST2比值。根据重症COPD组患者IL-33/ST2比值中位数,将该组患者分为高IL-33/ST2比值组、低IL-33/ST2比值组各45例。

1.3 血气指标

入组即刻,留取各组研究对象的桡动脉血标本2.0 mL左右,使用德国拜耳BJB36Rapidlab248血气分析仪测定血气指标,包括氧分压(PaO₂)、二氧化碳分压(PaCO₂)、PH。

1.4 氧化应激指标

血清标本同1.2,采用放射免疫法检测其中氧化应激指标水平,包括超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、活性氧(ROS)、丙二醛(MDA)。

1.5 统计学方法

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,正态分布,组间比较采用 t 检验。多组间比较采用方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组 IL-33/ST2 比值

重症 COPD 组患者血清 IL-33、ST2 的水平高于正常对照组, IL-33/ST2 比值低于正常对照组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$) 见表 1。

表 1 两组研究对象的 IL-33/ST2 比值比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of IL-33/ST2 ratios between the 2 groups of subjects ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	IL-33 (pg/mL)	ST2 (pg/mL)	IL-33/ST2 比值
重症 COPD 组	90	328.45±59.77	4.61±0.73	71.25±9.64
正常对照组	100	145.39±17.22	0.94±0.11	154.67±21.88
<i>t</i> 值		29.313	49.666	33.366
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000

2.2 动脉血气指标

高 IL-33/ST2 比值组、低 IL-33/ST2 比值患者的 PaO₂、PH 水平均低于正常对照组, PaCO₂ 水平高于正常对照组; 低 IL-33/ST2 比值患者 PaO₂、PH 水平

进一步低于高 IL-33/ST2 比值组, PaCO₂ 水平进一步高于高 IL-33/ST2 比值组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 3 组研究对象的动脉血气指标水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of arterial blood gas index levels of subjects in 3 group ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	PaO ₂ (mmHg)	PaCO ₂ (mmHg)	PH
低 IL-33/ST2 比值组	45	45.37±6.02	62.34±7.22	7.10±0.23
高 IL-33/ST2 比值组	45	53.21±5.88	54.21±6.09	7.26±0.21
正常对照组	100	99.02±0.71	39.77±4.12	7.39±0.09
<i>F</i> 值		3501	295.3	49.15
<i>P</i> 值		<0.01	<0.01	<0.01

2.3 氧化应激指标

高 IL-33/ST2 比值组、低 IL-33/ST2 比值患者血清中 SOD、CAT 的水平低于正常对照组, ROS、MDA 的水平高于正常对照组; 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 3 组研究对象的氧化应激指标水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of the levels of oxidative stress indicators of subjects in 3 group ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	SOD (U/mL)	CAT (μmol/L)	ROS (pg/mL)	MDA (nmol/mL)
低 IL-33/ST2 比值组	45	132.87±16.31	5.26±0.62	41.27±6.04	5.66±0.71
高 IL-33/ST2 比值组	45	218.46±42.20	10.20±1.71	30.16±5.49	3.79±0.53
正常对照组	100	452.19±69.34	22.76±4.30	13.72±1.88	2.18±0.42
<i>F</i> 值		625.5	532.3	732.1	693.1
<i>P</i> 值		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

2.4 重症 COPD 患者血清 IL-33/ST2 比值与动脉血气指标中 PaO₂、PH 的水平相关性分析

重症 COPD 患者血清 IL-33/ST2 比值与动脉血气指标中 PaO₂、PH 的水平呈正相关, 与 PaCO₂ 的水平呈负相关; 与氧化应激指标中 SOD、CAT 的水平呈正相关, 与 ROS、MDA 的水平呈负相关差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 4。

表 4 重症 COPD 患者 IL-33/ST2 比值与血气指标、氧化应激反应程度的相关性

Table 4 Correlation of IL-33/ST2 ratio with blood gas index and degree of oxidative stress in patients with severe COPD

	PaO ₂	PaCO ₂	PH	SOD	CAT	ROS	MDA
IL-33/ST2 比值	0.574	-0.681	0.723	0.660	0.605	-0.584	-0.711
<i>P</i> 值	0.02	0.009	0.000	0.005	0.012	0.019	0.001

3 讨论

慢性阻塞性肺疾病是临床上的常见病, 难治病。在中国, COPD 的死亡率排在第三位, 已被纳入重大疾病慢性病管理系统。COPD 患者存在明显通气及换气功能异常, 随病情加剧患者 PaO₂ 水平逐步下降而 PaCO₂ 水平明显上升^[6-7]。重症 COPD 患者存在不同程度呼吸衰竭并可致死亡, 检测其动脉血气水平是判断患者呼吸功能的简便手段, 与病情严重程度间具有良好的相关性^[8-9]。同时 COPD 由于各种致病因素可导致氧化产物合成增加以及抗氧化物合成减少、消耗增加, 引起氧化/抗氧化失衡并激发氧化应激反应, 与炎症反应协同导致 COPD 患者气道及肺实质损伤^[10-11]。氧化应激反应对炎症的促进机制可能涉及以下几点:

①氧化产物减弱中性粒细胞的变形能力并使之在肺微循环中滞留、活化^[12]；②氧化产物激活 κB 、 $\text{AP}=\text{I}$ 等,进一步调节炎症介质释放并促进中性粒细胞在肺内滞留^[13]；③氧化产物促进中性粒细胞表面黏附分子表达并进一步释放活性氧及蛋白酶^[14]。故 COPD 患者的血气指标与氧化应激指标会随着疾病的发生与发展而出现改变。

IL-33 是高表达于气管壁内皮细胞的核转录因子之一,其在免疫调节、主动防御、炎症过程中均扮演重要角色,主要通过 ST2 调节机体生物效应并激活 NF- κB 、MAPK 途径^[15-16]。有研究^[17]指出 IL-33 及其受体在呼吸道过敏性疾病的发生发展中扮演重要角色,但关于 IL-33 及其受体 ST2 的比值与具体呼吸系统疾病严重性的内在联系尚未有明确报道。本研究中重症 COPD 患者血清 IL-33、ST2 水平均较健康人群有了大幅提升,其中 ST2 水平提升更显著并最终出现 IL-33/ST2 比值下降。同时结果显示,随着 IL-33/ST2 比值下降,PaCO₂ 水平,ROS 及 MDA 的水平在不断的升高,而 PaO₂、PH 水平在不断的降低,且相关性分析表明重症 COPD 患者 IL-33/ST2 比值与 PaO₂、PH 的水平呈正相关,与 PaCO₂ 的水平呈负相关,可见 IL-33/ST2 比值与重症 COPD 患者的血气紊乱程度直接相关、可间接反映疾病严重程度。同时分析发现重症 COPD 患者 IL-33/ST2 比值与 SOD、CAT 的水平呈正相关,与 ROS、MDA 的水平呈负相关,说明 IL-33/ST2 比值与重症 COPD 患者的氧化应激程度相关。

综上所述,可得出结论:重症 COPD 患者血清 IL-33/ST2 比值异常降低,且具体比值与患者血气异常程度、氧化应激反应程度直接相关,是反映患者具体病情的简便、可靠指标,可能在日后临床病情转归、治疗指导方面具有一定价值。

参考文献

- [1] 刁鑫,兀威,张进召. 吸烟对慢性阻塞性肺疾病患者 CD8⁺T 细胞的影响[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2018, 10(6): 395-398.
- [2] Muhamad R, Draman N, Aziz AA, et al. The effect of Tualang honey on the quality of life of patients with chronic obstructive pulmonary disease: A randomized controlled trial [J]. J Taibah Univ Med Sci, 2017, 13(1): 42-50.
- [3] 马孙强,马成,李济宇. 结直肠癌细胞通过 IL-33/ST2 轴招募肥大细胞的研究[J]. 同济大学学报(医学版), 2018, 39(4): 2018, 39(4): 35-40.
- [4] 肖伟,罗艺. 小鼠局灶性脑缺血再灌注后 IL-33 及其受体的时程表达[J]. 中风与神经疾病杂志, 2017, 34(3): 202-207.
- [5] 中华医学会呼吸病学分会慢性阻塞性肺疾病学组. 性阻塞性肺疾病诊治指南(2007 年修订版)[J]. 中华内科杂志, 2007, 46(3): 254-261.
- [6] Cortegiani A, Longhini F, Carlucci A, et al. High-flow nasal therapy versus noninvasive ventilation in COPD patients with mild-to-moderate hypercapnic acute respiratory failure: study protocol for a noninferiority randomized clinical trial [J]. Trials, 2019, 20(1): 450.
- [7] Uemasu K, Sato S, Muro S, et al. Annual decline in arterial blood oxygen predicts development of chronic respiratory failure in COPD with mild hypoxaemia: A 6-year follow-up study [J]. Respirology, 2019, 24(3): 262-269.
- [8] Fuseya Y, Muro S, Sato S, et al. Complementary regional heterogeneity information from COPD patients obtained using oxygen-enhanced MRI and chest CT [J]. PLoS One, 2018, 13(8): e0203273.
- [9] Tomasic I, Tomasic N, Trobec R, et al. Continuous remote monitoring of COPD patients-justification and explanation of the requirements and a survey of the available technologies [J]. Med Biol Eng Comput, 2018, 56(4): 547-569.
- [10] 吴凡,李泽庚,董昌武,等. 芪白平肺胶囊通过调节 SIRT1/FoxO3a 通路改善 COPD 气虚痰瘀证大鼠炎症及氧化应激状态[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2019, 35(2): 115-120.
- [11] 张锋,张瑛,黄玲,等. 血清 SIRT1 水平与慢性阻塞性肺疾病患者肺功能及氧化应激的关系[J]. 山东医药, 2019, 59(4): 68-70.
- [12] Ryrsø CK, Thaning P, Siebenmann C, et al. Effect of endurance versus resistance training on local muscle and systemic inflammation and oxidative stress in COPD [J]. Scand J Med Sci Sports, 2018, 28(11): 2339-2348.
- [13] Choudhury G, MacNee W. Role of Inflammation and Oxidative Stress in the Pathology of Ageing in COPD: Potential Therapeutic Interventions [J]. COPD, 2017, 14(1): 122-135.
- [14] Austin V, Crack PJ, Bozinovski S, et al. COPD and stroke: are systemic inflammation and oxidative stress the missing links? [J]. Clin Sci (Lond), 2016, 130(13): 1039-1050.
- [15] Tsai S, Xian X. IL-33 in murine abdominal aortic aneurysm: a novel inflammatory mediator awaiting clinical translation [J]. J Thorac Dis, 2019, 11(6): 2181-2184.
- [16] Sun BB, Ma LJ, Qi Y, et al. Correlation of IL-33 gene polymorphism with chronic obstructive pulmonary disease [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(14): 6277-6282.
- [17] 伏晓,朱瑾,陈漫漫,等. IL-33 在呼吸道过敏性疾病中的作用研究进展[J]. 浙江医学, 2019, 41(5): 492-495.

· 论 著 ·

miR-26b-3p 靶向调控 *TRA2B* 表达抑制神经胶质瘤细胞的增殖和转移

隋锐 张焯 姚冰 孙佩欣 朴浩哲*

[摘要] 目的 探讨 miR-26b-3p 在神经胶质瘤细胞中的表达, 以及其对神经胶质瘤细胞增殖和转移的影响。方法 采用荧光实时定量 PCR (qRT-PCR) 检测神经胶质瘤组织与癌旁组织中 miR-26b-3p 与 *TRA2B* 的表达水平; 通过向神经胶质瘤细胞细胞系中转染 miR-26b-3p mimic 和 inhibitor 干扰内源 miR-26b-3p 的表达, 同时检测其靶基因 *TRA2B* 蛋白的表达变化; 采用 CCK-8 法检测各组神经胶质瘤细胞增殖能力的变化, 以及划痕实验对癌细胞迁移能力进行评估。结果 神经胶质瘤患者组织与癌旁组织比较, miR-26b-3p 的表达水平显著上调, *TRA2B* 的表达水平显著下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); Pearson 相关性分析显示, 在 32 例神经胶质瘤患者神经胶质瘤组织中, *TRA2B* 的表达水平与 miR-26b-3p 表达呈显著负相关 ($r = -0.510$; $P < 0.05$); SHG-44 细胞体外转染实验结果发现, 降低细胞内源 miR-26b-3p 的表达时, *TRA2B* 的表达水平显著升高, 细胞的增殖活性以及转移能力会被抑制; 而上调细胞内源 miR-26b-3p 的表达时, *TRA2B* 的表达水平显著下降, 细胞的增殖活性与转移能力会显著提高, 相比于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 miR-26b-3p 在神经胶质瘤组织中高表达, 其可能靶向调控 *TRA2B* 的表达抑制神经胶质瘤细胞的增殖活性与转移能力, 在神经胶质瘤的发生发展过程中起着重要的生理功能。

[关键词] 神经胶质瘤; miR-26b-3p; *TRA2B*

miR-26b-3p targeted regulation of *TRA2B* expression inhibits proliferation and metastasis of glioma cells

SUI Rui, ZHANG Ye, YAO Bing, SUN Peixin, PIAO Haozhe*

(Department of Neurosurgery, Liaoning Cancer Hospital, Shenyang, Liaoning, China, 110042)

[ABSTRACT] Objective To investigate the expression of miR-26b-3p in glioma cells and its effect on the proliferation and metastasis of glioma cells. Methods Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to detect the expression of miR-26b-3p and *TRA2B* in glioma and precancerous tissues. By transfection of miR-26b-3p mimic into glioma cell lines or using inhibitors inhibit the expression of endogenous miR-26b-3p, the expression of *TRA2B* protein was determined. The CCK-8 method was used to detect the proliferation of glioma cells in each group. The wound healing assay was used to measure the cancer cell migration. Results The expression level of miR-26b-3p was significantly up-regulated, and that of *TRA2B* was significantly decreased ($P < 0.05$) in glioma tissues compared with adjacent tissues. Pearson correlation score showed that the expression level of *TRA2B* was negatively correlated with the expression of miR-26b-3p in 32 cases of glioma ($r = -0.510$; $P < 0.05$). The results of SHG-44 cell transfection experiments in vitro found that when the expression of miR-26b-3p was reduced, the expression level of *TRA2B* was significantly increased, and the proliferation and metastasis of cells were inhibited. In contrast, When up-regulating the expression of endogenous miR-26b-3p in cells, the expression level of *TRA2B* decreased

基金项目: 辽宁省中央引导地方科技发展专项项目(2017106014); 辽宁省重点研发计划指导计划项目(2018225040)

作者单位: 辽宁省肿瘤医院神经外科, 辽宁, 沈阳 110042

*通信作者: 朴浩哲, E-mail: woxia608751182@163.com

significantly, and the cell proliferation activity and metastasis ability increased significantly ($P < 0.05$).

Conclusion miR-26b-3p is highly expressed in gliomas, which may target the regulation of *TRA2B* expression and inhibit the proliferation and metastasis of glioma cells. MiR-26b-3p plays an important physiological role in the development of gliomas.

[KEY WORDS] Glioma; MiR-26b-3p; *TRA2B*

神经胶质瘤是常见的一类恶性肿瘤,其发病率在我国逐年增加,并且往往伴随着较差的预后,严重威胁人们的身体健康^[1-2]。术后肿瘤的复发及转移是限制神经胶质瘤脑移植发展的关键问题^[3]。目前治疗的主要方法包括手术切除和介入化疗栓塞等手段,但以上方式的疗效仍有待进一步确证,其临床效果均不理想^[4]。因此提早诊断神经胶质瘤的发生和采取相应措施将会极大地改善神经胶质瘤患者的预后情况。微小RNA(miRNAs)是长度为20~22nt的非编码RNA,miRNAs与目的mRNA结合从而调控mRNA的表达^[5]。miRNAs具有极其重要的作用,它参与细胞增殖分化、应激及凋亡等一系列生物学过程,因而在肿瘤研究中具有很大意义^[6]。miR-26b-3p在多种恶性肿瘤组织中检测到表达上调,比如宫颈癌、胰腺癌以及肺癌等,在癌症的发生发展以及预后过程中发挥重要作用^[7-9]。但是国内关于miR-26b-3p在神经胶质瘤增殖与转移中的作用研究相对缺乏。我们将利用荧光定量PCR技术检测胶质瘤患者组织中miR-26b-3p的表达情况,并运用细胞学实验探究miR-26b-3p在神经胶质瘤细胞侵袭中起的作用。

1 材料和方法

1.1 标本来源

收集2016年8月至2017年8月来本院肿瘤科就诊的32例神经胶质瘤组织切片和癌旁组织切片(癌组织3~4 cm处)。入组标准:①不存在其他恶性肿瘤或其他系统性疾病;②属于原发性神经胶质瘤。排除标准:①手术前进行过放疗、化疗以及免疫治疗的患者;②服用抗肿瘤药物或进行放疗等治疗的患者。

1.2 细胞培养与转染

①取出冻存神经胶质瘤细胞SHG-44,水浴锅加温融化(水温37℃),低温低速离心4分钟,弃上清,加入1 mL RPMI-1640培养液,再放入培养箱进行培养(5% CO₂,温度为37℃)。②在鼎盛生物公司合成miR-26b-3p inhibitor和mimic,

取出两组细胞作为miR-26b-3p inhibitor组和miR-26b-3p mimic进行细胞转染,按Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent说明书实行细胞转染操作;阴性对照组不做处理,进行后续实验。

1.3 癌细胞 Total RNA 的抽提

转染24 h后,用胰酶对各组SHG-44细胞消化,收集细胞悬液;离心管进行低速离心3 min,再加入1.5 mL Trizol裂解液,重悬混匀。取离心之后的水相放在1.5 mL离心管,加入异丙醇震荡混匀。离心管低速离心12 min后采用600 μL,75%的酒精洗涤四次RNA沉淀。加入100 μL RNase-free溶解RNA,使用NanoDrop测定RNA浓度,再放在-20℃冰箱备用。

1.4 miRNA 的反转录与定量 PCR 检测

按照试剂盒说明书进行体外反转录实验得到cDNA产物,从而获得cDNA模版。反应体系为TaqMan® Universal PCR Master Mix 20 μL,用ΔCT表示miR-26b-3p相对表达量($\Delta CT = \text{ICT}_{\text{miR-26b-3p}} - \text{CT}_{\text{U6}}$),以U6作为内参。以同样的方法检测*TRA2B*在RNA水平的表达,PCR扩增引物如表1。

表1 各引物序列信息

引物	引物序列(5'-3')	退火温度
miR-26b-3p	上游引物 ATGACTCCAGCGTAT	65℃
	下游引物 CTCATGGGGTCTTG	
U6	上游引物 GGGTGCTCGTTCGGC	55℃
	下游引物 TGGTGTCGTGAGTCG	
TRA2B	上游引物 AACTCCAGGGGAGCTC	55℃
	下游引物 CTGACTGGTGCGGATA	

1.5 CCK8 检测细胞增殖活力

转染24 h后,将SHG-44细胞接种在96孔板(6 × 10³细胞/孔),每孔分别加入12 μL CCK-8溶液,放置在培养箱中。当到达时间节点24、48和72 h,分别检测各组细胞吸光度值(OD_{450 nm})。

1.6 细胞划痕实验

取各组SHG-44细胞接种6孔板(5 × 10⁶个/

孔),使用培养箱过夜培养。用无菌枪头进行划痕,采用1xPBS对各组细胞洗涤5次,加入培养基后拍照为0 h时细胞的迁移情况。继续进行培养,24 h后显微镜下拍照,两次拍照之间的划痕距离可衡量各组细胞的迁移能力。

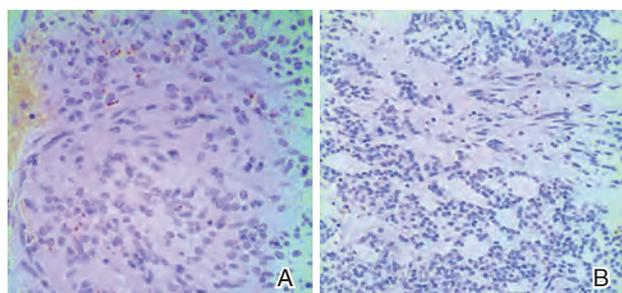
1.7 统计分析

采用SPSS 22.0软件进行分析,计数资料用 n (%)表示,行 χ^2 检验;计量资料用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,两组间比较用 t 检验,多组间比较使用单因素方差分析; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 组织切片HE染色结果

对神经胶质瘤组织切片和癌旁组织切片进行HE染色发现,神经胶质瘤组织组织出现少量点状坏死,细胞间有部分炎性细胞的浸润;而癌旁组织结构完整,无明显细胞坏死(图1)。



注:A 神经胶质瘤组织切片;B 癌旁组织切片

图1 脑组织HE染色结果比较(HE, ×200)

Figure 1 Comparison of HE staining results of brain tissue (HE, ×200)

2.2 miR-26b-3p与TRA2B在神经胶质瘤组织中的表达

通过q-PCR检测癌组织和癌旁组织切片中miR-26b-3p相对表达量发现,神经胶质瘤组织中其相对表达量显著高于癌旁组织,差异有统计学意义($P < 0.05$);神经胶质瘤组织中TRA2B相对表达量显著低于癌旁组织,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表2。进一步对患者癌组织中miR-26b-3p与TRA2B相对表达量进行分析发现,miR-26b-3p与TRA2B的表达呈显著负相关($r = -0.550, P < 0.05$),见图2。

2.3 各组SHG-44细胞中miR-26b-3p与TRA2B的相对表达量比较

利用q-PCR检测各组细胞miR-26b-3p的相对表达量,miR-26b-3p inhibitor组中的miR-26b-3p的

表2 不同脑组织中miR-26b-3p和TRA2B的相对表达量($\bar{x} \pm s$)

Table 2 The relative expression of miR-26b-3p and TRA2B in different brain tissues ($\bar{x} \pm s$)

	n	miR-26b-3p 相对表达量	TRA2B 相对表达量
神经胶质瘤组织	32	2.35±0.15	0.69±0.10
癌旁组织	32	1.57±0.21	1.55±0.12
t 值		6.12	11.56
P 值		<0.001	<0.001

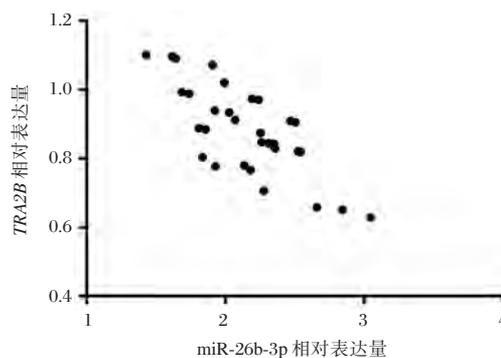


图2 神经胶质瘤组织中miR-26b-3p与TRA2B表达的相关性分析

Figure 2 Correlation Analysis of the expression of miR-26b-3p and TRA2B in glioma tissues

表达显著降低,miR-26b-3p mimic组中miR-26b-3p的表达显著升高,与阴性对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),如表3。

表3 各组SHG-44细胞中miR-26b-3p和TRA2B的相对表达量

Table 3 The relative expression of miR-26b-3p and TRA2B in SHG-44 cells of each group

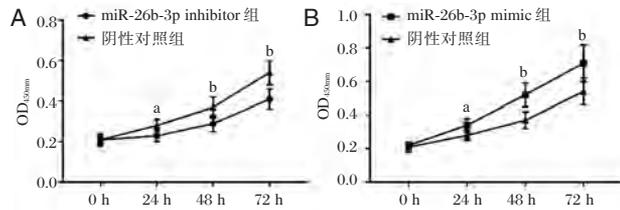
	n	miR-26b-3p 相对表达量	TRA2B 相对表达量
miR-26b-3p mimic组	6	1.59±0.13 ^a	0.69±0.12 ^a
miR-26b-3p inhibitor组	6	0.39±0.14 ^a	1.88±0.13 ^a
阴性对照组	6	0.79±0.10	1.31±0.18
F 值		11.36	12.97
P 值		<0.001	<0.001

注:^a相比于阴性对照组 $P < 0.05$

2.4 miR-26b-3p对SHG-44细胞增殖活性的影响

检测转染24、48与72 h后各组SHG-44细胞吸光值,miR-26b-3p mimic组的增殖率在转染24、48和72 h后增值率显著高于阴性对照组($P < 0.05$);miR-26b-3p inhibitor组的增殖率在各个时

间点增值率均低于阴性对照组,均具有统计学意义($P<0.05$),如图3。



注: A 不同时间段 miR-26b-3p inhibitor 组与阴性对照组增值率比较, B 不同时间段 miR-26b-3p mimic 组与阴性对照组增值率比较^a $P<0.05$,^b $P<0.01$

图3 miR-26b-3p 对 SHG-44 细胞增殖活性的影响
Figure 3 Effect of miR-26b-3p on the proliferation of SHG-44 cells

2.5 miR-26b-3p 对 SHG-44 细胞迁移能力的影响

转染 24 h 后,利用细胞划痕实验检测各组 SHG-44 细胞的迁移能力,miR-26b-3p inhibitor 组 SHG-44 细胞迁移距离小于阴性对照组($P<0.05$);miR-26b-3p mimic 组 SHG-44 细胞迁移距离显著高于阴性对照组($P<0.05$),见图4。

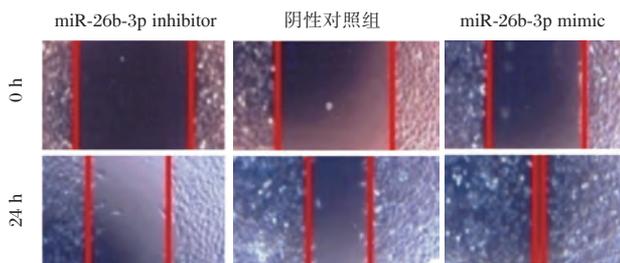


图4 不同组细胞迁移能力的比较(台盼蓝染色,×200)
Figure 4 Comparison of cell migration in different groups (台盼蓝染色,×200)

3 讨论

目前普遍认为细胞的恶性增殖是癌症发生的必要环节,近年来对神经胶质瘤的研究发现,miRNA 通过其对关键基因表达的调控,比如 P53,在癌细胞的增殖、迁移、侵袭以及凋亡过程中起着重要作用^[10-11]。在神经胶质瘤细胞中表达上调的 miRNA 包括 miRNA-183, miRNA-21, miRNA-221 等;在神经胶质瘤细胞中表达下调的 miRNA 有 miRNA-122, miRNA-145 以及 miRNA-26a 等,其表达水平不尽相同,作用机制各不相同^[11-12]。

有研究发现,miR-122 在正常脑组织中表达水平较高,占全部 miRNAs 表达量的 70%,而其表达的下调与癌症的发生发展密切相关,其在神经胶质瘤细胞中的下调会导致其靶基因如脑细胞核因子 3A (Hepatocyte nuclear factor 3A, HNF3A) 的表达升高,而 HNF3A 均是脑细胞细胞周期重要的调控蛋白,从而导致细胞周期紊乱,引发癌症的发生^[13-14]。Huang 等对 SHG-44 细胞系的研究发现,当提高细胞内源 miR-122 的表达水平时,细胞中 caspase9/3 蛋白的表达水平明显提高,同是细胞凋亡率显著提高;进一步对 miR-122 靶基因进行分析发现,其可能是通过抑制内源 Bcl-w 蛋白的表达,而实现对细胞凋亡的调控,表明在神经胶质瘤细胞中 miR-122 的表达上调,可抑制内源 Bcl-w 蛋白表达从而调控神经胶质瘤细胞的凋亡过程,在神经胶质瘤的发生发展中起着重要作用^[15]。在癌细胞中对 miR-26b-3p 的表达进行研究发现,miR-26b-3p 在癌细胞中的表达水平显著高于癌旁组织,而下调 miR-26b-3p 在癌细胞系中的表达会明显抑制血细胞的生长增殖;进一步通过流式细胞仪对细胞的凋亡情况进行检测发现,下调癌细胞系 Panc-1 内源 miR-26b-3p 表达,癌细胞的凋亡率显著提高,集聚能力明显下降,表明 miR-26b-3p 在癌症的发生发展中起着癌基因的作用^[16]。

本研究在神经胶质瘤细胞中对 miR-26b-3p 及其靶基因的进一步探究,发现 miR-26b-3p 在神经胶质瘤患者癌组织中表达明显上调;在神经胶质瘤组织中 TRA2B 的表达水平显著下降。Pearson 相关性分析显示,在 32 例神经胶质瘤患者神经胶质瘤组织中,TRA2B 的表达水平与 miR-26b-3p 表达呈显著负相关,进一步证实了 miR-26b-3p 对 TRA2B 的靶向调控作用。近来研究发现,TRA2B 表达水平降低可导致多种肿瘤细胞的迁移和侵袭能力减弱^[17]。这表明 miR-26b-3p 通过靶向调控 TRA2B 的表达,在神经胶质瘤细胞增殖和迁移过程中发挥重要作用。

综上所述,本研究首次在神经胶质瘤中研究 miR-26b-3p 的表达,发现在神经胶质瘤癌细胞中,miR-26b-3p 的表达明显上调,而 TRA2B 的表达被抑制;在神经胶质瘤细胞系中的研究进一步证实,miR-26b-3p 通过靶向调控癌细胞中 TRA2B 的表达,促进神经胶质瘤细胞的增殖和迁移,与肿瘤的发生发展密切相关。

参考文献

- [1] Zihuang Li, Ling Ye, Lei Wang, et al. Identification of miRNA signatures in serum exosomes as a potential biomarker after radiotherapy treatment in glioma patients [J]. *Annals of Diagnostic Pathology*, 2020, 44: 151436.
- [2] 许小斌, 武伟男, 马宁, 连世忠. miR-147 对胶质瘤 U87 细胞增殖、凋亡和侵袭的影响[J]. *现代肿瘤医学*, 2020, 28(3):360-363.
- [3] Güliz Acker, Julia Zollfrank, Claudius Jelgersma, et al. The CXCR2/CXCL2 signalling pathway-An alternative therapeutic approach in high-grade glioma [J]. *European Journal of Cancer*, 2020, 126:106-115.
- [4] 张桃桃, 赵中华, 王慧. RNA 干扰 XBP1 基因表达对人胶质瘤细胞增殖及凋亡的影响[J]. *卒中与神经疾病*, 2019, 26(6):693-696.
- [5] 于广周, 谭文刚, 张昊. 水翁花对过氧化氢诱导神经细胞凋亡的影响[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2019, 11(6): 517-521+544.
- [6] 曾庆, 谢莺, 张庆华. miR-155-5p 在宫颈癌中的表达及其对宫颈癌细胞侵袭与转移的影响[J]. *中国妇产科临床杂志*, 2019, 20(1): 13-15.
- [7] Lin Yu, Xiao Lili, Zhang Yiyuan, et al. MiR-26b-3p regulates osteoblast differentiation via targeting estrogen receptor α [J]. *Genomics*, 2019, 111(5): 1089-1096.
- [8] Xie Tao, Pi Guoliang, Yang Bin, et al. Long non-coding RNA 520 is a negative prognostic biomarker and exhibits pro-oncogenic function in nasopharyngeal carcinoma carcinogenesis through regulation of miR-26b-3p/USP39 axis [J]. *Gene*, 2019, 707:44-52.
- [9] Wang Qiaoling, Xu Chen, Zhao Yunpeng, et al. miR-26b-3p Regulates Human Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cell Proliferation by Targeting Estrogen Receptor [J]. *Stem cells and development*, 2016, 25(5):415-26.
- [10] 崔菀真, 朱彧, 岳伟. AGPS 基因沉默对神经胶质瘤细胞 lncRNA、mRNA 表达谱的影响及意义[J]. *山东医药*, 2019, 59(35):6-11.
- [11] 李新星, 于奇, 田羽, 张健, 刁宏宇, 刘云会. miR-222 在不同病理级别胶质瘤中的表达及对预后判断的价值[J]. *热带医学杂志*, 2015, 15(11):1460-1462+1470.
- [12] 陈曦, 刘浩生, 麦荣康. 低级神经胶质瘤的分子发病机制[J]. *解剖学研究*, 2019, 41(6):531-534.
- [13] 杨才弟, 王丽娟, 曾鼎华, 朱剑梅. miR-122 通过靶向 RUNX2 诱导胶质瘤细胞凋亡的实验研究[J]. *临床肿瘤学杂志*, 2019, 24(2): 124-128.
- [14] Ding C-Q, Deng W-S, Yin X-F, et al. MiR-122 inhibits cell proliferation and induces apoptosis by targeting runt-related transcription factors 2 in human glioma [J]. *European review for medical and pharmacological sciences*, 2018, 22(15): 4925-4933.
- [15] 唐玉蓉, 成立峰, 于本章. miR-122 和 VEGF 在胶质瘤患者中表达的临床意义[J]. *中国免疫学杂志*, 2019, 35(07): 849-852.
- [16] Geng F, Lu GF, Ji MH, et al. MicroRNA-26b-3p/ANTXR1 signaling modulates proliferation, migration, and apoptosis of glioma [J]. *American Journal of Translational Research*, 2019, 11(12): 7568-7578.
- [17] Paudel Dhruva, Ouyang Yiqin, Huang Qingting, et al. Expression of TRA2B in endometrial carcinoma and its regulatory roles in endometrial carcinoma cells [J]. *Oncology letters*, 2019, 18(3):2455-2463.

(上接第 295 页)

- [10] 闫鹏, 任飞霏, 苏龙翔, 等. 国产外周全血 γ 干扰素实验对肺结核病的诊断价值[J]. *解放军医学院学报*, 2015, 36(3): 258-261, 266.
- [11] 王甲甲, 唐义斌, 张玲英, 等. γ -干扰素释放实验在结核病诊断中的应用价值分析[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2018, 10(2):115-137.
- [12] 傅志辉, 骆虹妹, 何约明, 等. γ -干扰素释放试验在活动性肺结核的诊断价值[J]. *中外医学研究*, 2018, 16(30): 43-44.
- [13] 李振生, 李德新, 李春霞, 等. TB-RNA、TB-DNA 联合检测在痰菌阴性肺结核诊断中的应用价值[J]. *实用临床医药杂志*, 2016, 20(17): 32-34.
- [14] 周华, 杨春, 杜煦, 等. 胸水 ADA、TB-DNA 联合检测在结核性胸膜炎中的诊断运用[J]. *临床肺科杂志*, 2012, 17(6): 1066-1067.
- [15] Ramezani R, Forouzandeh MM, Rasaei MJ. Development of Sensitive and Rapid RNA Transcription-based Isothermal Amplification Method for Detection of Mycobacterium tuberculosis[J]. *Avicenna J Med Biotechnol*, 2019, 11(2): 169-175.
- [16] 王静, 刘立宾, 岳永宁, 等. RNA 恒温扩增实时检测技术与荧光定量 PCR 联合检测肺泡灌洗液对痰涂阴性肺结核的快速诊断价值[J]. *中华医院感染学杂志*, 2017, 27(2): 300-304, 320.
- [17] Alipoor SD, Tabarsi P, Varahram M, et al. Serum Exosomal miRNAs Are Associated with Active Pulmonary Tuberculosis [J]. *Dis Markers*, 2019, 2019: 1907426.
- [18] Ndzi EN, Nkenfou CN, Mekue LM, et al. MicroRNA hsa-miR-29a-3p is a plasma biomarker for the differential diagnosis and monitoring of tuberculosis [J]. *Tuberculosis (Edinb)*, 2019, 114: 69-76.

β溶血表型摩根摩根菌的鉴定及系统发育树构建

贾琴妹 满宝华*

[摘要] 目的 对β溶血表型摩根摩根菌进行准确的鉴定和系统发育分析。方法 常规方法分离培养菌株;先后采用VITEK-2 Compact全自动微生物鉴定仪、基质辅助激光解析离子-飞行时间质谱仪(MALDI-TOF-MS)、16S rDNA测序3种方法对菌株进行鉴定并验证其结果的正确性;基于16S rDNA的同源性分析和系统发育树构建;并对溶血基因的检测。结果 采用16S rDNA序列同源性分析结合构建系统发育树分析,鉴定菌株(标本编号:U1901)与摩根摩根菌摩根亚种NBRC 3848形成一个分支,同源性和可信度均达99.99%,同时验证了MALDI-TOF-MS的鉴定结果比VITEK-2 Compact全自动微生物鉴定仪准确及时。检测出新表型摩根摩根菌(β溶血表型)。结论 16S rDNA序列同源性分析与系统发育树构建相结合,准确鉴定出新型表型的摩根摩根菌(β溶血表型)。MALDI-TOF-MS在病原微生物检测和鉴定中具有快速、准确等优点,可为临床治疗提供快速的诊断依据。

[关键词] 摩根摩根菌;β溶血;16S rDNA;系统发育树

Identification and phylogenetic tree construction of beta hemolytic *Morganella morganii*

JIA Qinmei, MAN Baohua*

(Department of Clinical Laboratory, The third People's Hospital of Yunnan Province, KunMing, Yunnan, China, 650011)

[ABSTRACT] Objective To identify beta hemolytic *Morganella morganii* and perform the phylogenetic analysis. Methods The bacterial strain was cultured and isolated by conventional methods. Three methods, VITEK-2 Compact automatic microbial identification instrument, Matrix-assisted Laser Desorption / Ionization-time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF-MS) and 16SrDNA sequencing, were used to identify the strain and validate the result. Based on homology analysis of 16S rDNA, a phylogenetic tree was constructed; and hemolytic genes were detected. Results Using 16srDNA sequence homology analysis combined with phylogenetic tree construction, the identification strain (Sample No.: U1901) formed a separate branch with *Morganella morganii subsp.morganii* NBRC 3848, the homology and credibility were 99.99%. The identification result of MALDI-TOF-MS was more accurate and timely than that of VITEK-2 Compact automatic microbial identification instrument. A new phenotype of *Morganella morganii* (beta hemolytic phenotype) was detected. Conclusion The combination of 16S rDNA sequence homology analysis and phylogenetic tree construction accurately identified a new phenotype of *Morganella morganii* (beta hemolytic phenotype) MALDI-TOF-MS has the advantages of rapid and accurate in the detection and identification of pathogenic microorganisms, which can provide a rapid diagnostic basis for clinical treatment.

[KEY WORDS] *Morganella morganii*; Beta hemolysis; 16S rDNA; Phylogenetic tree

基金项目:云南省科技厅应用基础研究联合专项资金项目(201501UC00015)

作者单位:云南省第三人民医院检验科微生物室,云南,昆明 650011

*通信作者:满宝华, E-mail:782312993@qq.com

摩根摩根菌(*Morganella morganii*, *M. morganii*)是肠杆菌科摩根菌属(*Morganella*)的唯一菌种,常寄生于人和动物的肠道,为人体肠道正常菌群的重要成员之一,广泛分布于自然界及医院环境中,属条件致病菌。其主要引起泌尿道感染和伤口感染,其他部位感染少见^[1],但近几年国内外均有文献报道其引起菌血症、脑膜炎、关节炎、心包炎和眼内膜炎等^[2-3]。摩根摩根菌的生物学特性是兼性厌氧,对营养要求不高,在营养琼脂和血琼脂上均可生长,约有50%的菌株在血琼脂上产生 α 溶血^[4]。本文将报道一株从中段尿中分离培养及鉴定出的 β 溶血摩根摩根菌,以及基于16S rDNA的系统发育树构建,从而提高扩充医务人员对 β 溶血摩根摩根菌的认识,及时有效地为感染者诊治。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

分离出的摩根摩根菌(标本编号:U1901)源于云南省第三人民医院重症医学科(Intensive Care Unit, ICU)某患者中段尿培养。质控菌株大肠埃希菌(ATCC 25922)和摩根摩根菌(ATCC 25830)均购自国家卫健委临床检验中心。

1.2 仪器与试剂

VITEK-2 Compact全自动微生物鉴定仪及配套鉴定卡、VITEK MS-DS靶板和VITEK MS-CHCA基质液均购自法国梅里埃公司;CO₂培养箱为美国Thermo公司产品;旋涡混合器VDRTEX-5购自海门其林贝尔仪器制造有限公司;细菌基因组DNA快速抽提试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公司;PCR扩增仪购自美国PE公司;电泳仪购自美国Tanon公司;紫外凝胶成像仪购自上海复日生物技术有限公司。

1.3 菌株的分离培养和连续传代培养

无菌操作采集送检的中段尿样本,接种于血琼脂平板和麦康凯琼脂平板(郑州安图生物有限公司产品),置5% CO₂温箱35℃~37℃孵育18~24 h;同样的培养环境,将菌株连续传代培养10次,观察溶血现象。

1.4 菌株的鉴定

1.4.1 VITEK-2 Compact全自动微生物鉴定仪鉴定

挑取分离出的纯菌落与盐水充分混匀,菌

悬液浓度调至(0.5~0.63)麦氏单位;将配套的GN鉴定卡插入菌悬液中,再转移到鉴定仪中进行扫描上机处理;上机所得的生化反应结果与鉴定仪中高级专家系统(Advanced Expert System, AES)数据库进行比对分析,最终得出鉴定结果。

1.4.2 机制辅助激光解析离子-飞行时间质谱仪(Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization-time of Flight Mass Spectrometry, MALDI-TOF-MS)鉴定

选取分离培养后的纯菌落均匀涂布在质谱仪器特有的96孔钢板上;而后在涂布细菌的孔上加入1 μ L基质液;待其干燥后放入质谱仪器进行检测,最后将所得的质谱峰图与数据库中峰图进行比较,得出鉴定结果。

1.5 16S rDNA测序及同源性分析

首先采用细菌基因组DNA快速抽提试剂盒(生工生物工程(上海)股份有限公司)提取菌株DNA模板,操作严格按照试剂盒说明书操作。PCR扩增引物^[5]分别为:F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; R: 5'-CTACGGCTACCTTGTACGA-3', PCR反应体系(50 μ L)如下:40.2 μ L ddH₂O, 2 μ L基因组DNA(15 ng/ μ L)作为模板;0.5 μ L的dNTP(10 mM), 5 μ L的10 \times TaqPCR缓冲液(Mg²⁺), 每条引物(10 pmol/ μ L) 1 μ L, 0.3 μ L rTaq DNA聚合酶(5 U/ μ L)。PCR扩增条件为:95℃预变性5 min;95℃变性30 s、55℃退火30 s、72℃延伸50 s、35个循环;72℃补延伸10 min。扩增产物用1%的琼脂糖凝胶电泳,同时观察条带大小,并挑取阳性产物回收后送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。最后将测序的结果从NCBI网站“blast”GenBank数据库检出与所测菌株16S rDNA序列同源性较高的序列,判断16S rDNA基因鉴定结果,同时验证VITEK-2 Compact和MALDI-TOF-MS鉴定结果的正确性。

1.6 系统发育分析

使用Blast将基因预测得到的16S rDNA序列与NCBI的16S数据库进行比对,设置参数identify>95。然后选取identify最高的前30条16S rDNA序列(不足则全取),并利用Muscle(Multiple Protein Sequence Alignment)软件进行序列多重比对后,采用FastTree软件构建菌株的系统发育树。

1.7 溶血素(Hemolysin)基因检测

采用细菌基因组DNA快速抽提试剂盒(生工生物工程(上海)股份有限公司)提取的DNA作为模板,根据文献^[6]报道合成PCR引物,包括 *HlyA*、*HlyB*、*HlyC*、*HlyD* 引物序列引物序列见表1,PCR反应体系(10 μL)如下:3.2 μL ddH₂O,1 μL 基因组DNA(30 ng/μL)作为模板;0.5 μL的dNTP(10

mM),4 μL的10×TaqPCR缓冲液(Mg²⁺),每条引物(10 pmol/μL)1 μL,0.3 μL rTaq DNA聚合酶(5 U/μL)。PCR扩增条件为:94℃预变性3 min;94℃变性1 min、60℃退火1 min、72℃延伸40 s,共进行40个循环。PCR产物经1%的琼脂糖凝胶电泳,阳性产物送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

表1 编码溶血素基因引物序列

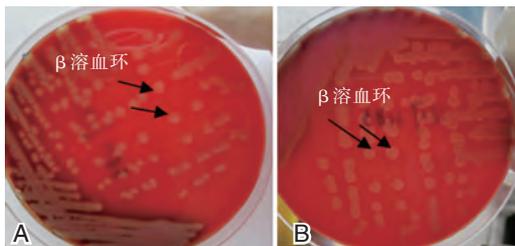
Table 1 Primer sequence of hemolysin gene

目的基因	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')
<i>HlyA</i>	ATGGTGAATCAAATTGGGG	GTTGTTTGGATGCTTTT
<i>HlyB</i>	GCCAAAGCCGAATCTAAG	CGAGTACAGGTGTTTGGT
<i>HlyC</i>	CTCTTGCCAATCCGTTATTA	GCTTTAACATGATTAGTTTT
<i>HlyD</i>	GAGTTGTTTAATTTTAAG	TTTTAGTGAATTTGT

2 结果

2.1 分离培养情况

血琼脂平板培养基上可观察到单个、中等大小、湿润的灰白色菌落,边缘整齐,无特殊气味,但菌落周围有β溶血环;连续10次传代后,β溶血现象稳定存在,见图1。



注:A为原代菌株;B为第10代菌株。

图1 细菌在血平板表型特征

Figure 1 The phenotypic characteristics of bacteria on the blood plate

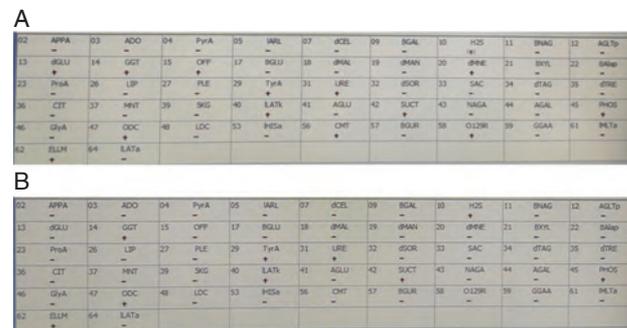
2.2 VITEK-2 Compact 和 MALDI-TOF-MS 鉴定结果

VITEK-2 Compact 鉴定结果:奇异变形杆菌,可信度99%,见图2。

MALDI-TOF-MS 鉴定结果:摩根摩根菌,可信度99.9%,见图3。

2.3 16S rDNA 测序结果

将菌株测序后获得的序列在 GenBank 数据库中进行比对,结果显示与摩根摩根菌摩根亚 NBRC 3848 同源性最高,达到99.99%。



注:A为质控菌株摩根摩根菌生化反应GN结果图;B为奇异变形杆菌生化反应GN结果图。

图2 质控菌株摩根摩根菌及奇异变形杆菌的GN鉴定图
Figure 2 The GN identification results of quality control strain *M. morganii* and *Proteus mirabilis*

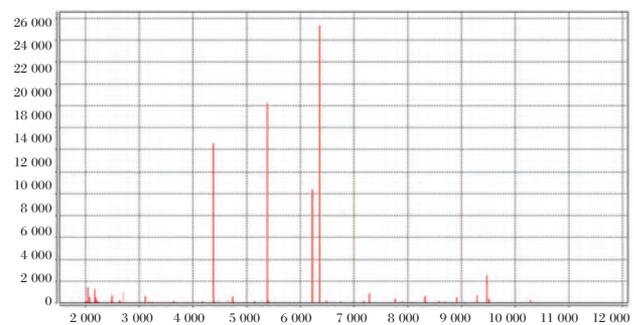


图3 摩根摩根菌质谱图

Figure 3 The mass spectrogram of *M. morganii*

2.4 16S rDNA 测序验证对比

VITEK-2 Compact 鉴定结果(奇异变形杆菌)和MALDI-TOF-MS 鉴定结果(摩根摩根菌)不一

致, 16SrDNA 测序方法验证结果为摩根摩根菌摩根亚种 NBRC 3848。

2.5 基于 16S rDNA 的同源性分析和系统发育树
使用 Blast 将菌株(标本编号: U1901)的

16SrDNA 序列与 NCBI 的 16S 数据库进行比对后发现在该系统发育树上可见, U1901 与摩根摩根菌摩根亚种 NBRC 3848 形成一个分支, 验证可信度达 99.99%。见图 4。

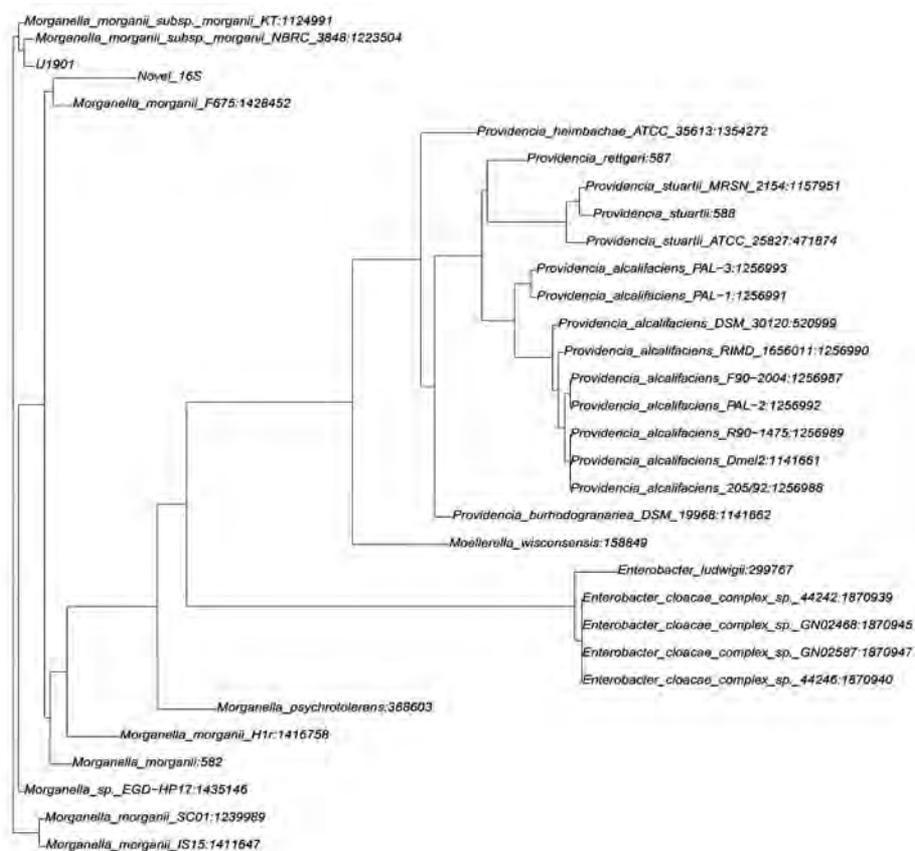


图 4 基于 16S rDNA 的系统发育树

Figure 4 The phylogenetic tree based on 16S rDNA

2.6 溶血素(Hemolysin, *Hly*)基因检测结果

通过对 *HlyA*、*HlyB*、*HlyC*、*HlyD* 基因的扩增, *HlyB* 为阳性, 其余均为阴性。测序结果显示检出的 *HlyB* 与病原菌毒力因子(Virulence Factors of Pathogenic Bacteria, VFDB)数据库中 *HlyB* 有 99% 同源性。

3 讨论

近几年, 随着社会环境和医疗技术水平的逐渐改变, 摩根摩根菌的感染部位和检出率在不断增加^[7]。由 ICU 患者所处的情况可知, 本研究中的摩根摩根菌是在众多因素作用压力下存活繁殖, 其毒力和耐药率较高。该菌在血琼脂平板上出现典型的 β 溶血环, 随后检测到溶血素(*HlyB*)基因。与传统摩根摩根菌相比较^[4], 此菌具有 β

溶血现象特征, 是摩根摩根菌家族中新增的一个表型。至今为止, 可能由于该表型的摩根摩根菌出现较少而未被发现等原因, 未查阅到与此表型相关的国内外文献报道。本实验中摩根摩根菌 *HlyB* 基因的获得可能是由混合感染的细菌(如: 大肠埃希菌 O157:H7)间经接合、转导、插入等方式传播而来。溶血素的产生, 增强了细菌的致病性。

VITEK-2 Compact 鉴定结果出来后, 检查排除了仪器设备、配套使用的材料、操作等无任何问题; 也查看分析了细菌无污染情况。随后重复操作多次, 鉴定结果均与首次一致。原因可能是 VITEK-2 Compact 仪器自身存在局限性(如: AES 数据库未更新), 也可能是由于菌株的生理生化反应发生了一点偏差, 最终均影响鉴定结果的准

确性。奇异变形杆菌和摩根摩根菌以前同属肠杆菌科变形杆菌族细菌,后来才成为独立菌属细菌,因此大部分生化反应相同,主要的鉴别试验是硫化氢、鸟氨酸脱羧酶和枸橼酸盐试验^[4],这3个试验中若某个发生一点偏差,均会显示不同的鉴定结果,这可能就是 VITEK-2 Compact 鉴定结果不准确的原因所在。但是,目前很多文献都有报道^[7-9]VITEK-2 Compact 对传统经典的摩根摩根菌鉴定结果均准确,本实验室也是如此。本研究中 MALDI-TOF-MS 方法对 β 溶血的摩根摩根菌能快速准确完成鉴定。其主要原因是 MALDI-TOF-MS 技术能直接分析完整的蛋白质分子避免了生化反应结果的偏差及所需的反应时间,弥补了传统的生理生化反应鉴定方法的不足之处。有文献报道^[10],其与全自动微生物鉴定仪的生化反应相比,MALDI-TOF-MS 已经逐步成为一种新型的微生物检测和鉴定技术,并且以其快速、准确、灵敏、高效、低成本、易操作等优势得到快速发展。目前,国内外临床微生物实验室逐渐重视 MALDI-TOF-MS 在微生物领域的应用^[11-12]。

16S rDNA 基因序列具有较高保守性、突变率小,分子量大小适中等优点,属于原核生物核糖体小亚基,存在于所有细菌染色体基因组中^[13]。序列包含 11 个恒定区和与之相间的 10 个可变区。保守区为所有细菌共有,细菌之间无显著差异^[14],可变区因细菌菌种不同而存在差异,因此利用可变区序列的这种差异来对不同种属的细菌进行分类鉴定已被认同且广泛应用。且国际上已逐步认同用原核生物的 16S rDNA 序列作为原核生物分类鉴定的标准^[15-16],也是验证其它方法结果的标准,其能准确将未知菌鉴定到种,甚至亚种水平。本文中,16S rDNA 系列测序结果验证了 MALDI-TOF-MS 方法能准确鉴定出细菌菌种。

摩根摩根菌虽不是临床常见病原菌,但引起的感染发生率在逐年增加^[17],且对抗菌药物耐药率也在增加。本研究中的摩根摩根菌产溶血素,增加了其致病性。因此,应引起临床医生和微生物检测人员的高度重视,不断提高补充自身知识库,及时对仪器专家数据库进行更新升级,加强医务人员之间有效的沟通,正确合理使用抗菌药物,严格执行消毒隔离措施,减少耐药基因和毒力因子的出现及传播扩散。

参考文献

- [1] 张卓然. 临床微生物学和微生物检验[M]. 第3版. 北京: 人民卫生出版社, 2003:140.
- [2] Golubic-Cepulic B, Budimir A, Plecko V, et al. *Morganella morganii* causing fatal sepsis in a platelet recipient and also isolated from a donor's stool[J]. *Transfus Med*, 2004, 14(3):237-240.
- [3] Eisenstein BI, Mandell GL, Douglas G, et al. *Principles and practice of infectious diseases*[M]. 4th ed. New York: Churchill Livingstone Inc, 1994:1748-1980.
- [4] 陈东科, 孙长贵. 实用临床微生物学检验与图谱[M]. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 2011:350.
- [5] 魏超, 代晓航, 郭灵安, 等. MALDI-TOF MS 与 16SrDNA 方法对肠杆菌科微生物鉴定比较分析[J]. *质谱学报*, 2018, 2(1):466-468.
- [6] 邓一脉. 临床不完全溶血型金黄色葡萄球菌相关特性研究[D]. 苏州大学, 2017.
- [7] 胡丽庆, 黄宇雯. 摩根摩根菌的临床分布及耐药性分析[J]. *中国卫生检验杂志*, 2017, 27(8): 1182-1184.
- [8] 刘芳, 金炎, 刘芸, 等. 摩根摩根菌的临床分布及耐药性分析[J]. *广西医学*, 2017, 39(5): 590-591.
- [9] 王磊, 杨雪静, 陈益民. 摩根摩根菌临床分布及耐药性分析[J]. *中国微生态学杂志*, 2016, 5(10): 1194-1196.
- [10] 王旭晖, 阎萍, 王萍. 机制辅助激光解析离子-飞行时间质谱仪在临床分离革兰阴性杆菌鉴定中的应用[J]. *标记免疫分析与临床*, 2017, 24(9):1047-1051.
- [11] Dingle TC, Butler-Wu SM. Maldi-tof mass spectrometry for microorganism Identification [J]. *Clin Lab Med*, 2015, 33(3):589-609.
- [12] Ling H, Yuan Z, Shen J, et al. Accuracy of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of clinical pathogenic fungi: a meta-analysis [J]. *J Clin Microbiol*, 2014, 52(7):2573-2582.
- [13] Hayashi H, Sakamoto M, Kitahara M, et al. Diversity of the clostridium coccoides group in human fecal microbiota as determined by 16SrRNA gene library [J]. *FEMS Microbiol Letters*, 2006, 257(2):202-207.
- [14] Petti CA. Detection and identification of microorganisms by gene amplification and sequencing [J]. *Clin Infect Dis*, 2007, 44(8):1108-1114.
- [15] Patrick C. Y. Woo, Kenneth H. L. Ng, Susanna K. P. Lau, et al. Usefulness of the Microseq 500 16S Ribosomal DNA-Based Bacterial Identification System for Identification of Clinically Significant Bacterial Isolates with Ambiguous Biochemical Profiles [J]. *J Clin. Microbiol*, 2003, 41(5):1996-2001.
- [16] Jill E. Clarridge III. Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases [J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2004, 17:840-862.
- [17] 宗志勇, 吕晓菊, 过孝静, 等. 临床分离 87 株摩根摩根菌的体外抗菌药物敏感性研究 [J]. *中国抗感染化疗杂志*, 2012, 2(4):237-239.

敲低 lncRNA DILC 对胶质瘤细胞体外生物学特性的影响

刘泉^{1*} 王新军² 王建业² 伍静¹

[摘要] 目的 探讨敲低长链非编码 RNA (lncRNA) 对胶质瘤细胞体外生物学特性的影响。方法 胶质瘤细胞系 LN382、U87MG 分别分组为 NC 组和敲低组, 其中 NC 组以 negative siRNA 转染, 敲低组以 DILC siRNA 转染。转染前和转染后 48 h, PCR 检测 IL-6、JAK2、STAT3 表达水平, ELISA 法检测离心细胞上清液中 IL-6 水平, Western Blot 法检测 p-JAK2/JAK2 和 p-STAT3/STAT3 蛋白质表达水平。细胞转染后 48 h, Transwell 小室侵袭实验观察细胞的侵袭能力, 划痕实验观察细胞的转移能力状况。结果 细胞转染后 48 h, 与 LN382、U87MG 胶质瘤细胞的 NC 组比较, 其相应敲低组的穿膜细胞数增加, 细胞迁移距离亦增加 ($P < 0.05$)。与 LN382、U87MG 胶质瘤细胞的 NC 组比较, 其相应敲低组的 IL-6、JAK2、STAT3 的 mRNA 相对表达量升高, 细胞上清液中 IL-6 水平升高, p-JAK2/JAK2 和 p-STAT3/STAT3 蛋白质表达水平亦相应升高 ($P < 0.05$)。结论 敲低 lncRNA DILC 可促进胶质瘤细胞的侵袭转移, 而激活 IL-6/JAK2/STAT3 信号通路可能为其作用机制。

[关键词] 敲低; lncRNA; 胶质瘤; 细胞; 生物学特性

Effects of knocking down of lncRNA DILC on the biological characteristics of glioma cells in vitro

LIU Quan^{1*}, WANG Xinjun², WANG Jianye², WU Jing¹

(1. Emergency department, the fifth affiliated hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan, China 450052; 2. Department of surgery, the fifth affiliated hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan, China, 450052)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the effect of knocking down long-chain non coding RNA (lncRNA) on the biological characteristics of glioma cells in vitro. **Methods** Glioma cell lines LN382 and U87MG were both divided into two groups: NC group and knocking down group. The NC group was transfected with negative siRNA, while the knocking down group was transfected with DILC siRNA. Before and 48 hours after transfection, the expression levels of IL-6, JAK2 and STAT3 were measured by RT-qPCR. The IL-6 level in the cell culture supernatant was detected by ELISA. The protein levels of p-JAK2/JAK2 and p-STAT3/STAT3 were detected by Western blot. 48 hours after transfection, the Transwell cell invasion experiment was used to observe the cell invasion ability, and the scratch experiment was used to observe the cell migration ability status. **Results** At 48 h after cell transfection, compared with the NC group of LN382 and U87MG glioma cells, the number of transmembrane cells in the corresponding knocking down group

基金项目: 2018年度河南省医学科技攻关计划项目(2018020253)

作者单位: 1. 郑州大学第五附属医院急诊科, 河南, 郑州 450052

2. 郑州大学第五附属医院经外科, 河南, 郑州 450052

*通信作者: 刘泉, E-mail: 109730640@qq.com

increased, and the cell migration distance also increased ($P < 0.05$). Compared with the NC group of LN382 and U87MG glioma cells, the relative expression levels of IL-6, JAK2, and STAT3 mRNA in the corresponding knocking down group increased, and the IL-6 level in the supernatant increased. p-JAK2 / JAK2 and p-STAT3 / STAT3 protein expression levels also increased accordingly ($P < 0.05$). Conclusion Knocking down lncRNA DILC can promote the invasion and metastasis of glioma cells. The mechanism of action may relate to the activation of IL-6 / JAK2 / STAT3 signaling pathway.

[KEY WORDS] Knockdown; LncRNA; Glioma; cell; Biological characteristics

脑胶质瘤为常见脑部肿瘤,放疗、化疗、手术等均为其公认治疗方法,但均无法有效预防复发、死亡等的发生,患者的整体预后状况仍不容乐观^[1-3]。在脑胶质瘤等恶性肿瘤疾病中,肿瘤的侵袭转移是影响其治疗效果和预后的重要因素^[4-5]。因此,对脑胶质瘤侵袭转移等生物学特性的干预有助于其疗效和预后的改善。长链非编码 RNA (lncRNA)指的是长度大于 200 bp 且无蛋白质编码能力的 RNA 链,且已有研究证实 lncRNA 在脑胶质瘤发生发展中均具有重要影响^[6-7]。本研究亦关注脑胶质瘤 lncRNA,分析敲低 lncRNA DILC 对胶质瘤细胞体外生物学特性的影响,旨在为胶质瘤早期诊治提供可能新策略,结果如下。

1 材料与方法

1.1 材料

胶质瘤细胞系 LN382、U87MG 购自中科院上海生命科学院研究院生物化学与细胞生物学研究所,相关仪器如下:SW-CY-1F 型净化工作台(苏州净化设备厂)、CO₂ 恒温培养箱(美国 Forman Scientific 公司)、离心机(德国 Eppendorf 公司)、显微镜(日本 Nikon 公司)、离心管、玻璃瓶、吸管、试管等(江苏佳美仪器有限公司)、低温冰箱(日本 Sanyo 公司)、PCR 基因扩增仪(美国 BIORAD 公司)、电泳仪(北京六一仪器厂)、酶标仪(美国 BIORAD 公司)、显微图像分析系统(美国 Image 公司)相关试剂如下:Lipofectamine 2000 转染试剂(Invitrogen 公司)、RPMI-1640 培养基和胎牛血清(美国 Gibco 公司)、RNA 提取试剂盒(德国 Qiagen 公司)、逆转录试剂盒(美国 Promega 公司)、实时定量 PCR 试剂盒和 SYBR Premix EX Taq(日本 Takara 公司)、ddH₂O(上海索宝生物科技有限公司)、胰蛋白酶(上海江莱生物科技有限公司)、JAK、STAT3、p-JAK2、p-STAT3 BCA 试剂盒(上海江莱生物科技有限公司)、多聚甲醛(武汉西祺生物科技有限公

司)、结晶紫(北京酷来搏科技有限公司)、IL-6、p-JAK2、p-STAT3 PCR 扩增引物序列(上海生物工程公司)、人 IL-6 ELISA 试剂盒(上海江莱生物科技有限公司)、Lnc RNA DILC siRNA、negative siRNA(上海吉玛制药技术有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 分组和处理

胶质瘤细胞系 LN382、U87MG 均培养在含 15% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中,放置在 5% CO₂、37℃ 恒温培养箱中培养,常规进行消化传代,并取对数生长期细胞进行相关实验研究。

胶质瘤细胞系 LN382、U87MG 分别分组为 NC 组和敲低组。取各组对数生长期细胞接种于 6 孔板中,细胞增长至 70% 融合时,通过 Lipofectamine 2000 转染试剂进行细胞转染,其中 NC 组均以 negative siRNA 转染,敲低组则以 lncRNA DILC siRNA 转染,lncRNA DILC siRNA 序列为 5'-AAGUG-GAAGCGCAACAGGAAA-3',而此序列打乱且并经分析不干扰任何基因表达的序列(5'-GAU-AAAGGAAGGCAAGGACAC-3')则为 negative siRNA。

1.2.2 PCR 检测

转染前和转染后 48 h,PCR 检测 IL-6、JAK2、STAT3 表达水平,细胞充分裂解提取总 RNA,取 2 μg 总 RNA 逆转录形成 cDNA。各引物序列(见表 1)。PCR 反应体系:上游引物 1 μg、下游引物 1 μg、2×ES Reaction Mix 10 μL、d T18 1 μL、RIES Mix 1 μL,并补水至 20 μL。PCR 反应条件如下:94℃ 5 min,94℃ 30 s、64℃ 30 s、72℃ 45 s,共 33 个循环后 72℃ 延伸 10 min。将获取的扩增产物行琼脂糖凝胶电泳,成像系统扫描,采用 2^{-ΔΔCT} 法进行各目标基因的 mRNA 相对表达量分析。

1.2.3 ELISA 法检测

转染前和转染后 48 h,ELISA 法检测离心细胞上清液中 IL-6 水平,收集细胞上清液,1 600 r/min 转

表1 引物序列表

Table 1 primer sequence table

基因	上游引物	下游引物
IL-6	5'-TACATCCTCGAGGGCATCTC-3'	5'-AGGACACTGTGCATTTGAGCCT-3'
JAK2	5'-CTGCCGAGGGATGTGAGTG-3'	5'-CAGAACATTTGCCGGCTACAC-3'
STAT3	5'-AGGAGCATCGTGAAGCTGAC-3'	5'-CGGCAGGTCAATGGTATTGC-3'
GAPDH	5'-AGGTCGGTGTGAACGGATTTG-3'	5'-GGGGTCGTTGATGGCAACA-3'

速、3 cm 半径离心 5 min, 分层后收取上清, 根据人 IL-6 ELISA 试剂盒以及酶标仪步骤指导进行 IL-6 水平的检测。

1.2.4 Western Blot 法检测

转染前和转染后 48 h, Western Blot 法检测 JAK2、STAT3、p-JAK2 及 p-STAT3 蛋白质表达水平, 取待检测样本离心漂洗进行细胞裂解, 再次离心处理后取上清液 5 μ L, 通过 BCA 法检测 JAK2、STAT3、p-JAK2 及 p-STAT3 蛋白浓度, 具体的检测操作严格按照试剂盒说明书步骤进行。通过同一泳道条带灰度值的比值反应蛋白表达水平, 计算 p-JAK2/JAK2 和 p-STAT3/STAT3。

1.2.5 Transwell 小室侵袭实验

细胞转染后 48 h, Transwell 小室侵袭实验^[8]观察细胞的侵袭能力。

1.2.6 划痕实验

细胞转染后 48 h, Transwell 小室迁移划痕实验^[9]观察细胞的转移能力状况。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 25.0 软件进行分析, 计量资料比较均符合正态分布, 以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 LN382、U87MG 胶质瘤细胞侵袭和转移能力比较

细胞转染后 48 h, 与 LN382、U87MG 胶质瘤细胞的 NC 组比较, 其相应敲低组的穿膜细胞数增加, 细胞迁移距离亦增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2、图 1 和图 2。

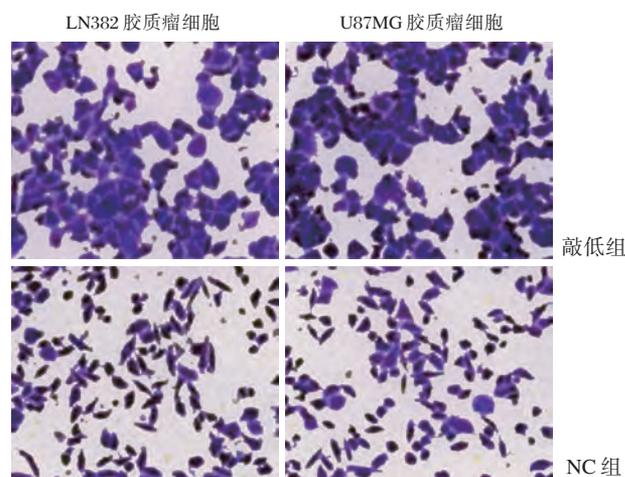
2.2 各组 LN382、U87MG 胶质瘤细胞 IL-6、JAK2、STAT3 的 mRNA 相对表达量比较

与 LN382、U87MG 胶质瘤细胞的 NC 组比较, 其相应敲低组的 IL-6、JAK2、STAT3 的 mRNA 相对表达量升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 2 各组 LN382、U87MG 胶质瘤细胞侵袭和转移能力比较 ($\bar{x} \pm s$)Table 2 Comparison of invasion and metastasis ability of ln382 and U87MG glioma cells in each groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	LN382		U87MG	
	Transwell 穿膜细胞数 (个)	细胞迁移距离 (mm)	Transwell 穿膜细胞数 (个)	细胞迁移距离 (mm)
敲低组	216.45 \pm 14.32 ^a	0.92 \pm 0.15 ^a	231.44 \pm 19.75 ^b	0.89 \pm 0.11 ^b
NC 组	96.75 \pm 12.43	0.66 \pm 0.13	95.68 \pm 15.62	0.68 \pm 0.09

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



注: A 为 LN382 胶质瘤细胞; B 为 U87MG 胶质瘤细胞。

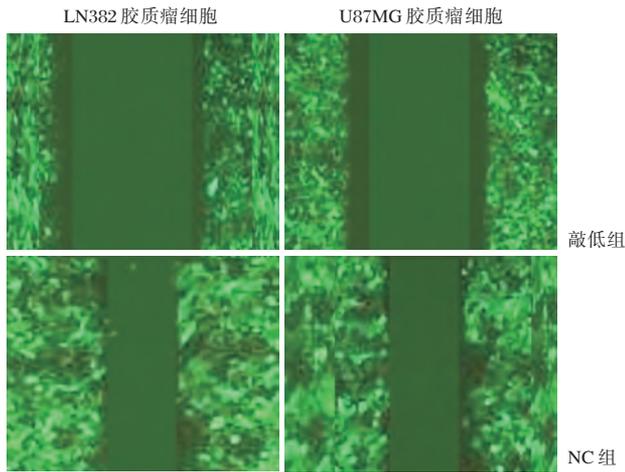
图 1 各组侵袭实验结果 (结晶紫染色, $\times 400$)Figure 1 Results of invasion experiment in each groups (结晶紫染色, $\times 400$)

2.3 LN382、U87MG 胶质瘤细胞各组 IL-6、JAK2、STAT3 蛋白质表达水平比较

细胞上清液中 IL-6 水平升高, p-JAK2/JAK2 和 p-STAT3/STAT3 蛋白质表达水平亦相应升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 4。

3 讨论

脑胶质瘤是颅内常见恶性肿瘤, 为常见中枢神经系统肿瘤疾病之一, 其发生率呈现逐年递增趋



注:A为LN382胶质瘤细胞;B为U87MG胶质瘤细胞。

图2 各组迁移实验结果

Figure 2 Results of migration experiment in each groups

表3 各组LN382、U87MG胶质瘤细胞IL-6、JAK2、STAT3的mRNA相对表达量比较($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of relative mRNA expression of IL-6, jak2 and STAT3 in ln382 and U87MG glioma cells in each groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	LN382			U87MG		
	IL-6	JAK2	STAT3	IL-6	JAK2	STAT3
敲低组	0.568±0.144 ^a	0.612±0.102 ^a	0.455±0.087 ^a	0.528±0.071 ^b	0.587±0.088 ^b	0.483±0.069 ^b
NC组	0.344±0.035	0.308±0.068	0.241±0.025	0.327±0.035	0.319±0.024	0.266±0.043

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

表4 LN382、U87MG胶质瘤细胞各组IL-6、JAK2、STAT3蛋白质表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Comparison of protein expression levels of IL-6, JAK2 and STAT3 in ln382 and U87MG glioma cells in each groups

($\bar{x} \pm s$)

组别	LN382			U87MG		
	IL-6 (ng/L)	p-JAK2/JAK2	p-STAT3/STAT3	IL-6 (ng/L)	p-JAK2/JAK2	p-STAT3/STAT3
敲低组	85.66±6.64 ^a	0.462±0.009 ^a	0.626±0.112 ^a	82.16±8.13 ^b	0.431±0.024 ^b	0.651±0.082 ^b
NC组	27.51±5.75	0.263±0.016	0.215±0.035	23.58±5.29	0.255±0.007	0.223±0.047

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

平较高,在脑胶质瘤细胞放疗抵抗中具有促进作用,且在脑胶质侵袭转移中亦具有促进作用。lncRNA DILC亦是与恶性肿瘤密切相关lncRNA之一,其在肝癌中的表达出现明显下调,可抑制肝癌干细胞扩增^[17]。本研究亦关注脑胶质瘤lncRNA DILC在胶质瘤细胞侵袭转移等生物学特性中的作用,并分析了其可能作用机制,可为通过lncRNA DILC检测干预达到胶质瘤早期诊治,从而改善疗效和预后提供依据。

本研究结果提示lncRNA DILC与LN382、U87MG胶质瘤细胞体外侵袭转移等生物学特性相关,而其表达抑制可能促进脑胶质瘤的侵袭转移,而提高其表可能有助于脑胶质瘤侵袭转移干

势,是目前研究热门肿瘤疾病之一。脑胶质瘤疾病的临床治疗方案中以手术切除治疗为主,术后常辅以放化疗等辅助治疗,但这样的治疗方案虽然一直在不断优化改进,大部分恶性胶质瘤患者的预后状况仍较差^[10-11]。多数恶性肿瘤具有较强的侵袭转移能力,邻近组织侵袭以及远处转移可加重其治疗的困难程度,进而影响疗效和预后状况^[12-13]。

近年来的研究表明,多个lncRNA的异常表达状况与脑胶质瘤发生发展以及疾病复发等预后状况密切相关^[14]。如陶海云等人^[15]的研究中,LINC00152与脑胶质瘤侵袭转移相关,而抑制LINC00152表达可达到抑制脑胶质瘤细胞侵袭转移的效果。郑杰灵等人^[16]的研究亦表明lncRNA TCONS_00008552在胶质瘤放疗抵抗株中的表达水

预。本研究中,结果提示IL-6/JAK2/STAT3信号通路可能为lncRNA DILC影响脑胶质瘤侵袭转移的重要信号通路,具体可能为lncRNA DILC低表达可能促进IL-6/JAK2/STAT3信号通路活化,从而促进血管内皮生长因子表达,抑制胶质纤维酸性蛋白转录,影响星形胶质细胞提供细胞骨架稳定性,从而促进脑胶质瘤细胞的迁移。

综上所述,lncRNA DILC与胶质瘤密切相关,敲低lncRNA DILC可激活IL-6/JAK2/STAT3信号通路,促进胶质瘤细胞的侵袭转移,因此,对lncRNA DILC及其相关信号通路IL-6/JAK2/STAT3信号通路干预可能为脑胶质瘤有效干预途径。

(下转第331页)

孕晚期亚临床甲状腺功能异常对孕妇糖代谢及妊娠并发症的影响

路春梅^{1*} 赵云刚² 杨旭¹ 范春燕¹

[摘要] 目的 探讨孕晚期亚临床甲状腺功能异常对孕妇糖代谢及妊娠并发症的影响。方法 选取62例孕晚期亚临床甲状腺功能减退孕妇(亚甲减组)、38例亚临床甲亢孕妇(亚甲亢组)和50例甲状腺功能正常孕妇(对照组)为研究对象。观察3组甲状腺功能及糖代谢指标情况,对比各组孕妇妊娠并发症和胎儿不良结局情况。结果 亚甲减组孕妇血清促甲状腺激素(TSH)水平明显高于对照组,而亚甲亢组TSH水平则明显低于对照组($P<0.05$)。亚甲减组孕妇空腹血糖(FBG)、餐后1h血糖(1hPBG)、2hPBG及糖化血红蛋白(HbA1c)等糖代谢指标均明显高于对照组($P<0.05$);而亚甲亢组和对照组孕妇各糖代谢指标比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。血TSH水平与孕妇FBG、1hPBG、2hPBG及HbA1c呈显著正相关($P<0.05$)。亚甲减组和亚甲亢组产妇胎盘早剥发生率均显著高于对照组($P<0.05$);亚甲减组产妇妊娠糖尿病以及胎儿窘迫、低出生体重儿、新生儿窒息发生率也高于对照组($P<0.05$)。结论 孕晚期甲状腺功能与孕妇糖代谢紊乱密切相关,甲状腺功能异常会增加妊娠期并发症和胎儿不良结局的发生率,其中亚甲减对母婴的影响更为严重。

[关键词] 妊娠晚期;甲状腺功能;糖代谢;妊娠并发症

Effects of subclinical thyroid dysfunction in late pregnancy on glucose metabolism and maternal prognosis in pregnant women

LU Chunmei^{1*}, ZHAO Yungang², YANG Xu¹, FAN Chunyan¹

(1. Department of obstetrics, Qinhuangdao first hospital, Qinhuangdao, Hebei, China, 066000;

2. Qinhuangdao haigang hospital, Qinhuangdao, Hebei, China, 066000)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the effect of subclinical thyroid dysfunction in late pregnancy on glucose metabolism and maternal prognosis in pregnant women. **Methods** 62 pregnant women with subclinical hypothyroidism (subclinical hypothyroidism group), 38 pregnant women with subclinical hyperthyroidism (subclinical hyperthyroidism group) and 50 healthy pregnant women (control group) were enrolled in this study. The thyroid function and metabolic indicators were observed in three groups. The pregnancy complications and fetal adverse outcomes were compared in each group. **Results** The level of TSH in subclinical hypothyroidism group were significantly higher than those in control group, while the level of TSH in subclinical hyperthyroidism group were significantly lower than those in control group ($P<0.05$). The levels of FBG, 1hPBG, 2hPBG and HbA1c in subclinical hypothyroidism group were significantly higher than the control group ($P<0.05$). There were no significant differences in glucose metabolism indexes between the subclinical hyperthyroidism group and control group ($P>0.05$). Blood TSH was significantly positively correlated with FBG, 1hPBG, 2hPBG and HbA1c in pregnant women ($P<0.05$). The occurrence rates of placental abruption in subclinical hypothyroidism group and subclinical hyperthyroidism group were significantly higher than that in control group ($P<0.05$), and the occurrence rates of gestational diabetes

基金项目:秦皇岛市市级科技计划项目(201602A169)

作者单位:1. 河北省秦皇岛市第一医院产科,河北,秦皇岛 066000

2. 河北省秦皇岛市海港医院,河北,秦皇岛 066000

*通信作者:路春梅, E-mail:alice1592@163.com

mellitus, fetal distress and low-birth weight, neonatal asphyxia in subclinical hypothyroidism group were higher than that in the control group ($P<0.05$). **Conclusion** Thyroid function in the third trimester is closely related to the disorder of glucose metabolism in pregnant women. Abnormal thyroid function will increase the incidence of pregnancy complications and fetal adverse outcomes. Among them, the effect of hypothyroidism on mothers and infants is more serious.

[KEY WORDS] Third trimester of pregnancy; Thyroid function; Glycometabolism; Pregnancy complication

甲状腺功能异常是孕产妇较为常见的内分泌疾病之一,发生率仅次于妊娠糖尿病,主要由于甲状腺激素分泌异常或甲状腺生物效应变化所致^[1]。妊娠期甲状腺功能异常不仅影响孕妇身体健康,还会对胎儿甲状腺功能和神经功能发育产生影响,严重者可造成流产和死胎^[2-3]。亚临床甲状腺功能疾病是指血清促甲状腺激素(Thyroid stimulating hormone, TSH)水平过低或过高,而游离甲状腺素(free thyroxine, FT)水平正常的甲状腺疾病,其临床特征不明显,较易被孕妇和临床医护人员所忽视^[4]。目前临床关于妊娠早中期孕妇甲状腺功能的研究较多,而关于孕晚期亚临床甲状腺功能异常方面的报道相对较少^[5]。本研究分析了100例亚临床甲状腺功能异常的孕晚期妇女和50例健康孕妇临床资料,探讨孕晚期亚临床甲减、亚临床甲亢与孕妇机体糖代谢及妊娠并发症的关系。现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2016年5月至2018年5月本院产科产检的100例孕晚期亚临床甲状腺功能异常孕妇为研究对象,其中亚临床甲状腺功能减退者62例(亚甲减组),年龄23~33岁,平均(28.73±3.55)岁;孕周28~41周,平均(35.22±2.54)周;体重指数(Body Mass Index, BMI)21~29 kg/m²,平均(24.35±2.73) kg/m²。亚临床甲状腺功能亢进孕妇38例(亚甲亢组),年龄22~32岁,平均(28.54±3.49)岁;孕周31~40周,平均(35.13±2.51)周;BMI为21~29 kg/m²,平均(24.15±2.68) kg/m²。同时选取同期50例孕检的甲状腺功能正常孕晚期孕妇为对照组,年龄22~34岁,平均(28.67±3.51)岁;孕周29~40周,平均(35.21±2.55)周;身体质量指数(Body Mass Index, BMI)为20~29 kg/m²,平均(24.18±2.72) kg/m²。3组孕妇在年龄、孕周以及BMI方面比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。具有可比性。

纳入标准:①符合亚甲减的诊断标准^[6];②年龄22~34岁;③单胎妊娠,孕周大于28周;④自愿参加研究,签署同意书;⑤病理资料完整,并完成后期随访。排除标准:①孕前糖尿病、高血压、甲状腺疾病以及其他内分泌系统疾病患者;②心肝肺肾等脏器功能异常者;③恶性肿瘤、凝血功能障碍以及精神类疾病患者;④近期(1月内)服用激素类药物及免疫抑制剂治疗者;⑤存在其他影响本研究因素患者。

1.3 方法

1.3.1 生化指标检查

所有孕妇于孕检时抽取空腹静脉血4 mL,室温放置30 min送检,以3 000 r/min离心10 min,收集血清。应用美国Beckman公司DX1800型化学发光免疫分析系统测定血TSH、FT3、FT4水平;采用JCA-BM6010/C分析仪检测糖化血红蛋白(hemoglobin A1c, HbA1c)水平,检测试剂购于上海生物制品所。对患者进行糖耐量实验,记录空腹血糖(fasting blood glucose, FBG)、餐后1 h血糖(1 h postprandial blood sugar, 1hPBG)及2hPBG。

1.3.2 跟踪治疗及随访结果

甲状腺功能异常孕妇确诊后立即配合内分泌科进行治疗,亚甲减患者服用左甲状腺素(海灵制药,国药准字H20060091)25~50 μg/d,亚甲亢患者服用小剂量甲巯咪唑(Merck KGaA,注册证号H20120405)2.5 mg/d治疗;控制TSH水平在参考范围以内,每2周复查甲状腺功能,适时调整用药剂量,跟踪随访至分娩后30 d转内分泌科继续治疗。记录3组孕妇妊娠糖尿病、贫血、妊娠高血压、胎盘早剥等并发症发生情况。

1.4 统计学方法

采用SPSS 19.0软件进行数据处理,计量资料符合正态分布以($\bar{x} \pm s$)表示,多组间采用单因素方差分析,两两比较用LSD检验;计数资料用(%)表示,采用 χ^2 检验;采用Pearson检验分析各指标间相关性, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组孕妇甲状腺激素浓度比较

亚甲减组孕妇血清 TSH 水平明显高于对照组, 而亚甲亢组 TSH 水平则显著低于对照组 ($P < 0.05$); 3 组孕妇血清 FT3、FT4 水平比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 3 组孕妇甲状腺激素浓度比较 [$n, (\bar{x} \pm s)$]

Table 1 Comparison of thyroid hormone among 3 groups [$n, (\bar{x} \pm s)$]

组别	<i>n</i>	TSH (mU/L)	FT3 (pmol/L)	FT4 (pmol/L)
对照组	50	2.57±0.63	4.31±0.64	13.72±1.89
亚甲减组	62	7.29±2.13 ^a	4.38±0.65	13.43±1.97
亚甲亢组	38	0.14±0.06 ^{ab}	4.27±0.59	14.05±2.08
<i>F</i> 值		214.257	0.219	0.816
<i>P</i> 值		<0.01	0.803	0.445

注: 与对照组相比, ^a $P < 0.05$; 与亚甲减组相比, ^b $P < 0.05$

2.2 各组孕妇糖代谢指标比较

亚甲减组孕妇 FBG、1 hPBG、2 hPBG 及 HbA1c 均明显高于对照组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); 而亚甲亢组和对照组孕妇各糖代谢指标比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 2。

表 2 3 组孕妇糖代谢指标比较 [$n, (\bar{x} \pm s)$]

Table 2 Comparison of glucose metabolism indexes among 3 groups [$n, (\bar{x} \pm s)$]

组别	<i>n</i>	FBG (mmol/L)	1hPBG (mmol/L)	2hPBG (mmol/L)	HbA1c (%)
对照组	50	4.52±0.68	9.13±0.98	7.58±0.75	4.37±0.68
亚甲减组	62	5.22±0.81 ^a	9.89±1.05 ^a	8.85±0.82 ^a	5.81±0.65 ^a
亚甲亢组	38	4.38±0.72 ^b	8.97±1.21 ^b	7.49±1.07 ^b	4.31±0.62 ^b
<i>F</i> 值		22.711	8.852	20.156	87.264
<i>P</i> 值		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注: 与对照组相比, ^a $P < 0.05$; 与亚甲减组相比, ^b $P < 0.05$

2.3 甲状腺激素水平与糖代谢指标的相关性

血清 TSH 水平与糖代谢指标 FBG、1hPBG、2hPBG 及 HbA1c 均呈显著正相关 ($P < 0.05$); 而 FT3、FT4 水平与 FBG、1hPBG、2hPBG 及 HbA1c 的相关性不显著 ($P > 0.05$)。见表 3。

2.4 3 组产妇产前并发症情况比较

亚甲减组产妇产前糖尿病及胎盘早剥发生率显著高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 亚甲亢组产妇产前胎盘早剥发生率高于对照组, 妊娠糖

表 3 血清 TSH、FT3、FT4 与糖代谢指标的相关性

Table 3 Correlation between serum TSH, FT3, FT4 and glucose metabolism

	FBG		1 h PBG		2 h PBG		HbA1c	
	<i>r</i> 值	<i>P</i> 值						
TSH	0.483	0.000	0.374	0.000	0.444	0.000	0.686	0.000
FT3	0.085	0.370	0.157	0.099	0.152	0.110	0.049	0.607
FT4	0.027	0.775	0.115	0.099	0.035	0.711	0.052	0.586

尿病发生率低于亚甲减组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 4。

表 4 3 组产妇产前并发症情况比较 [$n(\%)$]

Table 4 Comparison of maternal pregnancy complications in 3 groups [$n(\%)$]

组别	<i>n</i>	妊娠糖尿病	妊娠高血压	贫血	胎盘早剥
对照组	50	3(6.00)	2(4.00)	2(4.00)	0(0.00)
亚甲减组	62	12(19.35) ^a	9(14.52)	9(14.52)	5(8.06) ^a
亚甲亢组	38	2(5.26) ^b	5(13.16)	2(5.26)	3(7.89) ^a
χ^2 值		6.779	3.544	4.612	4.227
<i>P</i> 值		0.034	0.170	0.100	0.121

注: 与对照组相比, ^a $P < 0.05$; 与亚甲减组相比, ^b $P < 0.05$

2.5 各组胎儿不良结局比较

亚甲减组胎儿窘迫、低出生体重儿及新生儿窒息发生率显著高于对照组 ($P < 0.05$); 亚甲亢组和对照组各胎儿不良结局情况比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 5。

表 5 各组胎儿不良结局比较 [$n(\%)$]

Table 5 Comparison of fetus adverse outcomes in each group [$n(\%)$]

组别	<i>n</i>	胎儿窘迫	低出生体重儿	新生儿窒息	早产
对照组	50	1(2.00)	1(2.00)	0(0.00)	1(2.00)
亚甲减组	62	9(14.52) ^a	8(12.90) ^a	7(11.29) ^a	4(6.45)
亚甲亢组	38	2(5.26)	1(2.63)	2(5.26)	2(5.26)
χ^2 值		6.409	6.620	6.305	1.274
<i>P</i> 值		0.041	0.037	0.043	0.529

注: 与对照组相比, ^a $P < 0.05$; 与亚甲减组相比, ^b $P < 0.05$

3 讨论

甲状腺疾病是一种常见的内分泌疾病, 好发于育龄女性。妊娠合并甲状腺功能异常患者发病隐匿, 临床症状表现不一, 容易被忽视^[7-8]。世界卫生组织(world health organization, WHO)调查显示, 全球妊娠合并甲减发生率约为 1.6%~2.9%, 妊娠合并甲亢发生率约为 0.02%~0.5%^[9]。甲状腺激

素是维持机体生长和组织分化的重要激素,参与全身各脏器、组织的新陈代谢过程。妊娠期甲状腺功能异常可导致糖代谢紊乱,引发妊娠糖尿病等代谢疾病的发生^[10]。甲状腺对机体糖代谢调控具有双重作用,一方面甲状腺可促进糖原分解和糖异生,增强胰高血糖素、糖皮质激素以及肾上腺激素作用,从而升高血糖水平;另外,甲状腺能促进胰岛素分泌,提高机体组织对糖的利用率,增加糖酵解并降低血糖^[11-12]。本研究结果显示提示孕晚期亚临床甲亢对孕妇糖代谢的影响相对较小,但对于亚临床甲亢孕妇也应该密切注意甲状腺功能指标的变化,防止疾病进展,造成不良妊娠结局。

妊娠期是育龄女性的特殊生理期,妊娠期女性血中激素水平存在明显变化,下丘脑-垂体-甲状腺轴受其影响处于应激状态,导致甲状腺生理功能出现改变,容易引起甲状腺疾病^[13]。孕妇发生甲状腺功能异常的病理机制可能是^[14-16]:①孕妇怀孕期间血中人绒毛膜促性腺激素(HCG)水平增加,HCG与TSH具有相同的 β 亚基和相似的 α 亚基,故引起TSH分泌异常;②妇女怀孕期间需通过胎盘向胎儿提供必需的碘,以保证胎儿正常发育,导致孕妇体内碘含量不足,从而影响甲状腺激素合成和分泌;③妊娠期母体在提供自身所需甲状腺激素的同时,还需要为胎儿提供大部分甲状腺激素,以维持胎儿生长发育需求,导致孕妇容易发生甲状腺功能异常。妊娠期甲状腺功能异常对孕妇本人及胎儿均有较大影响。有研究^[17-18]显示,甲状腺功能异常会导致孕妇血糖代谢异常和孕酮分泌紊乱,增加妊娠期贫血、妊娠糖尿病、产后出血等妊娠并发症的发生;另外,妊娠期甲状腺功能异常会导致胎儿生长发育缓慢,甚至出现胎儿早产、生长受限、先天畸形等不良结局。本研究说明亚临床甲状腺功能异常均会增加妊娠并发症和胎儿不良结局的发生率,且亚临床甲减对妊娠期母婴健康的影响更为严重,应密切注意。

综上所述,孕晚期甲状腺功能与孕妇糖代谢紊乱密切相关,其功能异常可增加妊娠期并发症和胎儿不良结局的发生率,因此尽早预防和治疗妊娠期甲状腺疾病对改善母婴结局具有重要意义。

参考文献

- [1] 沈艳,杨悦,陈刚. 妊娠早期甲状腺功能与妊娠期糖尿病及糖代谢指标的关系[J]. 河北医学, 2017, 23(2): 297-300.
- [2] Levie D, Korevaar TIM, Mulder TA, et al. Maternal Thyroid Function in Early Pregnancy and Child Attention-Deficit

Hyperactivity Disorder: An Individual-Participant Meta-Analysis [J]. *Thyroid*, 2019, 29(9): 1316-1326.

- [3] Fetene DM, Betts KS, Alati R. MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY: Maternal thyroid dysfunction during pregnancy and behavioural and psychiatric disorders of children: a systematic review [J]. *Eur J Endocrinol*, 2017, 177(5): R261-R273.
- [4] 李霞,孙丽洲. 甲状腺疾病对母婴妊娠结局的影响[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2019, 39(10): 1511-1514.
- [5] 叶文慧,何柳瑜,吕小飞,等. 妊娠早期合并亚临床甲状腺功能减退妇女自身抗体阳性对不良妊娠结局的影响[J]. *实用妇产科杂志*, 2018, 34(1): 34-37.
- [6] 《妊娠和产后甲状腺疾病诊治指南》(第2版)编撰委员会,中华医学会内分泌学分会,中华医学会围产医学分会. 妊娠和产后甲状腺疾病诊治指南(第2版)[J]. *中华围产医学杂志*, 2019, 22(8): 505-506.
- [7] 邵侃,曲伸,陈美新,等. 小剂量左甲状腺素干预治疗早期妊娠合并亚临床甲状腺功能减退症的临床疗效分析[J]. *中国医刊*, 2016, 51(10): 45-48.
- [8] 全紫薇,金华. 妊娠期甲状腺肿瘤的诊断与治疗进展[J]. *中国临床医生杂志*, 2017, 45(10): 16-18.
- [9] Andersen SL, Knøsgaard L, Olsen J, et al. Maternal Thyroid Function, Use of Antithyroid Drugs in Early Pregnancy, and Birth Defects [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2019, 104(12): 6040-6048.
- [10] 何文慧. 亚临床甲减对妊娠期糖尿病及妊娠期高血压疾病发病率影响的调研分析[J]. *临床和实验医学杂志*, 2016, 15(23): 2344-2346.
- [11] 麦子霞,孙晓峰. 甲状腺功能亢进对妊娠期糖尿病孕妇糖脂代谢的影响[J]. *广东医学*, 2017, 38(6): 868-871.
- [12] Chen AX, Leung AM, Korevaar TIM. Thyroid Function and Conception [J]. *N Engl J Med*, 2019, 381(2): 178-181.
- [13] Andrisani A, Sabbadin C, Marin L, et al. The influence of thyroid autoimmunity on embryo quality in women undergoing assisted reproductive technology [J]. *Gynecol Endocrinol*, 2018, 34(9): 752-755.
- [14] Zhang C, Yang X, Zhang Y, et al. Association Between Maternal Thyroid Hormones and Birth Weight at Early and Late Pregnancy [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2019, 104(12): 5853-5863.
- [15] 庄咏梅,孙丽洲. 妊娠晚期合并亚临床甲状腺功能减退症对妊娠和胎儿影响的临床分析[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2016, 36(8): 1012-1014.
- [16] Çakır U, Tayman C. The effect of thyroid functions on osteopenia of prematurity in preterm infants [J]. *J Pediatr Endocrinol Metab*, 2019, 32(1): 65-70.
- [17] Zhang Y, Zhang C, Yang X, et al. Association of Maternal Thyroid Function and Thyroidal Response to Human Chorionic Gonadotropin with Early Fetal Growth [J]. *Thyroid*, 2019, 29(4): 586-594.
- [18] 钟琳琳,龙玉. 妊娠期甲状腺过氧化物酶抗体阳性对妊娠结局及新生儿并发症的影响[J]. *广西医科大学学报*, 2018, 35(12): 1628-1630.

IGF-IR 与前列腺癌发生发展及预后的关系

冯国亮^{1*} 张建伟² 徐泉泉² 冯伟³

[摘要] **目的** 探讨前列腺癌组织中胰岛素样生长因子受体 I (IGF-IR) 表达与前列腺癌发生发展及预后的关系。**方法** 选取本院获取的前列腺癌组织标本 74 例(癌组织)、因手术实施前列腺治疗的前列腺良性增生标本 80 例(BPH 组);采用免疫组化技术检测两组标本中的 IGF-IR 蛋白表达情况,并分析前列腺癌组织中的 IGF-IR 阳性蛋白表达与前列腺癌特征及预后的关系,以及前列腺癌术后患者生存时间的影响因素。**结果** 前列腺癌组织中的 IGF-IR 蛋白阳性表达率明显高于 BPH 组织,差异有统计学意义($P<0.001$)。不同临床分期及淋巴结转移情况的前列腺癌组织中的 IGF-IR 蛋白阳性表达率差异有统计学意义($P<0.05$)。IGF-IR 蛋白阳性表达的患者术后生化复发生存率显著高于阴性表达者,总体生存率显著低于阴性表达者,差异均有统计学意义($P<0.05$)。IGF-IR 蛋白阳性表达和阴性表达对前列腺癌患者生化复发生存时间及总体生存时间的影响差异有统计学意义($P<0.05$)。COX 回归分析结果显示,临床分期、以及生化复发生存是影响患者生存状态的独立因素($P<0.05$)。**结论** IGF-IR 蛋白表达增强可能会促进前列腺癌的发生及发展,但是否会对患者生存时间产生独立影响,仍有待进一步的大样本及长时间随访加以证实,IGF-IR 或可成为前列腺癌治疗研究的新靶点。

[关键词] 前列腺癌;胰岛素样生长因子受体 I;临床分期;淋巴结转移

Relationship between IGF-IR and occurrence, development and prognosis of prostate cancer

FENG Guoliang^{1*}, ZHANG Jianwei², XU Quanquan², FENG Wei³

(1. Department of Urology, General Hospital of Nanyang Oilfield, Nanyang, Henan, China, 473132;

2. Department of Urology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou Henan, China,

450052; 3. Department of Nephrology, Nanyang Oilfield General Hospital, Nanyang, Henan, China, 473132)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the relationship between the expression of insulin-like growth factor receptor I (IGF-IR) in prostate cancer tissue and the development and prognosis of prostate cancer. **Methods** 74 cases of prostate cancer tissues (cancer tissues) obtained from our hospital and 80 cases of benign prostatic hyperplasia due to surgery for prostate (BPH group) were recruited for this study. Immunohistochemical technique was used to detect the expression of IGF-IR protein in the two groups of specimens. The relationship between IGF-IR positive expression in prostate cancer tissues and the characteristics and prognosis of prostate cancer was analyzed. The factors affecting the survival time of patients with prostate cancer after surgery were also analyzed. **Results** The positive expression rate of IGF-IR protein in prostate cancer tissues was significantly higher than that in BPH tissues, and the difference had statistical significance ($P<0.001$). The positive expression rate of IGF-IR protein in prostate cancer tissues with different clinical

基金项目:河南省医学科技攻关计划项目(2018063891)

作者单位:1. 南阳油田总医院泌尿外科,河南,南阳 473132

2. 郑州大学附属第一医院泌尿外科,河南,郑州 450052

3. 南阳油田总医院肾内科,河南,南阳 473132

*通信作者:冯国亮, E-mail:fgliang3326@163.com

stages and lymph node metastasis had statistical significance ($P<0.05$). The survival rate of postoperative biochemical recurrence in patients with positive expression of IGF-IR protein was significantly higher than that of those with negative expression, and the overall survival rate was significantly lower than that of those with negative expression, the difference had statistical significance ($P<0.05$). There was a statistically significant difference between the positive and negative expression of IGF-IR protein on the survival time of biochemical recurrence and the overall survival time of prostate cancer patients ($P<0.001$). COX regression analysis showed that clinical stage and survival of biochemical recurrence are independent factors affecting the survival status of patients ($P<0.05$). **Conclusion** The increased expression of IGF-IR protein may promote the development and progression of prostate cancer. However, whether it will have an independent effect on patient survival remains to be confirmed by further large samples and long-term follow-up. IGF-IR may consider as a new target for prostate cancer treatment.

[KEY WORDS] Prostate cancer; Insulin-like growth factor receptor I; Clinical staging; Lymph node metastasis

前列腺癌发病率位居男性恶性肿瘤的第二位,并且这一数值正逐年增高。本病发生、发展是一个长期、多基因、多因素参与的复杂过程^[1-2]。胰岛素样生长因子受体 I (Insulin-like growth factor receptor I, IGF-IR) 是酪氨酸激酶受体家族之一,存在两个 α 异源胞外链及两个跨膜 β 链。IGF-IR 在乳腺癌、前列腺癌等多种恶性肿瘤中存在高表达。IGF-IR 是胰岛素样生长因子信号转导路径的主要介质之一,与配体结合后,其内在 β 链将被激活,并促使 C-末端结构域及近膜区酪氨酸激酶磷酸化,并激活下磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphatidylinositol-3-kinases, PI3K)/蛋白质丝氨酸苏氨酸激酶(protein-serine-threonine kinase, AKT)等信号路径,从而参与肿瘤细胞增殖、分裂以及凋亡抑制等过程^[3]。为探讨前列腺癌组织中胰岛素样生长因子受体 I (IGF-IR) 表达的临床意义,本文进行了如下研究。

1 资料与方法

1.1 资料

选取 2013 年 5 月至 2016 年 2 月本院确诊并行前列腺根治术的前列腺癌组织标本 74 例(前列腺癌组)、因手术实施前列腺治疗的前列腺良性增生(Benign prostatic hyperplasia, BPH)标本 80 例(BPH 组)。前列腺癌组,年龄 55~77 岁,平均(65.2 \pm 6.0)岁,根据 2010 年美国癌症联合委员会(American Cancer Council, AJCC)分期标准^[2]: T2 期 33 例、T3 期 34 例、T4 期 7 例;格里森(Gleason)评分^[3]>7 分 47 例、 \leq 7 分 27 例;淋巴结转移阳性 47 例;截止到本研究开始随访时间为 6~72 个月,平均为 43(38, 66)个月,生化复发(血清 PSA 水平>0.2

ng/mL) 53 例,死亡 42 例。对照组,年龄 48~79 岁,平均(64.1 \pm 8.3)岁。纳入标准:①前列腺癌的诊断标准参考 2012 年《NCCN 前列腺癌诊治指南中文版》中的标准^[5];②获取前列腺癌组织标本前患者无放疗化疗病史;③前列腺癌、前列腺良性增生的诊断主要依据肛门指检、超声及术后病理学;④所有患者及家属均已签署知情同意书;⑤研究对象的各项资料完整。排除标准:①资料缺失;②伴有其他部位恶性肿瘤;③合并其他类型前列腺、泌尿系统疾病;④免疫功能疾病、类风湿性疾病。本实验通过本院伦理委员会同意批准。两组研究对象的年龄比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。

1.2 方法

1.2.1 免疫组化检测

将各组石蜡包埋,4 μ m 切片,将样本置于温箱内于 68 $^{\circ}$ C 温度下烤片 2 h,取出后脱蜡至水,选用 PBS 进行洗涤,滴入 3 mL 3% H_2O_2 去离子水灭活,时长为 15 min, PBS 洗涤,滴入 10 mL 枸橼酸缓冲液煮沸后静置冷却 30 min,取出后 PBS 洗涤,滴入 10 mL 山羊血清封闭 30 min,鼠抗人 IGF-IR 单克隆抗体一抗(美国 Novus Biologicals 公司生产,稀释浓度 1:100),4 $^{\circ}$ C 冷藏过夜,取出后选用 PBS 洗涤 3 次,滴入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 二抗(Abcam 公司生产,稀释浓度 1:500),PBS 洗涤 3 次, DAB 染色,苏木精复染,冲洗后脱水、封片、镜检。

1.2.2 判断指标

IGF-IR 蛋白阳性染色表达于细胞质中,两种蛋白的阳性染色呈黄色、棕黄色、褐色表达,①依据染色的程度分为:未染色(0 分)、仅仅淡黄色染色(1 分)、棕黄色染色(2 分)、染色呈褐色、黑色(3

分);②根据染色的细胞占比结果:占比范围≤10%计分1分、>10%~≤50%计分2分、50%~<~≤75%计分3分、占比>75%计分4分,染色程度与阳性细胞计分之乘积<3分为阴性、≥3分为阳性。

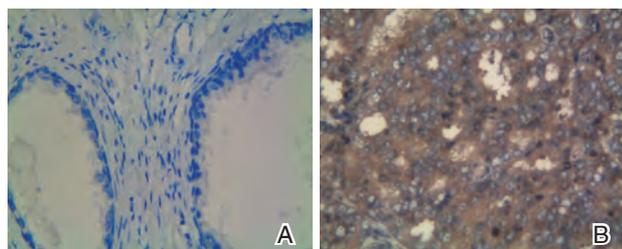
1.3 统计学处理

采用SPSS 21.0软件进行数据分析,计量资料符合正态分布采用($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用独立样本*t*检验,不符合正态分布用中位数(P_{25}, P_{75})表示,两组间比较采用Mann-Whitney 检验;计数资料用*n*(%)表示,用 χ^2 检验;K-M法绘制前列腺癌患者IGF-IR蛋白表达的生化复发生存曲线以及总体生存曲线,采用COX多因素回归分析前列腺癌术后生存的影响因素。以*P*<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组标本中IGF-IR蛋白阳性表达率比较

前列腺癌组织中的IGF-IR蛋白阳性表达率为68.92%(51/74),明显高于BPH组织的阳性表达率36.25%(29/80),差异有统计学意义($\chi^2=16.436, P<0.05$)见图1。



注:A为BPH组织;B为前列腺癌组织

图1 IGF-IR蛋白免疫组化结果(SP,×400)

Figure 1 IGF-IR protein immunohistochemistry results (SP,×400)

2.2 不同特征的前列腺癌组织中IGF-IR蛋白阳性表达率比较

不同临床分期、是否发生淋巴结转移的前列腺癌组织中的IGF-IR蛋白阳性表达率差异具有统计学意义(*P*<0.05),见表1。

2.3 IGF-IR蛋白表达与前列腺癌患者预后的关系

IGF-IR蛋白阳性表达的患者术后生化复发生存率显著高于阴性表达者(*P*<0.05),总体生存率显著低于阴性表达者,差异均有统计学意义(*P*=0.05)。IGF-IR蛋白阳性表达和阴性表达对前列腺癌患者生化复发生存时间及总体生存时间的影响差异有统计学意义($\chi^2=17.598, P<0.001; \chi^2=7.251, P<0.001$)。见表2,图2、3。

表1 不同特征的前列腺癌组织中IGF-IR蛋白表达率比较 [*n*(%)]

Table 1 Comparison of expression rates of IGF-IR protein in prostate cancer tissues with different characteristics [*n*(%)]

项目	<i>n</i>	阳性(<i>n</i> =51)	阴性(<i>n</i> =23)	χ^2 值	<i>P</i> 值
临床分期				6.025	0.049
T2	32	18(56.25)	14(43.75)		
T3	35	26(74.29)	9(25.71)		
T4	7	7(100.00)	0(0)		
Gleason评分				0.704	0.401
>7分	47	34(72.34)	13(27.66)		
≤7分	27	17(62.96)	10(37.04)		
淋巴结转移				5.781	0.016
是	47	37(78.72)	10(21.28)		
否	27	14(51.85)	13(48.15)		

表2 IGF-IR蛋白表达与前列腺癌患者预后的关系 [*n*(%)]

Table 2 Relationship between the expression of igf-ir protein and the prognosis of prostate cancer patients [*n*(%)]

IGF-IR蛋白表达	<i>n</i>	生化复发生存		总体生存	
		是	否	存活	死亡
阳性	51	43(84.31)	8(15.69)	18(35.29)	33(64.71)
阴性	23	10(43.48)	13(56.52)	14(60.87)	9(39.13)
χ^2 值		13.005		4.225	
<i>P</i> 值		<0.05		0.04	

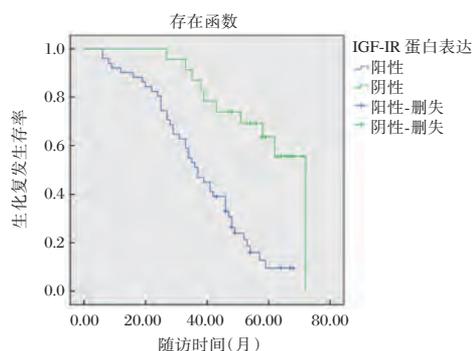


图2 IGF-IR蛋白表达与前列腺癌患者生化复发生存率的关系

Figure 2 Relationship between igf-ir protein expression and biochemical recurrence survival rate in prostate cancer patients

2.4 前列腺癌术后患者生存影响因素的COX回归分析

COX回归分析结果显示,临床分期以及生化复发生存是影响患者生存状态的独立因素(*P*<0.05)。见表3。

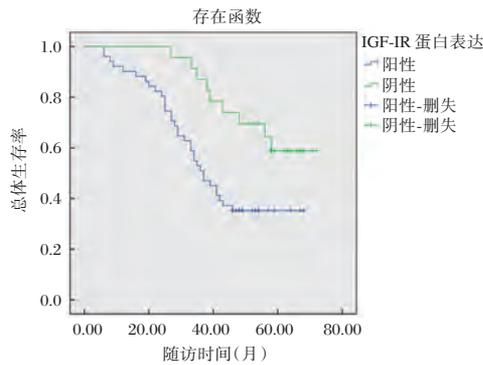


图3 IGF-IR 蛋白表达与前列腺癌患者总体生存率的关系
Figure 3 Relationship between igf-ir protein expression and overall survival rate in prostate cancer patients

表3 前列腺癌术后患者生存时间影响因素的 COX 回归分析

Table 3 COX regression analysis of influencing factors of survival time after prostate cancer surgery

参数	β 值	SE 值	Walds 值	P 值	OR 值	95%CI	
临床分期	-2.553	0.743	11.811	0.001	0.078	0.018	0.334
生化复发生存	1.073	0.507	4.485	0.034	2.925	1.083	7.898
淋巴结转移	-0.971	0.863	1.266	0.260	0.379	0.070	2.054
IGF-IR 蛋白表达	1.572	0.862	3.322	0.068	4.814	0.888	26.094

增殖密切相关^[7-8]。IGF-IR 与 IGF-I 结合后将借助两组信号路径调节细胞生理功能,第一组信号路径是 PI3K/AKT 路径,IGF-IR 与配体结合后磷酸化的底物及结构域将激活三磷酸磷脂酰肌醇,最终诱导蛋白激酶 B 活化,这一路径具有促细胞增殖、分裂以及抑制凋亡等效应^[9]。第二组信号路径为 MAPK/ERK 路径,IGF-IR 磷酸化后可诱导顺序激活信号转导及转录活化因子 3 活化,并诱导 Ras、Raf 蛋白向细胞内聚集,同时介导细胞内的信号级联反应,最终激活 MAPK/ERK 路径,诱导细胞增殖、分化^[10-11]。前列腺癌细胞转移潜能与 IGF-IR 信号路径对细胞粘附、迁移能力的修改能力密切相关^[12]。IGF-IR 可诱导血管内皮生长因子异常表达,增强肿瘤血管及淋巴生成能力^[13]。还有研究发现^[14],白介素 6 可通过活化 IGF-IR 及顺序激活信号转导及转录活化因子 3 来影响前列腺癌发生及侵袭,靶向阻断 IGF-IR 及顺序激活信号转导及转录活化因子 3 获得的疗效可能高于阻断白介素 6 信号。早期前列腺癌患者对雄激素阻断治疗均较敏感,但随着疾病进展,患者终将出现去势抵抗。此时如给予患者雄激素去势手术,患者疾病将转型为雄激素非依赖性前列腺癌,而 IGF-IR 诱导的 PI3K/AKT 路径介导的反式雄激素激活是患

3 讨论

目前研究发现前列腺癌无特异临床表现,5 年存活率仅为 25%左右^[4],早期对前列腺癌发生发展及预后进行评估,进一步分析前列腺癌去势抵抗机制,探究新的对前列腺癌预后具有指导意义的分子因素,提高患者病情评估质量,并制定有针对性的靶向治疗方案已成为临床研究热点^[5]。

IGF-IR 是单次跨膜蛋白的一种,IGF-IR 的激活有赖于其配体胰岛素样生长因子 I (insulin like growth factor-I, IGF-I)^[6]。IGF-I 则是人生长发育、代谢合成的重要介质,与骨骼肌等其他组织过度

者疾病转型的重要原因。这一路径的活化可能通过雄激素受体自磷酸化、叉形头转录因子及 NF- κ B 路径等机制来促使患者去势抵抗^[15]。因此,临床发现靶向阻断 IGF-IR 联合雄激素剥夺治疗可对前列腺癌患者形成协同疗效^[16],提示 IGF-IR 或将成为前列腺癌靶向治疗新方向。

综上所述,IGF-IR 蛋白表达增强可能会促进前列腺癌的发生及发展,且可能对患者的预后造成不利影响。但由于本次研究样本量较小,前列腺癌术后患者 IGF-IR 蛋白表达是否会对生存时间产生独立影响,仍有待进一步大样本及长期随访加以证实,IGF-IR 或可成为前列腺癌治疗研究的新靶点。

参考文献

- [1] 张逸敏,蔡馨梅,周姗,等.基于核酸适配体和有机纳米材料的肿瘤靶向递药系统研究进展[J].国际生物医学工程杂志,2018,41(1):78-84,89.
- [2] 王田,王骁,肖龙,等.更换抗雄激素药物治疗去势抵抗性前列腺癌 58 例临床分析[J].重庆医学,2018,47(1):109-111.
- [3] Niu X B, Fu G B, Wang L, et al. Insulin-like growth factor-I induces chemoresistance to docetaxel by inhibiting miR-143 in human prostate cancer [J]. Oncotarget, 2017, 8 (63) : 107157-107166.

- [4] 罗林,王海洋,邱凌,等. 前列腺癌患者免疫功能指标变化及临床特征对免疫功能影响的分析[J]. 癌症进展, 2018, 16(4):509-511.
- [5] Mancarella C, Casanova-Salas I, Calatrava A, et al. Insulin-like growth factor 1 receptor affects the survival of primary prostate cancer patients depending on TMPRSS2-ERG status [J]. *Bmc Cancer*, 2017, 17(1):367.
- [6] 周文浩, 龚志勇, 廖波, 等. ERG 蛋白表达与前列腺癌患者根治术后生化复发风险关系的研究[J]. 国际泌尿系统杂志, 2019, 39(1):1-4.
- [7] 宋翠豪, 王睿, 陈双景, 等. 二甲双胍对 HaCaT 细胞增殖分化和炎症因子分泌的影响[J]. 中华皮肤科杂志, 2019, 52(1):25-32.
- [8] 陈燕琼, 吴丕华, 宋向群, 等. IGF-1R 旁路活化在 EML4-ALK 阳性非小细胞肺癌 Alectinib 继发耐药中的作用[J]. 肿瘤学杂志, 2018, 24(5):418-424.
- [9] Küffer S, Gutting T, Belharazem D, et al. Insulin-like growth factor 2 expression in prostate cancer is regulated by promoter-specific methylation [J]. *Molecular Oncology*, 2018, 12(2):256-266.
- [10] 龚利. 子宫肌瘤组织中 TGF- β 3、VEGF、IGF-IR 的表达及临床意义[J]. 中国妇幼保健, 2018, 33(1):30-32.
- [11] 杜彦丹, 牛艺卿, 郑海军, 等. Snail 基因甲基化与 TGF β 1 诱导前列腺癌细胞发生 EMT 的相关性研究[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2019, 11(6):451-456.
- [12] 张青霞, 贺琪, 郭娟, 等. 胰岛素样生长因子 I 型受体 (IGF-IR) 在 MDS 患者骨髓 CD34 阳性细胞中的表达[J]. 中国实验血液学杂志, 2018, 26(3):849-853.
- [13] 徐小涵, 唐贤富. 腹腔镜前列腺癌根治术治疗前列腺癌的短期疗效及对患者血清 PSA、VEGF、IGF-I 和 FPSAR 水平的影响[J]. 标记免疫分析与临床, 2018, 25(11):118-121+125.
- [14] 顾震华, 冯宁翰, 徐新宇, 等. 阿仑膦酸钠对前列腺癌患者胰岛素样生长因子 1、胰岛素样生长因子结合蛋白 3 测定的意义[J]. 陕西医学杂志, 2017, 46(11):1520-1523.
- [15] 赵明, 王喆, 王福光, 等. IGF-1R 抑制剂 OSI-906 对鼻咽癌细胞 SUNE-1 放射增敏作用的研究[J]. 现代肿瘤医学, 2017, 25(2):167-171.
- [16] Er V, Biernacka K, Simpkin A J, et al. Post-diagnosis serum insulin-like growth factors in relation to dietary and lifestyle changes in the Prostate testing for cancer and Treatment (ProtecT) trial [J]. *Cancer Causes & Control*, 2017, 28(8):877-888.

(上接第 322 页)

参考文献

- [1] LHu YW, Kang CM, Zhao JJ, et al. ncRNA PLAC2 down-regulates RPL36 expression and blocks cell cycle progression in glioma through a mechanism involving STAT1 [J]. *J Cell Mol Med*, 2018, 22(1):497-510.
- [2] 赵舒杨, 雷艳杰, 马世杰, 等. 龙葵碱联合 KLF16 基因对胶质瘤细胞增殖、凋亡的影响及其机制研究[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2019, 11(4):303-309.
- [3] 邢树刚, 张丽红, 金明华, 等. 杨梅黄酮对小鼠脑胶质瘤 GL261 细胞增殖和凋亡的影响[J]. 吉林大学学报(医学版), 2018, 44(5):955-961+1116-1117.
- [4] 滕浩, 薛一雪, 王萍, 等. miR-194 对人脑胶质瘤 U87 细胞恶性生物学行为的影响 [J]. 中国医科大学学报, 2018, 47(8):673-677.
- [5] Guan F, Kang Z, Wang L, et al. Retinol dehydrogenase 10 promotes metastasis of glioma cells via the transforming growth factor- β /SMAD signaling pathway [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2019, 132(20):2430-2437.
- [6] Xue J, Zhong S, Sun BM, et al. Lnc-THOR silencing inhibits human glioma cell survival by activating MAGEA6-AMPK signaling [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(11):866.
- [7] Liu Y, Liu H, Zhang D. Identification of novel long non-coding RNA in diffuse intrinsic pontine gliomas by expression profile analysis [J]. *Oncol Lett*, 2018, 16(5):6401-6406.
- [8] 耿连婷, 郑克彬, 李春晖, 等. PTEN-Long 对人脑胶质瘤 U251 细胞增殖、侵袭及凋亡的影响 [J]. 实用医学杂志, 2019, 35(11):1757-1762.
- [9] 王军成, 邹有瑞, 吴桥, 等. 大鼠增殖抑制基因过表达对 C6 胶质瘤细胞侵袭的抑制作用及其机制探讨 [J]. 肿瘤, 2017, 37(2):126-134+162.
- [10] 赵伟, 唐辉, 邵川, 谯飞. 胰岛素样生长因子结合蛋白 2 促进神经胶质瘤干细胞的增殖与迁移侵袭 [J]. 中国组织工程研究, 2018, 22(29):4631-4636.
- [11] 王维, 张路阳, 张东勇, 等. 锌转运体 1 基因在脑胶质瘤组织中的表达及其对 U87 细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2018, 25(4):346-350.
- [12] Luo G, Luo W, Sun X, et al. MicroRNA-21 promotes migration and invasion of glioma cells via activation of Sox2 and β -catenin signaling [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 15(1):187-193.
- [13] 李传芬, 荆文, 向冬生, 等. MicroRNA-613 在人胶质瘤中的表达及其对增殖与转移的影响 [J]. 解剖学报, 2018, 49(5):579-583.
- [14] Huang Q, Chen H, Zuo B, et al. lncRNA NEF inhibits glioma by downregulating TGF- β 1 [J]. *Exp Ther Med*, 2019, 18(1):692-698.
- [15] 陶海云, 万里新. LncRNA-LINC00152 促进胶质瘤细胞侵袭及转移的机制探讨 [J]. 现代肿瘤医学, 2019, 27(9):1514-1518.
- [16] 郑杰灵, 袁亚维. 脑胶质瘤中长链非编码 RNA TCONS_00008552 促进放疗抵抗、侵袭转移的机制 [J]. 实用医学杂志, 2019, 35(11):1748-1752.
- [17] 王乐朋. 长链非编码 RNA DILC 在胶质瘤中的表达及功能初探 [D]. 河北: 河北医科大学, 2017.

miR-421 靶向 PDCD4 促进前列腺癌 DU145 细胞增殖的实验研究

李作为 郭航 邓超 燕东亮 田斌强*

[摘要] 目的 研究 MicroRNA-421(miR-421)促进前列腺癌 DU145 细胞增殖的作用及潜在的分子机制。方法 培养前列腺癌 DU145 细胞,分为对照组、miR-阴性对照(NC)组、miR-421 组、miR-421+pcDNA 组、miR-421+pcDNA-细胞程序性死亡基因 4(PDCD4),miR-NC 组转染 miR-NC、miR-421 组转染 miR-421、miR-421+pcDNA 组转染 miR-421 及 pcDNA 质粒、miR-421+pcDNA- PDCD4 组转染 miR-421 及 pcDNA-PDCD4 质粒,MTS 法测定细胞增殖活力,荧光定量 PCR 测定 PDCD4 的 mRNA 表达水平,western blot 测定 PDCD4 的蛋白表达水平,双荧光素酶报告基因实验验证 miR-421 与 PDCD4 的靶向结合。结果 与对照组及 miR-NC 组比较,miR-421 组的增殖活力增加,PDCD4 的表达水平及野生型 PDCD4 双荧光素酶报告基因的荧光活力均降低($P<0.05$);与 miR-421+pcDNA 组比较,miR-421+pcDNA-PDCD4 组的增殖活力降低,PDCD4 的表达水平增加($P<0.05$)。结论 miR-421 对前列腺癌 DU145 细胞的增殖具有促进作用,靶向抑制 PDCD4 是 miR-421 发挥这一作用的潜在分子机制。

[关键词] 前列腺癌; miR-421; 增殖; PDCD4; 靶基因

Experimental study of miR-421 promotes the proliferation of prostate cancer cell line DU145 by targeting PDCD4

LI Zuowei, GUO Hang, DENG Chao, YAN Dongliang, TIAN Binqiang*

(Department of Urology, Shanghai University of Medicine & Health Sciences affiliated Sixth People's Hospital east, Shanghai, China, 201306)

[ABSTRACT] Objective To investigate the effect of microRNA-421 (miR-421) on the proliferation of prostate cancer cell line DU145 and its potential molecular mechanism. Methods Prostate cancer DU145 cells were cultured and divided into control group, miR-negative control (NC) group, miR-421 group, miR-421+pcDNA group, miR-421+pcDNA-programmed cell death gene 4 (PDCD4) group. MiR-NC group was transfected with miR-NC, miR-421 group was transfected with miR-421, miR-421+pcDNA group was transfected with miR-421 and pcDNA plasmid, miR-421+pcDNA-PDCD4 group was transfected with miR-421 and pcDNA-PDCD4 plasmid, Cell proliferation activity was measured by MTS, PDCD4 mRNA expression was measured by FQ-PCR, PDCD4 protein expression was detected by Western blot, and the target binding of miR-421 and PDCD4 was verified by double luciferase reporter gene experiment. Results Compared with the control group and miR-NC group, the proliferation activity of the miR-421 group increased. The expression level of PDCD4 and the fluorescence activity of wild-type PDCD4 double luciferase reporter gene decreased ($P<0.05$). Compared with miR-421+pcDNA group, the proliferation activity of miR-421+pcDNA-PDCD4

基金项目:上海健康医学院种子基金(HMSF-16-21-016),上海健康医学院师资人才百人库和上海浦东新区发展基金(PKJ2014-Y07)

作者单位:上海健康医学院附属第六人民医院东院泌尿外科 201306

*通信作者:田斌强, E-mail: zong654947967654@163.com

group decreased, the expression level of PDCD4 increased ($P < 0.05$). Conclusion miR-421 can promote the proliferation of prostate cancer cell line DU145 by targeting the inhibition of PDCD4 expression.

[KEY WORDS] Prostate cancer; miR-421; Proliferation; PDCD4; Target gene

前列腺癌是常见的男性生殖系统恶性肿瘤,我国前列腺癌的发病率也呈逐年升高的趋势^[1-3]。前列腺癌的发病机制未完全阐明,临床上也缺乏前列腺癌的靶向治疗手段。微小RNA(microRNA, miR)是具有广泛生物学作用的非编码小分子RNA,在多种恶性肿瘤的发生发展中起抑癌或促癌作用。miR-421是一种具有促癌作用的miR,前列腺癌相关的临床研究表明,miR-421在前列腺癌患者血清及组织中的表达均明显增加^[4];乳腺癌和肺癌中miR-421相关的细胞实验表明,miR-421能够靶向抑癌基因细胞程序性死亡基因4(programmed cell death 4, PDCD4)并抑制乳腺癌细胞的增殖^[5-6];前列腺癌中PDCD4相关的细胞实验表明,过表达PDCD4能够显著抑制前列腺癌细胞的增殖^[7]。但miR-421对前列腺癌增殖的调控作用及机制尚未阐明。为此,本实验将以前列腺癌DU145细胞为对象,具体分析miR-421靶向PDCD4促进细胞增殖的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

前列腺癌DU145株购自美国ATCC;四唑化合物[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, MTS]细胞增殖试剂盒、双荧光素酶报告基因检测系统购自瑞士Promega公司;miR-421模拟物及阴性对照miR-NC、PDCD4过表达载体(pcDNA-PDCD4)及空白对照pcDNA、野生型及突变型PDCD4荧光素酶报告基因均由上海吉玛公司构建;总RNA提取试剂盒、cDNA第一链合成预混试剂盒、Talent荧光定量检测试剂盒购自北京天根公司;PDCD4抗体购自Abcam公司、 β -actin抗体购自Sigma公司,二抗购自武汉艾美捷公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

DU145细胞用含有10%胎牛血清、1%青霉素、1%链霉素的RPMI-1640培养基进行贴壁培养,培养条件为37℃、饱和湿度、5% CO₂,细胞铺满培养瓶底面90%后用0.25%胰蛋白酶进行消化传代,用

于后续分组处理。

1.2.2 细胞分组处理

消化后的DU145细胞稀释至 1×10^6 /mL,接种在6孔培养板中,细胞融合至50%~60%时进行分组,对照组用不含脂质体的RPMI-1640培养基处理,miR-NC组和miR-421组分别用脂质体转染miR-NC及miR-421,miR-421+pcDNA组用脂质体转染miR-421及pcDNA,miR-421+pcDNA-PDCD4组用脂质体转染miR-421及pcDNA-PDCD4,转染过程均按脂质体的说明书进行操作。

1.2.3 细胞增殖活力的检测

DU145细胞转染48 h后,0.25%胰蛋白酶消化收集细胞,调节细胞密度至 1×10^4 /mL,按照每孔200 μ L接种在96孔培养板中,继续培养24、48、72 h后,分别进行MTS实验,每孔加入MTS试剂盒的检测液20 μ L,继续培养4 h后,在酶标仪上检测490 nm波长处的吸光值。

1.2.4 细胞中PDCD4 mRNA表达的检测

DU145细胞转染48 h后,弃去培养基、保留细胞,根据总RNA提取试剂盒的说明书操作、提取细胞中RNA,然后以RNA为模板、根据cDNA第一链合成预混试剂盒的说明书操作、将RNA反转录为cDNA,最后按照Talent荧光定量检测试剂盒的说明书配置PCR反应体系、进行PCR反应,根据反应的循环曲线计算PDCD4的mRNA表达水平。

1.2.5 细胞中PDCD4蛋白表达的检测

DU145细胞转染48 h后,弃去培养基、保留细胞,加入RIPA裂解液,裂解细胞并提取蛋白,蛋白样本与上样缓冲液混合后加入十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶,电泳后电转移至NC膜,用5%脱脂牛奶在室温封闭NC膜1 h,加入1:1 000稀释的PDCD4抗体或1:5 000稀释的 β -actin抗体、4℃孵育过夜;第二天,洗膜3次后室温孵育1:1 000稀释的二抗1 h,最后在凝胶成像系统中显影得到蛋白条带,用ImageJ软件框选蛋白条带并得到条带的灰度值,计算PDCD4条带灰度值与 β -actin条带灰度值的比值、作为PDCD4的蛋白表达水平。

1.2.6 双荧光素酶报告基因实验

DU145 细胞转染 48 h 后, 0.25% 胰蛋白酶消化收集细胞, 调节细胞密度至 $1 \times 10^4 / \text{mL}$, 按照 $500 \mu\text{L}$ / 孔接种在 24 孔板内, 当细胞融合至 50%~60% 时, 将野生型及突变型 PDCD4 荧光素酶报告基因与 miR-NC 或 miR-421 共转染进入细胞, 48 h 后收集细胞并裂解, 裂解后的上清液中加入荧光素酶底物, 检测萤火虫荧光素的酶活性及海肾荧光素的酶活性, 计算比值作为双荧光素酶报告基因的荧光活力。

1.2.7 统计学方法

采用 SPSS 21.0 软件进行数据分析, 计数资料以 n 表示, 计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 组间比较采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-421 过表达促进 DU145 细胞增殖

与对照组及 miR-NC 组比较, miR-421 组 DU145 细胞在 24、48、72 h 时的增殖活力均显著增加, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 miR-421 过表达对 DU145 细胞增殖的影响 $(\bar{x} \pm s)$

组别	24 h	48 h	72 h
对照组	0.42±0.08	0.61±0.09	0.74±0.13
miR-NC 组	0.45±0.06	0.58±0.10	0.77±0.17
miR-421 组	0.69±0.11 ^{ab}	0.83±0.17 ^{ab}	1.08±0.24 ^{ab}
F 值	14.864	5.947	5.140
P 值	0.001	0.016	0.024

注: 与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与 miR-NC 组比较, ^b $P < 0.05$ 。

2.2 miR-421 过表达抑制 DU145 细胞中 PDCD4 的表达

与对照组及 miR-NC 组比较, miR-421 组 DU145 细胞中 PDCD4 的 mRNA 表达水平及蛋白表达水平均显著降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 1、表 2。

2.3 miR-421 靶向 PDCD4 基因 mRNA 3'UTR

Targetscan 网站生物信息学预测显示, PDCD4 基因 mRNA 3'UTR 中含有与 miR-421 互补的核苷酸序列, 见图 2; 双荧光素酶报告基因检测显示, 与对照组及 miR-NC 组比较, miR-421 组 DU145 细胞中野生型 PDCD4 荧光素酶报告基因的荧光活性显著降低 ($P < 0.05$), 突变型 PDCD4 荧光素酶报告基因的荧光活性无显著变化 ($P > 0.05$), 见表 3。

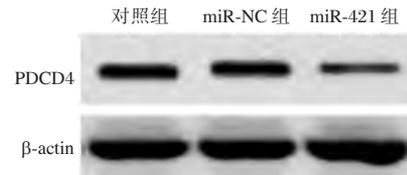


图 1 对照组、miR-NC 组、miR-421 组的 PDCD4 蛋白条带
Figure 1 Protein bands of PDCD in control group, miR-NC group, miR-421 group

表 2 miR-421 过表达对 DU145 细胞中 PDCD4 表达的影响 $(\bar{x} \pm s)$

组别	PDCD4 mRNA 表达	PDCD4 蛋白表达
对照组	0.82±0.19	0.65±0.12
miR-NC 组	0.87±0.22	0.70±0.14
miR-421 组	0.45±0.08	0.32±0.06
F 值	8.658	17.008
P 值	0.004	0.000

注: 与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与 miR-NC 组比较, ^b $P < 0.05$ 。

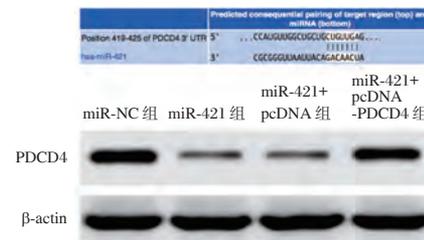


图 2 miR-421 靶向 PDCD4 基因 mRNA 3'UTR 的生物信息学预测
Figure 2 Bioinformatics prediction of miR-421 targeting 3' UTR of PDCD4 gene mRNA

表 3 miR-421 过表达对 DU145 细胞中 PDCD4 荧光素酶报告基因荧光活性的影响 $(\bar{x} \pm s)$

组别	野生型 PDCD4	突变型 PDCD4
对照组	1.08±0.25	1.04±0.27
miR-NC 组	1.11±0.28	0.99±0.19
miR-421 组	0.48±0.09 ^{ab}	1.09±0.22
F 值	12.715	0.238
P 值	0.001	0.792

注: 与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与 miR-NC 组比较, ^b $P < 0.05$ 。

2.4 PDCD4 过表达逆转 miR-421 过表达调控 DU145 细胞增殖的作用

与 miR-NC 组比较, miR-421 组 DU145 细胞中 PDCD4 的蛋白表达量显著降低, 24、48、72 h 时的

增殖活力均显著增加 ($P < 0.05$); 与 miR-421+pcDNA 组比较, miR-421+pcDNA-PDCD4 组 DU145 细胞中 PDCD4 的蛋白表达量显著增加, 24、48、72 h 时的增殖活力均显著降低 ($P < 0.05$)。表 4。

表 4 PDCD4 过表达对 miR-421 过表达调控 DU145 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Tabure 4 Effect of PDCD4 overexpression on miR-421 overexpression regulating proliferation of DU145 cell

组别	PDCD4 蛋白表达	增殖活力 (OD ₄₉₀)		
		24 h	48 h	72 h
miR-NC 组	0.72±0.18	0.45±0.06	0.58±0.10	0.77±0.17
miR-421 组	0.32±0.06 ^b	0.69±0.11 ^b	0.83±0.17 ^b	1.08±0.24 ^b
miR-421+ pcDNA 组	0.36±0.07	0.71±0.12	0.80±0.14	1.11±0.26
miR-421+pcDNA -PDCD4 组	0.71±0.20 ^c	0.40±0.08 ^c	0.54±0.09 ^c	0.72±0.15 ^c
F 值	11.658	14.078	6.634	4.689
P 值	0.000	0.000	0.004	0.016

注: 与 miR-NC 组比较, ^b $P < 0.05$; 与 miR-421+pcDNA 组比较, ^c $P < 0.05$ 。

3 讨论

近年来, miR 与恶性肿瘤发生发展的关系受到越来越多关注, miR 能够在转录后水平调节抑癌基因或原癌基因表达, 进而发挥促癌或抑癌作用。miR-421 是一种具有促癌作用的 miR, 在前列腺癌、肺癌、胃癌、食管癌等多种恶性肿瘤中均呈高表达的趋势^[4, 8-10], 另有多项细胞实验表明, miR-421 对乳腺癌、胃癌、骨肉瘤等恶性肿瘤细胞的增殖具有促进作用^[11-13], 以上研究提示 miR-421 对多种恶性肿瘤的发生发展起促进作用。

本实验分析了 miR-421 在前列腺癌细胞增殖中的调控作用及机制。在离体培养的前列腺癌 DU145 细胞中, 通过转染 miR-421 模拟物增加 miR-421 的表达后, DU145 细胞的增殖活力明显增强, 表明 miR-421 对前列腺癌 DU145 细胞的增殖具有促进作用, 这与前列腺癌组织中 miR-421 高表达的趋势吻合, 也与既往其他研究报道的 miR-421 促进癌细胞增殖的作用一致。

miR 本身不编码蛋白质, 其生物学作用通过调控靶基因的表达来实现, miR 与靶基因 mRNA 3' UTR 结合后能够促进 mRNA 降解、阻碍 mRNA 翻译。根据 Wang Y^[5] 和 Yang YN^[6] 的研究, 抑癌基因 *PDCD4* 受到 miR-421 的靶向调控。本实验在

TargetsCan 网站中进行了生物信息学预测, miR-421 能够靶向结合 *PDCD4* 基因 mRNA 3' UTR 的第 419-425 碱基; 在过表达 miR-421 后, DU145 细胞中 *PDCD4* 的 mRNA 表达水平及蛋白表达水平均明显降低, 表明 miR-421 能够抑制前列腺癌细胞中 *PDCD4* 的表达。进一步通过双荧光素酶报告基因实验验证 miR-421 对 *PDCD4* 的靶向结合可知, 过表达 miR-421 能够使野生型 *PDCD4* 双荧光素酶报告基因的荧光活力降低, 而将第 419-425 碱基突变后, 突变型 *PDCD4* 双荧光素酶报告基因的荧光活力不受 miR-421 的影响, 表明 miR-421 能够靶向结合 *PDCD4* 基因 mRNA 3' UTR 且结合位点与生物信息学预测一致, 即第 419-425 碱基。

PDCD4 是重要的抑癌基因, 相关研究表明, *PDCD4* 能够直接封闭 eIF4A 的解螺旋酶活性、抑制 eIF4A 与 eIF4G 的结合, 也能阻碍 PI3K/AKT 通路的激活, 进而使细胞的增殖受阻^[14-16]; 此外, *PDCD4* 还能增强 p21、p53 等抑癌基因的功能, 进而诱导细胞凋亡^[17]。国内张克克的细胞实验表明, 过表达 *PDCD4* 能够显著抑制前列腺癌细胞的增殖^[7]。结合本实验的结果, miR-421 能够靶向抑制 *PDCD4* 的表达, 提示靶向 *PDCD4* 可能是 miR-421 抑制前列腺癌细胞增殖的潜在分子机制。为了验证这一机制, 本实验构建了过表达 *PDCD4* 的载体, 在过表达 miR-421 的同时转染过表达 *PDCD4* 的载体, 增加 *PDCD4* 表达的同时也逆转了 miR-421 促进 DU145 细胞增殖的作用, 由此表明靶向 *PDCD4* 是 miR-421 促进前列腺癌 DU145 细胞增殖的可能分子机制。

综上所述, miR-421 对前列腺癌 DU145 细胞的增殖具有促进作用, 靶向抑制 *PDCD4* 是 miR-421 发挥这一作用的潜在分子机制, 本研究的结果为将来探究 miR-421 在前列腺癌靶向治疗中的作用提供了理论依据。

参考文献

- [1] 顾秀瑛, 郑荣寿, 张思维, 等. 2000-2014 年中国肿瘤登记地区前列腺癌发病趋势及年龄变化分析[J]. 中华预防医学杂志, 2018, 52(6): 586-592.
- [2] 齐金蕾, 王黎君, 周脉耕, 等. 1990-2013 年中国男性前列腺癌疾病负担分析[J]. 中华流行病学杂志, 2016, 37(6): 778-782.
- [3] 曾明坤, 刘玲, 张晓梅, 等. 代谢综合征对行根治术前列腺癌患者预后的影响[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2019, 11(2): 137.

(下转第 344 页)

血清 IL-1 β 、IL-10、IFN- γ 在乳腺肿瘤定性诊断中价值及与预后相关性研究

郭琪¹ 姚昶^{2*} 郭宇飞¹

[摘要] 目的 探讨血清白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-10(IL-10)、干扰素- γ (IFN- γ)在乳腺肿瘤定性诊断中价值及与预后相关性。方法 选取2016年9月至2018年11月本院92例乳腺癌患者为乳腺癌组,同期行手术切除治疗的92例乳腺良性肿瘤(乳腺纤维瘤)患者为良性组。对比2组与不同临床特征乳腺癌患者血清IL-1 β 、IL-10、IFN- γ 水平,绘制受试者工作特征(ROC)曲线分析血清各指标单一与联合检测对乳腺肿瘤良恶性的诊断价值,并比较不同预后(1年复发、未复发)乳腺癌患者血清各指标表达,Spearman相关性分析探讨血清各指标表达与乳腺癌预后复发的关联性。结果 乳腺癌组血清IL-1 β 、IL-10、IFN- γ 水平高于良性组($P<0.05$);血清IL-1 β 、IL-10、IFN- γ 诊断乳腺肿瘤良恶性均具有较高AUC,应用3者联合诊断乳腺肿瘤良恶性的敏感度为77.17%、特异度为84.78%;临床分期为Ⅲ~Ⅳ期、组织分化程度为中低分化、有淋巴结转移乳腺癌患者血清IL-1 β 、IL-10、IFN- γ 水平高于临床分期为Ⅰ~Ⅱ期、组织分化程度为高分化、无淋巴结转移患者($P<0.05$);1年复发患者血清IL-1 β 、IL-10、IFN- γ 水平高于未复发者,差异有统计学意义($P<0.05$);Spearman相关性分析显示,血清IL-1 β 、IL-10、IFN- γ 表达与乳腺癌预后复发呈显著正相关。结论 血清IL-1 β 、IL-10、IFN- γ 在乳腺肿瘤定性诊断中具有重要价值,与乳腺癌临床分期、组织分化程度、淋巴结转移密切相关,且可用于预后复发预测。

[关键词] IL-1 β ; IL-10; IFN- γ ; 乳腺肿瘤; 定性诊断; 预后

Serum IL-1 β , IL-10 and IFN- γ in the qualitative diagnosis of breast tumors and their correlation with prognosis

GUO Qi¹, YAO Chang^{2*}, GUO Yufei¹

[(1. Henan Hospital of traditional Chinese Medicine (The Second Affiliated Hospital of Henan University of traditional Chinese medicine), Zhengzhou, Henan, China, 450000; 2. Affiliated Hospital of Nanjing University of traditional Chinese medicine, Nanjing, Jiangsu, China, 210029)]

[ABSTRACT] Objective To investigate the value of serum interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-10 (IL-10) and interferon- γ (IFN- γ) in the qualitative diagnosis of breast tumors and their correlation with prognosis. Methods From September 2016 to November 2018, 92 breast cancer patients in our hospital were selected as the breast cancer group, 92 patients with benign breast tumors (breast fibroma) who underwent surgical resection during the same period were retrospectively studied in the benign group. The serum levels of IL-1 β , IL-10 and IFN- γ between two groups and breast cancer patients with different clinical characteristics were measured and compared, the receiver operating characteristic (ROC) curve was drawn to analyze the single and combined detection of serum indicators for the diagnosis of benign and malignant breast tumors, and compared the serum indicators of breast cancer patients with different prognosis (one year relapse, no

基金项目:江苏省中医院高峰学术人才培养(k2018yrc11)

作者单位:1. 河南省中医院(河南中医药大学第二附属医院),河南,郑州 450000

2. 南京中医药大学附属医院,江苏,南京 210029

*通信作者:姚昶, E-mail: yaochang33189@163.com

recurrence). Spearman correlation analysis was used to investigate the correlation between the expression of serum indicators and the prognosis of breast cancer. **Results** The serum levels of IL-1 β , IL-10 and IFN- γ in breast cancer group were higher than those in benign group ($P < 0.05$). Serum IL-1 β , IL-10, IFN- γ had high AUC in the diagnosis of benign and malignant breast tumors. The sensitivity of benign and malignant breast tumors diagnosed with the combination of the three was 77.17%, and the specificity was 84.78%. The levels of serum IL-1 β , IL-10, IFN- γ in the clinical stage III~IV, the degree of tissue differentiation at low to medium, and the patients with breast cancer with lymph node metastasis were higher than those in the clinical stage I~II, the degree of tissue differentiation at high level and no lymph node metastasis ($P < 0.05$). The levels of serum IL-1 β , IL-10 and IFN- γ in patients with relapse at one year were higher than those without relapse ($P < 0.05$). Spearman correlation analysis showed that the expression of serum IL-1 β , IL-10, IFN- γ was positively correlated with the prognosis and recurrence of breast cancer. **Conclusion** Serum IL-1 β , IL-10 and IFN- γ levels are of great value in the qualitative diagnosis of breast tumors, and are closely related to the clinical stage of breast cancer, the degree of tissue differentiation and lymph node metastasis, and can be used to predict prognosis and recurrence.

[KEY WORDS] IL-1 β ; IL-10; IFN- γ ; Breast tumor; Qualitative diagnosis; Prognosis

乳腺肿瘤按性质可分为良性、恶性肿瘤,良恶性肿瘤治疗方法与预后存在显著差异,早期判定病变性质对指导临床进行及时科学治疗、改善患者预后具有重要作用^[1]。乳腺恶性肿瘤(乳腺癌)于疾病早期常缺乏明显临床表现,易被临床医师忽略,应用影像学检查虽诊断准确度高,但不易发现早期病变^[2]。随近年来分子生物学研究不断深入,越来越多专家认为,乳腺癌发生、进展、转移、预后不但受环境、遗传因素影响,且与机体炎症反应具有密切关系^[3-4]。慢性炎症可通过多种途径对肿瘤细胞增殖及凋亡产生影响,参与肿瘤发生、进展,其中尤以白细胞介素类因子与肿瘤关系最为密切^[5-6]。同时,干扰素- γ (IFN- γ)为强力免疫调节因子,能抵抗入侵病原体,抑制肿瘤生长^[7]。但目前临床关于血清白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-10(IL-10)、IFN- γ 在乳腺肿瘤定性诊断、预后评价中的研究报道尚较少。本研究通过分组对照试验,对其进行探讨,旨在为临床诊疗工作提供一定支持。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2016年9月至2018年11月本院收治的92例乳腺癌患者为乳腺癌组,同期行手术切除治疗的92例乳腺良性肿瘤(乳腺纤维瘤)患者为良性组。2组年龄、体质量、合并症、吸烟、饮酒人数比例等一般资料均衡可比,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表1。本研究经医院伦理委员会批准。

表1 两组一般资料比较 [$n(\%)$, ($\bar{x} \pm s$)]

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

资料	乳腺癌组 ($n=92$)	良性组 ($n=92$)	t/χ^2 值	P 值
年龄(岁)	47.92 \pm 4.86	48.35 \pm 5.13	0.584	0.560
体质量(kg)	57.68 \pm 6.19	58.27 \pm 7.04	0.604	0.547
合并症				
高脂血症	10(10.87)	8(8.70)	0.246	0.620
高血压	25(27.17)	21(22.83)	0.464	0.496
糖尿病	14(15.22)	11(11.96)	0.417	0.519
饮酒	8(8.70)	6(6.52)	0.309	0.578
吸烟	5(5.43)	4(4.35)	0.000	1.000

1.2 选例标准

纳入标准:①乳腺癌组符合《中国抗癌协会乳腺癌诊治指南与规范》^[8]中乳腺癌有关诊断标准,且经病理检查确诊;②良性组经病理检查确诊为乳腺纤维瘤或腺病;③2组临床资料完整,知晓本研究,所有患者及家属均已签订知情同意书。排除标准:①血清检测前采取系统手术或药物治疗;②既往存在恶性肿瘤或乳腺良性疾病史;③肝、肾、心、肺等脏器产生严重器质性病变;④合并精神系统、血液系统及免疫系统疾病;⑤妊娠期、哺乳期女性;⑥合并严重感染。

1.3 方法

采集受检者2 mL(EDTA管)外周静脉血样,应用离心机以3 000 r/min转速离心10 min,取上层血清待检,应用青岛瑞斯凯尔生物科技有限公司生产的12项细胞因子试剂盒以多重微球流式免疫荧光

发光法测定血清 IL-1 β 、IL-10、IFN- γ 水平,测定3次取平均值,严格按仪器和试剂盒说明书操作。

1.4 观察指标

①2组血清 IL-1 β 、IL-10、IFN- γ 水平。②绘制受试者工作特征(ROC)曲线分析血清 IL-1 β 、IL-10、IFN- γ 单一检测对乳腺肿瘤良恶性的诊断价值。③ROC 曲线分析血清各指标联合检测对乳腺肿瘤良恶性的诊断价值。④乳腺癌组不同临床特征(肿瘤大小、临床分期、组织分化程度、有无淋巴结转移)患者血清各指标表达。⑤不同预后(1年复发、未复发)乳腺癌患者血清各指标表达。⑥Spearman 相关性分析探讨血清各指标表达与乳腺癌预后复发的关联性。

1.5 统计学处理

以 SPSS 22.0 分析研究数据,计量资料用($\bar{x} \pm s$)表示, t 检验;计数资料用 $n(\%)$ 表示, χ^2 检验;绘制 ROC 曲线分析血清各指标单一、联合检测对乳腺肿瘤良恶性的诊断价值;Spearman 相关性分析探讨血清各指标表达与乳腺癌预后复发关系; $P <$

0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2组血清 IL-1 β 、IL-10、IFN- γ 水平

乳腺癌组血清 IL-1 β 、IL-10、IFN- γ 水平高于良性组($P < 0.05$)。见表2。

表2 2组血清 IL-1 β 、IL-10、IFN- γ 水平对比($\bar{x} \pm s$, pg/mL)
Table 2 Comparison of serum IL-1 β , IL-10 and IFN- γ levels in 2 groups ($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

组别	n	IL-1 β	IL-10	IFN- γ
乳腺癌组	92	10.35 \pm 4.92	41.29 \pm 15.30	0.32 \pm 0.19
良性组	92	2.02 \pm 1.15	20.94 \pm 7.42	0.08 \pm 0.05
t 值		15.813	11.479	11.717
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

2.2 血清指标单一诊断乳腺肿瘤良恶性的 ROC 曲线

血清 IL-1 β 、IL-10、IFN- γ 诊断乳腺肿瘤良恶性的 AUC 均较高,尤以血清 IL-1 β 最高。见表3。

表3 血清指标单一诊断乳腺肿瘤良恶性的 ROC 曲线

Table 3 ROC curve of single serum index in the diagnosis of breast cancer

指标	AUC	95%CI	P 值	截断值	截断值敏感度(%)	截断值特异度(%)
IL-1 β (pg/mL)	0.808	0.744~0.862	<0.001	>7.23 pg/mL	56.52	95.65
IL-10(pg/mL)	0.707	0.635~0.771	<0.001	>29.44 pg/mL	70.65	63.04
IFN- γ (pg/mL)	0.746	0.677~0.807	<0.001	>0.29 pg/mL	64.13	81.52

注:以乳腺癌为阳性,乳腺良性肿瘤为阴性

2.3 血清指标联合诊断乳腺肿瘤良恶性的 ROC 曲线

为提高诊断效能,将血清 IL-1 β 、IL-10、IFN- γ 进行联合诊断,显示,应用血清各指标进行联合诊断的 AUC 为 0.879,95%CI 为 0.822~0.922,当血清 IL-1 β 截断值>7.23 pg/mL、血清 IL-10>29.44 pg/mL、血清 IFN- γ >0.29 pg/mL 时,应用3者联合诊断乳腺肿瘤良恶性的敏感度为 77.17%、特异度为 84.78%。见图1。

2.4 不同临床特征乳腺癌患者血清指标水平对比

不同肿瘤大小乳腺癌患者血清 IL-1 β 、IL-10、IFN- γ 水平相比,差异无统计学意义($P > 0.05$);临床分期为 III~IV 期、组织分化程度为中低分化、有淋巴结转移乳腺癌患者血清 IL-1 β 、IL-10、IFN- γ 水平高于临床分期为 I~II 期、组织分化程度为高分化、无淋巴结转移患者,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见表4。

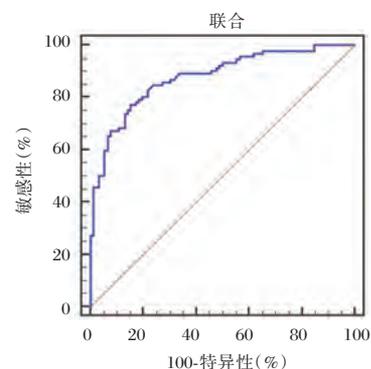


图1 联合诊断 ROC 曲线

Figure 1 Combined diagnosis ROC curve

2.5 不同预后乳腺癌患者血清各指标表达

1年复发患者血清 IL-1 β 、IL-10、IFN- γ 水平高于未复发者,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见表5。

表4 不同临床特征乳腺癌患者血清指标水平对比 ($\bar{x} \pm s$)Table 4 Comparison of serum indexes of breast cancer patients with different clinical characteristics ($\bar{x} \pm s$)

项目	<i>n</i>	IL-1 β (pg/mL)	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值	IL-10	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值	IFN- γ (pg/mL)	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值	
肿瘤大小	> 2 cm	52	11.02 \pm 5.19	1.511	0.134	43.42 \pm 16.23	1.476	0.144	0.34 \pm 0.21	1.252	0.214
	\leq 2 cm	40	9.48 \pm 4.36			38.52 \pm 15.19			0.29 \pm 0.16		
临床分期	III~IV期	61	13.54 \pm 5.85	8.548	<0.001	46.03 \pm 16.07	4.111	<0.001	0.41 \pm 0.23	6.372	<0.001
	I~II期	31	4.07 \pm 2.69			31.96 \pm 14.35			0.14 \pm 0.07		
组织分化程度	中低分化	63	13.28 \pm 6.02	7.899	<0.001	46.92 \pm 16.08	5.164	<0.001	0.38 \pm 0.20	4.784	<0.001
	高分化	29	3.98 \pm 2.87			29.06 \pm 13.82			0.19 \pm 0.11		
淋巴结转移	有	59	13.72 \pm 5.26	9.720	<0.001	48.86 \pm 17.24	6.000	<0.001	0.42 \pm 0.23	6.699	<0.001
	无	33	4.32 \pm 2.35			27.76 \pm 14.05			0.14 \pm 0.09		

表5 不同预后乳腺癌患者血清各指标表达对比 ($\bar{x} \pm s$, pg/mL)Table 5 Comparison of serum indexes in breast cancer patients with different prognosis ($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

组别	<i>n</i>	IL-1 β	IL-10	IFN- γ
1年复发患者	13	14.82 \pm 5.73	59.12 \pm 18.03	0.51 \pm 0.25
1年未复发患者	79	9.61 \pm 2.94	38.36 \pm 13.76	0.29 \pm 0.14
<i>t</i> 值		5.053	4.816	4.619
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001

2.6 血清各指标表达与乳腺癌预后复发的关联性

Spearman 相关性分析显示,血清 IL-1 β ($r=0.427$ 、 $P<0.001$)、IL-10 ($r=0.406$ 、 $P<0.001$)、IFN- γ ($r=0.392$ 、 $P<0.001$)表达与乳腺癌预后复发呈显著正相关。

3 讨论

乳腺癌为常见恶性肿瘤疾病,发病率约占全部妇科恶性肿瘤 23%,处于各大肿瘤首位,且病死率占女性恶性肿瘤的第二位,危害性大^[9-11]。近年来,临床研究指出,恶性肿瘤发病可能和细胞因子具有密切关系,机体遭受损伤后免疫系统会诱导生成炎症细胞,大量释放炎性因子、趋化因子等,产生肿瘤微环境,加速肿瘤血管生成、增殖、细胞浸润及转移等^[12-13]。IL-1 β 为白细胞介素家族中重要成员,主要是由巨噬细胞、单核细胞等分泌,生物活性主要依赖2级结构内 β 片层,在与细胞内外的IL-1 β 受体相结合后可传导受体信号,于肿瘤转移中扮演着重要角色^[14]。龚玉芳等^[15]学者报道,乳腺癌患者血清IL-1 β 水平显著高于乳腺良性增生患者及健康体检者,且表达与乳腺癌患者淋巴结转移密切相关,提示血清IL-1 β 可参与乳腺癌发生、进展。童文先等^[16]研究发现,经新辅助化疗治

疗后三阴性乳腺癌患者血清IL-1 β 表达显著降低,亦证实其表达与乳腺癌病情进展具有密切关系。

IL-10为一种于多种免疫细胞内广泛表达的细胞因子,于细胞生成、分化、炎症反应中起着重要作用。于丹军等^[18]研究发现,妇科恶性肿瘤患者血清IL-10显著高于健康体检者。新近研究证实,乳腺癌患者血清IL-10水平高于健康体检者^[19]。上述研究均提示IL-10于乳腺癌等妇科恶性肿瘤发生、发展中起着重要作用。本研究发现,乳腺癌血清IL-10表达与乳腺癌患者临床分期、组织分化程度、淋巴结转移有关。证实血清IL-1 β 在乳腺肿瘤定性诊断中具有重要价值。IL-10属负调控因子,可对自然杀伤细胞、单核细胞活性及T淋巴细胞增殖、分化产生抑制作用,其高表达可抑制抗肿瘤细胞因子分泌,阻止乳腺癌细胞衰亡,进而使肿瘤微环境重塑,加速肿瘤进展。

新近研究指出,IFN- γ 可导致ERK/Jak2-STAT信号通路激活,促使乳腺癌细胞过表达程序性死亡配体-1,促进上皮-间质转化,加速肿瘤进展^[20-21]。提示血清IL-1 β 、IL-10、IFN- γ 与乳腺癌患者预后复发有关,检测其表达对预后复发预测具有一定价值。

综上,血清IL-1 β 、IL-10、IFN- γ 在乳腺肿瘤定性诊断中具有重要价值,与乳腺癌临床分期、组织分化程度、淋巴结转移有关,且可用于预后复发预测。建议临床在乳腺肿瘤定性诊断及乳腺癌预后评价中可进行上述指标检测,为临床诊治提供有力依据。

参考文献

- [1] 范光荣,陈翠芬,黄奕巧,等.核磁共振ADC值对乳腺良恶性疾病的鉴别诊断价值[J].中华生物医学工程杂志,2017,23(1):51-54.
- [2] 郭智慧,胡清林,杨大学,等.乳腺疾病患者血清中肿瘤标志物、细胞因子及唾液酸水平的变化及临床意义[J].现代生物医学进展,2017,17(33):6549-6552,6509.

(下转第348页)

CD3⁺HLA-DR 细胞与 POI 患者免疫紊乱及卵巢功能的关系

郭蜜甜* 张继 王素梅

[摘要] **目的** 探究 CD3⁺HLA-DR 细胞与早发性卵巢功能不全(POI)患者免疫紊乱、卵巢功能的关系。**方法** 选取本院 2018 年 1 月至 2019 年 9 月 POI 患者 136 例作为观察组,另选取同期健康育龄女性 130 例作为对照组。检测对比两组外周血 CD3⁺HLA-DR 细胞比例、免疫球蛋白 A(IgA)、IgM、IgG、细胞免疫(CD3⁺、CD8⁺、CD4⁺)、血清抗苗勒氏管激素(AMH)、基础窦状卵泡数(AFC)、子宫内膜厚度,采用 Pearson 相关性分析外周血 CD3⁺HLA-DR 细胞与免疫指标、卵巢功能的关系。**结果** 观察组外周血 CD3⁺HLA-DR 细胞比例高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);观察组 CD4⁺、血清 IgA、IgM、IgG 水平低于对照组,CD3⁺、CD8⁺水平高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);外周血 CD3⁺HLA-DR 细胞与 CD4⁺、血清 IgA、IgM、IgG 呈负相关,与 CD3⁺、CD8⁺呈正相关($P<0.05$);观察组血清 AMH、AFC、子宫内膜厚度低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);外周血 CD3⁺HLA-DR 细胞与血清 AMH、AFC、子宫内膜厚度呈负相关($P<0.05$)。**结论** 外周血 CD3⁺HLA-DR 细胞在 POI 患者中呈异常升高表达,并与 POI 患者免疫紊乱、卵巢功能存在一定相关性,有望成为调控 POI 患者免疫应答、改善卵巢储备功能的重要 T 细胞亚群。

[关键词] CD3⁺HLA-DR 细胞;早发性卵巢功能不全;体液免疫;细胞免疫;卵巢功能;子宫内膜厚度

Relationship between CD3⁺ HLA-DR cells and immune disorders and ovarian function in patients with early-onset ovarian insufficiency

GUO Mitian, ZHANG Ji, WANG Sumei

(Department of obstetrics and gynecology, zhengzhou 7th people's hospital, Zhengzhou Henan, China, 450016)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the relationship between CD3⁺ HLA-DR cells and immune disorders and ovarian function in patients with early-onset ovarian insufficiency (POI). **Methods** From January 2018 to September 2019, 136 patients with POI in our hospital were selected as the observation group, and 130 healthy women of childbearing age during the same period were selected as the control group. The ratio of peripheral blood CD3⁺ HLA-DR cells, immunoglobulin A (IgA), IgM, IgG, cellular immunity (CD3⁺, CD8⁺, CD4⁺), serum anti-Mullerian hormone (AMH), basal sinus follicle number (AFC), endometrial thickness was compared between the two groups, Pearson correlation was used to analyze the relationship between peripheral blood CD3⁺ HLA-DR cells and immune indicators and ovarian function. **Results** The proportion of peripheral blood CD3⁺ HLA-DR cells in the observation group was higher than that in the control group, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). The levels of CD4⁺, serum IgA, IgM, and IgG in the observation group were lower than those in the control group, and the levels of CD3⁺ and CD8⁺ were higher than those in the control group ($P<0.05$). CD3⁺HLA-DR cells in peripheral blood were negatively correlated

基金项目:河南科技厅重点项目(20190607X)

作者单位:郑州市第七人民医院妇产科,河南,郑州 450016

*通信作者:郭蜜甜, E-mail:1397386483@qq.com

with CD4⁺, serum IgA, IgM, and IgG, and positively correlated with CD3⁺ and CD8⁺ ($P < 0.05$). The AMH, AFC, and endometrial thickness of the observation group were lower than those of the control group ($P < 0.05$). CD3⁺ HLA-DR cells in peripheral blood were negatively correlated with serum AMH, AFC, and endometrial thickness ($P < 0.05$). **Conclusion** Peripheral blood CD3⁺HLA-DR cells are abnormally elevated expression in patients with POI, and have a certain correlation with immune disorders and ovarian function in patients with POI. It is expected to become an important T cell subset that regulates the immune response of POI patients and improves ovarian reserve function.

[KEY WORDS] CD3⁺ HLA-DR cells; Early-onset ovarian insufficiency; Humoral immunity; Cellular immunity; Ovarian function; Endometrial thickness

早发性卵巢功能不全(Premature ovarian insufficiency, POI)多发生于女性40岁之前,发生率为1.0%~2.0%^[1],主要表现为血清促卵泡刺激素(follicle stimulating hormone, FSH)、雌二醇(Estradiol 2, E2)水平上升,雌激素水平下降,会引发卵巢功能衰竭,诱导闭经提前^[2]。目前临床尚未完全明确POI发病机制,相关研究发现,POI患者与自身免疫紊乱存在密切联系,最终会引发卵泡缺失,或诱发卵泡对FSH反应低下,降低卵巢功能^[3]。同时,相关研究还显示,POI患者外周血中存在细胞免疫、体液免疫改变现象^[4]。另外,有学者指出,人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA)主要表达于多种淋巴细胞上,在免疫反应中具有关键作用^[5]。然而关于CD3⁺HLA-DR细胞与POI患者细胞免疫、体液免疫、卵巢储备功能关联性研究鲜有报道。本研究旨在探讨CD3⁺HLA-DR细胞与POI患者免疫紊乱、卵巢功能的相关性。

1 资料和方法

1.1 一般资料

选取本院2018年1月至2019年9月POI患者136例作为观察组,另选取同期健康育龄女性130例作为对照组。本研究均经本院医学伦理委员会审批同意。

纳入标准:①观察组符合《2016 ESHRE指南:女性过早卵巢功能不全的管理》中POI诊断标准^[6],并经阴道超声检查确诊;年龄<40岁;月经稀发或停经时间 ≥ 4 个月;均伴有月经改变、生育力低减等临床症状;FSH水平 >40 U/L, E2水平 >183 pmol/L;②对照组月经正常,未合并其他妇科炎症;③两组临床资料均完整,且患者及家属均签署知情同意书。排除标准:①卵巢抵抗综合征、多囊卵巢综合征、卵巢不敏感综合征、功能性下丘脑

性闭经或完全性雄激素不敏感综合征者;②合并甲状腺功能亢进或减退者;③生殖道发育异常者;④妊娠或哺乳期女性;⑤卵巢手术或化疗所致卵巢衰竭者;⑥盆腔占位性病变或盆腔炎症者;⑦近4周内免疫抑制剂、激素或抗肿瘤药物服用史者;⑧精神行为异常者。

根据住院相关文献、病历资料等,设计临床研究表(CRF),主要调查年龄、初潮年龄、体质量指数、停经时间、产妇类型等内容。

1.2 方法

空腹取8mL静脉血:①离心分离外周血淋巴细胞,采用PE-conjugated Anti-HLA-DR、FITC-anti-CD3的同型单克隆抗体进行孵育,应用流式细胞仪检测CD3⁺HLA-DR抗原淋巴细胞的表达水平,仪器购自美国BD公司;②应用流式细胞仪检测CD3⁺、CD8⁺、CD4⁺水平;③离心12 min, 3 000 rpm,取血清,采用免疫比浊法检测免疫球蛋白A(immunoglobulin A, IgA)、IgM、IgG(上海瑞番生物科技有限公司);采用酶联免疫吸附试验检测血清抗苗勒氏管激素(Anti-mullerian hormone, AMH)(上海雅吉生物科技有限公司),上述均严格按照仪器、试剂盒说明书操作。

1.3 统计学方法

采用SPSS 22.0软件分析处理数据,计数资料用 $n(\%)$ 表示,行 χ^2 检验;计量资料采用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,两组间用 t 检验,采用Pearson进行相关性分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般资料

两组年龄、初潮年龄、体质量指数、停经时间、产妇类型比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表1。

表1 两组一般资料比较 ($\bar{x} \pm s$)

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

一般资料	观察组 (n=136)	对照组 (n=130)	t/ χ^2 值	P值
年龄(岁)	32.74±2.59	33.05±2.17	1.056	0.292
初潮年龄(岁)	13.48±0.22	13.50±0.20	0.775	0.439
体质量指数(kg/m ²)	22.89±1.64	23.11±1.49	1.144	0.254
停经时间(个月)	7.92±1.15	8.01±1.29	0.601	0.548
孕次(次)	1.98±0.40	2.00±0.39	0.413	0.680
产妇类型				
初产妇	79(58.09)	75(57.69)	0.004	0.948
经产妇	57(41.91)	55(42.31)		

2.2 两组外周血 CD3⁺HLA-DR 细胞

观察组外周血 CD3⁺HLA-DR 细胞比例(13.52±2.49)%, 对照组外周血 CD3⁺HLA-DR 细胞比例(8.77±1.63)%。两组比较, 观察组外周血 CD3⁺HLA-DR 细胞比例高于对照组, 差异有统计学意义($t=18.319, P<0.001$)。

2.3 两组免疫指标

观察组血清 IgA、IgM、IgG 水平低于对照组, CD3⁺、CD8⁺水平高于对照组、CD4⁺低于对照组, 差异有统计学意义($P<0.05$), 见表2。

表2 两组免疫指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of immune indexes between the 2 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	体液免疫指标(g/L)			细胞免疫指标(%)		
		IgA	IgM	IgG	CD3 ⁺	CD8 ⁺	CD4 ⁺
观察组	136	1.34±0.26	1.55±0.32	8.69±1.61	72.84±5.01	34.82±4.77	32.43±3.20
对照组	130	1.83±0.37	2.06±0.40	12.42±2.08	68.03±4.12	26.11±3.96	38.72±4.55
t值		12.541	11.508	16.397	8.531	16.165	13.088
P值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

2.4 外周血 CD3⁺HLA-DR 细胞与体液免疫、细胞免疫相关性

外周血 CD3⁺HLA-DR 细胞与 CD4⁺、血清 IgA、IgM、IgG 呈负相关, 与 CD3⁺、CD8⁺呈正相关, 差异有

统计学意义($P<0.05$), 见图1~2。

2.5 两组卵巢储备功能

观察组血清 AMH、AFC、子宫内膜厚度低于对照组, 差异有统计学意义($P<0.05$), 见表3。

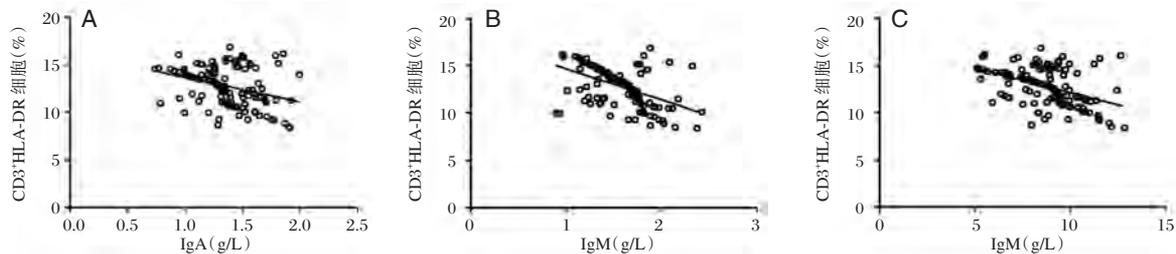


图1 外周血 CD3⁺HLA-DR 细胞与体液免疫相关性

Figure 1 correlation between peripheral blood CD3⁺HLA-DR cells and humoral immunity

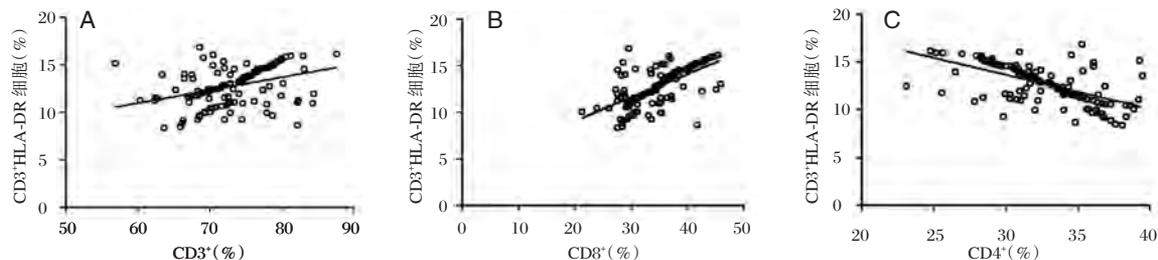


图2 外周血 CD3⁺HLA-DR 细胞与细胞免疫相关性

Figure 2 correlation between peripheral blood CD3⁺HLA-DR cells and cellular immunity

表3 两组卵巢储备功能比较 ($\bar{x} \pm s$)Table 3 Comparison of ovarian reserve function between the 2 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	血清 AMH (ng/mL)	AFC (个)	子宫内膜厚度 (mm)
观察组	136	1.15±0.04	1.28±0.64	3.82±0.63
对照组	130	5.27±1.80	5.65±2.19	6.47±1.56
<i>t</i> 值		26.688	22.298	18.311
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001

2.6 外周血 CD3⁺HLA-DR 细胞与卵巢储备功能关联性

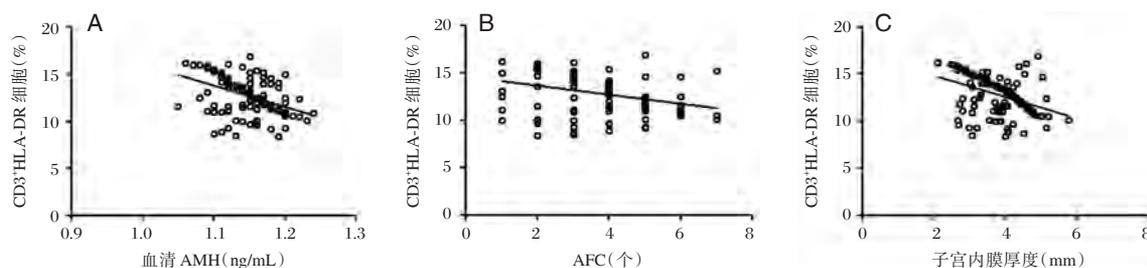
外周血 CD3⁺HLA-DR 细胞与血清 AMH、AFC、子宫内膜厚度呈负相关($P < 0.05$), 见图3。

3 讨论

相关文献报道, 组织中 HLA-DR 抗原表达异常, 会诱导抗原呈递细胞将自身抗原递呈至辅助 T 细胞, 从而启动、延续自身免疫反应^[7]。宗国霞等^[8]通过对比 63 例 POI 患者、40 例健康育龄女性, 结果表明, 外周血 CD3⁺HLA-DR 细胞水平在 POI 患者呈明显异常高表达, 与本研究观点一致, 提示外周血 CD3⁺HLA-DR 细胞水平可能参与 POI 发生、发展。HLA-DR 作为 MHC II 分子, 具有抗原呈递作用, 一定程度会激活自身免疫应答, 诱导 B 细胞形成自身抗体, 从而对卵泡产生攻击、破坏, 增加卵巢早衰发生率。同时, 本研究采用流式细胞仪检测还发现, POI 患者 CD4⁺、血清 IgA、IgM、IgG 水平明显低于健康育龄女性, CD3⁺、CD8⁺水平高于健康育龄女性, 与谢树红^[9]结果相似, 有力佐证了 POI 患者机体存在 T 细胞介导的免疫损伤表现。T 细胞亚群中辅助细胞、杀伤抑制细胞紊乱, 会分化制造 IgA 等免疫球蛋白, 攻击颗粒细胞等卵巢靶细胞, 引发卵泡过度闭锁, 诱导卵巢细胞凋亡, 增加排卵障碍发生危险性, 从而迅速降低卵泡数量, 提

高 POI 发生风险^[10-11]。经 Pearson 相关性进一步证明, 外周血 CD3⁺HLA-DR 细胞与 CD4⁺、血清 IgA、IgM、IgG 存在负相关关系, 与 CD3⁺、CD8⁺存在正相关关系, 充分说明 CD3⁺HLA-DR 细胞能有效反映 POI 患者机体细胞免疫紊乱状态, 原因考虑与 CD3⁺HLA-DR 细胞能激活 POI 患者机体辅助性 T 细胞, 识别自身抗原, 诱发自身免疫反应有关。

周灿权等^[12]认为, 卵泡过早衰竭的主要原因为卵巢内卵泡数目降低, 闭锁卵泡数目上升。AMH 在卵泡障碍性疾病发生中起着关键作用, 能阻碍原始卵泡初始募集, 减少原始卵泡耗损, 减轻生长卵泡对 FSH 刺激的反应性, 干扰卵泡选择。同时, 国外研究认为, AMH 水平下降及其在特定时期迅速减少是卵巢储备功能低下的重要标志^[13]。AFC 是卵巢储备功能的标志物, 李曼等^[14]观点表明, AFC 异常表达一定程度能反映卵泡成熟度。另外, 采用阴道超声检查子宫内膜厚度有助于监测卵泡发育程度, 为评估卵巢储备功能提供数据支持。本研究发现, POI 患者血清 AMH、AFC、子宫内膜厚度均低于健康育龄女性, 提示 POI 患者存在卵巢储备功能下降现象。T 细胞调节介导的自身免疫反应是 POI 的病理基础, 而 T 细胞活化可能会加快对卵巢颗粒细胞的免疫应答, 进而加重卵巢颗粒细胞损伤^[15], 减少血清 AMH、AFC, 降低子宫内膜厚度, 损伤卵巢储备功能。进一步研究外周血 CD3⁺HLA-DR 细胞与 POI 患者卵巢储备功能关联性显示, 外周血 CD3⁺HLA-DR 细胞与血清 AMH、AFC、子宫内膜厚度存在明显负相关关系, CD3⁺HLA-DR 细胞可能通过与浸润淋巴细胞相互作用, 促进黄体溶解, 调控 POI 患者 FSH、E2 等性激素水平, 影响卵巢存储功能, 可见外周血 CD3⁺HLA-DR 细胞有望成为调节 POI 患者卵巢储备功能的重要 T 细胞亚群。

图3 外周血 CD3⁺HLA-DR 细胞与卵巢储备功能关联性Figure 3 correlation between peripheral blood CD3⁺HLA-DR cells and ovarian reserve function

综上所述,外周血 CD3⁺HLA-DR 细胞在 POI 患者中呈异常升高表达,并与 POI 患者免疫紊乱、卵巢功能存在一定相关性,有望成为调控 POI 患者免疫应答、改善卵巢储备功能的重要 T 细胞亚群。

参考文献

- [1] Ma M, Chen X Y, Li B, et al. Melatonin protects premature ovarian insufficiency induced by tripterygium glycosides: Role of SIRT1[J]. *Am J Transl Res*, 2017, 9(4):1580-1602.
- [2] He W B, Tu C F, Liu Q, et al. DMC1 mutation that causes human non-obstructive azoospermia and premature ovarian insufficiency identified by whole-exome sequencing [J]. *J Med Genet*, 2018, 55(3):198-204.
- [3] Goh M, Nguyen H H, Khan N N, et al. Identifying and Addressing Osteoporosis Knowledge Gaps in Women with Premature Ovarian Insufficiency and Early Menopause: A mixed methods study[J]. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2019, 91(4):498-507.
- [4] 吴洁. 早发性卵巢功能不全诊断及遗传学进展[J]. *中国实用妇科与产科杂志*, 2018, 34(3):243-245.
- [5] 高静. 早发性卵巢功能不全患者自身抗体、T 淋巴细胞亚群及细胞因子的研究[D]. 山东大学, 2019.
- [6] European Society for Human Reproduction and Embryology (ESHRE) Guideline Group on POI, Webber L, Davies M, et al. ESHRE Guideline: management of women with premature ovarian insufficiency [J]. *Hum Reprod*, 2016, 31(5):926-937.
- [7] Chong C, Marino F, Pak H, et al. High-throughput and Sensitive Immunopeptidomics Platform Reveals Profound Interferon- γ -Mediated Remodeling of the Human Leukocyte Antigen (HLA) Ligandome[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2018, 17(3):533-548.
- [8] 宗国霞,王威,夏宇跃,等. 早发性卵巢功能不全患者外周血 CD3⁺HLA-DR 细胞水平与卵巢储备功能的相关性[J]. *实用医学杂志*, 2019, 35(13):2108-2111.
- [9] 谢树红. 影响早发性卵巢功能不全的免疫因素分析[J]. *东南国防医药*, 2017, 19(5):500-503.
- [10] 徐晖,沈妮. 大补阴丸加减联合克龄蒙对卵巢早衰患者卵巢储备功能和免疫功能的影响[J]. *中医学报*, 2016, 31(9):1365-1368.
- [11] 黄文玲. 补肾调肝活血方与戊酸雌二醇联合治疗卵巢早衰患者的疗效及对免疫功能、卵巢储备功能的影响[J]. *中国妇幼保健*, 2018, 33(24):5915-5919.
- [12] 周灿权,古芳. 重视卵巢储备功能减退与卵巢早衰对女性健康的影响[J]. *中国实用妇科与产科杂志*, 2015, 31(8):689-692.
- [13] Villarroel C, Salinas A, López P, et al. Anti-Müllerian hormone in type 2 and gestational diabetes during the second half of pregnancy: relationship with sexual steroid levels and metabolic parameters[J]. *Gynecol Endocrinol*, 2018, 34(2):120-124.
- [14] 李曼,温冬梅,王伟佳,等. AMH、FSH、LH、E2 联合检测在不孕症患者卵巢储备功能中的预测价值[J]. *检验医学与临床*, 2017, 14(12):1729-1731.
- [15] 王文静,刘金星. 补肾养精颗粒调节早发性卵巢功能不全模型大鼠卵泡颗粒细胞凋亡机制研究[J]. *山东中医药大学学报*, 2019, 43(1):87-91.

(上接第 335 页)

- [4] 黄晓娟,张力,徐凌凡,等. 前列腺癌患者血清和组织中 miR-421 的表达及临床意义[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2018, 34(6):610-614.
- [5] Wang Y, Liu Z, Shen J. MicroRNA-421-targeted PDCD4 regulates breast cancer cell proliferation [J]. *Int J Mol Med*, 2019, 43(1):267-275.
- [6] Yang YN, Bian LQ, Ling XD, et al. MicroRNA-421 promotes proliferation and invasion of non-small cell lung cancer cells through targeting PDCD4 [J]. *Pathol Res Pract*, 2019, 215(10):152555.
- [7] 张克克,张小芳,王福利,等. PDCD4 重组慢病毒载体的构建、包装及其对前列腺癌细胞增殖的影响[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2013, 29(6):609-612.
- [8] Li X, Chen SH, Zeng JW. MiR-421 Is Overexpressed and Promotes Cell Proliferation in Non-Small Cell Lung Cancer [J]. *Med Princ Pract*, 2020, 29(1):80-89.
- [9] Chen J, Wu L, Sun Y, et al. Mir-421 in plasma as a potential diagnostic biomarker for precancerous gastric lesions and early gastric cancer[J]. *Peer J*, 2019, 17(7):e7002.
- [10] Lin XF, Zhang CQ, Dong BR. MiR-421 expression independently predicts unfavorable overall survival in patients with esophageal adenocarcinoma [J]. *Eur Rev Med PharmacolSci*, 2019, 23(9):3790-3798.
- [11] Hu TB, Chen HS, Cao MQ, et al. MicroRNA-421 inhibits caspase-10 expression and promotes breast cancer progression [J]. *Neoplasma*, 2018, 65(1):49-54.
- [12] Yang P, Zhang M, Liu X, et al. MicroRNA-421 promotes the proliferation and metastasis of gastric cancer cells by targeting claudin-11 [J]. *Exp Ther Med*, 2017, 14(3):2625-2632.
- [13] Ren Z, He M, Shen T, et al. MiR-421 promotes the development of osteosarcoma by regulating MCP1 expression [J]. *Cancer Biol Ther*, 2020, 21(3):231-240.
- [14] Biyanee A, Singh P, Klemppner KH. Translation, Pdcd4 and eIF4A [J]. *Oncoscience*, 2015, 2(9):731-732.
- [15] Vikhrev PN, Kalinichenko SV, Korobko IV. Programmed cell death 4 mechanism of action: The model to be updated? [J]. *Cell Cycle*, 2017, 16(19):1761-1764.
- [16] Matsuhashi S, Manirujjaman M, Hamajima H, et al. Control Mechanisms of the Tumor Suppressor PDCD4: Expression and Functions [J]. *Int J MolSci*, 2019, 20(9):E2304.
- [17] Guo J, Ozaki I, Xia J, Kuwashiro T, et al. PDCD4 Knockdown Induces Senescence in Hepatoma Cells by Up-Regulating the p21 Expression [J]. *Front Oncol*, 2019, 9(8):661.

RA患者免疫功能失衡与疾病活动情况的关系研究

孟庆防*

[摘要] **目的** 探讨类风湿关节炎(RA)患者免疫功能失衡与患者疾病活动程度的关系。**方法** 选取我院风湿免疫科确诊的RA患者90例(RA组)、健康体检志愿者60例作为对照组;检测两组对象外周血中Th17细胞、调节性T细胞(Treg)、血清 γ 干扰素(IFN- γ)、白细胞介素-4(IL-4)、C反应蛋白(CRP)、血沉(ESR),并分析Th17细胞、Treg、IFN- γ 、IL-4与患者关节疼痛数目、类风湿关节炎病情评价(DAS28评分)的相关性。**结果** RA组患者的Th17细胞、血清IFN- γ 均高于对照组($P<0.05$),RA组患者的Treg细胞低于对照组($P<0.05$);RA组患者的血清CRP、ESR水平均高于对照组($P<0.05$);DAS28评分 >5.1 分RA患者的Th17细胞、血清IFN- γ 均高于 ≤ 5.1 分的患者($P<0.05$),DAS28评分 >5.1 分RA患者的Treg细胞低于 ≤ 5.1 分的患者($P<0.05$);RA患者的Th17细胞、血清IFN- γ 与DAS28评分、压痛关节数目呈显著正相关($P<0.05$),RA患者的Treg细胞与DAS28评分、压痛关节数目呈显著负相关($P<0.05$)。**结论** RA患者T细胞及免疫学因子失衡可能与患者疾病活动程度、病情严重程度有关。

[关键词] 类风湿关节炎;免疫功能;失衡;活动程度

Study on the relationship between immune function imbalance and disease activity in patients with rheumatoid arthritis

MENG Qingfang*

(Department of Rheumatology and immunology, Zhumadian Central Hospital, Henan, China, 463000)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the relationship between immune dysfunction and the degree of disease activity in patients with rheumatoid arthritis (RA). **Methods** 90 patients with RA (RA group) and 60 healthy volunteers were selected as the control group. The peripheral blood of the two groups was tested for Th17 cells, regulatory T cells (Treg) and serum interferon-gamma (IFN- γ), interleukin-4 (IL-4), C-reactive protein (CRP), erythrocyte sedimentation rate (ESR). The correlation between Th17 cells, Treg, IFN- γ , IL-4 and the number of joint pain in patients and the rheumatoid arthritis condition assessment (DAS28 score) was analyzed. **Results** The levels of Th17 cells and serum IFN- γ in the RA group were higher than those in the control group ($P<0.05$). The Treg cells in the RA group were lower than those in the control group ($P<0.05$). The serum CRP and ESR levels in the RA group were higher than those in the control group ($P<0.05$). Th17 cells and serum IFN- γ in RA patients with DAS28 score >5.1 points were higher than those in DAS28 ≤ 5.1 points ($P<0.05$). Treg cells in RA patients with DAS28 score > 5.1 points were lower than those in DAS28 ≤ 5.1 points ($P<0.05$). Th17 cells and serum IFN- γ in RA patients were significantly positively correlated with DAS28 score and number of tender joints ($P<0.05$). Treg cells in RA patients were significantly negatively correlated with DAS28 score and number of tender joints ($P<0.05$). **Conclusion** The imbalance of T cells and immunological factors in patients with RA may be related to the degree of disease activity and the severity of the disease.

[KEY WORDS] Rheumatoid arthritis; Immune function; Imbalance; Activity level

基金项目:河南省医学科技攻关计划项目(编号:201816216)

作者单位:驻马店市中心医院风湿免疫科,河南,驻马店 463000

*通信作者:孟庆防, E-mail: mengqfoo@163.com

类风湿关节炎(Rheumatoid arthritis, RA)是一组以炎性滑膜炎为临床表现的自身免疫性疾病,本病多发于双手、腕、膝以及足等关节处^[1]。RA患者症状以体重下降、易疲、关节畸形以及功能受限等为主,部分患者还将出现心脏、呼吸系统、神经系统以及肾脏受累等,严重影响患者生存质量^[2-3]。临床尚未就RA病机达成一致,但多数研究认为T细胞免疫应答失衡是本病的重要影响因素^[4-5]。最新研究表明^[6],T细胞因子异常表达与RA患者疾病进展时期相关,不同疾病阶段患者T细胞应答模式可能存在一定变化。为探究RA患者免疫功能失衡与患者疾病活动程度间的关系,本文选取90例RA患者进行如下研究。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2016年6月至2018年6月本院类风湿免疫科确诊的RA患者90例(RA组)、健康体检志愿者60例作为对照组。RA组,男26例、女64例,年龄46~79岁,平均(62.2±10.6)岁,病程(10.7±3.2)年,患者体质量指数(Body Mass Index, BMI)(23.4±2.1)kg/m²;关节压痛数目(18.4±7.1)个,DAS28(Disease Activity Score 28)评分>5.1分的有39例、DAS28评分≤5.1分的有51例。对照组,男18例、女42例,年龄41~79岁,平均(60.8±11.3)岁,患者(BMI 23.2±2.5)kg/m²。两组研究对象年龄、性别、BMI比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。

纳入标准:①RA患者的诊断标准参考2010年ACR(American College of Rheumatology)、EULAR(The European League Against Rheumatism)组织修订的诊断标准^[7],患者具有典型的关节肿胀、疼痛、畸形、晨僵等;②患者年龄范围19~79岁;③入组前3个月患者未接受任何相关药物治疗;④对照组为健康体检志愿者;⑤本研究符合《赫尔辛基伦理学宣言》^[8]中临床研究相关规定。排除标准:①骨肿瘤疾病、骨结核;②合并心肝肾疾病;③伴有精神及认知功能障碍;④伴有病毒感染、全身感染性疾病;⑤其他类型的免疫系统疾病;⑥近3个月具有糖皮质激素、免疫抑制剂应用史。

1.2 方法

收集两组患者外周静脉血各4 mL,选用盐城市凯特实验仪器有限公司生产的KS50R台式高速冷冻离心机进行4 500 r/min,10cm半径离心12

min,收集上清选用上海睿钰生物科技有限公司生产的Countstar Rigel智能荧光流式细胞仪检测两组患者Th17细胞、调节性T细胞(Regulatory cells, Treg)表达水平;选用魏氏法检测患者ESR(Erythrocyte sedimentation rate)水平;选用ELISA法检测IFN- γ (Interferon- γ)、IL-4(Interleukin-4)及CRP(C-reactive protein)表达水平,相关试剂盒由上海抚生实业有限公司提供,操作根据相应说明书进行。

记录RA组患者关节疼痛数目,并选用类风湿关节炎病情评价(DAS28评分)系统对患者进行评价。分析Th17细胞、Treg、IFN- γ 、IL-4与患者关节疼痛数目、类风湿关节炎病情评价(DAS28评分)的相关性。

1.4 统计学方法

采用SPSS 21.0软件进行数据分析,计量数据用($\bar{x} \pm s$)表示,两组间分析采用独立样本 t 检验相关性分析采用Pearson线性相关分析法;以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组的免疫相关指标比较

RA组患者的Th17细胞、血清IFN- γ 均高于对照组($P<0.05$),RA组患者的Treg细胞低于对照组($P<0.05$);(表1)。

表1 RA组和对照组的免疫相关指标比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of immune related indexes between RA group and control group ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	Th17细胞 (%)	Treg细胞 (%)	IFN- γ (pg/mL)	IL-4 (pg/mL)
RA组	90	1.68±0.54	2.17±0.67	24.28±6.33	141.7±17.4
对照组	60	0.61±0.27	3.21±0.82	7.52±2.11	144.0±22.0
<i>t</i> 值		14.200	-8.507	19.771	-0.713
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000	0.477

2.2 两组血清CRP、ESR水平比较

RA组患者的血清CRP、ESR水平均高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表2。

2.3 不同疾病活动程度的RA组患者免疫功能指标比较

DAS28评分>5.1分RA患者的Th17细胞、血清IFN- γ 均高于≤5.1分的患者($P<0.05$),DAS28评分>5.1分RA患者的Treg细胞低于≤5.1分的患者($P<0.05$)。见表3。

表2 两组的血清CRP、ESR水平比较 ($\bar{x} \pm s$)Table 2 Comparison of serum CRP and ESR levels between the two groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	CRP(mg/L)	ESR(mm/h)
RA组	90	21.51±8.40	43.88±7.19
对照组	60	3.77±1.04	16.50±3.12
t值		16.258	27.781
P值		0.000	0.000

表3 不同疾病活动程度的RA组患者免疫功能指标比较 [$n, (\bar{x} \pm s)$]Table 3 Comparison of immune function indexes of RA group with different disease activity [$n, (\bar{x} \pm s)$]

DAS28评分	n	Th17细胞 (%)	Treg细胞 (%)	IFN- γ (pg/mL)	IL-4 (pg/mL)
> 5.1分	39	2.11±0.51	1.81±0.62	27.54±6.10	145.0±16.2
≤5.1分	51	1.40±0.44	2.40±0.66	22.10±5.94	138.1±16.8
t值		7.079	-4.313	4.255	1.961
P值		0.000	0.000	0.000	0.053

2.4 RA组患者免疫功能指标与DAS28评分、压痛关节数目的相关性

RA患者的Th17细胞、血清IFN- γ 与DAS28评分、压痛关节数目呈显著正相关($P < 0.05$), RA患者的Treg细胞与DAS28评分、压痛关节数目呈显著负相关($P < 0.05$);见表4。

表4 RA组患者免疫功能指标与DAS28评分、压痛关节数目的相关性

Table 4 Correlation between immune function index and DAS28 score, number of tenderness joints in RA group

指标	Th17细胞		Treg细胞		IFN- γ		IL-4	
	r值	P值	r值	P值	r值	P值	r值	P值
DAS28评分	0.663	0.000	-0.591	0.000	0.724	0.000	0.116	0.295
关节压痛数	0.581	0.000	-0.402	0.000	0.577	0.000	-0.094	0.313

3 讨论

Th17细胞属于T细胞亚群家族,对机体防御及人自身免疫性疾病具有重要意义^[9]。Th17作为T细胞诱导的炎症反应的早期启动子,可通过促前炎因子释放来放大机体炎症反应^[10]。Th17还可向多种炎性细胞因子转化,并参与自身免疫性疾病的发生、发展;而Treg细胞则可抑制自身反应T细胞表达,并维持机体免疫平衡^[11]。本组研究结果提示Th17/Treg失衡是RA重要病理基础。Th17/Treg平

衡主要受IL-2、IL-17、TGF- β 等细胞因子及CC趋化因子受体4、维甲酸相关孤儿核受体 γ t等转录因子调控,这些细胞因子或许是RA靶向治疗的新方向。

DAS28评分是临床常用的RA病情评估体系,主要包含压痛关节数、肿胀关节数、红细胞沉降率以及近7d患者RA病情活动自评4个项目,并以此计算患者DAS28得分,得分越高提示患者RA病情越严重^[12]。进一步的研究发现,RA患者的Th17细胞与DAS28评分、压痛关节数目呈显著正相关,RA患者的Treg细胞与DAS28评分、压痛关节数目呈显著负相关,这佐证了前述结论。其原因可能为:①RA患者活动期及病情影响所致,活动期患者Th17高表达,Treg低表达,而非活动期患者Th17表达上升,同时Treg增高,甚至与健康人群相似^[13-14];②治疗因素,活动期RA患者服药药物种类及剂量可能增大,某些药物将加剧患者Th17/Treg失衡状况;③样本及检测误差影响。

IFN- γ 淋巴细胞来源的一种糖蛋白,可促巨噬细胞合成一氧化氮合酶,并引发氧化反应。IFN- γ 还具有抗病毒以及免疫调节功能^[15]。CRP则是人应急相蛋白的一种,可通过与细胞表面的Fc γ 受体相互作用来影响免疫细胞分泌,并以此联通人天然免疫系统及获得性免疫系统,最终介导机体炎症反应。ESR增大与急性细菌性炎症、风湿热、慢性肾炎等疾病密切相关。患者疾病严重程度及活动期与IFN- γ 表达水平密切相关,临床或可将IFN- γ 纳为RA疾病严重程度及活动期评估指标。

由于基础条件不足,本组研究取样数量有限,研究广泛适用性可能还存在一定不足,这有待我们下一步的大数据研究。

综上所述,RA患者T细胞及免疫学因子失衡可能与患者疾病活动程度、病情严重程度有关。Th17/Treg、IFN- γ 等指标或可RA患者活动程度及病情严重程度评估指标。

参考文献

- [1] 王群,陈红天,袁柳等.滑膜炎超声影像在评估早期类风湿性关节炎中的诊断价值[J].医学临床研究,2017,34(10):1911-1915.
- [2] 肖雪野.抗CCP抗体、补体及免疫球蛋白在类风湿性关节炎病理过程中的变化及临床意义[J].海南医学院学报,2017,23(4):514-517.
- [3] 张春兰,易甲其,郑晓芬,等.类风湿关节炎患者免疫球蛋白和血小板参数与病情活动的相关性[J].检验医学与临

- 床, 2018, 15(8):1207-1210.
- [4] Niu Y, Dong, Qiumei, Li, Rongheng. Matrine regulates Th1/Th2 cytokine responses in rheumatoid arthritis by attenuating the NF- κ B signaling [J]. *Cell Biology International*, 2017, 41(6):611-621.
- [5] 孙浩, 李丽, 樊卫民, 等. 类风湿性关节炎患者杀伤细胞免疫球蛋白样受体基因多态性分析[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2010, 2(1):17.
- [6] Ma A, Yang Y, Wang Q, et al. Anti-inflammatory effects of oxymatrine on rheumatoid arthritis in rats via regulating the imbalance between Treg and Th17 cells [J]. *Molecular Medicine Reports*, 2017, 15(6):3615-3622.
- [7] Kay J, Upchurch, K. S. ACR/EULAR 2010 rheumatoid arthritis classification criteria [J]. *Rheumatology*, 2012, 51(suppl 6):vi5-vi9.
- [8] Aschcroft RE. The Declaration of Helsinki. In: Emanuel EJ, Grady C, Crouch RA et al, eds. *The Oxford Textbook of Clinical Research Ethics*. New York: Oxford University Press, 2007.
- [9] Wang, Xiuzhen, Yang, Chunshu, Xu, Feng, et al. Imbalance of circulating Tfr/Tfh ratio in patients with rheumatoid arthritis [J]. *Clinical and Experimental Medicine*, 2018, 19(3 Suppl):1-10.
- [10] 陈冬志, 王园园, 张雪娇, 等. CH2b 对 RA 模型小鼠的 Th1/Th2、Th17/Treg 免疫平衡紊乱的影响 [J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2017, 37(2):97-104.
- [11] 曹风华, 陈鹏, 王斌, 等. RA 患者外周血 TH17 细胞/调节性 T 细胞变化水平及疾病活动性的研究 [J]. *检验医学与临床*, 2017, 14(A02):166-168.
- [12] 华丽, 王利民, 樊佳, 等. 类风湿关节炎患者脂肪因子水平及其与 DAS28 的相关性 [J]. *中华全科医学*, 2019, 17(2):230-233.
- [13] Ma A, Yang Y, Wang Q, et al. Anti-inflammatory effects of oxymatrine on rheumatoid arthritis in rats via regulating the imbalance between Treg and Th17 cells [J]. *Molecular Medicine Reports*, 2017, 15(6):3615-3622.
- [14] 马信文, 董泽民, 王勇, 等. 血清 MK 和 Th17 调节性 T 细胞对类风湿关节炎患者病情发生发展的影响 [J]. *海南医学*, 2017, 28(13):2128-2130.
- [15] 郝金奇, 陈霞, 陆改玲, 等. He-Ne 激光结合丹参对类风湿性关节炎大鼠免疫指标的影响 [J]. *动物医学进展*, 2017, 38(12):54-58.

(上接第 339 页)

- [3] Zhao X, Qu J, Sun Y, et al. Prognostic significance of tumor-associated macrophages in breast cancer: a meta-analysis of the literature [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(18):30576-30586.
- [4] 王刚, 李霓, 冯小双, 等. 炎症因子与乳腺癌发病风险的前瞻性队列研究 [J]. *中华疾病控制杂志*, 2019, 23(5):517-521.
- [5] Men T, Yu C, Wang D, et al. The impact of interleukin-10 (IL-10) gene 4 polymorphisms on peripheral blood IL-10 variation and prostate cancer risk based on published studies [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(28):45994-46005.
- [6] Ridker P M, Macfadyen J G, Thuren T, et al. Effect of interleukin-1 β inhibition with canakinumab on incident lung cancer in patients with atherosclerosis: exploratory results from a randomised, double-blind, placebo-controlled trial [J]. *Lancet*, 2017, 390(10105):1833-1842.
- [7] 姚天琦, 王伏生, 路晓庆, 等. 干扰素- γ 在肿瘤免疫中的双重作用 [J]. *中国药物与临床*, 2018, 18(4):46-49.
- [8] 中国抗癌协会乳腺癌专业委员会. 中国抗癌协会乳腺癌诊治指南与规范(2015版) [J]. *中国癌症杂志*, 2015, 25(9):692-751.
- [9] 耿艺维. SIRT3 基因在乳腺癌中的表达及其对乳腺癌细胞增殖能力的影响 [D]. 郑州大学, 2017.
- [10] Andersen Z J, Stafoggia M, Weinmayr G, et al. Long-Term Exposure to Ambient Air Pollution and Incidence of Postmenopausal Breast Cancer in 15 European Cohorts within the ESCAPE Project [J]. *Environ Health Perspect*, 2017, 125(10):107005.
- [11] 李颖, 刘强. 乳腺癌的免疫治疗进展 [J]. *临床外科杂志*, 2019, 27(3):13-16.
- [12] Wu L, Deng Z, Peng Y, et al. Ascites-derived IL-6 and IL-10 synergistically expand CD14+HLA-DR-/low myeloid-derived suppressor cells in ovarian cancer patients [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(44):76843-76856.
- [13] 崔彬, 姜汉国. Th22 细胞及其分泌的细胞因子白细胞介素-22 在乳腺癌中的作用 [J]. *中国医师进修杂志*, 2019, 42(8):685-689.
- [14] Bouchard G, Theriault H, Bujold R, et al. Induction of interleukin-1 β by mouse mammary tumor irradiation promotes triple negative breast cancer cells invasion and metastasis development [J]. *Int J Radiat Biol*, 2017, 93(5):507-516.
- [15] 龚玉芳, 姜斌, 刘峰. 乳腺癌患者血清趋化因子配体 8、白细胞介素 1- β 、sCD200 的表达水平及临床意义 [J]. *中国妇幼保健*, 2019, 34(5):1147-1150.
- [16] 童文先, 何安兵, 刘爱华, 等. 不同新辅助化疗方案治疗三阴性乳腺癌的临床效果比较 [J]. *癌症进展*, 2018, 16(8):970-972, 983.
- [17] 邢汉飞, 闫辉, 纪秀猛, 等. 乳腺癌患者血清白细胞介素-1 β 、白细胞介素-8、基质蛋白酶-2/9 的表达及临床意义 [J]. *中国基层医药*, 2018, 25(6):756-759.
- [18] 于丹军, 樊静, 胡月, 等. 妇科肿瘤患者外周血中调节性 T 细胞和血清中 TGF- β 、IL-10 的变化及相关性研究 [J]. *河北医科大学学报*, 2016, 37(11):1307-1311, 1316.
- [19] 杨文国. 血清 CA15-3、CA125 联合 MMP-1 和 IL-10 检测在乳腺癌诊断和预后评估中的价值探讨 [J]. *标记免疫分析与临床*, 2018, 25(8):1107-1113.
- [20] 张雪莹. 苏州市女大学生乳房自检情况及影响因素分析 [J]. *华南预防医学*, 2018, 44(5):426-430.
- [21] 韦美德, 董家书, 周格琛, 邓开凤, 戴盛明. 乳腺癌患者血清 PPAR- γ 基因甲基化 qPCR 检测及临床意义 [J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2018, 10(4):241-245+267.

CysC、Hcy、MPV、NT-proBNP对STEMI术后再狭窄的影响

邹延新¹ 李妮妮^{1*} 张月华² 张修振¹

[摘要] **目的** 分析急性ST段抬高型心肌梗死患者经冠状动脉支架术(PCI)治疗后再狭窄的相关危险因素。**方法** 选取2015年2月至2019年2月在本院心内科进行支架植入手术,且在术后6~12个月内完成冠状动脉造影复查的137例患者。根据造影复查结果将其分为支架内再狭窄(ISR)组和非ISR组。其中ISR组34例,非ISR组103例。对两组患者的病史资料,心脏超声情况,血液生化指标,植入支架情况,术后服药情况,主要心脏不良事件等进行回顾性分析,使用多因素Logistic回归分析其与PCI术后ISR的相关性。**结果** 所有患者ISR发生率为24.8%。单因素分析发现,与非ISR组比较,ISR组在吸烟史、高血压、糖尿病病史、冠心病家族史、MPV、CysC、Hcy、NT-proBNP、LDL-C、ApoB、NLR、支架植入直径(≥ 3 mm)、存在残余狭窄、术后未规律双抗及他汀类药物方面差异具有显著性统计学意义;多因素Logistic回归分析显示,糖尿病($OR=2.205$, $95\%CI: 1.069\sim 4.531$, $P=0.031$)、MPV($OR=1.873$, $95\%CI: 1.141\sim 4.275$, $P=0.016$)、CysC($OR=1.356$, $95\%CI: 1.244\sim 2.803$, $P=0.028$)、Hcy($OR=1.824$, $95\%CI: 0.709\sim 4.706$, $P=0.012$)、NT-proBNP($OR=1.106$, $95\%CI: 1.003\sim 1.264$, $P=0.033$)、NLR($OR=1.765$, $95\%CI: 0.439\sim 1.275$, $P=0.038$)是ISR的危险因素。**结论** 糖尿病、MPV、CysC、Hcy、BNP、NLR是PCI术后ISR的危险因素。

[关键词] 急性ST段抬高型心肌梗死;术后再狭窄;危险因素

Effects of CysC, Hcy, MPV, NT-proBNP on restenosis after STEMI

ZOU Yanxin¹, LI Ni Ni^{1*}, ZHANG Yuehua², ZHANG Xiuzhen¹

(1. Department of Cardiology, Laigang Hospital, Shandong First Medical University, Jinan, Shandong, China, 271126; 2. Department of Cardiovascular Rehabilitation, Laigang Hospital, Shandong First Medical University, Jinan, Shandong, China, 271126)

[ABSTRACT] **Objective** To analyze the risk factors of restenosis after Percutaneous coronary intervention (PCI) with STEMI patients. **Methods** From February 2015 to February 2019, 137 patients who complete review of coronary angiography within 6-12 months after surgery were selected. These patients were divided into the in-stent restenosis (ISR) group and non-ISR group according to the result of coronary angiography. The ISR group are 34 patients, the non-ISR group are 103 patients. The patient's history data, blood biochemical index, echocardiographic index, stents, medication compliance, major adverse cardiac events of the two groups were analyzed by multivariate models for the ability to predict the occurrence of ISR. **Results** The incidence of ISR was 24.8%. Univariate analysis found that compared with non-ISR group, ISR group has statistically significant differences among a history of smoking, hypertension, diabetes, family history of coronary heart disease, MPV, CysC, Hcy, NT-proBNP, LDL-C, ApoB, NLR, stent implantation diameter (≥ 3 mm), the existence of residual stenosis, irregular double antibodies and statins after surgery. Multivariate logistic regression analysis showed that diabetes ($OR=2.205$, $95\%CI: 1.069\sim 4.531$, $P=0.031$), MPV ($OR=$

基金项目:2019年济南市卫生健康委员会科技计划项目(2019-2-67)

作者单位:1. 山东第一医科大学附属莱钢医院心血管内科, 山东, 济南 271126

2. 山东第一医科大学附属莱钢医院心康复医学科, 山东, 济南 271126

*通信作者:李妮妮, E-mail:linini198336@163.com

1.873, 95% CI: 1.141~4.275, $P=0.016$), CysC ($OR=1.356$, 95% CI: 1.244~2.803, $P=0.028$), Hcy ($OR=1.824$, 95% CI: 0.709~4.706, $P=0.012$), NT-proBNP ($OR=1.106$, 95% CI: 1.003~1.264, $P=0.033$), NLR ($OR=1.765$, 95% CI: 0.439~1.275, $P=0.038$) are risk factors for ISR. **Conclusions** Diabetes, MPV, CysC, Hcy, NT-proBNP, NLR are risk factors for ISR after PCI.

[KEY WORDS] Acute ST elevation myocardial infarction; Postoperative restenosis; Risk factors

急性ST段抬高型心肌梗死(ST-segment elevation myocardial infarction, STEMI)是冠状动脉供血的中断或骤然减少,使得心肌持续严重地急性缺血引起的疾病,病死率较高^[1]。临床一般给予经皮冠状动脉介入治疗(PCI)进行救治,但是PCI术后再狭窄(in-stent restenosis, ISR)的高发严重影响了PCI的长期疗效,所以探索影响PCI术后再狭窄的生物学指标对于临床预防和发现术后再狭窄具有重要意义。本研究通过对137例STEMI患者的临床数据分析,探讨ISR发生的可能相关危险因素,为STEMI患者术后再狭窄的预防和早期发现提供依据。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取2015年2月至2019年2月在本院心内科成功行支架植入术治疗,并于术后6~12个月配合完成冠状动脉造影随访的患者共137例。据造影结果将患者分为ISR组和非ISR组。其中ISR组34例,21例男性患者,13例女性,平均年龄(63.53 ± 11.81)岁;非ISR组103例,65例男性患者,38例女性患者,平均年龄(62.21 ± 11.06)岁。所有患者术前均已签署知情同意书。

STEMI的诊断标准^[2]:缺血性胸痛持续发作30 min以上,心电图至少有2个相邻胸导ST段抬高0.2 mV以上、肢体导联 ≥ 0.1 mV或者新出现的左束支传导阻滞,CK-MB是正常上限的2倍以上。

ISR诊断标准^[3]:支架内或支架近端或远端边缘5 mm以内直径狭窄程度 $\geq 50\%$ 。

排除标准:未明确诊断为STEMI的梗死患者;既往接受过冠状动脉介入治疗的患者;阿托伐他汀和瑞舒伐他汀过敏史的患者。

检测仪器:AU680自动生化分析仪,美国贝克曼库尔特公司;全数字彩色多普勒超声诊断仪,徐州市瑞华科技发展有限公司。

1.2 随访及分组

所有STEMI患者在PCI术成功后6~12个月

内通过电话、门诊或是再住院等方式进行随访。无特殊情况每15天1次随访,患者若未出现特殊症状,在12个月随访结点时进行冠脉造影复查;若患者中途出现特殊症状,则应及时就诊,记录患者的症状表现、心电图及严重心脏不良事件,必要时进行冠脉造影检查,根据所有患者冠状动脉造影的结果进行分组。

1.3 资料收集

①临床资料:性别、年龄、吸烟史、饮酒史、糖尿病、高血压、冠心病家族史;②血液生化指标:血红蛋白(Hb)、平均红细胞体积(MCV)、红细胞比容(HCT)、血清胱抑素C(CysC)、血小板平均容积(MPV)、同型半胱氨酸(Hcy)、血小板计数(PLT)、B型脑钠肽前体(NT-proBNP)、中性粒细胞/淋巴细胞比值(NLR)、总胆固醇(TC)、尿酸(URIC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、血浆总胆红素(TBIL)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、载脂蛋白A(ApoA)和ApoB等;③心脏超声指标:左房内径(LAD)、左室舒张末内径(LVEDD)、左室射血分数(LVEF);④支架植入:植入支架数量、支架直径、支架长度、支架串联情况;⑤术后服药:术后是否按时服用双抗、 β 受体阻滞剂、血管紧张素转换酶抑制剂(ACEI)或血管紧张素II受体拮抗剂(ARB)及他汀类药物;⑥心脏不良事件:心绞痛、心力衰竭、恶性心律失常。

1.4 统计学方法

采用SPSS 18.0进行统计分析,计量资料用均($\bar{x} \pm s$)表示,进行 t 检验,计数资料进行 χ^2 检验,采用二分类Logistic回归进行多因素分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般临床资料特征与ISR

与非ISR组患者比较,ISR组患者在年龄、性别、饮酒史等方面差异无统计学意义($P > 0.05$);在吸烟史、既往病史(如高血压、糖尿病等)、冠心病家族史等差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见表1。

表1 两组患者一般临床资料特征 [n(%)($\bar{x}\pm s$)]

Table 1 General clinical data characteristics between 2 groups [n(%)($\bar{x}\pm s$)]

相关因素	ISR组 (n=34)	非ISR组 (n=103)	P值
性别(男/女)	21/13	65/38	0.235
年龄(岁)	63.53±11.81	62.21±11.06	0.784
饮酒史	12(35.3)	36(35.0)	0.652
吸烟史	24(70.6)	57(55.3)	0.035
高血压	27(79.4)	63(61.2)	0.041
糖尿病	14(41.2)	23(22.3)	0.012
冠心病家族史	3(8.8)	4(3.9)	0.039

2.2 血液生化指标与ISR

与非ISR组患者比较,ISR组患者的CysC、MPV、NLR、Hcy、Nt-proBNP、LDL-C及ApoB水平明显增加,差异具有统计学意义($P<0.05$);其余指标两组之间差异无统计学意义($P>0.05$)。见表2。

表2 两组患者血液生化指标 [n, ($\bar{x}\pm s$)]

Table 2 Blood biochemical index between 2 groups [n, ($\bar{x}\pm s$)]

相关因素	ISR组 (n=34)	非ISR组 (n=103)	P值
Hb(g/L)	140.37±14.15	143.25±16.37	0.469
MCV(fL)	92.81±5.03	92.21±6.62	0.536
HCT(%)	41.59±4.36	43.28±5.62	0.416
MPV(fL)	9.26±1.38	8.09±1.21	0.017
PLT(G/L)	190.63±56.63	184.71±57.58	0.531
CysC(mg/L)	1.27±0.34	1.16±0.30	0.026
Hcy(μ mol/L)	20.38±9.68	17.85±10.05	0.018
Nt-proBNP ng/L	324.09±31.64	236.43±15.3	0.016
NLR	7.62±1.10	6.15±1.12	0.008
URIC(μ mol/L)	395.27±78.16	377.26±76.34	0.067
TBIL(μ mol/L)	12.65±3.22	11.73±2.14	0.085
TC(μ mol/L)	3.61±0.75	3.84±0.82	0.061
TG(μ mol/L)	2.13±0.59	1.93±1.15	0.236
LDL-C(μ mol/L)	2.74±1.16	2.08±0.57	0.039
HDL-C(μ mol/L)	1.19±0.13	1.14±0.21	0.792
ApoA(g/L)	1.35±0.18	1.25±0.14	0.153
ApoB(g/L)	0.98±0.21	0.74±0.23	0.012

2.3 心脏超声情况与ISR

两组患者心脏超声情况相比,LAD、LVEF、LVEDD差异无统计学意义($P>0.05$)。见表3。

2.4 支架情况与ISR

与非ISR组患者比较,ISR组患者在植入支架长度、支架数量、重叠支架三方面差异无统计学意

表3 两组患者心脏超声指标 [n, ($\bar{x}\pm s$)]

Table 3 Echocardiographic index between 2 groups [n, ($\bar{x}\pm s$)]

相关因素	ISR组(n=34)	非ISR组(n=103)	P值
LAD	37.92±3.73	38.26±3.17	0.273
LVEF	60.13±6.15	60.57±6.33	0.612
LVEDD	55.26±5.84	54.96±6.05	0.538

义($P>0.05$),在支架直径(≥ 3 mm)、术后残余狭窄的差异有显著性统计学意义($P<0.05$)。见表4。

表4 两组患者支架情况 [n, ($\bar{x}\pm s$)]

Table 4 Stent between 2 groups [n, ($\bar{x}\pm s$)]

相关因素	ISR组 (n=34)	非ISR组 (n=103)	P值
支架数量	1.76±0.74	1.85±0.86	0.085
支架直径(mm)	2.77±0.38	2.82±0.41	0.125
支架长度(mm)	27.18±7.21	28.15±7.17	0.088
支架直径 ≥ 3 mm	15(28.8)	110(72.4)	0.005
支架串联)	7(13.5)	16(10.1)	0.413
术后残余狭窄	5.9±1.3	3.7±0.8	0.034

2.5 术后服药情况与ISR

与非ISR组患者相比,ISR组患者在术后未规律服用双抗、未规律服用他汀类药物差异有显著性统计学意义($P<0.05$)。而术后是否规律服用ACEI或ARB及 β 受体阻滞剂方面差异无统计学意义($P>0.05$)。见表5。

表5 ISR和非ISR患者术后服药情况 [n(%)]

Table 5 Postoperative medication between 2 groups [n(%)]

相关因素	ISR组 (n=34)	非ISR组 (n=103)	P值
未规律双抗	6(17.6)	5(4.8)	0.007
未规律服用 β 受体阻滞剂	5(14.7)	9(8.7)	0.058
未规律服用ACEI或ARB	3(8.8)	7(6.8)	0.152
未规律服用他汀类药物	3(8.8)	4(3.9)	0.009

2.6 主要心脏不良事件与ISR

在随访期内,共有24例患者因严重心律失常复诊,包括ISR组6例,非ISR组18例,两组比较差异无统计学意义($P>0.05$),共有17例患者因再发心绞痛复诊,包括ISR组5例,非ISR组12例,两组比较差异无统计学意义($P>0.05$),共有12例患者因心力衰竭复诊,ISR4例,包括非ISR组8例,两组差异无统计学意义($P>0.05$);见表6。

表6 ISR和非ISR患者主要心脏不良事件[n(%)]

Table 6 Major adverse cardiovascular events between 2 groups [n(%)]

相关因素	ISR组(n=34)	非ISR组(n=103)	P值
严重心律失常	6(17.6)	18(17.8)	0.254
再发心绞痛	5(14.7)	12(11.6)	0.128
心力衰竭	4(11.8)	8(7.8)	0.063

2.7 ISR的多因素 Logistic 回归分析

单因素分析显示影响ISR的因素混杂错乱,故使用“进出”法进行Logistic回归分析。将高血压、吸烟史、糖尿病、冠心病家族史等因素放入模型,结果表明糖尿病与ISR的发生呈正相关($P < 0.05$)。将血液指标MPV, CysC, Hcy, NLR, NT-proBNP, LDL-C, ApoB放入模型,结果显示CysC, MPV, NT-proBNP, NLR, Hcy与ISR的发生呈正相关($P < 0.05$)。将植入支架直径(≥ 3 mm)、术后残余狭窄引入模型,证实植入支架直径 ≥ 3 mm与ISR成负相关($P < 0.05$)。见表7。

表7 多因素 Logistic 回归分析结果

Table 7 Results of multiple Logistic regression analysis

相关因素	OR值	95%CI	P值
糖尿病	2.205	1.069~4.531	0.031
MPV	1.873	1.141~4.275	0.016
CysC	1.356	1.244~2.803	0.028
Hcy	1.824	0.709~4.706	0.012
Nt-proBNP	1.106	1.003~1.264	0.033
NLR	1.765	0.439~1.275	0.038
植入支架直径 ≥ 3 mm	0.805	0.698~0.912	0.015

3 讨论

平滑肌细胞的增殖、迁移及表型变化可能是PCI术后ISR的因素之一,而糖尿病患者服用胰岛素可能会影响平滑肌细胞的增殖。研究显示糖尿病不仅参与冠心病的发生,也是ISR的一个重要预测指标^[4]。血清CysC的水平与冠脉粥样硬化病变的严重程度有一定的相关性,可作为预测冠心病不良事件的因素之一^[5]。本研究结果中,血清CysC升高是PCI术后发生ISR的风险因素,提示PCI术后监测CysC有利于ISR的风险评估。MPV是反映血小板活性的指标,而血小板活性异常是评价心肌缺血损害的重要指标^[6]。STEMI患者会大量消耗血液中的血小板,骨髓生成新的大体积、不成熟的

血小板释放进入血液,所以STEMI患者的MPV会显著增多^[7]。NLR是血清中性粒细胞与淋巴细胞计数的比值,研究表明NLR与冠脉狭窄严重程度呈正比,也预示AMI发生的可能性也越大^[8];本实验结果显示术后ISR组患者血清MPV、NLR水平显著高于非ISR组,提示血清MPV、NLR水平与STEMI患者PCI术后ISR具有相关性。

同型半胱氨酸(Hcy)是机体内蛋氨酸代谢过程中的一个中间产物。有研究报道血清Hcy高的患者的冠状动脉狭窄程度高于Hcy正常患者,说明Hcy的高浓度预示和心血管病的高风险^[9]。B型脑钠肽前体(NT-proBNP)是脑钠肽前体(proBNP)的裂解产物,NT-proBNP是早期心功能不全的敏感标志物,当心肌受到刺激后,proBNP裂解为NT-proBNP和BNP,使得NT-proBNP水平升高^[10]。在本次研究显示,在本研究中,ISR组患者血清Hcy、NT-proBNP水平显著高于非ISR组患者,提示血清Hcy、NT-proBNP水平与STEMI患者PCI术后ISR具有相关性。

在PCI介入治疗中,植入的支架长度与病灶长度的完全匹配可以降低ISR的发生率^[11];每1cm病灶处支架可使得狭窄处血管直径增加8%,但若支架长度大于病灶长度,则狭窄处血管直径只增加4.0%,所以支架长度越长反而会增加ISR发生的风险^[12]。另外,如若植入的支架直径太小,术中血管未得到充分的扩张,那么术后ISR的发生率将大大增加^[13]。本研究结果表明,植入支架长度、支架直径与术后ISR的发生密切相关,较大的支架直径(≥ 3 mm)是ISR发生的保护因素,而支架长度较大是ISR发生的危险因素。

综上所述,PCI术后ISR的发生是一个多因素参与发生的复杂病理过程,糖尿病、MPV、CysC、Hcy、NT-proBNP、NLR是PCI术后ISR的危险因素。

参考文献

- [1] Güntekin Ünal, Tosun Veysel, Kiliç Ali Yaşar, et al. ST segment elevation myocardial infarction (STEMI) patients are more likely to achieve lipid-lowering treatment goals: A retrospective analysis of patients presenting with first acute coronary syndromes[J]. Medicine, 2018, 97(39): e12225.
- [2] Rui Wang, Biqi Mei, Xinlong Liao, et al. Determination of risk factors affecting the in-hospital prognosis of patients with acute ST segment elevation myocardial infarction after percu-

(下转第357页)

· 论 著 ·

血清 β -HCG、P及阴道超声评估在未破裂宫外孕诊断中的应用

颜雪萍^{1*} 田圆² 吴青京¹

[摘要] 目的 探究血清 β -人绒毛膜促性腺激素(β -HCG)、孕酮(P)监测及阴道超声量化评估在未破裂宫外孕诊断及疗效预测中的应用。方法 选取2017年10月至2019年12月本院未破裂宫外孕女性62例设为研究组,选择正常妊娠女性62例为对照组。入院后两组均实施超声检查,抽取血液样本测定血清 β -HCG、P水平,并给予研究组对症治疗。比较研究组与对照组、研究组不同疗效患者超声参数[阻力指数(RI)、搏动指数(PI)]及血清 β -HCG、P水平,分析超声参数及血清 β -HCG、P与未破裂宫外孕的相关性。结果 研究组PI、RI高于对照组,血清 β -HCG、P水平低于对照组($P<0.05$);PI、RI、血清 β -HCG、P水平与未破裂宫外孕间存在显著关联性($P<0.05$);PI、RI、血清 β -HCG、P联合诊断未破裂宫外孕的曲线下面积(AUC)为0.893,优于各指标单独诊断,联合诊断的最佳敏感度为82.26%,特异度为79.03%;治疗有效患者PI、RI低于无效患者,血清 β -HCG、P水平高于无效患者($P<0.05$);PI、RI、血清 β -HCG、P中,PI预测未破裂宫外孕疗效的AUC最大,为0.809,最佳预测敏感度为70.00%、特异度为90.38%。结论 破裂宫外孕患者血清 β -HCG、P水平明显低于正常孕妇,超声检查包块血流参数异常增高,联合血清 β -HCG、P及阴道超声量化评估在未破裂宫外孕诊断及疗效评估方面具有较高价值,可为临床诊断未破裂宫外孕提供重要参考。

[关键词] 未破裂宫外孕; β -人绒毛膜促性腺激素; 孕酮; 阴道超声; 诊断; 疗效

Evaluation of serum β -HCG, progesterone and vaginal ultrasound in the diagnosis and treatment of unruptured ectopic pregnancy

YAN Xueping¹, TIAN Yuan², WU Qingjing¹

(1. Department of ultrasound, Hainan women and children medical center, Haikou, Hainan, China, 570206;
2. Department of Gynecology, Hainan women and children medical center, Haikou Hainan, China, 570206)

[ABSTRACT] Objective To explore the application of serum β -human chorionic gonadotropin (β -HCG), progesterone (P) monitoring and vaginal ultrasound quantitative evaluation in the diagnosis and treatment of unruptured ectopic pregnancy. Methods From October 2017 to December 2019, 62 women with unruptured ectopic pregnancy in our hospital were selected as the study group, and 62 normal pregnant women were selected as the control group. After admission, both groups underwent ultrasound examination, blood samples were taken to determine serum β -HCG and P levels, and symptomatic treatment was given to the study group. Compared the ultrasound parameters [resistance index (RI), pulsation index (PI)] and serum β -HCG, P levels of patients in the study group with the control group and patients with different curative effects in the study group, explored the relationship between ultrasound parameters and serum β -HCG, P and unruptured

基金项目:海口市重点科技计划项目(2017-1246)

作者单位:1. 海南省妇女儿童医学中心超声科,海南,海口 570206

2. 海南省妇女儿童医学中心妇科,海南,海口 570206

*通信作者:颜雪萍, E-mail: zhanglijieaigo@163.com

ectopic pregnancy, and their diagnostic efficacy in the diagnosis of unruptured ectopic pregnancy. **Results** The PI and RI in the study group were higher than those in the control group, and the levels of serum β -HCG and P were lower than those of the control group ($P < 0.05$). There were significant correlations between PI, RI, serum β -HCG, P levels and unruptured ectopic pregnancy ($P < 0.05$). The area under the curve (AUC) of PI, RI, serum β -HCG, and P in the diagnosis of unruptured ectopic pregnancy was 0.893, which was greater than the individual diagnosis of the indicators, the best sensitivity of the combined diagnosis was 82.26% and the specificity was 79.03%. The PI and RI of treatment-effective patients were lower than those of ineffective patients, and the serum β -HCG and P levels were higher than those of ineffective patients ($P < 0.05$). Among PI, RI, serum β -HCG, and P, PI had the largest AUC for predicting the efficacy of unruptured ectopic pregnancy, 0.809, with the best predictive sensitivity of 70.00% and specificity of 90.38%. **Conclusion** The serum β -HCG and P levels of patients with unruptured ectopic pregnancy are significantly lower than those of normal pregnant women, and the blood flow parameters of the ultrasound examination mass are abnormally increased. The combined quantitative evaluation of serum β -HCG, P and vaginal ultrasound has a high value in the diagnosis and evaluation of the efficacy of unruptured ectopic pregnancy, and can provide an important reference for the clinical diagnosis of unruptured ectopic pregnancy.

[KEY WORDS] Unruptured ectopic pregnancy; β -human chorionic gonadotropin; Progesterone; Vaginal ultrasound; Diagnosis; Efficacy

宫外孕为妇产科常见急腹症之一,指孕囊着床在子宫腔以外的部位,发生率占妇科疾病的0.5%~1.0%,占妊娠女性的1.4%^[1-2]。报道显示,尽早检出宫外孕,在未发生破裂前给予有效治疗,对防止不良事件发生、改善患者预后具有重要意义^[3]。目前,超声检查广泛应用于多种妇科疾病诊断和治疗中,作为一种无创检查方法,超声检查方便、快捷、可重复性高、经济,尤其是阴道超声可进行量化评估,在宫外孕诊断方面具有重要价值^[4-6]。近年来,妊娠特异性标志物 β -人绒毛膜促性腺激素(β -Human chorionic gonadotropin, β -HCG)与异位妊娠的关系越来越受临床关注,可应用于异位妊娠的早期诊断^[7]。此外,孕酮(Progesterone, P)是卵巢分泌的具有生物活性的主要孕激素,伴随妊娠全过程,与妊娠结局密切相关^[8]。基于此,本研究尝试选取我院未破裂宫外孕患者进行探究,以期明确超声参数、P、 β -HCG在疾病诊断中应用价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2017年10月至2019年12月来本院就诊的未破裂宫外孕女性62例设为研究组,另选择正常妊娠女性62例设为对照组。对比两组生育史、年龄、停经时间、体质量、孕次、家庭住址,均无显著差异($P > 0.05$)(表1)。本研究经本院伦理委员会审批通过。

表1 两组一般资料对比 [$n(\%)$, ($\bar{x} \pm s$)]

Table 1 General information comparison between 2 groups information [$n(\%)$, ($\bar{x} \pm s$)]

项目	研究组 ($n=62$)	对照组 ($n=62$)	t/χ^2 值	P值
生育史(例)			0.337	0.562
无	41(66.13)	44(70.97)		
有	21(33.87)	18(29.03)		
年龄(岁)	25.73 \pm 3.13	26.54 \pm 3.72	1.312	0.192
体质量(kg)	56.31 \pm 5.15	57.20 \pm 5.08	0.969	0.335
停经时间(d)	42.19 \pm 2.90	41.58 \pm 3.26	1.101	0.273
孕次(次)	1.84 \pm 0.41	1.90 \pm 0.44	0.785	0.434
家庭住址(例)			0.304	0.582
城市	39(62.90)	36(58.06)		
农村	23(37.10)	26(41.94)		

1.2 选例标准

纳入标准:①研究组均经超声检查拟诊为未破裂宫外孕,并经治疗后病理诊断确诊;②对照组均为健康志愿者;③已婚;④自然受孕;⑤自愿接受阴道超声及血清指标检查;⑥对本研究药物无禁忌;⑦心智正常,无沟通交流障碍;⑧研究对象及家属均知晓本研究,已签署知情同意书。

排除标准:①以往有停经或阴道不规则出血史者;②肝肾功能不全者;③严重心脑血管疾病者;④子宫肌瘤、多囊卵巢综合征、泌尿生殖系统感染等疾病患者;⑤有精神疾病史者;⑥血液系统疾病、传染性疾病患者。

1.3 方法

试剂和仪器:AE-180S型全自动发光免疫分析仪及配套试剂盒购自苏州长光华医生物医学工程有限公司,HDI 3500型彩色多普勒超声仪购自美国通用公司,米非司酮购自北京法莫斯达制药科技有限公司,国药准字H20143063,甲氨蝶呤购自江苏恒瑞医药股份有限公司,国药准字H32020854。

血清指标检测方法:受检者入组第2 d清晨,采集空腹静脉血3 mL,离心处理(转速3 500 rpm,离心5 min)后取血清,置于-70℃冷冻保存待检,采用化学发光免疫分析法检测血清 β -hCG、P水平。

阴道超声检查方法:受检者入组当天,采用彩色多普勒超声仪常规进行阴道超声检查,选取多点测量阻力指数(Resistance index, RI)、搏动指数(Pulse index, PI),测量3次计算平均值。

研究组对症治疗方法:口服米非司酮25 mg/次,2次/d,肌肉注射甲氨蝶呤1 mg/次,1次/d,连续治疗1周后评估疗效,评估标准^[9]。

1.4 观察指标

两组超声参数RI、PI及血清 β -hCG、P水平。

1.6 统计学方法

采用SPSS 22.0软件进行数据分析,计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,t检验,RI、PI及血清 β -hCG、P与未破裂宫外孕关联性纳入Logistic回归分析模型分析,采用受试者工作(Receiver operating characteristic, ROC)曲线分析诊断及预测价值, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组超声参数及血清指标比较

研究组PI、RI较对照组高,血清 β -HCG、P水平较对照组低($P < 0.05$)。见表1。

表2 两组超声参数及血清指标比较 [$n, (\bar{x} \pm s)$]

Table 2 Comparison of ultrasound parameters and serum indicators between the two groups [$n, (\bar{x} \pm s)$]

组别	<i>n</i>	PI	RI	β -HCG (mIU/mL)	P (ng/mL)
研究组	62	0.88±0.33	0.52±0.14	50.61±15.15	17.85±3.19
对照组	62	0.69±0.27	0.40±0.09	90.22±21.39	28.89±6.37
<i>t</i> 值		3.509	5.677	11.899	12.202
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

2.2 超声参数及血清指标与未破裂宫外孕关联性以未破裂宫外孕作因变量,将PI、RI、 β -HCG、

P作自变量,纳入Logistic回归分析模型,结果显示,PI、RI、血清 β -HCG、P水平与未破裂宫外孕具有显著关联性($P < 0.05$)。见表2。

表3 超声参数、血清指标与未破裂宫外孕关联性
Table 3 Correlation between ultrasound parameters, serum indicators and unruptured ectopic pregnancy

变量	β 值	S.E.值	Wald/ χ^2 值	<i>P</i> 值	OR值	95%CI
PI	1.013	0.339	8.929	<0.001	2.593	1.513~4.896
RI	1.297	0.439	8.729	<0.001	3.606	2.577~5.654
β -HCG	1.511	0.504	8.988	<0.001	4.453	3.410~6.339
<i>P</i>	1.312	0.396	10.977	<0.001	3.811	2.628~5.911

2.3 超声参数及血清指标诊断未破裂宫外孕的诊断效能

经ROC曲线分析显示,各指标联合诊断未破裂宫外孕的曲线下面积(Area under the curve, AUC)为0.893,当PI>0.59、RI>0.46、血清 β -HCG \leq 69.87 mIU/mL、血清P \leq 25.41 ng/mL,这些指标联合诊断敏感度最佳,见图1。

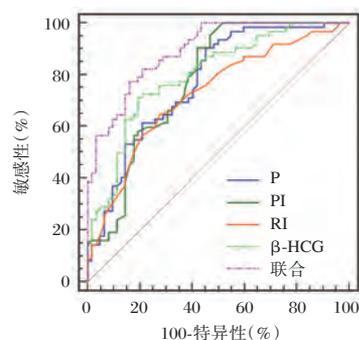


图1 各指标单独以及联合诊断未破裂宫外孕的ROC
Figure 1 ROC for individual and combined diagnosis of unruptured ectopic pregnancy

2.4 不同疗效患者治疗前超声参数及血清指标水平治疗有效患者PI、RI较无效患者低,血清 β -HCG、P水平较无效患者高($P < 0.05$)。见表3。

表4 不同疗效患者超声参数及血清指标水平 [$n, (\bar{x} \pm s)$]
Table 4 Ultrasound parameters and serum index levels of patients with different curative effects [$n, (\bar{x} \pm s)$]

组别	<i>n</i>	PI	RI	β -HCG (mIU/mL)	P (ng/mL)
无效患者	10	1.11±0.31	0.68±0.13	22.02±16.40	8.41±3.38
有效患者	52	0.33±0.29	0.49±0.11	56.11±19.28	19.67±6.26
<i>t</i> 值		7.707	4.860	5.230	6.492
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

2.5 超声参数及血清指标对未破裂宫外孕疗效预测价值

绘制PI、RI、血清 β -HCG、P对未破裂宫外孕疗效预测价值的ROC曲线,其中PI预测的AUC为0.809(95%CI为0.689~0.897),大于RI(AUC为0.794)、血清 β -HCG(AUC为0.773)、血清P(AUC为0.779)。当PI截断值 >0.92 时,其预测未破裂宫外孕疗效的敏感度为70.00%、特异度为90.38%。见图3。

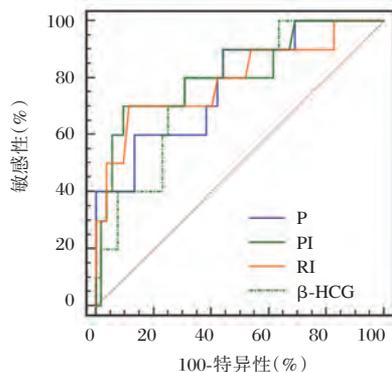


图2 各指标预测未破裂宫外孕疗效的ROC

Figure 2 ROC of various indicators predicting the efficacy of unruptured ectopic pregnancy

3 讨论

超声检查在宫外孕的诊断中有着重要的价值,其中阴道超声探头频率高,可置于阴道后穹隆部近距离对靶器官进行检查,有效避免腹壁、膀胱对检查带来的影响,能清晰显示子宫及附件情况,可对包块形态、性质等进行准确判断^[10-11]。由于宫外孕着床条件较差,妊娠囊血供不足,通过阴道超声可检测到宫外孕包块周围滋养层血流信号不够饱满,主要为点状或线状血流信号,血流频谱表现以高阻力型为主^[12]。本研究结果中,未破裂宫外孕女性阴道超声参数PI、RI值显著高于正常妊娠女性,与张秀珍等^[13]的研究结果相符。充分表明未破裂宫外孕女性包块周围滋养层血流阻力较大、血流情况差。

近年来,临床大量研究发现,超声联合妊娠特异性标志物对提高宫外孕诊断具有良好效果,其中 β -HCG水平检测是临床诊断宫外孕的常用标志物^[14-15]。 β -HCG是妊娠早期检测最重要指标之一,一般于受精7d左右由合体滋养叶细胞合成、

分泌,其水平随妊娠时间增加而升高^[16]。Tien SH^[17]研究发现,宫外孕患者受精卵未能正常着床,滋养叶细胞发育异常, β -HCG的合成、分泌障碍,表现为血清 β -HCG水平降低。此外,P是卵巢内黄体产生、卵巢分泌的具有生物活性的主要孕激素,在妊娠期P主要来源于胎盘,主要作用于子宫内膜和子宫肌层,是受精卵着床的必要条件^[18]。包震等^[19]对90例疑似早期输卵管妊娠患者的一项研究发现,早期输卵管妊娠患者血清P水平显著低于宫内妊娠孕妇。与本研究结果一致,P是反映妊娠期滋养细胞功能的主要指标,宫外孕引起的滋养层发育不良,滋养细胞活力急剧下降,卵泡周围供血不足,使黄体发育不良,从而引起P水平明显低于正常孕妇。充分表明血清P可作为诊断未破裂宫外孕的敏感性指标。基于上述结论,本研究将PI、RI、血清 β -HCG、P联合应用于未破裂宫外孕的诊断,诊断效能得到有效提高,有助于未破裂宫外孕的早期检出,具有较高的临床应用价值。

有文献指出,宫外孕包块内部血流范围对提示宫外孕保守治疗的成败有重要价值。本研究发现PI、RI、血清 β -HCG、P中可能是预测患者疗效的指标。进一步经ROC曲线分析发现,PI、RI、血清 β -HCG、P在预测未破裂宫外孕疗效方面均具有一定价值,可指导临床制定治疗方案,为改善未破裂宫外孕预后提供重要参考。

综上所述,阴道超声联合血清 β -HCG、P能有效提高未破裂宫外孕患者早期诊断效能,且在患者疗效预测方面具有重要作用,有助于指导临床选择合理有效的治疗方案,改善患者预后,具有重要临床应用价值。

参考文献

- [1] Hoyos LR, Malik M, Najjar M, et al. Morbid obesity and outcome of ectopic pregnancy following capped single-dose regimen methotrexate [J]. Arch Gynecol Obstet, 2017, 295(2): 375-381.
- [2] 奚嘉婧,梁政巧,柳玲. 经腹彩色多普勒超声与经阴道超声在异位妊娠诊断中的对比分析[J]. 首都食品与医药, 2018, 25(14): 85-86.
- [3] 张红花,李利. 甲氨喋呤联合中药治疗未破裂型异位妊娠疗效研究[J]. 中国实用医药, 2019, 14(22): 113-114.
- [4] 邹茗丹,何秀军,梁锦钊. 经阴道超声在早期异位妊娠诊断中的效果观察[J]. 深圳中西医结合杂志, 2018, 28(7): 71-72.

- [5] Nicula R, Diculescu D, Lencu CC, et al. Accuracy of transvaginal ultrasonography compared to endometrial biopsy for the etiological diagnosis of abnormal perimenopausal bleeding [J]. *Clujul Med*, 2017, 90(1): 33-39.
- [6] Hadinata IE, Doyle LW, Thompson D, et al. Serum β -hCG levels post-treatment of ectopic pregnancy with a single dose of intramuscular methotrexate [J]. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*, 2015, 55(2): 181-184.
- [7] 曹杰. 血清孕酮及绒毛膜促性腺激素的检测在早期先兆流产中的临床意义[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2013, 5(3): 185-188.
- [8] 陈国强, 朱圣娇, 桂瑞丰, 等. 血清 HCG、E₂、P、CA125 水平对早期异位妊娠与先兆流产诊断价值[J]. *中国计划生育学杂志*, 2019, 27(8): 1051-1054.
- [9] 周秀慧. 米非司酮联合甲氨蝶呤治疗异位妊娠的临床疗效和安全性评价[J]. *中国医药科学*, 2019, 9(3): 69-71.
- [10] 杨明荣, 席金平, 谢双. 经腹部多普勒超声和经阴道多普勒超声在早期异位妊娠诊断中的应用价值[J]. *中国妇幼保健*, 2018, 33(7): 1628-1630.
- [11] 智明春, 李炜, 李贞爱. 经阴道二维超声成像在宫腔黏连常规筛查中的价值及其与宫腔镜的比较[J]. *实用临床医药杂志*, 2017, 21(17): 165-167.
- [12] 韩培辰, 陈伟. 腹部超声联合阴道超声诊断妇科急腹症的临床应用研究[J]. *河北医科大学学报*, 2017, 38(1): 56-58.
- [13] 张秀珍, 袁领欢, 刘芳. 经阴道彩色多普勒超声对宫外孕破裂与卵巢黄体破裂的鉴别诊断价值[J]. *海南医学*, 2019, 30(4): 479-482.
- [14] 赵蒙. TVCDS 联合血清 β -HCG 水平检测在早期正常宫内妊娠与异位妊娠鉴别诊断中的应用价值[J]. *河南医学研究*, 2017, 26(20): 3713-3714.
- [15] 张雪梅, 王松涛, 刘玲, 等. 阴道超声下子宫内膜厚度联合 β 绒毛膜促性腺激素在早期鉴别诊断异位妊娠中的应用价值[J]. *中国医药*, 2016, 11(8): 1240-1243.
- [16] Irani M, Elias RT, Pereira N, et al. Abdominal ectopic pregnancy with undetectable serum β -human chorionic gonadotropin 9 days following blastocyst transfer [J]. *J Obstet Gynaecol Res*, 2016, 42(12): 1886-1888.
- [17] Tien SH, Yamamura Y. Cervical Ectopic Pregnancy: Persistence Despite a Serologically Negative β -hCG. A Case Report [J]. *J Reprod Med*, 2015, 60(5-6): 257-260.
- [18] 黄欢, 张庆华. 血清 β -人绒毛膜促性腺激素、孕酮、CA199 及子宫内膜厚度对早期异位妊娠的诊断价值分析[J]. *临床和实验医学杂志*, 2018, 17(14): 1553-1556.
- [19] 包霞, 程大伟, 张锦. 血清 β -HCG、孕酮测定结合阴道超声在早期输卵管妊娠诊断中的价值分析[J]. *中国现代药物应用*, 2016, 10(21): 47-48.

(上接第 352 页)

- taneous coronary intervention [J]. *BMC Cardiovascular Disorders*, 2017, 17(1): 243.
- [3] Pendyala L, Shinke T, Jabara R, et al. Drug-eluting stents: present and future [J]. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem*, 2008(2): 105-115.
- [4] Ries Wolfgang, Sherif Ahmed, Heigl Franz, et al. "First in Man": Case Report of Selective C-Reactive Protein Apheresis in a Patient with Acute ST Segment Elevation Myocardial Infarction [J]. *Case reports in cardiology*, 2018, 2018: 4767105.
- [5] 姚朝阳, 金凤. 氨氯地平阿托伐他汀钙片对冠心病患者 QT 离散度与冠脉病变程度的影响[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2018, 10(3): 189-195.
- [6] He Meijiao, Li Dan, Zhang Yingli, et al. Effects of different doses of ticagrelor on platelet aggregation and endothelial function in diabetic patients with stable coronary artery disease [J]. *Platelets*, 2019, 30(6): 1-10.
- [7] Jiang Ping, Song Ying, Xu Jing-Jing, et al. Two-year prognostic value of mean platelet volume in patients with diabetes and stable coronary artery disease undergoing elective percutaneous coronary intervention [J]. *Cardiology journal*, 2019, 26(2): 138-146.
- [8] 黄涛, 曾恋, 冉旋, 殷跃辉. 中性粒细胞淋巴细胞比值与急性冠脉综合征患者住院死亡风险的相关性分析[J]. *临床心血管病杂志*, 2019, 35(7): 600-603.
- [9] 牛杰, 黎敬锋, 王超, 等. Hcy 与 ACS 冠状动脉狭窄程度及其心血管事件的相关性[J]. *浙江临床医学*, 2017, 19(1): 79-80.
- [10] 朱燕阔, 张伟. 替格瑞洛对冠状动脉粥样硬化性心脏病支架术后患者脑钠肽、心率及心肌酶谱的影响[J]. *中华灾害救援医学*, 2020, 8(2): 103-104.
- [11] Tscharr Maximilian, Farhan Serdar, Bruno Veronika, et al. Impact of platelet turnover on long-term adverse cardiovascular outcomes in patients undergoing percutaneous coronary intervention [J]. *European journal of clinical investigation*, 2019, 49(9): e13157.
- [12] 朱颖之, 方五旺. 骨髓间充质干细胞治疗心肌梗死的研究进展[J]. *中国医药指南*, 2013, 11(3): 468-469.
- [13] Miura T, Miyashita Y, Soga Y, et al. Drug-Eluting Versus Bare-Metal Stent Implantation With or Without Cilostazol in the Treatment of the Superficial Femoral Artery [J]. *Circulation. Cardiovascular interventions*, 2018, 11(8): e006564.

狼疮性肾炎血清 MMP9、IFN- γ 与 HMGB1、TLR4 mRNA 的临床意义

鲁冰¹ 任东升^{1*} 陶雅非¹ 秉明²

[摘要] 目的 探讨狼疮性肾炎(LN)外周血中基质金属蛋白酶9(MMP9)、干扰素- γ (IFN- γ)、高迁移率族蛋白B1(HMGB1)、Toll样受体4(TLR4)的表达意义及与心脏损害相关性。方法 选取2017年8月至2019年7月本院收治的63例LN患者(LN组)及34例LN合并心脏损害患者(合并心脏损害组),比较两组不同2003年国际肾脏病学会和肾脏病理学会(ISN/RPS.2003)LN病理分型患者外周血中MMP9、IFN- γ 、HMGB1 mRNA、TLR4 mRNA的表达,采用Logistic多元回归方程行多因素分析,采用Pearson进行相关性分析,采用接收者操作特征(ROC)曲线及ROC下面积(AUC)分析各指标诊断LN合并心脏损害的价值。结果 合并心脏损害组MMP9、IFN- γ 、HMGB1 mRNA、TLR4 mRNA水平均较LN组高($P<0.05$);Ⅲ+Ⅳ型患者MMP9、IFN- γ 、HMGB1 mRNA、TLR4 mRNA水平均较Ⅰ+Ⅱ型高($P<0.05$);MMP9、IFN- γ 、HMGB1、TLR4是LN合并心脏损害发生的相关危险因素($P<0.05$);MMP9、IFN- γ 、HMGB1 mRNA、TLR4 mRNA与心脏损害呈正相关($P<0.05$);诊断LN合并心脏损害的AUC HMGB1 mRNA>TLR4 mRNA>IFN- γ >MMP9($P<0.05$)。结论 LN患者外周血中MMP9、IFN- γ 、HMGB1、TLR4高表达,与病理分型有关,并可作为心脏损害的参考指标。

[关键词] 狼疮性肾炎; MMP9; IFN- γ ; HMGB1 mRNA; TLR4 mRNA; 心脏损害

Clinical Significance of Serum MMP9, IFN- γ and HMGB1, TLR4 mRNA in Lupus Nephritis

LU Bing¹, REN Dongsheng^{1*}, TAO Yafei¹, LI Ming²

(1. Department of nephropathy rheumatology and immunology, Nanyang central hospital, Nanyang, Henan, China, 473000; 2. Department of nephrorheumatology and immunology, xinhua hospital affiliated to Shanghai jiao tong university school of medicine, Shanghai, China, 200092)

[ABSTRACT] Objective To investigate the significance of matrix metalloproteinase-9 (MMP9), interferon-gamma (IFN- γ), high mobility group protein B1 (HMGB1) and Toll-like receptor 4 (TLR4) in peripheral blood from lupus nephritis (LN) and the correlation between LN and heart damage. Methods A total of 63 LN patients (LN group) and 34 LN patients with heart damage (combined heart damage group) admitted to our hospital from August 2017 to July 2019 were enrolled for this study. According to the LN pathological classification criteria of the International Society of Nephrology and the Society of Kidney Pathology (ISN/RPS.2003) in 2003, the expressions of MMP9, IFN- γ , HMGB1 mRNA and TLR4 mRNA in the peripheral blood from the two groups of patients were compared. Logistic multiple regression equation was used for multi-factor analysis. Pearson analysis was used for correlation analysis. The receiver operating characteristic (ROC) curve and area under ROC (AUC) were used to analyze the value of LN combined with

基金项目:2018年度河南省科技攻关(182300410296)

作者单位:1.河南省南阳市中心医院肾病风湿免疫科,河南,南阳 473000

2.上海交通大学医学院附属新华医院肾脏风湿免疫科,上海 200092

*通信作者:任东升, E-mail:rends117@sina.com.cn

cardiac damage. **Results** The levels of MMP9, IFN- γ , HMGB1 mRNA and TLR4 mRNA in the group with heart injury were higher than those in the LN group ($P<0.05$). MMP9, IFN- γ , HMGB1, and TLR4 are related risk factors for LN combined with cardiac damage ($P<0.05$). MMP9, IFN- γ , HMGB1 mRNA and TLR4 mRNA were positively correlated with heart damage ($P<0.05$). AUC HMGB1 mRNA>TLR4 mRNA>IFN- γ >MMP9 ($P<0.05$) for diagnosis of LN combined with heart damage. **Conclusion** The high expression of MMP9, IFN- γ , HMGB1, and TLR4 in the peripheral blood of patients with LN is related to pathological typing and can be used as a reference index for heart damage.

[KEY WORDS] lupus nephritis; MMP9; IFN- γ ; HMGB1 mRNA; TLR4 mRNA; cardiac damage

狼疮性肾炎(Lupus nephritis, LN)是系统性红斑狼疮(Systemic lupus erythematosus, SLE)最为常见和严重的并发症,5%~20%患者十年内进展为终末期肾病,病死率较高^[1]。LN常累及心脏,根据相关报道,其发生率为52%~98%,可影响患者预后,且不易诊断^[2]。基质金属蛋白酶9(Matrix metalloproteinase 9, MMP9)定位于染色体20q11.1~13.1,根据申晓莉等^[3]研究,其在慢性心力衰竭患者中呈高表达,并能影响患者心功能。干扰素- γ (Interferon- γ , IFN- γ)是水溶性二聚体细胞因子,与自身免疫类疾病的发生有关^[4]。高迁移率族蛋白B1(High mobility group box 1 protein, HMGB1)具有调节基因转录、稳固细胞核结构的功能,近年来研究发现HMGB1亦是一种免疫反应相关因子^[5]。Toll样受体4(Toll-like receptor 4, TLR4)是参与非特异性免疫的一类重要分子,Chen X等^[6]研究指出,TLR通路在心力衰竭期间能通过自噬作用促进心肌细胞凋亡。本实验探讨LN外周血中MMP9、IFN- γ 、HMGB1、TLR4的表达意义及与心脏损害相关性,报告如下。

1 对象和方法

1.1 研究对象

选取2017年8月至2019年7月本院收治的63例LN患者(LN组)及34例LN合并心脏损害患者(合并心脏损害组),均符合LN诊断标准^[7],心脏损害标准根据左心室质量指数(Left ventricular mass index, LVMI)划分,即女性、男性分别>106、114 g/m²,排除入组前1个月内发生过急性心血管事件患者、先天性心脏病患者、合并恶性肿瘤者、存在感染类疾病者。

1.2 方法

采集肘部静脉血5 mL,分别采用上海康朗生

物科技有限公司、深圳市科润达生物工程有限公司酶联免疫吸附法试剂盒检测血清MMP9、IFN- γ 水平;采用荧光定量PCR检测HMGB1、TLR4水平,取适量外周血标本,加入Ficoll分离液,离心,取中间层悬浮细胞,磷酸盐缓冲液(Phosphate buffered saline, PBS)洗,离心,获得外周血单个核细胞,提取RNA,逆转录,配置反应体系,包括引物、4种dNTP、Taq DNA聚合酶、靶序列DNA和PCR反应缓冲液共20 μ L, HMGB1上下游引物分别为5'-TGGCAAAGGCTGACAAGGCTC-3'、5'-GGATGCTCGCCTTTGATTTTGG-3', TLR4上下游引物分别为5'-ATTCCTGCAGTGGGTCAA GG-3'、5'-ACAATTCCACCTGCTGCC TC-3', GAPDH上下游引物分别为5'-CAAATTCAACGGCACAGTCAA-3'、5'-TGGTGAAGACACCAGTAGACT C-3', 基因的表达水平以相对GAPDH来表示。

1.3 观察指标

①比较两组一般资料。②比较两组外周血中MMP9、IFN- γ 、HMGB1 mRNA、TLR4 mRNA的表达。③根据2003年国际肾脏病学会和肾脏病理学会(ISN/RPS.2003)病理分型^[8]划分LN患者为I+II、III+IV型,比较不同LN病理分型患者外周血各指标水平。④分析影响LN合并心脏损害发生的因素。⑤分析各指标与心脏损害的相关性。⑥分析各指标诊断LN合并心脏损害的价值。

1.4 统计学方法

采用SPSS 22.0软件进行处理数据,计量资料以($\bar{x}\pm s$)表示、 t 检验,计数资料用 $n(\%)$ 表示、 χ^2 检验,以Logistic多元回归方程行多因素分析,采用Pearson进行相关性分析,采用接收者操作特征(ROC)曲线及ROC下面积(AUC)分析各指标诊断LN合并心脏损害的价值。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组一般资料比较

两组性别、年龄、病程、LN 活动性指数、病理分型比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见

表 1。

2.2 两组外周血中各指标表达比较

合并心脏损害组 MMP9、IFN- γ 、HMGB1 mRNA、TLR4 mRNA 水平均较 LN 组高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 1 两组临床资料对比 ($\bar{x} \pm s$)

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

组别	n	男/女	年龄(岁)	病程(月)	LN 活动性指数(分)	ISN/RPS.2003 病理分型			
						I	II	III	IV
LN 组	63	27/36	(34.89±12.35)	(18.06±4.46)	(5.21±1.08)	5(7.94)	27(42.86)	23(36.51)	8(12.70)
合并心脏损害组	34	12/22	(35.05±13.97)	(17.91±6.41)	(5.33±1.14)	1(2.94)	15(44.12)	12(35.29)	6(17.65)
χ^2/t 值		0.525	0.058	0.135	0.512			1.283	
P 值		0.469	0.954	0.893	0.610			0.733	

表 2 两组外周血中各指标表达水平的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of the expression levels of various indicators in peripheral blood between the 2 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	MMP9(ng/mL)	IFN- γ (pg/mL)	HMGB1 mRNA	TLR4 mRNA
LN 组	63	381.92±112.03	211.62±65.75	2.91±0.95	1.36±0.42
合并心脏损害组	34	458.67±126.14	274.40±83.69	3.89±1.11	1.84±0.56
t 值		3.079	4.070	4.567	4.765
P 值		0.003	<0.001	<0.001	<0.001

2.3 比较不同 LN 病理分型患者外周血各指标表达水平比较

III+IV 型患者 MMP9、IFN- γ 、HMGB1 mRNA、TLR4 mRNA 水平均较 I+II 型高 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 比较不同 LN 病理分型患者外周血中各指标的表达 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of the expression of various indexes in peripheral blood of patients with different LN pathological types ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	MMP9(ng/mL)	IFN- γ (pg/mL)	HMGB1 mRNA	TLR4 mRNA
I+II	48	380.19±105.27	174.97±68.59	2.71±0.91	1.11±0.46
III+IV	49	436.87±128.45	291.09±75.42	3.78±1.07	1.94±0.48
t 值		2.374	7.928	6.903	8.692
P 值		0.020	<0.001	<0.001	<0.001

2.4 影响 LN 合并心脏损害发生因素的分析

MMP9、IFN- γ 、HMGB1、TLR4 是 LN 合并心脏损害发生的相关危险因素 ($P < 0.05$)。见表 4。

表 4 影响 LN 合并心脏损害发生因素的 Logistic 多元回归方程分析

Table 4 logistic multiple regression equation analysis of factors affecting LN combined with heart damage

影响因素	β 值	SE 值	Wald/ χ^2 值	P 值	OR 值	95%CI
MMP9	0.781	0.346	5.098	0.019	2.184	1.337~3.568
IFN- γ	1.020	0.467	4.767	0.023	2.772	2.615~2.939
HMGB1	0.617	0.305	4.098	0.036	1.854	1.029~3.341
TLR4	1.096	0.456	5.778	0.008	2.992	2.119~4.226

2.5 各指标与心脏损害的相关性分析

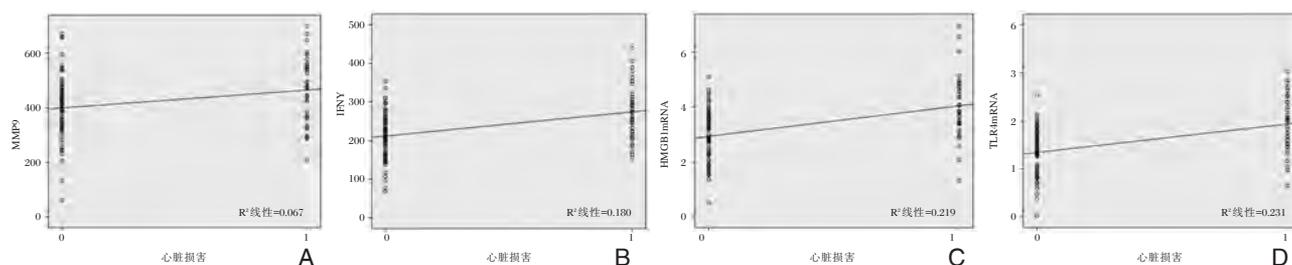
MMP9 ($r=0.259, P=0.010$)、IFN- γ ($r=0.424, P < 0.001$)、HMGB1 mRNA ($r=0.467, P < 0.001$)、TLR4 mRNA ($r=0.480, P < 0.001$) 与心脏损害呈正相关。见图 1。

2.6 各指标诊断 LN 合并心脏损害的价值分析

HMGB1 mRNA 诊断 LN 合并心脏损害的 AUC 大于其他指标, 表 5。

3 讨论

MMP9 可由成纤维细胞、单核细胞、中性粒细胞等分泌, 以往关于其在恶性肿瘤领域的研究较



注：“0”=无，“1”=有

图1 各指标与心脏损害的相关性图

Figure 1 correlation chart of each index and heart damage

表5 ROC分析结果

Table 5 ROC analysis results

指标	AUC	95%CI	Z值	P值	截断值	截断值敏感度(%)	截断值特异度(%)
MMP9	0.657	0.537~0.777	2.569	0.010	>466.7	55.88	77.78
IFN- γ	0.739	0.636~0.843	4.523	<0.0001	>241.92	67.65	71.43
HMGB1 mRNA	0.781	0.683~0.879	5.626	<0.0001	>3.35	79.41	66.67
TLR4 mRNA	0.773	0.671~0.875	5.258	<0.0001	>1.98	50.00	93.65

多,在LN及LN合并心脏损害中的报道较少。Vira H等^[9]研究纳入了150例SLE患者,发现MMP9可增加SLE患病风险,并与SLE疾病活动指数有关。Ugarte-Berzal E等^[10]研究指出,MMP9可激活免疫复合物中C1,造成肾脏损伤。Mao YM等^[11]进行的一项meta分析发现,SLE患者外周血MMP9水平高于无SLE正常人群。提示高MMP9水平与SLE有关,故可能与LN亦有关。本研究发现,MMP9在LN合并心脏损害组、Ⅲ+Ⅳ型患者中均呈高表达,与LN发生心脏损害、LN病理分型有关。曲哲等^[12]构建MMP9-siRNA慢病毒,对急性心肌缺血再灌注大鼠模型进行干预,发现干预后大鼠生存率提高,左室收缩末期内径、左室舒张末期内径、左心室质量指数较模型组减少,提示沉默MMP-9表达可减轻缺血再灌注损伤和心室重构,改善心室功能,从侧面论证了本研究。LN本质是一种自身免疫疾病,多种细胞因子、免疫细胞参与了疾病的发生。IFN- γ 是其中主要的细胞因子之一,马松鹤等^[13]研究采用降植烷诱导建立SLE小鼠模型,发现与正常小鼠比较,模型小鼠血清中IFN- γ 水平显著升高,并造成肾组织病理变化。张娜^[14]的报道中,采用人参皂苷Rg1抑制IFN- γ 的产生,发现实验动物Th1/Th2平衡及病情得到改善。可见高水平IFN- γ 可损伤肾组织,加重病情。根据Wen S等^[15]研究,IFN- γ 在LN患者外周血、肾脏组织中均呈高表达,与疾病活动度密切相关。本研

究发现,IFN- γ 在LN合并心脏损害组、Ⅲ+Ⅳ型患者中均呈高表达,与LN发生心脏损害、LN病理分型有关。运锋等^[16]研究指出,IFN- γ 在急性病毒性心肌炎小鼠模型心肌组织中呈高表达,采用苏木乙酸乙酯提取物降低IFN- γ 的表达后,光镜下可见心肌病理形态学得到改善,可见IFN- γ 与心肌损伤有关,支持本研究结论。IFN- γ 诊断LN合并心脏损害可为临床诊断LN合并心脏损害提供参考。

TLR4主要表达于单核巨噬细胞表面,可介导对病原分子模式及内源性表位的识别,连接天然免疫与获得性免疫,在人体免疫系统中起到重要作用。本研究发现,HMGB1、TLR4在LN合并心脏损害组、Ⅲ+Ⅳ型患者中均呈高表达,与LN发生心脏损害、LN病理分型有关。Song E等^[17]研究TLR4可通过激活HMGB1,增加心脏活检样本中炎性体的激活,造成心脏功能障碍,均支持本研究结论。同时诊断LN合并心脏损害的AUC HMGB1 mRNA>TLR4 mRNA,可为临床诊断LN合并心脏损害提供参考。值得注意的是,由于本研究客观实际病例数较少,可能造成数据存在偏倚,更可靠结果有待后续进一步验证。

综上所述,LN患者外周血中MMP9、IFN- γ 、HMGB1、TLR4高表达,与病理分型有关,并可作为心脏损害的参考指标。(下转第395页)

膜性肾病患者 Angptl4、CTLA-4 及维生素 D 检测与凝血功能的相关性

贾利敏* 赵翠 魏迪 房晓芳

[摘要] **目的** 探究膜性肾病(MN)患者血管生成素样蛋白4(Angptl4)、血清细胞毒性T淋巴细胞抗原4(CTLA-4)及25-羟基维生素D3[25-(OH)D3]水平与凝血功能的相关性。**方法** 选取2017年1月至2019年8月在本院收治的MN患者120例,其中不典型膜性肾病(UAMN)的患者40例,特发性腹膜性肾病(IMN)患者40例,继发性膜性肾病(SMN)患者40例,另选取同期健康体检人员40例作为对照组,检测各组血常规、凝血指标,血栓弹力图(TEG)检测凝血功能指标,并检测Angptl4、CTLA-4及25-(OH)D3水平,分析其相关性。**结果** 3组膜性肾病患者血白蛋白、24h尿蛋白、TG、TC、CREA、BUN水平比较,差异无统计学意义($P>0.05$),PLA水平比较,差异具有统计学意义($P<0.05$);膜性肾病患者各实验室指标与对照组比较,差异具有统计学意义($P<0.05$)。3组膜性肾病患者PT、TT、APTT及FIB水平比较,差异无统计学意义,D-D水平比较,差异具有统计学意义($P<0.05$);膜性肾病患者与对照组凝血因子指标比较,差异具有统计学意义($P<0.05$)。4组研究对象K值、R值、 α 角、MA比较,差异具有统计学意义($P<0.05$)。4组研究对象Angptl4、CTLA-4及25-(OH)D3水平比较,差异具有统计学意义($P<0.05$)。相关性分析结果显示,Angptl4、CTLA-4及25-(OH)D3分别与TEG各指标具有明显相关性。**结论** Angptl4、CTLA-4及维生素D测定对于膜性肾病患者者的诊断、治疗及了解患者凝血功能变化监测具有重要临床意义。

[关键词] 不典型腹膜性肾病;血管生成素样蛋白4;血清细胞毒性T淋巴细胞抗原4;25-羟基维生素D3;凝血功能

Correlation between detection of Angptl4, CTLA - 4 and vitamin D and coagulation function in patients with membranous nephropathy

JIA Limin*, ZHAO Cui, WEI Di, FANG Xiaofang

(Department of Nephrology, People's Hospital in Cangzhou City, Cangzhou, Hebei, China, 061000)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the levels of angiopoietin-like protein 4 (Angptl4), serum cytotoxic T lymphocyte antigen 4 (CTLA-4), and 25-hydroxyvitamin D3 [25-(OH)D3] in patients with membranous nephropathy (MN) and coagulation function relevance. **Methods** 120 cases of MN patients admitted in our hospital from January 2017 to August 2019 were selected, including 40 patients with atypical membranous nephropathy (UAMN), 40 patients with idiopathic peritoneal nephropathy (IMN), and secondary 40 patients with membranous nephropathy (SMN), and another 40 healthy medical staff were selected as the control group. The blood routine and blood coagulation indexes of each group were tested, the thromboelastography (TEG) was used to test the blood coagulation function indexes, and the levels of Angptl4, CTLA-4 and 25-(OH)D3 were detected, and their correlation was analyzed. **Results** There were no significant differences in the levels of serum albumin, 24-hour urine protein, TG, TC, CREA, and BUN

基金项目:沧州市重点研发计划项目(172302122)

作者单位:沧州市人民医院肾内科,河北,沧州 061000

*通信作者:贾利敏, E-mail:kaishenf40170@163.com

in the three groups of membranous nephropathy ($P>0.05$), and the differences in PLA levels were statistically significant ($P<0.05$). There was a statistically significant difference between the laboratory indexes of patients with membranous nephropathy and the control group ($P<0.05$). There was no significant difference in the levels of PT, TT, APTT and FIB in the three groups of patients with MN. The difference in D-D levels was statistically significant ($P<0.05$). MN patients had a statistically significant difference in coagulation factor indicators compared with the control group ($P<0.05$). The K value, R value, α angle, and MA were significantly different between the 4 groups ($P<0.05$). The differences in Angptl4, CTLA-4, and 25-(OH) D3 levels were statistically significant in the four groups ($P<0.05$). Correlation analysis showed that Angptl4, CTLA-4, and 25-(OH) D3 had significant correlations with TEG indicators, respectively. **Conclusion** The determination of Angptl4, CTLA-4 and vitamin D has important clinical significance for the diagnosis, treatment and monitoring of changes in coagulation function in patients with membranous nephropathy.

[KEY WORDS] Atypical peritoneal nephropathy; Angiopoietin-like protein 4; Serum cytotoxic T lymphocyte antigen 4; 25-hydroxyvitamin D3; Coagulation function

临床根据发病原因是否明确可分为不典型膜性肾病(Undetermined atypical membranous nephropathy, UAMN)、特发性膜性肾病(Idiopathic membranous nephropathy, IMN)和继发性膜性肾病(Secondary membranous nephropathy, SMN)^[1-2]。其中, UAMN的发病率较IMN和SMN发病率更高,并且近年来有不断增加的趋势。MN患者存在低血清白蛋白和高D-二聚体(D-dimer, D-D)的现象,患者血液存在不同程度的高凝状态,发生血栓栓塞的风险较高^[3]。因此,对于MN患者的血栓栓塞的预防、早期诊断和治疗十分重要。血管生成素样蛋白4(Angiopoietin-like protein 4, Angptl4)为血管生成素蛋白家族的重要成员,其与肾病患者蛋白尿的产生有着密切关系^[4]。研究显示^[5],在IMN患者中存在血清细胞毒性T淋巴细胞抗原4(Cytotoxic T lymphocyte associated antigen-4, CTLA-4)表达明显降低的情况。25-羟基维生素D3[25-(OH) D3]是维生素D在体内的主要存在形式,其对于血脂、钙磷等的代谢及机体免疫炎症反应调节等多个生理环节具有重要作用^[6]。血栓弹力图(Thromboelastography, TEG)可动态监测机体凝血情况,对于MN的临床抗凝治疗具有指导价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2017年1月至2019年8月在本院收治的膜性肾病(MN)患者120例,其中不典型膜性肾病(UAMN)的患者40例,特发性膜性肾病(IMN)患者40例,继发性膜性肾病(SMN)患者40例,另选取同期健康体检人员40例作为对照组,其中,

UAMN组男26例,女14例,年龄22~68岁,平均(44.6±3.9)岁;IMN组男25例,女15例,年龄25~71岁,平均(43.9±4.0)岁;SMN组男27例,女13例,年龄20~72岁,平均(44.6±4.1)岁。另选择同期于本院进行健康体检的40例正常人员作为对照组,其中男26例,女14例,年龄20~70岁,平均(44.4±4.5)岁。4组研究对象在性别、年龄上比较差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。本研究内容经本院伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 实验室指标检测

所有研究对象均于清晨空腹抽取5 mL静脉血,3 000 r/min离心取血清,采用迈瑞BS-220全自动生化分析仪(南京贝登医疗股份有限公司)检测血白蛋白、三酰甘油(Triacylglycerol, TG)、总胆固醇(Total cholesterol, TC)、肌酐(Creatinine, CREA)、尿素氮(Blood urea nitrogen, BUN),采用PL-11血小板分析仪(南京神州英诺华医疗科技有限公司)测定血小板数,并收集尿液检测24 h尿蛋白。并行常规凝血试验检测凝血酶原时间(PT)、凝血酶时间(TT)、活化部分凝血活酶时间(APTT)、D-D及纤维蛋白原(Fibrinogen, FIB)水平。采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测Angptl4、CTLA-4水平,试剂盒购自美国SANTA CRUZ公司;采用放射法检测25-(OH) D3水平,试剂盒购自上海罗氏公司。

1.2.2 血栓弹力图(Thromboelastography, TEG)

TEG检测并比较各组研究对象凝血时间(K值)、反应时间(R值)、凝固角(α 角)、血栓最大弹力(MA)指标。

1.3 统计学分析

采用SPSS 19.0统计学软件进行分析,计量资料以($\bar{x} \pm s$)差表示,多组间比较采用单因素方差分析,相关性采用Spearman分析。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组实验室指标水平比较

UAMN组、IMN组及SMN组血清白蛋白、24

h尿蛋白、TG、TC、CREA、BUN水平比较差异无统计学意义($P > 0.05$),PLA水平比较差异具有统计学意义($P < 0.05$)。3组膜性肾病患者24h尿蛋白、TG、TC、肌酐、尿素氮及血小板水平显著高于对照组,白蛋白水平显著低于对照组,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见表1。

2.2 各组凝血因子水平比较

3组膜性肾病患者PT、TT、APTT、D-D及FIB水平比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),IMN组、

表1 各组实验室指标水平比较 [(n=40), ($\bar{x} \pm s$)]

Table 1 Comparison of laboratory indicators in each group [(n=40), ($\bar{x} \pm s$)]

组别	白蛋白 (g/L)	24 h尿蛋白 (g)	TG (mmol/L)	TC (mmol/L)	CREA (μ mol/L)	BUN (mmol/L)	PLA (g/L)
IMN组	7.6 \pm 1.8	5.2 \pm 0.9	2.4 \pm 0.4	7.2 \pm 1.6	86.2 \pm 9.2	5.5 \pm 1.0	249.6 \pm 23.5
SMN组	7.4 \pm 1.9	5.3 \pm 0.8	2.5 \pm 0.4	7.4 \pm 1.7	84.4 \pm 9.5	5.4 \pm 0.8	186.5 \pm 21.9
UAMN组	7.3 \pm 1.6	5.1 \pm 0.9	2.6 \pm 0.3	7.6 \pm 1.5	85.1 \pm 9.8	5.6 \pm 1.1	184.7 \pm 23.2
对照组	38.8 \pm 5.7 ^a	0.1 \pm 0.0 ^a	4.4 \pm 0.5 ^a	0.7 \pm 0.1 ^a	76.3 \pm 9.7 ^a	3.9 \pm 0.5 ^a	125.8 \pm 16.5 ^a
F值		25.800	10.326	19.050	8.100	7.618	13.577
P值		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注:与膜性肾病患者比较,^a $P < 0.05$ 。

SMN组、UAMN组患者与对照组PT、TT、APTT、FIB、D-D水平比较差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见表2。

表2 各组凝血因子水平比较 [(n=40), ($\bar{x} \pm s$)]

Table 2 Comparison of clotting factor levels in each group [(n=40), ($\bar{x} \pm s$)]

组别	PT (s)	TT (s)	APTT (s)	D-D (μ g/L)	FIB (g/L)
IMN组	8.9 \pm 2.0	14.8 \pm 2.6	28.8 \pm 3.5	262.4 \pm 22.1	443.9 \pm 35.8
SMN组	9.3 \pm 2.2	14.6 \pm 2.7	30.3 \pm 3.2	175.7 \pm 25.6	447.7 \pm 36.2
UAMN组	9.1 \pm 2.3	14.5 \pm 2.4	29.3 \pm 3.1	179.9 \pm 23.2	443.1 \pm 33.9
对照组	12.8 \pm 2.4 ^a	16.9 \pm 2.9 ^a	33.6 \pm 2.8 ^a	84.3 \pm 8.6 ^a	312.5 \pm 37.5 ^a
F值	8.970	7.155	8.806	15.772	16.831
P值	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000

注:与膜性肾病患者比较,^a $P < 0.05$ 。

2.3 各组TEG检测凝血功能指标水平比较

与对照组相比,IMN组、SMN组及UAMN组K值、R值明显降低, α 角、MA值明显升高,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。与IMN组相比,SMN组及UAMN组K值、R值明显降低, α 角、MA值明显升高,差异具有统计学意义($P < 0.05$),见表3。

表3 各组TEG检测凝血功能指标水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of the levels of coagulation function in each group of TEG ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	K值(min)	R值(min)	α 角($^{\circ}$)	MA(mm)
IMN组	40	1.2 \pm 0.2	5.3 \pm 0.4	79.5 \pm 3.9	71.5 \pm 3.7
SMN组	40	1.5 \pm 0.3 ^a	6.2 \pm 0.6 ^a	71.3 \pm 3.6 ^a	68.3 \pm 3.3 ^a
UAMN组	40	1.5 \pm 0.3 ^a	6.3 \pm 0.6 ^a	70.6 \pm 2.6 ^a	68.7 \pm 3.6 ^a
对照组	40	2.6 \pm 0.2 ^b	7.2 \pm 0.4 ^b	66.8 \pm 3.2 ^b	64.5 \pm 3.1 ^b
F值		13.329	9.727	11.453	11.035
P值		0.000	0.000	0.000	0.000

注:与IMN组比较,^a $P < 0.05$;与膜性肾病患者比较,^b $P < 0.05$ 。

2.4 各组Angptl4、CTLA-4及25-(OH)D3水平比较

UAMN组、IMN组、SMN组患者Angptl4、25-(OH)D3水平显著高于对照组,CTLA-4水平显著低于对照组,差异具有统计学意义($P < 0.05$)见表4。

2.5 相关性分析

相关性分析结果显示,Angptl4及25-(OH)D3与K值、R值存在明显负相关性,与 α 角、MA存在明显正相关性($P < 0.05$);CTLA-4与K值存在明显正相关性,与 α 角、MA存在明显负相关性($P < 0.05$)见表5。

表4 各组 Angptl4、CTLA-4 及 25-(OH)D3 水平比较
[[$(\bar{x} \pm s)$, (ng/mL)]Table 4 Comparison of the levels of Angptl4, CTLA-4 and 25-(OH)D3 in each group [[$(\bar{x} \pm s)$, (ng/mL)]

组别	n	Angptl4	CTLA-4	25-(OH)D3
IMN 组	40	7.6±1.3	0.5±0.2	10.8±2.4
SMN 组	40	4.5±0.9 ^a	0.6±0.2 ^a	8.6±2.0 ^a
UAMN 组	40	4.1±0.8 ^a	0.8±0.2 ^a	7.7±1.3 ^a
对照组	40	0.8±0.2 ^b	1.0±0.2 ^b	5.2±1.4 ^b
F 值		23.855	10.180	11.747
P 值		0.000	0.000	0.000

注:与 IMN 组比较, ^aP<0.05;与膜性肾病患者比较, ^bP<0.05。

表5 Angptl4、CTLA-4 及 25-(OH)D3 与 TEG 指标相关性分析

Table 5 Correlation analysis between Angptl4, CTLA-4 and 25-(OH)D3 and TEG indexes

项目	K 值		R 值		α 角		MA	
	r 值	P 值	r 值	P 值	r 值	P 值	r 值	P 值
Angptl4	-0.498	0.001	-0.520	0.001	0.470	0.002	0.556	0.002
CTLA-4	0.377	0.017	0.115	0.480	-0.415	0.008	-0.391	0.013
25-(OH)D3	-0.486	0.002	-0.443	0.004	0.483	0.002	0.450	0.004

注:与 IMN 组比较, ^aP<0.05;与膜性肾病患者比较, ^bP<0.05。

相互作用,从而全面反映患者机体凝血状况^[9-10]。一些研究通过肾组织 IgG 亚型分布和血清抗 PLA2R 抗体检测发现,UAMN 患者与 SMN 更具有相似之处,在对其临床病情分析和治疗中应注意区分。

Angptl4 为一种分泌蛋白,其在机体糖脂代谢中发挥关键作用,并在组织创伤修复、血管生成、氧化应激及肿瘤等生理和病理反应中发挥关键作用。研究显示^[11],在膜性肾病、微小病理性肾病中肾小球足细胞分泌的 Angptl4 有明显增加的趋势,这与本研究结果相似。CTLA-4 为 CD28 的同源分子,CTLA-4 可下调 T 细胞反应,抑制免疫应答反应^[12]。CTLA-4 水平降低,导致其对 Th1/2 转录活性的抑制作用降低,从而导致 T 细胞反应和免疫应答反应,增加肾小球上皮细胞和基底膜免疫复合物的沉积,促使基底膜增厚,促使足细胞损伤和蛋白尿的形成,进而影响血液黏度和脂质代谢^[13]。本研究结果提示,25-(OH)D3 降低促使 UAMN 患者脂质代谢异常,并间接导致了 UAMN 患者的异常状况。25-(OH)D3 对于调节血脂、钙磷等的代谢、调节细胞增殖分化具有重要作用。研究显示^[14-15],维生素 D 类似物能够降低足细胞损伤,促进足细胞活性恢复,这说明 25-(OH)D3 对于控制 UAMN 疾病进展具有重要意义。同时,25-

3 讨论

研究提出^[7],脂质代谢异常是导致 MN 疾病发生发展的重要因素之一。高脂血症也促进了血液粘稠度增加,血小板和 D-D 功能受限,粗疏静脉血栓的形成概率增加,进一步损伤肾功能^[8]。本研究结果提示,膜性肾病患者由于脂质代谢异常导致机体出现高凝状态。

血栓弹力图通过高敏感悬垂丝检测血凝块的形成,可以图形形式动态评估血小板、凝血因子、纤溶系统、纤维蛋白原、白细胞、红霞博等之间的

(OH)D3 对于机体胆固醇等脂质的代谢具有重要意义,25-(OH)D3 缺乏可增加机体高甘油三酯血症代谢综合征发生的风险。本研究结果说明,在 UAMN、IMN 和 SMN 患者中 Angptl4、25-(OH)D3 及 CTLA-4 水平存在明显差异,因此,通过对 MN 患者 Angptl4、25-(OH)D3 及 CTLA-4 水平检测对于其临床疾病类型诊断具有明显价值。

本研究结果提示,Angptl4、CTLA-4 及 25-(OH)D3 与 MN 患者凝血功能的变化存在相互关系。Angptl4、CTLA-4 及 25-(OH)D3 主要通过对于 MN 患者肾组织及足细胞损伤及修复、机体免疫应答、蛋白尿形成、血管通透性及脂质代谢等造成影响,从而间接或直接的影响 MN 患者机体凝血功能。

综上所述,Angptl4、CTLA-4 及维生素 D 测定对于膜性肾患者的诊断、治疗及了解患者凝血功能变化监测具有重要临床意义。

参考文献

- [1] Zhang Q, Liu X, Zhang Z, et al. A comparison of clinical features between idiopathic membranous nephropathy patients with and without serum antibody against phospholipase A2 receptor[J]. Medicine, 2019,98(45):17658.

(下转第 375 页)

血清BUN、D-D、Lac、sCHE水平对重症肺炎生存预测价值

张健昌 赖燕波* 李盘石 覃炳军

[摘要] **目的** 探讨血清尿素氮(BUN)、D-二聚体(D-D)、血乳酸(Lac)、胆碱酯酶(sCHE)水平对重症肺炎患者生存状况的预测价值。**方法** 选取2014年4月至2019年6月本院收治的224例重症肺炎患者作为研究对象,根据入院后30 d生存状况分为生存组(152例)、死亡组(72例)。对比2组不同入院时间血清BUN、D-D、Lac、sCHE水平、急性生理与慢性健康(APACHE II)评分、多器官功能障碍综合征(MODS)评分,分析各血清指标与APACHE II、MODS评分关联性以及对重症肺炎生存状况的预测价值。**结果** 血清D-D、Lac、BUN与APACHE II、MODS评分呈正相关,sCHE与APACHE II、MODS评分呈负相关($P<0.05$);入院第7 d, BUN AUC值(0.810)>sCHE(0.808)>D-D(0.780)>Lac(0.777);随访30 d后,以ROC曲线最佳截断值分为低危组、高危组,血清BUN、D-D、Lac、sCHE高危组、低危组生存曲线对比有显著差异($P<0.05$)。**结论** 血清BUN、D-D、Lac、sCHE水平在重症肺炎患者中呈异常表达,可为临床预测生存状况提供一定的数据支持。

[关键词] 尿素氮; D-二聚体; 血乳酸; 胆碱酯酶; 重症肺炎

The predictive value of serum BUN, D-D, Lac, sCHE levels in the survival of severe pneumonia

ZHANG Jianchang, LAI Yanbo*, LI Panshi, TAN Bingjun

(Department of critical care, Dongguan people's hospital, Dongguan, Guangdong, China, 523000)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the predictive value of serum urea nitrogen (BUN), D-dimer (D-D), blood lactate (Lac) and cholinesterase (sCHE) levels in the survival status of patients with severe pneumonia. **Methods** A total of 224 patients with severe pneumonia admitted to our hospital from April 2014 to June 2019 were selected as the research objects, According to the survival status at 30 days after admission, they were divided into survival group (152 cases) and death group (72 cases). The serum BUN, DD, Lac, sCHE levels, acute physiology and chronic health (APACHE II) scores, and multiple organ dysfunction syndrome (MODS) scores at different admission times were compared between the two groups, The correlations of serum indexes with APACHE II and MODS scores and their predictive value for the survival status of severe pneumonia were analyzed. **Results** Serum D-D, Lac, BUN were positively correlated with APACHE II, MODS scores, and sCHE was negatively correlated with APACHE II, MODS scores ($P<0.05$). On the seventh day of admission, AUC of BUN (0.810) > sCHE (0.808) > D-D (0.780) > Lac (0.777). After 30 days of follow-up, the best cut-off value of the ROC curve was divided into low-risk group and high-risk group, and the survival curves of serum BUN, D-D, Lac, sCHE high-risk group and low-risk group were significantly different ($P<0.05$). **Conclusion** Serum BUN, D-D, Lac, and sCHE levels are abnormally expressed in patients with severe pneumonia, which can provide some data support for clinical

基金项目:东莞市社会科技发展项目(201950715001368)

作者单位:东莞市人民医院重症医学科,广东,东莞 523000

*通信作者:赖燕波, E-mail:740281257@qq.com

prediction of survival.

[KEY WORDS] Urea nitrogen; D-dimer; Blood lactic acid; Cholinesterase; Severe pneumonia

调查显示,我国重症肺炎病死率高达20.0%及以上,而重症肺部感染可改变不同生物学因子,激活炎症反应,加剧脂质代谢紊乱或凝血功能异常,增加多器官功能障碍综合征(Multiple organ dysfunction syndrome, MODS)风险^[1-2]。尿素氮(Blood urea nitrogen, BUN)是反映肾功能状态的重要指标,异常升高提示肾功能障碍加重;D-二聚体(D-Dimer, D-D)是评估机体凝血功能状态的有效指标,凝血功能异常能促使微血栓形成,加重病情^[3]。另外,血清胆碱酯酶(Serum cholinesterase, S-ChE)水平在重症肺炎患者出现不同程度降低趋势,相反,血乳酸(Lactate, Lac)水平呈升高趋势^[4]。基于此,本研究综合检测血清BUN、D-D、Lac、sCHE水平,旨在探讨对重症肺炎患者生存状况的预测价值。具体分析如下。

1 资料和方法

1.1 一般资料

选取2014年4月至2019年6月本院收治的224例重症肺炎患者作为研究对象,根据入院后30 d生存状况分为生存组(152例)、死亡组(72例)。2组基本资料(年龄、性别)无统计学意义($P>0.05$),但具有可比性。机械通气时间、氧合指数对比差异有统计学意义($P<0.05$),见表1。本研究经本院医学伦理委员会批准。

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

一般资料	生存组 ($n=152$)	死亡组 ($n=72$)	t/χ^2 值	P 值
性别(男/女)	87/65	41/31	0.002	0.967
年龄(岁)	64.89±3.01	65.07±2.95	0.421	0.674
机械通气时间(d)	14.38±6.49	6.07±4.62	9.752	<0.001
氧合指数	107.49±19.83	84.64±23.26	7.610	<0.001

1.2 选取标准

纳入标准:①均符合重症肺炎相关标准^[5];②均伴有呼吸困难、肤色发青发紫、呼吸伴有杂音等临床表现;③48 h内肺部浸润扩散>50.0%;④氧

合指数<250;⑤患者及家属知情并签署同意书。排除标准:①严重脓毒症者;②存在痛风、糖尿病酮症酸中毒等严重疾病者;③气道异物或急性心肌梗死者;④认精神行为异常者。

1.3 方法

空腹取3 mL静脉血,离心12 min,3 000 r/min,分离取血清:①采用全自动生化分析仪(型号:AU54200)检测血清BUN水平,仪器购自日本OLYMPUS公司,试剂盒购自奥森多医疗器械贸易(中国)有限公司;②采用速率法免疫发光法检测血清sCHE水平,试剂盒购自奥森多医疗器械贸易有限公司;③采用比色法酶显示法检测血清Lac水平,试剂盒购自奥森多医疗器械贸易有限公司;④采用自动乳胶增强免疫测定法检测血清D-D水平,试剂盒购自思塔高诊断技术(中国)有限公司,严格按照仪器、试剂盒说明书操作。

1.4 观察指标

①对比2组入院时、入院第3、5、7 d血清BUN、D-D、Lac、sCHE水平、急性生理功能与慢性健康评分(Acute physiological and chronic health-evaluation II, APACHE II)、MODS评分。②分析血清BUN、D-D、Lac、sCHE与APACHE II、MODS评分关联性。③分析血清BUN、D-D、Lac、sCHE对重症肺炎生存状况的预测价值。④分析血清BUN、D-D、Lac、sCHE高危组、低危组生存曲线。

1.5 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, t 检验,计数资料用 $n(\%)$ 表示,组间比较采用 χ^2 检验,采用Pearson进行线性相关性分析,采用受试者工作特征曲线(Receiver operating characteristic, ROC)分析生存状况预测价值,采用卡普兰-迈耶曲线(Kaplan-Meier, KM)进行生存曲线分析, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2组血清BUN、D-D、Lac、sCHE水平

入院第3、5、7 d,生存组血清D-D、Lac、BUN水平低于死亡组,sCHE水平高于死亡组($P<0.05$)。见表2。

表2 2组血清BUN、D-D、Lac、sCHE水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of serum BUN, D-D, lac and sche levels in 2 group ($\bar{x} \pm s$)

时间	组别	n	BUN(mmol/L)	D-D(μ g/L)	Lac(mmol/L)	sCHE(kU/L)
入院时	生存组	152	21.14±6.10	1.75±0.61	4.11±1.06	3.62±0.93
	死亡组	72	22.06±6.83	1.78±0.63	4.34±1.15	3.51±0.95
	t值		1.014	0.340	1.476	0.821
	P值		0.312	0.734	0.142	0.413
入院第3 d	生存组	152	18.97±3.02	1.48±0.28	3.64±0.58	3.96±0.47
	死亡组	72	21.53±3.71	1.75±0.36	4.28±0.69	3.48±0.61
	t值		5.495	6.130	7.247	6.466
	P值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
入院第5 d	生存组	152	16.82±2.14	1.21±0.30	3.07±0.72	4.22±0.82
	死亡组	72	21.22±5.07	1.70±0.59	4.15±1.38	3.41±1.06
	t值		9.857	8.245	7.698	6.265
	P值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
入院第7 d	生存组	152	15.24±5.02	1.08±0.35	2.73±0.90	4.49±1.40
	死亡组	72	20.89±6.27	1.61±0.56	4.02±1.34	3.22±1.07
	t值		7.245	8.645	8.500	6.810
	P值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

2.2 2组APACHE II、MODS评分

评分低于死亡组($P<0.05$)。见表3。

入院第3、5、7 d,生存组APACHE II、MODS

表3 2组APACHE II、MODS评分比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of Apache II and MODS scores of 2 groups ($\bar{x} \pm s$)

评分	组别	n	入院时	入院第3 d	入院第5 d	入院第7 d
APACHE II 评分 (分)	生存组	152	22.86±3.71	21.24±3.04	19.06±2.64	17.20±2.84
	死亡组	72	23.41±4.20	23.36±3.51	23.09±3.85	22.75±4.03
	t值		0.993	4.634	9.148	11.870
	P值		0.322	<0.001	<0.001	<0.001
MODS 评分 (分)	生存组	152	6.87±0.93	6.03±0.90	5.29±0.72	4.45±0.69
	死亡组	72	7.02±0.96	7.08±1.02	7.16±0.81	7.24±1.52
	t值		1.116	7.807	17.429	18.917
	P值		0.266	<0.001	<0.001	<0.001

2.3 血清BUN、D-D、Lac、sCHE与APACHE II、MODS评分关联性

Pearson线性相关性分析,血清D-D、Lac、BUN与APACHE II、MODS评分呈正相关,sCHE与APACHE II、MODS评分呈负相关($P<0.05$)。见表4。

表4 重症肺炎生存状况的影响因素

Table 4 Factors influencing the survival of severe pneumonia

评分		BUN	D-D	Lac	sCHE
APACHE II 评分	r值	0.416	0.457	0.432	-0.404
	P值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
MODS 评分	r值	0.510	0.544	0.530	-0.475
	P值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

2.4 重症肺炎生存状况的影响因素

将重症肺炎生存状况作为因变量(生存赋值为0,死亡赋值为1),以机械通气时间、氧合指数、血清BUN、D-D、Lac、sCHE、APACHE II、MODS评分作为自变量,纳入Logistic回归分析模型,结果显示,机械通气时间、氧合指数、血清BUN、D-D、Lac、sCHE、APACHE II、MODS评分是重症肺炎生存状况的重要影响因素($P<0.05$)。见表5。

2.4 血清BUN、D-D、Lac、sCHE对重症肺炎生存状况的预测价值

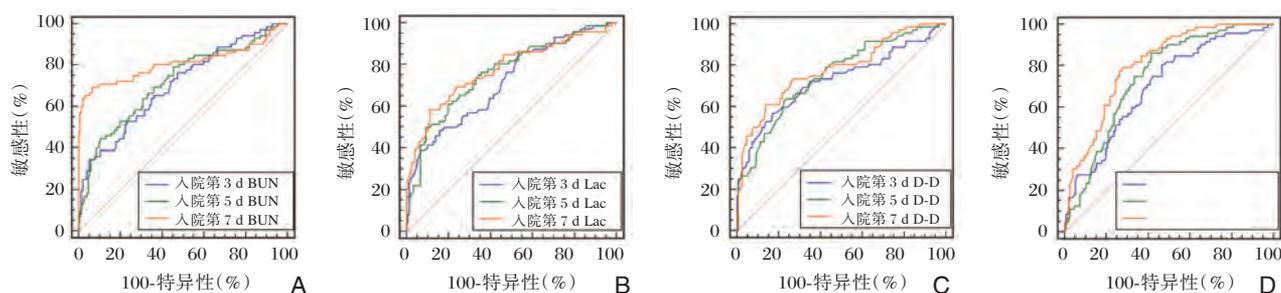
采用受试者工作特征曲线ROC分析生存状况,入院第3、5、7 d BUN ROC曲线(见图1A);入院第3、5、7 d Lac ROC曲线(见图1B);入院

表5 重症肺炎生存状况的影响因素

Table 5 Factors influencing the survival of severe pneumonia

变量	β 值	S.E 值	Wald χ^2 值	P 值	OR 值	95%CI
机械通气时间	-1.020	0.416	6.014	<0.001	0.361	0.261~0.498
氧合指数	-0.645	0.302	4.560	<0.001	0.525	0.342~0.805
BUN	0.910	0.377	5.825	<0.001	2.484	1.540~4.007
D-D	0.791	0.391	4.093	<0.001	2.206	1.276~3.813
Lac	1.223	0.457	7.165	<0.001	3.398	2.024~5.706
sCHE	-0.519	0.249	4.339	<0.001	0.595	0.389~0.911
APACHE II 评分	1.379	0.514	7.199	<0.001	3.971	2.351~6.708
MODS 评分	1.636	0.719	5.179	<0.001	5.136	3.013~8.755

第3、5、7 d D-D ROC 曲线(见图 1C); 入院第 3、5、7 d sCHE ROC 曲线(见图 1D)。



注:A 为入院第3、5、7 d BUN ROC 曲线; B 为入院第3、5、7 d Lac ROC 曲线; C 为入院第3、5、7 d D-D ROC 曲线; D 为入院第3、5、7 d sCHE ROC 曲线。

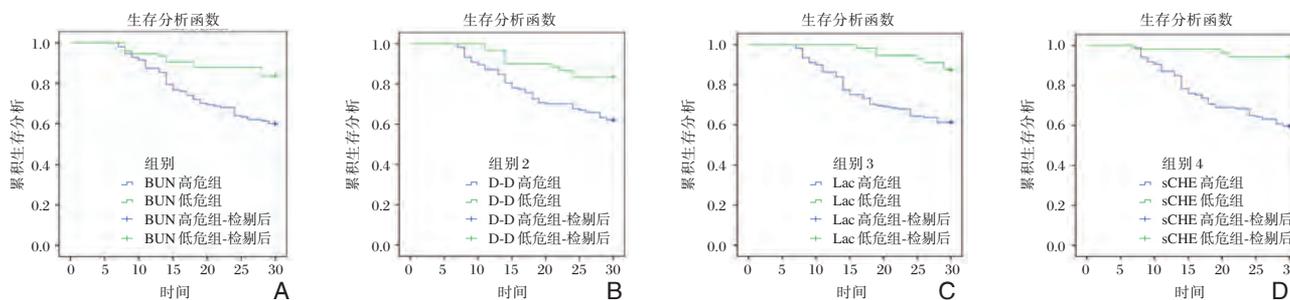
图1 ROC 曲线

Figure 1 ROC curve

2.5 生存曲线分析

随访30 d后,以ROC曲线最佳截断值分为低危组、高危组,KM曲线分析显示血清BUN、D-D、

Lac、sCHE 高危组、低危组生存曲线对比,差异有统计学意义($P<0.001$)。见图2。



注:A: BUN 生存曲线; B: D-D 生存曲线; C: Lac 生存曲线; D: sCHE 生存曲线。

图2 生存曲线

Figure 2 Survival curve

3 讨论

重症肺炎患者会引发微血管痉挛,诱发微循环障碍,降低外周血管阻力,增加感染性休克发生

率^[6-7]。因此动态监测炎症因子水平变化,对正确评估重症肺炎患者病情严重程度及预后至关重要。

Lac 是机体无氧代谢的中间产物,也是判断机体组织与细胞灌注、氧合受损的敏感性指标^[8];

sCHE是由人体肝脏合成的一种糖蛋白,当机体出现肝脏血液供应减少、电解质紊乱时,可导致肝脏合成sCHE能力降低^[9]。徐测梁等^[10]通过研究40例老年重症肺炎入院后第1、4、7d血清Lac、sCHE水平发现,死亡患者血清Lac水平明显高于治愈患者,相反,血清sCHE水平则低于治愈患者,与本研究观点相符。重症肺炎发生时,可减少机体全身或局部组织灌注,诱发组织细胞缺氧,特异性抑制肝脏合成功能,降低肝脏乳酸清除能力,增加机体Lac含量,降低sCHE含量,进一步提高严重脓毒症或感染性休克发生风险^[11-12]。经ROC曲线分析结果提示临床动态监测血清Lac水平,可为评估重症肺炎患者预后提供数据指导。

D-D水平异常升高可启动内源性凝血途径,激活内源性凝血系统,加重纤维蛋白溶解反应异常。本研究数据表明,入院第7d,生存患者血清D-D水平低于死亡患者。重症肺炎发生时,体内致病菌可释放大量的内毒素、外毒素,诱发全身炎症反应,暴露内皮下胶原,激活凝血系统,损伤血管内皮,引起血小板粘附、聚集、释放,促使血液凝固,进一步加重纤溶系统功能亢进,增加D-D含量。本研究经Pearson线性相关性、KM曲线进一步探讨血清D-D与重症肺炎患者生存状况关联性,发现入院第7d,血清D-D与APACHE II、MODS评分存在正相关关系,与昌盛等^[13]研究相符,且血清D-D水平异常升高可增加重症肺炎患者死亡风险。

BUN是人体蛋白质代谢的主要终末产物,水平异常提示机体肾功能不全失代偿本研究以血清BUN为观察指标,结果显示,血清BUN水平在存活患者中出现低表达状态,并与APACHE II、MODS评分存在明显正相关关系,与吴淡森等^[14]研究一致。受血管内容量减少、心输出量降低、外周血管扩张等多因素影响,重症肺炎患者可并发急性肾损伤,进而降低肾小球滤过率,相对增加肾小管对BUN、水、钠的重吸收,升高血清BUN水平。另外,据报道,APACHE II、MODS评分分值越高,重症肺炎患者并发脓毒症几率越大,病死率越高^[15]。

综上可知,血清BUN、D-D、Lac、sCHE水平在重症肺炎患者中呈异常表达,可为临床预测生存

状况提供数据支持。

参考文献

- [1] Haugen J, Basnet S, Hardang IM, et al. Vitamin D status is associated with treatment failure and duration of illness in Nepalese children with severe pneumonia [J]. *Pediatr Res*, 2017, 82(6): 986-993.
- [2] 陈山. 血必净注射液对重症肺炎病人的疗效及其对细胞免疫及炎性因子的影响[J]. *安徽医药*, 2017, 21(1): 127-129.
- [3] 王安桥. 乳酸、D-二聚体及C-反应蛋白水平检测对重症肺炎的临床意义及预后价值的分析[J]. *广西医科大学学报*, 2016, 33(3): 479-481.
- [4] 邓智刚, 曾滨, 戴美华, 等. 自主呼吸胸科手术围麻醉期患者氧供氧耗的观察[J]. *中华生物医学工程杂志*, 2019, 25(3): 367-371.
- [5] 中国医师协会急诊医师分会. 中国急诊重症肺炎临床实践专家共识[J]. *中国急救医学*, 2016, 36(2): 97-107.
- [6] Basnet S, Sharma A, Mathisen M, et al. Predictors of Duration and Treatment Failure of Severe Pneumonia in Hospitalized Young Nepalese Children [J]. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0122052.
- [7] 孙春荣, 黄琳娜, 崔晓阳, 等. 老年重症肺炎患者血清hs-CRP水平变化及临床意义[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2018, 10(5): 347-351.
- [8] 杨挺, 吴丁焯, 阙军. 乳酸清除率及APACHE II评分与重症肺炎预后的关系[J]. *江苏医药*, 2016, 42(17): 1924-1925.
- [9] Lai EC, Wong MB, Iwata I, et al. Risk of Pneumonia in New Users of Cholinesterase Inhibitors for Dementia [J]. *J Am Geriatr Soc*, 2015, 63(5): 869-876.
- [10] 徐测梁, 王齐国, 安娜, 等. 动态监测老年重症肺炎患者血乳酸、胆碱酯酶及前白蛋白的临床意义[J]. *内科急危重症杂志*, 2015, 21(4): 271-273.
- [11] 张小宁. 血清胆碱酯酶测定在重症肺炎中的应用[J]. *中国药物与临床*, 2015, 15(12): 1794-1795.
- [12] 张玲, 邵敏, 高磊, 等. 重症肺炎患者病感染原菌情况及相关因子检测分析[J]. *中国病原生物学杂志*, 2019, 14(3): 350-353.
- [13] 昌盛, 郑仁虎, 向玲, 等. APACHE II评分、动脉血乳酸、氧合指数、CRP、D-二聚体等指标对重症肺炎预后的价值[J]. *医学综述*, 2016, 22(5): 1026-1028.
- [14] 吴淡森, 石松菁, 张瑞, 等. 脓毒症并多器官功能不全综合征患者的新型抑制性细胞因子IL-35表达及其临床意义[J]. *中华急诊医学杂志*, 2019, 28(2): 175-180.
- [15] 郝明伟, 张琳, 章车明, 等. 动态监测中心静脉血氧饱和度对严重脓毒症患者预后判断的临床意义[J]. *中国急救医学*, 2016, 36(11): 980-983.

热休克蛋白 A2、IGFBP-2 在胰腺癌患者的表达及与临床病理特征相关性

于洋 薛莹 仓顺东*

[摘要] 目的 探究热休克蛋白 A2(HSPA2)、胰岛素样生长因子结合蛋白(IGFBP-2)在胰腺癌患者中的表达水平及其与临床病理特征的相关性。方法 选取本院2015年4月至2019年4月行手术切除的胰腺癌组织标本96例、癌旁正常胰腺组96例、胰腺良性肿瘤组织标本88例作为研究对象,检测3组HSPA2、IGFBP-2蛋白表达水平,分析HSPA2、IGFBP-2蛋白对胰腺癌诊断价值。并对比不同临床病理特征患者胰腺癌组织标本中HSPA2、IGFBP-2蛋白表达水平及与临床病理特征相关性。结果 胰腺癌组织标本HSPA2、IGFBP-2蛋白阳性表达率高于胰腺良性肿瘤组织标本、癌旁正常胰腺组织标本,差异具有统计学意义($P<0.05$);HSPA2、IGFBP-2蛋白表达与胰腺癌患者TNM分期、淋巴结转移呈正相关,与分化程度呈负相关($P<0.05$);经ROC曲线分析,两者联合诊断AUC为0.800,大于HSPA2、IGFBP-2单一诊断。结论 胰腺癌组织HSPA2、IGFBP-2蛋白异常高表达,并与TNM分期、淋巴结转移呈正相关,与分化程度呈负相关,监测其蛋白表达水平,可为临床判断病情发展提供诊断依据。

[关键词] 热休克蛋白 A2; 胰岛素样生长因子结合蛋白; 胰腺癌; TNM分期; 分化程度; 肿瘤

Expression of heat shock protein A2 and IGFBP-2 in patients with pancreatic cancer and its correlation with clinical pathological features

YU Yang, XUE Ying, CANG Shundong*

(Department of oncology, henan provincial people's hospital, Zhengzhou, Henan, China, 450003)

[ABSTRACT] Objective To investigate the expression levels of heat shock protein A2 (HSPA2) and insulin-like growth factor binding protein (IGFBP-2) in patients with pancreatic cancer and their correlation with clinical pathological characteristics. Methods A total of 96 patients with pancreatic cancer tissues who underwent surgical resection from April 2015 to April 2019 in our hospital, 96 patients with normal pancreas adjacent to the cancer group, and 88 patients with benign pancreatic tumor tissue samples were selected as the research objects. The expression levels of HSPA2 and IGFBP-2 proteins in three groups were detected, and the diagnostic value of HSPA2 and IGFBP-2 proteins in pancreatic cancer was analyzed. The expression levels of HSPA2 and IGFBP-2 in pancreatic cancer tissue samples from patients with different clinical pathological characteristics were compared and their correlation with clinical pathological characteristics. Results The positive expression rate of HSPA2 and IGFBP-2 protein in pancreatic cancer tissue specimens was higher than that in benign pancreatic tumor tissue specimens and normal pancreatic tissue specimens adjacent to the cancer, the difference was statistically significant ($P<0.05$). The expression of HSPA2 and IGFBP-2 protein was positively correlated with TNM stage and lymph node metastasis in patients with pancreatic cancer, and negatively correlated with the degree of differentiation ($P<0.05$). The combined diagnosis of AUC was 0.800, which was greater than the single diagnosis AUC of HSPA2 or IGFBP-2. Conclusions The abnormally high

基金项目:河南省科技厅基础与前沿技术研究项目(152300410154)

作者单位:河南省人民医院肿瘤内科一病区,河南,郑州 450003

*通信作者:仓顺东, E-mail: cangdsy@126.com

expression of HSPA2 and IGFBP-2 proteins in pancreatic cancer tissues is positively correlated with TNM stage and lymph node metastasis, and negatively correlated with the degree of differentiation. Monitoring the protein expression levels can provide a diagnostic basis for clinical judgment of disease development.

[KEY WORDS] Heat shock protein A2; Insulin-like growth factor binding protein; Pancreatic cancer; TNM staging; Degree of differentiation; Tumor

手术是现阶段临床治疗胰腺癌首选方案,但能进行手术切除者仅占20.0%,且术后5年生存率<25.0%^[1-2]。胰腺癌发病机制基础研究发现,相关调控细胞因子浓度在恶性肿瘤细胞增殖期间出现一定程度改变,可加快癌细胞增殖速度,促进癌细胞浸润或诱导分化^[3-4]。热休克蛋白A2(Heat shock protein A2, HSPA2)在精子发育、精卵结合过程中具有重要作用,近年来临床研究发现其在侵袭性肿瘤中呈异常高表达状态,可调控肿瘤增殖、侵袭等^[5]。胰岛素样生长因子结合蛋白(Insulin-like growth factor binding protein, IGFBP-2)表达水平异常,能激活癌细胞上游转录因子,加快癌细胞DNA扩增速度^[6]。基于此,本研究探讨分析HSPA2、IGFBP-2在胰腺癌患者的表达及与临床病理特征相关性。

1 资料和方法

1.1 一般资料

选取本院2015年4月至2019年4月行手术切除的胰腺癌组织标本96例、癌旁正常胰腺组96例、胰腺良性肿瘤组织标本88例作为研究对象。胰腺癌组织标本,男65例,女31例,年龄52~78岁,平均年龄(63.75±4.53)岁;癌旁正常胰腺组织标本,男63例,女33例,年龄50~75岁,平均年龄(63.91±4.85)岁;胰腺良性肿瘤组织标本,男59例,女29例,年龄51~79岁,平均年龄(64.05±4.96)岁;3组基本资料(年龄、性别)均衡可比,差异无统计学意义($P>0.05$)。本研究经本院医学伦理委员会批准。

1.2 选取标准

纳入标准:①3组临床资料完整,且知情本研究方案,自愿签署承诺书;②胰腺癌组织标本、癌旁正常胰腺组织标本符合以下标准:均经手术、病理学、细胞学检查证实为胰腺癌;均符合《2016 JPS临床实践指南:胰腺癌》中胰腺癌诊断标准^[7];③胰腺良性肿瘤组织标本:均经手术、病理学证实为胰腺良性病变;肿瘤标志物检测在正常范围内;胰腺组织距手术切缘>1.0 cm。排除标准:①转移性胰腺癌者;②合并自身免疫性疾病或免疫缺陷者;

③肝肾等重要脏器器质性病变者;④既往有放疗治疗史者;⑤存在胰腺疾病、糖尿病家族史者;⑥精神行为异常者。

1.2 方法

所有标本均经甲醛(40 g/L)固定,常规石蜡包埋。应用石蜡切片技术,甲苯-无水乙醇脱去石蜡,再利用无水乙醇、70.0%乙醇、50.0%乙醇反复洗涤切片,再加入牛奶液体等封闭抗体,封闭5 min,加入预先准备的HSPA2、IGFBP-2蛋白抗体[购自艾博抗(上海)贸易有限公司],温箱(37℃)条件下,孵育120 min,取出后应用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)反复洗涤3次,标本加入荧光标记二抗抗体[购自艾博抗(上海)贸易有限公司],温箱(37℃)条件下,孵育30 min,再次应用PBS洗涤,最后采用显色剂(购自南京凯基生物制剂公司)显色、封片,并于显微镜下观察。

1.3 阳性判断方法

随机选取切片中5个高倍视野,其中3分:细胞呈明显棕褐色颗粒;2分:细胞呈棕黄色颗粒;1分:细胞呈淡黄色颗粒;0分:无染色。阳性细胞比率:1分:阳性细胞数目比率≤10.0%;2分:10.0%<阳性细胞比率≤50.0%;3分:50.0%<阳性细胞比率≤75.0%;4分:阳性细胞比率>75.0%。总分=染色深度计分×阳性细胞比率。总分≥3分为阳性,<3分为阴性。

1.5 观察指标

①对比3组HSPA2、IGFBP-2蛋白表达。②分析HSPA2、IGFBP-2蛋白对胰腺癌诊断价值。③对比不同临床病理特征患者胰腺癌组织标本中HSPA2、IGFBP-2蛋白表达。④分析HSPA2、IGFBP-2蛋白表达与胰腺癌患者临床病理特征相关性。

1.6 统计学方法

采用SPSS 22.0软件进行分析,计数资料用 n (%)表示,组间比较采用 χ^2 检验,采用Pearson和Fisher's Exact Test进行相关性分析,采用ROC曲线分析诊断价值, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3组 HSPA2、IGFBP-2 蛋白表达

胰腺癌组织标本 HSPA2、IGFBP-2 蛋白阳性表达率高于胰腺良性肿瘤组织标本、癌旁正常胰腺组织标本, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 1、图 1。

2.2 HSPA2、IGFBP-2 蛋白对胰腺癌诊断价值

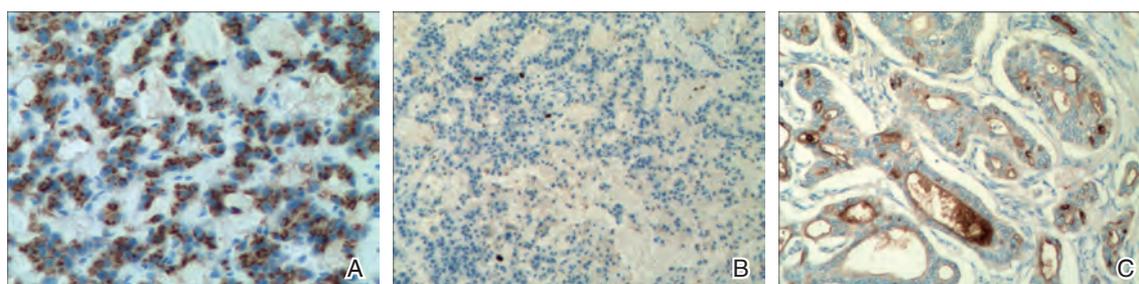
ROC 曲线分析, 两者联合诊断 AUC 为 0.800, 大于 HSPA2 (0.689)、IGFBP-2 (0.740), 诊断敏感性 93.75%, 诊断特异性 66.30%, 见表 2、图 4。

2.3 不同临床病理特征患者胰腺癌组织标本中 HSPA2、IGFBP-2 蛋白表达

表 1 3组 HSPA2、IGFBP-2 蛋白表达 [n (%)]

Table 1 Expression of HspA2 and IGFBP-2 in three groups [n (%)]

组别	n	HSPA2	IGFBP-2
胰腺癌组织标本	96	66(67.35)	78(79.59)
胰腺良性肿瘤组织标本	88	35(39.77)	39(44.32)
癌旁正常胰腺组织标本	96	18(18.75)	22(22.92)
χ^2 值		49.496	66.792
P 值		<0.001	<0.001



注: A 为胰腺癌病理图; B 为胰腺癌旁正常胰腺组织病理图; C 为胰腺良性肿瘤病理图。

图 1 胰腺癌、胰腺癌旁正常胰腺组织及胰腺良性肿瘤病理图 (×400)

Figure 1 pathology of pancreatic cancer, normal pancreatic tissue beside pancreatic cancer and benign pancreatic tumor (×400)

表 2 HSPA2、IGFBP-2 蛋白对胰腺癌诊断价值 [n (%)]

Table 2 diagnostic value of HspA2 and IGFBP-2 protein in pancreatic cancer [n (%)]

诊断方式	诊断准确性	诊断敏感性	诊断特异性
HSPA2	197(70.36)	66(68.75)	131(71.20)
IGFBP-2	201(71.79)	78(81.25)	123(66.85)
两者联合	212(75.71)	90(93.75)	122(66.30)
χ^2 值	2.167	19.692	1.218
P 值	0.338	<0.001	0.544

TNM 分期 III~IV 期、低分化、淋巴结转移的胰腺癌组织标本中 HSPA2、IGFBP-2 蛋白阳性表达率高于 TNM 分期 I~II 期、中高分化、无淋巴结转移者, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 3。

2.4 HSPA2、IGFBP-2 蛋白表达与胰腺癌患者临床病理特征相关性

经 Pearson 相关系数分析, HSPA2、IGFBP-2 蛋白表达与胰腺癌患者 TNM 分期、淋巴结转移呈正相关, 与分化程度呈负相关, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 4。

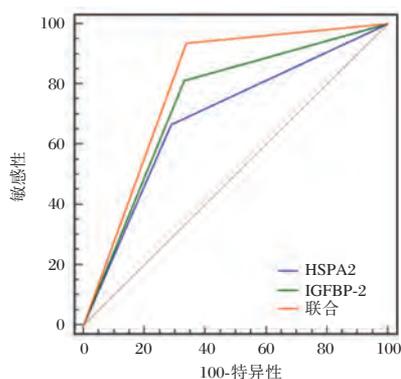


图 4 ROC 曲线

Figure 4 ROC curve

3 讨论

胰腺癌早期症状具有隐匿性, 多数患者确诊时已处于中晚期, 丧失手术最佳治疗时机, 且数据统计, 胰腺癌治疗后无瘤生存期 < 2 年, 且治疗后病死率持续性维持在 45%~60%^[8]。因此及时鉴别诊断胰腺癌, 探究影响患者预后相关因素, 对延长患者生存期具有重要意义。

Scioglinska D 等^[9]研究发现 HSPA2 在肺癌、膀胱癌、宫颈癌的组织标本、细胞株内呈高表达状态, 推测 HSPA2 在肿瘤发生、发展中可能扮演重要

表3 不同临床病理特征患者胰腺癌组织标本中 HSPA2、IGFBP-2 蛋白表达 [n (%)]

Table 3 HSPA2、IGFBP-2 protein expression in pancreatic cancer tissues of patients with different clinicopathological characteristics [n (%)]

临床病理参数	HSPA2 蛋白		χ^2 值	P 值	IGFBP-2 蛋白		χ^2 值	P 值
	阳性 (n=66)	阴性 (n=30)			阳性 (n=78)	阴性 (n=18)		
病灶直径 (cm)			0.110	0.740			0.017	0.896
≥ 3	31(46.97)	13(43.33)			36(46.15)	8(44.44)		
< 3	35(53.03)	17(56.67)			42(53.85)	10(55.56)		
门脉或腹腔神经侵犯			0.070	0.791			0.036	0.850
是	5(7.58)	2(6.67)			5(6.41)	2(11.11)		
否	61(92.42)	28(93.33)			73(93.59)	16(88.89)		
TNM 分期			13.627	<0.001			8.669	0.003
I~II 期	26(39.39)	24(80.00)			35(44.87)	15(83.33)		
III~IV 期	40(60.61)	6(20.00)			43(55.13)	3(16.67)		
淋巴结转移			9.195	0.002			16.838	<0.001
有	59(89.39)	19(63.33)			70(89.74)	8(44.44)		
无	7(10.61)	11(36.67)			8(10.26)	10(55.56)		
分化程度			16.405	<0.001			14.902	<0.001
低分化	38(57.58)	4(13.33)			48(61.54)	2(11.11)		
中、高分化	28(42.42)	26(86.67)			30(38.46)	16(88.89)		

表4 HSPA2、IGFBP-2 蛋白表达与胰腺癌患者临床病理特征相关性

Table 4 Correlation between HspA2, IGFBP-2 protein expression and clinicopathological characteristics of pancreatic cancer patients

临床病理特征	HSPA2 蛋白		IGFBP-2 蛋白	
	r 值	P 值	r 值	P 值
淋巴结转移	0.379	0.021	0.419	<0.001
分化程度	-0.414	<0.001	-0.463	<0.001
TNM 分期	0.527	<0.001	0.551	<0.001

角色。本研究结果显示, HSPA2 蛋白阳性表达率在胰腺癌组织标本中过度表达。吴杨等^[10]研究通过检测对比 15 例胰腺癌、癌旁胰腺组织标本, 证实 HSPA2 在胰腺癌组织中翻译、转录水平均明显高于癌旁胰腺组织, 充分证明 HSPA2 过度表达参与胰腺癌的发生、进展。文献分析, 胰腺癌细胞无限增殖过程中, 需大量 HSPA2 维持稳定, 且肿瘤所致应激环境一定程度也诱导 HSPA2 过度表达^[11]。同时, 相关研究显示, HSPA2 在多种侵袭性肿瘤中呈较高水平表达, HSPA2 基因沉默可大幅度降低肿瘤细胞增殖、侵袭及移植瘤生长能力^[12]。本研究数据表明, HSPA2 蛋白阳性表达率在 TNM 分期 III~IV 期、低分化、淋巴结转移的胰腺癌组织标本

中异常表达。姜波等^[13]研究通过检测对比 30 例食管癌患者也发现, 热休克蛋白水平阳性率高表达与肿瘤细胞分化、淋巴结转移、TNM 分期等因素相关, 可见通过检测 HSPA2 蛋白表达水平, 能指导临床评估病情进展。

IGFBP-2 作为生长因子家族成员, 其表达浓度改变可激活癌细胞转录 *cyc* 等上游因子或启动因子^[14]。本研究数据表明, IGFBP-2 蛋白阳性表达率在胰腺癌组织标本中高表达水平。王悦超等^[15]通过 73 例胰腺癌患者临床病理特征还发现, IGFBP-2 蛋白表达阳性率平均增高 >25.0%, 并在病情进展速度较快或治疗后生存预后较差人群中呈增高趋势。充分说明 IGFBP-2 蛋白水平在胰腺癌中过度表达, 能激活癌细胞内肿瘤相关信号通路 NOTCH, 提高 MAPK 等信号交错式激活风险, 影响胰腺癌患者体内肿瘤干细胞特征的维持^[16]。本研究进一步经 Pearson 相关系数分析发现, IGFBP-2 蛋白表达与胰腺癌患者 TNM 分期、淋巴结转移呈正相关, 与分化程度呈负相关。

综上可知, 胰腺癌组织 HSPA2、IGFBP-2 蛋白高表达, 与 TNM 分期、淋巴结转移呈正相关, 与分化程度呈负相关。监测上述蛋白表达水平, 可为临床判断病情发展、评估预后提供科学指导。

参考文献

- [1] Lambert A, Jarlier M, Gourgou Bourgade S, et al. Response to FOLFIRINOX by gender in patients with metastatic pancreatic cancer: Results from the PRODIGE 4/ACCORD 11 randomized trial[J]. *PLoS One*, 2017, 12(9):e0183288.
- [2] 杨尹默. 胰腺癌外科治疗的现状、存在问题与展望[J]. *中国普通外科杂志*, 2016, 25(9):1231-1235.
- [3] 赵伟, 唐辉, 邵川, 等. 胰岛素样生长因子结合蛋白2促进神经胶质瘤干细胞的增殖与迁移侵袭[J]. *中国组织工程研究*, 2018, 22(29):4631-4636.
- [4] 蔡文品, 梁世周. 血清胰岛素样生长因子结合蛋白2在直肠癌早期诊断中的价值[J]. *中华全科医学*, 2017, 15(2):308-310.
- [5] Gogler-Piğowska A, Klarzyńska K, Sojka DR, et al. Novel role for the testis-enriched HSPA2 protein in regulating epidermal keratinocyte differentiation[J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(3):2629-2644.
- [6] 顾静莉, 李文娜, 曹勤, 等. IGFBP-2、IL-8 和 CEA 联合检测对结直肠癌的诊断价值[J]. *胃肠病学*, 2018, 23(7):400-404.
- [7] Yamaguchi K. Clinical Practice Guidelines for Pancreatic Cancer 2016 from the Japan Pancreas Society [J]. *Nippon Shokakibyo Gakkai zasshi*, 2017, 114(4):627-636.
- [8] 杨健. 多肿瘤标志物蛋白芯片检测系统对消化道肿瘤诊断的价值评价[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2012, 4(5):25-27.
- [9] Scieglinska D, Krawczyk Z. Expression, function, and regulation of the testis-enriched heat shock HSPA2 gene in rodents and humans[J]. *Cell Stress Chaperones*, 2015, 20(2):221-235.
- [10] 吴杨, 黄强. HSPA2 在胰腺癌中的表达及其临床意义[J]. *安徽医科大学学报*, 2017, 52(8):1179-1182.
- [11] 袁小帅. WRAP53 及其相互作用蛋白在肺腺癌发生发展过程中的作用及机制研究[D]. 浙江大学, 2017:1-153.
- [12] 彭兆意, 周喜洋. HSPA2 在人肝癌组织中的表达及临床意义[J]. *浙江实用医学*, 2015, 20(3):157-159, 163.
- [13] 姜波, 高爱民, 盛莹, 等. EGFR、Her-2 及 Hsp90 α 在食管腺癌患者中的表达及病理研究[J]. *实用癌症杂志*, 2018, 33(6):874-877.
- [14] Gao S, Sun Y, Zhang X, et al. IGFBP2 Activates the NF- κ B Pathway to Drive Epithelial-Mesenchymal Transition and Invasive Character in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma [J]. *Cancer Res*, 2017, 76(22):6543-6554.
- [15] 王悦超, 亓文骞, 赵平. 胰岛素样生长因子1受体在胰腺癌治疗中的机制及进展[J]. *临床肝胆病杂志*, 2017, 33(4):790-794.
- [16] Gao C, Zhang RS, Zheng N, et al. Adeno-associated virus type 2-mediated gene transfer of a short hairpin-RNA targeting human IGFBP-2 suppresses the proliferation and invasion of MDA-MB-468 cells[J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(3):4383-4391.

(上接第365页)

- [2] Girisgen I, Conkar, Bulut İK, et al. Membranous nephropathy in a child with crescentic glomerulonephritis: Coincidence or comorbidity? [J]. *Saudi journal of kidney diseases and transplantation*, Saudi Arabia, 2019, 30(5):1156-1160.
- [3] 刘云, 马东红, 崔艳, 等. 幽门螺杆菌感染对膜性肾病患者血肌酐和血白蛋白及24小时尿蛋白水平的影响研究[J]. *中华医院感染学杂志*, 2017, 27(5):1004-1006.
- [4] Xue L, Feng X, Wang C, et al. Benazepril hydrochloride improves diabetic nephropathy and decreases proteinuria by decreasing ANGPTL-4 expression[J]. *BMC Nephrology*, 2017, 18(1):307.
- [5] 方华伟, 郑晓荣. 特发性膜性肾病患者血清 CTLA-4 水平及其临床意义[J]. *中国现代医学杂志*, 2019, 29(8):118-122.
- [6] Wu CC, Liao MT, Hsiao PJ, et al. Antiproteinuria Effect of Calcitriol in Patients With Chronic Kidney Disease and Vitamin D Deficiency: A Randomized Controlled Study [J]. *Journal of Renal Nutrition*, 2019, 19(1):30322.
- [7] 王素霞. 膜性肾病的病理诊断进展[J]. *内科急危重症杂志*, 2019, 25(4):268-270.
- [8] 刘昆, 马新童, 白东海, 等. 不典型膜性肾病临床特征及疗效分析[J]. *北京中医药*, 2018, 37(7):639-642.
- [9] 王自强, 贾利敏, 赵翠. 血栓弹力图评价阿魏酸哌嗪联合阿司匹林对不典型膜性肾病抗凝治疗的效果研究[J]. *陕西医学杂志*, 2019, 48(9):1178-1181.
- [10] 贾利敏, 陈保春, 赵翠, 等. 血栓弹力图指导不典型膜性肾病抗凝治疗临床研究[J]. *山西医药杂志*, 2019, 48(1):16-19.
- [11] 范小丽, 侯倩, 戚芸毓, 等. 肾病患者血管生成素样蛋白-4 与足细胞损伤的相关性研究[J]. *检验医学与临床*, 2018, 15(23):3556-3559.
- [12] Jacob M, Ohl K, Goodarzi T, et al. CTLA-4 Polymorphisms in Patients with IgA Nephropathy Correlate with Proteinuria [J]. *Kidney & blood pressure research*, 2018, 43(2):360-366.
- [13] Niknam A, Karimi MH, Geramizadeh B, et al. Polymorphisms of the Costimulatory Genes CTLA-4, CD28, PD-1, and ICOS and Outcome of Kidney Transplants in Iranian Patients [J]. *Experimental and clinical transplantation*, 2017, 15(3):295-305.
- [14] 谢大星, 郑笑, 郭广凤, 等. 特发性膜性肾病患者甲状腺激素及25-羟维生素D水平的分析[J]. *广东医学*, 2019, 40(7):952-956.
- [15] Gurpreet K, Jatinder S, Juhi K. Vitamin D and cardiovascular disease in chronic kidney disease [J]. *Pediatric Nephrology*, 2019, 34(12):2509-2522.

氧化修饰高密度脂蛋白对大鼠颗粒细胞激素分泌的影响及相关机制

马金平 李红娟* 李艳敏

[摘要] 目的 研究氧化修饰高密度脂蛋白(Ox-HDL)对大鼠颗粒细胞激素分泌的影响及相关机制。方法 30只6周龄SPF级SD雌性大鼠经适应性饲养5d后,采用孕激素拮抗剂米非司酮进行多囊卵巢综合征(PCOS)大鼠造模。随机选择25只雌鼠,每天对大鼠进行1次皮下注射,每次剂量0.2 mL米非司酮(20 mg/mL),连续14 d。其余5只雌鼠作为对照组。选择造模成功的15只雌鼠,分为模型组,低剂量组及高剂量组,每组5只。对照组及模型组大鼠尾静脉注射0.05 mL生理盐水,连续14 d。低剂量组和高剂量组每天尾静脉注射0.05 mL Ox-HDL溶液(浓度分别为200、400 $\mu\text{mol/L}$),连续14 d。并收集大鼠卵巢颗粒细胞。采用ELISA试验检测大鼠血清雌激素及孕酮水平;采用HE染色检测Ox-HDL对PCOS卵巢病理形态的影响观察;采用Hoechst33258凋亡染色检测大鼠颗粒细胞凋亡水平的影响;采用RT-PCR法检测Ox-HDL对大鼠颗粒细胞*Bcl-2*、*FSHR*、*StAR*及*Bax*基因表达的作用;采用Western blot法检测Ox-HDL对大鼠颗粒细胞*Bcl-2*、*FSHR*、*StAR*及*Bax*蛋白表达的作用。结果 PCOS大鼠在Ox-HDL作用后,雌激素及孕酮水平均下降差异有统计学意义($P<0.05$),高剂量组的雌激素及孕酮均显著低于其它各组差异有统计学意义($P<0.05$)。HE染色发现PCOS大鼠给予高剂量Ox-HDL后,囊肿卵泡进一步增多,颗粒细胞排列较为疏松,大鼠卵巢病理症状有一定加剧。Hoechst33258凋亡染色检测发现高剂量组细胞凋亡水平显著高于其它各组($P<0.05$)。RT-PCR实验发现发现Ox-HDL可抑制颗粒细胞*Bcl-2*、*FSHR*、*StAR*基因的mRNA表达水平差异有统计学意义;Ox-HDL可促进颗粒细胞*Bax*基因的mRNA表达水平差异有统计学意义($P<0.05$)。Western blotting实验发现发现Ox-HDL可抑制颗粒细胞*Bcl-2*、*FSHR*、*StAR*蛋白表达水平;Ox-HDL可促进颗粒细胞*Bax*蛋白表达水平差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 Ox-HDL可促使PCOS大鼠卵巢病理症状加剧,诱导颗粒细胞发生凋亡,并导致颗粒细胞激素分泌能力紊乱。

[关键词] 氧化修饰高密度脂蛋白;颗粒细胞;激素分泌

Effects of oxidized high-density lipoprotein on the secretion of granulosa cells and related mechanisms in rats

MA Jinping, LI Hongjuan*, LI Yanmin

(Department of Gynecology, Zhengzhou Central Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan, China, 450000)

[ABSTRACT] **Objective** To study the effect of oxidized high density lipoprotein (Ox-HDL) on hormone secretion in rat granulosa cells and its mechanism. **Methods** Thirty SPF SD female rats of 6-week-old were fed for 5 days. PCOS rats were induced by progesterone antagonist mifepristone. Twenty-five female rats were randomly selected and subcutaneously injected once a day at a dose of 0.2 mL mifepristone (20 mg/mL) for 14 consecutive days. The other five female rats served as control group. Fifteen PCOS female rats were selected and divided into model group, low dose group and high dose group, with 5 rats in each group. The rats

基金项目:河南省高等学校重点科研项目计划(16A320015)

作者单位:郑州大学附属郑州中心医院妇科,河南,郑州 450000

*通信作者:李红娟, E-mail: 1252809522@qq.com

in the control group and the model group were injected with 0.05 mL saline by tail vein for 14 consecutive days. The low-dose group and the high-dose group were injected with 0.05 mL Ox-HDL solution (200 $\mu\text{mol/L}$ and 400 $\mu\text{mol/L}$ respectively) by tail vein every day for 14 consecutive days. The granulosa cells of rat ovary were collected. Elisa assay was used to detect the serum estrogen and progesterone levels in rats. HE staining was used to detect the effect of Ox-HDL on the pathological morphology of PCOS ovary. Hoechst33258 apoptotic staining was used to detect the effects of Ox-HDL on the apoptotic level of rat granulosa cells. RT-PCR was used to detect Ox-HDL on rat granulosa cells. Western blot was used to detect the effects of Ox-HDL on the expression of Bcl-2, FSHR, StAR and Bax genes in granulosa cells were detected. **Results** The estrogen and progesterone levels of rats were decreased after Ox-HDL treatment ($P<0.05$). The estrogen and progesterone levels in high dose group were 42.39 ± 4.31 pg/mL and 0.65 ± 0.04 ng/mL, respectively, which were significantly lower than those in other groups ($P<0.05$). HE staining showed that after high dose Ox-HDL was given to PCOS rats, the cyst follicles further increased, the arrangement of granulosa cells was looser, and the pathological symptoms of ovaries in rats were aggravated. Hoechst 33258 staining showed that the apoptotic level in high dose group was significantly higher than that in other groups ($P<0.05$). RT-PCR showed that Ox-HDL could inhibit the expression of Bcl-2, FSHR and StAR genes in granulosa cells ($P<0.05$), and Ox-HDL could promote the expression of Bax genes in granulosa cells ($P<0.05$). Western blot showed that Ox-HDL could inhibit the expression of Bcl-2, FSHR, StAR protein in granulosa cells ($P<0.05$), and Ox-HDL could promote the expression of Bax protein in granulosa cells ($P<0.05$). **Conclusion** Ox-HDL can inhibit the proliferation of rat granulosa cells, induce apoptosis of granulosa cells, and lead to the disorder of hormone secretion of granulosa cells.

[KEY WORDS] Oxidized high density lipoprotein; Granulosa cells; Hormone secretion

多囊卵巢综合征(polycystic ovarian syndrome, PCOS)是一种妇科常见的内分泌紊乱疾病,患者主要表现为卵巢多囊样病变、月经失调、不孕及性激素分泌异常等症状^[1]。PCOS的发病机制尚不明确,不同种族、生活习惯及遗传因素均可能刺激PCOS发生,有研究发现大部分PCOS患者身体肥胖,并伴发代谢综合征^[2]。高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL)是一种可转运胆固醇的脂蛋白,但该蛋白在铜离子、过氧化物酶等物质作用下易形成氧化修饰高密度脂蛋白(oxidative high density lipoprotein, Ox-HDL),促使卵巢颗粒细胞的胆固醇堆积,并导致细胞的内质网不能正常修饰蛋白质^[3]。有研究通过动物实验发现Ox-HDL可促使小鼠发生内分泌紊乱,对卵巢发育、性激素分泌产生影响,从而导致雌鼠不孕^[4]。由于已有研究发现PCOS患者的血清Ox-HDL水平异常上升,Ox-HDL可能与PCOS的疾病程度密切相关,探讨Ox-HDL水平对卵巢内分泌功能的作用对治疗PCOS有重要价值^[5]。目前Ox-HDL对PCOS的影响研究较少,本研究分析Ox-HDL对雌性大鼠卵巢颗粒细胞激素分泌的影响及相关机制,为治疗PCOS提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物及大鼠颗粒细胞制备

30只6周龄SPF级SD雌性大鼠购自河南省实验动物中心,动物合格证号:SCXK(豫)2005-2001,体重180~220 g,平均体重 205 ± 12 g。大鼠自由饮食,室温控制为 $(24\pm 2)^\circ\text{C}$,湿度为 $(55\pm 5)\%$ 。大鼠适应性喂养5天后,采用孕激素拮抗剂米非司酮进行PCOS大鼠造模:用橄榄油溶解米非司酮,调整浓度为20 mg/mL,随机选择25只雌鼠,每天对大鼠进行1次皮下注射,每次剂量0.2 mL,连续14 d。其余5只雌鼠正常饲养,作为对照组。PCOS大鼠标准:①雌鼠未排卵;②阴道涂片发现大鼠阴道有角化细胞。选择造模成功的15只雌鼠,分为模型组,低剂量组及高剂量组,每组5只。采用生理盐水溶解Ox-HDL,调整为2种浓度,分别为200 $\mu\text{mol/L}$, 400 $\mu\text{mol/L}$ 。对照组及模型组大鼠尾静脉注射注射0.05 mL生理盐水,连续14天。低剂量组每天尾静脉注射0.05 mL Ox-HDL溶液(200 $\mu\text{mol/L}$),高剂量组,每天尾静脉注射0.05 mL Ox-HDL溶液(400 $\mu\text{mol/L}$),连续14天。经脱颈椎处死大鼠,在无菌超净台取出侧卵巢,移入含预冷PBS的培养皿中,清洗后刺破卵巢成熟

卵泡,收集含有颗粒细胞的卵泡液,经200目细胞筛滤后,以1 200 rpm/min 转速离心6 min,弃上清后采用DMEM培养液重悬细胞,密度为 5×10^5 mL,置于37℃、5% CO₂条件培养。

1.2 主要试剂及仪器

DMEM培养基、胎牛血清购自美国Hyclone公司;孕马血清促性腺激素购自上海博升生物科技有限公司;RIPA裂解液购自上海钰博生物科技有限公司;细胞周期试剂盒购自上海翊圣生物科技有限公司;MTT试剂盒购自北京百奥莱博科技有限公司;BCA蛋白定量试剂盒购自美国赛默飞世尔科技公司;ELISA试剂盒购于南京森贝伽生物科技有限公司;流式细胞仪购自德国Partec公司;酶标仪购自北京普天新桥技术有限公司。

1.3 ELISA实验检测大鼠血清孕激素和雌激素分泌水平

按照ELISA试剂盒说明书操作然后在492 nm用酶标仪检测各孔OD值。

1.4 Ox-HDL对PCOS卵巢病理形态学观察

采用4%多聚甲醛固定卵巢样本24 h,经清水清洗后采用梯度酒精脱水,采用苏木精染液进行染色,染色时间控制为4 min左右,经1%盐酸分化后,通过蒸馏水清洗,直至细胞核变蓝,然后经伊红染液浸润15 min后经梯度酒精清洗5 min,通过二甲苯透明后进行盖片及封片。

1.5 Hoechst33258凋亡染色实验

将卵巢颗粒细胞种植于12孔板中,密度为每孔 1×10^5 个,置于37℃、5% CO₂条件培养。孵育48 h后,采用甲醇固定细胞5 min,然后每孔加入Hoechst33258溶液避光6 min,然后采用倒置荧光显微镜观察并拍照。

1.6 RT-PCR检测颗粒细胞凋亡基因以及激素相关基因表达水平

各组颗粒细胞经相应处理24 h后经TRIzol裂解液提取总RNA,采用Nanodrop分光光度法检测RNA质量,按照反转录方法合成cDNA^[6],按照Prime6.0软件设计引物,*Bcl-2*基因引物:上游:5'-CTGCACTGCACGTCTGCAC-3',下游:5'-CGTCACTGCAGTGCTCA-3';*Bax*基因引物:上游:5'-CTGCTCACTCACTGCACTC-3',下游:5'-TCGACTGCACTCCTAC-3';*FSHR*基因引物:上游:5'-CGTGCATGCATGCCATC-3',下游:5'-CTA-ACTGCGTCACTC-3';*StAR*基因引物:上游:5'-

TCGACTCATCACTGCACTC-3v,下游:5'-CTGACTGCATGCACTGC-3'。通过PCR方法扩增目的基因^[7],以*GAPDH*基因为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算目的基因的相对表达水平。

1.7 Western blot检测颗粒细胞凋亡蛋白以及激素相关蛋白水平

各组颗粒细胞经相应处理24 h后,通过RIPA裂解液提取总蛋白,并采用BCA法检测蛋白浓度。采用10% SDS-PAGE电泳分离蛋白^[8],采用湿转法将分离的蛋白电转至PVDF膜,经含5%脱脂奶粉的封闭液孵育1 h后,分别加稀释的Bcl-2、StAR、FSHR、StAR蛋白单抗,4℃摇床过夜后,加入HRP标记的二抗孵育1.5 h,采用ECL试剂显影,拍照后采用ImageJ软件分析目的条带灰度值。

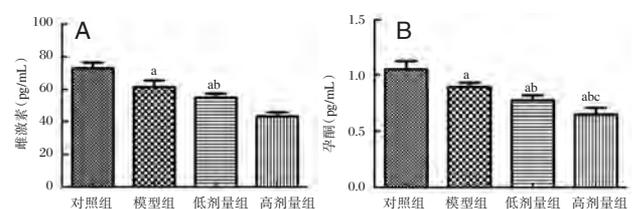
1.8 统计学分析

采用SPSS 19.0软件进行数据分析。计量资料均以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示。组间比较采用*t*检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Ox-HDL对PCOS大鼠血清雌激素及孕酮分泌的影响

本研究发现PCOS大鼠在Ox-HDL作用后,雌激素及孕酮水平均下降,高剂量组的雌激素及孕酮均显著低于其它各组差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图1。



注:A:各组血清雌激素水平;B:各组血清孕酮水平与对照组相比,^a $P < 0.05$;与模型组相比,^b $P < 0.05$;与低剂量组相比,^c $P < 0.05$ 。

图1 不同浓度Ox-HDL对PCOS大鼠血清雌激素及孕酮分泌的影响

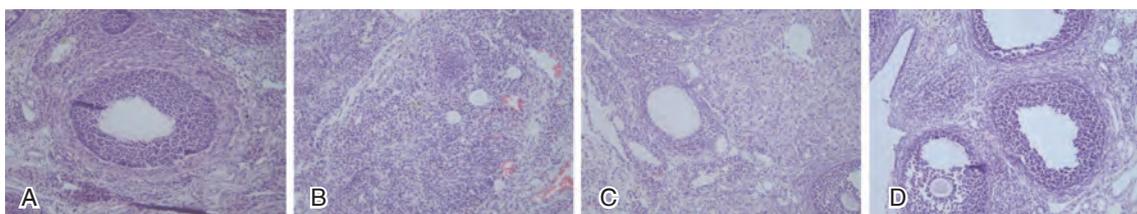
Figure 1 Effects of different concentrations of Ox-HDL on estrogen and progesterone secretion in rat ovarian granulosa cells

2.2 Ox-HDL对PCOS大鼠卵巢组织形态的影响

本研究经苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色发现正常大鼠卵巢组织黄体数和卵泡数量较多,颗粒细胞排列紧密,卵泡膜细胞层数较少。

PCOS 大鼠卵巢体积变大, 颗粒细胞排列疏松, PCOS 大鼠给予高剂量 Ox-HDL 后, 囊肿卵泡进一

步增多, 颗粒细胞排列较为疏松, 大鼠卵巢病理症状有一定加剧。见图 2。



注: A 为对照组大鼠卵巢组织形态; B 为模型组大鼠卵巢组织形态; C 为低剂量组大鼠卵巢组织形态; D 为高剂量组大鼠卵巢组织形态。

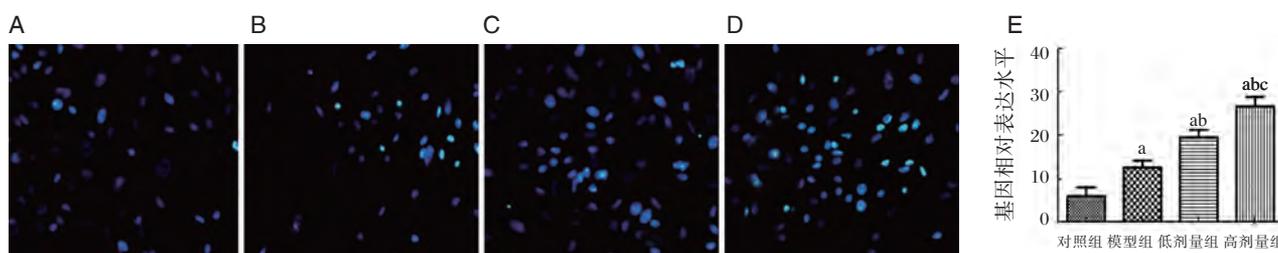
图 2 不同浓度 Ox-HDL 对 PCOS 大鼠卵巢形态的影响 (HE, ×40)

Figure 2 Effects of different concentrations of Ox-HDL on ovarian morphology in PCOS rats (HE, ×40)

2.3 Ox-HDL 对大鼠颗粒细胞凋亡能力的影响

Hoechst33258 凋亡染色检测发现高剂量组细胞凋亡水平显著高于其它各组差异有统计学意

义 ($P < 0.05$), 提示 Ox-HDL 可促进大鼠颗粒细胞的凋亡水平。见图 3。



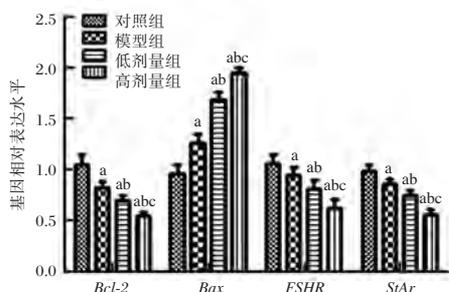
注: A 为对照组颗粒细胞凋亡能力检测; B 为模型组颗粒细胞凋亡能力检测; C 为低剂量组颗粒细胞凋亡能力检测; D 为高剂量组颗粒细胞凋亡能力检测; E 为各组细胞凋亡率; 与对照组相比, $^a P < 0.05$; 与模型组相比, $^b P < 0.05$; 与低剂量组相比, $^c P < 0.05$ 。

图 3 不同浓度 Ox-HDL 对大鼠卵巢颗粒细胞凋亡水平的影响

Figure 3 Effects of different concentrations of Ox-HDL on apoptotic level of ovarian granulosa cells in rats

2.4 Ox-HDL 对大鼠颗粒细胞凋亡及激素分泌相关基因的影响

RT-PCR 实验发现发现 Ox-HDL 可抑制颗粒细胞 *Bcl-2*、*FSHR*、*StAR* 基因的 mRNA 表达水平 ($P < 0.05$); Ox-HDL 可促进颗粒细胞 *Bax* 基因的 mRNA 表达水平差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 4。



注: 与对照组相比, $^a P < 0.05$; 与模型组相比, $^b P < 0.05$; 与低剂量组相比, $^c P < 0.05$ 。

图 4 不同浓度 Ox-HDL 对大鼠卵巢颗粒细胞凋亡及激素分泌相关基因的影响

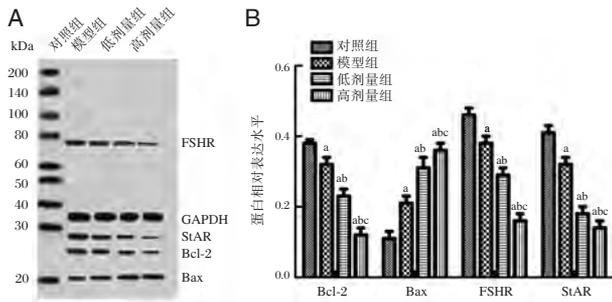
Figure 4 Effects of different concentrations of Ox-HDL on apoptosis of ovarian granulosa cells and hormone secretion-related genes in rats

2.5 Ox-HDL 对大鼠颗粒细胞凋亡及激素分泌相关蛋白的影响

Western blotting 实验发现发现 Ox-HDL 可抑制颗粒细胞 *Bcl-2*、*FSHR*、*StAR* 蛋白表达水平 ($P < 0.05$); Ox-HDL 可促进颗粒细胞 *Bax* 蛋白表达水平 ($P < 0.05$)。见图 5。

3 讨论

PCOS 是临床发病率较高的妇科疾病, 大部分患者糖脂代谢异常, 且性激素分泌紊乱^[9]。PCOS 的发病机制较为复杂, 已有研究发现胰岛素抵抗及代偿性高胰岛素血症是诱发 PCOS 发生的重要因素^[10]。HDL 是一种有重要生理功能的脂蛋白, 其中载脂蛋白 A-1 是 HDL 的主要组成部分, 主要参与机体的胆固醇运载、抗氧化及调节内分泌等代谢活动^[11]。HDL 在过氧化物酶、超氧化物阴离子等物质作用下易发生氧化修饰, 形成大量的 Ox-HDL, 对颗粒细胞的生理功能产生影响。Kolesarova A 等^[12]研究发现 PCOS 大鼠体内的 Ox-HDL



注:A. 颗粒细胞中相关蛋白电泳图; B. 颗粒细胞中相关蛋白相对水平,与对照组相比,^a $P<0.05$;与模型组相比,^b $P<0.05$;与低剂量组相比,^c $P<0.05$ 。

图5 不同浓度Ox-HDL对大鼠卵巢颗粒细胞凋亡及激素分泌相关蛋白的影响

Figure 5 Effects of different concentrations of Ox-HDL on apoptosis of ovarian granulosa cells and hormone secretion-related proteins in rats

水平显著高于健康大鼠,并与PCOS的疾病程度密切相关。

有研究发现Ox-HDL可下调猪卵巢颗粒细胞培养液中孕酮的分泌水平,但未阐明Ox-HDL通过何种途径抑制孕酮的合成^[13]。本研究结果说明Ox-HDL不仅可导致大鼠卵巢病理症状加剧,同时激活细胞内的凋亡机制,导致巢颗粒细胞数量下降。PCOS的病理发生机制较为复杂,有研究仅以卵巢颗粒细胞为研究模型分析Ox-HDL对细胞激素分泌的影响,不足以充分说明Ox-HDL对PCOS的作用效果^[14]。有研究发现PCOS患者血清雌激素及孕酮水平与体内的Ox-HDL水平有一定相关性^[15]。本研究通过Western Blotting实验证实Ox-HDL可诱发颗粒细胞发生凋亡。这表明Ox-HDL可能通过促进颗粒细胞凋亡减少血清雌激素及孕酮水平,由于动物实验中Ox-HDL通过静脉注射进入大鼠血液系统,并不是直接作用于大鼠颗粒细胞,因而需进一步分析Ox-HDL对颗粒细胞促凋亡的机制。FSHR、StAR是调节颗粒细胞分泌性激素的重要基因,可刺激cAMP/PKA信号通路激活,从而促进雌激素及孕酮的合成^[16]。本研究结果显示Ox-HDL可抑制颗粒细胞的FSHR、StAR基因的表达,提示Ox-HDL可有效抑制颗粒细胞的激素合成。

综上所述,Ox-HDL可PCOS大鼠卵巢病理症状加剧,促进颗粒细胞凋亡水平上升,并干扰性激素分泌相关基因的表达,从而对卵巢性激素分泌功能产生危害,为临床治疗PCOS提供实验参考。

参考文献

- [1] 刘贝,周惠芳,周伯如,等. 补肾助孕方对大鼠垂体细胞促性腺激素的调节[J]. 医学研究生学报, 2018, 31(7):703-708.
- [2] 赵敏,连小龙,刘景楠,等. 不同施加因素对下丘脑-垂体-卵巢轴调节作用的实验研究概况[J]. 甘肃中医药大学学报, 2018, 35(03):92-96.
- [3] 马双,宋鹏琰,翟福展,等. 孕鼠暴露双酚A对仔鼠存活率、生殖激素及相关基因的影响[J]. 中国畜牧兽医, 2017, 44(7):2033-2041.
- [4] 郭保平,徐明龙,胡进,等. DHEA诱导雌性大鼠PCOS模型早期性器官及其相关激素变化的研究[J]. 畜牧兽医学报, 2015, 46(08):1348-1355.
- [5] 荣霞,杨炳,余丽梅,等. 不同来源间充质干细胞治疗卵巢早衰的作用及机制研究进展[J]. 山东医药, 2018, 58(40):106-110.
- [6] Hossein G, Khanmohammadi M, Sahranavard FP, et al. Exogenous secreted frizzled-related protein-4 modulates steroidogenesis of rat granulosa cells through Wnt/ β -catenin and PI3K/AKT signaling pathways [J]. Avicenna J Med Biotechnol, 2016, 8(4):159-168.
- [7] Li H, Zhang C, Ni F, et al. Gestational N-hexane inhalation alters the expression of genes related to ovarian hormone production and DNA methylation states in adult female F1 rat offspring[J]. Toxicol Lett, 2015, 239(3):141-151.
- [8] 蔡静,张丹,张燕. 香芹酚拮抗大鼠卵巢储备化疗损伤的功能[J]. 中华生殖与避孕杂志, 2017, 37(11):904-909.
- [9] 马淑月,张树峰,佟继铭,等. 大黄不同萃取物对大鼠子宫卵巢形态结构及血清中P、T、E₂激素水平的影响[J]. 中药药理与临床, 2017, 33(3):91-94.
- [10] 杨琳,马红. 不同浓度的二仙汤及其拆方对大鼠卵泡颗粒细胞凋亡因子影响的比较研究[J]. 中华中医药学刊, 2016, 34(12):3013-3017.
- [11] Ma Y, Gong YJ, Xu QQ, et al. Molecular mechanism of mercuric chloride inhibiting progesterone secretion in ovarian granulosa cells of laying hens [J]. J Anim Physiol Anim Nutr (Berl), 2018, 102(6):1533-1542.
- [12] Kolesarova A, Medvedova M, Halenar M, et al. The influence of deoxynivalenol and zearalenone on steroid hormone production by porcine ovarian granulosa cells in vitro [J]. J Environ Sci Health B, 2017, 52(11):823-832.
- [13] 梁策,高慧,张腾. 补肾调冲方对卵巢早衰大鼠性激素水平和卵巢Bcl-2/Bax表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(19):100-104.
- [14] 李燕,李肖梅. 逍遥散加减方对高催乳激素血症大鼠卵巢颗粒细胞增殖和细胞周期的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(19):88-91.
- [15] Lei L, Han F, Cui Q, et al. IRS2 depletion inhibits cell proliferation and decreases hormone secretion in mouse granulosa cells [J]. J Reprod Dev, 2018, 64(5):409-416.
- [16] Itami N, Munakata Y, Shirasuna K, et al. Promotion of glucose utilization by insulin enhances granulosa cell proliferation and developmental competence of porcine oocyte grown in vitro [J]. Zygote, 2017, 25(1):65-74.

· 论 著 ·

结肠癌血清 IGF-1 水平及肿瘤组织中 VEGF-C、VEGFR-3 表达与淋巴结转移的相关性研究

杨秀成¹ 于琼² 巩林强¹ 杨艳^{1*}

【摘要】 **目的** 探讨结肠癌血清胰岛素生长因子1(IGF-1)水平及肿瘤组织中血管内皮生长因子-C(VEGF-C)、血管内皮生长因子受体3(VEGFR-3)表达与微淋巴管生成以及淋巴结转移的相关性。**方法** 收集60例结肠癌和60例结肠腺瘤患者血清样本和组织标本,分为结肠癌组和结肠腺瘤组,同一结肠癌组织标本癌旁正常组织作为癌旁正常组。另选取60例体检健康者作为健康组,健康组收集血清作为对照。比较各组血清IGF-1水平,组织中VEGF-C、VEGFR-3表达水平以及微淋巴管密度(LMVD)值,并分析其与结肠癌病理特征关系以及相互间关系。**结果** 结肠癌组血清IGF-1水平显著高于结肠腺瘤组和健康组;结肠癌组中VEGF-C、VEGFR-3表达水平以及LMVD值均显著高于结肠腺瘤组和癌旁正常组,差异有统计学意义(P 均 <0.05);血清IGF-1水平,组织中VEGF-C、VEGFR-3表达水平以及LMVD值均与浸润程度和淋巴结转移有关,差异有统计学意义(P 均 <0.05),与性别、年龄无关,差异无统计学意义($P>0.05$);IGF-1与VEGF-C、VEGFR-3及LMVD均呈正相关($r=0.68$, $r=0.66$, $r=0.55$, $P<0.05$),VEGF-C和VEGFR-3与LMVD均呈正相关($r=0.60$, $r=0.62$, $P<0.05$)。**结论** 结肠癌血清IGF-1水平与组织VEGF-C、VEGFR-3阳性表达均明显上调,共同参与微淋巴管生成以及淋巴结转移,促进结肠癌发生发展。

【关键词】 结肠癌; IGF-1; VEGF-C; VEGFR-3; 淋巴结转移

Correlation between serum IGF-1 level in colon cancer, expression levels of VEGF-C and VEGFR-3 in tumor tissues and lymph node metastasis

YANG Xiucheng¹, YU Qiong², GONG Linqiang¹, YANG Yan^{1*}

(1. Department of Gastroenterology, Tengzhou Central People's Hospital, Zaozhuang, Shandong, China, 277500; 2. Department of Pathology, Zaozhuang Mining Group Central Hospital, Zaozhuang, Shandong, China, 277000)

【ABSTRACT】 **Objective** To explore the correlation between the level of serum insulin growth factor 1 (IGF-1) in colon cancer, the expression levels of vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) and vascular endothelial growth factor receptor 3 (VEGFR-3) in tumor tissues and lymphangiogenesis and lymph node metastasis. **Methods** Serum samples and tissues specimens were collected from 60 patients with colon cancer and 60 patients with colon adenoma, and they were divided into colon cancer group and colon adenoma group. And the normal adjacent tissues of the same colon cancer tissue specimens were served as normal adjacent group. Another 60 healthy examiners were enrolled as healthy group, and the serum was collected as control in healthy group. The serum IGF-1 level, expression levels of VEGF-C and VEGFR-3 and lymphatic microvessel density (LMVD) value were compared among the groups. And their relationship with pathological features of colon cancer and their interrelation were analyzed. **Results** The serum IGF-1 level in colon

基金项目:山东省医药卫生科技发展计划资助项目(2017WSA04070)

作者单位:1.滕州市中心人民医院消化内科,山东,枣庄 277500

2.枣庄矿业集团中心医院病理科,山东,枣庄 277000

*通信作者:杨艳, E-mail: jiejiyingyue@sina.com

cancer group was significantly higher than that in colon adenoma group and healthy group ($P<0.05$). The expression levels of VEGF-C and VEGFR-3 and LMVD value in colon cancer group were significantly higher than those in colon adenoma group and normal adjacent group (all $P<0.05$). The serum IGF-1 level, expression levels of VEGF-C and VEGFR-3 in tissues and LMVD value were related to the invasion degree and lymph node metastasis (all $P<0.05$), but were not related to gender and age ($P>0.05$). IGF-1 was positively correlated with VEGF-C, VEGFR-3 and LMVD ($r=0.68$, $r=0.66$, $r=0.55$, $P<0.05$), and VEGF-C and VEGFR-3 were positively correlated with LMVD ($r=0.60$, $r=0.62$, $P<0.05$). Conclusions Serum IGF-1 level in colon cancer and positive expression levels of VEGF-C and VEGFR-3 in tissues are significantly up-regulated, and they jointly participate in lymphangiogenesis and lymph node metastasis, and promote the occurrence and development of colon cancer.

[KEY WORDS] Colon cancer; IGF-1; VEGF-C; VEGFR-3; Lymph node metastasis

结肠癌是消化道常见恶性肿瘤之一,发病率仅次于肺癌和乳腺癌,其发生原因与饮食、环境、种族、遗传等多种因素有关^[1]。血管内皮生长因子-C (vascular endothelial growth factor-C, VEGF-C) 是 VEGF 家族中的成员之一,血管内皮生长因子受体 3 (vascular endothelial growth factor receptor3, VEGFR-3) 是酪氨酸激酶家族成员之一,胚胎发育早期在心血管系统中表达,成年之后,仅在淋巴内皮上表达^[2],而在结直肠正常组织中检测不到表达^[3]。胰岛素生长因子 1 (Insulin-like growth factor 1, IGF-1) 是一种具有细胞增殖调控作用的低分子多肽,在多种恶性肿瘤中呈高表达状态,并参与肿瘤细胞的增殖、转移过程^[4]。本研究通过检测结肠癌患者血清 IGF-1 水平及肿瘤组织中 VEGF-C、VEGFR-3 表达情况,分析三者间关系,以期对结肠癌患者预后提供一定参考依据。

1 材料与方法

1.1 样本收集

血清样本和组织标本均来自于 2016 年 5 月至 2017 年 7 月本院接受手术治疗的 60 例结肠癌患者和 60 例结肠腺瘤患者,分别作为结肠癌组和结肠腺瘤组,同一结肠癌组织标本癌旁正常组织作为癌旁正常组。结肠癌和癌旁正常组中,男 36 例,女 24 例,年龄 46~77 岁,平均(61.22±7.68)岁;结肠腺瘤组中,男 33 例,女 27 例,年龄 45~75 岁,平均(62.18±6.25)岁。另选取 60 例体检健康者作为健康组,其中男性 35 例,女性 25 例,年龄 44~78 岁,平均(61.82±7.36)岁,3 组性别、年龄差异无统计学意义($P>0.05$)。健康组收集血清作为对照,血清样本贮存于-80°冰箱备用。结肠癌组、结肠腺瘤组、癌旁正常组的组织标本采用福尔马林固定,石

蜡包埋后备用。本实验经本院伦理委员会批准同意,所有患者均签署知情同意书。

结肠癌组纳入标准:①经肠镜活检或手术检查确诊;②符合《常见消化系肿瘤诊治学》^[5]中结肠癌诊断标准。排除标准:①术前接受相关治疗;②肛管癌、结直肠多发性息肉者;③有手术禁忌证者;④处于妊娠期或哺乳期者。

结肠腺瘤组纳入标准:①均采用手术切除治疗;②符合《常见消化系肿瘤诊治学》^[5]中结肠腺瘤诊断标准。排除标准:①合并肾功能障碍、陈旧性心肌梗死、冠心病者;②严重溃疡性结肠炎者;③伴有肠内容物潴留者;④处于妊娠期或哺乳期者。

1.2 主要试剂

兔抗人 VEGF-C 多克隆抗体(E-AB-33567)购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司;兔抗人 VEGFR-3 多克隆抗体(bs-1083R-1)购自上海恒斐生物科技有限公司;鼠抗人 D2-40 单克隆抗体(ZM-0465)购自北京中杉金桥生物技术有限公司;即用型快捷免疫组化 MaxVision™ 试剂盒(KIT-5002)购自福州迈新生物技术开发有限公司;二氨基联苯胺(3,3'-diaminobenzidine, DAB)显色试剂盒(ZLI-9019-10ML)购自北京中杉金桥生物技术有限公司;IGF-1 酶联免疫吸附试剂盒(XNDW36)购自上海旭年生物科技有限公司。

1.3 IGF-1 检测方法

采集受试者清晨空腹静脉血 5 mL,获取血清,根据酶联免疫吸附试剂盒说明书步骤检测血清 IGF-1 水平。

1.4 免疫组化方法

石蜡连续切片,厚度控制在 4~5 μm 作用,采用 3%过氧化氢处理 10 min 左右,将内源性过氧化

物酶阻断。磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)冲洗干净后,热修复 15 min。PBS 冲洗 3 次,一抗 4℃ 封闭过夜, PBS 冲洗干净后,二抗常温下孵育 20 min。然后 PBS 充分冲洗,二氨基联苯胺(3, 3'-diaminobenzidine, DAB)显色后采用苏木素复染。最后脱水、透明、封片,进行镜检。

结果判定^[6]:在肿瘤区选取 5 个视野,根据阳性细胞所占比例评分,低于 5% 为 0 分,6%~25% 为 1 分,26%~50% 之间为 2 分,51%~75% 为 3 分,75% 以上为 4 分;根据染色强度评分,不着色为 0 分,浅棕黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分。通过两者乘积判断结果,即 0~4 分为阴性,5 分以上为阳性。

1.5 微淋巴管密度(micro-lymphatic vessel density, LMVD)的判定

D2-40 阳性产物表达于淋巴管内皮细胞胞浆及细胞膜,按照 Weidner 法计算 LMVD,先于低倍镜下选取热点,然后调整至 200 倍镜,选取 4 个视野计算微淋巴管总数,LMVD 值取其均值^[7]。

1.6 统计学分析

采用 SPSS 21.0 软件进行分析,计量数据用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析计数资料用 % 表示,行 χ^2 检验,多组之间两两比较采用卡方分割比较。相关性分析采用 Spearman 等级相关分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组血清 IGF-1 水平比较

3 组间血清 IGF-1 水平比较,结肠癌组血清 IGF-1 水平显著高于结肠腺瘤组和健康组差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

表 1 各组血清 IGF-1 水平比较 $[(\bar{x} \pm s)]$

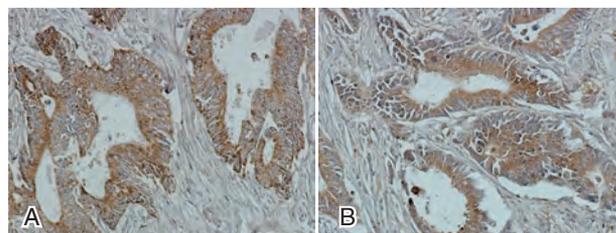
Table 1 Comparison of serum IGF-1 level in each group $[(\bar{x} \pm s)]$

组别	<i>n</i>	IGF-1 (ng/mL)
结肠癌组	60	145.83±18.32 ^{ab}
结肠腺瘤组	60	123.27±12.30
健康组	60	82.52±7.38
<i>F</i> 值		49.538
<i>P</i> 值		0.000

注:结肠癌组与健康组比较, $q=24.829$, $^aP=0.000$, 结肠癌组与结肠腺瘤组比较, $q=7.919$, $^bP=0.000$ 。

2.2 各组 VEGF-C 和 VEGFR-3 表达情况比较

结肠癌组的细胞胞质中可见棕黄色染色颗粒, VEGF-C 和 VEGFR-3 表达呈阳性,见图 1A, 图 1B。3 组间 VEGF-C 和 VEGFR-3 阳性表达比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),结肠癌组 VEGF-C 和 VEGFR-3 阳性表达率明显高于结肠腺瘤组和癌旁组($P < 0.05$)。见表 2。



注:A. 结肠癌肿瘤组织中 VEGF-C 呈阳性表达; B. 结肠癌肿瘤组织中 VEGFR-3 呈阳性表达。

图 1 结肠癌肿瘤组织中 VEGF-C 和 VEGFR-3 呈阳性表达 (SP 法, 200×)

Figure 1 Positive expressions of VEGF-C and VEGFR-3 in colon cancer tumor tissues (SP 法, 200×)

表 2 各组 VEGF-C 和 VEGFR-3 表达情况比较 $[n(\%)]$

Table 2 Comparison of expressions of VEGF-C and VEGFR-3 in each group $[n(\%)]$

组别	<i>n</i>	VEGF-C 阳性	VEGFR-3 阳性
结肠癌组	60	37 (61.67) ^{ab}	35 (58.33) ^{ab}
结肠腺瘤组	60	15 (25.00)	12 (20.00)
癌旁组	60	0 (0.00)	0 (0.00)
χ^2 值		56.201	54.652
<i>P</i> 值		0.000	0.000

注: VEGF-C 阳性: 结肠癌组与癌旁组比较, $\chi^2=53.490$, $^aP=0.000$, 结肠癌组与结肠腺瘤组比较, $\chi^2=16.433$, $^bP=0.000$; VEGFR-3 阳性: 结肠癌组与癌旁组比较, $\chi^2=49.412$, $^aP=0.000$, 结肠癌组与结肠腺瘤组比较, $\chi^2=18.502$, $^bP=0.000$ 。

2.3 结肠癌组血清 IGF-1 水平、组织 VEGF-C 和 VEGFR-3 表达与病理特征关系

结肠癌患者血清 IGF-1 水平与肿瘤直径、分化程度、浸润程度和淋巴结转移有关, 结肠癌肿瘤组织 VEGF-C 阳性表达与分化程度、浸润程度和淋巴结转移有关, 结肠癌肿瘤组织 VEGFR-3 阳性表达与浸润程度和淋巴结转移有关差异具有统计学意义($P < 0.05$), 见表 3。

2.4 LMVD 值与结肠癌病理特征关系

淋巴管在肿瘤组织中分布不均, 肿瘤边缘区域的 LMVD 明显高于肿瘤内部区域, 且边缘区域淋巴管形态不一, 多呈扩张状态, 而内部区域淋巴

表3 结肠癌组血清 IGF-1 水平、组织 VEGF-C 和 VEGFR-3 表达与病理特征关系 [(n(%)), ($\bar{x} \pm s$)]
Table 3 Relationship between serum IGF-1 level, expressions of VEGF-C and VEGFR-3 in tissues and pathological features in colon cancer group [(n(%)), ($\bar{x} \pm s$)]

病理特征		n	IGF-1 (ng/mL)	P 值	VEGF-C 阳性	P 值	VEGFR-3 阳性	P 值
性别	男	36	147.28±15.84	0.405	23 (63.89)	0.665	22 (61.11)	0.593
	女	24	143.93±14.05		14 (58.33)		13 (54.17)	
年龄(岁)	<60	15	144.28±13.04	0.508	9 (60.00)	0.878	9 (60.00)	0.880
	≥60	45	146.63±16.22		28 (62.22)		26 (57.78)	
肿瘤直径(cm)	<5	23	139.54±14.89	0.000	13 (56.52)	0.518	11 (47.83)	0.193
	≥5	37	156.32±16.21		24 (64.86)		24 (64.86)	
分化程度	高、中分化	49	136.93±17.66	0.002	27 (55.10)	0.027	27 (55.10)	0.284
	低分化	11	155.52±13.47		10 (90.01)		8 (72.72)	
浸润程度	T1-T2	41	132.05±17.34	0.000	21 (51.22)	0.014	20 (48.78)	0.027
	T3-T4	19	156.20±13.94		16 (84.21)		15 (78.95)	
淋巴结转移	有	37	158.73±15.96	0.000	28 (75.68)	0.005	26 (70.27)	0.017
	无	23	133.29±14.31		9 (39.13)		9 (39.13)	

管多表现为无腔、条索状,为无功能型。结肠癌组 LMVD 值为(3.86±1.14),结肠腺瘤组 LMVD 值为(1.45±0.41),癌旁组 LMVD 值为(0.76±0.16),结肠癌组 LMVD 值明显高于结肠腺瘤组和癌旁组($q_1=15.409, q_2=20.859, P<0.05$)。LMVD 值与结肠癌浸润程度和淋巴结转移有关($P<0.05$),见表4。

表4 LMVD 值与结肠癌病理特征关系
Table 4 Relationship between LMVD value and pathological features of colon cancer

病理特征		n	LMVD	P 值
性别	男	36	3.93±1.20	0.677
	女	24	3.80±1.14	
年龄(岁)	<60	15	3.78±1.09	0.408
	≥60	45	3.92±1.17	
肿瘤直径(cm)	<5	23	3.74±1.18	0.599
	≥5	37	3.91±1.23	
分化程度	高、中分化	49	3.84±1.36	0.837
	低分化	11	3.93±1.02	
浸润程度	T1-T2	41	3.06±1.41	0.000
	T3-T4	19	4.48±1.25	
淋巴结转移	有	37	4.76±1.17	0.000
	无	23	2.77±0.93	

2.5 血清 IGF-1 与组织 VEGF-C、VEGFR-3 及 LMVD 的相关性分析

IGF-1 与 VEGF-C、VEGFR-3 及 LMVD 均呈正相关($r=0.68, r=0.66, r=0.55, P<0.05$), VEGF-C

和 VEGFR-3 与 LMVD 均呈正相关($r=0.60, r=0.62, P<0.05$)。

3 讨论

随着饮食结构和生活习惯的改变,结肠癌发病率呈逐年上升趋势,我国新发病例约为1.3万^[8]。手术治疗是结肠癌的主要治疗方法,并辅以免疫、化疗、中药等综合治疗方案。治疗后1~3年内,许多患者会出现肿瘤转移或复发,而肿瘤的转移和复发与肿瘤侵袭、转移密切相关^[9]。许多研究证实微血管的形成可促进肿瘤侵袭、转移^[10],但关于微淋巴管形成对肿瘤发生发展的影响尚需进一步探究。

IGF-1 是由肝脏合成的具有细胞增殖和凋亡调控作用的多肽类生长因子,动物实验表明,IGF-1 基因缺失的结直肠癌小鼠与对照组小鼠相比,肿瘤生长缓慢,发病率明显降低,说明 IGF-1 在肿瘤的发生过程中起到促进作用^[11]。本研究结果显示与田晓慧等人^[12]研究结果一致。分析原因可能是 IGF-1 通过与其受体结合激活酪氨酸酶活性,启动 PI3K/AKT 和 MAPK 信号通路,进而促进癌细胞增殖分化,抑制癌细胞凋亡^[13]。本研究进一步分析结果显示,肿瘤直径≥5 cm、低分化、浸润程度深、有淋巴结转移的血清 IGF-1 水平明显较高,说明较高血清水平的 IGF-1 可促进肿瘤生长、浸润与淋巴结转移。

在淋巴管生成和淋巴结转移研究中,VEGF-C 和 VEGFR-3 为热门研究因子。本研究发现 VEGF-

C和VEGFR-3在结肠癌肿瘤组织中均表达上调,且浸润程度较深和伴有淋巴结转移的患者VEGF-C和VEGFR-3阳性率均明显高于浸润程度浅、无淋巴结转移患者,提示VEGF-C和VEGFR-3可促进结肠癌的侵袭和转移过程,与在食管癌^[14]、胃癌^[15]等研究中结果一致。

本研究发现,结肠癌组LMVD值明显高于结肠腺癌组,且浸润程度深、伴有淋巴结转移组织中LMVD值较浸润程度浅和无淋巴结转移组织中LMVD值较高,提示LMVD值与结肠癌淋巴结转移密切相关。因为肿瘤边缘区域淋巴管管壁基底膜不连续,肿瘤细胞易进入新生淋巴管,有利于肿瘤细胞的淋巴结转移^[16]。张泽进等人^[17]相关研究显示,结肠癌组织VEGFR-C、VEGFR-3与LMVD呈正相关,本研究与上述研究结果一致。IGF-1与淋巴结转移有关,但是否与LMVD及VEGF-C和VEGFR-3表达存在一定联系,国内尚未见相关文献报道。本研究结果显示,IGF-1与VEGF-C、VEGFR-3及LMVD均呈正相关,推测可能与IGF-1通过与其受体结合激活PI3-K信号通路,诱导VEGF-C表达上调有关,而VEGF-C作为淋巴生成的关键因素,可激活VEGFR-3以及后续一系列信号传导通路,促进淋巴管内皮增殖,在肿瘤边缘区域形成新生微淋巴管,提高淋巴结转移发生率^[18-19]。

综上所述,结肠癌血清IGF-1水平以及组织中VEGF-C和VEGFR-3表达均明显升高,高血清水平的IGF-1和VEGF-C和VEGFR-3的阳性表达与结肠癌淋巴结转移密切相关,所以结肠癌血清IGF-1水平的检测可在术前一定程度评估结肠癌恶化程度,且血清学检测操作简单方便,可能可作为预测肿瘤发生发展的新的生物标志物。另外IGF-1、VEGF-C和VEGFR-3互呈正相关,共同促进微淋巴管形成,阻断IGF-1水平的升高可能成为减少VEGF-C和VEGFR-3表达,抑制结肠癌发展的新途径。

参考文献

[1] 孙小莉,曹晓侠,丁晓明,等. 宝鸡地区80例结肠癌患者发病危险因素研究[J]. 现代生物医学进展, 2016, 16(23):4505-4507.

[2] 赵静,王晓蕾. 激活VEGF-C/VEGFR-3信号通路调控淋巴管生成对慢性结肠炎的影响[J]. 国际消化病杂志, 2016, 36(3):182-184.

[3] Sakima M, Hayashi H, Mamun A A, et al. VEGFR-3 signaling is regulated by a G-protein activator, activator of G-protein signaling 8, in lymphatic endothelial cells [J]. *Exper-*

mental Cell Research, 2018, 368(1):13-23.

[4] 许丹丹,王茹瑶,刘蕊,等. 循环IGF-1水平与结直肠癌临床病理因素的相关性[J]. 检验医学, 2017, 32(1):1-4.

[5] 贾鑑慧. 常见消化系肿瘤诊治学[M]. 辽宁科学技术出版社, 2014.

[6] 沈成龙,周国强,姚一舟,等. MMP-2、MMP-14及VEGF-C在结肠癌组织中的表达及其临床意义[J]. 现代免疫学, 2016, 36(1):21-26.

[7] 蒋华锋,应晓江,陈洪亮,等. 大肠癌中血管内皮生长因子-A的表达与淋巴管密度、微血管密度的关系研究[J]. 中华全科医学, 2016, 14(11):1870-1872.

[8] Liu YC, Park YR, Kim SL, et al. MicroRNA-30a inhibits colorectal cancer metastasis through down-regulation of type I insulin-like growth factor receptor [J]. *Digestive Diseases & Sciences*, 2017, 62(11):1-10.

[9] Yosry A, Omran D, Yousef M, et al. SNPs in the insulin-like growth factor gene and obesity impact on colorectal cancer in egyptians [J]. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention Apjcp*, 2017, 18(11):2959-2964.

[10] 武雪亮,王立坤,薛军,等. DNA结合分化抑制蛋白1和血管内皮生长因子的表达及其与肿瘤微血管生成的相关性研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2016, 32(5):430-432.

[11] Tarantini S, Valcarcelares NM, Yabluchanskiy A, et al. Insulin-like growth factor I deficiency exacerbates hypertension-induced cerebral microhemorrhages in mice, mimicking the aging phenotype [J]. *Aging Cell*, 2017, 16(3):469-479.

[12] 田晓慧,胡斌,秦溶,等. 血清IGF-1水平及癌组织VEGF表达在结肠癌患者诊断和治疗中的临床意义[J]. 实用临床医药杂志, 2014, 18(3):9-11.

[13] Ding J, Li C, Tang J, et al. Higher expression of proteins in IGF/IR axes in colorectal cancer is associated with type 2 diabetes mellitus [J]. *Pathology & Oncology Research*, 2016, 22(4):773-779.

[14] 曾芸珠,魏晓龙,祝建玲. 联合检测survivin、VEGF-C和VEGFR-3蛋白表达水平在食管癌诊治中的意义[J]. 诊断病理学杂志, 2018, 25(2):118-121.

[15] 修丽娟,刘龙,刘焯,等. 胃癌组织中VEGF-C、VEGF-D、VEGFR-3蛋白表达及其临床意义[J]. 第二军医大学学报, 2017, 38(11):1458-1461.

[16] Huang C, Chen Y. Lymphangiogenesis and colorectal cancer [J]. *Saudi Medical Journal*, 2017, 38(3):237-244.

[17] 张泽进,张东卫,谭莹. 结肠癌VEGF-C表达与淋巴管生成、淋巴结转移的关系[J]. 中华全科医学, 2013, 11(6):867-869.

[18] Zygoń J, Szajewski M, Kruszewski WJ, et al. VEGF, Flt-1, and microvessel density in primary tumors as predictive factors of colorectal cancer prognosis [J]. *Molecular & Clinical Oncology*, 2017, 6(2):243-248.

[19] 黄伟,刘文清,李静. 鼻咽癌VEGF-C及VEGFR-3的表达与其淋巴结转移的关系[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2009, 1(3):179.

云南省婴儿期不同民族高非结合性胆红素血症 *UGT1A1* 基因多态性研究

奎莉越* 王明英 周百灵 李莉 贺晓莉 世淑兰 沈茹

[摘要] **目的** 研究云南省婴儿期不同民族高非结合性胆红素血症 *UGT1A1* 基因多态性研究。**方法** 收集怒江、保山、临沧、迪庆云南边界地区 2018 年 1 月至 2019 年 11 月就诊于本院新生儿科及消化内科门诊确诊的 GS 和 CNS 患儿 67 例(观察组,基因检测均阳性),并选取同期健康体检婴儿 67 例作为对照组。比较两组 *UGT1A1* 基因突变位点基因型与等位基因频率分布,采用 Spearman 分析 *UGT1A1* 基因突变与非溶血性非结合型高胆红素血症的相关性,比较不同性别、民族患儿 *UGT1A1* 基因变异谱。**结果** 观察组 c.211G>A、c.1456T>G、c.1061C>T 位点突变率分别为 62.69%、62.69%、47.77%,高于对照组的 14.93%、2.99%、7.46%($P<0.05$),组间基因型频率和等位基因频率比较,差异具有统计学意义($P<0.05$)。c.211G>A、c.1456T>G、c.1061C>T 杂合与纯合突变均与非溶血性非结合型高胆红素血症呈正相关($P<0.05$);汉族患儿 c.211G>A、c.1456T>G、c.1061C>T 杂合突变型均高于少数民族患儿,汉族患儿 c.1456T>G 纯合突变型频率低于少数民族患儿($P<0.05$)。**结论** 云南地区婴儿期高非结合性胆红素血症发病与 *UGT1A1* 基因 c.211G>A、c.1456T>G、c.1061C>T 位点突变有关,c.1456T>G 纯合突变集中体现在少数民族中,c.211G>A、c.1456T>G、c.1061C>T 复合杂合突变致病主要集中在汉族人群。

[关键词] *UGT1A1* 基因;云南儿童; Gilbert 综合征; Crigler-Najjjar 综合征

Study on the Polymorphism of *UGT1A1* Gene in Unconjugated Hyperbilirubinemia of Different Nationalities in Yunnan Province during Infancy

KUI Liyue, WANG Mingying, ZHOU Bailing, LI Li HE Xiaoli, SHI Shulan, SHEN Ru

(Department of clinical laboratory Kunming Children's hospital, Kunming, Yunnan, China 560000)

[ABSTRACT] **Objective** To study the Unconjugated hyperbilirubinemia *UGT1A1* gene polymorphism in different ethnic groups in Yunnan Province during infancy. **Methods** A total of 67 infants with GS and CNS diagnosed in the neonatal and digestive medicine clinics of our hospital from January 2018 to November 2019 in the border areas of Nujiang, Baoshan, Lincang, and Diqing Yunnan were collected (observation group, genetic tests were positive), and 67 healthy infants in the same period were selected as the control group. Compared the genotype and allele frequency distribution of the *UGT1A1* mutation site in the two groups. Spearman analysis was performed to study the correlation between *UGT1A1* gene mutation and non-hemolytic non-binding hyperbilirubinemia. *UGT1A1* gene mutation profiles of children of different genders and nationalities were compared. **Results** The mutation rates of c.211G>A, c.1456T>G, and c.1061C>T in the observation group were 62.69%, 62.69%, and 47.77%, which were higher than that of the control group (14.93%, 2.99%, and 7.46%) ($P<0.05$). The genotype frequency and allele frequency were compared between the two groups, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). c.211G>A, c.1456T>G, c.1061C>T heterozygous and homozygous mutations were positively correlated with non-hemolytic non-bind-

基金项目:昆明市卫计委课题(2017-11-01-017)

作者单位:昆明市儿童医院检验科,昆明,云南 560000

*通信作者:奎莉越, E-mail: kuiliyue@etyy.cn

ing hyperbilirubinemia ($P<0.05$). Han children with c.211G>A, c.1456T>G, c.1061C>T heterozygous mutants were higher than those of ethnic minorities, the frequency of c.1456T>G homozygous mutation in Han children was lower than those of minority children ($P<0.05$). **Conclusions** The incidence of infantile hyperunconjugated bilirubinemia is related to c.211G>A, c.1456T>G, c.1061C>T locus mutations in the UGT1A1 gene in Yunnan. c.1456T>G homozygous mutations are concentrated in ethnic minorities, c.211G>A, c.1456T>G, c.1061C>T complex heterozygous mutations are mainly caused by Han population.

[KEY WORDS] UGT1A1 gene; Yunnan children; Gilbert syndrome; Crigler-Najjjar syndrome

非结合型胆红素血症包括 Gilbert 综合征 (Gilbert syndrome, GS) 和 Crigler-Najjjar 综合征 (Crigler-Najjjar syndrome, CNS) 等, 是由于编码胆红素-尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶 (Uridine diphosphate-glucuronosyl transferase, UGTs) 的 UGT1A1 基因发生突变或变异, 导致酶活性部分或完全丧失, 造成胆红素升高^[1-2]。患儿多在新生期出现黄疸, 也可在婴儿期即发生肝硬化、肝衰竭, 胆红素脑病等后遗症, 重者出生数天或数周死亡, 严重危害婴儿的健康^[3-4]。国内外的研究已发现该病有明显的遗传异质性, 已发现有 40 多个 UGT1A1 基因突变与该病相关, 并且突变谱存在明显的地区和人群差异^[5-8]。云南人群中 UGT1A1 基因突变谱目前还不清楚, 导致该病的诊断、治疗和遗传咨询困难。虽然国内有 UGT1A1 基因的相关研究, 但不同民族中可能有不同的突变类型分布, 且长期工作经验发现一些病例尚不能用已知的突变类型解释^[9]。本文将探讨 UGT1A1 基因突变与云南儿童 GS 和 CNS 的关系, 为临床诊断、治疗、遗传咨询提供参考, 报告如下。

1 对象和方法

1.1 研究对象

收集怒江、保山、临沧、迪庆云南边界地区 2018 年 1 月至 2019 年 11 月就诊于本院新生儿科及消化内科门诊确诊的 GS 和 CNS 患儿 67 例 (观察组, 基因检测均阳性), 并选取同期健康体检婴儿 67 例作为对照组。纳入标准: ①生长发育良好; ②新生儿期黄疸至 1 月未完全消退; ③肝功能检查结果为高非结合胆红素血症, 即总胆红素 $>17.1 \mu\text{mol/L}$, 非结合胆红素所占比值大于 80%, 经低热量试验、苯巴比妥试验、基因检测和 (或) 肝穿刺病理组织学检查符合 GS 或 CNS; ④均无亲缘关系。排除标准: ①急性肝炎患儿; ②结合胆红素 (Conjugated bilirubin, CB) $>$ 非结合胆红素 (Unconjugated bilirubin, UCB) 者; ③贫血、未做网织红细

胞 (Reticulocytes, Ret) 或 $\text{Ret}>5\%$ 者; ④谷草转氨酶 (Aspartate transaminase, AST)、丙转氨酶 (Alanine transaminase, ALT) 异常者; ⑤出生窒息者; ⑥早产儿 ($<37 \text{ W}$) 或出生低体重儿 ($<2500 \text{ g}$)。本研究经本院伦理委员会审核通过, 患儿家属均对本研究知情, 自愿签署知情同意书。

1.2 资料收集

记录患儿的性别、年龄、民族、喂养史、肝功能情况, 常规体检及血常规、Ret 计数等。

1.3 基因突变检测

抽取受试者静脉血 2 mL, 采用外周血样本 DNA 提取, 采用 PCR 方法获取 UGT1A1 基因, 针对 exon1、exon2、exon3、exon4、exon5 五个目的基因区段进行 PCR 扩增和 DNA 直接测序, 确定基因突变和变异; 分析氨基酸的改变。①样本 DNA 提取: 严格按血液基因组 DNA 抽提试剂盒操作提取基因组 DNA; ②引物的设计, 见表 1; ③PCR 扩增体系: 扩增反应总体积为 20 μL , 6 \times Buffer 缓冲液 5 μL , Taq 酶 (5 U/L) 1 μL , dNTP 5 μL , 引物各 2 μL , 模板 5 μL , 加无菌去离子水至 25 μL ; 反应条件 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 循环 35 次; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min; ④PCR 产物纯化后在用 AB-3500 型测序仪进行直接测序; ⑤测序图采用 BioEdit 基因阅读软件读图并人工核对, 和基因库中的标准序列 NG_009254.1 和已报道的 SNP 位点进行比对, 初步判定变异位点, 对变异所在的序列重复 PCR 并反向测序加以证实; ⑥测序结果用 Chromos 基因阅读软件判断, 用 Mutation Surveyor4.0 软件分析突变位点, 用 HGMD 数据库查询。

1.4 观察指标

①对比两组临床资料。②比较两组 UGT1A1 基因突变位点基因型与等位基因频率分布。③分析 UGT1A1 基因突变与非溶血性非结合型高胆红素血症的相关性。④比较分析性别、民族与 UGT1A1 基因变异谱的关系。

表1 引物设计
Table 1 Primer design

UGT1A1 基因片段	引物序列(5'-3')	片段长度 (bp)	循环参数
Exon 1	正向:GACACAGTCAAACATTAACCTGGT 反向:TGATGCCAAAGACAGACTCAAAC	1 127	95℃ 2 min; 94℃ 30 s, 58℃ 30 s, 72℃ 40 s, 循环 35 次; 72℃ 10 min
Exon 2	正向:GGAAGTAAAGGAGAGGAAAATGC 反向:AACAATGACAACAACCACAACAA	483	95℃ 2 min; 94℃ 30 s, 58℃ 30 s, 72℃ 40 s, 循环 35 次; 72℃ 10 min
Exon 3/4	正向:AAGTTGCCAGTCCTCAGAAGC 反向:TTTGAAACAACGCTATTAATGCT	851	95℃ 2 min; 94℃ 30 s, 58℃ 30 s, 72℃ 40 s, 循环 35 次; 72℃ 10 min
Exon 5	正向:AGGCAGGAGGATGGCTTG 反向:GGGGCAGCATACATATTCA	753	95℃ 2 min; 94℃ 30 s, 58℃ 30 s, 72℃ 40 s, 循环 35 次; 72℃ 10 min

1.5 统计学方法

采用 SPSS 22.0 统计进行数据处理, 计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示、两组间比较 *t* 检验, 计数资料用 *n* (%) 表示、行 χ^2 检验, 采用 Spearman 进行相关性分析。 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组一般资料比较

两组年龄、胎龄、出生体重、性别、血红蛋白、白细胞计数、喂养方式、民族、C 反应蛋白等资料比较, 差异无统计学意义 (*P* > 0.05)。具有可比性。见表 2。

表2 两组临床资料比较

Table 2 Comparison of clinical data between the 2 groups

资料	观察组 (n=67)	对照组 (n=67)	<i>t</i> / χ^2 值	<i>P</i> 值
年龄(月)	12.68±3.01	12.51±2.95	0.330	0.742
胎龄(周)	38.54±0.67	38.60±0.71	0.503	0.616
出生体重(kg)	3.21±0.26	3.26±0.30	1.031	0.305
性别(男/女)	37/30	32/35	0.747	0.387
血红蛋白(g/L)	128.44±12.23	130.04±10.13	0.825	0.411
白细胞计数 (×10 ⁹ /L)	8.55±1.01	8.43±0.96	0.705	0.482
喂养方式				
母乳喂养	37(55.22)	35(52.24)		
代乳品	22(32.84)	20(29.85)	0.951	0.622
混合喂养	8(11.94)	12(17.91)		
民族				
汉族	37(55.22)	40(59.70)	0.275	0.600
少数民族	30(44.78)	27(40.30)		
C 反应蛋白 (mg/L)	0.98±0.11	1.01±0.13	1.442	0.152

2.2 两组 UGT1A1 基因突变位点基因型与等位基因频率分布比较

行 UGT1A1 全外显子测序、HGMD 数据库查询

和 Alamut 功能软件预测, 发现 3 个与非结合性高胆红素血症致病相关的突变位点, 分别是: 1 号外显子 c.211G>A; 5 号外显子 c.1456T>G; 3 号外显子 c.1061C>T; 两组突变位点基因型和等位基因频率分布均符合 Hardy-Weinberg 平衡 (*P* > 0.05), 具有人群代表性; 观察组 c.211G>A、c.1456T>G、c.1061C>T 位点突变率高于对照组 (*P* < 0.05), 组间基因型频率和等位基因频率比较, 差异具有统计学意义 (*P* < 0.05)。见表 3。

表3 UGT1A1 基因突变位点基因型与等位基因频率分布 [n (%)]

Table 3 Genotype and allele frequency distribution of UGT1A1 mutation site [n (%)]

项目	观察组 (n=67)	对照组 (n=67)	χ^2 值	<i>P</i> 值
c.211G>A				
野生型(GG)	25(37.31)	57(85.074)		
杂合突变型(GA)	30(44.78)	10(14.93)	34.488	<0.001
纯合突变型(AA)	12(17.91)	0(0.00)		
突变率	42(62.69)	10(14.93)		
等位基因 G	80(59.70)	124(92.54)	39.740	<0.001
等位基因 A	54(40.30)	10(7.46)		
c.1456T>G				
野生型(TT)	25(37.31)	65(97.01)		
杂合突变型(TG)	12(17.91)	2(2.99)	54.921	<0.001
纯合突变型(GG)	30(44.78)	0(0.00)		
突变率	42(62.69)	2(2.99)		
等位基因 T	62(46.27)	132(98.51)	91.474	<0.001
等位基因 G	72(53.73)	2(1.49)		
c.1061C>T				
野生型(CC)	35(52.24)	62(92.54)		
杂合突变型(CT)	30(44.78)	5(7.46)	27.373	<0.001
纯合突变型(TT)	2(2.99)	0(0.00)		
突变率	32(47.77)	5(7.46)		
等位基因 C	100(74.63)	129(96.27)	25.237	<0.001
等位基因 T	34(25.37)	5(3.73)		

2.3 UGT1A1 基因突变与非溶血性非结合型高胆红素血症的相关性分析

采用 Spearman 进行相关性分析, c.211G>A、c.1456T>G、c.1061C>T 杂合与纯合突变均与非溶血性非结合型高胆红素血症呈正相关, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。见表 4。

表 4 UGT1A1 基因突变与非溶血性非结合型高胆红素血症的相关性

Table 4 Correlation between UGT1A1 gene mutation and non-hemolytic non-binding hyperbilirubinemia

UGT1A1 基因突变	r 值	P 值
c.211G>A		
杂合突变型 (GA)	6.749	<0.05
纯合突变型 (AA)	3.056	<0.05
c.1456T>G		
杂合突变型 (TG)	4.305	<0.05
纯合突变型 (GG)	6.028	<0.05
c.1061C>T		
杂合突变型 (CT)	5.417	<0.05
纯合突变型 (TT)	3.615	<0.05

2.4 性别、民族与 UGT1A1 基因变异谱的关系比较

不同性别、不同民族患儿 UGT1A1 基因各位点基因型分布比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$); 汉族患儿 c.211G>A、c.1456T>G、c.1061C>T 杂合突变型均高于少数民族患儿, 汉族患儿 c.1456T>G 纯合突变型频率低于少数民族患儿 ($P<0.05$)。见表 5。

3 讨论

GS 为遗传性非溶血性黄疸中常见的疾病, 常被误诊为肝炎等疾病; CNS-II 表现为中重度胆红素血症, 其胆红素水平可在苯巴比妥治疗后恢复正常或下降, 但黄疸长期持续存在并持续加重, 进而发生肝硬化、肝功能衰竭; CNS-I 为致死性疾病, CNS-I 患儿常在出生后数天到数周内死于胆红素性脑病^[10-11]。

陈伟等^[12]报道发现, 不明原因非结合性高胆红素血症足月新生儿 c.211G>A 突变占比高于生理性黄疸或健康足月新生儿。本研究结果提示 UGT1A1 基因 c.211G>A、c.1456T>G、c.1061C>T 位点突变可能是 GS、CNS 发病的原因。UGT1A1 是尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶 (UDP-glucuronosyl transferase, UGT) 1 家族中第一外显子, 对 UGT 的活性起决定性作用, UGT1A1 基因所编码的产物为胆红素尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶 (bilirubin UDP glucuronosyltransferase, B-UGT), 可促进非结合胆红素转变为结合胆红素^[13-15]。当 UGT1A1 基因突变, 如 UGT1A1 第 1 外显子 211 位 G>A 杂合突变, 导致所编码的第 71 位甘氨酸 (Gly) 变为精氨酸 (Arg); UGT1A1 第 5 号外显子 1456 位 T>G 杂合突变, 导致了酪氨酸 (Tyr) 变为天门冬氨酸 (Asp) 等, 均可使 B-UGT 活性降低或缺陷, 非结合胆红素葡萄糖醛酸化障碍, 不能排出体外, 从而造成体内非结合胆红素升高, 故与 GS、CNS 有关^[16-18]。且本研究进一步分析发现, c.211G>A、c.1456T>G、c.1061C>T 杂合与纯合突变均与非溶血性非结合

表 5 性别、民族与 UGT1A1 基因变异谱的关系比较 [n (%)]

Table 5 Comparative analysis of the relationship between gender, ethnicity, and UGT1A1 gene mutation profile [n (%)]

组别	n	c.211G>A 基因型			c.1456T>G			c.1061C>T		
		野生型 (GG)	杂合突变型 (GA)	纯合突变型 (AA)	野生型 (TT)	杂合突变型 (TG)	纯合突变型 (GG)	野生型 (CC)	杂合突变型 (CT)	纯合突变型 (TT)
性别										
男	69	42(60.87)	20(28.99)	7(10.14)	47(68.12)	10(14.49)	12(17.39)	47(68.12)	20(28.99)	2(2.90)
女	65	40(61.54)	20(30.77)	5(7.69)	42(64.62)	6(9.23)	17(26.15)	50(76.92)	15(23.08)	0(0.00)
χ^2 值		0.263			2.025			2.690		
P 值		0.877			0.363			0.261		
民族										
汉族	77	38(49.35)	32(41.56)	7(9.09)	62(80.52)	15(19.48)	0(0.00)	45(58.44)	30(38.96)	2(2.60)
少数民族	57	45(78.95)	7(12.28)	5(8.77)	27(47.37)	0(0.00)	30(52.63)	52(91.23)	5(8.77)	0(0.00)
χ^2 值		14.282			57.049			17.773		
P 值		<0.001			<0.001			<0.001		

型高胆红素血症呈正相关,进一步佐证了以上各位点突变与GS、CNS发病有关,这可为临床诊断GS、CNS及从遗传水平进一步阐述GS、CNS发病原因提供循证参考。

不同性别患儿 *UGT1A1* 基因各位点基因型分布比较相似,说明性别与 *UGT1A1* 基因突变无明显关系。Abudahab S 等^[19]报道显示,提示 *UGT1A1* 基因突变在不同民族中可能有不同的突变类型分布。目前国内关于 *UGT1A1* 基因突变在不同民族中的报道鲜见,本研究对此探讨结果提示 *UGT1A1* 基因 c.211G>A、c.1456T>G、c.1061C>T 复合杂合突变致病主要集中在汉族人群中,c.1456T>G 纯合突变集中体现在少数民族中,具有种族异质性,临床可据此有选择性的进行基因检测,以快速明确不明原因非结合性高胆红素血症的原因,为针对性的干预提供参考,但造成种族间差异的详细机制不清楚,仍有待后续的探讨。本研究不足之处在于,云南怒江、保山等地区包括白族、哈尼族等较少数民族种类,文中统一将其归为少数民族,尚未阐明具体各个少数民族 *UGT1A1* 基因突变谱,且病例数较少是另一不足,需后续扩大样本量进行深入的探究。

综上所述,云南地区婴儿期高非结合性胆红素血症发病与 *UGT1A1* 基因 c.211G>A、c.1456T>G、c.1061C>T 位点突变有关,c.1456T>G 纯合突变集中体现在少数民族中,c.211G>A、c.1456T>G、c.1061C>T 复合杂合突变致病主要集中在汉族人群。

参考文献

- [1] Liaqat A, Shahid A, Attiq H, et al. Crigler-Najjar Syndrome Type II Diagnosed in a Patient with Jaundice Since Birth [J]. J Coll Physicians Surg Pak, 2018, 28(10): 806-808.
- [2] Chiddarwar AS, D'Silva SZ, Colah RB, et al. Genetic lesions in the *UGT1A1* genes among Gilbert's syndrome patients from India [J]. Mol Biol Rep, 2018, 45(6): 6733-6739.
- [3] 白洁, 郑素军, 段钟平. 4种常见先天性高胆红素血症的临床特征及诊断思路 [J]. 临床肝胆病杂志, 2019, 35(8): 1680-1683.
- [4] Smets F, Dobbelaere D, McKiernan P, et al. Phase I/II Trial of Liver-derived Mesenchymal Stem Cells in Pediatric Liver-based Metabolic Disorders: A Prospective, Open Label, Multicenter, Partially Randomized, Safety Study of One Cycle of Heterologous Human Adult Liver-derived Progenitor Cells (HepaStem) in Urea Cycle Disorders and Crigler-Najjar Syndrome Patients [J]. Transplantation, 2019, 103(9): 1903-1915.
- [5] Amandito R, Putradista R, Jikesya C, et al. *UGT1A1* gene and neonatal hyperbilirubinemia: a preliminary study from Bengkulu, Indonesia [J]. BMC Res Notes, 2018, 11(1): 172.
- [6] Sun L, Li M, Zhang L, et al. Differences in *UGT1A1* gene mutations and pathological liver changes between Chinese patients with Gilbert syndrome and Crigler-Najjar syndrome type II [J]. Medicine (Baltimore), 2017, 96(45): e8620.
- [7] Mehrad-Majd H, Haerian MS, Akhtari J, et al. Effects of Gly71Arg mutation in *UGT1A1* gene on neonatal hyperbilirubinemia: a systematic review and meta-analysis [J]. J Matern Fetal Neonatal Med, 2019, 32(10): 1575-1585.
- [8] 刘雪梅, 骆子义. Gilbert综合征及Crigler-Najjar综合征诊断方法 [J]. 分子诊断与治疗杂志, 2016, 8(3): 201-202.
- [9] 熊清芳, 钟艳丹, 冯晓宁, 等. 遗传性非溶血性非结合型胆红素血症 *UGT1A1* 突变谱研究 [J]. 中华肝脏病杂志, 2018, 26(12): 898-902.
- [10] Elfar W, Järvinen E, Ji W, et al. A Novel Pathogenic *UGT1A1* Variant in a Sudanese Child with Type 1 Crigler-Najjar Syndrome [J]. Drug Metab Dispos, 2019, 47(1): 45-48.
- [11] Gailite L, Rots D, Pukite I, et al. Case report: multiple *UGT1A1* gene variants in a patient with Crigler-Najjar syndrome [J]. BMC Pediatr, 2018, 18(1): 317.
- [12] 陈伟, 林美丽, 王玉, 等. *UGT1A1* 基因多态性与新生儿不明原因非结合性高胆红素血症相关性研究 [J]. 中华新生儿科杂志(中英文), 2019, 34(2): 81-86.
- [13] Huang MJ, Chen YC, Huang YY, et al. Effect of UDP-glucuronosyltransferase 1A1 activity on risk for developing Gilbert's syndrome. [J]. Kaohsiung J Med Sci, 2019, 35(7): 432-439.
- [14] Volkov AN, Khabieva SM, Smirnova EY, et al. The genetic diagnostics of mutations *UGT1A1* in practice of modern medicine [J]. Klin Lab Diagn, 2018, 63(3): 186-192.
- [15] Chen S, Tukey RH. Humanized *UGT1* Mice, Regulation of *UGT1A1*, and the Role of the Intestinal Tract in Neonatal Hyperbilirubinemia and Breast Milk-Induced Jaundice [J]. Drug Metab Dispos, 2018, 46(11): 1745-1755.
- [16] Xiong QF, Zhong YD, Feng XN, et al. Study on spectrum of *UGT1A1* mutations in connection with inherited non-hemolytic unconjugated hyperbilirubinemia [J]. Chin J Hepatol, 2018, 26(12): 898-902.
- [17] Abuduxikuer K, Fang LJ, Li LT, et al. *UGT1A1* genotypes and unconjugated hyperbilirubinemia phenotypes in post-neonatal Chinese children: A retrospective analysis and quantitative correlation [J]. Medicine (Baltimore), 2018, 97(49): e13576.
- [18] 阮进成, 钟丹妮, 羊希, 等. 越南新生儿高胆红素血症与 *UGT1A1* Gly71Arg 突变的相关性研究 [J]. 广西医科大学学报, 2019, 36(5): 793-796.
- [19] Abudahab S, Hakooz N, Jarrar Y, et al. Interethnic Variations of *UGT1A1* and *UGT1A7* Polymorphisms in the Jordanian Population [J]. Curr Drug Metab, 2019, 20(5): 399-410.

血清HBeAg定量检测技术新进展

陈秀丽¹ 张学东² 戴二黑^{1*}

[摘要] 近年来,乙型肝炎e抗原(hepatitis B e Antigen, HBeAg)定量检测技术不断创新发展,由定性、半定量,发展至目前真正意义上的定量检测,并在临床上逐步推广应用。血清HBeAg定量水平与病毒复制、肝组织损伤以及谷氨酸-丙酮酸转氨酶(ALT)升高等指标密切相关。基线HBeAg定量水平可预测聚乙二醇化干扰素(PEG-IFN)、核苷(酸)类似物(NAs)的疗效;治疗过程中实时监测HBeAg降低水平及幅度,可更加精准预测抗病毒药物的疗效,有助于指导临床医师针对不同患者制定个体化治疗方案。本文就目前HBeAg定量检测技术及其在临床应用方面的最新进展做一综述,旨在为临床医师判断患者病情变化,制定优化治疗方案等方面提供理论依据。

[关键词] 乙型肝炎e抗原;定量检测;相关研究

Advances in the quantitative of serum HBeAg and its clinical significance

CHEN Xiuli¹, ZHANG Xuedong², DAI Erhei^{1*}

(1. Division of Liver Disease, The Fifth Hospital of Shijiazhuang, Hebei Medical University, Hebei, Shijiazhuang, China 050021; 2. Autobio Diagnostics Co., Ltd, National Eco &Tech development zone, Henan, Zhengzhou, China 450016)

[ABSTRACT] In recent years, the quantitative technology of serum Hepatitis B e Antigen has been developed continuously, from qualitative, semi-quantitative, to the real sense of quantitative detection. It is gradually popularized and applied in clinical practice. Serum HBeAg level is well correlated with virus replication, liver tissue damage and elevated Alanine aminotransferase. Baseline HBeAg quantification can predict the efficacy of Peginterferon and nucleoside analogues. Real-time monitoring of HBeAg level can predict the efficacy more accurately during the treatment, and guide clinicians to make individualized plan. This review summarizes the current progress in the field of HBeAg quantitative detection technology and its clinical application. The purpose is to provide a theoretical basis for clinicians to judge the illness and guide the selection of treatment programs.

[KEY WORDS] Hepatitis B e Antigen; Quantitative detection; Related research

近年来,乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染的实验室检测方法不断涌现和更新,HBV DNA、HBV RNA、HBV 共价闭合环状DNA(covalently closed circular, cccDNA)定量检测、HBV 基因型与基因突变位点检测、乙型肝炎核心相关抗原(hepatitis B core-related HBcrAg)检测方

法相继问世并在临床逐渐推广应用。HBV 血清标志物包括乙型肝炎表面抗原(hepatitis B surface antigen, HBsAg)、乙型肝炎表面抗体(hepatitis B surface antibody, 抗-HBs)、HBeAg(hepatitis B e Antigen, HBeAg)、乙型肝炎e抗体(hepatitis B e antibody, 抗-HBe)、乙型肝炎核心抗体(hepatitis B

基金项目:河北省2018年度医学科学研究重点课题计划资助项目(20181079)

作者单位:1. 河北医科大学附属石家庄市第五医院,肝病研究所,河北,石家庄 050021

2. 郑州安图生物工程股份有限公司,研发中心,河南,郑州 450016

*通信作者:戴二黑, E-mail: daieh2008@126.com

core antibody, 抗-HBc), 亦称乙肝五项, 由以往的定性检测发展为定量检测, 赋予了乙肝五项新的内涵, 逐渐被临床所认识。本文对血清 HBeAg 定量检测技术进展, 血清 HBeAg 定量与 HBV 复制、肝组织损伤、病情进展以及抗病毒治疗中的评估作用等方面进行综述。

1 血清 HBeAg 定量检测技术的进展

截止目前, 在乙肝五项检测中, 国外进口化学发光免疫分析系统仅能对 HBsAg 和抗-HBs 进行定量检测, 美国雅培 (architect) 公司检测的样品吸光度比临界值 (sample absorbance/cut off, S/CO), 瑞士罗氏 (elecsys) 公司检测样本的临界值指数 (cut off index, COI), 均为血清 HBeAg 检测“半定量”结果, 由于没有溯源标准, 结果难以进行比较。如果以 HBeAg 定量参考物质作为定值标准, 绘制标准曲线即可实现 HBeAg 的绝对定量。由于没有全球通用的参考物质, 目前绝大部分研究采用德国 Paul-Ehlich Institute 提供的 HBeAg 参考物质, 单位为 PEIU/mL。有学者自建了雅培微粒子酶免分析系统血清 HBeAg 定量检测方法, 这种方法检测范围为 0.15~200 PEIU/mL, 也可以用胎牛血清对本标本稀释后进行检测^[1]。此外, 还有学者提供了罗氏 Elecsys 系统的转换公式, 即 HBeAg (PEIU/mL)=COI 样本×0.222, 此公式可对结果为 1~1000 COI 的 HBeAg 进行定量, 超过 1 000 者可用阴性血清 1:40 稀释后再检测^[2]。近年来, 国内生产厂家在化学发光检测系统的研发方面, 实现了对乙肝五项全定量检测, 为血清 HBeAg 等指标定量检测提供了可靠的技术保障。

2 血清 HBeAg 定量测定的临床意义

2.1 血清 HBeAg 定量与 HBV 复制的关系

HBV 自然史研究表明, 免疫耐受期 (immune-tolerant, IT) HBV 复制活跃, Chen 等^[3]报道慢性 HBV 携带者血清 HBV DNA 与 HBeAg 定量变化规律呈现一致, 血清 HBeAg 水平范围很大, 相差 3 个数量级, 高水平 HBeAg 能有效提示高水平 HBV DNA, S/CO 为 768 的患者中, 94% 患者血清 HBV DNA >2107 copies/mL。肝组织 HBV cccDNA 较血清 HBV DNA 更能准确反映被感染细胞的数量, Thompson 等^[4]报道 HBeAg 定量与血清 HBV DNA、HBsAg 以及肝组织 HBV DNA 水平显著相

关, 但是, 与肝组织 HBV cccDNA 含量的相关系数为 0.400 1 ($P=0.111 5$)。张琳等^[5]发现 HBV 携带者肝组织 HBV cccDNA 含量为 (5.66 ± 0.93) log 拷贝/mg, 血清 HBeAg 定量为 $(1 065.80\pm 679.84)$ PEIU/mL, 两者之间无相关性 ($r=0.152, P>0.05$)。然而, 李春艳等^[6]证实肝组织 HBV cccDNA 含量与血清 HBeAg 水平显著相关 ($r=0.676, P<0.01$)。纳入的研究对象不同, 检测方法不统一等因素可能是研究结果不一致的原因, 李春艳等^[6]采用时间分辨荧光免疫分析法, 而其他研究均为化学发光免疫分析法。另外, 研究结果也可能与 HBV 前-C (pre-C)/基本核心启动子 (Basal Core Promoter, BCP) 突变以及研究人群的基因型不同有关, 血清 HBeAg 与病毒复制等指标的关系非常复杂, 取决于病毒和宿主免疫相互作用的结果。因此, 血清 HBeAg 与肝组织 HBV cccDNA 含量的关系尚需要进一步研究来证实。

2.2 PC/BCP 突变对血清 HBeAg 定量的影响

HBeAg 可诱导免疫耐受, 因而 HBeAg 的减少可能和免疫耐受打破有关。HBV 前-C 区 ntG1896A 点突变, 可以导致第 28 位氨基酸 (aa28) 由色氨酸 TGG 变为终止密码 TAG, 能阻断 HBeAg 的合成, 从而造成 HBeAg 转阴而抗-HBe 阳转^[7], 而且, 1896 变异的发生具有 HBV 基因型依赖性: B~E 基因型的 G1896 与 T1858 配对所形成的结构不稳定, nt1896 的 G 变异为 A 使结构变得稳定; 而 A 和 F 基因型的 nt1858 是 C, 与 G1896 组成较稳定的 C-G 对, 故很少发生前 C 区 ntG1896A 变异。HBeAg 及其前体翻译自 3.5 kb 的前 C mRNA, 而 BCP 调节该 mRNA 的转录。BCP 变异会降低前 C mRNA 的转录效率, 进而影响 HBeAg 前体的表达, 造成 HBeAg 阴性血清表现型的 HBV 感染^[8]。

B 基因型与 C 基因型相比, B 基因型易发生 PC 突变, 而 C 基因型易发生 BCP 突变。有研究证实 HBeAg 阳性慢性乙型肝炎 (chronic hepatitis B, CHB) 患者中, PC/BCP 突变患者血清 HBV DNA 水平明显低于野生型患者^[9-11]。Thompson 等^[4]发现在 61 例 HBeAg 阳性 CHB 患者中, 野生型仅有 27 例, PC 突变、BCP 突变、PC/BCP 同时突变者分别为 10、22、2 例, PC/BCP 突变患者血清 HBeAg 水平明显低于野生型患者。用血清 HBV DNA 校准后这种差异依然存在, 提示由于基因突变而非 HBV DNA 复制的抑制造成 HBeAg 水平降低。因

此,PC/BCP 突变株的出现是造成血清 HBeAg 定量水平降低甚至阴性的原因之一。

2.3 基线血清 HBeAg 定量与 HBeAg 自发清除密切相关

围生期 HBV 感染者的 HBeAg 自发消失率很低, HBeAg/抗-HBe 自发血清学转换主要出现在免疫清除期 (immune-clearance, IC), 年发生率约为 2%~15%, HBeAg 阴转或者 HBeAg/抗-HBe 血清学转换的患者每年只有约 1% 发展为肝硬化, 并且在 HBeAg 血清学转换后, HBsAg 年清除率约为 0.5%~1%, 而 HBeAg 未阴转的患者血清丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT) 波动较小, HBV DNA 呈现高水平^[12]。Song 等^[13]报道随访 1 年时 HBeAg/抗-HBe 血清学转换比例为 15.9% (18/113), 28 周时 HBeAg 定量为 1.53 log PEIU/mL 的界限值, 用于确定 1 年时 HBeAg/抗-HBe 自发血清学转换的敏感度、特异度、阳性预测值、阴性预测值分别为 94.4%、60.0%、30.9%、98.3%。因此, HBeAg/抗-HBe 自发血清学转换与患者 HBV 基因型、年龄、血清 ALT 水平以及基线 HBeAg 定量水平有关。

2.4 血清 HBeAg 定量与肝组织损伤的关系

有研究显示, 血清 ALT 水平可以反映肝细胞炎症损伤程度, 血清 HBeAg 定量高时, ALT 水平呈现下降^[14]。Li 等^[15]报道 IT 期患者高水平 HBeAg 持续时间长, ALT 正常, 肝组织学无明显异常或轻度炎症坏死及缓慢肝纤维化的进展, IC 期机体针对 HBV 免疫应答强烈, 被 HBV 感染的肝细胞受免疫攻击而减少, 从而 HBeAg 水平降低, ALT 持续或间歇升高, IC 期的 ALT 与血清 HBeAg 定量水平呈负相关 ($\beta=-0.290$, $P=0.018$)。Zeng 等^[16]证实血清 HBeAg 定量水平与 IC 期患者的肝组织炎症分级及肝纤维化分期显著相关, 相关系数分别为 0.304 和 0.371, ($P<0.001$)。因此, 血清 HBeAg 定量与肝组织损伤程度呈现负相关。

2.5 血清 HBeAg 定量在判断慢性 HBV 感染者病情进展中的意义

乙肝相关肝硬化、肝癌患者的 HBV DNA、HBeAg 水平较慢性乙型肝炎患者降低, 提示血清 HBV DNA、HBeAg 水平与乙型肝炎疾病的进展程度呈负相关。IT 患者 HBsAg 和 HBeAg 定量水平高, HBV DNA 通常高于 200 000 IU/mL; IC 患者血清 HBeAg 水平低于 IT 期, 多数可达到 HBeAg 血

清学转换和 HBV DNA 抑制^[17]。Wang 等^[18]报道 IT 和 IC 期 HBeAg 水平分别为 $(1317.9 \pm 332.9) S/CO$ 和 $(673.4 \pm 562.1) S/CO$, $P<0.001$, ROC 曲线分析数据显示, HBeAg $>1 118.96 S/CO$ 可以区分 IT 和 IC 期的敏感度为 85.2%, 特异度为 75%。因此, 血清 HBeAg 定量可以监测和判断患者病情变化, 以及区分自然病程的分期。

2.6 血清 HBeAg 定量在 CHB 患者抗病毒治疗中的评估作用

2.6.1 血清 HBeAg 定量在聚乙二醇化干扰素 (Pegylated interferon, PEG-IFN) 治疗中的预测价值

在 PEG-IFN 治疗过程中进行 HBsAg 和 HBeAg 定量检测, 可以更好地预测持久病毒学应答甚至 HBsAg 转阴或血清转换。基线特征指导治疗 (baseline-guided-therapy, BGT) 策略可以识别干扰素治疗的优势患者, 基线 HBeAg 定量可以预测患者抗 HBV 治疗效果, 从而优化治疗方案。Fried 等^[19]报道 PEG-IFN 治疗 48 周的 HBeAg 阳性 CHB 患者, 基线 HBeAg <31 PEIU/mL、HBeAg 31~1 294 PEIU/mL、HBeAg $>1 294$ PEIU/mL 3 组患者在治疗结束时, HBeAg/抗-HBe 血清学转换率分别为 54%、26%、24% ($P<0.001$, 95% CI 1.33~2.4)。应答指导治疗 (reponse-guided-therapy, RGT) 策略根据 PEG-IFN 治疗早期 (12 周或 24 周) 的应答情况, 预测停药后持久应答, 指导治疗方案的调整。Tang-kijvanich 等^[20]报道 PEG-IFN 治疗 24 周时, HBeAg 下降大于 2.0 log, 是预测 1 年内持续病毒学应答和 HBeAg/抗-HBe 血清学转换的界限值, 敏感性和阴性预测值分别为 85% 和 92%。一项亚洲研究证实, PEG-IFN 治疗 12 周或 24 周时检测 HBeAg 定量, 对 HBeAg/抗-HBe 血清学转换同样具有良好的预测价值^[21]。因此, 在治疗前及治疗过程中密切监测 HBeAg 定量, 可早期、及时预测 HBeAg 血清转换, 有助于优化治疗方案。

2.6.2 血清 HBeAg 定量在核苷 (酸) 类似物 (nucleoside analogues, NAs) 治疗中的预测价值

NAs 能够有效地抑制 HBV 复制, 但血清 HBeAg/抗-HBe 转换率不高^[22]。Wong 等^[23]研究发现替诺福韦 (tenofovir disoproxil fumarate, TDF) 治疗 384 周时 HBeAg/抗-HBe 血清学转换率为 52%, 基线和治疗 24 周时 HBeAg 定量分别为 1.63 log PEIU/mL 和 0.90 log PEIU/mL, 可以预测 HBeAg/抗-HBe 血清学转换 ($P=0.002$), 并且治疗 24 周时

HBeAg 定量下降大于 2.2 log 与基因 A 或 D 型患者的 HBsAg 消失相关 (38% vs 15%, $P=0.03$)。Shin 等^[24]报道恩替卡韦 (entecavir, ETV) 治疗 3 年的 HBeAg/抗-HBe 血清学转换率为 31.7%。Kwon 等^[25]发现基线 HBeAg 定量 <360 PEIU/mL, 以及治疗 12 周时 HBeAg 下降超过 1 log, 可以预测治疗 1 年的病毒学应答和 HBeAg/抗-HBe 血清学转换。因此, 在 NAs 治疗过程中, 检测血清 HBeAg 基线水平、动态监测治疗早期某些时间点 HBeAg 水平及下降幅度, 对于预测抗病毒疗效具有重要意义。

3 小结与展望

HBeAg 定量检测是近年来乙肝血清学标志物检测技术的重要发展, 是 HBV DNA 定量检测的补充, 基线 HBeAg 定量可预测 PEG-IFN 和 NAs 的疗效; 治疗过程中实时监测 HBeAg 降低幅度, 可更加精准预测抗病毒药物疗效, 指导临床医师制定和优化治疗方案。全自动化学发光免疫分析法是建立在信号示踪之上的技术, 检测血清 HBeAg 定量, 具有灵敏度高, 操作简便、快速, 结果稳定, 标准曲线剂量宽等优点, 因此在临床工作中值得普遍推广。

参考文献

- [1] Gencay M, Seffner A, Pabinger S, et al. Detection of in vivo hepatitis B virus surface antigen mutations-A comparison of four routine screening assays[J]. *J Viral Hepat*, 2018, 25(10): 1132-1138.
- [2] Wursthorn K, Zacher BJ, Jaroszewicz J, et al. Development of a protocol for the quantitative determination of HBeAg using the Elecsys(R) HBeAg immunoassay[J]. *J Viral Hepat*, 2011, 18(7): e179-83.
- [3] Chen P, Xie Q, Lu X, et al. Serum HBeAg and HBV DNA levels are not always proportional and only high levels of HBeAg most likely correlate with high levels of HBV DNA: A community-based study[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2017, 96(33): e7766.
- [4] Thompson AJ, Nguyen T, Iser D, et al. Serum hepatitis B surface antigen and hepatitis B e antigen titers: disease phase influences correlation with viral load and intrahepatic hepatitis B virus markers[J]. *Hepatology*, 2010, 51(6): 1933-1944.
- [5] 张琳, 吴峰, 石理兰, 等. HBV 携带者血清病毒标志物和 HBV DNA 与肝组织中 HBV cccDNA 相关性的研究. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2011, 25(2): 112-113.
- [6] 李春艳, 陈延平, 徐光华, 等. 慢性乙型肝炎患者肝组织乙型肝炎病毒 cccDNA 和血清病毒学标志物相关性的研究[J]. *肝脏*, 2017, 22(5): 442-444.
- [7] Carman WF, Jacyna MR, Hadziyannis S, et al. Mutation preventing formation of hepatitis B e antigen in patients with chronic hepatitis B infection[J]. *Lancet*, 1989, 2(8663): 588-591.
- [8] Laras A, Koskinas J, Hadziyannis SJ. In vivo suppression of precore mRNA synthesis is associated with mutations in the hepatitis B virus core promoter[J]. *Virology*, 2002, 295(1): 86-89.
- [9] Pan CQ, Dai E, Bhamidimarri KR, et al. Clinical Features of Chronic Hepatitis B in Treatment-naive Asian Patients With Positive HBeAg and Coexisting Precore and/or Basal Core Promoter Mutations[J]. *J Clin Gastroenterol*, 2017, 51(3): 261-267.
- [10] Yan CH, Zhao CY, Ding H, et al. Hepatitis B virus basal core promoter mutations A1762T/G1764A are associated with genotype C and a low serum HBsAg level in chronically infected HBeAg-positive Chinese patients[J]. *Antiviral Res*, 2012, 96(2): 108-114.
- [11] Testoni B, Lebossé F, Scholtes C, et al. Serum hepatitis B core-related antigen (HBcrAg) correlates with covalently closed circular DNA transcriptional activity in chronic hepatitis B patients[J]. *J Hepatol*, 2019, 70(4): 615-625.
- [12] Hoofnagle JH, Doo E, Liang TJ, et al. Management of hepatitis B: summary of a clinical research workshop[J]. *Hepatology*, 2007, 45(4): 1056-1075.
- [13] Song BC, Cho YK, Jwa H, et al. Is it necessary to delay antiviral therapy for 3-6 months to anticipate HBeAg seroconversion in patients with HBeAg-positive chronic hepatitis B in endemic areas of HBV genotype C?[J]. *Clin Mol Hepatol*, 2014, 20(4): 355-360.
- [14] 胡晨波, 方敏, 沈群, 等. HBeAg、HBV DNA 联合定量检测对 HBeAg 阳性不同程度慢性乙型肝炎的临床意义[J]. *肝脏*, 2014, 19(3): 187-189.
- [15] Li MH, Lu Y, Zhang L, et al. Association of Cytokines with Alanine Aminotransferase, Hepatitis B Virus Surface Antigen and Hepatitis B Envelope Antigen Levels in Chronic Hepatitis B[J]. *Chinese Medical Journal*, 2018, 131(15): 1813-1818.
- [16] Zeng DW, Liu YR, Dong J, et al. Serum HBsAg and HBeAg levels are associated with liver pathological stages in the immune clearance phase of hepatitis B virus chronic infection[J]. *Mol Med Rep*, 2015, 11(5): 3465-3472.
- [17] Feld JJ, Terrault NA, Lin HS, et al. Entecavir and Peginterferon Alfa-2a in Adults With Hepatitis B e Antigen-Positive Immune-Tolerant Chronic Hepatitis B Virus Infection[J]. *Hepatology*, 2019, 69(6): 2338-2348.
- [18] Wang L, Zou ZQ, Wang K, et al. Role of serum hepatitis B virus marker quantitation to differentiate natural history phases of HBV infection[J]. *Hepatol Int*, 2016, 10(1): 133-138.

- [19] Fried MW, Piratvisuth T, Lau GK, et al. HBeAg and Hepatitis B Virus DNA as Outcome Predictors During Therapy with Peginterferon Alfa-2a for HBeAg-Positive Chronic Hepatitis B [J]. *Hepatology*, 2008, 47(2): 428-434.
- [20] Tangkijvanich P, Komolmit P, Mahachai V, et al. Comparison between quantitative hepatitis B surface antigen, hepatitis B e-antigen and hepatitis B virus DNA levels for predicting virological response to pegylated interferon-alpha-2b therapy in hepatitis B e-antigen-positive chronic hepatitis B [J]. *Hepatol Res*, 2010, 40(4): 269-277.
- [21] Ma H, Yang RF, Wei L. Quantitative serum HBsAg and HBeAg are strong predictors of sustained HBeAg seroconversion to pegylated interferon alfa-2b in HBeAg-positive patients [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2010, 25(9): 1498-1506.
- [22] Wang B, Carey I, Bruce M, et al. HBsAg and HBcrAg as predictors of HBeAg seroconversion in HBeAg-positive patients treated with nucleos(t)ide analogues [J]. *J Viral Hepat*, 2018, 25(8): 886-893.
- [23] Wong D, Littlejohn M, Yuen L, et al. HBeAg levels at week 24 predict response to 8 years of tenofovir in HBeAg-positive chronic hepatitis B patients [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2018, 47(1): 114-122.
- [24] Shin JW, Jung SW, Park BR, et al. Prediction of response to entecavir therapy in patients with HBeAg-positive chronic hepatitis B based on on-treatment HBsAg, HBeAg and HBV DNA levels [J]. *J Viral Hepat*, 2012, 19(10): 724-731.
- [25] Kwon JH, Jang JW, Lee S, et al. Pretreatment HBeAg level and an early decrease in HBeAg level predict virologic response to entecavir treatment for HBeAg-positive chronic hepatitis B [J]. *J Viral Hepat*, 2012, 19(2): e41-47.

(上接第361页)

参考文献

- [1] 张荣伟,蔡小燕,林小军,等. 白细胞介素35+调节性B细胞在系统性红斑狼疮患者外周血中的表达[J]. *中华生物医学工程杂志*, 2016, 22(3): 239-243.
- [2] Lampropoulos K, Kotsas D, Iliopoulos T. Heart failure with complete recovery in a patient with systemic lupus erythematosus [J]. *Reumatologia*, 2015, 53(1): 49-52.
- [3] 申晓莉,赵军,申颖莉. 曲美他嗪对老年慢性心力衰竭病人NTproBNP、MMP9、MPO的影响[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2016, 14(20): 2410-2413.
- [4] 周丽彬,周剑涛,丁海峰. 低密度粒细胞在自身免疫性疾病中的病理生理作用[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2016, 8(1): 66-69.
- [5] Tang Y, Zhao X, Antoine D, et al. Antoinde D Regulation of Posttranslational Modifications of HMGB1 During Immune Responses [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2016, 4(12): 620-34.
- [6] Chen X, Xu S, Zhao C, et al. Role of TLR4/NADPH oxidase 4 pathway in promoting cell death through autophagy and ferroptosis during heart failure [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 516(1): 37-43.
- [7] American College of Rheumatology. American college of rheumatology guidelines for screening, treatment, and management of lupus nephritis [J]. *Arthritis Care Res (Hoboken)*, 2012, 64(6): 797-808.
- [8] Mubarak M, Nasri H. ISN/RPS 2003 classification of lupus nephritis: time to take a look on the achievements and limitations of the schema [J]. *JNephrothol*, 2014, 3(3): 87-90.
- [9] Vira H, Pradhan V, Umare V, et al. Role of polymorphisms in MMP-9 and TIMP-1 as biomarkers for susceptibility to systemic lupus erythematosus patients [J]. *Biomark Med*, 2019, 13(1): 33-43.
- [10] Ugarte-Berzal E, Martens E, Boon L, et al. EDTA/gelatin zymography method to identify C1s versus activated MMP-9 in plasma and immune complexes of patients with systemic lupus erythematosus [J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(1): 576-585.
- [11] Mao YM, Wang S, Zhao CN, et al. Circulating Matrix Metalloproteinase-9 Levels in Patients with Systemic Lupus Erythematosus: A Meta-analysis [J]. *Curr Pharm Des*, 2018, 24(16): 1780-1787.
- [12] 曲哲,刘佩,姚园,等. MMP-9在心肌缺血再灌注中的作用和机制研究[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2016, 14(13): 1483-1487.
- [13] 马松鹤,夏令杰,陶熔,等. 环孢素对系统性红斑狼疮模型小鼠的肾保护作用及其机制研究[J]. *中国药房*, 2018, 29(24): 74-79.
- [14] 张娜. 人参皂苷 Rg1 对系统性红斑狼疮的免疫调节作用的实验研究[D]. 青岛大学, 2016: 6-23.
- [15] Wen S, He F, Zhu X, et al. IFN- γ , CXCL16, uPAR: potential biomarkers for systemic lupus erythematosus [J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2018, 36(1): 36-43.
- [16] 运锋,田源,陈会君. 苏木乙酸乙酯提取物对急性病毒性心肌炎小鼠模型心肌组织 IFN- γ 的影响[J]. *中医药学报*, 2016, 44(6): 27-30.
- [17] Song E, Jahng JW, Chong LP, et al. Lipocalin-2 induces NLRP3 inflammasome activation via HMGB1 induced TLR4 signaling in heart tissue of mice under pressure overload challenge [J]. *Am J Transl Res*, 2017, 9(6): 2723-2735.

肿瘤微环境中外泌体在肿瘤发生发展中作用及机制

杨硕¹ 杨清玲^{2*} 陈昌杰²

[摘要] 外泌体(exosomes)是直径在30~100 nm,内含RNA、脂质和蛋白质的纳米级囊泡,来源于细胞内容酶体微粒内陷形成的多囊泡体,与细胞膜融合后释放到胞外,是肿瘤微环境中细胞间通讯和遗传物质的重要载体。肿瘤在发生、发展过程中可通过外泌体与肿瘤微环境中的免疫细胞、内皮细胞和肿瘤相关成纤维细胞之间相互作用从而促进肿瘤的进展,其携带蛋白质、脂质和核酸等内容物释放到细胞外随着体液运输改变肿瘤微环境、促进肿瘤细胞增殖、加快血管形成及促进癌症发展;肿瘤微环境是由肿瘤细胞、巨噬细胞、成纤维细胞及细胞外基质等共同构成的局部稳态环境,在癌症的发生、复发、转移和化疗耐药等过程中发挥重要的作用。本综述着重讨论外泌体的生物学特性及对肿瘤微环境的影响,为研究及诊断治疗肿瘤提供新的思路。

[关键词] 肿瘤微环境;外泌体;肿瘤

Role and mechanism of exosomes in tumor microenvironment in tumorigenesis and development

YANG Shuo¹, YANG Qingling², CHEN Changjie^{2*}

(1. Anhui Province Key Laboratory of Translational Cancer Research, Bengbu Medical College, Bengbu, Anhui, China, 233000; 2. Department of Biochemistry & Molecular Biology, Bengbu Medical College, Bengbu, Anhui, China, 233000)

[ABSTRACT] Exosomes are nanoscale vesicles with diameters of 30-100nm, containing RNA, lipids and proteins. Exosomes are polyvesicles formed by intracellular lysosomal particles, which are fused with the cell membrane and released to the extracellular environment. It is an important carrier of cellular communication and genetic material in tumor microenvironment. During the process of tumor development, exosomes interact with immune cells, endothelial cells and tumor-related fibroblasts in tumor microenvironment to promote tumor progression. It carries proteins, lipids, nucleic acids and other contents released to the outside of the cell to change the tumor microenvironment, promotes the proliferation of tumor cells, accelerates the formation of blood vessels and promotes the development of cancer. Tumor microenvironment is a local stable environment composed of tumor cells, macrophages, fibroblasts and extracellular matrix, which plays an important role in the occurrence, recurrence, metastasis, chemotherapy resistance and other processes of cancer. This review focuses on the biological characteristics of exosomes and their impact on tumor microenvironment, providing new ideas for the research, diagnosis and treatment of tumors.

[KEY WORDS] Tumor microenvironment; Exosomes; Tumor

基金项目:安徽省教育厅自然科学重大项目(KJ2016SD37);安徽省高校学科(专业)拔尖人才学术资助重点项目(gxbjZD2016069);安徽省学术与技术带头人后备人选资助项目(2017H110);2018年度高校学科(专业)拔尖人才学术资助项目(gxbjZD27)

作者单位:1. 癌症转化医学安徽省重点实验室,安徽,蚌埠 233000

2. 蚌埠医学院生物化学与分子生物学教研室,安徽,蚌埠 233000

*通信作者:杨清玲, E-mail: yqlmimi@163.com

外泌体(exosome)是一种直径在30~100 nm的双层膜性囊泡^[1],可由多种细胞通过胞吐方式分泌至微环境中。1983年,Johnstone等^[2]从羊网织红细胞上清液中分离出一种小囊泡,最初被认为是细胞分泌的垃圾,后随着对外泌体研究的深入,发现这些囊泡富含很多成分,如细胞特异性的蛋白质、脂质、RNA(mRNA、miRNA及其他非编码RNA)^[3]。外泌体可由多种细胞如肿瘤细胞、巨噬细胞、成纤维细胞等分泌,广泛分布于血液、尿液、腹腔积液、滑膜液、乳汁等各种体液中^[4],通过携带和传递重要的信号分子作用于靶细胞中从而影响目标细胞的生理与病理状态。研究证明外泌体参与细胞间通讯、免疫反应、血管形成和肿瘤细胞生长^[5]。目前在多种类型的细胞中均发现了外泌体,而肿瘤细胞来源的外泌体由于它本身的特性和功能特点逐渐成为肿瘤方向的研究热点。外泌体可释放自身携带的细胞因子等促进肿瘤的发生、发展、增殖与迁移,使肿瘤产生耐药性,给肿瘤的治疗带来不利影响。本综述回顾近年来肿瘤微环境中外泌体的研究成果,旨在阐述肿瘤来源的外泌体在肿瘤微环境中的产生机制从而为临床诊断治疗肿瘤提供新的方向。

1 外泌体的产生、组成和主要生物学功能

外泌体的形成主要经出芽、内陷、多泡体形成及分泌四个过程。外泌体产生于细胞内体。源于细胞质膜内陷形成早期内体,晚期内体向内出芽形成管腔状囊泡,转变成含多个小囊泡的多泡体(multivesicular body, MVB),而后MVBs与胞膜融合后其内囊泡再次凹陷,以内出芽的方式形成颗粒状小囊泡,并释放到细胞外,即为外泌体。外泌体到达受体细胞后通过与配体结合、吞噬和与质膜融合的方式在特定细胞内释放内容物,从而改变细胞生理状态和功能^[6]。

外泌体主要由蛋白质、核酸和脂质构成。所有的外泌体有共同的蛋白质如CD9、CD63、CD81、CD82等,这些可作为生物标记物,还可能与外泌体的生物来源有关。不同细胞来源的外泌体表达特异性蛋白,如肿瘤易感基因101蛋白(TSG101)、ALG-2相互作用蛋白X(ALIX)、热休克蛋白HSP70等与细胞的特定功能相关^[7]。外泌体还含有大量的核酸,如mRNA、miRNA和lncRNA等。这些核酸与靶细胞融合作用于受体细胞,可调节受体细胞的蛋白表达和信号通路^[8]。外泌体含有的脂质包括胆固醇、甘油

二脂和磷脂等^[9]。不仅参与形成和维持外泌体的形态,还可作为信号分子参与细胞间的信息通讯过程。这些内容物随着体液运输至目标细胞并被摄取参与血管形成及肿瘤的发生、发展和转移。

现今外泌体是细胞间通讯、免疫调节、疾病诊断和预后标志物的重要载体。肿瘤来源的外泌体通过TGF- β 和IL-10促进Treg增殖,从而增加它们对细胞凋亡的抗性^[10]。为外泌体的免疫调控作用提供了新的探索方向。此外Nilsson-I等^[11]的研究发现活化的NK细胞受体NKG2D的配体视黄酸转录本-1/UL16结合蛋白(RAET1/ULBP)1-6在外泌体膜表面捕获NKG2D,降低NKG2D的表达,使其不能激活NK细胞、自然杀伤T细胞,进而引起免疫逃逸。因此减少NKG2D的配体能够实现良好的抗肿瘤免疫治疗效果。另外Kordelas等^[12]研究发现,干细胞外泌体可降低抗移植宿主病(therapy-refractory graft-versus-host disease, GVHD)患者体内的IL-1 β 、TNF- α 及 γ -干扰素水平,调节机体免疫,促进受损组织修复。近年来外泌体领域的研究已经成为未来应用研究的新方向。

2 外泌体在肿瘤微环境中的作用

2.1 改变肿瘤转移前微环境

肿瘤微环境主要是由肿瘤细胞、内皮细胞、免疫细胞和细胞外基质共同构成的,是肿瘤细胞赖以生存的复杂环境,微环境的成分与肿瘤细胞之间相互作用,从而促进肿瘤的发生、发展和转移。不同来源的外泌体可通过改变微环境影响受体细胞。Gu等^[13]研究发现,胃癌细胞来源的外泌体具有诱导分化的能力,能转运转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β),后与间充质干细胞表面的受体相互作用,进一步激活TGF- β /Smad通路,使间质干细胞向肿瘤细胞相关成纤维细胞分化,参与肿瘤微环境的形成,从而有利于肿瘤的生长与转移。Grange等^[14]发现CD105+肾细胞瘤分泌的外泌体可以激活内皮细胞,使其在基底膜基质组建毛细血管样结构,并且诱导化疗耐药性的产生;此外,这个实验还表明,通过上调MMP2、MMP9和VEGFR1,SCID小鼠分泌的CD105+外泌体有助于肿瘤在肺组织中构建转移微环境。另有研究发现小鼠黑色素瘤来源的外泌体可提高肺内皮细胞的渗透性,促进肺转移;此外,黑色素瘤来源的外泌体能聚集骨转移来源的外泌体,形成转移微环境^[15]。

2.2 外泌体参与血管形成

肿瘤血管形成的过程包括内皮细胞移行、增殖和形成新的基底膜。研究发现^[16]多种活性物质可调节肿瘤血管生成,这些促进新血管生成的血管生成因子主要是细胞因子类的多肽物质如血管内皮生长因子(Vascular Endothelial Cell Growth Factor, VEGF)、脂类及维生素等。肿瘤的血管形成为肿瘤细胞的生长、侵袭与转移提供了良好的环境,在肿瘤进展中占据了重要的作用。目前研究发现^[17]外泌体通过不同途径参与肿瘤血管的形成。如黑色素瘤细胞分泌含有IL6、VEGF和MMP2等物质的外泌体,可通过激活WNT5A信号通路促进肿瘤血管的生成。另外,慢性髓源白血病来源的外泌体miR92a,可与内皮细胞上的整合素 $\alpha 5$ 相互作用,引起血管内皮细胞迁移和原始血管管腔形成,从而促进肿瘤血管的生成,为肿瘤细胞的侵袭和转移发挥重要作用^[18]。Hsu YL等^[19]研究发现肺癌细胞分泌的外泌体miR-23a直接抑制脯氨酰羟化酶1和2(prolyl hydroxylase, PHD1和2)的表达,导致内皮细胞中缺氧诱导因子1 α (HIF-1 α)的积累。此外,外泌体miR-23a还抑制紧密连接蛋白ZO-1,从而增加血管通透性和肿瘤细胞的跨内皮迁移能力。由此可得,肿瘤来源的外泌体介导不同信号分子参与肿瘤血管的形成和改变血管通透性,从而促进肿瘤的发生、发展与转移。

2.3 外泌体在肿瘤转移中的作用

外泌体促进肿瘤转移表现在外泌体可直接促进肿瘤的侵袭和转移。因外泌体内容物蛋白质、脂质、RNA作用于受体细胞,使得钙离子减少,削弱了细胞间的粘附作用,促进肿瘤的迁移和侵袭^[20]。另外肿瘤细胞通过外泌体与肿瘤微环境中的细胞外基质细胞相互作用,促进肿瘤的侵袭。例如肿瘤微环境中脂肪细胞来源的间充质细胞可转化为成纤维细胞的外泌体可与肿瘤细胞分泌的SMAD信号通路促进肿瘤细胞的侵袭和转移^[21]。Jan等^[22]研究显示外泌体促癌作用存在于老鼠肿瘤4T1细胞中,其4T1细胞外泌体在4T1+CD11比4T1-CD11明显增加,肿瘤分泌的外泌体能改变微环境的状态从而影响肿瘤相关巨噬细胞浸润和M2极化导致肿瘤的生长。Yang^[23]等发现活化的巨噬细胞通过外泌体传递有侵袭能力的miR-223,并进一步通过Mef2c- β -catenin信号通路促进肿瘤细胞的侵袭,在卵巢癌中发现,癌旁成纤维细胞中LINC00092显著升高,同时趋化因子CXCL14的升

高,与卵巢癌的转移与不良预后有显著关系^[24]。转移的肿瘤细胞在出发前会先行释放出外泌体,外泌体会到达预期转移的器官,被相应的细胞所摄取,改变这些靶细胞的状态,营造一个适合转移来的肿瘤生长的微环境。在这其中,外泌体表面的整合素种类决定靶器官的特异性,例如整合素 $\alpha 6\beta 4$ 和 $\alpha 6\beta 1$ 与肺转移有关,而整合素 $\alpha v\beta 5$ 与肝转移有关^[25]。

2.4 外泌体影响免疫系统的调节

肿瘤微环境中的免疫细胞在肿瘤的发生进展中发挥着重要作用,肿瘤来源的外泌体对免疫系统具有抑制作用,有利于肿瘤细胞的逃逸,进而促使肿瘤细胞的侵袭与转移。有研究发现^[26]肿瘤来源的外泌体含有miR-21和miR-29a,两者均与免疫细胞表面细胞内toll样受体(TLR)结合,从而触发促转移炎症反应。在NK细胞中可下调NKG2D的表达,导致受体脱敏和内化,降低NK细胞活性。外泌体含有的EGFR可能诱导致耐受性树突状细胞和调节性T细胞,最终导致肿瘤抗原特异性CD8⁺T细胞受抑制。黑色素瘤和结直肠癌来源的外泌体促进CD14⁺单核细胞分化为MDSC,外泌体与单核细胞相互作用,分化为树突状细胞,并促进维持不成熟的单核细胞状态。这些细胞自发地分泌免疫抑制性细胞因子,如TGF- β 和前列腺素E2从而抑制T细胞的增殖^[27]。Wang等^[28]的研究证实,巨噬细胞分泌的外泌体包含的mirco155传递给心脏成纤维细胞,抑制心脏成纤维细胞增殖并促进心脏局部的炎症发生。从以上结果表明,肿瘤来源的外泌体能够在肿瘤微环境中发挥免疫抑制作用,促进肿瘤的发展。

3 外泌体在肿瘤临床诊断与治疗中的作用

3.1 外泌体在临床诊断中的作用

肿瘤患者由于发现较晚常常治疗效果不是很显著,因此寻找一种既特异性强又无毒性的肿瘤标志物越来越迫切。最近几年研究发现外泌体有望成为新的肿瘤标志物,因为外泌体广泛分布于真核细胞中,不同类型肿瘤细胞分泌的外泌体里的内容物不同对于诊断不同肿瘤提供帮助。不同肿瘤细胞来源的外泌体携带特异性的蛋白质和核酸分子等物质,因此可通过检测外泌体内特异性的蛋白与核酸来检测相应疾病的诊断。外泌体在不同类型肿瘤中如肝细胞癌、卵巢癌、前列腺癌、乳腺癌、胰腺癌的体液中检测到,具有易取材,重复取材的特点,可以在-70 $^{\circ}$ C的条件下长期保存^[29]。

此外外泌体的双层膜结构能有效保护内容物蛋白质和核酸被体内的酶所降解,有利于作为生物标志物被检测出。于乐成^[30]等研究发现,外泌体中的 miR-92a 在肝细胞癌中过度表达,可能作为原发性肝癌的诊断标志物用于临床检测。Brase 等^[31]研究发现,miRNA-375 和 miRNA-141 在前列腺患者血液外泌体中的表达增强,可作为诊断标志物用于前列腺癌的早期筛查。另一项研究表明^[32],血浆外泌体中生存素在肿瘤患者中明显增加,并与患者临床分期呈负相关。生存素 survivin 在甲状腺癌中具有重要的诊断、预后价值。这表明通过检测外泌体中生存素表达水平,即可有效诊断甲状腺癌、评估甲状腺癌患者病情。从以上可得知,不同肿瘤细胞来源的外泌体携带的蛋白质跟核酸分子可作为肿瘤标志物可提高对肿瘤诊断的准确性。

由此可见,对外泌体的研究会越来越深入,外泌体在细胞间通讯、肿瘤生长、免疫调节等作用会进一步地被揭开。因外泌体内含多种蛋白质、脂质和核酸,广泛分布于不同体液中,伤害小,因此可成为肿瘤诊断的新的肿瘤标志物,提高肿瘤早期诊断的机率。外泌体也是肿瘤微环境的重要组成部分,参与了肿瘤发生发展侵袭等多种过程,外泌体在微环境中的具体作用还需进一步的探索。随着精准医学时代的到来,人们会更加注重研究外泌体与肿瘤之间的密切关系,以此提高肿瘤诊断率。

3.2 外泌体在临床治疗中的作用

肿瘤细胞来源的外泌体能改变肿瘤微环境,促进肿瘤的转移。因此,减少肿瘤细胞外泌体的分泌是治疗肿瘤的一个有效措施。鉴于外泌体安全性高、特异性强、易于取材的特性,越来越成为目前研究的热点,目前肿瘤的治疗方法主要有化疗、放疗、生物靶向治疗和手术治疗。但是这些治疗方法受到对肿瘤耐药的影响,再加上肿瘤极易复发和转移,因此给治疗肿瘤带来了挑战,为此需要开发一种提高对肿瘤细胞耐药敏感性且无毒性的新型治疗方式。外泌体可作为运输抗肿瘤药物的载体将内容物如蛋白质、核酸等释放到肿瘤细胞中调节受体细胞的基因及影响肿瘤微环境的变化,从而达到抗肿瘤的作用^[33]。肿瘤分泌的外泌体可作为运输载体将紫杉醇等化疗药物运输到肿瘤细胞内以达到抗肿瘤的作用^[34]。另有研究发现,肿瘤组织的循环肿瘤细胞的人类表皮生长因子-2(HER-2)阴性的患者在治疗中检测到循环肿瘤细胞的 HER-2 可转

变为阳性,患者服用贝伐单抗药物后获得较好疗效^[35]。另外 Ichim 等^[36]研究发现表明,外泌体切除能够降低外泌体对免疫系统的逃逸,从而增加免疫治疗的敏感性。因外泌体表面携带特异性蛋白、整合素与分子伴侣等,已被应用在纳米药物作为抗肿瘤的疫苗作为临床治疗癌症的方案。

4 展望与总结

肿瘤细胞来源的外泌体释放到细胞外通过体液循环与靶细胞上的受体结合,转运特征性蛋白质和核酸,在促进肿瘤的侵袭和转移的过程中发挥着重要作用。因此明确外泌体的功能对于了解其在肿瘤微环境中的作用起着重要作用,随着对外泌体的深入研究,使我们对肿瘤细胞间的相互交流与机制有了深刻理解,为诊断与治疗肿瘤提供了新的理论依据。长期以来,对外泌体的研究主要集中在研制特定靶向的抗肿瘤疫苗,该疫苗是增强免疫还是耐受,其内在机制仍需探讨。因外泌体广泛分布于体液中,且有较长半衰期,可能成为适合的药物载体。但是目前对于外泌体作为药物载体的可行性有待研究。总之,随着对外泌体认识的加深,以外泌体研究为基础明确肿瘤检测、诊断、治疗方法,有望开发新的抗肿瘤药物及临床肿瘤干预措施。

参考文献

- [1] Colombo M, Raposo G. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles [J]. Annual review of cell and developmental biology, 2014, 30:255-289.
- [2] BIN-TAO PAN K T, CHOAN WU, MOHAMMED AD-AM, AND ROSE M. JOHNSTONE. Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes [J]. J Cell Bio, 1985, 101: 942-948.
- [3] TOMASETTI M, LEE W, SANTARELLI L, et al. Exosome-derived microRNAs in cancer metabolism: possible implications in cancer diagnostics and therapy [J/OL]. Exp Mol Med, 2017, 49(1): e285 [2018-09-10].
- [4] Caby MP, Lankar D, Vincendeau-Scherrer C, et al. Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma [J]. International immunology, 2005, 17(7):879-887.
- [5] Camussi G, Deregibus MC, Bruno S, et al. Exosomes/microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication [J]. Kidney international, 2010, 78(9):838-848.
- [6] Caby MP, Lankar D, Vincendeauscherrer Cet al. Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma [J]. Int Immunol, 2005, 17(7): 879-887.
- [6] Latifkar A, Ling L, Hingorani A, et al. Loss of Sirtuin 1 Alters the Secretome of Breast Cancer Cells by Impairing Lysosomal Integrity [J]. Developmental cell, 2019, 49(3): 393-

- 408.e7.
- [7] Valadi H, Ekström K, Bossios A, et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells[J]. *Nature cell biology*, 2007, 9(6):654-659.
- [8] Valadi H, Ekström K, Bossios A, et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells [J]. *Nature cell biology*, 2007, 9(6):654-659.
- [9] Phuyal S, Hessvik NP, Skotland T, et al. Regulation of exosome release by glycosphingolipids and flotillins[J]. *FEBS J*, 2014, 281(9):2214-2227.
- [10] Zhang Q, Fu L, Liang Y, et al. Exosomes originating from MSCs stimulated with TGF- β and IFN- γ promote Treg differentiation [J]. *Journal of cellular physiology*, 2018, 233(9):6832-6840.
- [11] Mincheva-Nilsson L. Cancer exosomes and NKG2D receptor-ligand interactions: impairing NKG2D-mediated cytotoxicity and anti-tumour immune surveillance [J]. *Seminars in cancer biology*, 2014, 28:24-30.
- [12] Kordelas L, Schwich E, Dittich R, et al. Individual Immune-Modulatory Capabilities of MSC-Derived Extracellular Vesicle (EV) Preparations and Recipient-Dependent Responsiveness [J]. *International journal of molecular sciences*, 2019, 20(7).
- [13] Gu J, Qian H, Shen L, et al. Gastric cancer exosomes trigger differentiation of umbilical cord derived mesenchymal stem cells to carcinoma-associated fibroblasts through TGF- β /Smad pathway [J]. *PloS one*, 2012, 7(12):e52465.
- [14] Grange C, Tapparo M, Collino F, et al. Microvesicles released from human renal cancer stem cells stimulate angiogenesis and formation of lung premetastatic niche [J]. *Cancer Res*, 2011, 71(15):5346-5356.
- [15] Peinado H, Alečković M, Lavotshkin S, et al. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET [J]. *Nature medicine*, 2012, 18(6):883-891.
- [16] Conteduca V, Kopf B, Burgio SL, et al. The emerging role of anti-angiogenic therapy in ovarian cancer (review) [J]. *International journal of oncology*, 2014, 44(5):1417-1424.
- [17] Syn N, Wang L, Sethi G, et al. Exosome-mediated metastasis: From epithelial-mesenchymal transition to escape from immunosurveillance [J]. *Trends in pharmacological sciences*, 2016, 37(7):606-617.
- [18] Umezu T, Ohyashiki K, Kuroda M. Leukemia cell to endothelial cell communication via exosomal miRNAs [J]. *Oncogene*, 2013, 32:2747-2755.
- [19] Hsu YL, Hung JY, Chang WA, Lin YS, Pan YC, Tsai PH, Wu CY, Kuo PL. Hypoxic lung cancer-secreted exosomal miR-23a increased angiogenesis and vascular permeability by targeting prolyl hydroxylase and tight junction protein ZO-1. *Oncogene*. 2017 Apr 24. PubMed PMID: 28436951.
- [20] Sharma S, Wu SY, Jimenez H, et al. Ca and CACNA1H mediate targeted suppression of breast cancer brain metastasis by AMRFEMF. *EBioMedicine*, 2019:194-208.
- [21] Cho JA, Park H, Lim EH. Exosomes from breast cancer cells can convert adipose tissue-derived mesenchymal stem cells into myofibroblast-like cells [J]. *Int J Oncol*, 2012, 40:130-138.
- [22] Jang JY, Lee JK, Jeon YK. Exosome derived from epigallocatechin gallate treated breast cancer cells suppresses tumor growth by inhibiting tumor-associated macrophage infiltration and M2 polarization [J]. *BMC Cancer*, 2013, 13:421.
- [23] Yang M, Chen J, Su F, et al. Microvesicles secreted by macrophages shuttle invasion-potentiating microRNAs into breast cancer cells [J]. *Mol Cancer*, 2011, 10:117.
- [24] ZHAO L, JI G, LE X, et al. Long non-coding RNA LINC00092 acts in cancer-associated fibroblasts to drive glycolysis and progression of ovarian cancer [J]. *Cancer Res*, 2017, 77(6):1369-1382.
- [25] Hoshino A, Costa-Silva B, Shen TL, et al. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis [J]. *Nature*, 2015, 527:329-335.
- [26] Lässer C, Alikhani VS, Ekström K, et al. Human saliva, plasma and breast milk exosomes contain RNA: uptake by macrophages [J]. *J Transl Med*, 2011, 9:9.
- [27] Shamila D. Alipoor1, image Esmail Mortaz, imageMohammad Varahram, image Mehrnaz Movassaghi, imageAletta D. Kraneveld, image Johan Garssen and imageJan M. Adcock. The Potential Biomarkers and Immunological Effects of Tumor-Derived Exosomes in Lung Cancer [J]. *Front. Immunol*, 18 April 2018.
- [28] Wang C, Zhang C, Liu L, et al. Macrophage-Derived mir-155-containing exosomes suppress fibroblast proliferation and promote fibroblast inflammation during cardiac injury [J]. *Mol Ther*, 2017, 25:192-204.
- [29] Taylor DD, Gercel-Taylor C. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer [J]. *Gynecol Oncol*, 2008, 110(1):13-21.
- [30] 于乐成, 何长伦, 陈成伟. 外泌体在肝病发病机制、诊断和治疗中的作用 [J]. *肝脏*, 2014, 19(3):211-214.
- [31] Brase JC, Johannes M, Schlomm T, et al. Circulating miRNAs are correlated with tumor progression in prostate cancer [J]. *Int J Cancer*, 2011, 128:608-616.
- [32] Waligórska-Stachura J, Andrusiewicz M, Sawicka-Gutaj N, et al. Survivin delta Ex3 overexpression in thyroid malignancies. *PLoS One*, 2014, 9:e100534.
- [33] 盛湲, 李恒宇. 外泌体: 肿瘤精确诊疗的新热点 [J/CD]. *中华乳腺病杂志(电子版)*, 2016, 10(3):133-136.
- [34] Tian Y, Li S, Song J, et al. A doxorubicin delivery platform using engineered natural membrane vesicle exosomes for targeted tumor therapy [J]. *Biomaterials*, 2014, 35(7):2383-2390.
- [35] Wallwiener M, Hartkopf AD, Baccelli I, et al. The prognostic impact of circulating tumor cells in subtypes of metastatic breast cancer [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2013, 137:503-510.
- [36] Syn NL, Wang L, Chow EK, et al. Exosomes in Cancer Nanomedicine and Immunotherapy: Prospects and Challenges [J]. *Trends Biotechnol*, 2017, 35:665-676.

实验室巡礼

广州市番禺区妇幼保健院(番禺区何贤纪念医院)

广州市番禺区妇幼保健院(番禺区何贤纪念医院)始建于1965年。核定病床650张,开放床位800张,职工1463人,副高以上职称专业技术人员207名,硕博士118名。2015年12月广州市卫计委《关于番禺区妇幼保健院调整为三级妇幼保健机构的批复》明确调整为三级妇幼保健院。番禺区妇幼保健院以妇科、产科、儿科以及生殖医学为特色,妇幼保健体系健全的三级妇幼保健院和综合性医院;是南方医科大学非直属附属医院。是番禺区重症孕产妇救治中心、重症儿童救治中心,是番禺地区唯一的免费婚前孕前检查医疗机构,唯一获得“体外受精-胚胎移植及卵胞浆内单精子显微注射技术”运行资格机构,唯一具备产前诊断中心资质机构。近年,医院业务发展迅速,2017年门急诊量逾187万人次,出院3.6万人次,分娩数10517人次,占番禺区分娩数22.92%,居广州地区医院前列。何贤纪念医院坚持“以保健为中心,以保障生殖健康为目的,保健与临床相结合,面向群体、面向基层和预防为主”的工作方针,以服务妇女儿童为重,致力提高妇女儿童健康水平。充分依托各专科优势,为妇幼保健工作提供强有力的支持。多年来,产科质量和分娩量位居广州地区前列,妇科、生殖医学、儿科、新生儿科、儿童保健、妇女保健等学科特色突出。与区内九家医疗机构建立医联体关系,可推进医疗卫生资源合理布局和均衡发展。

作为番禺区政府唯一设置的妇幼保健院,在承担政府妇女儿童健康管理公益职能、技术力量、专业特长、专科医院建设、管理经验等方面均具备了三级妇产医院的条件和基础。番禺区妇幼保健院妇产科及相关专业经过数十年的建设,在番禺区及周边地区形成了品牌效应,得到了市民和区内同行的认可和信赖。

产科是何贤医院的重点科室,现有医生27名,护士156人(其中助产士43人),其中主任医师1名,副主任医师14名,主治医师9名,住院医师3名;硕士研究生9名。南方医科大学兼职教授、硕士研究生导师1名。开设产科床位167张对急危重症患者开通急诊绿色通道并收住OICU。对每位住院患者均有适宜的诊疗计划。按照临床诊疗指南、疾病诊疗规范、药物临床应用指南、临床路径规范诊疗行为,监控临床诊疗质量。

妇科是番禺区妇幼保健院重点科室,医护人员共50余名,其中主任医师3名,副主任医师13名,主治医师7名,住院医师4名;其中博士学历2名,硕士6名。南方医科大学兼职教授、硕士研究生导师1名。设普通妇科、妇女保健科、生殖医学科、中医妇科等学科。生殖医学科于2015年9月“体外受精-胚胎移植及卵胞浆内单精子显微注射技术”获得试运行资格;2016年10月通过广东省卫生计生委评审,开始正式运行。妇女群体保健科是番禺区妇女保健及业务指导中心,监管妇女医疗保健网络,承担辖区内妇女保健指导和全区各级妇女保健工作人员的技术培训。医院拥有多台高清宫腹腔镜、宫腔镜线旋切系统(奥美舒)、电子阴道镜、宫颈电环切设备等价值数千万余元妇科专科医疗设备,掌握妇科疑难重症诊治及关键技术能力。



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。

