



ISSN 1674-6929

CN 44-1656/R

邮发代号: 46-283

分子诊断与治疗杂志

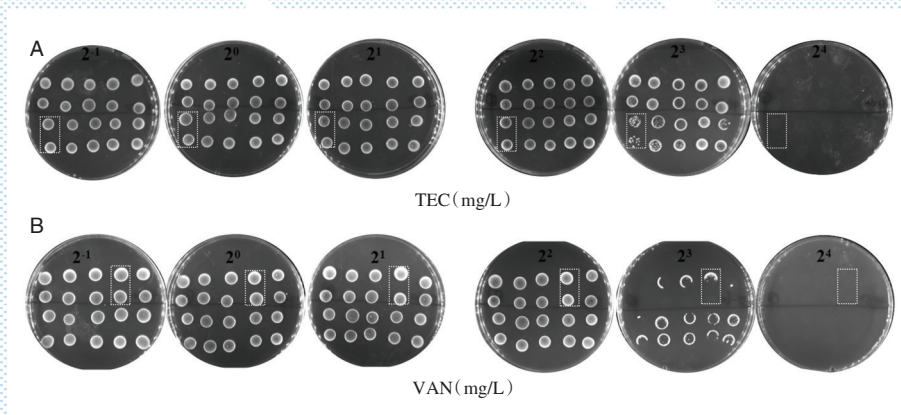
FENZI ZHENDUAN YU ZHILIAO ZAZHI

2021年11月 第13卷 第11期 总第87期

JOURNAL OF

MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Volume 13 Number 11 November 2021



注:白色虚线方框为MPAP法HR阳性结果;A为MRSA-TEC-HR MPAP法初筛结果;B为MRSA-VAN-HR MPAP法初筛结果。

图(1773) MRSA-TEC-HR与MRSA-VAN-HR初筛的MPAP结果

Figure(1773) The preliminary screening results of MRSA-TEC-HR and MRSA-VAN-HR by MPAP method

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

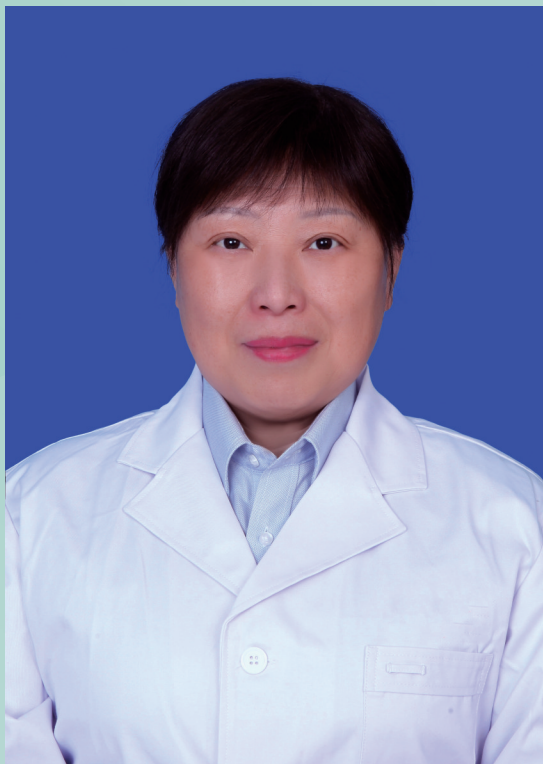


9 771674 692211

11>



于农



于农,《分子诊断与治疗杂志》第四、五届编辑委员会编委。

1963年8月出生,毕业于第一军医大学,主任技师。现任苏州国家高新技术产业开发区临床检验中心主任。担任中国中西医结合学会检验医学专业委员会委员,中国中西医结合学会分子诊断技术专委会副主任委员,中华医学会检验医学分会分子诊断学组委员,中国研究型医院学会检验专家委员会委员,中国医疗器械行业协会现场快速检测(POCT)分会委员,苏州医学会临床检验专业委员会委员,苏州市医院协会临床检验管理专业委员会委员。

从事微生物分子诊断研究工作多年,承担或参与国家“863”课题、973课题、国家自然科学基金课题等国家、省部级研究课题10余项。获全军医疗成果二等1项,三等奖2项,省科技进步二等奖1项,市级科技进步三等奖1项,市级新技术引进一等奖1项,获国家新型实用专利1项,发表SCI、核心期刊论文30余篇。参编专著3部。

作为学科带头人,实验室建立不久就获批苏州市重点专科,并于2021年11月通过国家认可委《医学实验室质量和能力认可准则》(CNAS-CL 02,ISO15189)认可现场评审,较早面向临床开展了24小时不间断报告的急诊快速分子诊断技术,在45分钟内可以报告甲流、乙流、呼吸道合胞病毒核酸检测结果,这个项目不但为临床快速诊断常见呼吸道传染病提供了依据,也在新冠疫情早期的临床鉴别诊断中发挥了很好的作用。做为江苏省首批新冠核酸检测实验室,目前已经具备了万管核酸检测能力。

分子诊断与治疗杂志

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

月刊 2021 年 11 月 第 13 卷 第 11 期 总第 87 期 Monthly Volume 13 Number 10 November 2021

主管	中山大学
主办	《中国家庭医生》杂志社有限公司
承办	广州达安基因股份有限公司
总编辑	张翼鹏
顾问	申子瑜
主编	李明
编辑部主任	蒋析文
编辑部副主任	刘悦
编辑部	《分子诊断与治疗杂志》编辑部
编辑	李晓兰 李彩珍 莫源浩
出版	《中国家庭医生》杂志社有限公司
地址	广州市天河区天河北路 179 号祥龙大厦 11 楼 (510620)
电话	(020) 32290789-206, 32290789-201
电子邮箱	jmdt@vip.163.com
刊号	ISSN 1674-6929 CN 44-1656/R
邮发代号	46-283
发行单位	广东省报刊发行局
发行范围	国内外公开发售
广告发布登记通知书	440100190057
印刷	天意有福科技股份有限公司
出版日期	2021 年 11 月 18 日
定价	RMB 15.00 元
Responsible Institution	Sun Yat-sen University
Sponsor	China Family Doctors Magazine Publisher Co., Ltd.
Organizer	Daan Gene Co., Ltd.
Editor in Chief	ZHANG Yipeng
Consultant	SHEN Ziyu
Editor in Chief	LI Ming
Managing Director	JIANG Xiwen
Associate Editor	LIU Yue
Editorial Office	<JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY> Editorial Office
Editors	LI Xiaolan LI Caizhen MO Yuanhao
Editing	China Family Doctors Magazine Publisher Co., Ltd.
Add	11 Fl., Xianglong Building, 179# Tian he bei Lu, Guangzhou, China 510620
Tel	(020) 32290789-206, 32290789-201
E-mail	jmdt@vip.163.com
CSSN	ISSN 1674-6929 CN 44-1656/R
Printing	TianYi Yofus Technology Co., Ltd.
Publish Date	2021.11.18
Price	RMB 15.00



扫码订阅《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。

中国科学技术信息研究所

Institute of Scientific and Technical Information of China

北京复兴路 15 号 100038

www.istic.ac.cn

2020年12月

证书编号: 2019-G556-0386
有效期至: 2021年12月



分子诊断与治疗杂志

月刊 2021年11月 第13卷 第11期

目次

述评

CRISPR/Cas 系统的核酸诊断技术应用进展 刘晓玫 魏双施 于农(1731)

论著

PBMC 中 PD-L1、HLA-B、MRP5 在晚期乳腺癌放疗过程中的动态表达及意义
..... 寸倩滢 张思荣 唐恩跃(1735)

流感嗜血杆菌核酸检测试剂盒国家参考品的建立 黄洋 李康 徐潇 等(1740)

宫腔镜电切手术在胚胎残留患者中的疗效观察及对 VEGF、FGF 血管生成因子的影响
..... 邱星梅 郑芳 谢艳芬 等(1744)

人类白细胞抗原基因分型检测试剂盒行业标准的修订与验证
..... 胡泽斌 王瑞霞 代蕾颖 等(1748)

RANKL/OPG、MIP-1 α 、TSLP 对口腔正畸治疗中牙周病的诊断价值
..... 闫利辉 陈卓 谢冰 等(1752)

基于生物信息学分析 *ESPL1* 基因在肺腺癌中表达与突变的临床意义
..... 柳家翠 黄奔 程庆元 等(1756)

CEA、CA153、CA125 与乳腺癌临床病理因素的关系 秦燕 陈英 陈雷(1761)

VEGF-C、CCL21 及 Bmi-1 蛋白在上皮性卵巢癌组织中的表达及意义
..... 惠志龙 张利萍 王龙影 等(1765)

MRSA 对万古霉素和替考拉宁的异质性耐药情况及分子分型
..... 蓝锴 钟国升 刘宇阳 等(1770)

Ki67、p63、P504s、LIMK1、Cofilin 免疫组化检测在前列腺病理诊断中的价值
..... 何进 徐月 沈文婷(1775)

术前 Lp-PLA2、PLR 联合术后 HPR 预测 AMI 患者 PCI 术后半年内 MACE 的价值
..... 朱晓明 黄勇先(1779)

利奈唑胺联合环丝氨酸胶囊治疗肺结核的疗效分析 任淑君 刘新 王旭 等(1783)

MSI、HGF 与胃癌临床病理学特征及预后关系的 孟宁 刘晟楠 周谦(1787)

粪便中脱落细胞基因检测在炎症性肠病诊断中的临床价值 刘秀卿 顾大勇 李延武 等(1792)

口腔癌患者血清 UCA1、HGF、uPA 水平与临床特征和预后的关系 冯建梅 王钟华 王芹(1796)

NHL 化疗患者 NLR、PLR、RDW 变化及对肺部感染的预测价值
..... 刘蕾 易琴 聂甜 等(1800)

S100A2、Blimp1 在多发性骨髓瘤患者骨髓单个核细胞中的表达水平及意义
..... 吕殿亮 张宽顺 吴艺 等(1805)

串联质谱技术在新生儿遗传代谢病筛查中的应用分析 郑国兵 梁睿 唐家彦 等(1809)

血清 PAF、IMA 水平联合 ABCD2 评分对 TIA 发作后短期进展为脑梗死的早期预测价值
..... 陈静 董俊兴 李启晖 等(1813)

急性髓系白血病患者CD73、DJ-1及LAMP4基因表达及意义

..... 王萍 高红秀 任晓艳 等(1817)

血清sIL-3、VEGF、25-(OH)D3在急性白血病患者中水平及其与凝血功能相关性

..... 向金峰 王刚 卜凡丹 等(1822)

血清Ghrelin、GAS、CCK与保胆取石术后患者胃肠功能恢复的关系

..... 刘雄友 郭忠涛 李阳阳(1826)

血浆抗糖抗体检测在IgA肾病中的作用及其与临床病理指标的相关性

杨钢 刘静(1830)

鼻腔鼻窦内翻性乳头状瘤组织中HPV/补体C3C4表达及意义

马汝显 周玲(1834)

孕妇血清PP13、甲状腺指标及β-hCG水平与重度PE发生的关系

..... 任国丽 邓春霞 张凡 等(1838)

外周血CTRP9、HMGB1及CRP水平对AIS患者静脉溶栓后出血转化的预测作用

..... 李虎 花军(1842)

胰腺癌患者手术前后血清S100A9、MMP-9变化及其相关性

..... 朱晓龙 张光亮 裴建灰 等(1846)

血清Vaspin、MMP-2联合Lp-PLA2对CAS斑块稳定性的诊断价值

..... 蒋海昌 郭亚鹏 王枫 等(1850)

慢性萎缩性胃炎Hp感染患者胃黏膜形态及IL-34、PLR水平探讨

..... 杨小乔 梁彪 叶丽芳 等(1854)

复发性流产患者PAI-1、TSP-1、D-D水平变化及其临床意义

张亚崴 张丽萍 于治芳(1858)

泌尿系肿瘤患者手术后联合DC-CIK免疫细胞治疗有效性及不良反应

..... 肖永平 潘钰娇 陶文学 等(1862)

MMP3、IL-18对膝关节关节炎的疗效评估价值及与PGE-2的相关性

..... 王俊江 王红建 宋晓磊 等(1866)

外周血Cyp A、NF-κB及VEGF水平与CHD患者术后再狭窄的相关性

..... 李洪 朱强 石梦然 等(1871)

Her-2蛋白、PGⅡ及Sema4D蛋白在胃癌组织中的表达及临床意义

彭强 余昌俊(1875)

PCT、N%、WBC、CRP在胎膜早破患者并发绒毛膜羊膜炎的诊断及预后评估中的应用

..... 程春花 张盼盼 郭艳 等(1879)

红细胞参数对小儿轻型地贫及轻度缺铁性贫血的诊断价值

杨喆 黄斌 苏伟娜 等(1884)

炎症水平对慢性阻塞性肺疾病患者肺气肿与骨密度的影响

王宇 赵勇 熊启敏(1888)

产前嵌合型9三体胎儿的临床和遗传学分析

李星 潘丽媛 王挺 等(1892)

脑脊液HBP、LDH、β2MG水平对化脓性脑膜炎患儿的诊断价值

..... 鲍茹 李永凤 陈莹(1896)

ABCG2、VEGF及miRNA-23a与乳腺癌术后同侧锁骨上淋巴结转移的关系

..... 刘平贤 张浩 王征 等(1900)

综 述

外泌体在神经系统疾病研究中的进展..... 李慧灵 赵琳琳 汪煜楠 等(1905)

专家风采

于农..... (封二)

实验室巡礼

苏州国家高新技术产业开发区临床检验中心分子诊断实验室..... (封三)

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Monthly Volume 13 Number 11 November 2021

CONTENTS

COMMENTS

Applications of the CRISPR/cas system for nucleic acid diagnostics

LIU Xiaomei, WEI Shuangshi, YU Nong (1731)

ORIGINAL ARTICLES

The dynamic expression and significance of PD-L1, HLA-B and MRP5 in PBMC during the radiotherapy of advanced breast cancer

CUN Qianying, ZHANG Sirong, TANG Enyue (1735)

Establishment of national reference materials of *Haemophilus influenzae* nucleic acid test kit

HUANG Yang, LI Kang, XU Xiao, LI Jiangjiao, WANG Chune, LIANG Li, CHEN Chi, LIU Rufeng, YE Qiang (1740)

Observation of the curative effect of hysteroscopic electric resection in patients with residual embryos and its influence on VEGF and FGF angiogenesis factors

QIU Xingmei, ZHENG Fang, XIE Yanfen, ZHANG Yanni (1744)

Establishment and Verification of the Industry Standard for HLA Gene Typing Kits

HU Zebin, WANG Ruixia, DAI Leiyang, QU Shoufang, HUANG Jie (1748)

The value of RANKL/OPG, MIP-1 α , TSLP in the diagnosis of periodontal disease in orthodontic treatment

YAN Lihui, CHEN Zhuo, XIE Bing, YAO Hailiang, ZHANG Xian, LIU Lin, WU Shiqian, YUE Yang (1752)

Clinical significance of *ESPL1* gene expression and mutation in lung adenocarcinoma based on bioinformatics analysis

LIU Jiabei, HUANG Ben, Cheng Qingyuan, CAI Weiguo, DUAN Yiping, CHEN Liangyue, MA Tiantian, ZHU Cuiwen, YU Mingxia (1756)

Relationship between nipple discharge and serum markers of carcinoembryonic antigen, cancer antigens 125 and cancer antigens 153 levels and clinicopathological factors of breast cancer

QIN Yan, CHEN Ying, CHEN Lei (1761)

Expression and significance of VEGF-C, CCL21 and Bmi-1 protein in epithelial ovarian cancer

HUI Zhilong, ZHANG Liping, WANG Longying, WANG Hui (1765)

Heteroresistance and molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to vancomycin and teicoplanin

LAN Kai, ZHONG Guosheng, LIU Yuyang, CHEN Yao, WU Zhongwen, YU Xuegao, CHEN Cha, HUANG Bin (1770)

The value of Ki67, p63, P504s, LIMK1, Cofilin immunohistochemical detection in the diagnosis of prostate pathology

HE Jin, XU Yue, SHEN Wenting (1775)

Preoperative Lp-PLA2 and PLR combined with postoperative HPR predicts the value of MACE within six months after PCI in AMI patients

ZHU Xiaoming, HUANG Yongxian (1779)

Curative effect of linezolid combined with cycloserine capsule on tuberculosis

REN Shujun, LIU Xin, WANG Xu, ZHAO Yong (1783)

Study on Clinical Pathologic Characteristics and Prognostic between MSI, HGF and Gastric Cancer

MENG Ning, LIU Shengnan, ZHOU Qian (1787)

Clinical value of gene detection of exfoliated cells in feces in the diagnosis of inflammatory bowel disease

LIU Xiuqing, GU Dayong, LI Yanwu, GUO Haijian, LI Taihan (1792)

Relationship between serum UCA1, HGF and uPA levels and clinical features and prognosis in patients with oral cancer

FENG Jianmei, WANG Zhonghua, WANG Qin (1796)

Changes of NLR, PLR and RDW in NHL chemotherapy patients and their predictive value for lung infection

LIU Lei, YI Qin, NIE Tian, HE Yana (1800)

Expression and significance of S100A2 and Blimp1 in bone marrow mononuclear cells of patients with multiple myeloma

LV Dianliang, ZHANG Kuanshun, WU Yi, FENG Lei, SHI Lin (1805)

Application of tandem mass spectrometry in the screening of neonatal inherited metabolic diseases ZHENG Guobing, LIANG Rui, TANG Jiayan, WANG Degang, LIANG Shaoxia, XIE Fenghua	(1809)
The early predictive value of serum PAF and IMA levels combined with ABCD2 score for the short-term progression of cerebral infarction after the onset of transient isochemic attack CHEN Jing, DONG Junxing, LI Qihui, LIANG Yan, DAI Min, ZHANG Min	(1813)
The expression and significance of CD73, DJ-1 and LAMP4 genes in patients with acute myeloid leukemia WANG Ping, GAO Hongxiu, REN Xiaoyan, GUO Li, WU Shengsheng	(1817)
Serum levels of sIL-3, VEGF, and 25-(OH) D3 in children with acute leukemia and their correlation with coagulation function XIANG Jinfeng, WANG Gang, BU fandan, CHEN Zhixin, ZHANG Xian, ZHANG Han	(1822)
Relationship between serum ghrelin, GAS, CCK and the recovery of gastrointestinal function in patients after cholecystolithotomy LIU Xiongyou, GUO Zhongtao, LI Yangyang	(1826)
Plasma anti-glycemic antibody detection in IgA nephropathy and its correlation with clinicopathological indicators YANG Gang, LIU Jing	(1830)
Expression and significance of HPV/complement C3, C4 in inverted papilloma of nasal cavity and paranasal sinuses MA Ruxian, ZHOU Ling	(1834)
Relationship between serum PP13, thyroid indicators and β -hCG levels and the occurrence of severe PE in pregnant women REN Guoli, DENG Chunxia, ZHANG Fan, GAO Liya, SUN Hongbo, ZHAO Guijun	(1838)
The predictive effect of peripheral blood CTRP9, HMGB1 and CRP levels on hemorrhage transformation after intravenous thrombolysis in AIS patients Effect and safety analysis of laser iphoplasty and YAG laser and composite trulectomy on angle-closed glaucoma LI Hu, HUA Jun	(1842)
Changes and correlation of serum S100A9 and MMP-9 in patients with pancreatic cancer before and after surgery ZHU Xiaolong, ZHANG Guangliang, PEI Jianhui, ZHU Leheng	(1846)
Diagnostic value of serum vaspin and MMP-2 combined with Lp-PLA2 for the stability of CAS plaques JIANG Haichang, GUO Yapeng, WANG Feng, GUO Daoliu, LI Lei	(1850)
Study on gastric mucosal morphology and IL-34 and PLR levels in patients with Helicobacter pylori infection in chronic atrophic gastritis YANG Xiaoqiao, LIANG Biao, YE Lifang, WU Jiachuan, CHEN Ruiyan, TAN Wenhui	(1854)
Changes and clinical significance of PAI-1, TSP-1 and D-D levels in patients with recurrent spontaneous abortion ZHANG Yawei, ZHANG Liping, YU Zhifang	(1858)
Effectiveness and adverse effects of combined DC-CIK immune cell therapy in patients with urinary tract tumors after surgery XIAO Yongping, PAN Yujiao, TAO Wenxue, WANG Fan, REN Xiaoxia	(1862)
Evaluation of the curative effect of MMP3 and IL-18 on knee osteoarthritis and their correlation with PGE-2 WANG Junjiang, WANG Hongjian, SONG Xiaolei, DING Junqing, HAN Jingmin, Yuan Weijie, SANG Zhenfei, ZHANG Bin	(1866)
Correlation between the levels of CYP A, NF- κ B and VEGF in peripheral blood and postoperative restenosis in patients with CHD LI Hong, ZHU Qiang, SHI Mengran, LIU Fuyuan	(1871)
Expressions and clinical significance of Her-2, PG II and Sema4D in gastric cancer PENG Qiang, YU Changjun	(1875)
Application of PCT, N%, WBC, CRP in the diagnosis and prognosis evaluation of patients with premature rupture of membranes complicated by chorioamnionitis CHENG Chunhua, ZHANG Panpan, GUO Yan, LI Genxia	(1879)
The value of red cell indices in diagnosis of the mild thalassemia and the mild iron deficiency anemia in children YANG Zhe, HUANG Bin, SU Weina, LIN Fen, CHEN Chaoqing, WU Jianpeng, LIN Weihao, XIE He, YANG Liye	(1884)
Influence of inflammation level on emphysema and bone mineral density in patients with chronic obstructive pulmonary disease WANG Yu, ZHAO Yong, XIONG Qimin	(1888)
The incidence of mosaic trisomy 9 in prenatal diagnosis and pregnancy outcome LI Xing, PAN Liyuan, WANG Ting, LIU Shu, LU Jian	(1892)
The value of cerebrospinal fluid HBP, LDH, β 2MG levels in the diagnosis of children with suppurative meningitis BAO Ru, LI Yongfeng, CHEN Ying	(1896)
The relationship between ABCG2, VEGF and miRNA-23a levels and ipsilateral supraclavicular lymph node metastasis after breast cancer surgery LIU Pingxian, ZHANG Hao, WANG Zheng, LI Weihan, LU Jiatuan	(1900)

REVIEWS

Progress of research on exosomes in nervous system diseases LI Huiling, ZHAO Linlin, WANG Yunan, SONG Ling, GUO Siqi, ZHANG Jingyu	(1905)
---	--------

CRISPR/Cas 系统的核酸诊断技术应用进展

刘晓玫¹ 魏双施^{1*} 于农^{2*}

[摘要] 建立快速、灵敏、特异的核酸分析方法,对于精准的疾病诊断和有效的临床治疗具有重要意义。规则成簇间隔短回文重复序列(CRISPR)系统被认为是具有广泛医学应用潜力的通用型基因组编辑工具。近几年,由于CRISPR/Cas系统高度的灵活性、敏感性和特异性而被开发用于病原体检测、肿瘤早期诊断、单核苷酸多态性(SNP)分析等。本文概括介绍了CRISPR/Cas系统核酸检测技术及其应用进展。

[关键词] CRISPR/Cas系统;核酸检测;病原检测;肿瘤诊断

Applications of the CRISPR/Cas system for nucleic acid diagnostics

LIU Xiaomei¹, WEI Shuangshi^{1*}, YU Nong^{2*}

(1. The Key Laboratory of Bio-Medical Diagnostics, Chinese Academy of Sciences, Suzhou Institute of Biomedical Engineering and Technology, CAS, Suzhou, Jiangsu, China, 215163; 2. Department of Laboratory Medicine, the People's Hospital of SND, Suzhou, Jiangsu, China, 215129)

[ABSTRACT] Methods that enable rapid, sensitive and specific analyses of nucleic acid sequences are of great significance for precise disease diagnosis and effective clinical treatment. The clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) system is considered to be a universal genome editing tool with a wide range of potential medical applications. In recent years, due to the high flexibility, sensitivity and specificity of the CRISPR/Cas system, it has been developed for pathogen detection, early tumor diagnosis, single nucleotide polymorphism (SNP) analysis. This review provides an overview of the nucleic acid detection technology of the CRISPR/Cas system and its application progress.

[KEY WORDS] CRISPR/Cas system; Nucleic acid detection; Pathogen detection; Tumor diagnosis

自1987年在大肠杆菌(*Escherichia coli*, E.coli)中发现规则成簇间隔短回文重复序列(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, CRISPR)以来,对生物学,尤其是基因组编辑和基因工程领域的基础研究和临床应用带来了巨大的改变^[1]。细菌和古细菌的原核细胞中存在的CRISPR/Cas系统,通过依赖于指导RNA的DNA或RNA核酸酶活性提供针对外来遗传元件的适应性免疫,保护生物体免受外源核酸的引入^[2-4]。CRISPR基因座由重复序列组成,长度约为20~40 bp,被独特的间隔20~58 bp的间隔子隔开^[5]。CRISPR基因座的下

游为编码Cas蛋白的序列,而且其中一些蛋白质以前被认为与DNA修复有关^[3]。病毒DNA或质粒首次进入细胞后,它将被Cas蛋白降解并插入重复序列之间的特定位置。如果细菌宿主确实具有CRISPR系统,则这些序列会在细胞中转录生成CRISPR RNA(crRNA),并与Cas蛋白形成干扰复合物。在crRNA的指导下,该复合物可指导crRNA与病毒DNA之间氢键的形成,从而催化外源DNA的分裂^[5]。

随着研究的逐步深入,人们对CRISPR和CRISPR相关(Cas)蛋白的结构以及功能有了更深入的了解,发现具有核酸酶、解旋酶和聚合酶等多种

基金项目:江苏省自然科学基金资助项目(BK20180224)

作者单位:1. 中国科学院苏州生物医学工程技术研究所,中国科学院生物医学检验技术重点实验室,江苏,苏州215163

2. 苏州高新区人民医院检验科,江苏,苏州215129

*通信作者:魏双施, E-mail: weiss@sibet.ac.cn; 于农, E-mail: yunong78612@sina.com

活性的不同类型的 Cas 蛋白。根据最新的分类, CRISPR/Cas 系统被分为两个主要的大类、六种型以及 48 个亚型。其中第一类的 Cas 蛋白为多亚基效应复合物,包括 I 型的 Cas3、III 型的 Cas10、IV 型的 Cas1;第二类的 Cas 蛋白为单亚基效应蛋白,包括 II 型的 Cas9、V 型的 Cas12 和 VI 型 Cas13 等^[6-7]。

CRISPR 系统因具有有效的核酸识别和编辑能力的固有优势,已被证明是核酸检测的有力工具。此篇综述简要总结 CRISPR/Cas 系统在检测中的几种常用酶,及其在传染病病原及肿瘤核酸诊断中的应用进展,旨在为该领域研究人员提供参考。

1 核酸检测中的 Cas 蛋白

1.1 Cas9

CRISPR/Cas9 的工作原理是,Cas9 与引导 RNA (guide RNA, gRNA) 协同工作。gRNA 包含一个 CRISPR RNA (crRNA),其 3' 端与 tracrRNA 配对,crRNA 的 5' 游离端是 DNA 的靶序列,Cas9 抓住 tracrRNA,形成二元复合物。这使 Cas9 可以将 crRNA 靶序列引导至 DNA 分子上的互补区(前间隔序列)。crRNA 与前间隔序列的配对将使匹配的第二条 DNA 链分开,并形成 Cas9-gRNA-前间隔序列三元复合物。取决于前间隔序列和前间隔序列相邻基序 (protospacer adjacent motif, PAM) 的存在,crRNA 目标序列可指导 Cas9 切割前间隔序列中两条 DNA 链(图 1A)。为了方便进行基因组编辑,crRNA 和 tracrRNA 被设计为单个嵌合体,称为单向导 RNA (single guide RNA, sgRNA)^[8-9]。2016 年,Keith Pardee 等^[10]首次报道了一种基于 CRISPR/Cas9 的序列特异性核酸酶活性的新技术,应用于寨卡病毒检测。作者利用依赖核酸序列的扩增技术 (Nucleic Acid Sequence Based Amplification, NASBA),扩增过程的中间产物双链 DNA 作为 Cas9 核酸内切酶的底物,如果 Cas9 切割了该 dsDNA 中间体,则体外转录产生截短的 RNA;而非目标分子中间体不被切割产生完整的 RNA,从而激活 Toehold 反应。靶标 RNA 的检测通过纸盘上的颜色变化来指示(图 2A)。该技术可实现区分具有单碱基差异的寨卡病毒毒株,例如非洲和美国 Zika 变体,而区分不同的 Zika 变体可用于基因分型和确定感染的起源。

随后,研究人员相继开发了 CRISPR/Cas9 与指数扩增反应 (Exponential amplification reaction, EXPAR) 和滚环扩增 (Rolling circle amplification,

RCA) 相结合的高度敏感和特异性的核酸检测器。Huang 及其同事将 CRISPR/Cas9 切割与 EXPAR 结合在一起,提出了一种称为 CAS-EXPAR 的单链核酸生物传感方法^[11]。在 PAM 呈递寡核苷酸 (PAM-presenting oligonucleotide, PAMmer) 的协助下,将 ssDNA 或 RNA 在特定位点切割,以释放短片段,这些片段起引物作用以启动 EXPAR 过程,从而产生丰富的 ds-和 ssDNA 扩增子。EXPAR 强大的指数扩增能力使 CAS-EXPAR 的分析灵敏度达到了 0.82 aM。就特异性而言,CAS-EXPAR 可以区分恰好位于切割位点的单碱基错配,因为该错配会阻碍 EXPAR 的引物延伸,从而消除读数。CAS-EXPAR 技术已成功应用于单核细胞增生李斯特菌 mRNA 的检测。

1.2 Cas13

Cas13 是一种 RNA 引导的核糖核酸酶 (RNase)。Cas13a 在相应的 crRNA 的引导下,特异性切割带有互补间隔序列的单链 RNA (ssRNA)。而且,结合到 ssRNA 靶标后,Cas13a 蛋白被激活并转化为非特异性内切酶,对附近的非靶标 ssRNA 具有附带的裂解活性(图 1C)^[12-13]。2016 年,East-Seletsky 及其同事首次尝试使用 LbuCas13a 检测噬菌体 λ RNA 和内源性 β -肌动蛋白 mRNA。Cas13a 被 ssRNA 靶标激活,进而降解了荧光淬灭剂标记的 ssRNA (ssRNA-FQ) 报告基因,从而增加了荧光强度,并实现了检出限 (Limit of detection, LOD) 低至 1-10 pM 的快速检测^[12]。

2017 年,张锋等^[14]报道了基于 Cas13a 的“SHERLOCK”核酸诊断工具。首先,将重组酶聚合酶扩增 (Recombinase Polymerase Amplification, RPA) 或 RT-RPA 用作预扩增,然后进行 T7 体外转录,这会产生大量 RNA 扩增子,这些扩增子随后触发 ssRNA-FQ 报告基因的 Cas13 侧链切割,从而产生荧光读数(图 2B)。整个过程在 37℃ 条件下的 1~3 h 内实现了阿摩尔 (attomolar, aM 或 10^{-18} M) 浓度的 RNA 和 DNA 检测。值得关注的是,将该技术试剂制成冻干滤纸可用于即时检测 (point-of-care testing, POCT),同时保持了阿摩尔的灵敏性,而且成本低廉,只需 0.61 美元/反应。随后,该团队推出了名为 SHERLOCKv2 的二代技术,它增加了四点优势:①可实现单管四重检测;②通过调节 RPA 引物来控制指数预扩增的进程,从而在低至阿摩尔水平的各种浓度范围内进行定量;③由

Cas13a 侧链切割触发的 Csm6 核酸酶活性的级联激活提高敏感性;④90 分钟内通过肉眼读数灵敏度可达 2 aM。总的来说, SHERLOCK 和先进的 SHERLOCKv2 是具有 aM 级的核酸检测灵敏度和单碱基特异性的多功能、快速、便携式且经济高效的核酸检测技术, 这对于 POCT、流行病监测和病原体检测非常需要, 尤其适用于基础设施比较不完善的欠发达地区。

1.3 Cas12

2 类 V-A 型的 Cas12a 系统(以前称为 Cpf1), 是由有序的 cas12a- cas4- cas1- cas2- CRISPR 阵列组成。Cas12a 蛋白含有 RuvC 内切核酸酶结构域, 可识别富含 T 的 PAM 序列以进行靶标切割^[15]。此外, Cas12, 特别是 LbCas12a, 与其目标 DNA 的结合释放了非特异性的 ssDNA 切割活性(图 1B)。DETECTR 技术(DNA Endonuclease Targeted CRISPR Trans Reporter)和 HOLMES 技术(one-Hour Low-cost Multipurpose highly Efficient System)正是基于 Cas12 的这种靶向激活的附带 ssDNA 切割活性而开发的^[15]。其工作原理是通过 RPA 或 RT-RPA 等温扩增靶核酸, 然后结合 Cas12a-sgRNA 复合物并触发 ssDNA 荧光猝灭剂报告 ssDNA 的裂解, 从而产生荧光信号。见图 2C。

1.4 Cas14

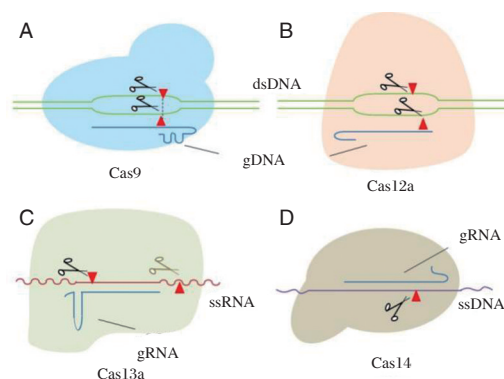
Cas14 是一种很小的 Cas 蛋白, 大小仅为其他 Cas 蛋白的一半。Cas14 蛋白能够进行靶向单链 DNA(ssDNA)切割, 而无需 PAM 进行激活(图 1D)。此外, Cas14 识别靶标会触发非特异性 ssDNA 分子裂解活性, 类似于含 RuvC 的酶 Cas12a^[18]。Cas14a 也可应用到 DETECTR 平台中, 以生成一个新的 ssDNA 检测系统 Cas14a-DETECTR。它可以在没有 PAM 限制的情况下进行高保真 DNA 单核苷酸多态性(SNP)以及病毒 DNA 检测^[19]。

2 CRISPR/Cas 核酸检测系统的应用

2.1 病原检测

2.1.1 人乳头瘤病毒检测

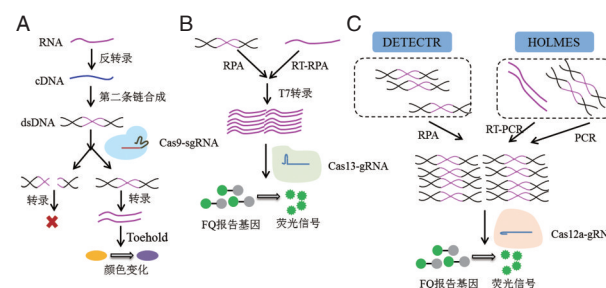
人乳头瘤病毒(Human papillomavirus, HPV)是一种 Papillomaviridae 家族的 DNA 病毒, 可引起某些常见的人类癌症, 尤其是宫颈癌, 而宫颈癌是全世界女性第二大最常见的癌症死亡原因。准确地鉴定 HPV 基因型对于确定那些处于 HPV 相关癌症风险中的人至关重要。最近报道了三种 CRISPR-



注: A-D 分别为 gRNA 引导 Cas9、Cas12、Cas13 和 Cas14 酶结合切割靶序列。

图 1 CRISPR/Cas 核酸识别示意图^[16-17]

Figure 1 Schematic diagram of CRISPR/Cas nucleic acid recognition



注: A 为 Cas9 介导的 NASBA 检测技术; B 为 Cas13a 介导的 SHERLOCK 检测技术; C 为 Cas12a 介导的 DETECTR 和 HOLMES 检测技术。

图 2 基于 CRISPR/Cas 的核酸检测工具^[23]

Figure 2 Nucleic acid detection tool based on CRISPR/Cas

分型 PCR(CRISPR-typing PCR, ctPCR)的方法。其原理是通过一对 Cas9-sgRNA 复合物切割靶 DNA, 然后将切割的 DNA 连接形成线性或环状分子, 再通过 PCR 或 qPCR 扩增检测^[20-22]。除 Cas9 系统外, 前文也提到了基于“附带”裂解活性的 Cas12a 的 DETECTR 检测平台也可用于 HPV 检测^[15]。

2.1.2 SARS-CoV-2(severe acute respiratory syndrome coronavirus-2)检测

当前由 SARS-CoV-2 引起了(新冠肺炎)(COVID-19)全球大流行。建立快速、准确、经济的 SARS-CoV-2 诊断对于疾病的早期治疗和控制至关重要。研究者们基于 CRISPR 的诊断原理, 利用 Cas12、Cas13 识别切割特性开发出一系列快速、精准的方法来检测 SARS-CoV-2。此外, Moon 等^[24]报道了一种基于 CRISPR/dCas9 系统的病毒诊断方法, 并成功检测出 SARS-CoV-2、pH1N1 和 pH1N1/H275Y 突变病毒。

2.1.3 结核分枝杆菌(Mtb)检测

结核病主要由结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, M.tb)感染引起的传染病,是一项严重的全球健康挑战,预防和控制结核病的关键是开发低成本、快速且可靠的诊断方法,尤其在资源匮乏的地区及早诊断结核病^[25]。Zhang等^[26]将dCas9分别连接到一对萤火虫荧光素酶(NFluc和CFluc)的N端和C端,在sgRNA的指导下,分别与靶DNA序列的上游和下游片段互补。当两个相邻片段的底物DNA被一对dCas9结合时,荧光素酶的整体催化活性就会产生荧光。国内的张文宏团队建立了一种基于Cas12a的Mtb快速精准检测系统^[27]。

2.2 癌症诊断

监测肿瘤来源的细胞外囊泡(Tumor-derived EVs, TEVs)并检测其内含的生物标志物,可能是在“液体活检”中筛查癌症的一种有前途的方法。Li等通过将特异性结合TEV上蛋白质靶标的适配体,与基于PCR的指数扩增和CRISPR/Cas12a实时DNA检测相结合,开发了一种称为aptamer-CRISPR/Cas12a检测的新技术,可快速、方便地检测血清中超低浓度的CD109+和EGFR+TEV,可用于鼻咽癌的诊断和预后评价^[28]。

MicroRNA(miRNA)作为癌症早期临床诊断的潜在生物标记已被广泛地研究^[29]。Zhou等^[30]构建了一个由CRISPR/Cas13a驱动的便携式电化学发光(Electrochemiluminescence, ECL)芯片(PECL-CRISPR)。其中靶标miRNA激活Cas13a以裂解系统中设计的预引物,并触发随后的指数扩增和ECL检测,miR-17的检测限达到 1×10^{-15} M。

3 小结与展望

基于CRISPR的核酸检测系统经过几年的发展,已经显示出其巨大的优势,比如可以提供快速、灵敏、特异性、低成本以及现场即时定量分析,并且可以实现多重化检测。该技术已被用于医学诊断的多个领域,例如,它们可以用于确定病原体的基因型,从而实现量身定制的治疗。它们还可以用于检测人、动物、植物或环境病原体。此外,还可用于植物病原体的鉴定和基因型检测以指导农药施用的数量和类型;关键病原体的检测来快速评估水质或评估生物恐怖威胁;食品中的病原体检测以预防食源性疾病等。随着当前技术的应用发展以及新型功能强大的Cas直系同源物的不

断开发,相信CRISPR/Cas系统将成为核酸检测不可替代的重要工具。

参考文献

- [1] Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, et al. Nucleotide-Sequence of the Iap Gene, Responsible for Alkaline-Phosphatase Isozyme Conversion in *Escherichia-Coli*, and Identification of the Gene-Product [J]. *J Bacteriol*, 1987, 169 (12): 5429-5433.
- [2] 张庆颜,董小玉,臧乃亮,等. CRISPR/Cas9 系统在人类疾病中的研究应用进展[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2018, 10 (3):206-211.
- [3] Jansen R, van Embden JDA, Gaastra W, et al. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes [J]. *Mol Microbiol*, 2002, 43(6):1565-1575.
- [4] Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes [J]. *Science*, 2007, 315(5819):1709-1712.
- [5] Marraffini LA. CRISPR-Cas immunity in prokaryotes [J]. *Nature* 2015, 526(7571):55-61.
- [6] Ishino Y, Krupovic M, Forterre P. History of CRISPR-Cas from Encounter with a Mysterious Repeated Sequence to Genome Editing Technology [J]. *J Bacteriol*, 2018, 200 (7): e00580-17.
- [7] Wright AV, Nunez JK, Doudna JA. Biology and Applications of CRISPR Systems: Harnessing Nature's Toolbox for Genome Engineering [J]. *Cell*, 2016, 164(1-2):29-44.
- [8] Makarova KS, Wolf YI, Alkhnbashi OS, et al. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2015, 13(11):722-736.
- [9] Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM, et al. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III [J]. *Nature*, 2011, 471(7340):602-607.
- [10] Pardee K, Green AA, Takahashi MK, et al. Rapid, Low-Cost Detection of Zika Virus Using Programmable Biomolecular Components [J]. *Cell*, 2016, 165(5):1255-1266.
- [11] Huang MQ, Zhou XM, Wang HY, et al. Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/Cas9 Triggered Isothermal Amplification for Site-Specific Nucleic Acid Detection [J]. *Anal Chem*, 2018, 90(3):2193-2200.
- [12] Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Konermann S, et al. C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector [J]. *Science*, 2016, 353 (6299): aaf5573.
- [13] East-Seletsky A, O'Connell MR, Knight SC, et al. Two distinct RNase activities of CRISPR-C2c2 enable guide-RNA processing and RNA detection [J]. *Nature*, 2016, 538(7624): 270-273.
- [14] Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Lee JW, et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2 [J]. *Science*, 2017, 356 (6336):438-442.

(下转第1739页)

PBMC中PD-L1、HLA-B、MRP5在晚期乳腺癌放疗过程中的动态表达及意义

寸倩滢* 张思荣 唐恩跃

【摘要】目的 探究外周血单个核细胞(PBMC)中程序性细胞死亡配体1(PD-L1)、人类白细胞抗原-B(HLA-B)、多药耐药相关蛋白5(MRP5)在晚期乳腺癌放疗过程中的动态表达及意义。**方法** 选取保山市人民医院122例晚期乳腺癌患者,根据放疗结束后4周评估疗效,分为有效组(74例)与无效组(48例),放疗过程中动态监测PBMC中PD-L1、HLA-B、MRP5 mRNA水平,分析其临床意义。**结果** 放疗1个疗程、放疗结束后PBMC中PD-L1、MRP5 mRNA水平低于放疗前,HLA-B mRNA水平高于放疗前($P<0.05$);有效组放疗1个疗程、放疗结束后PBMC中PD-L1、MRP5 mRNA水平低于无效组,HLA-B mRNA水平高于无效组,放疗前与放疗结束后PBMC中PD-L1、MRP5、HLA-B mRNA水平差值绝对值高于无效组($P<0.05$);PBMC中PD-L1、HLA-B、MRP5 mRNA水平放疗前与放疗结束后差值绝对值呈正相关($P<0.05$);放疗前与放疗结束后PBMC中PD-L1、MRP5、HLA-B mRNA水平差值绝对值与疗效呈正相关($P<0.05$);PBMC中PD-L1、HLA-B、MRP5 mRNA差值绝对值联合预测疗效的AUC为0.951,95%CI为0.906~0.996,敏感度为91.67%,特异度为91.89%,优于各指标单独预测($P<0.05$)。**结论** 晚期乳腺癌放疗过程中动态监测PBMC中PD-L1、MRP5、HLA-B mRNA水平变化情况能作为临床预测疗效的潜在途径,有助于及时调整放疗方案、提高疗效。

【关键词】 晚期乳腺癌;放疗;外周血单个核细胞;程序性细胞死亡配体1;人类白细胞抗原-B;多药耐药相关蛋白5

The dynamic expression and significance of PD-L1, HLA-B and MRP5 in PBMC during the radiotherapy of advanced breast cancer

CUN Qianying*, ZHANG Sirong, TANG Enyue

(Department of Clinical Laboratory, Baoshan People's Hospital, Baoshan, Yunnan, China, 678000)

【ABSTRACT】 Objective To explore the advanced stage of programmed cell death ligand 1 (PD-L1), human leukocyte antigen-B (HLA-B) and multidrug resistance-related protein 5 (MRP5) in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) dynamic expression and significance during the radiotherapy of advanced breast cancer. **Methods** 122 patients with advanced breast cancer in Baoshan People's Hospital were selected and divided into the effective group (74 cases) and the ineffective group (48 cases) according to the evaluation of the efficacy 4 weeks after the end of radiotherapy. During radiotherapy, PD-L1, HLA-B, and MRP5 mRNA in PBMC were dynamically monitored to analyze its clinical significance. **Results** After 1 course of radiotherapy, PD-L1 and MRP5 mRNA in PBMC were lower than before radiotherapy, and HLA-B mRNA was higher than before radiotherapy ($P<0.05$). In the effective group, after 1 course of radiotherapy, PD-L1, MRP5 mRNA in PBMC was lower than those in the ineffective group, HLA-B mRNA was higher than that in the ineffective group. The absolute value of the difference between PD-L1, MRP5 and HLA-B mRNA in PBMC before and after radiotherapy was higher than that of the ineffective group ($P<0.05$). The absolute value of the

基金项目:国家科技支撑计划项目(2015BAI32H00)

作者单位:保山市人民医院检验科,云南,保山678000

*通信作者:寸倩滢, E-mail: cunqianying@126.com

difference between *PD-L1*, *HLA-B*, and *MRP5* mRNA in PBMC before radiotherapy and after radiotherapy was positively correlated ($P < 0.05$). The absolute value of the difference between *PD-L1*, *MRP5*, and *HLA-B* mRNA in PBMC before and after radiotherapy was positively correlated with the therapeutic effect ($P < 0.05$). The absolute value of the difference between *PD-L1*, *HLA-B*, and *MRP5* mRNA in PBMC predicts the efficacy of the AUC of 0.951, 95% CI of 0.906–0.996, sensitivity of 91.67%, and specificity of 91.89%, which is better than the independent prediction of each indicator ($P < 0.05$). **Conclusion** Dynamic monitoring of *PD-L1*, *MRP5*, *HLA-B* mRNA changes in PBMC during radiotherapy of advanced breast cancer can be used as a potential way to predict clinical efficacy, which is helpful for timely adjustment of radiotherapy regimen and improve the efficacy.

[KEY WORDS] Advanced breast cancer; Radiotherapy; Peripheral blood mononuclear cells; Programmed cell death ligand 1; Human leukocyte antigen-B; Multidrug resistance-related protein 5

据统计,乳腺癌发生率居于全球范围内女性恶性肿瘤首位,此类患者转移后的5年生存率仅为27%甚至更低^[1-2]。近年来,随着放疗技术进展,放疗患者总体生存状况得到显著改善。但肿瘤在分子基因水平方面存在高度异质性,从而导致放疗效果出现明显差异^[3]。程序性细胞死亡配体1(Programmed cell death ligand 1, PD-L1)通路在乳腺癌中存在活性,参与免疫介导的细胞凋亡^[4]。人类白细胞抗原-B(Human leukocyte antigen-B, HLA-B)缺失表达是多种肿瘤发生的重要因素^[5]。研究证实,肿瘤组织中存在多药耐药相关蛋白(Multidrug resistance associated proteins, MRP),其中MRP5参与肿瘤发生进展,并与肿瘤复发有一定关系^[6]。但关于三者在晚期乳腺癌放疗过程中的监测价值仍缺乏循证依据。为此,本研究尝试探究外周血单个核细胞(Peripheral blood mononuclear cells, PBMC)中PD-L1、MRP5、HLA-B在晚期乳腺癌放疗过程中的动态表达及意义。报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取保山市人民医院2018年1月至2021年1月122例晚期乳腺癌患者,其中年龄平均年龄(52.17 ± 7.61)岁;体质量指数平均(22.06 ± 1.81) kg/m²;临床分期:ⅢB期72例,Ⅳ期50例。纳入标准:均经病理检查证实为乳腺癌;均具备放疗指征;患者及家属均知情,签订知情同意书。排除标准:参与本研究前接受抗肿瘤、免疫抑制治疗者;伴有自身免疫性疾病者;存在急慢性严重感染者;妊娠期、哺乳期女性;合并血液系统疾病者。本研究经本院伦理委员会审批通过。

1.2 方法

1.2.1 治疗方法

所有患者均行放疗,采用直线加速器6 MVX

射线与9 MEV电子线,根据肿瘤分期、病理类型^[7]等确定放疗区域,照射剂量为2 Gy/次,5次/周,总量直至50 Gy。以21 d为1个疗程,共放疗2个疗程。放疗结束后4周评估疗效,肿瘤病灶完全消失,持续时间 ≥ 4 周为完全缓解;肿瘤病灶缩小幅度 $\geq 50\%$,且持续时间 ≥ 4 周为部分缓解;介于部分缓解与进展之间为稳定;肿瘤病灶增大幅度 $\geq 25\%$ 为进展。将完全缓解、部分缓解纳入有效组,稳定、进展纳入无效组^[8],分为有效组(74例)与无效组(48例)。

1.2.2 检测方法

采集静脉血30 mL,肝素抗凝,采用Hark's液稀释1倍,缓慢加到NycoprepTM1.077A人淋巴细胞分离液上,离心处理,2 000 r/min,离心20 min离心半径(13.5 cm),吸取中间白膜层,提取PBMC。采用Trizol裂解PBMC,提取总RNA,逆转录为cDNA,采用Real-time PCR Master Mix kit进行实时荧光定量聚合酶链反应(Real time fluorescent quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)检测,引物由广州伯信生物科技有限公司合成,反应条件:95℃ 60 s, 95℃ 15 s, 40个循环, 60℃ 60 s。采用 $\Delta\Delta C_t$ 法相对定量分析PBMC中*PD-L1*、*MRP5*、*HLA-B* mRNA表达量。

1.3 统计学方法

采用统计学软件SPSS 22.0处理数据,计量资料均确认具备方差齐性且近似服从正态分布,以($\bar{x} \pm s$)描述,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两组间比较采用LSD-t检验,两组间比较采用独立样本t检验;计数资料用n(%)表示, χ^2 检验;相关性分析采用Spearman/Pearson相关系数模型;预测价值采用受试者工作特征(ROC)曲线分析,获取曲线下面积、置信区间、敏感度、特异度及截断值,联合诊断实施Logistic二元回归拟合,返回预测概率logit(p),将其作为独立检验变量。

$P<0.05$ 表明差异有统计学意义。

2 结果

2.1 放疗前后 PBMC 中 *PD-L1*、*HLA-B*、*MRP5* mRNA 水平比较

放疗 1 个疗程、放疗结束后 PBMC 中 *PD-L1*、*MRP5* mRNA 水平低于放疗前, *HLA-B* mRNA 高于放疗前($P<0.05$)。见表 1。

表 1 放疗前后 PBMC 中 *PD-L1*、*HLA-B*、*MRP5* mRNA 水平比较 ($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Comparison of *PD-L1*, *HLA-B* and *MRP5* mRNA in PBMC before and after radiotherapy ($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	<i>PD-L1</i> mRNA	<i>HLA-B</i> mRNA	<i>MRP5</i> mRNA
放疗前	122	1.48±0.22	0.34±0.08	5.12±0.67
放疗 1 个疗程	122	1.27±0.18 ^a	0.43±0.12 ^a	4.56±0.52 ^a
放疗结束后	122	1.09±0.12 ^a	0.52±0.15 ^a	4.23±0.34 ^a
<i>F</i> 值		146.477	68.467	88.742
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001

注:与放疗前比较,^a $P<0.05$ 。

2.2 两组放疗前后 PBMC 中 *PD-L1*、*HLA-B*、*MRP5* mRNA 及差值

有效组放疗 1 个疗程、放疗结束后 PBMC 中 *PD-L1*、*MRP5* mRNA 水平低于无效组, *HLA-B* mRNA 水平高于无效组,放疗前与放疗结束后 PBMC 中 *PD-L1*、*MRP5*、*HLA-B* mRNA 差值绝对值高于无效组($P<0.05$)。见表 2。

2.3 PBMC 中 *PD-L1*、*HLA-B*、*MRP5* mRNA 放疗前与放疗结束后差值相关性

Pearson 相关性分析, PBMC 中 *PD-L1*、*HLA-B*、*MRP5* mRNA 水平放疗前与放疗结束后差值绝对值呈正相关($r=0.632$ 、 0.650 、 0.731 , P 均 <0.05)。

2.4 放疗前后 PBMC 中 *PD-L1*、*HLA-B*、*MRP5* mRNA 差值与疗效的关系

Spearman 相关性分析,放疗前与放疗结束后 PBMC 中 *PD-L1*、*MRP5*、*HLA-B* mRNA 差值绝对值与疗效呈正相关($r=0.711$ 、 0.726 、 0.803 , $P<0.05$)。

表 2 两组放疗前后 PBMC 中 *PD-L1*、*HLA-B*、*MRP5* mRNA 表达量及差值比较 ($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Comparison of *PD-L1*, *HLA-B*, *MRP5* mRNA and difference between two groups before and after radiotherapy ($\bar{x}\pm s$)

指标	组别	例数	放疗前	放疗 1 个疗程后	放疗结束后	放疗前与放疗结束后差值
<i>PD-L1</i> mRNA	无效组	48	1.52±0.53	1.42±0.47	1.35±0.45	0.17±0.06
	有效组	74	1.45±0.44	1.18±0.63	0.92±0.21	0.53±0.20
	<i>t</i> 值		0.791	2.261	7.122	12.107
	<i>P</i> 值		0.430	0.026	<0.001	<0.001
<i>HLA-B</i> mRNA	无效组	48	0.33±0.11	0.35±0.12	0.40±0.14	-0.07±0.03
	有效组	74	0.35±0.12	0.48±0.16	0.59±0.20	-0.24±0.08
	<i>t</i> 值		0.929	4.816	5.730	14.078
	<i>P</i> 值		0.355	<0.001	<0.001	<0.001
<i>MRP5</i> mRNA	无效组	48	5.15±1.09	5.03±1.01	4.76±0.94	0.39±0.13
	有效组	74	5.10±1.04	4.25±0.73	3.88±0.61	1.22±0.44
	<i>t</i> 值		0.255	4.947	6.276	12.698
	<i>P</i> 值		0.800	<0.001	<0.001	<0.001

2.5 放疗前后 PBMC 中 *PD-L1*、*HLA-B*、*MRP5* mRNA 水平差值对疗效的预测价值

以无效组作为阳性样本,有效组作为阴性样本,绘制 ROC 曲线,结果显示,放疗前与放疗结束后 PBMC 中 *PD-L1*、*HLA-B*、*MRP5*

mRNA 差值绝对值预测疗效的 AUC 分别为 0.896、0.901、0.908,联合预测疗效的 AUC 为 0.951,95%CI 为 0.906–0.996,敏感度为 91.67%,特异度为 91.89%,优于各指标单独预测,见表 3、图 1。

表 3 放疗前后 PBMC 中 *PD-L1*、*HLA-B*、*MRP5* mRNA 表达量差值对疗效的预测价值

Table 3 the predictive value of *PD-L1*, *HLA-B*, *MRP5* mRNA difference in PBMC before and after radiotherapy for curative effect

指标	AUC	95%CI	Z 值	截断值	敏感度(%)	特异度(%)	<i>P</i> 值
<i>PD-L1</i> mRNA 差值绝对值	0.896	0.842–0.957	16.630	≤0.28	91.67	82.43	<0.001
<i>HLA-B</i> mRNA 差值绝对值	0.901	0.840–0.954	16.829	≤0.12	89.58	83.78	<0.001
<i>MRP5</i> mRNA 差值绝对值	0.908	0.851–0.963	17.197	≤0.57	85.41	89.19	<0.001
联合	0.951	0.906–0.996	19.603	–	91.67	91.89	<0.001

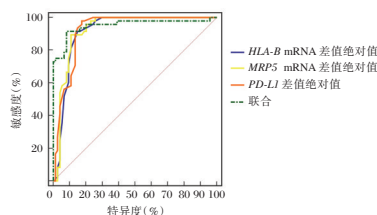


图1 ROC 曲线图

Figure 1 ROC curve

3 讨论

近年来,临床在乳腺癌筛查、治疗及生存方面取得较大进展,但乳腺癌仍是45岁以下女性最主要的癌症死因。放疗在减少乳腺癌术后复发、改善预后方面具有重要作用。但临床实践证实,即使临床病理特征相同的乳腺癌患者在接受相同放疗方案治疗后,效果也会存在差异^[9]。因此,在放疗期间监测相关指标变化情况成为临床预测放疗效果、调整治疗方案的重要途径。

PD-L1通路在多种癌症中均扮演活跃的免疫检查点的角色。PD-L1作为一种跨膜蛋白,能够结合活化细胞毒性T细胞表面表达的PD-1受体,阻滞T细胞活化及下游信号转导,抑制CD3/CD28介导的T细胞转录过程,从而促使肿瘤细胞逃避T淋巴细胞的杀伤作用,进而加快肿瘤细胞生长、增殖。本研究发现,乳腺癌患者放疗后PBMC中PD-L1 mRNA较治疗前明显下降,主要是由于PD-L1通路在参与肿瘤发生发展过程中会引起葡萄糖代谢、蛋白激酶的激活、磷脂酰肌醇激酶的磷酸化等一系列生化反应,而放疗过程中细胞代谢通路广泛参与免疫识别与凋亡细胞的清除,导致PD-L1表达下调^[10]。乳腺癌肿瘤细胞会表达过多的PD-L1,降低其免疫原性,导致机体无法产生充足的抗肿瘤免疫效应,造成肿瘤细胞成功逃避宿主免疫系统监视,发生肿瘤免疫逃逸,而放疗后肿瘤细胞被杀伤杀灭,PD-L1表达便随之下调^[11]。故临床可通过监测放疗期间PD-L1变化情况及早预测放疗效果。

HLA-B是HLA-I类分子中最主要的因子之一,广泛分布于所有有核细胞表面,此类因子属于机体免疫的核心,不仅可参与免疫应答遗传调控、调节全身免疫状态,还是影响免疫识别的主要因素,在肿瘤发生时表达降低或缺失。Tevis SE等^[12]报道证实,乳腺间变性大细胞淋巴瘤患者HLA-B表达明显减少,在肿瘤发生过程中发挥重要作用。本研究则表明,与放疗前相比,乳腺癌患者放

疗后PBMC中HLA-B mRNA明显升高,且其放疗前后的变化差值与放疗疗效密切相关。究其原因,PBMC是重要的抗原递呈细胞,宿主PBMC中HLA-B的表达不仅代表的是宿主的免疫特性,还可呈现肿瘤特性,是细胞毒性T细胞识别肿瘤细胞的关键,其表达量下调被认为是肿瘤细胞逃逸的重要机制之一^[13]。因此,临床可根据PBMC中HLA-B表达情况评估患者机体细胞免疫情况及肿瘤特性,为制定个体化放疗方案提供可靠依据。

报道显示,炎症除了是肿瘤发生的影响因素之外,还可改变药物转运蛋白表达及活性,促使肿瘤对放化疗产生耐药性,成为肿瘤放化疗失败的重要原因^[14]。MRP5是临床常见的多药耐药相关蛋白之一,其表达上调可能是由于肿瘤患者外周血中的促炎介质与PBMC表面相应受体结合的结果。在此基础上,本研究结果显示,PBMC中MRP5 mRNA放疗后呈下降趋势,其中放疗无效组虽有下降但并不明显,放疗有效组下降较为显著,出现这种现象的原因是放疗虽可杀伤杀灭肿瘤细胞,但也会一定程度损伤正常细胞,破坏其细胞结构,导致促炎因子释放并介导炎症反应,激活NF-κB,释放相关因子改变MRP5活性功能与表达情况,并将输入的抗逆转录病毒从细胞中泵出,从而引发耐药效应^[15]。提示监测其在放疗过程中的变化情况是及早预测放疗疗效的重要途径。

此外,在上述研究基础上,本研究初次尝试探究放疗前后PBMC中PD-L1、MRP5、HLA-B mRNA差值联合预测放疗疗效的价值,结果显示,三者联合预测的AUC高达0.951,为临床早期预测放疗疗效、调整放疗方案提供新思路、新途径,有利于提高疗效,改善预后。但本研究属于单中心、小样本分析,可能造成数据偏移,需做进一步分析与探究。

综上所述,晚期乳腺癌放疗过程中动态监测PBMC中PD-L1、MRP5、HLA-B mRNA变化情况能作为临床预测疗效的潜在途径,有助于及时调整放疗方案、提高疗效。

参考文献

- [1] 胡南林,李明舟,朱安婕,等.热休克蛋白-90α在乳腺癌诊断和疗效监测及复发预测中的临床价值[J].中国肿瘤临床,2018,45(23):1206-1209.
- [2] Tharmapalan P, Mahendralingam M, Berman HK, et al. Mammary stem cells and progenitors: targeting the roots of breast cancer for prevention [J]. EMBO J, 2019, 38 (14):

- e100852.
- [3] Braunstein LZ, Bellon JR. Contemporary Issues in Breast Cancer Radiotherapy [J]. *Hematol Oncol Clin North Am*, 2020, 34(1): 1-12.
 - [4] 王战伟, 徐炜, 邵霞, 等. PD-L1 在乳腺癌及腋窝淋巴结中的表达及意义[J]. *实用医学杂志*, 2019, 35(20): 3179-3181.
 - [5] 吴明雨, 于大海, 程立, 等. HLA-B 在口腔鳞状细胞癌中的表达及意义[J]. *微生物学免疫学进展*, 2018, 46(4): 35-39.
 - [6] 王雷, 王煜霞, 薛会朝. 多药耐药相关蛋白在原发性肝癌患者外周血淋巴细胞及癌组织中的表达[J]. *新乡医学院学报*, 2017, 34(6): 538-541.
 - [7] 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(2017年版)[J]. *中国癌症杂志*, 2017, 27(9): 695-759.
 - [8] Karmakar A, Kumtakar A, Sehgal H, et al. Interobserver Variation in Response Evaluation Criteria in Solid Tumors 1.1 [J]. *Acad Radiol*, 2019, 26(4): 489-501.
 - [9] 邓丁梅, 叶娴, 温润耀, 等. ER、PR 以及 Ki-67 状态与乳腺癌新辅助化疗疗效的相关性[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2021, 13(1): 83-86, 90.
 - [10] 姜杰, 黄伟. 乳腺癌放疗联合 PD-1/PD-L1 抑制剂研究进展[J]. *中华放射肿瘤学杂志*, 2021, 30(4): 424-428.
 - [11] Kurozumi S, Fujii T, Matsumoto H, et al. Significance of evaluating tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) and programmed cell death-ligand 1 (PD-L1) expression in breast cancer[J]. *Med Mol Morphol*, 2017, 50(4): 185-194.
 - [12] Tevis SE, Hunt KK, Miranda RN, et al. Differences in Human Leukocyte Antigen Expression Between Breast Implant-Associated Anaplastic Large Cell Lymphoma Patients and the General Population[J]. *Aesthet Surg J*, 2019, 39(10): 1065-1070.
 - [13] Chowell D, Morris LGT, Grigg CM, et al. Patient HLA class I genotype influences cancer response to checkpoint blockade immunotherapy[J]. *Science*, 2018, 359(6375): 582-587.
 - [14] 王文胜, 马志强, 张冠男, 等. MRP1 蛋白表达情况与乳腺癌新辅助化疗疗效的关系[J]. *癌症进展*, 2018, 16(3): 339-341, 389.
 - [15] Yano K, Todokoro I, Kamioka H, et al. Functional Alterations of Multidrug Resistance-Associated Proteins 2 and 5, and Breast Cancer Resistance Protein upon Snail-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition in HCC827 Cells [J]. *Biol Pharm Bull*, 2021, 44(1): 103-111.

(上接第 1734 页)

- [15] Chen JS, Ma EB, Harrington LB, et al. CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity [J]. *Science*, 2018, 360(6387): 436-439.
- [16] Tang Y, Fu Y. Class 2 CRISPR/Cas: an expanding biotechnology toolbox for and beyond genome editing [J]. *Cell Biosci*, 2018, 8(59).
- [17] Aman A, Mahas A, Mahfouz M. Nucleic Acid Detection Using CRISPR/Cas Biosensing Technologies [J]. *ACS Synth Biol*, 2020, 9(6): 1226-1233.
- [18] Harrington LB, Burstein D, Chen JS, et al. Programmed DNA destruction by miniature CRISPR-Cas14 enzymes [J]. *Science*, 2018, 362(6416): 839-842.
- [19] Khan MZ, Haider S, Mansoor S, et al. Targeting Plant ssDNA Viruses with Engineered Miniature CRISPR-Cas14a [J]. *Trends Biotechnol*, 2019, 37(8): 800-804.
- [20] Wang Q, Zhang BB, Xu XH, et al. CRISPR-typing PCR (ctPCR), a new Cas9-based DNA detection method [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 14126.
- [21] Zhang BB, Wang Q, Xu XH, et al. Detection of target DNA with a novel Cas9/sgRNAs-associated reverse PCR (CARP) technique [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2018, 410(12): 2889-2900.
- [22] Zhang BB, Xia Q, Wang Q, et al. Detecting and typing target DNA with a novel CRISPR-typing PCR (ctPCR) technique [J]. *Anal Biochem*, 2018, 561: 37-46.
- [23] Wang M, Zhang R, Li J. CRISPR/cas systems redefine nucleic acid detection: Principles and methods [J]. *Biosens Bioelectron*, 2020, 165: 112430.
- [24] Moon J, Kwon HJ, Yong D, et al. Colorimetric Detection of SARS-CoV-2 and Drug-Resistant pH1N1 Using CRISPR/dCas9 [J]. *Acs Sens*, 2020, 5(12): 4017-4026.
- [25] Kamariza M, Shieh P, Ealand CS, et al. F Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum with a solvatochromic trehalose probe [J]. *Sci Transl Med*, 2018, 10(430): eaam6310.
- [26] Zhang YH, Qian L, Wei WJ, et al. Paired Design of dCas9 as a Systematic Platform for the Detection of Featured Nucleic Acid Sequences in Pathogenic Strains [J]. *Acs Synth Biol*, 2017, 6(2): 211-216.
- [27] Ai JW, Zhou X, Xu T, et al. CRISPR-based rapid and ultrasensitive diagnostic test for *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Emerg Microbes Infect*, 2019, 8(1): 1361-1369.
- [28] Li HL, Xing S, Xu JH, et al. Aptamer-based CRISPR/Cas12a assay for the ultrasensitive detection of extracellular vesicle proteins [J]. *Talanta*, 2021, 221: 121670.
- [29] 贾音, 张毅, 孙树汉. MicroRNAs 在肿瘤和其它疾病诊断治疗中的应用 [J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2010, 2(2): 123-127.
- [30] Zhou T, Huang R, Huang MQ, et al. CRISPR/Cas13a Powered Portable Electrochemiluminescence Chip for Ultrasensitive and Specific MiRNA Detection [J]. *Adv Sci*, 2020, 7(13): 1903661.

· 论 著 ·

流感嗜血杆菌核酸检测试剂盒国家参考品的建立

黄洋 李康 徐潇 李江蛟 王春娥 梁丽 陈驰 刘茹凤 叶强*

【摘要】目的 建立流感嗜血杆菌(HI)核酸检测试剂盒国家参考品。**方法** 将10株流感嗜血杆菌和10株非流感嗜血杆菌参考菌株分别在各自适宜的培养基和温度下培养,收获新鲜的无菌培养物,计数并灭活后制备成10份阳性参考品、10份阴性参考品、1份最低检出限参考品和3份重复性参考品,使用两家试剂盒对参考品进行确证,考察参考品分装的均匀性以及在不同处理条件下的稳定性,并组织7家相关企业进行协作标定。**结果** 本参考品具有良好的准确性、特异性、重复性以及分装均匀性;反复冻融3、5次和分别于2~8℃、室温、37℃放置3、7、14天后均不影响参考品的稳定性;协作标定结果显示7家企业的试剂盒准确性、特异性和重复性均符合规定;最低检出限结果显示2家为 10^2 个/mL、3家为 10^3 个/mL、2家在 10^4 个/mL仍未检出。**结论** 建立了HI核酸检测试剂盒国家参考品,可用于相关试剂盒的质量评价。

【关键词】 流感嗜血杆菌;核酸检测;国家参考品

Establishment of national reference materials of *Haemophilus influenzae* nucleic acid test kit

HUANG Yang, LI Kang, XU Xiao, LI Jiangjiao, WANG Chune, LIANG Li, CHEN Chi, LIU Rufeng, YE Qiang*

(National Center for Medical Culture Collections, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing, China, 102629)

【ABSTRACT】Objective To establish a national reference panel for *Haemophilus influenzae* (HI) nucleic acid test kit. **Methods** 10 strains of HI and 10 strains of non-HI were cultured in a suitable media and temperature, separately. Using those cultutes, we developed 10 positive samples, 10 negative samples, 1 minimum detection limit sample and 3 reproducible samples after calculation and inactivation. Two kits are used to conform this panel and inspect the uniformity verification, stability evaluation after different treatment. Meanwhile, we organize 7 related enterprises to carry out collaborative calibration. **Results** The national reference had good accuracy, specificity, repeatability, uniformity of packaging and the stability after freeze-thawing 3 or 5 times and at 2~8℃, room temperature and 37℃ for 3 days, 7 days and 14 days separately. The results of the collaborative calibration showed that the accuracy, specificity, and repeatability of the kits from 7 companies were in compliance with the regulations. The minimum detection limit results showed that 2 companies were 1.0×10^2 bacteria/mL, 3 companies were 1.0×10^3 bacteria/mL, 2 companies were not detected at 1.0×10^4 bacteria/mL. **Conclusion** The national reference materials have been established, which can be used for quality evaluation of HI nucleic acid detection kits.

【KEY WORDS】 *Haemophilus influenzae*, Nucleic acid detection, National reference materials

流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*, HI)是一种短小的革兰阴性杆菌,根据荚膜多糖抗原的不同,可分为6个血清型(a~f型)^[1]。HI主要分布

在咽部、鼻部及鼻咽部,是条件致病菌,也是社区性肺炎的主要致病菌^[2],临床上主要引起非侵袭性疾病如肺炎、急性中耳炎、急性鼻窦炎、中耳炎

基金项目:国家“十三五”科技重大专项(2018ZX10102-001,2018ZX10734404)

作者单位:中国食品药品检定研究院中国医学细菌保藏管理中心,北京 102629

*通信作者:叶强, E-mail: qiangye@nifdc.org.cn

注:黄洋与李康为共同第一作者

及侵袭性疾病,如菌血症、中枢神经系统感染等^[3-4]。尽管在接种Hib疫苗后,侵入性HI疾病的发病率已显著下降,但接种疫苗后,HI血清型转换,导致HI仍是某些疾病发病率、病死率高的原因^[5-6]。近年来不少研究显示HI在免疫缺陷人群中的感染率不断地上升^[3]。因此,研究一种快速经济的检测方法对于HI的早期诊断具有重要的研究意义。目前,流感嗜血杆菌的实验室诊断方法有细菌的培养和生化鉴定等传统方法,然而传统的方法存在一定的局限,如时间长、通量低、干扰因素多,无法满足临床大量样本的诊断需求。近年来实时荧光PCR(real-time fluorescent PCR, Rt-PCR)由于其快速、易操作、高通量和高灵敏度等优势,以此为基础研发的试剂盒成为各个企业研发的主流产品。但是,尚无相关的国家参考品供企业对其研发的试剂盒进行质量控制和评价。为解决这一问题,本研究选择了10株不同血清型流感嗜血杆菌和10株与流感嗜血杆菌感染部位相同或感染症状相似且常见的非流感嗜血杆菌制备成一套流感嗜血杆菌核酸检测试剂盒用国家参考品,通过对参考品开展确证、分装均匀性、稳定性评估、协作标定,旨在研制适用于荧光定量PCR方法的流感嗜血杆菌核酸检测试剂盒国家参考品,用于该类试剂盒质量的评价。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 参考品原料

流感嗜血杆菌CMCC(B)58533、58552、58558、58561、58573、58566、58567、58568、58574、58525和非流感嗜血杆菌[脑膜炎奈瑟菌CMCC(B)29052,肺炎克雷伯CMCC(B)46117,铜绿假单胞菌CMCC(B)10104,金黄色葡萄球菌CMCC(B)26001,肺炎链球菌CMCC(B)31001,A族链球菌CMCC(B)32067,白喉棒杆菌CMCC(B)38102,卡他布朗汉姆氏菌CMCC(B)29118,百日咳博德特菌CMCC(B)58039,嗜肺军团菌CMCC(B)60001]均来源于中国医学细菌保藏管理中心。

1.1.2 试剂及主要仪器

GC基础培养基(批号:7297698,500 g/瓶)、血红蛋白粉(批号:7325834,500 g/瓶)和脑心浸液(批号:5139642,500g/瓶)均购自美国BD公司;0.9%氯化钠注射液(批号:1912293102,100 mL/瓶)购自石

家庄四药有限公司;NU-5810E型二氧化碳培养箱购自美国NUAIRE公司;7500型荧光定量PCR分析系统购自ABI公司;国家细菌浊度标准(国家药品标准物质中心)由中国食品药品检定研究院提供。

1.1.3 检测试剂

确证试剂盒来自上海之江生物科技股份有限公司和中山大学达安基因股份有限公司;协作标定试剂盒分别来自北京卓诚惠生生物科技股份有限公司、广东和信健康科技有限公司、苏州天隆生物科技有限公司、上海之江生物科技股份有限公司、重庆中元汇吉生物技术有限公司、上海捷诺生物科技有限公司和中山大学达安基因股份有限公司(分别编号为A-G)。

1.2 试验方法

1.2.1 菌株的培养及参考品原菌液的定值

10株HI菌株和10株非HI菌株分别选择合适的培养基和培养条件进行复苏、传代培养。刮取第2代培养物溶于一定体积的注射用生理盐水中,制备成菌悬液,除卡他布朗汉姆氏菌、嗜肺军团菌、金黄色葡萄球菌、白喉棒状杆菌、肺炎克雷伯菌采用活菌计数法外,其余参考品的定值采用比浊法。计数后的菌悬液置于60℃水浴中,灭活30~45 min,计数前后的菌悬液分别接种于各自合适的培养基和培养条件中检测灭活效果,同时将灭活前的培养物进行形态学、生理生化特性分析,并提取基因组进行分子生物学特征分析,确保所选菌株的无污染,于-20℃以下保存。

1.2.2 参考品的制备

使用注射用生理盐水将10株上述HI菌悬液稀释至 10^6 /mL并分装成0.5 mL/管,即阳性参考品(P1~P10)。脑膜炎奈瑟氏菌的菌悬液稀释至 10^7 /mL,其余9株非HI菌株的菌悬液稀释至 10^7 /mL,均分装成0.5 mL/管,即阴性参考品(N1~N10)。CMCC(B)58561的菌悬液稀释至 10^6 /mL,定量分装,0.8 mL/管,于-20℃以下保存,即重复性参考品(3管/套)和最低检出限参考品(1管/套)。

1.2.3 参考品的确证

按照两种试剂盒的各自说明书方法检测参考品,对其进行确证,以下各试验中每份样本平行检测2次,每个试剂盒进行2次独立实验。

1.2.3.1 准确性 对阳性参考品(P1~P10)的10倍稀释液进行检测,要求均为阳性。

1.2.3.2 特异性 对阴性参考品(N1~N10)的10倍稀释液进行检测,要求均为阴性。

1.2.3.3 重复性 对重复性参考品的10倍稀释液进行检测,重复检测10次,批内变异系数(CV)应 $\leq 5.0\%$ 。

1.2.3.4 最低检出限验证 将最低检出限参考品进行10倍系列,稀释成 10^4 、 10^3 、 10^2 、 10^1 个/mL,分别检测每个试剂盒的最低检出限。

1.2.4 分装均匀性验证

随机抽取阳性参考品、最低检出限参考品各10支,重复性参考品15支,使用上海之江生物科技股份有限公司生产的流感嗜血杆菌核酸测定试剂盒(荧光PCR法)进行检测,要求均为阳性结果,且每个参考品均匀性的变异系数(CV)应 $\leq 5.0\%$ 。

1.2.5 参考品的稳定性验证

将阳性参考品、最低检出限参考品分别于2~8℃、25℃、37℃放置3天、7天、14天,反复冻融3次和5次,以-20℃中保存的参考品作为对照,使用中山大学达安基因股份有限公司生产的流感嗜血杆菌核酸测定试剂盒(PCR-荧光探针法),考察放置于不同温度放置不同时间及反复冻的融参考品的稳定性。

1.2.6 参考品的协作标定

参照1.2.3项,7家参加协作标定的企业使用各自研发的诊断试剂对参考品进行验证,并对数据进行汇总分析。

1.3 统计学分析

使用SPSS 18.0软件对稳定性数据进行定量资料的非参数检验;以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 参考品的确证

2.1.1 准确性

结果显示两家试剂盒对阳性参考品(P1~P10)均为阳性。

2.1.2 特异性

结果显示两家试剂盒对阴性参考品(N1~N10)均为阴性。

2.1.3 重复性

结果显示两家试剂盒批内变异系数(CV)分别为1.71%和1.37%、1.62%和1.47%,均小于5.0%。

2.1.4 最低检出限

两家试剂盒的最低检出限均为 1.0×10^3 个菌/mL。

2.2 参考品分装均匀性验证

抽取的10份阳性参考品、最低检出限参考品以及15份重复性参考品Ct值的CV均在5.0%以内,说明参考品的分装均匀度良好。见表1。

2.3 参考品的稳定性验证

2.3.1 冻融稳定性评估

分别经反复冻融3、5次处理后参考品的Ct值,与-20℃保存的参考品的Ct值比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图1。

表1 参考品的分装均匀性结果

Table 1 Detective result for packing uniformity references

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	S ^a	R ^b
	31.37	27.30	27.82	27.29	28.92	26.36	32.17	30.45	30.30	29.76	29.20	28.88
	29.75	26.73	28.23	27.18	27.88	26.05	31.05	31.81	28.68	30.35	31.22	29.32
	30.29	26.67	26.74	26.04	27.75	26.08	30.71	30.39	29.89	28.92	29.47	29.07
	30.36	25.46	28.76	27.65	27.57	25.43	30.16	30.43	29.73	28.38	28.77	29.49
	31.91	27.20	27.80	25.19	27.53	25.42	30.76	31.02	29.80	28.54	29.62	28.75
	31.71	26.29	28.10	27.83	26.96	26.08	30.24	31.86	28.18	30.42	28.66	28.46
	32.31	27.79	28.15	26.08	27.64	25.83	31.20	30.78	29.61	28.61	28.59	29.42
Ct 值	29.91	26.24	28.79	27.06	27.23	26.60	32.01	32.77	29.69	31.36	28.92	27.62
	29.78	26.75	29.29	26.31	26.98	26.17	32.08	30.79	28.84	32.91	29.40	29.16
	31.23	27.23	27.67	27.11	26.33	25.66	31.96	30.52	28.89	29.56	28.47	28.94
												29.94
												29.30
												29.10
												29.17
												27.77
均值	30.86	26.77	28.14	26.77	27.48	25.97	31.23	31.08	29.36	29.88	29.23	28.96
标准差	0.95	0.66	0.71	0.83	0.69	0.38	0.77	0.80	0.67	1.44	0.81	0.62
CV	3.09	2.47	2.52	3.11	2.49	1.48	2.48	2.58	2.27	4.81	2.75	2.13

注:^aS代表最低检出限参考品;^bR代表重复性参考品。

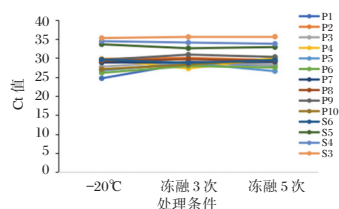


图1 参考品冻融的稳定性分析

Figure 1 The stability analysis of the references after repeated freezing-thawing

2.3.2 加速稳定性评估

分别于2~8℃、室温、37℃放置3、7、14天后的参考品的Ct值,与-20℃保存的参考品的Ct值比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见图2。

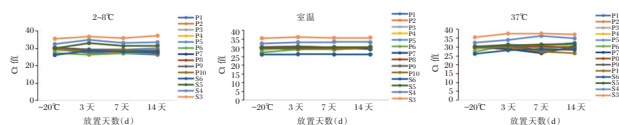


图2 参考品加速稳定性分析

Figure 2 The stability analysis of the references kept in different temperatures

2.4 参考品的协作标定

7家企业的试剂盒检测的准确性、特异性和重复性结果均符合要求;最低检出限结果显示2家为 10^2 个/mL、3家为 10^3 个/mL、2家在 10^4 个/mL仍未检出。见表2。

表2 参考品的验证结果

Table 2 erification results of references by using HI detection kits

参考品编号	不同企业试剂盒结果						
	A	B	C	D	E	F	G
P1-P10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10
N1-N10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10
R1-R10(CV%)	1.18	3.42	1.03	2.05	1.44	0.96	1.83
10^4 个/mL	+	-	-	+	+	+	+
10^3 个/mL	+	-	-	+	+	+	+
10^2 个/mL	-	-	-	-	+	+	-
10^1 个/mL	-	-	-	-	-	-	-

注:“+”为检测阳性,“-”为检测阴性。

3 讨论

流感嗜血杆菌能引发扁桃体炎、支气管炎、肺炎等呼吸道感染疾病,是儿童下呼吸道感染最常见的细菌^[7]。目前临床上针对HI的检测方法较多,但由于核酸的检测具有快速、简便等优势,受到越来越多的关注^[8]。体外诊断试剂标准物质是实现临床检验标准化的主要工具,同时,国家参考

品的制备和评价对于诊断试剂的质量控制至关重要^[9]。核酸检测试剂国家参考品对于相关试剂盒的质量控制和评价至关重要,是相关产品注册检验、上市审批的重要物质基础^[10]。本研究通过精心选择菌株研制出一套流感嗜血杆菌核酸检测试剂盒国家参考品,所选用的菌株均来自中国医学细菌保藏管理中心,阳性菌株的选择充分考虑了不同的血清型/群,以及感染的不同部位,阴性菌株的选择则兼顾了感染症状相似且常见的其他病原体。对建立的参考品进行了分装均匀度、冻融稳定性和加速稳定性评估,并开展了质量评价的研究。

本研究首先对分装后的参考品进行了确证,结果显示本参考品具有较好的准确性、特异性和重复性,最低检出限能达到为 1×10^3 个菌/mL。根据标准物质的研制要求^[11-12],对参考品的均匀性和稳定性进行了验证,均匀性检验中,随机抽取10份阳性参考品和最低检出限参考品及15份重复性参考品进行检测,结果显示抽取参考品Ct值的CV均在5.0%以内,说明参考品的分装均匀性满足要求;稳定性结果表明在冻融3次、5次以及2~8℃、室温、37℃放置3、7、14天后,均具有较好的稳定性,能够满足不同条件下的运输及正常的使用。同时开展了试剂盒的协作标定,结果显示7家企业的试剂盒准确性、特异性和重复性的检测结果均符合规定,最低检出限结果的差异可能与不同企业的试剂盒基因组提取效率和本身的灵敏度有关。

综上所述,本研究成功研制了流感嗜血杆菌核酸检测试剂盒国家参考品,研制的参考品经均匀性、稳定性考察和验证后,显示其可用于不同企业相关试剂盒的质量评价,为此类产品的评价提供了统一的标尺。但是研究仍缺少参考品长期稳定性数据,为此需在后续研究中应补充完整并持续监测。

参考文献

- [1] 杨耀锋,徐兰飞,金洪星,等.呼吸道感染患儿不可分型流感嗜血杆菌分离率和耐药性分析[J]. 儿科药学杂志, 2020, 26(8): 41-45.
- [2] 王玉洁,国霞,王晓飞. 我院136株流感嗜血杆菌分离特点及耐药性分析[J]. 中国实验诊断学, 2020, 24(7): 1151-1153.
- [3] Suga S, Ishiwada N, Sasaki Y, et al. A nationwide population-based surveillance of invasive Haemophilus influenzae diseases in children after the introduction of the Haemophilus influenzae type b vaccine in Japan [J]. Vaccine, 2018, 36(38): 5678-5684.

(下转第1747页)

· 论 著 ·

宫腔镜电切手术在胚胎残留患者中的疗效观察及对 VEGF、FGF 血管生成因子的影响

邱星梅^{1*} 郑芳² 谢艳芬¹ 张燕妮¹

【摘要】目的 探讨宫腔镜电切手术在胚胎残留患者中的疗效观察及对血清血管内皮生长因子(VEGF)、成纤维细胞生长因子(FGF)的影响研究。**方法** 选择2017年1月至2020年1月广东省四会市妇幼保健院妇产科胚胎残留患者128例,随机分为对照组($n=64$ 例)和观察组($n=64$ 例)。对照组给予清宫手术治疗,观察组给予宫腔镜电切手术治疗,治疗7 d后对患者效果进行评估,比较两组血清 VEGF、FGF 水平、外周血 CD3+T 细胞、手术指标以及术后并发症。**结果** 观察组治疗后1周血清 VEGF 水平、FGF 水平均低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);观察组患者的 CXCR1 和 CCR2 均低于对照组,细胞 CCR6 和 CCR5 均高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);观察组患者的手术时间无明显区别,而术中出血量、术后下床时间、术后出血时间均低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);观察组患者术后腹痛、清除不彻底、子宫粘连、子宫穿孔的并发症发生率(6.24%),明显低于对照组并发症发生率(17.18%)差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 宫腔镜电切手术用于胚胎残留患者中能降低 VEGF、FGF 水平,不良反应发生率较低,手术创伤较小,能降低血管生成因子水平,值得推广应用。

【关键词】 宫腔镜电切手术;清宫手术;胚胎残留;血管内皮生长因子;成纤维细胞生长因子

Observation of the curative effect of hysteroscopic electric resection in patients with residual embryos and its influence on VEGF and FGF angiogenesis factors

QIU Xingmei^{1*}, ZHENG Fang², XIE Yanfen¹, ZHANG Yanni¹

(1. Department of Obstetrics & Gynecology, Guangdong Sihui Maternity and Child Care, Sihui, Guangdong, China, 526200; 2. Department of Obstetrics & Gynecology, the Second People's Hospital of Zhaoqing City, Guangdong, Zhaoqing, Guangdong, China, 526000)

【ABSTRACT】Objective To investigate the effect of hysteroscopic resection in patients with residual embryos and the study of its effect on serum vascular endothelial growth factor (VEGF) and fibroblast growth factor (FGF). **Methods** From January 2017 to January 2020, 128 patients with residual embryos in the Department of Obstetrics and Gynecology, Maternal and Child Health Hospital of Sihui City, Guangdong Province were randomly divided into a control group ($n=64$ cases) and an observation group ($n=64$ cases). The control group was treated with uterine evacuation surgery, and the observation group was treated with hysteroscopic resection. After 7 days of treatment, the patient's effect was evaluated, and the two groups were compared with serum VEGF, FGF levels, peripheral blood CD3+T cells, surgical indicators, and postoperative complications. **Results** The serum VEGF and FGF levels of the observation group were lower than those of the control group one week after treatment, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). The CXCR1 and CCR2 in the observation group were lower than those of the control group, and the cell CCR6 and CCR5 were higher than those in the control group, the difference was statistically significant ($P<0.05$). There was no significant difference in the operation time of patients in the observation group, but intraoperative blood loss,

基金项目:广东省医学科学技术研究基金项目(2020213)

作者单位:1. 广东省四会市妇幼保健院妇产科,广东,四会 526200

2. 广东省肇庆市第二人民医院妇产科,广东,肇庆 526000

*通信作者:邱星梅, E-mail: qixingmei123a@163.com

postoperative time to get out of bed, and postoperative bleeding time were lower than those of the control group, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). The complication rate of postoperative abdominal pain, incomplete removal, uterine adhesion, and uterine perforation in the observation group (6.24%) was significantly lower than that in the control group (17.18%). The difference is statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** Hysteroscopic electric resection can reduce the levels of VEGF and FGF in patients with residual embryos. It has a lower incidence of adverse reactions and less surgical trauma, and can reduce the level of angiogenic factors. It is worthy of popularization and application.

[KEY WORDS] Hysteroscopic electrosurgical surgery; Uterine cavity surgery; Embryonic residue; Vascular endothelial growth factor; Fibroblast growth factor

胚胎残留是指胎儿娩出或流产后,未完全排除,残留在子宫内部的组织,如得不到有效的治疗干预,则会增加妇科疾病发生率,影响患者健康、生活^[1]。既往研究表明^[2]:宫腔胚物残留是药物流产后主要的并发症之一,临床多表现为阴道淋漓出血、月经不调等,严重者将会引起宫腔粘连、不孕等,影响患者身心健康。临床上对于药物流产后胚胎残留治疗以手术治疗为主,包括^[3]:常规清宫手术和宫腔镜电切手术,选择不同的手术,手术指标和恢复情况都不同。清宫手术即为传统的人工流产手术,需要在严密的消毒措施下进行,这种手术的最佳时间段需要在胎儿未产3个月之内进行^[4-5]。而宫腔镜电切手术是在宫腔镜的辅助下借助专业的宫腔操作钳进行操作,能够避免对于子宫的过度刮蹭,使胚胎残留能够得到彻底清除的一项手术方式^[6-7]。因此,本文以胚胎残留为对象,探讨宫腔镜电切手术在胚胎残留患者中的疗效观察,报道如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选择2017年1月至2020年1月广东省四会市妇幼保健院妇产科胚胎残留患者128例作为对象,随机分为对照组($n=64$ 例)和观察组($n=64$ 例)。对照组给予清宫手术治疗,观察组给予宫腔镜电切手术治疗。对照组孕妇平均年龄(31.41 ± 2.91)岁,29例有1次剖宫产子,10例2次剖宫产子,25例未进行过产子。观察组孕妇平均年龄(30.51 ± 3.21)岁,30例有1次剖宫产子,19例2次剖宫产子,15例未进行过产子。两组患者年龄及妊娠经历比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。纳入标准:①符合胚胎残留患者临床诊断标准,均经影像检查确诊^[8];②能严格遵循医嘱完成有关治疗工作,且对手术均耐受。③所有受试者均知情同意。排除标准:①近1个月给予其他药物治疗或对本研

究实验结果产生影响者;②糖尿病、高血压患者,有麻药禁忌者^[6]。本实验经医院伦理委员会批准。

1.2 方法

对照组患者采用传统的清宫手术。术前患者需要进行专业麻醉师进行麻醉,使用芬太尼和异丙酚联合静脉注射,待患者意识消失后给予常规的手术操作,首先把子宫颈扩张到相应大小,再将刮匙伸入到子宫内腔,把胚胎组织进行刮吸操作。观察组患者给予B超监测下宫腔镜电切手术治疗。本院选用B超仪器是徐州凯信公司提供的多焦点线阵超声诊断仪^[7],探头频率设置为3.5 MHz,宫腔镜使用的是德国连续灌注型宫腔电切镜,切割功率为100 w,凝固功率为35 w。术前对患者的外阴和阴道等部位进行消毒,然后取出检查镜,扩张宫颈宫口,明确胚胎残留的大小、形态、数目和位置等基本情况,对于残留胚物表现为灰黄色、灰白色或暗红色陈旧性形态不规则的组织,在直视下电切残留的妊娠物,观察宫腔内无残留的妊娠物、无活动性出血者结束手术^[9-10]。手术完毕后,进行球囊压迫,取样送检。所有患者在术后均使用抗生素进行治疗24小时时间。

1.3 统计分析

采用SPSS 18.0软件处理,计数资料采用 n (%)表示,行 χ^2 检验,计量资料采用($\bar{x}\pm s$)表示,行 t 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组血清 VEGF、FGF 比较

两组治疗前血清 VEGF、FGF 水平比较,差异无统计学意义($P>0.05$);观察组治疗后1周血清 VEGF 水平、FGF 水平均低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表1。

2.2 两组外周血 CD3+T 细胞表面受体表达比较

两组患者的外周血 CD3+T 细胞差异无统计学

表1 两组血清 VEGF、FGF 比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of serum VEGF and FGF between the two groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	VEGF(ng/L)		FGF(pg/L)	
		治疗前	治疗后1周	治疗前	治疗后1周
观察组	64	978.57±4.61	770.25±23.29	13.39±4.63	5.12±0.49
对照组	64	977.41±13.98	812.45±21.12	13.46±4.67	9.19±0.51
t 值		1.135	8.532	0.7544	6.996
P 值		0.145	0.000	0.223	0.000

意义($P>0.05$)。观察组患者的 CXCR1 和 CCR2 均低于对照组,细胞 CCR6 和 CCR5 均高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表2。

表2 两组外周血 CD3+T 细胞表面受体表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of the expression of CD3+ T cell surface receptors in peripheral blood between 2 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	CXCR1 (%)	CCR6 (%)	CCR5 (%)	CCR2 (%)
对照组	64	7.89±1.39	2.64±1.44	12.54±1.12	6.75±0.92
观察组	64	8.48±0.35	2.80±1.39	13.88±1.39	7.44±0.41
t 值		5.002	6.748	5.993	6.499
P 值		0.022	0.013	0.023	0.010

2.3 不同组别的患者的临床手术指标比较

观察组与对照组手术时间比较,差异无统计意义($P>0.05$);观察组术中出血量、术后下床时间、术后出血时间均低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表3。

表3 不同组别的患者的临床手术指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of clinical surgical indicators in different groups of patients ($\bar{x} \pm s$)

组名	n	手术时间(mim)	术中出血量(mL)	术后下床时间(min)	术后出血时间(d)
对照组	64	14.55±3.71	14.32±10.43	31.51±2.24	4.27±1.34
观察组	64	14.06±2.32	10.32±9.45	15.15±2.53	2.16±2.08
t 值		4.341	5.452	6.341	5.119
P 值		0.023	0.021	0.023	0.048

2.4 两组术后并发症比较

观察组术后腹痛、清除不彻底、子宫粘连、子宫穿孔的并发症发生率明显低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表4。

表4 两组并发症比较 [$n(\%)$]

Table 4 Comparison of complications between 2 groups [$n(\%)$]

组名	n	腹痛	清除不彻底	子宫粘连	子宫穿孔	并发症发生率
对照组	64	5(7.80)	2(3.12)	2(3.12)	2(3.12)	11(17.18)
观察组	64	4(6.24)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	4(6.24)
χ^2 值						5.547
P 值						0.024

3 讨论

近年来,随着居民性观念的开放,导致流产女性呈上升趋势,虽然我国目前的临床流产手术技术水平已经非常先进,但是也会对女性的子宫健康和心理健康起到一定的消极作用^[11-12]。清宫术操作时间长,且术中出血量大,不利于患者恢复,治疗最佳时间不宜超过3个月^[13-14],怀孕时间越长,胎儿越大,刮宫手术难度越大。

宫腔镜手术可以清晰观察到宫腔内情况,采用电切的方式将病灶组织彻底清理,并用电凝进行创面修复,不会破坏子宫内膜,不影响患者的生育能力^[15]。宫腔镜电切术清除妊娠残留物,越来越被大众所认可。本研究观察组治疗后1周血清 VEGF 水平、FGF 水平均低于对照组,由此看出,宫腔镜电切手术的实施,可在一定程度上改善患者 VEGF 水平、FGF 水平,使其符合临床中受体的生物学特性和功能。趋化因子及其受体与胚胎均有着密不可分的关系^[16]。主要是由于趋化因子可以增强特异性和抵抗固有的免疫反应^[17]。通过对于趋化因子进行可靠分析,不仅在患者病情控制上效果较好,可使患者放松心情,有效控制病情恶化,在临床上效果显著^[18-19]。胚胎残留患者在外周血 CD3+T 细胞分析探讨中发现,细胞 CCR6、CCR5 的表达水平略高于正常人的水平,说明外周血趋化因子受体的表达水平和胚胎残留后的时候发生并不明显^[20]。本研究结果说明,宫腔镜电切手术的运用,可有效的改善患者临床的手术指标,降低患者痛苦时间;本研究中,观察组患者术后腹痛、清除不彻底、子宫粘连、子宫穿孔的并发症发生率明显低于对照组。由此说明,先进的宫腔镜电切手术相比传统治疗方式,可降低不良事件的发生。

综上所述,宫腔镜电切手术用于胚胎残留患者的治疗效果显著高于清宫术,有效降低患者清除不彻底等不良情况的发生率,改善临床手术指标,降低血管生成因子水平,值得推广应用。

参考文献

- [1] 王良义,林允冠.腹腔镜肝癌切除术效果及其对患者血清 VEGF、FGF 水平和免疫功能的影响[J]. 山东医药, 2017, 57(34):33-35.
- [2] 伍婧,邓伟英,胡斌,等. STAT3 与 VEGF 蛋白在结肠癌中的表达及对血管生成的影响[J]. 中国临床研究, 2017, 30(2):208-210.

- [3] Chen C, Huang P, Lai L, et al. Dexmedetomidine improves gastrointestinal motility after laparoscopic resection of colorectal cancer: A randomized clinical trial [J]. *Medicine*, 2016, 95(29):e4295.
- [4] 黄凤,叶永生,董雨,等. 经穴注射 BMSCs 联合中药对下肢缺血大鼠促血管生成相关因子的影响[J]. *世界中医药*, 2016, 11(2):114-117+122.
- [5] 程丽芳. 愈障再生汤联合雄激素治疗慢性再生障碍性贫血疗效及对骨髓 MVD、VEGF 及 FGF-1 的影响[J]. *现代中西医结合杂志*, 2018, 27(6):56-58.
- [6] 王晓飞,金焰,李学民,等. 直肠癌根治术联合放疗效果分析及对血管生成影响[J]. *中华放射肿瘤学杂志*, 2019, 28(6):425-427.
- [7] Sposito C, Battiston C, Facciorusso A, et al. Propensity score analysis of outcomes following laparoscopic or open liver resection for hepatocellular carcinoma [J]. *British J Surg*, 2016, 103(7):871-880.
- [8] 朱婷,王瑾,陈海华,等. 支气管哮喘患者血清中 VEGF、EGF 等相关生长因子表达及与临床表型、肺功能以及病情程度相关性研究[J]. *标记免疫分析与临床*, 2017, 24(12):32-37.
- [9] 宋渊,方鹏飞. 血塞通对家兔皮瓣移植术后并发症的早期干预及对 VEGF、bFGF 表达的影响[J]. *西部中医药*, 2016, 29(10):11-16.
- [10] 包久铭. 节拍式化疗联合微波热疗对晚期卵巢癌患者血管生成的影响及疗效观察[J]. *实用癌症杂志*, 2017, 32(11):1882-1885.
- [11] 夏琛,褚志刚. Marjolin 溃疡不同形态区域中三种血管调节相关因子的表达及其与血管生成关系的临床研究[J]. *中华烧伤杂志*, 2019, 35(9):676-682.
- [12] 陶梦璋,王雨生,王海燕. 病理性近视继发脉络膜新生血管抗血管内皮生长因子药物治疗后预后因素研究现状[J]. *中华眼底病杂志*, 2019, 35(5):513-517.
- [13] Ireland LD, Allen RH. Pain Management for Gynecologic Procedures in the Office [J]. *Obstet Gynecol Survey*, 2016, 71(2):89-98.
- [14] 王丹,李怀芳. 达菲林联合腹腔镜手术治疗子宫内膜异位症对 VEGF、Ang-2 和 Tie-2 水平的影响[J]. *中国妇幼健康研究*, 2016, 27(8):994-997.
- [15] 袁学芝,郭金荣. 米非司酮联合曼月乐对功血患者雌孕激素受体及子宫内膜 bFGF、VEGF 表达的影响[J]. *中华保健医学杂志*, 2019, 21(1):60-63.
- [16] Martínez-Cecilia D, Cipriani F, Vishal S, et al. Laparoscopic Versus Open Liver Resection for Colorectal Metastases in Elderly and Octogenarian Patients: A Multicenter Propensity Score Based Analysis of Short- and Long-term Outcomes [J]. *Ann Surg*, 2017, 265(6):1192-1200.
- [17] 宋渊,方鹏飞. 血塞通对家兔皮瓣移植术后并发症的早期干预及对 VEGF、bFGF 表达的影响[J]. *西部中医药*, 2016, 29(10):11-16.
- [18] 李新峰,符亚辉,吴林波,等. 化疗栓塞术对中晚期肝癌患者血清 TGF- β 1、bFGF 和 VEGF 的影响[J]. *实用临床医药杂志*, 2016, 20(9):61-63.
- [19] 谢昌营,吴成成,肖慧荣. 肛门洗剂对肛瘘模型大鼠创面组织修复作用及创面血管生长相关因子、炎症相关因子、FGF 蛋白的影响[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2019, 25(4):57-61.
- [20] Barkhatov L, Åsmund A, Fretland, Kazaryan AM, et al. Validation of clinical risk scores for laparoscopic liver resections of colorectal liver metastases: A 10-year observed follow-up study [J]. *J Surg Oncol*, 2016, 114(6):757-763.

(上接第 1743 页)

- [4] Meyler K, Meehan M, Bennett D, et al. Spontaneous capsule loss in *Haemophilus influenzae* serotype b associated with Hib conjugate vaccine failure and invasive disease [J]. *Clin Microbiol Infect*, 2019, 25(3):390-391.
- [5] Cleland G, Leung C, Wan S CJ, et al. Paediatric invasive *Haemophilus influenzae* in Queensland, Australia, 2002 - 2011: Young Indigenous children remain at highest risk [J]. *J Paediatr Child Health*, 2018, 54(1):36-41.
- [6] Safari D, Lestari A N, Khoeri M M, et al. Nasopharyngeal carriage and antimicrobial susceptibility profile of *Haemophilus influenzae* among patients infected with HIV in Jakarta, Indonesia [J]. *Access Microbiol*, 2020, 2(12):acmi000165.
- [7] 陈静宜,廖飞,冯磊. 2016 年玉溪市某院儿童下呼吸道感染细菌菌群分布及耐药性分析[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2018, 10(3):148-152.
- [8] 王春娥,卢旭,刘茹凤,等. 淋病奈瑟菌核酸检测试剂盒国家参考品的制备[J]. *微生物学免疫学进展*, 2016, 44(5):21-25.
- [9] 麻婷婷,许四宏,周海卫. 人细小病毒 B19 核酸检测试剂国家参考品的建立[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2020, 12(12):1596-1599.
- [10] 刘东来,周海卫,石大伟,等. 细菌感染多重核酸检测试剂参考品的建立[J]. *传染病信息*, 2018, 31(3):209-214.
- [11] 韩永志,全浩. 标准物质及其应用技术[M]. 北京:中国标准出版社, 2003.
- [12] 国家标准物质管理委员会. 标准物质的研制、管理与应用[M]. 北京:中国计量出版社, 2010.

· 论 著 ·

人类白细胞抗原基因分型检测试剂盒行业标准的修订与验证

胡泽斌¹ 王瑞霞² 代蕾颖² 曲守方^{1*} 黄杰^{1*}

[摘要] 目的 对2010年发布的YY/T 1180-2010《人类白细胞抗原(HLA)基因分型试剂盒(SSP法)》进行修订并验证。方法 按照拟定行业标准的要求,选择不同方法学的人类白细胞抗原(HLA)基因分型试剂盒进行验证。结果 外观、参考品符合率、重复性、有效检测范围、检出限、稳定性等性能指标符合要求。结论 人类白细胞抗原(HLA)基因分型试剂盒行业标准的修订及时科学合理,适用范围更加全面,有助于规范此类试剂盒的技术要求和检验方法,从而提高此类试剂盒的产品质量,并为其上市前后的监管提供依据。

[关键词] 人类白细胞抗原; 试剂盒; HLA 基因分型; 行业标准; 验证

Establishment and Verification of the Industry Standard for *HLA* Gene Typing Kits

HU Zebin^{1*}, WANG Ruixia², DAI Leiyang², QU Shoufang^{1*}, HUANG Jie^{1*}

(1. National Institute for Food and Drug Control, Beijing, China, 100050; 2. Beijing Institute of medical device testing, Beijing, China, 101111)

[ABSTRACT] **Objective** To revise and verify the feasibility of the industry standard for YY / T 180-2010 human leukocyte antigen (HLA) genotyping kits (SSP). **Methods** The HLA gene typing kits of different methods were selected for validation in accordance with the new revised HLA industry standard. **Results** The appearance, compliance rate, repeatability, effective detection range, detection limit, stability and other performance indicators all meet the requirements. **Conclusion** The revision of the industry standard of human leukocyte antigen (HLA) genotyping kit is timely, scientific and reasonable, and the scope of application is more comprehensive, which helps to standardize the technical requirements and test methods of this kind of kit, so as to improve the product quality of this kind of kit and provide a basis for its supervision before and after marketing.

[KEY WORDS] Human leukocyte antigen; Kits; HLA gene typing; Industry Standard; Verify

人类白细胞抗原(Human Leucocyte Antigen, HLA)的I类A、B、C位点和II类DR、DQ位点等位基因的分型检测在造血干细胞移植,骨髓移植以及肝脏肾脏等其他组织器官移植的供体受体配型中发挥关键作用^[1-2]。同时HLA-I类B座位的单位点如B27和B5801等基因分型检测在强制性脊柱

炎的辅助诊断和痛风用药指导中也发挥重要作用^[3-4]。目前,在国家药品监督管理局取得医疗器械注册证的HLA基因分型检测试剂盒约有十种,方法学包含聚合酶链反应-序列特异性引物法(polymerase chain reaction-sequence specific primer, PCR-SSP)、聚合酶链反应-序列特异性寡核苷酸探

基金项目:国家药品监督管理局2020年医疗器械行业标准制修订计划(I2020023-T-BJ)

作者单位:1. 中国食品药品检定研究院体外诊断试剂检定所,北京100050

2. 北京市医疗器械检验研究院,北京101111

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

注:胡泽斌和王瑞霞同为第一作者

针法 (polymerase chain reaction - sequence specific oligonucleotide, PCR-SSO)、基因测序分型法 (sequence based genotyping, PCR-SBG)、荧光 PCR 法等^[5-7]。2010 年原国家食品药品监督管理局发布的行业标准 YY/T 1180-2010《人类白细胞抗原 (HLA) 基因分型试剂盒 (SSP 法)》^[8], 为分子诊断领域较早制定的产品标准, 仅针对当时较为流行的 SSP 方法学的 HLA 基因分型试剂盒, 随着 HLA 产品多样性的增加, 原条款适用性降低, 按照国家药品监督管理局 2020 年医疗器械行业标准制修订计划^[9], 对其进行修订。本研究选取 16 批次不同方法学的 HLA 基因分型试剂盒, 对拟定标准的技术指标和检验方法进行验证。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂

HLA-A、B、C、DRB1、DQB1 核酸分型检测试剂盒 (PCR-SBT 法), 由德必基生物科技 (厦门) 有限公司提供; HLA-A、B、C、DR、DQ 位点分型检测试剂盒 (SSO 法), 由北京博富瑞基因诊断技术有限公司提供; 人类白细胞抗原 B*5801 核酸检测试剂盒 (荧光 PCR 法), 人类白细胞抗原 B*1502 核酸检测试剂盒 (荧光 PCR 法), 人类白细胞抗原 B*27 基因分型试剂盒 (SSP 法), 由江苏伟禾生物科技有限公司提供; HLA-B27 基因检测试剂盒 (荧光 PCR 探针法), 由山东英盛生物技术有限公司提供; 人类白细胞抗原 B27 核酸检测试剂盒 (荧光 PCR 法), 由江苏默乐生物科技股份有限公司提供; HLA-A、B、C、DRB1、DQB1 位点分型检测试剂盒 (SBT 法), HLA-A、B、C、DR、DQ 位点分型检测试剂盒 (SSP 法), HLA-A、B、C、DR、DQ 位点分型检测试剂盒 (SSO 法), 由赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司提供。人类白细胞抗原 B27 核酸检测国家参考品 (批号: 360035-201901, 10 支/套, 30 μ L/支, 20 ng/ μ L), 由中国食品药品检定研究院提供; 人类白细胞抗原 B5801/5701/1502 核酸检测国家参考品 (批号: 360036-201901, 20 支/套, 30 μ L/支, 20 ng/ μ L), 由中国食品药品检定研究院提供; 人类白细胞抗原组织配型基因分型国家参考品 (批号: 360045-202001, 38 支/套, 30 μ L/支, 20 ng/ μ L), 由中国食品药品检定研究院提供。

1.1.2 仪器

ABI 7500 荧光定量基因扩增仪由中国食品药品检定研究院提供; ABI GeneAmpPCR System, 上海天能凝胶成像仪, 由江苏伟禾生物科技有限公司提供; luminex200 多功能流式点阵仪由北京博富瑞基因诊断技术有限公司提供; ABI 3730XL 分析仪由德必基生物科技 (厦门) 有限公司提供; SLAN-96P 全自动医用 PCR 分析系统由江苏默乐生物科技股份有限公司提供; Thermofisher DNA 分析仪, Alpha Imager 凝胶成像系统由赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司提供。

1.2 方法

按照修订后的行业标准《人类白细胞抗原 (HLA) 基因分型试剂盒》进行验证。验证的技术指标包括外观、参考品符合率、重复性、有效检测范围、稳定性、准确性、特异性、检出限。

1.2.1 外观

目测检查外观, 包括试剂盒的完整性、效期、包装信息、是否有人为损伤。

1.2.2 与移植或输血的供体与受体匹配相关试剂盒的性能要求

1.2.2.1 参考品符合率 对 HLA 基因分型国家参考品或者企业参考品进行检测, 应与已知基因分型结果相符合。

1.2.2.2 重复性 将 1~3 份具有代表性的 DNA 样品进行检测, 每份样品平行检测 3~5 次, 检测的结果应一致且与已知基因分型结果相符合。

1.2.2.3 有效检测范围 用试剂盒检测范围内的阳性参考品, 分别配制出最高和最低两个浓度进行检测, 均应与已知基因型别相符合。

1.2.2.4 稳定性 可选用效期稳定性或热稳定性试验进行参考品符合率和有效检测范围项目的验证。

1.2.3 疾病辅助诊断相关试剂盒的性能要求

1.2.3.1 准确性 对试剂盒检测范围内已知基因分型的国家或企业阳性参考品进行检测, 结果应为阳性或相应基因型。

1.2.3.2 特异性 对试剂盒检测范围外的国家或企业阴性参考品进行检测, 检测结果应为阴性或未检出。

1.2.3.3 重复性 对 1~3 份阳性参考品平行进行检测 5~10 次, 结果应均为阳性或相应基因型; 对 1~3 份阴性参考品平行进行检测 5~10 次, 结果应均为阴性或未检出。

1.2.3.4 检出限 对检出限参考品进行检测,结果应为阳性或相应基因型。

1.2.3.5 稳定性 可选用效期稳定性或热稳定性试验进行准确性、特异性、检出限、4项目的验证。

2 结果

2.1 外观验证结果

对6家共16批次HLA基因分型检测试剂盒,依据拟定HLA行业标准的上述性能指标进行了全部验证,所有试剂盒的各组份齐全、完整,液体无渗漏;包装标签应清晰,无磨损,外观均符合行业标准规定。

2.2 与移植或输血的供体与受体匹配相关试剂盒的性能验证结果

2.2.1 参考品符合率验证结果

3家企业的HLA-A、B、C、DR、DQ位点分型检测试剂盒(SBT法和SSO法)对人类白细胞抗原组织配型基因分型国家参考品的38支人基因组DNA样品,全部进行参考品符合率检测,在制造商宣称的分辨率水平上,验证结果与国家参考品已知基因分型结果相符合,结果均符合规定。

2.2.2 重复性和有效检测范围验证结果

采用2种方法学的HLA-A、B、C、DR、DQ位点分型检测试剂盒(SSP法和SSO法),对3份已知基因分型的具有代表性的重复性参考品进行检测,每份样品平行检测3次,检测结果应一致,且在制造商宣称的分辨率水平上与已知基因分型结果相符合。

对2份试剂盒检测范围内已知基因分型的企业阳性参考品,分别配制出高、低2个浓度后进行检测,结果均在试剂盒制造商宣称的分辨率水平上与已知基因型别相符合。

2.2.3 稳定性验证结果

采用2种方法学的HLA-A、B、C、DR、DQ位点分型检测试剂盒(SSP法和SSO法)对效期稳定性进行验证,参考品符合率和有效检测范围均符合拟定行业标准的要求,见表1。

2.3 疾病辅助诊断相关试剂盒的性能验证结果

2.3.1 HLA-B27基因检测试剂盒的性能验证结果

采用3家共4批次HLA-B27基因检测试剂盒(荧光PCR法和SSP法),对人类白细胞抗原B27核酸检测国家参考品的10支人基因组DNA样品全部进行了准确性和特异性检测,试剂盒检测范

表1 与移植或输血的供体与受体匹配相关试剂盒的部分验证结果

Table 1 Partial verification results of related kits matched with donors and recipients for transplantation or blood transfusion

试剂盒	参考品符合率		重复性	有效检测范围	效期稳定性
	国家参考品 (%)	企业参考品 (%)			
A(SSO法)	/	100	符合规定	符合规定	符合规定
A(SSP法)	/	100	符合规定	符合规定	符合规定
A(SBT法)	100	/	/	/	/
B(SSO法)	100	/	/	/	/
C(SBT法)	100	/	/	/	/

注:/表示该试剂盒未对该项指标进行验证。

围内已知基因分型的国家阳性参考品检测结果均阳性或相应基因型。

试剂盒检测范围外的国家阴性参考品的检测结果均为阴性;同时对2家的企业阳性参考品和企业阴性参考品进行检测,结果全部符合规定;重复性和检出限项目中,采用2家2批次HLA-B27基因检测试剂盒(荧光PCR法),对阳性重复性参考品平行进行检测10次,结果一致均为阳性,对阴性重复性参考品平行进行检测10次,结果一致应均为阴性,对检出限参考品进行检测结果均检出阳性;稳定性项目中,采用2家2批次HLA-B27基因检测试剂盒(荧光PCR法),对效期稳定性进行验证,准确性、特异性和检出限均符合拟定行业标准的要求,见表2。

2.3.2 HLA-B1502和B5801基因检测试剂盒的性能验证结果

在疾病辅助诊断相关试剂盒的性能要求中,采用1家各1批次的HLA-B1502和B5801试剂盒(PCR法),对人类白细胞抗原B5801/5701/1502核酸检测国家参考品的20支人基因组DNA样品全部进行了准确性和特异性检测,试剂盒检测范围内已知基因分型的国家阳性参考品检测结果均为阳性;试剂盒检测范围外的国家阴性参考品的检测结果均为阴性;重复性和检出限项目中,还采用1批次HLA-B5801试剂盒,对阳性重复性参考品平行进行检测10次,结果一致均为阳性,对阴性重复性参考品平行进行检测10次,结果一致应均为阴性,对检出限参考品进行检测结果均检出阳性;稳定性项目中,还采用1批次HLA-B5801试剂盒对效期稳定性进行验证,准确性、特异性和检出限均符合拟定行业标准的要求。

表2 疾病辅助诊断相关试剂盒的部分验证结果

Table 2 Partial verification results of related kits for auxiliary diagnosis of diseases

试剂盒	准确性		特异性		重复性	检出限	效期稳定性
	国家参考品(%)	企业参考品(%)	国家参考品(%)	企业参考品(%)			
D(PCR法)	100	100	100	100	符合规定	符合规定	符合规定
D(SSP法)	100	/	100	/	/	/	/
E(PCR法)	100	100	100	100	符合规定	符合规定	符合规定
F(PCR法)	100	/	100	/	/	/	/

注:/表示该试剂盒未对该项指标进行验证。

3 讨论

随着体外诊断分子检测技术的飞速发展和对HLA科学研究的不断深入,临床上涌现出更多更丰富的HLA基因分型试剂盒。从临床预期用途来说,此类试剂盒主要有两大类,一类是用于组织器官和干细胞移植供受体配型的A、B、C、DRB、DQB位点的HLA分型试剂,方法学上有低分辨率、中分辨率的SSP法和SSO法,还有高分辨率的SBT法;另一类是用于疾病辅助诊断或临床用药指导的HLA单位点核酸检测试剂盒^[10-11],如与强制性脊柱炎密切相关的B27,与治疗痛风常用药别嘌醇过敏相关的HLA-B5801,与抗艾滋病经典药物阿巴卡韦超敏反应相关的HLA-B5701,与抗癫痫药卡马西平药物引起的史蒂芬琼森症候群相关的HLA-B1502等基因检测,这类试剂盒在方法学上主要以PCR为主,包括荧光PCR法、PCR探针法、PCR熔解曲线法等。

原行业标准YY/T 1180-2010人类白细胞抗原(HLA)基因分型试剂盒(SSP法)于2010年12月27日发布并于2012年6月1日实施,仅适用于SSP法检测HLA基因分型试剂盒,而该方法学的试剂盒主要用于HLA的I类A、B、C位点和II类DRB、DQB位点的低分辨率、中分辨率的基因分型。为拓展行业标准的适用范围,提高各类HLA基因分型检测试剂的产品质量,更好满足监管需要,本次修订标准时,根据HLA基因分型产品临床预期用途和性能指标的不同,对产品指标做了分类。在技术指标的确定方面,参考了目前市场上进口企业和国产企业厂家相关产品的说明书和性能评估资料,并结合临床要求制定,业内专家对逐条性能指标进行了充分讨论。并且对标准中每一条性能指标和试验方法均进行了实验验证,关键指标准确性和特异性采用了相应的HLA国家参考品^[12-14]进行考察,如上所述,验证结果全部符合标准规定的要求。综上,修订后的HLA产品标准所列技术指标是合理的,所列试验方法是可靠的可行的。

参考文献

- [1] Edgerly CH, Weimer ET. The Past, Present, and Future of HLA Typing in Transplantation[J]. Methods Mol Biol, 2018, 1802:1-10.
- [2] Petersdorf EW. In celebration of Ruggero Ceppellini: HLA in transplantation[J]. HLA, 2017, 89(2):71-76.
- [3] Shankarkumar U, Pawar A, Ghosh K. Implications of HLA sequence-based typing in transplantation[J]. J Postgrad Med, 2008, 54(1):41-44.
- [4] Romero-Sanchez C, Chila-Moreno L, Gómez A, et al. The Frequency of HLA-B*27 in a Colombian Population with Signs of Spondyloarthritis[J]. Curr Rheumatol Rev, 2018, 14(3):246-250.
- [5] Cheng H, Yan D, Zuo X, et al. A retrospective investigation of HLA-B*5801 in hyperuricemia patients in a Han population of China[J]. Pharmacogenet Genomics, 2018, 28(5):117-124.
- [6] Madden K, Chabot-Richards D. HLA testing in the molecular diagnostic laboratory[J]. Virchows Arch, 2019, 474(2):139-147.
- [7] Dunkley H. HLA typing by SSO and SSP methods[J]. Methods Mol Biol, 2012, 882:9-25.
- [8] 中国标准化委员会. YY/T 1180-2010 人类白细胞抗原(HLA)基因分型试剂盒(SSP法)[S]. 北京:中国标准出版社, 2012.
- [9] 国家药品监督管理局. 药监综械注[2020]48号 国家药监局综合室关于印发2020年医疗器械行业标准制修订计划项目的通知[S]. 2020.
- [10] Shah Reena, Nabiswa Hilda, Okinda Nancy, et al. Prevalence of HLA-B*5701 in a Kenyan population with HIV infection[J]. J Infect, 2018, 76(2):212-214.
- [11] Chen P, Lin JJ, Lu CS, et al. Carbamazepine-induced toxic effects and HLA-B*1502 screening in Taiwan[J]. N Engl J Med, 2011, 364(12):1126-1133.
- [12] 胡泽斌, 高飞, 孙彬裕, 等. HLA组织配型基因分型国家参考品的研制[J]. 中国生物制品学杂志, 2021, 34(10):1212-1215.
- [13] 胡泽斌, 高飞, 曲守方, 等. 人类白细胞抗原B27核酸检测国家参考品的建立[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(10):1285-1288.
- [14] 胡泽斌, 孙彬裕, 黄杰, 等. 人类白细胞抗原B5801/5701/1502核酸检测国家参考品的建立[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(9):1137-1141.

RANKL/OPG、MIP-1 α 、TSLP对口腔正畸治疗中牙周病的诊断价值

闫利辉 陈卓* 谢冰 姚海亮 张娴 刘琳 武时谦 越杨

【摘要】目的 探究核因子 κ B受体活化因子配体(RANKL)/骨保护蛋白(OPG)、单核细胞炎性蛋白-1 α (MIP-1 α)、胸腺基质淋巴细胞生成素(TSLP)对口腔正畸治疗中牙周病的诊断价值。**方法** 选取郑州大学附属郑州中心医院口腔科2017年3月至2020年3月牙周病正畸治疗患者24例为A组,牙周正常的30例正畸患者作为B组,比较两组患者在正畸治疗过程中1,3,6个月龈沟液中RANKL/OPG、MIP-1 α 、TSLP水平、牙周指标:菌斑指数(PLI)、牙龈指数(GI),分析各龈沟液指标对牙周病的诊断价值。**结果** 正畸治疗1,3个月后龈沟液中RANKL/OPG、MIP-1 α 、TSLP及PLI、GI水平组间比较,牙周患者组>正常组,差异有统计学意义($P<0.05$);正畸治疗3个月后龈沟液中RANKL/OPG、MIP-1 α 、TSLP与PLI、GI呈正相关($P<0.05$);正畸治疗3个月后龈沟液中RANKL/OPG、MIP-1 α 、TSLP联合诊断牙周病的AUC最大,为0.907。**结论** 龈沟液中RANKL/OPG、MIP-1 α 、TSLP联合可为临床诊断口腔正畸治疗中牙周病提供科学指导。

【关键词】 核因子 κ B受体活化因子配体;骨保护蛋白;单核细胞炎性蛋白-1 α ;胸腺基质淋巴细胞生成素;牙周病;正畸治疗

The value of RANKL/OPG, MIP-1 α , TSLP in the diagnosis of periodontal disease in orthodontic treatment

YAN Lihui, CHEN Zhuo*, XIE Bing, YAO Hailiang, ZHANG Xian, LIU Lin, WU Shiqian, YUE Yang
(Department of Stomatology, Zhengzhou Central Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan, China, 450000)

【ABSTRACT】 Objective To explore the diagnostic value of nuclear factor kappa B receptor activator ligand (RANKL)/osteoprotective protein (OPG), monocyte inflammatory protein - 1 α (MIP - 1 α), thymic stromal lymphopoietin (TSLP) in orthodontic treatment of periodontal disease. **Methods** Twenty - four orthodontic patients with periodontal disease in Zhengzhou Central Hospital Affiliated to Zhengzhou University from March 2017 to March 2020 were selected as group A, and 30 orthodontic patients with normal periodontal period were selected as group B, and the two groups were compared during orthodontic treatment. RANKL/OPG, MIP - 1 α , TSLP levels, periodontal indexes: plaque index (PLI), gingival index (GI) in gingival crevicular fluid at 1, 3, and 6 months were compared. The diagnostic value of various gingival crevicular fluid indicators for periodontal disease was analyzed. **Results** Comparison of RANKL/OPG, MIP-1 α , TSLP, PLI and GI levels in gingival crevicular fluid after orthodontic treatment 1 month and 3 months: the periodontal patient group > the normal group ($P<0.05$). After 3 months of orthodontic treatment, RANKL/OPG, MIP-1 α , TSLP in gingival crevicular fluid were positively correlated with PLI and GI ($P<0.05$). After 3 months of orthodontic treatment, the AUC of RANKL/OPG, MIP-1 α , and TSLP combined in the diagnosis of periodontal disease in gingival crevicular fluid was the largest, which was 0.907. **Conclusion** The combination of RANKL/OPG, MIP-1 α and TSLP in gingival crevicular fluid can provide scientific guidance for clinical diagnosis of

基金项目:河南省医学科技攻关计划(联合共建)项目(LHGJ20191047)

作者单位:郑州大学附属郑州中心医院口腔科,河南,郑州450000

*通信作者:陈卓, E-mail: 1156026104@qq.com

periodontal disease in orthodontic treatment.

[KEY WORDS] Nuclear factor kappa B receptor activator ligand; osteoprotective protein; Monocyte inflammatory protein-1 α ; Thymic stromal lymphopoietin; Periodontal disease; Orthodontic treatment

正畸治疗有助于改善患者咬合关系,促进口腔生理功能恢复,可以帮助患者有效改善患者的牙周组织状况,减轻患者的牙齿炎症,增加患者牙齿的稳定程度,改变患者牙周袋深度,使患者牙周袋变浅,提升患者的牙齿美观度以及牙齿功能,但在正畸治疗的过程中,患者的牙周组织会出现改变,长期使用固定矫治器可能会增加牙齿清洁难度,改变口腔内环境,导致菌斑大量蓄积,进而引发患者机体自然产生一定程度的炎症反应。同时正畸治疗过程中,牙周组织的炎症愈合更为缓慢,牙周纤维、牙槽骨的改建及牙齿的移动会加速牙周病情的发展^[1-3]。相关研究显示^[4],牙周局部微环境改变,可破坏核因子 κ B受体活化因子配体(receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand, RANKL)/骨保护素(osteoprotegerin, OPG)平衡,引起牙槽骨吸收。单核细胞炎性蛋白-1 α (Macrophage inflammatory protein-1 α , MIP-1 α)、胸腺基质淋巴细胞生成素(thymic stromal lymphopoietin, TSLP)均为趋化因子,在免疫炎症反应中起着重要作用^[5-6]。本研究尝试探讨RANKL/OPG、MIP-1 α 、TSLP在牙周病正畸治疗中诊断及转归中的应用价值,旨在为临床诊治提供一种新途径。报告如下。

1 资料和方法

1.1 一般资料

选取郑州大学附属郑州中心医院口腔科2017年3月至2020年3月牙周病正畸治疗患者24例为A组,牙周正常的30例正畸患者作为B组,其中女30例,男24例,年龄平均(22.49 $\pm$ 1.60)岁;体质指数平均(20.62 $\pm$ 1.39) kg/m²;病程平均(15.19 $\pm$ 1.36)m;纳入标准:①年满18周岁,口腔卫生习惯良好,有良好的依从性;②全身状况:营养正常,无糖尿病、心脏病、血液病、心脑血管疾病、免疫缺陷、骨质疏松等系统性疾病,无长期用药史,女性非妊娠期;③既往史:无正畸治疗史,无颌面部外伤史,无唇腭裂病史,无夜磨牙或紧咬牙习惯;无囊肿或肿瘤病变者,无牙体和根尖周病变者,无不良修复体;④研究对象均在同一位正畸医师处采用相同的托槽矫治器进行正畸治疗,口腔卫生维

护习惯良好;⑤其中牙周炎患者为轻、中度慢性牙周炎:根据1999年牙周疾病新分类法诊断为轻中度慢性牙周炎。稳定期诊断标准^[7]:患者能良好的自我控制菌斑无 $\geq$ 5 mm牙周袋,附着丧失无增加,全口探诊出血阳性位点在20%以下,牙松动度无增加,无溢脓,无创伤等。本院伦理委员会经审核评议同意本研究,研究对象均知情同意。

1.2 方法

两组患者均给予基础治疗,保持两组患者口腔卫生,两组患者均分别于正畸治疗前、治疗1、3、6个月后,先评估牙龈颜色,牙周探针检查并记录牙周探诊深度(PD)、牙龈指数(Gingival index, GI)和菌斑指数(PLI);所有研究对象均取6颗指数牙(16、11、26、36、31、46)的近中颊位点,佩戴无菌手套,常规清除龈上菌斑、软垢,隔湿,轻柔吹干,于受试牙近中颊位点插入滤纸条(2 mm $\times$ 10 mm),遇轻微阻力时停止,30 s后取出,若出现血液和唾液污染,则弃置不用,再取。将取完龈沟液后6根吸潮纸尖置入原离心管称重,减去原记录重量即为龈沟液重量,按1 g/mL换算成体积,收集后封闭离心管,放于-70 $^{\circ}$ C低温保存,注意上述采集过程均由同一操作者独立完成。缓冲液浸润龈沟液纸尖末端,12 000 r/min离心15 min,离心半径10 cm,取上清液,采用上海沪震实业有限公司酶联免疫吸附试验试剂盒测定龈沟液RANKL、OPG、MIP-1 α 、TSLP水平,将试剂盒中标准液稀释至10 μ g/mL,取96孔板每孔加入标准液0.1 mL,4 $^{\circ}$ C条件下过夜;第2 d加入待测样品,5 000 r/min离心5 min,去除滤纸条,保留上清液,37 $^{\circ}$ C下孵育60 min,加入双抗,再次孵育30 min,采用酶标仪测定450 nm波长处光密度值。并计算RANKL/OPG。

1.3 统计学方法

使用SPSS 24.0软件进行统计分析,正态资料以($\bar{x} \pm s$)表示, t 检验;计数资料用 $n(\%)$ 表示, χ^2 检验;龈沟液中RANKL/OPG、MIP-1 α 、TSLP与PLI、GI相关性用Pearson相关分析;龈沟液中RANKL/OPG、MIP-1 α 、TSLP水平对牙周病的诊断价值用受试者工作特征(ROC)曲线分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组正畸治疗前后龈沟液中 RANKL/OPG、MIP-1 α 、TSLP 水平

两组正畸治疗前、治疗 6 个月后龈沟液中 RANKL/OPG、MIP-1 α 、TSLP 水平差异无统计学意义

($P>0.05$); 两组正畸治疗 1、3、6 个月后龈沟液中 RANKL/OPG、MIP-1 α 、TSLP 水平呈先升高后降低趋势, 且均在正畸治疗 3 个月后达到最高峰($P<0.05$); A 组正畸治疗 1、3 个月后 RANKL/OPG、MIP-1 α 、TSLP 水平高于 B 组, 差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

表 1 两组正畸治疗前后龈沟液中 RANKL/OPG、MIP-1 α 、TSLP 水平比较 ($\bar{x}\pm s$)

Table 1 levels of RANKL / OPG and MIP-1 α 、TSLP in GCF before and after orthodontic treatment in 2 groups ($\bar{x}\pm s$)						
时间	组别	<i>n</i>	正畸治疗前	正畸治疗 1 个月后	正畸治疗 3 个月后	正畸治疗 6 个月后
RANKL/OPG	A 组	24	0.57 $\pm$ 0.10	0.82 $\pm$ 0.15	0.96 $\pm$ 0.24	0.63 $\pm$ 0.16
	B 组	30	0.55 $\pm$ 0.12	0.68 $\pm$ 0.13	0.73 $\pm$ 0.18	0.60 $\pm$ 0.12
	<i>t</i> 值		0.654	3.672	4.025	0.787
	<i>P</i> 值		0.516	0.001	<0.001	0.435
MIP-1 α (ng/ μ L)	A 组	24	4.76 $\pm$ 0.71	12.24 $\pm$ 2.05	20.16 $\pm$ 4.27	9.37 $\pm$ 2.24
	B 组	30	4.52 $\pm$ 0.66	8.73 $\pm$ 1.76	13.29 $\pm$ 3.08	8.81 $\pm$ 2.03
	<i>t</i> 值		1.284	6.768	6.864	0.962
	<i>P</i> 值		0.205	<0.001	<0.001	0.305
TSLP(ng/mL)	A 组	24	4.04 $\pm$ 0.67	6.29 $\pm$ 1.28	8.56 $\pm$ 2.34	5.32 $\pm$ 0.94
	B 组	30	3.85 $\pm$ 0.62	5.11 $\pm$ 1.14	6.05 $\pm$ 1.59	5.01 $\pm$ 0.88
	<i>t</i> 值		1.080	3.579	4.682	1.248
	<i>P</i> 值		0.285	0.001	<0.001	0.218

2.2 两组正畸治疗前后 PLI、GI

两组正畸治疗前、治疗 6 个月后 PLI、GI 差异无统计学意义($P>0.05$); 两组正畸治疗 1、3、6 个月后 PLI、GI 呈先升高后降低趋势, 且均在正畸治疗 3 个月后达到最高峰($P<0.05$); A 组正畸治疗 1、3 个月后 PLI、GI 高于 B 组, 差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 2。

表 2 两组正畸治疗前后 PLI、GI 比较 ($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Comparison of PLI and GI between 2 groups before and after orthodontic treatment ($\bar{x}\pm s$)

指标	组别	<i>n</i>	正畸治疗前	正畸治疗 1 个月后	正畸治疗 3 个月后	正畸治疗 6 个月后
PLI	A 组	24	1.03 $\pm$ 0.15	1.48 $\pm$ 0.20	2.06 $\pm$ 0.41	1.22 $\pm$ 0.23
	B 组	30	1.01 $\pm$ 0.13	1.31 $\pm$ 0.17	1.53 $\pm$ 0.28	1.17 $\pm$ 0.19
	<i>t</i> 值		0.525	3.376	5.632	0.875
	<i>P</i> 值		0.602	0.001	<0.001	0.386
GI	A 组	24	0.40 $\pm$ 0.13	0.75 $\pm$ 0.16	1.04 $\pm$ 0.26	0.57 $\pm$ 0.15
	B 组	30	0.38 $\pm$ 0.12	0.60 $\pm$ 0.14	0.81 $\pm$ 0.22	0.53 $\pm$ 0.11
	<i>t</i> 值		0.587	3.672	3.521	1.130
	<i>P</i> 值		0.560	0.001	0.001	0.264

2.3 龈沟液中 RANKL/OPG、MIP-1 α 、TSLP 与 PLI、GI 相关性

因两组龈沟液中 RANKL/OPG、MIP-1 α 、TSLP 及 PLI、GI 均于正畸治疗 3 个月后达到最高峰, 故选择该时间点做相关性。Pearson 相关性分析, 正畸治疗 3 个月后龈沟液中 RANKL/OPG、MIP-1 α 、TSLP 与 PLI、GI 呈正相关($P<0.05$)。见表 3。

表 3 龈沟液中 RANKL/OPG、MIP-1 α 、TSLP 与 PLI、GI 相关性

Table 3 RANKL/OPG and MIP-1 in GCF α 、Correlation of TSLP with PLI and GI

指标	PLI		GI	
	<i>r</i> 值	<i>P</i> 值	<i>r</i> 值	<i>P</i> 值
RANKL/OPG	0.610	<0.001	0.695	<0.001
MIP-1 α	0.700	<0.001	0.726	<0.001
TSLP	0.647	<0.001	0.650	<0.001

2.4 龈沟液中 RANKL/OPG、MIP-1 α 、TSLP 水平对牙周病的诊断价值

因两组龈沟液中 RANKL/OPG、MIP-1 α 、TSLP 均于正畸治疗 3 个月后达到最高峰, 故选择该时间点做诊断。ROC 曲线显示, 正畸治疗 3 个月后龈沟液中 RANKL/OPG、MIP-1 α 、TSLP 诊断牙周病的曲线下面积(AUC)分别为 0.735、0.871、0.824, 联合诊断的 AUC 为 0.907($P<0.05$)。见图 1。

3 讨论

RANKL、OPG 均为牙周炎牙槽骨吸收的重要调节因子, 有学者指出, 二者比值是评估慢性牙周炎牙槽骨吸收严重程度的客观指标之一^[8]。本研究数据表明, 两组正畸治疗 1 个月、3 个月后龈沟液中 RANKL/OPG 均较治疗前升高, 但牙周病患者升高幅度高于正常正畸治疗患者, 结合黄俊红等^[9]、张瑞林等^[10]研究考虑机制可能在于牙周病可

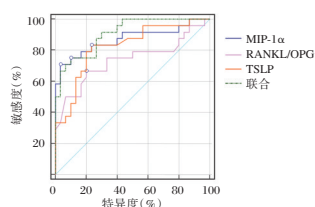


图1 龈沟液中RANKL/OPG、MIP-1 α 、TSLP水平对牙周病的诊断价值

Figure 1 Expression of RANKL / OPG and MIP-1 in gingival crevicular fluid α 、Diagnostic value of TSLP level in periodontal disease

加重牙周组织损伤程度,降低新骨形成能力,增加骨吸收活性,从而表现为RANKL/OPG升高。另外,因两组龈沟液中RANKL/OPG于正畸治疗3个月后达到最高峰,故选择此时间点分析上述指标对牙周病的诊断价值,结果显示,当截断值设定为0.87时,正畸治疗3个月后龈沟液中RANKL/OPG单一诊断牙周病的敏感度为80.00%,提示龈沟液中RANKL/OPG具有成为诊断牙周病的敏感指标。

MIP-1 α 是炎症介质之一,可趋化单核巨噬细胞、T淋巴细胞、树突状细胞及自然杀伤细胞,并可穿透血管内皮细胞,结合特异性受体,刺激炎症因子产生,发挥促炎作用^[11]。TSLP为一类白介素17样因子,主要衍生于上皮细胞,通过TSLP受体,可刺激树突状细胞表达,调控促炎因子水平,促使Th细胞亚群分化^[12]。本研究通过对比研究可知,牙周病患者正畸治疗1个月、3个月后龈沟液中MIP-1 α 、TSLP水平均高于正常正畸治疗患者,结合黄怀荣等^[13]、林浩^[14]研究推测这可能是由于正畸治疗可引起牙周病原菌大量堆积,刺激牙龈上皮细胞、成纤维细胞及炎症期牙龈中肥大细胞,从而造成MIP-1 α 、TSLP异常分泌,间接诱导CD4⁺T细胞前体转化,促进白三烯、花生四烯酸、白介素等炎症因子释放,进而介导牙周炎性免疫反应。PLI、GI是评估牙周炎病情程度的重要牙周临床指标^[15]。本研究结果显示,正畸治疗3个月后龈沟液中MIP-1 α 、TSLP与牙周病患者PLI、GI均存在正相关关系,佐证了龈沟液中MIP-1 α 、TSLP对判断牙周病炎症程度亦具有一定价值。然而正畸治疗3个月后龈沟液中MIP-1 α 、TSLP单一诊断牙周病敏感度较低,存在一定局限性,故本研究通过绘制联合曲线发现,正畸治疗3个月后龈沟液中RANKL/OPG、MIP-1 α 、TSLP联合诊断牙周病AUC>0.900。提示共同检

测龈沟液中RANKL/OPG、MIP-1 α 、TSLP有望为牙周病提供一种有效诊断手段,可帮助临床医生合理调整治疗策略。

综上所述,龈沟液中RANKL/OPG、MIP-1 α 、TSLP联合可为临床诊断口腔正畸治疗中牙周病提供科学指导。但本研究样本量小,且受年龄、力的作用点等因素影响,不用个体龈沟液中细胞因子水平差较大,研究结果可能存在一定偏移,今后需扩大样本量,开展分子生物学及动物体内研究,进一步论证本研究结果。

参考文献

- [1] 宋生璋,程楚昕,阎转君.老年口腔正畸感染者病原学分布及相关影响因素分析[J].实用老年医学,2020,34(3):266-269.
- [2] 白玲,李松.力学刺激对体外软骨细胞的生长与重构影响研究进展[J].中华生物医学工程杂志,2016,22(2):168-171.
- [3] 姜昱,李怀奇.口腔医院儿童就诊原因及其家长对子女早期错(牙合)畸形认知情况调查[J].华南预防医学,2019,45(6):579-581.
- [4] 林嘉旭,张汝弘,张健娜,等.不同正畸治疗措施对错颌畸形患者龈沟液趋化因子CX3CL1、RANKL/OPG水平的影响[J].上海口腔医学,2021,30(1):85-88.
- [5] Yang JY, Zhang J, Lu R, et al. Tcell-derived exosomes induced macrophage inflammatory protein-1 α / β drive the trafficking of CD8⁺T cells in oral lichen planus[J]. J Cell Mol Med, 2020,24(23):14086-14098.
- [6] 王丹丹,刘宝,唐光俊,等.上皮来源胸腺基质淋巴细胞生成素(TSLP)在过敏性疾病中的研究进展[J].细胞与分子免疫学杂志,2020,36(9):849-857.
- [7] 张丹丹.正畸治疗中、重度慢性牙周炎的临床初步研究[D].杭州:浙江大学,2014:1-78.
- [8] Ge N, Peng J, Yu L, et al. Orthodontic treatment induces Th17/Treg cells to regulate tooth movement in rats with periodontitis[J]. Iran J Basic Med Sci, 2020,23(10):1315-1322.
- [9] 黄俊红,蒋东辉,王俐洁,等.IL-17和RANKL、OPG蛋白在牙周炎正畸大鼠牙周组织中的表达及其意义[J].中国实验诊断学,2020,24(9):1549-1552.
- [10] 张瑞林,孙瑶.正畸牙槽骨改建中RANKL/OPG表达动态变化特征及牙周组织细胞凋亡观察[J].口腔医学,2019,39(6):488-493.
- [11] Zhai T, Wu X, Zhang N, et al. Inflammatory risk factors for hypertriglyceridemia in patients with severe influenza[J]. J Int Med Res, 2020,48(8):300060520918058.
- [12] Gauvreau GM, Sehmi R, Ambrose CS, et al. Thymic stromal lymphopoietin: its role and potential as a therapeutic target in asthma[J]. Exp Opin Ther Targets, 2020,24(8):777-792.

(下转第1760页)

基于生物信息学分析 *ESPL1* 基因在肺腺癌中表达与突变的临床意义

柳家翠¹ 黄奔¹ 程庆元¹ 蔡伟国² 段怡平¹ 陈梁玥¹ 马甜甜¹ 朱翠雯¹ 喻明霞^{1*}

[摘要] 目的 研究 *ESPL1* 在肺腺癌中的表达及突变情况,探索 *ESPL1* 在肺腺癌中的预后价值及生物学功能。方法 TCGA 数据库中下载并整理肺腺癌中 *ESPL1* 基因表达数据及患者的临床病理信息,比较 *ESPL1* 在肺腺癌与正常组织中的表达差异。通过 cBioportal 分析 *ESPL1* 基因突变率及突变患者的预后情况。Kaplan-Meier 法分析 *ESPL1* 表达对患者预后的影响并利用 GEPIA 与 Kaplan Meier-plotter 在线工具对此进行验证。通过 COX 回归分析 *ESPL1* 表达与肺腺癌患者临床预后相关性,用 STRING 数据库探索与 *ESPL1* 共表达的蛋白互作网络。利用 GSEA 富集分析预测 *ESPL1* 在肺腺癌中参与的分子通路。结果 *ESPL1* 表达在肺腺癌中显著上调($P<0.05$),*ESPL1* 在 TCGA 数据库样本中突变率为 1.6%且突变组患者生存率显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。*ESPL1* 高表达组患者的总体生存率低于低表达组,差异有统计学意义($P<0.05$)。*ESPL1* 的表达水平与 stage 分期及远处转移显著相关($P<0.05$),是肺腺癌预后的独立危险因素($HR=1.122$, 95%CI: 1.014~1.241, $P<0.05$)。富集分析结果显示 *ESPL1* 主要富集在细胞周期、碱基切除修复及 Wnt 信号通路等。结论 *ESPL1* 在肺腺癌患者中高表达并具有一定突变率,可参与多种信号通路促进肺腺癌的发生发展并影响其预后,*ESPL1* 有望成为评价肺腺癌预后及治疗靶点。

[关键词] *ESPL1*; 肺腺癌; TCGA; 预后; 临床意义

Clinical significance of *ESPL1* gene expression and mutation in lung adenocarcinoma based on bioinformatics analysis

LIU Jiacyi¹, HUANG Ben¹, Cheng Qingyuan¹, CAI Weiguo², DUAN Yiping¹, CHEN Liangyue¹, MA Tiantian¹, ZHU Cuiwen¹, YU Mingxia^{1*}

(1. Gene Diagnosis Center, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan, Hubei, China, 430071;

2. Department of Radiology, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan, Hubei, China, 430071)

[ABSTRACT] **Objective** To study the expression and mutation of *ESPL1* and explore the prognostic value and biological function of *ESPL1* in lung adenocarcinoma. **Methods** *ESPL1* expression profile and clinicopathological data of lung adenocarcinoma patients were downloaded from the TCGA database. The expression differences between the cancer group and the normal control group were compared. *ESPL1* mutation rate and the prognosis of mutant patients were analyzed by cBioportal. Kaplan-Meier method was used to perform survival analysis, GEPIA and Kaplan Meier-plotter online tools were used to verify the prognostic value. COX regression was used to analyze the correlation between *ESPL1* expression and the clinical prognosis of patients with lung adenocarcinoma, and the STRING database was used to explore the protein interaction

基金项目:国家自然科学基金(81472033、30901308),湖北省卫生健康科研基金资助(WJ2019M203),武汉市应用基础研究(2017060201010171),湖北省卫生和计划生育委员会联合基金项目(WJ2018H0028),湖北省卫生和计划生育委员会青年人才项目(WJ2015Q021),武汉大学中南医院科技创新培育基金(cxy2018031、cxy20160054),武汉大学大学生创新项目(MS2017045、S2018301747)

作者单位:1. 武汉大学中南医院基因诊断中心,湖北,武汉 430071

2. 武汉大学中南医院影像科,湖北,武汉 430071

*通信作者:喻明霞, E-mail: dewrosy520@163.com

network co-expressed with *ESPL1*. GSEA enrichment analysis was used to predict the molecular pathway involved in *ESPL1* in lung adenocarcinoma. **Results** The expression level of *ESPL1* in the lung adenocarcinoma group was higher than that in the normal control group ($P<0.05$). The mutation rate of *ESPL1* in the TCGA database samples was 1.6% and the survival rate of patients in the mutation group was significantly reduced ($P<0.05$). The overall survival rate of *ESPL1* in the *ESPL1* high expression group was lower than that in the low expression group. The expression level of *ESPL1* was significantly related to TNM stage and distant metastasis ($P<0.05$). *ESPL1* was an independent risk factor for the prognosis of lung adenocarcinoma (HR=1.122, 95% CI: 1.014-1.241, $P<0.05$). The GSEA enrichment analysis results indicated that *ESPL1* was mainly enriched in cell cycle, base excision repair and Wnt signaling pathway. **Conclusion** *ESPL1* is highly expressed in patients with lung adenocarcinoma and has a certain mutation rate. It can participate in a variety of signaling pathways to promote the occurrence and development of lung adenocarcinoma and affect its prognosis. *ESPL1* is expected to be a target for evaluating the prognosis and treatment of lung adenocarcinoma.

[KEY WORDS] *ESPL1*; Lung adenocarcinoma; TCGA; Prognosis; Clinical significance

肺腺癌(Lung adenocarcinoma, LUAD)是肺癌主要的组织学类型^[1]。肺癌患者五年生存率仅为15%,尽管治疗取得一定进展,但生存率仅小幅提升^[2]。因此,深入认识肺癌分子发病机制,寻求有效的新型标志物进行分子靶向治疗,对改善肺癌患者的总体生存期具有重要意义。外纺锤体极样蛋白1(Extra spindle poles-like 1 protein, *ESPL1*)具有半胱氨酸型内肽酶活性,其编码的分离酶在染色体分离和细胞分裂过程中发挥重要作用^[3]。分离酶的功能是在有丝分裂后期开始时裂解黏附素,从而释放黏附的姐妹染色单体。分离酶还参与DNA损伤修复、膜运输等多种基本生物功能^[4]。*ESPL1*表达受到严格调控以确保许多重要细胞生物学活动的正常运行。由于其在细胞周期和DNA损伤修复中的重要性,*ESPL1*的表达异常或突变极可能与恶性肿瘤的发生发展有关。研究发现,*ESPL1*在乳腺癌^[5]、前列腺癌^[6]、子宫内膜癌^[7]等肿瘤中异常表达,并影响患者预后。但是该分子在肺腺癌中的表达与临床相关性还未有讨论。因此,本研究利用癌症基因组图谱(The Cancer Genome Atlas, TCGA)数据库中的肺腺癌样本数据,探索*ESPL1*在肺腺癌中的表达、突变及预后价值,并预测*ESPL1*在肺腺癌发生发展中的分子作用机制。

1 材料与方法

1.1 原始数据的下载及预处理

检索并下载来自TCGA官网(<https://portal.gdc.cancer.gov/>)的肺腺癌(LUAD)的表达谱数据(535例肿瘤组织样本,59例正常组织样本)及相应临床信息。使用Strawberry Perl 5.30.1软件将原始

基因表达谱数据整理成基因表达矩阵文件并整理肺腺癌患者临床资料。

1.2 *ESPL1*表达、突变与患者临床病理特征及预后的相关性分析

通过R 4.0.2软件中“limma”包、“beeswarm”包提取*ESPL1*在肺腺癌组织样本和正常肺组织样本中的表达量数据并分析比较两组的表达差异;以*ESPL1*在肺腺癌患者中表达值中位数为界进一步将肿瘤组样本分为高、低表达水平两组。使用IBM SPSS Statistics 25.0软件对*ESPL1*表达与临床病理特征之间的相关性进行卡方检验。利用R 4.0.2软件“survival”包分析两组之间总体生存率(overall survival, OS)的差异;根据下载整理的临床病理信息,结合*ESPL1*表达量,研究*ESPL1*与年龄、性别、TNM分期等临床相关性。通过单因素和多因素COX回归分析判断*ESPL1*在肺腺癌中预后价值。通过cBioportal在线软件分析*ESPL1*在TCGA数据库中的突变情况以及突变患者的生存率。

1.3 在线工具验证*ESPL1*在肺腺癌预后情况

使用GEPIA在线数据库(<http://gepia.cancer-pku.cn/>)、Kaplan Meier-plotter在线数据库(<https://kmplot.com/analysis/>)分析*ESPL1*在肺腺癌中的表达与OS的关系,详细参数设置如下:①GEPIA数据库, Gene: “*ESPL1*”; Methods: “Overall survival”; Group Cutoff: “Median”; Dataset: “LUAD”,其他为数据库默认条件;②Kaplan Meier-plotter数据库, Gene symbol: “*ESPL1*”; Survival: “OS”; Probe set options: “only JetSet best probe set”; COX regression: “multivariate”;其他条件选择数据库默认条件。

1.4 蛋白互作网络的构建与基因富集分析

使用检索相互作用基因数据库 (STRING 11.0, <https://string-db.org/>) 搜索工具在蛋白质水平上分析共表达基因之间的潜在交互作用, 筛选条件为: 中等置信分数 > 0.95。利用 Cytoscape 软件 (3.6.0 版, <https://cytoscape.org/>) 对蛋白质相互作用 (Protein-Protein Interaction, PPI) 网络进行可视化。使用 GSEA 4.0.3 软件对 *ESPL1* 进行基因富集分析。以 Molecular Signature Database (MsigDB) 数据库中的 c2.cp.kegg.v7.0.symbols.gmt 数据集作为功能基因集进行富集分析。将 *ESPL1* 的表达水平分为高、低表达两组。采用缺省加权富集统计的方法, 随机组合次数设 1 000 次, 其他参数设为默认值。

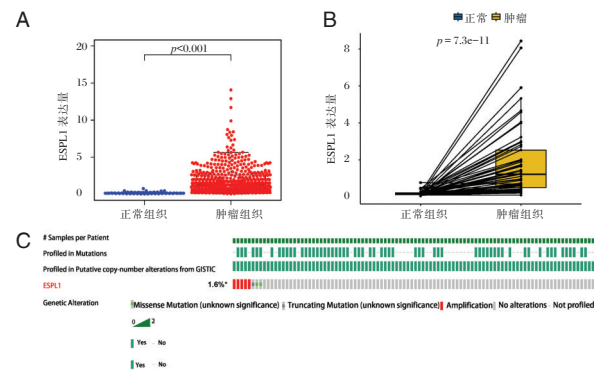
1.5 统计学分析

采用 SPSS 25.0 软件进行数据分析, 计数资料以 $n(\%)$ 表示, 行 χ^2 检验; Wilcoxon 秩和检验, 使用 Excel 将肺腺癌患者年龄、性别、TNM 分期等临床信息进行量化赋值, 采用单因素和多因素分析采用 COX 比例风险回归模型, 生存分析采用 KM 法, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 *ESPL1* 表达差异与突变分析

在肺腺癌组织中, *ESPL1* 表达水平高于正常肺组织, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 1A-B。cBioportal 网站分析结果显示, TCGA 数据库的 516 个肿瘤样本中有 8 个发生了 *ESPL1* 突变, 突变率为 1.6%。见图 1C。



注: TCGA-LUAD 数据集中, *ESPL1* 在肺正常组织和肺腺癌组织中 (A) 以及 57 对配对的肺癌组织和癌旁组织中 (B) 表达差异比较; C 为 cBioportal 网站分析 *ESPL1* 基因突变率结果。

图 1 *ESPL1* 在肺腺癌组织及正常肺组织中的表达差异分析及突变情况

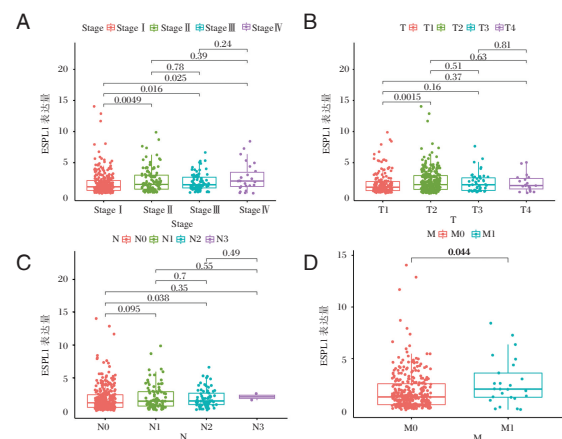
Figure 1 Expression and mutation rate of *ESPL1* in lung adenocarcinoma and normal lung tissues

2.2 *ESPL1* 表达与临床病理特征及预后相关性分析

ESPL1 表达水平与性别和远处转移具有相关性, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。Stage 分期 II、III、IV 期与 I 期相比, 均高表达 *ESPL1*, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$) 见图 2A, 发生远处转移患者组 *ESPL1* 表达量显著高于未发生远处转移组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 2D。

表 1 *ESPL1* 与肺腺癌患者临床病理特征的相关性分析 [$n(\%)$]

临床特征	占比	<i>ESPL1</i>		χ^2 值	P 值
		高表达	低表达		
年龄	≤65	241 (46.17)	126	103	0.086 0.769
	>65	262 (50.19)	111	136	
	未知	19 (3.64)			
性别	男性	242 (46.36)	130	89	14.862 0.000
	女性	280 (53.64)	107	150	
临床分期	I + II	403 (77.20)	177	189	2.307 0.129
	III + IV	111 (21.27)	58	44	
	未知	8 (1.53)	2	6	
原发肿瘤分期	T ₁ +T ₂	453 (86.78)	205	208	0.086 0.769
	T ₃ +T ₄	66 (12.64)	31	29	
	未知	3 (0.58)	1	2	
淋巴结转移分期	N ₀ +N ₁	433 (82.95)	196	201	1.480 0.224
	N ₂ +N ₃	77 (14.75)	39	29	
	未知	12 (2.30)	2	9	
远处转移	M0	353 (67.62)	151	162	3.897 0.048
	M1	25 (4.79)	16	7	
	未知	144 (27.59)	70	70	



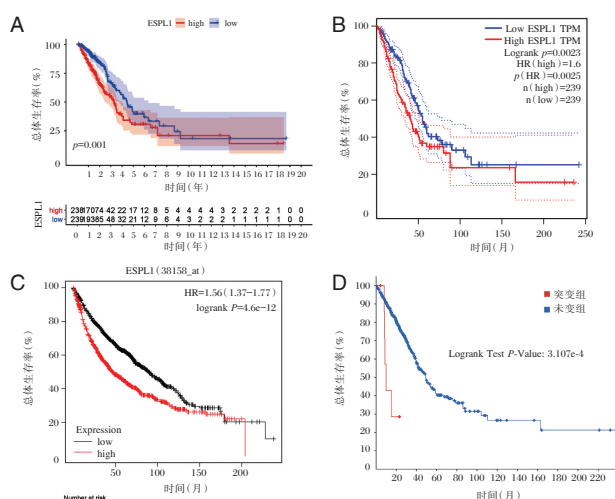
注: A-D 为 stage 分期、T 分期、N 分期、M 分期与 *ESPL1* 表达量相关性分析。

图 2 *ESPL1* 表达量与肺腺癌患者临床病理特征相关性分析
Figure 2 Correlation analysis between *ESPL1* expression and clinicopathological characteristics of patients with lung adenocarcinoma

2.3 *ESPL1* 表达、突变与肺腺癌患者预后的关系

TCGA-LUAD 数据集中, *ESPL1* 高表达与肺

腺癌患者不良预后有关,差异有统计学意义($P<0.05$),见图3A。GEPIA数据库结果显示,*ESPL1*高表达组具有不良预后,差异有统计学意义($HR=1.6$, $P<0.05$),见图3B; Kaplan Meier-plotter数据库分析结果同样显示高表达*ESPL1*组肺腺癌患者OS较差($HR=1.56$, 95% CI : 1.37~1.77, $P<0.05$),见图3C; cBioportal分析结果显示发生*ESPL1*基因突变组生存率较低,差异有统计学意义($P<0.05$)。见图3D。



注: *ESPL1* 表达生存差异分析(A TCGA; B GEPIA; C Kaplan Meier-plotter); *ESPL1* 突变生存分析(D cBioportal)。

图3 *ESPL1* 在肺腺癌中的预后作用

Figure 3 Prognosis of *ESPL1* in lung adenocarcinoma

2.4 单因素和多因素 COX 回归分析

stage 分期($HR=1.473$, 95% CI : 1.196-1.814, $P<0.05$)和*ESPL1*表达($HR=1.122$, 95% CI : 1.014~1.241, $P<0.05$)可以作为肺腺癌的独立预后因素。见表2。

表2 单因素和多因素 COX 回归分析

Table 2 Univariate and multivariate COX regression analysis

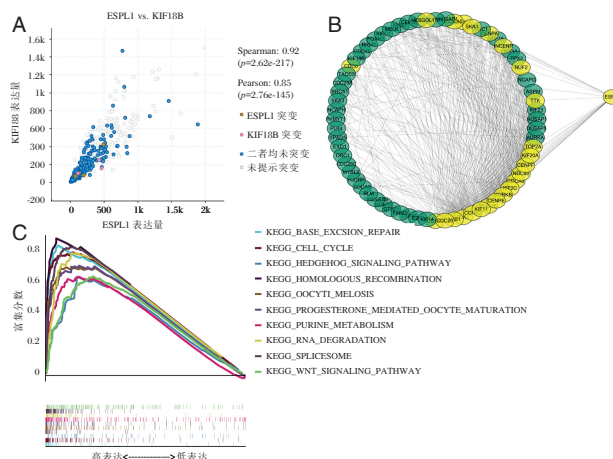
因素	单变量分析			多变量分析		
	HR	95%CI	P值	HR	95%CI	P值
年龄	1.000	0.981~1.019	0.987			
性别	0.984	0.686~1.412	0.930			
stage 分期	1.637	1.389~1.929	<0.001 ^a	1.473	1.196~1.814	<0.001 ^a
T 分期	1.588	1.278~1.974	<0.001 ^a	1.148	0.932~1.415	0.195
M 分期	1.698	0.933~3.091	0.083			
N 分期	1.772	1.446~2.172	<0.001 ^a	1.162	0.917~1.473	0.213
<i>ESPL1</i>	1.144	1.024~1.280	0.017 ^a	1.122	1.014~1.241	0.025 ^a

注:^a $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2.5 PPI 网络构建与 GSEA 富集分析

共表达基因预测结果显示 *KIF18B* 是与*ESPL1*相关性最强的基因(spearman 相关系数为0.92, $P<$

0.05),见图4A,与*ESPL1*共表达基因的蛋白互作网络,见图4B。GSEA结果显示*ESPL1*主要富集在细胞周期、卵母细胞减数分裂、碱基切除修复以及Wnt信号通路等。见图4C。



注: A为*ESPL1*与*KIF18B*的相关性分析; B为*ESPL1*相关的PPI网络构建,黄色节点表示与*ESPL1*节点直接相邻; C为*ESPL1*多GSEA功能富集分析。

图4 *ESPL1* 的PPI网络构建及GSEA功能富集分析

Figure 4 PPI network construction of *ESPL1* and GSEA functional enrichment analysis

3 讨论

染色体结构和数目的正常是细胞正常存活和维持细胞后代遗传稳定性必不可少的基本条件。研究表明^[8],染色体的错误分离会导致DNA损伤以及非整倍体的产生而这些改变将会导致包括恶性肿瘤在内的多种人类疾病的发生。而*ESPL1*基因表达的分离酶就是一种在细胞有丝分裂中促使姐妹染色单体分离从而防止染色体发生内聚的酶,目前研究较多并且与*ESPL1*具有显著相关性的*KIF18B*是驱动蛋白8家族的成员,与微管运动有关,和*ESPL1*一样在细胞有丝分裂中发挥重要作用^[9]。研究发现在特异性诱导乳腺高表达*ESPL1*的转基因小鼠^[10-11]中发生了乳腺肿瘤并且导致了非整倍体的产生。Mukherjee^[12]与Shepard^[13]等人发现了在斑马鱼和小鼠的早期致死胚胎存在*ESPL1*的纯合缺失,说明*ESPL1*的基因突变可能对机体产生致死性严重影响。由*ESPL1*在细胞周期以及DNA损伤修复中的重要作用来看,研究其在肺腺癌肿瘤病人的表达以及突变情况,为深入了解患者发病机制以及寻找相应治疗靶点具有十分重要意义。

本研究结合多种生物信息学方法分析发现, *ESPL1* 在肺腺癌的发生发展中扮演了重要角色。研究表明,发现肿瘤发生发展的特定抑制途径或分子靶点是阻滞肿瘤进展以及减轻副作用的最具前景方法^[14]。*ESPL1* 有潜力成为肿瘤治疗中具有吸引力的分子靶点。目前,分离酶在多种肿瘤中过表达并参与肿瘤相关调控通路,比如,据报道约四分之一过度表达分离酶的乳腺癌是 p53 功能改变的 Luminal-B 亚型^[15]。因此,抑制分离酶活性的药物等抑制剂可为肿瘤治疗提供新思路。另外, Zhang 等^[16]已经筛选出 Sepin-1 作为分离酶靶点, Sepin-1 能够抑制三阴性乳腺癌异种移植瘤生长,并且 Sepin-1 的敏感性与肿瘤中 *ESPL1* 表达水平呈正相关。由此,可以通过检测 *ESPL1* 在肿瘤病人的表达量并进行表达和突变分析,以作为是否满足使用分子抑制剂的使用条件,从而实现对患者个体化治疗。

综上所述,*ESPL1* 在肺腺癌中表达明显上调,且具有一定突变率。该基因的过表达与突变均与肺腺癌患者的恶性进展及不良预后有关。*ESPL1* 有望成为肿瘤治疗的新型分子标志物。

参考文献

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2018,68(6):394-424.
- [2] 李华芳. 非小细胞肺癌患者 ALK、ROS1 及 BRAF-V600E 基因突变与临床特征的相关性[J]. 分子诊断与治疗, 2020,12(6):701-704.
- [3] Zhang N, Pati D. Biology and insights into the role of cohesin protease separase in human malignancies [J]. Biol Rev Camb Philos Soc, 2017,92(4):2070-2083.
- [4] Bacac M, Fusco C, Planche A, et al. Securin and separase modulate membrane traffic by affecting endosomal acidification [J]. Traffic, 2011,12(5):615-626.
- [5] Buechler SA, Gray KP, Gökmen-Polar Y, et al. Independent Validation of EarlyR Gene Signature in BIG 1-98: A Randomized, Double-Blind, Phase III Trial Comparing Letrozole and Tamoxifen as Adjuvant Endocrine Therapy for Postmenopausal Women With Hormone Receptor-Positive, Early Breast Cancer [J]. JNCI Cancer Spectr, 2019(3):pkz051.
- [6] Wang Y, Yang Z. A Gleason score-related outcome model for human prostate cancer: a comprehensive study based on weighted gene co-expression network analysis [J]. Cancer Cell Int, 2020,20:159.
- [7] Liu J, Wan Y, Li S, et al. Identification of aberrantly methylated differentially expressed genes and associated pathways in endometrial cancer using integrated bioinformatic analysis [J]. Cancer Med, 2020,9(10):3522-3536.
- [8] Kou F, Wu L, Ren X, et al. Chromosome Abnormalities: New Insights into Their Clinical Significance in Cancer [J]. Mol Ther Oncolytics, 2020,17:562-570.
- [9] Liu Q, Zhang X, Tang H, et al. Bioinformatics Analysis Suggests the Combined Expression of AURKB and KIF18B Being an Important Event in the Development of Clear Cell Renal Cell Carcinoma [J]. Pathol Oncol Res, 2020,26(3):1583-1594.
- [10] Zhang N, Ge G, Meyer R, et al. Overexpression of Separase induces aneuploidy and mammary tumorigenesis [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008,105(35):13033-13038.
- [11] Mukherjee M, Ge G, Zhang N, et al. MMTV-*Espl1* transgenic mice develop aneuploid, estrogen receptor alpha (ER α)-positive mammary adenocarcinomas [J]. Oncogene, 2014,33(48):5511-5522.
- [12] Shepard JL, Amatruda JF, Finkelstein D, et al. A mutation in separase causes genome instability and increased susceptibility to epithelial cancer [J]. Genes Dev, 2007,21(1):55-59.
- [13] Kumada K, Yao R, Kawaguchi T, et al. The selective continued linkage of centromeres from mitosis to interphase in the absence of mammalian separase [J]. J Cell Biol, 2006,172(6):835-846.
- [14] 李慧, 李朝锋. 非小细胞肺癌靶向治疗现状及未来展望 [J]. 当代医学, 2020,26(19):191-194.
- [15] Dawood S, Hu R, Homes MD, et al. Defining breast cancer prognosis based on molecular phenotypes: results from a large cohort study [J]. Breast Cancer Res Treat, 2011,126(1):185-192.
- [16] Zhang N, Scorsone K, Ge G, et al. Identification and Characterization of Separase Inhibitors (Sepins) for Cancer Therapy [J]. J Biomol Screen, 2014,19(6):878-889.

(上接第 1755 页)

- [13] 黄怀荣, 胡凡荣. 龈沟液巨噬细胞炎症蛋白-1 α 及肿瘤坏死因子- α 与慢性牙周炎病情及疗效的关系 [J]. 实用临床医药杂志, 2017,21(17):42-44.
- [14] 林浩. 正畸固定矫治患者龈沟液中 TSLP 和 IL-33 浓度的变化与牙周炎症的关系 [J]. 实用口腔医学杂志, 2019,35(4):583-586.
- [15] 颜孟雄, 黄婧, 杨再波. 慢性牙周炎龈沟液 IL-10、IL-23、MCP-1 与牙周指数的相关性分析 [J]. 分子诊断与治疗杂志, 2021,13(2):255-258.

CEA、CA153、CA125与乳腺癌临床病理因素的关系

秦燕* 陈英 陈雷

【摘要】目的 研究乳头溢液中癌胚抗原(CEA)、糖类抗原125(CA125)和糖类抗原153(CA153)在乳腺癌中的表达及意义。**方法** 电化学发光法检测日照市人民医院2014年1月至2019年12月间43例乳腺导管癌患者乳头溢液CEA、CA153、CA125水平,与136例乳腺良性病变对照,分析CEA、CA153、CA125水平与乳腺癌临床病理因素的关系。免疫组化Ultra Sensitive™ S-P法检测乳腺切除组织ER、PR、Her-2/neu、VEGF和Ki-67。**结果** 乳腺癌患者乳头溢液及血清中CEA、CA153、CA125的含量明显高于良性病变组,差异有统计学意义($P<0.05$),乳腺癌组乳头溢液CEA、CA153、CA125水平高于血清水平,差异有统计学意义($P<0.05$);乳腺癌观察组不同的组织学分级、淋巴结转移、肿瘤复发、HER-2/neu表达、VEGF和Ki-67指数中患者乳头溢液中CEA、CA153、CA125水平比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。而不同BMI、ER&PR、患病年龄、肿瘤大小中乳头溢液CEA、CA153、CA125水平比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 乳头溢液CEA、CA153、CA125检测增加了一种潜在的检查途径,和血清中CEA、CA153、CA125肿瘤标志物常规动态检测有助于乳腺癌判断预后,指导监测肿瘤复发转移。

【关键词】 乳腺癌;乳头溢液;血清;癌胚抗原;糖类抗原125;糖类抗原153

Relationship between nipple discharge and serum markers of carcinoembryonic antigen, cancer antigens 125 and cancer antigens 153 levels and clinicopathological factors of breast cancer

QIN Yan*, CHEN Ying, CHEN Lei

(Department of laboratory, Rizhao people's Hospital Affiliated to Jining Medical College, Rizhao, Shandong, China, 276826)

【ABSTRACT】 Objective To study the expression and significance of carcinoembryonic antigen (CEA), carbohydrate antigen 125 (CA125) and carbohydrate antigen 153 (CA153) in nipple discharge in breast cancer. **Methods** The levels of CEA, CA153 and CA125 were detected by Electrochemiluminescence in 43 cases of ductal carcinoma of breast and 136 cases of benign breast lesions between January 2014 and December of 2019 in Rizhao People's Hospital, and the relationship between nipple discharge CEA, CA153 and CA125 levels and their clinicopathological factors in 43 cases of breast ductal carcinoma of Immunohistochemical Ultra Sensitive™ S-P method was employed to detect the expression of ER, PR, Her-2/neu and Ki-67 in 43 cases of breast invasive carcinoma. **Results** Our results indicate that the CEA, CA153 and CA125 levels of nipple discharge and serum in breast cancer patients were significantly higher than those in benign lesions, the difference was statistically significant ($P<0.05$). The levels of CEA, CA153 and CA125 in nipple discharge of breast cancer group were higher than those in serum, the difference was statistically significant ($P<0.05$). Comparison of the levels of CEA, CA153, and CA125 in the nipple discharge of patients with different histological grades, lymph node metastasis, tumor recurrence, HER-2/neu expression, VEGF and Ki-67 index in the breast

基金项目:济宁医学院教师科研扶持基金(JYFC2018FKJ055)

作者单位:济宁医学院附属日照市人民医院检验科,山东,日照276826

*通信作者:秦燕, E-mail: tongshuoshuo@163.com

cancer observation group, the difference was statistically significant ($P<0.05$). There was no statistically significant difference in the levels of CEA, CA153, and CA125 in nipple discharge in different BMI, ER&PR, age of disease, and tumor size ($P>0.05$). **Conclusion** The detection of CEA, CA153 and CA125 in nipple discharge has increased a potential way of examination, and routine dynamic detection of serum CEA, CA153 and CA125 tumor markers can help breast cancer to predict prognosis and guide the monitoring of tumor recurrence and metastasis.

[KEY WORDS] Breast cancer; Nipple discharge; Serum; carcinoembryonic antigen; Cancer antigens 125; Cancer antigens 153

乳腺癌长期以来是全球范围内最常见的恶性肿瘤之一,全球癌症研究数据显示乳腺癌发生率和死亡率分别位于女性恶性肿瘤首位和第二位^[1],近年来我国乳腺癌发病率和增长速度高于世界平均水平,且发病高峰年龄提前,年龄、地域等因素的差异性模糊,是社会急需解决的公共卫生问题。乳腺癌也是系统性全身性疾病^[2],血清生物标志物癌胚抗原(Carcinoembryonic antigen, CEA)、糖类抗原 125(Cancer antigens 125, CA125)和糖类抗原(Cancer antigens 153, CA153)对乳腺癌诊断、随访和预后评估有一定价值,乳头溢液有肿瘤细胞分泌物,CEA、CA153 和 CA125 能否反映肿瘤负荷研究甚少,本课题对乳头溢液中 CEA、CA153 和 CA125 在乳腺癌中的表达水平及与临床病理因素的关系进行了探索,以期发现新的肿瘤标志物检测途径,对乳腺癌预后判断和随访有所帮助。

1 资料与方法

1.1 一般资料

分析 2014 年 1 月至 2019 年 12 月间日照市人民医院 43 例乳腺导管癌(观察组)、136 例导管内乳头状瘤良性病变(对照组)患者血清或乳头溢液 CEA、CA153 和 CA125 水平。乳腺导管癌年龄 24~68 岁,平均(42.3±8.9)岁;导管内乳头状瘤患者年龄 22~64 岁,平均(45.6±7.6)岁,两组人群年龄比较,差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。纳入标准:患者检验、临床和病理因素齐全,包括发病年龄、肿瘤大小、BMI、组织学分级、TNM 分期、肿瘤复发及雌激素受体(Estrogen receptor, ER)、孕激素受体(Progesterone receptor, PR)、人类表皮生长因子受体(Human epidermal growth factor receptor, Her-2/neu)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和细胞核增值指数 Ki-67 等;乳腺导管癌和导管内

乳头状瘤符合 WHO 诊断标准^[2-3];两组患者术前六个月内均未接受任何治疗包括过放、化疗及内分泌治疗。排除标准:乳腺患者临床资料不全,或同时患有泌乳素垂体腺瘤等其他肿瘤乳汁分泌者或术前六个月内曾接受过放、化疗及内分泌治疗。研究经病人及家属知情同意,研究经院医学伦理委员会批准同意。

1.2 研究方法

比较乳腺癌观察组与良性对照组患者血清或乳头溢液 CEA、CA153 和 CA125 水平差异,分析 CEA、CA153 和 CA125 水平与临床病理因素的关系。

1.2.1 血清和乳头分泌物的生物标志物测定

采集 3 mL 肝素抗凝血和 0.5 mL 乳头溢液,采用电化学发光法分别进行血清和乳头分泌物 CEA、CA153 和 CA125 生物标志物检测,研究前取 30 例正常妊娠女性乳汁做预实验对照,正常妊娠女性年龄 22~38 岁。结合本实验室标准,血清中 CEA、CA153 和 CA125 的截断值分别为 3.40 ng/mL、25.00 U/mL 和 35.00 U/mL,乳头溢液为 9.80 ng/mL、35.00 U/mL 和 40.00 U/mL。

1.2.2 免疫组织化学

免疫组化 Ultra Sensitive™ S-P 法检测乳腺切除组织 ER、PR、Her-2/neu、VEGF 和 Ki-67,组织样本固定在 10% 中性福尔马林缓冲液中。常规 3~4 μm 切片,组织切片脱蜡并用标准程序方法包埋制片,设阳性、阴性对照,免疫反应信号用 DAB 底物显示,DAB 底物染色呈黄色。HER-2/neu 细胞膜阳性。肿瘤 10% 以上的癌细胞 HER-2/neu 表达被认为是 HER-2/neu 阳性^[2-4]。此外,对于 ER、PR 和 Ki-67 核阳性,记录细胞核阳性癌细胞百分率。所有在 200× 计数,取平均值。肿瘤 ER 和 PR 阳性表达率 >10% 评价为阳性^[2-3, 5],Ki-67 以 14%^[2-3] 为界限分为两组;VEGF 分为阳性组(大于

25%肿瘤细胞阳性)和阴性组(不足25%肿瘤细胞阳性)。

1.3 统计学处理

采用SPSS 20.0统计软件对数据进行分析;计量资料采用($\bar{x} \pm s$)表达,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 良恶性病变中乳头溢液及血清CEA、CA153、CA125水平比较

乳腺癌患者乳头溢液及血清中CEA、CA153、CA125的含量明显高于良性病变组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图1;乳腺癌组乳头溢液CEA、CA153、CA125水平高于血清水平,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图2。

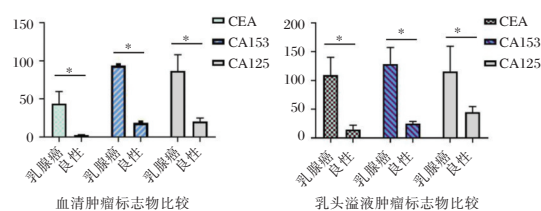


图1 乳腺癌与良性组血清及乳头溢液肿瘤标志物水平比较

Figure 1 Comparison of serum and nipple discharge tumor markers in breast cancer and benign group

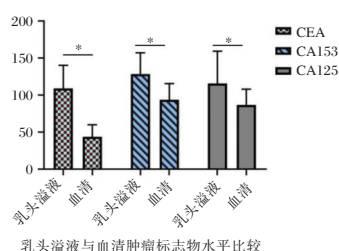


图2 乳腺癌患者乳头溢液与血清肿瘤标志物水平比较

Figure 2 Comparison of nipple discharge and serum tumor markers in breast cancer patients

2.2 乳腺癌观察组不同临床病理因素组中乳头溢液CEA、CA153、CA125水平比较

乳腺癌观察组不同的组织学分级、淋巴结转移、肿瘤复发、HER-2/neu表达、VEGF和Ki-67指数中患者乳头溢液中CEA、CA153、CA125水平比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。而不同BMI、ER&PR、患病年龄、肿瘤大小中乳头溢液CEA、CA153、CA125水平比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表1。

表1 乳腺癌观察组不同临床病理因素组中乳头溢液CEA、CA153、CA125水平比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of CEA, CA153 and CA125 levels in nipple discharge in different clinicopathological factors of

breast cancer ($\bar{x} \pm s$)				
组别	n	CEA (ng/mL)	CA153 (U/mL)	CA125 (U/mL)
肿瘤大小				
≤2 cm	27	106.65±21.37	116.48±27.23	112.98±26.58
>2 cm	16	110.01±30.03	122.37±23.28	115.46±29.98
t 值		0.428	0.722	0.282
P 值		0.671	0.474	0.779
患病年龄				
≥50 years	20	113.34±23.45	122.34±27.45	114.43±37.67
<50 years	23	121.54±23.45	123.65±22.77	105.59±22.43
t 值		1.144	0.170	0.949
P 值		0.259	0.866	0.348
组织学分级				
Ⅲ	16	193.34±53.23	345.57±76.09	165.31±67.76
Ⅱ	27	76.65±22.32	123.08±67.87	87.76±39.50
t 值		10.06	9.934	4.758
P 值		<0.001	<0.001	<0.001
淋巴结转移				
阳性	11	112.54±32.23	141.67±56.65	126.32±41.34
阴性	32	23.21±8.67	34.68±19.76	43.21±8.45
t 值		14.51	6.971	10.960
P 值		<0.001	<0.001	<0.001
远处转移				
阳性	9	167.45±57.87	421.12±109.98	189.98±76.61
阴性	34	111.01±64.23	112.64±29.78	146.43±34.64
t 值		2.388	14.790	2.529
P 值		0.022	<0.001	0.015
肿瘤复发				
阳性	7	178.87±65.46	176.32±105.25	189.62±98.78
阴性	36	81.34±13.56	134.26±43.32	123.34±56.67
t 值		8.432	2.065	3.050
P 值		<0.001	0.045	0.004
BMI				
<30 kg/m ²	22	121.12±31.12	124.56±23.32	117.01±42.75
≥30 kg/m ²	21	119.62±27.89	129.87±33.12	117.07±39.98
t 值		0.190	0.658	0.005
P 值		0.850	0.513	0.996
ER & PR				
阳性	31	112.21±32.13	132.12±28.32	117.78±25.67
阴性	12	129.12±27.65	143.68±39.67	132.31±30.32
t 值		0.751	1.070	1.583
P 值		0.457	0.291	0.121
HER2/neu				
阳性	9	119.34±19.65	159.99±38.56	129.89±31.12
阴性	34	89.62±26.34	129.87±22.34	101.01±23.54
t 值		3.149	3.055	3.057
P 值		0.003	0.004	0.004
VEGF				
阳性	36	129.67±31.21	152.43±41.23	127.76±22.78
阴性	7	89.44±19.34	109.98±29.98	98.73±29.78
t 值		3.271	2.583	2.436
P 值		0.002	0.014	0.005
Ki-67				
>14%	12	134.17±34.12	178.24±23.76	134.43±41.37
≤14%	31	72.12±22.23	128.29±24.29	89.21±32.28
t 值		4.284	4.388	2.476
P 值		0.001	0.000	0.024

3 讨论

乳腺癌的发病率在世界范围内呈逐年上升趋势^[1],严重影响女性健康,是社会急需解决的公共卫生问题。乳头溢液常见,占有乳腺病变相关症状的5%左右^[7-9]。大部分乳头溢液起源于乳腺大导管,常合并乳腺良性或恶性肿瘤。多数乳头溢液见于乳腺良性疾病,如导管内乳头状瘤,导管扩张,乳头状瘤病,乳腺炎,纤维囊性改变^[9-10],乳头溢液异常5%~21%见于乳腺癌^[7,11-12],大多数表现为孤立性导管病变,乳头溢液可见于早期乳腺癌如导管原位癌等疾病,导管原位癌导致的乳头溢液,一般是广泛性疾病,乳头溢液可能是乳腺癌的早期征兆,表现为病理性分泌物^[13-14]。血性乳头溢液提示罹患乳腺癌的风险更大^[15-16]。本研究意义发现乳头溢液是一种新的检测手段,也可以CEA、CA153、CA125检测,是对传统血清生物标志物检测途径的补充。

癌胚抗原对乳腺癌复发和预后的诊断价值^[17-18],CA153在乳腺癌预后、转移及复发中具有评估作用^[19-20],术前血清CEA和CA153水平被认为能较好地反映乳腺癌预后^[21-22]。不同组病例显示,CA125在乳腺癌与良性病变中的意义不同,有的病例显示CA125在良恶性病变中差异无统计学意义,该组病例显示乳头溢液和血清中CEA、CA153、CA125这3种生物标志物在恶性病变中的表达,与良性组比较,差异都有统计学意义,恶性病变组乳头溢液中CEA、CA153、CA125水平高于良性病变组,乳头溢液中的水平明显高于血清,并且在高分期、淋巴结有转移和/或有复发乳腺癌组中表达也与低分期组、无转移和无复发组表达也有差异,也可能与病例入组及入组病例量大小有关,也有待扩大病例量进一步观察。术前患者乳头溢液及血清CEA、CA153、CA125水平明显高于术后。复发组乳头溢液CEA、CA153、CA125三项肿瘤标志物高于非复发组,两组统计学有差异,但不能提高乳腺癌前病变诊断的敏感性。

乳头溢液占有乳腺病变相关症状的5%左右,比例虽不高,乳腺癌占比更低,但乳头溢液肿瘤标志物的检测为乳腺癌提供了一种新的潜在的检测手段,其意义不是替代对传统血清生物标志物检测,而是对有乳头溢液的病人多了一种检测途径。乳头溢液包含肿瘤细胞直接分泌的物质,甚至有肿瘤细胞死亡的碎片,乳头溢液肿瘤标志物水平明显升高。

综上所述,乳头溢液肿瘤标志物的检测为乳腺癌提供了一种新的潜在的检测手段,乳头溢液和血清中CEA、CA153、CA125肿瘤标志物常规动态检测有助于乳腺癌判断预后,对监测乳腺癌复发和转移有一定的指导意义,但前期研究发现,乳头溢液和血清中CEA、CA153、CA125肿瘤标志物诊断价值有限,不能提高早期乳腺癌的诊断敏感性,不宜夸大诊断价值,乳头溢液和血清中CEA、CA153、CA125肿瘤标志物与临床病理因素的意义还需要扩大病例量进一步观察。

参考文献

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020 [J]. CA Cancer J Clin, 2020, 70: 7-30.
- [2] WHO Classification of Tumors Editorial Board, ed. WHO classification of tumors, 5th edition - Breast tumors [M]. Lyon: International Agency for Research on Cancer; Lyon; 2019.
- [3] Lakhani SR, Ellis IO, Schnitt SJ, et al. WHO classification of tumours of the breast [M]. Lyon, France: IARC Press, 2012: 1-117.
- [4] 《乳腺癌HER2检测指南(2014版)》编写组. 乳腺癌HER2检测指南(2014版) [J]. 中华病理学杂志, 2014, 43(4): 262-267.
- [5] 刘月平, 步宏, 杨文涛. 2019版中国乳腺癌HER2检测指南更新解读 [J]. 中华病理学杂志, 2019, 48(3): 182-185.
- [6] 水若鸿, 杨文涛. 乳腺癌雌、孕激素受体免疫组织化学检测中的常用抗体 [J]. 中华病理学杂志, 2015, (4): 229-231.
- [7] Lang JE, Kuerer HM. Breast ductal secretions: clinical features, potential uses, and possible applications [J]. Cancer Control, 2007, 14(4): 350-359.
- [8] Zervoudis S, Iatrakis G, Economides P, et al. Nipple discharge screening [J]. Womens Health (Lond), 2010, 6(1): 135-151.
- [9] Gupta D, Mendelson EB, Karst I. Nipple Discharge: Current Clinical and Imaging Evaluation [J]. AJR Am J Roentgenol, 2021, 216(2): 330-339.
- [10] Klassen CL, Hines SL, Ghosh K. Common benign breast concerns for the primary care physician [J]. Cleve Clin J Med, 2019, 86(1): 57-65.
- [11] Sajadi-Ernazarova KR, Sugumar K, Adigun R. Breast Nipple Discharge. 2021 Jun 30. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2021 Jan-. PMID: 28613688.
- [12] Dupont SC, Boughey JC, Jimenez RE, et al. Frequency of diagnosis of cancer or high-risk lesion at operation for pathologic nipple discharge [J]. Surgery, 2015, 158(4): 988-994.
- [13] Parthasarathy V, Rathnam U. Nipple discharge: an early warning sign of breast cancer [J]. Int J Prev Med, 2012, 3: 810-814.

(下转第1769页)

VEGF-C、CCL21 及 Bmi-1 蛋白在上皮性卵巢癌组织中的表达及意义

惠志龙^{1*} 张利萍¹ 王龙影² 王慧²

【摘要】目的 分析血管内皮细胞生长因子 C (VEGF-C)、C-C 趋化因子配体 (CCL21) 及 B 细胞特异性莫洛氏鼠白血病病毒插入位点-1 (Bmi-1) 在上皮性卵巢癌组织中的表达及其表达与微淋巴管生成、患者预后的关系。**方法** 收集。河北北方学院附属第一医院 2017 年 1 月至 2020 年 1 月收治的 82 例上皮性卵巢癌患者术中所取癌组织作为研究组,并选取距癌组织 3 cm 处的癌旁组织作为对照组。比较两组 VEGF-C、CCL21 及 Bmi-1 表达情况;分析上述因子、微淋巴管密度 (LVD) 与卵巢上皮性癌病理特征的关系及各因子与 LVD 的相关性,并采用多元 Logistic 回归分析影响患者预后生存的危险因素。**结果** 研究组 VEGF-C、CCL21 及 Bmi-1 阳性表达率均显著高于对照组,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。VEGF-C、CCL21 阳性表达率与上皮性卵巢癌临床分期、淋巴结转移及病理分级具有显著相关性 ($P < 0.05$)。Bmi-1 阳性表达率、LVD 值与上皮性卵巢癌组织学类型、临床分期及淋巴结转移具有显著相关性 ($P < 0.05$)。LVD 值亦与病理分级具有显著相关性 ($P < 0.05$)。相关性分析结果显示,VEGF-C、CCL21 及 Bmi-1 与 LVD 均呈正相关关系 ($P < 0.05$)。上述因子是影响上皮性卵巢癌患者预后生存的独立危险因素 ($P < 0.05$)。**结论** 上皮性卵巢癌 VEGF-C、CCL21 及 Bmi-1 过度表达可能促进微淋巴管生成,可能提示预后不良。

【关键词】 VEGF-C; CCL21; Bmi-1; 上皮性卵巢癌; 微淋巴管生成

Expression and significance of VEGF-C, CCL21 and Bmi-1 protein in epithelial ovarian cancer

HUI Zhilong^{1*}, ZHANG Liping¹, WANG Longying², WANG Hui²

(1. Department of Gynecology, the First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou, Hebei, China, 075000; 2. Department of Obstetrics and Gynecology, the First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou, Hebei, China, 075000)

【ABSTRACT】Objective To analyze the expression of vascular endothelial growth factor C (VEGF-C), CC chemokine ligand (CCL21), and B-cell-specific Moloney leukemia virus insertion site-1 (Bmi-1) in the tissues of epithelial ovarian cancer and its relationship with microlymphangiogenesis and prognosis of patients. **Methods** The 82 patients with epithelial ovarian cancer admitted to the First Affiliated Hospital of Hebei North University from January 2017 to January 2020 were selected. The cancer tissues were collected as the study group and normal tissues 3 cm away from the cancer tissues were selected as the control group. The expression of VEGF-C, CCL21 and Bmi-1 in the two groups were compared. The relationship among the above factors, microlymphatic vessel density (LVD) and the pathological characteristics of epithelial ovarian cancer and the correlations between each factor and LVD were analyzed. Multivariate Logistic regression was used to analyze the risk factors that affected the prognosis of patients. **Results** The positive expression rates of VEGF-C,

基金项目:张家口市科技计划自筹经费项目(2021024D)

作者单位:1. 河北北方学院附属第一医院妇科,河北,张家口 075000

2. 河北北方学院附属第一医院妇产科,河北,张家口 075000

*通信作者:惠志龙, E-mail:417797331@qq.com

CCL21 and Bmi-1 in the study group were significantly higher than those in the control group, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). The positive expression rate of VEGF-C and CCL21 was significantly correlated with the clinical stage, lymph node metastasis and pathological grade of epithelial ovarian cancer ($P<0.05$). The positive expression rate of Bmi-1 was significantly correlated with the histological type, clinical stage, and lymph node metastasis of epithelial ovarian cancer ($P<0.05$). LVD value had significant correlation with histological type, clinical stage, lymph node metastasis and pathological grade of epithelial ovarian cancer ($P<0.05$). The results of correlation analysis showed that VEGF-C, CCL21 and Bmi-1 were all positively correlated with LVD ($P<0.05$). Multivariate logistic regression analysis showed that VEGF-C (positive), CCL21 (positive) and Bmi-1 (positive) were independent risk factors affecting the prognosis survival of patients with epithelial ovarian cancer ($P<0.05$). **Conclusion** The overexpression of VEGF-C, CCL21 and Bmi-1 in epithelial ovarian cancer may promote microlymphangiogenesis, which may indicate a poor prognosis.

[KEY WORDS] VEGF-C; CCL21; Bmi-1; Epithelial ovarian cancer; Microlymphangiogenesis

卵巢癌是威胁女性健康的一种恶性肿瘤,约占女性恶性肿瘤的3%~4%,其病死率位居妇科恶性肿瘤首位^[1]。肿瘤侵袭性生长与转移是导致患者预后不良的关键,而淋巴管的生成及淋巴结转移在其中扮演重要角色。血管内皮细胞生长因子C (Vascular endothelial growth factor C, VEGF-C)是一种重要的淋巴管生成因子,在促进新生淋巴管内皮细胞的增殖和迁移方面具有重要作用^[2]。B细胞特异性莫洛氏鼠白血病病毒插入位点-1(B-cell-specific Moloney leukemia virus insertion site-1, Bmi-1)是一种广泛表达的核蛋白,参与细胞增殖的调控^[3]。趋化因子与肿瘤器官特异性转移有关,相关研究显示,肺癌、乳腺癌及卵巢癌中均有趋化因子及其受体的表达增高,其中趋化因子21主要由淋巴管内皮细胞分泌,在卵巢癌淋巴转移中具有重要作用^[4]。基于此,本研究通过检测 VEGF-C、C-C趋化因子配体(C-C chemokine ligand, CCL21)及 Bmi-1在上皮性卵巢癌组织中的表达情况,探讨其表达及与微淋巴管生成、患者预后的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取河北北方学院附属第一医院2017年1月至2020年1月收治的82例上皮性卵巢癌患者术中所取癌组织纳入研究组,平均年龄为(47.56±9.36)岁;临床分期:Ⅰ期16例,Ⅱ期12例,Ⅲ期30例,Ⅳ期24例;病理类型:浆液性癌43例,黏液性癌39例;淋巴结转56例;病理分级G₁16例,G₂31例,G₃35例。纳入标准:①均符合上皮性卵巢癌的诊断标准^[5];②初次手术者;③临床资料无缺失

或丢失;④未进行化疗、放疗等治疗者。排除标准:①心脏、肝肾功能不全;②合并免疫功能、血液功能障碍者;③合并其他恶性疾病;④中途退出者。并选取距癌组织3 cm处的癌旁组织作为对照组。本研究经院医学伦理委员会批准通过,受试者或其家属均签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂

鼠抗人 VEGF-C 单克隆抗体,购自美国 Neomarkers 公司;兔抗人 CCL21 多克隆抗体,购自武汉博士德生物技术有限公司;兔抗人 Bmi-1 单克隆抗体,购自上海生物技术有限公司。链酶菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连接(SP)免疫组化超敏试剂盒、胰蛋白酶及二氨基联苯胺酶底物显色试剂盒均购自福州迈新公司。

1.2.2 检测方法

标本均在手术后立即采集,用10%甲醛溶液固定后,常规脱水石蜡包埋。根据S-P免疫组化染色法对 VEGF-C、CCL21 及 Bmi-1 蛋白进行检测,检测过程严格按照说明书进行。一抗阴性对照使用PBS(磷酸盐缓冲液)进行代替。

1.2.3 结果判断^[6]

根据阳性细胞百分比、染色强度判定。①阳性标准为在细胞核或细胞浆内出血棕黄色或褐色颗粒。0分为无色,1分淡黄色,棕黄色2分,棕褐色3分。②阳性细胞率计算:从每张切片中随机选取5个高倍视野并计算阳性细胞数,阳性细胞率=阳性细胞数/观察细胞数×100%。0分:无阳性细胞,1分:阳性细胞<10%,2分:10%~50%,3分:50%~75%,4分:>75%。总积分:上述2项评分的

乘积。阳性:总积分>4分。

1.2.4 微淋巴管密度(Microlymphatic vessel density, LVD)计数

采用低倍显微镜($\times 100$)观察经SP染色后切片,寻找LVD相对最高处,即热点位置,随后在高倍显微镜($\times 400$)下计数,D2-40定位于淋巴管内皮细胞胞浆或胞膜,呈棕色,对于着色内皮细胞或淋巴管内皮簇,只要它们和邻近的染色的淋巴管、肿瘤细胞或其他结缔组织分开,即可作为一个淋巴管计数,记录5个视野内的微淋巴管数,取其最高数作为LVD值^[7]。

1.3 随访

以病例查询、电话或门诊复查的方式对患者进行1年随访(截止时间2021年1月),分析影响其56预后生存的危险因素。

1.4 统计学方法

采用SPSS 22.0统计软件进行分析,计量资料采用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,采用 t 检验;计数资料采用 $n(\%)$ 表示,采用 χ^2 检验;采用Pearson法对各参数进行相关性分析;采用多元Logistic回归分析影响上皮性卵巢癌患者1年预后生存的相关危险因素,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

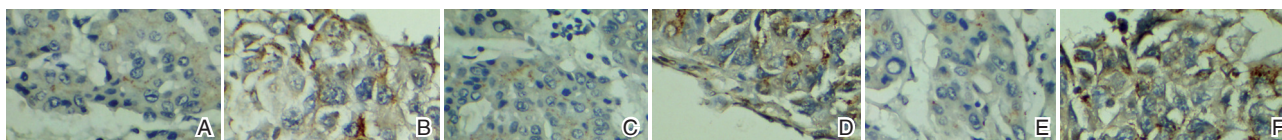
2.1 VEGF-C、CCL21及Bmi-1在各组的表达情况

研究组VEGF-C、CCL21及Bmi-1阳性表达率均显著高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表1、图1。

表1 VEGF-C、CCL21及Bmi-1在各组的表达情况 [$n(\%)$]

Table 1 expression of VEGF-C, CCL21 and Bmi-1 in each group [$n(\%)$]

组别	n	VEGF-C		CCL21		Bmi-1	
		阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性
对照组	82	10(12.20)	72(87.80)	18(21.95)	64(78.05)	8(9.76)	74(90.24)
研究组	82	50(60.98)	32(39.02)	58(70.73)	24(29.27)	56(68.29)	26(31.71)
χ^2 值		42.051		39.234		59.040	
P 值		<0.001		<0.001		<0.001	



注:A、B为VEGF-C在癌旁、及癌组织中的表达;C、D为CCL21在癌旁及癌组织中的表达;E、F为Bmi-1在癌旁及癌组织中的表达。

图1 免疫组化图(SP, $\times 400$)

Figure 1 Immunohistochemistry map (SP, $\times 400$)

2.2 上皮性卵巢癌病理特征与VEGF-C、CCL21、Bmi-1及LVD的关系

上皮性卵巢癌临床分期Ⅲ~Ⅳ期、有淋巴结转移及病理分级 G_3 级者VEGF-C、CCL21阳性表达率显著高于上皮性卵巢癌临床分期Ⅰ~Ⅱ期、无淋巴结转移及病理分级 G_1 ~ G_2 级者,差异有统计学意义($P < 0.05$)。上皮性浆液性卵巢癌、临床分期Ⅲ~Ⅳ期、有淋巴结转移者Bmi-1阳性表达率更高($P < 0.05$);且上皮性浆液性卵巢癌、临床分期Ⅲ~Ⅳ期、有淋巴结转移、病理分级 G_3 级者LVD值更高($P < 0.05$)。见表2。

2.3 VEGF-C、CCL21、Bmi-1与LVD的相关性

相关性分析结果显示,VEGF-C($r=0.647$)、CCL21($r=0.584$)及Bmi-1($r=0.576$)与LVD均呈正相关关系($P < 0.05$)。

2.4 影响上皮性卵巢癌患者预后的单多因素分析

临床分期(Ⅲ~Ⅳ期)、淋巴结转移(有)、病理分级(G_3)、VEGF-C(阳性)、CCL21(阳性)及Bmi-1(阳性)为影响上皮性卵巢癌患者预后生存的独立危险因素($P < 0.05$)。见表3。

3 讨论

上皮性卵巢癌是临床常见恶性疾病,早期无特异性症状,大部分患者就诊已是晚期,预后不佳^[8]。目前淋巴管形成已成为国内外研究热点,已有临床研究证实,淋巴管形成是卵巢癌恶性进展的关键步骤^[9]。因此需对上皮性卵巢癌发病、发展机制进行研究,并寻找、开发新治疗靶点以改善上皮性卵巢癌患者预后。

VEGF-C是近年来发现的介导肿瘤淋巴管生成及淋巴结转移的重要因子,其可通过调节原有

表2 上皮性卵巢癌病理特征与 VEGF-C、CCL21、Bmi-1 及 LVD 的关系 [$n(\%)$, ($\bar{x} \pm s$)]

Table 2 Relationship between pathological features of epithelial ovarian cancer and VEGF-C, CCL21, Bmi-1 and LVD [$n(\%)$, ($\bar{x} \pm s$)]

病理特征	<i>n</i>	VEGF-C 阳性	χ^2 值	<i>P</i> 值	CCL21 阳性	χ^2 值	<i>P</i> 值	Bmi-1 阳性	χ^2 值	<i>P</i> 值	LVD 值	χ^2 值	<i>P</i> 值	
年龄	<45 岁	38	22(44.00)	0.328	0.567	26(44.83)	0.183	0.669	26(46.43)	0.001	0.981	12.07±3.02	0.723	0.472
	≥45 岁	44	28(56.00)			32(55.17)			30(53.57)			11.59±2.98		
肿瘤直径	<10 cm	32	19(38.00)	0.057	0.812	22(37.93)	0.100	0.752	25(44.64)	2.343	0.126	12.15±3.34	1.725	0.088
	≥10 cm	50	31(62.00)			36(62.07)			31(55.36)			11.06±2.38		
组织学类型	浆液性	43	29(58.00)	1.589	0.208	33(56.90)	1.579	0.209	35(62.50)	7.168	0.007	12.78±3.69	3.017	0.003
	黏液性	39	21(42.00)			25(43.10)			21(37.50)			10.89±1.32		
临床分期	I~II	28	12(24.00)	5.866	0.015	13(22.41)	12.131	<0.001	13(23.21)	9.387	0.002	9.29±1.88	8.735	<0.001
	III~IV	54	38(76.00)			45(77.59)			43(76.79)			15.45±3.47		
淋巴结转移	有	56	41(82.00)	7.163	0.007	46(79.3)	6.309	0.012	44(78.57)	4.503	0.034	15.72±4.89	6.126	<0.001
	无	22	9(18.00)			12(20.69)			12(21.43)			8.88±2.94		
病理分级	G ₁ -G ₂	47	21(42.00)	12.287	<0.001	25(43.10)	16.365	<0.001	36(64.29)	0.539	0.463	10.11±3.45	6.723	<0.001
	G ₃	35	29(58.00)			33(56.90)			20(35.71)			16.21±4.77		

表3 影响上皮性卵巢癌患者预后的单多因素分析

Table 3 univariate and multivariate analysis of prognosis in patients with epithelial ovarian cancer

变量	单因素分析			多因素分析		
	OR 值	95%CI	P 值	OR 值	95%CI	P 值
年龄(≥45 岁 vs <45 岁)	1.524	0.524~1.534	0.660			
肿瘤直径(≥10 cm vs <10 cm)	1.487	0.546~1.547	0.714			
组织学类型(浆液性 vs 黏液性)	1.666	0.584~1.943	0.541			
临床分期(I~II 期 vs III~IV 期)	1.578	1.385~1.756	0.017	1.368	1.231~1.992	<0.001
淋巴结转移(有 vs 无)	1.624	1.527~1.857	0.008	1.258	1.467~1.339	<0.001
病理分级(G ₁ -G ₂ vs G ₃)	1.547	1.427~1.997	0.024	1.335	1.321~1.875	<0.001
VEGF-C(阳性 vs 阴性)	1.354	1.235~1.456	0.019	1.354	1.372~1.698	0.025
CCL21(阳性 vs 阴性)	1.475	1.342~1.568	0.004	1.647	1.247~1.654	<0.001
Bmi-1(阳性 vs 阴性)	1.524	1.458~1.687	0.012	1.221	1.247~1.657	<0.001

淋巴管内皮细胞间的细胞分泌方式,促进原有淋巴管增生,并与新生淋巴管相互吻合,形成淋巴管网,使得肿瘤细胞通过淋巴管间的吻合进入淋巴管,并发生转移,影响患者预后^[10-11]。已有多项研究表明,VEGF-C 与卵巢癌、胰腺癌及乳腺癌等多种恶性疾病的淋巴结转移、预后有着密切的相关性^[12]。CCL21 是一种主要表达于外周免疫器官或组织的趋化因子,通过作用于趋化因子受体 7,介导淋巴细胞与经抗原分化的树突状细胞进入淋巴管。Cunnea 等^[13]报道发现,在肺癌、乳腺癌等恶性肿瘤中 CCL21 呈高表达,并促进了肿瘤细胞增值、分化,CCL21 参与了癌细胞侵袭、转移过程。Bmi-1 是多梳基因家族成员之一,在白血病、淋巴瘤的发生、发展中具有重要作用。国外有研究发现,Bmi-1 在多数人体正常组织中无表达或呈低表达,在多种肿瘤组织或细胞中表达明显上调,且与患者预后不良有关,被认为是一种潜在的癌基因^[14]。

本研究发现,VEGF-C、CCL21 及 Bmi-1 在正常组织中的阳性表达率均显著低于上皮性卵巢癌

组织。进一步分析发现,多数的临床晚期(III~IV 期)Bmi-1 呈过度表达,仅少数临床早期(I~II 期)者 VEGF-C、CCL21 及 Bmi-1 呈过度表达。国外报道显示,VEGF-C、CCL21 及 Bmi-1 高表达与患者淋巴结转移、病理类型、病理分级有关^[15]。但本研究上述因子中仅 Bmi-1 高表达与患者病理类型有关,VEGF-C、CCL21 表达与患者病理类型无显著相关性,分析其原因可能与样本量纳入偏少、患者自身因素等有关。此外本研究通过分析 VEGF-C、CCL21 及 Bmi-1 与 LVD 相关性发现,VEGF-C、CCL21 及 Bmi-1 均与 LVD 呈显著正相关。上述结论均提示,VEGF-C、CCL21 及 Bmi-1 蛋白过度表达可能在上皮性卵巢癌发生、发展中担当重要作用,参与了部分肿瘤浸润、淋巴结转移等恶性进程。本研究还发现,VEGF-C、CCL21 及 Bmi-1 阳性表达均是影响上皮性卵巢癌患者预后生存的危险因素。推测可能是由于 VEGF-C、CCL21 及 Bmi-1 过度表达可刺激微淋巴管生成,癌细胞通过脉管间隙侵入脉管系统而导致淋巴结转移,影响患者预后。

综上所述,上皮性卵巢癌 VEGF-C、CCL21 及 Bmi-1 过度表达可能促进微淋巴管生成,是影响患者预后不良的危险因素。

参考文献

- [1] 孙娟, 信艳萍, 张国梅, 等. 慢病毒介导 HMGN5 基因沉默对卵巢癌细胞增殖, 迁移, 侵袭的影响及其机制研究[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2019, 11(6):53-58.
- [2] 刘敏, 徐杰, 康婷, 等. 卵巢癌组织中 VEGF 及 MVD 表达及其临床意义[J]. 实用癌症杂志, 2017, 32(7):1069-1072.
- [3] 汪学文, 冯祺论, 陈炜, 等. Bmi-1 参与血管重塑及其机制的研究进展[J]. 生理科学进展, 2018, 49(5):75-78.
- [4] Ferber D, Lenoir B, Suarez-Carmona M, et al. Omental fat in ovarian cancer induces lymphangiogenesis [J]. Eur J Cancer, 2018, 92(12):S8.
- [5] Labovsky V, Martinez LM, Davies KM, et al. Prognostic significance of TRAIL-R3 and CCR-2 expression in tumor epithelial cells of patients with early breast cancer [J]. BMC Cancer, 2017, 17(1):784-786.
- [6] Kulus M, Kranc W, Sujka-Kordowska P, et al. The processes of cellular growth, aging, and programmed cell death are involved in lifespan of ovarian granulosa cells during short-term IVC-Study based on animal model [J]. Theriogenology, 2020, 148(15):456-457.
- [7] Osabe M, Tajika T, Tohkin M. Allopurinol suppresses expression of the regulatory T-cell migration factors TARC/CCL17 and MDC/CCL22 in HaCaT keratinocytes via restriction of nuclear factor- κ B activation [J]. J Appl Toxicol, 2017, 32(4):464-470.
- [8] Blanca GPMD, Coronado PJ, Castro SVD, et al. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Polymorphisms and Serum VEGF Levels in Women With Epithelial Ovarian Cancer, Benign Tumors, and Healthy Ovaries [J]. Int J Gynecol Cancer, 2017, 27(6):1088-1095.
- [9] Wei R, Lv M, Li F, et al. Human CAFs promote lymphangiogenesis in ovarian cancer via the Hh-VEGF-C signaling axis [J]. Oncotarget, 2017, 8(40):67315-67328.
- [10] Camerin GR, Brito ABC, José V, et al. VEGF gene polymorphisms and outcome of epithelial ovarian cancer patients [J]. Future Oncol, 2017, 13(5):409-414.
- [11] Kuerti S, Oliveira-Ferrer L, Milde-Langosch K, et al. VEGF-C expression attributes the risk for lymphatic metastases to ovarian cancer patients [J]. Oncotarget, 2017, 8(26):798-799.
- [12] Osabe M, Tajika T, Tohkin M. Allopurinol suppresses expression of the regulatory T-cell migration factors TARC/CCL17 and MDC/CCL22 in HaCaT keratinocytes via restriction of nuclear factor- κ B activation [J]. J Appl Toxicol, 2018, 38(5):645-651.
- [13] Cunnea P, Gorgy T, Petkos K, et al. Clinical value of bioelectrical properties of cancerous tissue in advanced epithelial ovarian cancer patients [J]. Sci Rep, 2018, 8(1):412-413.
- [14] Hong C, Lee C. 595 CCL21 induces mTOR activation, followed by malat-1 expression, and then cell migration in cutaneous T cell lymphoma [J]. J Invest Dermatol, 2017, 137(10):S294.
- [15] Gorski JW, Mccorkle JR, Dejohn J, et al. Predicting chemosensitivity in epithelial ovarian cancer using patient derived tissue organoids [J]. Gynecol Oncol, 2020, 159(15):156-157.
- [14] Dolan RT, Butler JS, Kell MR, et al. Nipple discharge and the efficacy of duct cytology in evaluating breast cancer risk [J]. Surgeon, 2010, 8: 252-258.
- [15] Zhang X, Liu W, Hai T, et al. Upgrade Rate and Predictive Factors for Breast Benign Intraductal Papilloma Diagnosed at Biopsy: A Meta-Analysis [J]. Ann Surg Oncol, 2021, 28(13):8643-8650.
- [16] Chen L, Zhou WB, Zhao Y, et al. Bloody nipple discharge is a predictor of breast cancer risk: a meta-analysis [J]. Breast Cancer Res Treat, 2012, 132: 9-14.
- [17] Shao Y, Sun X, He Y, et al. Elevated Levels of Serum Tumor Markers CEA and CA15-3 Are Prognostic Parameters for Different Molecular Subtypes of Breast Cancer [J]. PloS One, 2015, 10:e0133830.
- [18] Stieber P, Nagel D, Blankenburg I, et al. Diagnostic efficacy of CA 15-3 and CEA in the early detection of metastatic breast cancer-A retrospective analysis of kinetics on 743 breast cancer patients [J]. Clin Chim Acta, 2015, 448:228-231.
- [19] Kim MJ, Park BW, Lim JB, et al. Axillary lymph node metastasis: CA-15-3 and carcinoembryonic antigen concentrations in fine-needle aspirates for preoperative diagnosis in patients with breast cancer [J]. Radiology, 2010, 254: 691-697.
- [20] Li X, Dai D, Chen B, et al. Clinicopathological and Prognostic Significance of Cancer Antigen 15-3 and Carcinoembryonic Antigen in Breast Cancer: A Meta-Analysis including 12,993 Patients [J]. Dis Markers, 2018, 2018:9863092.
- [21] Lee JS, Park S, Park JM, et al. Elevated levels of preoperative CA 15-3 and CEA serum levels have independently poor prognostic significance in breast cancer [J]. Ann Oncol, 2013, 24(5): 1225-1231.
- [22] Wu SG, He ZY, Zhou J, et al. Serum levels of CEA and CA15-3 in different molecular subtypes and prognostic value in Chinese breast cancer [J]. Breast, 2014, 23:88-93.

(上接第 1764 页)

· 论 著 ·

MRSA对万古霉素和替考拉宁的异质性耐药情况及分子分型

蓝锴¹ 钟国升² 刘宇阳³ 陈瑶³ 伍众文³ 余学高³ 陈茶^{1*} 黄彬^{3*}

【摘要】目的 研究耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)对临床常用抗生素万古霉素(VAN)和替考拉宁(TEC)的异质性耐药情况及分子分型,为临床合理应用抗菌药物提供实验依据,为MRSA的异质性耐药机制研究奠定基础。**方法** 收集2016年1月至2020年12月间中山大学附属第一医院临床分离的305株MRSA,采用多重PCR进行SCCmec分型,用菌群谱型分析微量滴定法(MPAP)初筛、群体谱型分析法(PAP)确认MRSA对VAN和TEC的异质性耐药情况。**结果** SCCmec分型中Ⅳa型占35.7%(109/305),Ⅳb型2.0%(6/305),Ⅳc型0.3%(1/305),Ⅳd型0.7%(2/305),Ⅱ型25.9%(79/305),Ⅲ型10.2%(31/305),Ⅴ型5.6%(17/305),未能分型19.7%(60/305)。血液和脓液标本中分离的MRSA主要为SCCmecⅣ型,分别占47.9%(45/94)和43.0%(43/100);痰液标本中分离的MRSA主要为SCCmecⅡ型,占50.5%(35/111)。PAP法显示MRSA对VAN和TEC的异质性耐药阳性率分别为35.5%(104/293)和59.9%(163/272)($P<0.05$)。不同SCCmec型别的MRSA对TEC的异质性耐药率分别为:Ⅳ型69.7%(76/109),Ⅴ型56.3%(9/16),Ⅲ型48.1%(13/27),Ⅱ型44.6%(29/65),未能分型65.5%(36/55),差异有统计学意义($P<0.05$),SCCmec分型与MRSA-TEC-HR有一定相关性($r=0.22$)。不同SCCmec型别的MRSA对VAN的异质性耐药率分别为:Ⅳ型40.7%(48/118),Ⅴ型29.4%(5/17),Ⅱ型29.2%(21/72),Ⅲ型23.3%(7/30),未能分型41.1%(23/56),差异无统计学意义($P>0.05$),SCCmec分型与MRSA-VAN-HR不存在相关性。**结论** 临床分离的MRSA SCCmec型别以SCCmecⅣ型为主,其次是Ⅱ型。MRSA对VAN与TEC有较高的异质性耐药率,对TEC的异质性耐药率高于VAN。MRSA的SCCmec型别与其对TEC的异质性耐药有一定的相关性。

【关键词】 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌; SCCmec分型; 异质性耐药; 万古霉素; 替考拉宁

Heteroresistance and molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to vancomycin and teicoplanin

LAN Kai¹, ZHONG Guosheng², LIU Yuyang³, CHEN Yao³, WU Zhongwen³, YU Xuegao³, CHEN Cha^{1*}, HUANG Bin^{3*}

(1. Department of Laboratory Medicine, Guangdong Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong, China, 510120; 2. Department of Medical Technology, Guangdong Medical University, Dongguan, Guangdong, China, 523770; 3. Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangzhou, Guangdong, China, 510080)

【ABSTRACT】 Objective To study the heteroresistance (HR) of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) to vancomycin (VAN) and teicoplanin (TEC), and the corresponding molecular typing, and to provide a basis for guiding clinical treatment and lay a foundation for further investigation of the

基金项目:国家自然科学基金面上项目(81871703)

作者单位:1. 广东省中医院检验医学部,广东,广州 510120

2. 广东医科大学医学技术学院,广东,东莞 523770

3. 中山大学附属第一医院检验医学部,广东,广州 510080

*通信作者:陈茶, E-mail: chench906@163.com; 黄彬, E-mail: hb906@163.com

注:蓝锴和钟国升为并列第一作者

mechanism of HR in MRSA. **Methods** A total of 305 MRSA isolates were collected from the First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University from January 2016 to December 2020. The Multiplex PCR was used for SCCmec typing. The HR of MRSA resistance to VAN and TEC were primary screened by microtitration population analysis profiling (MPAP) and confirmed by population analysis profiling (PAP). **Results** In SCCmec classification, type IV a accounted for 35.7% (109/305), type IV b 2.0% (6/305), type IV c 0.3% (1/305), type IV d 0.7% (2/305), type II 25.9% (79/305), type III 10.2% (31/305), type V 5.6% (17/305), and 19.7% (60/305) could not be classified. MRSA isolated from blood and pus specimens are mainly SCCmec type IV, accounting for 47.9% (45/94) and 43.0% (43/100) respectively. The MRSA isolated from sputum samples was mainly SCCmec type II, accounting for 50.5% (35/111). PAP method showed that the positive rates of MRSA to VAN and TEC were 35.5% (104/293) and 59.9% (163/272) ($P<0.05$). The heteroresistance rates of different SCCmec types of MRSA to TEC are: type IV 69.7% (76/109), type V 56.3% (9/16), type III 48.1% (13/27), type II 44.6% (29/65), 65.5% (36/55) failed to be typed, the difference was statistically significant ($P<0.05$), SCCmec typing has a certain correlation with MRSA-TEC-HR ($r=0.22$). The heteroresistance rates of different SCCmec types of MRSA to VAN are: type IV 40.7% (48/118), type V 29.4% (5/17), type II 29.2% (21/72), type III 23.3% (7/30), 41.1% (23/56) failed to type, the difference was not statistically significant ($P>0.05$), there was no correlation between SCCmec typing and MRSA-VAN-HR. **Conclusion** The clinically isolated MRSA SCCmec type is mainly SCCmec type IV, followed by type II. MRSA has a higher rate of heterogeneous resistance to VAN and TEC, and the rate of heterogeneous resistance to TEC is higher than that of VAN. The SCCmec type of MRSA is related to its heterogeneous resistance to TEC.

[KEY WORDS] Methicillin - resistant *Staphylococcus aureus*; SCCmec typing; Heteroresistance; Teicoplanin; Vancomycin

异质性耐药(heteroresistance, HR)意指同一克隆菌株中同时存在对某种抗生素耐药和敏感亚群的现象,可能是导致临床上患者用药失败甚至诱导耐药菌株产生的重要原因^[1]。多种临床常见致病菌已被报道存在异质性耐药现象^[2]。长期以来,万古霉素(vancomycin, VAN)是治疗甲氧西林金黄色葡萄球菌(*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*, MRSA)的首选药物,随着其在临床中的广泛应用,MRSA对VAN的敏感性逐渐下降,异质性万古霉素中介金黄色葡萄球菌(heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*, hVISA)的检出率愈来愈高,但异质性耐药的机制尚不清楚,因此研究MRSA异质性耐药的机制显得极其重要。葡萄球菌染色体mec盒基因遗传元件(staphylococcal cassette chromosome mec, SCCmec)分型是目前临床较常用的分子分型方法。目前,国内外研究发现MRSA耐药机制与SCCmec元件整合mecA、mecC等相关耐药基因、双组分系统的调控以及生物膜的形成^[3]等有关,但MRSA异质性耐药的机制尚不十分清楚。替考拉宁(teicoplanin, TEC)与VAN同属于糖肽类抗生素,广泛应用于临床,其治疗效果与VAN相当,但是MRSA对TEC的异质性耐药情况并不清楚。因此,本文拟研究MRSA

对VAN和TEC的异质性耐药情况,对其进行SCCmec基因分型,并研究SCCmec基因型是否与MRSA的异质性耐药有关,为MRSA异质性耐药的流行病学研究及防治提供实验室依据,为MRSA复杂的异质性耐药机制研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

收集2016年1月至2020年12月间中山大学附属第一医院临床分离的MRSA 305株,剔除同一患者重复分离的菌株,冻存于-80℃备用。菌株分离自血液、脓液、痰液标本。质控菌株金黄色葡萄球菌ATCC 25923购自卫健委全国临床检验中心;SCCmec分型标准菌株由上海肺科医院检验科余方友教授惠赠。

1.2 主要仪器与试剂

VAN粉末购自上海麦克林生化有限公司,TEC粉末购自上海源叶生物科技有限公司,Brain Heart Infusion Agar 脑心浸液琼脂、Brain Heart Infusion Broth 脑心浸液肉汤购自青岛高科园海博生物技术有限公司,Vitek 2全自动微生物检测系统购自法国生物梅里埃公司,Veriti扩增仪购自美国Life Technologies公司。Vilber Fusion FX7凝胶成

像仪购自法国 VILBER 公司, DYY-6C 电泳仪购自北京市六一仪器厂, PCR 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 2×Accurate Taq 预混液购自湖南艾科瑞生物工程有限公司。

1.3 菌株复苏

将临床分离的 MRSA 从 -80℃ 冰箱取出, 解冻后用接种环挑取一环菌液, 分区划线接种于血平板, 37℃ 培养 18 h, 得到 MRSA 单个菌落。

1.4 SCCmec 分型

采用广州达安基因股份有限公司核酸提取与纯化试剂盒提取细菌的 DNA。按照参考文献^[4]合成引物见表 1, 采用多重 PCR 进行 SCCmec 分型。多重 PCR 反应条件: 预变性 94℃ 5 min; 变性 94℃ 45 s, 退火 65℃ 45 s, 延伸 72℃ 90 s 共 10 个循环; 变性 94℃ 45 s, 退火 55℃ 45 s, 延伸 72℃ 90 s 共 25 个循环; 最后延伸 72℃ 10 min。取 3 μL 反应产物在 1.2% 琼脂糖凝胶上电泳, 在 120 V、55 mA 条件下电泳 40 min 后用凝胶成像系统观察结果并拍照保存。

表 1 SCCmec 基因分型所用的引物

Table 1 Primers of SCCmec genotyping

基因	引物序列(5'→3')	扩增产物长度(bp)
SCCmec I	F GCTTTAAAGAGTGTCTGTTACAGG R GTTCTCTCATAGTATGACGTCC	613
SCCmec II	F CGTTGAAGATGATGAAGCG R CGAAATCAATGGTTAATGGACC	398
SCCmec III	F CCATATTGTGTACGATGCG R CCTTAGTTGTCTGTAACAGATCG	280
SCCmec IVa	F GCCTTATTCGAAGAAACCG R CTACTCTTCTGAAAAGCGTCG	776
SCCmec IVb	F TCTGGAATTACTTCAGCTGC R AAACAATATTGCTCTCCCTC	493
SCCmec IVc	F ACAATATTGTATTATCGGAGAGC R TTGGTATGAGGTATTGCTGG	200
SCCmec IVd	F CTCAAAATACGGACCCCAATACA R TGCTCCAGTAATTGCTAAAAG	881
SCCmec V	F GAACATTGTTACTTAAATGAGCG R TGAAAGTTGTACCCTTGACACC	325

1.5 异质性耐药初筛

以菌群谱型分析微量滴定法 (microtitration population analysis profiling, MPAP)^[5]对 MRSA 进行异质性耐药表型初筛, 分别配制 7 个倍比稀释浓度 2^{-2} ~ 2^{-4} mg/L 含 VAN 和 TEC 的 BHI 平板。挑取复苏的单个克隆菌落接种于 3 mL BHI 肉汤培养基, 37℃ 过夜增菌后, 用 BHI 肉汤调节菌液浓度分别为 10^1 、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 CFU/mL。取 10 μL 菌液滴定于梯度抗生素平板, 每个克隆重复两

滴, 每块板滴 10 株菌的菌液。实验重复三次。37℃ 孵育 48 h 后观察细菌生长情况, 菌落数量随着抗生素浓度升高而缓慢下降, 最低抑菌浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC) 与最高不抑菌浓度 (the highest noninhibitory concentration, HNIC) 的比值大于 8, 则为异质性耐药初筛阳性。

1.6 异质性耐药确证

采用菌群谱型分析法 (population analysis profiling, PAP)^[6]对 MRSA 异质性耐药表型初筛阳性菌株进行确证。分别配制 7 个倍比稀释浓度 2^{-2} ~ 2^{-4} mg/L 含 VAN 和 TEC 的 BHI 平板。挑取 HR 阳性的单个克隆菌落接种于 3 mL BHI 肉汤培养基, 37℃ 过夜增菌后, 用 BHI 肉汤调节菌液浓度分别为 10^1 、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 CFU/mL。取 20 μL 菌液滴定于 PAP 梯度抗生素平板, 均匀涂布, 重复三次。37℃ 孵育 48 h 后菌落计数, 并使用 Graph-Pad Prism 软件将菌落数量与抗生素浓度作图, 若 MIC 与 HNIC 比值大于 8, 则为异质性耐药确证阳性。

1.7 统计学分析

利用 SPSS 25.0 统计软件进行统计分析; 计数资料采用 $n(\%)$ 表示, 采用 χ^2 检验; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MRSA 的临床特征

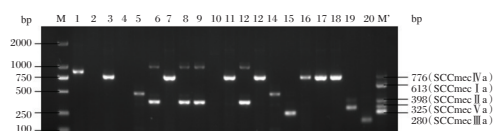
305 株 MRSA 主要分离自患者痰液 36.4% (111/305)、血液 30.8% (94/305)、脓液 32.8% (100/305)。分离科室主要为重症监护室 26.6% (81/305)、外科 26.9% (82/305)、内科 10.5% (32/305)、急诊区 7.5% (23/305)、皮肤科 7.5% (23/305)。

2.2 SCCmec 分型

79 株为 SCCmec II 型 25.9%, 31 株为 SCCmec III 型 10.2%, 109 株为 SCCmec IVa 型 35.7%, 6 株为 SCCmec IVb 型 2.0%, 1 株为 SCCmec IVc 型 0.3%, 2 株为 SCCmec IVd 型 0.7%, 17 株为 SCCmec V 型 5.6%, 剩下 60 株未能分型 19.7%。部分 MRSA SCCmec 分型电泳结果见图 1。血液和脓液标本中分离的 MRSA 主要为 SCCmec IV 型; 痰液标本中分离的 MRSA 主要为 SCCmec II 型 ($P < 0.05$)。见表 2。

2.3 MRSA 异质性耐药初筛

305 株 MRSA 中有 12 株对 VAN 耐药, 33 株对 TEC 耐药, 6 株同时对两者耐药, 后续实验分别剔除对 VAN 和 TEC 耐药的 MRSA, 剩下对 VAN 敏感



注: M, DL2000 DNA marker; M', SCCmec I、SCCmec II、SCCmec III、SCCmec IVa 和 SCCmec V 五种 SCCmec 标准菌株多重 PCR 产物; 1-20, 部分 MRSA 多重 PCR 电泳结果, 其中 1 为 SCCmec IVd 型, 3、7、11、13、16、17、18 为 SCCmec IVa 型, 5、14 为 SCCmec IVb 型, 6、8、9、12 为 SCCmec II 型, 15 为 SCCmec III 型, 19 为 SCCmec V 型, 20 为 SCCmec IVc 型, 2、4 为未能分型。

图1 部分 MRSA SCCmec 分型结果(多重 PCR)

Figure 1 SCCmec typing results of partial MRSA (multiplex PCR)

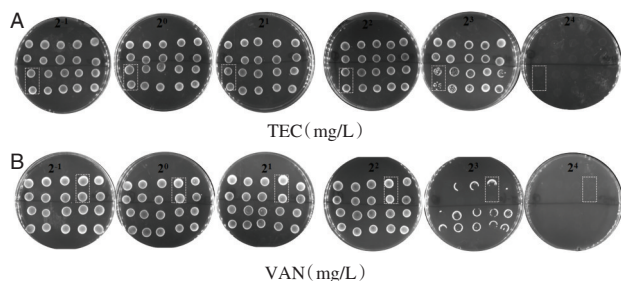
表2 来源于不同标本类型 MRSA 的 SCCmec 分型结果 [n(%)]

Table 2 SCCmec typing results of MRSA from different types of specimens [n(%)]

类型	n	II 型	III 型	IV 型	V 型	未能分型
血液	94	11(11.7) ^a	9(9.6)	45(47.9) ^a	6(6.4)	23(24.5)
脓液	100	12(12.0) ^a	14(14.0)	43(43.0) ^a	7(7.0)	24(24.0)
痰液	111	56(50.5)	8(7.2)	30(27.0)	4(3.6)	13(11.7)
χ^2 值				56.3		
P 值				<0.05		

注: 与痰液组相比, ^a $P < 0.05$ 。

的 MRSA 293 株, 对 TEC 敏感的 MRSA 272 株。分别对 VAN、TEC 敏感的 MRSA 进行 MPAP 异质性耐药初筛, 见图 2。MPAP 结果显示对 VAN 异质性耐药 MRSA (MRSA-VAN-HR) 阳性菌 114 株 (114/293, 38.9%), 对 TEC 异质性耐药 MRSA (MRSA-TEC-HR) 阳性菌 166 株 (166/272, 61.0%), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); MRSA 对 VAN 和 TEC 同时异质性耐药 (MRSA-VAN-TEC-HR) 阳性 68 株。



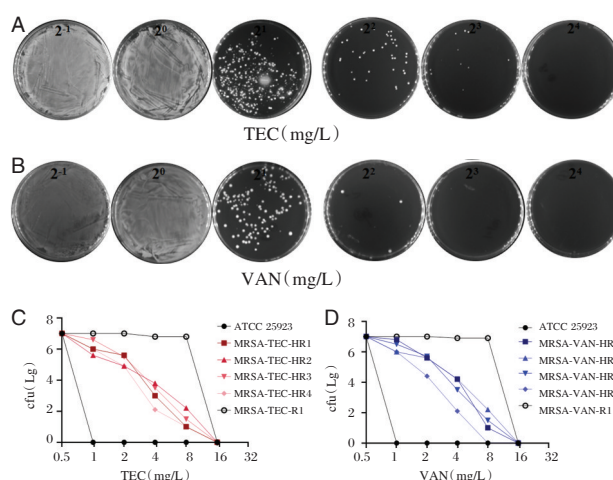
注: 白色虚线方框为 MPAP 法 HR 阳性结果; A 为 MRSA-TEC-HR MPAP 法初筛结果; B 为 MRSA-VAN-HR MPAP 法初筛结果。

图2 MRSA-TEC-HR 与 MRSA-VAN-HR 初筛的 MPAP 结果

Figure 2 The preliminary screening results of MRSA-TEC-HR and MRSA-VAN-HR by MPAP method

2.4 MRSA 异质性耐药确证

PAP 法显示, 114 株初筛对 VAN 异质性耐药阳性菌中有 104 株确证对 VAN 异质性耐药阳性 (MRSA-VAN-HR), 异质性耐药率为 35.5% (104/293); 166 株初筛对 TEC 异质性耐药阳性菌中有 163 株对 TEC 异质性耐药阳性 (MRSA-TEC-HR), 异质性耐药率为 59.9% (163/272), MRSA 对 VAN 与 TEC 的异质性耐药率比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。62 株 MRSA 表现为 VAN 和 TEC 同时异质性耐药 (MRSA-VAN-TEC-HR)。见图 3。



注: A 为 MRSA-TEC-HR PAP 法确证结果; B 为 MRSA-VAN-HR PAP 法确证结果, C 为 MRSA 对 TEC 的 PAP 曲线图; D 为 MRSA 对 VAN 的 PAP 曲线图。

图3 MRSA-TEC-HR 与 MRSA-VAN-HR PAP 法确证结果
Figure 3 The results of MRSA-TEC-HR and MRSA-VAN-HR by PAP method

2.5 SCCmec 分型与 MRSA 异质性耐药情况的相关性分析

不同 SCCmec 型别的 MRSA 对 TEC 的异质性耐药率比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), SCCmec 分型与 MRSA-TEC-HR 有一定相关性 ($r = 0.22$)。不同 SCCmec 型别的 MRSA 对 VAN 的异质性耐药率比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), SCCmec 分型与 MRSA-VAN-HR 不存在相关性。见表 3。

3 讨论

SCCmec 分型是临床常用的分子分型方法, 可根据多重 PCR 后电泳条带的位置进行分子分型。SCCmec 元件也被称为“耐药岛”, 携带的多种耐药基因可能也与 MRSA 的异质性耐药现象存在一定的关联。

表3 MRSA的SCCmec型别与异质性耐药相关性分析

Table 3 Correlation analysis between SCCmec typing and heteroresistance of MRSA

抗生素	SCCmec 型别的异质性耐药率(%)					r 值	P 值	χ^2 值
	II 型	III 型	IV 型	V 型	未能分型			
TEC	44.6(29/65) ^a	48.1(13/27)	69.7(76/109) ^a	56.3(9/16)	65.5(36/55)	0.22	0.01	13.03
VAN	29.2(21/72)	23.3(7/30)	40.7(48/118)	29.4(5/17)	41.1(23/56)	0.14	0.23	5.62

注:两者异质性耐药率比较,^aP<0.05。

本院 2016 至 2020 年五年间临床分离的 MRSA 流行菌株以 SCCmec IV 型为主(38.7%),其次为 SCCmec II 型(25.9%),提示临床分离的 MRSA 以 SCCmec IV 型为主要流行菌株,可能与 SCCmec IV 型元件相对较短更容易在不同遗传背景的 MRSA 中转移有关^[7]。本院 2008 年至 2011 年四年间 560 株 MRSA 分型主要为 SCCmec III 型(占 66%)^[4],提示这几年来本院发生了 MRSA 菌株从以 SCCmec III 型为主到以 SCCmec IV、II 型为主的转变。国内有关文献报道 MRSA SCCmec 分型主要以 III 型为主^[8],主要为院内感染。本次研究有 60 株(19.7%)未能分型,可能是除了 SCCmec I~V 型以外的 SCCmec VI-X IV 型,但是否存在新的型别还有待进一步研究。本研究来源于不同标本类型 MRSA 的 SCCmec 分型结果不同,血液和脓液标本都以 SCCmec IV 型为主,而痰液标本则以 SCCmec II 型为主;提示 SCCmec IV 型 MRSA 更容易经血源性及化脓性感染途径传播,而 SCCmec II 型 MRSA 更容易通过呼吸道传播。

目前,有关 MRSA 异质性耐药情况的报道相对较少,已有的研究主要为 MRSA 对 VAN 的异质性耐药。VAN 作为临床上治疗 MRSA 的最后一道防线,随着其广泛使用,全球 MRSA-VAN-HR 检出率逐渐增高,2004 年的一项研究^[9]曾经报道中国局部地区 h-VISA 检出率为 6.7%;2009 年济南地区的 h-VISA 分离率为 13.4%^[10];2012 至 2017 年 5 年间郑州大学附属第一医院 h-VISA 检出率为 17.9%^[11]。本研究结果显示,中山大学附属第一医院 2016 至 2020 年 5 年间 MRSA-VAN-HR 检出率为 35.5%,相比于已有报道的检出率更高,提示 MRSA 对 VAN 的异质性耐药现象愈发严重。

TEC 与 VAN 都作为糖肽类抗生素被广泛应用于临床,TEC 治疗效果与 VAN 相当,但还未见 MRSA-TEC-HR 检出率的相关报道。研究结果显示本院 MRSA-TEC-HR 的检出率为 59.9%,提示

MRSA 对 TEC 有较高的异质性耐药水平。

SCCmec 型别与 MRSA 异质性耐药的相关性分析中,SCCmec 型别与 MRSA-TEC-HR 存在一定的相关性,相关强度偏弱。SCCmec IV 型 MRSA-TEC-HR 阳性率高达 69.7%,提示相对于其它 SCCmec 分型,SCCmec IV 型 MRSA 更容易出现对 TEC 的异质性耐药。SCCmec 型别与 MRSA-VAN-HR 不存在相关性。

综上所述,本院临床分离 MRSA 的流行菌株可能存在以 SCCmec III 型为主到以 SCCmec IV 型为主的转变,SCCmec IV 型 MRSA 的逐渐流行提示应注重社区环境的卫生检测与卫生习惯的培养,防止其暴发流行。MRSA 对 VAN 与 TEC 都存在较高的异质性耐药水平,有必要定期监测 MRSA 耐药性的变化用于指导临床用药,以避免低剂量抗生素对 MRSA 的长时间无效作用。MRSA 的 SCCmec 型别与 MRSA 对 TEC 的异质性耐药情况存在一定的相关关系。MRSA 对 TEC 与 VAN 异质性耐药的分子机制值得深入探讨,以防止异质性耐药菌株发展为耐药菌。

参考文献

- [1] Dewachter L, Fauvart M, Michiels J. Bacterial Heterogeneity and Antibiotic Survival: Understanding and Combatting Persistence and Heteroresistance [J]. Mol Cell, 2019, 76(2): 255-267.
- [2] 刘宇阳,蓝锴,熊蕊,等.耐碳青霉烯类大肠埃希菌对替加环素异质性耐药的机制[J].分子诊断与治疗杂志,2021,13(2):178-182.
- [3] Feßler AT, Wang Y, Wu C, et al. Mobile macrolide resistance genes in staphylococci [J]. Plasmid, 2018, 99: 2-10.
- [4] 何秋莹,张智贤,曾华,等.2008-2011 年四年我院 560 株 MRSA 的耐药性分析及分子分型[J].中国微生物学杂志,2014,26(1):82-86.
- [5] Nicoloff H, Hjort K, Levin BR, et al. The high prevalence of antibiotic hetero-resistance in pathogenic bacteria is mainly caused by gene amplification [J]. Nature Microbiol, 2019, 4(3): 504-514.

(下转第 1778 页)

Ki67、p63、P504s、LIMK1、Cofilin 免疫组化检测在前列腺病理诊断中的价值

何进* 徐月 沈文婷

[摘要] **目的** 探究免疫组化技术检测 Ki67、p63、P504s、LIMK1、Cofilin 阳性表达对前列腺癌诊断的作用。**方法** 收集南京医科大学附属江苏盛泽医院自 2012 年 3 月至 2021 年 3 月,行前列腺早期穿刺和电切患者 190 例。根据病理诊断结果对样本进行分类,检测各样本中 Ki67、p63、P504s、LIMK1、Cofilin 的阳性表达情况。并检测前列腺癌样本中 Ki67、p63、P504s、LIMK1、Cofilin 的阳性表达情况和临床病理特征的关系。**结果** Ki67、P504s、LIMK1、Cofilin 在前列腺癌中检出阳性率显著升高,p63 阳性率显著降低($P<0.05$)。Ki67、p63、P504s、LIMK1、Cofilin 阳性检出率和患者年龄无关($P>0.05$),和前列腺体积、PSA 浓度、淋巴结转移、临床分期和 Gleason 评分相关($P<0.05$)。**结论** 使用免疫组化技术检测 Ki67、p63、P504s、LIMK1、Cofilin 等前列腺癌标志物,是检测前列腺癌的有效病理诊断方式。

[关键词] 免疫组化; Ki67; p63; P504s; LIMK1; Cofilin; 前列腺癌; 临床诊断

The value of Ki67, p63, P504s, LIMK1, Cofilin immunohistochemical detection in the diagnosis of prostate pathology

HE Jin*, XU Yue, SHEN Wenting

(Department of Pathology, Jiangsu Shengze Hospital, Nanjing Medical University, Suzhou, Jiangsu, China, 215200)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the role of immunohistochemical detection of Ki67, p63, P504S, LIMK1, cofilin in the diagnosis of prostate cancer. **Methods** From September 2018 to September 2020, 320 patients with prostate related surgery and treatment in our hospital were collected. The samples were classified according to the pathological diagnosis results, and the positive expressions of Ki67, p63, P504S, LIMK1 and Cofilin were detected. The expressions of Ki67, p63, P504S, LIMK1 and Cofilin in prostate cancer samples were detected, and their relationship with clinicopathological features was analyzed. **Results** The positive rates of Ki67, p63, P504S, LIMK1 and cofilin in prostate cancer were significantly increased ($P<0.05$). The positive detection rate of Ki67, p63, P504s, LIMK1, Cofilin is not related to the age of the patient ($P>0.05$), and is related to prostate volume, PSA concentration, lymph node metastasis, clinical stage and Gleason score ($P<0.05$). **Conclusion** The use of immunohistochemical technology to detect prostate cancer markers such as Ki67, p63, P504s, LIMK1, Cofilin, is an effective pathological diagnosis method for the detection of prostate cancer.

[KEY WORDS] Immunohistochemistry; Ki67; p63; P504s; LIMK1; Cofilin; Prostate cancer; Clinical diagnosis

基金项目:南京医科大学康达学院科研发展基金(KD2018KYJJYB031)

作者单位:南京医科大学附属江苏盛泽医院病理科,江苏,苏州 215200

*通信作者:何进, E-mail: dahhs@163.com

前列腺癌(prostatic cancer, PCa)是男性中高发恶性肿瘤之一,其死亡率仅次于肺癌,严重危害全球男性的生命健康^[1-2]。目前,对于前列腺癌的早期诊断主要包括血清前列腺特异性抗原(Prostate specific antigen, PSA)含量检测、早期肿瘤穿刺活检和病理诊断,很大程度提高前列腺癌检出率^[3-4]。但由于前列腺癌具有起病隐匿、发病早期症状不明显、疾病早期发展慢等特点^[5-6],临床上仍需进一步提高检出率,进而达到早诊断,早治疗的目的,提高前列腺癌患者生存率。随着医疗和科技水平的发展,免疫组织化学技术(简称免疫组化)在肿瘤中的协助诊断得到越来越广泛的应用^[7-9]。在本研究中,通过收集前列腺相关手术样本,免疫组化检测各样本中相关标志物的表达情况。探究免疫组化技术在前列腺癌病理诊断中的价值,现报道如下。

1 资料与方法

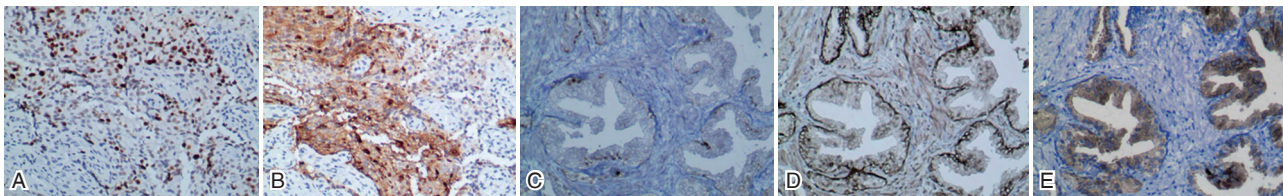
1.1 一般资料

收集自2012年3月至2021年3月,南京医科大学附属江苏盛泽医院收治的行前列腺穿刺和电切活检的患者190例。其中良性前列腺增生(benign prostatic hyperplasia, BPH)患者161例,年龄为43~74岁,平均年龄为(57.24±6.37)岁,患者血清PSA含量均在0~10 μg/L之间。前列腺癌患者29例,年龄为41~75岁,平均年龄为(53.86±7.38)岁,所有患者血清PSA含量均大于4 μg/L。患者纳入

标准:①此前未经任何前列腺相关药物或化疗等治疗手段。②未合并其他原发性恶性肿瘤。③为何任何感染性疾病。④患者病历资料完整。⑤自愿签署知情同意书。患者排除标准:①合并感染性疾病。②合并其他恶性肿瘤。③合并感染性疾病。④合并其他生殖系统相关的内分泌疾病。⑤肝肾功能异常。⑥患者病历资料不全。⑦未签署或非自愿签署知情同意书。所有患者均签署知情同意书,本研究经院伦理委员会审批通过。

1.2 指标检测

检测各穿刺活检样本中Ki67、p63、P504s、LIM激酶(LIM Kinase1, LIMK1)、丝切蛋白(Cofilin)的阳性检出情况。收集患者穿刺活检样本,使用10%甲醛进行固定,对组织进行常规处理后进行石蜡包埋。将制作好的蜡块进行切片,切片厚度为2 μm。对处理好的切片进行免疫组化染色,见图1。分别进行Ki67(GT209402,基因科技(上海)股份有限公司)、p63(GM7247002,基因科技(上海)股份有限公司)、P504s(13H4,基因科技(上海)股份有限公司)、LIMK1(bs-2775R,北京博奥森生物技术有限公司)、Cofilin(bs-2759R,北京博奥森生物技术有限公司)一抗染色。以细胞核或胞浆中出现棕黄色颗粒为染色阳性。使用光学显微镜,随机选取5个视野进行阳性细胞比例计数。当阳性细胞比例大于10%,则认定为表达阳性^[7]。典型病例图片见图1。



注:A为Ki67病理图;B为p63病理图;C为P504s病理图;D为LIMK1病理图;E为Cofilin病理图。

图1 Ki67、p63、P504s、LIMK1、Cofilin免疫组化典型病例染色图(SP, ×400)

Figure 1 Immunohistochemical staining of Ki67, p63, P504S, LIMK1 and cofilin in typical cases (SP, ×400)

1.3 统计学分析

采用SPSS 20.0进行统计学分析;计数资料采用 $n(\%)$ 表示,组间样本比较采用 χ^2 检验;以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Ki67、p63、P504s、LIMK1、Cofilin在不同样本类型中的阳性检出情况

和BPH样本相比,PCa样本中Ki67、P504s、

LIMK1、Cofilin阳性检出率均显著升高,p63阳性检出率显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表1。

2.2 Ki67、p63、P504s、LIMK1、Cofilin阳性检出率和前列腺癌临床病例特征的关系

Ki67、p63、P504s、LIMK1、Cofilin阳性检出率和患者年龄无关($P > 0.05$),和前列腺体积、PSA浓度、淋巴结转移、临床分期和Gleason评分相关($P < 0.05$)。见表2。

表1 Ki67、p63、P504s、LIMK1、Cofilin 在不同样本类型中的阳性检出情况 [n(%)]

Table 1 positive detection of Ki67, p63, P504S, LIMK1 and cofilin in different sample types [n(%)]

检测项目	BPH(n=161)	PCa(n=29)	χ^2 值	P值
Ki67 阳性	10(6.21)	23(79.31)	91.490	<0.001
p63 阳性	143(88.82)	6(20.69)	72.190	<0.001
P504s 阳性	16(9.94)	24(82.76)	78.400	<0.001
LIMK1 阳性	8(4.97)	26(89.66)	119.900	<0.001
Cofilin 阳性	12(7.45)	25(86.21)	97.190	<0.001

表2 Ki67、p63、P504s、LIMK1、Cofilin 阳性检出率和前列腺癌临床病例特征的关系 [n(%)]

Table 2 Relationship between Ki67, p63, P504S, LIMK1, cofilin positive rate and clinical features of prostate cancer [n(%)]

临床病理特征	Ki67 阳性 (n=23)	χ^2 值	P值	p63 阳性 (n=6)	χ^2 值	P值	P504s 阳性 (n=24)	χ^2 值	P值	LIMK1 阳性 (n=26)	χ^2 值	P值	Cofilin 阳性 (n=25)	χ^2 值	P值
年龄(岁)		1.025	0.311		3.468	0.062		2.435	0.119		0.453	0.501		1.007	0.316
≤65(n=14)	10(34.48)			4(13.79)			10(34.48)			12(41.38)			13(44.83)		
>65(n=15)	13(44.83)			2(6.90)			14(48.28)			14(48.28)			12(41.38)		
前列腺体积(cm ³)		13.750	<0.001		7.991	0.004		5.541	0.019		6.358	0.012		8.816	0.003
<35(n=10)	4(13.79)			5(17.24)			6(20.69)			7(24.14)			19(65.52)		
≥35(n=19)	18(62.07)			1(3.45)			18(62.07)			19(65.52)			6(20.69)		
淋巴结转移		9.668	0.002		9.668	0.002		13.430	<0.001		7.436	0.006		4.191	0.041
是(n=20)	19(65.52)			1(3.45)			20(68.97)			20(68.97)			19(65.52)		
否(n=9)	4(13.79)			5(17.24)			4(13.79)			6(20.69)			6(20.6)		
临床分期		5.490	0.019		10.720	0.001		8.559	0.003		4.740	0.030		6.573	0.010
<T3(n=12)	7(24.14)			6(20.69)			7(24.14)			9(31.03)			8(27.59)		
≥T3(n=17)	16(55.17)			0(0.00)			17(58.62)			17(58.62)			17(58.62)		
Gleason 评分/分		4.535	0.033		9.311	0.002		7.436	0.006		4.118	0.042		5.711	0.017
<7(n=13)	8(27.59)			6(20.69)			8(27.59)			10(34.48)			9(31.03)		
≥7(n=16)	15(51.72)			0(0.00)			16(55.17)			16(55.17)			16(55.17)		

性,有可能造成患者生存获益较小或过度治疗等情况^[12]。肿瘤穿刺活检对肿瘤取样部位、医生的操作技术等均具有一定的要求^[13]。并且由于前列腺癌的异质性,病理早期可能不易发现前列腺癌细胞的典型诊断特点,进而导致误诊或漏诊等情况发生^[14]。因此寻找更好的诊断手段有利于提高前列腺癌的早期诊断,并有利于提高患者的生存期,改善患者预后情况。

肿瘤穿刺活检是确诊前列腺癌的首选办法,免疫组化技术检测肿瘤相关标志物,协助诊断肿瘤的早期病理诊断,目前在医学上发展迅速^[15]。Ki67 是反应细胞增殖的核抗原,是反映细胞过度增殖的表达,其在正常组织中表达很低,在良性增生组织和癌组织中表达异常升高。且肿瘤分化程度越低,恶性程度越大,Ki67 则越强,其对肿瘤的生物行为学和预后具有一定的指导意义。但仅通过检测 Ki67 的表达判断前列腺癌,会造成假阳性较高的情况^[16]。p63 属于 p53 抑癌基因家族成员之一,可特

3 讨论

前列腺癌是严重威胁男性生命健康的癌症之一^[10]。我国男性前列腺癌发病率虽远低于西方国家,但由于饮食结构的改变,人口老龄化等原因,我国前列腺癌发病率正逐年升高^[11]。目前普遍认可的前列腺癌诊断方式主要包括血清 PSA 含量检测、肿瘤穿刺活检和病理诊断。但血清 PSA 含量的检测在早期前列腺癌诊断中具有较大的局限

异性标记基底细胞,其在大多数前列腺良性增生或低级别上皮内瘤中呈阳性表达,在高级别上皮内瘤中 p63 阳性表达成间断性消失,在前列腺癌中绝大多数呈阴性表达。基底细胞消失是前列腺癌的重要依据,但由于 p63 在基底细胞中呈间断性表达,其阴性结果不能作为前列腺癌诊断的单独因素,且 p63 表达消失时间较长,不利于前列腺癌的早期诊断^[17]。P504s 蛋白属于细胞质蛋白,在前列腺癌中表达升高,在前列腺癌诊断中具有非常重要的作用,但临床上存在前列腺良性病变中 P504s 表达阳性的情况,具有一定的假阳性情况^[18]。目前临床主要通过 Ki67、p63、P504s 联合检测进行前列腺癌病理诊断,其联合检测可显著提高临床前列腺癌检出率,但其灵敏度和特异性,以及在前列腺癌的早期诊断中仍存在一定局限。LIMK1 是一种丝氨酸-苏氨酸蛋白, Cofilin 是一种肌动蛋白结合蛋白。LIMK1 和 Cofilin 蛋白均在前列腺癌组织中表达升高^[19]。本研究结果显示,前列腺癌相关标志物

Ki67、P504s在前列腺癌中的阳性检出率远高于良性前列腺增生样本,p63阳性检出率检出低于良性前列腺增生样本,这与先前的研究一致。LIMK1、Cofilin在前列腺癌中的阳性检出率显著升高,且一定程度上高于Ki67、P504s阳性检出率。

提示联合前列腺癌相关标志物 Ki67、p63、P504s、LIMK1、Cofilin 的检测,可显著提高前列腺癌早期检出率。同时将前列腺癌各样本中前列腺癌相关标志物 Ki67、p63、P504s、LIMK1、Cofilin 的阳性检出情况和前列腺癌样本临床病例特征进行对比,发现 Ki67、p63、P504s、LIMK1、Cofilin 的阳性检出率和前列腺癌患者前列腺体积、淋巴结转移、临床分期和 Gleason 评分相关。进一步提示可通过免疫组化技术检测标志物的表达,进一步定位患者临床分期,从而制定更合适的治疗方案,提高前列腺癌患者治疗获益,改善前列腺癌预后生存情况。

综上所述,免疫组化技术对前列腺癌标志物的检测对前列腺癌临床诊断具有重要的意义。对肿瘤标志物的联合检测对提高临床检出率具有重要的价值。

参考文献

- [1] 邓芝云,董菊子,张峰,等.前列腺特异性抗原密度在前列腺癌诊断中的价值[J].临床军医杂志,2010,38(6):975-976.
- [2] 李显永,官润云,柯坤彬,等.甲基转移酶3在前列腺癌中的表达及其临床意义[J].实用医学杂志,2019,35(1):75-79.
- [3] 延敏博,练文飞,黄书畅,等.PD-L1和PD-1在前列腺癌中的表达及其临床意义[J].亚洲外科手术病例研究,2019,8(2):9-14.
- [4] 忻志祥. INSM1在神经内分泌前列腺癌诊断及预后评估中的作用研究[D].上海:上海交通大学,2019.
- [5] 郭睿,田怡,金雪媛,等.胸苷酸合成酶免疫组化染色在标记前列腺基底细胞中的应用[J].山西医科大学学报,

- 2019, 50(5):658-663.
- [6] 史涛,杭震宇,沈露明. LIMK1和Cofilin蛋白在前列腺癌组织中的表达及其临床意义[J].医学临床研究,2020,37(4):525-527+531.
- [7] 王君可.经直肠超声引导下前列腺穿刺活检120例临床病理特征与免疫组化分析[J].中国基层医药,2020,27(14):1751-1754.
- [8] 赖己创,曾宝辉,陈佳琳,等.超声引导下前列腺穿刺病理标本免疫学指标与前列腺癌相关性[J].实用医学杂志,2019,35(6):898-902.
- [9] Magi-Galluzzi C. Prostate cancer: diagnostic criteria and role of immunohistochemistry [J]. Mod Pathol, 2018, 31 (S1): S12-21.
- [10] 王晖,徐雪莹,张徐.miR-381靶向MAP3K2抑制前列腺癌细胞增殖、迁移和侵袭[J].江苏大学学报(医学版),2019,29(3):208-215.
- [11] 冯国亮,张建伟,徐泉泉,等. IGF-IR与前列腺癌发生发展及预后的关系[J].分子诊断与治疗杂志,2020,12(3):327-331.
- [12] 刘慧,红华.前列腺癌超声造影参数与其Ki-67蛋白表达的相关性研究[J].临床超声医学杂志,2020,25(5):21-25.
- [13] 王大鹏.快速免疫组化技术检测在前列腺穿刺组织冰冻切片诊断中的应用价值[J].首都食品与医药,2019,26(18):27-27.
- [14] 邹恩泽,才艳红. TMEFF2和LTF基因在前列腺癌和正常前列腺组织中差异表达的研究[J].中国医刊,2020,55(3):334-337.
- [15] 宋旭,王蓉,张圣熙,等. HSF1和4-HNE的过度表达对前列腺癌恶性表型的影响[J].中华男科学杂志,2020,26(8):51-54.
- [16] 刘胜辉,赵岩,徐玉茹,等. MAGE-A9,MAGE-A11和Ki67在喉鳞状细胞癌组织中的表达及其临床意义[J].中国肿瘤生物治疗杂志,2019,147(12):65-71.
- [17] 李冰.免疫组化在前列腺穿刺活检中的诊断意义[J].首都食品与医药,2019,26(24):13.
- [18] 赖己创,曾宝辉,陈佳琳,等.超声引导下前列腺穿刺病理标本免疫学指标与前列腺癌相关性[J].实用医学杂志,2019,35(6):898-902.
- [19] 瞿根义,阳光,徐勇. LIMK1与前列腺癌侵袭转移的研究进展[J].临床与病理杂志,2018,38(1):162-166.

(上接第1774页)

- [6] Andersson DI, Nicoloff H, Hjort K. Mechanisms and clinical relevance of bacterial heteroresistance [J]. Nature Rev Microbiol, 2019, 17(8): 479-496.
- [7] Ruud H. Deurenberg, Ellen E. Stobberingh. The Molecular Evolution of Hospital- and Community-Associated Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus [J]. Curr Mol Medi, 2009, 9(2): 100-115.
- [8] 林娅,叶永志,屠雷钧,等.耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 SCCmec 基因分型及耐药性分析[J].中国现代应用药学,2021,38(2): 184-188.
- [9] 马筱铃,王敬华,李华.异质性万古霉素耐药葡萄球菌分离及生物学特性观察[J].中华微生物学和免疫学杂志,2004,24: 583-586.
- [10] 毕少杰.济南地区异质性万古霉素中介金黄色葡萄球菌的分离率及方法研究[D].济南:山东大学,2010.
- [11] 刘彩林,明亮.异质性万古霉素中介金黄色葡萄球菌的流行性及mgrA基因对万古霉素耐药性影响的研究[J].中国抗生素杂志,2020,45(2):175-180.

术前 Lp-PLA2、PLR 联合术后 HPR 预测 AMI 患者 PCI 术后半年内 MACE 的价值

朱晓明 黄勇先*

【摘要】目的 探讨术前脂蛋白相关磷脂酶 A2 (Lp-PLA2)、血小板计数与淋巴细胞计数比值 (PLR) 联合术后血小板高反应性 (HPR) 预测急性心肌梗死 (AMI) 患者经皮冠状动脉介入治疗 (PCI) 术后半年内心血管不良事件 (MACE) 的价值。**方法** 选取 2018 年 8 月至 2020 年 6 月于东南大学附属中大医院无锡分院接受 PCI 手术的 102 例急性心肌梗死患者, PCI 术后随访 6 个月, 根据患者是否发生 MACE 分为 MACE 组和非 MACE 组。比较两组 Lp-PLA2、PLR、HPR 水平, 分析影响急性心肌梗死患者 PCI 术后 MACE 发生的独立危险因素。**结果** MACE 组 Lp-PLA2、PLR 水平和 HPR 比例均明显高于非 MACE 组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。非条件多因素 logistic 回归模型分析显示, 年龄 (≥ 65 岁)、有心衰病史、Lp-PLA2 (异常升高)、PLR (异常升高)、HPR 为影响急性心肌梗死患者 PCI 术后 MACE 事件发生的独立危险因素 ($P < 0.05$)。**结论** 术前 Lp-PLA2、PLR 水平及术后 HPR 为影响患者预后的独立危险因素, 通过检测三者可为 AMI 患者 PCI 术后半年内 MACE 事件提供有效的预测信息, 以采取积极预防措施, 改善患者预后。

【关键词】 急性心肌梗死; 冠状动脉介入治疗术; 血管不良事件; 脂蛋白酶相关磷脂酶 A2; 血小板计数与淋巴细胞计数比值

Preoperative Lp-PLA2 and PLR combined with postoperative HPR predicts the value of MACE within six months after PCI in AMI patients

ZHU Xiaoming, HUANG Yongxian*

(Wuxi Branch of Zhongda Hospital Affiliated to Southeast University, Wuxi, Jiangsu, China, 214000)

【ABSTRACT】Objective To explore the value of preoperative lipoprotein associated phospholipase A2 (Lp-PLA2), platelet to lymphocyte ratio (PLR) combined with postoperative high platelet reactivity (HPR) predicting major adverse cardiovascular events (MACE) of patients with acute myocardial infarction (AMI) after PCI in six months. **Methods** 102 patients with acute myocardial infarction who were treated with PCI surgery in Wuxi Branch of Zhongda Hospital Affiliated to Southeast University from August 2018 to June 2020 were selected. The patients were followed up for 6 months after PCI. According to whether the patients had MACE or not, they were divided into the MACE group and the non-MACE group. The levels of Lp-PLA2, PLR, and HPR in the two groups were compared, and the independent risk factors that affected the occurrence of MACE events after PCI in patients with acute myocardial infarction were analyzed. **Results** The levels of Lp-PLA2, the PLR and HPR ratio in the MACE group were significantly higher than those in the non-MACE group. The difference was statistically significant ($P < 0.05$). Analysis of unconditional multivariate logistic regression model showed that age (≥ 65), history of heart failure, Lp-PLA2 (abnormal increase), PLR (abnormal increase), and HPR were independent risk factors that affect MACE events after PCI in patients with acute myocardial infarction ($P < 0.05$). **Conclusion** The preoperative Lp-PLA2, PLR levels and postoperative

基金项目: 无锡市卫生计生委科研项目 (Q201823)

作者单位: 东南大学附属中大医院无锡分院, 江苏, 无锡 214000

*通信作者: 黄勇先, E-mail: hyongxian@163.com

HPR are independent risk factors that affect the prognosis of patients. The detection of the three can provide effective predictive information for MACE events within six months after PCI in AMI patients, to take active preventive measures and improve the patient's prognosis.

[KEY WORDS] Acute myocardial infarction; PCI; MACE; Lp-PLA2; PLR

急性心肌梗死 (acute myocardial infarction, AMI) 是因冠状动脉急性、持续性缺血、缺氧造成的心肌坏死情况。经皮冠状动脉介入治疗 (percutaneous coronary intervention, PCI) 现已被广泛应用于 AMI 治疗中。但 PCI 术后患者可出现严重心血管不良事件 (major adverse cardiovascular events, MACE), 据统计, 2015 年全世界死亡人群中约 31% 是由 MACE 导致的^[1]。全球急性冠状动脉事件注册危险评分 (global registry of acute coronary events, GRACE) 为目前常用于预测 MACE 发生率的工具, 但研究指出, GRACE 评分的 c-统计量仅为 0.75, 这说明其对 MACE 的预测价值有限^[2]。此外, PCI 术后常予以抗血小板治疗, 但因部分患者对抗血小板药物存在抵抗现象, 致使患者仍存在血小板高反应性 (high platelet reactivity, HPR), 而 HPR 极易造成血栓、血小板聚集^[3]。脂蛋白相关磷脂酶 A2 (lipoprotein associated phospholipase A2, Lp-PLA2) 为新型炎症因子, 由淋巴细胞与巨噬细胞合成分泌, 参与 AMI 发生、发展的各个阶段^[4]。血小板计数与淋巴细胞计数比值 (Platelet to lymphocyte ratio, PLR) 是用于观察炎症反应的指标, 相关研究证实 PLR 对评估机体免疫反应具有重要作用^[5]。本研究对术前 Lp-PLA2、PLR 联合术后 HPR 预测 AMI 患者 PCI 术后半年内 MACE 的价值进行分析, 旨在为临床预防提供依据, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 基本资料

选取 2018 年 8 月至 2020 年 6 月于东南大学附属中大医院无锡分院接受 PCI 手术的 102 例 AMI 患者作为研究对象。纳入标准: ①皆满足《心脏病学》中关于 AMI 诊断^[6], 且经影像学检查确诊; ②皆

满足《心脏病学》中 PCI 治疗指征者^[6]; ③皆为首次进行 PCI 治疗者; ④患者对研究内容知情了解且自愿参加。排除标准: ①合并血液系统疾病、感染、恶性肿瘤、严重肝肾功能不全、重大创伤者; ②处于妊娠或哺乳期女性; ③合并慢性充血性心力衰竭、严重左心衰竭、心肌病者; ④不能接受随访者。

研究对象 PCI 术后随访 6 个月, 术后治疗以及随访措施均一致, 随访时间截至 2020 年 12 月, 根据患者是否发生 MACE^[7] (包括心源性死亡、心肌梗死复发、心力衰竭、靶血管重建、恶性心律失常等), 分为 MACE 组和非 MACE 组。2 组患者基本资料比较差异无统计学意义 ($P>0.05$), 具有可比性, 见表 1。本研究经医院医学伦理委员会批准通过。

1.2 方法

1.2.1 Lp-PLA2、PLR、HPR 检测方法

所有患者在术前 1 天清晨空腹常规采肘前静脉血 10 mL, 血液标本经凝血反应-离心-取上清-冷冻 (-80°C) 待测。采用酶联免疫吸附分析检测 Lp-PLA2, 检测仪器: 美国 Bio Tek 的酶标仪, 试剂盒由美国 R&D 公司提供。采用贝克曼库尔特 LH-750 全自动五分类血液分析仪进行外周血淋巴细胞计数和血小板计数检测, 根据检测结果记录或计算同一时间点抽取的同一血液标本中血小板计数与淋巴细胞的比值, 得出 PLR。于 PCI 术后 24 h 采用光密度比浊法进行血小板聚集试验, 检测仪器: 美国 Helena 公司的 AggRAM 血小板聚集功能检测仪及其配套的二磷酸腺苷 (adenosine diphosphate, ADP) 诱导剂。具体方法均严格按照操作说明书执行。Lp-PLA2 $\geq 200 \mu\text{g/L}$ 即为异常升高, PLR ≥ 103.72 即为异常升高, 血小板聚集率 $\geq 50\%$ 则为 HPR^[8]。

表 1 两组患者基本资料比较 [$n(\%)$, ($\bar{x} \pm s$)]

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

组别	n	男/女	平均年龄 (岁)	梗死部位		高血压病史	糖尿病史
				前壁	下壁		
MACE 组	44	31/13	56.32 $\pm$ 6.48	35 (79.55)	9 (20.45)	17 (38.64)	13 (29.55)
非 MACE 组	58	43/15	57.83 $\pm$ 7.21	42 (72.41)	16 (27.59)	21 (36.21)	18 (31.03)
χ^2 值		0.170	1.094	0.688		0.063	0.026
P 值		0.680	0.277	0.407		0.802	0.871

1.3 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析。计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,行 t 检验;计数资料采用 $n(\%)$ 表示,行 χ^2 检验;影响因素采用多元 Logistic 回归分析,以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 两组 Lp-PLA2、PLR、HPR 比较

所有患者均成功完成随访,其中 MACE 组 44 例患者,非 MACE 组 58 例患者。MACE 组 Lp-PLA2、PLR 水平及 HPR 比例均明显高于非 MACE 组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 两组 Lp-PLA2、PLR、HPR 比较 [$n(\%)$, $(\bar{x} \pm s)$]

Table 2 Comparison of Lp-PLA2, PLR and HPR between the two groups [$n(\%)$, $(\bar{x} \pm s)$]

组别	n	Lp-PLA2 (ng/mL)	PLR	血小板聚集	
				HPR	非 HPR
MACE 组	44	275.43±109.38	189.71±64.65	34 (77.27)	10 (22.73)
非 MACE 组	58	174.28±86.37	144.21±52.77	22 (37.93)	34 (58.62)
t/χ^2 值		5.219	3.912	15.640	
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	

2.2 影响 AMI 患者 PCI 术后 MACE 事件发生的单因素分析

患者性别、梗死部位、高血压史、糖尿病史非影响 AMI 患者 PCI 术后 MACE 事件发生的单因素($P > 0.05$),年龄、心衰病史、Lp-PLA2 及 PLR 表达、HPR 为影响 AMI 患者 PCI 术后 MACE 事件发生的单因素($P < 0.05$)。见表 3。

2.3 影响 AMI 患者 PCI 术后 MACE 事件发生的多因素分析

非条件多因素 logistic 回归模型分析显示,年龄(≥ 65 岁)、有心衰病史、Lp-PLA2 (异常升高)、PLR (异常升高)、HPR 为影响 AMI 患者 PCI 术后 MACE 事件发生的独立危险因素($P < 0.05$),见表 4。

3 讨论

AMI 患者有效治疗方式为 PCI 术,但由于患

表 3 影响 AMI 患者 PCI 术后 MACE 事件发生的单因素分析 [$n(\%)$]

Table 3 single factor analysis of mace events in patients with acute myocardial infarction after PCI [$n(\%)$]

变量	n	MACE($n=44$)	χ^2 值	P 值
年龄(岁)	≥ 65 岁	43	25 (56.82)	6.820 0.009
	< 65 岁	59	19 (43.18)	
性别	男	74	29 (65.91)	1.713 0.191
	女	28	15 (34.09)	
梗死部位	前壁	77	35 (79.55)	0.688 0.407
	下壁	25	9 (20.45)	
心衰病史	有	33	22 (50.00)	11.011 0.001
	无	69	22 (50.00)	
高血压史	有	38	13 (29.55)	1.968 0.161
	无	64	31 (70.45)	
糖尿病史	有	31	12 (27.27)	0.356 0.551
	无	71	32 (72.73)	
Lp-PLA2	异常升高	59	36 (81.82)	52.306 <0.001
	正常	43	8 (18.18)	
PLR	异常升高	62	37 (84.09)	17.633 <0.001
	正常	40	7 (15.91)	
血小板聚集	HPR	56	34 (77.27)	15.640 <0.001
	非 HPR	46	10 (22.73)	

者冠状动脉中存在大量血栓,经 PCI 治疗后虽可使冠状动脉狭窄部分或全部解除,大血管血流恢复,但脱落的血栓可导致远端微循环栓塞,造成心肌组织复流欠佳甚至无复流,严重影响远期的预后效果。相关研究认为 PCI 术后 MACE 是导致 AMI 患者病情恶化或病死率增加的主要原因^[9]。因此,如何准确预测 AMI 患者 PCI 术后 MACE 发生风险是近年来研究的热点。

Lp-PLA2 为血小板活化因子乙酰水解酶,是一种新兴的炎性生化标志物,能生成溶血卵磷脂、氧化游离脂肪酸等促炎物质,提升细胞因子以及粘附因子的表达,促进内皮细胞的凋亡,最终聚集成动脉粥样硬化性斑块。研究指出,Lp-PLA2 水平越高则会导致体内斑块越多,也易造成斑块破裂,而一旦斑块破裂,则会导致毛细血管网障碍,加剧心肌组织缺氧及缺血程度,诱发 MACE 事件的发生^[10]。Ren 等^[11]研究显示,Lp-PLA2 是比 CRP 更有前景的风险预测标志物。Wang 等人^[12]研究表

表 4 影响 AMI 患者 PCI 术后 MACE 事件发生的多因素分析

Table 4 multivariate analysis of mace events in patients with acute myocardial infarction after PCI

变量	回归系数	标准误	wald χ^2 值	OR 值	95%CI 值	P 值
心衰病史:有(参照组:无)	0.642	0.228	5.864	1.900	1.215~2.971	0.012
Lp-PLA2:异常升高(参照组:正常)	0.916	0.425	6.527	2.499	1.087~5.749	<0.001
PLR:异常升高(参照组:正常)	0.741	0.354	7.398	2.098	1.048~4.199	<0.001
血小板聚集:HPR(参照组:非 HPR)	0.843	0.321	7.246	2.323	1.238~4.359	<0.001
年龄 ≥ 65 岁(参照组: < 65 岁)	0.535	0.132	5.488	1.707	1.318~2.212	<0.001

明, Lp-PLA2可能对行PCI治疗的AMI患者的预后具有预测价值。PLR是血小板计数与淋巴细胞计数比值, 相关研究发现, 血小板可分泌P选择素黏附因子, 促使炎性及内皮细胞致密黏附^[13]。Luo等^[14]研究指出, PLR与机体炎症状态和血栓状态存在一定相关性。Zhang等^[15]研究证实, PLR与AMI患者PCI术后发生MACE事件密切相关。并且PLR可分泌血管内皮生长因子, 致使内皮细胞增殖、迁移, 并提升组织血管通透性。研究认为HPR可能造成不良的临床预后, 包括支架血栓形成、心肌梗死等^[16]。相关文献指出, HPR与MACE事件的发生存在一定的关联, 尤其是采用氯吡格雷治疗的患者^[17]。氯吡格雷为ADP受体阻滞剂, 是PCI术后标准的抗血小板治疗药物, 通过不可逆地与P2Y₁₂-ADP受体结合以发挥抑制血小板聚集的作用。Shah等^[18]报道, 即使在PCI术后进行充分的抗血小板治疗, 但对氯吡格雷存在药物抵抗的患者仍存在HPR。Lp-PLA2、PLR的表达上升和血小板的聚集会加重患者的心肌损伤, 致使患者心功能的下降, 增加MACE事件的发生几率。本研究通过进一步分析显示, 年龄、心衰病史、Lp-PLA2、PLR、HPR均为影响AMI患者PCI术后MACE事件发生的独立危险因素, 提示上述指标可作为评估AMI患者PCI术后MACE事件的重要指标。

综上所述, AMI患者PCI术后6月内发生MACE事件的患者术前Lp-PLA2、PLR水平明显高于未发生MACE事件的患者, 且术后HPR发生率也高于未发生MACE事件的患者, 三者为影响患者预后的独立危险因素。临床医务工作者可通过监测上述指标, 以便及时采取预防性针对措施, 降低PCI术后MACE事件的发生率。

参考文献

- [1] 白光辉. 血小板高反应性、Lp-PLA2及GRACE评分联合评估对AMI患者急诊PCI术后的预后价值[D]. 天津: 天津医科大学, 2017, 23(1): 1-41.
- [2] 王素玲, 贾永平, 何丽娟. GRACE评分联合血清Lp-PLA2 NT-proBNP水平监测在急性心肌梗死患者PCI术后MACE事件预测中的应用[J]. 河北医学, 2019, 25(5): 737-742.
- [3] Yuyun MF, Narayan HK, Quinn PA, et al. Prognostic value of human mature adrenomedullin in patients with acute myocardial infarction[J]. J Cardio Med, 2017, 18(1): 42-50.
- [4] Liu PY, Su CH, Kuo FY, et al. Prasugrel switching from clopidogrel after percutaneous coronary intervention for acute coronary syndrome in Taiwanese patients: an analysis of safety and efficacy[J]. Card Interv Ther, 2021, 23(14): 12-16.
- [5] Huang FM, Peng Q, Han J, et al. Analysis of Relationship Between LDL-C Level and Cardiovascular Events After PCI in Patients with Acute Myocardial Infarction[J]. Label Immun Clin Med, 2018, 23(8): 863-865.
- [6] 陈鑫森, 邵萌, 张天, 等. 血液学参数预测急性ST段抬高型心肌梗死患者经皮冠状动脉介入治疗术后发生主要MACE事件的价值研究[J]. 中国全科医学, 2020, 23(27): 3389-3395.
- [7] Xia B, Zg A, Dza B, et al. High-efficiency multi-crystalline black silicon solar cells achieved by additive assisted Ag-MACE-ScienceDirect[J]. Solar Energy, 2020, 195(3): 176-184.
- [8] 徐伟干, 岑锦明, 符岳, 等. 急性心肌梗死患者CYP2C19基因多态性分布及氯吡格雷治疗对PCI术后不良心血管事件和再狭窄的影响[J]. 临床急诊杂志, 2020, 21(4): 49-56.
- [9] 刘汉毅, 杜小杰, 王金墙, 等. miR-126、miR-96与急性心肌梗死患者血小板活化及近期预后相关性[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(8): 1022-1025+1038.
- [10] 周允, 魏利龙, 张瑞苹, 等. 冠心病患者血清CTRP3与Lp-PLA2水平监测的临床价值分析[J]. 中华检验医学杂志, 2021, 44(7): 609-614.
- [11] Ren Y, Gao S, Zhao K, et al. Predictive value of procalcitonin for major adverse cardiovascular events in patients with acute ST segment elevation myocardial infarction undergoing emergency PCI[J]. J Clin Cardiol, 2018, 28(4): 34-37.
- [12] Wang YP, Wang JH, Wang XL, et al. Roles of ST2, IL-33 and BNP in predicting major adverse cardiovascular events in acute myocardial infarction after percutaneous coronary intervention[J]. J Cell Mol Med, 2017, 50(1): 138-146.
- [13] Long B, April MD. In Patients With Acute Myocardial Infarction and No Hypoxemia, Does Oxygen Therapy Improve Outcomes Compared With No Supplemental Oxygen? [J]. Ann Emerg Med, 2018, 23(7): 1269-1271.
- [14] Luo G, Li Q, Duan J, et al. The Predictive Value of Fragmented QRS for Cardiovascular Events in Acute Myocardial Infarction: A Systematic Review and Meta-Analysis[J]. Front Physiol, 2020, 11(22): 1027-1028.
- [15] Zhang S, Diao J, Qi C, et al. Predictive value of neutrophil to lymphocyte ratio in patients with acute ST segment elevation myocardial infarction after percutaneous coronary intervention: a meta-analysis[J]. BMC Cardiovasc Disord, 2018, 18(1): 75-76.
- [16] Sui D, Lu D, Shang C, et al. Investigation on response of HPR1000 under different mitigation strategies after SGTR accident[J]. Ann Nuclear Energy, 2018, 112(24): 328-336.
- [17] Lu F, Li S Z, Gao X, et al. Diagnostic value of circulating miR-208b and miR-499 in peripheral blood of patients with acute myocardial infarction[J]. J Biol Regul Homeost Agents, 2020, 34(3): 22-28.
- [18] Shah T, J Chou, Grines C, et al. TCT CONNECT-184 Impact of Sex and Timing of Impella Support in Patients With Acute Myocardial Infarction Complicated by Cardiogenic Shock[J]. J Am Coll Cardiol, 2020, 76(17): B78-B79.

利奈唑胺联合环丝氨酸胶囊治疗肺结核的疗效分析

任淑君^{1*} 刘新¹ 王旭² 赵勇¹

【摘要】目的 探讨利奈唑胺联合环丝氨酸胶囊治疗肺结核的疗效。**方法** 选取本院2019年6月至2020年6月84例肺结核患者作为研究对象,经随机数字表法分为观察组($n=42$)和对照组($n=42$),对照组予以环丝氨酸胶囊治疗,观察组予以利奈唑胺联合环丝氨酸胶囊治疗。比较两组临床疗效、症状改善时间、治疗前后肝功能[天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、碱性磷酸酶(ALP)]、免疫功能[CD3⁺、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺]、血清干扰素- γ (INF- γ)、白细胞介素-6(IL-6)、转化生长因子- β (TGF- β)水平。**结果** 观察组临床治疗总有效率为90.48%,高于对照组的73.81%,差异有统计学意义($P<0.05$)。观察组痰培养转阴时间、空洞闭合时间、病灶吸收缩小时间均短于对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。观察组治疗后AST、ALT、ALP低于对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。观察组治疗后CD3⁺、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺高于对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。观察组治疗后血清INF- γ 水平高于对照组,IL-6、TGF- β 水平低于对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 利奈唑胺联合环丝氨酸胶囊治疗能缓解肺结核患者的临床症状,减少肝功能损伤程度,提高免疫功能。

【关键词】 利奈唑胺;环丝氨酸胶囊;肺结核

Curative effect of linezolid combined with cycloserine capsule on tuberculosis

REN Shujun^{1*}, LIU Xin¹, WANG Xu², ZHAO Yong¹

(1. No.1 Ward, Department of Tuberculosis, Tuberculosis Prevention and Treatment Institute, Shangqiu, Henan, China, 476000; 2. Department of Minimally Invasive Surgery, Henan Chest Hospital, Zhengzhou, Henan, China, 450000)

【ABSTRACT】Objective To explore the curative effect of linezolid combined with cycloserine capsule on tuberculosis. **Methods** A total of 84 patients with tuberculosis in the hospital were enrolled as the research objects from June 2019 to June 2020. They were divided into the observation group ($n=42$) and the control group ($n=42$) by random number table method. The control group was treated with cycloserine capsule, while the observation group was additionally treated with linezolid. The clinical curative effect, symptoms improvement time, levels of liver function [aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP)], immune function [CD3⁺, CD4⁺, CD4⁺/CD8⁺], serum interferon- γ (INF- γ), interleukin-6 (IL-6) and transforming growth factor- β (TGF- β) before and after treatment were compared between the two groups. **Results** The total effective rate of clinical treatment in the observation group was higher than that in the control group (90.48% vs 73.81%) ($P<0.05$). The time for sputum culture to become negative, the time for cavity closure, and the time for lesion absorption and reduction in the observation group were shorter than those in the control group, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). After treatment, the AST, ALT and ALP in the observation group were lower than those in the control group ($P<0.05$). CD3⁺, CD4⁺ and CD4⁺/CD8⁺ were higher than those in the control group ($P<0.05$). The level of serum INF- γ was higher than that in the control group, and the levels of IL-6 and TGF- β were lower than

基金项目:河南省医学科技攻关计划项目(LHGI201906215)

作者单位:1. 商丘市结核病防治所结核内科一病区,河南,商丘 476000

2. 河南省胸科医院微创外科,河南,郑州 450000

*通信作者:任淑君, E-mail: renshujun1976@sina.com

those in the control group ($P < 0.05$). **Conclusion** Linezolid combined with cycloserine capsule can relieve the clinical symptoms of tuberculosis patients, reduce the degree of liver damage, and enhance immune function.

[KEY WORDS] Linezolid; Cycloserine capsule; Tuberculosis

肺结核是结核分枝杆菌感染引起的慢性传染性肺部疾病,具有病程长、传染性强等特点^[1]。现阶段临床一般采用常规化疗方案治疗肺结核,但随着抗结核药物的广泛应用,结核分枝杆菌耐药性不断增加,导致治疗无法达到预期目标^[2]。肺结核患者存在不同程度的免疫功能损伤,也增加了治疗难度^[3]。此外,抗结核药物存在较强的肝毒性作用,长期服用会对肝功能造成损伤^[4]。因此,如何在确保疗效的基础上改善肺结核患者免疫功能、减少肝功能损伤已成为临床研究的热点。环丝氨酸可通过抑制结核分枝杆菌的合成发挥抗结核作用,且耐药率较低^[5]。利奈唑胺是恶唑烷酮类合成抗生素,对结核分枝杆菌耐药菌株具有良好的抗菌活性^[6]。本研究探讨利奈唑胺联合环丝氨酸胶囊治疗肺结核的疗效,现将结果报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取本院2019年6月至2020年6月84例肺结核患者作为研究对象。纳入标准:①符合《肺结核诊断和治疗指南》^[7]中诊断标准;②痰结核菌培养为阳性,经影像学检查确诊;③年龄超过18岁;④首次确诊;⑤近期末接受相关抗结核治疗;⑥药敏试验证明对利奈唑胺、环丝氨酸胶囊不耐药;⑦患者签署知情同意书。排除标准:①合并其他类型肺结核;②对本研究药物过敏者;③合并心、肾、肝功能严重损伤者;④精神、认知功能障碍者;⑤临床资料不全者;⑥合并矽肺、气胸、肺部肿瘤等疾病者;⑦合并感染性疾病、免疫变态反应性疾病者。所有患者经随机数字表法分为观察组($n=42$)和对照组($n=42$)。两组一般资料比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表1。本研究经医学伦理委员会批准。

1.2 方法

两组均接受常规抗结核治疗,2个月强化期予以乙胺丁醇、吡嗪酰胺、利福平及异烟肼治疗,4个月巩固期予以乙胺丁醇、利福平及异烟肼治疗。乙胺丁醇(生产厂家:广东华南药业集团有限公

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

Table 1 Comparison of general data between 2 groups

组别	n	性别		年龄(岁)	体质量指数(kg/m^2)
		男	女		
观察组	42	23(54.76)	19(45.24)	45.28 $\pm$ 5.19	23.21 $\pm$ 1.51
对照组	42	25(59.52)	17(40.48)	44.57 $\pm$ 4.85	22.85 $\pm$ 1.74
χ^2/t 值		0.194		0.648	1.013
P 值		0.659		0.519	0.314

司,H44020758),0.75 g/d;吡嗪酰胺(生产厂家:上海上药信谊药厂有限公司,H31020800),1.5 g/d;利福平(生产厂家:杭州民生药业有限公司,H33022466),0.45 g/d;异烟肼(生产厂家:西南药业股份有限公司,H50020124),0.3 g/d。对照组:在常规抗结核治疗的基础上予以环丝氨酸胶囊治疗,口服环丝氨酸胶囊(生产厂家:Dong-A ST Co. Ltd,H20140984),250 mg/次,2次/d,连续治疗6个月。观察组:在对照组基础上联合利奈唑胺治疗,口服利奈唑胺片(生产厂家:Pfizer Pharmaceuticals LLC,H20090516),600 mg/次,2次/d,连续治疗6个月。

1.3 观察指标

1.3.1 临床疗效

判定标准^[8]:显效:胸部X片显示病灶基本吸收,空洞闭合,痰菌转阴;有效:胸部X片显示病灶及空洞缩小,痰菌转阴;无效:病灶及空洞无变化甚至加重,痰菌阳性。临床治疗总有效率为有效率及显效率之和。

1.3.2 症状改善时间

统计并比较两组痰培养转阴时间、空洞闭合时间、病灶吸收缩小时间。

1.3.3 血清指标

在治疗前、治疗后6个月,于清晨取两组空腹静脉血5 mL,离心速度为3 000 r/min,离心10 min,取上清液存于-80℃环境待用。采用全自动生化分析检测两组血清天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase,AST)、丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase,ALT)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase,ALP)等肝功能指标;采用流式细胞仪检测两组全血 CD_3^+ 、 CD_4^+ 、 $\text{CD}_4^+/\text{CD}_8^+$ 等免

疫功能指标;采用酶联免疫吸附法检测两组血清干扰素- γ (interferon gamma, INF- γ)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)水平。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 20.0 统计学软件分析数据。计量资料采用($\bar{x} \pm s$)表示,组内行配对 t 检验,组间行独立样本 t 检验;计数资料采用 $n(\%)$ 表示,行 χ^2 检验;等级资料比较采用秩和检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组临床疗效比较

观察组临床治疗总有效高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表2。

表2 两组临床疗效比较 [$n(\%)$]

Table 2 Comparison of clinical efficacy between 2 groups

组别	n	显效	有效	无效	总有效率
观察组	42	22(52.38)	16(38.10)	4(9.52)	38(90.48)
对照组	42	16(38.10)	15(35.71)	11(26.19)	31(73.81)
χ^2 值					3.977
P 值					0.046

2.2 两组症状改善时间比较

观察组痰培养转阴时间、空洞闭合时间、病灶吸收缩小时间均短于对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表3。

表3 两组症状改善时间比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of symptom improvement time between the two groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	痰培养转阴时间(d)	空洞闭合时间(d)	病灶吸收缩小时间(d)
观察组	42	48.84 $\pm$ 8.12	102.36 $\pm$ 10.84	42.39 $\pm$ 5.42
对照组	42	69.42 $\pm$ 12.37	138.28 $\pm$ 13.69	50.15 $\pm$ 4.61
t 值		9.014	13.331	7.068
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

2.3 两组治疗前后肝功能比较

治疗前,两组 AST、ALT、ALP 比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。治疗后,两组 AST、ALT、ALP 高于治疗前,但观察组低于对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表4。

2.4 两组治疗前后免疫功能比较

治疗前,两组 CD_3^+ 、 CD_4^+ 、 CD_4^+/CD_8^+ 比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。治疗后,两组 CD_3^+ 、 CD_4^+ 、 CD_4^+/CD_8^+ 高于治疗前,且观察组高于对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表5。

2.5 两组治疗前后血清 INF- γ 、IL-6、TGF- β 水平比较

治疗前,两组血清 INF- γ 、IL-6、TGF- β 水平比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。治疗后,两组血清 INF- γ 水平高于治疗前,且观察组高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。治疗后,两组血清 IL-6、TGF- β 水平低于治疗前,且观察组低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表6。

表4 两组治疗前后肝功能比较 ($\bar{x} \pm s$, U/L)

Table 4 Comparison of liver function between the two groups before and after treatment ($\bar{x} \pm s$, U/L)

组别	n	AST		ALT		ALP	
		治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
观察组	42	25.61 $\pm$ 5.04	51.68 $\pm$ 8.37 ^a	37.52 $\pm$ 6.16	79.28 $\pm$ 10.06 ^a	65.16 $\pm$ 8.51	89.36 $\pm$ 13.69 ^a
对照组	42	26.38 $\pm$ 4.86	72.36 $\pm$ 11.69 ^a	38.14 $\pm$ 5.82	96.37 $\pm$ 14.28 ^a	64.57 $\pm$ 8.23	109.63 $\pm$ 14.27 ^a
t 值		0.713	9.322	0.474	6.341	0.323	6.643
P 值		0.478	<0.001	0.637	<0.001	0.748	<0.001

注:与本组治疗前比较,^a $P < 0.05$ 。

表5 两组治疗前后免疫功能比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Comparison of immune function between the two groups before and after treatment ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	$CD_3^+(\%)$		$CD_4^+(\%)$		CD_4^+/CD_8^+	
		治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
观察组	42	57.26 $\pm$ 4.15	67.35 $\pm$ 6.68 ^a	32.83 $\pm$ 4.61	45.63 $\pm$ 6.04 ^a	1.22 $\pm$ 0.34	1.89 $\pm$ 0.45 ^a
对照组	42	56.81 $\pm$ 4.92	62.39 $\pm$ 5.43 ^a	33.26 $\pm$ 4.24	39.71 $\pm$ 5.43	1.27 $\pm$ 0.36	1.54 $\pm$ 0.41 ^a
t 值		0.453	3.734	0.445	4.724	0.654	3.726
P 值		0.652	<0.001	0.658	<0.001	0.515	<0.001

注:与本组治疗前比较,^a $P < 0.05$ 。

表6 两组治疗前后血清INF- γ 、IL-6、TGF- β 水平比较($\bar{x} \pm s$)Table 6 serum inf before and after treatment in two groups- γ 、IL-6、TGF- β Level comparison ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	INF- γ (ng/L)		IL-6(ng/L)		TGF- β (ng/mL)	
		治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
观察组	42	18.39 $\pm$ 2.73	42.17 $\pm$ 5.68 ^a	50.47 $\pm$ 7.06	36.38 $\pm$ 6.33 ^a	65.36 $\pm$ 10.79	32.68 $\pm$ 6.24 ^a
对照组	42	17.84 $\pm$ 3.01	29.37 $\pm$ 4.52 ^a	49.75 $\pm$ 6.89	25.57 $\pm$ 5.62 ^a	64.71 $\pm$ 11.35	44.36 $\pm$ 8.79 ^a
t值		0.877	11.428	0.473	8.276	0.269	7.022
P值		0.383	0.000	0.638	0.000	0.789	0.000

注:与本组治疗前比较,^aP<0.05。

3 讨论

肺结核具有发病率高、易复发、病死率高等特点,主要表现为咳嗽、低热、盗汗及咳血等症状^[9]。临床常使用乙胺丁醇、利福平及异烟肼等药物治疗肺结核,但随着结核分枝杆菌耐药性的增加,药物治疗效果并不理想。因此,采取有效的治疗方案对改善肺结核患者病情具有重要的临床价值。环丝氨酸能抑制结核分枝杆菌的合成过程,是临床常用的抗结核药物。利奈唑胺是结核分枝杆菌蛋白质合成抑制剂,具有不良反应较少、耐药率较低等优点。本研究中结果显示利奈唑胺联合环丝氨酸治疗能缩短病灶吸收缩小时间、痰培养转阴时间及空洞闭合时间,具有良好的临床疗效,与高岭等^[10]研究结果相符。其机理可能为环丝氨酸胶囊能抑制细菌细胞浆中丙氨酸合成酶、丙氨酸消旋酶活性,从而阻断结核分枝杆菌细胞壁N-乙酰胞壁酸五肽合成,破坏细菌细胞壁,发挥抗菌作用。利奈唑胺通过作用细菌核糖体50S亚基的RNA位点,抑制核糖体与mRNA连接,进而阻止70S起始复合物的形成,阻断细菌蛋白质的合成过程,最终发挥抗结核作用。

有报道显示,长时间、持续性接受抗结核药物治疗,不仅可能会增加耐药菌株数,还会对肝脏造成不同程度损伤,进而影响治疗效果^[11]。程雯雯等^[12]研究发现,利奈唑胺治疗结核性疾病患者并不会对肝功能造成额外损伤。本研究结果与上述研究结果一致,表明利奈唑胺联合环丝氨酸治疗能减少肺结核患者肝功能的损伤。可能因为利奈唑胺口服后可以被快速吸收到达肺部,具有血药浓度稳定、绝对生物利用度高等优点,其主要经肾脏代谢后随尿液排出,对肝功能的损害程度较小。

临床研究发现,肺结核患者通常存在免疫功能减退,T细胞亚群主要表现为CD₃⁺、CD₄⁺水平降低^[13]。国内研究发现,利奈唑胺对结核性疾病的疗

效确切,能有效改善患者免疫功能^[14]。本研究结果与上述研究结果相符,说明利奈唑胺联合环丝氨酸胶囊治疗可以明显提高肺结核患者的免疫功能。分析原因为,利奈唑胺能减少机体能量消耗,缓解炎症反应,进而改善机体免疫功能。INF- γ 能促进T淋巴细胞增殖,有利于巨噬细胞的活化,与肺结核保护性免疫反应相关。IL-6是促炎因子,在结核杆菌感染引起的自身免疫反应中发挥着重要作用。TGF- β 能有效抑制T淋巴细胞增殖,有利于结核分枝杆菌增殖。国内外研究发现,肺结核患者血清INF- γ 水平降低,IL-6、TGF- β 水平明显升高^[15]。本研究中观察组治疗后血清INF- γ 水平高于对照组,IL-6、TGF- β 水平低于对照组,提示利奈唑胺联合环丝氨酸胶囊治疗能调节INF- γ 、IL-6、TGF- β 水平。

综上所述,在肺结核的治疗中,利奈唑胺联合环丝氨酸胶囊治疗可以提高临床治疗效果,缓解临床症状,减少肝功能损伤程度,提高免疫功能。

参考文献

- [1] Osawa T, Watanabe M, Morimoto K, et al. Serum Procalcitonin Levels Predict Mortality Risk in Patients With Pulmonary Tuberculosis: A Single-Center Prospective Observational Study[J]. J Infect Dis, 2020, 222(10):1651-1654.
- [2] Mok J, Kang BH, Kim HJ, et al. Drug resistance in extra-pulmonary tuberculosis in South Korea: comparison with pulmonary tuberculosis [J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2019, 23(2):151-156.
- [3] Maji A, Misra R, Dhakan DB, et al. Gut microbiome contributes to impairment of immunity in pulmonary tuberculosis patients by alteration of butyrate and propionate producers [J]. Environ Microbiol, 2018, 20(1):402-419.
- [4] 陶磊, 赵志忍, 张乐天. 利福平胶囊(II)治疗肺结核的临床效果及对患者肝功能的影响[J]. 中国医药, 2020, 15(5):681-684.
- [5] 郭乐, 刘鑫. 注射用胸腺肽 α 1联合环丝氨酸治疗耐多药肺结核的临床疗效及对免疫功能的影响[J]. 检验医学与临床, 2020, 17(15):2157-2159, 2163.

(下转第1791页)

MSI、HGF与胃癌临床病理学特征及预后关系研究

孟宁^{1*} 刘晟楠² 周谦¹

[摘要] **目的** 探究微卫星不稳定性(MSI)、肝细胞生长因子(HGF)与胃癌临床病理学特征及预后关系。**方法** 选取石家庄市人民医院普通外科2013年12月至2018年12月收治的100例胃癌患者作为研究对象。免疫组化法检测MSI、HGF表达情况,分析两者与胃癌患者临床病理学特征关系,对患者进行随访,Kaplan-Meier生存分析患者预后生存情况,COX回归分析影响胃癌患者预后的影响因素。**结果** MSI-H、MSI-L、MSS三组在肿瘤位置、肿瘤Lauren分型、TNM分期、淋巴结转移、分化程度上,比较差异有统计学意义($P<0.05$);HGF表达情况与胃癌临床病理学特征均无相关($P>0.05$)。spearman相关性分析显示:MSI与HGF表达呈负相关($r=-0.259$, $P<0.05$)。Kaplan-Meier生存分析显示,MSI与MSS、HGF表达阴性与HGF表达阳性胃癌患者的生存时间比较差异有统计学意义($P<0.05$)。多因素COX回归分析显示,TNM分期Ⅲ~Ⅳ期、淋巴结转移阳性、HGF表达阳性均为胃癌患者预后的危险因素,MSI为其保护因素($P<0.05$)。**结论** MSI、HGF表达与胃癌患者随访生存率密切相关;TNM分期Ⅲ~Ⅳ期、淋巴结转移阳性、HGF表达阳性均为胃癌患者预后的危险因素,MSI为其保护因素。

[关键词] 胃癌; MSI; HGF; 临床病理学特征; 预后

Study on Clinical Pathologic Characteristics and Prognostic between MSI、HGF and Gastric Cancer

MENG Ning^{1*}, LIU Shengnan², ZHOU Qian¹

(1. Department of General Surgery, Shijiazhuang People's Hospital, Shijiazhuang, Hebei, China, 050000;

2. Department of Nuclear Medicine, Shijiazhuang People's Hospital, Shijiazhuang, Hebei, China, 050000)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the clinical pathological characteristics and prognosis of microsatellite instability (MSI), hepatic cell growth factor (HGF) and gastric cancer. **Methods** Abtotal of 100 patients with gastric cancer admitted to the Department of General Surgery of Shijiazhuang People's Hospital from December 2013 to December 2018 were selected as the research subjects. MSI、HGF expression was detected by immunohistochemistry, the relationship between the clinical pathological characteristics of patients with gastric cancer, follow - up patients, Kaplan-Meier survival and patient prognosis survival was analyzed. COX regression was used to analyze the influencing factors affecting patients with gastric cancer. **Results** The three groups of MSI-H, MSI-L and MSS had significant differences in tumor location, tumor Lauren typing, TNM staging, lymph node metastasis, and degree of differentiation ($P<0.05$). There was no correlation between the expression of HGF and the clinicopathological characteristics of gastric cancer ($P>0.05$). Spearman correlation analysis showed a negative correlation between MSI and HGF expression ($r=-0.259$, $P<0.05$). Kaplan-Meier survival analysis showed statistically significant survival differences between MSI - negative MSS、HGF and patients with HGF - positive gastric cancer ($P<0.05$). Multifactor COX regression analysis showed that TNM stage Ⅲ ~ Ⅳ, lymph node metastasis positive, and positive HGF

基金项目:石家庄市科技计划项目(181200963)

作者单位:1. 石家庄市人民医院普外科一病区,河北,石家庄 050000

2. 石家庄市人民医院核医学科,河北,石家庄 050000

*通信作者:孟宁, E-mail: mengning88@126.com

expression were all risk factors for patients with gastric cancer, and MSI is a protective factor ($P<0.05$).

Conclusion The expression of MSI and HGF are closely related to the follow-up survival rate of patients with gastric cancer. TNM stage III~IV, positive lymph node metastasis, and HGF expression are all risk factors for the prognosis of patients with gastric cancer, and MSI is a protective factor.

[KEY WORDS] Gastric cancer; MSI; HGF; Clinicopathologic features; Prognosis

胃癌是我国常见消化道恶性肿瘤,研究表明:在我国,胃癌每年新增病例数和死亡人口均超过了全球的40%^[1]。胃癌的早期诊断困难,尽管采取多种治疗手段,但晚期胃癌患者的预后较差^[2]。目前,临床尚无特异性指标来预测胃癌患者远期预后,因此,寻找有效指标评估胃癌患者预后是临床治疗重点。微卫星不稳定性(microsatellite instability, MSI)是由于错配修复基因机制导致重复序列的紊乱,既往研究显示其与结直肠癌发生发展密切相关;肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)是重要抗纤维化因子,临床已证实,其与肝细胞生长因子受体(cMET)结合通路广泛参与肿瘤发展及转移^[3-4]。基于此,本研究旨在探究胃癌患者中MSI和HGF的表达情况,分析二者与肿瘤临床病理学参数的关系以及对预后的影响。现将研究成果报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取石家庄市人民医院普通外科2013年12月至2018年12月收治的100例胃癌患者作为研究对象。纳入标准:①诊断符合《胃癌治疗指南》^[5]的诊断标准;②均于本院行手术治疗;③术后经临床病理证实;未接受放化疗治疗;④患者及家属均知情同意。排除标准:①合并其它恶性肿瘤;②临床资料或随访资料不完整;③生存期<6个月;④胃癌家族史患者。本研究符合《赫尔辛基宣言》中的伦理审查标准。

1.2 方法

使用免疫组化法检测:组织标本均经4%甲醛固定,常规石蜡包埋,4 nm厚连续切片5张行免疫组化法检测,操作均遵循试剂说明严格进行,每个病理切片均经2位病理医师复诊。

1.3 观察指标

MSI结果判读^[6]:肿瘤细胞核中产生棕黄色颗粒为阳性,MLH1、MSH2、MSH6、PMS2染色均为阳性则视为微卫星稳定(microsatellite stability, MSS),任一项中染色为阴性则视为MSI。每例患者出现≥2个MSI则为高度微卫星不稳定(micro-

satellite instability-high, MSI-H),出现1个位点不稳定性则为低度微卫星不稳定(microsatellite instability-low, MSI-L)。

HGF结果判读^[7]:肿瘤细胞膜或细胞质中产生棕黄色颗粒为阳性,根据细胞染色强度与阳性细胞数百分比计分进行判定,无着色(0分)、淡黄色(1分)、棕黄色(2分)、棕褐色(3分);阳性细胞数百分比0%(0分),1%~5%(1分),6%~20%(2分),21%~80%(3分),>80%(4分),两项得分结果相加。最终得分0分为(-),2~3分为(+),4~5分为(++),6~7分为(+++),以“-”为阴性,“+、++、+++”分别为弱阳性、中度阳性与强阳性。通过门诊和电话相结合的方式随访,末次随访时间为2019年5月。

1.4 统计学处理

采用SPSS 20.0进行统计分析。计量资料采用($\bar{x} \pm s$)表示,行 t 检验;计数资料 $n(\%)$ 表示,行 χ^2 检验。采用Kaplan-Meier检验进行生存分析,MSI与HGF表达的关系采用spearman相关性分析,多因素分析采用Cox比例风险模型。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 100例胃癌患者MSI、HGF检测结果

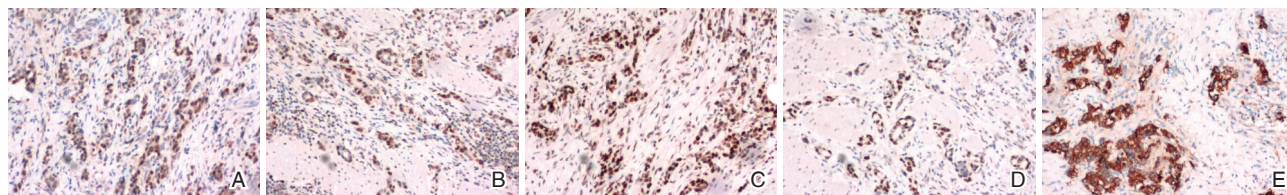
100例胃癌患者中,检测出MSI有38例,占比38.00%,其中MSI-H有20例,占20.00%,MSI-L有18例,占18.00%,检测出HGF阳性72例,占比72.00%。见图1。

2.2 MSI、HGF表达与胃癌临床病理学特征

在MSI-H组患者中发生于胃窦、肠型、TNM分期早期、淋巴转移阴性及低分化高于MSS组与MSI-L组,差异有统计学意义($P<0.05$);HGF表达情况与性别、年龄、肿瘤大小、肿瘤位置、肿瘤Lauren分型、TNM分期、淋巴结转移、分化程度均无相关($P>0.05$)。见表1。

2.3 胃癌患者MSI与HGF表达的关系

在38例MSI胃癌患者中,HGF表达阳性患者为33例(86.84%),62例MSS胃癌患者中,HGF表



注: A、B、C、D、E 分别对应胃癌组织中 MLH1、PMS2、MSH2、MSH6、HGF 表达阳性。

图1 典型患者 MSI、HGF 检测病理图 (SP, ×100)

Figure 1 Pathological diagram of MSI、HGF detection of a typical patient (SP, ×100)

表1 MSI、HGF 与胃癌临床病理学特征的关系 [n(%)]

Table 1 Relationship between MSI、HGF and clinicopathological characteristics of gastric cancer [n(%)]

相关因素		MSI			χ^2 值	P 值	HGF		χ^2 值	P 值
		MSS 组 (62)	MSI-L 组 (18)	MSI-H 组 (20)			HGF 阳性组 (72)	HGF 阴性组 (28)		
性别	男	47(75.81)	13(72.22)	13(65.00)	0.469	0.493	52(72.22)	21(75.00)	0.079	0.779
	女	15(24.19)	5(27.78)	7(35.00)			20(27.78)	7(25.00)		
年龄	<65 岁	29(46.77)	8(44.44)	9(45.00)	0.029	0.865	30(41.67)	16(57.14)	1.944	0.163
	≥65 岁	33(53.23)	10(55.56)	11(55.00)			42(58.33)	12(42.86)		
肿瘤大小	<5 cm	24(38.71)	8(44.44)	7(35.00)	0.080	0.778	24(33.33)	15(53.57)	3.471	0.062
	≥5 cm	38(61.29)	10(55.56)	13(65.00)			48(66.67)	13(46.43)		
肿瘤位置	胃窦	24(38.71)	7(38.89)	16(80.00)	8.887	0.003	31(43.06)	16(57.14)	0.960	0.327
	胃体	23(37.10)	8(44.44)	2(10.00)			25(34.72)	8(28.57)		
	贲门	15(24.19)	3(16.67)	2(10.00)			16(22.22)	4(14.29)		
肿瘤 Lauren 分型	肠型	23(37.10)	5(27.78)	16(80.00)	11.365	0.001	34(47.22)	10(35.71)	1.084	0.298
	弥漫型	39(62.90)	13(72.22)	4(20.00)			38(52.78)	18(64.29)		
TNM 分期	I~II	26(41.94)	10(55.56)	18(90.00)	12.21	0.000	37(51.39)	17(60.71)	0.706	0.401
	III~IV	36(58.06)	8(44.44)	2(10.00)			35(48.61)	11(39.29)		
淋巴结转移	无	18(29.03)	7(38.89)	15(75.00)	11.49	0.001	27(37.50)	13(46.43)	0.670	0.413
	有	44(70.97)	11(61.11)	5(25.00)			45(62.50)	15(53.57)		
分化程度	高分化	19(30.65)	6(33.33)	1(5.00)	7.145	0.008	18(25.00)	7(25.00)	2.962	0.085
	中分化	30(48.39)	11(61.11)	10(50.00)			41(56.94)	11(39.29)		
	低分化	13(20.97)	2(11.11)	9(45.00)			13(18.06)	10(35.71)		

达阳性患者为 39 例(62.90%), MSI 与 MSS 胃癌患者中 HGF 表达阳性比较, 差异有统计学意义($\chi^2=6.697, P<0.05$)。spearman 相关性分析显示: MSI 与 HGF 表达呈负相关($r=-0.259, P<0.05$)。

2.4 MSI 及 HGF 表达与胃癌预后关系

末次随访显示, 100 例胃癌患者中死亡 39 例(39.00%), 生存 61 例(61.00%), Kaplan-Meier 生存分析显示, MSI 与 MSS、HGF 表达阴性与 HGF 表达阳性胃癌患者的生存时间比较差异有统计学意义($P<0.05$), MSI 组胃癌患者生存率显著高于 MSS 组, HGF 表达阴性胃癌患者生存率显著高于 HGF 表达阳性($P<0.05$)。见表 2、图 2。

2.5 胃癌患者预后生存影响因素分析

结果显示: 两组在性别、年龄、肿瘤大小、肿瘤位置、肿瘤 Lauren 分型、分化程度上比较差异无统计学意义($P>0.05$), 但在 TNM 分期、淋巴结转移、MSI、HGF 表达上比较, 差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 3。

表2 MSI 与 HGF 表达与胃癌预后关系

Table 2 The relationship between the expression of MSI and HGF and the prognosis of gastric cancer

组别	估算	标准误	95%CI	χ^2 值	P 值
MSI	60.539	1.306	57.979~63.098	8.074	0.004
MSS	53.873	1.779	50.385~57.360		
HGF 表达阴性	60.081	1.784	56.583~63.578	5.152	0.023
HGF 表达阳性	51.800	1.770	48.331~55.268		

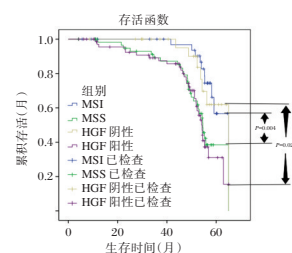


图2 MSI 与 MSS、HGF 表达阳性与 HGF 表达阴性胃癌患者预后的生存曲线

Figure 2 Survival curve of prognosis of gastric cancer patients with MSI and MSS, HGF expression positive and HGF expression negative

表3 胃癌患者预后生存影响因素分析 [n(%)]

Table 3 Analysis of factors affecting the prognosis and survival of patients with gastric cancer [n(%)]

相关因素	生存组(61)	死亡组(39)	χ^2 值	P值
性别(男/女)	35(57.38)/ 26(42.62)	28(71.79)/ 11(28.21)	2.122	0.145
年龄	<65岁 26(42.62) ≥65岁 35(57.38)	20(51.28) 19(48.72)	0.718	0.397
肿瘤大小	<5 cm 28(45.90) ≥5 cm 33(54.10)	11(28.21) 28(71.79)	3.132	0.077
肿瘤位置	胃窦 26(42.62) 胃体 23(37.70) 贲门 12(19.67)	21(53.85) 10(25.64) 8(20.51)	1.156	0.282
肿瘤 Lauren 分型	肠型 31(50.82) 弥漫型 30(49.18)	18(46.15) 21(53.85)	0.207	0.649
TNM 分期	I~II 39(63.93) III~IV 22(36.07)	15(38.46) 24(61.54)	6.214	0.013
淋巴结转移	阴性 32(52.46) 阳性 29(47.54)	8(20.51) 31(79.49)	10.116	0.001
分化程度	高分化 11(18.03) 中分化 34(55.74) 低分化 16(26.23)	14(35.90) 18(46.15) 7(17.95)	3.015	0.082
MSI	是 28(45.90) 否 33(54.10)	10(25.64) 29(74.36)	4.145	0.042
HGF 表达	阳性 38(62.30) 阴性 23(37.70)	32(82.05) 7(17.95)	4.422	0.035

2.6 影响胃癌患者生存状况的多因素 COX 回归分析

以“死亡组”为因变量(赋值:0=是,1=否),以“TNM分期、淋巴结转移、MSI、HGF表达”为自变量,纳入 COX 回归分析。多因素 COX 回归分析显示,TNM分期 III~IV期、淋巴结转移阳性、HGF表达阳性均为胃癌患者预后的危险因素,MSI为其保护因素($P<0.05$),见表4。

3 讨论

微卫星不稳定(MSI)是由于DNA错配修复机制发生异常而导致基因重复序列发生错乱,在肿瘤的发生和发展中发挥了重要作用^[8]。MSI最早发现于结直肠癌中,被认为是遗传性非息肉病性结直肠癌的特征,后又于多种散发性肿瘤(胃癌、肺癌等)中发现。但研究表明,胃癌与结直肠癌中MSI产生机制不同,在结肠癌中,多由MMR中h-MLH1

和h-MSH2的突变产生,而MSI-H胃癌多因h-MLH1启动子甲基化所致^[9]。胃癌是复杂生物过程中多种调控基因功能紊乱导致,外基因改变与基因不稳定性是导致调控基因紊乱主要原因。且既往研究表明:MSI-H与MSI-L、MSS相比,具有独特的临床病理特征且根治术后多化疗胃癌患者能否最终获益同MSI状态密切相关^[10]。在本研究中MSI-H组患者中发生于胃窦、肠型、TNM分期早期、淋巴转移阴性及低分化高于MSS组与MSI-L组。既往诸多研究一致结论显示,MSI多点位阳性胃癌多发生于胃窦部,肠型,淋巴结转移较少,与本研究结果一致^[11-12]。

肝细胞生长因子(HGF)是多功能细胞因子,也称为离散因子,具有刺激肝细胞增殖,促进上皮细胞的分裂作用,于血液及组织中广泛分布^[13]。目前发现唯一HGF高亲和力受体为cMET,正常生理情况下,HGF与cMET受体结合可参与胚胎发育、组织再生等过程;但在肿瘤组织中,HGF与cMET受体呈过表达,其通路可使肿瘤细胞间黏附作用减弱,细胞外基质降解,促进肿瘤血管刺激形成发生肿瘤细胞转移^[14]。近年来有研究表明:HGF与cMET受体结合通路与胃癌发生关系密切^[15]。同时本研究spearman相关性分析显示:MSI与HGF表达呈负相关。分析为:MSI与HGF-cMET通路存在交叉,二者共同参与胃癌发生发展。

MSI与胃癌患者预后之间的关系仍然是一个非常具有争议的问题,多数研究显示胃癌MSI患者对比MSS患者的预后更良好,分析与MSI肿瘤细胞攻击性较小,可激发免疫反应有关^[10,16]。在本研究中,Kaplan-Meier生存分析显示,MSI与MSS、HGF表达阴性与HGF表达阳性胃癌患者的生存时间比较差异有统计学意义。MSI组胃癌患者生存率显著高于MSS组,HGF表达阴性胃癌患者生存率显著高于HGF表达阳性。在正常人体细胞中,HGF受体可在短时间增加后恢复正常,但在肿

表4 胃癌患者预后影响因素的COX回归分析

Table 4 COX regression analysis of factors affecting the prognosis of patients with gastric cancer

相关因素	B值	S.E.值	Wald值	自由度	Exp(B)	95%CI	P值
TNM分期 III~IV期	1.043	0.424	6.057	1	2.836	1.237~6.506	0.014
淋巴结转移阳性	1.453	0.472	9.468	1	4.276	1.695~10.789	0.002
MSI	-0.900	0.448	4.044	1	0.406	0.169~0.977	0.044
HGF表达阳性	1.018	0.494	4.247	1	2.767	1.051~7.284	0.039

瘤细胞中其持续过表达,使癌细胞能动性增强,加速肿瘤扩散,生存不佳。多因素 COX 回归分析显示,TNM 分期Ⅲ~Ⅳ期、淋巴结转移阳性、HGF 表达阳性均为胃癌患者预后的危险因素,MSI 为其保护因素。分析为:TNM 分期Ⅲ~Ⅳ期、淋巴结转移阳性、HGF 表达阳性患者病情严重程度更高,预后风险越大,MSI 胃癌患者预后良好为其保护因素。

综上所述,MSI 组胃癌患者随访生存率显著高于 MSS 组,HGF 表达阴性胃癌患者随访生存率显著高于 HGF 表达阳性;TNM 分期Ⅲ~Ⅳ期、淋巴结转移阳性、HGF 表达阳性均为胃癌患者预后的危险因素,MSI 为其保护因素。

参考文献

- [1] Liu J, Yang C, Gu Y, et al. Knockdown of the lncRNA SNHG8 inhibits cell growth in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma[J]. Cell Mol Biol Lett, 2018, 23(1):17.
- [2] 葛维,曾斌. UNC5B-AS1 在胃癌中差异表达的临床意义及对胃癌细胞活力和迁徙的影响[J]. 中南医学科学杂志, 2020, 48(1):59-64.
- [3] Drusbosky LM, Kiedrowski LA, Johnson K, et al. Circulating tumor (ct) DNA-based comprehensive genomic profiling to identify microsatellite instability (MSI) and defective DNA damage repair (DDR) in prostate cancer (PCa) patients[J]. J Clin Oncol, 2020, 38(6):190.
- [4] 孙瑞营,李洋,赵旭,等. 胃癌患者血清中胃癌相关细胞因子检测及其在胃癌诊断中的应用价值[J]. 吉林大学学报(医学版), 2020, 46(6):171-179.
- [5] 所剑,李伟. 第5版日本《胃癌治疗指南》解读[J]. 中国实用外科杂志, 2018, 38(4):407-413.
- [6] 孟令桦,吴海涛,梁婷婷,等. 微卫星不稳定性在胃癌预后及疗效预测中的意义[J]. 肿瘤研究与临床, 2020, 32(3):213-216.
- [7] 宗桂娟,尹海兵,李春笋,等. 肝细胞生长因子受体蛋白表达及基因突变与胃癌临床病理特征的关系[J]. 安徽医药, 2020, 24(11):61-64.
- [8] 付英,周皓岚,朱秀娟. MSI, HGF 与大肠癌患者预后关系的初步研究[J]. 中国现代医学杂志, 2018, 28(1):115-119.
- [9] 邱海波,周志伟. NCCN 胃癌临床实践指南 2017 年第五版更新要点解读[J]. 中华胃肠外科杂志, 2018, 21(2):160-164.
- [10] 缪小兵,吴雅珣,蔡南南,等. 214 例胃癌微卫星不稳定状态分析[J]. 临床与实验病理学杂志, 2018, 34(11):32-36.
- [11] 刘欢,辛彦. 微卫星不稳定性(MSI)与胃癌关系的研究进展[J]. 现代肿瘤医学, 2018, 26(1):124-127.
- [12] 刘欢,孙丹,李文会,等. DNA 错配修复蛋白表达与胃腺癌临床病理特征的关系及意义[J]. 现代肿瘤医学, 2019, 27(15):2702-2708.
- [13] 庄晓苹,林琼琼,季剑乐,等. 乳腺癌中 SyK, HGF 表达的相关性及预后的关系[J]. 医学研究杂志, 2019, 48(5):126-129.
- [14] 张煜涵,吴焕文,王靖,等. 错配修复缺陷的子宫内膜样腺癌中微卫星不稳定性分析[J]. 中华病理学杂志, 2021, 50(5):470-475.
- [15] 孟宁,周谦,赵静,等. 肝细胞生长因子及 RECK 在胃癌组织中的表达及临床意义[J]. 疑难病杂志, 2020, 19(11):40-43+49.
- [16] 吕艳华,杨继元. 微卫星不稳定、血管内皮生长因子、基质金属蛋白酶在胃癌腹膜转移中作用的研究概况[J]. 癌症进展, 2019, 17(7):754-757, 779.
- [6] Diacon AH, De Jager VR, Dawson R, et al. Fourteen-Day Bactericidal Activity, Safety, and Pharmacokinetics of Linezolid in Adults with Drug-Sensitive Pulmonary Tuberculosis[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2020, 64(4):e2012-2019.
- [7] 中华医学会结核病学分会. 肺结核诊断和治疗指南[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2001, 24(2):70-74.
- [8] 孙明,王蔚文. 临床疾病诊断与疗效判断标准[M]. 北京:科学技术文献出版社, 2010:456-459.
- [9] 张信鸽,刘新,赵丹晖. IFN- γ 、IL-6、sIL-2R 在初治型肺结核患者血清中的变化意义研究[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(6):777-780.
- [10] 高岭,任鹏飞,常娅莉,等. 利奈唑胺/环丝氨酸对耐多药肺结核患者细胞免疫及体液免疫的影响及安全性评价[J]. 中国免疫学杂志, 2020, 36(14):1735-1739.
- [11] Abdullaev RY, Komissarova OG, Chumakova ES, et al. Changes in markers of liver damage in the treatment of patients with pulmonary tuberculosis with multiple drug resistance of the Mycobacterium tuberculosis [J]. Consil Med, 2018, 20(11):46-51.
- [12] 程雯雯,孙红,张正中,等. 利奈唑胺联合抗结核治疗对结核性脑膜炎患者肝功能及脑脊液腺苷脱氨酶水平的影响[J]. 中国医药, 2021, 16(2):217-220.
- [13] Ndishimye P, Zakham F, Musanabaganwa C, et al. CD4+ regulatory T cells and CD4+ activated T cells in new active and relapse tuberculosis[J]. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2019, 65(8):18-22.
- [14] 崔丹,冯秀莉,李志惠,等. 利奈唑胺与微卡联用对耐多药肺结核的免疫功能影响及临床疗效分析[J]. 解放军预防医学杂志, 2020, 38(6):61-63.
- [15] Abebe F, Belay M, Legesse M, et al. Association of ESAT-6/CFP-10-induced IFN- γ , TNF- α and IL-10 with clinical tuberculosis: evidence from cohorts of pulmonary tuberculosis patients, household contacts and community controls in an endemic setting[J]. Clin Exp Immunol, 2017, 189(2):241-249.

(上接第 1786 页)

粪便中脱落细胞基因检测在炎症性肠病诊断中的临床价值

刘秀卿 顾大勇* 李延武 郭海建 李太哈

[摘要] **目的** 探索粪便中脱落细胞基因检测在炎症性肠病诊断中的临床价值。**方法** 选取2020年6月至2021年6月期间在深圳市第二人民医院收治的30例健康人群作为对照组,70例炎症性肠病患者作为观察组,收集所有受检者粪便样本后,进行粪便中DNA的提取和荧光定量PCR检测,经ROC曲线分析SDC2甲基化水平、内参基因ACTB预测效能,并用Spearman法分析内参基因ACTB表达与临床病理特征关系。**结果** 两组SDC2甲基化检测Ct值、阳性率比较,差异无统计学意义($P>0.05$),观察组ACTB的阳性率高于对照组,ACTB Ct值低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。经ROC曲线分析,内参基因ACTB、SDC2甲基化Ct值预测炎症性肠病的AUC分别为0.918、0.473;不同性别、年龄段患者、内参基因ACTB的Ct值比较,差异无统计学意义($P>0.05$),不同病程、病变位置患者内参基因ACTB的Ct值比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。经Spearman法分析,内参基因ACTB与病程、病变位置呈正相关性($P<0.05$)。**结论** 粪便中脱落细胞内参基因ACTB表达水平与肠炎可能有关系,SDC2甲基化与肠炎无关系。

[关键词] 粪便;脱落细胞;DNA甲基化;炎症性肠病

Clinical value of gene detection of exfoliated cells in feces in the diagnosis of inflammatory bowel disease

LIU Xiuqing, GU Dayong*, LI Yanwu, GUO Haijian, LI Taihan

(Department of Clinical Laboratory, Shenzhen Second People's Hospital, Shenzhen, Guangdong, China, 518035)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the clinical value of detection of exfoliated cells in feces in the diagnosis of inflammatory bowel disease. **Methods** Seventy patients with inflammatory bowel disease admitted to Shenzhen Second People's Hospital from June 2020 to June 2021 were selected as the observation group, and 30 healthy people were selected as the control group. The stool samples were collected for DNA extraction and fluorescence quantitative PCR (qPCR) detection. The ROC curve was used to analyze the methylation of SDC2 and internal reference gene ACTB was used to predict assay performance. Spearman method was used to analyze the relationship between the expression of internal reference gene ACTB and clinicopathological characteristics. **Results** There was no significant difference in the Ct value and positive rate of SDC2 methylation detection between the two groups ($P>0.05$). The positive rate of ACTB in the observation group was higher than that in the control group, and the ACTB Ct value was lower than that in the control group. The difference was statistically significant ($P<0.05$). Based on ROC curve analysis, the methylation Ct values of internal reference genes ACTB and SDC2 predicted the AUC of inflammatory bowel disease to be 0.918 and 0.473, respectively. There was no statistically significant difference in the Ct values of patients with different genders, ages, and internal reference gene ACTB ($P>0.05$). The comparison of the Ct values of internal reference gene ACTB in patients with different course of disease and lesion location showed statistically

基金项目:深圳市科技研发资金(国际合作研究项目)(GJHZ20200731095604013)

作者单位:深圳市第二人民医院检验科,广东,深圳 518035

*通信作者:顾大勇, E-mail: wanhood@163.com

significant differences ($P<0.05$). According to Spearman's analysis, the internal reference gene *ACTB* was positively correlated with the course of the disease and the location of the disease ($P<0.05$). **Conclusion** The expression level of the reference gene *ACTB* in fecal exfoliated cells may be related to enteritis, while *SDC2* methylation has no relationship with enteritis.

[KEY WORDS] Feces; exfoliated cells; DNA methylation; inflammatory bowel disease

炎症性肠病(Inflammatory bowel disease, IBD)发病率为1.74/10万,近年来呈上升趋势^[1],以南方地区多发,是消化道常见慢性非特异性炎症病变。IBD主要病变在肠道,但也可累及多种器官、系统,故需尽早诊疗,虽然IBD治愈率低,但通过一系列治疗后,可缓解病情,使得患者能够像正常人群一样工作、生活,为了保证患者后期得到及时、有效救治,还需注重疾病筛查,以便及时为临床治疗提供科学依据^[2]。组织病理学检查、内镜检查是评估肠道炎症活动度的金标准,虽诊断准确率高,但反复内镜检查可给患者带来经济负担,且存在出血、穿孔等风险,加重身心负担,故无法首推^[3]。粪便DNA检测具有诊断效能高、方便、无创等优势,其中DNA甲基化是最早发现的修饰途径之一,与多种疾病的发生、发展密切相关,目前已有学者用于结直肠癌检测中^[4],通过检测粪便中脱落细胞的肿瘤标志物来判断患病风险,其中使用的目标基因为黏结蛋白聚糖2(Syndecan 2, *SDC2*),内参基因为β肌动蛋白(β -actin, *ACTB*),而且在该技术的开发过程中,也观察到一些IBD患者出现了*ACTB*基因水平异常升高,但当前未有深入研究。本文就此展开深入调查,分析*SDC2*、*ACTB*在预测IBD中效能以及与临床病理特征相关性。

1 资料和方法

1.1 资料

分析在2020年6月至2021年6月深圳市第二人民医院收集的70例IBD患者(观察组)、30例健康人群(对照组)作为研究对象。观察组男性48例,女性22例,平均年龄(47.45 ± 4.53)岁,平均体重(62.35 ± 4.46)kg;对照组男性18例,女性12例,平均年龄(47.33 ± 4.49)岁,平均体重(62.49 ± 4.58)kg。两组性别、体重、年龄比较,差异无统计意义($P>0.05$)。符合《赫尔辛基宣言》^[5]伦理审查。纳入标准:①符合《炎症性肠病外科治疗国内外共识与指南》^[6]中关于IBD临床

诊断标准;②自愿提供粪便样本,接受粪便DNA检测;③没有任何肿瘤病史;④签署知情同意书。排除标准:①合并脊柱严重畸形者;②有切口疝或腹部疝气者;③可疑结肠穿孔者;④因直肠、肛门畸形或高度狭窄结肠镜无法插入者;⑤下消化道严重梗阻,无法排便、排气者。本研究经院伦理委员会批准同意。

1.2 样本收集

收集受检者各项基本信息,包括年龄、性别、姓名、家族史、联系方式、疾病史等。在接受肠镜检查后7~30天进行粪便样本采集,在采集前嘱咐受检者正常饮食,对于服用黄连素等影响检测结果者,需停药一周。收集粪便样本时,严格按照说明书操作,保证DNA样本不降解,采样后24h内送至检验科。

1.3 检测方式

进行粪便DNA提取和qPCR检测。首先将粪便样本震荡混匀,离心10 min, 5 000 rpm,取上清,保存于 -80°C ,待检。检测时,先从冰箱取出样本,待融解后,取3.2 mL上清过SPE柱,将杂质去除,加入特异性磁珠捕获目标基因,提取的基因组DNA,取2 μL 用超微量分光光度计Nanodrop one测定仪测定浓度及纯度。开展qPCR法检测,使用广州康立明生物人类*SDC2*基因甲基化检测试剂盒(国械注准20183400506)与上海宏石全自动医用分析系统SLAN-96S,采用荧光PCR法检测*ACTB*、*SDC2*。具体步骤如下:取10 μL 粪便样本中提取的DNA,加入1 $\times$ GoTaq缓冲液,5 mM MgCl_2 , 0.4 mM dNTPs, 2.5 U GoTaq热启动聚合酶(Promega),上下游引物各0.5 μM , 0.2 μM Taqman探针,总反应体系30 μL 。在PCR仪上扩增,反应条件:变性 95°C 5 min, (95°C 15 s, 58°C 30 s, 72°C 30 s) $\times$ 48个循环,冷却 40°C 30 s。各基因临界值:根据*ACTB* Ct临界值26.86, *ACTB*的Ct值 <26.86 为阳性, Ct值 ≥ 26.86 为阴性; *SDC2* Ct临界值38.97, *SDC2*的Ct值 <38.97 为阳性, Ct值 ≥ 38.97 为阴性。阳性率=阳性标本例数/总例数 $\times 100\%$ 。

1.4 统计学处理

运用 SPSS 22.0 统计学软件处理;计数资料以 $n(\%)$ 表示,行 χ^2 检验;计量资料用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,行 t 检验, F 值采用方差分析;采用受试者工作特征 (ROC) 曲线分析 $ACTB$ 的 Ct 值、 $SDC2$ 甲基化的 Ct 值及两项联合预测价值;采用 Spearman 法分析相关性;以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组 $ACTB$ 基因水平和 $SDC2$ 甲基化水平比较

两组 $SDC2$ 甲基化检测 Ct 值、阳性率比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$),观察组 $ACTB$ 的阳性率高于对照组, $ACTB$ Ct 值低于对照组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 两组 $ACTB$ 基因水平和 $SDC2$ 甲基化水平比较
[$n(\%)$, ($\bar{x} \pm s$)]

Table 1 Comparison of $actb$ gene level and $SDC2$ methylation level between the two groups [$n(\%)$, ($\bar{x} \pm s$)]

组别	n	$ACTB$		$SDC2$	
		阳性率	Ct 值	阳性率	Ct 值
观察组	70	67 (95.71)	25.78 $\pm$ 1.63	5 (7.14)	40.78 $\pm$ 1.25
对照组	30	3 (10.00)	32.12 $\pm$ 1.13	2 (6.67)	40.79 $\pm$ 1.33
χ^2/t 值		73.469	19.375	0.007	0.396
P 值		<0.001	<0.001	0.932	0.693

2.2 ROC 曲线分析

经 ROC 曲线分析,内参基因 $ACTB$ 、 $SDC2$ 甲基化 Ct 值预测炎症性肠病的 AUC 分别为 0.918、0.473 ($P < 0.05$)。见表 2、图 1。

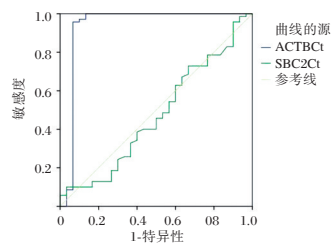


图 1 $ACTB$ Ct、 $SDC2$ Ct 预测的 ROC 曲线图

Figure 1 $ACTB$ Ct, $SDC2$ Ct predicted ROC curve

2.3 观察组不同临床病理特征的 $ACTB$ 基因水平的比较

不同性别、年龄段患者内参基因 $ACTB$ 的 Ct

值比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$),不同病程、病变位置患者内参基因 $ACTB$ 的 Ct 值比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 观察组不同临床病理特征的 $ACTB$ 基因水平的比较
Table 3 Comparison of $ACTB$ gene levels with different clinicopathological characteristics in observation group

指标		<i>n</i>	<i>ACTB</i> 基因的 Ct 值	<i>t/F</i> 值	<i>P</i> 值
性别	男性	42	25.61±1.35	1.041	0.302
	女性	28	25.94±1.22		
年龄	≤60 岁	27	25.68±1.36	0.410	0.683
	>60 岁	43	25.82±1.41		
病程	≤6 个月	39	26.55±1.53	4.585	<0.001
	>6 个月	31	24.96±1.32		
病变位置	回肠	11	26.12±1.12	18.018	<0.001
	直肠	32	26.56±1.49		
	结肠	27	24.31±1.55		

2.4 相关性分析

经 Spearman 法分析,内参基因 $ACTB$ 水平与年龄、性别不存在相关性 ($P > 0.05$),与病程、病变位置呈正相关性 ($P < 0.05$)。见表 4。

表 4 内参基因 $ACTB$ 水平与临床病理特征的相关性分析
Table 4 Correlation between $ACTB$ level of internal reference gene and clinicopathological features

指标	$ACTB$ 基因水平	
	r 值	P 值
性别	0.077	0.525
年龄	0.046	0.707
病程	0.514	<0.001
病变位置	0.685	<0.001

3 讨论

诊断 IBD 金标准为肠镜联合组织学病理检查,虽准确率较高,但属于创伤性操作,且存在出血、穿孔等风险,患者依从率较低^[7]。粪便潜血实验是早期临床推荐的非侵入手段,虽具有无创、简便优势,但特异性、敏感性低,尤其是对于微小病变者,误诊率较高。因此,基于粪便、血液等生物样本的精准无创检测便成为肠道炎症病变新选择。有研究表明^[8],病变患者粪便中脱落细胞在碱性环境下,可减慢降解速度,因此学者提议将粪便中脱落细胞 DNA 基因作为检测标本。随着分子

表 2 分析各项指标预测预后的 AUC 值

Table 2 Analysis of the AUC value of various indicators to predict prognosis

检验结果变量	面积图	标准错误	95%CI	约登指数	敏感性	特异性	临界值	P 值
$ACTB$ Ct	0.918	0.041	0.869~1.000	0.914	1.00	0.93	26.86	0.000
$SDC2$ Ct	0.473	0.065	0.346~0.600	0.067	0.97	0.10	38.97	0.678

生物学发展,分子生物学标记已逐渐成为肠道病变新型无创检测技术,通过测序技术分析DNA基因突变,具有更好的特异性和敏感性,但测序技术成本较高,步骤复杂,不利于推广于IBD中。相比之下,实时荧光定量PCR检测更值得推广,具有成本低廉、步骤简便优势,且作为非侵入性操作,更易被人们接受。

DNA甲基化是肠道癌症病变发生、发展中一个早期重要事件,故异常DNA甲基化可作为早期诊断、预测病变的分子标记物^[9]。*SDC2*基因甲基化是肿瘤早期筛查分子标记物;*SDC2*是硫酸乙酰肝素蛋白聚糖家族中成员之一,属于I型细胞表面跨膜蛋白聚糖,目前常作为肿瘤标志物,能够调节机体内基因转录,与多种癌症发生、发展密切相关^[10]。*ACTB*是actin家族中一员,在细胞生理活动方面发挥着重要作用^[11]。本研究结果显示,观察组*ACTB*基因水平阳性率高于对照组,*ACTB*Ct值低于对照组,说明IBD病变存在明显脱落细胞异常增多。主要是IBD病变发展阶段,NO大量生成,会破坏小肠上皮细胞肌动蛋白,导致肌动蛋白丝网络解体,从而引起上皮细胞功能失调,而*ACTB*基因参与了细胞迁移和分裂,在IBD充质细胞中存在异常表达,故引起内参基因*ACTB*表达异常升高^[12-13]。经ROC曲线分析,内参基因*ACTB*、*SDC2*甲基化Ct值预测炎症性肠病的AUC分别为0.918、0.473,说明内参基因*ACTB*检测效能较高,能有效避免盲目大规模肠镜筛查带来的弊端和创伤性,同时节约了医疗资源,提高检测阳性率^[14]。而*SDC2*基因甲基化在肠炎中无特异性表现,敏感性和特异性较低,曹亚萍^[15]学者发现*SDC2*基因在肠癌患者以及癌前病变中表现为异常的高度甲基化,在其他良性疾病(包括肠炎)中则没有表现为高度甲基化。此外,经Spearman法分析,*ACTB*与年龄、性别不存在相关性,与病程呈正相关性,说明*ACTB*可受到疾病严重程度影响。而与病变位置也存在正相关性的原因可能是基因组DNA来源不同,且本研究纳入例数也较少,可对结果造成一定影响,故关于病变位置与脱落细胞*ACTB*基因的相关性还有待进一步探索。

综上所述,粪便中脱落细胞基因检测是一项灵敏性高、无创、简便、检测迅速的筛查技术,内参基因*ACTB*用于IBD筛查中,可提高诊断效能,对疾

病发生、发展起到一定预测评估作用,而*SDC2*甲基化与肠炎无直接关系。但本次研究样本量较小,可造成分类偏差大,并未进行长期随访,故关于脱落细胞*ACTB*基因检测效能还需进一步探索。

参考文献

- [1] Wirth JP, Kitilya B, Petry N, et al. Growth Status, Inflammation, and Enteropathy in Young Children in Northern Tanzania[J]. Am J Trop Med Hyg, 2019,100(1):192-201.
- [2] 王庆忠,范云,沈祁烨.人类微生物组学与健康及其临床检验的需求[J].分子诊断与治疗杂志,2018,10(1):67-72.
- [3] 王龙,辛毅,梅俏.粪便检测在炎症性肠病评估中的价值[J].实用医学杂志,2016,32(8):1359-1361.
- [4] 潘辉,黄琰璿,王国新,等.粪便基因*SDC2*和*BMP3*甲基化联合检测在结直肠癌筛查中的价值[J].中国医药导报,2020,17(11):15-19.
- [5] 王福玲.世界医学会《赫尔辛基宣言》[J].中国医学伦理学,2016,29(3):544-546.
- [6] 钟敏儿,吴斌.炎症性肠病外科治疗国内外共识与指南主要内容介绍及解读[J].中国实用外科杂志,2017,37(3):244-247.
- [7] 杨志,王玲,孙子发,等.婴儿型炎症性肠病1例并文献分析[J].分子诊断与治疗杂志,2020,12(8):1112-1114.
- [8] 李军,吕愈敏.粪便巨细胞病毒DNA PCR检测在炎症性肠病患者中的应用价值[J].世界华人消化杂志,2016,24(21):3314-3318.
- [9] 冯凯瑜,范明娟,谭荣荣,等.粪便中MGMT,p16INK4A及ECAD基因启动子甲基化检测在结直肠癌诊断中的价值[J].海南医学,2016,27(21):3461-3463.
- [10] 王倩,商建,王晓月,等.*SDC2*基因甲基化对结直肠癌诊断价值的Meta分析[J].胃肠病学和肝病学杂志,2021,30(4):396-404.
- [11] 郭鹏,周晓俊,徐露,等.粪便DNA甲基化标志物检测在胃癌筛查中的应用[J].中华医学杂志,2021,101(11):808-812.
- [12] 王龙,辛毅,梅俏.粪便检测在炎症性肠病评估中的价值[J].实用医学杂志,2016,32(8):3.
- [13] Vaz Nery S, Bennett I, Clarke NE, et al. Characterisation of environmental enteropathy biomarkers and associated risk factors in children in the context of a WASH trial in Timor-Leste[J]. Int J Hyg Environ Health, 2018,221(6):901-906.
- [14] George CM, Burrows V, Perin J, et al. Enteric Infections in Young Children are Associated with Environmental Enteropathy and Impaired Growth[J]. Trop Med Int Health, 2018,23(1):26-33.
- [15] 曹亚萍,赵国栋,刘益,等.血浆胞裂蛋白9和多配体蛋白聚糖2前体甲基化联合检测与4种血清肿瘤标志物对结直肠癌诊断效果的对比性研究[J].中国综合临床,2021,37(2):105-111.

口腔癌患者血清UCA1、HGF、uPA水平与临床特征和预后的关系

冯建梅* 王钟华 王芹

【摘要】目的 研究口腔癌患者血清肝细胞生长因子(HGF)、尿激酶型纤溶酶原激活剂(uPA)、尿路上皮癌抗原1(UCA1)表达水平及其与临床特征和预后的关系。**方法** 选取河北北方学院附属第一医院2016年4月至2019年4月收治的83例口腔癌患者作为口腔癌组,另选择同期79例体检正常的志愿者作为对照组,检测两组血清UCA1、HGF、uPA表达水平,并分析其与口腔癌患者临床特征和预后关系。**结果** 口腔癌组患者血清UCA1、HGF、uPA表达水平均显著高于对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。低中分化、Ⅲ~Ⅳ期和有淋巴结转移患者血清UCA1、HGF、uPA表达水平明显高于高分化、Ⅰ~Ⅱ期和无淋巴结转移患者,肿瘤大小为T3-T4型患者血清uPA表达水平高于T1-T2型患者,差异均有统计学意义($P<0.05$)。UCA1、HGF、uPA高表达患者生存时间明显低于低表达患者,差异均有统计学意义($P<0.05$)。病灶低中分化、Ⅲ~Ⅳ期、有淋巴结转移以及血清UCA1、HGF、uPA的高表达均为导致口腔癌患者预后不良的独立危险因素($P<0.05$)。**结论** 口腔癌患者血清HGF、uPA和UCA1水平高表达与患者部分临床病理参数以及预后有关,检测患者血清HGF、uPA和UCA1水平可能有利于预后判断。

【关键词】 口腔癌;肝细胞生长因子;尿激酶型纤溶酶原激活剂;尿路上皮癌抗原1

Relationship between serum UCA1, HGF and uPA levels and clinical features and prognosis in patients with oral cancer

FENG Jianmei*, WANG Zhonghua, WANG Qin

(Department of Stomatology, the First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou, Hebei, China, 075000)

【ABSTRACT】 Objective To study the expression levels of serum hepatocyte growth factor (HGF), urokinase plasminogen activator (uPA) and urethral epithelium cancer antigen 1 (UCA1) in patients with oral cancer, and their relationship with clinical features and prognosis. **Methods** 83 patients with oral cancer (oral cancer group) and 79 healthy volunteers (control group) were enrolled in this study between April 2016 and April 2019. The expression levels of serum UCA1, HGF, and uPA in the two groups were tested, and their relationship with clinical features and prognosis of patients with oral cancer was analyzed. **Results** The expression levels of serum UCA1, HGF and uPA in the oral cancer group were significantly higher than those in the control group, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). The expression levels of serum UCA1, HGF and uPA were higher in patients with poorly and moderately differentiated tumors, patients with tumors in stage Ⅲ~Ⅳ and patients with lymph node metastasis than in those with highly differentiated tumors, stage Ⅰ~Ⅱ, and without lymph node metastasis. The expression level of serum uPA is higher in patients with a tumor size of T3~T4 type than in those with T1~T2 type, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). The survival time of patients with high expression levels of UCA1, HGF and uPA was significantly shorter than that of patients with low expression levels, and the differences were statistically significant ($P<$

基金项目:河北省医学科学研究课题计划(20210456)

作者单位:河北北方学院附属第一医院口腔科,河北,张家口 075000

*通信作者:冯建梅, E-mail: fengjianmei0011@163.com

0.05). Poorly and moderately differentiated lesions, stage III~IV, lymph node metastasis, and high expression of serum UCA1, HGF and uPA were independent risk factors for poor prognosis of patients with oral cancer ($P<0.05$). **Conclusion** The high expression levels of serum HGF, uPA and UCA1 in patients with oral cancer are closely related to some clinicopathological parameters and prognosis. The detection of serum HGF, uPA and UCA1 levels may be beneficial to prognosis judgment.

[KEY WORDS] Oral cancer; Hepatocyte growth factor; Urokinase plasminogen activator; Urothelial epithelium cancer antigen 1

口腔癌是发展中国家常见的十大癌症之一,近年来其发病率呈递增趋势,且趋于年轻化,45岁以下患者的比例甚至高达30%^[1]。虽通过手术、放化疗等方式让口腔癌患者的总体疗效有所提高,但5年生存率仍只在50%~60%之间^[2]。既往研究表明在组织细胞发生形态变化之前,分子水平的变化早已发生异常,出现某些肿瘤标记物表达水平异常变化^[3]。肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)是近年来关注度较高的激活肿瘤细胞增殖相关的众多传导通路的信号途径之一;尿激酶型纤溶酶原激活剂(Urokinase plasminogen activator, uPA)属于纤维蛋白溶解系统,对于肿瘤细胞侵袭、转移可能存在促进作用;尿路上皮癌抗原1(urethral epithelium cancer antigen, UCA1)是发现于膀胱癌中特异性表达的长链非编码RNA分子。国内外已有部分研究表明上述指标在口腔颌面部肿瘤中也存在异常表达情况^[4-6],但目前的研究尚集中于对口腔中组织形态学的研究,基于此,本研究将分析口腔癌患者血清UCA1、HGF、uPA表达情况,旨在探讨其与患者临床病理特征和预后的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取河北北方学院附属第一医院2016年4月至2019年4月收治的83例口腔癌患者作为口腔癌组,其中男54例,女29例;平均年龄(61.87 ± 10.34)岁。纳入标准:①均符合口腔癌诊断标准^[7],存在耳部和咽喉痛、斑块、溃疡、颈部淋巴结肿大、口腔黏膜可变粗糙/厚或呈硬结、口腔糜烂等症状;CT检查可见翼腭窝扩大、脂肪消失等;细胞学与活组织检查呈阳性。②在标本获取前未进行放化疗或免疫治疗;③患者临床资料完整。排除标准:①既往存在或伴有其他恶性肿瘤;②非原发于口腔的转移癌、多原发癌;③治疗后失访者;④因非肿瘤复发、转移原因死亡者。另选取同期

体检正常的志愿者79例作为对照组,其中男52例,女27例;平均年龄(60.18 ± 11.04)岁。两组患者性别、年龄比较无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。本研究经医院医学伦理委员会批准通过,受试者均签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 一般资料收集

收集患者一般资料,包括年龄、性别、肿瘤大小、分化程度、临床分期、淋巴结转移情况等。根据血清UCA1、HGF、uPA表达水平的cut-off值将口腔癌组患者分别分为高UCA1表达组和低UCA1表达组、高HGF表达组和低HGF表达组、高uPA表达组和低uPA表达组,比较不同血清UCA1、HGF、uPA表达患者生存时间^[8-10]。

1.2.2 血清指标检测

对照组于体检当天、口腔癌组患者于入院后次日抽取空腹静脉血5 mL。室温下静置30 min,以3 000 r/min进行离心分离10 min,取上清液于40℃保存。采用荧光定量PCR法检测血清UCA1相对表达量,采用酶联免疫吸附法检测血清HGF、uPA水平,试剂盒由上海恒远生化试剂有限公司提供,操作步骤严格按照试剂盒说明书进行。

1.2.3 随访

对口腔癌组患者均进行手术治疗以及术后放化疗。以术后出院为观察起点,以总生存时间(overall survival, OS, 疾病诊断至末次随访或患者死亡)作为观察终点,通过电话、门诊复诊等方法对患者及其家属进行随访,随访截止时间为2021年4月,随访时间约为24个月,无失访人员。

1.3 统计学分析

采用SPSS 19.0软件处理数据,计量数据以($\bar{x}\pm s$)表示,行 t 检验,以Kaplan-Meier法绘制生存曲线,应用Log-rank法进行生存分析,采用Cox风险回归模型分析口腔癌患者预后影响因素,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组血清UCA1、HGF、uPA表达水平比较

口腔癌组患者血清UCA1、HGF、uPA表达水平均显著高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表1。

表1 两组血清UCA1、HGF、uPA表达水平比较($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Comparison of the expression levels of serum UCA1, HGF and uPA between 2 groups ($\bar{x}\pm s$)

分组	n	UCA1表达量	HGF(ng/L)	uPA(mg/L)
口腔癌组	83	2.46±0.62	386.81±49.37	5.64±1.47
对照组	79	0.64±0.25	187.69±25.98	1.67±0.52
t值		24.277	31.888	22.688
P值		<0.001	<0.001	<0.001

2.2 血清UCA1、HGF、uPA表达水平与临床特征的关系

不同年龄、性别的口腔癌患者血清UCA1、HGF、uPA表达水平比较差异无统计学意义($P>0.05$),不同肿瘤大小患者的血清UCA1、HGF水平比较无统计学意义($P>0.05$),但低中分化、Ⅲ~Ⅳ期和有淋巴结转移患者血清UCA1、HGF、uPA表达水平明显高于高分化、Ⅰ~Ⅱ期和无淋巴结转移患者,肿瘤大小为T3~T4型患者血清uPA表达

水平高于T1~T2型患者,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表2。

2.3 不同血清UCA1、HGF、uPA表达患者生存分析

随访期间无失访人员,至随访结束,68例患者生存,15例患者死亡,均因原发灶复发死亡。UCA1、HGF、uPA高表达患者生存时间明显低于低表达患者,差异有统计学意义($P<0.05$)。见图1。

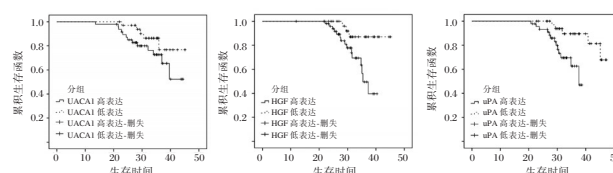


图1 不同血清UCA1、HGF、uPA表达患者Kaplan-Meier曲线

Figure 1 Kaplan-Meier curves of patients with different expression of serum UCA1, HGF and uPA

2.4 口腔癌患者预后影响因素的Cox回归分析

单因素及多因素Cox回归分析均证实病灶低分化、Ⅲ~Ⅳ期、有淋巴结转移以及血清UCA1、HGF、uPA的高表达均为导致口腔癌患者预后不良的独立危险因素($P<0.05$),见表3。

表2 血清UCA1、HGF、uPA表达水平与临床特征的关系($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Relationship between the expression levels of serum UCA1, HGF and uPA and clinical features ($\bar{x}\pm s$)

临床特征	n	UCA1表达量	t值	P值	HGF(ng/L)	t值	P值	uPA(mg/L)	t值	P值
年龄										
<60岁	45	2.43±0.56			384.15±51.55			5.61±1.41		
≥60岁	38	2.51±0.68	0.588	0.558	389.95±46.79	0.533	0.596	5.68±1.54	0.216	0.830
性别										
男	54	2.43±0.60			385.32±48.15			5.62±1.36		
女	29	2.53±0.66	0.699	0.487	389.60±51.63	0.376	0.708	5.70±1.68	0.235	0.815
病理分级										
低中分化	60	2.59±0.69			397.40±50.57			6.04±1.57		
高分化	23	2.12±0.43	3.042	0.003	359.19±46.22	3.152	0.002	4.62±1.23	3.898	<0.001
临床分期										
Ⅰ~Ⅱ期	48	2.31±0.58			376.59±47.72			5.01±1.42		
Ⅲ~Ⅳ期	35	2.67±0.68	2.596	0.011	400.82±51.62	2.207	0.030	6.52±1.56	4.589	<0.001
淋巴结转移										
有	39	2.71±0.68			405.16±53.31			6.29±1.72		
无	44	2.30±0.56	3.011	0.004	370.54±45.87	3.180	0.002	5.07±1.26	3.714	<0.001
肿瘤大小										
T1~T2	55	2.42±0.60			386.41±46.87			5.32±1.45		
T3~T4	28	2.55±0.66	0.902	0.370	387.61±54.29	0.104	0.917	6.28±1.52	2.806	0.006

表3 口腔癌患者预后影响因素的Cox回归分析

Table 3 Cox regression analysis of the prognostic factors in patients with oral cancer

病理指标	单因素			多因素		
	HR	95%CI	P值	HR	95%CI	P值
低中分化	2.067	1.269~3.367	0.004	3.473	1.558~7.742	0.002
Ⅲ~Ⅳ期	1.817	1.076~3.066	0.026	3.842	1.267~11.651	0.018
有淋巴结转移	2.214	1.450~3.382	0.001	2.214	1.538~3.189	<0.001
UCA1高表达	1.931	1.102~3.382	0.022	3.647	1.314~10.127	0.013
HGF高表达	1.837	1.184~2.849	0.007	2.291	1.471~3.568	<0.001
uPA高表达	2.002	1.143~3.506	0.016	2.683	1.444~4.985	0.002

3 讨论

肿瘤细胞的浸润、转移被认为是导致癌症治疗后复发、死亡等不良预后的重要原因。近年来,随着肿瘤分子生物学的深入研究,参与口腔癌发生、侵袭和转移的分子调控机制被逐渐揭示。HGF是一种可促进肝细胞DNA合成与增殖的营养因子,可由肿瘤组织的细胞外基质经蛋白水解酶降解后释放。已有研究表明HGF通过持续激活信号通路,从而参与肿瘤细胞的多种病理过程^[11]。Yasui等人^[12]发现HGF在口腔癌组织的阳性表达率明显高于癌旁组织,并认为过表达的HGF与口腔癌的恶性进展有关。uPA是一种蛋白水解酶,与HGF可协同发挥作用。UCA1是一种长链非编码RNA,在消化和泌尿生殖系统肿瘤中存在明显的表达差异,其异常表达可促进肿瘤细胞的增殖转移,增强肿瘤在人体的转移能力。

本研究发现,口腔癌组患者血清UCA1、HGF、uPA表达水平均显著高于对照组,提示口腔癌患者血清HGF、uPA和UCA1水平存在明显的高表达现象。Gao等^[13]也发现口腔鳞癌患者血清HGF含量明显高于健康人,且经治疗后无瘤生存患者相比于残余瘤患者血清HGF含量明显降低。本研究发现低分化、Ⅲ~Ⅳ期和有淋巴结转移患者血清UCA1、HGF、uPA表达水平相对更高,肿瘤大小为T3-T4型患者血清uPA表达水平相对更高,表明血清HGF、uPA和UCA1水平与口腔癌的发生、发展均存在一定的联系,与董爱芬^[14]、刘兵等^[15]研究结果类似。实体肿瘤的生长离不开血管提供的氧和营养物质,而一些通过血管转移的肿瘤也需要充足的血管。有学者认为,肿瘤细胞在乏氧条件下大量表达C-MET蛋白,当C-MET蛋白与HGF结合后,进而显著增加肿瘤细胞侵袭和转移能力;而uPA可调节纤溶酶的活性,促使纤溶酶原转化为纤溶酶,从而促进细胞外基质的降解,促进HGF的合成,进而与HGF相互作用,共同促进口腔癌的演进^[16]。也有研究发现在口腔癌的血管生长过程中,血管的内皮细胞可通过uPA的表达与内皮细胞表面的受体结合,有利于血管的长入,促进淋巴结的转移^[17]。目前已有研究发现UCA1具有促进肿瘤细胞的耐药性和转化能力,并能够通过调节caspase-3来抑制肿瘤细胞的凋亡^[18]。本研

究发现UCA1、HGF、uPA高表达患者生存时间明显低于低表达患者,且病灶低分化、Ⅲ~Ⅳ期、有淋巴结转移以及血清UCA1、HGF、uPA的高表达均为导致口腔癌患者预后不良的独立危险因素。但目前国内尚无关于UCA1、HGF、uPA高表达与口腔癌预后关系的相关研究,仍待于后续论证结论。推测其原因可能与血清HGF、uPA和UCA1的高表达会促进肿瘤细胞的增殖、侵袭和转移,而癌细胞的侵袭转移是导致患者死亡的主要原因有关。故对于血清HGF、uPA和UCA1高表达的患者,后续应加强监测,配合放化疗等方法提高其预后。

综上所述,口腔癌患者血清HGF、uPA和UCA1水平的高表达与癌症的病理分级、临床分期和淋巴结转移密切相关,同时也是导致患者预后不良的独立危险因素,有望成为口腔癌疾病严重程度判断以及预后评估的重要生物标志物。

参考文献

- [1] Hussein AA, Helder MN, de Visscher JG, et al. Global incidence of oral and oropharynx cancer in patients younger than 45 years versus older patients: A systematic review[J]. *Eur J Cancer*, 2017, 82: 115-127.
- [2] Ong TK, Murphy C, Smith AB, et al. Survival after surgery for oral cancer: a 30-year experience[J]. *Br J Oral Maxillofac Surg*, 2017, 55(9): 911-916.
- [3] 邵婷如, 赵萌, 吕晓智. 口腔鳞状细胞癌肿瘤标记物的研究[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2016, 8(2): 123-129.
- [4] 赵小康, 刘业海, 吴静, 等. 肝细胞生长因子(HGF)增强头颈肿瘤侵袭转移能力[J]. *基因组学与应用生物学*, 2019, 38(12): 348-353.
- [5] Serpa MS, Mafra RP, Queiroz SIML, et al. Expression of urokinase-type plasminogen activator and its receptor in squamous cell carcinoma of the oral tongue[J]. *Braz Oral Res*, 2018, 32: e93.
- [6] Pentenero M, Bowers LM, Jayasinghe R, et al. World Workshop on Oral Medicine VII: Clinical evidence of differential expression of lncRNAs in oral squamous cell carcinoma: A scoping review[J]. *Oral Dis*, 2019, 25(Suppl 1): 88-101.
- [7] Kerawala C, Roques T, Jeannon JP, et al. Oral cavity and lip cancer: United Kingdom National Multidisciplinary Guidelines[J]. *J Laryngol Otol*, 2016, 130(S2): S83-S89.
- [8] Kilic-Baygatalp N, Ozturk N, Orsal-Ibisoglu E, et al. Evaluation of serum HGF and CK18 levels in patients with esophageal cancer[J]. *Genet Mol Res*, 2016, 15(3): 29.
- [9] Zhang Z, Li JZ, Wei ZW, et al. Correlation between expression levels of lncRNA UCA1 and miR-18a with prognosis of hepatocellular cancer[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(7): 3586-3591.

(下转第1804页)

· 论 著 ·

NHL化疗患者NLR、PLR、RDW变化及对肺部感染的预测价值

刘蕾^{1,2} 易琴¹ 聂甜¹ 何娅娜^{1*}

[摘要] **目的** 探究非霍奇金淋巴瘤(NHL)化疗患者外周血中性粒细胞计数/淋巴细胞计数比率(NLR)、血小板计数/淋巴细胞计数比率(PLR)和红细胞体积分布宽度(RDW)变化情况,分析其对肺部感染的预测价值。**方法** 选取2018年3月至2021年3月在湖南中医药大学第一附属医院接受化疗的110例NHL患者(观察组)的临床资料,根据是否存在肺部感染将观察组患者分为肺部感染组、非肺部感染组和未感染组,根据感染程度将肺部感染组患者分为轻中度感染和重度感染,另选取同期体检的105例健康人群(对照组),比较各组外周血NLR、PLR和RDW表达水平,Logistic回归分析NHL化疗患者肺部感染的危险因素;受试者工作特征(ROC)曲线分析NLR、PLR和RDW对NHL化疗患者发生肺部感染的预测价值。**结果** 外周血NLR、PLR和RDW水平:对照组<观察组化疗后<和观察化疗前,肺部感染组>非肺部感染组>未感染组,重度感染>轻中度感染,差异均有统计学意义($P<0.05$)。Logistic回归分析显示,化疗前NLR、PLR和RDW水平是化疗后肺部感染的危险因素($P>0.05$)。ROC曲线分析显示,NLR、PLR和RDW对肺部感染预测的AUC值分别为0.848、0.758和0.713($P<0.05$)。**结论** NHL患者外周血NLR、PLR、RDW水平偏高,化疗后三者水平均有所改善,其水平变化对肺部感染的预测具有一定参考价值。

[关键词] 非霍奇金淋巴瘤;肺部感染;中性粒细胞计数/淋巴细胞计数比率;血小板计数/淋巴细胞计数比率;红细胞体积分布宽度

Changes of NLR, PLR and RDW in NHL chemotherapy patients and their predictive value for lung infection

LIU Lei^{1,2}, YI Qin¹, NIE Tian¹, HE Yana^{1*}

(1. Department of Hematology and Oncology, the First Affiliated Hospital of Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha, Hunan, China, 410000; 2. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan, China, 410000)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the changes of peripheral blood neutrophil to lymphocyte ratio (NLR), platelet to lymphocyte ratio (PLR) and red blood cell distribution width (RDW) in patients undergoing non-Hodgkin lymphoma (NHL) chemotherapy, and analyze their predictive value for lung infection. **Methods** A total of 110 patients undergoing chemotherapy for NHL in the First Affiliated Hospital of Hunan University of Traditional Chinese Medicine (observation group) and 105 healthy individuals (control group) were enrolled in this study between March 2018 and March 2021. According to presence or absence of lung infection, patients in the observation group were divided into the lung infection group, the non-lung infection group and the non-infection group. According to the severity of infection, patients in the lung infection group were divided into the mild, the moderate infection group and the severe infection group. Peripheral blood

基金项目:湖南省自然科学基金资助项目(2018JJ40207)

作者单位:1. 湖南中医药大学第一附属医院血液肿瘤科,湖南,长沙 410000

2. 湖南中医药大学,湖南,长沙 410000

*通信作者:何娅娜, E-mail: 909932870@qq.com

NLR, PLR and RDW were compared among the groups. Logistic regression analysis was performed to analyze the risk factors for lung infection in patients undergoing chemotherapy for NHL. The receiver operating characteristic (ROC) curve was used to analyze the predictive value of the three indicators for lung infection in patients undergoing chemotherapy for NHL. **Results** The order of peripheral blood NLR, PLR and RDW was as follows: the control group < the observation group after chemotherapy < the observation group before chemotherapy. The lung infection group > the non-lung infection group > the non-infection group. The severe infection group > the moderate infection group > the mild infection group, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). Logistic regression analysis showed that NLR, PLR and RDW before chemotherapy were risk factors of lung infection after chemotherapy ($P > 0.05$). ROC curve analysis showed that the AUC values of NLR, PLR and RDW for predicting lung infection were 0.848, 0.758 and 0.713, respectively ($P < 0.05$). **Conclusion** The levels of NLR, PLR and RDW in the peripheral blood of NHL patients are relatively high, and the levels of the three have improved after chemotherapy. The changes in the three levels have certain reference value for the prediction of lung infection.

[KEY WORDS] NHL; Lung infection; NLR; PLR; RDB

联合化疗是临床治疗非霍奇金淋巴瘤(non Hodgkin lymphoma, NHL)的主要手段,但治疗期间因抗肿瘤药物的免疫抑制作用,患者往往存在免疫力下降等问题,极易引发肺部感染,加重患者病情^[1-3]。因此,化疗期间提前预警感染的发生,并及时进行抗感染治疗,对NHL化疗患者并发肺部感染的早期防治具有重要意义。近年来研究表明,从血常规检查中获得的外周血中性粒细胞计数/淋巴细胞计数比率(neutrophil to lymphocyte ratio, NLR)、血小板计数/淋巴细胞计数比率(platelet to lymphocyte ratio, PLR)和红细胞体积分布宽度(red blood cell distribution width, RDW)是反映炎症反应严重程度及诊断感染性疾病的重要指标^[4],但有关其在NHL化疗患者并发肺部感染中的研究报道较少。本研究将评估患者化疗前后外周血NLR、PLR和RDW的变化情况,并分析其在患者肺部感染中的预测价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2018年3月至2021年3月在湖南中医药大学第一附属医院接受化疗的110例NHL患者(观察组)的临床资料,纳入标准:①临床检查符合NHL诊断标准,且均经病理检查确诊,肿瘤分期为Ⅱ~Ⅳ期^[5];②首次接受化疗患者;③性别不限,年龄 ≥ 18 岁。排除标准:①合并其他恶性肿瘤、呼吸系统疾病患者;②合并重要脏器功能障碍患者。另选取同期体检的健康人群105例为对照组。观察组男73例,女37例,平均年龄(48.28 ± 5.46)岁;

对照组男69例,女36例,平均年龄(46.34 ± 6.72)岁。两组的性别、年龄等一般资料比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。本研究经院医学伦理委员会批准通过,受试者或家属均签署知情同意书。

1.2 研究方法

1.2.1 一般临床资料收集

收集观察组患者的性别、年龄、身体质量指数(body mass index, BMI)、吸烟史、基础疾病(高血压、糖尿病)、化疗前第1秒用力呼气容积(forced expiratory volume in one second, FEV₁)和肿瘤分期等资料。

1.2.2 肺部感染评估

参考肺部感染相关诊断标准^[6]将观察组患者分为肺部感染组(合并肺部感染)、非肺部感染组(未发生肺部感染,合并其他感染性疾病)和未感染组(未发生感染)。肺炎严重指数(pneumonia severity index, PSI)评估肺部感染组患者的肺部感染严重程度,PSI评分 < 130 分为轻中度感染,PSI评分 ≥ 130 分为重度感染^[7]。

1.2.3 外周血NLR、PLR和RDW水平检测

观察组患者于入院后次日清晨(化疗前)、治疗4个疗程后(化疗后)抽取空腹静脉血,对照组于体检当日清晨抽取空腹静脉血,采用血细胞分析仪(BD FACS calibur,美国BD公司)行血常规检测,获得中性粒细胞计数、淋巴细胞计数、血小板计数和RDW水平,据此计算NLR和PLR。

1.3 统计学处理

采用SPSS 20.0统计软件对数据进行分析。计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方

差分析,进一步两两比较采用LSD-T比较;计数资料以 $n(\%)$ 表示,行 χ^2 检验,等级资料行秩和检验;危险因素分析采用Logistic回归分析法;受试者工作特征(ROC)曲线分析NLR、PLR和RDW对NHL化疗患者发生肺部感染的预测价值;以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 化疗前后观察组与对照组外周血NLR、PLR和RDW水平比较

外周血NLR、PLR和RDW水平:对照组<观察组化疗后<和观察化疗前,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表1。

表1 化疗前后观察组与对照组外周血NLR、PLR和RDW水平比较($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Comparison of peripheral blood NLR, PLR and RDW between observation group and control group before and after chemotherapy ($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	NLR	PLR	RDW(%)
观察组化疗前	110	2.83±0.86 ^{ab}	178.46±48.34 ^{ab}	12.78±1.77 ^{ab}
观察组化疗后	110	1.96±0.58 ^a	148.35±36.27 ^a	12.37±1.53 ^a
对照组	105	1.58±0.41	112.92±18.14	10.13±2.78
<i>F</i> 值		106.134	86.034	51.452
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001

注:与对照组比较,^a $P<0.05$;与观察组化疗后比较,^b $P<0.05$ 。

2.2 肺部感染组、非肺部感染组与未感染组一般临床资料比较

110例NHL患者中,发生肺部感染患者34例(肺部感染组),发生其他类型感染患者18例(非肺部感染组),未发生肺部感染患者58例(未感染组)。肺部感染组和非肺部感染组患者的吸烟史

病例数高于未感染组,化疗前FEV₁水平低于未感染组,差异均有统计学意义($P<0.05$),肺部感染组和非肺部感染组吸烟史病例数、化疗前FEV₁水平比较差异无统计学意义($P>0.05$)。见表2。

2.3 3组患者化疗前外周血NLR、PLR和RDW水平比较

三组患者化疗前外周血NLR、PLR和RDW水平:肺部感染组>非肺部感染组>未感染组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表3。

表3 3组患者化疗前外周血NLR、PLR和RDW水平比较($\bar{x}\pm s$)

Table 3 Comparison of peripheral blood NLR, PLR and RDW before 3 groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	NLR	PLR	RDW(%)
肺部感染组	34	3.77±0.75 ^{ab}	190.77±38.47 ^{ab}	13.28±1.68 ^{ab}
非肺部感染组	18	2.75±0.58 ^b	179.53±20.46 ^b	12.88±1.01 ^b
未感染组	58	2.31±0.63	170.91±22.63	12.46±1.07
<i>F</i> 值		52.285	5.328	4.362
<i>P</i> 值		<0.001	0.006	0.005

注:与非肺部感染组比较,^a $P<0.05$;与未感染组比较,^b $P<0.05$ 。

2.4 肺部感染组不同感染程度患者化疗前外周血NLR、PLR和RDW水平比较

34例发生肺部感染患者中,PSI评分<130分16例(轻中度感染),PSI评分≥130分18例(重度感染)。重度感染患者化疗前外周血NLR、PLR和RDW水平明显高于轻中度感染患者,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表4。

2.5 Logistic回归分析

化疗前外周血NLR、PLR和RDW水平是影响NHL患者化疗后肺部感染的危险因素($P<0.05$)。见表5。

表2 肺部感染组、非肺部感染组与未感染组一般临床资料比较 [$n(\%)$, ($\bar{x}\pm s$)]

Table 2 Comparison of general clinical data among the lung infection group, the non-lung infection group and the non-infection group [$n(\%)$, ($\bar{x}\pm s$)]

指标		肺部感染组(<i>n</i> =34)	非肺部感染组(<i>n</i> =18)	未感染组(<i>n</i> =58)	<i>F</i> / χ^2 值	<i>P</i> 值
性别	男	20(58.82)	10(55.56)	31(53.45)	0.882	0.932
	女	14(41.18)	8(44.44)	27(46.55)		
年龄(岁)		50.41±7.63	48.48±5.13	49.24±8.65	0.409	0.665
BMI(kg/m ²)		23.46±2.23	24.06±1.73	24.24±1.28	2.293	0.106
吸烟史		18(52.94) ^{ab}	7(38.89)	11(18.97)	11.613	0.003
基础疾病	高血压	13(38.24)	8(44.44)	29(50.00)	1.205	0.547
	糖尿病	12(35.29)	6(33.33)	22(37.93)	0.150	0.928
化疗前FEV ₁ (L)		1.26±0.47 ^{ab}	1.32±0.61	1.61±0.53	5.443	0.006
肿瘤分期	Ⅱ期	9(26.47)	6(33.33)	18(31.03)	1.579	0.813
	Ⅲ期	17(50.00)	10(55.56)	31(53.45)		
	Ⅳ期	8(23.53)	2(11.11)	9(15.52)		

注:与非肺部感染组比较,^a $P<0.05$;与未感染组比较,^b $P<0.05$ 。

表4 肺部感染组不同感染程度患者化疗前外周血 NLR、PLR 和 RDW 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)Table 4 Comparison of peripheral blood NLR, PLR and RDW between patients with different degrees of infection in the lung infection group before chemotherapy ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	NLR	PLR	RDW(%)
轻中度感染	16	4.07±0.86	202.41±28.53	13.83±1.51
重度感染	18	3.50±0.61	180.42±30.64	12.79±1.34
t 值		2.248	2.157	2.169
P 值		0.032	0.039	0.038

表5 Logistic 回归分析结果

Table 5 The results of logistic regression analysis

因素	β 值	SE 值	Wald χ^2 值	OR 值	95%CI	P 值
吸烟史	0.285	0.267	1.139	1.330	0.788~2.244	0.286
化疗前 FEV ₁	0.176	0.113	2.426	1.192	0.956~1.488	0.120
化疗前 NLR	0.096	0.042	5.224	1.101	1.014~1.195	0.023
化疗前 PLR	0.068	0.030	5.138	1.070	1.009~1.135	0.024
化疗前 RDW	0.124	0.052	5.686	1.132	1.022~1.253	0.018

2.6 NLR、PLR 和 RDW 对 NHL 化疗患者肺部感染的预测价值分析

ROC 曲线分析结果显示,化疗前 NLR、PLR 和 RDW 水平对 NHL 化疗患者肺部感染预测的 AUC 值分别为 0.848、0.758 和 0.713 ($P < 0.05$)。见表 6、图 1。

表6 NLR、PLR 和 RDW 对 NHL 化疗患者肺部感染的预测价值分析

Table 6 Predictive value of NLR, PLR and RDW for lung infection in patients undergoing chemotherapy for NHL

指标	AUC	截断值	Youden's 指数	敏感度	特异度	P 值
NLR	0.848	2.86	0.760	90.00	86.00	<0.001
PLR	0.758	180.50	0.460	76.70	68.00	<0.001
RDW	0.713	13.10%	0.447	70.00	76.00	0.003

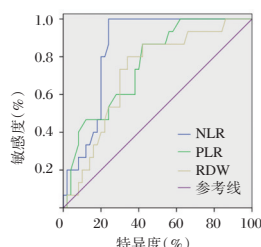


图1 ROC 曲线

Figure 1 ROC curve

3 讨论

化疗作为 NHL 最常用的临床治疗手段,主要通过破坏肿瘤细胞结构、抑制肿瘤细胞增殖等作用发挥治疗效果,但化疗后引起的肺部感染不

仅会影响治疗效果,还会增加患者的死亡风险,需引起高度重视^[8]。因此,寻找与疾病病理生理学相关的生物标志物以实现化疗后肺部感染的早期预测在改善患者预后方面具有重要意义。

炎症反应被认为是肿瘤发生发展的病理生理学基础,肿瘤细胞、炎性细胞可通过调控信号通路、诱导细胞因子合成等参与肿瘤的发生发展^[9]。与中性粒细胞、淋巴细胞、红细胞相关的指标 NLR、PLR 和 RDW 已被证实是多种恶性肿瘤预后的独立预测因素,在医院获得性肺炎的病情评估中也有所应用^[10]。但其对 NHL 化疗患者并发肺部感染是否也存在预测价值,尚需临床验证。本研究发现,化疗前后,观察组的外周血 NLR、PLR 和 RDW 水平均明显高于对照组,且化疗后观察组的外周血 NLR、PLR 和 RDW 水平均明显低于化疗前,提示 NHL 患者外周血 NLR、PLR、RDW 水平偏高,化疗可改善患者外周血 NLR、PLR、RDW 水平,与 Ju 等^[11]的结果一致,这主要与化疗可在一定程度上增强患者的抗肿瘤能力有关。

化疗患者由于免疫力下降,会使机体处于慢性微炎症状态,呼吸道黏膜的屏障作用、排痰能力减弱,病原菌更易侵入,增加了肺部感染概率^[12]。本研究中,肺部感染组患者的吸烟史病例数最高,化疗前 FEV₁ 水平最低,这可能与长期吸烟会造成支气管黏膜损伤,使肺部顺应性下降,增加肺部感染风险有关^[13];也可能与肺功能下降患者多存在辅助性 T 细胞 17 和调节性 T 细胞失衡的现象,抵御外界病原菌感染的能力下降有关^[14]。本研究中化疗前外周血 NLR、PLR 和 RDW 水平比较,肺部感染组>非肺部感染组>未感染组,重度感染>轻中度感染,且化疗前外周血 NLR、PLR 和 RDW 水平是 NHL 患者肺部感染的危险因素,提示化疗前外周血 NLR、PLR 和 RDW 水平升高,患者发生肺部感染的风险增大。俞怡雪等^[15]研究发现,NLR、PLR 与小儿肺部感染的严重程度和免疫紊乱相关,可作为临床辅助评估肺部感染的重要指标。ROC 曲线分析结果显示,NLR、PLR 和 RDW 对 NHL 化疗患者肺部感染预测的 AUC 值分别为 0.848、0.758 和 0.713,进一步表明 NLR、PLR 和 RDW 与 NHL 患者化疗期间并发肺部感染相关,三者可作为预测患者肺部感染的良好指标。因此,临床可通过监测 NLR、PLR 和 RDW 表达水平对 NHL 患者化疗期间的肺部感染情况进行早期

预测,同时积极采取相关防治措施以降低肺部感染发生率,提高化疗有效性。

综上所述,NHL患者外周血NLR、PLR、RDW水平偏高,化疗后患者的外周血NLR、PLR、RDW水平均有所改善,其水平变化对肺部感染的临床预测具有一定参考价值。

参考文献

- [1] Wei Y, Yang Q, Qin Q, et al. Profiling of the Risk Factors and Designing of a Model to Identify Ischemic Stroke in Patients with Non-Hodgkin Lymphoma: A Multicenter Retrospective Study[J]. *Eur Neurol*, 2020,83(1):1-8.
- [2] Lee DH, Kim GW, Kwon SH. The HDAC6-selective inhibitor is effective against non-Hodgkin lymphoma and synergizes with ibrutinib in follicular lymphoma[J]. *Mol Carcinog*, 2019, 58(6):944-956.
- [3] 黄杨,张磊,郭伟. CRP、PCT联合肺部感染评分在ICU肺部感染诊断及预后中的应用价值[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2020,12(8):1064-1068.
- [4] 陈万臣,辛莘,郭雅丽,等. NLR、PLR、RDW检测在结直肠癌诊断、预后评估中的研究[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2021,13(6):893-896.
- [5] Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues [M]. Lyon: IARC Press, 2008:250-300.
- [6] 中华医学会呼吸病学分会感染学组. 中国成人医院获得性肺炎与呼吸机相关性肺炎诊断和治疗指南(2018年版)[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2018,41(4):255-280.
- [7] 冯开俊,张泓. 血小板相关参数联合肺炎严重指数评分对重症肺炎患者病死率的预测作用[J]. *中国急救医学*, 2019, 18(3):739-743.
- [8] 赵海涛,王春燕,辛杰,等. 非霍奇金淋巴瘤合并肺部感染列线图风险预测模型的建立[J]. *中华医院感染学杂志*, 2020, 30(21):68-72.
- [9] El-Nikhely N, Karger A, Sarode P, et al. Metastasis-Associated Protein 2 Represses NF- κ B to Reduce Lung Tumor Growth and Inflammation[J]. *Cancer Res*, 2020,80(19):4199-4211.
- [10] 李萌,姚莉,王菁,等. NLR、PLR在评估重症肺炎患者预后中的价值[J]. *安徽医学*, 2020,41(4):106-109.
- [11] Ju C, Wen Y, Zhang L, et al. Neoadjuvant Chemotherapy Based on Abraxane/Human Neutrophils Cytopharmaceuticals with Radiotherapy for Gastric Cancer[J]. *Small*, 2019,15(5): e1804191.
- [12] Lavi N, Avivi I, Kra-Oz Z, et al. Community-acquired respiratory infections are common in patients with non-Hodgkin lymphoma and multiple myeloma[J]. *Support Care Cancer*, 2018,26(7):2425-2431.
- [13] Wang J, Ji Y, Jiang L, et al. Analysis of factors influencing hospital-acquired infection in postoperative patients with intracranial aneurysm[J]. *BMC Neurol*, 2019,19(1):332.
- [14] 党瑞志,刘羽. 胸腺肽联合异丙托溴铵雾化吸入对老年COPD合并肺部感染患者肺功能及免疫功能的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2020,40(22):4760-4762.
- [15] 俞怡雪,张芙蓉,范玉洁,等. NLR和PLR在肺炎支原体肺炎患儿中的意义[J]. *中国妇幼保健*, 2019,34(19):4467-4470.
- [10] Banys-Paluchowski M, Witzel I, Aktas B, et al. The prognostic relevance of urokinase-type plasminogen activator (uPA) in the blood of patients with metastatic breast cancer[J]. *Sci Rep*, 2019,9(1):2318.
- [11] 马德健,曹珍,王贇士,等. 沉默肝细胞生长因子受体c-Met表达对结肠癌细胞生物学特性的影响[J]. *中华肿瘤杂志*, 2020, 42(05):362-368.
- [12] Yasui H, Ohnishi Y, Nakajima M, et al. Migration of oral squamous cell carcinoma cells are induced by HGF/c-Met signalling via lamellipodia and filopodia formation[J]. *Oncol Rep*, 2017,37(6):3674-3680.
- [13] Gao P, Li C, Chang Z, et al. Carcinoma associated fibroblasts derived from oral squamous cell carcinoma promote lymphangiogenesis via c-Met/PI3K/AKT *in vitro* [J]. *Oncol Lett*, 2018,15(1):331-337.
- [14] 董爱芬,李旭升. PTEN, MMP-7,血清HGF, uPA在口腔鳞状细胞癌中的诊断价值及其与组织分化和淋巴结转移的关系[J]. *中国实验诊断学*, 2018, 22(7):1130-1133.
- [15] 刘兵,张爱泓,张贞. UCA1,核因子,口腔菌群与口腔癌发生发展的相关性[J]. *实用癌症杂志*, 2017, 32(9):1423-1426.
- [16] Hartmann S, Bhola NE, Grandis JR. HGF/Met Signaling in Head and Neck Cancer: Impact on the Tumor Microenvironment[J]. *Clin Cancer Res*, 2016,22(16):4005-4013.
- [17] Christensen A, Kiss K, Lelkaitis G, et al. Urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR), tissue factor (TF) and epidermal growth factor receptor (EGFR): tumor expression patterns and prognostic value in oral cancer[J]. *BMC Cancer*, 2017,17(1):572.
- [18] Yang YT, Wang YF, Lai JY, et al. Long non-coding RNA UCA1 contributes to the progression of oral squamous cell carcinoma by regulating the WNT/ β -catenin signaling pathway[J]. *Cancer Sci*, 2016,107(11):1581-1589.

(上接第1799页)

S100A2、Blimp1 在多发性骨髓瘤患者骨髓单个核细胞中的表达水平及意义

吕殿亮¹ 张宽顺² 吴艺² 冯磊² 石琳^{2*}

【摘要】目的 研究 S100 钙结合蛋白(S100A2)、B 淋巴细胞诱导成熟蛋白-1(Blimp1)在多发性骨髓瘤(MM)患者骨髓单个核细胞(BMMNCs)中的表达水平及意义。**方法** 选取 2018 年 3 月至 2020 年 5 月于河南省中医院治疗的 MM 患者 82 例作为观察组(采用 VAD 治疗方案),同时选取同期贫血患者(常规贫血治疗)35 例作为对照组。分别采用酶联免疫吸附法与反转录聚合酶链式反应法检测 MM 患者 BMMNC 中 S100A2、Blimp1 的水平。观察比较两组一般资料及 S100A2、Blimp1 表达水平;采用 Pearson 相关性检验分析 MM 患者 Blimp1、S100A2 表达水平的相关性;建立受试者工作特征(ROC)曲线分析 MM 发生的预测价值。**结果** 观察组 S100A2 表达水平显著低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);Blimp1 表达水平显著高于对照,组差异有统计学意义($P<0.05$)。S100A2、Blimp1 表达水平均为 MM 发生的独立危险因素($P<0.05$)。S100A2 与 Blimp1 呈显著负相关($P<0.05$)。S100A2、Blimp1 及联合指标预测 MM 发生的曲线下面积(AUC)分别为 0.881、0.836、0.945,联合指标预测价值更高,敏感度和特异度分别为 97.1%与 78.0%。**结论** S100A2、Blimp1 表达水平均可作为 MM 发生的独立危险因素,且 S100A2、Blimp1 表达水平均可作为 MM 发生的预测因子,其中联合指标预测价值更高。

【关键词】 多发性骨髓瘤; S100 钙结合蛋白 A2; B 淋巴细胞诱导成熟蛋白-1; 骨髓单个核细胞

Expression and significance of S100A2 and Blimp1 in bone marrow mononuclear cells of patients with multiple myeloma

LV Dianliang¹, ZHANG Kuanshun², WU Yi², FENG Lei², SHI Lin^{2*}

(1. Department of Hematology, Henan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou, Henan, China, 450002; 2. Department of Hematology, The Second Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou, Henan, China, 450002)

【ABSTRACT】Objective To study the expression level and significance of S100 calcium binding protein (S100A2) and B lymphocyte-induced mature protein-1 (Blimp1) in bone marrow mononuclear cells (BMMNC) of patients with multiple myeloma (MM). **Methods** A total of 82 patients with MM who were treated in Henan Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine from March 2018 to May 2020 were selected as the observation group (using the VAD treatment plan), and 35 patients with anemia during the same period (conventional anemia treatment) were selected as the control group. Enzyme-linked immunosorbent assay and reverse transcription polymerase chain reaction were used to detect the levels of S100A2 and Blimp1 in BMMNC of MM patients. The general data and the expression levels of S100A2 and Blimp1 between the two groups were observed and compared. Pearson correlation test was used to analyze the correlation between the expression levels of Blimp1 and S100A2 in MM patients. The receiver operating characteristic (ROC) curve was established to analyze the predictive value of the occurrence of MM. **Results** After univariate analysis, the expression level of S100A2 in the observation group was significantly lower than that in the control group ($P<$

基金项目:河南省医学科技攻关计划项目(192102310158)

作者单位:1. 河南省中医院血液科,河南,郑州 450002

2. 河南省中医药大学第二附属医院血液科,河南,郑州 450002

*通信作者:石琳, E-mail:slin7085@163.com

0.05). The expression level of Blimp1 was significantly higher than that in the control group ($P<0.05$). The expression levels of S100A2 and Blimp1 were independent risk factors for the occurrence of MM ($P<0.05$). S100A2 was significantly negatively correlated with Blimp1 ($P<0.05$). The area under the curve (AUC) of S100A2, Blimp1 and the combination of the two predicting the occurrence of MM are 0.881, 0.836, 0.945, respectively. The combined detection has a higher predictive value, and the sensitivity and specificity are 97.1% and 78.0%, respectively. **Conclusion** The expression levels of S100A2 and Blimp1 can be used as independent risk factors and predictors for the occurrence of MM, and the combination of the two has a higher predictive value.

[KEY WORDS] Multiple myeloma; S100A2; Blimp1; BMMNCS

多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)是血液系统恶性肿瘤类疾病,其特征为克隆浆细胞异常增殖,可引起骨折、贫血、高钙血症等^[1]。MM发病率在血液系统恶性肿瘤类疾病为第二位,仅次于非霍奇金淋巴瘤,多发于老年人群,极大影响患者生存质量。研究表明,相关细胞及分子生物学与MM患者之间有很大的关系^[2]。S100 钙结合蛋白 A2 (S100A2)属于S100 蛋白家族,测定S100 蛋白浓度有助于判断相关部位的病灶大小、患者预后等^[3]。S100 蛋白家族中众多成员在MM等不同疾病中呈现异常表达,而S100A2位于细胞核中,并与细胞周期有一定关系。B淋巴细胞诱导成熟蛋白-1 (Blimp1)为浆细胞分化过程中的主要调节因子,MM患者体内浆细胞出现异常增殖,Blimp1可作为重要的调节与预测指标^[4]。目前国内外的研究多集中于将MM患者体内的S100A2或Blimp1作为单独指标讨论,但关于MM患者与两指标间关系的研究较少。本研究旨在研究S100A2、Blimp1在MM患者骨髓单个核细胞(BMMNCS)中的表达水平及意义,以期临床治疗提供案例依据,报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2018年3月至2020年5月于河南省中医院血液科治疗的MM患者82例为观察组(MM患者),平均病程为(8.68±2.13)月,同期本科收治的单纯贫血治疗患者35例为对照组,其中,轻度贫血20例,中度贫血11例,重度贫血4例;缺铁性贫血20例,巨幼细胞性贫血7例,再生障碍性贫血5例,其他3例。MM分型为IgG型43例,IgA型29例,IgD型6例,IgM型4例。依据MM的国际分期体系(ISS)^[5]对患者进行分期:I期14例,II期22例,III期46例。两组患者的一般资料比较差异无统计学意义($P>0.05$),本研究经医院医学伦理委员会批准,患者及其家属均知情且签订同意书。

纳入标准:①符合《中国多发性骨髓瘤诊治指南(2020年修订)》^[6]中相关诊断标准:经骨髓细胞学检查、病理检查等确诊为MM患者②入组前未接受相关MM治疗方式;③对化疗等无禁忌;④患者其它器官无严重病变;⑤治疗依从性良好。排除标准:①存在其他免疫类疾病;②具有精神疾病、认知障碍及沟通交流障碍患者;③非首次确诊MM;④不愿意参与研究者;⑤中途退出者。

1.2 方法

两组患者均保持良好休息、营养补充等常规治疗。观察组患者采用VAD方案实施化疗:长春新碱0.4 mg+多柔比星9 mg/m²,连续静滴4 d,地塞米松40 mg/天口服,4 d为1个小疗程,4周为1个大疗程。入院后,第二日清晨采集两组患者空腹静脉血3~5 mL,使用EDTA管并且加入肝素钠进行抗凝处理,分离患者BMMNCS,放置于-80℃的超低温环境下。采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测患者BMMNCS中S100A2表达水平,采用反转录聚合酶链式反应法(RT-PCR)检测患者BMMNCS中Blimp1表达水平。试剂盒分别购至武汉伊莱瑞特生物科技有限公司与上海联迈生物工程有限公司,操作步骤均严格按照试剂盒说明书进行。

1.3 统计学分析

使用SPSS 22.0软件进行数据分析。计数资料用 $n(\%)$ 表示,行 χ^2 检验;计量资料用($\bar{x} \pm s$)表示,两组间采用 t 检验,采用Pearson相关性检验分析MM患者BMMNCS中Blimp1、S100A2水平的相关性;采用受试者工作特征(ROC)曲线分析患者BMMNCS中Blimp1、S100A2表达水平及联合指标对发生MM的预测价值。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组一般资料比较

两组年龄、性别、体质量指数、吸烟史等比较

差异无统计学意义($P>0.05$)。观察组患者 S100A2 表达水平显著低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$); Blimp1 表达水平显著高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

表 1 两组一般资料比较 ($\bar{x}\pm s$)Table 1 Comparison of general information between 2 groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	年龄(年)	性别(男)	BMI(kg/m ²)	S100A2(ng/mL)	Blimp1(相对比值)	吸烟史(年)
观察组	82	70.98±5.22	45	23.32±3.22	1.35±0.24	2.39±0.67	20.96±5.48
对照组	35	71.56±5.35	23	23.48±3.36	1.87±0.39	1.46±0.38	21.52±5.32
<i>t</i> 值		0.546	1.183	0.243	8.806	7.689	0.510
<i>P</i> 值		0.586	0.277	0.808	<0.001	<0.001	0.611

2.2 MM 病因的单因素分析

S100A2、Blimp1 表达水平比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表 2。

表 2 MM 患者病因的单因素分析 ($\bar{x}\pm s$)Table 2 Single factor analysis of the etiology of MM patients ($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	S100A2(ng/mL)	Blimp1(相对比值)
观察组	82	1.35±0.24	2.39±0.67
对照组	35	1.87±0.39	1.46±0.38
χ^2 值		77.339	59.060
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001

2.3 MM 患者疾病发生影响因素的多因素 Logistic 回归分析

基于患者病因的单因素分析结果,以上述具有统计学意义的因素为自变量,以是否发生 MM 为因变量(发生组=1,未发生组=2),纳入多项 Logistic 回归模型进行分析,结果显示:S100A2、Blimp1 表达水平均为宫颈癌术后复发的独立危险因素($P<0.05$)。见表 3。

表 3 MM 患者疾病发生影响因素的多因素 Logistic 回归分析
Table 3 Multivariate Logistic regression analysis of factors affecting the occurrence of MM patients

变量	<i>B</i> 值	<i>SE</i> 值	Wald χ^2 值	<i>OR</i> 值	95% <i>CI</i>	<i>P</i> 值
S100A2	5.970	1.199	24.775	391.311	37.311~4108.905	0.000
Blimp1	3.789	0.897	17.830	44.228	7.618~256.784	0.000

2.4 MM 患者 BMMNCS 中 S100A2 与 Blimp1 的相关性

S100A2 表达水平与 Blimp1 表达水平呈显著负相关($P<0.05$)。

2.5 MM 患者 BMMNCS 中 S100A2 与 Blimp1 的 ROC 曲线

S100A2 预测 MM 患者 BMMNCS 中 S100A2 与 Blimp1 联合指标的曲线下面积为 0.945,敏感度和特异度分别为 0.971 与 0.780 均高于单一检测($P<0.05$)。见表 4、图 1。

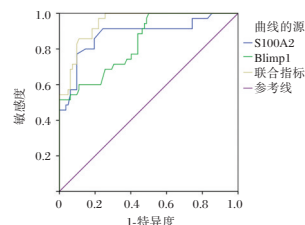


图 1 ROC 曲线

Figure 1 ROC curves

3 结论

MM 是一种起源于 B 细胞系的造血系统恶性肿瘤类疾病,特征为产生单克隆免疫球蛋白的异常浆细胞在骨髓内发生恶性增殖。MM 患者 90% 以上发生过溶骨性骨疾病,徐珍珍等^[7]的研究表明,其还可引起高钙血症、骨折等一系列骨相关疾病,王德印等^[8]的研究对其病因进行了深入分析,但其发病机制尚未完全明确。随着新型化疗药物的研发及化疗方式的进步,MM 患者的生存质量与五年生存率得到极大改善,但部分患者出现化疗耐药反应导致综合预后效果不佳。因此,深入探讨 MM 发病机制并在分子生物学及基因学领域寻找新的治疗方向已成为 MM 临床研究的重点。

表 4 分析 S100A2 与 Blimp1 及联合指标预测价值

Table 4 Analysis of the predicted value of S100A2 and Blimp1 and the combined index

检验结果变量	AUC	标准错误	95% <i>CI</i>	约登指数	敏感度	特异度	临界值	<i>P</i> 值
S100A2	0.881	0.039	0.804~0.957	0.801	0.771	0.902	0.372	0.000
Blimp1	0.836	0.039	0.759~0.912	0.453	0.514	0.939	1.505	0.000
联合指标	0.945	0.019	0.908~0.982	0.851	0.971	0.780	0.207	0.000

众多研究^[9-10]共同表明,S100蛋白家族作为主要的钙离子结合蛋白家族亚类,在调控细胞分化、细胞周期、钙稳态等过程中发挥重要作用,且参与调控多项生理病理过程。S100A2是S100家族重要成员,汪必成等^[11]的研究表明,其在胰腺癌中呈表达水平异常,且在肿瘤发生及进展期发挥重要作用。Blimp-1是一种具有抑制 β -干扰素分泌功能的转录因子,其存在一个重要的抑制基因叫做c-myc,它可以促进细胞增值,并且阻断细胞的终末分化。张倩男等^[12]的研究表明,MM患者机体的B淋巴细胞发生了Blimp-1的过早表达,这说明MM患者浆细胞的异常应从其前体细胞B细胞阶段开始。国外学者^[13]研究表明,浆细胞的存活需要与特定的微环境密切互动,该微环境由基质细胞和造血起源的细胞组成,已经显示浆细胞通过释放细胞因子来调节免疫应答。浆细胞的恶性转化可导致MM的产生,而Blimp-1可调控浆细胞的转录,同时促进浆细胞相关基因的表达,并促进B细胞向浆细胞的转化过程。

本次研究结果表明,S100A2、Blimp1表达水平均为MM发生的独立危险因素。间接提示,S100A2作为MM发病过程的危险因素,对于MM发病具有抑制作用;而MM的发生导致其呈现低表达水平。本次研究结果表明,S100A2表达水平与Blimp1表达水平间呈显著负相关。间接提示,S100A2与Blimp1的表达水平与MM患者的BMMNCS间存在中等相关性,并分别呈现低表达与高表达水平。另外,汪玉芳等^[14]的研究表明,MM患者浆细胞S100A2呈低表达水平,S100A2在肝癌、胃癌等恶性肿瘤中作为抑癌因子,而在胰腺癌、肺癌等恶性肿瘤作为促癌因子,并推测S100A2在MM发病机制中可能为抑癌因子,这与本次研究结果一致。刘红春等^[15]的研究结果表明,MM患者浆细胞Blimp1呈高表达水平。这与本次研究结果一致。间接提示,S100A2、Blimp1或可作为MM的预测因子,且联合指标预测价值更高。

本研究的不足之处为,对于MM患者骨髓微环境的研究,逐渐成为MM新型药物研究的方向。朱晶晶^[16]的研究就表明,双调蛋白(AREG)、白细胞介素-6(IL-6)、免疫抑制剂(PD-1)等物质与MM患者骨髓微环境存在诸多联系及反应。而S100A2与Blimp1表达水平与MM患者的骨髓微环境间是否存在某种相关性,有待进一步的研究讨论。

综上所述,S100A2、Blimp1表达水平均可作为MM发生的独立危险因素,且S100A2、Blimp1表达水平均可作为MM发生的预测因子,其中联合指标预测价值更高。

参考文献

- [1] 管楠楠,李恂,王帅飞,等. 沈阳市2009-2014年多发性骨髓瘤发病分析[J]. 肿瘤防治研究, 2019, 46(6): 547-550.
- [2] 陈文萃,李婷. 多发性骨髓瘤的诊断和治疗进展[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 2019, 28(1): 78-82.
- [3] 阙敬保,沈歌前,杨洁,等. S100钙结合蛋白A16通过内质网应激促进HepG2细胞脂肪合成[J]. 生理学报, 2019, 71(2): 279-286.
- [4] 刘国生,王姣平,褚志华,等. 骨髓单个核细胞中B淋巴细胞诱导成熟蛋白-1表达对多发性骨髓瘤患者预后的影响[J]. 中国实验血液学杂志, 2017, 25(5): 1449-1453.
- [5] Greipp PR, San miguel J, Durie BG, et al. International staging system for multiple myeloma[J]. J Clin Oncol, 2005, 23(15): 3412-3420.
- [6] 中国医师协会血液科医师分会,中华医学会血液学分会,中国医师协会多发性骨髓瘤专业委员会. 中国多发性骨髓瘤诊治指南(2020年修订)[J]. 中华内科杂志, 2020, 59(5): 341-346.
- [7] 徐珍珍,吴顺泉,王青青,等. 320例多发性骨髓瘤校正血钙的临床意义[J]. 中国实验血液学杂志, 2017, 25(4): 1058-1062.
- [8] 王得印,郝云良,肖萌,等. 多发性骨髓瘤流行病学及病因分析[J]. 国际流行病学传染病学杂志, 2018, 45(4): 277-280.
- [9] 赵璞,杨军峰,董冠中,等. RNP1、S100A6蛋白在肺癌中的表达及与临床病理特征的关系[J]. 中国实验诊断学, 2019, 23(5): 777-780.
- [10] 杜晓文,林大鹏,屠冠军. S100A4促进脑源性神经营养因子表达影响神经干细胞的分化[J]. 中国组织工程研究, 2020, 24(19): 3029-3034.
- [11] 汪必成,向远航,王杰,等. 钙结合蛋白S100A2在胃癌组织的表达及其与启动子甲基化的关系[J]. 中华实验外科杂志, 2018, 35(1): 136-137.
- [12] 张倩男,姚瑶,李振宇. B淋巴细胞诱导成熟蛋白-1对多发性骨髓瘤中浆细胞分化和存活调控作用的研究进展[J]. 国际输血及血液学杂志, 2016, 39(3): 229-232.
- [13] Schuh W, Mielenz D, Jäck HM. Unraveling the mysteries of plasma cells[J]. Adv Immunol, 2020, 146: 57-107.
- [14] 汪玉芳,柯善栋. S100A2在多发性骨髓瘤病人中表达及临床意义[J]. 青岛大学学报(医学版), 2018, 54(4): 431-434.
- [15] 刘红春,熊超,耿杰,等. 多发性骨髓瘤细胞中Blimp1、ATF4和CHOP的表达及阿司匹林对其表达的影响[J]. 中国实验血液学杂志, 2020, 28(1): 165-170.
- [16] 朱晶晶. 多发性骨髓瘤与骨髓微环境关系的研究进展[J]. 实用癌症杂志, 2021, 36(3): 516-518.

串联质谱技术在新生儿遗传代谢病筛查中的应用分析

郑国兵^{1*} 梁睿¹ 唐家彦² 王德刚¹ 梁少霞¹ 谢丰华¹

[摘要] **目的** 探讨串联质谱技术(MS/MS)在新生儿遗传代谢病(IMD)筛查中的应用。**方法** 选取2018年10月至2020年12月于中山市博爱医院产前中心就诊的新生儿70 509例,采用MS/MS技术对其有机酸代谢异常、脂肪酸代谢异常、及氨基酸代谢异常三类疾病进行筛查。**结果** 在接受筛查的70 509例新生儿中,住院可疑阳性患儿663例,门诊可疑阳性患儿26例,阳性初筛率为0.98%,最终确诊30例,总发病率为1/2 350,其中有机酸代谢异常6例、脂肪酸代谢异常8例、氨基酸代谢异常16例;确诊疾病具体分型为:3-羟-3-甲基戊二酸血症(HMG)、异丁酰辅酶A缺乏症(IBDD)、全羟化酶合成酶不足症(HLCS)、鸟氨酸血症(ORN)、I型瓜氨酸血症(CTLN1)各1例,甲基丙二酸血症(MMA)、短酰基辅酶A缺乏症(SCADD3)各3例,高甲基硫酸血症(MIM)4例,原发性肉碱缺乏症(PCD)5例,高丙氨酸血症(HPA)12例。**结论** 运用MS/MS对新生儿遗传代谢性疾病进行筛查,可起到及早发现、诊断、治疗的作用,能显著降低人口出生缺陷。MS/MS具有筛查病种丰富,筛查项目齐全,且筛查时间短的优势。因此MS/MS在筛查新生儿IMD中具有重要运用价值。

[关键词] 遗传代谢病;串联质谱技术;新生儿;筛查

Application of tandem mass spectrometry in the screening of neonatal inherited metabolic diseases

ZHENG Guobing^{1*}, LIANG Rui¹, TANG Jiayan², WANG Degang¹, LIANG Shaoxia¹, XIE Fenghua¹

(1. Zhongshan Boai Hospital Prenatal Diagnosis Center, Zhongshan, Guangdong, China, 528400;

2. Department of Pediatrics, Boai Hospital, Zhongshan, Guangdong, China, 528400)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the application of tandem mass spectrometry (MS/MS) in the screening of neonatal inherited metabolic disease (IMD). **Methods** A total of 70509 newborns who were treated at the Prenatal Center of Bo'ai hospital in Zhongshan city from October 2018 to December 2020 were selected group. Tandem mass spectrometry (MS/MS) was used to screen three types of diseases: abnormal organic acid metabolism, abnormal fatty acid metabolism and abnormal amino acid metabolism. **Results** Among the 70509 newborns undergoing screening, 663 were suspected positive in hospitalization and 26 in outpatient clinic. The total positive rate of primary screening was 0.98%. The final diagnosis was 30, with a total incidence rate of 1/2350, including 6 cases of organic acid metabolism, 8 cases of fatty acid metabolism, and 16 cases of abnormal amino acid metabolism. The specific types of diagnosed diseases are: 3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria (HMG), isobutyryl-coenzyme dehydrogenase A deficiency (IBDD), holohydroxylase synthase deficiency (HLCS), ornithine Acidemia (ORN), type I citrullinemia (CTLN1), 1 case each, methylmalonic acidemia (MMA), short acyl coenzyme dehydrogenase A deficiency (SCADD3), 3 cases each, 3 cases of methylmalonic acidemia (MMA), 3 cases of short acyl coenzyme dehydroxylase a deficiency (scadd3) and 4 cases of hypermethylosulfaemia (MIM), 5 cases of primary carnitine deficiency (PCD) and 12 cases of hyperalaninemia (HPA). **Conclusion** The use of MS/MS to screen newborns for hereditary and metabolic diseases can play a role in early detection, diagnosis, and treatment, and can significantly reduce birth

基金项目:中山市社会公益科技研究项目(2018SYF04)

作者单位:1. 中山市博爱医院产前诊断中心,广东,中山 528400

2. 中山市博爱医院儿科,广东,中山 528400

*通信作者:郑国兵, E-mail: zgb821028@163.com

defects in the population. MS/MS has the advantages of abundant screening diseases, complete screening items, and short screening time. Therefore, MS/MS has important application value in the screening of neonatal IMD.

[KEY WORDS] Inherited metabolic disease; Tandem mass spectrometry; Newborn; Screening

遗传代谢病(Inherited metabolic disease, IMD)是因机体各代谢途径部分酶缺陷,造成毒副产物过度堆积或必要代谢产物合成不足,而出现各种临床症状的一组疾病^[1-3]。该病虽单一病种发病率较低,但总体发病率及死亡率不低^[4-5]。有研究报道,部分IMD具有严重致死性,而另一部分存活患者,如不能在中枢系统发育之前或出现严重症状之前给予有效治疗,将难以达到理想治疗效果^[6-7]。因此临床对IMD早发现、早治疗十分重要。但常规筛查方式,由于体内生化代谢物浓度受疾病、药物、饮食等因素影响而不断变化,因此检查结果具有一定不确定性。串联质谱技术(Tandem mass spectrometry, MS/MS)可在2~3 min检测几十种分子代谢产物,从而实现40多种IMD筛查^[8-9],继而通过分子手段找到致病基因与致病突变,但目前国内有关分子检测研究报道较少。本研究探讨MS/MS在IMD筛查中的应用价值。现报道如下。

1 一般资料与方法

1.1 一般资料

选取2018年10月至2020年10月于中山市博爱医院产前中心就诊的新生儿70 509例,采用MS/MS术筛查其遗传代谢性疾病。接受MS/MS筛查的新生儿中,男39 364例(55.83%),女31 145例(44.17%);足月儿(37~42)周68 543例(97.21%),早产儿(<37周)1 966例(2.79%);采血日龄平均(5.48±1.76)天;体重平均(3.52±1.49)kg;正常体重(2.5~4)kg新生儿60 542例(85.87%),体重偏低(<2.5 kg)新生儿3 480例(4.93%),巨大儿(>4 kg)6 487例(9.20%);单胎为69 959例(99.22%),多胎550例(0.78%);来自乡镇地区为8 855例(12.56%)。纳入标准:本院产前中心自愿接受IMD筛查者。排除标准:①出生时出现窒息、产伤、颅内出血患儿。②药物或母亲原发性肉碱缺乏等继发因素造成IMD者。③芯片检测拷贝数据异常或染色体G显带异常的已知IMD综合征患儿。本研究经医院医学伦理委员会委员批准,新生儿家属均知情,且签订同意书。

1.2 方法

1.2.1 采集标本

新生儿充分喂养后3天,采集其足跟血及末梢

血于专用筛查滤纸,血斑直径>8 mm,常温下阴干,再将滤纸片送往新生儿疾病筛查中心待检。

1.2.2 使用仪器与试剂

串联质谱检测:采用美国Waters公司的TQD质谱仪,采用PE公司NeoBuse™ Non-derivatized MSMS Kit非衍生化多种肉碱、琥珀酰丙酮、及氨基酸试剂盒及配套试剂检测。试剂盒涵盖13种同位素标记的酰基肉碱及游离肉碱标准品。基因测序检测:利用核酸(DNA)提取试剂盒(由艾康生物技术(杭州)有限公司提供)提取基因组DNA,及基因测序仪NextSeqCN500对富集文库进行高通量测序。

1.2.3 实验室检测

串联质谱:从血滤纸片中取出直径为3 mm的圆形滤纸片,放于96孔聚丙烯板(试剂盒由北京泰泽嘉业科技发展有限公司提供)中进行肉碱、非衍生化多种氨基酸、及琥珀酰丙酮测定。非衍生化法:将100 μL同位素内标的酰基肉碱与氨基酸加入孔中,运用微孔板封膜将其密封,震荡萃取40 min,取70 μL上清液加入96孔聚丙烯板中,运用铝膜将其覆盖,上样检测。基因测序检测:运用基因序列捕获技术将患儿全基因组文库与IMD常见致病基因捕获探针混合。当致病基因附着于探针上后,用洗脱方式洗掉非目标区域DNA片段。对目标区域进行测序,再用Trim-Galore程序处理便可获得读数。

1.2.4 召回及确诊可疑阳性标本

通过电话及时召回筛查结果为可疑阳性新生儿,重新采集标本进行MS/MS检测。如第二次检测依然呈阳性的标本,需及时送检分析其基因突变,本次研究中663例可疑阳性新生儿均接受定期检测与随访,无失访现象发生。

1.3 统计分析

运用EXCEL表格汇总数据;可疑阳性率用 n (%)表示,通过可疑阳性例数/总筛查例数计算出可疑阳性率;阳性总发病率、发病率及总发病率均用 $1/n$ 表示,通过等式:阳性确诊例数/总筛查例数= $1/n$ 可得出 n 值;总构成比用 n (%)表示,各类型遗传代谢性疾病确诊例数/总确诊例数,可得出不同类型代谢性疾病在总确诊例数中的构成比。

2 结果

2.1 串联质谱筛查阳性初筛率及阳性确诊率

在参与筛查的 70 509 例新生儿中,初筛住院阳性患儿为 663 例,门诊阳性患儿为 26 例,阳性初筛率为 0.98%,成功召回 689 例,成功召回率为 100%。被召回阳性可疑新生儿再次进行

MS/MS 检测,56 例依旧阳性,56 例患儿依据不同阳性可疑病种,均进行基因诊断与鉴别诊断,最终 30 例新生儿确诊为 IMD,总发病率为 1/2 350。在 689 例初筛阳性新生儿中,最终确诊仅为 30 例,假阳性率为 0.93%。其中有机酸代谢异常 6 例,脂肪酸代谢异常 8 例,氨基酸代谢异常 16 例。见表 1。

表 1 串联质谱筛查阳性初筛率及阳性确诊率 [n(%)]

Table 1 Specific conditions of tandem mass spectrometry screening in children with positive diagnosis [n(%)]

疾病种类	n	筛查项目	可疑阳性率	阳性确诊(n)	阳性总发病率(1/n)
有机酸代谢障碍	70 509	游离肉碱酰基肉碱	137(0.19)	6	1/11 752
脂肪酸代谢障碍	70 509	游离肉碱酰基肉碱	197(0.28)	8	1/8 814
氨基酸代谢障碍	70 509	氨基酸	355(0.50)	16	1/4 407

2.2 阳性确诊患儿串联质谱筛查具体情况

30 例确诊病例中,有机酸代谢障碍 6 例,即 3 羟-3 甲基戊二酸尿症(3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria, HMG)、异丁酰辅酶脱羟酶 A 缺乏症(Isobutyryl coenzyme dehydroxylase a deficiency, IBDD)、全羟化酶合成酶不足(Total hydroxylase synthase deficiency, HLCS)各 1 例,甲基丙二酸血症(Methylmalonic acidemia, MMA)3 例;脂肪酸代

谢障碍 8 例,即短酰基辅酶脱羟酶 A 缺乏症(Short acyl coenzyme dehydroxylase a deficiency, SCADD)3 例、原发性肉碱缺乏症(Hypermethylsulfatemia primary carnitine deficiency, PCD)5 例;氨基酸代谢障碍 16 例,即鸟氨酸血症(Ornithinemia, ORN)、I 型瓜氨酸血症(Citrullinemia type I, CTLN1)各 1 例,高甲基硫酸血症(Hypermethylsulfaemia, MIM)4 例高丙氨酸血症(Hyperalaninemia, HPA)12 例。见表 2。

表 2 阳性确诊患儿串联质谱筛查具体情况

Table 2 specific conditions of tandem mass spectrometry screening in children with positive diagnosis

疾病种类	确诊分型	例数 (n)	判定指标	检测值	参考范围	发病率 (1/n)	总构成比 (%)	总发病率 (1/n)	基因检测结果
有机酸代谢障碍	HMG	1	C4DC\C5OH/C8	15.98	0.95~12.0	1/70 509	0.20	1/11 752	c.1181T>G、c.877G>A 复合杂合
			C4DC\C5OH	0.91	0.06~0.52				
			C5	1.12	0.04~0.50				
	MMA	3	C3/C2	0.61~1.08	0.04~0.42	1/23 503			c.W203X、p.E432A 复合杂合
			C3	6.13~14.24	0.32~4.66				
	IBDD	1	C4/C2	0.21	0.00~0.05	1/70 509			c.1157>A 纯合
脂肪酸代谢障碍	HLCS	1	C4DC\C5OH/C8	18.1	0.95~12.0	1/70 509	0.27	1/8 814	c.1088T>A、c.1552C>T 复合杂合
			C4DC\C5OH	1.01	0.06~0.52				
	PCD	5	C0	8.98~112	10~62	1/14 102			c.1440C>G、c.1064C>T 复合杂合
	SCADD	3	C4/C2	0.21~0.35	0.00~0.05	1/23 503			
			C4	1.87~2.32	0.07~0.45				
	MIM	2	MET/PHE	1.34~5.13	0.09~0.74	1/17 627			c.W203X、p.E432A 复合杂合
氨基酸代谢疾病	ORN	1	MET	61~192	4.3~36.3	1/17 627	53.33	1/4 409	c.W203X、p.E432A 复合杂合
			ORN	652	44~389				
	CTLN1	1	CIT/PHE	6.74	0.13~0.71	1/70 509			c.782T>C 半合子
			CIT	221	5.6~39.3				
	HPA	12	PHE/TYR	4~39.2	0.2~1.2	1/5 875			c.717+1C>T 半合
		PHE	231~1923	26~120					

2.3 串联质谱筛查技术优势

串联质谱技术筛查病种丰富,筛查项目齐全,

可实现对 18 种氨基酸代谢性疾病、14 种有机酸代谢性疾病及 14 种脂肪酸代谢性疾病的筛查。该技

术筛查时间仅需5 h左右。

3 讨论

遗传代谢性疾病治疗难度较大,其治疗效果与干预时间密切相关^[10-11]。近年来遗传代谢性疾病随着新生儿出生缺陷率增加,有逐渐上涨趋势,严重影响患儿身心健康,并对患儿家庭造成巨大经济负担。因此早期对新生儿遗传代谢性疾病进行筛查十分重要。从1981年我国首次开展新生儿疾病筛查以来,纳入普筛的疾病为先天性甲状腺功能降低症。随着串联质谱技术及配套筛查试剂的发展,可筛疾病已达到40余种,这将推动更多疾病纳入普筛项目^[12-13]。串联质谱技术能对多种疾病、多种指标进行筛查,能在2 min内实现多种游离肉碱、氨基酸、及酰基肉碱的检测^[14]。

本研究对70 509例新生儿采用串联质谱技术进行遗传代谢性疾病筛查,可疑阳性为663例,其中30例被最终确诊,总发病率达1/2 350,高于浙江地区1/5 626的发病率,上海地区1/3 529的发病率,盐城地区1/4 384的发病率,但低于淄博市1/1 683的发病率、及郑州地区0.1%的发病率^[14]。由此得出,遗传代谢性疾病分布具有显著地区差异性,分析原因可能为,不同地区采集标本方式、筛查标准、及基因多态性分布差异造成。本地区总体来说,为比较高发地区。因此对本地区新生儿遗传代谢性疾病,运用串联质谱技术进行筛查十分必要。

本文研究结果还表明,串联质谱技术具有筛查病种丰富、筛查项目齐全及筛查时间短的特点。因为串联质谱技术具有高选择性、高特异性、及高灵敏度等优良性能,因此在检测新生儿代谢疾病领域具有显著优势。本研究串联质谱具体检测结果显示,高丙氨酸血症(PHA),为氨基酸代谢障碍疾病中多发疾病。该病多为丙氨酸羟化酶突变造成相关酶活性降低而引发,临床主要表现为小脑共济失调、视神经萎缩,肌张力降低等。

值得注意的是,本研究采用串联质谱技术对新生儿代谢疾病进行筛查,假阳性率高达0.93%,相关研究指出,提升筛查性能,加强筛查质量管理,降低筛查假阳性率。可通过保证血片质量、控制实验流程、检验程序、实验室评估、判读方法等质量,及互相交流与数据共享,加强实验室及区域协作而实现。因此通过严格质量把控,与交流协作可降低串联质谱技术筛查假阳性率。

综上所述,新生儿遗传代谢性疾病采用串联质谱技术进行筛查可提高筛查有效性与准确率。串联质谱技术能对遗传代谢性疾病早发现,为后续治疗赢得宝贵时间,从而改善患儿预后效果,使我国出生人口综合质量得到提高。且串联质谱技术具有筛查病种丰富,筛查项目齐全,且筛查时间短的特点。因此串联质谱技术筛查新生儿遗传代谢性疾病具有推广价值。

参考文献

- [1] 郝虎,肖昕.遗传代谢病诊疗新进展及面临的新挑战[J].分子诊断与治疗杂志,2019,11(1):1-5+38.
- [2] Su L, Patti ME. Paternal Nongenetic Intergenerational Transmission of Metabolic Disease Risk[J]. Curr Diab Rep, 2019, 19(7):38.
- [3] 万智慧,刘伟,马志军,等. Waters Xevo TQD 串联质谱仪筛查新生儿遗传代谢病的性能验证[J]. 优生与遗传杂志,2019,27(11):1311-1335.
- [4] 齐红. 串联质谱技术在新生儿遗传代谢性疾病筛查中的应用[J]. 中国妇幼保健,2019,34(20):4734-4735.
- [5] 计国平,李涛,孙巧玲. 安徽省新生儿遗传代谢性疾病筛查项目效果分析[J]. 中国妇幼保健,2019,34(23):5462-5464.
- [6] 吕金峰,王伟青,李文杰. 青岛市280例高危新生儿遗传代谢性病例分析[J]. 临床与病理杂志,2019,39(3):597-602.
- [7] 河北城市多中心高危儿遗传代谢病调查协助组. 河北地区遗传代谢病高危儿筛查结果分析[J]. 解放军医药杂志,2019,31(2):76-80.
- [8] 罗玉雷,杨亚红,陈倩倩,等. 阜阳市99835例新生儿遗传代谢病筛查结果回顾性分析[J]. 中国计划生育学杂志,2020,28(11):1905-1908.
- [9] 艾力克木·阿不都玩克,古丽娜·沙依木,孙岩,等. 串联质谱和气相色谱技术在新疆地区高危儿遗传代谢病临床筛查诊断中的应用研究[J]. 中国妇幼保健,2020,35(7):1280-1283.
- [10] 许静,王惠珍,简亚娟. 新生儿先天性甲状腺功能低下症筛查结果及流行病学特征分析[J]. 分子诊断与治疗杂志,2020,12(5):670-673+687.
- [11] 李玛,叶燕绸,何国炜,等. 广州市地区7234例新生儿耳聋基因突变分析[J]. 分子诊断与治疗杂志,2020,12(1):11-15.
- [12] 中国医师协会检验医师分会临床质谱检验医学专业委员会. 液相色谱串联质谱临床检测方法的开发与验证[J]. 检验医学,2019,34(3):189-196.
- [13] 张晓刚,杨建平,阎亚琼,等. 81138例新生儿遗传代谢病串联质谱筛查结果回顾性分析[J]. 中国医师杂志,2019,21(7):1081-1082.
- [14] 汤欣欣,郑芹,刘双,等. 串联质谱技术在连云港地区110158例新生儿遗传代谢病筛查中的应用分析[J]. 中国妇幼保健,2019,34(24):5717-5720.

血清 PAF、IMA 水平联合 ABCD2 评分对 TIA 发作后短期进展为脑梗死的早期预测价值

陈静¹ 董俊兴¹ 李启晖^{1*} 梁燕¹ 代敏¹ 张敏²

【摘要】目的 研究血清 PAF、IMA 水平联合 ABCD2 评分对 TIA 发作后短期进展为脑梗死的早期预测价值。**方法** 选取 2018 年 1 月至 2020 年 12 月于郑州市第七人民医院接受诊治的 92 例 TIA 患者为观察组,另选取 50 名同期健康体检者为对照组,检测所有受试者血清 PAF、IMA 水平,对所有患者进行 ABCD2 评分并进行为期 7 d 的随访,根据是否发生脑梗死,分为脑梗死组和非脑梗死组。比较观察组与对照组及脑梗死组与非脑梗死组基线资料,采用二元 logistics 回归分析短期进展为脑梗死的独立危险因素,分析 PAF、IMA 水平联合 ABCD2 评分对 TIA 发作后短期进展为脑梗死的早期预测价值。**结果** 观察组 PAF、IMA 水平高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),脑梗死组 PAF、IMA 水平、高血压比率、糖尿病比率、高脂血症比率、冠心病比率高于非脑梗死组,且 ABCD2 评分高危及中危比率高于非脑梗死组,低危比率低于非脑梗死组,差异有统计学意义($P<0.05$)。二元 logistics 回归分析表明,PAF、IMA 及 ABCD2 评分、高血压、糖尿病、高脂血症、冠心病是引起 TIA 发展为脑梗死的独立危险因素($P<0.05$)。ROC 分析结果:血清 PAF、IMA 水及 ABCD2 评分对 TIA 发作后短期进展为脑梗死具有一定早期预测价值($AUC=0.783、0.709、0.762$),且三指标联合应用价值更高($AUC=0.841$)($P<0.05$)。**结论** 血清 PAF、IMA 水平及 ABCD2 评分对 TIA 发作后短期进展为脑梗死均有一定的早期预测价值,且联合预测效果更佳。

【关键词】 血小板活化因子;缺血修饰蛋白;脑梗死

The early predictive value of serum PAF and IMA levels combined with ABCD2 score for the short-term progression of cerebral infarction after the onset of transient isochemic attack

CHEN Jing¹, DONG Junxing¹, LI Qihui¹, LIANG Yan¹, DAI Min¹, ZHANG Min²

(1. Department of Neurology, the Seventh People's Hospital of Zhengzhou, Zhengzhou, Henan, China, 450016; 2. Department of Neurology, Zhengzhou People's Hospital, Zhengzhou, Henan, China, 450000)

【ABSTRACT】Objective To study the early predictive value of serum PAF and IMA levels combined with ABCD2 score for the short-term progression of cerebral infarction after the onset of TIA. **Methods** A total of 92 patients with TIA who were diagnosed and treated at the Seventh People's Hospital of Zhengzhou from January 2018 to December 2020 were selected as the observation group, and 50 healthy subjects at the same period were selected as the control group. The serum PAF and IMA levels were tested. All patients were scored ABCD2 and followed up for 7 days. According to whether cerebral infarction occurred, they were divided into the cerebral infarction group and the non-cerebral infarction group. The baseline data of the observation group and the control group and the cerebral infarction group and the non-cerebral infarction group were compared. The binary logistics regression was used to analyze the short-term progression as an independent risk factor for cerebral infarction. The early predictive value of infarction was analyzed. **Results** The PAF and

基金项目:河南省医学科技攻关联合共建项目(LHGJ20200735)

作者单位:1. 郑州市第七人民医院神经内科,河南,郑州 450016

2. 郑州市人民医院神经内科,河南,郑州 450000

*通信作者:李启晖, E-mail:421317140@qq.com

IMA levels in the observation group were higher than those in the control group ($P<0.05$). The PAF, IMA levels, hypertension rate, diabetes rate, hyperlipidemia rate, and coronary heart disease rate in the cerebral infarction group were higher than those in the non-cerebral infarction group, and the ABCD2 score of high-risk and medium-risk ratio was higher than that of the non-cerebral infarction group, and the low-risk ratio was lower than that of the non-cerebral infarction group ($P<0.05$). Binary logistics regression analysis showed that PAF, IMA and ABCD2 scores, hypertension, diabetes, hyperlipidemia, and coronary heart disease are independent risk factors that cause TIA to develop into cerebral infarction ($P<0.05$). ROC analysis results: serum PAF and IMA levels and ABCD2 scores have a certain early predictive value for the short-term progression of cerebral infarction after the onset of TIA (AUC=0.783, 0.709, 0.762), and the combined application value of the three indicators is higher (AUC=0.841) ($P<0.05$). **Conclusion** Serum PAF, IMA levels and ABCD2 score have a certain early predictive value for the short-term progression of cerebral infarction after the onset of TIA, and the combined prediction effect is better.

[KEY WORDS] Platelet activating factor; Ischemia-modifying protein; Cerebral infarction

短暂性脑缺血发作(transient ischemic attack, TIA)是指局灶性脑血管或视网膜动脉缺血导致短暂性、可逆性神经功能障碍^[1]。临床症状表现为单侧肢体无力、麻木或失语,一般情况下,1~2 h内能够得到缓解和恢复,完全缓解时间不超过24 h,且经颅内核磁及CT检查未发现责任病灶^[2]。但TIA已成为脑梗死特级预警,多数研究表明,30%~50% TIA患者在弥散加权成像上有脑组织坏死^[3]。如果早期预测并及时干预TIA发作后短期进展为脑梗死,则可以避免不良事件发生。ABCD2评分[由A(Age)年龄、B(Blood pressure)血压、C(Clinical features)临床特征、D(Symptom duration)持续时间、D(Diabetes)糖尿病组成]是目前国内外常用卒中风险评估工具,具有一定预测价值^[4]。血小板活化因子(platelet activating factor, PAF)能够促进血小板桥联作用并启动血栓形成,是体内最强血小板聚集剂;缺血修饰白蛋白(ischemia-modified albumin, IMA)是急性缺血事件发生重要早期诊断指标,有研究认为二者与TIA发展及脑梗死发生存在联系^[5-6],但其对TIA发作后短期发展为脑梗死预测价值尚不明确。因此,本文对血清PAF、IMA水平联合ABCD2评分对TIA发作后短期进展为脑梗死早期预测价值进行研究,以期为临床诊治提供参考。

1 研究对象与方法

1.1 研究对象

选取2018年1月至2020年12月于郑州市第七人民医院接受诊治的92例TIA患者为观察组,另选取同期健康体检者50例作为对照组。

纳入标准:①年龄30~90岁;②符合《短暂性脑缺血发作的中国专家共识更新版(2011年)》^[7]中关于TIA诊断标准;③突发神经功能缺损,24 h内体征和症状完全消失;④头部CT检查或MRI检查未发现占位或出血情况,亦未发现其他病灶;⑤随访和临床资料完整。排除标准:①肝肾功能缺陷;②免疫功能异常;③急性传染病;④急性心肌梗死;⑤妊娠妇女;⑥心源性TIA。所有受试者均知情同意,本实验经医院伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 临床资料采集

对于多次发作患者记录发作持续时间最长的一次,由本科室一名资深医师行ABCD2评分评估,年龄 ≥ 60 岁计1分,收缩压 ≥ 140 mmHg/舒张压 ≥ 90 mmHg计1分,言语障碍不伴肢体无力计1分、单侧肢体无力计2分,症状持续时间10~59 min计1分、症状持续时间 ≥ 60 min计2分,合并糖尿病计1分,各项评分和为总分,总分 ≤ 3 分为低危,总分4~5分为中危,总分 ≥ 6 分为高危^[8]。

1.2.2 PAF和IMA指标测试

所有受试者入院24 h内抽取空腹静脉血4 mL,采用酶联免疫吸附法检测PAF水平,采用白蛋白钴结合法检测IMA水平,试剂盒购自深圳芬德生物技术有限公司。

1.2.3 随访

在患者发生TIA后进行为期7 d随访,记录患者是否进展为脑梗死,脑梗死诊断以头部MRI、CT及临床症状为依据,根据是否发生脑梗死,分为脑梗死组(31例),非脑梗死组(61例)。

1.3 统计学处理

使用 SPSS 23.0 进行研究资料分析。计量资料用($\bar{x} \pm s$)描述。两组间比较用 t 检验。计数资料 $n(\%)$ 描述,行 χ^2 检验。影响因素综合分析为二元 Logistic 回归,采用逐步后退法进行变量选择和剔除。预测价值分析为 ROC 分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组基线资料对比

观察组与对照组年龄、BMI、心率、吸烟史、饮酒史、男性比率比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),观察组 PAF、IMA 水平高于对照组($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 两组基线资料对比 [$(\bar{x} \pm s)$, $n(\%)$]

Table 1 Comparison of baseline data between 2 groups

基线资料	观察组(92)	对照组(50)	χ^2/t 值	P 值
年龄(岁)	61.30±6.63	60.21±5.93	(0.970)	0.334
BMI(kg/m ²)	23.41±4.16	23.29±4.21	(0.163)	0.870
心率(次/min)	76.13±6.22	75.48±5.61	(0.615)	0.539
吸烟史	31(33.7)	19(38)	0.263	0.608
饮酒史	33(35.87)	21(42)	0.517	0.472
男性	64(69.57)	33(66)	0.19	0.663
PAF(Pg/mL)	176.62±6.69	46.72±6.82	(109.763)	0.000
IMA(U/mL)	46.43±5.98	32.81±4.35	(15.550)	0.000
TOAST 分型				
大动脉粥样硬化	49(53.26)			
小动脉闭塞	34(36.96)			
不明原因	9(9.78)			

2.2 脑梗死组与非脑梗死组的一般资料及 ABCD2 评分、PAF、IMA 水平比较

脑梗死组与非脑梗死组年龄、BMI、心率、吸烟史、饮酒史、男性比率比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),脑梗死组 PAF、IMA 水平、高血压比率、糖尿病比率、高脂血症比率、冠心病比率高于

非脑梗死组,且 ABCD2 评分高危及中危比率高于非脑梗死组,低危比率低于非脑梗死组($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 脑梗死组与非脑梗死组的一般资料及 ABCD2 评分、PAF、IMA 水平比较 [$(\bar{x} \pm s)$, $n(\%)$]

Table 2 General data, ABCD2 scores and PAF, IMA levels between cerebral infarction and non-cerebral infarction groups [$(\bar{x} \pm s)$, $n(\%)$]

项目	脑梗死组(31)	非脑梗死组(61)	t/χ^2 值	P 值
年龄(岁)	64.39±6.82	62.72±6.42	1.155	0.251
BMI(kg/m ²)	23.67±4.16	23.29±4.21	0.411	0.682
心率(次/min)	78.43±6.21	76.73±5.63	1.322	0.189
吸烟史	10(32.26)	20(32.79)	(0.003)	0.959
饮酒史	9(29.03)	21(34.43)	(0.272)	0.602
男性	20(64.52)	42(68.85)	(0.176)	0.675
ABCD2 评分				
低危	2(6.45)	48(78.69)	[7.240]	0.000
中危	10(32.26)	12(19.67)		
高危	19(61.29)	1(1.64)		
PAF(Pg/mL)	232.62±66.53	148.17±45.72	6.347	0.000
IMA(U/mL)	52.58±4.51	43.31±3.83	10.328	0.000
高血压	21(67.74)	25(40.98)	(5.887)	0.015
糖尿病	11(35.48)	6(9.84)	(8.976)	0.003
高脂血症	13(41.94)	12(19.67)	(5.148)	0.023
冠心病	16(51.61)	18(29.51)	(4.311)	0.038

2.3 TIA 发展为脑梗死的影响因素分析

建立非条件二元 Logistic 回归模型,以 TIA 发展为脑梗死状况为因变量,赋值 1=发展为脑梗死,0=否。以表 2 中 $P < 0.10$ 的指标为自变量。各变量赋值见表 3。回归过程采用逐步后退法进行自变量选择和剔除,设定 $\alpha_{剔除} = 0.10$, $\alpha_{入选} = 0.05$ 。回归结果:7 个自变量均被保留入回归模型中($P < 0.05$),提示较高的 PAF、IMA 及 ABCD2 评分(中危及高危)、高血压、糖尿病、高脂血症、冠心病是引起 TIA 发展为脑梗死独立危险因素($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 TIA 发展为脑梗死的二元 Logistic 回归分析

Table 3 TIA was developed as a binary Logistic regression analysis of cerebral infarction

指标/因素	回归赋值	回归系数	标准误差	χ^2 值	OR 值	95%CI	P 值
常数		-0.036	0.017	4.248			0.039
PAF	1=≥180 Pg/mL, 0=否	0.763	0.311	6.017	2.145	1.166~3.947	0.014
ABCD2(中危)	2=高危, 1=中危, 0=低危	0.567	0.186	9.285	1.763	1.224~2.539	0.002
ABCD2(高危)		1.531	0.416	13.555	4.624	2.046~10.448	0.000
IMA	1=≥46 U/mL, 0=否	0.225	0.070	10.355	1.252	1.092~1.436	
高血压	1=是, 0=否	1.700	0.584	8.459	5.473	1.741~17.204	
糖尿病	1=是, 0=否	1.848	0.658	7.886	6.350	1.748~23.069	
高脂血症	1=是, 0=否	1.588	0.588	7.299	4.895	1.546~15.492	
冠心病	1=是, 0=否	1.501	0.583	6.615	4.485	1.429~14.074	

注 1: ABCD2: 总分 ≤3 分为低危, 总分 4~5 分为中危, 总分 ≥6 分为高危。注 2: 赋值为 0 项均为参比。

2.4 血清 PAF、IMA 水及 ABCD2 评分对 TIA 发作后短期进展为脑梗死的早期预测价值

建立 Logistic 预测模型,依据所得回归系数 B,归一化加权计算并据其进行联合应用的 ROC 分析:联合应用对 TIA 发作后短期进展为脑梗死的早期预测价值明显高于各指标单独应用($P<0.05$)。见表 4。

表 4 血清 PAF、IMA 水及 ABCD2 评分对 TIA 发作后短期进展为脑梗死的早期预测价值

Table 4 Early predictive value of serum PAF, IMA water and ABCD2 score for short-term progression to cerebral infarction after the onset of TIA

指标	AUC	95%CI	阈值	灵敏度	特异度	约登指数
PAF	0.783	0.691~0.887	180 Pg/mL	0.802	0.764	0.566
IMA	0.709	0.516~0.975	46 U/mL	0.712	0.707	0.419
ABCD2 评分	0.762	0.641~0.905	4 分	0.784	0.736	0.520
联合应用	0.841	0.745~0.950		0.852	0.823	0.675

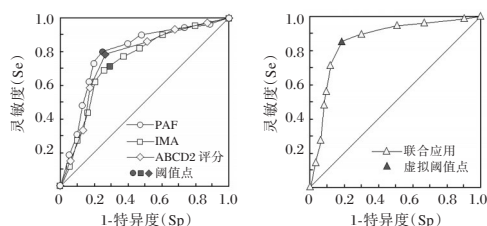


图 1 ROC 曲线
Figure 1 ROC curve

3 讨论

脑梗死是指由脑部血液供血障碍及缺血、缺氧引起局限性脑组织坏死,是心脑血管疾病中致死率极高一种^[9]。而 TIA 是急性缺血性脑血管疾病诱导因素,被认为是脑梗死超早期预警信号^[10]。据统计,临床上继发性脑梗死患者中三分之一是由 TIA 发展而来^[11]。因此,快速准确评估 TIA 患者发展为脑梗死的风险至关重要。

本文分析 TIA 患者和健康体检者基线资料以及发展为脑梗死患者和未发展为脑梗死患者基线资料发现,TIA 患者 PAF、IMA 水平均高于健康体检者,脑梗死患者 PAF、IMA 水平高于非脑梗死患者,且 ABCD2 评分高危及中危比率高于非脑梗死组,低危比率低于非脑梗死组。进一步二元 logistics 回归分析表明,PAF、IMA 水平及 ABCD2 评分是引起 TIA 发展为脑梗死独立危险因素。

ABCD2 评分分别由 Rothwell 和 Johnston 提出和改良,将年龄、症状及病史作为评估内容,便捷有效,可以迅速对患者整体病情做出评估^[12]。本研究参照国外学者研究,将 ABCD2 评分 ≥ 4 作为 TIA 后是否短期发展为脑梗死标准^[13],由此可得较高敏感度和特异度。

PAF 被证实与多种心脑血管疾病发生、发展有关,有文献指出,脑梗死发生与血小板活化、凝血途径激活密切相关,凝血因子 FVⅢ及 vWF 在此过程中起到重要作用,而高 PAF 水平 TIA 患者血清中 FVⅢ及 vWF 水平显著高于低 PAF 水平 TIA 患者^[14];此外,PAF 水平上升会造成炎性介质大量分泌,由此带来炎症反应会加速粥样斑块破裂,引发脑梗死^[15]。本文 ROC 曲线分析发现,PAF 具有一定预测价值。

IMA 是一种灵敏度较高心肌缺血病变标志物,近年来开始用于急性脑血管疾病研究。有报道认为,TIA 患者缺血缺氧会造成能量代谢障碍,引起自由基反应,进而促使脑细胞死亡,在该过程中 IMA 水平会上升,且升高程度与再灌注损伤和缺血相关,由此增加脑梗死风险^[16]。因此 TIA 患者 IMA 水平显著高于健康体检者,脑梗死组患者 IMA 水平显著高于非脑梗死患者。ROC 曲线也表明,IMA 对 TIA 短期发展为脑梗死具有一定预测价值。

特别地,本研究进行了以 ABCD2 评分 ≥ 4 和 PAF 及 IMA 的 cut-off 值作为标准,进行联合应用价值分析,结果得到联合预测 AUC、灵敏度、特异度均高于单指标,表明三者联合具有较高的预测价值。

综上所述,PAF、IMA 水平联合 ABCD2 评分对 TIA 发作后短期进展为脑梗死具有一定的早期预测价值,在病人发生 TIA 后,应注意检测 PAF、IMA 水平及评估 ABCD2 评分,及时予以干预。

参考文献

- [1] 张丽君,黄奕平,黄庆梅. TIA、脑卒中患者血清 MMP-1、MMP-3、MMP-9 的表达水平[J]. 热带医学杂志, 2018, 18(4): 524-528.
- [2] 李占增,任英巧,伍淑玲,等. hs-CRP、NF- κ B、VCAM-1 与缺血性脑血管病病情及预后关系[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(8): 1034-1038.
- [3] 孙玲. Essen 评分联合 CTA 对短暂性脑缺血发作患者发生脑梗死的评估价值[J]. 卒中与神经疾病, 2019, 26(3): 290-293.
- [4] 蒋孝宗,马兰,张守成,等. 弥散加权成像联合 ABCD2 评分对短暂性脑缺血发作患者 90d 内卒中的预测价值研究[J]. 实用心脑血管病杂志, 2020, 28(2): 48-52.

(下转第 1821 页)

急性髓系白血病患者CD73、DJ-1及LAMP4基因表达及意义

王萍* 高红秀 任晓艳 郭力 吴胜胜

【摘要】目的 探讨急性髓系白血病(AML)患者CD73、DJ-1及溶酶体相关膜蛋白4(LAMP4)基因表达及意义。**方法** 选取驻马店市中心医院血液内科收治的70例AML患者骨髓标本作为研究组,另选取10例骨髓捐献者骨髓标本作为对照组,实时荧光定量PCR(RT-PCR)检测CD73、DJ-1及LAMP4基因表达,分析3者与AML患者临床特征及预后的关系。**结果** 研究组CD73、DJ-1及LAMP4 mRNA表达水平显著高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。CD73、DJ-1及LAMP4 mRNA表达水平与患者性别、年龄、贫血程度、血小板计数、幼稚细胞计数无相关性($P>0.05$),但与疾病危险程度分级、白细胞计数、FAB分型存在显著相关性($P<0.05$)。CD73、DJ-1及LAMP4低表达的AML患者完全缓解率(CR)显著高于高表达患者,且治疗缓解后AML患者CD73、DJ-1及LAMP4表达较治疗前明显降低,差异均有统计学意义($P<0.05$)。预后良好的AML患者CD73、DJ-1及LAMP4较预后不良患者表达水平较低,且CD73、DJ-1及LAMP4低表达的AML患者总体生存率及中位生存时间显著高于高表达患者($P<0.05$)。**结论** AML患者CD73、DJ-1及LAMP4呈高表达,结合患者临床特征及三指标表达有助于判断患者预后,并为临床治疗提供参考。

【关键词】 急性髓系白血病; CD73; DJ-1; 溶酶体相关膜蛋白4

The expression and significance of CD73, DJ-1 and LAMP4 genes in patients with acute myeloid leukemia

WANG Ping*, GAO Hongxiu, REN Xiaoyan, GUO Li, WU Shengsheng

(Department of Hematology, Zhumadian Central Hospital, Zhumadian, Henan, China, 463000)

【ABSTRACT】 Objective To investigate the expression and significance of CD73, DJ-1 and lysosomal-associated membrane protein 4 (LAMP4) genes in patients with acute myeloid leukemia (AML). **Methods** The bone marrow specimens of 70 AML patients admitted to department of Zhumadian Central hospital hematology were selected as the research group, and the bone marrow specimens of 10 bone marrow donors were selected as the control group. Real-time fluorescent quantitative PCR (RT-PCR) was used to detect the expression of CD73, DJ-1 and LAMP4 genes. The relationships were further analyzed between the three indicators and the clinical characteristics or prognosis of AML patients. **Results** The expression levels of CD73, DJ-1 and LAMP4 mRNA in the study group were significantly higher than those in the control group, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). The expression levels of CD73, DJ-1 and LAMP4 mRNA were not correlated with the patient's gender, age, degree of anemia, platelet count, and immature cell count ($P>0.05$). However, they were significantly correlated with disease risk grades, white blood cell count and FAB classification ($P<0.05$). The complete remission rate (CR) of AML patients with low expression of CD73, DJ-1 and LAMP4 was significantly higher than that of patients with high expression, and the expression levels of CD73, DJ-1 and LAMP4 in AML patients after treatment remission was significantly lower than those before treatment ($P<0.05$). The expression levels of CD73, DJ-1 and LAMP4 in AML patients with good prognosis were lower than those in other patients with poor prognosis, and the overall survival rate and median survival time of AML patients with low expression of CD73, DJ-1 and LAMP4 were significantly high-

作者单位:驻马店市中心医院血液内科,河南,驻马店 463000

*通信作者:王萍, E-mail: yumidonggua@163.com

er than those in patients with high expression ($P < 0.05$). **Conclusion** CD73, DJ-1 and *LAMP4* are highly expressed in AML patients. Combining the clinical characteristics and the expression of three indicators can help judge the prognosis of patients and provide references for clinical treatment.

[KEY WORDS] acute myeloid leukemia; CD73; DJ-1; Lysosomal associated membrane protein 4

急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)又被称作急性非淋巴细胞白血病或急性粒细胞白血病,是一种较为常见的造血系统恶性增生性疾病,疾病早期患者血细胞数目明显减少,并引发发热、倦怠、食欲减退等症。目前,对于AML的发病机制尚未十分明确,对于急性早幼粒细胞白血病患者通过系统治疗近期生存率较高,而其他AML患者多病情急重,复发率高,预后差,因而寻找有效评估AML病情预后的标志物及相关治疗靶点具有重要意义。CD73为存在于细胞膜上的一类5'-核苷酸酶,与人体正常淋巴细胞的分化、发育有关。近年来研究显示^[1],CD73与急性白血病、慢性髓系白血病等患者预后存在密切联系。*DJ-1*基因又被称为*PARK7*基因,具有抗氧化、抑制细胞凋亡等多种功能,研究证实^[2],*DJ-1*基因表达与多种恶性肿瘤的发生、侵袭转移及预后相关,可作为恶性肿瘤的诊断及治疗靶点。溶酶体相关膜蛋白(lysosome-associated membrane protein, LAMP)为溶酶体膜蛋白的主要组成成分,其中LAMP4主要定位于内膜系统,主要参与细胞的吞噬作用、细胞癌变等过程,在恶性肿瘤的诊断和预后研究中应用较广^[3]。因此,本研究分析了AML患者CD73、DJ-1及*LAMP4*基因表达情况,以期为AML的临床诊断提供有效分子标记及治疗靶点。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取驻马店市中心医院血液内科2018年1月至2020年1月初诊为AML的70例患者的骨髓标本作为研究组,纳入标准:①符合《血液病诊断及疗效标准(第3版)》^[4]中的诊断标准;②自愿参与本研究并签署知情同意书;③非APL患者采用IA方案化疗;④均为初次确诊。排除标准:①合并其他部位肿瘤者;②无法配合研究进行者;③肝肾等脏器功能异常者;④合并其他影响本研究结果的因素。其中,男39例,女31例,年龄平均(51.1 ± 3.2)岁,依照FAB标准^[5]分为M0(5例)、M1(6例)、M2(30例)、M4(4例)、M5(19例)、M6(6例)。另选取10例于本院行骨髓穿刺检查的非血

液系统肿瘤疾病的骨髓捐献者骨髓穿刺标本作为对照组,其中男6例,女4例,年龄平均(49.6 ± 3.4)岁。两组性别、年龄比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。本实验经医院伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 临床指标统计

统计所有患者性别、年龄、法国-美国-英国(French-American-British, FAB)白血病分型标准、贫血程度及世界卫生组织(World Health Organization, WHO)疾病危险度分级^[6],并检查血液白细胞、血小板、幼稚细胞组等实验室指标。

1.2.2 CD73、DJ-1及*LAMP4* mRNA水平检测

采用实时荧光定量PCR(RT-PCR)检测CD73、DJ-1及*LAMP4*基因表达:所有患者入院确诊后立即抽取2 mL骨髓血,梯度离心20 min获得 $1 \sim 2 \times 10^6$ 个骨髓单个核细胞,PBS洗涤,提取细胞总RNA。采用QuantiNova SYBR Green PCR Kit试剂盒(购自德国Qiagen公司)提取总RNA,Quant cDNA第一链合成试剂盒(购自天根公司)逆转录获取cDNA。CD73、DJ-1及*LAMP4*引物均由上海生物工程公司合成。CD73引物序列,上游:5'-CAC-CAAGGTTTCAGCAGATCCG-3',下游:5'-GTTCAT-CAATGGGCGACCGG-3'。DJ-1引物序列:上游:5'-GTGTAGCCGTGATGTGGTC-3',下游:5'-GCTCCTTCAGTATCTCCTTCAC-3'。LAMP4引物序列:上游:5'-GACAAGTACAACGTGAGCGG-3',下游:5'-CGAGGTCTTGTGGGGTTGA-3'。内参照 β -actin引物序列,上游:5'-TCACCCACACTGT-GCCCATCTACGA-3',下游:5'-CAGCGGAACC-GCTCATTTGCCAATGG-3'。荧光定量PCR扩增获取溶解曲线、扩增曲线,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算CD73、DJ-1及*LAMP4*基因相对定量表达水平。

1.2.3 预后分析

依照《血液病诊断及疗效标准(第3版)》^[4]中标准定义病人缓解定义为外周血象恢复,骨髓原始细胞 $< 5\%$ 。并根据缓解情况分为未缓解(none remission, NR)、部分缓解(partial remission, PR)和完全缓解(complete remission, CR)。所有患者随访6~36个月,统计患者预后生存情况,计算生存率

和中位生存时间。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 20.0 统计学软件进行数据分析, 计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 两两比较采用 t 检验, 多组间比较采用 F 检验; 计数资料以 $n(\%)$ 表示, 组间比较采用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 研究组和对照组 CD73、DJ-1 及 LAMP4 基因表达水平比较

研究组 CD73、DJ-1 及 LAMP4 mRNA 表达水平显著高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 两组 CD73、DJ-1 及 LAMP4 mRNA 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	CD73	DJ-1	LAMP4 mRNA
对照组	10	0.24±0.07	0.51±0.11	0.28±0.07
研究组	70	0.77±0.20	2.52±0.39	0.42±0.09
<i>t</i> 值		16.268	34.558	4.710
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000

2.2 CD73、DJ-1 及 LAMP4 mRNA 与 AML 患者临床特征的相关性

CD73、DJ-1 及 LAMP4 mRNA 表达水平与患者性别、年龄、贫血程度、血小板计数、幼稚细胞计数无相关性 ($P > 0.05$), 与疾病危险程度分级、白细胞计数、FAB 分型存在显著相关性 ($P < 0.05$)。见表 2。

2.3 CD73、DJ-1 及 LAMP4 mRNA 与 AML 患者治疗效果的相关性

70 例患者经过治疗后完全缓解率为 74.3% (52/70), 依照 AML 患者入院确诊后测定的 CD73、DJ-1 及 LAMP4 mRNA 均值为分界线分为低于均值的低表达组和高于均值高表达组并对比显示, CD73、DJ-1 及 LAMP4 低表达的 AML 患者完全缓解率显著高于高表达患者, 且治疗缓解后 AML 患者 CD73、DJ-1 及 LAMP4 表达较治疗前明显降低 ($P < 0.05$)。见表 3~4。

2.4 CD73、DJ-1 及 LAMP4 mRNA 与 AML 患者预后的相关性

所有患者随访 6~36 个月, 平均 (21.3 ± 2.4) 个月, 预后良好的 AML 患者入院确诊后测定的 CD73、DJ-1 及 LAMP4 较预后不良患者表达水平较低, 且 CD73、DJ-1 及 LAMP4 低表达的 AML 患者总体生存率及中位生存时间显著高于高表达患者 ($P < 0.05$)。见表 5~6。

表 2 CD73、DJ-1 及 LAMP4 mRNA 与 AML 患者临床特征的相关性 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Correlation between CD73, DJ-1 and LAMP4 mRNA and clinical characteristics of AML patients mRNA ($\bar{x} \pm s$)

项目	<i>n</i>	CD73	DJ-1	LAMP4 mRNA
性别	男	39 0.78±0.22	2.55±0.43	0.42±0.09
	女	31 0.75±0.20	2.51±0.37	0.43±0.08
<i>t</i> 值		0.590	0.411	0.485
<i>P</i> 值		0.557	0.682	0.629
年龄	≤60	49 0.76±0.17	2.46±0.47	0.40±0.11
	>60	21 0.77±0.23	2.53±0.41	0.43±0.09
<i>t</i> 值		0.202	0.592	1.101
<i>P</i> 值		0.840	0.556	0.275
FAB 分型	M0	5 0.64±0.20	2.30±0.29	0.43±0.08
	M1	6 0.65±0.22	2.31±0.36	0.44±0.12
	M2	30 0.94±0.20	2.96±0.62	0.66±0.15
	M4	4 0.63±0.18	2.33±0.35	0.55±0.10
	M5	19 0.77±0.23	2.70±0.28	0.58±0.13
	M6	6 0.61±0.20	2.25±0.21	0.43±0.09
<i>F</i> 值		8.699	9.153	10.314
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000
贫血程度	正常	7 0.77±0.22	2.50±0.42	0.40±0.07
	轻中度	49 0.74±0.21	2.53±0.44	0.43±0.09
	重度	14 0.79±0.25	2.54±0.41	0.41±0.09
<i>F</i> 值		0.186	0.219	0.267
<i>P</i> 值		0.854	0.829	0.792
白细胞计数	≤50	50 0.59±0.17	2.33±0.36	0.30±0.06
	>50	20 0.83±0.22	3.19±0.47	0.52±0.13
<i>t</i> 值		4.894	8.253	7.265
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000
血小板计数	< 50	46 0.78±0.19	2.51±0.45	0.44±0.09
	50~100	12 0.72±0.23	2.55±0.51	0.44±0.11
	>100	12 0.77±0.23	2.56±0.39	0.42±0.08
<i>F</i> 值		0.155	0.387	0.770
<i>P</i> 值		0.877	0.700	0.444
幼稚细胞比例	0~0.5	23 0.76±0.15	2.52±0.44	0.41±0.09
	0.5~1.0	47 0.78±0.26	2.53±0.41	0.42±0.13
<i>t</i> 值		0.610	0.094	0.331
<i>P</i> 值		0.544	0.926	0.741
疾病危险程度分级	低	21 0.52±0.14	2.16±0.24	0.25±0.05
	中	37 0.63±0.18	2.33±0.34	0.45±0.06
	高	12 0.96±0.22	2.98±0.42	0.67±0.15
<i>F</i> 值		7.041	6.209	9.405
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000

表 3 不同 CD73、DJ-1 及 LAMP4 mRNA 表达水平治疗后 CR 比较 [$n(\%)$]

Table 3 Comparison of CR after treatment with different expression levels of CD73, DJ-1 and LAMP4 mRNA [$n(\%)$]

项目	CD73		DJ-1		LAMP4 mRNA	
	低表达	高表达	低表达	高表达	低表达	高表达
CR	16(94.1)	36(67.9)	14(100)	39(69.6)	15(93.8)	37(68.5)
χ^2 值	4.623		5.613		4.114	
<i>P</i> 值	0.032		0.018		0.043	

表4 治疗缓解前后 AML 患者 CD73、DJ-1 及 *LAMP4* mRNA 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Comparison of CD73, DJ-1 and *LAMP4* mRNA levels in AML patients before and after treatment remission

时间	<i>n</i>	CD73	DJ-1	<i>LAMP4</i> mRNA
缓解前	52	0.75±0.08	2.36±0.26	0.41±0.10
缓解后	52	0.32±0.15	0.77±0.20	0.31±0.10
<i>t</i> 值		18.240	34.954	5.099
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.012

表5 不同预后的 AML 患者 CD73、DJ-1 及 *LAMP4* mRNA 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Comparison of CD73, DJ-1 and *LAMP4* mRNA levels in AML patients with different prognosis ($\bar{x} \pm s$)

项目	<i>n</i>	CD73	DJ-1	<i>LAMP4</i> mRNA
预后良好	52	0.48±0.08	1.96±0.26	0.36±0.10
预后不良	18	0.83±0.12	2.71±0.47	0.62±0.14
<i>t</i> 值		11.520	6.438	8.538
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000

表6 不同 CD73、DJ-1 及 *LAMP4* 表达水平 AML 患者总体生存率及中位生存时间比较

Table 6 Comparison of overall survival rate and median survival time of AML patients with different expression levels of CD73, DJ-1 and *LAMP4*

项目	CD73		mRNA		<i>LAMP4</i> mRNA	
	低表达	高表达	低表达	高表达	低表达	高表达
总体生存率(%)	16(94.1)	34(64.1)	13(92.9)	37(66.1)	15(93.8)	35(64.8)
χ^2 值		5.664		3.938		5.064
<i>P</i> 值		0.017		0.047		0.024
中位生存时间(月)	16.3±1.1	12.6±1.3	15.9±1.0	12.2±1.9	15.9±1.4	12.8±2.1
<i>t</i> 值		11.662		9.729		6.845
<i>P</i> 值		0.000		0.000		0.000

越差。DJ-1 基因为新发现的一类丝裂原依赖性癌基因,在胃癌、肝细胞癌等多种实体肿瘤中广泛表达,在调节肿瘤细胞凋亡、促进细胞增殖、转录、侵袭、转移等方面发挥重要作用^[10-11]。研究显示在初治急性白血病及骨髓增生异常综合征患者的骨髓标本中 DJ-1 基因表达水平明显增加^[12]。溶酶体为细胞质中重要的细胞器,参与了细胞免疫、代谢、自噬等生理过程,*LAMP4* 为主要定位于溶酶体的巨噬细胞表面分子标记物,可能通过调节 AML 细胞的凋亡抑制和分化阻滞参与疾病的发生发展。研究指出^[13],*LAMP4* 在胃癌、乳腺癌等恶性肿瘤组织中高表达,并与恶性肿瘤患者临床病理特征存在密切关系。本研究结果显示,在 AML 患者骨髓标本中 CD73、DJ-1 及 *LAMP4* mRNA 表达水平明显高于正常人群的骨髓标本。研究结果 CD73、DJ-1 及 *LAMP4* mRNA 表达水平与 AML 患者临床特征、疾

3 讨论

AML 以造血干细胞/祖细胞异常增殖、分化受阻和凋亡抑制为主要特征的高度异质性血液系统疾病,随着遗传学及分子医学的不断发展,研究显示基因突变、染色体易位及造血细胞免疫表型改变与白血病的发生发展密切相关,对 AML 患者的治疗反应和预后均有一定的影响^[7]。因此,研究 AML 患者相关分子表达对于寻找患者个体化治疗、基因治疗的分子靶点及了解 AML 的发生发展分子机理等具有重要意义。

CD73 为分布于多种细胞细胞膜上的一类白细胞抗原,具有磷酸转移酶和水解酶两种酶活性,在维持核苷酸代谢平衡中具有重要作用。近年来报道显示^[8],CD73 与白血病患者治疗预后及分型相关;另有研究证实^[9],AML 患者核苷酸水解酶活性越强,患者白血病相关细胞分化程度越低,预后也

病发展有着显著关系,可能为 AML 发生发展的危险因素,这与一些研究的结果相类似^[14-16]。

本研究结果还显示,CD73、DJ-1 及 *LAMP4* 低表达的 AML 患者完全缓解率显著高于高表达患者,且治疗缓解后 AML 患者 CD73、DJ-1 及 *LAMP4* 表达较治疗前明显降低。同时,预后良好的 AML 患者 CD73、DJ-1 及 *LAMP4* 较其他患者表达水平较低,且 CD73、DJ-1 及 *LAMP4* 低表达的 AML 患者总体生存率及中位生存时间显著高于高表达患者。因此,AML 患者 CD73、DJ-1 及 *LAMP4* 表达水平越高,患者治疗效果及预后越差,而抑制 CD73、DJ-1 及 *LAMP4* 表达可延长患者生存时间,提升患者生存率。因而检测 CD73、DJ-1 及 *LAMP4* 表达有助于 AML 患者的诊断和预后判断,但其具体的机制尚需进一步深入探讨。综上所述,AML 患者 CD73、DJ-1 及 *LAMP4* 呈高表达,结合患者临床特

征及治疗前后三指标表达变化有助于判断患者预后,并为临床治疗提供参考。

参考文献

- [1] 张江召,刘敏,黄知平. CD73在NPM1突变型急性髓系白血病患者中的表达及其临床意义[J]. 中国实验血液学杂志, 2021, 29(2): 416-421.
- [2] Guadagno E, Borrelli G, Pignatiello S, et al. Anti-Apoptotic and Anti-Oxidant Proteins in Glioblastomas: Immunohistochemical Expression of Beclin and DJ-1 and Its Correlation with Prognosis[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(16): 4066.
- [3] 何昕雅,张强,段静诗,等. 溶酶体相关膜蛋白LAMP1与肿瘤相关性的研究进展[J]. 生命科学, 2020, 32(10): 1074-1080.
- [4] 张之南,沈悌. 血液病诊断及疗效标准(第3版). 科学出版社, 2007.
- [5] 大岛年照,肖洪万. 诊断急性白血病的FAB分类[J]. 临床荟萃, 1991(3): 33-34.
- [6] 马军,赵东陆. WHO 2016(修订版)急性髓系白血病分型解读[J]. 临床血液学杂志, 2017(2): 169-171.
- [7] 张阳,王芳,房建成,等. 基因突变筛查对急性髓性白血病患者临床诊疗的获益对比分析[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2021, 13(2): 174-177.
- [8] Sędek Ł, Theunissen P, Sobral da Costa E, et al. Differential expression of CD73, CD86 and CD304 in normal vs. leukemic B-cell precursors and their utility as stable minimal residual disease markers in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia [J]. J Immunol Methods, 2019, 475(1): 112429.
- [9] Nahla O, Eman A, Manal M, et al. CD73, a potential diagnostic marker in Egyptian patients with chronic lymphocytic leukemia[J]. J Menoufia Med, 2017, 30(1): 128-132.
- [10] 王文松,黄英,李清叶,等. 利用组织芯片分析DJ-1蛋白在非霍奇淋巴瘤组织中的定位表达及意义[J]. 中南医学科学杂志, 2018, 46(2): 119-122.
- [11] Qiu B, Wang J, Yu Y, et al. DJ-1 promotes development of DEN-induced hepatocellular carcinoma and proliferation of liver cancer cells[J]. Oncotarget, 2017, 8(5): 8499-8511.
- [12] 岳海燕,秦晶,王文松,等. DADS对DJ-1核定位高表达人白血病HL-60细胞的影响(英文)[J]. 生物化学与生物物理进展, 2019, 46(2): 201-210.
- [13] Yamazaki Y, Thongchankaew-Seo U, Nagao K, et al. Development and evaluation of a point-of-care test with a combination of EZâ Fast DNA extraction and real-time PCR and LAMP detection: evaluation using blood samples containing the bovine leukaemia DNA[J]. Lett Appl Microbiol, 2020, 71(6): 560-566.
- [14] Tembhare PR, Ghogale S, Ghatwai N, et al. Evaluation of new markers for minimal residual disease monitoring in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: CD73 and CD86 are the most relevant new markers to increase the efficacy of MRD 2016; 00B: 000-000[J]. Cytometry B Clin Cytom, 2018, 94(1): 100-111.
- [15] 孔春芳,柯波,李安娜,等. DJ-1基因在急性髓系白血病中的表达及其临床意义[J]. 江西医药, 2021, 56(1): 8-12.
- [16] 黄巧娟,何波,赵鑫,王文涛. LAMP4在急性髓系白血病中的表达与功能分析[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2020, 59(6): 12-20.

(上接第1816页)

- [5] Shigekiyo T, Yagi H, Sekimoto E, et al. Cerebral infarction and iron deficiency anemia due to uterine myoma in two middle-aged women with histidine-rich glycoprotein deficiency [J]. Thromb Res, 2020, 11(7): 118-126.
- [6] Sasaki T, Yasuda T, Abe D, et al. A Case of Multiple Cerebral Infarction Preceding Acute Exacerbation of Idiopathic Thrombocytopenic Purpura [J]. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2019, 28(3): 789-791.
- [7] 短暂性脑缺血发作中国专家共识组. 短暂性脑缺血发作的中国专家共识更新版(2011年)[J]. 中华内科杂志, 2011, 50(6): 530-533.
- [8] Xi HY, Si ZH, Li JC, et al. Assessment of cerebral infarction after transient cerebral ischemic attack by ABCD2 score combined with the position of intracranial vascular stenosis [J]. Medicine (Baltimore), 2019, 98(12): 123-131.
- [9] Chieh-Ni, Kao, Yu-Wei, et al. Acute cerebral infarction caused by atrial thrombus originating from left upper pulmonary vein stump after left upper lobe trisegmentectomy [J]. Gen Thorac Cardiovas Surg, 2020, 68(2): 206-207.
- [10] Stanciu A, Banciu M, Sadighi A, et al. A predictive analytics model for differentiating between transient ischemic attacks (TIA) and its mimics [J]. BMC Med Inform Decis mark, 2020, 20(11): 216-223.
- [11] 李璇,吴江. 动脉自旋标记技术评估TIA的研究进展[J]. 磁共振成像, 2019, 10(4): 58-61.
- [12] 李尚坤,余恒旺,崔美莲,等. ABCD2评分法结合头颈部CTA对短暂性脑缺血发作后脑梗死的预测价值[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2019, 17(10): 1573-1575.
- [13] 韩正冉,闫凤侠,王双. 脑梗死合并高脂血症患者VEGF、Lp-PLA2及血小板活化功能的分析及意义[J]. 医学临床研究, 2019, 36(6): 1128-1130.
- [14] 李伟,张咪娟,王琰,等. 血小板活化因子和血管内皮活性标志物与腔隙性脑梗死的关系[J]. 华西医学, 2019, 34(10): 66-70.
- [15] 马牧欣,周立君,赵继义. 缺血修饰白蛋白对急性心肌梗死患者在院期间不良心血管事件的预测价值[J]. 医学临床研究, 2019, 36(6): 1093-1095.
- [16] 王辉. 血清NSE、IMA及LPA对急性脑梗死患者预后的评估价值[J]. 脑与神经疾病杂志, 2020, 28(2): 91-95.

· 论 著 ·

血清 sIL-3、VEGF、25-(OH)D3 在急性白血病患者中水平及其与凝血功能相关性

向金峰* 王刚 卜凡丹 陈志鑫 张娴 张晗

[摘要] **目的** 探讨急性白血病(AL)患儿血清可溶性白细胞介素3(sIL-3)、血管内皮生长因子(VEGF)、25-羟维生素D3[25-(OH)D3]水平变化意义及与凝血功能相关性。**方法** 选取南阳市中心医院74例AL患儿作为观察组,其中凝血功能正常13例,凝血功能异常61例,另选取同期健康体检者74例作为对照组。比较两组血清sIL-3、VEGF、25-(OH)D3水平,分析上述血清各指标与AL的关系,并比较观察组不同凝血功能患儿基线资料、血清各指标水平,分析血清各指标水平、基线资料与凝血功能的相关性。**结果** 观察组血清sIL-3、VEGF水平高于对照组,25-(OH)D3水平低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。血清sIL-3、VEGF、25-(OH)D3水平与急性白血病有关($P<0.05$)。AL患儿凝血功能异常与乳酸脱氢酶、组织肿瘤负荷、肝功能不良、血清sIL-3、VEGF水平呈正相关关系,与25-(OH)D3水平呈负相关关系($P<0.05$)。血清sIL-3、VEGF、25-(OH)D3水平仍与AL患儿凝血功能相关($P<0.05$)。**结论** 血清sIL-3、VEGF、25-(OH)D3水平在AL患儿中异常表达,有望评估AL患儿凝血功能异常的重要手段。

[关键词] 急性白血病;可溶性白细胞介素3;血管内皮生长因子;25-羟维生素D3;凝血功能

Serum levels of sIL-3, VEGF, and 25-(OH) D3 in children with acute leukemia and their correlation with coagulation function

XIANG Jinfeng*, WANG Gang, BU fandan, CHEN Zhixin, ZHANG Xian, ZHANG Han

(Department of Pediatric Hematology and Oncology, Nanyang Central Hospital, Nanyang, Henan, China, 473000)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the significance of serum soluble interleukin 3 (sIL-3), vascular endothelial growth factor (VEGF), 25-hydroxyvitamin D3 [25-(OH) D3] levels in children with acute leukemia (AL) and their correlation with coagulation function. **Methods** 74 children with AL in Nanyang Central Hospital were selected as the observation group, including 13 cases of normal coagulation function and 61 cases of abnormal coagulation function, and 74 cases of healthy physical examination in the same period were selected as the control group. The levels of serum sIL-3, VEGF and 25-(OH) D3 between the two groups were compared. The relationship between the above serum indicators and AL was analyzed. The baseline data and serum levels of three indicators in children with different coagulation functions in the observation group were compared, and the correlation between serum indicators, baseline data and coagulation function was analyzed. **Results** The serum levels of sIL-3 and VEGF in the observation group were higher than those in the control group, and the levels of 25-(OH) D3 were lower than those in the control group ($P<0.05$). The levels of serum sIL-3, VEGF and 25-(OH) D3 were related to acute leukemia ($P<0.05$). Abnormal coagulation function in children with AL was positively correlated with lactate dehydrogenase, tissue tumor load, poor liver function, serum sIL-3 and VEGF levels, and negatively correlated with 25-(OH) D3 levels ($P<0.05$). The

基金项目:河南省医学科技计划项目(68050365)

作者单位:南阳市中心医院儿童血液肿瘤科,河南,南阳 473000

*通信作者:向金峰, E-mail: fengyanpu2014@163.com

levels of serum sIL-3, VEGF and 25-(OH) D3 are related to coagulation function in children with AL.

Conclusion Serum sIL-3, VEGF and 25-(OH) D3 levels are abnormally expressed in children with AL, which is expected to be an important means for evaluating abnormal blood coagulation function in children with AL.

[KEY WORDS] Acute leukemia; Soluble interleukin 3; Vascular endothelial growth factor; 25-hydroxyvitamin D3; Coagulation function

急性白血病(Acute leukemia, AL)是一种由骨髓异常大量增殖原始细胞及幼稚细胞所致血液系统恶性克隆性疾病,随病情进展可广泛浸润肝、脾、淋巴结等髓外脏器^[1-2]。相关研究表明,AL患儿血管内皮受损,体内存在凝血与纤溶异常现象,是造成患儿早期死亡的重要原因,主要表现为高凝状态或血栓形成^[3-4]。目前尚未完全明确AL患儿血栓及出血机制,研究认为,其发生与血管生成具有一定联系^[5]。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是血管形成的主要刺激因子,可提高血管通透性,促使炎性渗透,加快内皮细胞生长、迁移^[6]。25-羟维生素D3[1,25-dihydroxyvitamin D3, 25-(OH)D3]可诱导细胞分化、凋亡、促进血管生成。而可溶性白细胞介素3(soluble interleukin 3, sIL-3)是多效干细胞刺激因子,可调节造血干细胞定向分化与增殖功能。然而关于血清sIL-3、VEGF、25-(OH)D3水平与AL患儿凝血功能的相关性鲜有报道。本研究综合探讨血清sIL-3、VEGF、25-(OH)D3水平在AL患儿中的变化及与凝血功能的相关性。

1 资料和方法

1.1 一般资料

选取2019年1月至2020年12月南阳市中心医院74例AL患儿作为观察组,另选取同期健康体检者74例作为对照组。其中观察组:男46例,女28例,年龄(0.5~12.0)岁,中位年龄6.84岁;病程平均(28.57±0.53)d;凝血功能正常13例,凝血功能异常61例;对照组:男49例,女25例,年龄(0.8~11.9)岁,中位年龄7.12岁。两组基本资料(年龄、性别)比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。

纳入标准:观察组均符合AL诊断标准^[7];符合以下任意一项指标异常即定义为凝血功能异常:凝血酶时间(TT)延长 >3 s;活化部分凝血活酶时间(activated partial thromboplastin time, APTT)延长 >10 s;纤维蛋白原(fibrinogen, FIB) <2 g/L, 0.5 μg/mL $\leq$ D-二聚体(D-dimer, D-D)水平升高 ≤ 19.24 μg/mL;凝血酶时间均在正常范围内;对照组均经

血象、骨髓细胞形态学、细胞组织化学染色等检查未见骨髓异常原始细胞及幼稚细胞大量增殖、感染、出血、贫血、髓外组织器官浸润等主要表现;本研究经医院医学伦理委员会批准,所有研究对象均签署知情同意书;排除标准:合并肝肾等重要脏器器质性病变者;合并先天性心脏病、风疹病毒感染所致畸形、先天性髋关节脱位等先天性疾病者;监护人精神行为异常。

1.2 方法

所有研究对象均于上午6:00~8:00空腹采集静脉血4 mL,置于促凝管中凝固30 min,后置入普通离心机中以2 500 r/min(离心半径8 cm)转速离心10 min,收集血清标本,置于-80℃冰箱冻存待检。①凝血功能:采用ACL-200型全自动凝血仪检测TT、APTT、D-D、FIB水平,仪器及配套试剂盒购自美国贝克曼库尔特有限公司,严格按照仪器及配套试剂盒说明书操作。②血清sIL-3、VEGF、25-(OH)D3水平:采用酶标仪(型号:SAF-680T)以双抗体夹心酶联免疫吸附试验技术检测,仪器购自上海巴玖实业有限公司,试剂盒购自英国IDS Ltd公司,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,计量资料采用($\bar{x}\pm s$)表示, t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,计数资料用 $n(\%)$ 表示, χ^2 检验。采用Spearman相关性分析血清sIL-3、VEGF、25-(OH)D3水平、基线资料与凝血功能相关性,采用Logistic多因素回归分析血清sIL-3、VEGF、25-(OH)D3水平与AL患儿凝血功能关联性,采用受试者工作特征曲线(ROC)分析血清sIL-3、VEGF、25-(OH)D3水平与AL的关系,获取曲线下面积。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组血清sIL-3、VEGF、25-(OH)D3水平比较

观察组血清sIL-3、VEGF水平高于对照组,25-(OH)D3水平低于对照组($P<0.05$)。见表1。

表1 两组血清 sIL-3、VEGF、25-(OH)D3 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of serum sil-3, VEGF and 25-(OH) D3 levels between 2 groups ($\bar{x} \pm s$)				
组别	n	sIL-3(pg/mL)	VEGF(pg/mL)	25-(OH)D3(ng/mL)
观察组	74	349.85±102.31	230.74±85.23	23.40±9.18
对照组	74	192.54±56.73	118.52±40.14	31.74±9.52
t 值		11.568	10.247	5.425
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

表2 血清 sIL-3、VEGF、25-(OH)D3 水平与急性白血病的关系

Table 2 Relationship between serum sil-3, VEGF, 25-(OH) D3 levels and acute leukemia

指标	AUC	95%CI	Z 值	截断值	敏感度(%)	特异度(%)	P 值
sIL-3	0.805	0.731~0.865	8.641	>274.54 pg/mL	68.92	81.08	<0.001
VEGF	0.808	0.736~0.868	8.647	>180.42 pg/mL	64.86	87.84	<0.001
25-(OH)D3	0.786	0.712~0.849	7.774	≤25.07 ng/mL	66.22	79.73	<0.001
联合	0.890	0.840~0.939	15.445		77.03	83.78	<0.001

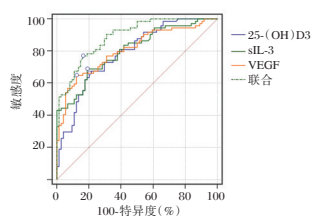


图1 ROC 曲线图

Figure 1 ROC curve

肿瘤负荷、肝功能不良、血清 sIL-3、VEGF、25-(OH)D3 水平方面比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表3。

2.4 血清 sIL-3、VEGF、25-(OH)D3 水平、基线资料与凝血功能的相关性

Spearman 相关性分析,AL 患儿凝血功能异常与乳酸脱氢酶、组织肿瘤负荷、肝功能不良、血清 sIL-3、VEGF 水平呈正相关关系($P<0.05$),与 25-(OH)D3 水平呈负相关关系($P<0.05$)。见表4。

2.5 多元逐步回归分析血清指标与凝血功能的关系

Logistic 多因素回归分析,将乳酸脱氢酶、组织肿瘤负荷、肝功能不良等其他因素控制后,血清 sIL-3、VEGF、25-(OH)D3 水平仍与 AL 患儿凝血功能显著相关($P<0.05$)。见表5。

3 讨论

sIL-3 可促进巨核细胞、红细胞、中性粒细胞等多种细胞分化、成熟。本研究结果显示,血清 sIL-3 水平升高可能增加 AL 发生风险。AL 患儿白血病细胞异常大量增殖,可抑制 T 细胞及自然细胞增生与活化,进而导致 sIL-3 水平升高,刺激白血病细胞增殖,从而在 AL 病理进程中发挥重要调控作

2.2 血清 sIL-3、VEGF、25-(OH)D3 水平与急性白血病的关系

ROC 曲线显示,血清 sIL-3、VEGF、25-(OH)D3 水平与急性白血病有关($P<0.05$)。见表2、图1。

2.3 不同凝血功能患儿基线资料、血清各指标水平比较

观察组不同凝血功能患儿乳酸脱氢酶、组织

表3 观察组不同凝血功能患儿基线资料、血清 sIL-3、VEGF、25-(OH)D3 水平比较 [$n(\%)$, ($\bar{x} \pm s$)]Table 3 Comparison of baseline data, serum sil-3, VEGF and 25-(OH) D3 levels in children with different coagulation functions in the observation group [$n(\%)$, ($\bar{x} \pm s$)]

资料	凝血功能异常 (n=61)	凝血功能正常 (n=13)	χ^2 值	P 值
性别				
男	39(63.93)	7(53.85)	0.134	0.714
女	22(36.07)	6(46.15)		
年龄(岁)				
<1	6(9.84)	2(15.38)	0.472	0.637
1~10	48(78.69)	10(76.92)		
>10	7(11.48)	1(7.69)		
白细胞计数($\times 10^9/L$)				
<10	26(42.62)	6(46.15)	0.400	0.689
10~100	21(34.43)	5(38.46)		
>100	14(22.95)	2(15.38)		
血小板计数($\times 10^9/L$)				
<20	13(21.31)	3(23.08)	0.400	0.689
20~100	31(50.82)	5(38.46)		
>100	17(27.87)	5(38.46)		
白血病分型乳酸脱氢酶(U/L)				
<300	6(9.84)	7(53.85)	2.567	0.010
300~1 000	35(57.38)	4(30.77)		
>1 000	20(32.79)	2(15.38)		
组织肿瘤负荷				
大	40(65.57)	4(30.77)	5.385	0.020
一般	21(34.43)	9(69.23)		
肝功能				
正常	13(21.31)	9(69.23)	9.597	0.002
异常	48(78.69)	4(30.77)		
危险度				
低危	9(14.75)	4(30.77)	0.122	0.903
中危	18(29.51)	1(7.69)		
高危	34(55.74)	8(61.54)		
sIL-3(pg/mL)	369.84±84.26	256.05±74.26	4.506	<0.001
VEGF(pg/mL)	247.63±74.26	151.49±62.19	4.348	<0.001
25-(OH)D3(ng/mL)	22.11±5.21	29.44±9.27	3.948	<0.001

表4 血清 sIL-3、VEGF、25-(OH)D3 水平、基线资料与凝血功能的相关性

Table 4 Correlation between serum sil-3, VEGF, 25-(OH)D3 levels, baseline data and coagulation function

项目	乳酸 脱氢酶	组织肿瘤 负荷大	肝功能 不良	sIL-3	VEGF	25-(OH)D3
凝血功能						
r 值	0.471	0.394	0.412	0.398	0.427	-0.374
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

表5 多元逐步回归分析血清指标与凝血功能的关系

Table 5 Relationship between serum indexes and coagulation function by multiple stepwise regression analysis

因变量	自变量	偏回归 系数	标准 误差	偏回归系数 (标准化)	t 值	P 值
凝血功能	常量	8.245	1.027	-	7.461	<0.001
	sIL-3	0.537	0.031	0.624	6.145	<0.001
	VEGF	0.612	0.043	0.698	8.137	<0.001
	25-(OH)D3	-0.574	0.028	-0.614	7.265	<0.001

用。推测早期下调血清 sIL-3 水平可能是降低 AL 发生率的重要手段之一。另外,经 Spearman 相关性分析还发现,血清 sIL-3 水平与 AL 患儿凝血功能异常存在正相关性,这可能归因于血清 sIL-3 水平升高可能促进白血病细胞大量分化、凋亡,增加纤维蛋白原含量,影响纤溶酶原及抗纤溶因子平衡,上调促凝物质表达,激活凝血系统,进而诱发凝血功能异常,加重高凝状态,最终形成恶性循环。提示早期检测血清 sIL-3 水平一定程度可为评估 AL 患儿出血倾向提供有效辅助血清标志物。VEGF 通过结合 VEGF 受体,可大量增殖血管内皮细胞,促进血管形成,在血液系统疾病中扮演重要角色^[8]。陈玥等^[9]通过回顾性分析发现,血清 VEGF 水平在 AL 患者中呈异常高表达状态,支持本研究观点,分析机制在于 VEGF 不仅通过自分泌方式刺激血液恶性肿瘤有丝分裂反应,促进白血病祖细胞自我更新,形成白血病细胞自分泌环路,为恶性造血细胞提供充足血流供应^[10-11],还利用旁分泌方式大量增殖血管内皮细胞,与血管内皮细胞受体结合,分泌造血生长因子,刺激白血病细胞增殖,促进新血管网形成,加速白血病细胞恶性增殖,从而为白血病细胞持续增殖、浸润、转移提供所需营养。进一步经 Logistic 多因素回归分析,血清 VEGF 水平异常升高是 AL 患儿凝血功能异常的独立危险因素。这可能是由于血清 VEGF 水平异常升高可旁分泌方式大量增殖血管内皮细胞,合成与释放单链形成的组织型纤维蛋白溶酶

激活物,溶解血管内凝块,且其还能促进不同凝血因子释放,加速内皮细胞对凝血酶原的激活,降低抗凝血系统活性,进而引发凝血功能异常。

25-(OH)D3 是维生素 D 的活性形式,能促进造血干细胞等正常细胞生长,其水平高表达对血液系统恶性疾病的治疗具有一定价值^[12-13]。本研究通过检测可知,AL 患儿血清 25-(OH)D3 水平过度下调,与张鹏程等^[14]观点基本一致。机制可能为 AL 患儿 25-(OH)D3 水平下降,可影响维生素 D 受体蛋白表达,活化丝裂原活化蛋白激酶/细胞外调节激酶 1,2 与 P13K 信号通路介导,调控髓系分化标志物髓过氧化物酶的表达与活性,促进白血病 6T-CEM 细胞增生,从而参与 AL 的发生、发展。考虑缺乏 25-(OH)D3 可能是 AL 发病因素之一。另外,本研究还显示,血清 25-(OH)D3 水平下降可能增加 AL 患儿凝血功能异常发生率,可能与 AL 患儿血清 25-(OH)D3 下调可导致白血病细胞滞留于血管壁或侵入各脏器,激活血管内皮细胞,释放过多促血管生成因子,增加血管通透性,引发出血存在一定关系。

综上可知,血清 sIL-3、VEGF、25-(OH)D3 水平在 AL 患儿中异常表达,有望成为评估 AL 凝血功能异常的重要手段。但血清 sIL-3、VEGF、25-(OH)D3 水平变化在诊断 AL 分型、判断预后中的应用价值仍有待研究进一步探索。

参考文献

- [1] Harris MH, Czuchlewski DR, Arber DA, et al. Genetic Testing in the Diagnosis and Biology of Acute Leukemia[J]. Am J Clin Pathol, 2019, 152(3):322-346.
- [2] Gutierrez A, Kentsis A. Acute myeloid/T-lymphoblastic leukaemia (AMTL): a distinct category of acute leukaemias with common pathogenesis in need of improved therapy[J]. Br J Haematol, 2018, 180(6):919-924.
- [3] 林素珂,周立峰. 儿童急性白血病患者凝血和抗凝及纤溶指标变化研究[J]. 中国妇幼健康研究, 2017, 28(12):1745-1747.
- [4] 李海涛,赵淑艳,刘志宇,等. 柔红霉素对急性早幼粒细胞白血病细胞释放的微粒的数量及促凝活性的影响[J]. 中国实验血液学杂志, 2018, 26(4):972-977.
- [5] 王改锋,张琰,王升,等. 急性髓细胞白血病患者联合检测血清 VEGF 和 sPD-L1 对疗效及预后评估价值的研究[J]. 感染、炎症、修复, 2019, 20(1):41-45.
- [6] 谢云鹏,柳新,刘兵. TGF- β 1、Smad7 及 VEGF 在脑胶质瘤中表达及与病理特征、预后的关系[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2021, 13(1):38-42.

(下转第 1829 页)

血清 Ghrelin、GAS、CCK 与保胆取石术后患者胃肠功能恢复的关系

刘雄友* 郭忠涛 李阳阳

【摘要】目的 分析胆结石患者血清胃饥饿素(Ghrelin)、胃泌素(GAS)、胆囊收缩素(CCK)水平与保胆取石术后胃肠功能恢复的关系。**方法** 选取2019年1月至2020年12月本院收治的66例胆结石患者,均进行保胆取石手术治疗,根据术后胃肠功能恢复情况将其分为功能恢复组和未恢复组,比较两组术后第一天血清 Ghrelin、GAS 和 CCK 水平以及手术方式、持续时间、术中出血量、术后开始下床活动时间,并采用多因素 Logistic 回归分析术后胃肠功能恢复的影响因素。**结果** 功能未恢复组血清 Ghrelin、GAS 水平均低于功能恢复组,CCK 水平高于功能恢复组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。功能未恢复组性别、高血压、糖尿病、BMI、文化程度、结石数目、结石大小、术前症状与功能恢复组比较差异无统计学意义($P>0.05$),年龄、手术方式、手术持续时间、术中出血量、术后开始下床活动时间与功能恢复组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。多因素 Logistic 回归分析显示,影响患者术后胃肠功能恢复的因素包括年龄、术式、手术持续时间、术中出血量、术后开始下床活动时间、血清 Ghrelin、GAS 和 CCK 水平($P<0.05$)。**结论** 监测术后第一天血清 Ghrelin、GAS 和 CCK 水平有助于预测胆结石患者保胆取石术后胃肠功能恢复状况。

【关键词】 胆结石; 保胆取石术; 胃肠功能恢复; 胃饥饿素; 胃泌素; 胆囊收缩素

Relationship between serum ghrelin, GAS, CCK and the recovery of gastrointestinal function in patients after cholecystolithotomy

LIU Xiongyou*, GUO Zhongtao, LI Yangyang

(Department of Hepatobiliary Surgery, Puyang People's Hospital, Puyang, Henan, China, 457000)

【ABSTRACT】 Objective To analyze the correlation between serum ghrelin, gastrin (GAS) and cholecystokinin (CCK) levels in patients with gallstone and recovery of gastrointestinal function after cholecystolithotomy after gallbladder preservation. **Methods** A total of 66 patients with gallstones admitted to our hospital from January 2019 to December 2020 were selected for gallstone preservation and stone removal. According to the recovery of gastrointestinal function after surgery, the patients were divided into the recovered group and the non-recovered group. The levels of serum Ghrelin, GAS, and CCK on the first day after surgery were compared between the two groups, as well as the operation method, duration, intraoperative blood loss, and time to get out of bed after surgery. Multivariate Logistic regression was used to analyze the effect of postoperative gastrointestinal function recovery. **Results** The levels of serum Ghrelin and GAS in the function-unrecovered group were lower than those in the function-recovered group, and the CCK level was higher than that in the function-recovered group, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). There were no statistically significant differences in gender, hypertension, diabetes, BMI, education level, number of stones, stone size, preoperative symptoms between two groups ($P>0.05$). There were statistically significant differences in age, operation method, operation duration, intraoperative blood loss, and time to get out of bed after operation between two groups ($P<0.05$). Multivariate Logistic regression analysis showed that the factors affecting

基金项目:河南省医学科技攻关计划项目(2017062235)

作者单位:濮阳市人民医院肝胆外科,湖南,濮阳 457000

*通信作者:刘雄友, E-mail:2002511xy@163.com

the recovery of gastrointestinal function after surgery included age, surgical method, operation duration time, intraoperative blood loss, postoperative time to get out of bed, serum ghrelin, GAS and CCK levels ($P<0.05$).

Conclusion Monitoring the serum levels of ghrelin, GAS and CCK on the 1st day after surgery can help predict the recovery of gastrointestinal function in patients with gallstones after cholecystolithotomy.

[KEY WORDS] Gallstone; Cholecystolithotomy with gallbladder preservation; Recovery of gastrointestinal function; Ghrelin; Gastrin; Cholecystokinin

胆结石为临床常见肝胆外科疾病,是指胆囊、胆管内存在结石,部分患者无症状,部分患者可见右上腹部不适、嗝气、恶心等症状^[1]。保胆取石术为当前临床治疗胆结石常用手术方法,是在保留胆囊的基础上取出结石,相对于胆囊切除手术更容易被患者接受。尽管如此,胆结石患者保胆取石术后胃肠功能恢复仍是临床上关注的重要内容。胃饥饿素(Ghrelin)是主要由人胃底部P/D1细胞及胰腺 ϵ 细胞产生的一种激素,具有多种生物学作用^[2]。胃泌素(gastrin, GAS)可刺激胃酸和胃蛋白酶分泌,可调节胃肠道功能^[3]。胆囊收缩素(cholecystokinin, CCK)是由胃肠道粘膜I细胞分泌,可以刺激胆囊收缩和胰酶分泌,在胃肠功能运动调节中具有一定作用^[4]。本次研究分析血清Ghrelin、GAS和CCK水平与保胆取石术后胃肠功能恢复的相关性,以期为胆结石患者保胆取石术后胃肠功能的恢复提供指导依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2019年1月至2020年12月本院收治的66例胆结石患者为研究对象,纳入标准:①有黄疸病史,术前经B超或磁共振胰胆管成像(Magnetic resonance cholangiopancreatography, MRCP)检查发现有胆结石,胆囊体积明显增大,符合相关诊断标准^[5];②术前行血常规、肝肾功能检查无异常;③临床资料完整。排除标准:①术前已有胃肠道病变;②凝血功能障碍;③严重心肺功能障碍;④长期服用激素类药物或其他影响代谢的药物;⑤合并全身性疾病。66例胆结石患者中,男37例,女29例,平均年龄(34.83 ± 10.12)岁。本研究经医院医学伦理委员会批准通过,受试者均签署知情同意书。

根据术后胃肠功能恢复情况将其分为功能恢复组和未恢复组。术后胃肠功能恢复判断标准为^[6]:术后3d进水进食后发生上腹部饱胀不适、恶心呕吐,>12h无法恢复为胃肠功能未恢复;未出现上述不适且进食量逐渐增加为胃肠功能恢复。

1.2 方法

1.2.1 手术方式

66例胆结石患者中有53例行腹腔镜下保胆取石术治疗,13例行开腹保胆取石术治疗。

1.2.2 血清Ghrelin、GAS、CCK水平检测

采集患者术后第1d清晨空腹外周静脉血5mL送检,采用酶联免疫吸附法检测血清Ghrelin、GAS、CCK水平。

1.2.3 资料收集

收集患者临床资料,包括年龄、性别、高血压、糖尿病、体质指数(Body mass index, BMI)、文化程度、结石数目、结石大小、术前症状、手术方式、手术持续时间、术中出血量、术后开始下床活动时间。

1.3 统计学分析

应用SPSS 19.0统计软件处理数据,符合正态分布的计量资料以($\bar{x}\pm s$)表示,行 t 检验;计数资料以 $n(\%)$ 表示,采用 χ^2 检验;采用多因素Logistic回归分析患者术后胃肠功能恢复的影响因素;以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组血清Ghrelin、GAS、CCK水平比较

功能未恢复组血清Ghrelin、GAS水平均低于功能恢复组,CCK水平高于功能恢复组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表1。

表1 两组血清Ghrelin、GAS、CCK水平比较($\bar{x}\pm s$)
Table 1 Comparison of serum ghrelin, gas and CCK levels between 2 groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	Ghrelin(pg/mL)	GAS(ng/L)	CCK(ng/L)
功能恢复组	50	227.85 $\pm$ 51.96	164.92 $\pm$ 35.71	28.36 $\pm$ 6.59
功能未恢复组	16	142.69 $\pm$ 34.77	111.35 $\pm$ 29.28	41.52 $\pm$ 9.83
<i>t</i> 值		6.297	5.665	6.785
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001

2.2 两组临床资料比较

功能未恢复组性别、高血压、糖尿病、BMI、文化程度、结石数目、结石大小、术前症状与功能恢复组比较差异无统计学意义($P>0.05$),年龄、手术

方式、手术持续时间、术中出血量、术后开始下床活动时间与功能恢复组比较差异有统计学意义 ($P<0.05$)。见表2。

表2 两组临床资料比较 [$n(\%)$]Table 2 Comparison of clinical data between 2 groups [$n(\%)$]

因素	分类	功能恢复组 ($n=50$)	功能未恢复组 ($n=16$)	χ^2 值	P 值
年龄(岁)	<40	38(76.00)	9(56.25)	6.059	0.014
	≥ 40	12(24.00)	7(43.75)		
性别	男	28(56.00)	9(56.25)	0.047	0.829
	女	22(44.00)	7(43.75)		
高血压	有	11(22.00)	2(12.50)	0.099	0.753
	无	39(78.00)	14(87.50)		
糖尿病	有	7(14.00)	2(12.50)	0.390	0.532
	无	43(86.00)	14(87.50)		
BMI(kg/m^2)	<24	37(74.00)	8(50.00)	0.108	0.742
	≥ 24	13(26.00)	8(50.00)		
文化程度	初高中	12(24.00)	3(18.75)	0.077	0.962
	专科	15(30.00)	3(18.75)		
	本科及以上	23(46.00)	10(62.50)		
结石数目(个)	≤ 3	40(80.00)	9(56.25)	0.649	0.421
	>3	10(20.00)	7(43.75)		
结石大小(mm)	<15	32(64.00)	10(62.50)	0.255	0.614
	≥ 15	18(36.00)	6(37.50)		
术前症状	有	29(58.00)	8(50.00)	0.245	0.621
	无	21(42.00)	8(50.00)		
手术方式	腹腔镜	47(94.00)	6(37.50)	11.026	0.001
	开腹	3(6.00)	10(62.50)		
手术持续时间(h)	<1	35(70.00)	5(31.25)	4.931	0.026
	≥ 1	15(30.00)	11(68.75)		
术中出血量(mL)	<30	34(68.00)	5(31.25)	5.334	0.021
	≥ 30	16(32.00)	11(68.75)		
术后开始下床活动时间(d)	<1	37(74.00)	4(25.00)	7.296	0.007
	≥ 1	13(26.00)	12(75.00)		

2.3 影响患者术后胃肠功能恢复的多因素 Logistic 回归分析

多因素 Logistic 回归分析显示,年龄、手术方式、手术持续时间、术中出血量、术后开始下床活动时间、血清 Ghrelin、GAS 和 CCK 水平是影响患者术后胃肠功能恢复的因素($P<0.05$),见表3。

表3 影响患者术后胃肠功能恢复的多因素 Logistic 回归分析

Table 3 multivariate logistic regression analysis of postoperative gastrointestinal function recovery

影响因素	β 值	SE值	Wald χ^2 值	OR值	95%CI	P 值
年龄 ≥ 40 岁	0.992	0.417	5.659	2.697	1.191~6.106	0.018
手术方式为开腹	1.008	0.369	7.462	2.740	1.329~5.648	0.007
手术持续时间 ≥ 1 h	0.917	0.424	4.677	2.502	1.090~5.743	0.031
术中出血量 ≥ 30 mL	0.956	0.431	4.920	2.601	1.118~6.054	0.027
术后开始下床活动时间 ≥ 1 d	1.013	0.398	6.478	2.754	1.262~6.008	0.011
Ghrelin	-1.114	0.325	11.749	0.328	0.174~0.621	0.001
GAS	-0.981	0.313	9.823	0.375	0.203~0.692	0.002
CCK	1.068	0.296	13.018	2.910	1.629~5.197	<0.001

3 讨论

胃肠道运动受限是保胆取石术创伤所造成的最常见全身性反应,术中对胆囊管夹闭、相关组织的牵拉等导致患者胃肠道、肝脏和大网膜等交感和副交感神经平衡失衡,加之因手术麻醉作用,使得术后容易发生胃肠功能紊乱,表现为不同程度的腹部不适、腹胀等,不利于术后早期健康恢复^[7]。关注患者保胆取石术后胃肠功能恢复情况,以采取针对性干预措施,对改善预后非常重要。

Ghrelin 在人体组织中呈广泛分布,具有独特分子结构和生物学功能,在机体生理活动和代谢中起到了重要作用。研究指出,Ghrelin 能够通过迷走神经对胰多肽产生刺激,继而使胰多肽释放增多,兴奋胃窦平滑肌而促进胃排空加速^[8-9]。另一方面,血液与及中枢 Ghrelin 可以与其受体结合,刺激产生一氧化氮,起到胃黏膜保护作用^[10]。贺建祯等^[11]研究显示胃肠动力改善的胃肠积热大鼠血清 Ghrelin 水平明显升高。GAS 主要由胃窦部及十二指肠 G 细胞分泌,是重要的胃肠分泌激素,能够兴奋胃部运动,加速胃排空^[12]。GAS 经基因转录形成蛋白前体,再经相关修饰、加工可形成有效活性物质进入血液中。研究显示,血清 GAS 容易受到交感和副交感神经系统活动的影响^[13]。在保胆取石术中,胆结石患者交感和副交感神经平衡被打破,其 GAS 水平也会发生变化。CCK 是一种肽类激素,具有广泛生物学活性,其能够抑制食管下括约肌、幽门括约肌收缩以及近端十二指肠蠕动,对十二指肠远端及空肠蠕动具有促进作用^[14]。于惠玲等^[15]研究显示,对比健康老年人群,老年功能性消化不良及重叠腹泻型肠易激综合征患者 CCK 水平均较高。本次研究结果提示血清 Ghrelin、GAS 和 CCK 水平与胆结石患者保胆取石术后胃肠功能恢复有关。在临床资料比较中,功能未恢复组年龄、手术方式、手术持续

时间、术中出血量、术后开始下床活动时间与功能恢复组比较差异有统计学意义。多因素 Logistic 回归分析结果显示年龄、手术方式、手术持续时间、术中出血量、术后开始下床活动时间是影响术后胃肠功能恢复的因素。其他相关研究也显示,年龄、手术持续时间、术中出血量、术后开始下床活动时间为患者术后胃肠功能恢复的影响因素^[16]。而对于手术方法,考虑到是因为开腹手术术中对学生器官组织的牵引更多,创伤更大,出血量相对于腹腔镜手术也更多。本次结果还显示,血清 Ghrelin、GAS 和 CCK 水平是影响患者术后胃肠功能恢复的因素,提示监测患者血清 Ghrelin、GAS 和 CCK 水平可以评估其术后胃肠道功能恢复情况。

本研究的局限性在于样本量较小、来源集中,分组后可能有失平衡且缺乏代表性,且血清 Ghrelin、GAS 和 CCK 检测结果可能还受到其它因素的影响,故相关结论仍需扩大样本量后更严谨的研究进一步证实。

综上所述,血清 Ghrelin、GAS 和 CCK 水平与胆结石患者保胆取石术后胃肠功能恢复具有关联性,胃肠功能恢复不佳的患者血清 Ghrelin、GAS 水平较低,CCK 水平较高,术后第一天监测有利于评估其术后胃肠功能恢复情况。

参考文献

- [1] 皮儒先,伍强,袁涛,等.微创保胆取石治疗胆结石的近期疗效及对患者生活质量的影响[J].第三军医大学学报,2017,39(5):477-480.
- [2] 安东,徐磊.急性胰腺炎患者外周血 NGAL 和胃饥饿素水平变化及其意义[J].中国普通外科杂志,2016,25(9):1331-1335.
- [3] Conrad KP, Tuna KM, Mestre CT, et al. Activation of multiple receptors stimulates extracellular vesicle release from trophoblast cells[J]. *Physiol Rep*, 2020, 8(20):1-13.
- [4] 胡亦懿,杜国平,胡元元,等.胆囊切除术后胆汁动力学及胃肠激素的研究[J].中华消化内镜杂志,2018,35(5):350-353.
- [5] 徐降兴,肖义容,杨小红,等.MRCP 诊治胆囊结石合并正常范围直径胆总管结石中的应用价值及有效性分析[J].临床外科杂志,2019,27(3):250-252.
- [6] 林继宗,刘波.《2016年世界急诊外科学会急性结石性胆囊炎指南》摘译[J].临床肝胆病杂志,2016,32(10):1843-1846.
- [7] 时丽萍.腹腔镜胆囊切除术患者术后胃肠道功能恢复情况观察[J].中国中西医结合消化杂志,2016,24(1):56-58.
- [8] Lenz A, Lenz G, Ku HT, et al. Islets from human donors with higher but not lower hemoglobin A1c levels respond to gastrin treatment in vitro[J]. *PLoS One*, 2019, 14(8):e0221456.
- [9] 刘爽,徐雄业,徐积兄. Ghrelin 及其受体激动剂在糖尿病性胃轻瘫中的作用[J].国际内分泌代谢杂志,2020,40(4):253-257.
- [10] 高飞,刘铁钢,徐竞男,等.银柴汤对胃肠积热合并肺炎大鼠胃肠动力的作用及机制研究[J].湖南中医药大学学报,2019,39(3):20-24.
- [11] 贺建祯,谷晓红,刘铁钢,等.莱菔子对胃肠积热大鼠胃肠动力的影响[J].中国中医急症,2020,29(5):765-768.
- [12] 谭树慧,任卫琼,夏伯候,等.醋炙乌药-木香对肝郁气滞型功能性消化不良模型大鼠胃排空及胃肠激素的影响[J].中国药房,2019,30(5):684-688.
- [13] 尹宏,陈庆春,苏艳蓉,等.重症高血压脑出血并发应激性胃溃疡影响因素及 GAS, MTL, SS, CCK-8, VIP 水平变化意义[J].分子诊断与治疗杂志,2020,12(2):156-160.
- [14] 庞彩霞,冯健科.胆囊切除术后慢性胃炎伴胆汁反流患者血清胆囊收缩素,胃泌素,胃动素水平研究[J].解放军预防医学杂志,2019,37(10):34-35.
- [15] 于惠玲,鲁素彩,王阳阳,等.老年功能性消化不良重叠腹泻型肠易激综合征的胃肠激素水平变化[J].中国老年学杂志,2015,35(21):6175-6176.
- [16] 王晓月,周宁,刘威.胃癌患者术后胃肠功能恢复的影响因素分析[J].癌症进展,2020,18(1):96-98.
- [7] Arber DA, Borowitz MJ, Cessna M, et al. Initial Diagnostic Workup of Acute Leukemia: Guideline From the College of American Pathologists and the American Society of Hematology[J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2017, 141(10):1342-1393.
- [8] Nóbrega-Pereira S, Dias S. VEGF signaling in acute leukemia: mitochondrial connections[J]. *Oncoscience*, 2018, 5(3-4):54-56.
- [9] 陈玥,王建成,张林.肝细胞生长因子及血管内皮生长因子血清水平检测在急性白血病患者临床诊断中的应用价值[J].临床和实验医学杂志,2018,17(8):832-834.
- [10] Wang J, Wang W, Cai H, et al. MACC1 facilitates chemoresistance and cancer stem cell like properties of colon cancer cells through the PI3K/AKT signaling pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(6):8747-8754.
- [11] Cheng Z, Fu J, Liu G, et al. Angiogenesis in JAK2 V617F positive myeloproliferative neoplasms and ruxolitinib decrease VEGF, HIF-1 enesis in JAK2 V617F positive cells[J]. *Leuk Lymphoma*, 2018, 59(1):196-203.
- [12] Dunlop E, Cunningham J, Sherriff JL, et al. Vitamin D3 and 25-Hydroxyvitamin D3 Content of Retail White Fish and Eggs in Australia[J]. *Nutrients*, 2017, 9(7):647.
- [13] Song J H, Park E, Kim M S, et al. l-Asparaginase-mediated downregulation of c-Myc promotes 1, 25(OH)2 D3 -induced myeloid differentiation in acute myeloid leukemia cells [J]. *Int J Cancer*, 2017, 140(10):2364-2374.
- [14] 张鹏程,罗琴,杨芳.血清甲状腺激素和 25-(OH)D3 对急性白血病患儿化疗疗效的影响[J].中国处方药,2019,17(6):164-165.

(上接第 1825 页)

血浆抗糖抗体检测在IgA肾病中的作用及其与临床病理指标的相关性

杨钢¹ 刘静^{2*}

[摘要] **目的** 探讨血浆抗糖抗体指标与IgA肾病病理分级的相关性以及早期诊断IgA肾病中的应用价值。**方法** 纳入2018年3月至2020年4月本院收治的IgA肾病患者80例,为IgA组;另选取同期在本院健康体检的人群80例,为对照组。比较两组临床资料、肾功能指标以及血浆抗糖抗体指标。根据IgA患者临床病理Lee分级进行亚组分组(分为:I级、II级、III级、IV级),比较不同病理分级的IgA患者之间肾功能指标、血压、病理类型等资料的差异;采用pearman线性方程分析血浆抗糖抗体指标与IgA肾病病理分级、尿酸及牛津分型的相关性;绘制受试者工作特征曲线(ROC)分析血浆抗糖抗体指标在早期诊断IgA肾病中的应用价值。**结果** Pearson的相关分析显示血浆抗糖抗体指标IgG型抗糖抗体与IgA肾病病理分级、尿酸水平、IgA肾病牛津分型呈正相关($P>0.4$);IgA1型抗糖抗体与IgA肾病病理分级、尿酸水平、IgA肾病牛津分型无相关性($P<0.4$);血浆抗糖抗体指标预测IgA肾病的AUC为0.785,敏感度为90.00%,特异度为65.00%。**结论** IgG、IgA1型抗糖抗体在IgA肾病含量高于健康人群,推测抗糖抗体参与了IgA肾病的发生发展,且IgG型抗糖抗体明显优于IgA1型抗糖抗体,并可作为IgA肾病诊断指标。

[关键词] 血浆抗糖抗体; IgA肾病; 临床病理指标

Plasma anti-glycemic antibody detection in IgA nephropathy and its correlation with clinicopathological indicators

YANG Gang¹, LIU Jing^{2*}

(1. Department of Nephrology, Wuhan Red Cross Hospital, Wuhan, Hubei, China, 430000; 2. Department of Nephrology, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei, China, 430000)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the correlation between plasma anti-glycemic antibody and the pathological grade of IgA nephropathy and its application value in the early diagnosis of IgA nephropathy. **Methods** 80 patients with IgA nephropathy admitted to this hospital from March 2018 to April 2020 were enrolled to the IgA group. 80 patients who had a health checkup in our hospital during the same period were selected as the control group. The clinical data, renal function and plasma anti-glycemic antibody indicators were compared between the two groups. According to the clinical pathological Lee classification of IgA patients, the IgA group were divided into four subgroups: I, II, III, IV). The differences in renal function indicators, blood pressure, pathological types and other data among IgA patients of different pathological classifications are compared. Pearson linear equation was used to analyze the correlation between plasma anti-glycemic antibody and the pathological grade of IgA nephropathy. The receiver operating characteristic curve (ROC) was drawn to analyze the application value of plasma anti-glycemic antibody in the early diagnosis of IgA nephropathy. **Results** Pearson's correlation analysis showed that the plasma anti-glucose antibody IgG type anti-glucose antibody is positively correlated with the pathological grade of IgA nephropathy, uric acid

作者单位:1. 武汉市红十字会医院肾内科,湖北,武汉 430000

2. 华中科技大学同济医学院附属协和医院肾内科,湖北,武汉 430000

*通信作者:刘静, E-mail: bq63453@163.com

level, and Oxford classification of IgA nephropathy ($P>0.4$). IgA1 type anti-glycemic antibody has no correlation with pathological grade of IgA nephropathy, uric acid level, Oxford classification of IgA nephropathy ($P<0.4$). The plasma anti-glycemic antibody predicts the AUC of IgA nephropathy is 0.785, the sensitivity is 90.00%, and the specificity is 65.00%. **Conclusion** The levels of IgG and IgA1 anti-glycemic antibodies in IgA nephropathy are higher than those in healthy people. It is speculated that anti-glycemic antibodies are involved in the occurrence and development of IgA nephropathy, and IgG anti-glycemic antibodies are better than IgA1 anti-glycemic antibodies and can be used as a diagnostic indicator for IgA nephropathy.

[KEY WORDS] Plasma anti-glycemic antibody; IgA nephropathy; Clinicopathological indicator

IgA 肾病是最为常见的一种原发性肾小球疾病。IgA 肾病四重打击学说指出 IgA 肾病主要病理特征为铰链区 O 糖的半乳糖缺陷型 IgA1 在肾小球系膜中与特定受体相互作用,通过激活补体或成为自身免疫应答抗 IgA 的靶点而沉积在肾小球膜中,诱导活化肾小球系膜基质使基质合成增加,损伤细胞;同时半乳糖缺陷型 IgA 通过与 RR Fc α / γ 相互作用,激活循环淋巴细胞和单核细胞,增强其对肾小球膜细胞的趋化作用,引起炎症浸润,持续损伤间质,最终导致肾脏损伤和疾病进展^[1-2]。然而该学说仍缺乏广泛的证据支持,尤其是抗糖抗体在 IgA 肾病中的作用有待进一步探究。因此,本研究通过抗糖抗体测定探讨抗糖抗体检测在 IgA 肾病中的作用及其与临床病理指标的相关性。

1 资料与方法

1.1 一般资料

纳入 2018 年 3 月至 2020 年 4 月本院收治的 IgA 肾病患者 80 例,为 IgA 组,其中男 46 例,女 34 例,平均年龄(48.13 ± 7.14),BMI 平均指数(26.12 ± 3.10);另选取同期 80 例健康人群为对照组,其中男 42 例,女 38 例,平均年龄(46.18 ± 6.73),BMI 平均指数(25.84 ± 3.27)。两组性别、年龄、BMI 指数、SBP、DBP 比较差异无统计学意义($P>0.05$)。所有参与者均已知情并签署同意书。本实验经伦理委员会批准同意。

纳入标准:①所有患者均符合 2016 年版《原发性 IgA 肾病诊治循证指南》^[3]中 IgA 肾病的诊断标准;②年龄在 18~75 岁之间;③患者依从性好。排除标准:①近 1 月内服用肾毒性药物者;②合并心、脑等严重的器质性病变者;③其他病因所致的肾脏疾病者;④合并其他自身免疫性疾病或严重感染者;⑤临床资料不完整者。

1.2 方法

1.2.1 半乳糖缺陷 IgA1(Gd-IgA1)测定

采用山羊抗人 IgA 多克隆抗体 F(ab)'₂(2.5

mg/L)包被 96 孔酶标板,孵育过夜,小牛血清蛋白封闭未结合位点。稀释 IgAN 患者血浆,设复孔及空白对照孔。唾液酸酶 37℃ 酶切后,加 HPA 与 GalNAc 结合,37℃ 孵育。加 HRP 标记生物亲和素,37℃ 孵育。过氧化物酶底物显色,TMB A 液与 B 液以 1:1 混匀,室温下避光显色,1 mol/L H₂SO₄ 终止显色。酶标仪 450/570 nm 双波长读数。分别以 Gd-IgA1 标准品浓度及相应 A 值以 Logistic 四参数拟合各自标准曲线,最终求得各样品浓度。将 1 μ g IgA1 混合物的缺糖 IgA1 定义为 1 U,最终 Gd-IgA1 浓度单位以 U/mL 表示。

1.2.2 抗糖抗体测定

抗原制备:分离并纯化患者血浆 IgA1,通过细菌培养获得 IgA1 特异性蛋白酶 HF48;从铰链区 237 和 238 氨基酸之间切开 IgA1 分子,最大程度保留该区 Fab 段抗原的完整性,纯化保留 Fab-HR 抗原。用 HAA-Western 印迹法验证纯化的 Fab-HR 自身抗原存在半乳糖的缺失;IgG 型抗糖抗体测定:采用 ELISA 法测定,将 Fab-HR 包被酶标板,孵育过夜;加入 1:20 稀释后的标准品血浆,ALP 标记的山羊抗人 IgG 抗体检测 IgG 型抗糖抗体。酶标仪 450 nm 读数,ALP 底物显色液室温避光显色,计算 IgG 型抗糖抗体浓度。IgA1 型抗糖抗体测定:采用 ELISA 法测定,将 Fab-HR 包被酶标板,孵育过夜;加入 1:20 稀释后的标准品血浆;HRP 标记的小鼠抗人 IgA1 重链抗体检测 IgA1 型抗糖抗体;过氧化物酶底物室温下避光显色;酶标仪 450/570 nm 双波长读数,计算 IgA1 型抗糖抗体浓度。

1.3 IgA 肾病病理 Lee 分级及牛津分型^[4]

Lee 分级: I 级、II 级、III 级、IV 级、V 级。牛津分型:即 MEST 分型,系膜细胞增殖积分(M)、节段肾小球硬化或粘连(S)、毛细血管内增生性病变(E)、间质纤维化/肾小球萎缩(T)。

1.4 统计学方法

使用 SPSS 22.0 软件进行数据处理,计数资料

用 $n(\%)$ 表示,使用 χ^2 检验进行比较;计量资料用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,使用 t 检验进行比较。两变量间进行Pearson 相关分析;采用Logistics 回归方程分析血浆抗糖抗体与临床资料(尿酸、肌酐等)及牛津分析的相关性,绘制受试者工作特征曲线(ROC)分析血浆抗糖抗体指标在早期诊断IgA 肾病中的应用价值, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IgA 组与对照组患者临床资料比较

两组性别、年龄、BMI 指数、SBP、DBP 比较,差异无统计学意义($P>0.05$);肾功能指标以及血浆抗糖抗体指标 IgG、IgA1 型抗糖抗体比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

表 1 两组患者临床资料比较 [$n(\%)$, ($\bar{x} \pm s$)]

Table 1 Comparison of clinical data between the 2 groups

临床资料	IgA 组 ($n=80$)	对照组 ($n=80$)	χ^2/t 值	P 值
年龄(岁)	48.13 $\pm$ 7.14	46.18 $\pm$ 6.73	1.167	0.248
性别(男/女)	46/34	42/38	0.404	0.525
BMI(kg/m ²)	26.12 $\pm$ 3.10	25.84 $\pm$ 3.27	0.365	0.716
SBP(mmHg)	126.78 $\pm$ 15.98	124.79 $\pm$ 14.30	0.545	0.588
DBP(mmHg)	81.54 $\pm$ 11.84	83.18 $\pm$ 11.74	0.578	0.283
IgG 型抗糖抗体	0.71 $\pm$ 0.15	0.38 $\pm$ 0.10	10.721	<0.001
IgA1 型抗糖抗体	1.28 $\pm$ 0.14	1.12 $\pm$ 0.10	5.449	<0.001
血清胱抑素 C(mg/L)	1.65 $\pm$ 0.32	0.85 $\pm$ 0.21	12.240	<0.001
尿酸(μ mol/L)	386.89 $\pm$ 74.40	219.45 $\pm$ 56.87	10.481	<0.001
BUN(mmol/L)	8.98 $\pm$ 1.41	5.26 $\pm$ 1.05	12.402	<0.001
SCr(μ mol/L)	125.38 $\pm$ 13.73	62.85 $\pm$ 20.62	14.866	<0.001
24hUAER(g/24h)	2.27 $\pm$ 0.55	1.13 $\pm$ 0.22	11.244	<0.001
eGFR[mL/(min ⁻¹ · (1.73 m ²) ⁻¹]	72.54 $\pm$ 20.30	104.51 $\pm$ 10.27	8.218	<0.001

2.2 血浆抗糖抗体指标与 IgA 肾病病理分级的相关性

Pearson 的相关分析血浆抗糖抗体指标 IgG 型抗糖抗体与 IgA 肾病病理分级呈正相关($r=0.679$, $P=0.000$), IgA1 型抗糖抗体与 IgA 肾病病理分级无统计学意义($r=0.272$, $P=0.051$)。见图 1。

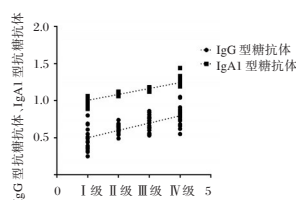


图 1 IgG、IgA1 型抗糖抗体与 IgA 肾病病理分级相关性

Figure 1 Correlation between IgG, IgA1 type anti-glycemic antibody and the pathological grade of IgA nephropathy

2.3 血浆抗糖抗体与尿酸的相关性

Pearson 的相关分析提示血浆抗糖抗体指标 IgG 型抗糖抗体与尿酸水平呈正相关($R=0.589$, $P=0.032$), IgA1 型抗糖抗体与尿酸水平无统计学意义($R=0.114$, $P=0.073$)。见图 2。

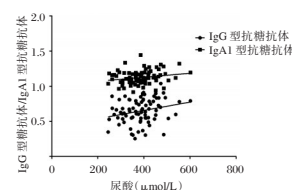


图 2 IgG、IgA1 型抗糖抗体与尿酸水平相关性

Figure 2 Correlation between IgG-type, IgA1 type anti-glycemic antibodies and uric acid levels

2.4 血浆抗糖抗体与牛津分级的相关性

根据 IgA 肾病牛津分型标准分为 M、E、S、T。Pearson 的相关分析提示血浆抗糖抗体指标 IgG 型抗糖抗体与 IgA 肾病牛津分型呈正相关($r=0.752$, $P=0.024$), IgA1 型抗糖抗体与 IgA 肾病牛津分型无显著相关性($r=0.032$, $P=0.384$)。见图 3。

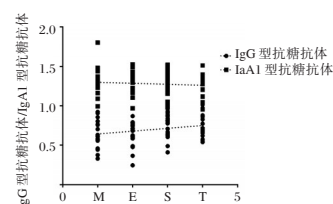


图 3 IgG、IgA1 型抗糖抗体与牛津分型相关性

Figure 3 Correlation between IgG, IgA1 type anti-glycemic antibodies and Oxford classification

2.5 血浆抗糖抗体指标在早期诊断 IgA 肾病中的 ROC 曲线

血浆 IgG 型抗糖抗体诊断 IgA 肾病的 AUC 为 0.785(95%CI:0.708~0.862, $P<0.05$), 临界值为 0.550, 敏感度为 90.00%, 特异度为 65.00%。见图 4。

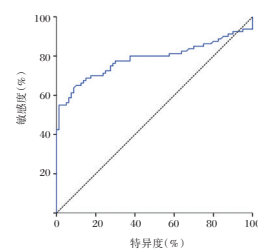


图 4 血浆抗糖抗体指标在早期诊断 IgA 肾病中的 ROC 曲线

Figure 4 ROC curve of plasma anti-glycemic antibody indicators in the early diagnosis of IgA nephropathy

3 讨论

IgA 肾病是一种以 IgA 沉积为主的常见肾小球肾炎。IgA 肾病患者 IgA1 链区氮乙酰半乳糖氨 O-糖基化程度降低,引起乙酰半乳糖氨暴露形成异常糖基化 IgA1 (Gd-IgA1),低糖基化的 IgA 可作为自身抗原诱导机体产生特异性的 IgA1-IgA1 和 IgA1-IgG 免疫复合物,抗原、抗体或免疫复合物的形成和自聚集沉积于肾脏损伤肾功能^[5-6]。有研究表明^[7],二聚体和 IgA1 聚合物比单体更易聚集,这可能解释了大分子 IgA 在组织中聚集和沉积的倾向。多数学者认为,对特定抗原改变的 IgA 免疫反应是导致 IgA 肾病中形成肾素性 IgA 抗体复合物的原因^[8]。虽然 IgG 型抗糖抗体可能参与了大分子 IgA 的形成,但没有直接证据支持这一假设。

现有资料尚不能最终确定 IgA 肾病 IgA 沉积物的来源,但多数认为半乳糖缺陷型 IgA 通过与 RR Fcα/γ 相互作用,引起 IgA 同型转换的 TGFβ、促进产生 IgA 的激活循环淋巴细胞和单核细胞分化^[9];另, IgA 肾病系膜细胞增殖和基质扩张,这一过程依赖于 IgA 诱导的系膜细胞激活的触发。研究表明^[10],IgA 复合物能够激活细胞内钙离子、PLC-γ1 肌醇三磷酸,使蛋白质酪氨酸磷酸化,激活人系膜细胞,使系膜细胞释纤维原性转化生长因子-β、白介素-6 等,介导 IgA 产生。在 Suzuki^[11]的研究中发现 IgA 肾病单克隆 IgG 抗体重链可变区的互补决定区 3 区氨基酸由丙氨酸转变为苏氨酸,其与 Gd-IgA1 结合力下降,提示该区氨基酸的改变可导致 IgG 型抗糖抗体与乙酰半乳糖氨的特异性亲和力提高,增加 IgA 肾病抗体沉积。

Perše 等^[12]人在 IgA 肾病的肾小球及受损的组织中检测到骨髓 Gd-IgA1 受体 FcαRI 的信使 RNA。Suzuki H^[13]的研究中指出,在 IgA 肾病的白细胞中发现大量的 Gd-IgA1 与跨膜 FcαRI 结合产生炎症反应,其结合水平与肾小球硬化呈相关性,而在 IgA 肾病患者表现出局灶节段性肾小球硬化相似的病理损害,推测 IgG 型血浆抗糖抗体可能引发局灶性肾小球硬化。同时骨髓 IgG 受体 FcαRI 可通过启动细胞因子、抗炎因子等机制介导炎症反应,损伤肾功能^[14]。另,在血尿酸异常的 IgA 肾病患者肾小管萎缩和间质纤维化更为严重,

同时还可以通过激活 RAS 系统引发肾小球损害,证实 IgG 型抗糖抗体可能会引发或加重肾脏损害;促进疾病的发展^[15]。在补体系统方面 IgA 可通过选择性途径和凝集素途径激活该系统,在 IgA 肾病患者肾系膜区 MBL 和 MBL 相关丝氨酸蛋白酶与 IgA 的沉积支持凝集素通路参与了 IgA 肾病的进展。有学者^[16-17]也证实了在 IgA 肾病中局部存在肾小球补体活化的作用。提示 IgA 肾病中 IgG 可能利用补体的局部激活和系膜细胞的激活促进了肾损害的发生,促进疾病的发展。

综上所述,IgG、IgA1 型抗糖抗体在 IgA 肾病含量高于健康人群,推测抗糖抗体参与了 IgA 肾病的发生发展,且 IgG 型抗糖抗体明显优于 IgA1 型抗糖抗体,并可作为 IgA 肾病诊断指标。同时本研究的不足之处在于血浆抗糖抗体水平仅代表单个时间点的水平,未对机体抗糖抗体水平进行连续测量,另外由于样本量较少且来源较单一,会影响研究结果,因此后期我们将进行大样本、多中心、连续时间点的研究。

参考文献

- [1] 刘莹,刘彩琼. C1GALT1 在 IgA 肾病发病中的作用机制[J]. 国际儿科学杂志, 2020, 47(9): 636-639.
- [2] Kosztu P, Hill M, Jemelkova J, et al. Supplementary Material for: Glucocorticoids Reduce Aberrant O-Glycosylation of IgA1 in IgA Nephropathy Patients [J]. Kidney Blood Press Res, 2018, 43(2): 350-359.
- [3] 中华医学会儿科学分会肾脏学组. 原发性 IgA 肾病诊治循证指南(2016)[J]. 中华儿科杂志, 2017, 55(9): 643-646.
- [4] Yeo SC, Cheung CK, Barratt J. New insights into the pathogenesis of IgA nephropathy [J]. Pediatr Nephrol, 2018, 33(5): 763-777.
- [5] 李湛,解新芳,张雪,等. IgA 肾病患者血浆抗糖抗体的测定及其与临床病理指标的相关性[J]. 中华肾脏病杂志, 2019, 35(2): 81-87.
- [6] Bollin R, Haller H. Pathophysiologie und Therapie der IgA-Nephropathie [J]. Internist (Berl), 2018, 59(7): 736-740.
- [7] 方心紫,金善善,王小琴. IgA 肾病分子机制研究进展[J]. 临床肾脏病杂志, 2018, 18(12): 784-787.
- [8] Novak J, Barratt J, Julian BA, et al. Aberrant Glycosylation of the IgA1 Molecule in IgA Nephropathy [J]. Semin Nephrol, 2018, 38(5): 461-476.
- [9] Chen P, Yu G, Zhang X, et al. Plasma Galactose-Deficient IgA1 and C3 and CKD Progression in IgA Nephropathy [J]. Clin J Am Soc Nephrol, 2019, 14(10): 1458-1465.
- [10] 谢院生,陈香美. IgA 肾病的诊治研究进展[J]. 中华肾病研究电子杂志, 2019, 8(1): 5-9.

(下转第 1837 页)

鼻腔鼻窦内翻性乳头状瘤组织中 HPV/补体 C3C4 表达及意义

马汝显 周玲*

【摘要】目的 探究鼻腔鼻窦内翻性乳头状瘤组织中 HPV/补体 C3C4 表达及意义。**方法** 选取 2017 年 3 月至 2020 年 9 月安徽省宿州市第一人民医院收治的无鼻腔鼻窦内翻性乳头状瘤患者 32 例为对照组;选取同时收治的鼻腔鼻窦内翻性乳头状瘤患者 73 例为观察组。分析两组补体 C3、C4 水平的表达、HPV 水平的阳性表达、采用 ROC 曲线分析 C3、C4 对该病预测价值。**结果** 观察组鼻腔鼻窦内翻性乳头状瘤患者的补体 C3、C4 水平较对照组明显更高,差异有统计学意义 ($P<0.05$)。观察组、对照组的 HPV 阳性表达率分别为 91.78%、21.88%,差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。ROC 分析结果显示,补体 C3、C4 及两项联合指标的 ROC 曲线下面积 AUC 分别为 0.701、0.739、0.919 ($P<0.05$)。由此可得,两项联合指标价值明显更高,其敏感度分别为 91.8%、75.3%、87.7%,特异度分别为 50.0%、75.0%、87.5%,cut-off 值分别为 0.760、0.235、0.708 ($P<0.05$)。**结论** HPV 可能与鼻腔鼻窦内翻性乳头状瘤的发生、发展相关,补体 C3、C4 以及两者联合均可作为预测鼻腔鼻窦内翻性乳头状瘤的指标。

【关键词】 HPV; 补体 C3、C4; 鼻腔鼻窦内翻性乳头状瘤组织

Expression and significance of HPV/complement C3, C4 in inverted papilloma of nasal cavity and paranasal sinuses

MA Ruxian, ZHOU Ling*

(Department of Otolaryngology, Suzhou First People's Hospital, Suzhou, Anhui, China, 234000)

【ABSTRACT】Objective To explore the expression and significance of HPV/complement C3, C4 in inverted papilloma of the nasal cavity and paranasal sinuses. **Methods** Thirty-two patients with inverted papilloma of the nasal cavity and paranasal sinuses who were admitted to the First People's Hospital of Suzhou City, Anhui Province from March 2017 to September 2020 were selected as the control group. 73 patients without inverted papilloma of the nasal cavity and paranasal sinuses who were admitted at the same time were selected as the observed group. The expression of complement C3 and C4 levels and the positive expression of HPV levels in the two groups were analyzed. The ROC curve was used to analyze the predictive value of C3 and C4 to the disease. **Results** The levels of complement C3 and C4 in the observation group with inverted papilloma of the nasal cavity and paranasal sinuses were significantly higher than those in the control group without inverted papilloma of the nasal cavity and paranasal sinuses, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). The positive expression rates of HPV in the observation group and control group were 91.78% and 21.88%, respectively, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). ROC analysis results showed that the area under the ROC curve AUC of complement C3, C4 and the two combined indicators were 0.701, 0.739, 0.919 ($P<0.05$), respectively. The value of the two combined indicators is significantly higher, the sensitivity is 91.8%, 75.3%, 87.7%, the specificity is 50.0%, 75.0%, 87.5%, and the cut-off value is 0.760, 0.235, 0.708 ($P<0.05$). **Conclusion** HPV may be related to the occurrence and development of nasal

基金项目:安徽省医学会急诊临床研究项目(ky2018023)

作者单位:安徽省宿州市第一人民医院耳鼻喉科,安徽,宿州 234000

*通信作者:周玲, E-mail:36623812@qq.com

cavity and sinus inverted papilloma. Complement C3, C4 and the combination of the two can be used as indicators to predict nasal cavity and sinus inverted papilloma.

[KEY WORDS] Nasal cavity and paranasal sinuses inverted papilloma; HPV; Complement C3, C4

鼻腔鼻窦内翻性乳头状瘤(nasalcavity orparanasal sinus inverted papilloma, NIP)是一种具有潜在的复发和癌变倾向特征的良性肿瘤,其恶化大部分是由于人乳头状瘤病毒(human papillomavirus, HPV) HPV? 感染所导致,以涕中带血丝、脓性涕、反复头痛为症状表现^[1]。近些年来,随着人们工作以及生活压力的增大,该病的患病频率逐渐升高,对患者的生活质量和生命健康影响巨大^[2]。目前临床治疗该病的方法为鼻腔乳头状瘤摘除术,其治疗效果随着医疗水平的上升而提高,但有关文献报道^[3],该病具有高复发率特点。HPV是一种感染皮肤、黏膜的嗜上皮性 DNA 病毒,能够引起机体免疫反应。而补体 C3、C4 是补体系统中最常见的组分,在机体免疫反应中异常激活,从而导致其外周血中的表达升高。已有研究将补体 C3C4 运用于红斑狼疮的诊断。但目前关于其在鼻腔鼻窦内翻性乳头状瘤中的诊断应用鲜有研究。基于此,本研究探讨鼻腔鼻窦内翻性乳头状瘤组织中 HPV/补体 C3C4 表达及意义。

1 一般资料与方法

1.1 一般资料

选取2017年3月至2020年9月本院收治的鼻腔鼻窦内翻性乳头状瘤患者为观察组(73例),选取同期收治的无鼻腔鼻窦内翻性乳头状瘤患者为对照组(32例)。两组患者一般资料差异无统计学意义($P>0.05$)。本研究经医院医学伦理委员会批准。见表1。

表1 一般资料比较($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Complement of Table 1 General information ($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	年龄(岁)	性别
			男/女
观察组	73	57.14±7.23	38/35
对照组	32	57.18±7.25	17/15
t/χ^2 值		0.026	0.010
<i>P</i> 值		0.979	0.919

1.2 诊断标准

参照《乳头状瘤。实用耳鼻咽喉头颈外科学》^[4]拟定:①单侧病变,持续性鼻塞;②嗅觉退化;③面部僵硬;④涕血、头部疼痛、鼻息肉、脓性涕;⑤经影像学确诊。

纳入标准:符合鼻腔鼻窦内翻性乳头状瘤的诊断标准;年龄20~64岁;意识清醒并签署同意书;排除标准:严重的基础性疾病;患有精神疾病;同时患有其他鼻病;妊娠期妇女;月经期女性;依从性较差患者。

1.3 方法

①患者在检查前不可食用高嘌呤、高蛋白食品,且抽取静脉血必须要在空腹10小时后的次日清晨。②补体 C3、C4 水平检测:使用散射比浊法检测。采集患者3 mL的静脉血液放入采血管,离心吸取外周血血清,放入冰箱保存待检验。血清补体 C3、C4,应用全自动生化分析仪(山东科博有限公司,型号:BK-600)及原装配套试剂检测。正常范围值:补体 C3 为(0.85~2.00)g/L;C4 为(0.12~0.40)g/L。③HPV 检测:取鼻腔鼻窦组织和局部粘液制作样本进行检测,标本常规经4%甲醛(规格:溶液剂20 mL 西安天正药用辅料有限公司 国字准号 H53031618)固定石蜡(规格:500 mL 西安天正药用辅料有限公司 国字准号 H49815831)包埋4 μm厚连续切片。采用免疫组织化学 Envision 二步法染色。用山羊 IgG(Normal Goat IgG)代替一抗作阴性对照,用抗体稀释液作1:100稀释。用DAB(北京纪宁生物工程有限公司)显色后进行染色、封片。两组切片在四百倍光学显微镜下观察,阳性细胞为浅黄颗粒;阳性细胞数小于四分之一(-);阳性细胞数大于四分之一(+). 感染率=有/无鼻腔鼻窦内翻性乳头状瘤患者标本阳性数/总调查例数×100%。

1.4 统计学方法

使用软件统计 SPSS 22.0 处理数据。符合正态分布以及方差齐性的计量资料用($\bar{x}\pm s$)表示,行独立样本 *t* 检验;计数资料计数资料用 *n*(%)表示,行 χ^2 检验。采用 ROC 曲线分析 C3、C4 对其预测价值; $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组补体 C3、C4 水平比较

观察组鼻腔鼻窦内翻性乳头状瘤患者的补体 C3、C4 水平较对照组明显无鼻腔鼻窦内翻性乳头状瘤患者明显更高,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表2。

表2 两组补体C3、C4水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 The expression of two groups of complement C3 and C4 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	C3(g/L)	C4(g/L)
观察组	73	1.03±0.24	0.28±0.05
对照组	32	0.85±0.22	0.17±0.06
t值	-	3.626	9.751
P值	-	<0.001	<0.001

2.2 两组 HPV 阳性率表达

观察组 HPV 呈阳性表达患者较对照组明显更多,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表3。

表3 两组 HPV 阳性表达 [$n(\%)$]

Table 3 Positive expression of HPV levels in the two groups [$n(\%)$]

组别	n	HPV 表达		感染率
		阴性(-)	阳性(+)	
观察组	73	6(8.22)	67(91.78)	67(91.78)
对照组	32	25(78.12)	7(21.88)	7(21.88)
χ^2 值	-	-	-	52.215
P值	-	-	-	<0.001

2.3 补体C3、C4诊断价值分析

ROC 分析结果显示,补体 C3、C4 及两项联合指标的 ROC 曲线下面积 AUC 分别为 0.701、0.739、0.919($P<0.05$)。由此可得,两项联合指标价值明显更高,其敏感度分别为 91.8%、75.3%、87.7%,特异度分别为 50.0%、75.0%、87.5%,cut-off 值分别为 0.760、0.235、0.708($P<0.05$)。见表4、表5、图1。

表4 补体C3、C4诊断价值分析ROC曲线下面积AUC分析

Table 4 Complement C3, C4 diagnostic value analysis ROC area under the curve AUC analysis

检验结果变量	AUC	标准错误	95%CI		P值
			下限值	上限	
C3(g/L)	0.701	0.055	0.601	0.808	<0.001
C4(g/L)	0.739	0.058	0.632	0.852	<0.001
联合预测	0.919	0.031	0.679	0.980	P值

表5 补体C3、C4诊断效能分析

Table 5 Efficacy analysis of C3 and C4 in diagnosing stroke outcome

检验结果变量	cut-off 值	约登指数	敏感度	特异度
C3(g/L)	0.760	0.418	0.918	0.500
C4(g/L)	0.235	0.003	0.753	0.750
联合预测	0.708	0.002	0.877	0.875

3 讨论

鼻腔鼻窦内翻性乳头状瘤是一种 DNA 病毒,该病的发病机制尚未明确,但有研究表示可能与

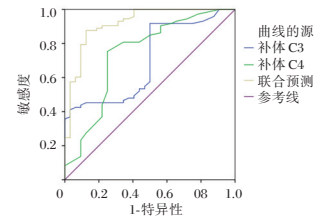


图1 补体C3、C4及联合指标的ROC曲线

Figure 1 ROC curve of C3, C4 and combined indicators

HPV、炎症因子有关^[5];如不及时治疗可能会发生恶化对人的危害严重影响鼻腔鼻窦内翻性乳头状瘤患者的生命安全^[6],也给家庭造成了巨大经济负担。目前,临床治疗该病的方法是鼻腔乳头状瘤摘除术,但其特点为高复发率,在手术的过程中尽量做到一次切除干净,如术中未做到,必然会增加该病的复发率^[7]。因此,鼻腔鼻窦内翻性乳头状瘤的早期诊断是提高预后的关键^[8]。

补体是存于人体血清和组织液内免疫的一道重要的防线^[9]。当补体系统被激活后各组分以酶原形式存在于血清中^[10],其具有杀菌、溶菌的免疫活性^[11]。而补体 C3、C4 是最为常见的补体组分^[12]。在发生炎症时,肝脏内会产生较多的补体 C3、C4;但巨噬细胞在肝外也能产生,且补体 C3、C4 大于肝内产生^[13]。在本研究中,鼻腔鼻窦内翻性乳头状瘤患者的补体 C3、C4 水平高于无鼻腔鼻窦内翻性乳头状瘤患者,其原因可能与补体 C3、C4 大量激活有关^[14],当炎症反应发生时,肝脏与巨噬细胞同时产生补体 C3、C4 抵抗细菌侵入,而当微生物以及细菌过多且无外界干预时,体内的补体 C3、C4 激活过度将会产生降低鼻腔鼻窦内翻性乳头状瘤患者抵抗细菌能力、加重炎症、损伤组织等一系列危害^[15]。在本研究中,使用散射比浊法检验补体水平,结果显示观察组鼻腔鼻窦内翻性乳头状瘤患者补体 C3、C4 水平较对与照组无鼻腔鼻窦内翻性乳头状瘤患者明显更高。补体 C3、C4 以及二者联合预测 ROC 曲线下面积 AUC 分别为 0.701、0.739、0.919;补体 C3、C4 的二者联合预测的敏感度分别为 91.8%、75.3%、87.7%;特异度分别为:50.0%、75.0%、87.5%;临界值分别为 0.760、0.235、0.708,均具有良好的敏感度、特异性。提示补体 C3、C4 以及二者联合均可预测检测鼻腔鼻窦内翻性乳头状瘤,且其预测效能由高到低依次为联合检测、补体 C4、补体 C3,这与有关研究报道内容一致。

HPV是一种无囊膜的病毒,可通过母婴感染,性交,公共泳池、浴室、马桶等接触感染身体表层皮肤、粘膜,其主要分布在口咽、肛周、生殖道^[16]。有研究报道,百分之八十的女性都曾感染过HPV^[17],该病毒不仅潜伏期较长,而且感染率极高,当人体免疫力正常时其症状不显,因自身免疫可把大多数病毒清除;但在免疫力下降时,开始显现^[18],该病会引起呼吸道、子宫癌、宫颈癌等疾病。目前,治疗该病的方式主要以切除术为主预防为辅,其具有易复发的特点^[19]。但因早期HPV症状不显,所以检测尤为重要。在本研究结果提示该HPV阳性表达结果表明HPV可能与鼻腔鼻窦内翻性乳头状瘤的发生有关。

综上所述,HPV可能参与了鼻腔鼻窦内翻性乳头状瘤的发生;补体C4、补体C3及二者联合均可作为鼻腔鼻窦内翻性乳头状瘤的诊断指标,值得临床应用。但本研究属于单中心小样本研究,还需大样本多中心研究、考证。同时随访观察时间有限,故还有待进一步开展远期观察的研究检验。

参考文献

- [1] 常笑,连荣,曹宸,等.经鼻内镜对鼻腔鼻窦内翻性乳头状瘤深层次处理的疗效分析[J].实用临床医药杂志,2021,25(8):30-33,38.
- [2] 石书婧,侯君,梁华,等.ZEB2在鼻腔鼻窦内翻性乳头状瘤中的表达及意义[J].中国中西医结合耳鼻咽喉科杂志,2021,29(1):1-4.
- [3] 于文玲,刘兆会,李书玲,等.鼻腔鼻窦内翻性乳头状瘤内骨化的CT特征及其与术中肿瘤根蒂位置的对照研究[J].中华放射学杂志,2021,55(6):633-637.
- [4] 黄逸兆,汪吉宝.乳头状瘤.实用耳鼻咽喉头颈外科学.北京:人民卫生出版社,2007:236-237.
- [5] 吴亮,刘明.血清免疫球蛋白及补体C3、C4水平与高血压性脑出血患者预后的关系[J].临床荟萃,2021,36(2):107-111.
- [6] 陈倩.中青年早期宫颈癌患者高危人乳头瘤病毒(HPV)检查的知信行水平及影响因素[J].护理实践与研究,2020,17(24):30-33.
- [7] 肖丽红,梁晓,周玉,等.老年2型糖尿病患者尿白蛋白/肌酐比值与血清补体C3、C4水平的关系[J].中国老年学杂志,2019,39(9):2099-2101.
- [8] 华夏,刘稳.鼻内镜手术对鼻腔鼻窦内翻性乳头状瘤的临床疗效及预后影响分析[J].徐州医科大学学报,2020,40(8):596-599.
- [9] 陈宓.宫颈癌组织中HPV16、18E6与p53的表达水平及临床意义[J].实用癌症杂志,2019,34(8):1267-1270.
- [10] 邵明希,李樱珠,滕济森,等.血清补体C3、C4水平与视神经炎的相关性分析[J].国际眼科杂志,2019,19(6):1075-1078.
- [11] 武丽蕊,王兰朋,李红霞,等.免疫细胞及肿瘤标志物与高危型HPV感染宫颈癌患者HPV水平的相关性及与预后的关系[J].癌症进展,2019,17(11):1342-1346.
- [12] 张彦平,贺军涛,张艳,等.血清补体C3、C4、C1q水平与SLE病情活动程度的关系探讨[J].西部医学,2019,31(11):1777-1780.
- [13] 石书婧,徐莉,翟建华,等.鼻腔鼻窦内翻性乳头状瘤组织中E盒结合锌指蛋白2的表达及其与临床病理特征的关系[J].广西医学,2020,42(22):2984-2986.
- [14] 王军,欧理,周清梓,等.直肠癌患者术后血清补体C3、C4水平变化及其与术后疼痛的相关性研究[J].陕西医学杂志,2019,48(8):984-986,996.
- [15] 李波,吴翠霞,胡传翠.对阴道局部固有免疫细胞因子表达水平的及其同宫颈高危型HPV感染的相关性分析[J].湖南师范大学学报(医学版),2020,17(3):127-132.
- [16] 蒋贵林,安晓青,余文婷,等.化湿解毒止带方治疗慢性宫颈炎伴HPV感染的临床疗效及对血清hs-CRP、TNF- α 水平的影响[J].中华中医药学刊,2020,38(11):14-17.
- [17] 狄海红,冯未,王凤姣.HR-HPV阳性宫颈癌患者宫颈组织匀浆上清液IL-17、IL-6水平及意义[J].实用癌症杂志,2021,36(1):36-38+42.
- [18] 吴秋珍,毛瑛玉,林茂华,等.Aptima HPV E6/E7 mRNA 16, 18/45基因型检测技术在宫颈癌前病变和宫颈癌筛查中的应用价值[J].诊断病理学杂志,2021,28(3):202-206.
- [19] 孙炎,黄谦,崔顺九,等.鼻嗜酸细胞性乳头状瘤的HPV检测和临床病理分析[J].国际病毒学杂志,2021,28(3):236-239.

(上接第1833页)

- [11] Suzuki H, Fan R, Zhang Z, et al. Aberrantly glycosylated IgA1 in IgA nephropathy patients is recognized by IgG antibodies with restricted heterogeneity[J]. J Clin Invest, 2009, 119(6):1668-1677.
- [12] Perše M, Večerić-Haler Ž. The Role of IgA in the Pathogenesis of IgA Nephropathy[J]. Int J Mol Sci, 2019,20(24):6199.
- [13] Suzuki H, Yasutake J, Makita Y, et al. IgA nephropathy and IgA vasculitis with nephritis have a shared feature involving galactose-deficient IgA1-oriented pathogenesis[J]. Kidney Int, 2018,93(3):700-705.
- [14] 罗慧婷,梁少嫻,梁丹丹,等.肾小球毛细血管内增生伴巨噬细胞浸润的IgA肾病[J].肾脏病与透析肾移植杂志,2019,28(1):1-6.
- [15] 陈慧萍.IgA肾病补体异常的研究进展[J].海南医学,2020,31(6):780-783.
- [16] Suzuki H. Biomarkers for IgA nephropathy on the basis of multi-hit pathogenesis[J]. Clin Exp Nephrol, 2019,23(1):26-31.
- [17] 兰天,刘巍梦,邹阳,等.MicroRNA-21表达与糖尿病肾病相关性研究[J].华南预防医学,2019,45(4):82-84.

孕妇血清 PP13、甲状腺指标及 β -hCG 水平与重度 PE 发生的关系

任国丽* 邓春霞 张凡 高立亚 孙鸿博 赵桂君

[摘要] **目的** 研究孕妇血清胎盘蛋白 13 (PP13)、血清游离三碘甲腺原氨酸 (FT3)、血清游离四碘甲腺原氨酸 (FT4)、促甲状腺素 (TSH) 等甲状腺相关指标及 β -人绒毛膜促性腺激素 (β -hCG) 与重度子痫前期 (PE) 的关系。**方法** 选取北京市垂杨柳医院 2019 年 1 月至 2020 年 1 月收治的 50 例 PE 孕妇作为研究组, 选取同时期 50 例正常孕妇作为对照组。比较两组研究对象血清 PP13、FT3、FT4、TSH 及 β -hCG 指标表达水平差异及血压与上述指标的相关性分析, 分析上述指标对重度子痫前期疾病的预测效能。**结果** 研究组孕妇 PP13、TSH 及 β -hCG 均高于对照组, FT3、FT4 等均低于对照组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。重度 PE 孕妇 PP13、TSH 及 β -hCG 均高于轻度 PE 患者, FT3、FT4 等低于轻度 PE 患者, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。PE 孕妇血清 PP13、TSH、 β -hCG 与收缩压、舒张压呈正相关 ($P < 0.05$)。ROC 曲线显示血清 PP13、TSH、 β -hCG 曲线下面积 (AUC) 分别为 0.879、0.869、0.857, 敏感性分别为 62.50%、100.00%、81.25%, 特异性为 100.00%、62.90%、78.57%。**结论** 重度 PE 孕妇血清 PP13、TSH 及 β -hCG 表达水平随疾病加重而升高, 其中 PP13 对重度 PE 发病预测效能最高。

[关键词] 孕妇血清胎盘蛋白 13; 甲状腺相关指标; β -人绒毛膜促性腺激素; 重度子痫前期

Relationship between serum PP13, thyroid indicators and β -hCG levels and the occurrence of severe PE in pregnant women

REN Guoli*, DENG Chunxia, ZHANG Fan, GAO Liya, SUN Hongbo, ZHAO Guijun

(Department of Obstetrics and Gynecology, Beijing Chuiyangliu Hospital, Beijing, China, 100022)

[ABSTRACT] **Objective** To study the relationship between levels of serum placental protein 13 (PP13), thyroid-related indicators of serum free triiodothyronine (FT3), serum free thyroxine (FT4) and thyroid stimulating hormone (TSH) and β -human chorionic gonadotropin (β -hCG) and severe preeclampsia (PE) in pregnant women. **Methods** 50 pregnant women with PE admitted to Beijing Chuiyangliu Hospital from January 2019 to January 2020 were selected as the study group, and 50 normal pregnant women during the same period were selected as the control group. The differences in the expression levels of serum PP13, FT3, FT4, TSH and β -hCG and the correlation between blood pressure and the above indicators were compared between the two groups of subjects, and the predictive efficacy of the above indicators on severe preeclampsia was analyzed. **Results** The levels of PP13, TSH and β -hCG of pregnant women in the study group were higher than those in the control group. The levels of FT3 and FT4 were lower than those in the control group ($P < 0.05$). PP13, TSH and β -hCG in pregnant women with severe PE were higher than those in patients with mild PE, and FT3 and FT4 were lower than those with mild PE ($P < 0.05$). The levels of serum PP13, TSH and β -hCG of pregnant women with PE were positively correlated with systolic blood pressure and diastolic blood pressure ($P < 0.05$). The ROC curve analysis showed that the areas under the curves (AUC) of serum PP13,

基金项目: 北京市科技计划课题 (D171100002817036)

作者单位: 北京市垂杨柳医院妇产科, 北京 100022

*通信作者: 任国丽, E-mail: chikan935395@163.com

TSH and β -HCG were 0.879, 0.869 and 0.857 respectively, and the sensitivities were 62.50%, 100.00% and 81.25%, and the specificities were 100.00%, 62.90% and 78.57%. **Conclusion** The expression levels of serum PP13, TSH and β -hCG in pregnant women with severe PE increased with the aggravation of the disease. PP13 has the highest predictive effect on the onset of severe PE.

[KEY WORDS] Maternal serum placental protein 13; Thyroid-related indicators; β -human chorionic gonadotropin; Severe preeclampsia

子痫是妊娠约20周后出现的妊娠高血压综合征,孕妇常出现抽搐与昏迷,可并出现肾功能衰竭、心力衰竭、肺水肿、颅内出血及胎盘早期剥离等情况,严重威胁胎儿及孕妇生理健康^[1-2]。孕妇血清胎盘蛋白13(Serum placental protein 13, PP13)是由蜕膜化的子宫内膜腺上皮合成分泌的一类妊娠糖蛋白,在胎盘正常生长及母体妊娠过程中起着重要作用^[3-4]。研究发现部分重度子痫前期(Preeclampsia, PE)孕妇存在甲状腺功能异常能情况,血清游离三碘甲腺原氨酸(Free Triiodothyronine, FT3)、血清游离四碘甲腺原氨酸(free tetraiodothyronine, FT4)、促甲状腺素(Thyrotrophin, TSH)等甲状腺相关指标可有效反映机体甲状腺功能变化情况^[5]。 β -人绒毛膜促性腺激素(Beta human chorionic gonadotropin, β -hCG)是正常情况下精子与卵子结合后机体分泌的一种糖蛋白,在受精卵着床于子宫后随着胎儿进一步的生长分泌随之升高^[6]。本研究对PE患者血清PP13、甲状腺相关指标及 β -hCG进行研究,分析其与重度PE发生的关系,报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取本院2019年1月至2020年1月收治的50例PE孕妇作为研究组,平均年龄(28.87 ± 3.59)岁,平均孕周(33.59 ± 2.98)周。纳入标准:①符合PE相关诊断标准^[7];②均无糖尿病、心脏病及近期感染等病史;③研究对象及家属对本研究均知情并签署知情同意书。排除标准:①存在严重神经功能障碍;②合并肝肾功能障碍。根据子痫前期相

关诊断标准对研究组进行疾病分级^[8]:轻度PE 35例,重度PE 15例。选取同时期50例正常孕妇作为对照组,平均年龄(27.8 ± 3.66)岁,平均孕周(34.08 ± 3.01)周。两组研究对象一般资料比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。本研究经医院伦理委员会审核通过。

1.2 研究方法

两组研究对象均于孕检后留取空腹静脉血5 mL,待室温将血液标本自然凝固10~20 min后使用美国美克曼医用离心机转速2 000~3 000 r/min离心20 min后收集上层血清并冷冻保存,使用酶联免疫吸附法(ELISA)对血清样本进行PP13、TSH、FT3、FT4等甲状腺相关指标及 β -hCG检测。PP13 ELISA检测试剂盒、人FT3、FT4检测试剂盒购自上海沪震生物科技有限公司, β -hCG、TSH检测试剂盒购自武汉明德生物科技有限公司。

1.3 统计学分析

采用SPSS 22.00软件进行分析,计量数据采用($\bar{x} \pm s$)表示,行 t 检验。采用Pearson相关性分析PE患者血清PP13、TSH、FT3、FT4等甲状腺相关指标及 β -hCG表达水平与血压关系,绘制其受试者工作特征曲线(ROC)分析各参数预测重度PE的效能。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组甲状腺相关指标及 β -hCG表达水平比较

研究组PP13、TSH及 β -hCG水平均高于对照组,FT3、FT4水平均低于对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表1。

表1 两组甲状腺相关指标及 β -hCG表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	PP13 (pg/mL)	TSH (mIU/L)	FT3 (pmol/L)	FT4 (pmol/L)	β -hCG (IU/L)
研究组	50	160.59 ± 31.12	4.21 ± 0.25	3.81 ± 0.73	11.59 ± 2.94	60.11 ± 17.84
对照组	50	62.22 ± 15.52	1.91 ± 0.20	5.11 ± 1.10	15.60 ± 1.81	37.98 ± 14.41
t 值		20.002	31.363	6.963	8.213	6.824
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

2.2 不同严重程度子痫患者甲状腺相关指标及β-hCG表达水平比较

重度PE孕妇PP13、TSH及β-hCG水平均

高于轻度PE患者,FT3、FT4水平均低于轻度PE患者,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表2。

表2 不同严重程度患者甲状腺相关指标及β-hCG表达水平比较($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Comparison of expression levels of thyroid-related indicators and β-HCG in patients with different severity degrees in study group ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	PP13(pg/mL)	TSH(mU/L)	FT3(pmol/L)	FT4(pmol/L)	β-hCG(IU/L)
轻度PE	35	144.59±28.84	3.52±0.65	4.26±1.11	12.29±2.16	50.59±15.51
重度PE	15	197.92±35.59	5.82±1.20	2.76±0.65	9.96±1.87	82.32±20.05
t值		5.581	8.788	4.870	3.631	6.062
P值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

2.3 不同严重程度患者甲状腺相关指标及β-hCG表达水平与患者血压相关性

重度PE孕妇收缩压及舒张压均高于轻度PE孕妇,差异均有统计学意义($P<0.05$)。血清PP13、TSH、β-hCG与PE孕妇收缩压、舒张压呈正相关($P<0.05$);FT3、FT4与PE孕妇收缩压、舒张压无相关性($P>0.05$)。见表3、表4。

表3 不同严重程度PE患者血压比较($\bar{x}\pm s$)

Table 3 Comparison of blood pressure in patients with PE of different severity degrees ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	收缩压(mmHg)	舒张压(mmHg)
轻度PE	35	165.52±10.58	105.54±8.87
重度PE	15	175.56±15.11	115.51±10.59
t值		2.674	3.435
P值		0.010	0.001

表4 PE患者甲状腺相关指标及β-hCG表达水平与血压的相关性分析

Table 4 Analysis of correlation between expression levels of thyroid-related indicators and β-HCG and blood pressure in patients with PE

观察指标	收缩压		舒张压	
	r值	P值	r值	P值
PP13	0.589	<0.001	0.611	<0.001
TSH	0.263	0.035	0.310	0.041
FT3	-0.156	0.210	-0.159	0.710
FT4	-0.211	0.315	-0.168	0.054
β-hCG	0.556	<0.001	0.515	<0.001

2.4 研究组血清PP13、FT3、FT4、TSH及β-hCG水平预测重度PE发生的效能

ROC曲线显示血清PP13、TSH、β-hCG曲线下面积(AUC)分别为0.879、0.869、0.857,敏感性分别为62.50%、100.00%、81.25%,特异性为100.00%、62.90%、78.57%。见表5、图1。

表5 研究组患者血清PP13、FT3、FT4、TSH及β-hCG与重度PE的疾病发生关系

Table 5 Relationship between serum PP13, FT3, FT4, TSH and β-HCG and occurrence of severe PE in study group

观察指标	AUC	95%CI	敏感性(%)	特异性(%)	约登指数	截断值
PP13	0.879	0.709~0.969	62.50	100.00	0.625	166.05
TSH	0.869	0.709~0.969	100.00	62.90	0.643	4.78
FT3	0.730	0.537~0.875	68.75	78.57	0.473	3.23
FT4	0.717	0.523~0.765	75.00	71.43	0.464	10.90
β-hCG	0.857	0.681~0.957	81.25	78.57	0.598	63.90

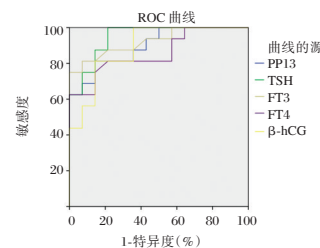


图1 ROC曲线分析

Figure 1 ROC curves

3 讨论

重度PE是在妊娠高血压的基础上出现如肾脏、颅脑、心肺功能、肝脏等全身性脏器损伤,患者出现血压明显增高,大量蛋白尿及明显头痛、视物不清、头晕等症状,肝功能检查结果出现转氨酶明显升高、血小板减少等血液系统异常,胎儿处于慢性缺氧状态,对母体正常妊娠产生严重影响甚至导致胎儿及产妇死亡^[9-10]。

PP13能与糖类产生非共价结合,通过胎盘分泌,在妊娠早期分泌较多后达到一定水平逐渐稳定。重度PE由于胎盘营养与血流状态发生改变,导致滋养细胞分泌旺盛,由于滋养细胞的不断凋

亡与增殖而导致血清 PP13 表达水平升高。Sera-valli 等^[11]相关研究表明胎盘滋养不足、血液养分供给差是导致孕妇出现 PE 及胎儿生长发育异常的相关因素之一,血清 PP13 的浓度可有效预测先兆子痫的发生^[12]。本研究发现重度 PE 孕妇血清 PP13 表达水平显著升高,且与其血压为正相关关系。PP13 具有凝集细胞与沉淀聚糖与复合糖的作用,在妊娠母体中 PP13 主要存在于胎盘合体滋养细胞层的边缘,其具备的糖类识别域可大量精确定位氢键部分结合特定的寡糖链,从而使得 PP13 具备有效的细胞识别与黏附效果^[13]。Poloski 等^[14]研究发现 PP13 的分泌在胎盘娩出后受到抑制且表达水平迅速降低。重度 PE 孕妇中由于缺血等状况常导致出现滋养细胞分化增殖作用加强,继而出现 β -hCG 表达水平升高。本研究中重度 PE 孕妇 β -hCG 表达水平显著高于轻度 PE 孕妇及对照组孕妇,与李凤秋等^[15]研究报道相一致。

刘文萃等^[16]相关研究中发现重度 PE 孕妇 FT3、FT4 低于正常孕妇,TSH 表达水平高于正常孕妇,与本研究重度 PE 孕妇 FT3、FT4 及 TSH 等甲状腺指标表达水平基本一致。妊娠时期女性甲状腺功能常出现不同程度异常表现,重度 PE 孕妇中由于妊娠期高血压的影响出现血液系统、心肺功能异常等问题,孕妇血管内皮功能受损,TSH 对甲状腺功能存在直接影响,导致孕妇甲状腺功能应激性增强。刘湘萍等^[17]研究发现,PE 孕妇在肝肾功能受损后出现甲状腺激素缺乏,但由于 β -hCG 对 TSH 存在生物活性,增加了 TSH 的合成,同时孕妇妊娠状态导致其 β -hCG 分泌增多,进一步增强了 TSH 的生成。本研究中 ROC 曲线显示重度子痫早期孕妇血清 PP13、TSH 及 β -hCG 均具有一定预测价值,其中以 PP13 对重度 PE 预测效能最高。分析原因为 PP13 作为非抗体糖蛋白,在重度 PE 孕妇由于滋养细胞的不断分化增殖,对 PP13 的分泌产生直接影响,因此 PP13 与重度 PE 孕妇发病关系最为密切。

综上所述,重度 PE 孕妇血清 PP13、TSH 及 β -hCG 表达水平随疾病加重而升高,与 PE 孕妇血压呈正相关,且 PP13 对重度 PE 发病预测效能最高,对 PE 预测与重度 PE 防治具有一定指导价值。

参考文献

[1] 沈新丽.联合检测妊娠早中期孕妇血清 β -hCG、PAPP-A、sFlt-1 及 PLGF 对预测子痫前期的意义[J].中国妇幼保健,2018,33(15):3412-3415.

[2] 张翠翠,谢玲,李洁.重度子痫前期患者血清和胎盘 VEGF、sVEGFR-1 水平异常与 lncRNA-LOC391533 表达的相关性分析[J].临床和实验医学杂志,2019,18(21):2293-2296.

[3] 周隽,唐佳,郑钊平,等.PI、RI 联合 sFh-1/PLCF 检测对妊娠中晚期孕妇产前子痫前期的预测价值[J].分子诊断与治疗杂志,2021,13(1):107-110.

[4] 顾玮,林婧,侯燕燕.妊娠早中期孕妇血清中 β -hCG、PAPP-A、AFP 及 uE3 水平检测在联合预测子痫前期中的价值[J].中华妇产科杂志,2015,50(2):101-107.

[5] 周佳任,李威,杜鹃,等.重度子痫前期合并甲状腺功能减退症孕妇的甲状腺激素水平变化与肾功能的相关性[J].中华妇产科杂志,2014,49(11):811-815.

[6] 郑琪珍,邓玉清,钟世林,等.孕 15~20 周 β -HCG 与 PIGF 水平变化预测胎盘缺血性疾病发生的价值[J].现代妇产科进展,2016,25(1):50-53.

[7] 漆洪波.子痫前期的诊断和子痫的处理:需要规范化[J].中华围产医学杂志,2015,18(6):411-413.

[8] 曹泽毅.中华妇产科学[M].第3版.北京:人民卫生出版社,2014:493-496.

[9] 王晶,东星,张学军,等.血清及胎盘中脂蛋白相关磷脂酶 A2 水平与妊娠期高血压疾病的关系[J].武警医学,2020,31(9):805-808.

[10] Chen Q, Wang Y, Zhao M, et al. Serum levels of GDF15 are reduced in preeclampsia and the reduction is more profound in late-onset than early-onset cases[J]. Cytokine, 2016, 83(1):226-230.

[11] Seravalli V, Grimpel YI, Meiri H, et al. Relationship between first-trimester serum placental protein-13 and maternal characteristics, placental Doppler studies and pregnancy outcome[J]. J Perinat Med, 2016, 1(44):543-549.

[12] 吴玉娟,朱辉.人血白蛋白联合小剂量肝素对重度子痫前期患者病情、血清学指标及胎盘血流的影响[J].海南医学院学报,2018,24(6):723-726.

[13] 冉雪莲,林彬,尹航.早发型子痫前期孕妇血清及尿液中胎盘蛋白 13 的变化[J].河北医学,2017,23(7):1094-1097.

[14] Poloski E, Oettel A, Ehrentaut S, et al. JEG-3 Trophoblast Cells Producing Human Chorionic Gonadotropin Promote Conversion of Human CD4+FOXP3-T Cells into CD4+FOXP3+Regulatory T Cells and Foster T Cell Suppressive Activity[J]. Biol Reprod, 2016, 94(5):106.

[15] 李凤秋,杨孜,张爱青,等.中孕早期子痫前期游离脂肪酸与 β -人绒毛膜促性腺激素游离三醇及甲胎蛋白关联性分析[J].中国实用妇科与产科杂志,2016,32(4):335-340.

[16] 刘文萃,翟斯文,刘丽.不同严重程度 HDGP 患者孕晚期甲状腺功能水平的差异[J].中国妇幼保健研究,2017,28(9):1099-1101.

[17] 刘湘萍,杨晓文,黄婷,等.不同 MTHFR 基因型子痫前期患者感染病原菌对血清 β -HCG 与和 PLGF 水平的影响研究[J].中华医院感染学杂志,2016,26(1):150-152.

· 论 著 ·

外周血 CTRP9、HMGB1 及 CRP 水平对 AIS 患者静脉溶栓后出血转化的预测作用

李虎* 花军

[摘要] 目的 探讨外周血 CTRP9、HMGB1 及 CRP 水平与急性缺血性脑卒中(AIS)患者静脉溶栓后出血转化(HT)后的相关性及其预测价值。**方法** 分析2019年1月到2020年12月淮南东方医院诊治108例AIS患者的临床资料,根据患者静脉溶栓后是否出现出血转化分为HT组(76例)和无HT组(32例),比较两组外周血 CTRP9、HMGB1 及 CRP 水平差异,并采用 Logistic 回归分析 AIS 患者静脉溶栓后发生 HT 的危险因素;同时运用 ROC 曲线分析外周血 CTRP9、HMGB1 及 CRP 水平对出血转化的预测价值。**结果** 两组外周血 CTRP9、HMGB1 及 CRP 水平比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。Logistic 回归分析显示,HMGB1 及 CRP 水平高是溶栓后发生 HT 的危险因素;CTRP9 水平低是溶栓后发生 HT 的危险因素($P<0.05$)。ROC 曲线结果分析显示,血清中 CTRP9、HMGB1 及 CRP 水平预测 AIS 患者静脉溶栓后 HT 的 ROC 曲线下面积分别为 0.817、0.752、0.781,敏感性为 89.5%、65.8%、69.7%($P<0.05$)。**结论** HMGB1 和 CRP 水平的升高及 CTRP9 水平的下降均能 HT 的发生有关,可作为预测 HT 的潜在指标。

[关键词] 急性缺血性脑卒中;CTRP9;高迁移率族蛋白1;血清C反应蛋白;静脉溶栓;出血转化

The predictive effect of peripheral blood CTRP9, HMGB1 and CRP levels on hemorrhage transformation after intravenous thrombolysis in AIS patients

LI Hu*, HUA Jun

(Department of Neurology, Huainan Eastern Hospital Group, Huainan, Anhui, China, 202001)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the correlation between the levels of CTRP9, HMGB1 and CRP in peripheral blood and the hemorrhagic transformation (HT) after intravenous thrombolysis in patients with acute ischemic stroke (AIS). **Methods** The clinical data of 108 AIS patients from January 2019 to December 2020 were analyzed. According to whether the patients had hemorrhage transformation after intravenous thrombolysis, the were divided into the HT group (76 cases) and the non-HT group (32 cases). The levels of CTRP9, HMGB1, and CRP in peripheral blood were compared between the two groups. Logistic regression was used to analyze the risk factors of HT after intravenous thrombolysis in AIS patients. The ROC curve was used to analyze the predictive value of peripheral blood CTRP9, HMGB1 and CRP levels for hemorrhage transformation. **Results** The levels of peripheral blood CTRP9, HMGB1 and CRP between the two groups were statistically significant ($P<0.05$). Logistic regression analysis showed that high HMGB1 and CRP levels are risk factors for HT after thrombolysis. Low CTRP9 level is the risk factor for HT after thrombolysis ($P<0.05$). Analysis of the ROC curve results showed that serum CTRP9, HMGB1 and CRP levels predicted the area under the ROC curve of HT after intravenous thrombolysis in AIS patients were 0.817, 0.752 and 0.781, with the sensitivity of 89.5%, 65.8% and 69.7% ($P<0.05$). **Conclusion** The increase of HMGB1 and CRP levels and decrease of CTRP9 level can be related to the occurrence of HT, and can be used as potential

基金项目:安徽省卫生和计划生育委员会科研计划项目(2016QK082)

作者单位:淮南东方医院集团总院神经内科,安徽,淮南 202001

*通信作者:李虎, E-mail:19841120lh@163.com

indicators for predicting HT.

[KEY WORDS] Acute ischemic stroke; CTRP9; High-mobility family protein 1 (HMGB1); Serum C-reactive protein (CRP); Venous thrombolysis; Hemorrhagic transformation

急性缺血性脑卒中 (acute ischemic stroke, AIS) 属于中枢神经系统血管疾病, 在常见的卒中类型中占比较高, 有着非常高的发病率、致残率及死亡率^[1]。随着人口的老齡化, AIS 在高龄人群中的发病率显著增加, 对于 AIS 的治疗应越早越好。目前, 治疗 AIS 多采用药物进行静脉溶栓, 是最为便捷也是最有效的方法。但是, 静脉溶栓也会产生许多的并发症, 出血性转化 (hemorrhagic transformation, HT) 就属于其中最危险的并发症, HT 会导致患者的病情急剧恶化甚至严重者可死亡, 极大地破坏了治疗的效果和安全性。有研究表明, AIS 患者再进行静脉溶栓后出现出血性转化的起因还是与神经炎症的反应息息相关^[2-3]。由此可以研究与神经炎症相关的血清生物标志物来预测出血性转化的发生, 通过指标水平的高低及时有效的对临床患者进行监测, 以便提高临床获益^[4-5]。因此, 本文特选取外周血 CTRP9、HMGB1 及 CRP 水平来分析这三组指标与 AIS 患者静脉溶栓后发生 HT 之间的关系, 以期临床预测患者出血转化提供数据参考, 便于后期重点监测相关影响因素, 降低出血性转化的风险, 提高静脉溶栓疗效。

1 资料与方法

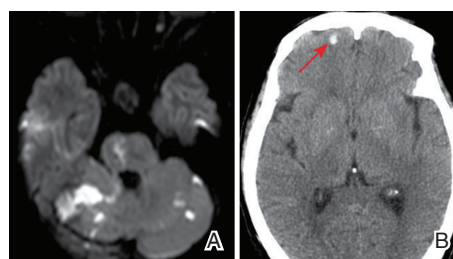
1.1 一般资料

1.1.1 研究对象

选取 2019 年 1 月到 2020 年 12 月淮南东方医院诊治 108 例 AIS 患者, 其中 39 岁以下 2 例, 49 岁以下 14 例, 59 岁以下 26 例, 69 岁以下 33 例, 79 岁以下 25 例, 80 岁以上 8 例, 根据患者静脉溶栓后 72 h 内是否出现出血转化分为 HT 组 (76 例) 和无 HT 组 (32 例)。纳入标准: ①符合《中国急性缺血性脑卒中诊治指南 (2014 年)》诊断标准^[6]且被确诊者; ②患者入院时经检测未有出血症状; ③符合静脉溶栓适应症。排除标准: ①入院时首次诊断发现出血倾向; ②实施其他治疗方法的患者; ③因外伤造成脑内出血者; ④其他卒中患者; ⑤临床资料缺乏; ⑥严重心肝肾功能不全; ⑦感染性疾病或免疫缺陷病。两组患者一般临床资料比较均无统计学意义 ($P>0.05$)。

1.1.2 临床资料

收集所有患者临床资料 (年龄、性别、糖尿病史、高血压病史、既往卒中史); 卒中病因学分型 (大动脉粥样硬化、心源性栓塞、其他明确或未明确病因、小血管闭塞); 一般实验室检查 (空腹血糖、总胆固醇、尿酸、低密度脂蛋白胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇); 入院时美国国立卫生院卒中量表 (National institute of health strokescale, NIHSS)^[7] 评分及卒中分类 (NIHSS 评分分为三个等级, 轻度 ≤ 8 分, 中度 9~15 分, 重度 ≥ 16 分); 入院至溶栓治疗时间; 基线血压 (收缩和舒张)。头颅 CT 复查, 依据复查的结果来判断是否出现 HT, 并且按照欧洲急性卒中协作研究 (European Cooperative Acute Stroke Study, ECASS) 标准^[8] 进行分类, 如梗死区附近出现出血灶则将其定义为 HT, 如图 1。



注: A 为溶栓后 DWI 右侧脑桥、双侧小脑半球急性梗死 (责任病灶); B 为溶栓后复查头部 CT 显示, 右侧额叶发生出血 (箭头处)。

图 1 CT 结果

Figure 1 CT curves

1.2 方法

分析两者患者经静脉溶栓治疗及血清血检查的临床资料。其步骤如下: ①静脉溶栓治疗方法: 两组患者均予以阿替普酶 (通用名: 爱通立, 德国勃林格英格翰国际公司生产) 分别按照静脉推注 10%、滴注 90% 的方式进行静脉溶栓治疗。治疗后均收入病房服用药物进行观察, 并在 24 h 后进行头颅 CT 复查。②血清学检测: 两组患者均在入院次日空腹采集静脉血 5 mL, 使其室温内静置 25 min, 进行离心半径 13.5 cm、转速 3 000 r/min、时长 10 min 的离心, 分离并提取血清。应用酶联免疫吸附法检测血清中 CTRP9、HMGB1 水平, 前者使用上海研尊生物科技有限公司生产的试剂盒 (货

号:YZ-E989068),后者选用了上海沪震实业有限公司生产的试剂盒(货号:HZ-0884);应用乳胶免疫比浊法对血清中CRP水平进行检测,使用产上海研尊生物科技有限公司的CRP检测试剂盒(货号:YZ-P64716);仪器采用AU680自动生化分析仪(美国贝克曼库尔特公司)进行测定。

1.3 统计学分析

采用统计软件SPSS 22.0处理数据,符合正态分布的计量资料用($\bar{x} \pm s$)表示,行 t 检验;计数资料采用百分数 $n(\%)$ 表示,行 χ^2 检验;绘制受试者工作特性曲线(ROC)分析血清中CTRP9、HMGB1及CRP水平对AIS患者静脉溶栓后HT的诊断价值;运用Logistic回归分析影响AIS患者静脉溶栓后HT的危险因素。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组一般资料比较

两组患者一般资料、卒中病因学分型、一般实验室检查、入院至溶栓治疗时间、基线血压等进行差异比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);CTRP9、HMGB1、CRP水平比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表1。

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

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

指标	HT组 ($n=76$)	NHT组 ($n=32$)	χ^2/t 值	P 值
年龄(岁)	71.27±4.65	69.85±4.23	1.487	0.140
男性	42(55.26)	20(62.5)	0.482	0.487
糖尿病史	22(28.95)	8(25)	0.175	0.676
高血压病史	58(76.32)	20(62.5)	2.143	0.143
既往卒中史	24(31.58)	7(21.88)	1.036	0.309
收缩压(mmHg ^a)	146±25	148±20	0.401	0.689
舒张压(mmHg ^a)	80±12	84±13	1.543	0.126
总胆固醇(mmol/L)	4.21±0.79	4.30±0.85	0.529	0.598
低密度脂蛋白胆固醇(mmol/L)	2.64±0.79	2.72±0.84	0.472	0.638
高密度脂蛋白胆固醇(mmol/L)	1.23±0.32	1.24±0.31	0.150	0.881
空腹血糖	7.5±3.2	7.29±10.1	0.164	0.870
尿酸	292±85.1	322±100	1.587	0.116
心源性筛栓	28(36.84)	10(31.25)	0.309	0.578
大动脉粥样硬化	38(50)	11(34.38)	2.218	0.136
小血管闭塞	27(35.53)	8(25)	1.139	0.286
入院至溶栓时间(min)	63±50	53±31	1.048	0.297
CTRP9/(ng/mL)	206.78±45.65	259.86±40.52	5.679	0.000
HMGB1	9.1±4.8	4.8±2.1	5.996	0.000
CRP/(mg/L)	15.38±10.02	5.28±2.08	5.637	0.000
NIHSS(分)	12.03±4.01	10.46±3.15	1.972	0.051

2.2 AIS患者静脉溶栓后影响HT发生的因素分析

将AIS患者静脉溶栓后是否发生HT为因变量,以CTRP9、HMGB1及CRP水平为自变量进行多因素Logistic回归分析显示,HMGB1及CRP水平高是AIS患者静脉溶栓后发生HT的危险因素,CTRP9水平明显下降为AIS患者静脉溶栓后发生HT的危险因素($P < 0.05$)。见表2。

表2 AIS患者静脉溶栓后影响HT发生的因素分析

Table 2 Analysis of the factors affecting HT occurrence after venous thrombolysis in AIS patients

影响因素	B 值	$S.E.$	Wald	自由度	Exp(B)	95%CI	P 值
CTRP9	0.082	0.027	9.576	1	1.085	1.031~1.143	0.002
HMGB1	-0.851	0.324	6.904	1	0.427	0.226~0.806	0.009
CRP	-0.621	0.282	4.838	1	0.537	0.309~0.935	0.028
常量	-10.807	4.106	6.926	1	0.000		0.008

2.3 CTRP9、HMGB1及CRP水平预测静脉溶栓后发生HT的价值分析

将CTRP9、HMGB1及CRP纳入二元Logistic回归模型行统计分析,得到三项指标回归的预测概率,并建立各自受试者工作特征(ROC)曲线。ROC分析结果显示,CTRP9、HMGB1及CRP水平预测AIS患者静脉溶栓后HT的ROC曲线下面积AUC分别为0.817、0.752、0.781,其敏感度分别为0.895、0.658、0.697($P < 0.05$)。见表3、图2。

表3 CTRP9、HMGB1及CRP水平预测静脉溶栓后发生HT的价值分析

Table 3 Value analysis of HT after intravenous thrombolysis at CTRP9, HMGB1 and CRP levels

项目	AUC	标准 错误	95%CI	临界值	敏感度	特异性	约登 指数	P 值
CTRP9	0.817	0.047	0.724~0.909	254.2	0.895	0.719	0.614	0.000
HMGB1	0.752	0.045	0.663~0.841	7.065	0.658	0.906	0.564	0.000
CRP	0.781	0.044	0.696~0.867	7.81	0.697	0.969	0.666	0.000

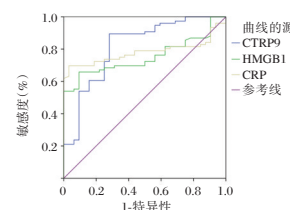


图2 ROC曲线图

Figure 2 ROC curve

3 讨论

HT作为AIS患者进行静脉溶栓后发生率最高的并发症,其导致致残率和病死率不断上升^[9]。从

根本上来讲,HT通常发生在血管再灌注损伤后导致的凝血功能异常,与血脑屏障通透性有关,主要表现为炎症级联反应、脑组织环境和血脑屏障遭到破坏、细胞破裂等^[10-11]。如果出现HT则极有可能造成神经功能的损伤,从而降低了静脉溶栓的治疗效果,不利于患者的转归和恢复。CTRP9经由脂肪组织进行分泌蛋白,能够促进血管的生成、降低炎症的发生率、防止细胞凋亡和纤维化。CTRP9有着抗氧化、抗衰老的作用,能够修复损伤的干细胞、保护血管内皮、促进血管的舒张,对脑梗死起到了一定的保护作用。因此推测CTRP9对AIS患者HT也能够发挥保护作用^[12]。通过研究发现,AIS患者经过静脉溶栓后,HT组血清中CTRP9水平要明显低于NHT组,由此推测血清中CTRP9的低水平削弱了其对抗组织的抗炎、抗氧化作用,从而加剧了脑组织的不平衡与氧自由基的升高,炎症水平也随之上升,最终加重AIS导致患者转化不良,形成HT。HMGB1分泌分为主动和被动两种情况,主动是由小胶质细胞分泌,被动是由坏死的神经元释放。患者发病后,HMGB1则通过大量释放介质引起炎症反应,此结论也在脑缺血再灌注损伤动物模型中得到证实。在脑缺血动物模型中通过注射抗HMGB1的药物能够增厚血脑屏障,提示HMGB1的大量释放会破坏血脑屏障,导致屏障保护作用减弱,使HT的发生风险增大^[13]。本研究通过分析比对发现,经治疗后HT组的HMGB1水平显著高于NHT,与之前研究结论保持一致。临床上通常将CRP作为一种炎症标志物。而炎症又会改变微环境导致血管内皮结构出现异常,主要体现为小胶质细胞的异常活跃以及白细胞的不断渗出。有大量研究证实表明,CRP水平的升高会加剧缺血性卒中后的炎症反应、加大对组织的破坏力度,从而在通过静脉溶栓后促进HT的发生,两者存在显著正相关性^[14-15]。本研究通过分析比对HT组的CRP水平显著高于NHT组,之前研究结果也再一次得到验证。

综上所述,AIS患者静脉溶栓后HT组患者血清中HMGB1、CRP水平高于NHT组,说明两者水平与HT的发生率成正相关,而HT组患者血清中CTRP9水平低于NHT组,说明其与HT的发生率成负相关。HMGB1、CRP水平越高,越容易在静脉溶栓后发生出血转化现象,而CTRP9水平则与HMGB1、CRP水平相反,CTRP9水平越高,越能够有效保护患者降低静脉溶栓后出血转化的风险。

三者水平均能够有效预测AIS患者静脉溶栓后HT的发生情况,有一定的预测价值,可作为AIS患者静脉溶栓后HT的潜在预测指标。因此,在临床实践中,应当更加关注血清中HMGB1、CTRP9、CRP水平,有利于及时监测HT的发生。

参考文献

- [1] Rabinstein AA. Update on Treatment of Acute Ischemic Stroke [J]. Continuum (Minneapolis), 2020,26(2):268-286.
- [2] Suh CH, Jung SC, Cho SJ, et al. MRI for prediction of hemorrhagic transformation in acute ischemic stroke: a systematic review and meta-analysis [J]. Acta Radiol, 2020,61(7):964-972.
- [3] Liu L, Teng J, Ma M, et al. Serum homocysteine level is an independent predictor for hemorrhagic transformation within 24 h of intravenous thrombolysis in acute ischemic stroke [J]. J Clin Neurosci, 2020,82(Pt A):13-19.
- [4] 李洪杰,杜昌儒,邓博师,等.高龄急性缺血性脑卒中患者静脉溶栓后出血性转化的危险因素[J].中华老年多器官疾病杂志,2020,19(10):740-744.
- [5] 邢灿,李丹,李燕,等.血清C反应蛋白预测急性缺血性卒中患者静脉溶栓后出血性转化[J].国际脑血管病杂志,2020,28(10):733-738.
- [6] 中华医学会神经病学分会,中华医学会神经病学分会脑血管病学组.中国急性缺血性脑卒中诊治指南2014[J].中华神经科杂志,2015,48(4):246-257.
- [7] Dunning K. National Institutes of Health Stroke Scale [J]. Encyclopedia of Clinical Neuropsychology, 2011,9(1):1714-1715.
- [8] Amiri H, Bluhmki E, Bendszus M, et al. European Cooperative Acute Stroke Study-4: Extending the time for thrombolysis in emergency neurological deficits ECASS-4: EXTEND [J]. Int J Stroke, 2016,11(2):260-7.
- [9] 李崇伟. sdLDL-C、IMA及UACR与急性缺血性脑卒中病情及预后的关系[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2021,13(3):495-499.
- [10] Song Q, Pan R, Jin Y, et al. Lymphocyte-to-monocyte ratio and risk of hemorrhagic transformation in patients with acute ischemic stroke [J]. Neurol Sci, 2020,41(9):2511-2520.
- [11] 郑国将,毛相濡,丁刚玉,等.探讨ASPECTS、DRAGON和SEDAN评分对我国急性缺血性卒中患者静脉溶栓后急性期内出血转化的预测价值[J].中国卒中杂志,2019,14(6):533-540.
- [12] 袁咏梅,赵鑫,刘畅,等.血清CTRP3、CTRP9水平对急性缺血性脑卒中患者静脉溶栓后出血转化的预测价值[J].卒中与神经疾病,2020,27(6):743-746+757.
- [13] 李鑫,李琼莉,王军伟,等.急性缺血性脑卒中静脉溶栓后出血转化的多因素联合预测模型研究[J].中华老年心脑血管病杂志,2021,23(4):430-432.
- [14] Wang R, Zeng J, Wang F, et al. Risk factors of hemorrhagic transformation after intravenous thrombolysis with rt-PA in acute cerebral infarction [J]. QJM, 2019,112(5):323-326.
- [15] 张磊,罗国君,唐春雷,等.急性缺血性卒中患者溶栓后血压变异性与有症状脑出血和转归的相关性[J].国际脑血管病杂志,2020,28(6):407-414.

胰腺癌患者手术前后血清 S100A9、MMP-9 变化及其相关性

朱晓龙* 张光亮 裴建灰 朱乐恒

[摘要] **目的** 探讨胰腺癌患者手术前后血清钙结合蛋白 A9 复合物(S100A9)、基质金属蛋白酶9(MMP-9)水平变化及其相关性。**方法** 选取本院2016年5月至2018年2月60例行手术治疗的原发性胰腺癌患者作为胰腺癌组,另选取30例同期于本院进行健康体检者作为对照组,检测胰腺癌组患者手术前后以及对照组血清S100A9、MMP-9水平,分析两项指标的相关性,研究其与临床病理及预后的关系。**结果** 血清S100A9、MMP-9含量:术前>术后7d>术后1个月>对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。胰腺癌组患者术前、术后7d、术后1个月血清S100A9水平与血清MMP-9含量呈现正相关($r=0.341, 0.314, 0.303$, 均 $P<0.05$)。胰腺癌组患者术前肿瘤 >4 cm、肿瘤分化程度低、临床分期Ⅲ期或Ⅳ期、淋巴结转移患者血清S100A9、MMP-9含量高于肿瘤 ≤ 4 cm、肿瘤分化程度高、临床分期Ⅰ期或Ⅱ期、未发生淋巴结转移者,差异均有统计学意义($P<0.05$)。高S100A9表达患者2年生存率6.45%低于低S100A9表达患者的27.59%,中位生存时间14.7个月短于低S100A9表达患者的19.1个月,差异均有统计学意义($P<0.05$)。高MMP-9表达患者2年生存率8.57%低于低MMP-9表达患者的28.00%,中位生存时间15.3个月短于低MMP-9表达患者的18.6个月,差异均有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 胰腺癌患者术前血清S100A9、MMP-9高表达与临床病理相关,术后血清S100A9、MMP-9高表达患者预后差。

[关键词] 胰腺癌;血清钙结合蛋白A9复合物;基质金属蛋白酶9

Changes and correlation of serum S100A9 and MMP-9 in patients with pancreatic cancer before and after surgery

ZHU Xiaolong*, ZHANG Guangliang, PEI Jianhui, ZHU Leheng

(Department of General Surgery, General Hospital of Pingmei Shenma Medical Group, Pingdingshan, Henan, China, 467000)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the changes and correlation of serum S100 calcium-binding protein A9 (S100A9) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) before and after surgery in patients with pancreatic cancer. **Methods** Sixty patients with primary pancreatic cancer undergoing surgery in the hospital were enrolled as the pancreatic cancer group from May 2016 to February 2018, while other 30 healthy controls during the same period were enrolled as the control group. The levels of serum S100A9 and MMP-9 in two groups were detected. The correlation between the two indicators was analyzed. The relationship with clinicopathology and prognosis was studied. **Results** The levels of serum S100A9 and MMP-9 in the pancreatic cancer group were higher than those in the control group before and after surgery ($P<0.05$). The levels of serum S100A9 and MMP-9 at 7 d and 1 month after surgery were lower than those before surgery in the pancreatic cancer group ($P<0.05$). In pancreatic cancer group, level of serum S100A9 was positively correlated with serum MMP-9 before surgery, at 7 d and 1 month after surgery ($r=0.341, 0.314, 0.303, P<0.05$). In the pancreatic

基金项目:河南省科技计划项目(162102210416)

作者单位:平煤神马医疗集团总医院普外科,河南,平顶山 467000

*通信作者:朱晓龙, E-mail:zx1342913118@163.com

cancer group, the levels of serum S100A9 and MMP-9 in patients with tumors longer than 4 cm, low differentiation, clinical staging at stage III and IV, and lymph node metastasis were higher than those with tumors not longer than 4 cm, high differentiation, clinical staging at stage I and II, and without metastasis ($P<0.05$). The 2-year survival rate in the 31 patients with high S100A9 expression was lower than that with low S100A9 expression [6.45% vs 27.59% (13/29)], and the median survival time was shorter than that with low S100A9 expression (14.7 months vs 19.1 months) ($P<0.05$). The 2-year survival rate in patients with high MMP-9 expression was lower than that with low MMP-9 expression [8.57% vs 28.00%], and the median survival time was shorter than that with low MMP-9 expression (15.3 months vs 18.6 months) ($P<0.05$). **Conclusion** The pre-operative high expressions of serum S100A9 and MMP-9 are related to clinicopathology in patients with pancreatic cancer. The prognosis is poor in patients with postoperative high expressions of serum S100A9 and MMP-9.

[KEY WORDS] Pancreatic cancer; S100A9; MMP-9

胰腺癌是消化道常见恶性肿瘤,转移快,患者生存时间短,病死率高。据统计大部分胰腺癌患者在1年左右死亡,5年生存期患者不超过4%^[1]。手术是治疗胰腺癌的首选方式,然而相关研究显示胰腺癌患者手术及周围淋巴结清扫后,生存时间一般约为11~20个月,5年存活率不超过25%^[2]。钙结合蛋白A9复合物(S100 calcium-binding protein A9, S100A9)可促进免疫与炎症修复,其异常表达上调和多种恶性肿瘤的发生及发展有关,具有促癌作用^[3]。基质金属蛋白酶9(Matrix Metalloprotein-9, MMP-9)由结缔组织细胞分泌,参与细胞外基质降解过程,使内皮细胞迁移增殖,促进新血管和基底膜形成,在肿瘤周围组织浸润、远隔转移中发挥重要作用^[4]。本研究将比较手术前后胰腺癌患者血清S100A9、MMP-9含量差异,分析两项指标的相关性,分析其与临床病理与预后的关系。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取本院2016年5月至2018年2月原发性胰腺癌行手术治疗的患者60例作为胰腺癌组,其中男性34例,女性26例;平均年龄(60.25 ± 6.04)岁;肿瘤位置:胰头25例,胰体11例,胰尾24例;肿瘤大小: ≤ 4 cm者28例, >4 cm者32例;肿瘤分化:高分化26例,中分化22例,低分化12例;临床分期^[5]: I期8例, II期11例, III期20例, IV期21例。纳入标准:①符合《胰腺癌诊治指南(2014)》胰腺癌诊断标准^[6];②Karnofsky评分^[7] >60 分;③术前未接受过放化疗以及其他生物治疗。排除标准:①合并自身免疫或血液疾病;②合并感染性疾病;③合并重要脏器功能障

碍;④合并手术相关禁忌症;⑤妊娠或哺乳期妇女;⑥合并认知障碍或精神疾病。另选取30例同期于本院进行健康体检者作为对照组,其中男性16例,女性14例;平均年龄(60.87 ± 5.95)岁。两组患者性别、年龄资料比较差异无统计学意义($P>0.05$)。本研究经医院伦理委员会批准,患者或家属签署知情同意书。

1.2 方法

对照组于体检当日、胰腺癌组于术前、术后7 d、术后1个月抽取空腹静脉血4 mL,室温下离心分离血清,用于S100A9测定的血清置于 -20°C 条件下保存待检,用于MMP-9测定的血清置于 -8°C 条件下保存。S100A9试剂盒来源于上海沪震实业有限公司, MMP-9试剂盒来源于上海瑞齐生物科技有限公司,酶联免疫吸附法操作按试剂盒说明书进行。对胰腺癌组患者进行随访,随访时间为术后2年,随访方式为电话随访和门诊复查,随访周期为3个月,生存起始时间为胰腺癌手术后,主要终点事件为死亡时间,次要终点事件为随访结束。生存期的计算方法为术后到死亡或随访结束所历经的时间。

1.3 统计学方法

采用SPSS 20.0统计软件进行统计分析,计量资料采用($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较行 t 检验;采用Pearson相关性分析血清指标之间的关系,以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 血清S100A9、MMP-9含量比较

血清S100A9、MMP-9含量:术前 $>$ 术后7 d $>$ 术后1个月 $>$ 对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表1。

表1 血清 S100A9、MMP-9 含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison on contents of serum S100A9 and MMP-9 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	S100A9($\mu\text{g/L}$)	MMP-9(ng/mL)
对照组	30	150.08 $\pm$ 14.88	18.29 $\pm$ 1.73
胰腺癌组 术前	60	211.06 $\pm$ 20.94 ^a	91.06 $\pm$ 8.14 ^a
术后 7 d	60	197.46 $\pm$ 18.33 ^{ab}	82.33 $\pm$ 7.04 ^{ab}
术后 1 个月	60	169.64 $\pm$ 15.40 ^{ab}	40.71 $\pm$ 4.25 ^{ab}

注:与对照组比较,^a $P<0.05$;与术前比较,^b $P<0.05$ 。

2.2 胰腺癌组患者血清 S100A9、MMP-9 含量相关性分析

胰腺癌组患者术前、术后 7d、术后 1 个月血清 S100A9 水平与血清 MMP-9 含量呈现正相关($r=0.341, 0.314, 0.303$, 均 $P<0.05$)。

2.3 胰腺癌组患者术前血清 S100A9、MMP-9 含量与临床病理特征的关系分析

胰腺癌组患者术前肿瘤 $>4\text{ cm}$ 、肿瘤分化程度低、临床分期Ⅲ期或Ⅳ期、淋巴结转移患者血清 S100A9、MMP-9 含量高于肿瘤 $\leq 4\text{ cm}$ 、肿瘤分化程度高、临床分期Ⅰ期或Ⅱ期、未发生淋巴结转移者,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表 2。

2.4 手术后 1 个月血清 S100A9、MMP-9 水平与预后的关系分析

60 例患者依照术后 1 个月血清 S100A9、MMP-9 水平,将大于等于平均值的患者纳入高表达组,将小于平均值的患者纳入低表达组,其中 S100A9 高表达患者 2 年生存率 6.45%(2/31)低于 S100A9 低表达患者的 27.59%(8/29),中位生存时间 14.7 个

月短于 S100A9 低表达患者的 19.1 个月,差异均有统计学意义($P<0.05$)。MMP-9 高表达患者 2 年生存率 8.57%(3/35)低于 MMP-9 低表达患者的 28.00%(7/25),中位生存时间 15.3 个月短于 MMP-9 低表达患者的 18.6 个月,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见图 1。

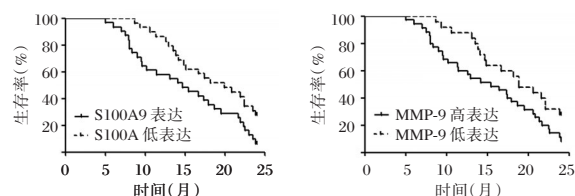


图1 手术后 1 个月血清 S100A9、MMP-9 不同表达状态患者 2 年总生存曲线

Figure 1 The 2-year overall survival curves of patients with different expressions of serum S100A9 and MMP-9 at 1 month after surgery

3 讨论

胰腺癌的早期诊断仍缺乏客观有效的指标,探寻胰腺癌有效诊断标志物是临床重要难题之一。近年来,关于胰腺癌发生发展机制研究有了较大进展,多种蛋白或基因均参与其发生及发展过程^[8]。

S100A9 是钙结合蛋白 S100 家族的重要成员之一,参与多种癌细胞初始发育和转移性疾病发展过程^[9]。胰腺癌患者 S100A9 可能通过 TGF- β /SMAD4 信号通路影响肿瘤的生长及迁移,同时 S100A9 作用于远处部位,如肝脏、肺等,通过改变

表2 患者术前血清 S100A9、MMP-9 含量与临床病理特征的关系分析 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Relationship between preoperative serum S100A9, MMP-9 levels and clinicopathological features ($\bar{x} \pm s$)

临床病理特征	n	S100A9($\mu\text{g/L}$)	t/F 值	P 值	MMP-9(ng/mL)	t/F 值	P 值
性别							
男	34	209.77 $\pm$ 20.06	0.559	0.548	90.80 $\pm$ 8.03	0.271	0.787
女	26	212.75 $\pm$ 20.98			91.40 $\pm$ 9.05		
年龄(岁)							
≤ 60	29	208.05 $\pm$ 19.97	1.109	0.272	89.05 $\pm$ 8.71	1.768	0.082
> 60	31	213.88 $\pm$ 20.43			92.94 $\pm$ 8.08		
肿瘤位置							
胰头	25	209.98 $\pm$ 18.77	0.091	0.913	90.76 $\pm$ 7.05	0.029	0.971
胰体	11	211.03 $\pm$ 19.43			91.21 $\pm$ 8.46		
胰尾	24	212.20 $\pm$ 17.05			91.30 $\pm$ 9.01		
肿瘤大小							
$\leq 4\text{ cm}$	28	205.11 $\pm$ 17.73	2.382	0.021	86.11 $\pm$ 7.84	4.439	<0.001
$> 4\text{ cm}$	32	216.27 $\pm$ 18.43			95.39 $\pm$ 8.28		
肿瘤分化							
低分化	12	218.96 $\pm$ 16.33	4.170	0.020	96.77 $\pm$ 7.46	10.981	<0.001
中分化	22	214.63 $\pm$ 16.75			94.06 $\pm$ 8.43		
高分化	26	204.39 $\pm$ 15.64			85.89 $\pm$ 7.01		
临床分期							
Ⅰ期	8	197.41 $\pm$ 18.30	5.363	0.008	81.64 $\pm$ 7.41	11.333	<0.001
Ⅱ期	11	200.71 $\pm$ 17.95			84.25 $\pm$ 6.95		
Ⅲ期	20	214.30 $\pm$ 15.40			93.07 $\pm$ 7.77		
Ⅳ期	21	218.60 $\pm$ 16.63			96.30 $\pm$ 8.08		
淋巴结转移							
无	28	201.73 $\pm$ 14.95	3.708	0.001	83.13 $\pm$ 8.01	6.971	<0.001
有	32	219.22 $\pm$ 20.66			98.00 $\pm$ 8.44		

微环境,创造一个有利于转移细胞粘附及生长的条件,这说明 S100A9 在胰腺癌的发生、迁移、侵袭中具有重要作用^[10]。MMP-9 是研究广泛的基质金属蛋白酶之一,参与多种生物过程,通过降解细胞外基质蛋白使得细胞外基质重构,调节细胞黏附性,降解血管基底膜和血管周围基质,促进癌细胞侵袭及转移,在新的肿瘤血管系统生成中具有不可或缺的作用^[11]。相关文献报道显示,MMP-9 蛋白在人类多种恶性肿瘤如肝癌、食管癌、胃癌、结肠癌、肾癌等均呈现高表达,并与肿瘤的侵袭、生长、转移等不良预后相关^[12]。

临床上可通过检测癌症患者血清 S100A9、MMP-9 表达水平,依照其浓度变化来判断患者手术治疗后病情变化,预测患者预后状态,发挥病情监测作用。郭涛弦等^[13]研究比较癌症患者手术前后 S100A9、MMP-9 表达水平变化,结果显示患者手术后 S100A9、MMP-9 表达水平明显降低。本研究中胰腺癌患者手术后 1 个月血清 S100A9、MMP-9 表达水平均明显低于治疗前,患者术后血清 S100A9、MMP-9 表达趋势与上述研究结果一致,说明手术治疗可有效降低患者 S100A9、MMP-9 表达水平,改善患者疾病与预后。Mroczko 等^[14]研究显示胰腺癌患者 S100A9、MMP-9 表达水平与其病理分期及淋巴结转移相关。本研究中,随着肿瘤直径增大、临床分期升高、出现淋巴结转移,患者血清 S100A9、MMP-9 表达水平也随之增高,这一结果更加证实了血清 S100A9、MMP-9 与胰腺癌增殖及转移有密切关系,其表达水平的升高,可作为胰腺癌诊断、预测预后的重要生物学标志,这与刘翔等^[15]研究报道中显示的胰腺癌患者血清 S100A9、MMP-9 高表达与其临床病理特征相关的结论相吻合。本研究进一步分析术后 1 个月患者血清 S100A9、MMP-9 含量与患者生存期的关系,结果显示 S100A9、MMP-9 高表达患者生存时间短于低表达患者,进一步说明血清 S100A9、MMP-9 含量可对胰腺癌患者的预后进行判断,Liao 等^[16]研究结果支持本结论。

综上所述,S100A9、MMP-9 在胰腺癌的发生、发展、转移与预后评估等方面具有较大的潜在价值,但其是否能够作为胰腺癌患者预后评估的可靠指标,还需要多中心,大样本的临床数据和研究支持,S100A9、MMP-9 及其相关信号通路可能是胰腺癌治疗中的潜在目标之一。

参考文献

- [1] Jia X, Du P, Wu K, et al. Pancreatic Cancer Mortality in China: Characteristics and Prediction[J]. *Pancreas*, 2018, 47(2):233-237.
- [2] 于洋,薛莹,仓顺东. 热休克蛋白 A2, IGFBP2 在胰腺癌患者的表达及与临床病理特征相关性[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2020, 12(3):371-375.
- [3] Kawano T, Shimamura M, Nakagami H, et al. Therapeutic Vaccine Against S100A9 (S100 Calcium - Binding Protein A9) Inhibits Thrombosis Without Increasing the Risk of Bleeding in Ischemic Stroke in Mice [J]. *Hypertension*, 2018, 72(6):1355-1364.
- [4] 徐华祥,徐帅帅,李硕,等. 术前血清 CA125 预测血清 CA19-9 正常胰腺癌患者术后生存的价值[J]. *中国临床医学*, 2020, 27(1):50-54.
- [5] 成东华,刘永锋,郭克敬. 胰腺癌的 TNM 分期[J]. *中国实用外科杂志*, 2004, 24(5):320-320.
- [6] 杨尹默,刘子文,赵玉沛,等. 胰腺癌诊治指南(2014 版)[J]. *中华消化外科杂志*, 2014, 13(11):831-837.
- [7] 陈剑,胡庆雷,孙彦春,等. 脑胶质瘤术后超选介入化疗联合系统化疗的临床研究[J]. *介入放射学杂志*, 2010, 19(10):817-820.
- [8] 吕少诚,贺强,郎韧,等. 外科手术在伴有门静脉系统侵犯的胰腺癌治疗中的临床价值[J]. *中华胰腺病杂志*, 2020, 20(4):254-258.
- [9] Francis A, Bosio E, Stone SF, et al. Markers Involved in Innate Immunity and Neutrophil Activation are Elevated during Acute Human Anaphylaxis: Validation of a Microarray Study [J]. *J Innate Immun*, 2018, 11(1):63-73.
- [10] Moravkova P, Kohoutova D, Vavrova J, et al. Serum S100A6, S100A8, S100A9 and S100A11 proteins in colorectal neoplasia: results of a single centre prospective study [J]. *Scand J Clin Lab Invest*, 2019, 34(18):1-6.
- [11] Awasthi N, Mikels - Vigdal A, Stefanutti E, et al. Abstract 4822: Anti-MMP9 antibody in combination with standard cytotoxic therapy in preclinical models of pancreatic cancer [J]. *Cancer Res*, 2018, 78(13):4822-4822.
- [12] 钱俊峰,徐芳,王洪源,等. 血清 CYFRA21-1、MMP-9 及 TTF-1 水平在诊断肺恶性肿瘤患者中的临床价值[J]. *中华全科医学*, 2019, 17(6):951-954.
- [13] 郭涛弦,范红松,罗勤. 非小细胞肺癌患者血清 S100A8, S100A9, MMP-9 的表达及意义[J]. *国际呼吸杂志*, 2020, 40(22):1729-1734.
- [14] Mroczko B, Ukaszewicz M, Groblewska M, et al. The significance of the measurement of serum matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) in pancreatic cancer patients [J]. *Clin Chim Acta*, 2019, 493(16):S126.
- [15] 刘翔. 胰腺癌患者血清中 S100A8 与 S100A9 水平及其临床意义[J]. *实用癌症杂志*, 2018, 14(2):188-190.
- [16] Liao WC, Huang BS, Yu YH, et al. Galectin-3 and S100A9: Novel Diabetogenic Factors Mediating Pancreatic Cancer-Associated Diabetes [J]. *Diabetes Care*, 2019, 42(9):1752-1759.

血清 Vaspin、MMP-2 联合 Lp-PLA2 对 CAS 斑块稳定性的诊断价值

蒋海昌^{1*} 郭亚鹏² 王枫¹ 郭道骝¹ 李磊¹

【摘要】目的 探讨血清内脏脂肪组织来源的丝氨酸蛋白酶抑制剂(Vaspin)、基质金属蛋白酶-2(MMP-2)联合脂蛋白相关磷脂酶 A2(Lp-PLA2)对颈动脉粥样硬化(CAS)斑块稳定性的诊断价值。**方法** 选取2018年1月至2019年12月在本院接受治疗的98例CAS患者作为研究对象,根据超声结果分为稳定斑块组($n=48$ 例)和不稳定性斑块组($n=50$ 例),选取同期健康体检者45例作为对照组,检测并比较三组血清 Vaspin、MMP-2、Lp-PLA2 水平,采用 Pearson 及散点图分析血清 Vaspin、MMP-2、Lp-PLA2 相关性,采用受试者工作特征曲线(ROC)评估各指标联合检测对 CAS 的诊断价值。**结果** Vaspin 水平:不稳定斑块组<稳定斑块组<对照组, MMP-2、Lp-PLA2 水平:不稳定斑块组>稳定斑块组>对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。Pearson 相关性分析结果显示, Lp-PLA2 与 MMP-2 呈正相关($P<0.05$),与 Vaspin 呈负相关($P<0.05$), Lp-PLA2 与 Vaspin、MMP-2 存在直线相关性($R^2=0.118、0.112$)。ROC 曲线结果显示, Vaspin、MMP-2 联合 Lp-PLA2 检测诊断效能最大, AUC 为 0.946, 特异性为 0.967, 灵敏性为 0.933。**结论** CAS 斑块患者血清 Vaspin、MMP-2、Lp-PLA2 水平明显增高,三者联合检测对评估斑块稳定性意义重大。

【关键词】 Vaspin; MMP-2; Lp-PLA2; 颈动脉粥样硬化斑块

Diagnostic value of serum vaspin and MMP-2 combined with Lp-PLA2 for the stability of CAS plaques

JIANG Haichang^{1*}, GUO Yapeng², WANG Feng², GUO Daoliu², LI Lei²

(1. Department of Neurology, Wuxi People's Hospital, Nanjing Medical University, Wuxi, Jiangsu, China, 214000; 2. Department of Neurology, Yijishan Hospital, Wannan Medical College, Wuhu, Anhui, China, 241000)

【ABSTRACT】Objective To investigate the diagnostic value of serum visceral adipose tissue-derived serine protease inhibitor (vaspin) and matrix metalloproteinase - 2 (MMP - 2) combined with lipoprotein - associated phospholipase A2 (Lp - PLA2) for the stability of carotid atherosclerosis (CAS) plaques. **Methods** A total of 98 patients with CAS treated in the hospital were selected as the research subjects from January 2018 to December 2019. According to ultrasound findings, the patients were divided into the stable plaque group ($n=48$) and the unstable plaque group ($n=50$). Meanwhile, 45 healthy individuals were selected as the control group. The levels of serum vaspin, MMP - 2, and Lp - PLA2 were compared among the three groups. The correlation of serum Lp - PLA2, vaspin and MMP - 2 was analyzed using Pearson analysis method and scatter plots. The diagnostic value of joint detection of the three indicators for the stability of CAS plaques was evaluated using the receiver operating characteristic (ROC) curves. **Results** The order of vaspin level in the three groups from low to high was as follows: the unstable plaque group <the stable plaque group <the control group. The order of MMP-2 and Lp-PLA2 levels from high to low was the unstable plaque group >the stable

基金项目:江苏省卫生健康委科研项目(LGY201835)

作者单位:1. 南京医科大学附属无锡市人民医院神经内科,江苏,无锡 214000

2. 皖南医学院附属弋矶山医院神经内科,安徽,芜湖 241000

*通信作者:蒋海昌, E-mail: jhcer@sina.com

plaque group > the control group, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). Pearson correlation analysis showed that Lp-PLA2 was positively correlated with MMP-2 ($P<0.05$), and was negatively correlated with vaspin ($P<0.05$), and there was a linear correlation between Lp-PLA2 and vaspin, MMP-2 ($R^2=0.118, 0.112$). ROC curve analysis found that the joint detection of vaspin, MMP-2 and Lp-PLA2 has the highest diagnostic efficiency, with an AUC of 0.946, specificity of 0.967, and sensitivity of 0.933. **Conclusion** The levels of serum vaspin, MMP-2 and Lp-PLA2 in patients with CAS plaques are significantly increased. The joint detection of the three is of great significance to assess the stability of plaques.

[KEY WORDS] Vaspin; MMP-2; Lp-PLA2; Carotid atherosclerosis plaque

颈动脉粥样硬化是一种常见的心脑血管疾病,多发生于中老年人群,病死率和致残率较高^[1]。颈动脉不稳定斑块脱落后成为血流中栓子,随血流到达大脑会堵塞远端脑动脉,导致血管堵塞和狭窄,引发缺血性脑血管事件发生^[2]。准确评估患者颈动脉斑块稳定性,进行针对性治疗对患者预后意义重大。临床主要采用彩色多普勒超声、CT血管造影等评估斑块稳定性,但缺乏定量指标^[3]。近年来有研究认为脂蛋白相关磷脂酶A2 (Lipoprotein associated phospholipase A2, Lp-PLA2) 活性升高与急性脑梗死发生和复发有关^[4]。血清内脏脂肪组织来源的丝氨酸蛋白酶抑制剂(visceral adipose tissue-derived serine protease inhibitor, Vaspin)是一种新发现的脂肪细胞因子,可以抑制内皮细胞凋亡与高糖刺激血管平滑肌细胞增殖,与2型糖尿病及血管病变密切相关^[5]。基质金属蛋白酶-2(Matrix metalloproteinase-2, MMP-2)不仅能够降解细胞外基质蛋白质,还可以促进血管收缩 MMP2 基因C端非催化片段形成^[6]。本研究将探究颈动脉粥样硬化患者血清 Vaspin、MMP-2、

Lp-PLA2 水平变化及其临床意义,为临床治疗方案提供理论参考依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2018年1月至2019年12月在本院接受治疗的98例颈动脉粥样硬化患者。纳入标准:①参照《中国头颈部动脉粥样硬化诊治共识》^[7]的标准,经超声检测发现存在高回声、异质回声、等回声以及低回声斑块,提示颈动脉粥样硬化斑块形成;②无颈部肿块等器质性病变;③治疗依从性高;④患者或家属知情且自愿参与研究并签署知情同意书。排除标准:①严重感染患者;②合并恶性肿瘤者;③既往有脑梗死病史;④免疫缺陷患者;⑤合并血液系统疾病。根据超声检查结果分为稳定斑块组($n=48$ 例)和不稳定性斑块组($n=50$ 例)。选取同期45例健康体检者作为对照组。三组受试者的基本资料比较差异无统计学意义($P>0.05$),见表1。本研究经医院医学伦理委员会批准通过。

表1 3组受试者基本资料比较 [$n(\%)$, ($\bar{x}\pm s$)]

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

组别	n	性别(男/女)	年龄(岁)	BMI(kg/m^2)	饮酒史	吸烟史
不稳定斑块组	50	32/18	54.82 $\pm$ 12.51	23.14 $\pm$ 4.58	20(40.00)	19(38.00)
稳定斑块组	48	28/20	53.61 $\pm$ 11.24	22.39 $\pm$ 4.35	21(43.75)	18(37.50)
对照组	45	26/19	52.29 $\pm$ 11.67	23.25 $\pm$ 4.81	17(37.78)	19(42.22)
F/χ^2 值		0.481	0.541	0.496	0.354	0.261
P 值		0.786	0.583	0.610	0.838	0.878

1.2 方法

Vaspin、MMP-2、Lp-PLA2 检测方法:患者入院第2d、对照组体检当日清晨空腹静脉取血5 mL, 2 000 r/min 离心8 min,取上清液待测。采用双抗体一步夹心法酶联免疫吸附法检测 Vaspin、Lp-PLA2,试剂盒均购自上海臻科生物科技有限公司,采用明胶酶谱法检测 MMP-2,试剂盒购自上

海信帆生物科技有限公司,严格按照试剂盒说明操作。

1.3 斑块稳定性的评估标准^[8]

颈动脉斑块分类:①扁平斑:内膜回声不光滑,局部增厚1.5~2.0 mm;②软斑:呈局限性均匀或不均匀低回声、弱回声斑块,隆起厚度超过1.5 mm,表面有连续性轮廓回声;③硬斑:局部回

声增强,后方声衰减较明显,颈动脉与斑块基底附着处基底宽为宽基底,附着处基底窄为窄基底;④溃疡型斑:斑块粗糙不平,溃疡边缘为低回声,斑块表面缺损呈火山口样,长度、深度均大于2 mm。

稳定斑块:扁平斑、宽底硬斑,不稳定型斑块:溃疡斑、软斑、窄底硬斑。

1.4 观察指标

①检测并比较三组受试者的Vaspin、MMP-2、Lp-PLA2水平差异。②采用Pearson相关性及散点图分析Lp-PLA2水平与Vaspin、MMP-2的相关性。③采用ROC曲线评估Vaspin、MMP-2、Lp-PLA2三个指标及其联合检测对颈动脉粥样硬化斑块稳定性的诊断价值。

1.5 统计学分析

采用SPSS 18.0统计软件统计分析数据,计数资料采用 $n(\%)$ 表示,行 χ^2 检验;计量资料采用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,两两比较应用 t 检验,多组间比较行方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3组Vaspin、MMP-2、Lp-PLA2水平比较

Vaspin水平:不稳定斑块组<稳定斑块组<对照组,MMP-2、Lp-PLA2水平:不稳定斑块组>稳定斑块组>对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表2。

表2 3组Vaspin、MMP-2、Lp-PLA2水平比较($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of vaspin, MMP-2 and Lp-PLA2 levels among the 3 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	Vaspin ($\mu\text{g/L}$)	MMP-2 (ng/mL)	Lp-PLA2 (g/L)
不稳定斑块组	50	1.16 $\pm$ 0.18 ^{ab}	382.46 $\pm$ 57.93 ^{ab}	116.78 $\pm$ 33.89 ^{ab}
稳定斑块组	48	1.57 $\pm$ 0.26 ^a	263.76 $\pm$ 44.39 ^a	84.59 $\pm$ 21.76 ^a
对照组	45	1.92 $\pm$ 0.38	215.48 $\pm$ 42.64	53.77 $\pm$ 12.74
<i>F</i> 值		86.629	147.536	76.972
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$,与稳定斑块组比较,^b $P < 0.05$ 。

2.2 颈动脉粥样硬化斑块不稳定组患者Lp-PLA2与Vaspin、MMP-2的相关性

Pearson相关性分析结果显示,Lp-PLA2与MMP-2呈正相关($r = -0.489$, $P < 0.05$),与Vaspin呈负相关($r = 0.579$, $P < 0.05$)。Lp-PLA2与Vaspin、MMP-2存在直线相关性($R^2 = 0.118$ 、 0.112)。见图1。

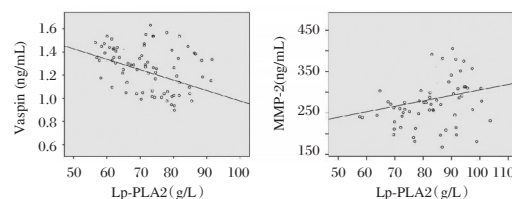


图1 Lp-PLA2与Vaspin、MMP-2的直线相关性散点图

Figure 1 Scatter plot of linear correlation between Lp-PLA2 and vaspin, MMP-2

2.3 Vaspin、MMP-2、Lp-PLA2水平对颈动脉粥样硬化斑块稳定性的诊断价值

ROC曲线结果显示,Vaspin、MMP-2联合Lp-PLA2检测诊断效能最大,AUC为0.946,特异性为0.967,灵敏性为0.933。见表3、图2。

表3 Vaspin、MMP-2、Lp-PLA2水平对颈动脉粥样硬化斑块稳定性的诊断价值

Table 3 Diagnostic value of vaspin, MMP-2 and Lp-PLA2 levels for the stability of CAS plaques

诊断指标	AUC	特异性	灵敏性	95%CI	<i>P</i> 值
Vaspin	0.641	0.700	0.733	0.493~0.789	0.026
MMP-2	0.793	0.833	0.767	0.675~0.912	0.015
Lp-PLA2(g/L)	0.903	0.900	0.833	0.829~0.978	<0.001
三者联合检测	0.946	0.967	0.933	0.893~0.998	<0.001

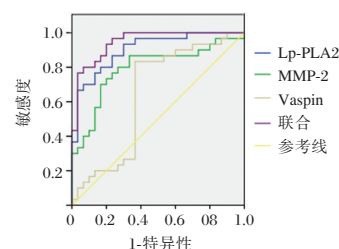


图2 ROC曲线

Figure 2 ROC curve

3 讨论

缺血性脑卒中发生与颈动脉粥样硬化斑块形成关系密切,动脉粥样硬化不稳定斑块破裂出血、脱落会增加血管狭窄甚至栓塞风险,进而发生缺血性中风^[9]。医生会根据病人血管狭窄程度和斑块状况分析患者病情进而制定后续治疗方案,可见准确评估并预测颈动脉粥样硬化斑块稳定性对治疗和预防缺血性脑卒中意义重大^[10]。

本研究发现不稳定斑块组、稳定斑块组、对照组Vaspin依次增加上升,MMP-2、Lp-PLA2水平依次下降,显示Vaspin、MMP-2、Lp-PLA2参与介导斑块形成整个过程。分析认为炎症反应在颈动脉

粥样硬化斑块的形成过程中起到重要作用,Vaspin则可以经由抑制炎症反应来延缓动脉粥样硬化过程,而存在斑块患者Vaspin水平下降导致机体对于炎症抑制作用减弱;MMP-2经由增加细胞核密度、降解细胞外基质成分以及上调内膜面积而为斑块形成提供有利条件,因此MMP-2水平上升显示机体斑块形成增多;Lp-pla2作为一种血管特异性炎症介质,参与斑块炎症过程,即斑块形成和斑块破裂过程,Lp-pla2上升显示斑块形成和斑块破裂增加^[11]。国内研究者认为随着冠心病患者病情加重,血清Vaspin水平明显下降,这种下降趋势增加了斑块不稳定性^[12]。Chen等^[13]研究发现颈动脉粥样硬化斑块稳定患者的血清MMP-2水平显著高于不稳定斑块患者和健康者,与本研究结果基本一致。Pearson相关性分析结果显示,Lp-PLA2与MMP-2成正相关,与Vaspin成负相关,散点图结果显示Lp-PLA2与Vaspin、MMP-2存在直线相关性,表明在颈动脉粥样硬化斑块不稳定患者体内随着Lp-PLA2、MMP-2相应升高,Vaspin会相应降低,显示三指标可能一同介导动脉粥样硬化过程。Wang等^[14]研究认为Lp-pla2水平上升会增加动脉粥样硬化斑块破裂的风险,Lp-pla2有助于预测中风发生与复发。国内研究则发现MMP-9、Lp-PLA2以及C反应蛋白单一指标用于评估斑块性质AUC值均超过0.7,而三指标联合用于评估斑块性质AUC值接近0.9,显示各指标联合可以有效提高对于斑块性质评估价值^[15]。本研究中ROC曲线显示,Vaspin、MMP-2联合Lp-PLA2检测诊断效能最大,AUC为0.946,特异性为0.967,灵敏性为0.933,也显示三种指标联合有助于提高对颈动脉粥样硬化斑块稳定性的预测价值。虽然Lp-PLA2在诊断颈动脉粥样硬化斑块稳定性的AUC值较高,但特异性不高,对颈动脉粥样硬化斑块稳定性的诊断仍有一定的局限性,三者联合检测诊断效能较高,可作为临床诊断的新方式。

综上所述,Vaspin、MMP-2、Lp-PLA2对颈动脉粥样硬化斑块稳定性具有一定诊断价值,三者联合检测具有更好诊断效能,可为临床上预防缺血性脑卒中提供评估依据。

参考文献

[1] 谭红,朱红霞,张可帅.颈动脉粥样硬化患者中血清Lp-PLA2、CD147的表达及意义[J].分子诊断与治疗杂志,

- 2020, 12(8):1030-1033.
- [2] Wannig C, Fang X, Hua Y, et al. Lipoprotein-Associated Phospholipase A2 and Risk of Carotid Atherosclerosis and Cardiovascular Events in Community-Based Older Adults in China[J]. *Angiology*, 2018, 69(1):49-58.
- [3] Spacek M, Zemanek D, Hutrya M, et al. Vulnerable atherosclerotic plaque - a review of current concepts and advanced imaging [J]. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 2018, 162(1):10-17.
- [4] Wei L, Ke Z, Zhao Y, et al. The elevated lipoprotein-associated phospholipase A2 activity is associated with the occurrence and recurrence of acute cerebral infarction[J]. *Neuroreport*, 2017, 28(6):325-330.
- [5] Sato K, Shirai R, Yamaguchi M, et al. Anti-Atherogenic Effects of Vaspin on Human Aortic Smooth Muscle Cell/Macrophage Responses and Hyperlipidemic Mouse Plaque Phenotype[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(6):1732.
- [6] Ying R, Li SW, Chen JY, et al. Endoplasmic reticulum stress in perivascular adipose tissue promotes destabilization of atherosclerotic plaque by regulating GM-CSF paracrine [J]. *J Transl Med*, 2018, 16(1):105-117.
- [7] 中华医学会神经病学分会,中华医学会神经病学分会脑血管病学组.中国头颈部动脉粥样硬化诊治共识[J].*中华神经科杂志*, 2017, 50(8):572-578.
- [8] Fisher M. Stroke. Geometry is destiny for carotid atherosclerotic plaques[J]. *Nat Rev Neurol*, 2012, 8(3):127-129.
- [9] Meng X, Piao L, Wang H, et al. Deficiency of cysteinyl cathepsin K suppresses the development of experimental intimal hyperplasia in response to chronic stress [J]. *J Hypertens*, 2020, 38(8):1514-1524.
- [10] Sakellarios AI, Bizopoulou SP, Papafaklis MI, et al. Natural history of carotid atherosclerosis in relation to the hemodynamic environment[J]. *Angiol*, 2017, 68(2):109-118.
- [11] 宁庆,尹浩军,孙广锋,等.血清Lp-PLA2、MMP-9表达水平与缺血性脑卒中患者血管性痴呆的相关性[J].*中南医学科学杂志*, 2020, 48(6):572-575.
- [12] 蒋宾,曹莉梅,董能斌,等.冠心病患者血清Vaspin和MCP-1水平变化及与患者心肌损伤程度及心功能的相关性分析[J].*河北医学*, 2020, 26(12):1986-1991.
- [13] Chen L, Yang Q, Ding R, et al. Carotid thickness and atherosclerotic plaque stability, serum inflammation, serum MMP-2 and MMP-9 were associated with acute cerebral infarction[J]. *Exp Therap Med*, 2018, 16(6):5253-5257.
- [14] 张伟,张伊湄,李琳琳,等.基于KIM分型脑白质病变患者血清脂蛋白相关磷脂酶A2变化及其与颈动脉粥样硬化斑块的相关性[J].*中华医学杂志*, 2020, 100(15):1130-1135.
- [15] 廖琴,解义菊,曹杰.能谱CT血管造影技术评估血清学指标与冠状动脉斑块性质的关系[J].*湖南师范大学学报(医学版)*, 2020, 17(6):74-78.

· 论 著 ·

慢性萎缩性胃炎 Hp 感染患者胃黏膜形态及 IL-34、PLR 水平探讨

杨小乔 梁彪* 叶丽芳 吴嘉钊 陈睿妍 谭文惠

【摘要】目的 探讨典型胃黏膜形态结合血清白细胞介素-34(IL-34)、血小板/淋巴细胞之值(PLR)水平检测与慢性萎缩性胃炎(CAG)患者幽门螺旋杆菌(Hp)感染关联性及其临床意义。**方法** 选取2019年1月至2020年2月本院268例CAG患者,根据有无Hp感染分组,其中感染组($n=140$)、未感染组($n=128$)。观察对比两组典型胃黏膜形态、血清IL-34、PLR水平,分析典型胃黏膜形态与血清IL-34、PLR水平相关性,ROC曲线分析典型胃黏膜形态、血清IL-34、PLR水平对CAG患者Hp感染的诊断价值。**结果** 两组典型胃黏膜形态、血清IL-34、PLR水平相比,差异有统计学意义($P<0.05$);颗粒型患者IL-34水平低于灰白型、浅凹陷型,PLR高于灰白型、浅凹陷型,差异有统计学意义($P<0.05$);Logistic回归分析显示,胃炎分型、萎缩程度分型、胃黏膜呈颗粒型、IL-34、PLR均为CAG患者Hp感染的影响因素($P<0.05$);ROC曲线显示,典型胃黏膜形态、血清IL-34、PLR水平联合诊断AUC均为最大,为0.854,最佳敏感度为70.71%,特异度为87.50%($P<0.05$)。**结论** Hp感染会导致CAG患者血清IL-34、PLR表达异常,促进胃黏膜形态改变,典型胃黏膜形态结合血清IL-34、PLR水平检测可提高Hp感染诊断价值,利于加深对CAG致病机制的研究,改善临床预后。

【关键词】 典型胃黏膜形态;白细胞介素-34;血小板/淋巴细胞之值;慢性萎缩性胃炎

Study on gastric mucosal morphology and IL - 34 and PLR levels in patients with *Helicobacter pylori* infection in chronic atrophic gastritis

YANG Xiaoqiao, LIANG Biao*, YE Lifang, WU Jiachuan, CHEN Ruiyan, TAN Wenhui

(Center of Digestive Endoscopy, The Second People's Hospital of Guangdong, Guangzhou, Guangdong, China, 510317)

[ABSTRACT] Objective To investigate the relationship between the detection of typical gastric mucosal morphology combined with serum interleukin-34 (IL-34) level and the value of platelet/lymphocyte ratio (PLR) and *Helicobacter pylori* (Hp) infection in patients with chronic atrophic gastritis (CAG) and its clinical significance. **Methods** A total of 268 CAG patients in our hospital from January 2019 to February 2020 were selected and divided into two groups according to the presence or absence of Hp infection, including the infected group ($n=140$) and the uninfected group ($n=128$). The two groups of typical gastric mucosal morphology, serum IL-34 level and The PLR value were observed. The correlation between typical gastric mucosal morphology and serum IL-34 level/the PLR value was analyzed. ROC curve analysis was used to analyze the diagnostic value of typical gastric mucosal morphology, serum IL-34 and PLR levels in CAG patients with Hp infection. **Results** The two groups of typical gastric mucosal morphology, serum IL-34 level and the PLR value were statistically significant ($P<0.05$). The level of IL-34 in the granular type patients was lower than that in the gray type and shallow depression type, and the PLR value was higher than that in the gray type and Shallow depression type, the difference was statistically significant ($P<0.05$). Logistic regression analysis showed that the types of gastritis, the type of atrophy, the granular type of gastric mucosa, IL-34,

基金项目:广东省中医药管理局项目(20181296)

作者单位:广东省第二人民医院消化内镜中心,广东,广州 510317

*通信作者:梁彪, E-mail:liang-lb@139.com

and PLR are all influencing factors of Hp infection in CAG patients ($P<0.05$). The ROC curve showed that the combined diagnosis of typical gastric mucosal morphology, serum IL-34 level, and the PLR value had the highest AUC, which was 0.854, with best sensitivity of 70.71%, and the specificity of 87.50% ($P<0.05$).

Conclusion Hp infection can cause the abnormal expression of serum IL-34 and PLR in CAG patients and promote changes in gastric mucosal morphology. The typical gastric mucosal morphology combined with the detection of serum IL-34 and PLR can improve the diagnostic value of Hp infection and help to deepen the research on the pathogenic mechanism of CAG, and improve the clinical prognosis.

[KEY WORDS] Typical gastric mucosal morphology; Interleukin - 34; Platelet/lymphocyte ratio; Chronic atrophic gastritis

慢性萎缩性胃炎(Chronic atrophic gastritis, CAG)是胃黏膜炎症向癌变转化的关键点,被定义为癌前状态,与胃癌紧密联系^[1]。CAG内镜下表现有时并不十分典型,诊断准确率无法完全满足临床需要,胃镜活检仍是确诊的金标准,但该方法为侵入性检查,且无法对患者病情进展及预后做动态监测^[2]。CAG致病机制尚待阐明,幽门螺旋杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)感染是重要危险因素之一^[3]。白细胞介素-34(Interleukin-34, IL-34)、血小板/淋巴细胞之值(Platelet - lymphocyte ratio, PLR)是新的炎症标志物,已有研究报道,二者对慢性胃炎患者预后有一定预测价值^[4]。Hp感染会刺激胃粘膜发生炎症反应,而IL-34、PLR在Hp感染引起CAG中的作用尚有待明确。本研究首次分析典型胃黏膜形态结合血清IL-34、PLR水平检测与CAG患者HP感染关联性及临床意义,为深入研究CAG致病机制提供依据。报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2019年1月至2020年2月本院268例CAG患者,根据有无Hp感染分组,其中感染组($n=140$)、未感染组($n=128$)。纳入标准:均符合《慢性萎缩性胃炎中西医结合诊疗共识意见(2017年)》^[5]中相关诊断标准,并经胃镜活检确诊;感染组¹³C尿素呼气试验阳性;3个月内未服用抗生素、益生菌、质子泵抑制剂等可能影响检测结果的药物;患者及家属知情同意。排除标准:上消化道手术史;入组前4周出现急性感染或重大刺激;自身免疫性疾病;其他重要器官严重疾病,如恶性肿瘤、心功能不全等;长期使用非甾体类抗炎药;妊娠期或哺乳期女性。所有患者及家属均知情同意,本研究经本院医学伦理委员会审批同意。

1.2 方法

①内镜下诊断及形态分类:采用奥林巴斯H260胃镜完成检查,诊断参照《中国慢性胃炎共识意见(2012年,上海)》^[6],镜下表现为黏膜红白相间,以白为主,部分区域血管可见,皱褶浅平甚至消失,伴或不伴颗粒状改变。形态分类:颗粒型:胃窦黏膜表面弥漫性颗粒样改变;灰白型:病变区域呈现大片灰白样改变;浅凹陷型:病变处黏膜层变薄,相对发白,周围黏膜发红,与正常组织分界清晰,中央小血管透见。②血清IL-34、PLR测定:入组24 h内,取空腹静脉血4 mL,离心(半径8 cm, 3 500 r/min, 9 min),取血清,IL-34采用酶联免疫吸附法检测(上海通蔚生物科技有限公司试剂盒);通过血常规结果计算PLR。

1.3 统计学方法

采用统计学软件SPSS 22.0处理数据,计数资料以 $n(\%)$ 描述,计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 描述,两组间比较用 t 检验;多组间比较用 F 检验。影响因素采用Logistic回归分析;预测价值采用受试者工作特征(ROC)曲线,获取曲线下面积(AUC)、置信区间、敏感度、特异度及cut-off值,联合预测实施Logistic二元回归拟合,返回预测概率 $\text{logit}(p)$,将其作为独立检验变量。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组临床资料对比

两组性别、年龄、BMI、病程、吸烟及饮酒率相比,差异无统计学意义($P>0.05$),感染组胃炎分型及萎缩程度分型相比,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表1。

2.2 两组典型胃黏膜形态、血清IL-34、PLR水平

两组典型胃黏膜形态、血清IL-34、PLR水平相比,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表2。胃镜下典型胃黏膜形态见图1。

表1 两组临床资料对比 [n(%)]

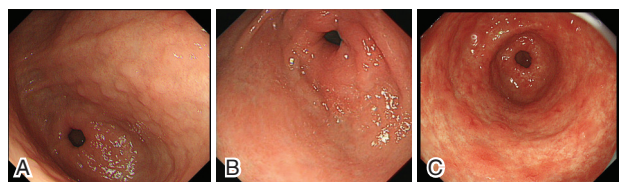
Table 1 Comparison of clinical data between the two groups [n(%)]

指标		感染组 (n=140)	未感染组 (n=128)	χ^2 值	P值
性别	男	79(56.43)	68(53.13)	0.295	0.587
	女	61(43.57)	60(46.88)		
年龄	≤60岁	82(58.57)	78(60.94)	0.276	0.599
	>60岁	58(41.43)	50(39.06)		
BMI	≤23 kg/m ²	72(51.43)	65(50.78)	0.011	0.916
	>23 kg/m ²	68(48.57)	63(49.22)		
病程	≤2年	75(53.57)	68(53.13)	0.005	0.942
	>2年	65(46.43)	60(46.88)		
吸烟	是	21(15.00)	17(13.28)	0.162	0.687
	否	119(85.00)	111(86.72)		
饮酒	是	30(21.43)	25(19.53)	0.148	0.701
	否	110(78.57)	103(80.47)		
胃炎分型	轻度	7(5.00)	40(31.25)	5.588	<0.001
	中度	91(65.00)	78(60.94)		
	重度	42(30.00)	10(7.81)		
萎缩程度分型	轻度	45(32.14)	56(43.75)	2.120	0.034
	中度	84(60.00)	70(54.69)		
	重度	11(7.86)	2(1.56)		

表2 两组典型胃黏膜形态、血清 IL-34、PLR 水平对比 [n(%), ($\bar{x} \pm s$)]

Table 2 Comparison of typical gastric mucosal morphology, serum IL-34 and PLR levels between the two groups under endoscope [n(%), ($\bar{x} \pm s$)]

指标	感染组 (n=140)	未感染组 (n=128)	t/ χ^2 值	P值
典型胃黏膜形态				
颗粒型	92(65.71)	10(7.81)	95.123	<0.001
灰白型	26(18.57)	62(48.44)		
浅凹陷型	22(15.71)	56(43.75)		
IL-34 (pg/mL)	11.37±4.06	13.68±4.31	4.518	<0.001
PLR	234.72±35.19	205.69±30.87	7.151	<0.001



注: A为颗粒型; B为灰白型; C为浅凹陷型。

图1 胃镜病理图(×85)

Figure 1 Gastroscopic pathological view (×85)

表5 ROC曲线相关数据

Table 5 ROC curve related data

指标	AUC	95%CI	Z值	截断值	敏感度(%)	特异度(%)	P值
Hp感染	颗粒型	0.790	0.736~0.837	12.378	65.71	92.19	<0.001
	IL-34	0.664	0.604~0.720	4.948	≤11.99 pg/mL	67.14	<0.001
	PLR	0.741	0.684~0.792	8.136	>227.22	55.00	<0.001
	联合诊断	0.854	0.806~0.894	15.246		70.71	<0.001

2.3 血清 IL-34、PLR 水平与典型胃黏膜形态的关系

CAG Hp 感染患者中,颗粒型患者 IL-34 水平低于灰白型、浅凹陷型,PLR 高于灰白型、浅凹陷型,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表3。

表3 血清 IL-34、PLR 水平与典型胃黏膜形态的关系 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 The relationship between serum IL-34, PLR levels and typical gastric mucosal morphology under endoscopy ($\bar{x} \pm s$)

典型胃黏膜形态	例数	IL-34 (pg/mL)	PLR
颗粒型	93	10.82±1.82	241.17±19.84
灰白型	26	12.56±2.06	222.10±16.17
浅凹陷型	22	12.53±3.14	221.78±20.85
F值		10.537	15.551
P值		<0.001	<0.001

2.4 CAG 患者 Hp 感染影响因素

以 Hp 感染为因变量(赋值:未感染=0,感染=1),将上述有差异因素纳入 Logistic 回归分析,结果显示,胃炎分型、萎缩程度分型、胃黏膜呈颗粒型、IL-34、PLR 均为 CAG 患者 Hp 感染的影响因素($P<0.05$)。见表4。

表4 CAG 患者 Hp 感染影响因素

Table 4 Influencing factors of Hp infection in CAG patients

因素	β 值	S.E.值	Wald χ^2	OR值	95%CI	P值
胃炎分型	1.711	0.321	28.413	5.535	2.987~10.256	<0.05
萎缩程度分型	1.786	0.341	27.427	5.965	3.145~11.312	<0.05
典型胃黏膜形态						
颗粒型	1.524	0.324	22.134	4.592	2.146~9.826	<0.05
灰白型	0.069	0.309	0.050	1.071	0.732~1.568	>0.05
浅凹陷型	-0.076	0.341	0.050	0.927	0.694~1.237	>0.05
IL-34	-0.865	0.271	10.188	0.421	0.254~0.698	<0.05
PLR	1.687	0.369	20.905	5.404	3.145~9.286	<0.05

注:赋值:胃炎分型:轻度=1,中度=2,重度=3;萎缩程度分型:轻度=1,中度=2,重度=3;典型胃黏膜形态为无序变量,引入哑变量(浅凹陷型=MCN1,灰白型=MCN2,颗粒型=MCN3);IL-34、PLR:以平均值为界,≤平均值=1,>平均值=2。

2.5 典型胃黏膜形态、血清 IL-34、PLR 水平对 CAG 患者 Hp 感染诊断价值

绘制典型胃黏膜形态、血清 IL-34、PLR 水平对 CAG 患者 Hp 感染的诊断价值的 ROC 曲线,显示典型胃黏膜形态、血清 IL-34、PLR 水平联合诊断 AUC 均为最大,为 0.854,最佳敏感度为 70.71%,特异度为 87.50%($P<0.05$)。见表5,图2。

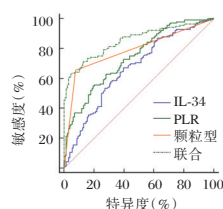


图2 ROC 曲线

Figure 2 ROC curve

3 讨论

目前,病理学检查仍是CAG确诊的金标准。近年来,随内镜技术发展,内镜下CAG确诊率显著升高,但总体准确率并不十分理想。李飞鹏等^[7]研究中,225例CAG患者内镜下明确诊断率仅78.7%,23例误诊为黏膜隆起性病变、息肉样病变,38例误诊为慢性浅表性胃炎(CSG)。可见单纯内镜下诊断无法满足临床要求。因此,发现一种无创、准确检测CAG的方法并进行预后动态评估具有重要临床意义。

Hp感染是CAG重要致病因素,CAG年发病率在0%~11%,而无Hp感染人群中发病率低于1%,Hp感染者CAG风险显著高于无Hp感染者^[8]。Hp可促使免疫活性细胞释放炎症细胞因子、增殖因子、生长因子等,相互作用,通过不同调节机制作用于胃粘膜,参与CAG发生发展。PLR是机体炎症反应的重要指标,Hp感染时,多种细胞受到刺激,分泌PLT活化因子(PAF),PLT数量增加,进而促使PLR升高。陈福敏等^[9]研究显示,Hp感染可增加胃炎炎症程度,导致PLT、PLR升高。本研究发现,Hp感染CAG患者血清PLR水平高于未感染者,与上述分析一致。

IL-34是新型细胞因子,参与单核巨噬细胞活化和分化,促进IL-6、TNF等多种细胞因子分泌。研究显示,应激细胞中,IL-34的mRNA和蛋白水平上调,NF- κ B是其调节因子^[10]。周红菊等^[11]研究显示,胃癌、慢性胃炎中,血清IL-34水平表达增高,可作为Hp感染阴性的胃癌、慢性胃炎的血清学标志物。其原因在于,胃部炎症会引起淋巴细胞、中性粒细胞、巨噬细胞等的浸润,并分泌一些促炎因子,如IL-6、IL-10、IL-11等,高水平促炎因子刺激细胞内激酶磷酸化,诱导激活蛋白1(AP-1)、NF- κ B等转录因子表达。以往研究显示,HP分为I型和II型,I型可产生细胞毒素,毒性较强^[12]。HP I型菌株携带40 kb左右的特殊基因片段[cag致病岛(cag PAI)],激活NF- κ B途径的

能力更强^[13]。cag PAI也被认为是NF- κ B的重要诱导因子。本研究中并未对Hp感染患者进行cag PAI检测,所检测到的CAG患者中感染的HP菌株是否携带cag PAI未可知。根据结果推测,纳入实验的CAG患者可能感染的是cag PAI阴性HP菌株,无法激活NF- κ B通道,进而对血清IL-34表达产生影响。后续研究可以此为切入点,进一步明确血清IL-34表达与Hp感染的关系。

CAG内镜下表现分为三种类型,即颗粒型、灰白型、浅凹陷型,研究报道,颗粒型患者Hp感染率、肠上皮化生率较高^[14]。本研究结果提示CAG患者血清IL-34、PLR水平可能与典型胃黏膜形态存在一定相关性。Logistic回归分析结果可推测胃黏膜呈颗粒型CAG患者Hp感染率高,进而影响血清IL-34、PLR表达及胃炎分型、萎缩程度分型。因此,本研究创新性探讨典型胃黏膜形态、血清IL-34、PLR水平对CAG患者Hp感染的诊断价值,ROC曲线显示,颗粒型、IL-34 $\leq$ 11.99 pg/mL、PLR $>$ 227.22的患者要高度怀疑Hp感染的可能性,联合诊断AUC最高,达0.854。临床可同时检测典型胃黏膜形态、血清IL-34、PLR水平,为诊断Hp感染提供更全面、可靠的参考信息。

综上可知,典型胃黏膜形态、血清IL-34、PLR水平均与CAG患者Hp感染有关,在CAG患者Hp感染对不同介质影响研究,利于加深对CAG致病机制的研究,为CAG及胃癌防治提供帮助。

参考文献

- [1] Rossi AF, Cadamuro AC, Biselli-Perico JM, et al. Interaction between inflammatory mediators and miRNAs in Helicobacter pylori infection [J]. Cell Microbiol, 2016, 18 (10): 1444-1458.
- [2] 孙雪飞,何旭.慢性萎缩性胃炎的胃镜下表现与病理诊断[J].实用临床医药杂志,2017,21(1):194-195.
- [3] 顾星,吴莺.幽门螺杆菌毒力因子、宿主反应与相关胃肠疾病关系的研究进展[J].热带医学杂志,2019,19(2):249-252.
- [4] 朱子毓,汪亦民,李凤科,等.血小板与淋巴细胞比值和中性粒细胞与淋巴细胞比值对TNM I至III期胃癌患者的预后评估[J].中华消化杂志,2020,40(2):93-98.
- [5] 中国中西医结合学会消化系统疾病专业委员会.慢性萎缩性胃炎中西医结合诊疗共识意见(2017年)[J].中国中西医结合消化杂志,2018,26(2):121-131.
- [6] 中华医学会消化病学分会,房静远,刘文忠,等.中国慢性胃炎共识意见(2012年,上海)[J].中华消化杂志,2013,33(1):5-16.
- [7] 李飞鹏,胡彦辉.OLGIM分级系统、内镜下形态学分类对慢性萎缩性胃炎癌变风险的评估(下转第1861页)

复发性流产患者PAI-1、TSP-1、D-D水平变化及其临床意义

张亚巍* 张利萍 于治芳

【摘要】目的 观察复发性流产(RSA)患者纤溶酶原活化物抑制因子(PAI-1)、血小板反应蛋白-1(TSP-1)、交联纤维蛋白降解产物(D-D)水平变化及其临床意义。**方法** 选取2018年1月至2019年3月本院收治的184例复发性流产患者作为RSA组,根据流产次数分为RSA1组(流产次数>3次)和RSA2组(流产次数≤3次),根据胎儿预后情况分为流产组和活产组。选取同时期具有正常分娩史、染色体、内分泌等检查均为正常且本次妊娠正常女性172例作为正常妊娠组,检测各组血清PAI-1、TSP-1、D-D水平,采用Pearson对RSA组血清PAI-1、TSP-1、D-D水平进行相关性分析,记录RSA组妊娠结局。**结果** RSA组血清PAI-1、D-D、TSP-1含量显著高于正常妊娠组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。RSA组血清PAI-1与TSP-1表达水平无显著相关性($P>0.05$),PAI-1与D-D表达水平无显著相关性($P>0.05$),TSP-1与D-D表达水平无显著相关性($P>0.05$)。流产组血清PAI-1、TSP-1、D-D水平显著高于活产组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。RSA1组PAI-1、TSP-1、D-D水平显著高于RSA2组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。**结论** RSA患者血清PAI-1、TSP-1、D-D水平呈高表达,对RSA妊娠结局具有一定的临床应用价值。

【关键词】 复发性流产;纤溶酶原活化物抑制因子;血小板反应蛋白-1;交联纤维蛋白降解产物

Changes and clinical significance of PAI-1, TSP-1 and D-D levels in patients with recurrent spontaneous abortion

ZHANG Yawei*, ZHANG Liping, YU Zhifang

(Department of Gynecology, Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou, Hebei, China, 075000)

【ABSTRACT】Objective To observe the changes and clinical significance of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), platelet reactive protein-1 (TSP-1) and cross-linked fibrin degradation product (D-D) in patients with recurrent spontaneous abortion (RSA). **Methods** A total of 184 patients with RSA admitted to the hospital from January 2018 to March 2019 were selected in the RSA group. According to the frequency of abortion, they were divided into the RSA1 group (frequency of abortion more than 3 times) and the RSA2 group (frequency of abortion of or less than 3 times). 172 women with history of normal pregnancy and having normal pregnancy during the same period were selected as the normal pregnancy group. The serum levels of PAI-1, TSP-1 and D-D were measured. Pearson correlation analysis was performed to analyze the serum levels of PAI-1, TSP-1 and D-D in patients with RSA. Pregnancy outcomes of the RSA group were recorded. **Results** The levels of serum PAI-1, D-D and TSP-1 in the RSA group were significantly higher than those in the normal pregnancy group ($P<0.05$). There was no significant correlation between serum PAI-1 and TSP-1 levels, PAI-1 and D-D levels or TSP-1 and D-D levels ($P>0.05$). The levels of serum PAI-1, TSP-1 and D-D in the abortion group were significantly higher than those in the live birth group, and the differences were

基金项目:河北省卫生健康委员会科研基金项目(20180925)

作者单位:河北北方学院附属第一医院妇科,河北,张家口 075000

*通信作者:张亚巍, E-mail:leizha939719@163.com

statistically significant ($P<0.05$). The levels of PAI-1, TSP-1 and D-D in the RSA1 group were significantly higher than those in the RSA2 group, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** The levels of serum PAI-1, TSP-1 and D-D in patients with RSA are highly expressed, which has a certain clinical value for RSA pregnancy outcome.

[KEY WORDS] Recurrent spontaneous abortion; Plasminogen activator inhibitor; Thrombospondin-1; Cross-linked fibrin degradation products

复发性流产 (recurrent spontaneous abortion, RSA) 是指连续 2 次及以上的自然流产, 占孕妇妊娠期间流产总数的 15%~20%^[1]。RSA 常见的病因有父本或母本染色体异常、子宫生理结构异常、病原感染等, 但仍有 30%~40% 的反复流产原因尚不明确^[2]。RSA 的发生对育龄妇女造成极大的身体与精神创伤, 给其家庭带来巨大的压力。随着国家二胎政策的开放和人口老龄化的加剧, 人们对 RSA 也愈加重视。有研究表明, RSA 早期诊断能有效减少 RSA 的发生, 提高 RSA 患者的治疗效果, 因此寻找一种有效的 RSA 诊断方法, 对 RSA 的预防及预后具有重要的意义^[3]。纤溶酶原活化物抑制因子 (Plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1) 是纤溶系统中调节纤溶活性的重要指标, 可保持血管壁通透性, 维持血液流动状态, 并修复组织。血小板反应蛋白-1 (Thrombospondin-1, TSP-1) 是发现最早、关注最多的抑制因子, 其包含多个 TSRs 结构域, 可与不同的配体相结合并发挥多种生物学效应, 在人体生理和病理调节中发挥着重要。D-二聚体 (D-dimer, D-D) 是纤维蛋白降解产物, 与纤溶系统活性和血栓溶解密切相关。本研究选取 PAI-1、TSP-1、D-D 三种检测指标, 探讨三者在复发性流产患者血清中的变化, 以期临床提供参考。现报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2018 年 1 月至 2019 年 3 月本院收治的 184 例复发性流产患者作为 RSA 组, 根据流产次数分为 RSA1 组 (流产次数>3 次) 和 RSA2 组 (流产次数≤3 次)。纳入标准: ①经期规律, 内分泌检查结果正常; ②夫妻染色体检查正常; ③生殖系统发育正常; ④连续自然流产≥2 次。排除标准: ①患有甲状腺疾病或糖尿病; ②2 月内使用抗凝或者促纤溶药品; ③合并患有其他严重肝、肾、心脑血管疾病。④内分泌、遗传、感染等原因所致的流产。RSA 组平均年龄 (29.65±2.27) 岁, 平均孕周 (9.05±2.27) 周。选取同时期具有正常分娩史、染

色体、内分泌等检查均为正常且本次妊娠正常女性 172 例作为正常妊娠组, 平均年龄 (28.05±2.62) 岁, 平均孕周 (9.65±2.61) 周。两组年龄、孕周比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。本研究经医院医学伦理委员会批准通过, 受试者均签署知情同意书。

1.2 实验室检测

两组受试者空腹 8 h 后抽取妊娠早期外周血 4 mL, 以 3 000 r/min 速度 ($r=10$ cm) 离心 10 min, 取上清置于 EP 管中, 置于 -80℃ 备用。采用酶联免疫吸附法对 PAI-1、TSP-1、D-D 进行检测, 试剂盒购自美国 ThermoFisher 公司, 具体实验步骤: ①包被抗体: 用包被缓冲液稀释特异性抗体球蛋白至最适浓度, 每凹孔加 0.3 mL, 4℃ 过夜, 贮存冰箱; ②洗涤: 移去包被液, 凹孔用洗涤缓冲液洗 3 次, 每次 5 min; ③每凹孔加入 0.2 mL 用稀释缓冲液稀释的含抗原的被检标本, 37℃ 作用 1~2 h; ④洗涤: 移去包被液, 凹孔用洗涤缓冲液洗 3 次, 每次 5 min; ⑤加入 0.2 mL 用稀释缓冲液稀释的酶标记特异性抗体溶液, 37℃ 作用 1~2 h; ⑥洗涤: 移去包被液, 凹孔用洗涤缓冲液洗 3 次, 每次 5 min; ⑦加入 0.2 mL 底物溶液于每个凹孔, 室温作用 30 min; ⑧加终止剂: 每凹孔加 2 M H_2SO_4 0.05 mL; ⑨观察记录结果: 目测或用酶标比色计测定 OD 值。并统计 RSA 组胎儿预后情况, 根据结果分为流产组和活产组。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 18.0 统计学软件进行数据分析, 计量资料采用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 t 检验, 相关性分析采用 Pearson 分析。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组血清 PAI-1、TSP-1、D-D 含量比较

RSA 组血清 PAI-1、TSP-1、D-D 含量显著高于正常妊娠组, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。见表 1。

2.2 RSA 组血清中 PAI-1、TSP-1、D-D 水平的相关性分析

Pearson 相关性分析结果显示, RSA 组血清 PAI-1

表1 两组血清PAI-1、TSP-1、D-D含量比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of PAI-1, TSP-1 and D-D in serum of two groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	PAI-1 (ng/mL)	TSP-1 (mg/mL)	D-D (mg/mL)
RSA组	184	38.49±3.38	3.72±0.61	1.69±0.31
正常妊娠组	172	30.24±2.46	2.67±0.42	1.19±0.27
t值		26.178	19.020	16.180
P值		<0.001	<0.001	<0.001

与TSP-1表达水平无显著相关性($P>0.05$), PAI-1与D-D表达水平无显著相关性($P>0.05$), TSP-1与D-D表达水平无显著相关性($P>0.05$)。见表2。

表2 观察组血清中PAI-1、TSP-1、D-D水平的相关性

Table 2 Correlation of PAI-1, TSP-1 and D-D levels in serum of women in observation group

相关因素	PAI-1		TSP-1		D-D	
	r值	P值	r值	P值	r值	P值
PAI-1	1		0.217	<0.001	0.312	<0.001
TSP-1	0.217	<0.001	1		0.204	<0.001
D-D	0.312	<0.001	0.204	<0.001	1	

2.3 RSA组PAI-1、TSP-1、D-D水平与预后情况比较

根据RSA组胎儿预后情况,结果分为流产组($n=98$)和活产组($n=89$)。流产组血清PAI-1、TSP-1、D-D水平显著高于活产组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表3。

表3 RSA组PAI-1、TSP-1、D-D水平与预后情况比较($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of PAI-1, TSP-1, D-D levels and prognosis in RSA group ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	PAI-1 (ng/mL)	TSP-1 (mg/mL)	D-D (mg/mL)
流产组	98	40.30±4.29	2.86±0.53	1.82±0.40
活产组	86	36.94±3.61	2.32±0.41	1.59±0.29
t值		6.610	8.287	5.268
P值		<0.001	<0.001	<0.001

2.4 RSA组流产次数与PAI-1、TSP-1、D-D水平的比较

RSA1组PAI-1、TSP-1、D-D水平显著高于RSA2组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表4。

表4 两组PAI-1、TSP-1、D-D水平与预后情况比较($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Comparison of PAI-1, TSP-1, D-D levels and prognosis between the two groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	PAI-1 (ng/mL)	TSP-1 (mg/mL)	D-D (mg/mL)
RSA1组	82	40.95±4.17	2.93±0.56	1.84±0.42
RSA2组	102	37.31±3.54	2.46±0.45	1.61±0.30
t值		6.402	6.313	4.327
P值		<0.001	<0.001	<0.001

3 讨论

RSA是指孕龄妇女发生连续2次及以上的自然流产,其发病机制较为复杂,反复流产原因尚不完全明确。RSA早期诊断能有效提高RSA患者的治疗效果,RSA早期有效诊断方法对其预防及预后具有重要的意义。文献研究发现,血液中相关因子表达水平与妊娠状态的维持有一定的相关性^[4]。

本研究选取PAI-1、TSP-1、D-D三种检测指标,探讨三者在复发性流产患者血清中的变化及其对预后的预测价值。PAI-1是一种单链糖蛋白,能特异性地抑制纤溶酶原的激活^[5]。纤溶酶活性受到抑制,纤维蛋白及纤维蛋白原清除作用减弱,诱导血栓形成^[6]。D-D是结构最简单的纤维蛋白溶解产物,在正常人血清中浓度较低,D-D水平下降表明机体存在纤维蛋白溶解作用抑制,是机体血液高凝状态的临床评价指标之一^[7-8]。近年来有研究发现,妊娠女性血液凝固系统的失衡与病因不明的RSA存在某种联系,部分RSA患者经治疗改善凝血状态后均成功分娩^[9-10]。本研究显示,RSA组孕妇血清PAI-1、D-D水平显著高于正常妊娠组,且随着流产次数的增加,患者血清中PAI-1、D-D表达水平逐渐升高。分析原因可能是,血清PAI-1、D-D水平的上升提示RSA组孕妇血液处于高凝状态,纤维蛋白清除能力受到抑制,造成子宫内膜上皮组织、胎盘绒毛间隙纤维蛋白积聚,脐动脉和毛细血管通畅性降低,血液灌注量不足,导致胎盘氧气和营养物质运输能力下降,局部微血栓扩张加剧形成梗死灶,最终造成胚胎停止发育或流产^[11]。本研究根据胎儿最终结局分组发现,胎儿活产组孕妇血清PAI-1、D-D表达水平显著低于流产组,也进一步说明了孕妇血液高凝状态对妊娠结局的影响,提示孕妇血清PAI-1、D-D水平检测对于妊娠结局和预后具有一定的参考价值。

TSP-1是细胞外基质糖蛋白家族中的一员,也是广泛研究的血管抑制因子之一,主要通过TSR与其相应受体结合,抑制血管生成,调节细胞表面功能,影响细胞迁移和黏附,其在肿瘤复发和转移方面的作用在近年来的研究中引发重点关注^[12-13]。TSP-1可以通过竞争结合的方式抑制血管内皮生长因子活性,还能抑制血管内皮细胞增殖和分化,诱导细胞凋亡^[14]。动物实验发现TSP-1在小鼠受精卵分裂早期的表达水平上升,推测TSP-1可能对于妊娠初期胎

盘血管的形成具有重要意义^[15]。有文献认为,妊娠初期胎盘血管机能不全是造成流产的潜在原因之一^[16]。本研究结果显示,RSA组血清中TSP-1水平显著低于正常妊娠组,且随着流产次数的上升,RSA组TSP-1水平出现增加的趋势,提示TSP-1表达水平上升可引发RSA组血管生成抑制作用增强,新生血管数量下降,继而造成妊娠中止。相关性分析结果显示,RSA组血清PAI-1、D-D、TSP-1水平两两比较无显著相关性,原因尚需要进一步的实验证实。

综上所述,RSA患者血清PAI-1、TSP-1、D-D水平呈高表达,三者对RSA预后具有一定的临床应用价值。因此,本研究认为,临床应对血清PAI-1、TSP-1、D-D水平进行监测,并进行针对性干预,以降低RSA。

参考文献

- [1] Li J, Xu D, Li HL, et al. Evaluation of failed immunotherapy among patients with negative APLA recurrent spontaneous abortion by serum anticardiolipin antibodies and mononuclear cell of Tim-1[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2017, 21(5):908.
- [2] Mahdavi-pour M, Zarei S, Fatemi R, et al. Polymorphisms in the Estrogen Receptor Beta Gene and the Risk of Unexplained Recurrent Spontaneous Abortion[J]. *Avic J Med Biotechnol*, 2017, 9(3):150-154.
- [3] Zhang LL, Li Y, Lin XY, et al. Liquid Chromatography/Mass Spectrometry based serum metabolomics study on recurrent abortion women with antiphospholipid syndrome [J]. *PloS One*, 2019, 14(11):e0225463.
- [4] 朱一喜,何树光,陈超英,等. PD-1/PD-L1在复发性流产患者外周血T淋巴细胞中的表达及意义[J]. *中国免疫学杂志*, 2020, 36(1):5.
- [5] 陈昌礼,银保,徐德兴,等. D-D、FIB及PAI-1在创伤性脊柱骨折表达及术后静脉血栓的预测[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2021, 13(1):43-46.
- [6] Sholat AD, Gatot D, Handayani S, et al. Comparison Pai-1 Level in Type 2 Diabetes Mellitus with and Without Diabetic Foot Ulcer[J]. *Sumat Med J*, 2018, 1(1):1-5.
- [7] 郭俊芳,张宝伟,陈蓉,等. 血浆D-二聚体含量在急性主动脉夹层与非ST段抬高型急性冠脉综合征鉴别中的意义[J]. *江苏大学学报(医学版)*, 2018, 28(4):316-319.
- [8] Onselar MB, Hardy AT, Wilson C, et al. Fibrin and D-dimer bind to monomeric GPVI[J]. *Blood Advances*, 2017, 1(19):1495-1504.
- [9] Bagheri M, Rad IA, Omrani MD, et al. The Val34Leu genetic variation in the A subunit of coagulation factor XIII in recurrent spontaneous abortion [J]. *Systems Biol Rep Med*, 2011, 57(5):261-264.
- [10] Taylor M, Cauchi MN, Buchanan RRC. The Lupus Anticoagulant, Anticardiolipin Antibodies, and Recurrent Miscarriage[J]. *Am J Reprod Immunol*, 2013, 23(2):33-36.
- [11] Xu D, Ren Z, Shi J, et al. Preliminary findings on the expression of plasma CD63, CD62P, and PAI 1 in patients with acute cerebral infarction [J]. *Eur J Inflamm*, 2018, 16(4):205873921881967.
- [12] Buda V, Andor M, Petrescu L, et al. Perindopril Induces TSP-1 Expression in Hypertensive Patients with Endothelial Dysfunction in Chronic Treatment [J]. *Internat J Mol Sci*, 2017, 18(2):348-350.
- [13] 冯六连,李儒佑. 血小板反应蛋白-1在复发性流产患者绒毛膜组织中的表达及其价值探讨[J]. *现代中西医结合杂志*, 2019, 28(14):59-62.
- [14] Jeanne A, Boulagnon-Rombi C, Devy J, et al. Matricellular TSP-1 as a target of interest for impeding melanoma spreading: towards a therapeutic use for TAX2 peptide[J]. *Clin Exp Metastasis*, 2016, 33(7):637-649.
- [15] Wu M, Liu P, Cheng L. Galectin-1 reduction and changes in T regulatory cells may play crucial roles in patients with unexplained recurrent spontaneous abortion [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(2):1973-1978.
- [16] Manna S, Mccarthy C, Mccarthy FP. Placental Ageing in Adverse Pregnancy Outcomes: Telomere Shortening, Cell Senescence, and Mitochondrial Dysfunction [J]. *Oxid Med, Cell Longev*, 2019, 2019:3095383.

(上接第1857页)

- [8] 刘涛,李睿,龚琳,等. 胃幽门螺杆菌感染后 Semaphorin 5A致胃癌可能机制的研究[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2019, 11(3):189-193.
- [9] 陈福敏,罗君,童明霞. 慢性胃炎患者外周血血小板计数及血小板/淋巴细胞之值与幽门螺杆菌感染之间的关系及其临床意义[J]. *现代医学*, 2019, 47(11):1347-1350.
- [10] Guillon C, Bézie S, Anegón I. Immunoregulatory properties of the cytokine IL-34[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2017, 74(14):2569-2586.
- [11] 周红菊,杨扬,向瑜. 分析血清IL-34水平与幽门螺杆菌感染相关性胃疾病的关系[J]. *国际检验医学杂志*, 2020, 41(11):1333-1336.
- [12] 张超群,马士朝,吴丹丹,等. LAMP技术用于幽门螺旋杆菌检测与分型的研究[J]. *中国病原生物学杂志*, 2019, 14(1):50-54.
- [13] 朱伟琴,贾立涛. 不同类型Hp感染在非萎缩性胃炎、萎缩性胃炎、肠化生之间的分布[J]. *中国医师杂志*, 2019, 21(2):300-302.
- [14] 陈萍,李军民,吕祥瑞,等. 慢性胃炎镜下病理特点与幽门螺杆菌血清抗体类型的相关性研究[J]. *中国内镜杂志*, 2018, 24(8):81-85.

泌尿系肿瘤患者手术后联合 DC-CIK 免疫细胞治疗 有效性及不良反应

肖永平* 潘钰娇 陶文学 王帆 任晓雯

[摘要] **目的** 探究泌尿系肿瘤患者手术后联合 DC-CIK 免疫细胞(树突状细胞-细胞因子诱导的杀伤细胞)治疗的有效性和不良反应。**方法** 选取 2018 年 12 月至 2020 年 12 月于甘肃省武威肿瘤医院就诊的 80 例泌尿系肿瘤术后患者进行观察研究,按照治疗差异性进行分组,对照组($n=40$)术后给予化疗治疗;治疗组($n=40$)术后给予 DC-CIK 免疫细胞治疗,对比分析其有效率、血清肿瘤标志物水平、免疫功能、炎症因子水平、不良反应。**结果** 治疗后,治疗组有效率高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。治疗后,两组血清肿瘤标志物水平比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。治疗后,治疗组免疫功能 CD3⁺、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺ 高于对照组,CD8⁺ 低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。治疗后,治疗组 IL-2(白介素-2)、IFN- γ (白介素- γ)、TNF- α (肿瘤坏死因子- α) 高于对照组,IL-6(白介素-6) 低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。治疗后,治疗组不良反应发生率低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 对两组泌尿系肿瘤术后患者进行 DC-CIK 免疫细胞治疗可显著提升其有效性,减少不良反应,改善免疫功能。

[关键词] 泌尿系肿瘤;免疫细胞;炎症因子;树突状细胞

Effectiveness and adverse effects of combined DC - CIK immune cell therapy in patients with urinary tract tumors after surgery

XIAO Yongping*, PAN Yujiao, TAO Wenxue, WANG Fan, REN Xiaowen

(Biological Immunotherapy Room, Wuwei Cancer Hospital, Gansu, Wuwei, Gansu, China, 733000)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the effectiveness and adverse effects of combined DC - CIK immune cells (dendritic cells-cytokine-induced killer cells) treatment in patients with urinary tract tumors after surgery. **Methods** 80 postoperative patients with urinary tract tumors who were treated at Wuwei Cancer Hospital in Gansu Province from December 2018 to December 2020 were selected for observation and research. They were divided into groups according to treatment differences. The control group ($n=40$) was given chemotherapy after operation; The treatment group ($n=40$) was treated with DC - CIK immune cells after operation. The effective rate, serum tumor marker level, immune function, inflammatory factor level and adverse reactions were compared and analyzed. **Results** After treatment, the effective rate of the treatment group was higher than that of the control group, the difference was statistically significant ($P<0.05$). After treatment, there was no significant difference in serum tumor markers between the two groups ($P>0.05$). After treatment, the immune function of the treatment group was higher than that of the control group (CD3⁺, CD4⁺, CD4⁺/CD8⁺), and lower than that of the control group ($P<0.05$). After treatment, IL-2 (interleukin-2), IFN- γ (interleukin- γ) and TNF- α (tumor necrosis factor - α) in the treatment group were higher than those in the control group, while IL-6 (interleukin-6) was lower than those in the control group, the differences were statistically significant ($P<0.05$). After treatment, the incidence of adverse reactions in the treatment group was

基金项目:武威市市列科技计划项目(ww2002069)

作者单位:甘肃省武威肿瘤医院生物免疫治疗室,甘肃,武威 733000

*通信作者:肖永平, E-mail: xayp456@163.com

lower than that in the control group, the difference was statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** DC-CIK immune cell therapy for two groups of patients after urinary tract tumor surgery can significantly improve its effectiveness, reduce adverse reactions, and improve immune function.

[KEY WORDS] Urinary system tumors; Immune cells; Inflammatory factors; Dendritic cells

泌尿系肿瘤是发生于泌尿系统的肿瘤,其内部接触环境为尿液^[1-2]。大量报道显示,泌尿系肿瘤发展快、难以治愈,且近年来发病率不断上升,严重威胁患者的生命安全,临床治疗肿瘤的方法有很多,如手术、化疗、靶向放疗、中医治疗以及免疫治疗,提倡手术切除^[3-4]。部分泌尿系肿瘤患者术后存在转移现象,泌尿系统肿瘤患者术后复发率在64%左右,但针对不同分期的患者,术后复发率存在一定差异,因此对于手术患者而言,术后根据肿瘤分期差异,应结合实际情况对应联合其他治疗方式,以提高预后效果,化疗虽然治疗效果较好,但是毒副反应较大,不利于机体的恢复。树突状细胞(Dendritic Cells, DC)作为机体功能最强的抗原呈递细胞(Antigen presenting cell, APC),诱导形成抗原特异性细胞T淋巴细胞(Antigen specific cell T lymphocyte, CTL),提高机体免疫力^[5-6]。细胞因子诱导的杀伤细胞(Cytokine-induced killer cells, CIK)是患者外周血中单个核细胞,通过多种细胞因子培养,获得的一群异质细胞,有抗肿瘤活性的T淋巴细胞功能,同时兼顾非限制性肿瘤杀伤的功能^[7]。因此目前生物细胞免疫治疗(Biological cell immunotherapy, DC-CIK)是泌尿系肿瘤治疗的重要辅助方法,本研究对患者进行分组,观察辅助治疗有效率及不良反应,具体报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2018年12月至2020年12月于甘肃省武威肿瘤医院收治的80例泌尿系肿瘤患者作为研究对象,根据治疗差异性分两组,各40例,其中对照组:男25例,女15例;平均年龄(56.28 ± 2.14)岁;肿瘤直径平均(3.01 ± 0.82)cm;肿瘤分期: T_1 22例, T_2 9例, T_3 7例, T_4 2例。治疗组:男24例,女16例;平均年龄(57.178 ± 2.14)岁;肿瘤直径平均(3.11 ± 0.32)cm;肿瘤分期^[8]: T_1 20例, T_2 10例, T_3 6例, T_4 4例。两组资料均衡可比,差异无统计学意义($P>0.05$)。纳入标准:①患者均符合《临床肿瘤诊疗指南》^[8]中泌尿系肿瘤的相关

诊断标准;②均自愿参加本研究;③均具有手术耐受性。排除标准:①精神病患者;②体温 $>37^\circ\text{C}$;③凝血功能异常者;④研究所用药物过敏者。研究经伦理委员会批准同意。

1.2 方法

两组患者均进行腹腔镜根治术,术后进行常规抗感染、利尿、稳定血压。

对照组:术后第3周开始化疗,第1天、第8天注射吉西他滨(北京协和药厂;国药准字H20103522),初始剂量: $1\ 000\ \text{mg}/\text{m}^2$ 的标准,第2 d注射葡萄糖氯化钠溶液 $1\ 000\ \text{mL}$,再注射顺铂(山东凤凰制药;国药准字H20056422),剂量: $70\ \text{mg}/\text{m}^2$,一期为一周,持续治疗4 w。

治疗组:给予DC-CIK免疫细胞治疗,术前1 d饮食清淡,取患者外周静脉血 $50\ \text{mL}$,送至生物细胞中心GMP实验室进行诱导、培养7 d;然后将DC细胞与CIK按一定比例进行培养12~14 d,将培养出DC-CIK细胞混悬液分为3份,在常温条件下,输入 $50\ \text{mL}$ 灭菌生理盐水后,通过7号针头输血器静脉回输至患者,并静脉冲入 $2\ \text{mg}$ 地塞米松(厂家:安徽城市药业;国药准字H34020484),以 $30\sim 40\ \text{滴}/\text{min}$ 输入,连续3 d。注意回输细胞时若温度 $\leq 2^\circ\text{C}$ 时,须保温运输。回输细胞时间 $>1\ \text{h}$ 或温度 $\geq 37.0^\circ\text{C}$,须低温($2\sim 8^\circ\text{C}$)保存和运输,运输过程避免剧烈震荡,持续治疗4 w。

1.3 检查指标^[8]

①有效率:治疗后对两组患者疗效进行评定,其中完全缓解(治疗后,病灶完全消失时间 $\geq 4\ \text{w}$)、部分缓解(病灶直径缩小超过30%时间 $\geq 4\ \text{w}$)、疾病稳定(病灶缩小不超过30%时间 $<4\ \text{w}$)、疾病进展(不符合以上标准);有效率= $[(\text{总例数}-\text{疾病进展})/\text{总例数}]\times 100\%$ 。②血清肿瘤标志物水平:治疗前后,取静脉血 $5\ \text{mL}$,检测糖类抗原50(CA50)、癌胚抗原(CEA)、细胞角质蛋白19片段抗原21-1(CYFRA21-1)。③免疫功能:治疗前后,取患者静脉外周血 $5\ \text{mL}$,采用流式细胞仪(美国贝克曼)检测T淋巴细胞亚群($\text{CD}3^+$ 、 $\text{CD}4^+$ 、 $\text{CD}8^+$ 、 $\text{CD}4^+/\text{CD}8^+$)的变化。④炎性因子水平:治疗前后,取5

mL空腹静脉血,离心速率3 000 r/min,时间20 min,置入冰箱冷冻待测,酶联免疫吸附法检测肿瘤坏死因子- α (Tumor necrosis factor- α , TNF- α)于白介素-2(Interleukin-2, IL-2),白介素- γ (Interferon γ , IFN- γ)及白介素-6(Interleukin-6, IL-6)。⑤记录两组不良反应例数。

1.4 统计学方法

采用SPSS 23.0统计学软件进行数据处理;计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,采用 t 检验;计数资料以 $n(\%)$ 表示,行 χ^2 检验;以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组有效率比较

治疗后,治疗组有效率高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表1。

2.2 两组肿瘤标志物比较

治疗后,两组血清肿瘤标志物水平比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表2。

2.3 两组免疫功能比较

治疗后,治疗组免疫功能CD3+、CD4+、CD4+/CD8+高于对照组,CD8+低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表3。

表1 两组有效率比较 [$n(\%)$]

Table 1 Comparison of effective rates between the two groups [$n(\%)$]

组别	n	完全缓解	部分缓解	疾病稳定	疾病进展	有效率
治疗组	40	15(37.50)	18(45.00)	4(10.00)	3(7.50)	37(92.50)
对照组	40	10(25.00)	12(30.00)	8(20.00)	10(25.00)	30(75.00)
χ^2 值						4.501
P 值						0.034

2.4 两组炎症因子比较

治疗后,治疗组IL-2、IFN- γ 、TNF- α 高于对照组,IL-6低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表4。

2.5 两组不良反应发生率比较

治疗后,治疗组不良反应发生率低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表5。

表5 两组不良发应发生率比较 [$n(\%)$]

Table 5 Comparison of incidence of adverse reactions between the two groups [$n(\%)$]

组别	n	发热	胃肠道反应	白细胞增加	寒战	发生率
治疗组	40	0(0.00)	1(2.50)	0(0.00)	1(2.50)	2(5.00)
对照组	40	4(10.00)	1(2.50)	1(2.50)	3(7.50)	9(22.50)
χ^2 值						5.165
P 值						0.023

表2 两组肿瘤标志物水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of tumor marker levels between the two groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	CEA (ng/mL)		CA50 (U/mL)		CYFRA21-1 (ng/mL)	
		治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
治疗组	40	22.75 $\pm$ 4.66	9.85 $\pm$ 2.36	28.05 $\pm$ 14.96	11.76 $\pm$ 3.65	5.35 $\pm$ 1.66	3.25 $\pm$ 1.06
对照组	40	22.54 $\pm$ 4.43	9.47 $\pm$ 2.45	27.72 $\pm$ 14.85	11.41 $\pm$ 3.43	5.34 $\pm$ 1.43	3.17 $\pm$ 1.05
t 值		0.207	0.706	0.099	0.442	0.029	0.339
P 值		0.837	0.482	0.921	0.660	0.977	0.735

表3 两组免疫功能比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of immune function between the two groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	CD3+ (%)		CD4+ (%)		CD8+ (%)		CD4+/CD8+	
		治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
治疗组	40	49.35 $\pm$ 6.79	63.23 $\pm$ 7.36	21.45 $\pm$ 4.96	40.76 $\pm$ 5.65	32.75 $\pm$ 6.46	23.45 $\pm$ 4.36	0.65 $\pm$ 0.19	1.73 $\pm$ 0.16
对照组	40	50.42 $\pm$ 6.87	56.76 $\pm$ 7.45	21.72 $\pm$ 4.45	34.71 $\pm$ 5.43	31.54 $\pm$ 6.43	26.77 $\pm$ 5.45	0.66 $\pm$ 0.20	1.31 $\pm$ 0.15
t 值		0.701	3.907	0.256	4.883	0.840	3.008	0.229	12.112
P 值		0.486	0.000	0.798	0.000	0.404	0.004	0.819	0.000

表4 两组炎症因子比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Comparison of inflammatory factors between the two groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	IL-2 (ng/L)		IL-6 (pg/mL)		IFN- γ (ng/L)		TNF- α (ng/mL)	
		治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
治疗组	40	9.35 $\pm$ 2.99	13.78 $\pm$ 2.26	2.35 $\pm$ 19.99	1.23 $\pm$ 0.26	8.65 $\pm$ 2.46	13.45 $\pm$ 3.16	7.15 $\pm$ 2.09	10.23 $\pm$ 1.06
对照组	40	9.32 $\pm$ 2.42	12.06 $\pm$ 2.25	2.32 $\pm$ 10.42	1.36 $\pm$ 0.25	8.54 $\pm$ 2.43	10.77 $\pm$ 3.15	7.12 $\pm$ 2.42	8.16 $\pm$ 1.05
t 值		0.049	3.411	0.008	2.279	0.201	3.799	0.059	8.775
P 值		0.961	0.001	0.993	0.025	0.841	0.000	0.953	0.000

3 讨论

泌尿系肿瘤临床常采用手术治疗,根据进展期肿瘤的实际情况,临床常辅助化疗、放疗、分子靶向治疗等治疗手段,虽然可以使患者的存活率增高,但是其副作用明显,具有较高的复发性,进一步破坏机体免疫力^[9]。相关研究表明,大部分肿瘤患者存在自身免疫功能失调,机体免疫力大幅度下降,导致无法有效抵御外来致病因子,无法识别、清除体内突变细胞,导致这些细胞大量滋生,无法抑制,造成肿瘤转移、扩散^[10-12]。因此对于术后残留的微小病灶需要体内免疫功能配合,帮助清除。而肿瘤免疫治疗就是通过增强机体抵抗肿瘤免疫活性,打破免疫系统对肿瘤的耐受性,增强患者体内抗肿瘤免疫活性,纠正肿瘤防御功能,重建免疫系统,清除病灶,有利于避免肿瘤复发、转移等,从而达到提高治疗效果的作用,本研究为提高治疗效果术后联合 DC-CIK 免疫细胞治疗,结果提示,联合 DC-CIK 免疫治疗效果确切。DC 细胞能够提取肿瘤抗原呈递给 CIK 细胞,完成肿瘤细胞特异性杀伤,其安全性、持久性、全面性、选择性较高,完全实现了个体化治疗的特性,从而改变患者的病情。

本次研究提示,联合治疗可以改善患者血清因子表达水平。近年来,临床上广泛应用 DC-CIK 免疫细胞治疗泌尿系肿瘤,DC 是具有相对特异性表面物质的典型树突状形态细胞,可以移至淋巴器官,刺激初始型 T 细胞增殖活化,是最强的抗原递呈细胞^[13-15]。同时 DC 分泌多种细胞因子,其中 IFN- α 可以诱导 CTL,干扰 B 淋巴细胞增殖;同时可以吞噬凋亡或坏死细胞;DC 活化后增加 TNF 家族细胞因子的表达;抑制肿瘤细胞增殖,增强杀伤肿瘤细胞巨噬细胞功能。CIK 细胞是肿瘤杀伤细胞的一种,同时兼有溶瘤效应、非主要组织相容性复合体(MHC)限制性杀瘤的特点,可通过自身细胞毒性及自身分泌性细胞完成杀伤,DC-CIK 细胞共培养,促进 DC 成熟同时可增强 CIK 细胞的细胞毒性,抑制多耐药肿瘤细胞,其疗效“1+1>2”。同时 IL-6 是肝细胞刺激因子,刺激活化 B 细胞增殖,分泌抗体,CIK 体外大量增殖后回输时无需 IL-2 参与,保证体内 IL-2 含量,促进 T 细胞活化,增殖 NK 细胞,有利于减少患者发热、寒战,安全性高,诱导人体自身免疫细胞活化,可降低机体排斥反应、毒副作用,但对机体肿瘤标志物水平影响不

大,这一点表 3 已证实,提示术后联合免疫细胞治疗对肿瘤标志物水平影响较小。

机体抗肿瘤免疫中以细胞免疫为主,在细胞免疫中起主导地位的是 T 淋巴细胞介导的特异性细胞免疫,其中 CD3+ 是成熟 T 细胞,CD4+ 是辅助性 T 细胞,对效应细胞抗肿瘤有促进作用,CD8+ 则是抑制性 T 细胞,对免疫应答有抑制作用,CD4+/CD8+ 正常时范围处于 1.5-2.0 之间,表示免疫功能稳定,可保证机体内环境稳定。本研究结果提示术后联合 DC-CIK 免疫细胞治疗,提高了细胞毒效应,启动患者体内先天、后天免疫反应,调节免疫功能,从而增强细胞杀伤性及特异性,阻止或延缓肿瘤转移、复发。由于,患者术后体质较弱,免疫系统受损,对残存肿瘤细胞杀伤能力较弱,容易被不利因素影响,DC-CIK 细胞特异性杀伤残留肿瘤细胞,有效防止复发、转移,提高患者的免疫能力,二者联用,疗效显著提升,降低不良反应发生率。本次研究中,治疗后组间不良反应发生率比较,差异有统计学意义,提示联合 DC-CIK 免疫细胞治疗可增强用药安全性。

综上所述,对两组泌尿系肿瘤术后患者进行 DC-CIK 免疫细胞治疗可显著提升其有效性,提高机体免疫力,减少患者机体不良反应。

参考文献

- [1] 靳明伟,徐在革. DC-CIK 生物免疫疗法用于甲状腺癌术后的疗效及对患者 IL-16, TNF 水平的影响[J]. 实用癌症杂志, 2020, 35(3): 490-493.
- [2] Liu Y L, Yang LX, Zhang F, et al. Clinical effect and safety of dendritic cell-cytokine-induced killer cell immunotherapy for pancreatic cancer: a systematic review and meta-analysis [J]. Cytotherapy, 2019, 21(10): 35-45.
- [3] 张曼,赵旭林,徐全晓,等. DC-CIK 调节弥漫大 B 细胞淋巴瘤患者细胞免疫功能的临床研究[J]. 中华全科医学, 2019, 17(8): 1302-1304+1391.
- [4] 王村,温珍平,梁俊青. DC-CIK 细胞过继免疫治疗联合 XELOX 方案化疗对进展期结直肠癌患者的疗效分析[J]. 癌症进展, 2019, 17(8): 933-935, 938.
- [5] 李建龙,王健,史占军. 树突状细胞疫苗抗骨肉瘤免疫治疗[J]. 中国矫形外科杂志, 2019, 27(11): 1014-1017.
- [6] 于航,吉九阳,徐晨,等. DC-CIK 细胞治疗异基因造血干细胞移植后复发急性髓系白血病的临床研究[J]. 军事医学, 2020, 44(8): 43-48.
- [7] 李悦,尹秀艳,刘婉露,等. 肾癌 DC-CIK 免疫治疗对相关细胞因子的影响[J]. 中国免疫学杂志, 2020, 36(9): 1075-1079.

(下转第 1870 页)

· 论 著 ·

MMP3、IL-18对膝骨关节炎的疗效评估价值及与PGE-2的相关性

王俊江^{1*} 王红建¹ 宋晓磊¹ 丁俊青² 韩井民¹ 袁伟杰¹ 桑振飞¹ 张宾¹

[摘要] **目的** 探究血清基质金属蛋白酶-3(MMP-3)、白细胞介素-18(IL-18)水平对胫骨高位截骨(HTO)治疗膝骨关节炎(KOA)的疗效评估价值及其与血清前列腺素E2(PGE2)的相关性。**方法** 选取2019年1月至2020年1月新里程安钢总医院收治接受HTO手术治疗的KOA患者120例,对所有患者治疗前后MMP-3、IL-18、PGE-2水平进行比较。运用多因素Logistic回归分析影响HTO治疗KOA疗效的影响因素。分析血清MMP-3、IL-18水平对HTO治疗KOA的疗效评估价值。采用Pearson相关分析法对血清MMP-3、IL-18与血清PGE-2的相关性进行分析。**结果** KOA患者经HTO治疗后血清MMP-3、IL-18、PGE-2水平与治疗前相比明显下降,差异有统计学意义($P<0.05$)。治疗后1年与治疗前相比,差异无统计学意义($P>0.05$)。多因素Logistic回归分析结果显示,血清MMP-3、IL-18水平升高是影响HTO治疗KOA治疗效果的独立危险因素($P<0.05$)。血清MMP-3、IL-18联合指标评估HTO治疗KOA治疗效果确切的特异性(89.87%)、灵敏度(87.91%)、AUC(0.915)均显著高于单一指标($P<0.05$)。Pearson相关分析结果显示,血清MMP-3、IL-18与血清PGE-2均呈正相关($r=0.714, r=0.653$)($P<0.05$)。120例HTO治疗KOA患者,经1年随访,失访3例。影像学复查结果显示,175例患者均达截骨处骨性愈合,FTA角度为 $168^{\circ}\sim 172^{\circ}$,矫正角度 $8^{\circ}\sim 18^{\circ}$,平均 $(12.05\pm 3.26)^{\circ}$ 。**结论** 血清MMP-3、IL-18水平对HTO治疗KOA的疗效评估价值较高,联合指标的评价准确性优于单一指标,且血清MMP-3、IL-18水平与血清PGE-2均呈正相关。

[关键词] 基质金属蛋白酶-3; 白细胞介素-18; 胫骨高位截骨; 膝骨关节炎; 前列腺素E2

Evaluation of the curative effect of MMP3 and IL-18 on knee osteoarthritis and their correlation with PGE-2

WANG Junjiang^{1*}, WANG Hongjian¹, SONG Xiaolei¹, DING Junqing², HAN Jingmin¹, Yuan Weijie¹, SANG Zhenfei¹, ZHANG Bin¹

(1. Department of Orthopedics, Anyang General Hospital, Anyang, Henan, China, 455004; 2. Department of Laboratory Medicine, Anyang General Hospital, Anyang, Henan, China, 455004)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the value of serum matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) and interleukin-18 (IL-18) levels in the treatment of Knee osteoarthritis (KOA) by High Tibial osteotomy (HTO) and their correlation with Prostaglandin E2 (PGE2). **Methods** 120 KOA patients admitted to our hospital for HTO surgery from January 2019 to January 2020 were selected, and the levels of serum MMP-3, IL-18 and PGE-2 were compared before and after treatment. Multivariate Logistic regression was used to analyze the factors influencing the efficacy of HTO in the treatment of KOA. The Area under curve (AUC) of Receiver Operating Characteristics (ROC) was used to analyze the efficacy evaluation value of serum MMP-3 and IL-18 levels in the HTO treatment of KOA. Pearson correlation analysis was used to analyze the correlation between serum MMP-3 and IL-18 and serum PGE-2. **Results** The serum levels of MMP-3, IL-18 and PGE-2 in KOA

项目基金:河南省医学科技攻关计划项目(2018072139)

作者单位:1. 新里程安钢总医院骨科,河南,安阳 455004

2. 新里程安钢总医院检验科,河南,安阳 455004

*通信作者:王俊江, E-mail: W13526120361@163.com

patients after HTO treatment were significantly lower than those before treatment ($P<0.05$). There was no significant difference between 1 year after treatment and after treatment ($P>0.05$). The results of multivariate Logistic regression analysis showed that the elevated serum MMP-3 and IL-18 levels were independent risk factors affecting the therapeutic effect of HTO treatment for KOA ($P<0.05$). The specificity (89.87%), sensitivity (87.91%) and AUC (0.915) of the combined indicators of serum MMP-3 and IL-18 in evaluating the therapeutic effect of HTO on KOA were significantly higher than those of single indicator ($P<0.05$). The results of Pearson correlation analysis showed that serum MMP-3 and IL-18 were positively correlated with serum PGE-2 ($r=0.714$, $r=0.653$) ($P\leq 0.05$). 120 patients with KOA treated with HTO were followed up for 1 year and 3 patients were lost to follow-up. The imaging review results showed that 127 patients achieved osseous union at the osteotomy site, with FTA angle of $168^{\circ}\sim 172^{\circ}$ and the correction angle was $8^{\circ}\sim 18^{\circ}$, with an average of $(12.05\pm 3.26)^{\circ}$. **Conclusion** Serum MMP-3 and IL-18 levels are of high value in evaluating the efficacy of HTO in the treatment of KOA. The evaluation accuracy of the combined indicators is better than a single indicator, and serum MMP-3 and IL-18 levels are positively correlated with serum PGE-2.

[KEY WORDS] Matrix metalloproteinase-3; Interleukin-18; High tibial osteotomy; Knee osteoarthritis; Prostaglandin E2

骨性关节炎(Osteoarthritis, OA)是可引起关节软骨面出现原发性或继发性退行性改变或骨质增生^[1],高发于膝关节、髋关节以及脊柱等部位,其中膝关节关节炎(Knee osteoarthritis, KOA)发生率最高。KOA是发生于膝关节的一种慢性退行性关节疾病^[2],随着病情进展可引起膝关节半月板损伤、骨质增生以及关节脱位等并发症^[3]。而胫骨高位截骨(high tibial osteotomy, HTO)是临床用于治疗KOA的一项安全有效的外科治疗方式,是通过截骨手术使得下肢异常力线改变,改善膝关节生物力学环境及血液循环,促进膝关节功能恢复^[4]。目前临床对于HTO疗效评估大多采用股胫角、胫骨近端内侧角、膝关节评分以及影像学检查等指标^[5],很少采用生物学指标。临床研究发现,部分炎性细胞因子浓度的改变,可破坏关节软骨,与KOA进展存在密切关联^[6]。然而目前国内外对KOA的研究大多针对其治疗方式,危险因素等方面^[7],很少有研究MMPs与炎性因子对KOA疗效的评估价值。因此本研究探讨基质金属蛋白酶-3(matrix metalloproteinase-3, MMP-3)、白细胞介素-18(interleukin-18, IL-18)对HTO治疗KOA的疗效评估价值及其与血清前列腺素E2(Prostaglandin E2, PGE2)的相关性,为临床进一步提高治疗效果,改善患者临床症状提供理论依据。报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2019年1月至2020年1月新里程安钢

总医院收治接受HTO手术治疗的KOA患者120例,其中男42例,女78例;平均年龄(59.45 ± 3.16)岁;软骨损伤Outerbridge分级^[8]:1级24例,2级68例,3级28例;平均病程(4.52 ± 1.24)年。所有患者及其家属知情同意。

纳入标准:①所有患者均符合中华医学会编制的《骨关节炎诊治指南》中膝关节关节炎的相关诊断标准^[9],并经临床确诊为KOA;②软骨损伤Outerbridge分级不超过3级;③均接受HTO治疗;④依从性好,精神及意识状态正常。排除标准:①未进行两次关节镜检查;②伴有脏器严重病变或存在障碍;③存在全身感染;④术后出现关节感染;⑤膝关节外侧间室病变及髌股骨关节炎,或存在韧带损伤。本实验经医院伦理委员会批准。

1.2 治疗方法

患者取俯卧位,进行腰硬联合阻滞麻醉方式,并对病变下肢采用气囊止血带。常规消毒后,采用膝关节镜对需要手术的膝关节进行检查,并清理关节滑膜及髌间窝骨赘、修整半月板及软骨或软骨下骨、取出游离体等。在胫骨近端关节线前内侧打开6厘米的竖向切口,在透视监视下,由切口向胫骨前内侧5毫米处插入钢板,在胫骨内侧平台下3.5厘米处进行截骨位置标记,再剥离截骨位置至远端内侧副韧带浅层。裸露髌腱、胫骨结节,,在胫骨近端横向的截骨线前后两侧均打入两个克氏针,并测量深度。胫骨结节竖斜向截骨完成后,在胫骨后方放置Hoffman撬板,然后在胫骨

近端到外侧皮质1厘米左右处进行截骨位置标记,再于截骨断端放置撑开器,测量下肢髌膝踝力线,调整截骨断端,使下肢力线恢复到正常位置,于截骨断端植入钢板,并用螺钉固定。在透视指导下复查下肢髌膝踝力线及钢板内固定。在术区留置引流管,并缝合切口,包扎。术后两天鼓励患者进行适当的股四头肌锻炼,指导术后7天内可进行屈膝动作,28天可实现负重行走。

1.3 血清MMP-3、IL-18、PGE-2检测方法

所有患者治疗前后在早晨空腹时采集静脉血2 mL,在其分层出现血清时,将其置于离心机中,通过3 000 r/min的速度离心(半径为10 cm),10 min后吸取上层血清,将检测样本在-30℃的冰箱内保存,4~6 h后,利用化学分析仪(上海玉研科学仪器有限公司,Altair 240型号),按照电化学发光法进行MMP-3水平检测。利用人IL-18定量酶联免疫吸附检测试剂盒,采用双抗体夹心ABC-ELISA法进行IL-18水平检测,试剂盒购自厦门慧嘉生物科技有限公司,具体实验步骤严格遵循试剂盒说明书。将静脉血在4℃环境下静置1 h,在其分层出现血清时,将其置于离心机中,通过14 000 r/min的速度离心20 min后吸取上层血清,采用

PGE2-EIA单克隆抗体试剂盒,按照酶联免疫竞争法进行PGE2水平检测,试剂盒购自上海研谨生物科技有限公司,具体实验步骤严格遵循试剂盒说明书。

1.4 统计学处理

采用SPSS 22.0统计学软件进行分析。计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用方差分析;计数资料用 $n(\%)$ 来表示,采用 χ^2 检验。运用多因素Logistic回归分析影响HTO治疗KOA疗效的影响因素。运用受试者工作特征(ROC)曲线下面积(AUC)分析血清MMP-3、IL-18水平对HTO治疗KOA的疗效评估价值。采用Pearson相关分析法对血清MMP-3、IL-18与血清PGE-2的相关性进行分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 KOA患者治疗前后血清MMP-3、IL-18、PGE-2水平比较

KOA患者经HTO治疗后血清MMP-3、IL-18、PGE-2水平与治疗前相比明显下降,差异有统计学意义($P < 0.05$)。治疗后1年与治疗前相比,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表1。

表1 KOA患者治疗前后血清MMP-3、IL-18、PGE-2水平比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of serum MMP-3, IL-18 and PGE-2 levels in KOA patients before and after treatment ($\bar{x} \pm s$)

指标	治疗前	治疗后	治疗后1年	F值	P值
MMP-3 (ng/mL)	152.71±42.32	94.18±16.35 ^a	93.85±17.24 ^a	18.113	0.000
IL-18 (ng/L)	72.48±11.75	29.42±6.73 ^a	28.91±6.45 ^a	15.135	0.000
PGE-2 (ng/L)	41.82±9.37	26.54±7.16 ^a	26.15±6.83 ^a	14.258	0.000

注:与治疗前比较,^a $P < 0.05$;与治疗1年后比较,^b $P < 0.05$ 。

2.2 评估HTO治疗KOA疗效不佳的多因素Logistic回归分析

多因素Logistic回归分析结果显示,血清MMP-3、IL-18水平升高是影响HTO治疗KOA治疗效果的独立危险因素($P < 0.05$)。见表2。

表2 评估HTO治疗KOA疗效不佳的多因素Logistic回归分析

Table 2 Multivariate Logistic regression analysis evaluating the poor efficacy of HTO for KOA treatment

评价因素	回归系数	标准误	Wald值	OR值	95%CI	P值
MMP-3	0.752	0.315	24.132	2.356	1.758~3.823	0.000
IL-18	0.727	0.278	21.654	1.962	1.224~2.611	0.000

2.3 血清MMP-3、IL-18水平对HTO治疗KOA的疗效评估价值

血清MMP-3、IL-18联合指标评估HTO治疗KOA治疗效果确切的特异性(89.87%)、灵敏度(87.91%)、AUC(0.915)均显著高于单一指标($P < 0.05$)。见表3。

表3 血清MMP-3、IL-18水平对HTO治疗KOA的疗效评估价值比较

Table 3 Comparison of efficacy evaluation value of serum MMP-3 and IL-18 levels for HTO treatment of KOA

	最佳截定点	特异性 (%)	灵敏度 (%)	AUC	95%CI	P值
MMP-3	95.74	86.24	88.32	0.823	0.745~0.857	0.015
IL-18	31.05	86.57	87.82	0.879	0.774~0.912	0.016
联合	55.51	89.87	90.91	0.915	0.812~0.936	0.011

2.4 血清 MMP-3、IL-18 与血清 PGE-2 的相关性

Pearson 相关分析结果显示,血清 MMP-3($r=0.714$)、IL-18($r=0.653$)与血清 PGE-2 均呈正相关($P<0.05$)。

2.5 随访结果

120 例 HTO 治疗 KOA 患者,经 1 年随访,失访 3 例。影像学复查结果显示,117 例患者均达截骨处骨性愈合,FTA 角度为 $168^{\circ}\sim 172^{\circ}$,矫正角度 $8^{\circ}\sim 18^{\circ}$,平均 $(12.05\pm 3.26)^{\circ}$,表明 HTO 治疗 KOA,患者预后良好。

3 讨论

目前临床对于 KOA 的治疗包括中西医结合非手术治疗以及外科治疗方式^[10],其中 HTO 与其他手术方式比较,其操作相对简单,手术风险较低,患者术后恢复较快,但 HTO 也存在感染、矫正不足及内翻复发、关节强直等并发症。因此,在 HTO 治疗后对其治疗效果进行准确评估可有效降低并发症对患者正常生理功能的损伤,而在生化代谢方面进行疗效评估,则可在并发症不可逆发展前及时进行干预。

有研究表明 MMPs 水平的变化与 OA 的发病存在密切关联^[11]。MMP-3 是 MMPs 蛋白酶超家族中最为重要的一类,可降解软骨链接蛋白等多种胶原酶和基质蛋白底物,引起关节滑膜炎^[12]。IL-18 为干扰素- γ 诱导因子,具有诱导 T 细胞和自然杀伤细胞产生干扰素 γ ,拮抗感染和肿瘤等生物作用^[13]。PGE-2 为一类炎症介质,可持久扩张血管和导致疼痛,是引起 OA 患者关节疼痛的因子之一^[14]。因此,在 KOA 发生发展中均有 MMP-3、IL-18 及 PGE-2 的参与。

王腾等^[15]学者研究发现,血清钙卫蛋白、硫酸软骨素 846、MMP3 在膝关节骨性关节炎患者表达水平升高,三者联合检测 AUC 为 0.919,灵敏度为 0.906,特异度为 0.857,三项指标水平的变化对膝关节骨性关节炎具有一定预测价值。李春树等^[16]学者研究发现,KOA 患者治疗前血清 IL-18、TNF- α 水平较对健康人群高,KOA 患者治疗后血清 IL-18 及 TNF- α 水平均低于治疗前,对二者进行检测可充分反映患者 KOA 严重程度和治疗效果,可将其作为早期临床诊断及预后的重要指标。本研究结果显示,血清 MMP-3、IL-18 二者联合检测与独立指标相比,对 HTO 治疗 KOA 的

疗效评估价值更高。另外,IL-18 能够诱导 MMP 的产生,增加 MMP-13 和组织 MMP 抑制剂的表达。因此,经 HTO 治疗后,患者关节软骨磨损情况改善,炎症反应降低,对滑膜细胞刺激减少,从而使得 IL-18 水平降低,并进一步降低 MMP-3 水平。因此,血清 MMP-3 及 IL-18 水平可作为评估疗效的敏感性指标。这与王腾等、李春树等学者研究结论相似。

魏春等^[17]学者研究发现,腰椎间盘突出症外周血白细胞介素-1 β 、PGE2 和 MMP-3 水平与病情严重程度及患者疼痛程度有相关性,并且患者 PGE2 和 MMP-3 水平呈明显正相关性。付兆宗等^[18]学者研究发现,不同浓度的 IL-18 刺激软骨细胞,随着 IL-18 浓度提高,PGE2 水平上升。本研究 Pearson 相关分析结果显示,血清 MMP-3、IL-18 表达升高会引起血清 PGE-2 水平上升。原因可能在于 MMP-3 水平异常升高引起膝关节软骨及关节滑膜退行性改变与破坏,形成病变关节骨赘,刺激滑膜细胞,使得 IL-18 水平升高,促进炎症反应,而炎性环境会刺激巨噬细胞和成骨细胞大量分泌及合成 PGE-2,导致血清 PGE-2 水平上升,从而与血清 MMP-3、IL-18 水平呈正相关。这与魏春等、付兆宗等学者研究结论相似。

综上所述,血清 MMP-3、IL-18 水平对 HTO 治疗 KOA 的疗效评估价值较高,联合指标的评价准确性优于单一指标,且血清 MMP-3、IL-18 水平与血清 PGE-2 均呈正相关,三者在 KOA 发生发展及治疗中均有重要作用。

参考文献

- [1] Vinko Palada, Aisha Siddiqah Ahmed, Eva Freyhult, et al. Elevated inflammatory proteins in cerebrospinal fluid from patients with painful knee osteoarthritis are associated with reduced symptom severity[J]. J Neuroimmunol, 2020,349(45): 1147-1151.
- [2] Anne Maria Sjoerdje de Hoop, Corelien Jacoba Johanna Klock, Martijn Frits Pisters, et al. Movement behaviour patterns in patients with hip and/or knee osteoarthritis in the physical therapy setting: a cross-sectional study [J]. BMC Musculoskel Dis, 2020,21(1):859-862.
- [3] Darren R. Mazzei, Ayoola Ademola, J. Haxby Abbott, et al. Marshall. Systematic review of economic evaluations investigating education, exercise, and dietary weight management to manage hip and knee osteoarthritis: protocol [J]. Syst Rev, 2020,9(1):821-824.

- [4] Zhang ZQ, Mei YF, Zhang L, et al. Therapeutic Effects Comparison and Revision Case Analysis of Unicompartmental Knee Arthroplasty and Open Wedge High Tibial Osteotomy in Treating Medial Knee Osteoarthritis in Patients Under 60 years: A 2-6-year Follow-up Study [J]. Orthop Surg, 2020, 14(2):963-965.
- [5] Kwak Yoon Hae, Kwak Dae-Kyung, Kim Nan Young, et al. Significant changes in synovial fluid microRNAs after high tibial osteotomy in medial compartmental knee osteoarthritis: Identification of potential prognostic biomarkers [J]. Plos One, 2020, 15(1):589-591.
- [6] Zhao QH, Lin LP, Guo YX, et al. Matrix metalloproteinase-13, NF- κ B p65 and interleukin-1 β are associated with the severity of knee osteoarthritis [J]. Exp Ther Med, 2020, 19(6):874-876.
- [7] 任志帅,程招军,孙和军,等. 膝骨关节炎全膝关节置换前骨质疏松的相关因素分析[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(22):3212-3218.
- [8] Woertler K, Buerger H, Moeller J, et al. Patellar articular cartilage lesions: in vitro MR imaging evaluation after placement in gadopen-tetate dimeglumine solution [J]. Radiology, 2004, 230(3):768-773.
- [9] 中华医学会骨科学分会. 骨关节炎诊治指南(2007年版) [J]. 中华骨科杂志, 2007, 27(10):793-796.
- [10] Horikawa Tomohiro, Kubota Kenji, Hara Shintaro, et al. Distal tuberosity osteotomy in open-wedge high tibial osteotomy does not exacerbate patellofemoral osteoarthritis on arthroscopic evaluation [J]. Knee Sports Traumatol Arthrosc, 2020, 28(6):796-798.
- [11] Permatasari Dian Agustina, Karlana Deantari, Iskandarsyah Iskandarsyah, et al. Quercetin prevent proteoglycan destruction by inhibits matrix metalloproteinase-9, matrix metalloproteinase-13, a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs-5 expressions on osteoarthritis model rats [J]. J Adv Res, 2019, 10(1):859-861.
- [12] Shivnath Neelam, Rawat Vineeta, Siddiqui Sahabjada, et al. Antiosteoarthritic effect of Punica granatum L. peel extract on collagenase induced osteoarthritis rat by modulation of COL-2, MMP-3, and COX-2 expression [J]. Environ Toxicol, 2020, 26(11):583-586.
- [13] Koh SM, Chan CK, Teo SH, et al. Elevated plasma and synovial fluid interleukin-8 and interleukin-18 may be associated with the pathogenesis of knee osteoarthritis [J]. Knee, 2020, 27(1):905-907.
- [14] Yang Mao, Chen Chunlin, Wang Kun, et al. Astilbin influences the progression of osteoarthritis in rats by down-regulation of PGE-2 expression via the NF- κ B pathway [J]. Ann Transl Med, 2020, 8(12):741-743.
- [15] 王腾,丁洪,赵正明,等. S100A8/A9、CS-846、MMP3 在膝关节骨性关节炎中的表达及临床意义 [J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(19):2337-2340.
- [16] 李春树. 膝骨关节炎患者远红外线理疗后 IL-18、TNF- α 的变化及其关系研究 [J]. 中国疗养医学, 2020, 29(10):1050-1052.
- [17] 魏春,徐杰. 腰椎间盘突出症患者外周血白细胞介素-1 β 、前列腺素 E2 及基质金属蛋白酶-3 水平变化 [J]. 新乡医学院学报, 2017, 34(1):76-78.
- [18] 谢进,舒莉莉,苏虔,等. miR-155-5p 靶向 FNDC3B 基因通过 NF- κ B 信号通路调控骨关节炎软骨细胞增殖和凋亡 [J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(7):914-918+927.

(上接第 1865 页)

- [8] 陈萍. 临床肿瘤诊疗指南 [M]. 广东:世界图书出版广东有限公司, 2013.
- [9] 彭娟,崔慢慢. DC-CIK 细胞免疫治疗联合化疗治疗晚期卵巢癌的效果及对免疫功能的影响 [J]. 中国医药导报, 2019, 16(17):59-62.
- [10] 刘华胜,时靖,刘海波,等. 自体 DC-CIK 细胞联合其它免疫细胞治疗血液系统肿瘤的回顾性研究 [J]. 中国实验血液学杂志, 2019, 27(3):983-990.
- [11] 宋钰,张琳,王光辉,等. 系统炎症反应联合肿瘤免疫评分对结直肠癌肝转移患者术后预后的预测价值 [J]. 现代肿瘤医学, 2020, 28(6):121-125.
- [12] Song M, Pan Q, Ding Y, et al. The efficacy and safety of the combination of axitinib and pembrolizumab-activated autologous DC-CIK cell immunotherapy for patients with advanced renal cell carcinoma: a phase 2 study [J]. CT I, 2021, 10(2):59-62.
- [13] 葛刚,李志强,徐林浩. 胸腔镜手术治疗非小细胞肺癌的疗效及对患者血清肿瘤标志物和免疫反应指标的影响 [J]. 癌症进展, 2019, 17(16):1916-1919.
- [14] 贺金标,常琴,母健君. 三种不同微创手术联合化疗治疗肌层浸润性膀胱癌的疗效及安全性分析 [J]. 实用医院临床杂志, 2019, 16(2):59-62.
- [15] 蒋玉欢,何本超,郑志刚,等. 改良 Miccoli 微创术联合术后 DC-CIK 治疗甲状腺癌疗效及对患者血清 Gal-3, sIL-2R 水平的影响 [J]. 陕西医学杂志, 2020, 49(11):51-55+44.

外周血 Cyp A、NF- κ B 及 VEGF 水平与 CHD 患者术后再狭窄的相关性

李洪 朱强 石梦然 刘福元*

〔摘要〕 **目的** 分析外周血中亲环素 A (Cyp A)、核因子- κ B (NF- κ B) 及血管内皮生长因子 (VEGF) 水平与冠心病 (CHD) 患者经皮冠状动脉介入术 (PCI) 术后再狭窄的相关性。**方法** 选取 2018 年 8 月至 2019 年 8 月本院收治的 200 例行 PCI 术治疗的 CHD 患者为研究对象, 随访 1 年, 根据冠脉造影结果分为血管再狭窄组 ($n=40$) 和血管未再狭窄组 ($n=160$), 检测外周血 Cyp A、NF- κ B 及 VEGF 水平, 收集两组基本资料, 采用 Logistic 多因素回归分析 CHD 患者 PCI 术后再狭窄的危险因素, 同时采用 ROC 曲线分析外周血 Cyp A、NF- κ B 及 VEGF 水平对 CHD 患者术后再狭窄的诊断价值。**结果** 两组 FPG、LDL-C、TC、FIB、Cyp A、NF- κ B、VEGF 及支架直径比较差异有统计学意义 ($P<0.05$), 两组性别、年龄、吸烟史、高血压病史、TG、LDL-C、HDL-C、RBC、DD、中性粒细胞、WBC、淋巴细胞、支架长度及支架数量比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。多因素 Logistic 回归分析显示, FPG、LDL-C、TC、FIB、Cyp A、NF- κ B、VEGF 及支架直径为 CHD 患者 PCI 术后再狭窄的独立危险因素 ($P<0.05$)。ROC 曲线分析显示, 外周血 Cyp A、NF- κ B 及 VEGF 水平联合预测 CHD 患者 PCI 术后再狭窄的敏感度为 94.00%, AUC 为 0.951, 高于单独检测 ($P<0.05$)。**结论** 外周血 Cyp A、NF- κ B 及 VEGF 水平呈高表达可导致 CHD 患者术后再狭窄的发生, 临床应对其水平进行监测, 并进行针对性干预, 以避免 PCI 术后再狭窄发生。

〔关键词〕 经皮冠状动脉介入术; 中亲环素 A; 核因子- κ B; 血管内皮生长因子; 术后再狭窄

Correlation between the levels of CYP A, NF- κ B and VEGF in peripheral blood and postoperative restenosis in patients with CHD

LI Hong, ZHU Qiang, SHI Mengran, LIU Fuyuan*

(Department of Cardiology, Xiangyang First People's Hospital Affiliated to Hubei Medical College, Xiangyang, Hubei, China, 441000)

〔ABSTRACT〕 **Objective** To analyze the correlation between peripheral blood cyclophilin A (Cyp A), nuclear factor- κ B (NF- κ B) and vascular endothelial growth factor (VEGF) levels and restenosis in patients with coronary heart disease (CHD) after percutaneous coronary intervention (PCI). **Methods** From August 2018 to August 2019, 200 CHD patients treated with PCI were selected as the study subjects. They were followed up for 1 year and were divided into the restenosis group ($n=40$) and the non-restenosis group ($n=160$) according to the results of coronary angiography. The levels of peripheral blood Cyp A, NF- κ B and VEGF were detected. The basic data from two groups were collected. Logistic multivariate regression analysis was conducted to screen the risk factors for restenosis in CHD patients after PCI. The ROC curve was used to analyze the value of peripheral blood Cyp A, NF- κ B and VEGF levels in the diagnosis of restenosis in CHD patients after PCI. **Results** There was a statistically significant difference between the two groups of FPG, LDL-C, TC, FIB, Cyp A, NF- κ B, VEGF and the diameter of the stent ($P<0.05$). There was no significant difference in gender, age, smoking history, history of hypertension, TG, LDL-C, HDL-C, RBC, DD, neutrophils,

基金项目:湖北省卫健委科研项目(ZY2018F013)

作者单位:湖北医药学院附属襄阳市第一人民医院心血管内科,湖北,襄阳 441000

*通信作者:刘福元, E-mail:lfy0053@163.com

WBC, lymphocytes, stent length and number of stents between the two groups ($P>0.05$). Multivariate logistic regression analysis showed that FPG, LDL-C, TC, FIB, Cyp A, NF- κ B, VEGF and stent diameter were independent risk factors for restenosis in CHD patients after PCI ($P<0.05$). ROC curve analysis showed that the sensitivity and AUC of combined CYP A, NF- κ B and VEGF in predicting restenosis after PCI in CHD patients were 94.00% and 0.951, which were higher than those of single detection ($P<0.05$). **Conclusion** The high expression of CYP A, NF- κ B and VEGF in peripheral blood can lead to the occurrence of postoperative restenosis in patients with CHD. The clinical level should be monitored and targeted interventions should be carried out to avoid the occurrence of restenosis after PCI.

[KEY WORDS] Percutaneous coronary intervention; Cyclophilin A; Nuclear factor- κ B; Vascular endothelial growth factor; Postoperative restenosis

冠心病(coronary atherosclerotic heart disease, CHD)是由于血管狭窄或闭塞,导致心肌缺血、缺氧而引起的心脏病,以突发性心前区疼痛为主要症状^[1]。经皮冠状动脉介入术(percutaneous coronary intervention, PCI)是治疗CHD的首要方法,具有显著疗效,但可损伤冠脉血管,导致支架内再狭窄发生,而支架内再狭窄是影响患者预后的主要因素之一^[2]。据报道显示,支架再狭窄的发生率为20%^[3],对CHD患者预后产生严重影响。中亲环素A(Cyclophilin A, Cyp A)是氧化应激引起组织损伤的介质,可通过促进单核细胞粘附和创造氧化环境来促进炎症,在动脉粥样硬化的几个阶段中发挥重要作用^[4]。核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)是炎症和免疫调节的关键核转录因子,可通过调节细胞因子和炎症分子的表达,参与冠心病过程^[5]。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是一种特异的内皮细胞促分裂剂,能特异性促进血管内皮细胞的增殖和分裂,促进细胞转移,促进血管生成^[6]。本研究将分析外周血Cyp A、NF- κ B及VEGF水平与CHD患者PCI术后再狭窄的关系,以期临床降低再狭窄发生率提供参考。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2018年8月至2019年8月本院收治的200例行PCI术治疗的CHD患者为研究对象。纳入标准:①符合《临床冠心病诊断与治疗指南》^[7]中诊断,冠脉造影示左主干管腔狭窄程度 $\geq 50\%$,分支血管管腔狭窄程度 $\geq 75\%$,成功置入支架,无支架贴壁不良;且均于6~12个月内行CAG复查;②年龄40~80岁;③知情同意并经医院伦理委员会批准。排除标准:①脏器功能不全;②合并恶性肿

瘤者;③认知障碍者;④急性脑血管疾病、急性心肌梗死、风湿性心脏病及肝功能损害者。随访1年,根据冠脉造影结果分为血管再狭窄组($n=40$)和血管未再狭窄组($n=160$)。

1.2 研究方法

记录两组患者临床资料,包括性别、年龄、吸烟史、高血压病史及支架长度、直径及数量。术后12个月后采集3.0 mL患者外周静脉血,离心10 min分离血浆,采用雅培越捷型血糖仪(雅培贸易上海有限公司,批准文号:2404047)检测空腹血糖(fasting plasma glucose, FPG);采用全自动生化分析仪(日立7600系列全自动生化分析仪)测定总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglycerides, TG)、纤维蛋白原(Fibrinogen, FIB)、低密度脂蛋白(low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)、高密度脂蛋白(high-density lipoprotein cholesterol HDL-C)、红细胞计数(Red blood cells, RBC)、D-二聚体(D-Dimer, DD)、中性粒细胞、白细胞计数(White Blood Count, WBC)及淋巴细胞表达水平;采用酶联免疫吸附法(山东风途物联网科技有限公司FT-SY96A型)检测血清Cyp A、NF- κ B、VEGF水平。

1.3 统计学处理

采用SPSS 20.0软件进行统计分析,计数资料采用 $n(\%)$ 表示,行 χ^2 检验,计量资料采用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,行 t 检验,多因素采用logistic回归分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CHD患者PCI术后再狭窄的单因素分析

两组FPG、LDL-C、TC、FIB、Cyp A、NF- κ B、VEGF及支架直径比较差异有统计学意义($P<0.05$),两组性别、年龄、吸烟史、高血压病史、TG、LDL-C、HDL-C、RBC、DD、中性粒细胞、WBC、淋

巴细胞、支架长度及支架数量比较差异无统计学意义($P>0.05$)。见表1。

表1 CHD患者PCI术后再狭窄的单因素分析 [$n(\%)$, ($\bar{x}\pm s$)]

Table 1 single factor analysis on restenosis of CHD patients after PCI [$n(\%)$, ($\bar{x}\pm s$)]

项目	血管再狭窄组 ($n=40$)	血管未再狭窄组 ($n=160$)	t/χ^2 值	P 值
年龄(岁)	62.56 $\pm$ 7.80	61.82 $\pm$ 7.76	0.539	0.591
性别 男	30(75.00)	128(80.00)	0.482	0.487
女	10(25.00)	32(20.00)		
吸烟史	22(55.00)	85(53.13)	0.045	0.832
高血压病史	26(65.00)	87(54.38)	1.470	0.225
FPG(mm/L)	6.25 $\pm$ 2.05	5.40 $\pm$ 1.63	2.794	0.006
TG(mm/L)	1.62 $\pm$ 0.14	1.65 $\pm$ 0.19	0.936	0.350
TC(mm/L)	5.04 $\pm$ 2.33	4.21 $\pm$ 1.56	2.700	0.008
LDL-C(mm/L)	3.45 $\pm$ 0.30	2.61 $\pm$ 0.35	13.946	<0.001
HDL-C(mm/L)	1.05 $\pm$ 0.23	1.12 $\pm$ 0.26	1.557	0.121
FIB(g/L)	4.34 $\pm$ 0.51	3.22 $\pm$ 0.40	14.945	<0.001
RBC($\times 10^{12}/L$)	4.35 $\pm$ 1.28	4.41 $\pm$ 1.36	0.252	0.801
DD($\mu g/L$)	261.52 $\pm$ 20.36	255.60 $\pm$ 18.77	1.754	0.081
中性粒细胞($\times 10^9/L$)	4.71 $\pm$ 1.22	4.67 $\pm$ 1.20	0.188	0.851
WBC($\times 10^9/L$)	7.02 $\pm$ 2.16	6.97 $\pm$ 2.13	0.132	0.895
淋巴细胞($\times 10^9/L$)	1.58 $\pm$ 0.19	1.63 $\pm$ 0.21	1.372	0.172
Cyp A(ng/mL)	17.82 $\pm$ 5.69	13.71 $\pm$ 3.90	5.392	<0.001
NF- κ B(pg/mL)	52.65 $\pm$ 7.03	35.59 $\pm$ 5.23	17.141	<0.001
VEGF(ng/L)	313.28 $\pm$ 50.36	259.41 $\pm$ 40.26	7.180	<0.001
支架长度(mm)	22.80 $\pm$ 6.53	23.04 $\pm$ 6.58	0.207	0.837
支架直径(mm)	2.84 $\pm$ 0.70	3.15 $\pm$ 0.98	1.883	0.061
支架数量(个)	1.85 $\pm$ 0.23	1.80 $\pm$ 0.17	1.542	0.125

2.2 CHD患者PCI术后再狭窄的多因素 Logistic 回归分析

Logistic 回归分析,结果显示,FPG、LDL-C、TC、FIB、Cyp A、NF- κ B、VEGF及支架直径为CHD患者PCI术后再狭窄的独立危险因素($P<0.05$)。见表2。

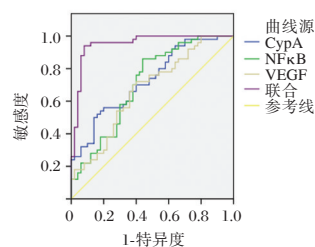
2.3 外周血 Cyp A、NF- κ B 及 VEGF 水平预测 CHD 患者 PCI 术后再狭窄的 ROC 曲线分析

ROC 曲线分析显示,外周血 Cyp A、NF- κ B 及 VEGF 水平联合预测 CHD 患者 PCI 术后再狭窄的敏感率为 94.00%,AUC 为 0.951,高于单独检测($P<0.05$)。见表3和图1。

表3 外周血 Cyp A、NF- κ B 及 VEGF 水平预测 CHD 患者 PCI 术后再狭窄的 ROC 曲线分析

Table 3 CYP in peripheral blood A、NF- κ ROC curve analysis of B and VEGF levels in predicting restenosis after PCI in patients with CHD

指标	敏感度	特异度	AUC	95%CI
Cyp A	0.840	0.602	0.726	0.630~0.824
NF- κ B	0.800	0.633	0.704	0.603~0.814
VEGF	0.753	0.663	0.665	0.566~0.778
Cyp A+NF- κ B+VEGF	0.940	0.453	0.951	0.904~0.992



ROC 曲线

Figure 1 ROC curve

3 讨论

近年来,随着生活水平的提高和饮食结构的改变及工作压力的增加,CHD 发病率逐年上升。PCI 是治疗有效手段,但术后再狭窄发生率较高。目前认为,PCI 术后再狭窄的原因是:血管内膜过度增生和平滑肌细胞迁移,支架置入后新生内膜增生,导致再狭窄发生,进而影响疗效^[8]。因此对再狭窄进行诊断并进行干预至关重要。

相关研究显示,FPG、TC、LDL-C、支架直径为CHD患者PCI术后再狭窄的危险因素^[9]。本研究表明,FPG、LDL-C、TC、FIB及支架直径为CHD患者PCI术后再狭窄的独立危险因素。分析其可能机制为:较高浓度的血糖可影响支架置入后的冠脉内皮修复,促进冠脉内血栓形成、平滑肌迁移和新生内膜增殖,从而导致再狭窄发生。LDL-C和TC可评估血脂水平,高水平的血脂会引起过多脂质和

表2 CHD患者PCI术后再狭窄的影响因素赋值表

Table 2 evaluation table of influencing factors of restenosis in CHD patients after PCI

因素	赋值	β 值	SE	Wald χ^2	OR	95%CI	P 值
FPG	<6.1 mmol/L=0, $\geq$ 6.1 mmol/L=1	0.426	0.112	14.467	1.531	1.229~1.907	<0.001
LDL-C	<3 mmol/L=0, $\geq$ 3 mmol/L=1	0.381	0.109	12.218	1.464	1.182~1.812	0.001
TC	<4.5 mmol/L=0, $\geq$ 4.5 mmol/L=1	0.376	0.114	10.878	1.456	1.165~1.821	0.001
FIB	<3.8 g/L=0, $\geq$ 3.8 g/L=1	0.359	0.120	8.950	1.432	1.132~1.812	0.003
Cyp A	<15 ng/mL=0, $\geq$ 15 ng/mL=1	0.362	0.117	9.573	1.436	1.142~1.806	0.002
NF- κ B	<40 pg/mL=0, $\geq$ 40 pg/mL=1	0.375	0.123	9.295	1.455	1.143~1.852	0.002
VEGF	<270 ng/L=0, $\geq$ 270 ng/L=1	0.369	0.127	8.442	1.446	1.128~1.855	0.004
支架直径	<3 mm=0, $\geq$ 3 mm=1	0.402	0.110	12.18	1.495	1.205~1.854	<0.001

斑块,从而损伤血管内皮细胞,促进动脉粥样硬化,导致再狭窄发生。FIB可促使平滑肌细胞迁移,引起冠脉内膜增生,最终引起再狭窄^[10]。同时相关研究显示,支架直径、长度及数量是CHD患者PCI术后再狭窄的危险因素^[11]。本研究显示,支架直径是CHD患者PCI术后再狭窄的独立危险因素,由于支架直径较小对于狭窄部位无功能性作用,并对血管损伤更为严重,进而增加血管狭窄发生率。

CypA是受体蛋白,具有肽基脯氨酰顺反异构酶活性,在蛋白质折叠、细胞外信号调节激酶和细胞凋亡诱导因子中起重要作用;CypA还可作为氧化应激诱导的分泌因子。此外CypA的分泌受Rho激酶激活的调节,对血管平滑肌细胞的收缩和动脉粥样硬化具有重要作用^[12]。研究证实,CypA可使内膜增厚,形成腹主动脉瘤、动脉粥样硬化和心肌梗死^[13]。活化的NF- κ B能与DNA链特定的 κ B序列结合,启动和调节与免疫和炎症反应有关的基因转录,在机体的免疫应答、炎症反应及细胞的生长调控中具有重要作用^[14]。VEGF主要分布于血管内皮细胞,能促进缺血组织血管内皮细胞增殖和血管生成及多种血管活性物质的合成,并抑制平滑肌细胞增殖。VEGF可反映心肌缺血的程度,与冠心病的程度密切相关^[15]。本研究结果提示CypA、NF- κ B、VEGF可能参与血管再狭窄发生发展。分析原因可能为:PCI术可导致冠状动脉斑块破裂出血,并可损伤内膜,释放炎症介质,诱导CypA、NF- κ B、VEGF表达;同时缺血再灌注损伤可激活外周血单核和T淋巴细胞,浸润内皮细胞下层,释放大炎症介质,从而导致外周CypA、NF- κ B、VEGF升高。多因素Logistic回归分析结果显示,CypA、NF- κ B、VEGF为CHD患者PCI术后再狭窄的独立危险因素。高水平的CypA、NF- κ B、VEGF可损伤血管并刺激血小板,致使平滑肌细胞堆积、血管内膜增生,从而导致再狭窄发生。ROC曲线分析显示,CypA、NF- κ B及VEGF水平联合预测CHD患者PCI术后再狭窄的敏感度和AUC高于单独检测,提示外周血CypA、NF- κ B及VEGF水平联合预测CHD患者PCI术后再狭窄的价值较高。

综上,FPG、LDL-C、TC、LDL-C、CypA、NF- κ B、VEGF及支架直径是CHD患者PCI术后再狭窄发生的独立危险因素,其中外周血CypA、NF- κ B及VEGF水平联合检测可提高对其诊断价值。

参考文献

- [1] Kasem M, Bentham J, Thomson J, et al. Single-centre experience in stenting arterial shunts for adult CHD patients with single-ventricle physiology and pulmonary blood flow dependent on arterial shunts [J]. *Cardiol Young*, 2018, 28(12): 1431-1435.
- [2] 黄佳,唐惠芳,李柳军,等. RT-3DE定量评价心梗患者PCI术前后左室功能的变化[J]. *中南医学科学杂志*, 2019, 47(1): 15-19.
- [3] 张静,赵会连. PCI术前Lp(a), MAU蛋白水平与冠心病术后冠状动脉再狭窄的关系研究[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2019, 17(18): 2834-2836.
- [4] Ohtsuki T, Satoh K, Omura J, et al. Prognostic Impacts of Plasma Levels of Cyclophilin A in Patients With Coronary Artery Disease [J]. *Arter Thromb Vasc Biol*, 2017, 37(4): 685-693.
- [5] 邹国辉,黄小燕,唐娜娜,等. 解毒活血方对经皮冠状动脉介入术后患者NF- κ B、IL-1 β 、TNF- α 变化及支架内再狭窄的影响[J]. *广州中医药大学学报*, 2017, 34(1): 1-5.
- [6] 马明娟,王素娟,刘晓梅. 血清VEGF, hs-CRP, MMP在急性脑梗死中的诊断价值及临床意义[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2021, 13(6): 905-908+912.
- [7] 颜红兵. 临床冠心病诊断与治疗指南[M]. 北京:人民卫生出版社, 2010.
- [8] Dorofeeva NP, Orekhova YN, Ter-Akopyan AO, et al. Quality of life dynamics in patients with ischemic heart disease after percutaneous coronary intervention with stent implantation [J]. *J Clin Pract*, 2018, 9(3): 10-15.
- [9] 罗江宾,王天松,何喜民,等. 冠心病患者经皮冠状动脉介入治疗术后支架内再狭窄的相关危险因素分析[J]. *现代生物医学进展*, 2019, 19(15): 176-179+193.
- [10] 谷臣锋,刘剑雄,郑庆昆,等. 中老年冠心病患者冠状动脉药物洗脱支架置入术后支架内再狭窄的相关因素分析[J]. *四川医学*, 2017, 38(7): 797-801.
- [11] 卢晓操,王晓琳. 影响冠状动脉粥样硬化性心脏病支架植入术后冠脉支架再狭窄相关因素的Logistic回归分析[J]. *河北医学*, 2020, 26(2): 205-210.
- [12] Giacoppo D, Alfonso F, Xu B, et al. Drug-Coated Balloon Angioplasty Versus Drug-Eluting Stent Implantation in Patients With Coronary Stent Restenosis [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2020, 75(21): 2664-2678.
- [13] 刘进军,张恒,张宁汝,等. 阿托伐他汀联合替格瑞洛治疗冠心病不稳定型心绞痛的疗效观察[J]. *基因组学与应用生物学*, 2018, 37(3): 85-91.
- [14] 曹伟,吴桂平,周瀛,等. 通心络胶囊对冠脉支架植入术后病人NF- κ B, IL-6及TNF- α 表达的影响[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2018, 16(3): 342-343.
- [15] 姚远,王甫誉,刘志新,等. 血管内皮生长因子和一氧化氮水平对心肌梗死患者冠状动脉支架置入术后再狭窄的预测研究[J]. *中国临床医生杂志*, 2018, 46(9): 1054-1056.

Her-2 蛋白、PG II 及 Sema4D 蛋白在胃癌组织中的表达及临床意义

彭强 余昌俊*

【摘要】 目的 分析 Her-2 蛋白、血清胃蛋白酶原 II (PG-II) 及轴突生长导向因子 4D (Sema4D) 蛋白在胃癌组织中的表达及临床意义。方法 选取 2014 年 10 月至 2016 年 1 月于安徽医科大学第一附属医院接受根治手术的 100 例胃癌患者, 收集患者的胃癌组织及癌旁正常胃粘膜组织作为胃癌组和癌旁正常组织组。比较两组 Her-2 蛋白、PG II 及 Sema4D 蛋白水平表达差异, 分析 Her-2 蛋白、PG II 及 Sema4D 蛋白与临床病理参数的关系, 采用 Logistic 回归分析影响胃癌患者预后生存的危险因素。结果 胃癌组 Her-2 蛋白、PG II 及 Sema4D 蛋白阳性表达率均高于癌旁正常组织组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。肿瘤直径 (≥ 5 cm)、分化程度 (低分化)、TNM 分期 (III 期~IV 期)、淋巴结转移 (有) 患者的 Her-2、PG II 及 Sema4D 蛋白的阳性表达率更高 ($P < 0.05$)。肿瘤直径、分化程度、TNM 分期、淋巴结转移为影响患者预后生存的单因素 ($P < 0.05$)。logistic 分析结果显示, 患者的肿瘤直径、分化程度、TNM 分期、淋巴结转移及 Her-2、PG II、Sema4D 蛋白是影响患者预后的危险因素 ($P < 0.05$)。结论 Her-2 蛋白、PG II 及 Sema4D 蛋白在胃癌组织中呈高表达状态, 可作为预测胃癌患者预后的分子标志物和肿瘤治疗的潜在靶点。

【关键词】 Her-2 蛋白; PG II; Sema4D 蛋白; 胃癌组织

Expressions and clinical significance of Her-2, PG II and Sema4D in gastric cancer

PENG Qiang, YU Changjun*

(Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei, Anhui, China, 230022)

【ABSTRACT】 **Objective** To analyze the expressions and clinical significance of Her-2, serum pepsinogen II (PG-II) and axon growth guiding factor 4D (Sema4D) in gastric cancer tissues. **Methods** 100 patients with gastric cancer treated with radical surgery in this hospital from October 2014 to January 2016 were selected. The gastric cancer tissues and normal gastric mucosa tissues adjacent to the cancer were collected as the gastric cancer group and the adjacent normal tissue group. The differences in the expression levels of Her-2, PG II and Sema4D between the two groups were compared. The relationship between Her-2, PG II and Sema4D and clinicopathological parameters was analyzed. Logistic regression was used to analyze the risk factors affecting the prognostic survival of patients with gastric cancer. **Results** The positive expression rates of Her-2, PG II and Sema4D in the gastric cancer group were higher than those in the adjacent normal tissue group, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The positive expression of Her-2, PG II and Sema4D was higher in patients with tumor diameter (≥ 5 cm), degree of differentiation (low differentiation), TNM stage (stage III ~ IV), lymph node metastasis (yes) ($P < 0.05$). Tumor diameter, degree of differentiation, TNM stage, and lymph node metastasis were the single factors that affected the prognostic survival of patients ($P < 0.05$). The logistic analysis results showed that the tumor diameter, degree of differentiation, TNM stage, lymph node metastasis, and Her-2, PG II, and Sema4D were risk factors affecting the patient's prognosis ($P <$

基金项目: 安徽省自然科学基金资助项目 (1608085MH215)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院普外科胃肠外科, 安徽, 合肥 230022

*通信作者: 余昌俊, E-mail: tikaoy771117@163.com

0.05)。 **Conclusion** Her-2, PG II and Sema4D are highly expressed in gastric cancer tissues, and can be used as molecular markers for predicting the prognosis of patients with gastric cancer and potential targets for tumor treatment.

[KEY WORDS] Her-2; PG II; Sema4D; Gastric cancer tissue

据统计,我国胃癌的发病率位居世界第一,每年死亡人数高达30万人,严重危害了患者的生命健康^[1-2]。寻找诊断胃癌、评估病情的特异性标志物意义重大^[3]。目前,已有较多相关研究证实人类表皮生长因子受体-2(Human epidermal growth factor receptor 2, HER-2)、胃蛋白酶原(Pepsinogen, PG)、轴突导向生长因子4D(Semaphorin 4D, Sema4D)对胃癌的诊断具有一定价值^[4]。HER-2是一种糖基化多肽性分泌因子,在肿瘤的发生发展中发挥关键作用^[5]。PG是一种消化性蛋白酶,主要有PGI及PG II,其中PG II与胃底黏膜病变有较高相关性^[6]。Sema4D蛋白具有促进肿瘤血管发生的作用^[7],是继血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)后,又一促血管新生因子。本文就Her-2蛋白、PG II及Sema4D蛋白在胃癌组织中的表达及临床意义进行分析,旨在为胃癌的研究提供参考数据,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取安徽医科大学第一附属医院2014年10月至2016年1月收治的100例胃癌患者。纳入标准:①均符合《内科学(第九版)》中胃癌的诊断标准^[8];②参与研究前3月均未参与其他治疗;③病例资料完整;④无其他消化系统疾病。排除标准:①合并白血病等血液疾病者;②三月内服用过抗生素者;③合并精神障碍者;④存在其他恶性肿瘤者;⑤合并风湿免疫系统疾病者。男68例,女32例,平均年龄(55.21±6.37)岁。收集患者的胃癌组织及癌旁(距离胃癌组织5 cm以上)正常组织作为胃癌组和癌旁正常组织组。本研究经院医学伦理委员会批准通过,受试者或其家属已签署知情同意书。

1.2 方法

采用酶联免疫吸附法检测血清PG II,患者空腹采静脉血3 mL,抗凝离心后以-20℃保存。实验时将血浆以37℃温浴箱孵化,同时取出PG II试剂盒,等温度达到28℃时,开始配制标准品液,加样

并密封保存,洗板4~7次,将反应板置于酶标仪里分别测定其水平。PG II试剂盒购自上海西唐生物科技有限公司。

采用免疫组化染色法检测Her-2蛋白、Sema4D蛋白。兔抗人HER2单克隆抗体、兔抗人Sema4D单克隆抗体均购于福州迈新生物技术开发公司,检测试剂盒均购自北京中衫金桥生物技术有限公司,检测均严格按照检测说明书进行。阳性判定标准^[9]:肿瘤细胞胞质或细胞核中出现棕黄色或棕褐色颗粒,反之则为阴性。阳性细胞比例评分:≤5%为0分,>5%~25%为1分,>25%~50%为2分,>50%~75%为3分,>75%为4分;染色强度评分:未染色为0分,淡黄色为1分,棕黄色为2分,棕褐色为3分。染色指数=阳性细胞比例评分+染色强度评分。染色指数>3分为阳性;染色指数≤3分为阴性。阳性率=阳性例数/总例数×100%。

所有患者均在出院后通过电话、微信、到院复诊等方式进行为期5年的随访,随访直至随访期结束或患者死亡。

1.3 统计学方法

采用SPSS 22.0软件进行统计分析,计数资料以 $n(\%)$ 表示,行 χ^2 检验,影响胃癌患者预后生存的危险因素以Logistic回归分析,以 $P<0.05$ 为差异统计学意义。

2 结果

2.1 两组Her-2蛋白、PG II及Sema4D蛋白表达情况比较

胃癌组Her-2蛋白、PG II及Sema4D蛋白阳性表达率均高于癌旁正常组织组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表1、图1。

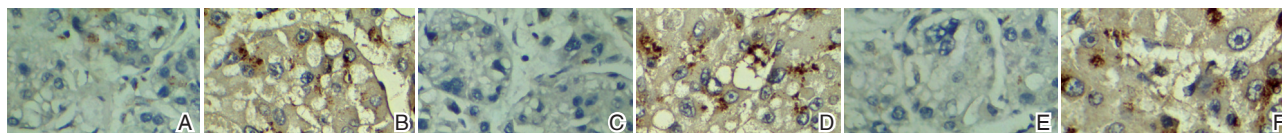
2.2 Her-2蛋白、PG II及Sema4D蛋白与临床病理参数的关系

肿瘤直径(≥ 5 cm)、分化程度(低分化)、TNM分期(Ⅲ期~Ⅳ期)、淋巴结转移(有)患者的Her-2、PG II及Sema4D蛋白的阳性表达率更高($P<0.05$)。见表2。

表1 两组 Her-2 蛋白、PG II 及 Sema4D 蛋白表达情况比较 [n(%)]

Table 1 Expression of HER-2 protein, PG II and Sema4D between the two groups [n(%)]

组别	n	Her-2		PG II		Sema4D	
		阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性
胃癌组	100	86(86.00)	14(14.00)	85(85.00)	15(15.00)	89(89.00)	11(11.00)
癌旁正常组织组	100	11(11.00)	89(89.00)	6(6.00)	94(94.00)	16(16.00)	84(84.00)
χ^2 值	—	280.060		293.625		287.665	
P 值	—	<0.001		<0.001		<0.001	



注: A 为 Her-2 蛋白在癌旁正常组织中的表达; B 为 Her-2 蛋白在癌组织中的表达; C 为 PG II 在癌旁正常组织中的表达; D 为 PG II 在癌组织中的表达; E 为 Sema4D 蛋白在癌旁正常组织中的表达; F 为 Sema4D 蛋白在癌组织中的表达。

图1 胃癌组织中 Her-2 蛋白、PG II 及 Sema4D 蛋白免疫组化染色图 (SP, ×500)

Figure 1 Immunohistochemical staining of Her-2 protein, PG II and Sema4D protein in gastric cancer tissue (SP, ×500)

表2 Her-2 蛋白、PG II 及 Sema4D 蛋白与临床病理参数的关系 [n(%)]

Table 2 the relationship between HER-2 protein, PG II and Sema4D protein and clinicopathological parameters [n(%)]

病理参数	n	HER-2		χ^2 值	P 值	PG II		χ^2 值	P 值	Sema4D		χ^2 值	P 值
		阳性 (n=86)	阴性 (n=14)			阳性 (n=85)	阴性 (n=15)			阳性 (n=89)	阴性 (n=11)		
年龄	<50 岁	50	44(88.00)	6(12.00)	0.426	50	42(84.00)	8(16.00)	0.107	50	44(88.00)	6(12.00)	0.107
	≥50 岁	50	42(84.00)	8(16.00)		50	42(84.00)	8(16.00)		50	45(90.00)	5(10.00)	
性别	男	68	60(88.24)	8(11.76)	0.882	68	59(86.76)	9(13.24)	0.519	68	61(89.71)	7(10.29)	0.108
	女	32	26(81.25)	6(18.75)		32	26(81.25)	6(18.75)		32	28(87.50)	4(12.50)	
肿瘤直径	<5 cm	30	20(66.67)	10(33.33)	10.235	30	19(63.33)	11(36.67)	12.854	30	21(70.00)	9(30.00)	9.885
	≥5 cm	70	66(94.29)	4(5.71)		70	66(94.29)	4(5.71)		70	68(97.14)	2(2.86)	
分化程度	低分化	63	61(96.83)	2(3.17)	26.772	63	58(92.06)	5(7.94)	1.926	63	60(95.24)	3(4.76)	17.804
	中/高分化	37	25(54.05)	12(32.43)		37	27(72.97)	10(27.03)		37	29(78.38)	8(21.62)	
TNM 分期	I 期~II 期	75	70(93.33)	5(6.67)	8.590	75	68(90.67)	7(9.33)	5.129	75	74(98.67)	1(1.33)	8.825
	III 期~IV 期	25	16(64.00)	9(36.00)		25	17(68.00)	8(32.00)		25	15(60.00)	10(40.00)	
淋巴结转移	有	72	69(95.83)	3(4.17)	38.126	72	67(93.05)	5(6.94)	15.743	72	70(97.22)	2(2.78)	26.656
	无	28	17(60.71)	11(39.29)		28	18(64.29)	10(35.71)		28	19(67.86)	9(32.14)	

2.3 影响胃癌患者预后生存的单因素分析

随访资料显示 100 例胃癌患者死亡 41 例, 存活 59 例, 死亡率为 41.00%, 存活率 59.00%。肿瘤直径、分化程度、TNM 分期、淋巴结转移为影响患者预后生存的单因素 ($P<0.05$), 年龄、性别非影响患者预后生存的单因素 ($P>0.05$)。见表 3。

2.4 影响胃癌患者预后生存的多因素分析

logistic 分析结果显示: 肿瘤直径、分化程度、TNM 分期、淋巴结转移及 Her-2、PG II、Sema4D 蛋白表达均为影响患者预后的危险因素 ($P<0.05$), 见表 4。

3 讨论

胃癌恶性程度高, 早期症状不明显且进展迅

速, 术后复发转移及死亡的风险较高。因此, 寻找和肿瘤发生发展相关的分子标志物对胃癌患者的诊疗及预后具有重要意义。Saiyin 等人^[10]研究发现, 胃癌患者的发病与 Her-2 蛋白、PG II 及 Sema4D 蛋白表达水平有关。HER-2 是一种具有活性的跨膜蛋白, 属于 VEGF 家族成员。人体健康状态下 HER-2 单体保持着非激活状态, 与需 HER-2 蛋白的络氨酸磷酸化后, 参与了基因表达、DNA 合成代谢, 具有介导细胞内磷酸化等生理功能^[11]。病理状态下, HER-2 通常呈现出高表达水平, 导致细胞迅速增殖引起肿瘤, 其在肿瘤细胞的生长增殖过程中扮演了重要角色。国外文献显示, Her-2 蛋白可抑制细胞凋亡、促进胃癌肿瘤细胞存活, 在胃癌的发展中具有重要作用, 是预测胃癌预后的一个重要参考指标^[12]。

表3 影响胃癌患者预后生存的单因素分析 [n(%)]
Table 3 univariate analysis of prognostic factors in patients with gastric cancer [n(%)]

因素	n	生存组 (n=59)	死亡组 (n=41)	t/χ^2 值	P值
年龄					
<50岁	50	26(44.07)	24(58.54)	2.026	0.155
≥50岁	50	33(55.93)	17(41.46)		
性别					
男	49	27(45.76)	22(53.66)	0.604	0.437
女	51	32(54.24)	19(46.34)		
肿瘤直径					
<5 cm	30	27(45.76)	3(7.32)	17.026	0.000
≥5 cm	70	32(54.24)	38(92.68)		
分化程度					
中/高分化	63	53(89.83)	10(24.39)	44.441	0.000
低分化	37	6(10.17)	31(75.61)		
TNM分期					
I期~II期	75	56(94.92)	19(46.34)	30.440	0.000
III期~IV期	25	3(5.08)	22(53.66)		
淋巴结转移					
无	72	55(93.22)	17(41.46)	32.143	0.000
有	28	4(6.78)	24(58.54)		

表4 影响胃癌患者预后生存的多因素分析
Table 4 multivariate analysis of prognostic factors in patients with gastric cancer

变量	OR值	95%CI	P值
肿瘤直径(≥5 cm vs <5 cm)	2.181	1.817~2.960	<0.001
分化程度(低分化 vs 中高分化)	2.125	1.605~2.813	<0.001
TNM分期(III+IV期 vs I+II期)	2.572	1.865~3.548	<0.001
淋巴结转移(有 vs 无)	2.330	1.778~3.054	<0.001
HER-2表达(阳性 vs 阴性)	2.444	1.772~3.371	<0.001
PG II表达(阳性 vs 阴性)	2.401	1.775~3.247	<0.001
Sema4D表达(阳性 vs 阴性)	2.565	1.896~3.468	<0.001

PG II是一种蛋白酶的前体,合成于胃黏膜组织并进行分泌,与胃底黏膜病变有较高相关性,能够作为初步判断胃癌组织的病理情况^[13]。Sema4D蛋白属于Semaphorins家族,具有促进肿瘤血管发生的作用,多项研究显示,Sema4D蛋白在血管病变、肿瘤侵袭转移等方面发挥了重要作用,同时也在肺癌组织、乳腺癌组织等癌症组织中呈现高表达状态^[14]。本研究结果显示 Her-2、PG II 及 Sema4D 蛋白在胃癌组织中的阳性表达率高于癌旁正常组织,与上述文献研究结果相一致,进一步佐证了 Her-2、PG II 及 Sema4D 蛋白呈高表达水平时可反映机体癌变的发生。肿瘤直径(≥5 cm)、分化程度(低分化)、TNM分期(III期~IV期)、淋巴结转移(有)患者的 Her-2、PG II 及 Sema4D 蛋白的阳性表达率更高,与既往对胃癌组织的研究结果一致^[15],说明 Her-2、PG II 及 Sema4D 蛋白的表达与胃癌病理参数具有一定关系。

相关文献显示,Her-2、PG II 及 Sema4D 蛋白与胃癌细胞周期调节、增殖、凋亡以及信号传导的关

系紧密,参与了肿瘤的发生发展,三者表达水平影响着胃癌患者后期的预后及生存率^[16]。PG II 及 Sema4D 蛋白表达水平与肿瘤的侵袭转移有关,是判断胃癌患者疾病程度与预后的分子标志物^[17]。本研究 Logistic 回归分析结果显示,肿瘤直径、分化程度、TNM 分期、淋巴结转移及 Her-2、PG II、Sema4D 蛋白表达均为影响患者预后的独立危险因素,这与既往研究一致^[18],进一步提示 Her-2、PG II 及 Sema4D 蛋白通过参与肿瘤细胞的分化、浸润和转移影响胃癌患者临床结局。

综上所述,Her-2 蛋白、PG II 及 Sema4D 蛋白在胃癌组织中为高表达状态,三者的表达水平能够作为评估胃癌患者预后生存率的分子标志物和肿瘤治疗的潜在靶点。

参考文献

- [1] 文采,肖明娜,朴善英. PG、MG7-Ag 联合 G-17 检测对胃癌前病变、胃癌的诊断及鉴别诊断[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(11): 1488-1492.
- [2] 高淳,王志强,邵俊. 胃癌组织 Her-2 的表达及其临床意义的研究[J]. 重庆医学, 2020, 49(2): 248-251.
- [3] 袁远,宋玉成,张广坛,等. 微小 RNA-122 靶向锌指和 BTB 结构域蛋白 20 调控 Wnt 通路影响胃癌的侵袭和迁移[J]. 中华外科杂志, 2017, 34(4): 608-611.
- [4] Qin X, Cui X. Methyl-indole inhibits pancreatic cancer cell viability by down-regulating ZFX expression[J]. Biotech, 2020, 10(4): 1-8.
- [5] 汤彪,孙圣荣. 甲状腺乳头状癌中 TPO、HER-2 的表达及临床意义[J]. 热带医学杂志, 2015, 15(9): 4.
- [6] Wang C, Suan F, Minga W, et al. Zinc finger protein X... inked (ZFX) promotes expansion of EpCAM+ cancer stem like cells in hepatocellular carcinoma[J]. Molecul oncol, 2017, 11(5): 745-749.
- [7] 唐善浩,乐静,钱素英,等. Ikaros 家族锌指蛋白 1 基因突变是成人费城染色体阳性急性淋巴细胞白血病预后不良因素[J]. 中华内科杂志, 2019, 58(4): 301-306.
- [8] Guo B, Yan H, Li L, et al. Collagen triple helix repeat containing 1 (CTHRC1) activates Integrin β 3/FAK signaling and promotes metastasis in ovarian cancer[J]. J Ovarian Res, 2017, 10(1): 765-769.
- [9] Bakula D, Müller, Amelie J, Zuleger T, et al. WIPI3 and WIPI4 β -propellers are scaffolds for LKB1-AMPK-TSC signalling circuits in the control of autophagy[J]. Nat Commun, 2017, 35(8): 15633-15637.
- [10] Saiyin H, Na N, Han X, et al. BRSK2 induced by nutrient deprivation promotes Akt activity in pancreatic cancer via downregulation of mTOR activity[J]. Oncotarget, 2017, 8(27): 44669-44681.

(下转第 1883 页)

PCT、N%、WBC、CRP在胎膜早破患者并发绒毛膜羊膜炎的诊断及预后评估中的应用

程春花 张盼盼 郭艳 李根霞*

【摘要】目的 探究PCT、N%、WBC、CRP在未足月胎膜早破(PPROM)患者并发绒毛膜羊膜炎(CAM)的诊断及预后评估中的应用。**方法** 分析郑州大学第三附属医院2019年2月至2021年2月收治的145例PPROM患者(研究组)以及同期收治的49例正常足月孕妇(健康对照组)病历资料,依据研究组中有否并发CAM分为并发组(78例),未并发组(67例);分别检测、对比三组入院4小时内外周血白细胞数(WBC)、中性粒细胞比例(N%)、C反应蛋白(CRP)、降钙素原(PCT)水平;采用ROC曲线检测PCT、N%、WBC、CRP对PPROM患者并发CAM的预测诊断价值;检测对比并发组患者入院时及入院48小时(62例)PCT、N%、WBC、CRP水平。**结果** 3组N%、WBC水平结果:N%、WBC水平并发组>未并发组>健康对照组,组间差异有统计学意义($P<0.05$)。3组PCT、CRP水平结果:并发组高于未并发组和健康对照组,组间差异有统计学意义($P<0.05$);未并发组和健康对照组相比,组间差异无统计学意义($P>0.05$)。PCT、N%、WBC、CRP均对CAM均有诊断价值($P<0.05$),但PCT、N%、WBC特异度均较低。合并组患者入院时及入院48小时PCT、N%比较,差异无统计学意义($P>0.05$),WBC、CRP水平均显著高于入院时,差异有统计学意义(均 $P<0.05$)。**结论** PCT、N%、WBC、CRP对于PPROM患者并发CAM均具有诊断价值,可作为该类患者临床诊断生物学指标,并可用于其预后评估,指标水平越高则预后越差。

【关键词】 血白细胞数;中性粒细胞比例;C反应蛋白;降钙素原;未足月胎膜早破;绒毛膜羊膜炎

Application of PCT, N%, WBC, CRP in the diagnosis and prognosis evaluation of patients with premature rupture of membranes complicated by chorioamnionitis

CHENG Chunhua, ZHANG Panpan, GUO Yan, LI Genxia*

(Department of Obstetrics, The Third Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, Hennan, China, 450052)

【ABSTRACT】Objective To explore the application of PCT, N%, WBC, CRP in the diagnosis and prognosis evaluation of patients with preterm premature rupture of membranes (PPROM) complicated by chorioamnionitis (CAM). **Method** A retrospective analysis of the medical records of 145 PPROM patients (study group) admitted to our hospital from February 2019 to February 2021 and 49 normal term pregnant women (healthy control group) admitted during the same period was performed. According to whether there was concurrent CAM in the study group, they were divided into the concurrent group (78 cases) and the non-complicated group (67 cases). The number of peripheral blood white blood cells (WBC), the proportion of neutrophils (N%), and C-reactive protein in the three groups were tested and compared within 4 hours of admission. The ROC curve was used to detect the predictive diagnostic value of PCT, N%, WBC, and CRP in patients with PPROM complicated with CAM. The PCT, N%, WBC, and CRP levels of patients in the concurrent group were tested and compared at the time of admission and 48 hours after admission (62 cases).

基金课题:河南省医学科技攻关计划(联合共建)项目(2018020216)

作者单位:郑州大学第三附属医院产科,河南,郑州450052

*通信作者:李根霞, E-mail: ligenxia@163.com

Results The levels of N%、WBC between three groups: concurrent group >non-concurrent group >healthy control group, and the differences were statically significant ($P<0.05$). The levels of PCT、CRP between three groups: concurrent group were significantly higher than those in non-concurrent group and the healthy control ($P<0.05$); Compared with the healthy control group, the PCT and CRP levels of the non-concurrent group was not statically significant ($P>0.05$). PCT、N%、WBC、CRP have diagnostic value for CAM ($P<0.05$), but the specificity of PCT, N% and WBC is low. There was no statistically significant difference in PCT and N% of patients in the concurrent group at the time of admission and 48 hours after admission ($P>0.05$). The levels of WBC and CRP were significantly higher than that at admission, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** PCT, N%, WBC, and CRP have diagnostic value for PPROM patients with CAM, which can be used as clinical diagnostic biological indicators for this type of patients, and can be used for prognostic evaluation. The higher the indicator level, the worse the prognosis.

[KEY WORDS] White blood cell count; Neutrophil ratio; C-reactive protein; Procalcitonin; Preterm premature rupture of membranes; Chorioamnionitis

未足月胎膜早破 (preterm premature rupture of membrane, PPROM) 指孕周不足 37 周于临产前胎膜自然破裂, 是造成早产的首要原因之一。于胎儿而言, 胎膜具有保护屏障的作用, 若发生破裂, 则微生物可通过破裂口上行侵入羊膜腔, 继而发生绒毛膜羊膜炎 (chorioamnionitis, CAM)^[1]。CAM 分为临床型 CAM、组织学 CAM (histologic chorioamnionitis, HCA)^[2], 而 HCA 一般为无特殊临床表现、感染征象有研究发现 HCA 病理诊断显示存在大量白细胞、淋巴细胞、变性坏死伴炎细胞浸润绒毛膜、蜕膜以及出现绒毛膜急、慢性炎反应等, 因此亦为亚临床 CAM (subclinical chorioamnionitis, SCA)^[3]。患者一旦出现症状转为临床 CAM 则表明已于宫内感染晚期, 或将对母婴产生严重危害; 而多数 HCA 因其无临床症状, 极大地增加了产前诊断难度, 难以及时发现, 致使治疗时机延误^[4]。目前虽有针对筛查 PPROM 并发 CAM 的研究, 但指标过于单一, 3 项及以上指标诊断的研究尚且不足, 且中性粒细胞比例 (neutrophil%, N%) 用于该疾病的诊断鲜有研究, 故本研究将探究白细胞数 (white blood cell, WBC)、N%、C 反应蛋白 (C-neactiveprotein, CRP)、降钙素原 (procalcitonin, PCT) 四项指标在 PPROM 患者并发 CAM 的诊断及预后评估中的应用。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取郑州大学第三附属医院 2019 年 2 月至 2021 年 2 月的 145 例 PPROM 患者作为研究组, 依据其是否并发 CAM 分为并发组 (78 例)、未并发组

(67 例), 并选取 49 例同期收治的正常足月孕妇作为健康对照组。其中并发组为 PPROM 并发 CAM 患者, 年龄平均 (30.91 ± 3.9) 岁, 孕周平均 (33.43 ± 3.26) 周, 身高平均 (162.48 ± 11.89) cm, 体质量平均 (73.52 ± 5.76) kg; 未并发组为 PPROM 未并发 CAM 患者, 年龄平均 (31.10 ± 4.64) 岁, 孕周平均 (33.69 ± 3.38) 周, 身高平均 (161.39 ± 9.98) cm, 体质量平均 (72.43 ± 5.88) kg; 健康对照组孕周平均 (38.23 ± 0.44) 周, 身高平均 (162.36 ± 7.96) cm, 体质量平均 (72.51 ± 5.08) kg。

纳入标准: ①年龄 18~45 岁, 研究组经检查确诊为单胎 PPROM; ②入院前近期无抗生素使用史, 既往无吸烟、习惯性流产史; ③入院当日未进入产程; ④孕妇无妊娠期高血压、癫痫、心衰、贫血以及糖尿病等妊娠期并发症; ⑤无严重内科病史, 且依从性良好, 意识清醒、配合随访调查, 具有一定理解和表达能力; ⑥临床资料完整。排除标准: ①孕妇确诊为弓形虫、巨细胞病毒、单纯疱疹病毒、梅毒、风疹病毒感染; ②存在多次人工流产史; ③存在营养不良。本研究所有患者家属均签署知情同意书, 并经本院伦理委员会批准。

1.2 方法

PPROM 诊断标准^[5]: ①患者主诉存在阴道流血、外阴湿润情况; ②经窥阴器查见宫颈内口有液体流出、后穹窿形成液池; ③经 B 超查得羊水量减少; ④胰岛素样生长因子结合蛋白-1 (insulin-like growth factor binding protein-1, IGFBP-1) 检测呈阳性。

病理 CAM 诊断标准^[6]: 胎膜与胎盘切片镜检存在每高一倍镜视野超过 5 个及以上 N 浸润, 此为金标准。

临床型 CAM 诊断标准^[7]:①孕妇体温不低于 38℃;②胎心率增快、孕妇心率增快;③孕妇外周 WBC 超过 $15 \times 10^9/L$;④阴道分泌物异味;⑤子宫激惹、宫体压痛。①与②~④任一项同时表现即可诊断为 CAM。

WBC、N%、CRP、PCT 检验方法:入院 4 小时内采集内肘关节静脉血 5 mL 置入抗凝管,转速 3 000 r/min,离心(半径为 10 cm)5 min,取血清,采用迈瑞 BC-6800 全自动血液细胞分析仪行血细胞五分类法检测血清 N%、WBC 水平;采用迈瑞 CRP-M100 特定蛋白免疫分析仪行免疫散射比浊法检测血清 CRP 水平;采用诺尔曼 NRM411 全自动化学发光测定仪行电化学发光法检测血清 PCT 水平,均严格按照操作手册实操并采用相应配套试剂盒检测。

病理取样、检测:于孕妇分娩后取其胎盘、胎膜破口周边组织 3 cm×3 cm,行 10%甲醛固定并常规石蜡包埋,室温保存送检。

孕妇入院确诊 PPRM 后平卧绝对卧床休息,密切监测孕妇体温、心率、胎心率,定期检查孕妇阴道分泌物及子宫有否压痛,保持外阴清洁并行抗生素预防感染,孕期<35 周需行 6 mg 地塞米松肌注,每天 2 次,共 4 次,以促胎肺成熟。定期胎心电子监护、行 B 超检查。若孕妇发生临产征象,胎

儿窘迫或胎盘早剥等,应立即终止妊娠,由产科视产妇产情况拟定分娩方式。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 25.0 统计软件进行数据分析,计量资料($\bar{x} \pm s$)表示,PCT<0.02(0.02 为检测低限值)按 0.01 进行数据分析。多组间采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 *t* 检验,采用 ROC 曲线分析 PCT、N%、WBC、CRP 对 PPRM 并发 CAM 的预测价值,以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 组 PCT、N%、WBC、CRP 水平比较

3 组 N%、WBC 水平结果:N%、WBC 水平并发组>未并发组>健康对照组,组间差异具有统计学意义($P<0.05$)。3 组 PCT、CRP 水平结果:并发组高于未并发组和健康对照组,组间差异具有统计学意义($P<0.05$);未并发组和健康对照组相比,组间差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 1。

2.2 PCT、N%、WBC、CRP 对 PPRM 患者并发 CAM 的预测诊断价值

结果显示,PCT、N%、WBC、CRP 均对 CAM 均有诊断价值($P<0.05$),PCT、N%、WBC 特异度均较低。见表 2、图 1。

表 1 3 组 PCT、N%、WBC、CRP 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Three groups of PCT, N%, WBC, CRP levels ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	PCT(ng/mL)	N%	WBC($10^9/L$)	CRP(mg/L)
并发组	78	0.086±0.19	80.45±7.08	12.17±3.43	20.35±33.97
未并发组	67	0.029±0.08 ^a	75.20±11.48 ^a	10.17±3.19 ^a	4.23±3.66 ^a
健康对照组	49	0.010±0.00 ^a	68.56±16.26 ^{ab}	8.50±2.20 ^{ab}	4.9±6.672 ^a
<i>F</i> 值		2.372	0.210	-3.617	-4.135
<i>P</i> 值		0.020	0.001	<0.001	<0.001

注:与并发组相比^a $P<0.05$,与未并发组相比,^b $P<0.05$ 。

表 2 PCT、N%、WBC、CRP 预测诊断价值分析

Table 2 Analysis of predictive diagnostic value of PCT, N%, WBC, CRP

检验结果变量	AUC	SE 值	95%CI	cut-off 值	约登指数	敏感度	特异度	<i>P</i> 值
PCT	0.741	0.042	0.658~0.824	0.015	0.453	0.684	0.769	<0.05
N%	0.675	0.045	0.586~0.764	78.60	0.309	0.632	0.677	<0.05
WBC	0.691	0.044	0.604~0.777	12.29	0.293	0.447	0.846	<0.05
CRP	0.742	0.042	0.658~0.842	15.33	0.395	0.395	1.000	<0.05

2.3 PPRM 患者并发 CAM 入院时及入院 48 小时 PCT、N%、WBC、CRP 水平比较结果

合并组共 62 例在入院 48 小时未进入产程纳入分析。合并组患者入院时及入院 48 小时 PCT、N%比较,差异无统计学意义($P>0.05$),WBC、CRP 水平均显著

高于入院时,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 3。

3 讨论

PPROM 于产科临床工作中,其诊断中相对简单,但当孕妇胎膜破裂后,羊膜腔与外界屏障被破

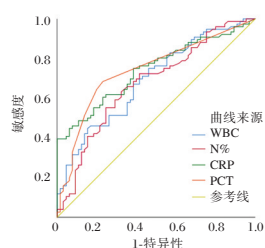


图1 ROC曲线

Figure 1 ROC curve

表3 PPRM患者并发CAM治疗前后PCT、N%、WBC、CRP水平 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 PCT, N%, WBC, CRP levels before and after CAM treatment in PPRM patients ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	PCT (ng/mL)	N% (%)	WBC ($10^9/L$)	CRP (mg/L)
合并组入院时	62	0.09 $\pm$ 0.21	80.7 $\pm$ 7.04	12.02 $\pm$ 2.89	19.73 $\pm$ 35.83
合并组入院 2天后	62	0.18 $\pm$ 0.50	79.48 $\pm$ 12.05	13.66 $\pm$ 4.16	36.7 $\pm$ 40.1
t值		-1.09	0.68	-2.54	-2.45
P值		0.279	0.496	0.013	0.016

坏而直接相通,导致CAM并发几率上升^[8-9]。于PPROM并发CAM早期,大部分孕妇为SCA,无明显临床表现,导致感染无法及时发现,而未足月孕妇为提高早产儿存活率,多采用期待疗法,以至于无法有效病情发展,进而导致发生严重母婴并发症。因此早期诊断PPROM患者是否并发CAM,并及时终止妊娠,可显著提升早产儿生存率,降低母婴并发症。但多数诊断方式均存在各自局限性,如行羊水细菌培养、产后胎盘膜病理检测诊断等,其中羊水细菌培养属有创性检测,或将致使发生相应并发症,且细菌培养需一定时间得出结果,易延误最佳诊治时间,而胎盘组织病理检测属产后回顾性诊断,存在延后性,无法于早期做出诊断预测^[10]。故临床中亟需探索早期诊断、识别PPROM并发CAM的监测指标。同时由于多种影响因素(包括病原体及个体差异、行为方式及生存环境的不同等),难以采用单一指标诊断PPROM有否并发CAM,故本研究将对PPROM患者及健康足月产妇的血清PCT、N%、WBC、CRP水平进行检测,探究其对PPROM患者并发CAM的诊断价值及预后评估。

本研究结果提示以上指标可用于PPROM患者并发CAM的预后评估中,预后越差则指标水平越高。究其原因,PCT为降钙素(CT)前体^[11],属无激素活性降钙素前肽,正常状况下甲状腺C细胞可产生极少量的PCT,化学性质稳定,若机体

受炎性刺激,则PCT将被外周血单核细胞及巨噬细胞等大量释放,并且肝脏由于受到炎性因子刺激,亦可大量合成、分泌PCT释放入血,且PCT增长程度于机体感染严重程度相关。有研究指出^[12],机体发生感染后约4小时可检出PCT,而感染 ≥ 6 h且 ≤ 12 h时PCT可达峰值,半衰期约为24~30小时,若感染持续或进展,PCT浓度或将维持甚至进一步提高;当感染得以控制后,PCT浓度则会出现明显下降。既往观察性研究^[13]已报道PCT于败血症、严重细菌感染等疾病监测中的诊断潜力与截值,并提示PCT水平对感染性疾病抗生素的使用具有指导作用。CRP^[14]为干细胞于IL-6作用下合成的急性时相反应蛋白,是临床常用炎症反应诊断指标,正常状态下机体血清CRP含量极少,当人体受到感染、外伤、肿瘤等炎症反应刺激时,血清CRP水平将出现异常上升,可于6 h左右提升到 ≥ 5 mg/L,直至48 h左右水平达到峰值;但若感染、炎症得以控制,则其水平可于短时间内快速降至正常标准范围。WBC、N%于临床检测感染中属最普遍的检测指标^[15],具有较高的敏感性,但有研究^[16]显示WBC、N%特异性较差,易受到其他因素影响,如其他部位炎症等,该与本研究结果相近,故单独采用WBC、N%水平无法及时诊断PPROM是否并发CAM。

概而论之,PCT、N%、WBC、CRP对于PPROM患者并发CAM均具有诊断价值,可作为临床诊断PPROM并发CAM无创性生物学指标,便于临床早期诊断CAM并及时给予治疗,帮助患者及胎儿改善预后,但因但PCT、N%、WBC因其特异性较低,无法单独对CAM诊断;同时PCT、N%、WBC、CRP可用于PPROM并发CAM患者预后评估,预后越差则指标水平越高。

参考文献

- [1] Balciuniene G, Gulbinienė V, Dumalakiene I, et al. Prognostic Markers for Chorioamnionitis: IL-6, TNF- α , and MMP-8 in Vaginally Obtained Amniotic Fluid[J]. J Clin Med, 2021, 10(5):1136.
- [2] Muraoka J, Kodama Y, Ohashi M, et al. Intrapartum fetal heart rate patterns and perinatal outcome in chorioamnionitis at or beyond 34 weeks of gestation[J]. J Obstetr Gynaecol Res, 2021, 47(3):1110-1117.
- [3] Galli L, Dall A, Andrea, Whelehan V, et al. Intrapartum cardiotocography patterns observed in suspected clinical and sub-clinical chorioamnionitis in term fetuses[J]. J Obstetr Gynaecol Res, 2021, 47(3):1110-1117.

- cology Res, 2019,45(12):2343-2350.
- [4] 李天浩,沈蔚,林新祝. 产前激素对母亲组织型绒毛膜羊膜炎早产儿近期临床结局的影响[J]. 中华新生儿科杂志, 2021,36(1):26-30.
- [5] 刘騷遥,漆洪波. 美国妇产科医师学会“胎膜早破指南2018版”解读[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2018, 34(3):266-269.
- [6] 张荣萍,何晓梅,周玲. 孕34周前胎膜早破早产病例中组织学诊断绒毛膜羊膜炎与母婴结局的临床分析[J]. 贵州医药, 2019,43(11):1734-1735.
- [7] 曹蕾,陆琴. 早产的临床因素及胎盘的病理学改变[J]. 中国妇幼保健, 2017,32(18):4376-4379.
- [8] 邢顺莲,李洁,谭泽欢. 未足月胎膜早破时间与组织学绒毛膜羊膜炎相关性分析[J]. 热带医学杂志, 2019,19(8):1040-1043.
- [9] 屈婉红,尚聪敏. 未足月胎膜早破后羊水指数对孕妇妊娠结局及新生儿的影响[J]. 贵州医药, 2021, 45(4):582-583.
- [10] 余红波,符策岗. 绒毛膜羊膜炎的临床诊断及治疗进展[J]. 医学研究生学报, 2019,32(1):109-112.
- [11] 张峰,肖铮,赵亚超,等. 血清PCT及S100b蛋白在颅脑术后颅内感染早期诊断中的价值[J]. 中国临床神经外科杂志, 2021,26(4):290-291.
- [12] 何罗宜,刘晶晶,古立新. 肺部超声B线数目及PCT等级与肺部感染危重症患者氧合状态的相关性[J]. 西部医学, 2021,33(4):601-604,610.
- [13] 陈凤萍,刘玲,赵友云,等. 降钙素原在细菌感染败血症中的早期诊断价值[J]. 中国医师杂志, 2020,22(12):1805-1808.
- [14] 中国妇幼保健协会临床诊断与实验医学分会. SAA单独和与CRP联合检测在儿童感染性疾病中的应用专家共识[J]. 检验医学, 2021,36(7):685-690.
- [15] 岳宏,武爱梅,陈静,等. 中性粒细胞与淋巴细胞比率联合ICH评分预测自发性脑出血患者30 d转归[J]. 国际脑血管病杂志, 2020,28(3):175-179.
- [16] 王婷,刘振国,柴春艳,等. 白细胞计数、中性粒细胞百分比、降钙素原和C反应蛋白在80岁以上老年感染性患者中的应用评价[J]. 实用老年医学, 2016,30(8):654-656.

(上接第1878页)

- [11] 王小强,常家聪,叶啸天,等. 人胃癌组织BRSK2表达与患者临床病理学参数及预后的关系[J]. 安徽医科大学学报, 2017, 52(9):1346-1351.
- [12] Cui N, Liu J, Xia H, et al. LncRNA SNHG20 contributes to cell proliferation and invasion by upregulating ZFX expression sponging miR-495-3p in gastric cancer[J]. J Cellul Biochem, 2019,31(26):859-863.
- [13] 张雪,刘国东,林群,等. siRNA靶向沉默ZFX基因对肝内胆管癌细胞生物学功能的影响[J]. 安徽医科大学学报, 2018, 53(11):1667-1671.
- [14] 崔纪芳,王宏磊,赵永捷,等. ZFX蛋白在胃癌组织中的表达与病理和预后关系的研究[J]. 中国中西医结合外科杂志, 2019,25(3):276-280.
- [15] Yanrui H, Shilei W. Relationship between expression of MT1E, CA153 and clinical characteristics and prognosis of breast cancer patients[J]. Oncol Progr, 2019,18(3):574-576.
- [16] 李彦冬,丁希艳,邵旭辉,等. 胃癌组织中低氧诱导因子-1 α 和轴突导向因子4D的表达及临床意义[J]. 中西医结合心血管病电子杂志, 2017,5(27):169-169.
- [17] 王腾,金琳芳,华东. 临床分期高于病理分期的偏倚影响胃癌根治术后患者预后的临床观察[J]. 临床肿瘤学杂志, 2019, 24(12):1119-1123.
- [18] 张群. 血清胃蛋白酶原I和II检测在早期胃癌筛查中的应用价值体会[J]. 中国实用医药, 2020,15(5):48-50.

勘误声明

- 1.《分子诊断与治疗杂志》2021年10月第13卷第10期第1565页作者信息(第一作者):“贾铮”应改为:“贾峥”
- 2.《分子诊断与治疗杂志》2021年1月第13卷第1期第38页摘要中的结论部分中:“可VEGF在脑胶质瘤中低表达TGF- β 1、Smad7蛋白高表达及VEGF蛋白低表达参与脑胶质瘤临床生物学进展”应改为:“TGF- β 1、Smad7及VEGF高表达参与了脑胶质瘤的临床生物学进展”;英文摘要中第五行:“November”应改为“January”;英文摘要的结果部分“TNM staging:”应改为“WHO classification”;结论部分应改为“TGF- β 1, Smad7, and VEGF are highly expressed in glioma tissues; the high expression of TGF- β 1, Smad7 and VEGF is involved in the clinical biological progress of glioma, and is closely related to the prognosis and survival of patients”。讨论部分第三段第三行“Smad7低表达”应改为:“Smad7高表达”

· 论 著 ·

红细胞参数对小儿轻型地贫及轻度缺铁性贫血的诊断价值

杨喆¹ 黄斌¹ 苏伟娜¹ 林芬² 陈潮青¹ 吴建鹏¹ 林伟豪¹ 谢鹤¹ 杨立业^{2*}

[摘要] **目的** 总结小儿轻型地中海贫血(地贫)及轻度缺铁性贫血(IDA)血液学特征,评价红细胞参数对小儿轻型地贫及轻度IDA的诊断价值。**方法** 选取2013年2月至2019年3月潮州市中心医院158例轻型地贫患儿为轻型地贫组,100例轻度IDA患儿为轻度IDA组,215例健康体检儿童为对照组。采用血球分析仪分析各组间红细胞参数:红细胞计数(RBC)、平均红细胞体积(MCV)、红细胞血红蛋白量(MCH)、平均红细胞血红蛋白浓度(MCHC)及红细胞体积分布宽度(RDW-CV);采用PCR+导流杂交法行 α 和 β 地贫基因检测,通过受试者工作特征(ROC)曲线法确定各参数最佳筛查指标和截断值。**结果** RBC:轻型地贫组>对照组>轻度IDA组,差异有统计学意义($P<0.05$);RDW-CV:轻型地贫组>轻度IDA组>对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);MCV、MCH:对照组>轻度IDA组>轻型地贫组,差异有统计学意义($P<0.05$)。RBC曲线下面积(AUC)为84.7%,截断值为 $4.70\times 10^{12}/L$,RDW-CV AUC为74.6%,截断值为14.25%。**结论** 小儿地贫和IDA红细胞参数分布特征及变化趋势各异,红细胞参数RBC及RDW-CV对小儿轻型地贫和轻度IDA具一定鉴别诊断价值。

[关键词] 红细胞参数;小儿;地中海贫血;缺铁性贫血

The value of red cell indices in diagnosis of the mild thalassemia and the mild iron deficiency anemia in children

YANG Zhe¹, HUANG Bin¹, SU Weina¹, LIN Fen², CHEN Chaoqing¹, WU Jianpeng¹, LIN Weihao¹, XIE He¹, YANG Liye^{2*}

(1. Department of Pediatrics, Chaozhou Central Hospital Affiliated to Southern Medical University, Chaozhou, Guangdong, China, 521021; 2. Central Laboratory, Chaozhou Central Hospital affiliated to Southern Medical University, Chaozhou, Guangdong, China, 521021)

[ABSTRACT] **Objective** To summarize the hematological characteristics of children with mild thalassemia and mild iron deficiency anemia (IDA), and to evaluate the value of erythrocyte parameters in the differential diagnosis of children with mild thalassemia and mild IDA. **Methods** A total of 158 children with mild thalassemia in Chaozhou Central Hospital from February 2013 to March 2019 were selected as the mild thalassemia group, 100 children with mild IDA as the mild IDA group, and 215 healthy children as the control group. RBC (red blood cell count), MCV (mean red blood cell volume), MCH (mean red blood cell hemoglobin), MCHC (mean red blood cell hemoglobin concentration) and RDW-CV (red blood cell volume distribution width) were analyzed by blood cell analyzer. PCR+ diversion hybridization was used to detect α and β thalassemia genes. The optimal screening indexes and cut-off values of each parameter were determined by ROC curve method. **Results** RBC: mild thalassemia group > control group > mild IDA group; RDW-CV: mild thalassemia group > mild IDA group > control group; MCV and MCH: control group > mild IDA group >

基金项目:潮州市卫生健康局科研项目(2019038号)

作者单位:1. 南方医科大学附属潮州市中心医院儿科,广东,潮州 521021

2. 南方医科大学附属潮州市中心医院中心实验室,广东,潮州 521021

*通信作者:杨立业, E-mail: yangleeyee@sina.com

mild thalassemia group; There were statistically significant differences in RBC, RDW-CV, MCV and MCH among these three groups ($P<0.05$). The area under the curve (AUC) of RBC was 84.7% and the cut-off value was $4.70\times 10^{12}/L$, the AUC of RDW-CV was 74.6% and the cut-off value was 14.25%. **Conclusion** RBC and RDW-CV are valuable in the differential diagnosis of children with mild thalassemia and mild IDA.

[KEY WORDS] Erythrocyte parameters; Children; Thalassemia; Iron deficiency anemia

地中海贫血(下称地贫)分布具明显地域及种族特征,广东、广西、福建、海南等长江以南省份为地贫高发区,中国当前罹患中重度地贫儿童人数约达30万^[1]。小儿缺铁性贫血(iron deficiency anemia, IDA)高发年龄为6月至3岁,代表铁缺乏最低分布状态,此期储存铁已耗竭,可出现小细胞低色素性贫血及非造血系统受累的严重表现,危害不容小觑。小儿轻度IDA和轻型地贫表现均不典型,血液学特征尤为相似。虽然小儿轻度IDA有缺铁诱因、铁蛋白含量减低、骨髓外铁粒幼红细胞减少及铁剂治疗反应等临床特点可资鉴别,而基因检测为地贫确诊方法,但上述方法无法广泛应用于小儿贫血简易筛查。小儿骨髓造血及血象具明显年龄特征,利用现有的成人红细胞参数规律对两者予以甄别并不可靠^[2]。国内外学者对小儿地贫及IDA的血液学特征及区分标准说法不一,数据较少^[3-5]。本文总结小儿轻型地贫及轻度IDA红细胞参数规律,以期确定最优鉴别指标及截断值。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取2013年2月至2019年3月潮州市中心医院儿科住院部及门诊轻型地贫患儿(轻型地贫组)158例,轻度IDA患儿(轻度IDA组)100例及门诊体检血常规正常的健康儿童(对照组)215例。纳入标准:①年龄为6月~14岁;②轻型地贫:依据地贫基因结果诊断^[6];③轻度IDA:排除地贫,6个月至6岁的患者血红蛋白90~110 g/L,6至14岁的血红蛋白90~120 g/L,血清铁小于11 $\mu\text{mol/L}$ ^[4,7]。排除标准:地贫基因阳性并铁代谢异常、溶血性贫血、失血性贫血、弥散性血管内凝血、再生障碍性贫血、急性白血病、真性红细胞增多症、肾病、内分泌疾病、肝病、肿瘤、免疫性疾病等。各组男女性别比例及年龄比较差异无统计学意义($P>0.05$)。本研究经医院医学伦理委员会批准,受试者监护人均知情了解并签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 血液学分析

采用乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K2)抗凝真空管抽取2 mL外周静脉血,采用Sysmex XE-5000血球计数仪进行血液学检查,记录红细胞计数(red blood cell count, RBC)、平均红细胞体积(mean red blood cell volume, MCV)、红细胞血红蛋白量((mean red blood cell hemoglobin, MCH)、平均红细胞血红蛋白浓度(mean red blood cell hemoglobin concentration, MCHC)及红细胞体积分布宽度(red blood cell volume distribution width, RDW-CV)参数。

1.2.2 外周血基因组DNA提取

使用潮州凯普生物化学有限公司提取试剂盒,严格按说明书操作提取DNA。

1.2.3 α 和 β 地中海贫血基因检测

使用广州凯普医药科技有限公司的地贫基因检测试剂盒(PCR+导流杂交法)。该试剂盒用于体外定性检测人抗凝静脉血样本中3种缺失型 α -地贫(--^{SEA}、- $\alpha^{3.7}$ 和- $\alpha^{4.2}$),3种突变型 α -地贫Hb Constant Spring ($\alpha^{\text{CS}}\alpha$)、Hb Quong Sze ($\alpha^{\text{QS}}\alpha$)和Hb WestMeade ($\alpha^{\text{WS}}\alpha$),19种突变型 β -地贫-29M (A>G), -28M (A>G), -30M (T>C), -32 (C>A), CapM (A>C, -AAAC), IntM (T>G), 14-15M (+G), 17M (A>T), βEM (G>A), 27-28M (+C), 31M (-C), IVS-I-1M (G>A, G>T), IVS-I-5M (G>C), 41-42M (-TTCT), 43M (G>T), 71-72M (+A), IVS-II-654M (C>T)。试验流程严格按试剂说明书进行。

1.2.4 血清铁检测

应用德赛DiaSys诊断系统上海有限公司铁测定试剂盒(络合法),采用7180日立(HITACHI)生化分析仪测定。

1.3 统计学分析

采用SPSS 16.0软件行统计学分析,计量资料采用($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用 t 检验,多组间比较采用 F 检验;计数资料采用 $n(\%)$ 表示,采用 χ^2 检验;构建受试者工作特征(ROC)曲线,约登系数(youden指数)最大值对应最佳诊断临界值(cut-off

值),计算敏感度、特异度及曲线下面积(AUC)。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 红细胞参数比较结果

RBC:轻型地贫组>对照组>轻度IDA组,差

异有统计学意义($P<0.05$);HGB、MCV、MCH及MCHC:对照组>轻度IDA组>轻型地贫组,差异有统计学意义($P<0.05$);RDW-CV:轻型地贫组>轻度IDA组>对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表1。

表1 轻型地贫组、轻度IDA组和对照组临床资料及红细胞参数比较结果($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Comparison of clinical data and erythrocyte parameters between mild thalassemia group, mild IDA group and control group ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	性别(男/女)	年龄(岁)	RBC($\times 10^{12}/L$)	HGB(g/L)	MCV(fl)	MCH(pg)	MCHC(g/L)	RDW-CV(%)
轻型地贫组	158	88/70	2.648 $\pm$ 0.220	5.306 $\pm$ 0.052	101.436 $\pm$ 1.113	60.980 $\pm$ 0.662	19.035 $\pm$ 0.226	314.611 $\pm$ 3.283	16.886 $\pm$ 0.268
轻度IDA组	100	52/48	2.274 $\pm$ 0.227	4.394 $\pm$ 0.060 ^a	103.310 $\pm$ 0.886 ^b	73.096 $\pm$ 0.787 ^a	23.905 $\pm$ 0.339 ^a	325.800 $\pm$ 1.676 ^b	15.041 $\pm$ 0.350 ^a
对照组	215	128/87	2.953 $\pm$ 0.181	4.676 $\pm$ 0.026 ^{ac}	122.670 $\pm$ 0.602 ^{ac}	77.616 $\pm$ 0.342 ^{ac}	26.270 $\pm$ 0.175 ^{ac}	339.349 $\pm$ 0.758 ^{ac}	13.387 $\pm$ 0.078 ^{ac}
χ^2/F 值		1.618	2.431	103.494	200.764	269.596	260.338	46.040	109.976
P值		0.445	0.089	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与轻型地贫组相比,^a $P<0.05$;与轻型地贫组相比,^b $P>0.05$;与轻度IDA组相比,^c $P<0.05$ 。

2.2 轻型地贫基因检测结果

轻型 α 地贫仅检出--^{SEA}1种基因型,轻型 β 地贫检出IVS-II-654M(C>T)、CD41-42M、17M(A>T)、-28M(A>G)、EM、43M(G>T)及IVS-I-1M(G>T)7种基因型。见表2。

表2 158例轻型地贫患儿基因型分布

Table 2 Genotype distribution of 158 children with mild thalassemia

类型	基因型	n	构成比(%)
轻型 α 地贫	-- ^{SEA}	92	58.23
	IVS-II-654M(C>T)	28	17.72
	-28M(A>G)	5	3.16
	17M(A>T)	9	5.70
轻型 β 地贫	EM	1	0.63
	CD41-42M	21	13.29
	43M(G>T)	1	0.63
	IVS-I-1M(G>T)	1	0.63

2.3 轻型地贫组及轻度IDA组ROC曲线结果

RBC及RDW-CV AUC>70%;HGB、MCV、MCH、MCHC及(RBC+RDW-CV)等AUC均<50%。见表3和图1。

表3 红细胞参数对小儿轻型地贫及轻度IDA鉴别诊断价值
Table 3 Evaluation of erythrocyte parameters in differential diagnosis of children with mild thalassemia and mild IDA

参数	截断值	敏感度	特异度	AUC(%)	Youden指数
RBC($\times 10^{12}/L$)	4.70	0.872	0.730	84.7	0.602
HGB(g/L)	116.50	0.087	0.940	44.4	0.027
MCV(fl)	86.40	0.013	1.000	14.8	0.013
MCH(pg)	11.20	1.000	0.000	17.8	0.000
MCHC(g/L)	355.00	0.000	1.000	34.0	0.000
RDW-CV(%)	14.25	0.918	0.545	74.6	0.464
RBC+RDW-CV		0.007	1.000	15.4	0.007

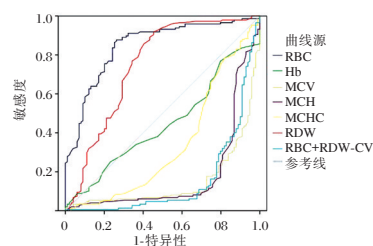


图1 轻型地贫VS轻度IDA ROC曲线图

Figure 1 ROC curve of mild thalassemia VS mild IDA

3 讨论

IDA常见于7岁以下儿童,除了影响儿童体格生长及免疫功能,对小儿认知及心理行为可形成不可逆转的影响^[8]。轻型地贫儿童仅表现轻度贫血或无症状,成年后在未知情况下与基因携带者婚配概率会更高,增加重型地贫患儿发生率。本研究总结儿童轻型地贫及轻度IDA血液特征,确定鉴别诊断的最优参数及截断值。

潮州地处我国南疆,东邻福建,西与揭阳接壤,北连梅州,南临南海并通汕头,以汉族人为主,畬族为唯一聚居少数民族。地贫基因突变具地域及种族特异性,潮州地贫发生率约6.61%, α 及 β 地贫各占5.18%及1.43%^[9]。本课题158例轻型地贫患儿中,轻型 α 地贫以--^{SEA}基因优势最大,轻型 β 地贫以IVS-II-654M及CD41-42M为主,潮州儿童地贫基因谱呈多样化分布,与海南、广西等南方高发区主要基因型相似^[10]。

本研究确定红细胞参数RBC为轻型地贫>轻度IDA,与Sakorn Pornprasert^[11]和申丽等^[12]结论一

致;轻型地贫在贫血时因红细胞生成素介导所产生的反馈,以及骨髓代偿使微小细胞数量增多,而重型地贫因骨髓原位溶血及脾脏对异常红细胞清除的叠加作用使RBC反而下降^[13]。Fowkes等^[14]认为儿童地贫纯合子中红细胞计数增加和小细胞增多可能有抗疟作用,地贫本就是人类抵抗疟疾自然选择的结果,小红细胞增多是生物学上一种保护策略。IDA因造血原料缺乏最终表现为细胞浆减少和细胞变小,对增殖分裂和红细胞数目影响小^[7]。MCV、MCH及MCHC为轻型地贫<轻度IDA,小红细胞增多常见地贫与铁缺乏症,相较铁缺乏症,轻型地贫小细胞低色素更明显,与Tong等^[4]报道一致。RDW-CV为轻型地贫>轻度IDA, RDW-CV为外周血红细胞体积异质性参数, RDW增大一定程度上反映骨髓造血活跃,地贫原为均一贫血,骨髓在贫血时会代偿产生更多新生红细胞且形态大小不一,外周红细胞碎片增多使RDW-CV更呈优势^[15]。

红细胞参数广泛用以区分IDA和地贫,同类研究常见缺陷为:运用公式计算复杂、将不同基因型地贫或贫血程度不同IDA笼统合并成组分析、仅评价地贫或IDA血象规律而未确定最优参数和截断值,各类缺陷影响参数的评估效能及实用价值。本研究克服上述缺陷,所设置的轻型地贫组与轻度IDA组匹配度高,运用ROC曲线确定最优筛查指标及截断值,结论更可靠实用。ROC AUC>0.5证明该诊断试验具诊断价值, AUC越接近1真实性越好。本研究RBC及RDW-CV AUC各达84.7%及74.6%,特异度及敏感度高,相较其他参数(HGB、MCV、MCH、MCHC及RBC+RDW-CV联合诊断)诊断价值更突出。轻度贫血前提下, RBC>4.7×10¹²/L或RDW-CV>14.25%可考虑为地贫,反之可能为IDA。Shen等^[3]鉴别中国儿童β地贫和IDA时发现Green和King公式 $[MCV^2 \times RDW / (Hb \times 100)]$ 较可靠,单一指标中RBC及RDW敏感度和特异度更具优势,截断值与本研究接近。Tong等^[4]确定RBC和RDW诊断价值大, RBC截断值为5.18×10¹²/L。申丽等^[12]统计出单独红细胞参数RBC AUC达83.5%。各项报道研究结果的不同,与所选取研究对象、地贫基因型和贫血程度不同导致血液表型差异有关。

综上所述,本研究综合考量了儿童年龄差异、地贫基因型、IDA贫血程度及参数诊断效能等因

素,结论更严谨、客观。当患儿地贫或IDA达中重度贫血时,受骨髓反馈、脾脏清除及外周新生血红细胞形态变化等影响,呈现的血液表型将更复杂,仅靠红细胞参数诊断敏感度及特异度差,需结合更多临床资料予以甄别。本研究结论给儿童地贫及IDA初筛及诊断提供参考,具有重要意义。

参考文献

- [1] Xu X, Wu X. Epidemiology and treatment of beta thalassemia major in China [J]. *Pediatr Investig*, 2019, 4(1): 43-47.
- [2] 袁秋蓉, 牛诗琼, 林雪萍, 等. RBC、Ret-He与HbA2联合检测对地中海贫血的临床价值[J]. *中国实验血液学杂志*, 2021, 29(1): 203-206.
- [3] Shen C, Jiang YM, Shi H et al. Evaluation of indices in differentiation between iron deficiency anemia and β-thalassemia trait for Chinese children [J]. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2010, 32(6): e218-e222.
- [4] Tong L, Kauer J, Wachsmann-Hogiu S, et al. A new red cell index and portable RBC analyzer for screening of iron deficiency and thalassemia minor in a Chinese population [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 10510.
- [5] 黄娟娟, 芦映红, 杨琰, 等. 地中海贫血患儿红细胞参数分析及意义[J]. *现代医药卫生*, 2018, 34(22): 3535-3537.
- [6] 徐湘民, 张新华, 陈荔丽, 等. 地中海贫血预防控制操作指南[M]. 北京: 人民军医出版社, 2011, 20: 36-37.
- [7] 王卫平, 毛萌. 儿科学[M]. 8版, 北京: 人民卫生出版社, 2013: 350-357.
- [8] Pivina L, Semenova Y, Doşa MD, et al. Iron deficiency, cognitive functions, and neurobehavioral disorders in children [J]. *J Mol Neurosci*, 2019, 68(1): 1-10.
- [9] 林芬, 林春萍, 翁妙珊, 等. 潮州地区人群血红蛋白病基因型分布调查[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2012, 4(2): 107-110.
- [10] 杨阳, 张杰. 中国南方地区地中海贫血研究进展[J]. *中国实验血液学杂志*, 2017, 25(1): 276-280.
- [11] Pornprasert S, Panya A, Punyamung M, et al. Red cell indices and formulas used in differentiation of β-thalassemia trait from Iron deficiency in Thai school children [J]. *Hemoglobin*, 2014, 38(4): 258-261.
- [12] 申丽, 罗燕婷, 陈志丹, 等. 红细胞参数及运算公式在广东深圳地区儿童地中海贫血与缺铁性贫血鉴别诊断中的效能评价[J]. *中国实验血液学杂志*, 2020, 28(5): 1689-1693.
- [13] 马婧, 杨惠. 血常规红细胞参数对β地中海贫血诊断、筛查价值探讨[J]. *中外医疗*, 2008, 27(20): 6-8.
- [14] Fowkes FJ, Allen SJ, Angela A, et al. Increased microerythrocyte count in homozygous α+ -thalassaemia contributes to protection against severe malarial anaemia [J]. *Plos Medicine*, 2008, 5(3): 494-499.
- [15] 万学红, 卢学峰. 诊断学[M]. 9版, 北京: 人民卫生出版社, 2018: 250-251.

炎症水平对慢性阻塞性肺疾病患者肺气肿与骨密度的影响

王宇* 赵勇 熊启敏

[摘要] **目的** 探索炎症水平对慢性阻塞性肺疾病患者肺气肿和骨密度的影响。**方法** 选取2017年12月至2021年2月于安徽医科大学附属阜阳医院接受治疗的106例慢性阻塞性肺疾病患者为研究对象,所有研究对象进行胸部螺旋CT检查,根据检查结果中的肺部低衰减区域百分比将患者分为3组,42例肺部低衰减区域百分比<10%的患者为非肺气肿组;38例10%≤肺部低衰减区域百分比<30%的患者为轻中度肺气肿组;26例肺部低衰减区域百分比≥30%为重度肺气肿组。比较三组患者的骨密度和炎症因子水平,同时对不同肺功能分级患者的腰椎骨密度值和血清炎症因子水平进行比较,分析椎骨密度与肺气肿、血清炎症因子指标的相关性。**结果** 各组患者的股骨胫骨密度、股骨骨密度T值、腰椎骨密度以及腰椎骨密度T值,重度肺气肿组<(或负于)轻中度肺气肿<(或负于)非肺气肿组,差异有统计学意义($P<0.05$)。各组血清C反应蛋白、NLR以及血小板与淋巴细胞比值,重度肺气肿组>轻中度肺气肿组>非肺气肿组,差异有统计学意义($P<0.05$)。各组腰椎骨密度值,肺功能Ⅱ级组>Ⅲ级组>Ⅳ级组,差异有统计学意义($P<0.05$)。各组血清C反应蛋白、NLR以及血小板与淋巴细胞占比,肺功能Ⅱ级组<Ⅲ级组<Ⅳ级组,差异有统计学意义($P<0.05$)。相关性分析结果表明腰椎骨密度与肺部低衰减区域百分比、C反应蛋白、NLR以及血小板与淋巴细胞比值等血清炎症因子水平也呈强负相关关系($P<0.05$)。**结论** 慢性阻塞性肺疾病患者体内炎症水平与肺气肿和骨密度具有相关性,骨密度与肺气肿具有负相关关系,与患者炎症水平的上升有关,因此临床应加强相关指标的防治工作。

[关键词] 炎症水平;慢性阻塞性肺疾病;肺气肿;骨密度

Influence of inflammation level on emphysema and bone mineral density in patients with chronic obstructive pulmonary disease

WANG Yu, ZHAO Yong, XIONG Qimin

(Department of Emergency Medicine, Fuyang Hospital affiliated to Anhui Medical University, Fuyang, Anhui, China, 236000)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the effect of inflammation level on emphysema and bone mineral density in patients with chronic obstructive pulmonary disease. **Methods** 106 patients with chronic obstructive pulmonary disease who were treated in our hospital from December 2017 to February 2021 were selected as the research subjects. All subjects underwent a chest spiral CT examination. The patients were divided according to the percentage of low-attenuation areas in the lungs in the examination results. Divided into 3 groups, 42 patients with low lung attenuation area percentage <10% are non-emphysema group; 38 patients with 10% ≤ lung low attenuation area percentage <30% are mild to moderate emphysema group; 26 cases of lung low attenuation area percentage ≥ 30% were severe emphysema group. The bone mineral density and inflammatory factor levels of the three groups of patients were compared, and the lumbar spine bone mineral density and serum inflammatory factor levels of patients with different lung function grades were compared, and the

基金项目:安徽省自然科学基金项目(1808085QH269)

作者单位:安徽医科大学附属阜阳医院急诊医学科,安徽,阜阳 236000

*通信作者:王宇, E-mail: wangyu0182@163.com

correlation between vertebral bone density and emphysema and serum inflammatory factor indexes was analyzed. **Results** The femoral tibial density, femoral femoral bone density T value, lumbar spine bone density and lumbar spine bone density T value of the non-emphysema group were higher than those in the mild to moderate emphysema group than in the severe emphysema group. The comparison of the data between the groups was statistically significant. Significance ($P<0.05$). The serum C-reactive protein, NLR, and the ratio of platelets to lymphocytes in the non-emphysema group were lower than those in the mild to moderate emphysema group than in the severe emphysema group, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). The bone mineral density of the lumbar spine in the pulmonary function class II group was higher than that in the pulmonary function class III group than in the pulmonary function class IV group. The comparison of the data between the groups was statistically significant ($P<0.05$). The proportion of serum C-reactive protein, NLR, platelets and lymphocytes in the pulmonary function group II was lower than that in the pulmonary function group III and lower than that in the IV group, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). The results of correlation analysis showed that there was a strong negative correlation between lumbar bone density and the percentage of low-attenuation areas in the lungs, C-reactive protein, NLR, and the ratio of platelets to lymphocytes and other serum inflammatory factors ($P<0.05$). **Conclusion** The level of inflammation in patients with chronic obstructive pulmonary disease is correlated with emphysema and bone density. Bone density is negatively correlated with emphysema, and is related to the increase in the level of inflammation in patients. Therefore, clinical prevention and treatment of related indicators should be strengthened.

[KEY WORDS] Inflammation level; Chronic obstructive pulmonary disease; Emphysema; Bone mineral density

慢性阻塞性肺疾病是临床呼吸科常见疾病之一,主要病理表现是进行性发展的气流受阻和慢性炎症,基本特征是持续性气流受限,临床表现为肺气肿和慢性支气管炎^[1-2]。目前对于慢性阻塞性疾病的病因尚且没有准确的结论,但相关研究表明空气污染、化学物质吸入、粉尘、吸烟以及呼吸道感染等外因;遗传因素、成长发育期的肺部发育不良以及气道反应性增高等内因都会增加慢性阻塞性疾病的发生风险^[3-4]。慢性阻塞性肺疾病常见的并发症主要有贫血、心血管疾病以及骨质疏松等,尤其是骨质疏松最为常见,长此以往大大增加了患者发生骨折的风险,给患者生活带来不便,影响患者的身心健康^[5]。本次研究旨在探索炎症水平对慢性阻塞性肺疾病患者肺气肿和骨密度的影响,为提高患者生活质量提供参考。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2017年12月至2021年2月于安徽医科大学附属阜阳医院接受治疗的106例慢性阻塞性肺疾病患者为研究对象,所有研究对象进行胸部螺旋CT检查,根据检查结果中的肺部低衰减区域百分比将患者分为3组,42例肺部低衰减区域百分比<10%的患者为非肺气肿组;38例10%≤肺部

低衰减区域百分比<30%的患者为轻中度肺气肿组;26例肺部低衰减区域百分比≥30%为重度肺气肿组^[8]。所有研究对象男性58例,女性48例;平均年龄(52.44 ± 13.27)岁;平均病程(2.18 ± 0.59)月。纳入标准:①年龄≥18岁;②经临床诊断和影像学诊断确诊为慢性阻塞性肺疾病^[6];③患者及其家属知情并签署知情同意书。排除标准:①肾、肝等其他严重器官性疾病;②精神、意识等障碍性疾病;③妊娠期妇女、儿童。本研究经医院伦理委员会批注。

1.2 方法

1.2.1 研究方法

指导患者取仰卧位,并深呼吸屏住气胸口贴于仪器上进行扫描检测,以测量肺部低衰减区域百分比^[7],计算公式为肺部低衰减区域百分比=(肺气肿低衰减去容积)/(全肺总容积)×100%,应用快速全身骨密度测试仪(美国Hologic公司,型号ZT-2460)对所有患者进行骨密度测定,所检测部位为患者的腰椎L1-4和双侧股骨颈,所得到的结果有绝对值和T值。使用肺功能仪测定患者的相关肺部指标进行肺功能分级,第1秒最大呼气容积≥80%为I级;50%≤第1秒最大呼气容积<80%预计值为II级;30%≤第1秒最大呼气容积<50%预计值为III级;第1秒最大呼气容积<50%且伴有呼吸衰竭为IV级。收集三组患者的清晨空腹

外周静脉血,经离心机离心后取血清使用全自动血液分析检测仪进行C反应蛋白、中性粒细胞与淋巴细胞占比(neutrophil to lymphocyte ratio, NLR)、血小板与淋巴细胞比值。

1.2.2 统计学方法

使用EXCEL2016进行数据汇总,使用SPSS 23.0进行研究资料分析。计量资料均通过正态性检验,以($\bar{x} \pm s$)描述。多组间的比较为单因素方差分析,两两比较 t 检验。相关分析为Pearson相关分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表1 3组患者骨密度和炎症因子水平比较表($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of bone mineral density and inflammatory factor levels in 3 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	股骨胫骨 密度 (g/cm ²)	股骨胫骨 密度 T值	腰椎骨 密度 (g/cm ²)	腰椎骨 密度 T值	血清C 反应蛋白 (mg/L)	NLR	血小板 与淋巴细胞 比值
非肺气肿组	42	0.97±0.14	-0.45±0.08	1.07±0.16	-0.49±0.13	4.09±3.98	2.66±1.25	120.84±46.23
轻中度肺气肿组	38	0.76±0.15a	-1.82±0.13a	0.89±0.31a	-1.70±0.04a	7.68±6.09a	3.11±1.57	159.74±60.62a
重度肺气肿组	26	0.59±0.06ab	-2.79±0.05ab	0.68±0.14ab	-2.77±0.16ab	9.95±6.74a	4.58±2.46ab	174.01±51.86a
<i>F</i> 值		71.321	4,913.660	25.228	3,242.600	9.715	10.239	9.529
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注:与轻中度肺气肿组比较,* $P < 0.05$,与重度肺气肿组比较,* $P < 0.05$ 。

2.2 不同肺功能分级患者腰椎骨密度值和血清炎症因子水平比较

各组腰椎骨密度值,肺功能Ⅱ级组>Ⅲ级组>Ⅳ级组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

各组血清C反应蛋白、NLR以及血小板与淋巴细胞占比,肺功能Ⅱ级组<Ⅲ级组<Ⅳ级组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表2。

表2 不同肺功能分级患者腰椎骨密度值和血清炎症因子水平比较表($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of lumbar spine bone mineral density and serum inflammatory factor levels in patients with different lung function classifications ($\bar{x} \pm s$)

肺功能 分级	<i>n</i>	腰椎骨 密度	C反应 蛋白	NLR	血小板与淋巴 细胞比值
Ⅱ级	54	1.31±0.16	2.13±1.11	1.38±0.59	113.26±40.23
Ⅲ级	25	0.84±0.13	5.65±2.80	4.05±0.17	160.37±51.48
Ⅳ级	27	0.62±0.11	9.57±3.60	5.09±0.21	179.75±46.08
<i>F</i> 值		233.878	54.795	339.658	23.031
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000	0.000

2.3 腰椎骨密度与肺气肿、血清炎症因子指标相关性分析

经Pearson相关性分析,结果表明腰椎骨密度与肺部低衰减区域百分比、C反应蛋白、NLR以及血小板与淋巴细胞比值等血清炎症因子水平呈强负相关关系($P < 0.05$)。见表3。

2 结果

2.1 3组患者骨密度和炎症因子水平比较

3组患者的股骨胫骨密度、股骨胫骨密度T值、腰椎骨密度以及腰椎骨密度T值,重度肺气肿组<(或负于)轻中度肺气肿<(或负于)非肺气肿组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。3组血清C反应蛋白、NLR以及血小板与淋巴细胞比值,重度肺气肿组>轻中度肺气肿组>非肺气肿组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表1。

表3 腰椎骨密度与肺气肿、血清炎症因子指标相关性

Table 3 Correlation analysis table of lumbar bone mineral density, emphysema and serum inflammatory factors

指标	总水平	<i>r</i> 值	<i>P</i> 值
腰椎骨密度% vs	1.02±0.18		
肺部低衰减区域百分比	28.22±7.63	-0.386	0.000
血清C反应蛋白	4.86±2.97	-0.351	0.000
NLR	2.95±0.57	-0.475	0.000
血小板与淋巴细胞比值	141.31±62.16	-0.490	0.000

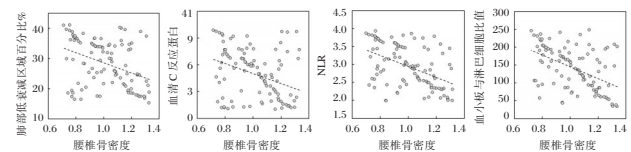


图1 腰椎骨密度与肺气肿、血清炎症因子等指标的相关性分析

Figure 1 Correlation analysis of lumbar bone mineral density, emphysema, serum inflammatory factors and other indicators

3 讨论

慢性阻塞性肺疾病的核心是气道炎症,同时也会伴随有全身性的系统炎症呼吸疾病,骨质疏松是慢性阻塞性肺疾病最为常见的并发症,一旦发生骨质疏松,患者的椎体骨密度下降,容易发生骨折变形,发展为继发性后凸进,进一步对患者的

肺功能造成不良影响,增加患者治疗成本,影响患者预后^[9]。

非肺气肿组患者的股骨胫骨密度、股骨密度T值、腰椎骨密度以及腰椎骨密度T值高于轻中度肺气肿组高于重度肺气肿组。非肺气肿组血清C反应蛋白、NLR以及血小板与淋巴细胞比值低于轻中度肺气肿组低于重度肺气肿组。霍晋^[10]等作者发现与慢性支气管炎表现型的慢性阻塞性肺疾病患者相比较,肺气肿表型的慢性阻塞性肺疾病患者发生骨质疏松的风险有很大程度的提高,这与本研究结果具有一致性。慢性阻塞性肺疾病最明显的病理特征是气流阻塞,因此患者的机体会长时间处于慢性缺氧状态,而低氧血症会降低1- α 羟化酶的活性,从而抑制了二羟维生素D₃的合成,胃肠道吸收钙的能力明显受到影响,骨密度下降。慢性阻塞性肺疾病患者大多年龄较大,而疾病的病程较长,肺部长期的通气功能不足使得患者机体活动能力受限和下降,导致失用性萎缩的发生,也就是肌肉强度下降,对骨骼缺乏足够的刺激,从而明显降低了成骨细胞的活性,骨密度因而下降。慢性阻塞性肺疾病患者机体长时间缺氧,胃肠道也有淤血情况的存在,对患者的食欲造成了影响,因而进食量相比之前有所减少,对钙磷的吸收也受到抑制,尤其是重度或者急性发作期的患者,还有可能合并高碳酸血症,加上细胞缺氧,肾小管的排酸功能出现严重障碍,最终导致大量的钠、钙、钾、镁离子随着尿液被排除体外,血液中的游离钙水平大大下降,进而导致甲状旁腺功能亢进的出现,破骨细胞活性明显增加,骨吸收能力增强,而骨钙含量降低。肺功能Ⅱ级组腰椎骨密度值高于肺功能Ⅲ级高于Ⅳ级组腰椎骨密度较高。肺功能Ⅱ级组血清C反应蛋白、NLR以及血小板与淋巴细胞占比低于肺功能Ⅲ级低于Ⅳ级组血清C反应蛋白、NLR以及血小板与淋巴细胞占比较低。这提示我们随着慢性阻塞性肺疾病患者肺部功能的不断下降,病情逐渐恶化,而骨密度也随之有所下降,同时患者体内的炎症水平具有明显的上升^[11]。相关性分析结果表明腰椎骨密度与肺部低衰减区域百分比、C反应蛋白、NLR以及血小板与淋巴细胞比值等血清炎症因子水平也呈强负相关关系。这提示我们随着慢性阻塞性肺疾病患者肺气肿程度的加重,骨密度越来越低,而该现象的出现与外周血中的炎症水平具有密切相关

性^[12]。本研究中发现存在肺气肿的慢性阻塞性肺疾病患者其体内外周血炎症指标水平高于非肺气肿患者,且肺气肿程度越严重,相应的炎症水平就越高,而骨密度水平呈现下降的形式,因此我们推测肺气肿和骨密度之间所呈现的强负相关关系与慢性阻塞性肺疾病促进患者机体分泌大量炎症因子有关^[13-14]。另外慢性阻塞性肺疾病患者大多为老年人,机体免疫力较差,长时间患病使得患者体内炎症因子水平不断累积,通气功能大大下降,对机体的活动量产生了限制,肌肉强度逐渐下降,最终对成骨细胞的活性造成了影响,从而出现骨密度下降的现象^[15]。

综上所述,慢性阻塞性肺疾病患者体内炎症水平与肺气肿和骨密度具有相关性,骨密度与肺气肿具有负相关关系,与患者炎症水平的上升有关,因此临床应加强相关指标的防治工作。

参考文献

- [1] 曹婷婷,万俊,冯永海,等.老年COPD伴严重呼吸衰竭患者血清CysC、VEGF、IL-17、ACTA水平变化[J].分子诊断与治疗杂志,2020,12(4):533-537.
- [2] 金明,陈国忠,余红缨,等.急性加重期慢性阻塞性肺疾病患者肺气肿表型肺功能及痰细胞因子水平及其关系研究[J].心肺血管病杂志,2019,36(7):521-524.
- [3] PETITE, SARAH E, MURPHY, JULIE A. Systemic Corticosteroid and Antibiotic Use in Hospitalized Patients With Chronic Obstructive Pulmonary Disease Exacerbation [J]. The annals of pharmacotherapy, 2019, 53(2): 144-150.
- [4] 何军颖,申永春,蒙毅,等.慢性阻塞性肺疾病急性加重患者的临床特征分析[J].重庆医学,2019,47(16):2162-2164.
- [5] 沙正凯,李林静,张祥杰,等.慢阻肺疾病合并肺癌患者的辅助性T细胞水平与疾病发生的关系[J].临床肺科杂志,2020,25(7):977-982.
- [6] 中华人民共和国卫生部.慢性阻塞性肺疾病诊断标准[J].国际呼吸杂志,2011,31(1):1-2.
- [7] MILNE, STEPHEN, JETMALANI, KANIK, CHAPMAN, DAVID G, et al. Respiratory system reactance reflects communicating lung volume in chronic obstructive pulmonary disease [J]. Journal of applied physiology, 2019, 126(5):1223-1231.
- [8] 王会娟,王昌明,易玉芳.慢性阻塞性肺疾病患者血清炎症因子表达水平与骨密度关系[J].山西医药杂志,2020,49(16):2132-2135.
- [9] 杨珍娇,崔妙玲,张小芳,等.慢性阻塞性肺疾病病人症状群及其与炎症因子水平的相关性[J].护理研究,2021,35(7):1134-1139.
- [10] 霍晋,王蕾,贾原,等.老年慢性阻塞性肺疾病合并骨质疏松血清白介素-6及C反应蛋白相关研究[J].中国药物与临床,2018,18(12):2104-2106.

(下转第1895页)

产前嵌合型9三体胎儿的临床和遗传学分析

李星 潘丽媛 王挺 刘舒 卢建*

【摘要】目的 对妊娠中期产前诊断嵌合型9三体胎儿进行临床和遗传学分析,为遗传咨询提供依据。**方法** 分析2016年1月至2021年6月在广东省妇幼保健院行羊水产前诊断的26 913例染色体核型分析结果,进而分析嵌合型9三体胎儿的临床表现及妊娠结局。**结果** 通过羊水染色体核型分析共发现10例嵌合型9三体胎儿,发生率约为0.04%,其中9例同时行羊水CMA检测,均提示胎儿为嵌合型9三体。进一步行B型超声检查,发现胎儿有不同程度的异常。10例嵌合型9三体胎儿的产前诊断指征主要涉及孕妇高龄、唐筛高风险及无创产前基因检测提示9号染色体异常。经过孕妇夫妇双方慎重考虑,8例选择终止妊娠,2例选择继续妊娠。**结论** 对怀疑是嵌合型胎儿进行产前诊断时,建议根据相应的产前诊断指征联合应用染色体核型分析和CMA检测技术进行综合分析,对发现为嵌合型9三体胎儿的病例需进一步行B型超声检查,为临床医生进行产前遗传咨询提供全面、准确的依据。

【关键词】 产前诊断;嵌合型9三体;妊娠结局

The incidence of mosaic trisomy 9 in prenatal diagnosis and pregnancy outcome

LI Xing, PAN Liyuan, WANG Ting, LIU Shu, LU Jian*

(Guangdong Women and Children Hospital, Guangdong, Guangzhou, Guangdong, China, 511400)

【ABSTRACT】 Objective To analyze the clinical and genetics of mosaic trisomy 9 in prenatal diagnosis at second trimester, in order to provide the basis for genetic counseling. **Method** The results of karyotype analysis of 26,913 cases of prenatal diagnosis of amniotic fluid in our hospital, from January 2016 to June 2021, were retrospectively analyzed, and the clinical manifestations and pregnancy outcomes of mosaic trisomy 9 were analyzed. **Results** 10 cases of mosaic trisomy 9 were found, with an incidence of about 0.4%. Among them, 9 cases underwent chromosomal microarray (CMA) at the same time, all of which indicated that were trisomy 9 mosaicism. Further ultrasound examination also found that the fetus had varying degrees of abnormalities. The indications for prenatal diagnosis of 10 mosaic trisomy 9 fetuses mainly involved the advanced age of pregnant women, high risk of Down screening and high risk of non-invasive prenatal testing. After consideration, 8 cases chose to terminate the pregnancy and 2 cases chose to continue. **Conclusion** It is recommended to use chromosome karyotype analysis and CMA to confirm further the prenatal diagnosis of mosaic trisomy 9, as well as ultrasound, so as to provide comprehensive and accurate informations for prenatal genetic counseling.

【KEY WORDS】 Prenatal diagnosis; Mosaic trisomy 9; Pregnancy outcome

嵌合型9号染色体三体是一种罕见的染色体异常,临床表型多变,从没有明显异常到具有典型表型特征均有发生,包括生长和智力低下、面部畸形、低耳位、小眼症、球鼻、小嘴、高颧弓、先天性心

脏缺陷、泌尿生殖系统异常、骨骼异常和中枢神经系统异常等^[1-3]。现有文献多为个案报道,且多为出生后诊断。产前诊断病例通常选择终止妊娠,因此对嵌合型9三体胎儿的自然病程知之甚少,因

基金项目:广东省中医药局科研项目(20211046)

作者单位:广东省妇幼保健院医学遗传中心,广东,广州 511400

*通信作者:卢建, E-mail: lxjian326@foxmail.com

而临床上对嵌合型9三体进行产前遗传咨询仍然十分困难。本文对10例嵌合型9三体胎儿进行回顾性分析,以期为临床医生在产前遗传咨询嵌合型9三体病例提供更多有用信息。

1 对象与方法

1.1 研究对象

2016年1月至2021年6月30日于广东省妇幼保健院医学遗传中心行羊膜腔穿刺术进行羊水染色体核型分析孕妇26 913例,共发现329例染色体嵌合体,其中10例为嵌合型9三体。这10例病例中,3例因唐筛高风险、5例因无创产前检测(Noninvasive prenatal testing, NIPT)异常、1例因绒毛染色体异常、1例因外院羊水染色体异常要求行进一步检查。10例病例中有9例同时行羊水染色体微阵列分析(chromosomal microarray analysis, CMA)和染色体G显带核型分析,1例仅进行了染色体G显带核型分析。本实验经医院伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 羊膜腔穿刺术

孕妇签署知情同意后,在超声引导下经羊膜腔穿刺抽取羊水标本送检。

1.2.2 羊水细胞培养并染色体G显带分析

按细胞遗传学方法对羊水细胞进行原位培养、收获、G显带和核型分析^[4]。核型依据《人类遗传学国际命名体制ISCN(2016)》^[5]进行命名。

1.2.3 羊水原位培养嵌合体判断标准^[6]

2个或2个以上培养物中发现1个或以上相同异常核型的细胞克隆,判定为“真嵌合体”;发现以下情况为“假嵌合体”:①单细胞异常嵌合;②单克隆异常嵌合;③多细胞异常嵌合,但异常类型各不相同。

1.2.4 羊水染色体微阵列分析(chromosomal microarray analysis, CMA)

采用美国Affymetrix公司Cytoscan 750k基因芯片进行全基因组拷贝数变异(copy number variation, CNVs)分析。德国Qiagen公司QIAamp DNA blood Mini Kit DNA提取试剂盒提取孕妇羊水细胞DNA,按照Affymetrix公司Cytoscan 750k基因芯片标准操作手册进行基因组DNA消化、连接、扩增、纯化、片段化、标记和杂交,洗涤后对芯片荧光信号进行扫描,扫描结果使用Affymetrix公司提供的Chromosome Analysis Suite(ChAs)4.0版进行分析。

1.3 统计分析

应用SPSS 19.0软件对数据进行统计学分析。计数资料采用例数和百分数表示,变量数据采用平均值表示。

2 结果

2.1 基本情况

26 913例孕妇羊水标本中,共发现10例嵌合型9三体(0.04%)。这10例孕妇行产前诊断时平均年龄约为33岁(23~42岁),平均孕周约为20周(17~23周),其产前诊断指征主要有高龄、唐筛高风险和(或)无创产前DNA提示异常,或外院染色体结果提示异常于本中心复查等。

2.2 羊水检查结果

10例孕妇经羊水染色体核型分析,结果均提示为46,XN和47,XN,+9的嵌合体。其中9例同时行羊水CMA检测,结果均提示为嵌合型9三体,嵌合比例范围在15~65%之间。图1-a、1-b为病例10的核型分析结果,计数16个克隆,其中9三体和正常细胞系各有8个;图1-c为病例10的CMA检测结果,发现整条9号染色体的拷贝数约为2.3,提示为嵌合型9三体,嵌合比例约30%。

2.3 Ⅲ级超声结果

10例病例中有3例(病例2、6、7)确诊嵌合型9三体后直接选择引产,未行Ⅲ级超声检查,1例(病例9)于外院产检,因而无法获得其胎儿超声检查结果,其余6例均于孕22~26周在本院行Ⅲ级超声检查,发现胎儿不同程度异常。其中2例(病例1、10)心脏发育异常、2例(病例4、10)双肾实质回声增强、2例(病例3、10)股骨长小于孕周、2例(病例3、5)胆囊未探及、2例(病例1、3)单脐动脉、2例(病例8、10)永存左上腔静脉、1例(病例3)左侧膈疝、1例(病例1)尿道下裂、1例(病例4)左侧输尿管扩张。见表1。

2.4 妊娠结局

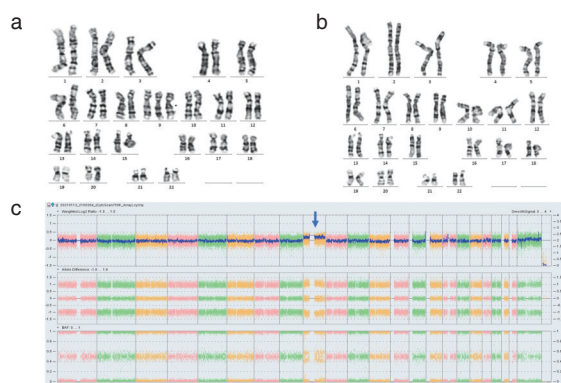
经遗传咨询和夫妇双方慎重考虑后,10例病例中有8例选择终止妊娠,2例选择继续妊娠。经电话随访,病例4自诉于外院生育一男孩,但拒绝提供关于患儿生长发育情况的相关信息;病例9继续妊娠中。见表1。

3 讨论

9三体是一种罕见的染色体病,完全性9三体

表1 嵌合型9三体检出情况及妊娠结局
Table 1 Detection and pregnancy outcome of mosaic trisomy 9

编号	年龄 (岁)	孕周	羊穿原因	羊水染色体核型 结果	羊水CMA结果 (嵌合比例)	Ⅲ级超声表现	妊娠结局
1	33	18+	唐筛高风险	mos 47,XY,+9 [8]/46,XY[13]		胎儿多发畸形:单脐动脉、室间隔缺损、胎儿尿道下裂可能	引产
2	40	18+	高龄,NT增厚(4.7 mm),绒毛染色体异常	mos 47,XY,+9 [10]/46,XY[20]	9三体嵌合(65%)		引产
3	37	23+	高龄,唐筛高风险	mos 47,XY,+9 [7]/46,XY[15]	9三体嵌合(35%)	胎儿左侧膈疝,股骨长小于孕周,单脐动脉,胆囊未探及	引产
4	42	23+	高龄,外院羊水染色体异常	mos 47,XY,+9 [6]/46,XY[18]	9三体嵌合(40%)	双肾实质回声增强,左侧输尿管扩张	活产,自诉小孩正常,但拒绝提供更多信息
5	30	20+	无创产前DNA提示21三体高风险	mos 47,XY,+9 [5]/46,XY[28]	9三体嵌合(25%)	胆囊未探及	引产
6	31	18+	无创产前DNA提示9号染色体数目增多	mos 47,XY,+9 [3]/46,XY[27]	9三体嵌合(50%)		引产
7	26	17+	无创产前DNA提示9号染色体数目偏多	mos 47,XX,+9 [12]/46,XX[8]	9三体嵌合(45%)		引产
8	28	19+	无创产前DNA提示9号染色体异常	mos 47,XX,+9 [10]/46,XX[21]	9三体嵌合(15%)	胎儿永存左上腔静脉	引产
9	38	17+	高龄,唐筛高风险,外院无创产前DNA提示9号三体高风险	mos 47,XY,+9 [2]/46,XY[21]	9三体嵌合(15%)		继续妊娠
10	23	20+	唐筛高风险	mos 47,XX,+9 [8]/46,XX[8]	9三体嵌合(30%)	胎儿四肢长骨径小于孕周,心脏发育异常:心脏稍大、血管环(右位主动脉弓并左迷走锁骨下动脉、永存左上腔静脉),双肾实质回声增强。	引产



注:a为47,XN,+9;b为46,XN;c为CMA结果

图1 羊水染色体G显带核型及CMA

Figure 1 G-banding karyotype and chromosomal microarray analysis of amniotic cells

胎儿往往是致死性的,临床可见的9三体胎儿一般都是嵌合型9三体^[7]。嵌合型9三体可能是由生殖细胞减数分裂不分离,随后胚胎发生不完全三体自救造成,或是由于胚胎发生体细胞有丝分裂不分离造成^[8],发病率不详。现有文献多为出生后个案报道,产前报道文献更是少之又少。本研究

回顾性分析了2016年1月至2021年6月在广东省妇幼保健院医学遗传中心行羊水产前诊断的26913例染色体核型分析结果,共发现10例(0.04%)嵌合型9三体胎儿。

嵌合型9三体临床表现差异较大,从没有明显异常到具有典型表现均有发生,典型的临床表现包括生长和智力低下、面部畸形、低耳位、小眼症、球鼻和小嘴、高颧弓、先天性心脏缺陷(常见室间隔缺损)、泌尿生殖系统异常(如生殖器发育不良、隐睾、囊性肾或肾积水)、骨骼异常(关节脱位或变形)和中枢神经系统异常(脑积水或Dandy-Walker畸形)^[1-3]。报道的典型嵌合型9三体患儿大都有产前和新生儿并发症,常见早产、呼吸问题、喂养困难和生长发育迟缓,且个体之间生长趋势差异很大^[9]。部分患儿有严重的精神障碍、智力低下、发育迟缓的表现,但只有大约三分之一患儿有中枢神经系统结构异常^[10],也有些嵌合体患儿的症状较轻,可以完成普通教育^[9]。

本研究发现的10例嵌合型9三体胎儿中,有6例在本院进行了Ⅲ级超声检查,发现胎儿有不同程

度异常,主要涉及心脏发育异常(2/6)、股骨长小于孕周(2/6)、胆囊未探及(2/6)、双肾实质回声增强(2/6)、单脐动脉(2/6)、永存左上腔静脉(2/6)、膈疝(1/6)、尿道下裂(1/6)和输尿管扩张(1/6)。其中单脐动脉在胎儿没有其它异常的情况下,一般认为不会对胎儿的生长发育造成影响,但如果合并其他结构异常或染色体异常,则不能排除是由于胎儿异常造成的一种表现。有文献报道,在嵌合型9三体患儿产前超声表现中,单脐动脉发生率较高^[11]。

在产前诊断中,嵌合体的诊断一直是一个难点,选择有效的检测方法至关重要。核型分析是检测染色体异常的重要方法^[12],但需要对细胞进行培养,因此当发现嵌合时需要判断是否为培养造成的假性嵌合,嵌合比例也需要考虑可能是由于培养造成的生长偏移而非真实比例。CMA由于不需要细胞培养,因此检出的嵌合比例更能真实反映实际比例,但由于CMA检测结果在异常细胞比例达到30%时才比较可靠^[13],容易漏诊低比例嵌合体,因此核型分析结合CMA分析可有效的帮助嵌合体的诊断。

综上所述,嵌合型9三体患儿产前产后临床表现多样,且个体差异显著,新生儿出生后的发育状况也不能代表未来的发育趋势,这都给临床对嵌合型9三体患儿进行产前诊断和长期生长预测带来不小的挑战,因此,有效检测方法的应用,病例的收集,加强产前产后长期监测对该病未来的产前诊断和遗传咨询都是有益的。

参考文献

- [1] Saneto RP, Applegate KE, Frankel DG. Atypical manifestations of two cases of trisomy 9 syndrome: rethinking development delay[J]. *Am. J. Med. Genet*, 1998, 80(1):42-45.
- [2] Chen CP, Chern SR, Town DD, et al. Fetoplacental and foetamniotic chromosomal discrepancies in prenatally detected mosaic trisomy 9[J]. *Prenat. Diagn*, 2003, 23(12):1019-1021.
- [3] Chen CP, Chern SR, Cheng S J, et al. Second-trimester diagnosis of complete trisomy 9 associated with abnormal maternal serum screen results, open sacral spina bifida and congenital diaphragmatic hernia, and review of the literature[J]. *Prenat. Diagn*, 2004, 24(6):455-462.
- [4] 潘小英,吴菁,傅文婷,等.羊水细胞原位培养染色体制备技术在产前诊断上的应用[J]. *中国优生与遗传杂志*, 2006, 14(5):43-44.
- [5] McGowan-Jordan J, Simons A, Schmid M, (eds.). *An international system for human cytogenomic nomenclature. Reprint of Cytogenetic and Genome Res*, S Karger, Basel, New York, 2016, 149:1-2.
- [6] Hsu LY, Benn PA. Revised guidelines for the diagnosis of mosaicism in amniocytes[J]. *Prenat. Diagn*, 1999, 19(11):1081-1082.
- [7] Arnold GL, Kirby RS, Stern TP, et al. Trisomy 9: review and report of two new cases[J]. *Am. J. Med. Genet*, 1995, 56(3):252-257.
- [8] Stipoljev F, Kos M, Miskovi B, et al. Antenatal detection of mosaic trisomy 9 by ultrasound: a case report and literature review[J]. *J Matern Fetal Neonat Med*, 2003, 14(1):65-69.
- [9] Li M, Glass J, Du X, et al. Trisomy 9 mosaic syndrome: Sixteen additional patients with new and/or less commonly reported features, literature review, and suggested clinical guidelines[J]. *Am J Med Genet*, 2021, 185(8):2374-2383.
- [10] Miryounesi M, Dianatpour M, Shadmani Z, et al. Report of a Case with Trisomy 9 Mosaicism[J]. *Iranian J med sci*, 2016, 41(3):249-252.
- [11] Takahashi H, Hayashi S, Miura Y, et al. Trisomy 9 mosaicism diagnosed in utero[J]. *Obstetrics and Gynecology International*, 2010, 2010:1-4.
- [12] 刘慧;方慧琴;陈薇;严雅兰;袁静.羊水穿刺在产前筛查无创高风险病例中染色体异常的产前诊断价值[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2020, 10:1311-1314+1318.
- [13] 染色体微阵列分析技术在产前诊断中的应用协作组.染色体微阵列分析技术在产前诊断中的应用专家共识[J]. *中华妇产科杂志*, 2014, 49(8):570-572.
- [11] DING Z, WANG K, LI J, et al. Association between glutathione S-transferase gene M1 and T1 polymorphisms and chronic obstructive pulmonary disease risk: A meta-analysis[J]. *Clinical Genetics: An International Journal of Genetics in Medicine*, 2019, 95(1):53-62.
- [12] 张宏,孙辉,欧阳文,等.慢性阻塞性肺疾病肺气肿型与非肺气肿型气道特征分析[J]. *现代仪器与医疗*, 2019, 23(1):119-120, 24.
- [13] MOGHOOFEI, MOHSEN, AZIMZADEH JAMALKANDI, et al. Bacterial infections in acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease: a systematic review and meta-analysis[J]. *Infection*, 2020, 48(1):19-35.
- [14] 李英莲,常琼.慢性阻塞性肺疾病合并骨质疏松患者血清肿瘤坏死因子 α 、转化生长因子 β 1、白细胞介素6水平的变化[J]. *中国组织工程研究*, 2021, 25(32):5085-5090.
- [15] YOUNG, ALEXANDRA L, BRAGMAN, et al. Disease Progression Modeling in Chronic Obstructive Pulmonary Disease[J]. *Am Respirat critic care med*, 2020, 201(3):294-302.

(上接第1891页)

脑脊液 HBP、LDH、 β 2MG 水平对化脓性脑膜炎患儿的诊断价值

鲍茹* 李永凤 陈莹

[摘要] **目的** 探究脑脊液肝素结合蛋白(HBP)、乳酸脱氢酶(LDH)、 β 2微球蛋白(β 2MG)水平对化脓性脑膜炎患儿的诊断价值。**方法** 选取2018年4月至2021年4月郑州大学第二附属医院儿科诊治的中枢神经感染新生儿128例,其中化脓性脑膜炎患儿66例为化脓组,结核性脑膜炎28例为结核组,病毒性脑膜炎患儿34例为病毒组,另选取同期非中枢神经系统感染患儿42例为对照组。比较四组患儿脑脊液HBP、LDH、 β 2MG水平差异,并以ROC曲线评估脑脊液HBP、LDH、 β 2MG水平对化脓性脑膜炎患儿的诊断价值。**结果** 四组患儿脑脊液HBP水平比较:对照组<病毒组<结核组<化脓组,差异有统计学意义($P<0.05$),LDH及 β 2MG水平比较:对照组<病毒组<化脓组<结核组,差异有统计学意义($P<0.05$)。Pearson相关性显示,脑脊液HBP与LDH及 β 2MG均呈显著正相关($r=0.534、0.567, P<0.05$);LDH与 β 2MG呈正相关($r=0.884, P<0.05$)。ROC曲线结果显示,脑脊液HBP、LDH、 β 2MG水平诊断化脓性脑膜炎患儿的AUC分别为0.976、0.733、0.737,敏感度、特异度:HBP为95.5%、86.5%,LDH为90.9%、62.5%, β 2MG为90.9%、61.5%,诊断的敏感性均较高($P<0.05$)。二元Logistic回归分析显示,脑脊液HBP、LDH及 β 2MG值均为化脓性脑膜炎患儿预后不良的危险因素($P<0.05$)。**结论** 脑脊液HBP化脓性脑膜炎患儿的诊断价值高,而LDH、 β 2MG水平对化脓性脑膜炎患儿诊断敏感性高,但特异性均较低。

[关键词] 化脓性脑膜炎;脑脊液;肝素结合蛋白;乳酸脱氢酶; β 2微球蛋白

The value of cerebrospinal fluid HBP, LDH, β 2MG levels in the diagnosis of children with suppurative meningitis

BAO Ru*, LI Yongfeng, CHEN Ying

(Department of Pediatrics, The Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan, China, 450014)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the diagnostic value of cerebrospinal fluid heparin-binding protein (HBP), lactate dehydrogenase (LDH) and β 2 microglobulin (β 2MG) levels in children with purulent meningitis. **Methods** From April 2018 to April 2021, 128 neonates with central nervous system infection diagnosed and treated in the Department of Pediatrics of the Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University were selected. Among them, 66 children with purulent meningitis were in the suppurative group, and 28 children with tuberculous meningitis were in the tuberculosis group. 34 children with viral meningitis were in the virus group, and 42 children with non-central nervous system infection during the same period were selected as the control group. The levels of HBP, LDH, and β 2MG in the cerebrospinal fluid of the four groups of children were compared. The ROC curve was used to evaluate the diagnostic value of the levels of HBP, LDH, and β 2MG in the cerebrospinal fluid in children with purulent meningitis. **Results** Comparison of HBP levels in the cerebrospinal fluid of the four groups of children: the control group < the virus group < the tuberculosis group < the suppurative group, the difference was statistically significant ($P<0.05$). Comparison of LDH and β

基金项目:河南省医学科技攻关项目(2017T02033)

作者单位:郑州大学第二附属医院儿科,河南,郑州450014

*通信作者:鲍茹, E-mail: drpeggie@163.com

2MG levels: the control group <viral group <the suppurative group <the tuberculosis group, the difference was statistically significant ($P<0.05$). Pearson correlation showed that cerebrospinal fluid HBP was significantly positively correlated with LDH and β 2MG ($r=0.534, 0.567, P<0.05$). LDH was positively correlated with β 2MG ($r=0.884, P<0.05$). The ROC curve results showed that the AUC of cerebrospinal fluid HBP, LDH, and β 2MG levels in children with purulent meningitis were 0.976, 0.733, and 0.737, respectively. The sensitivity and specificity were 95.5% and 86.5% for HBP, and 90.9% and 62.5% for LDH. β 2MG is 90.9%, 61.5%, the sensitivity of diagnosis is high. Binary Logistic regression analysis showed that the values of HBP, LDH and β 2MG in cerebrospinal fluid are all risk factors for poor prognosis in children with purulent meningitis ($P<0.05$). **Conclusion** The diagnostic value of cerebrospinal fluid HBP in children with purulent meningitis is high, while the levels of LDH and β 2MG are highly sensitive to the diagnosis of purulent meningitis in children, but the specificity is low.

[KEY WORDS] Suppurative meningitis; Cerebrospinal fluid; Heparin binding protein; Lactate dehydrogenase; β 2 microglobulin

化脓性脑膜炎为临床常见中枢神经系统感染性疾病,其多发于婴幼儿,发热、头痛、脑膜刺激征及颅内压增高为其主要临床表现。临床资料显示,化脓性脑膜炎在婴幼儿中的发病率及死亡率均较高,可严重影响患儿的生命健康,早期诊断及治疗可有效提高其预后^[1-2]。脑脊液检查为脑膜炎的有效确诊方式之一。既往研究指出,白细胞计数(WBC)、C反应蛋白(CRP)等为脑脊液生化检查的常规指标,二者对化脓性脑膜炎的诊断价值已得到证实,但仍缺乏一定的特异性^[3]。故继续探究化脓性脑膜炎诊断的敏感性指标仍是研究的重点。近年来有文献报道,肝素结合蛋白(heparin-binding protein, HBP)在细菌性感染、感染程度评估及预后的诊断中均具有重要价值。另文献指出,脑组织坏死及细菌感染后,乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)及 β 2微球蛋白(β 2-microglobulin, β 2MG)可被大量释放,水平显著升高^[4-5]。但目前临床关于三者在中枢神经系统感染性疾病的诊断价值结论不一。本研究探讨脑脊液 HBP、LDH 及 β 2MG 水平对化脓性脑膜炎患儿的诊断价值,并分析其与预后的关系,以期对化脓性脑膜炎患儿的早期诊断及治疗提供参考。结果如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2018年4月至2021年4月郑州大学第二附属医院儿科诊治的中枢神经感染新生儿128例,其中化脓性脑膜炎患儿66例为化脓组,结核性脑膜炎28例为结核组,病毒性脑膜炎患儿34例为病毒组。纳入标准:①均符合《诸福棠实用儿科学》^[6]

诊断标准;②年龄 ≥ 1 个月;③患儿均为首次发病,且发病至脑脊液采集时间 ≤ 48 h。排除标准:①他种类型中枢系统疾病者;②入院前已进行抗感染治疗者;③合并自身免疫性疾病者;④合并代谢性疾病者。脓性组中,男、女各42、24例,年龄平均(5.1 ± 1.5)岁。结核组中,男、女各18、10例,年龄平均(5.0 ± 1.6)岁。病毒组中,男、女各19、15例,年龄平均(5.2 ± 1.5)岁。另选取同期非中枢神经系统感染患儿42例为对照组,男、女各28、14例,年龄平均(5.0 ± 1.5)岁。四组患儿一般资料比较差异无统计学意义($P>0.05$)。所有患者监护人均知情同意;本实验经伦理委员会批准。

1.2 方法

入选患儿均在入院24 h内行腰椎穿刺,采集脑脊液2 mL,静置后以3 000 r/min,离心10 min,离心半径为10 cm,取上层-80℃保存待测。肝素结合蛋白(HBP)采用ELISA法检测(兔抗人HBP抗体供自Life Biosciences公司);乳酸脱氢酶(LDH)、 β 2微球蛋白(β 2MG)均采用XL300型全自动生化分析仪,行免疫比浊法测定。

1.3 预后

所有脑膜炎患儿经抗生素抗感染治疗后,以格拉斯哥预后评分(glasgow outcome scale, GOS)^[7]标准进行分级,其中GOS 5分定义为预后良好,GOS 1~4分为预后不良。

1.4 统计学处理

采用统计软件SPSS 22.0处理数据,计数资料用 $n(\%)$ 表示,行 χ^2 检验;计量资料用($\bar{x}\pm s$)表示,行独立样本 t 检验,多组间用F检验;脑脊液HBP、LDH、 β 2MG相关性采用Pearson相关性分

析,多因素采用二元 Logistic 回归分析;预测价值评估采用 ROC 曲线分析,得出曲线下面积(AUC)。\$P<0.05\$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 4组患儿脑脊液 HBP、LDH、β2MG 水平比较

4组患儿脑脊液 HBP 水平比较:对照组<病毒组<结核组<化脓组,差异有统计学意义(\$P<0.05\$);LDH 及 β2MG 水平比较:对照组<病毒组<化脓组<结核组,差异有统计学意义(\$P<0.05\$)。见表1。

表1 两组患儿脑脊液 HBP、LDH、β2MG 水平比较 (\$\bar{x} \pm s\$)
Table 1 Comparison of the levels of HBP, LDH and β2MG in cerebrospinal fluid between 2 groups (\$\bar{x} \pm s\$)

组别	n	HBP(ng/mL)	LDH(U/L)	β2MG(mg/L)
对照组	42	3.24±1.02	22.2±4.9	2.06±0.44
病毒组	34	8.12±3.84 ^a	30.4±5.8 ^a	2.62±0.48 ^a
化脓组	66	58.02±20.85 ^{ab}	40.3±6.2 ^{ab}	3.48±0.62 ^{ab}
结核组	28	16.42±5.28 ^{abc}	48.6±7.4 ^{abc}	4.12±0.68 ^{abc}
F 值		191.818	133.289	95.700
P 值		0.000	0.000	0.000

注:与对照组比较,^a\$P<0.05\$;与病毒组比较,^b\$P<0.05\$;与化脓组比较,^c\$P<0.05\$。

2.2 脑脊液 HBP、LDH、β2MG 相关性分析

Pearson 相关性显示,脑脊液 HBP 与 LDH 及 β2MG 均呈显著正相关(\$r=0.534、0.567, P<0.05\$);LDH 与 β2MG 呈正相关(\$r=0.884, P<0.05\$)。

2.3 脑脊液 HBP、LDH、β2MG 水平对化脓性脑膜炎患儿的诊断价值

ROC 曲线结果显示,脑脊液 HBP、LDH、β2MG 水平诊断化脓性脑膜炎患儿的 AUC 分别为 0.976、0.733、0.737,均有一定准确性;且 HBP、LDH、β2MG 水平诊断化脓性脑膜炎患儿的敏感度均较高(\$P<0.05\$)。

HBP 与 LDH 的 AUC 比较:\$Z=(0.976-0.733)/(0.012*0.012+0.039*0.039)^{0.5}=5.956, P=[1-NORMSDIST(5.956)]*2<0.001\$。同公式统计可得出:HBP 与 β2MG 的 AUC 比较 \$Z=4.334, P<0.05\$;LDH 与 β2MG 的 AUC 比较 \$Z=0.130, P=0.896\$。见表2,图1。

表2 脑脊液 HBP、LDH、β2MG 水平对化脓性脑膜炎患儿的诊断价值

项目	AUC	标准误	P 值	95%CI	最佳临界值	约登指数	敏感度	特异度
HBP	0.976	0.012	<0.05	0.954~0.999	16.38 ng/mL	0.820	0.955	0.865
LDH	0.733	0.039	<0.05	0.657~0.809	34U/L	0.534	0.909	0.625
β2MG	0.737	0.039	<0.05	0.662~0.813	2.825mg/L	0.524	0.909	0.615

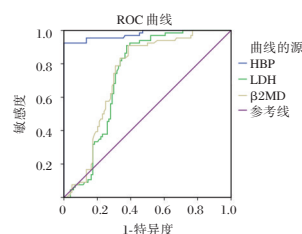


图1 ROC 曲线

Figure 1 ROC curve

2.4 脑脊液患儿预后情况单因素分析

化脓性患儿中,经治疗后预后良好者 54 例(81.82%),预后不良者 12 例(18.18%)。预后良好组患儿的发生率显著高于预后不良组(\$P<0.05\$)。见表3。

表3 化脓性脑脊液患儿预后情况单因素分析 [n(%)]

Table 3 Univariate analysis of prognosis of children with suppurative cerebrospinal fluid [n(%)]

项目	分类	预后良好组 (54)	预后不良组 (12)	χ ² 值	P 值
HBP(ng/mL)	<16.38	38(70.37)	3(25.00)	8.589	0.003
	≥16.38	16(29.63)	9(75.00)		
LDH(U/L)	<34	35(64.81)	4(33.33)	4.025	0.045
	≥34	19(35.19)	8(66.67)		
β2MG(mg/L)	<2.83	39(72.22)	5(41.67)	4.125	0.042
	≥2.83	15(27.78)	7(58.33)		

2.5 化脓性脑脊液患儿预后情况 Logistic 回归分析

以“预后情况”为因变量(赋值:0=良好,1=不良),以“脑脊液 HBP(<16.74=0, ≥16.74=1)、LDH(<33.35=0, ≥33.35=1)及 β2MG(<3.12=0, ≥3.12=1)”为自变量,进行二元 Logistic 回归分析。二元 Logistic 回归分析显示,脑脊液 HBP、LDH 及 β2MG 值均为化脓性脑脊液患儿预后不良的危险因素(\$P<0.05\$)。见表4。

表4 化脓性脑脊液患儿预后情况 Logistic 回归分析

Table 4 Logistic regression analysis of prognosis of children with suppurative cerebrospinal fluid

相关因素	B 值	S.E. 值	Wald 值	自由度	Exp (B)	95%CI	P 值
HBP	1.964	0.730	7.231	1	7.125	1.703~29.811	0.007
LDH	1.406	0.707	3.952	1	4.078	1.020~16.301	0.047
β2MG	1.396	0.693	4.055	1	4.040	1.038~15.724	0.044

3 讨论

中枢神经系统感染为临床常见感染性疾病,其患病率及致残率均较高,若未及时发现与治疗,可严重影响患儿的生命安全。化脓性脑膜炎中枢神经系统疾病的一种,其主要为细菌感染引起,发生后可引起患儿发热、脑膜刺激征、颅内压升高及神经功能损伤等,对患儿的生命健康造成威胁。研究显示,化脓性脑膜炎患儿的临床表现无特异性,其颅内压增高出现较晚,因此早期诊断具有一定的困难^[8]。

病原学检查为对感染性疾病的诊断价值确切,而脑脊液病原学检查可化脓性脑膜炎诊断的金标准。HBP为中性粒细胞分泌的蛋白质,是细菌感染最早升高的标志物之一。近年来,有研究指出HBP自身具有较强的正电荷,可趋化细胞因子,具有较强的杀菌活性,并可有效激活巨噬细胞及单核细胞,参与感染性疾病的病理变化过程^[9]。且资料显示,HBP在一般情况下储存于中性粒细胞中,当受到细菌感染刺激后大量释放,并在局部或轻微的细菌感染中其水平亦呈现迅速升高^[10]。李星^[11]等研究人员对健康人群及化脓性脑膜炎患者进行研究发现,化脓性脑膜炎患者HBP显著高于健康者。此即证实了HBP在中性粒细胞受到细菌本身或细菌释放的毒素激活后呈现大幅度增长。提示脑脊液HBP水平诊断化脓性脑膜炎的价值高,可作为细菌性脑膜炎及病毒性脑膜炎的有效鉴别指标。

LDH为NAD依赖性激酶,主要存在肾脏中,可催化 α -酮酸,且组织特异性高。已有研究指出,脑脊液LDH的活性较低,仅为血清中的10%,因此当脑脊液中LDH呈高表达时,提示脑实质细胞广泛坏死^[12]。而化脓性脑膜炎患儿中,其致病菌大量生长繁殖,可造成脑组织炎性水肿,增高颅内压,降低脑血流量,进一步造成脑组织病变部位缺血缺氧,催化LDH活性增强^[13]。且文献报道,化脓性脑膜炎患者脑脊液LDH水平显著高于病毒性脑膜炎患者,其结合患儿的临床病情,对化脓性脑膜炎的临床诊断价值较高^[14]。另 β 2MG为小分子球蛋白,其主要由淋巴细胞及多形核白细胞等产生,具有免疫调节作用,在血浆、尿液、脑脊液及唾液中广泛存在。临床资料显示, β 2MG可由人体内多数有核细胞合成,但由于血脑屏障影响,正常者

脑脊液中 β 2MG水平含量极少^[15]。而化脓性脑膜炎中,由于病原体的侵入,机体免疫系统被激活,T细胞反映的效应增加,加快了 β 2MG的合成^[16]。且中枢神经系统受到细菌感染后,血脑屏障损伤致使通透性增加,释放大量的 β 2MG,进入脑脊液,因此 β 2MG水平显著升高。提示脑脊液 β 2MG对化脓性脑膜炎的诊断具有一定的辅助价值,需联合其他指标提高诊断效能。

中枢神经系统感染后,细菌、病毒、支原体及结核杆菌等病原体均可侵入患儿中枢神经,可造成患儿脊髓及脑炎性变化,部分患儿即使经治疗后,也可能存在严重的后遗症^[17]。另有研究报道,脑膜炎患儿若出现反复性抽搐、意识障碍等,可能提示其预后不佳。本研究中,HBP、LDH及 β 2MG升高组患儿预后不良发生率显著升高,且二元Logistic回归分析显示,脑脊液HBP、LDH及 β 2MG均为化脓性脑脊液患儿预后不良的危险因素。提示,脑脊液HBP、LDH及 β 2MG对与化脓性脑膜炎患儿预后评估具有一定的价值。

综上所述,脑脊液HBP化脓性脑膜炎患儿的诊断价值高,而LDH、 β 2MG水平对化脓性脑膜炎患儿诊断的敏感性高,但特异性均较低。本研究不足之处为研究样本量较少,且纳入的脑膜炎疾病类型仅为化脓性及病毒性两种,因此仍需进一步行大样本及多类型疾病研究验证。

参考文献

- [1] Ratuszny D, Sühs KW, Novoselova N, et al. Identification of Cerebrospinal Fluid Metabolites as Biomarkers for Enterovirus Meningitis[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(2):337.
- [2] 杜伟鹏,汪海霞,卢芳. AQP-4、VCAM-1、NPY在重症手足口病患儿脑脊液中的表达及对并发脑炎的诊断价值[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2021, 13(3):352-355.
- [3] 陈艳,苏慧霞,陈海英,等. 化脓性脑膜炎患儿脑脊液白细胞水平与早期临床症状、降钙素原及细菌类型的相关性研究[J]. 中南医学科学杂志, 2020, 48(3):272-274+278.
- [4] 黄彩芝,张洁,莫丽亚. 脑脊液肝素结合蛋白检测在小儿化脓性脑膜炎中的应用价值[J]. 中华检验医学杂志, 2019, 42(11):955-961.
- [5] 宋文奇,余金蓉,陈莉. 脑脊液LDH+CRP联合检测对新生儿化脓性脑膜炎的诊断价值[J]. 西南国防医药, 2019, 29(2):122-124.
- [6] 胡亚美. 诸福棠实用儿科学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2002.

(下转第1904页)

· 论 著 ·

ABCG2、VEGF 及 miRNA-23a 与乳腺癌术后同侧锁骨上淋巴结转移的关系

刘平贤 张浩* 王征 李伟汉 陆佳团

【摘要】目的 研究 ATP 结合膜转运蛋白超家族 G 成员 2 (ABCG2)、血管内皮生长因子 (VEGF) 及微小 RNA-23a (miRNA-23a) 与乳腺癌术后同侧锁骨上淋巴结转移的关系。**方法** 选取本院 2018 年 6 月至 2020 年 10 月收治的 79 例乳腺癌行根治术患者设为研究组, 其中伴同侧锁骨上淋巴结转移者 43 例 (转移组), 未伴同侧锁骨上淋巴结转移者 36 例 (未转移组), 另选取同期进行健康体检的 49 例健康人员作为对照组。分析各组 ABCG2、VEGF 及 miRNA-23a 表达情况及上述因子与乳腺癌组织临床病理参数的关系, 并绘制受试者工作特征曲线 (ROC), 分析 ABCG2、VEGF 及 miRNA-23a 对乳腺癌术后同侧锁骨上淋巴结转移的预测价值。**结果** 研究组 ABCG2、VEGF 阳性表达率明显高于对照组, miRNA-23a 水平明显低于对照组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。转移组 ABCG2、VEGF 阳性表达率明显高于未转移组, miRNA-23a 水平明显低于未转移组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。临床分期 I ~ II 期者 ABCG2 阳性表达率显著低于 III 期者, miRNA-23a 水平高于 III 期者, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。ROC 曲线分析结果显示, ABCG2、VEGF 及 miRNA-23a 三者联合预测乳腺癌术后同侧锁骨上淋巴结转移的 ROC 下曲线下面积 (AUC) 为 0.737, 明显高于各项单独检测 ($P < 0.05$)。**结论** ABCG2、VEGF 表达增高, miRNA-23a 表达下降对乳腺癌术后同侧锁骨上淋巴结转移有促进作用, 推测上述因子可能是防止乳腺癌术后淋巴结转移的靶点。

【关键词】 ABCG2; VEGF; miRNA-23a; 乳腺癌; 同侧锁骨上淋巴结转移

The relationship between ABCG2, VEGF and miRNA-23a levels and ipsilateral supraclavicular lymph node metastasis after breast cancer surgery

LIU Pingxian, ZHANG Hao*, WANG Zheng, LI Weihang, LU Jiatuan

(Department of Secretary Gland Surgery, Nanyang Central Hospital, Nanyang, Henan, China, 473009)

【ABSTRACT】Objective To study the relationship between the levels of ATP-binding cassette transporter, superfamily G member 2 (ABCG2), vascular endothelial growth factor (VEGF) and microRNA-23a (miRNA-23a) and the ipsilateral supraclavicular lymph node metastasis after breast cancer surgery. **Methods** The clinical data of 79 patients with breast cancer undergoing radical mastectomy admitted to our hospital from June 2018 to October 2020 were selected as the study group, including 43 cases with ipsilateral supraclavicular lymph node metastasis (metastasis group), 36 cases without ipsilateral supraclavicular lymph node metastasis (non-metastasis group). In addition, 49 healthy persons who had physical examinations during the same period were selected as the control group. The expressions of ABCG2, VEGF and miRNA-23a in each group were analyzed and the relationship between the above factors and clinicopathological parameters of breast cancer tissues was analyzed. The receiver operating characteristic curve (ROC) was drawn to analyze the value of ABCG2, VEGF and miRNA-23a in predicting ipsilateral supraclavicular lymph node metastasis after breast cancer surgery. **Results** The positive expression rates of ABCG2 and VEGF in the study group were significantly higher than those in the control group, and the miRNA-23a level in the study group was significantly lower than that in the control group, the differences were all statistically significant ($P < 0.05$).

基金项目: 河南省医学科技攻关计划联合共建项目 (LHGJ20191451)

作者单位: 河南省南阳市中心医院乳腺分泌腺外科, 河南, 南阳 473009

*通信作者: 张浩, E-mail: rxwk0377@163.com

The positive expression rates of ABCG2 and VEGF in the metastasis group were significantly higher than those in the non-metastasis group, and the miRNA-23a level in the metastasis group was significantly lower than that in the non-metastasis group, the differences were all statistically significant ($P<0.05$). In addition, the positive expression rate of ABCG2 in clinical stages I to II was significantly lower than those in stage III, and the level of miRNA-23a was higher than those in stage III, the differences were all statistically significant ($P<0.05$). The results of ROC curve analysis showed that the areas under curve (AUC) of ABCG2, VEGF, and miRNA-23a in predicting ipsilateral supraclavicular lymph node metastasis after breast cancer surgery were 0.735, 0.728, 0.727, respectively, and AUC of the three joint inspections was higher, which was 0.737.

Conclusion The increased expression of ABCG2 and VEGF and the decreased expression of miRNA-23a can promote the ipsilateral supraclavicular lymph node metastasis after breast cancer surgery. It is speculated that the above factors may be the target to prevent lymph node metastasis after breast cancer surgery.

[KEY WORDS] ABCG2; VEGF; miRNA-23a; Breast cancer; Ipsilateral supraclavicular lymph node metastasis

乳腺癌是临床上妇科常见的一种恶性肿瘤,具有高发率、死亡率特征。乳腺原位癌不致命,但若治疗不及时,易发生转移而侵袭心、脑、肺等重要器官,其中同侧锁骨上淋巴结转移是导致患者预后不良的因素之一^[1-2]。临床相关报道显示,初诊伴有同侧锁骨上淋巴结转移总发病率较高,对女性生命健康造成严重危险^[3]。外科根治术是目前临床治疗乳腺癌的主要方法,可有效切除肿瘤细胞,防止癌细胞扩散,但仍有部分患者因病情恶化而发生淋巴结转移,因此预测其淋巴结转移逐渐受到关注与重视^[4]。近年来,相关研究发现,ATP结合膜转运蛋白超家族G成员2(ATP-binding cassette superfamily G member 2, ABCG2)、血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)及微小RNA-23a(miRNA-23a)等因子均与乳腺癌发生、发展及治疗、预后关系密切^[5],但关于其与乳腺癌术后同侧锁骨上淋巴结转移的关系报道鲜为少见。对此,本研究将探讨ABCG2、VEGF及miRNA-23a水平与乳腺癌术后同侧锁骨上淋巴结转移的关系。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取本院2018年6月至2020年10月收治的79例乳腺癌行根治术患者纳入为研究组。纳入指标:①所有患者均符合乳腺癌诊断标准^[6];②术前均未接受放化疗、抗氧化等治疗;③影像学资料和病理资料完整;④年龄>18岁,且无手术禁忌症。排除标准:①过敏体质;②合并血液、神经等系统疾病;③合并心、肝、肾等严重原发性疾病;④二次手术者。

79例均为女性,平均年龄为(53.98 ± 6.28)岁,伴同侧锁骨上淋巴结转移者43例(转移组),未伴同侧锁骨上淋巴结转移者36例(未转移组)。另选取同期进行健康体检的49例健康女性作为对照组,平均(52.78 ± 5.71)岁,各组资料比较差异无统计学意义($P>0.05$)。本研究经医院医学伦理委员会批准通过,受试者均签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 S-P免疫组化染色法检测 ABCG2、VEGF

主要试剂:兔抗人ABCG2单克隆抗体、兔抗人VEGF多克隆抗体、链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连接(SP)试剂盒、胰蛋白酶及二氨基联苯氨酶底物显色试剂盒,均购自福州迈新生物技术开发有限公司。

标本准备:手术切除的病理组织均经4%福尔马林固定,石蜡包埋,4 μm 连续切片后脱蜡、水化。使用S-P免疫组化染色法对ABCG2、VEGF蛋白进行检测,检测过程严格按照说明书进行。一抗阴性对照使用PBS(磷酸盐缓冲液)进行代替。

结果判断^[7]:根据阳性细胞百分比、染色强度判定。阳性细胞百分比:0分:无阳性细胞;1分:阳性细胞<10%;2分:10%~50%;3分:50%~75%;4分:>75%。染色强度:0分,无色;1分,淡黄色;2分,棕黄色;3分,棕褐色。总积分:上述2项评分的乘积。阳性:总积分>4分。

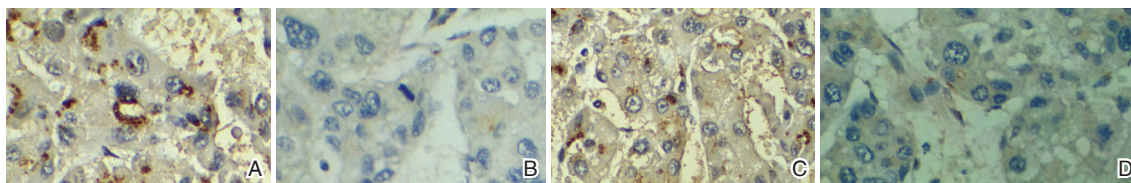
1.2.2 荧光定量PCR检测 miRNA-23a

研究组于术前、对照组于体检当日空腹抽取受3 mL外周静脉血,以4 000 r/min离心10 min,分离血清,置于-20℃低温保存。根据总RNA提取试剂说明书提取总RNA,水溶解后采用分光光度计测定

RNA 浓度与纯度,吸光度在 1.8~2.1 之间可用于后续逆转录。miRNA-23a 茎环逆转录反应引物:5'-CGTCGCTACATCcAG7AGCATATGCGACGCTrC-CAGT-3'。反应条件:42℃ 15 min, 85℃ 5 s, 4℃ 10 min。反应产物置于-20℃保存。应用 SYBR Green rQ-PCR 试剂盒检测实时荧光定量 PCR。miR-23a:上游引物(F):5'-ITIHCAGA CCCCAG-GCAG-GCACA-3';下游引物(R):5-TCCATCAGC-GTCAA-CACCATCA-3'。本实验设置复孔 3 个,采用 u6 基因作为内参,每个样品测定 3 次,PCR 循环参数:95℃ 3 min;95℃ 12 s,62℃ 40 s,共 40 个循环。

1.3 统计学方法

采用统计软件 SPSS 22.0 进行分析,计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,行 t 检验;计数资料以 $n(\%)$ 表示,行 χ^2 检验;采用 ROC 曲线分析 ABCG2、VEGF 及 miRNA-23a 对乳腺癌术后同侧锁骨上淋巴结转移的预测价值,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。



注:A、B 为 ABCG2 在乳腺癌及癌旁组织中表达;C、D 为 VEGF 在乳腺癌及癌旁组织中表达。

图1 免疫组化染色图(SP,×400)

Figure 1 immunohistochemical staining (SP, ×400)

2.2 转移组与未转移组 ABCG2、VEGF 及 miRNA-23a 表达情况比较

转移组 ABCG2、VEGF 阳性表达率明显高于未转移组,miRNA-23a 水平明显低于未转移组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

表2 转移组与未转移组 ABCG2、VEGF 及 miRNA-23a 表达情况比较 [$n(\%)$, $(\bar{x} \pm s)$]

Table 2 Comparison of ABCG2, VEGF and miRNA-23a expression between metastasis group and non metastasis group [$n(\%)$, $(\bar{x} \pm s)$]

组别	n	ABCG2		VEGF		miRNA-23a
		阳性	阴性	阳性	阴性	
转移组	43	28(65.12)	15(34.88)	36(83.72)	7(16.28)	0.43±0.08
未转移组	36	12(33.33)	24(66.67)	10(27.78)	26(72.22)	1.16±0.12
t/χ^2 值		7.919		25.213		32.256
P 值		0.005		<0.001		<0.001

2.3 不同临床病理参数乳腺癌患者 ABCG2、VEGF 及 miRNA-23a 表达情况

不同年龄、肿瘤直径、月经状态及肿瘤类型

2 结果

2.1 对照组与研究组 ABCG2、VEGF 及 miRNA-23a 表达情况比较

研究组 ABCG2、VEGF 阳性表达率明显高于对照组,miRNA-23a 水平明显低于对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1、图 1。

表1 对照组与研究组 ABCG2、VEGF 及 miRNA-23a 表达情况比较 [$n(\%)$, $(\bar{x} \pm s)$]

Table 1 Comparison of ABCG2, VEGF and miRNA-23a expression between control group and Study Group

组别	n	ABCG2		VEGF		miRNA-23a
		阳性	阴性	阳性	阴性	
研究组	79	40(50.63)	39(49.37)	46(58.23)	33(41.77)	1.32±0.13
对照组	49	8(16.33)	41(83.67)	9(18.37)	40(81.63)	2.44±0.21
t/χ^2 值		15.186		19.608		37.303
P 值		<0.001		<0.001		<0.001

的乳腺癌患者 ABCG2、VEGF 及 miRNA-23a 表达比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。不同临床分期的患者 VEGF 阳性表达率比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。临床分期 I~II 期者 ABCG2 阳性表达率显著低于 III 期者,miRNA-23a 水平高于 III 期者,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 3。

2.4 ABCG2、VEGF 及 miRNA-23a 对乳腺癌术后同侧锁骨上淋巴结转移的预测价值

ROC 曲线分析结果显示,ABCG2、VEGF 及 miRNA-23a 三者联合预测乳腺癌术后同侧锁骨上淋巴结转移的 ROC 下曲线面积(AUC)为 0.737,明显高于各项单独检测($P < 0.05$)。见表 4、图 1。

3 讨论

对于乳腺癌患者而言,术后同侧锁骨上淋巴结转移的发生率较高,是乳腺癌预后不良的重要指标^[8]。因此如何有效评估患者术后淋巴结转移是医学工作者关注的热点。

表3 ABCG2、VEGF及miRNA-23a与乳腺癌临床病理参数的关系 [$n(\%)$, ($\bar{x} \pm s$)]Table 3 the relationship between ABCG2, VEGF and mirna-23a and clinicopathological parameters of breast cancer [$n(\%)$, ($\bar{x} \pm s$)]

临床病理特征	n	ABCG2 阳性	χ^2 值	P 值	VEGF 阳性	χ^2 值	P 值	miRNA-23a	χ^2 值	P 值
年龄(岁)										
≤50	45	21(52.50)	0.658	0.417	25(54.35)	0.307	0.580	1.36±0.11	0.864	0.391
>50	34	19(47.50)			21(45.65)			1.34±0.09		
肿瘤直径(cm)										
≤3	43	18(45.00)	2.905	0.088	23(50.00)	0.871	0.351	1.18±0.07	1.349	0.181
>3	36	22(55.00)			23(50.00)			1.16±0.06		
月经状态										
绝经前	34	17(42.50)	0.010	0.922	22(47.83)	1.030	0.310	1.75±0.16	0.265	0.791
绝经后	45	23(57.50)			24(52.17)			1.76±0.17		
临床分期										
I~II期	58	20(50.00)	22.768	<0.001	36(78.26)	1.324	0.250	1.25±0.11	30.308	<0.001
III期	21	20(50.00)			10(21.74)			0.51±0.03		
肿瘤类型										
浸润性导管癌	42	21(52.50)	0.098	0.952	26(56.52)	0.950	0.622	1.37±0.12	0.670	0.516
浸润性小叶癌	28	14(35.00)			16(34.78)			1.34±0.09		
其他	9	5(12.50)			4(8.70)			1.35±0.10		

表4 ABCG2、VEGF及miRNA-23a对乳腺癌术后同侧锁骨上淋巴结转移的预测价值

Table 4 the predictive value of ABCG2, VEGF and mirna-23a in ipsilateral supraclavicular lymph node metastasis after breast cancer surgery

预测因子	敏感度	特异度	AUC	95%CI	P 值
ABCG2	0.713	0.687	0.735	0.620~0.851	<0.001
VEGF	0.695	0.711	0.728	0.612~0.845	<0.001
miRNA-23a	0.651	0.628	0.727	0.615~0.839	<0.001
三者联合	0.926	0.813	0.737	0.620~0.854	<0.001

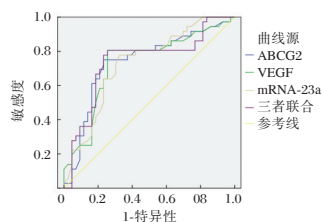


图1 ROC曲线

Figure 1 ROC curve

相关研究显示,ABCG2是肿瘤细胞株中分离的ABC转运蛋白家族之一,被认为与肿瘤耐药有关,尤其是在乳腺癌多药耐药中发挥重要作用^[9]。Kim等^[10]研究发现,ABCG2是参与肿瘤生长、分化、侵袭与转移等生物学行为的重要因子,且在乳腺癌中呈高表达。Kumari等^[11]研究则指出,ABCG2过表达者,其生物学行为具有特殊性,表现为化疗效果差、患者预后不佳等。本研究发现,ABCG2在乳腺癌中呈高表达,阳性率为50.63%,其与患者年龄、肿瘤直径等无明显关系,但与临床分期有关,且合并淋巴结转移者ABCG2阳性表达率显著高于无淋巴结转移者。上述研究结果均提示ABCG2在乳腺癌发生、转移过程中具有一定作用。

Kazakydasan等^[12]发现,乳腺癌侵袭与转移是一个涉及多方面因素的过程,其中肿瘤细胞的过度增殖及新生血管生成是重要影响因素。VEGF为作用于血管内皮细胞的血管内皮生长因子,是重要的血管生成正性调节因子,可促进血管内皮细胞分裂。肿瘤的生长依赖肿瘤新生血管的形成,血管生成对肿瘤的发生、侵袭和转移至关重要^[13]。本研究中,转移组VEGF阳性表达率显著高于无转移组,与国外研究结果相符^[14]。提示VEGF表达增高有利于乳腺癌细胞发生淋巴结转移。VEGF可促进肿瘤血管内皮细胞增殖,增加肿瘤血管数量,为乳腺癌细胞转移提供通道。另外,本研究发现,VEGF表达与肿瘤分期、病理类型均无关,与Choi等^[15]结果报道不符。推测可能与本研究样本量纳入偏少有关,亦可能与VEGF的表达在不同类型肿瘤变异及发展过程中所起作用不明显有关。

miRNA-23a是存在脊椎动物基因组中的一种抑癌因子,参与基因转录表达,具有调控细胞增殖的作用,其过表达可能抑制肿瘤细胞的生长并促进肿瘤细胞凋亡,从而起到抑制肿瘤细胞增殖、侵袭的作用。本研究中,研究组miRNA-23a水平显著低于对照组,尤其是伴有淋巴结转移组miRNA-23a水平更低,且该因子表达与乳腺癌临床分期有关。周永安等^[15]报道通过分析影响乳腺癌患者术后复发转移的危险因素亦发现,miRNA-23a低表达是患者术后复发转移的独立影响因素,与本研究报道相符。表明miRNA-23a低表达可能提示患者伴有淋巴结转移,预后较差。此外,本研究ROC曲线结果显示,ABCG2、VEGF及miRNA-23a均可有效预测乳腺癌患者术后淋巴结转移,是

评估患者术后淋巴结转移的重要指标,且联合检测的诊断价值最佳。

综上所述,ABCG2、VEGF表达增高,miRNA-23a表达下降对乳腺癌术后同侧锁骨上淋巴结转移有促进作用,推测上述因子可能是防止乳腺癌术后淋巴结转移的靶点。

参考文献

- [1] 邢海霞,赵明燕,郭勇. 乳腺癌患者血清性激素、IGF-1、VEGF和组织 LOX 水平与淋巴结转移的相关性分析[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2019, 11(2):56-61.
- [2] Min SK, Lee SK, Woo J, et al. Relation Between Tumor Size and Lymph Node Metastasis According to Subtypes of Breast Cancer[J]. J Breast Cancer, 2021, 24(1):1045-1046.
- [3] 焦得闯,朱久俊,乔江华,等. 新辅助化疗后乳腺癌同侧锁骨上淋巴结病理完全缓解影响因素分析[J]. 中华医学杂志, 2019, 99(38):2989-2993.
- [4] 瞿新. 乳腺癌根治术后心肌损伤标志物与临床病理的关系研究[J]. 西南国防医药, 2018, 28(2):129-131.
- [5] Abe H, Teramoto A, Tanaka M, et al. Abstract PD2-06: Pre-operative diagnosis of sentinel lymph node metastasis using computed tomography lymphography for early breast cancer patients[J]. Cancer Res, 2018, 78(4 Supplement):5-7.
- [6] 张兰,崔利民,付倩,等. miRNA-23a 表达与晚期乳腺癌全切除术后的预后关系分析[J]. 实用癌症杂志, 2019, 34(7):1057-1059.
- [7] 张季,李杨,李析胤,等. HIF-1 α , TP, VEGF 在乳腺癌组织中的表达及其与癌组织生长,浸润及转移的关系[J]. 西北国防医学杂志, 2018, 39(3):188-192.
- [8] 李建丽,李永梅,康鸿斌,等. ANXA2, STAT3, VEGF 在乳腺癌中的表达及与肿瘤转移的关系[J]. 癌症进展, 2020, 18(3):241-244.
- [9] Koh S, Moon J, Unno T, et al. Baicalein Suppresses Stem Cell-Like Characteristics in Radio- and Chemoresistant MDA-MB-231 Human Breast Cancer Cells through Up-Regulation of IFIT2[J]. Nutrients, 2019, 11(3):11-14.
- [10] Kim CK, Oh S, Kim SJ, et al. Correlation of IGF1R expression with ABCG2 and CD44 expressions in human osteosarcoma[J]. Genes Genomics, 2018, 477(4):104-106.
- [11] Kumari M, Krishnamurthy PT, Sola P. Targeted Drug Therapy to Overcome Chemoresistance in Triple-negative Breast Cancer[J]. Current Cancer Drug Targets, 2020, 20(8):559-572.
- [12] Kazakydasan S, Rahman Z, Ismail SM, et al. Prognostic significance of VEGF-C in predicting micrometastasis and isolated tumour cells in N0 oral squamous cell carcinoma[J]. J Oral Pathol Med, 2017, 50(6):19-20.
- [13] 汤中,蒋亦龙,彭辉灿. 原花青素对高糖环境下人视网膜内皮细胞增殖及 VEGF 表达的影响[J]. 中南医学科学杂志, 2020, 48(2):155-159.
- [14] 周永安,赵德庆. 乳腺癌根治术患者 miRNA-23 a 表达水平与术后复发转移的关系[J]. 中国实验诊断学, 2018, 22(12):11-15.
- [15] Choi JU, Chung SW, Al-Hilal TA, et al. A heparin conjugate, LHbisD4, inhibits lymphangiogenesis and attenuates lymph node metastasis by blocking VEGF-C signaling pathway[J]. Biomaterials, 2017, 139(11):56.

(上接第 1899 页)

- [7] 格拉斯哥预后评分[J]. 临床和实验医学杂志, 2014, 13(1):57.
- [8] Alhazmi A, Lazrek M, Alidjinou EK, et al. Paediatric enterovirus meningitis without cerebrospinal fluid pleocytosis. [J]. J Infect, 2019, 79(6):612-625.
- [9] 管军,张建秋,邓超,等. 脑脊液肝素结合蛋白鉴别细菌性颅内感染的临床价值[J]. 中华医院感染学杂志, 2020, 30(18):2768-2771.
- [10] 顿士娟,邹琪,吴强,等. 颅脑术后继发颅内感染患者脑脊液肝素结合蛋白水平的变化及意义[J]. 中华全科医学, 2020, 18(12):2017-2020.
- [11] 李星,张志刚,林慧卿,等. HBP 联合 PCT 在中枢神经系统感染患儿的诊断价值[J]. 中国妇幼健康研究, 2020, 31(5):591-597.
- [12] 宋文奇,余金蓉,陈莉. 脑脊液 LDH+CRP 联合检测对新生儿化脓性脑膜炎的诊断价值[J]. 西南国防医药, 2019, 29(2):122-124.
- [13] 李林艳,陈嫩梅,张玉巧,等. 血清心肌酶和 CSF 中 LDH 与 TNF- α 对成年患者颅内感染的诊断效果[J]. 中华医院感染学杂志, 2019, 29(11):1643-1646.
- [14] 赵辉,白玉彦,温桂莲,等. 血清心肌酶与脑脊液 LDH 及 TNF- α 对神经内科颅内感染患者的诊断分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2018, 28(10):1496-1499.
- [15] Maeyama M, Sasayama T, Tanaka K, et al. Multi-marker algorithms based on CXCL13, IL-10, sIL-2 receptor, and β 2-microglobulin in cerebrospinal fluid to diagnose CNS lymphoma[J]. Cancer Med, 2020, 9(12):4114-4125.
- [16] 陈洪德,程耀,毛毅,等. 脑脊液 ADA、T-SPOT.TB 单独和联合诊断结核性脑膜炎的价值[J]. 热带医学杂志, 2021, 21(4):468-471.
- [17] 陈颖,徐晓红,胡琦音,等. MRI 联合脑脊液天门冬氨酸氨基转移酶、乳酸脱氢酶、 β 2-微球蛋白诊断新生儿化脓性脑膜炎的效果研究[J]. 中国妇幼保健, 2020, 35(17):3205-3208.

外泌体在神经系统疾病研究中的进展

李慧灵 赵琳琳 汪煜楠 宋岭 郭思琦 张惊宇*

【摘要】 神经系统疾病范围广、诊治难、预防及预后较差,因此对其预防、诊断与治疗的研究显得尤为重要。外泌体作为细胞自身分泌的一种脂质双分子层包裹形成的膜性小体,参与了机体免疫反应、炎症反应乃至肿瘤的发生与发展,且参与了临床中神经系统疾病如阿尔茨海默病、帕金森病、重症肌无力、多发性硬化乃至胶质瘤的发生与发展。本文对外泌体与神经系统疾病相关性的研究进展进行归纳总结并予以综述,以期对神经系统疾病的预防、诊断与治疗提供更新及更深入具体的理论参考。

【关键词】 外泌体; 神经系统疾病; 诊断; 治疗

Progress of research on exosomes in nervous system diseases

LI Huiling, ZHAO Linlin, WANG Yunan, SONG Ling, GUO Siqi, ZHANG Jingyu*

(Department of Neurology, the Fourth Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, China, 150001)

【ABSTRACT】 Diseases of the nervous system vary widely in scope and are difficult to diagnose and treat. Because prevention and prognosis of nervous system diseases remain poor, research into prevention, diagnosis and treatment is particularly important. Exosomes are membranous bodies formed by a lipid bilayer secreted by cells. They are involved in the immune response, inflammatory response, the occurrence and development of tumors, and in clinical neurological diseases, such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease, myasthenia gravis, multiple sclerosis and glioma. This review summarizes the progress of research into the correlation between exosomes and nervous system diseases in order to provide updates and more in-depth and specific theoretical references for the prevention, diagnosis and treatment of nervous system diseases.

【KEY WORDS】 Exosomes; Nervous system diseases; Diagnosis; Treatment

外泌体(exosomes)是指包含了复杂核糖核酸(Ribonucleic Acid, RNA)和蛋白质的小膜泡(30~150 nm),现特指直径在40~100 nm的盘状囊泡,电镜下呈双凹圆盘状或杯口状。活细胞能够由内吞途径使得原始胞内小泡等内吞物质转变为内吞小体,随后融合成早期胞内体。神经细胞、肿瘤细胞、心肌细胞等多种细胞均能分泌外泌体,而外泌体亦天然存在于体液之中。外泌体可携带多种信息分子,目前被视为特异性分泌的膜泡而参与细胞间通讯^[1]。在某些疾病的发生和发展过程中,外泌体中所含的内容物如miRNA、蛋白质等会发生

改变,提示外泌体可以作为潜在的生物标志物^[2]。有研究表明外泌体参与阿尔茨海默病、帕金森病等中枢神经系统疾病的发生发展,在神经系统疾病中起着至关重要的作用^[3]。本文对外泌体在神经系统疾病中的研究进展给予综述,为阿尔茨海默病、帕金森病等神经系统疾病的治疗寻找新的治疗靶点提供参考。

1 外泌体生物合成及其功能

Trams等^[4]在1981年首次将体外培养细胞过程中脱落并具有胞外酶活性的小泡描述为胞外囊

作者单位:哈尔滨医科大学附属第四医院神经内科,黑龙江,哈尔滨 150001

*通信作者:张惊宇, E-mail: zhangjingyux@163.com

泡。随后的研究者在此基础上不断深入认识,直到1987年将发现的纳米囊泡分离而命名为“exosomes”^[5]。外泌体是膜性囊泡,其脂质膜的磷脂双分子层方向与细胞质膜方向一致,是通过质膜的向外出芽脱落直接产生的微泡。外泌体的来源不同,亦包含着超1万种的不同蛋白,脂质双层膜的物质构成,能够有效维持内容物不被降解,尽管经历了长时间以及长距离的运输,仍旧能够维持其生物活性,并进一步维持外泌体的形态^[6-8]。此外,外泌体参与机体多个重要的生物过程,如肿瘤的扩散、免疫的调节、神经生长与修复过程等,而外泌体在神经组织的氧化应激过程中,被证实起到了神经保护的作用^[9],这亦肯定了外泌体在神经系统疾病中的作用。

2 外泌体在神经系统疾病诊断中的作用

外泌体除了能够反映来源细胞的内容物之外,亦能够对其生理病理状态产生映像。目前的研究表明,外泌体是一种普遍的细胞间通信系统,向中枢神经系统传递信息或从中枢神经系统传递信息的能力可能依赖于外泌体进入和穿过血脑屏障,并且外泌体和大脑的相互作用有特殊的意义,因此可作为神经系统疾病非侵袭性诊断工具而应用^[10]。

徐宏炎等^[11]研究表明,重症肌无力患者(眼肌型和全身型)的外泌体源性 miR-1224-5p 表达显著升高,全身型尤著,进一步实验表明 miR-1224-5p 的相对表达量与重症肌无力定量评分(quamitative myasthenia gravis score, QMGS)呈正相关,说明在眼肌型和全身型重症肌无力(myasthenia gravis, MG)患者中,miR-1224-5p 的表达影响着重症肌无力定量评分(quamitative myasthenia gravis score, QMGS),外泌体源性 miR-1224-5p 可能具有诊断重症肌无力的价值。Lugli 等^[12]则指出在阿尔茨海默病患者的血清中亦可提取到外泌体 miRNA,并筛选出 20 个具有显著差异的 miRNA,经过进一步研究指出 miR-342-3p 可能成为一个疾病诊断的独立标志物,这也证实了外泌体 miR-342-3p 在阿尔茨海默病诊断中的重要意义。李武等^[13]亦对外泌体及 miRNA 的诊断作用进行总结,并指出 miR-422a 和 miR-125b-2-3p 在脑卒中的诊断、miR-135a、miR-384 和 miR-193b 等在阿尔茨海默病的诊断,miR-1、miR-19b-3p、miR-153、miR-409-3p 和 miR-10a-5p 等在帕金森病等神经系统疾病中均可能成为有效的生物标志物。

综上所述,外泌体源性 miRNAs 在神经系统疾病的诊断中具有重要应用价值,可分别作为阿尔茨海默病、帕金森病、脑卒中及重症肌无力等神经系统疾病的生物标志物而更好地协助临床的诊断^[14]。

3 外泌体在神经系统疾病治疗中的作用

3.1 阿尔茨海默病的治疗

Lee 等^[15]研究表明,来源于脂肪干细胞的外泌体可抑制阿尔茨海默病小鼠神经干细胞中 A β 42 水平、A β 40 水平以及 A β 42/40 比值的表达,此外在其研究中还进一步证实外泌体能够干预阿尔茨海默病小鼠神经干细胞的凋亡,并有效修护脑中被 A β 损伤的神经突触,进而对神经功能起到调控作用,说明外泌体可通过干预细胞凋亡及神经突触的生长而干预阿尔茨海默病。Gui 等^[16]通过对淀粉样前体蛋白(amyloid precursor protein, APP)/PS1 大鼠模型实验中缺氧预处理的间充质干细胞来源的外泌体的研究指出,其可以有效降低促炎症因子 TNF- α 、IL-1 的表达,并提升抗炎因子 IL-4、IL-10 的表达,说明外泌体能够有效对抗炎症反应而改善大鼠神经认知功能,减轻阿尔茨海默病发展。Patrik 等^[17]研究表明,外泌体能够介导小胶质细胞产生的 tau 样蛋白的扩散,而通过下调外泌体能够有效降低致病 tau 样蛋白的扩散,从而为阿尔茨海默病提供了新的治疗靶点。

综上所述,外泌体可能可通过干预 A β 、tau 样蛋白及炎症因子等不同途径在阿尔茨海默病的治疗中发挥关键作用,降低阿尔茨海默病对患者带来的损伤,减缓病情的进展。

3.2 帕金森病的治疗

傅曼等^[18]将 75 例帕金森病患者作为研究对象,通过检测其血浆外泌体 miR-331-5p 表达水平以观察外泌体 miR-331-5p 在帕金森病患者中的诊断价值,结果表明帕金森病患者的血浆外泌体 miR-331-5p 表达水平明显高于健康者,此外 V 期帕金森病患者血浆外泌体 miR-331-5p 表达水平明显高于 I ~ IV 期患者,说明血浆外泌体 miR-331-5p 表达能够帮助诊断帕金森病,并评估其临床分型,为帕金森病患者的治疗提供了方向。谢振华^[19]亦通过研究指出,血浆外泌体中 α -syn 寡聚体/总 α -syn 及其磷酸化后比值水平的提升,或是帕金森病潜在的生物标志,对其有效干预亦在 α -突触核

蛋白相关性帕金森病中的发病过程起到至关重要的作用。Stuendl等^[20]在帕金森病患者的脑脊液中的外泌体进行研究,结果表明帕金森病患者脑脊液中的外泌体能够诱导靶细胞中可溶性 α -Syn的低聚化,从而导致帕金森病患者病情进一步加剧,说明对脑脊液源性的外泌体所诱导的 α -Syn的干预可有效调控帕金森病的发生与发展。

综上所述,通过对帕金森病患者外泌体 miR-331-5p 表达、 α -Syn 及 α -syn 寡聚体/总 α -syn 比值的干预,可能能够干预帕金森病的发病过程,并进一步调控帕金森病的发生与发展,为疾病的治疗提供新的靶点。

3.3 重症肌无力的治疗

尹炜凡^[21]选取能够抵抗肽段 T α 146-162 刺激的抗原特异性不成熟树突状细胞(dendritic cell, DC)来源的外泌体,并为应用于实验性自身免疫性重症肌无力的治疗做准备,结果可见其能够有效降低实验性自身免疫性重症肌无力的肌无力程度,并可有效改善病理性自身抗体水平,说明其对实验性自身免疫性重症肌无力有较理想的治疗作用。杜通等^[22]通过对他汀类药物诱导骨髓源性细胞(bone marrow derived cells, BMDCs)外泌体对实验性自身免疫性重症肌无力大鼠自然杀伤细胞和自然杀伤T(Natural killer T, NK T)细胞的影响的研究,得出结论可知他汀Dex可缓解实验性自身免疫性重症肌无力大鼠的临床症状,而这种作用与提升淋巴结单核细胞(mononuclear cell, MNC)中的自然杀伤(Natural killer, NK)细胞有关,说明外泌体能够有效干预重症肌无力。

综上所述,通过对机体内外泌体的干预,能够有效改善病理性自身抗体水平,提升淋巴结单核细胞中的自然杀伤细胞,进而改善自身免疫性重症肌无力程度,对重症肌无力起到较理想的治疗作用。

3.4 脑胶质瘤的治疗

脑胶质瘤为一种常见的侵袭性、原发性脑肿瘤,肿瘤分泌的外泌体被发现参与了胶质瘤微环境的调节、细胞间通讯乃至肿瘤耐药性等多个方面。Liu等^[23]通过研究指出外泌体作为 α -GalCer激活的一种细胞佐剂,其同iNKTs联合使用可协同破坏免疫耐受,诱导对多形性胶质母细胞瘤(glioblastoma multiforme, GBM)产生强抗原特异性细胞毒性T淋巴细胞(Cytotoxic T lymphocyte, CTL)反应,说明其能够协同iNKTs对胶质母细胞

瘤的相关免疫治疗起到较好的疗效。徐文华等^[24]指出,低级别胶质瘤组外泌体含量低于高级别胶质瘤组,说明外泌体含量与胶质瘤级别呈正相关性。Murgoci等^[25]则指出,由小胶质细胞衍生的外泌体介导的免疫反应最明显地参与了神经炎症、神经退行性疾病和脑癌的传播,并通过3D球状神经胶质瘤培养测试实验证实小胶质细胞来源的外泌体能够及时抑制肿瘤的侵袭活动,说明其对胶质瘤有较好的抑制作用。

综上所述,小胶质细胞来源的外泌体可破坏免疫耐受、抑制肿瘤的侵袭,并由此为临床中胶质瘤的治疗提供了新的治疗靶点和新的研究思路。

3.5 神经系统其他疾病的治疗

多发性硬化是发生在中枢神经系统的自身免疫性疾病,近期研究表明外泌体参与多发性硬化的多个生理病理过程,研究显示外泌体所含有的microRNA与多发性硬化的发生与发展密切相关,其能够增加髓鞘形成和氧化应激的耐受性,且在多发性硬化的发展中起到免疫调节的作用^[26-27]。Ella等^[28]的研究也表明,间充质干细胞来源的外泌体具有抗炎、调节免疫及清除A β 和oA β 的功能,并可有效改善突触功能重塑、阻止神经细胞死亡的功效。

4 总结与展望

外泌体的研究是一个新兴和快速发展的领域,得到越来越多的关注。外泌体作为一种纳米载体,通过将载体对准受体细胞发挥作用,外泌体的转移改变了宿主细胞的行为,这些纳米载体有望作为治疗神经系统疾病的诊断和治疗工具。外泌体在多种细胞中广泛存在,能够参与小胶质细胞的激活、炎症反应、细胞交流和信息传递等。目前关于神经系统免疫疾病与外泌体之间关联的研究仍相对较少,现有研究发现外泌体miRNA的相关因子在神经系统疾病中具有较好的诊断趋势,而对外泌体的有效干预亦可有效调控神经系统疾病,如帕金森病、阿尔茨海默病、重症肌无力、多发性硬化、胶质瘤等。在现有的研究中,外泌体自身在靶向性、免疫原性和携带生物活性分子等方面已存在着较显著的作用,使得其在神经系统疾病的实验研究及临床检测与治疗中发挥着极大的潜在作用,提示临床工作者可以从外泌体方向入手寻找新的诊断与治疗途径。

参考文献

- [1] Mathilde M, Lorena MJ Grégory L, et al. Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication[J]. *Nat Cell Biol*, 2019, 21(1):9-17.
- [2] Paula W, Mariusz S, Mariola M. Differential diagnosis of multiple sclerosis and other inflammatory CNS disease[J]. *Mult Scler Relat Disord*, 2020, 37:101452.
- [3] Liu W, Bai X, Zhang A, et al. Role of Exosomes in Central Nervous System Diseases[J]. *Front Mol Neurosci*, 2019, 12: 240.
- [4] Trams EG, Lauter CJ, Salem NJR, et al. Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1981, 645(1):63-70.
- [5] Johnstone RM, Adam M, Hammond J, et al. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes)[J]. *J Biol Chem*, 1987, 262(19):9412-20.
- [6] Manu PK, Jinyan D, Georgia L, et al. Analysis of Single-Cell RNA-Seq Identifies Cell-Cell Communication Associated with Tumor Characteristics[J]. *Cell Rep*, 2018, 25(6):1458-1468. e4.
- [7] Guillaume van N, Gisela DA, Graça R. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2018, 19(4):213-228.
- [8] Sato S, Weaver AM. Extracellular vesicles: important collaborators in cancer progression[J]. *Essays Biochem*, 2018, 62(2):149-163.
- [9] D Michiel Pegtel Stephen J Gould. Exosomes[J]. *Annu Rev Biochem*, 2019, 88:487-514.
- [10] Banks WA, Sharma P, Bullock KM, et al. Transport of Extracellular Vesicles across the Blood - Brain Barrier: Brain Pharmacokinetics and Effects of Inflammation[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(12):4407.
- [11] 徐宏炎,李梦夏,梁大业,等. 血浆外泌体源性 miR-1224-5p 在重症肌无力患者中的表达及诊断价值[J]. *中国神经免疫学和神经病学杂志*, 2019, 26(3):172-178.
- [12] Lugli G, Cohen AM, Bennett DA, et al. Plasma exosomal mirnas in persons with and without alzheimer disease: altered expression and prospects for biomarkers[J]. *PLoS One*, 2015, 10(10):e0139233.
- [13] 李武,牛晓晨,张萌,等. 外泌体及其 miRNA 在神经系统常见疾病诊断和治疗中的研究进展[J]. *生命科学研究*, 2020, 24(4):321-326.
- [14] Iranifar E, Seresht BM, Momeni F, et al. Exosomes and microRNAs: New potential therapeutic candidates in Alzheimer disease therapy[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(3):2296-2305.
- [15] Lee M, Ban JJ, Yang S, et al. The exosome of adipose-derived stem cells reduces β -amyloid pathology and apoptosis of neuronal cells derived from the transgenic mouse model of Alzheimer's disease[J]. *Brain Res*, 2018, 1691:87-93.
- [16] Cui GH, Wu J, Mou FF, et al. Exosomes derived from hypoxia - preconditioned mesenchymal stromal cells ameliorate cognitive decline by rescuing synaptic dysfunction and regulating inflammatory response in APP/PS1 mice[J]. *FASEB J*, 2018, 32(2):654-668.
- [17] Patrik B, Kuldip DD, Jeffrey HK. Therapeutic approaches to target alpha-synuclein pathology[J]. *Exp Neurol*, 2017, 298(Pt B):225-235.
- [18] 傅曼,许盼,王娟. 帕金森病患者血浆外泌体 miR-331-5p 表达水平及意义[J]. *中国煤炭工业医学杂志*, 2019, 22(4):337-341.
- [19] 谢振华. 帕金森病标志物磷酸化 α -突触核蛋白在血浆外泌体中的定量分析研究[D]. 郑州:郑州大学, 2019, 8:83.
- [20] Stuehl A, Kunadt M, Kruse N, et al. Induction of α -synuclein aggregate formation by CSF exosomes from patients with Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies[J]. *Brain*, 2016, 139(Pt 2):481-494.
- [21] 尹伟凡. 不成熟 DC 外泌体抗原特异性治疗实验性自身免疫性重症肌无力的实验研究[D]. 长沙:中南大学, 2013, 2:116.
- [22] 杜通,杨春林,李亨,等. 髓源树突细胞源性外泌体对实验性自身免疫性重症肌无力大鼠 NK 及 NK T 细胞的影响[J]. *中国神经免疫学和神经病学杂志*, 2018, 25(5):350-354, 362.
- [23] Liu H, Chen L, Liu J, et al. Co-delivery of tumor-derived exosomes with alpha - galactosylceramide on dendritic cell-based immunotherapy for glioblastoma[J]. *Cancer Lett*, 2017, 411:182-190.
- [24] Kae MP, Lisa W, Richard PK, et al. IFN γ -Stimulated Dendritic Cell Exosomes for Treatment of Migraine Modeled Using Spreading Depression[J]. *Front Neurosci*, 2019, 13:942.
- [25] Adriana-Natalia M, Dasa C, Petra M, et al. Brain-Cortex Microglia-Derived Exosomes: Nanoparticles for Glioma Therapy[J]. *Chemphyschem*, 2018, 19(10):1205-1214.
- [26] 徐文华,梁锐,万希晨,等. 外泌体含量与脑胶质瘤级别、预后的相关性研究[J]. *中国医学创新*, 2020, 17(30):53-56.
- [27] 李杰,庞炳昕,张静. 外泌体 microRNA 与多发性硬化相关研究进展[J]. *中华神经科杂志*, 2018, 51(10):846-848.
- [28] Elia CA, Losurdo M, Malosio ML, et al. Extracellular Vesicles from Mesenchymal Stem Cells Exert Pleiotropic Effects on Amyloid-beta, Inflammation, and Regeneration: A Spark of Hope for Alzheimer's Disease from Tiny Structures? [J]. *Bioessays*, 2019, 41(4):e1800199.

苏州国家高新技术产业开发区临床检验中心分子诊断实验室

苏州国家高新技术产业开发区临床检验中心分子医学实验室位于苏州市虎丘区华山路95号,距离“姑苏城外寒山寺,夜半钟声到客船”的寒山寺2公里。以苏州国家高新技术产业开发区临床检验中心为主体,是苏州市重点专科,于2021年11月25日通过国家认可委《医学实验室质量和能力认可准则》(CNAS-CL 02; ISO15189)现场评审。现有技术人员6名,其中高级职称2名、中级职称2名、初级职称2名,获硕士以上学历2名,全部人员均取得ISO15189内审员外部培训证书,实验室人员不但全部具有江苏省临床检验中心颁发的临床基因扩增实验室上岗证,还做为江苏省临床检验中心PCR上岗证技术操作培训点,带教上岗证培训人员操作技能。是江苏大学、蚌埠医学院、安徽医学高等专科学校等多所高等院校教学单位,实验室拥有荧光PCR仪15台(其中包括罗氏480、ABI7500,赛沛X-pert全自动PCR分析系统等),全自动核酸提取仪12台(其中包括罗氏MagNa pure 96全自动核酸提取仪、硕士全自动核酸提取工作站等),赛默飞超微量紫外分光光度计1台,DA8600二代高通量测序仪等设备。总值价值超过1000万元。

做为江苏省第一批新型冠状病毒核酸检测实验室,于今年完成了万管实验室建设,目前,实验室开展了40余个检验项目,不但包括感染类项目,还包括药物基因检测等精准医疗项目。高通量测序在医院科研攻关中发挥了很好的作用。科室较早引进了急诊分子医学检测方法,于2019年底就开展了24小时急诊甲流、乙流、呼吸道合胞病毒快速病原体核酸检测项目,30分钟即可出核酸检测结果,不但在临床呼吸道疾病诊治中,也在新冠疫情早期的临床鉴别诊断中发挥了很好的作用。近五年,实验室承担或参与课题9项(其中国家级课题1项,市级课题4项、省级横向课题4项);发表SCI、核心期刊等论文30余篇;参编专著4部;获国家级实用新型专利2项。

近五年,获得奖项7项(其中,包括教育部科学技术进步一等奖在内的国家级奖项2项,包括苏州市新技术引进一等奖在内的市级奖项3项)

学科带头人于农长期从事病原微生物的分子诊断研究,是中国中西医结合学会检验专业委员会委员,中国中西医结合学会分子诊断技术专业委员会副主任委员,中华医学会检验医学分会分子诊断专业学组委员,苏州医学会临床检验学分会委员,中国合格评定国家认可委员会评审专家



杂志简介：

《分子诊断与治疗杂志》于 2009 年 5 月创刊，是由中山大学主管，《中国家庭医生》杂志社有限公司主办，广州达安基因股份有限公司承办的面向国内外公开发行的分子医学权威性刊物，也是我国第一份以分子诊断与治疗学科为主要内容的分子医学专业学术期刊。本刊以传播分子医学理念、报道分子医学前沿、倡导分子医学创新、促进分子医学进步为办刊宗旨。主要刊登我国医学分子诊断和分子治疗相关领域中的基础理论研究、临床实践和技术方法的最新研究成果以及国内分子医学新技术、新理论和新进展等方面的文章。目前有编委及审稿专家 80 余人。在编委会和审稿专家及编辑部的共同努力下，于 2016 年被收录为“中国科技核心期刊”（中国科技论文统计源期刊）。

目前有“述评”、“论著”、“综述”、“前沿进展”、“专家笔谈”、“讲座”、“动态”和“专栏”等栏目。涵盖基因诊断、免疫诊断、核酸分子诊断、蛋白分子诊断、信号分子诊断、分子影像诊断、诊断仪器应用、基因治疗、核酸分子治疗、蛋白分子治疗等内容。

