



ISSN 1674-6929

CN 44-1656/R

邮发代号: 46-283

分子诊断与治疗杂志

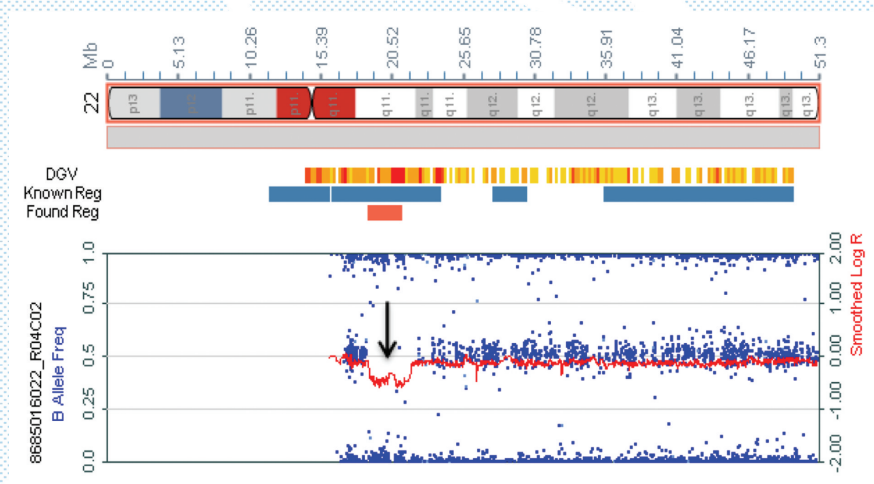
FENZI ZHENDUAN YU ZHILIAO ZAZHI

2021年3月 第13卷 第3期 总第79期

JOURNAL OF

MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Volume 13 Number 3 March 2021



注:箭头指向的区域表示22q11.2微缺失区域。

图(P420) 病例2诊断为22q11.2微缺失综合征的SNP-array结果

Figure(P420) SNP-array analysis results analysis diagram of case 2 diagnosed with 22q11.2 microdeletion syndrom

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

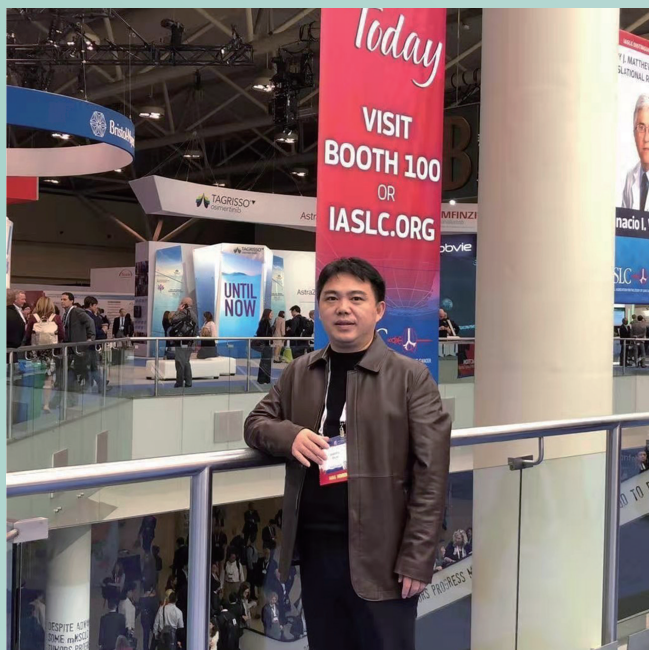
ISSN 1674-6929



9 771674 692211



赵建夫



赵建夫, 80 年出生, 主任医师, 临床肿瘤博士、硕士生导师, 肿瘤学及全科医学、规培生导师。现任暨南大学肿瘤诊疗研究中心执行主任, 暨南大学附属第一医院肿瘤学科常务副主任, 广东省医学教育协会肿瘤诊疗技术转化专委会主委。重组人源化抗 PD-1 单克隆抗体临床研究 PI、广东省抗体药物与免疫检测工程技术研究中心学术委员、广东省纳米化学创新药物工程技术研究中心特聘专家。欧盟营养学会成员; 国际肺癌研究联盟成员;

赵建夫博士在暨南大学附属第一医院从事肿瘤学医教研工作多年, 注重将临床工作与科研转化相结合。临床抗癌工作中率先开展生物免疫联合微创、分子靶向、微量元素(硒、双磷酸盐)放、化疗增敏增效等应用研究。所带团队目

前已积累了 3 000 多例临床案例, 其中以临床非化疗药物的组合用药方案, 治疗转移性晚期前列腺癌临床策略, 取得突破性的临床效果(授权发明专利: ZL 201710052841.0, 实现转化 150 万元)。开展基于肿瘤微环境、生物、免疫、增敏的化学药物设计与开发在中晚期宫颈癌、巨块型肝癌的治疗获得突破性的临床效果, 成果申请专利保护 3 项。

赵建夫博士自 2017 年起担任暨南大学广东省抗体药物与免疫检测工程技术研究中心学术委员(临床应用研究方向学术带头人), 广东省纳米化学创新药物工程技术研究中心特聘专家。参与开展肿瘤靶向药物的制剂改造与精准诊疗应用研究, 主持国家重大项目子课题 1 项, 大型横向科学技术研基金项目子课题 1 项, 省部级科研项目 3 项, 厅局级科研项目 3 项, 校、院级培育基金课题各 5 项, 承担横向课题 10 余项, 累计科研经费 500 余万元。参编论著《鼻咽癌放疗后神经损伤学》与中国科学院规划教材《动物细胞工程》各 1 部, 发表论文 40 余篇。其中近 3 年来发表 SCI 论文 10 余篇、TOP 期刊 SCI 论文 2 篇。指导规培生发表临床个案 5 篇。2018 年 CSCO 收录论文 1 篇。申请发明专利 3 项, 授权发明专利 1 项。实现专利技术 3 年使用权转化 150 万元。所在学科 2019 年获广东省最强科室推荐, 2019 年首进中国医院科技量值榜百强。团队成果分别获中国抗癌协会科技奖二等奖(2020 年暨南大学为独立完成单位)和教育部发明奖二等奖。2020 年赵建夫博士入选《岭南名医录》。

学术兼职: 广东省医师协会临床精准医学工作委员会常委; 广东省胸部疾病学会免疫治疗专业委员会委员; 广东省医院协会放射治疗科管理专业委员会常委; 广东省临床医学学会肿瘤学专委会常委; 广东省医学会肺部肿瘤学分会常务委员; 广东省医学教育协会肿瘤学专业委员会副主委; 广东省医学教育协会肺肿瘤中西医康复治疗专委会副主委; 广东省精准医学应用学会免疫治疗分会副主委; 广东省健康管理学会胸部肿瘤肺部结节专委会副主委。

分子诊断与治疗杂志

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

月刊 2021 年 3 月 第 13 卷 第 3 期 总第 79 期 Bimonthly Volume 13 Number 3 March 2021

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

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

地址 广州市天河区天河北路 179 号祥龙大厦 11 楼 (510620)
电话 (020) 32290789-206, 32290789-201
电子邮箱 jmdt@vip.163.com
刊号 ISSN 1674-6929
CN 44-1656/R
邮发代号 46-283
发行单位 广东省报刊发行局
发行范围 国内外公开发售
广告发布登记通知书 440100190057
印刷 天意有福科技股份有限公司
出版日期 2021 年 3 月 18 日
定价 RMB 15.00 元

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

Add 11 Fl., Xianglong Building, 179# Tian he bei Lu, Guangzhou, China 510620
Tel (020) 32290789-206, 32290789-201

E-mail jmdt@vip.163.com

CSSN ISSN 1674-6929
CN 44-1656/R

Printing TianYi Yofus Technology Co., Ltd.

Publish Date 2021.3.18

Price RMB 15.00



扫码订阅《分子诊断与治疗杂志》



中国科技核心期刊

(中国科技论文统计源期刊)

收录证书

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

分子诊断与治疗杂志

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

特颁发此证书。

中国科学技术信息研究所

Institute of Scientific and Technical Information of China

北京复兴路 15 号 100038

www.istic.ac.cn

2020年12月



分子诊断与治疗杂志

月刊 2021年3月 第13卷 第3期

目次

述评

疗效预测生物标志物在去势抵抗性前列腺癌中的研究进展 蓝丹 张倩瑜 张焱 等(341)

论著

肿瘤突变负荷位点检测准确性评价 孙楠 于婷 张文新 等(345)

2016-2020年吉林省流感病原学监测分析 李静 柳鸿敏 侯程程 等(348)

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

..... 杜伟鹏 汪海霞 卢芳(352)

mNGS技术在儿童重症肺炎病原学诊断中的价值 黄珮琪 陆小霞 陈和斌 等(356)

OPN基因多态性与潮汕人群女性SLE发病风险的相关性 陈新瑶 丁燕佳 梁雪雁 等(360)

miR-200a和YAP1在肺癌的不同表达及病理学意义 宰国真 李维山 何晓燕(364)

HBV病毒慢性感染者的ALDH2基因多态性研究 赵婧 岳鹏 邢国征 等(368)

BRAF^{V600E}突变对甲状腺乳头状癌HMGB1及MMP-9表达的影响

..... 张冲 古虎霞 刘定荣 等(372)

乳腺癌患者组织中FOXA1、BRCA-1表达与临床病理参数的相关性

..... 王增辉 李昊楠 李润华 等(376)

NLR、PLR在高血脂症性急性胰腺炎诊断及病情评估中的价值 刘畅 宋建梅 李晓阳(380)

妊娠期糖尿病患者孕晚期血清趋化素水平的意义 李宁 尹倩(384)

MSI、PD-L1在NSCLC患者中的表达及其与预后的相关性 张文静 章春芝 王贵刚 等(388)

脑脊液CK、Aβ42、P-tau在阿尔茨海默病中的诊断价值 李丹 徐进 范晓飞 等(392)

外周血miR-210表达及血清VEGF含量与脑梗死再发的相关性 李颖颖 高岚 王洪新(396)

HBeAg阴性慢性乙型肝炎患者HBV MHR外变异临床意义 顾超 章晓鹰 孙学华 等(400)

钙蛋白酶-1表达水平与结直肠癌患者病理特征及疾病进展风险的相关性

..... 徐金平 苏玲 史盼成 等(404)

miR-204-3p靶向CYP2E1介导脂多糖诱导的肾小管上皮细胞损伤 朱志伟 郑培明 王荣(408)

测定血液病患者血浆Venetoclax浓度的HPLC-MS/MS方法 王磊 代玉超 李梦 等(413)

染色体22q11.2微缺失检测在先心病产前诊断中的应用 许育双 刘思平 宋兰林 等(418)

老年住院患者FIB、APTT水平变化与下肢和DVT的关系 边春红 郭胜香 何逸林 等(422)

肺部细菌感染与病毒感染IL-33/ST2信号通路活性变化及其鉴别诊断价值

..... 胡金亮 王振 吴瑞红(426)

一例 HIV 窗口期样本三种试管核酸检测结果分析	帅敏 薛薇 黄超 等(430)
铜仁市育龄妇女耳聋基因突变检测结果分析	龙丽 田松娅 雷星 等(433)
吸烟介导的 COPD 呼吸道微生态失调对 Treg/Th17 失衡的影响	王辉 叶彩虹 马焕丽 等(437)
血清 SAA、sTREM-1、PCT 联合检测在新生儿宫内感染性肺炎中的价值	胡冰 周栩平 时英才 等(441)
TPP、FM、CRP/HDL-C 与 LVEF 关系及预测桥内血栓形成价值	程军涛 李芳 高源(445)
基于可视化基因芯片技术指导幽门螺杆菌个体化治疗的临床研究	杨莉丽 邹傲 吴慧华 等(449)
血清 GDF-15、sST2 与慢性心力衰竭患者心功能的相关性分析及对预后的评估	段洪强 闫鹏 祁娜(453)
¹⁸ F-FDG PETCT 联合血清 SCC-Ag 对宫颈鳞癌腹膜后淋巴结转移的诊断价值	韩超 王朝栋 赵宝琼 等(457)
NSE、TTF-1 及 Ki-67 与小细胞肺癌患者预后、化疗反应的关系	王仪胜 张章 秦岭 等(461)
TSGF、GGT 联合、VEGF 检测对原发性肝癌 TACE 疗效的预测价值	周永祥 首峰 张景俊 等(466)
Hcy、NSE 及 IL-8 水平变化与脑卒中患者神经功能恢复的关系研究	彭远艳 邱呈兵 周敏 等(470)
胸腔镜手术对非小细胞肺癌患者 SAA、IL-2R 及 T 淋巴细胞的影响	梁建伟 孙滕 张昊(474)
胃癌患者 CyPj、ERp29 及 CSN5 的表达其与预后生存的关系研究	杨敬端 何明 吴品(478)
不同剂量美托洛尔对心力衰竭患者 NT-proBNP、GDF-15 及 Cys-C 的影响	朱洪新 王涛 王皓 等(483)
糖尿病酮症酸中毒患者 PCT、CRP、乳酸水平与感染关系	康孟杰 王薇 韩朝霞 等(487)
ICAM-1、HSP70 及 PAF 水平变化与脊髓损伤患者病情及预后的关系	谢海洋 王治 蒋成 等(491)
sdLDL-C、IMA 及 UACR 与急性缺血性脑卒中病情及预后的关系	李崇祯(495)
GDF-15、HDL-C 及 cTnI 检测联合 CRUSADE 评分在 NSTEMI-ACS 预后评估中的应用	柴博兰 刘晶晶 王晓伟 等(500)

综 述

甲状腺癌靶向治疗进展	李浩 聂荣成 张詮(504)
------------------	----------------

专家风采

赵建夫	(封二)
-----------	------

实验室巡礼

暨南大学肿瘤诊疗研究中心	(封三)
--------------------	------

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Monthly Volume 13 Number 3 March 2021

CONTENTS

COMMENTS

- Efficacy prediction biomarkers in castration-resistant prostate cancer
LAN Dan, ZHANG Qianyu, ZHANG Yan, HE Zirui, CHEN Wenhui, ZHAO Jianfu (341)

ORIGINAL ARTICLES

- Evaluation of the accuracy of tumor mutation burden site detection
SUN Nan, YU Ting, ZHANG Wenxin, JIA Zheng, HUANG Jie, QU Shoufang (345)
- Analysis on the Etiology of Influenza in Jilin Province from 2016 to 2020
LI Jing, LIU Hongmin, HOU Chengcheng, WU Donglin, YANG Xianda (348)
- Expression of AQP-4, VCAM-1 and NPY in the cerebrospinal fluid of children with severe hand-foot-mouth disease and their diagnostic value for complicated encephalitis
DU Weipeng, WANG Haixia, LU Fang (352)
- The value of mNGS technology in the etiological diagnosis of severe pneumonia in children
HUANG Peiqi, LU Xiaoxia, CHEN Hebin, DU Hui, LI Ying, CHEN Hongwei (356)
- Association between osteopontin genetic polymorphism and the risk of systemic lupus erythematosus in Chaoshan women
CHEN Xinyao, DING Yanjia, LIANG Xueyan, HUANG Huiying, WEI Huagui, WANG Junli, LIN Min (360)
- Differentiate expression and pathological significance of miR-200a and YAP1 in lung cancer
ZAI Guozhen, LI Weishan, HE Xiaoyan (364)
- Study on ALDH2 Gene Polymorphism in Patients with Chronic HBV Virus Infection
ZHAO Jing, YUE Peng, XING Guozheng, YIN Xianyan, YU Hongyuan (368)
- Effect of *BRAF*^{V600E} mutation on the expression of HMGB1 and MMP-9 in papillary thyroid carcinoma
ZHANG Chong, GU Huxia, LIU Dingrong, WEI Huijie, ZHOU Dan, FANG Jing, YANG Yan, DAI Xiaolu (372)
- Correlation between the expression of FOXA1 and BRCA-1 in tissues and clinicopathological parameters in breast cancer patients
WANG Zenghui, LI Haonan, LI Runhua, FENG Shuo (376)
- The value of NLR and PLR in diagnosis and evaluation of hyperlipidemia acute pancreatitis
LIU Chang, SONG Jianmei, LI Xiaoyang (380)
- Significance of serum chemokine levels in patients with gestational diabetes mellitus in late pregnancy
LI Ning, YIN Qian (384)
- Expression of MSI and PD-L1 in NSCLC patients and their correlation with prognosis
ZHANG Wenjing, ZHANG Chunzhi, WANG Guigang, RONG Yu, HAN Yuanyuan, CHEN Lijun (388)
- Diagnostic value of cerebrospinal fluid CK, A β 42, P-tau in Alzheimer's disease
LI Dan, XU Jin, FAN Xiaofei, ZHANG Huailiang (392)
- Correlation between the expression of miR-210 in peripheral blood, the content of VEGF in serum and recurrence of cerebral infarction
LI Yingying, GAO Lan, WANG Hongxin (396)
- Clinical relevance of outside the MHR mutations in HBeAg-negative chronic hepatitis B patients
GU Chao, ZHANG Xiaoying, SUN Xuehua, ZHANG Jue, GAO Yueqiu (400)
- Correlation between the expression level of calpain-1 and the pathological characteristics and the risk of disease progression in patients with colorectal cancer
XU Jinping, SU Ling, SHI Pancheng, HUI Yi, CHANG Jian (404)
- miR-204-3p targets CYP2E1 to mediate lipopolysaccharide-induced renal tubular epithelial cell damage
ZHU Zhiwei, ZHENG Peiming, WANG Rong (408)

HPLC-MS/MS method for the determination of plasma Venetoclax concentration in patients with hematological diseases

WANG Lei, DAI Yuchao, LI Meng, LIU Hongxing (413)

Prenatal Diagnosis for 22q11.2 Deletion Syndrome in Congenital Heart Diseases

XU Yushuang, LIU Siping, SONG Langlin, WU Rui Feng, QIU Yurong, JIA Bei (418)

Relationship between the changes of FIB and APTT levels in elderly hospitalized patients and DVT of lower limbs

BIAN Chunhong, GUO Shengxiang, HE Yilin, YU Jian, ZHOU Bo, WANG Rongqi (422)

Changes of IL-33/ST2 signal pathway activity in pulmonary bacterial infection and virus infection and its differential diagnosis value

HU Jinliang, WANG Zhen, WU Ruihong (426)

Analysis of NAT results of one HIV window period sample by three processing modes

SHUAI Min, XUE Wei, HUANG Chao, ZOU Chen, TIAN Zhi (430)

Detection of deafness gene mutation in childbearing age women in Tongren City

LONG Li, TIAN Songya, LEI Xing, LUO Xia (433)

The effect of smoking-mediated respiratory microecological disorder on Treg/Th17 imbalance in COPD

WANG Hui, YE Caihong, MA Huanli, SUN Junsheng, CHEN Siliang, ZHANG Shaobin (437)

Value of combined detection of serum SAA, sTREM-1 and PCT in neonatal intrauterine infectious pneumonia

HU Bing, ZHOU Xuping, SHI Yingcai, WANG Xiang (441)

Relationship between TPP, FM, CRP/HDL-C and LVEF after coronary artery bypass grafting and its value in predicting intra-bridge thrombosis

CHENG Juntao, LI Fang, GAO Yuan (445)

Clinical research on the guidance of individualized treatment of Helicobacter pylori based on visual gene chip technology

YANG Lili, ZOU Ao, WU Huihua, GUO Hai, ZHANG Fangting, ZOU Bing, WANG Junping (449)

Correlation between serum GDF-15, sST2 and cardiac function in patients with chronic heart failure and evaluation of prognosis

DUAN Hongqiang, YAN Peng, QI Na (453)

Diagnostic value of 18F-FDG PETCT combined with serum SCC-Ag for retroperitoneal lymph node metastasis of cervical squamous cell carcinoma

HAN Chao, WANG Chaodong, ZHAO Baoqiong, KANG Wenwen, CHAI Lijuan, HE Fei (457)

Relationship between NSE, TTF-1, Ki-67 and the prognosis and chemotherapy response in patients with small cell lung cancer

WANG Yisheng, ZHANG Zhang, QIN Ling, SUN Lingling (461)

Predictive value of TSGF and GGT combined with VEGF detection in the efficacy of transcatheter arterial chemoembolization in patients with primary hepatocellular carcinoma

ZHOU Yongxiang, SHOU Feng, ZHANG Jingjun, YE Shifu (466)

Relationship between the changes of Hcy, NSE and IL-8 levels and the recovery of neurological function in stroke patients

PENG Yuanyan, QIU Chengbing, ZHOU Min, YANG Hongye, XIANG Xueli (470)

The effect of thoracoscopic surgery on SAA, IL-2R and T lymphocytes in patients with non-small cell lung cancer

LIANG Jianwei, SUN Teng, ZHANG Hao (474)

Study on the relationship between the expressions of CyPJ, ERp29 and CSN5 in patients with gastric cancer and prognostic survival

YANG Jingduan, HE Ming, WU Pin (478)

Effects of different doses of metoprolol on NT-proBNP, GDF-15 and Cys-C in patients with heart failure

ZHU Hongxin, WANG Tao, WANG Hao, HUO Jianfeng (483)

Study on relationship between PCT, CRP, lactic acid levels and infection in patients with diabetic ketoacidosis

KANG Mengjie, WANG Wei, HAN Zhaoxia, LIU Xiaoman (487)

Relationship between the changes of ICAM-1, HSP70 and PAF levels and the condition and prognosis of patients with spinal cord injury

XIE Haiyang, WANG Ye, JIANG Cheng, ZHANG Yingbo (491)

The relationship between sdLDL-C, IMA and UACR and the disease severity and prognosis of acute ischemic stroke

LI Chongyi (495)

The application of GDF-15, HDL-C and cTnl detection combined with CRUSADE score in the prognosis assessment of NSTEMI-ACS

CHAI Bolan, LIU Jingjing, WANG Xiaowei, WANG Lixian (500)

REVIEWS

Commentary on the progress of targeted therapy for thyroid cancer

LI Hao, NIE Rongcheng, ZHANG Quan (504)

· 述 评 ·

疗效预测生物标志物在去势抵抗性前列腺癌中的研究进展

蓝丹¹ 张倩瑜¹ 张焱¹ 何子蕊¹ 陈文慧¹ 赵建夫^{1,2*}

[摘要] 免疫检查点抑制剂(ICIs)疗法在治疗多种晚期实体瘤中取得了革命性的突破,其中包括了去势抵抗性前列腺癌(CRPC)。在过去几年中,已有多种 ICIs 应用于 CRPC,并证明可改善患者的总生存期(OS),但是由于适用人群受限以及毒副作用大,大部分药物的临床获益很少是持久的。目前可预测 ICIs 在 CRPC 疗效的生物标志物仍欠缺可靠性和临床实用性,因此寻找相关生物标志物对指导治疗至关重要。本文主要就疗效预测生物标志物在去势抵抗性前列腺癌中的研究进展进行综述。

[关键词] 免疫检查点抑制剂; 去势抵抗性前列腺癌; 生物标志物

Efficacy prediction biomarkers in castration-resistant prostate cancer

LAN Dan¹, ZHANG Qianyu¹, ZHANG Yan¹, HE Zirui¹, CHEN Wenhui¹, ZHAO Jianfu^{1,2*}

(1. Department of Oncology of the First Affiliated Hospital, Jinan University, Guangzhou, Guangdong, China, 510632; 2. Cancer Diagnosis and Therapy Research Center, Jinan University, Guangzhou, Guangdong, China, 510632)

[ABSTRACT] Immune checkpoint inhibitors (ICIs) therapy has made a revolutionary breakthrough in the treatment of a variety of advanced solid tumors, including castration-resistant prostate cancer (CRPC). In the past few years, a variety of ICIs have been applied to CRPC and proved to improve the overall survival (OS) of patients. Due to the limitation of the applicable population and the serious side effects, the clinical benefits of most drugs are rarely long-lasting. The current biomarkers that can predict the efficacy of ICIs in CRPC are still lacking in reliability and clinical applicability. Therefore, finding relevant biomarkers is essential to guide treatment. This review summarizes the progress of biomarkers related to efficacy prediction in castration-resistant prostate cancer.

[KEY WORDS] Immune checkpoint inhibitors; Castration-resistant prostate cancer; Biomarkers

在欧美发达国家中,前列腺癌(prostate cancer, PC)是导致男性死亡的主要恶性肿瘤之一,其发病率仅次于肺癌^[1]。在中国,PC的发病率和死亡率也在随着年龄的增长而上升^[2]。去势抵抗性前列腺癌(castration-resistant prostate cancer, CRPC)是经过雄激素剥夺治疗疾病仍然进展的PC,其临床疗效及预后较差,不仅是PC患者最常

见的死因,也是目前PC临床治疗中最为棘手的问题之一^[3]。随着免疫时代的到来,越来越多的免疫检查点抑制剂(immune checkpoint Inhibitors, ICIs)应用于临床,但适用人群受限,只有部分CRPC患者因此受益,所以建立可预测疗效的生物标志物对ICIs的评估与决策使用方案至关重要^[4]。本文主要就疗效预测生物标志物在CRPC中的研究进

基金项目:国家自然科学基金面上项目(82072993);广东省科技计划项目(2017Z00005);广东省中医药局科研项目(20182020);中央高校基本科研项目(21620402);广东省普通高校特色创新项目(2020KTSCX010)

作者单位:1. 暨南大学附属第一医院肿瘤科,广东,广州 510632

2. 暨南大学肿瘤诊疗研究中心,广东,广州 510632

*通信作者:赵建夫, E-mail: zhaojianfu@jnu.edu.cn

展展开综述。

1 免疫检查点分子及其抑制剂

肿瘤组织可过度表达免疫检查点 (immune checkpoint, ICPs) 分子, 抑制 T 细胞活化增殖或诱导 T 细胞凋亡, 导致免疫抑制性肿瘤微环境 (tumor microenvironment, TME) 形成, 使肿瘤细胞逃避机体的免疫监控和杀伤^[5]。目前细胞毒性 T 淋巴细胞相关蛋白 4 (cytotoxic T lymphocyte associated protein 4, CTLA-4), 程序性死亡蛋白 1 (programmed death protein 1, PD-1) 及其配体 (programmed death protein 1 ligand, PD-L1) 是最具代表性的 ICPs^[6]。ICIs 主要包括 CTLA-4 抑制剂与 PD-L1 抑制剂, 它通过结合 ICPs 导致肿瘤细胞免疫系统失衡, 激活 T 细胞, 从而达到抗肿瘤的效果。

2 ICI 的疗效预测生物标志物

2.1 PD-L1 表达

肿瘤细胞上的 PD-L1 过度表达可使它们脱离宿主的免疫监控, 从而导致不同类型肿瘤预后不良^[7]。Haffner 等人^[8]的研究发现 PD-L1 表达在原发性 PC 中很少见, 但在转移性去势抵抗性前列腺癌 (metastatic castration-resistant prostate cancer, mCRPC) 中观察到 PD-L1 阳性率增加, 根据这一结果推测出 PD-L1 在肿瘤细胞上的表达是预测 PC 抗 PD-1/PD-L1 治疗反应的有价值的预后生物标志物。在 KEYNOTE-028 Ib 期试验中, 共纳入 23 名 mCRPC 且 PD-L1 阳性患者接受 pembrolizumab 治疗, 结果显示总体缓解率 (objective response rate, ORR) 为 17%, 病情稳定 (stable disease, SD) 患者占 35%, 没有治疗相关的停药或死亡, 有 3 个 3 级和 1 个 4 级治疗相关的不良事件 (treatment-related adverse events, TRAEs), 可见 PD-L1 阳性 mCRPC 患者接受 pembrolizumab 治疗具有安全性且有一定的抗肿瘤效果^[9]。但是, 关于利用 PD-L1 表达来预测 ICI 的疗效尚存在争议。IMbassador250 是一项临床 III 期试验, 探讨了 atezolizumab 与 enzalutamide 联合应用对 PD-L1 的抑制作用, 这项试验包括 759 名 mCRPC 的患者, 在观察 PD-L1 表达的亚组分析中, PD-L1<1%、PD-L1≥1% 或 PD-L1≥5% 的患者在总生存期 (overall survival, OS) 上并没有显著差异^[10]。同样在 KEYNOTE-199 II 期研究中也提出, pembrolizumab 在 mCRPC 的 PD-L1 阳性和

PD-L1 阴性队列中显示出相同的效果^[11]。另有证据也同样支持该 ICPs 可能不是有效的预后生物标志物: 首先, 没有统一表达的阳性阈值和用于 PD-L1 测量的标准技术; 其次, PD-L1 的肿瘤表达受多种机制调控, 包括遗传和表观遗传学的改变、转录和修饰^[12,5]; 再者, PD-L1 表达的位置 (肿瘤细胞与浸润的免疫细胞) 对免疫反应也有不同的影响, 并且肿瘤中的基因突变, 不同水平的 PD-L1 表达, TME 的组成及其动态相互作用都可能影响 PD-1/PD-L1 靶向治疗的效果^[13-14]。尽管如此, 仍不可否认的是 PD-L1 表达在抗 PD-1/PD-L1 mAb 疗效预测方面具有一定价值, 尚且需要进一步加强基础和临床研究来证实。

2.2 循环肿瘤细胞 (circulating tumor cell, CTC)

美国食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 目前已经批准使用 CTC 评估来作为转移性乳腺癌、PC 和结肠直肠癌患者的预后指标^[15]。在一项探讨 CTC 预测 mCRPC 治疗生存获益的实验中, 共有 231 名可评估患者, 五组患者在开始治疗后 2 至 5 周、6 至 8 周、9 至 12 周和 13 至 20 周分别进行了 CTC 的评估。治疗后 2~5 周, CTC 良好 (CTC 计数<5/7.5 mL 血液) 患者的中位生存期 (median overall survival, MOS) 为 20.7 个月 (95% CI, 20.5 个月~未达到中位生存期), 而不良 (CTC 计数>5/7.5 mL 血液) 组为 9.5 个月 (95% CI, 5.8~10.7 个月)。在治疗开始后 6 至 8 周、9 至 12 周和 13 至 20 周, CTC 良好和不良的患者的 MOS 差异与 2 至 5 周的 OS 差异相似。在所有时间点, CTC 都比前列腺特异性抗原 (prostate-specific antigen, PSA) 递减算法更好地计算了预测的 OS。可见, 相对于 PSA, CTC 是 CRPC 中 OS 较准确且独立的预测指标^[16]。同样, 在 2016 ASCO 会议上, Boffa 等人^[17]表明使用 PD-L1 阳性 CTCs 可评估转移性癌症的预后。尽管 CTC 具有可预测的潜力, 但 CTC 的表征仍然受限, 因为它们的发生率极低且生命力短^[18]。因此, 关于 CTC 作为预测标志物的研究仍有待完善。

2.3 吲哚胺 2, 3 双加氧酶 (indoleamine 2, 3 dioxygenase, IDO)

IDO 可通过降解局部组织中的色氨酸而调节机体抗肿瘤免疫, 还可以促进 TME 中的血管生成。首次进行 PC 诊断的细针穿刺活检的男性尿液沉积物中获得的数据表明, IDO 基因表达水平升高的患者极有可能携带临床相关形式的 PC, 并且在前列腺切除术后复发的可能性更高^[19]。尽管

筛选的受试者数量有限,但该试验性研究的优势还是 IDO 基因表达的高敏感性。实验结果发现 PC 阳性的受试者均未显示 IDO 基因表达水平低于最佳临界水平 0.001 5,按照受试者工作曲线(ROC)的定义将患者分为 PC 阳性(局部 PC)和 PC 阴性(正常组织)(阳性预测值 100%,无假阴性)^[19]。分析相关数据后发现,IDO 的高表达与 PC 进展以及对 ICI 靶向疗法的不良临床预后有关,且在针对 ICIs 疗法中具有免疫抑制作用,对预测 PC 患者的无复发生存期(Relapse-Free Survival, RFS)具有重要意义。此外,癌症患者血清中 IDO 活性与犬尿酸/色氨酸之比之间存在相关性,这一发现表明,可以考虑使用犬尿酸和/或色氨酸的血浆水平来评估 IDO 活性,而无需分析癌症患者的肿瘤样本^[6, 19]。

2.4 DNA 损伤修复(DNA Damage Repair, DDR)

DDR 基因(BRCA1, BRCA2, CDK12, ATM)是人体 DNA 损伤修复机制中的重要参与者。现已有报道称 AR-V7 阳性患者的亚组与 DDR 基因突变相关^[20]。在一项 ipilimumab 联合 nivolumab 用于 AR-V7 阳性 mCRPC II 期生物标志物驱动研究中,将 15 例具有 ARV7+CTC 的 mCRPC pts 纳入单臂 2 期研究中,其中有 6/15 受试者具有致病性 DNA 修复基因突变(BRCA2, ATM, MSH6, FANCM, FANCA, POLH),这 6 位受试者则标记为 AR-V7 阳性,DDR 突变阳性。结果显示与 AR-V7 阳性、DDR 阴性的受试者相比,这些具有致病性 DNA 修复基因突变的患者在无进展生存期(progression-free survival, PFS)方面具有统计学上的显著益处(缺乏 ≥ 24 周的进展)^[21]。该项研究表示,具有同源重组缺陷(homologous recombination defect, HRD)突变的 mCRPC 可以从免疫治疗中受益。

CDK12 中的突变可导致 DNA 累积损伤及免疫原性新抗原的形成。先前有研究表示,大约 7% 的 mCRPC 存在双等位基因 CDK12 突变^[22]。2018 年的一项研究评估了 360 名晚期 PC 的男性患者的肿瘤 DNA,分析出新发现的与缺失 CDK12 基因拷贝相关的遗传变化模式与先前确定的其他 PC 遗传亚型都不同,让这部分患者成为完全独立的疾病亚型。其中,在 11 名 CDK12 基因突变患者中,共有 4 名 mCRPC 患者接受了 ICIs 治疗,有 2 名患者 PSA 明显,除了具有错配修复缺陷的患者外,ICIs 疗法通常在 PC 中并不有效。这些早期的临

床结果支持以下假说:携带双等位基因 CDK12 的 mCRPC 患者丢失可能比未选择的转移性 PC 人群对免疫疗法有更高的反应可能性^[23]。综上所述,CDK12 突变体代表特定类别的 PC,具有不同的转录表型。同时鉴定出 CDK12 基因缺失可能是晚期 PC 患者对靶向免疫检查点疗法有反应的生物标志物,但是需要进行更大规模的临床研究验证。

2.5 错配修复缺陷(deficient mismatch repair, dMMR)和高度微卫星不稳定性(microsatellite instability-high, MSI-H)

早在 2017 年, FDA 已对抗 PD-1 药物 pembrolizumab 进行了批准,以治疗不可切除或转移性 MSI-H/dMMR 恶性肿瘤(不限制肿瘤类型),多项临床研究也表明 MSI-H/dMMR 实体瘤可从免疫治疗中显著获益^[24]。在一项前瞻性分析实验中,有 11 例 MSI-H/dMMR mCRPC 患者接受抗 PD-1/PD-L1 治疗,其中 54.5% 患者的 PSA 水平下降幅度大于 50%,其中 4 个下降幅度超过 99%^[25]。近期一项临床试验更是支持了这个观点,在 KEYNOTE-164 试验中,总共 124 例转移性 MSI-H/dMMR mCRPC 患者被分配到 A 组(基于接受 ≥ 1 的先前治疗)或 B 组(≥ 2 的先前治疗)并接受 Keytrude 长达 35 个周期或直到病情进展,主要终点是 ORR。在中位随访时间为 31.3 个月(A 组)和 24.2 个月(B 组)时,两组的 ORR 均为 33%。A 组 MOS 为 31.4 个月, B 组未达到 MOS(2 年 OS 为 63%),而具有 3~4 级 TRAE 的风险相似(分别为 16% 和 13%)^[26]。

2.6 肿瘤突变负荷(tumor mutation burden, TMB)

TMB 可反映肿瘤细胞所携带的突变种数,而这些突变中有些会转录表达多肽抗原表位或肿瘤新抗原,这样不仅可以帮助免疫系统识别肿瘤,还可以刺激 T 细胞增殖和激发抗肿瘤活性。一项实验在受益于 ICIs 的患者中,观察到了与效应 T 细胞反应关联的免疫学相关性,30 名 mCRPC 患者接受 ipilimumab 治疗后,有利队列中的患者具有高的肿瘤内 CD8 T 细胞密度和 IFN- γ 应答基因标记或抗原特异性 T 细胞应答,两名 TMB 相对较低的患者对独特的新抗原具有 T 细胞反应。研究人员从而将肿瘤内高浓度 CD8 T 细胞、IFN- γ 应答基因标记、抗原特异性 T 细胞应答列为可预测 ipilimumab 良好反应的生物标志物,同时证明了即使具有低肿瘤突变负荷的 mCRPC,也可表达能诱发与 ipili-

mumab 较优疗效相关的新型抗原^[27]。TMB 的评估虽然在预测 ICIs 上发挥重要作用,但目前还是存在诸多挑战,一方面 TMB 阈值尚未统一,另一方面 TMB 测定方法还欠缺规范。

3 小结与展望

虽然多项研究表明,存在可预测针对去势抵抗性前列腺癌疗效的生物标志物,但仍欠缺可靠性和临床实用性。因此,需要进一步加强基础和临床研究,以提高去势抵抗性前列腺癌的治疗效果,并找到能够精准评估疗效预测的免疫生物标志物。

参考文献

- [1] 刘欣,陈昊.前列腺癌患者的生存质量现状及影响因素[J].中国卫生工程学,2020,19(3):389-391.
- [2] 李志标.基于大数据的前列腺癌生物信息学分析[J].中山大学学报(医学版),2019,40(6):857-865.
- [3] 凌乐,刘博,刘继红,转移性去势抵抗性前列腺癌免疫治疗的研究现状与展望[J].中华实验外科杂志,2020,37(12):2185-2188.
- [4] 唐辉.肿瘤免疫检查点抑制剂致免疫相关不良反应的预测标志物[J].中国医学科学院学报,2020,42(6):825-830.
- [5] Toor SM, Nair VS, Decock J, et al. Immune checkpoints in the tumor microenvironment[J]. Semin Cancer Biol, 2020, 65:1-12.
- [6] Jafari S, Molavi O, Kahroba H, et al. Clinical application of immune checkpoints in targeted immunotherapy of prostate cancer[J]. Cell Mol Life Sci, 2020, 77(19):3693-3710.
- [7] Gevensleben H, Dietrich D, Golletz C, et al. The immune checkpoint regulator PD-L1 is highly expressed in aggressive primary prostate cancer[J]. Clin Cancer Res, 2016, 22(8):1969-1977.
- [8] Haffner MC, Guner G, Taheri D, et al. Comprehensive evaluation of programmed death-ligand 1 expression in primary and metastatic prostate cancer[J]. Am J Pathol, 2018, 188(6):1478-1485.
- [9] Hansen AR, Massard C, Ott PA, et al. Pembrolizumab for advanced prostate adenocarcinoma: findings of the KEYNOTE-028 study[J]. Ann Oncol, 2018, 29(8):1807-1813.
- [10] Sommer SG, Powles T, Drake C, et al. IMbassador250: A phase III trial in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer (mCRPC) comparing atezolizumab plus enzalutamide vs enzalutamide alone[J]. Eur Urol Suppl, 2018, 17(2):e1155.
- [11] De Bono JS, Goh JC, Ojamaa K, et al. KEYNOTE-199: Pembrolizumab (pembro) for docetaxel-refractory metastatic castration-resistant prostate cancer (mCRPC)[J]. J Clin Oncol, 2018, 36(15):5007.
- [12] Gibney GT, Weiner LM, Atkins MB. Predictive biomarkers for checkpoint inhibitor-based immunotherapy[J]. Lancet Oncol, 2016, 17(12):e542-e551.
- [13] Fujii T, Naing A, Rolfo C, et al. Biomarkers of response to immune checkpoint blockade in cancer treatment[J]. Crit. Rev Oncol Hematol, 2018, 130:108-120.
- [14] Song Y, Li Z, Xue W, et al. Predictive biomarkers for PD-1 and PD-L1 immune checkpoint blockade therapy[J]. Immunotherapy, 2019, 11(6):515-529.
- [15] Bidard FC, Hajage D, Bachelot T, et al. Assessment of circulating tumor cells and serum markers for progression-free survival prediction in metastatic breast cancer: a prospective observational study[J]. Breast Cancer Res, 2012, 14(1):1-10.
- [16] De Bono JS, Scher HI, Montgomery RB, et al. Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer[J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(19):6302-6309.
- [17] Yue C, Hu Z. Circulating Tumor Cells (CTCs) as Biomarker for PD-1/PD-L1 Blockade Immunotherapy[J]. J Cancer Sci Therapy, 2017, 9(8):1-12.
- [18] Pantel K, Speicher MR. The biology of circulating tumor cells[J]. Oncogene, 2016, 35(10):1216-1224.
- [19] Banzola I, Mengus C, Wyler S, et al. Expression of Indoleamine 2,3-Dioxygenase Induced by IFN- γ and TNF- α as Potential Biomarker of Prostate Cancer Progression[J]. Front Immunol, 2018, 9:1051.
- [20] Ciccarese C, Santoni M, Brunelli M, et al. AR-V7 and prostate cancer: The watershed for treatment selection?[J]. Cancer Treat Rev, 2016, 43:27-35.
- [21] Boudadi K, Suzman DL, Lubner B, et al. Phase 2 biomarker-driven study of ipilimumab plus nivolumab (Ipi/Nivo) for ARV7-positive metastatic castrate-resistant prostate cancer (mCRPC)[J]. J Clin Oncol, 2017, 35(15):5035.
- [22] Barrero M, Rediti M, Crespo M, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes in biallelic-CDK12 mutated prostate cancer[J]. J Clin Oncol, 2018, 36(15):5070.
- [23] Wu YM, Cieřlik M, Lonigro RJ, et al. Inactivation of CDK12 Delineates a Distinct Immunogenic Class of Advanced Prostate Cancer[J]. Cell, 2018, 173(7):1770-1782.
- [24] 付焱,章必成.肿瘤免疫治疗的预测和预后标志物[J].医药导报,2020,39(8):1058-1062.
- [25] Abida W, Cheng ML, Armenia J, et al. Analysis of the prevalence of microsatellite instability in prostate cancer and response to immune checkpoint blockade[J]. JAMA Oncol, 2019, 5(4):471-478.
- [26] Sidaway P. MSI-H: a truly agnostic biomarker?[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2020, 17(2):68-68.
- [27] Subudhi SK, Vence L, Zhao H, et al. Neoantigen responses, immune correlates, and favorable outcomes after ipilimumab treatment of patients with prostate cancer[J]. Sci Transl Med, 2020, 12(537):eaaz3577.

• 论 著 •

肿瘤突变负荷位点检测准确性评价

孙楠 于婷 张文新 贾峥 黄杰* 曲守方*

[摘要] 目的 使用肿瘤突变负荷国家参考品中高置信 SNP/Indel 位点标准集的参考品,评价肿瘤突变负荷检测试剂盒的位点检测准确性。方法 采用 TMB 检测试剂盒(可逆末端终止测序法)检测肿瘤突变负荷检测国家参考品中高置信 SNP/Indel 位点标准集的参考品。首先将 DNA 片段化处理,进行末端修复、接头连接和文库扩增等步骤后构建文库;然后将文库杂交捕获;最后使用 NextSeq 550 Dx 基因测序仪进行测序。结果 TMB-14-2%、TMB-14-5%和 TMB-14-10%参考品的突变检测准确性分别为 89.00%、95.20%、95.80%。结论 高置信 SNP/Indel 位点标准集的参考品,能够用于评价肿瘤突变负荷检测试剂盒的位点检测准确性。

[关键词] 肿瘤突变负荷;免疫检查点抑制剂;全外显子测序;标准集;单核苷酸多态性

Evaluation of the accuracy of tumor mutation burden site detection

SUN Nan, YU Ting, ZHANG Wenxin, JIA Zheng, HUANG Jie*, QU Shoufang*

(National Institutes for Food and Drug Control, Beijing, China, 100050)

[ABSTRACT] **Objective** To evaluate the site detection accuracy of the tumor mutation burden (TMB) detection kit by using high - confidence SNP/ Indel locus standard set in the national reference materials. **Methods** The TMB detection kit (reversible terminal termination sequencing method) was used to detect the reference samples of the high - confidence SNP/Indel locus standard set in the national reference materials for tumor mutation burden detection. First, the library was constructed by shearing DNA, end repair, adapter ligation, and library amplification. Then the library was hybridized and captured. Finally, the NextSeq550 Dx sequencer was used for sequencing. **Results** The accuracy of TMB-14-2%、TMB-14-5% and TMB-14-10% was 89.00%、95.20%、and 95.80% , respectively. **Conclusion** The reference material of the high - confidence SNP/ Indel site standard set can be used to evaluate the site detection accuracy of the tumor mutation burden detection kit.

[KEY WORDS] Tumor mutation burden; Immune Checkpoint Inhibitor; Whole exon sequence; Standard sets; Single nucleotide polymorphisms

肿瘤免疫治疗是通过激发或调动机体自身的免疫系统,解除肿瘤细胞对于自身免疫系统的抑制,达到调控和杀伤肿瘤细胞的目的。免疫治疗这种全新的治疗模式也为肿瘤患者带来了新的机遇。其中免疫检查点抑制剂(Immune Checkpoint Inhibitor, ICI)给恶性肿瘤治疗带来了新的选择,包括程序性死亡受体 1(PD-1)抑制剂及其配体(PD-L1)抑制剂,以及细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 4

(CTLA-4)抑制剂等^[1-2]。肿瘤突变负荷(tumour mutation burden, TMB)是预测患者对免疫检查点抑制剂治疗反应的新兴生物标志物,识别可能受益于免疫治疗的肿瘤患者^[3-4]。已有研究表明,与低 TMB 相比,高 TMB 患者的免疫治疗效果更好^[5-6]。

常见的 TMB 检测方法是对肿瘤组织切片或血液标本进行高通量测序(Next-generation sequencing, NGS),包括全外显子(Whole Exome Se-

基金项目:中国食品药品检定研究院学科带头人培养基金;肿瘤突变负荷(TMB)标准化研究(2019X3)

作者单位:中国食品药品检定研究院,北京 100050

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

注:孙楠和于婷共为第一作者

quencing, WES)测序和试剂盒(Panel)靶向测序等方法^[7-8]。虽然肿瘤组织全外显子测序是公认的检测 TMB 的金标准,但其测序成本较高、周期长,并且对肿瘤组织标本大小和肿瘤细胞含量有较高要求,在临床实践中难以广泛使用。国内外有多家体外诊断试剂公司都在二代测序平台上开发了 TMB 检测试剂盒(Panel),用经过验证的 panel 算法来计算 TMB,期望替代全外显子测序。中国食品药品检定研究院(简称中检院)建立肿瘤突变负荷检测(TMB)国家参考品,包括高置信单核苷酸多态性和插入缺失(Single nucleotide polymorphisms/insertion-deletion, SNP/Indel)位点标准集,用来考察试剂盒(Panel)的位点检测准确性。

1 材料与方法

1.1 样本

肿瘤突变负荷检测国家参考品由简称中检院提供。

1.2 试剂与仪器

核酸纯化试剂和 TMB 检测试剂盒(可逆末端终止测序法),购自南京世和医疗器械有限公司; KAPA Library Quant Kit (illumina) Universal qPCR Mix, 购自 KAPA Biosystems 公司;测序试剂盒,购自 Illumina 公司。超声破碎仪,购自 Diagenode 公司; Qubit®4.0 荧光定量仪,购自 Life Technology 公司;Nextseq 550 DX 测序仪,购自 Illumina 公司。

1.3 方法

肿瘤突变负荷检测国家参考品中 TMB-14 样本,是来自不同人体且是非肿瘤组织的 1 对细胞系。将这对细胞按照不同体积比例进行混合,1 个细胞(TMB-H)基因组 DNA 所占的体积比例分别为 0%、1%、2%、5%和 10%,其配对细胞(TMB-BL)基因组 DNA 所占的体积比例分别为 100%、99%、98%、95%和 90%。取不同体积比例的 TMB-14 样本基因组 DNA,用 TMB 检测试剂盒(可逆末端终止测序法)进行检测。基因组 DNA 经超声片段化处理,进行末端修复和文库接头连接。将文库扩增后进行杂交捕获富集,洗脱掉未富集的片段后进行扩增。最后将标准化文库上机测序。下机后按照国家参考品说明书,根据 panel 检测的 bed 文件,将试剂盒 panel 检测的 VCF 文件与 TMB-14 样本的高置信 SNP/Indel 位点标准集进行比对分析,评价肿瘤突变负荷位点检测准确性。

2 结果

panel 检测的 VCF 文件与标准集比对后, TMB-14-2%、TMB-14-5%、TMB-14-10%的突变检测准确性分别为 89.00%、95.20%、95.80%,符合 TMB-14-2%、TMB-14-5%、TMB-14-10%国家参考品应分别不低于 40%、60%、80%的要求。TMB-14 样本的高置信 SNP/Indel 位点标准集和试剂盒 panel 检测的 SNP/Indel 位点比对。见表 1、图 1~2。

表 1 TMB 检测国家参考品结果

Table 1 Results of national reference material for TMB detection

样本名称	TMB-14-1%	TMB-14-2%	TMB-14-5%	TMB-14-10%
TP_snp	199	295	317	317
FP_snp	25927	38982	31841	30939
FN_snp	122	26	4	4
Sensitivity_snp	61.99	91.90	98.75	98.75
TP_indel	17	20	20	22
FP_indel	2649	3226	2926	2887
FN_indel	16	13	13	11
Sensitivity_indel	51.52	60.61	60.61	66.67
Sensitivity	61.00	89.00	95.20	95.80

注: TP: 真阳性; FP: 假阳性; FN: 假阴性。Sensitivity=TP/(TP+FN)×100%

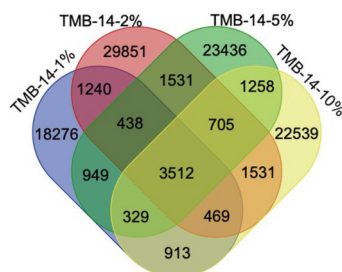


图 1 国家参考品高置信 SNP 位点标准集与试剂盒 SNP 的比对结果

Figure 1 Comparison results of high confidence SNP site standard set in the national reference material and SNP by kit

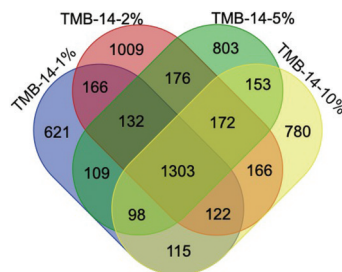


图 2 国家参考品高置信 Indel 位点标准集与试剂盒 Indel 比对结果

Figure 2 Comparison results of high confidence Indel site standard set in the national reference material and Indel by kit

3 讨论

随着二代测序技术的不断发展,对肿瘤治疗理念的创新,从肿瘤的分型逐渐引入了分子分型的理念,重视肿瘤的分子靶向治疗,实现异癌同治、同癌异治,美国食品和药物管理局(FDA)突破性的批准了泛癌种的二代测序技术的肿瘤基因突变检测 panel。2017年11月30日美国FDA批准上市 FoundationOne CDx 伴随诊断产品,针对324个基因进行检测,检测的突变类型包括替换、插入、缺失、拷贝数变化、基因重排等突变,以及微卫星不稳定性(MSI)和TMB检测,适用的样品类型为福尔马林固定石蜡包埋组织样本(FFPE)^[9-11]。但是我国尚未批准用于TMB检测的伴随诊断试剂产品。我国已经有多个公司在NGS平台上开发TMB检测试剂盒,但是至今尚未进入审批阶段。目前TMB缺乏统一的检测标准,研制相应的国家参考品,开展TMB相关应用技术以及标准化研究,可以为TMB检测试剂的申报奠定工作基础。

2019年中检院建立TMB检测国家参考品,开展国内TMB试剂盒(panel)的性能评价工作。对于TMB检测试剂盒的性能,应关注于两个方面:一是试剂盒(panel)的TMB检测一致性,panel的TMB检测结果与WES检测结果的一致性,考察其检测TMB准确性;二是试剂盒的差异性SNP/Indel位点检测准确性评价,检测SNP/Indel位点标准集时能够拷出的合适的突变位点个数,考察试剂盒整体检测的准确性,从而对TMB检测试剂盒的性能进行全方位的评价。

而评价TMB试剂盒(panel)的位点检测准确性,需要与高置信SNP/Indel位点标准集进行比对。美国的瓶中基因组协会(Genome In A Bottle, GIAB)采用五种不同平台对美国国家标准技术研究所提供的DNA标准参考品8392(又称NA24385, HG002)进行结构变异标准集构建^[12-13]。参考国际建立标准集的方式,本院建立国家参考品高置信SNP/Indel位点标准集。首先使用软件SOAPnuke对所有原始数据进行低质量过滤得到有效数据,使用软件BWA+GATK Haplotype Caller对各数据集分别进行变异检测,得到两类文件:(a)gVCF,用于生成候选变异区间(b)VCF,用软件GATK VQSR进行处理,初步过滤得到候选变异集。然后合并各

平台的候选变异集,使用软件vcf annotate将各候选变异区间注释到合并的变异集上。对于每一个候选变异集,随机取40 000个在候选变异区间内的变异位点作为训练集,使用R语言包“e1071”中的软件one-class SVM进行分类,得到各候选变异集的极端变异阈值用于变异筛选。对于未通过筛选的变异,在其两侧加减50碱基(bp),生成低置信变异区间。最后合并候选变异区间,与低置信变异区间取补集,再与参考基因组非N区间取交集,从而建立了TMB-14样本的两种细胞系有差异的高置信SNP/Indel位点标准集。研究结果表明panel检测的VCF文件与标准集比对后,TMB-14-2%、TMB-14-5%、TMB-14-10%的突变检测准确性符合国家参考品TMB-14样本的要求。研制的TMB国家参考品,能够满足肿瘤突变负荷检测试剂盒的位点检测准确性的要求,具有重要的应用价值。

参考文献

- [1] 刘巍,李婧婧,丁娅,等. PD-1抗体联合替莫唑胺治疗晚期黑色素瘤的疗效及安全性分析[J]. 中山大学学报(医学科学版), 2020, 41(3):452-459.
- [2] 吕萌萌,沈扬,卢锦,等. PD-1/PD-L1抑制剂在妇科肿瘤中的研究进展[J]. 临床肿瘤学杂志, 2019, 24(12):1139-1144.
- [3] Lee M, Samstein RM, Valero C, et al. Tumor mutational burden as a predictive biomarker for checkpoint inhibitor immunotherapy [J]. Hum Vaccin Immunother, 2020, 16(1): 112-115.
- [4] 吴鹏,赵玉梅,杨玲麟. 肿瘤突变负荷作为非小细胞肺癌免疫疗效预测标志物的研究进展[J]. 中国免疫学杂志, 2019, 35(19):2414-2418.
- [5] 张奥伦,殷婷,张西志. 肿瘤突变负荷对结直肠癌患者免疫治疗疗效的预测价值[J]. 实用临床医药杂志, 2020, 24(8):128-132.
- [6] Hellmann MD, Callahan MK, Awad MM, et al. Tumor Mutational Burden and Efficacy of Nivolumab Monotherapy and in Combination with Ipilimumab in Small-Cell Lung Cancer [J]. Cancer Cell, 2019, 35(2): 853-861.
- [7] Yang W, Morris LGT, Chan TA. Panel-based estimates of tumor mutational burden: characterizing unknown unknowns [J]. Ann Oncol, 2019, 30(9):1413-1415.
- [8] Noskova H, Kyr M, Pal K, et al. Assessment of Tumor Mutational Burden in Pediatric Tumors by Real-Life Whole-Exome Sequencing and In Silico Simulation of Targeted Gene Panels: How the Choice of Method Could Affect the Clinical Decision? [J]. Cancers (Basel), 2020, 12(1):230.

(下转第351页)

2016–2020年吉林省流感病原学监测分析

李静 柳鸿敏 侯程程 吴东林 杨显达*

[摘要] 目的 了解2016–2020年吉林省流感病毒的流行趋势、病原学变化特点,为本省流感防控提供科学依据。方法 对吉林省13家流感监测哨点医院报告的流感样病例(ILI)进行统计学分析,对采集的流感样病例标本进行实验室检测和病原学监测分析。结果 2016–2020年度ILI就诊比例呈逐年上升的趋势,4个监测年度报告的ILI比例差异有统计学意义($\chi^2=7\,681.309, P<0.05$)。2016–2020年度流感样病例年龄段主要集中在15岁以下儿童,不同监测年度ILI年龄构成比差异有统计学差异($\chi^2=636.663, P<0.05$)。4个监测年度共采集流感样病例患者咽拭子标本35\,504份,检测阳性标本5\,042份,阳性率为14.20%。除2018–2019年以B型流感病毒为流行优势株外,其它三个监测年度都以A型流感病毒为流行优势株,H3N2亚型和H1N1pdm亚型交替流行。结论 2016–2020年吉林省ILI就诊比例的流行高峰发生在冬春季,15岁以下年龄组为主要的易感人群,应加强相应的防控措施并积极推广流感疫苗的接种。

[关键词] 流感样病例;流感;病原学

Analysis on the Etiology of Influenza in Jilin Province from 2016 to 2020

LI Jing, LIU Hongmin, HOU Chengcheng, WU Donglin, YANG Xianda*

[Jilin Provincial Center for Disease Control and Prevention (Public Health Research Institute), Changchun, Jilin, China, 130062]

[ABSTRACT] **Objective** To understand the epidemic trend and etiological characteristics of influenza viruses in Jilin Province from 2016 to 2020, and to provide scientific basis for influenza prevention and control in the province. **Methods** Statistical analysis was carried out on influenza-like cases (ILI) reported by 13 influenza surveillance sentinel hospitals in Jilin Province, and laboratory testing and pathogenic monitoring and analysis were carried out on the collected influenza-like case specimens. **Results** The proportion of ILI visits from 2016 to 2020 showed an upward trend year by year, and the difference in the proportion of ILI reported in the four monitoring years was statistically significant ($\chi^2=7\,681.309, P<0.05$). The age group of influenza-like cases from 2016 to 2020 is mainly concentrated in children under 15 years old, and there are statistical differences in the age composition ratio of ILI between different monitoring years ($\chi^2=636.663, P<0.05$). A total of 35,504 throat swab specimens from patients with influenza-like cases were collected in the 4 monitoring years, and 5,042 positive specimens were detected, with a positive rate of 14.20%. Except for the influenza B virus as the predominant strain in 2018–2019, influenza A virus was the predominant strain in the other three monitoring years, and the H3N2 subtype and H1N1pdm subtype were alternately circulating. **Conclusion** The prevalence peak of the proportion of ILI visits in Jilin Province from 2016 to 2020 occurs in winter and spring. The age group under 15 years old is the main susceptible population. Corresponding prevention and control measures should be strengthened and influenza vaccination should be actively promoted.

[KEY WORDS] Influenza-like illness; Influenza; Etiology

基金项目:国家科技重大专项(2017ZX10103007-003)

作者单位:吉林省疾病预防控制中心(吉林省公共卫生研究院)病毒所,吉林,长春 130062

*通信作者:杨显达, E-mail: flemingyang@163.com

流行性感(Infuenza)是由流感性感病毒(Infuenza Virus)引起的急性呼吸道感染的传染病,具有传播迅速、传染性强、抗原易变异等特点^[1]。流感病毒根据核蛋白和基质蛋白抗原性不同,分为甲(A)、乙(B)、丙(C)、丁(D)4个型别^[2]。其中甲型流感病毒有广泛的宿主,可感染人类、家禽、野禽等,且宿主间的流感病毒易发生抗原转换,产生新的流感病毒。人群对变异株普遍易感,容易引起暴发和流行,因此流感是一个较难控制的传染病,也是第一个实行全球监测的传染病^[3]。吉林省于2001年加入国家流感监测网络,目前设有流感监测网络实验室10家,流感监测哨点医院13家,可全面及时了解吉林省流感流行趋势及变化特点。本文就2016-2020年流感监测结果进行分析,对本省的流感流行情况进行总结。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 研究对象

1.1.1 流感样病例(influenza-like illness, ILI)

在全省13家流感监测哨点医院,监测诊室的医务人员根据流感样病例的定义^[4-5](体温 $\geq 38^{\circ}\text{C}$,伴咳嗽或咽痛之一),每天按照科室登记各年龄组的ILI病例数和门急诊就诊病例总数(监测数据来源于流感监测系统)。2016年4月至2020年3月流感样病例共188 330人,其中0~岁68 624人,5~14岁45 287人,15~24岁16 446人,25~59岁43 761人, ≥ 60 岁14 212人。

1.1.2 流感样病例监测标本

采集2016年4月至2020年3月符合流感样病例定义且发热3天内未使用抗病毒药物的流感样病例病人的咽拭子或鼻咽拭子标本。

1.2 方法

1.2.1 标本采集和处理

每家哨点医院设专职采样护士,采集的标本在 4°C 条件下保存,48 h内运送至流感监测网络实验室。实验室收到标本后,用旋涡混合器震荡混匀,静置10 min后,取上清液提取病毒核酸。

1.2.2 核酸检测

使用QIAamp Viral RNA Mini kit(德国Qiagen)试剂盒提取核酸,具体操作参照说明书。使用Ag-Path-ID™One-Step RT-PCR Kit对流感病毒核酸进行Real-time PCR检测,相关引物及探针序列参考《全国流感监测方案(2010年版)》^[4]及《全国流感监

测技术指南(2017年版)》^[5],由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成。对2016年4月至2020年3月标本进行A、B型流感及A(H3N2)、H1N1pdm、B型Victoria系和Yamagata系流感病毒分型检测。

1.3 统计学分析

采用SPSS 20.0统计软件进行数据处理。计数资料采用 $n(\%)$ 表示,采用 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 流感样病例监测

2.1.1 时间分布

2016年4月至2020年3月吉林省国家级哨点医院门急诊总就诊病例为8 799 873人,其中流感样病例188 330人(2.14%),4年平均ILI总数与急诊总就诊病例数百分比(ILI%)分别为1.7%、1.76%、2.20%、2.96%。不同监测年度的ILI%最高值分别为2.62%(2017年第4周)、2.68%(2018年第4周)、4.53%(2018年第51周)、16.01%(2020年第5周)。4个年度ILI就诊比例呈逐年上升的趋势,每个年度的ILI就诊比例高峰均在冬季。4个监测年度报告的ILI比例差异有统计学意义($\chi^2=7 681.309, P<0.05$)。见图1。

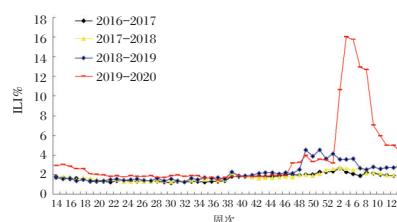


图1 2016-2020年吉林省ILI%情况

Figure 1 Situation of ILI% in Jilin Province from 2016 to 2020

2.1.2 人群分布

不同监测年度ILI年龄构成比差异有统计学意义($P<0.05$)。见表1。

2.2 病原学监测

2.2.1 检测结果

各个年度流行的流感病毒亚型差异有统计学意义($P<0.001$)。见表2。

2.2.2 性别分布

各个年度阳性标本不同性别差异无统计学意义($P=0.372$)。见表3。

2.2.3 流行情况

从时间分布上看,2016年10月流感流行初期

表1 2016-2020年吉林省ILI年龄分布 [n(%)]

Table 1 Age distribution of ILI in Jilin Province from 2016 to 2020 [n(%)]

年度	0~4岁	5~14岁	15~24岁	25~59岁	≥60岁
2016.4~2017.3	13 150 (35.78)	9 873 (26.87)	3 105 (8.45)	7 795 (21.21)	2 826 (7.69)
2017.4~2018.3	13 919 (34.68)	9 653 (24.05)	4 019 (10.01)	9 229 (23.00)	3 315 (8.26)
2018.4~2019.3	19 016 (37.49)	12 184 (24.02)	4 570 (9.01)	11 354 (22.39)	3 594 (7.09)
2019.4~2020.3	22 539 (37.11)	13 577 (22.36)	4 752 (7.83)	15 383 (25.33)	4 477 (7.37)
合计	68 624 (36.44)	45 287 (24.04)	16 446 (8.73)	43 761 (23.24)	14 212 (7.55)
χ^2 值	636.663				
P值	<0.001				

表2 2016-2020年吉林省流感病毒核酸检测结果 [n(%)]

Table 2 Results of influenza virus nucleic acid test in Jilin Province from 2016 to 2020 [n(%)]

年度	标本数	阳性标本数	A型标本数		B型标本数	
			H3N2	H1N1pdm	Victoria系	Yamagata系
2016.4~2017.3	8 684	964 (11.10)	424 (43.98)	485 (50.31)	54 (5.60)	1 (0.11)
2017.4~2018.3	8 890	1 574 (17.71)	579 (36.79)	137 (8.70)	13 (0.83)	845 (53.68)
2018.4~2019.3	9 036	1 320 (14.61)	86 (6.52)	1 081 (81.89)	95 (7.20)	58 (4.39)
2019.4~2020.3	8 894	1 184 (13.31)	893 (75.42)	187 (15.79)	104 (8.79)	0 (0.00)
合计	35 504	5 042 (14.20)	1 982 (39.31)	1 890 (37.48)	266 (5.28)	904 (17.93)
χ^2 值	3 731.539					
P值	<0.001					

表3 2016-2020年吉林省流感阳性标本性别分布 [n(%)]

Table 3 Gender distribution of positive specimens in Jilin Province from 2016 to 2020 [n(%)]

年度	男	女
2016.4~2017.3	515 (53.42)	449 (46.58)
2017.4~2018.3	795 (50.51)	779 (49.49)
2018.4~2019.3	667 (50.53)	653 (49.47)
2019.4~2020.3	623 (52.62)	561 (47.38)
χ^2 值	3.128	
P值	0.372	

以A(H3N2)亚型为优势病毒开始流行,2017年3月份H1N1pdm逐渐转变成流行优势病毒;2017年10月份以A(H3N2)亚型流行为主,2018年1月份B型Yamagata系逐渐转变成流行优势病毒;2018年11月H1N1pdm以优势病毒开始流行,2019年4月份B型Victoria系逐渐转变成流行优势病毒;2019年10月开始一直以A(H3N2)亚型为优势流行病毒。见图2。

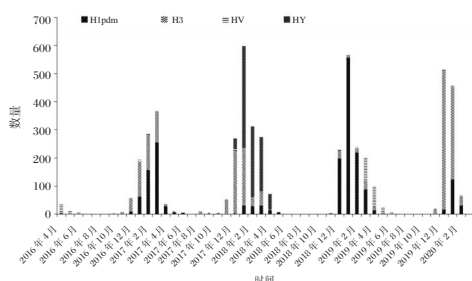


图2 吉林省2016-2020年流感病毒时间分布情况

Figure 2 Time distribution of influenza viruses in Jilin Province from 2016 to 2020

3 讨论

20世纪以来流感病毒引起至少4次世界范围内大流行,分别是1918-1919年的“西班牙流感”、1957年的“亚洲流感”、1968年的“香港流感”以及2009年新甲型H1N1流感^[6]。流感的暴发和流行带来巨大的经济损失和社会负担,导致劳动力减少和医疗负担增加^[7]。上个世纪中叶起,世界卫生组织逐步在全世界范围内建立起流感监测网络,实时了解流感的流行趋势并及时发现新型流感病毒^[8]。

吉林省2016-2020年流感样病例监测情况分析发现,4个流感监测年度ILI就诊比例呈逐年升高的趋势,表明流感病毒活动强度与时间有密切联系。ILI就诊比例的流行高峰发生在冬春季,与我国北方其它省市研究结果一致^[9-11],却不同于南方地区冬春季、夏季两个流行季节的特征,表明地理位置和气候差异是造成南方和北方地区流感流行时间不同的主要因素^[12]。在2020年4~8周ILI%出现异常增高,是既往监测年度同期ILI就诊比例的4~5倍,可能与2019年新型冠状病毒疫情有关。流感与新型冠状病毒引起的临床症状相似,多以呼吸道症状为主,两者在症状上很难区分,因此造成ILI比例异常变化。不同年龄组在ILI中占比有明显差异,主要为15岁以下青少年,与相关报道结果一致^[13-14]。这一结果提示幼儿与青少年是感染流感病毒的高危人群,可能与儿童

免疫能力发育不完全有关,且人群密度高,患病后易造成群体间相互传播。因此应在幼儿园及学校加强预防流感的宣传工作,降低其发病率。 ≥ 60 岁组人群在流感样病例中比例最少,但不能忽视,此人群患有基础性疾病的比例较高,易于因患流感而加重其他疾病导致死亡^[15]。

吉林省 2016-2020 年流感病原监测情况分析显示,吉林省与北京^[9]、上海^[16]等地区比较流感病毒阳性检出率偏低,原因可能与对流感患者症状的判断、标本采集的质量等因素有关。4 个流感监测年度各个亚型均有检出,呈现多种型别混合流行,各个年度流感毒株优势株变化情况不同,主要以 A 型流感病毒为流行优势株, H3N2 亚型和 H1N1pdm 亚型交替流行,可能是因为甲型流感较乙型流感更易引起流行。吉林省流感病毒流行期一般在 12 月到次年 4 月份,呈单峰流行,流感病原学阳性率与 ILI% 呈正相关符合流感病毒特征^[17]。

临床发现新冠肺炎患者合并感染流感病毒的机率很高,合并感染的患者将出现严重的炎症反应和器官损伤,死亡风险更高。2020 年流感病毒流行期即将到来,应加强流感疫苗接种的宣传工作,增强大众对流感疫苗的认知,提高医务工作者、老年慢性病患者,儿童等重点人群的流感疫苗接种率,降低流感与新型冠状病毒合并感染,同时加强 2020 年秋冬季流感样病例的监测工作。

参考文献

- [1] 聂丽, 罗万军, 孔德广, 等. 2013-2018 年武汉市儿童流感流行病学特征分析[J]. 现代预防医学, 2020, 47(10): 1754-1757.
- [2] Jason SL, Bhakti M, Stuart M, et al. Host and viral determinants of influenza A virus species specificity[J]. Nat Rev Microbiol, 2018, 17:67-81.
- [3] 王慧馨, 跃华, 张宇耕, 等. 2013-2015 年内蒙古自治区流行性感冒流行病学特征与病原学分析[J]. 中国病毒病杂志, 2017, 7(6):431-435.
- [4] 中华人民共和国卫生部. 全国流感监测方案(2010 年版)[S]. 2010.
- [5] 中国国家流感中心. 《全国流感监测技术指南(2017 年版)》[S]. 2017.
- [6] 陈玲霞, 姬莉莉, 孙卫明, 等. 北京市怀柔区 2013-2018 年流感监测结果分析[J]. 实用预防医学, 2019, 26(10):82-84.
- [7] 周洁楠, 王佳云, 李多, 等. 2014-2017 年云南省流感病原体监测结果分析[J]. 现代预防医学, 2019, 46(9):172-177.
- [8] 崔蕾, 冯芳莉, 王如敏, 等. 2016-2020 年海南省流感病原学监测分析[J]. 现代预防医学, 2020, 47(16): 3028-3032.
- [9] 杨雄, 肖征, 吴双胜, 等. 2015-2018 年北京市西城区流感样病例监测情况分析[J]. 医学动物防制, 2020, 36(7):85-88.
- [10] 许晶, 张蕾, 马萍, 等. 2010-2016 年度陕西省流行性感冒监测分析[J]. 现代预防医学, 2017, 44(17):3240-3244.
- [11] 王璐璐, 孙海波, 孙佰红, 等. 辽宁省 2017 年 4 月-2018 年 3 月流感监测结果分析[J]. 中国当代医药, 2019, 26(9):174-177.
- [12] 王伟. 2009-2019 年山东省流感样病例流行特征及其与气象因素关系研究[D]. 2016.
- [13] 周美兰, 胡世雄, 周志华, 等. 湖南省 2010-2015 年流感样病例监测分析[J]. 实用预防医学, 2017, 24(9):1112-1116.
- [14] 曹蓝, 李魁彪, 马钰, 等. 2017 年广州市流感暴发疫情病原学监测与分析[J]. 热带医学杂志, 2018, 18(12):81-84.
- [15] 郭燕慧, 郭卫东, 跃华. 内蒙古自治区 2018 年流行性感冒流行病学及病原学研究[J]. 内蒙古医学杂志, 2019, 51(8):909-911.
- [16] 王唐, 李淑华, 杜荐如, 等. 上海市金山区 2015-2017 年流感监测结果征分析[J]. 实用预防医学, 2019, 26(7):854-856.
- [17] 钱程, 陈聪, 祖荣强, 等. 常州市 2010-2016 年流感监测的流行病学特征分析[J]. 中华疾病控制杂志, 2017, 21(11):1123-1127.
- [9] Ready N, Hellmann MD, Awad MM, et al. First-Line Nivolumab Plus Ipilimumab in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer (CheckMate 568): Outcomes by Programmed Death Ligand 1 and Tumor Mutational Burden as Biomarkers[J]. J Clin Oncol, 2019, 37(12): 992-1000.
- [10] Fancello L, Gandini S, Pelicci PG, et al. Tumor mutational burden quantification from targeted gene panels: major advancements and challenges[J]. J Immunother Cancer, 2019, 7(1):183.
- [11] Merino DM, McShane LM, Fabrizio D, et al. Establishing guidelines to harmonize tumor mutational burden (TMB): in silico assessment of variation in TMB quantification across diagnostic platforms: phase I of the Friends of Cancer Research TMB Harmonization Project [J]. J Immunother Cancer, 2020, 8(1): e000147.
- [12] Huang J, Liang X, Xuan Y, et al. A reference human genome dataset of the BGISEQ-500 sequencer [J]. Gigascience, 2017, 6(5):1-9.
- [13] Zook JM, Chapman B, Wang J, et al. Integrating human sequence data sets provides a resource of benchmark SNP and indel genotype calls[J]. Nat Biotechnol, 2014, 32(3):246-251.

(上接第 347 页)

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

杜伟鹏 汪海霞* 卢芳

[摘要] **目的** 探究水通道蛋白-4(AQP-4)、血管细胞粘附分子-1(VCAM-1)、神经肽Y(NPY)在重症手足口病(HFMD)患儿脑脊液中的表达情况,并探究其对并发脑炎的诊断价值。**方法** 选取本院36例重症HFMD患儿作为重症组,另选取32例普通HFMD患儿作为普通组。检测对比两组、重症组并发与未并发脑炎患儿脑脊液AQP-4、VCAM-1、NPY水平,分析3者与病情程度的关系,探究脑脊液AQP-4、VCAM-1、NPY对重症HFMD并发脑炎的诊断价值。**结果** 重症组脑脊液AQP-4、VCAM-1、NPY水平高于普通组,差异有统计学意义($P<0.05$);HFMD病情程度与脑脊液AQP-4、VCAM-1、NPY水平显著相关,差异有统计学意义($P<0.05$);重症组并发脑炎患儿脑脊液AQP-4、VCAM-1、NPY水平高于未并发脑炎患儿,差异有统计学意义($P<0.05$);脑脊液AQP-4、VCAM-1、NPY联合诊断重症HFMD并发脑炎的AUC为0.894,大于各指标单独诊断,联合诊断的最佳敏感度为81.25%,特异度为90.00%。**结论** 脑脊液AQP-4、VCAM-1、NPY表达水平在重症HFMD并发脑炎诊断方面具有较高应用价值,可为临床评估HFMD病情程度、诊断重症HFMD并发脑炎提供重要参考。

[关键词] 重症手足口病;脑脊液;水通道蛋白-4;血管细胞粘附分子-1;神经肽Y;脑炎

Expression of AQP-4, VCAM-1 and NPY in the cerebrospinal fluid of children with severe hand-foot-mouth disease and their diagnostic value for complicated encephalitis

DU Weipeng, WANG Haixia*, LU Fang

(Department of Medical Laboratory, Nanyang Central Hospital, Nanyang, Henan, China, 473009)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the expression of aquaporin-4 (AQP-4), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), neuropeptide Y (NPY) in the cerebrospinal fluid of children with severe hand-foot-mouth disease (HFMD), and their diagnostic value for complicated encephalitis. **Methods** 36 children with severe HFMD in our hospital were selected as the severe group, and 32 children with ordinary HFMD as the normal group. The levels of AQP-4, VCAM-1, and NPY in the cerebrospinal fluid of children with and without encephalitis were compared between the two groups and the severe group, and the relationship between the three and the severity of the disease was analyzed. The value of cerebrospinal fluid AQP-4, VCAM-1, NPY in the diagnosis of severe HFMD complicated with encephalitis was explored. **Results** The levels of AQP-4, VCAM-1 and NPY in the cerebrospinal fluid of the severe group were higher than those in the normal group, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). The severity of HFMD was significantly correlated with the levels of AQP-4, VCAM-1, and NPY in cerebrospinal fluid, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). The levels of AQP-4, VCAM-1 and NPY in cerebrospinal fluid of children with severe encephalitis were higher than those of children without encephalitis, and the difference was statistically significant ($P<0.05$); the AUC of AQP-4, VCAM-1, and NPY in cerebrospinal fluid combined diagnosis of severe HFMD complicated with encephalitis was 0.894, which was greater than each index alone, the best sensitivity of the combined diagnosis was 81.25%, and the specificity was 90.00%. **Conclusion** The abnormal increase in the expression levels of

基金项目:河南省科技厅基金项目(20190038x)

作者单位:河南省南阳市中心医院医学检验科,河南,南阳473009

*通信作者:汪海霞, E-mail:nymedical@126.com

AQP-4, VCAM-1 and NPY in high application value in the diagnosis of severe HFMD complicated with encephalitis. It can be used for clinical evaluation of the severity of HFMD and diagnosis of severe disease.

[KEY WORDS] Severe hand-foot-and-mouth disease; Cerebrospinal fluid; Aquaporin-4; Vascular cell adhesion molecule-1; Neuropeptide Y; Encephalitis

手足口病 (Hand-foot-and-mouth disease, HFMD) 是学龄期儿童常见的急性出疹性传染病, 主要由柯萨奇病毒 A16、肠道病毒 71 型等感染所致, 多发于 3 岁以下患儿, 且常见表现为群体发病^[1-2]。HFMD 症状轻者一般 1 周左右可自行痊愈, 但部分重症患儿因病情快速发展, 多累及神经系统, 一旦并发脑炎, 则会增加患儿残疾或死亡风险。因此, 加强重症 HFMD 患儿病情评估及并发脑炎诊断的研究非常重要^[3]。近年来研究发现, 水通道蛋白-4 (Aquaporin-4, AQP-4)、血管细胞粘附分子-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1, VCAM-1) 在脑水肿脑损伤的发生、发展中起重要作用^[4-5], 且神经肽 Y (Neuropeptide Y, NPY) 可用于反映神经细胞损伤^[6], 均参与重症 HFMD 的发生发展。但上述指标在 HFMD 中的研究多为单独应用, 尚无联合应用的研究。故本研究尝试联合检测分析 AQP-4、VCAM-1、NPY 在重症 HFMD 患儿脑脊液中的表达及对并发脑炎的诊断价值, 旨在为临床提供数据支持。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取本院 2016 年 1 月至 2019 年 9 月 36 例重症 HFMD 患儿作为重症组 (重症评估^[7]: 伴有神经系统受累表现, 如精神状态差、谵妄、易惊、嗜睡, 惊厥, 急性弛缓性麻痹或无力, 伴有呕吐、头痛, 出现脑膜刺激征、腱反射减弱或无腱反射, 肌阵挛、肢体抖动、眼球震颤、眼球运动障碍、共济失调), 另选取 32 例普通 HFMD 患儿作为普通组 (轻型评估: 不伴有中枢神经系统感染)。纳入标准: ①符合 HFMD 诊断标准^[8]; ②年龄 ≤ 12 岁; ③无脑部疾病史; ④无营养不良、贫血或肥胖; ⑤研究经本院伦理委员会审批通过, 患儿家属均知晓本研究, 已签署同意书。排除标准: ①白血病、凝血功能障碍等疾病患儿; ②乙型肝炎、肺结核等传染性疾病患儿; ③发病前 1 个月内有感染性疾病史者; ④发病前有精神系统疾病者; ⑤有颅脑创伤及手术史者; ⑥遗传性疾病患儿; ⑦家属不能配合完成研究者。两组一般资料比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

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

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

项目	重症组 ($n=36$)	普通组 ($n=32$)	t/χ^2 值	P 值
性别 (女/男)	16/20	14/18	0.003	0.954
年龄 (岁)	3.26 ± 1.37	3.71 ± 1.60	1.249	0.516
病程 (d)	2.35 ± 0.67	2.61 ± 0.80	1.458	0.150
体质量 (kg)	15.27 ± 3.28	15.80 ± 3.29	0.664	0.509
发病季节	冬季、春季 夏季、秋季	19 (52.78) 15 (46.88)	0.236	0.627
户籍地	农村 城市	21 (58.33) 18 (56.25)	0.030	0.862
	15 (41.67)	14 (43.75)		

1.2 方法

实验试剂与检测仪器: AQP-4、VCAM-1 检测试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司; MR-96T 型酶标仪购自深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司; NPY 检测试剂盒购自北京福瑞润泽生物技术有限公司, Mokosensor-A300 型胶体金免疫分析仪购自南京美宁康诚生物科技有限公司。

检测方法: 所有研究对象入组 6 h 内均由专业人员于腰椎穿刺采集脑脊液 2 mL, 操作严格按照无菌操作规范进行, 采用双抗体夹心酶联免疫吸附试验测定脑脊液 AQP-4、VCAM-1 采用放射免疫分析法测定脑脊液 NPY 水平, 采用 Mokosensor-A300 型胶体金免疫分析仪检测。

1.3 观察指标

①两组脑脊液 AQP-4、VCAM-1、NPY 水平。②重症组并发与未并发脑炎患儿一般资料、脑脊液 AQP-4、VCAM-1、NPY 水平, 参照欧洲神经科学协会联盟制定的病毒性脑炎诊断标准诊断是否并发脑炎^[9]。③脑脊液 AQP-4、VCAM-1、NPY 水平与 HFMD 病情程度的关系。④探究脑脊液 AQP-4、VCAM-1、NPY 对重症 HFMD 并发脑炎的诊断价值。

1.4 统计学方法

数据处理采用 SPSS 22.0 软件; 计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 t 检验; 计数资料以 $n(\%)$ 表示, 采用 χ^2 检验; 通过 Logistic 进行多因素回归分析, 采用受试者工作 (Receiver operating characteristic, ROC) 曲线分析诊断价值, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组脑脊液 AQP-4、VCAM-1、NPY 水平比较

重症组脑脊液 AQP-4、VCAM-1、NPY 水平较普通组高,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表2。

表2 两组脑脊液 AQP-4、VCAM-1、NPY 水平比较 ($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Comparison of AQP-4, VCAM-1 and NPY levels in cerebrospinal fluid between 2 groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	AQP-4($\mu\text{g/L}$)	VCAM-1(mg/L)	NPY(g/L)
重症组	36	16.68 $\pm$ 4.31	15.06 $\pm$ 3.19	351.17 $\pm$ 55.34
普通组	32	7.43 $\pm$ 2.02	11.13 $\pm$ 2.65	287.20 $\pm$ 36.15
t 值		11.099	5.486	5.566
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

2.2 脑脊液 AQP-4、VCAM-1、NPY 与 HFMD 病情程度的关系

以 HFMD 病情程度作因变量,将脑脊液 AQP-4、VCAM-1、NPY 作为自变量,Logistic 回归分析显示脑脊液 AQP-4、VCAM-1、NPY 与 HFMD 病情程度显著相关,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表3。

表3 脑脊液 AQP-4、VCAM-1、NPY 与 HFMD 病情程度的关系

Table 3 The relationship between cerebrospinal fluid AQP-4, VCAM-1, NPY and the severity of HFMD

变量	β 值	S.E. 值	Wald χ^2	OR 值	95%CI	P 值
AQP-4	1.649	0.475	12.046	5.200	3.104~8.710	<0.001
VCAM-1	1.559	0.518	9.063	4.756	1.928~11.733	<0.001
NPY	1.522	0.390	15.228	4.581	2.231~9.406	<0.001

2.3 重症组并发与未并发脑炎患儿一般资料、脑脊液 AQP-4、VCAM-1、NPY 水平比较

重症组并发脑炎患儿组性别、年龄、病程与未并发脑炎组患儿比较,差异无统计学意义($P>$

0.05);重症组并发脑炎患儿组脑脊液 AQP-4、VCAM-1、NPY 水平高于未并发脑炎组患儿,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表4。

2.4 脑脊液 AQP-4、VCAM-1、NPY 对重症 HFMD 并发脑炎的诊断价值

ROC 曲线显示脑脊液 AQP-4、VCAM-1、NPY 联合诊断的曲线下面积(AUC)分别为0.894,敏感度为81.25%,特异度为90.00%。见表5、图1。

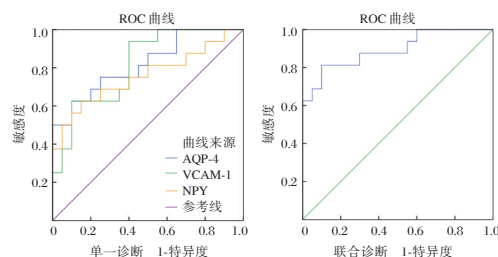


图1 脑脊液 AQP-4、VCAM-1、NPY 单独及联合诊断重症 HFMD 并发脑炎的 ROC

Figure 1 ROC of cerebrospinal fluid AQP-4, VCAM-1 and NPY in the diagnosis of severe HFMD complicated with encephalitis alone and in combination

3 讨论

HFMD 传染性较强,被我国卫生部列为丙类传染病。随着相关疫苗的研发、上市,HFMD 患病率得到良好控制,但少数患儿病情严重,出现神经系统受累的状况。

AQP-4 是近年新发现的一个膜通道蛋白家族的13个成员之一,在介导水跨细胞膜的流动中起关键性作用^[10]。笔者认为,AQP 是一种位于细胞膜上的内在膜蛋白,在细胞膜上组成“孔道”,可控制水分子在细胞内外进出,脑脊液中 AQP-4 表达增加

表4 重症组并发与未并发脑炎患儿一般资料、脑脊液 AQP-4、VCAM-1、NPY 水平比较 ($\bar{x}\pm s$)

Table 4 Comparison of general data and cerebrospinal fluid AQP-4, VCAM-1, NPY levels in severe group with and without encephalitis ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	性别(女/男)	年龄(岁)	病程(d)	AQP-4($\mu\text{g/L}$)	VCAM-1(mg/L)	NPY(g/L)
并发脑炎患儿	16	6/10	3.12 $\pm$ 1.28	2.46 $\pm$ 0.63	26.17 $\pm$ 8.15	18.65 $\pm$ 4.04	405.18 $\pm$ 84.22
未并发脑炎患儿	20	10/10	3.40 $\pm$ 1.42	2.24 $\pm$ 0.71	9.09 $\pm$ 3.02	12.19 $\pm$ 3.11	307.96 $\pm$ 42.53
t 值		0.563	0.614	0.971	9.682	5.425	4.505
P 值		0.453	0.543	0.339	<0.001	<0.001	<0.001

表5 脑脊液 AQP-4、VCAM-1、NPY 诊断重症 HFMD 并发脑炎的价值

Table 5 Value of cerebrospinal fluid AQP-4 VCAM-1 NPY in the diagnosis of severe HFMD complicated with encephalitis

指标	AUC	95%CI	Z 统计	截断值	敏感度(%)	特异度(%)	P 值
AQP-4	0.819	0.655~0.927	4.427	>19.44 $\mu\text{g/L}$	62.50	90.00	<0.001
VCAM-1	0.813	0.648~0.923	4.386	>15.03 mg/L	93.75	60.00	<0.001
NPY	0.756	0.585~0.883	2.935	>375.27 g/L	62.50	85.00	<0.001
联合	0.894	0.746~0.971	7.077	—	81.25	90.00	<0.001

提示脑细胞细胞膜水分子的流动性增强,引发并促进脑水肿发生发展,增加脑组织损伤程度,从而促进重症 HFMD 患儿病情进展。Chen 等^[11]通过构建大鼠模型发现,大鼠创伤性脑损伤后脑脊液 AQP-4 表达显著升高,与脑水肿程度呈正相关。可为临床治疗重症 HFMD 患儿提供新的方向。

本研究结果提示脑脊液中 VCAM-1 表达增加参与 HFMD 病情进展。重症 HFMD 患儿病情累及脑组织,当机体发生病毒侵入机体与脑组织时,促使 T 淋巴细胞激活,诱导活化的炎症因子和细胞,促使内皮细胞 VCAM-1 释放,导致脑脊液中 VCAM-1 水平升高,且重症患儿感染及脑组织损伤严重,VCAM-1 合成、分泌量更高,从而加重患儿病情程度,与 HFMD 病情程度密切相关,可增加不良预后发生风险^[12]。

本研究结果提示 NPY 也可能参与 HFMD 患儿病情进展。NPY 属于胰多肽家族的主要成员,在哺乳动物外周神经系统与中枢神经系统中均有广泛分布,是含量最丰富的神经肽之一,临床已有大量研究证实,NPY 在多种脑损伤疾病(脑炎、脑出血、癫痫等)中水平异常升高,与本研究结果相近^[13-14]。重症 HFMD 患儿感染病情严重,机体长期处于应激、炎症刺激状态,这会刺激神经细胞大量释放 NPY,导致长期的血管收缩,并且通过平滑肌的增殖而重构血管,还能刺激单核细胞激活、迁移,对 T 淋巴细胞功能的增强产生双峰效应,激活血小板,引发动脉粥样硬化,增加脑组织缺血缺氧,促进神经功能受损,加重重症 HFMD 患儿病情程度。因此,本研究结果说明,NPY 可作为评估重症 HFMD 患儿病情、判断预后的重要指标。

目前 HFMD 合并脑炎尚缺乏足够的研究,对于重症 HFMD 合并脑炎的诊断及治疗效果仍不理想,仍需加强相关指标的探索。本研究采用 ROC 曲线发现脑脊液 AQP-4、VCAM-1、NPY 在重症 HFMD 并发脑炎诊断方面均具有重要应用价值,有助于尽早发现重症 HFMD 并发脑炎并给予有效治疗,以改善患者预后。但本研究样本选取量较少,研究结果可能存在一定误差,有待日后进一步证实。

综上所述,重症 HFMD 患儿脑脊液 AQP-4、VCAM-1、NPY 表达水平的异常升高,与病情程度具有密切关联性,有助于评估 HFMD 病情程度,同时能指导临床重症 HFMD 并发脑炎,可为临床制定针对性治疗、干预措施提供重要参考。

参考文献

- [1] 杨坤祥,陈剑虹,贺海林,等. 2014-2016 年惠州市手足口病住院患儿流行病学研究[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2018, 10(1):25-29+66.
- [2] Nakata K, Takeda S, Tanaka A, et al. Antiviral Activity of Acid beta - Glucosidase 1 on Enterovirus 71, a Causative Agent of Hand-Foot-Mouth Disease[J]. J Gen Virol, 2017, 98(4):643-651.
- [3] 闵晓兰,蔡强,卢玉容. 重组人干扰素 α -1b 联合大剂量丙种球蛋白治疗重症手足口病合并病毒性脑炎的疗效[J]. 安徽医学, 2019, 40(4):392-395.
- [4] 朱磊,朱俊岭,盛利平,等. 危重型手足口病患儿水通道蛋白 4 的表达及其临床意义[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2018, 33(22):1716-1719.
- [5] 尹燕泽,许伟,何江龙. VEGF 及 VCAM-1 联合检测对手足口病并脑炎患儿临床诊治的指导意义[J]. 中国地方病防治杂志, 2018, 33(3):334, 336.
- [6] 安闻,范维,何理. 脑脊液和血清 S100 β 蛋白、神经元烯醇化酶、sVCAM-1 和 NPY 对重型手足口病患儿脑损害的评估价值[J]. 临床和实验医学杂志, 2019, 18(5):501-504.
- [7] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 手足口病诊疗指南(2018 年版)[J]. 中国实用乡村医生杂志, 2018, 25(6):8-13.
- [8] 汪受传,王雷,尚莉丽. 中医儿科临床诊疗指南·手足口病(修订)[J]. 世界中医药, 2016, 11(4):734-740.
- [9] Steiner I, Budka H, Chaudhuri A. Viral meningoencephalitis: a review of diagnostic methods and guidelines for management[J]. Eur J Neurol, 2010, 17(8):999-e57.
- [10] Yuan M, Ge M, Yin J, et al. Isoflurane post-conditioning down-regulates expression of aquaporin 4 in rats with cerebral ischemia/reperfusion injury and is possibly related to bone morphogenetic protein 4/Smad1/5/8 signaling pathway [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 97:429-438.
- [11] Chen JQ, Zhang CC, Jiang SN, et al. Effects of Aquaporin 4 Knockdown on Brain Edema of the Uninjured Side After Traumatic Brain Injury in Rats[J]. Med Sci Monit, 2016, 22(1):4809-4819.
- [12] Wu Y. Expression of VEGF and VCAM-1 of Children with Encephalitis Combined with HFMD[J]. J Guiyang Med Coll, 2016, 41(1):80-82.
- [13] 张绎平,韩亚荣,刘云霞,等. 血液透析联合血液灌流治疗尿毒症脑病效果及对患者血清脑源性神经营养因子和神经肽 Y 的影响[J]. 陕西医学杂志, 2019, 48(8):1028-1031.
- [14] Schebesch KM, Bründl E, Schödel P, et al. Differences in Neuropeptide Y Secretion Between Intracerebral Hemorrhage and Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage [J]. J Neurosurg Anesthesiol, 2017, 29(3):312-316.

mNGS技术在儿童重症肺炎病原学诊断中的价值

黄珮琪¹ 陆小霞^{2*} 陈和斌² 杜慧² 李颖² 陈红卫³

[摘要] **目的** 探讨宏基因组二代测序(mNGS)技术在儿童重症肺炎病原学诊断中的价值。**方法** 选取2017年12月至2020年6月武汉儿童医院收治住院治疗的219例社区获得性重症肺炎患儿临床资料,比较肺泡灌洗液mNGS检测与传统实验室病原检测对诊断儿童重症肺炎的诊断价值。**结果** 219例送检标本中mNGS共检出阳性病例190例(86.76%);而传统实验室病原共检出阳性病例173例(78.99%),两种检测方法比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。mNGS和传统实验室病原病原总检出率在各年龄段之间比较,差异有统计学意义($\chi^2=76.4887, P<0.05$)。mNGS与传统实验室病原学检测均阳性患者163例,mNGS与传统实验室病原学检测均阴性患者22例,mNGS阳性而传统实验室病原学检测阴性患者27例,mNGS阴性而传统实验室病原学检测阳性患者7例。mNGS和传统实验室病原诊断儿童重症肺炎病原学灵敏度、特异度比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 二代测序技术较传统实验室病原检测可快速检测重症肺炎患儿病原学诊断,指导临床早期合理用药。

[关键词] 宏基因组二代测序技术;社区获得性重症肺炎

The value of mNGS technology in the etiological diagnosis of severe pneumonia in children

HUANG Peiqi¹, LU Xiaoxia^{2*}, CHEN Hebin², DU Hui², LI Ying², CHEN Hongwei³

(1. Medical College of Jiangnan University, Wuhan, Hubei, China, 430056; 2. Department of Respiration, Wuhan Children's Hospital, Wuhan, Hubei, China, 430015; 3. Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei, China, 430074)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the value of metagenomic next generation sequencing (mNGS) in the etiological diagnosis of severe pneumonia in children. **Methods** The clinical data of 219 children with community-acquired severe pneumonia hospitalized in Wuhan Children's Hospital from December 2017 to June 2020 were selected. The diagnostic value of mNGS detection between alveolar lavage fluid and traditional laboratory pathogen detection in the diagnosis of severe pneumonia in children was compared. **Results** Among the 219 specimens submitted for inspection, 190 positive cases (86.76%) were detected by mNGS detection, and 173 positive cases (78.99%) were detected by traditional laboratory pathogens. The difference between the two detection methods was statistically significant ($P<0.05$). The differences in the total pathogen detection rate of every age bracket were significant between the mNGS and traditional laboratory pathogens detection ($\chi^2=76.4887, P<0.05$). 63 patients were positive in both the mNGS and traditional laboratory pathogenic detection, 22 were negative in the mNGS and traditional laboratory pathogenic detection. 27 patients were positive in the mNGS detection but negative in the traditional laboratory pathogenic detection, and 7 patients were negative in the mNGS but positive in the traditional laboratory pathogen detection. The sensitivity and specificity between the mNGS and traditional laboratory pathogens in the diagnosis of severe pneumonia in children were compared, the differences were statistically significant ($P<0.05$). **Conclusions** Compared with the traditional laboratory pathogen detection, the metagenomic next generation sequencing can quickly detect the pathogenic diagnosis of children with severe pneumonia and guide the rational use of drugs

基金项目:江汉大学研究生科研创新基金项目(YKYCXJJYX18002)

作者单位:1. 江汉大学医学院,湖北,武汉 430056

2. 武汉儿童医院呼吸科,湖北,武汉 430015

3. 华中科技大学医学院,湖北,武汉 430074

*通信作者:陆小霞, E-mail: lusi74@163.com

in the early clinical stage.

[KEY WORDS] Metagenomic next generation sequencing; Community-acquired severe pneumonia

社区获得性肺炎(community acquired pneumonia, CAP)是儿童期常见感染性疾病,也是5岁以下儿童死亡的首位病因^[1]。由于小儿肺功能发育不完全、抵抗力较弱,7%~13%肺炎可发展为重症肺炎,给家庭带来沉重负担^[2-3]。目前常用检查方法有传统微生物培养、核酸扩增检测、分子免疫学检查等,但这些检测方法存在样本处理过程复杂、花费时间长、病原体检测种类少等缺点^[4]。宏基因组二代测序(Metagenomic next generation sequencing, mNGS)是一种不依赖于分离培养的新兴病原体检测技术^[5]。以其不需培养、鉴定速度快、准确率高等优点逐步应用于感染性疾病领域^[6]。本研究对219例社区获得性重症肺炎患儿的病原学mNGS资料进行分析,旨在为临床诊断提供理论依据,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2017年12月至2020年6月武汉儿童医院收治住院治疗的219例社区获得性重症肺炎患儿临床资料。纳入标准:①所有患儿均参照中华医学会儿科学分会呼吸学组制定的《儿童社区获得性肺炎管理指南(2013版)》^[7]。②患儿均有行支气管镜术的适应症^[8],并与家长签署支气管镜检查的知情同意书,且家长同意行mNGS检查。③临床资料完整。排除标准:①因其他原因入院,院内发展为重症肺炎;②合并其他免疫缺陷疾病。本研究经医院伦理委员会批准。

1.2 方法

所有患儿入院当天采样,完善血常规、CRP、PCT、(1,3)- β -D葡聚糖检测(G试验)、半乳甘露聚糖检测(GM试验)、肺炎支原体抗体等检查。219例患儿均进行支气管镜检查,采集其肺泡灌洗液并分为两份,一份送检一般细菌涂片及培养,另一份送检mNGS,标本转运符合规范要求。

1.3 设备与检测方法

采取合格样本,送至华大基因测序仪平台(深圳华大基因股份有限公司,型号:BGISEQ-50)进行检测,经DNA提取、文库构建和测序,测序数据下机后去除低质量和长度小于35 bp的数据以获得高质量的数据。通过BWA(BWA: <http://bio-bwa>.

sourceforge.net/)比对将高质量数据中比对上人参考基因组序列的数据去除。剩下的数据在去除低复杂度reads后与专用4个微生物大数据库比对,获得能够匹配到某种病原体的序列数,根据序列数的高低以及临床其它检测来判断可能的病原体。

1.4 统计学方法

采用SPSS 26.0统计学分析;计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,两组间采用 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 mNGS与传统实验室病原检出分析

2.1.1 病原检出情况

219例送检标本中mNGS共检出阳性病例190例(86.76%);而传统实验室病原共检出阳性病例173例(78.99%),两种检测方法比较,差异有统计学意义($\chi^2 = 4.649, P < 0.05$)。见表1。

2.1.2 年龄分布

mNGS和传统实验室病原病原总检出率在各年龄段之间比较,差异有统计学意义($\chi^2 = 76.4887, P < 0.05$)。见图1。

2.2 肺泡灌洗液mNGS与传统实验室病原诊断儿童重症肺炎病原学诊断结果

mNGS与传统实验室病原学检测均阳性患者163例,mNGS与传统实验室病原学检测均阴性患者22例,mNGS阳性而传统实验室病原学检测阴性患者27例,mNGS阴性而传统实验室病原学检测阳性患者7例。

2.3 肺泡灌洗液mNGS与传统实验室病原诊断儿童重症肺炎病原学灵敏度、特异度

mNGS与传统实验室病原诊断儿童重症肺炎病原学灵敏度、特异度比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表2。

3 讨论

现临床对于微生物分离培养技术依赖病原体活力;但由于病灶受纤维组织包围影响及抗生素的应用,阳性培养率较低,无法满足快速、准确诊断感染需求^[7-8]。mNGS是临床中新推出的病原学检测方式,其只需提取患儿少量DNA即可快速检测鉴定病

表1 不同年龄组患儿二代测序及传统实验室病原检出情况及病原体类型 [$n(\%)$]Table 1 Second generation sequencing and traditional laboratory pathogen detection and pathogen types in children of different age groups [$n(\%)$]

病原体	株数(检出率)	0~	6月~	1岁~	3岁~	5岁~
革兰氏阳性菌 19(8.68)	肺炎链球菌	9(4.11)	1(6.25)	1(2.27)	3(3.26)	1(2.17)
	金黄色葡萄球菌	3(1.37)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	2(4.35)
	屎肠球菌	2(0.91)	0(0.00)	1(2.27)	0(0.00)	1(2.17)
	优美颗粒链菌	1(0.46)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	1(2.17)
	轻型链球菌	1(0.46)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	1(2.17)
	龋齿放线菌	1(0.46)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	1(2.17)
	黏液罗氏菌	1(0.46)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	1(2.17)
	化脓性链球菌	1(0.46)	0(0.00)	0(0.00)	1(1.09)	0(0.00)
	鲍曼不动杆菌	8(3.65)	1(6.25)	2(4.55)	2(2.17)	1(2.17)
	流感嗜血杆菌	5(2.28)	0(0.00)	0(0.00)	3(3.26)	1(2.17)
革兰氏阴性菌 22(10.05)	卡他莫拉菌	3(1.37)	1(6.25)	1(2.27)	0(0.00)	0(0.00)
	不液化莫拉菌	2(0.91)	0(0.00)	0(0.00)	2(2.17)	0(0.00)
	脱氮假单胞菌	1(0.46)	0(0.00)	0(0.00)	1(1.09)	0(0.00)
	铜绿假单胞菌	1(0.46)	0(0.00)	0(0.00)	1(1.09)	0(0.00)
	肺炎克雷伯菌	1(0.46)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	1(2.86)
	羧基酮丛毛单胞菌	1(0.46)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	1(2.86)
	烟曲霉	9(4.11)	1(6.25)	3(6.82)	0(0.00)	2(4.35)
	产黄青霉	1(0.46)	1(6.25)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)
	米曲霉	1(0.46)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	1(2.17)
	黄曲霉	1(0.46)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	1(2.17)
真菌 13(5.94)	白色念珠菌	1(0.46)	0(0.00)	1(2.27)	0(0.00)	0(0.00)
	人类腺病毒 7 型	135(61.64)	8(50.00)	30(68.18)	56(60.87)	23(50.00)
	腺相关病毒 2 型	2(0.91)	0(0.00)	0(0.00)	1(1.09)	0(0.00)
	人类腺病毒 55 型	1(0.46)	0(0.00)	1(2.27)	0(0.00)	0(0.00)
	人类疱疹病毒 5 型	4(1.83)	0(0.00)	0(0.00)	3(3.26)	1(2.17)
	人类疱疹病毒 6B 型	2(0.91)	0(0.00)	0(0.00)	1(1.09)	1(2.17)
	人类疱疹病毒 7 型	1(0.46)	0(0.00)	0(0.00)	1(1.09)	0(0.00)
	人类疱疹病毒 1 型	1(0.46)	0(0.00)	0(0.00)	1(1.09)	0(0.00)
	EBV	2(0.91)	0(0.00)	1(2.27)	1(1.09)	0(0.00)
	人类博卡病毒 1 型	1(0.46)	1(6.25)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)
TB		1(0.46)	0(0.00)	0(0.00)	1(1.09)	0(0.00)
肺炎支原体		24(10.96)	2(12.50)	2(4.55)	11(11.96)	7(15.22)
耶氏肺孢子虫		5(2.28)	0(0.00)	1(2.27)	3(3.26)	0(0.00)
合计		233	16	44	92	46

续表 1

Continued Table 1

病原体	传统实验室病原 检测结果	0~	6月~	1岁~	3岁~	5岁~
革兰氏阳性菌 16(7.65)	肺炎链球菌	8(3.82)	1(7.14)	1(7.14)	2(14.29)	1(7.14)
	金黄色葡萄球菌	3(1.43)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	2(14.29)
	屎肠球菌	2(0.95)	0(0.00)	1(7.14)	0(0.00)	1(7.14)
	优美颗粒链菌	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)
	轻型链球菌	1(0.47)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	1(7.14)
	龋齿放线菌	1(0.47)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	1(7.14)
	黏液罗氏菌	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	1(7.14)
	化脓性链球菌	1(0.47)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)
	鲍曼不动杆菌	6(2.87)	1(7.14)	1(7.14)	1(7.14)	2(14.29)
	流感嗜血杆菌	4(1.91)	0(0.00)	0(0.00)	2(14.29)	1(7.14)
革兰氏阴性菌 17(8.13)	卡他莫拉菌	3(1.43)	1(7.14)	0(0.00)	0(0.00)	1(7.14)
	不液化莫拉菌	2(0.95)	0(0.00)	0(0.00)	1(7.14)	0(0.00)
	脱氮假单胞菌	1(0.47)	0(0.00)	0(0.00)	1(7.14)	0(0.00)
	铜绿假单胞菌	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)
	肺炎克雷伯菌	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)
	羧基酮丛毛单胞菌	1(0.47)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	1(7.14)
	烟曲霉	8(3.82)	1(7.14)	2(14.29)	0(0.00)	2(14.29)
	产黄青霉	1(0.47)	1(7.14)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)
	米曲霉	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	1(7.14)
	黄曲霉	1(0.47)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)
真菌 10(4.78)	白色念珠菌	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)
	人类腺病毒 7 型	129(61.72)	8(57.14)	27(192.86)	54(385.71)	22(157.14)
	腺相关病毒 2 型	2(0.95)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	1(7.14)
	人类腺病毒 55 型	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)
	人类疱疹病毒 5 型	3(1.43)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	2(14.29)
	人类疱疹病毒 6B 型	2(0.95)	0(0.00)	0(0.00)	1(7.14)	1(7.14)
	人类疱疹病毒 7 型	1(0.47)	0(0.00)	0(0.00)	1(7.14)	0(0.00)
	人类疱疹病毒 1 型	1(0.47)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	1(7.14)
	EBV	1(0.47)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	1(7.14)
	人类博卡病毒 1 型	1(0.47)	0(0.00)	1(7.14)	0(0.00)	0(0.00)
TB		0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)
肺炎支原体		22(10.52)	1(7.14)	1(7.14)	8(57.14)	9(64.29)
耶氏肺孢子虫		4(1.91)	0(0.00)	0(0.00)	2(14.29)	1(7.14)
合计		209	14	35	70	51

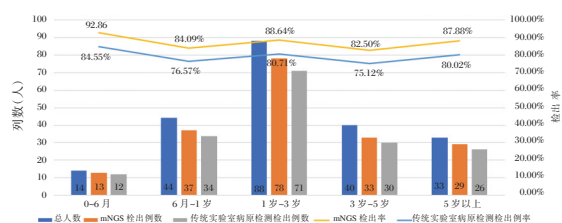


图1 不同年龄段患儿病原检出情况

Figure 1 Detection of pathogens in children of different ages

表2 肺泡灌洗液 mNGS 与传统实验室病原诊断儿童重症肺炎病原学灵敏度、特异度 (%)

Table 2 sensitivity and specificity of alveolar lavage fluid (BALF) mngs and traditional laboratory pathogens in the diagnosis of severe pneumonia in children (%)

检测方法	阳性	阴性	灵敏度	特异度	χ^2 值	P值
mNGS	190	29	90.87	9.13	4.649	0.031
传统病原学检测	173	46	79.00	21.00		

原体;具有其通量高、敏感性高、无偏倚等优势。本研究显示,采用 mNGS 检测重症肺炎病原检出率达 86.76%,略高于上海^[9]、南京^[10]等地的报道。且病原检出以病毒检出率最高,其次为细菌、肺炎支原体、真菌等。与房亚菲等^[11]收集了 586 例社区获得性肺炎患儿的病原学资料检出病原结构相似。

而病毒病原学诊断中,mNGS 共检出病毒阳性者 149 例,其中 135 例腺病毒 7 型阳性。孙永峰等^[12]分析了 2016 至 2017 年 198 例重症肺炎患儿病原学特点,结果发现呼吸道合胞病毒最多见,腺病毒排第二,明显低于本研究结果。考虑腺病毒感染具有明显季节性,且与地域有关。本研究取样期间武汉市儿童呼吸道主要流行病原为腺病毒 7 型,故样本中腺病毒 7 型占主要比例。腺病毒 7 型作为腺病毒目前已知的 100 多个基因型之一,具有组织嗜性广特点。其严重时可致多脏器功能障碍,诱发病死率高^[13]。目前尚无针对腺病毒 7 型感染后遗症的有效治疗方案。因此,对于重症腺病毒肺炎,早期使用 mNGS 不仅有助于在病程早期阶段确诊病原,及时治疗,减少后遗症的产生。还可以判断是否有混合感染,避免不必要的抗生素使用,造成耐药的情况。

另本研究对比 mNGS 以及传统实验室病原检测结果与传统 ELISA 检查比较,mNGS 对于病毒的检测能够有效的克服前者缺陷,对于病毒抗体的检测达到精确性和及时性。郭玮等^[14]对 198 例重症肺炎患儿进行病原学分析,革兰阳性菌中,同样以肺炎链球菌及金黄色葡萄球菌为主。而革兰阴性

菌中,则以鲍曼不动杆菌及肺炎克雷伯杆菌为主,流感嗜血杆菌仅排第四。本研究结果与之有部分差异,考虑可能与不同地区,不同季节气候,也可能与入院前抗生素的使用有关。故使用 mNGS 能够更加精确地诊断重症肺炎,从而对临床的实际治疗进行科学的指导。但进行 mNGS 检测时临床上缺乏标准化流程,且对检测者技术要求极高,因此检测医师应严格把握二代测序的适用条件,避免出现误诊。

综上所述,二代测序技术较传统实验室病原检测可快速检测重症肺炎患儿病原学诊断,指导临床早期合理用药。

参考文献

- [1] 中华医学会儿科学分会呼吸学组. 儿童社区获得性肺炎管理指南(2013 修订)(上)[J]. 中华儿科杂志, 2013, 51(10): 745-752.
- [2] Walker CLF, Rudan I, Liu L, et al. Global burden of childhood pneumonia and diarrhoea[J]. Lancet, 2013, 381(9875): 1405-1416.
- [3] Hu HL, Guo LY, Wu HL, et al. Evaluation of next-generation sequencing for the pathogenic diagnosis of children brain abscesses[J]. J Infect, 2019, 78(4): 323-337.
- [4] 储芳芳,王亚亭,毕良学,等. 重症肺炎合并呼吸衰竭患儿的病原学特征及支气管镜肺泡灌洗术的疗效分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2020, 30(8): 1275-1280.
- [5] 徐智察,赵冬冬,周华,等. 宏基因组测序在感染性疾病病原学诊断中的应用[J]. 中华临床感染病杂志, 2019, 12(4): 32-38.
- [6] Li Z, Wang Y, Wang F. A study on fast calling variants from next-generation sequencing data using decision tree[J]. BMC Bioinformatics, 2018, 19(1): 145.
- [7] Gu W, Miller S, Chiu CY. Clinical Metagenomic Next-Generation Sequencing for Pathogen Detection [J]. Annu Rev Pathol, 2019, 24(14): 319-338.
- [8] 徐凯峰,陈勇. 纤维支气管镜临床应用的适应证和注意事项[J]. 中国全科医学, 2008, (4): 281-283.
- [9] 车大钊,陆权,陆敏,等. 2000 年上海地区儿童急性下呼吸道感染的病原学研究[J]. 中国当代儿科杂志, 2004, 17(2): 136-138.
- [10] 秦铭. 儿童社区获得性肺炎的病原学研究[J]. 临床儿科杂志, 2008, 4(26): 218-221.
- [11] 房亚菲,刘丽娟,霍晨. 儿童社区获得性肺炎的流行特征和临床表现及病原菌调查[J]. 中华医院感染学杂志, 2020, 30(5): 752-756.
- [12] 孙永峰,杨勤,陈敏,等. 198 例小儿重症肺炎病原学分析[J]. 贵州医科大学学报, 2020, 45(3): 345-349+355.
- [13] Ismail AM, Zhou X, Dyer DW, et al. Genomic foundations of evolution and ocular pathogenesis in human adenovirus species D [J]. FEBS Lett, 2019, 593(24): 3583-3608.
- [14] 郭玮,张文馨,邱晨,等. 重症肺炎患儿病原学调查及病原菌耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2017, 27(21): 4998-5001.

OPN 基因多态性与潮汕人群女性 SLE 发病风险的相关性

陈新瑶¹ 丁燕佳¹ 梁雪雁¹ 黄慧莹¹ 韦华贵² 王俊利² 林敏^{3*}

[摘要] **目的** 探讨骨桥蛋白(OPN)基因三个单核苷酸多态性(SNP)位点 *rs1126772*、*rs11728697* 和 *rs4754* 与潮汕人群女性系统性红斑狼疮(SLE)发病风险的相关性。**方法** 选取2018年1月至2019年12月在汕头大学医学院附属潮州市人民医院以及汕头大学医学院第一附属医院就诊的59例SLE女性患者作为研究组,选取同期94例健康人作为对照组,采用PCR-Sanger测序与高分辨率熔解曲线(HRM)分析法确认 *rs1126772*、*rs11728697* 和 *rs4754* 的基因型,Logistic 回归分析 SNP 与 SLE 的相关性。**结果** 研究组和对照组中 *rs1126772*、*rs11728697* 和 *rs4754* 位点的基因型分布比较差异无统计学意义($P>0.05$),与 SLE 的临床症状无关($P>0.05$)。**结论** 潮汕人群女性 OPN 基因的 *rs1126772*、*rs11728697* 和 *rs4754* 位点与 SLE 发病风险无关。

[关键词] 骨桥蛋白; 系统性红斑狼疮; 单核苷酸多态性

Association between osteopontin genetic polymorphism and the risk of systemic lupus erythematosus in Chaoshan women

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

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

[ABSTRACT] **Objective** To explore the relationship between the three single nucleotide polymorphism (SNP) sites *rs1126772*, *rs11728697* and *rs4754* of the osteopontin (OPN) gene and the risk of systemic lupus erythematosus (SLE) in Chaoshan women. **Method** A total of 59 female SLE patients treated at Chaozhou People's Hospital Affiliated to Shantou University Medical College and the First Affiliated Hospital of Shantou University Medical College from January 2018 to December 2019 were recruited as the research group. 94 healthy people during the same period were selected as the control group. PCR-Sanger sequencing and high-resolution melting curve (HRM) analysis were used to confirm the genotypes of *rs1126772*, *rs11728697* and *rs4754*, and the correlation between SNP and SLE was analyzed by Logistic regression. **Results** There was no significant difference in the genotype distribution of *rs1126772*, *rs11728697* and *rs4754* between the research group and the control group ($P>0.05$) and it was not associated with the clinical symptoms of SLE ($P>0.05$). **Conclusion** The *rs1126772*, *rs11728697* and *rs4754* loci of OPN gene in Chaoshan women are not associated with the risk of SLE.

[KEY WORDS] OPN; SLE; SNP

基金项目: 广东省医学科学技术研究基金项目(B2019232); 广西省自然科学基金重点项目(AB18221029; 2019JJD140052); 广东省教育厅重点项目(2019-GDXK-0031)

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

2. 右江民族医学院检验学院, 广西, 百色 533000

3. 韩山师范学院食品工程与生命科学院, 广东, 潮州 521011

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

系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)是一种累及多器官、多系统、临床表现复杂且病程反复的自身免疫性疾病。相关文献报道SLE发病机制是某些环境因素作用于一定遗传背景的机体引发自身免疫调节失衡而致^[1]。骨桥蛋白(osteopontin, OPN)是一种细胞外基质磷酸化糖蛋白,在细胞表面与其受体结合并诱导细胞信号转化,促进细胞的黏附和迁移,在免疫系统的疾病进程中发挥着重要的调节作用^[2]。OPN也称为早期T1型淋巴细胞因子,由多种免疫细胞产生并在人体的骨、肾、脑等多种组织中表达。近年研究发现,OPN参与了免疫炎症、肿瘤细胞凋亡等^[3]。目前OPN基因多态性与SLE发病风险的报道仍较为少见,研究表明,OPN在SLE中高表达^[4-5]。李兴锐等^[6]报道提示研究基因的多态性与人类特殊疾病的关联性具有重大的意义。本课题将探究OPN基因多态性rs1126772、rs11728697和rs4754位点与女性SLE患者发病风险的相关性,为潮汕地区女性SLE患者的预防和治疗提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 病例来源

选取2018年1月至2019年12月汕头大学医学院附属潮州市人民医院以及汕头大学医学院第一附属医院就诊的59例SLE女性患者作为研究组,平均年龄(38.05±8.45)岁。纳入标准:①所有病例均符合《2019欧洲抗风湿病联盟/美国风湿病学会系统性红斑狼疮分类标准发布》^[7];②通过身份信息及询问确认患者和健康对照人群均为潮汕人,居住在中国潮州的同一地理区域。排除标准:①结缔组织疾病;②血液系统疾病;③感染性疾病;④恶性肿瘤。在同一时期招募94名年龄匹配的女性作为对照组,平均年龄(44.66±7.13)岁。两组年龄比较差异无统计学意义($P>0.05$)。本研究已获得本院伦理委员会批准,所有患者均签订知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 基因组DNA提取

采用EDTA-K2抗凝真空管采集受试者外周血2 mL,按照血液基因组DNA提取试剂盒(DP348)(天根生化科技有限公司,北京)操作说明书提取人外周血白细胞基因组DNA。采用全波长酶标仪Multiskan GO(赛默飞世尔科技,德国)测定DNA浓度,-70℃保存备用。

1.2.2 引物设计及反应体系

根据NCBI的OPN基因参考序列NC_000004.12,采用LightScanner引物设计软件(Idaho Technology Idaho Technology,美国)设计高分辨率熔解曲线(High Resolution Melting, HRM)的引物(表1)所有引物由苏州金唯智生物科技有限公司合成。PCR反应体系为:扩增体系为20 μL,其中包括基因组DNA 100 ng,100 μmol/L dNTPs,上下游引物各0.2 μM,1 μL LC Green plus,4 μL 5×PCR buffer,0.5 U HotStar Taq DNA聚合酶,纯净水9.2 μL。在LifeTouch基因扩增仪TC-96(博日科技,杭州)进行反应,反应条件为:94℃预变性3 min;94℃变性10 s,60℃退火10 s,72℃延伸15 s,35个循环。

1.2.3 SNP的基因分型

PCR扩增结束后,使用LightScanner 96分析仪对产物进行基因分型,在70℃~95℃范围内收集荧光信号并绘制熔解曲线,采用已测序验证的DNA作为标准品,熔解温度相同的归为同一基因型。将本实验中三个位点的HRM分型结果统计分类后,抽取部分样本采用同样的引物进行测序验证。

1.2.4 基因测序验证

根据NCBI的OPN基因参考序列NC_000004.12和SNP位点,采用Primer Premier 5.0软件设计测序引物(表1)。扩增体系为50 μL,其中包括基因组DNA 100 ng,200 μmol/L dNTPs,2.0 mmol/L MgCl₂,上下游引物各1 μmol/L,2.5 U Taq DNA聚合酶,5 μL 10×PCR buffer,纯净水36 μL。反应条件为:94℃预变性3 min;94℃变性10 s,60℃退火10 s,72℃延伸15 s,35个循环。扩增结束后用2%的琼脂糖凝胶电泳对产物进行鉴定,纯化,使用ABI3730双向测序,与标准序列比对查找突变点。

1.3 统计学分析

采用SPSS 20.0软件包进行统计分析。Logistic回归分析影响SLE临床症状的SNP分型危险因素;计数资料以 $n(\%)$ 表示,行 χ^2 检验,采用 χ^2 检验以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 熔解曲线分型与测序验证

测序结果与HRM分型结果100%一致。见图1~3。

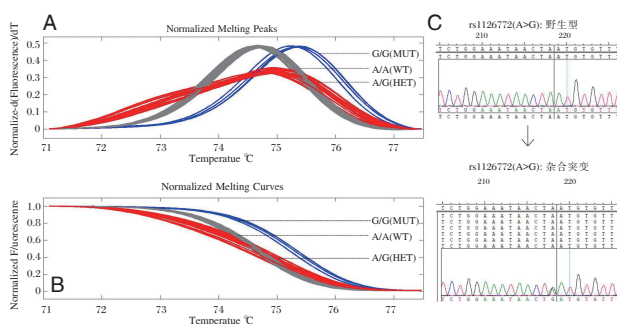
2.2 两组OPN基因SNP比较

研究组和对照组的OPN rs1126772、rs11728697

表1 *OPN* 基因三个 SNPs 的 HRM 引物及测序引物Table 1 HRM primers and Sequencing primers of 3 SNPs of *OPN* gene

SNP	HGVS 名称	用途	引物名称	序列 5'-3'	产物(bp)
<i>rs1126772</i>	<i>NC_000004.12:g.87983034A>G</i>	HRM	HRM-F2	ATGTGTATCTATTTGAGTCTGGA	67
			HRM-R2	CATGAAGCCACAACTAACT	
		测序	SQ-F2	CGTATTTCTCATGAATTAGATAGTGC	361
			SQ-R2	TGGGTAAAAGTATTTGTTTGCTTC	
<i>rs11728697</i>	<i>NC_000004.12:g.87977789 C>T</i>	HRM	HRM-F3	GCACACAGAGTTCAATTCCAGT	75
			HRM-R3	GTCTAATTGCAGTGACCCCAA	
		测序	SQ-F3	ATTTGACCAGCACTAAAGATGTACC	354
			SQ-R3	AAAAGACGCTAATTCTTGCTCA	
<i>rs4754</i>	<i>NC_000004.12:g.87981540T>C</i>	HRM	HRM-F1	GTCCAACGAAAGCCATGACCAC	79
			HRM-R1	AATGGAGTCCTGGCTGTCCAC	
		测序	SQ-F1	GGAAGATGCTCACTTTAGCTCC	427
			SQ-R1	TCACCTCGGCCATCATATGTGT	

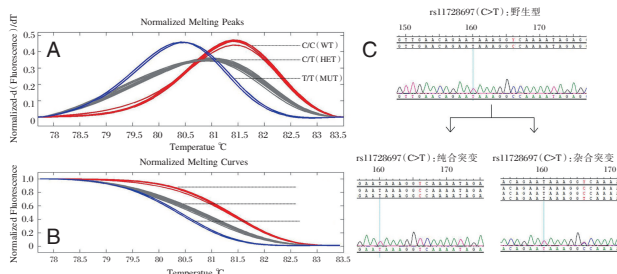
注:HGVS:人类基因组变异协会(Human Genome Variation Society)。



注:A为高分辨熔解曲线分析温度-荧光导数曲线图;B为高分辨熔解曲线分析温度-荧光曲线图;C为Sanger测序图。

图1 高分辨率熔解曲线和PCR-Sanger测序分析 *OPN_rs1126772* 位点基因型的结果

Figure 1 High Resolution Melting curves and PCR-Sanger sequencing result of *OPN_rs1126772* genotyping

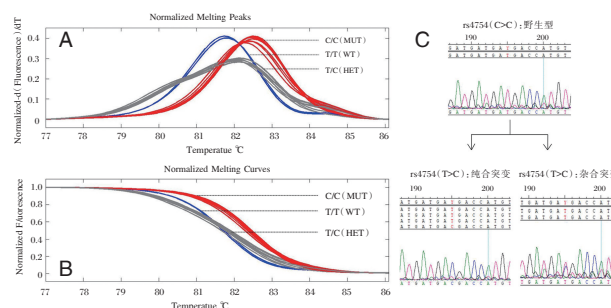


注:A为高分辨熔解曲线分析温度-荧光导数曲线图;B为高分辨熔解曲线分析温度-荧光曲线图;C为Sanger测序图。

图2 高分辨率熔解曲线和PCR-Sanger测序分析 *OPN_rs11728697* 位点基因型的结果

Figure 2 High Resolution Melting curves and PCR-Sanger sequencing result of *OPN_rs11728697* genotyping

及 *rs4754* 位点的基因频率均符合群体基因遗传平衡 ($P>0.05$)。研究组和对照组 *rs1126772*、*rs11728697* 及 *rs4754* 基因型分布频率比较,差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见表2。



注:A为高分辨熔解曲线分析温度-荧光导数曲线图;B为高分辨率熔解曲线分析温度-荧光曲线图;C为Sanger测序图。

图3 高分辨率熔解曲线和PCR-Sanger测序分析 *OPN_rs4754* 位点基因型的结果

Figure 3 High Resolution Melting curves and PCR-Sanger sequencing result of *OPN_rs4754* genotyping

2.3 *OPN* 基因 SNPs 与 SLE 关联性

59例SLE患者的临床表型:狼疮性肾炎24例、蝶形红斑11例、关节炎13例、血液系统病变18例、神经系统病变7例,其中15例合并2种及以上临床并发症。通过分析,*OPN* 基因 *rs1126772*、*rs11728697* 及 *rs4754* 位点与SLE患者的临床表型差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见表3。

3 讨论

目前我国估计超过100万SLE患者,而女性SLE患者发病率高达113/10万人,且有逐年递增的趋势^[8]。SLE发病机制复杂,多种遗传基因与SLE关联密切^[6,9],因此探索与SLE发病风险相关的基因是目前研究其发病机制的热点之一。李星军等^[10]报道SLE患者白细胞免疫球蛋白样受体 *LIL-RA2* 基因多态性位点(*rs2241524*) ($G>A$)与SLE的发病风险相关。吴成将等^[11]研究表明 *CD40* 基因多

表2 *OPN* SNPs 位点在研究组与对照组的基因型分布频率 [(n, %)]Table 2 Genotypes distribution frequency of *OPN* SNP sites in both research group and control group [(n, %)]

SNP 位点 基因型	n	<i>rs1126772</i>			<i>rs11728697</i>			<i>rs4754</i>		
		GG	AG	AA	TT	CT	CC	CC	TC	TT
研究组	59	5(8.47)	21(35.59)	33(55.94)	3(5.08)	30(50.85)	26(44.07)	27(45.76)	26(44.07)	6(10.17)
对照组	94	5(5.32)	42(44.68)	47(50.00)	4(4.26)	47(50.00)	43(45.74)	52(55.32)	36(38.30)	6(6.38)
χ^2 值			0.367			0.041			0.719	
P 值			0.545			0.839			0.396	

表3 *OPN* 基因 *rs1126772*、*rs11728697* 和 *rs4754* 位点与 SLE 患者临床表型的相关性 [(n, %)]Table 3 Correlation between *rs1126772*, *rs11728697* and *rs4754* of *OPN* gene and the clinical phenotype of SLE patients [(n, %)]

临床表型		<i>rs1126772</i>			<i>rs11728697</i>			<i>rs4754</i>		
		GG/AG	AA	P 值	TT/CT	CC	P 值	CC/TC	TT	P 值
狼疮性肾炎	是	10(16.95)	14(23.73)	0.336	14(23.73)	10(16.95)	0.51	23(38.99)	1(1.69)	0.198
	否	16(27.12)	19(32.20)		19(32.20)	16(27.12)		30(50.85)	5(8.47)	
蝶形红斑	是	4(6.78)	7(11.86)	0.454	6(10.17)	5(8.47)	0.686	10(16.95)	1(1.69)	0.788
	否	22(37.29)	26(44.07)		27(45.76)	21(35.60)		43(72.89)	5(8.47)	
关节炎	是	8(13.56)	5(8.47)	0.148	8(13.56)	5(8.47)	0.377	12(20.34)	1(1.69)	0.959
	否	18(30.51)	28(47.46)		25(42.37)	21(35.60)		41(69.50)	5(8.47)	
血液系统病变	是	7(11.86)	11(18.64)	0.543	8(13.56)	10(16.95)	0.293	15(25.42)	3(5.08)	0.386
	否	19(32.20)	22(37.30)		25(42.37)	16(27.12)		38(64.42)	3(5.08)	
神经系统病变	是	3(5.08)	4(6.78)	0.859	4(6.78)	3(5.08)	0.742	5(8.47)	2(3.39)	0.103
	否	23(38.99)	29(49.15)		29(49.15)	23(38.99)		48(81.36)	4(6.78)	

态性会增加 SLE 患者的易感性并且与患者病情有关。董鑫等^[12]研究指出 *Fcγ* 受体基因 *rs396991A/C* 位点基因多态性与 SLE 易感性有关,携带其 AA、AC 基因型的 SLE 患者分别更易出现血液、肾脏系统受累。本课题所研究的 *OPN* 基因是目前已知与 SLE 易感性相关的关键基因之一,此前已有多项研究表明其二者之间的关联性。Forton 等^[13]发现 SLE 患者和正常对照人群 *OPN* 基因的多态性与该病存在显著的相关性,提示 *OPN* 基因的多态性可能在 SLE 的发病中发挥着重要的作用。Kaleta 等^[14]的研究表明, *OPN_rs1126616* 的杂合或纯合突变(707C/T)的个体具有更高的 SLE 易感性。石凤等^[15]研究指出 *OPN_rs2853750* 可能是 SLE 女性患者并发关节炎的易感位点。对于 *OPN* 基因影响 SLE 的作用机制也被广泛研究: *OPN* 水平增加与 SLE 疾病活动指数(SLEDAI: Disease Activity Index)呈正相关^[16]。直至目前为止,未发现有报道 *OPN* 基因 *rs1126772*、*rs11728697* 及 *rs4754* 位点与 SLE 易感性相关的研究,本课题填补了这一研究方向的空白,为后续的研究提供参考和依据。

值得关注的是,此前一项研究提示,合并肾炎的 SLE 患者 *OPN* 的表达水平高于非肾炎组^[17]。本研究收集的 SLE 病例样本在临床表型中合并狼疮性肾炎的病例不在少数,回归分析结果表明 *OPN* 基因上述三个位点可能与狼疮性肾炎表型不具有相关性。本

研究尚有几方面不足:首先,由于本研究只选取了 *OPN* 基因中的 3 个 SNPs,而且只局限于潮汕地区人群;其次,收集的样本病例数较少且只收集单一性别女性患者标本,研究结果可能不具有广泛的代表性。因此, *OPN* 基因更多相关位点以及不同性别人群与 SLE 是否存在相关性尚待扩大区域以及增加实验样本数量进行深入的综合分析,以期更进一步发现 *OPN* 基因的多态性与 SLE 发病风险的相关性,为该病的发病机制寻求更多的有效信息和有力的理论依据。此外,本研究的另一个限制是没有测量血浆 *OPN* 浓度,这可能成为最终结论更有力的支持,并且可能与 *OPN* 基因型依赖性差异相关。综上所述, SLE 疾病复杂多变,本研究从 *OPN* 基因多态性阐述了 SLE 与健康人群的疾病易感性差异,为进一步从分子水平更深入研究其发病机制提供了思路。

参考文献

- [1] Dörner T, Furie R. Novel paradigms in systemic lupus erythematosus[J]. Lancet, 2019, 393(10188): 2344-2358.
- [2] Spinelli FR, Garufi C, Truglia S, et al. The role of osteopontin as a candidate biomarker of renal involvement in systemic lupus erythematosus[J]. Clin Exp Rheumatol, 2019, 37(6): 899-905.
- [3] 樊梅,王宋平. 骨桥蛋白与肺部疾病关系的研究进展[J]. 中国呼吸与危重监护杂志, 2017, 16(5): 525-528.

(下转第 367 页)

miR-200a和YAP1在肺癌的不同表达及病理学意义

宰国真^{1*} 李维山² 何晓燕¹

【摘要】目的 探讨非小细胞肺癌(NSCLC)中 miR-200a 与 Yes 相关蛋白 1(YAP1)表达量在癌组织和癌旁组织的相关性及其临床病理意义。**方法** 回顾性选取 259 例非小细胞肺癌患者术后切除的肿瘤组织及癌旁组织为本次研究对象,采用 RT-PCR 方法检测并比较患者的 miR-200a 与 YAP1 表达量在癌组织和癌旁组织的相关性及其临床病理意义。**结果** 所选患者中 miR-200a 及 YAP1 在非小细胞肺癌中表达量显示,miR-200a 与 YAP1 的表达量在病理类型、浸润深度、肿瘤分级、肿瘤数目中的比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。miR-200a 与 YAP1 的表达量在肿瘤分化程度、淋巴结转移的比较中,差异有统计学意义($P<0.05$)。所选患者中 miR-200a、YAP1 在非小细胞肺癌组织表达量比癌旁组织较高,其中,YAP1 的非小细胞肺癌组织表达量水平明显高于 miR-200a 的表达量水平,差异有统计学意义($P<0.05$)。miR-200a、YAP1 对非小细胞肺癌 ROC 曲线显示,miR-200a 的 ROC 曲线下面积 0.689 比 YAP1 的 0.666 大,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** miR-200a、YAP1 表达量水平与非小细胞肺癌临床病理严重程度呈正相关,对非小细胞肺癌诊断有一定预测价值。

【关键词】 非小细胞肺癌; miR-200a; YAP1; Rt-pcr; 临床病理意义

Differentiate expression and pathological significance of miR-200a and YAP1 in lung cancer

ZAI Guozhen^{1*}, LI Weishan², HE Xiaoyan¹

(1. Department of Pathology, the Fifth Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan, China, 450052; 2. Department of Pathology, Jiyuan Cancer Hospital, Jiyuan, Henan, China, 454650)

【ABSTRACT】 Objective To investigate the correlation between the expression of miR-200a and Yes-associated protein 1 (YAP1) in non-small cell lung cancer (NSCLC) and its clinicopathological significance. **Methods** A total of 259 non-small cell lung cancer patients were retrospectively enrolled in this study. The tumor tissues and adjacent tissues were collected. RT-PCR was used to detect and compare the expression of miR-200a and YAP1 in cancer tissues and adjacent tissues. The relevance and its clinicopathological significance was analyzed. **Results** There was no significant difference of the expression miR-200a and YAP1 levels in pathological type, depth of invasion, tumor grade, and number of tumors ($P>0.05$). The expression levels of miR-200a and YAP1 were significantly different in the comparison of tumor differentiation and lymph node metastasis ($P<0.05$). The expression levels of miR-200a and YAP1 in non-small cell lung cancer tissues were higher than those in adjacent tissues. Among them, the expression level of YAP1 in non-small cell lung cancer tissues was significantly higher than that of miR-200a. The difference was statistically significant ($P<0.05$). The area under the ROC curve of miR-200a (0.689) was larger than that of YAP1 (0.666), and the difference was statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** The expression levels of miR-200a and YAP1 are positively correlated with the clinicopathological severity of non-small cell lung cancer and have certain predictive value for the diagnosis of non-small cell lung cancer.

【KEY WORDS】 Non-small cell lung cancer; miR-200a; YAP1; Clinicopathological significance

作者单位:1. 郑州大学第五附属医院病理科,河南,郑州 450052

2. 济源市肿瘤医院病理科,河南,济源 454650

*通信作者:宰国真, E-mail: zaiguozhen@163.com

非小细胞肺癌(Non-small cell lung cancer, NSCLC)患者占肺癌患者的85%,且大约70%的患者处于中晚期。近几年在我国发病率逐渐上升,患者的生活及健康受到严重影响^[1-2]。近年来,随着遗传学、分子生物学等科学实验室检测方法的飞速发展,其在临床实践中的广泛应用,肺癌的诊断和治疗也取得了一定的进展^[3]。然而缺乏有效的早期发现和诊断方法,大多数患者在被发现时失去了手术的机会,导致患者存活时间不到10%^[4]。Yes相关蛋白1(YAP1)是一种多功能细胞内心和转录共活剂,在正常细胞的信号转导和基因转录调控中发挥作用^[5]。研究发现,miR-200a的异常表达量与恶性肿瘤的发生和发展有一定的关系,miR-200a的表达量在大多数恶性肿瘤中受到抑制或激活,其作用类似于肿瘤抑制基因或肿瘤基因^[6]。目前YAP1蛋白及miR-200a在肺癌中的表达量研究很少,作用机制也不清楚。基于此,本研究为探讨非小细胞肺癌中miR-200a与YAP1表达量在癌组织和癌旁组织的相关性及其临床病理意义。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2017年7月至2020年6月本院和济源市肿瘤医院收治的259例非小细胞肺癌患者术后切除的肿瘤组织及癌旁组织为本次研究对象。纳入标准:①本研究所有患者均符合《美NCCN非小细胞肺癌治疗指南》^[7]对非小细胞肺癌的诊断标准;②所选患者均为初次治疗且未接受放化疗,临床病理资料完整。排除标准:①患者合并全身感染或者其它肿瘤患者;②近3个月有影响miR-200a、YAP1表达量水平的相关药物及手术治疗者;③有严重心、肝、肾疾病等对本实验有干扰者。

1.2 RT-PCR方法检测miR-200a及YAP1的表达量

实验所需引物由上海生工生物科技有限公司合成。miR-200a上游引物:5'-AGTATGTCAGTAGCATGACGAGGT-3';miR-200a下游引物:5'-ATTGATGGCAGTAGCAGTAGCTAA-3'。YAP1上游引物:5'-ACCCACAGCTCAGCATCTTC-3';YAP1下游引物:5'-TCATGGCAAACGAGGGTCA-3'。

用TRIZOL试剂(Invitrogen)按照操作说明书提取肺癌组织、癌旁正常组织的总RNA,提取的RNA经NanoDrop2000C(美国,Thermo Scientific)检测其浓度和纯度,A260/A280比值在1.9左右视

为后续实验使用样本。以其为模板严格按照PrimeScript RT reagent Kit反转录试剂盒(日本,Takara)说明书要求逆转录合成cDNA,采用SYBR Green PCR试剂盒(美国,Thermo Fisher Scientific)进行PCR,终体积25 μ L。每个样本设三个复孔。扩增条件为:预变性95 $^{\circ}$ C 10 min,进入循环,95 $^{\circ}$ C 15 s,58 $^{\circ}$ C 30 s,扩增40个循环。以U6作为内参照校正,用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析基因的相对表达量。

1.3 统计学方法

数据处理运用SPSS 25.0统计进行分析;计数资料以用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,符合正态分布的计量平均数资料并行 t 检验或单因素方差分析;计数资料以 $n(\%)$ 表示,行卡方检验;预测效能应用ROC曲线评价; $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-200a、YAP1表达量与非小细胞肺癌病理特征关系

miR-200a与YAP1表达量在癌组织和癌旁组织的平均年龄、性别、病理类型、肿瘤大小比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。miR-200a表达量与YAP1表达量的分化程度、淋巴结转移比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表1。

2.2 miR-200a与YAP1表达量在癌组织和癌旁组织中的比较

miR-200a、YAP1在非小细胞肺癌组织表达量比癌旁组织较高,YAP1的非小细胞肺癌组织表达量水平明显高于miR-200a的表达量水平,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表2。

2.3 miR-200a、YAP1与非小细胞肺癌的关系

ROC曲线显示,miR-200a面积0.689比YAP1的0.666大,miR-200a与非小细胞肺癌关系密切,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表3、图1。

3 讨论

研究表明,YAP是Hippo通路的核心效应因子,其主要生物效应是调节细胞之间的接触抑制,保持细胞增殖和凋亡之间的平衡^[8]。YAP的过度表达量会导致接触抑制的丧失、细胞增殖过多和凋亡不足^[9]。目前miR-200a的异常表达量与恶性肿瘤的发生和发展密切相关。研究发现,miR-200a在神经母细胞瘤中的表达量明显低于相邻组织。通过靶向AP-2 γ 基因抑制肿瘤细胞增殖和肿

表1 miR-200a、YAP1表达量与非小细胞肺癌病理特征关系分析

Table 1 Analysis of the relationship between the expression of miR-200a, YAP1 and the pathological characteristics of non-small cell lung cancer

组别		<i>n</i>	miR-200a		χ^2 值	<i>P</i> 值	YAP1		χ^2 值	<i>P</i> 值
			癌组织	癌旁组织			癌组织	癌旁组织		
年龄	≤60岁	109	104	105	0.042	0.838	102	107	0.121	0.728
	>60岁	150	73	77			76	74		
性别	女	70	60	10	0.099	0.754	59	11	0.005	0.942
	男	189	159	30			160	29		
分化程度	高、中	179	130	49	5.809	0.016	129	50	6.274	0.012
	低	80	46	34			45	35		
淋巴结转移	有	159	119	40	6.336	0.012	109	50	4.855	0.028
	无	100	60	40			55	45		
病理类型	鳞癌	129	62	67	0.035	0.851	61	68	0.038	0.850
	腺癌	130	64	66			63	67		
肿瘤大小	T1~T2	119	69	50	2.645	0.104	67	52	2.160	0.142
	T3~T4	140	67	73			66	74		
TNM临床分期	I~Ⅱ期	70	60	10	0.099	0.754	59	11	0.005	0.942
	Ⅲ~Ⅳ期	189	159	30			160	29		

表2 miR-200a与YAP1表达量在癌组织和癌旁组织中的比较 ($\bar{x} \pm s$)Table 2 Comparison of the expression levels of miR-200a and YAP1 in cancerous tissues and adjacent tissues in cancerous tissues and adjacent tissues ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	miR-200a表达量	YAP1表达量
癌组织	259	1.78±0.52	2.78±0.79
癌旁组织	259	0.62±0.06	1.62±0.50
<i>t</i> / χ^2 值		35.664	19.968
<i>P</i> 值		0.000	0.000

表3 miR-200a、YAP1与非小细胞肺癌的关系比较

Table 3 Comparison of the relationship between miR-200a, YAP1 and non-small cell lung cancer

检验结果变量	区域	Wald/ χ^2	AUC	95%CI
miR-200a	0.689	0.060	0.004	0.571~0.806
YAP1	0.666	0.061	0.010	0.546~0.787

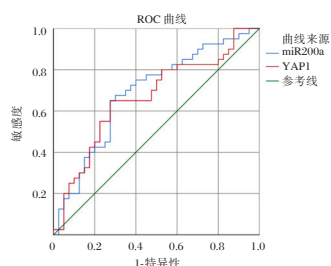


图1 miR-200a、YAP1与非小细胞肺癌的ROC曲线

Figure 1 ROC curve of miR-200a, YAP1 and non-small cell lung cancer

瘤可以实现 miR-200a 的上调节表达量, miR-200a 在乳腺癌中的表达量减少^[10-12]。在多种肿瘤细胞中发现 miR-200a 基因过表达量促进肿瘤发生发展,但目前为止国内外相关文献研究甚少,所选患

者中 miR-200a、YAP1 在非小细胞肺癌组织表达量比癌旁组织较高。

本研究为探讨结果提示 miR-200a 与 YAP1 在非小细胞肺癌的增殖表达量中有重要意义。YAP1 是 Hippo 的主要下游效应因子,可以调节组织平衡、器官体积和肿瘤形成^[13]。Hippo 的某些成分可以抑制细胞增殖,促进凋亡,调节干细胞和祖细胞的增殖,从而在调节器官体积方面发挥重要作用^[14]。Hippo 信号失活可导致 YAP1 去磷酸化积聚于细胞核中,然后向上调节转录因子,从而调节与细胞增殖、干细胞活性和抗凋亡相关的基因表达量^[15]。

miR-200a、YAP1 对非小细胞肺癌 ROC 曲线显示, miR-200a 的 ROC 曲线下面积 0.689 比 YAP1 的 0.666 大,差异有统计学意义。提示 miR-200a、YAP1 表达量水平与非小细胞肺癌临床病理严重程度呈正相关。研究发现, miR-200a 可以通过靶向 EGFR 抑制肺癌细胞的入侵和转移,也可以通过靶向 TSPAN1 来抑制肺肿瘤细胞的入侵^[16]。

本研究存在一定局限性。首先,本研究纳入的样本主要为鳞癌和腺癌,对于其他类型的非小细胞肺癌未进行纳入研究,可能导致研究结果不具有普遍性;其次,所选样本数量较少,研究结果可能存在差异;最后,未进行生存分析及长期随访,对非小细胞肺癌中 miR-200a 与 YAP1 表达量在癌组织和癌旁组织的相关性未能进行长期研究。

综上所述, miR-200a、YAP1 表达量水平与非小细胞肺癌临床病理严重程度呈正相关,对非小细胞肺癌诊断有一定预测价值。

参考文献

- [1] 许文娟, 康妍萌, 周玲, 等. 预后营养指数评估中晚期非小细胞肺癌患者预后的临床应用价值[J]. 中华肿瘤杂志, 2017, 39(2):146-149.
- [2] 赵天源, 常延河, 张艳敏, 等. 非小细胞肺癌中 KiSS-1, MMP-2 和 MVD 的表达及意义[J]. 临床与实验病理学杂志, 2020, 36(2):199-202.
- [3] 中华医学会呼吸病学分会肺癌学组, 中国呼吸肿瘤协作组. 呼吸道感染病——新型冠状病毒肺炎流行期间晚期非小细胞肺癌患者诊疗专家指引(试行)[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2020, 43(4):297-301.
- [4] 刘敏, 温成泉, 高蕾, 等. 非小细胞肺癌几种化疗方案的药物流行病学分析[J]. 中国医刊, 2014, (9):83-85.
- [5] 关勇, 袁智勇. Yap1 在非小细胞肺癌发生发展及治疗中的作用[J]. 中国肿瘤临床, 2018, 45(19):55-58.
- [6] 许璐, 方玉松, 王丹云, 等. miR-200a 抑制 YAP1 基因表达对肺癌细胞增殖的影响[J]. 中国肿瘤临床, 2017, 44(7):311-315.
- [7] Ettinger DS, Wood DE, Aisner DL, et al. Non-Small Cell Lung Cancer, Version 5.2017, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology [J]. J Natl Compr Canc Netw, 2017, 15(4):504-535.
- [8] 蒋庚西, 李春光, 赵铁军, 等. 沉默 Yes 相关蛋白 1 对人非小细胞肺癌细胞增殖和侵袭的影响[J]. 第二军医大学学报, 2017, 38(8):1004-1008.
- [9] 李斯文, 王珊, 杨超, 等. 神经母细胞瘤中 Yes 相关蛋白 1 的表达及其与药物敏感性关系的研究[J]. 中华小儿外科杂志, 2019, 40(6):494-498.
- [10] Wu DM, Wang S, Wen X, et al. LncRNA SNHG15 acts as a ceRNA to regulate YAP1-Hippo signaling pathway by sponging miR-200a-3p in papillary thyroid carcinoma [J]. Cell Death Dis, 2018, 20, 9(10):947.
- [11] Yu SJ, Yang L, Hong Q, et al. MicroRNA-200a confers chemoresistance by antagonizing TP53INP1 and YAP1 in human breast cancer [J]. BMC Cancer, 2018, 18(1):74.
- [12] Yu SJ, Yang L, Hong Q, et al. MicroRNA-200a confers chemoresistance by antagonizing TP53INP1 and YAP1 in human breast cancer [J]. BMC Cancer, 2018, 18(1):74.
- [13] Yu SJ, Hu JY, Kuang XY, et al. MicroRNA-200a promotes anoikis resistance and metastasis by targeting YAP1 in human breast cancer [J]. Clin Cancer Res, 2013, 19(6):1389-1399.
- [14] 陈顺华, 尹玉, 曹立宇, 等. YAP1 和 β -catenin 在大肠癌中的表达及相关性研究[J]. 安徽医科大学学报, 2016, 51(6):836-840.
- [15] 冯亮, 蒋伏松. YAP1 基因沉默诱导甲状腺癌细胞凋亡及逆转免疫抑制的机制研究[J]. 医学分子生物学杂志, 2019, 16(4):345-349.
- [16] 倪雯, 刘佳, 张弘雅. miR-29/miR-200a 在妊娠期糖尿病患者外周血中表达及临床意义[J]. 中国计划生育学杂志, 2018, 26(10):65-68.
- (上接第 363 页)
- [4] Pasha HF, Tantawy EA, Youssef MA. Osteopontin and interleukin-17A genes polymorphisms in Egyptian systemic lupus erythematosus patients: A relation to disease activity and severity [J]. Gene, 2019, 702:107-113.
- [5] Lee YH, Song GG. Correlation between circulating osteopontin level in systemic lupus erythematosus and disease activity and associations between osteopontin polymorphisms and disease susceptibility: A meta-analysis [J]. Lupus, 2017, 26(2):132-138.
- [6] 李兴锐, 徐建华, 周小妹, 等. 骨桥蛋白基因 C707T 多态性与系统性红斑狼疮关联性研究[J]. 临床和实验医学杂志, 2010, 9(4):862-864.
- [7] 李常虹, 刘湘源. 2019 欧洲抗风湿病联盟/美国风湿病学会系统性红斑狼疮分类标准发布[J]. 中华风湿病学杂志, 2019(12):862-863-864.
- [8] 吴海竞, 陆前进. 系统性红斑狼疮发病机制的研究进展[J]. 皮肤科学通报, 2018, 35(3):249-257, 235.
- [9] 朱盈, 翟建昭, 罗娟, 等. 系统性红斑狼疮致病基因研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(9):1126-1131.
- [10] 李星军, 张瑜芬, 李锋, 等. 白细胞免疫球蛋白样受体 A2 基因多态性与上海地区汉族系统性红斑狼疮相关性的研究[J]. 临床皮肤科杂志, 2017, 46(5):318-321.
- [11] 吴成将, 袁秋然, 莫益姣, 等. CD40 基因多态性及血清水平与系统性红斑狼疮发病机制的相关研究[J]. 中华皮肤科杂志, 2016, 49(1):12-16.
- [12] 董鑫, 王学彬, 闫秀清, 等. Fc γ 受体基因 rs396991A/C 位点基因多态性与系统性红斑狼疮关系的探讨[J]. 滨州医学院学报, 2019, 42(3):168-171.
- [13] Forton AC, Petri MA, Goldman D, et al. An osteopontin (SPP1) polymorphism is associated with systemic lupus erythematosus [J]. Hum Mutat, 2010, 19(4):459.
- [14] Kaleta B, Piotr M, Andrzej G, et al. The preliminary association study of osteopontin 707 C/T polymorphism with systemic lupus erythematosus in a Polish population [J]. A Postepy Dermatol Alergol, 2020, 37(2):190-194.
- [15] 石凤, 庞晓霞, 韦莹慧, 等. 女性 SLE 患者骨桥蛋白基因 rs2853750 及 rs6811536 突变差异与发病风险及不同并发症的相关性[J]. 中国皮肤性病学杂志, 2019, 33(5):513-517.
- [16] Wirestam L, Frodlund M, Enocsson H, et al. Osteopontin is associated with disease severity and antiphospholipid syndrome in well characterised Swedish cases of SLE [J]. Lupus Sci Med, 2017, 4(1):e000225.
- [17] 胡伟, 生媛, 徐学静, 等. 血浆骨桥蛋白水平与系统性红斑狼疮疾病活动性及肾脏损害的相关研究[J]. 现代医学, 2017, 45(11):1591-1593.

HBV 病毒慢性感染者的 *ALDH2* 基因多态性研究

赵婧¹ 岳鹏² 邢国征¹ 尹显艳¹ 于洪远^{1*}

【摘要】目的 探讨慢性乙型肝炎患者中 *ALDH2* 基因 504 位点多态性分布及其与 HBV 感染的相关性。**方法** 选取 2014 年 1 月至 2020 年 1 月之间于本院就诊的 125 例慢性乙肝患者作为研究组,根据临床分型的不同,分为 CHB I 级 72 例,CHB II 级 47 例,CHB III 级 6 例,同期健康体检者 60 名为对照组。收集标本,采用基因芯片法检测 *ALDH2* 基因多态性,SPSS 23.0 软件分析各组数据的相关性。**结果** CHB 患者不同临床分型与血清 HBV-DNA 病毒载量比较,差异有统计学意义 ($P<0.05$);血清 HBV-DNA 病毒载量与 *ALDH2* 基因分型比较,差异无统计学意义 ($P=0.068$);GA+AA 型与 GG 型基因在研究组与对照组中分布比较,差异有统计学意义 ($P=0.042$),在 CHB 临床分型中差异无统计学意义 ($P>0.05$);经 Logistic 回归分析 GA+AA 型与 GG 型基因 HBV 感染风险的差异有统计学意义 ($P<0.05$);对吸烟和饮酒状况进行校正后,GA+AA 型的乙肝病毒感染风险有所增加 ($OR=1.939, 95\%CI: 1.028\sim 3.658$)。**结论** 乙肝病毒的感染与 *ALDH2* 基因 504 位点的单核苷酸多态性有关,突变型为其感染危险因素。

【关键词】 乙型肝炎;乙醛脱氢酶基因;多态性;分子诊断

Study on *ALDH2* Gene Polymorphism in Patients with Chronic HBV Virus Infection

ZHAO Jing¹, YUE Peng², XING Guozheng¹, YIN Xianyan¹, YU Hongyuan^{1*}

(1. Department of Clinical Laboratory, Beijing Aerospace General Hospital, Beijing, China, 100076; 2. The Yang Fang Clinic, The Northern Medical District of the PLA General Hospital, Beijing, China, 102205)

【ABSTRACT】Objective To explore the distribution of *ALDH2* gene 504-locus polymorphism in patients with chronic hepatitis B and its correlation with HBV infection. **Methods** A total of 125 patients with CHB who were treated in our hospital from Jan 2014 to Jan 2020 were enrolled in the study and divided into the CHB I group with 72 mild cases, the CHB II group with 47 moderate cases and the CHB III group with 6 severe cases according to the clinical classification, meanwhile, 60 healthy people who received physical examination were set as the control group. The genotype distribution was detected by gene chip, and the data were analyzed by SPSS 23.0. **Results** There was statistically significant difference between the serum HBV-DNA viral load and the different clinical types of CHB patients ($P<0.05$), but no significant difference between the serum HBV-DNA viral load and *ALDH2* genotyping ($P=0.068$). The GA+AA type and GG type genes were compared in the study group and the control group, the difference was statistically significant ($P=0.042$), and there was no statistically significant difference in the clinical classification of CHB ($P>0.05$). Logistic regression analysis showed that the difference of HBV infection risk between GA+AA type and GG type gene was statistically significant ($P<0.05$). After adjusting for smoking and drinking status, the risk of GA+AA type of hepatitis B virus infection increased ($OR=1.939, 95\%CI: 1.028\sim 3.658$). **Conclusion** The infection of hepatitis B virus is related to the single nucleotide polymorphism at 504 of *ALDH2* gene, and the mutation is its risk factor for infection.

【KEY WORDS】 Hepatitis B; *ALDH2*; polymorphism; molecular diagnosis

基金项目:首都临床特色应用研究与成果推广(Z171100001017131);北京航天总医院创新基金科研立项(2020-610)

作者单位:1. 北京航天总医院检验科,北京市 100076

2. 解放军总医院京北医疗区阳坊门诊部,北京市 102205

*通信作者:于洪远, E-mail: zj9699@163.com

乙型肝炎病毒(HBV)引起的传染病乙型病毒性肝炎呈世界性流行,感染具有隐匿性,全球有2.91亿人为慢性HBV感染者^[1],每年约有88.7万人死于HBV感染相关疾病^[2],早期诊断和治疗慢性乙型肝炎可降低肝硬化和肝细胞癌的发生率^[3]。*ALDH2*基因504位点多态性由G-A的单碱基突变的谷氨酸(Glu)到赖氨酸(Lys)的替换,形成三种活性不同的基因型。不仅参与乙醇的代谢,还与体内同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)、胆固醇等多种物质的代谢有关^[4],其催化活性发生改变会增加代谢性疾病的发生风险^[5-6],*ALDH2*基因多态性在不同地区、民族间差别较大^[7]。本研究通过对CHB患者和正常人群中*ALDH2*基因单核苷酸多态(single nucleotide polymorphism, SNP)位点504基因型的检测,发现*ALDH2*基因突变人群存在的更多风险因素,为HBV感染早期干预与治疗提供更多基因筛查的理论基础。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取2014年1月至2020年1月就诊于本院的125例乙肝患者(研究组)。纳入标准:参照中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会制定的《病毒性肝炎防治方案》^[6],通过筛选血清中的HBsAg、HBeAg和肝功能水平及临床症状选择符合慢性乙型肝炎诊断标准及分级标准的患者。男性80例,女性45例,平均年龄(60.3±14.1)岁。根据临床分型的不同,分为轻度72例(CHB I级:HBV-DNA以阴性<10³ IU/mL和低拷贝10³~10⁵ IU/mL为主),中度47例(CHB II级:HBV-DNA以中拷贝10⁶~10⁸ IU/mL为主),重度6例(CHB III级:HBV-DNA以高拷贝>10⁹ IU/mL为主),同时选取同期60名免疫标志物、生化指标均为阴性的健康体检者作为对照组,平均年龄(58.1±15.9)岁。两组在年龄、性别间比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。

1.2 试剂与仪器

乙肝两对半测定采用雅培 I2000 化学发光酶免法,肝功测定采用雅培 I2000 检测;HBV-DNA 检测采用上海之江科技有限公司核酸提取试剂及基因扩增试剂盒,PCR仪宏石 SLAN-96P;*ALDH2*基因检测:血液基因组DNA提取试剂盒(BaiO[®] DNA提取纯化试剂盒组),BaiO[®] CYP2C19基因检测试剂盒(DNA微阵列芯片法),BaiO[®] BR-526-24全自动杂交仪,BaiO[®] BE-3.0生物芯片识读仪,BaiO[®]基

因芯片图像分析软件。

1.3 研究方法

1.3.1 血清HBV-DNA定量检测

取120 μL血清加入之江核酸提取试剂检测深96孔板加样孔中,参照提取试剂盒说明书进行,同时取5×10⁶~5×10³共4个点标准品建立标准曲线,提取DNA;建立PCR扩增体系,于SLAN-96P进行HBV-DNA基因扩增,根据绘制的标准曲线计算HBV-DNA病毒定量结果。

1.3.2 *ALDH2*基因多态性检测

取200 μL外周全血,用吸附柱法提取基因组DNA,步骤参照BaiO[®] DNA提取纯化试剂盒说明书;PCR仪上进行基因扩增,将扩增出的大量单链目的基因DNA,置于8联排管中,与基因芯片共同置于BaiO[®]全自动杂交仪进行基因杂交,杂交结束后使用生物芯片识读仪读取基因分型结果。

1.4 *ALDH2*基因型的判定

应用BaiO[®] *ALDH2*基因图像分析软件进行数据分析,对送检标本的基因型进行判定。

1.5 统计学处理数据

运用SPSS 23统计软件处理,计数资料用 $n(\%)$ 表示,行 χ^2 检验,组间比较,采用Hardy-winberg遗传平衡定律检验所选人群的代表性,建立多因素非条件Logistic回归分析模型,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 *ALDH2*基因型多态性结果测定

*ALDH2*基因分型在CHB患者不同临床分型中分布无统计学意义($P>0.05$),在研究组与对照组间差异无统计学意义($P<0.05$)。见图1、表1。



注: A为GG型; B为AA型; C为GA型。

图1 *ALDH2*基因 Glu504Lys位点基因芯片分型图

Figure 1 Microarray genotyping of *ALDH2* gene Glu504Lys

表1 *ALDH2*基因型分布频率比较 [$n(\%)$]

Table 1 Distribution of genotypes of *ALDH2* [$n(\%)$]

项目	<i>n</i>	Glu504Glu	Glu504Lys	Lys504Lys	<i>P</i> 值
研究组					
I级	72	31(43.05)	36(50.00)	5(6.94)	0.892
II级	47	20(42.55)	23(48.94)	4(8.51)	
III级	6	4(66.67)	2(33.33)	0(0.00)	
对照组		36(60.00)	19(31.66)	5(8.33)	0.085

2.2 HBV-DNA 病毒载量结果分析

CHB 患者不同临床分型与血清 HBV-DNA 病毒载量差异有统计学意义 ($P<0.05$) ; 血清

HBV-DNA 病毒载量之间的差异与 *ALDH2* 基因分型无统计学意义 ($P>0.05$)。见表 2。

表 2 HBV-DNA 病毒载量分布 [$n(\%)$]

Table 2 Distribution of viral load of HBV-DNA [$n(\%)$]

病毒载量(IU/mL)	CHB 分级			<i>P</i> 值	ALDH2 基因分型			<i>P</i> 值
	I 级 (<i>n</i> =72)	II 级 (<i>n</i> =47)	III 级 (<i>n</i> =6)		Glu504Glu (<i>n</i> =55)	Glu504Lys (<i>n</i> =61)	Lys504Lys (<i>n</i> =9)	
<10 ³	31(43.05)	10(21.28)	0(0.00)	0.00	19(34.55)	22(36.07)	0(0.00)	0.068
10 ³ ~10 ⁵	41(56.94)	30(63.83)	0(0.00)		29(52.73)	34(55.74)	8(88.89)	
10 ⁶ ~10 ⁸	0(0.00)	5(10.64)	4(66.67)		3(5.45)	5(8.20)	1(11.11)	
>10 ⁹	0(0.00)	2(4.26)	2(33.33)		4(7.27)	0(0.00)	0(0.00)	

2.3 ALDH2 基因野生型和突变型结果分析

根据本课题组前期数据整理结果提示 *ALDH2* 基因 504 位点单核苷酸多态性(SNP)分布 504 位点 G>A 碱基突变率(29.2%),将三种基因型根据碱基突变原则重新分组,即野生型(GG)和突变型(GA+AA)进行统计分析。突变型在实验组和对照组中的分布中差异有统计学意义 ($P<0.05$)。见表 3。

表 3 ALDH2 基因型检测结果分析 [$n(\%)$]

Table 3 Analysis of ALDH2 genotype test results [$n(\%)$]

	<i>n</i>	野生型	突变型	<i>P</i> 值
研究组	I 级	31(43.05)	41(56.94)	0.042
	II 级	20(42.55)	27(57.45)	
	III 级	4(66.67)	2(33.33)	
对照组	60	36(60.00)	24(40.00)	

2.4 Hardy-Weinberg 遗传平衡检验法分析

研究组与对照组 *ALDH2* 等位基因 G 碱基频率分别为 171 与 91, 频率分别为 68.4%与 75.8%, A 碱基频率分别为 79 与 29, 频率分别为 31.6%和 24.2%。等位基因频率在 2 组中的分布不存在显著性差异 ($\chi^2=2.168, P=0.141$)。研究组与对照组相比时,以 GG 基因型作为参照,AA 基因频率在两组中分布没有统计学差异 ($P>0.05$)。见表 4。

2.5 Logistic 回归检验基因与环境因素

应用多因素二元非条件 Logistic 回归检验显

示突变型比野生型人群感染乙肝病毒的风险差异有统计学意义 ($P<0.05$),感染风险是野生型的 1.939 倍,环境因素(饮酒、吸烟状况)未见交互作用,差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见表 5。

表 5 不同环境因素中 ALDH2 基因与 HBV 易感性的关系

Table 5 Frequency of ALDH2 on HBV between different genders

	<i>B</i>	<i>SE</i>	<i>Wald</i>	<i>OR</i> 值	95% <i>CI</i>	<i>P</i> 值
GA+AA	0.662	0.324	4.182	1.939	1.028~3.658	0.041
饮酒状况	0.427	0.326	1.716	1.533	0.809~2.904	0.190
吸烟状况	0.157	0.360	0.190	1.170	0.578~2.367	0.663
常量	0.135	0.290	0.216	1.144		0.642

3 讨论

肝脏是人体重要的具有复杂代谢系统的器官,是合成蛋白的主要场所,也是合成凝血因子的重要场所^[8],在 HBV 感染后机体通过免疫应答过程对 HBV 颗粒进行清除,抑制病毒复制及对肝细胞的损伤,但是在免疫应答过程中对肝细胞也可能形成免疫性损伤^[9],HBV 持续感染在机体长期低水平复制引起的免疫和炎症反应是引起肝损伤-肝纤维化的中心力量,进而发展为肝炎、肝硬化和肝细胞癌^[10]。随着检验医学技术的发展,对于 HBV 感染的诊断技术越来越多,目前临床常用的检测技术包括:血清标志物检测、HBV-DNA 检测、HBV 基因分

表 4 Hardy-Weinberg 遗传平衡检验方法

Table 4 Hardy-Weinberg genetic balance test

分组		例数	基因型频率			等位基因频率		χ^2 值	P 值
			GG(q ²)	GA(2pq)	AA(p ²)	G(q)	A(p)		
总体	实际频数	185	91(0.492)	80(0.432)	14(0.076)	262/370(0.708)	108/370(0.292)	0.393	0.531
	理论频数	185	92.69(0.501)	76.49(0.413)	15.73(0.085)	—	—		
对照组	实际频数	60	36(0.6)	19(0.317)	5(0.083)	91/120(0.758)	29/120(0.242)	1.11	0.292
	理论频数	60	34.47(0.575)	22.01(0.3667)	3.51(0.059)	—	—		
研究组	实际频数	125	55(0.44)	61(0.488)	9(0.072)	171/250(0.684)	79/250(0.316)	2.076	0.15
	理论频数	125	54.48(0.468)	54.04(0.432)	12.5(0.1)	—	—		

型、荧光显微镜检查等^[11-12]。多指标的联合应用,使HBV感染的检出率不断提高,既往的研究认为^[13],抗-HBe阳性表示体内无HBV存在,无传染性,为良好预后的标志,但有部分患者抗-HBe阴性,因HBV基因存在变异,病毒仍可复制,甚至可出现病情加重^[14]。故同时积极寻找HBV感染潜在相关分子机制及风险因素对HBV感染的预防具有深远的意义。

ALDH2作为直接参与酒精代谢的重要限速酶之一^[15],直接决定体内乙醇和乙醛的蓄积量,其活性水平与酒精性肝病的发生有着密切的关系,进一步影响肝癌的发生^[16]。且有研究发现^[17],ALDH2基因表达量与病人总体生存率以及远期转移密切相关。该基因突变杂合子(GA)的酶活性为野生纯合子(GG)活性的30%左右,而突变纯合子(AA)的酶活性约为野生纯合子的2%,基本无生物活性^[18]。基因型决定了酶活性,ALDH2酶失活或活性下降后,可致使体内拮抗氧化应激及炎症反应的能力减弱^[7],在我国ALDH2基因突变的人群高于欧美国家,本研究结果说明各组研究对象具有可比性。本院检出ALDH2基因突变人群占比50.81%,基因突变型人群感染乙肝病毒的风险是野生型人群的1.939倍,对于存在ALDH2基因突变人群应更加注重HBV感染的风险提示。

本研究结果提示该基因多态性与乙肝病毒的感染存在相关性,但该基因的突变与CHB患者临床分型及血清HBV-DNA病毒载量之间无统计学意义,积极寻找ALDH2基因的直接作用靶点及干扰因素尤为重要,现本课题还存在标本量较少,且未能收集到更多临床治疗资料以对HBV病毒的拷贝量及治疗方案进行进一步分析,后续将继续进行相关内容的拓展,以期能对HBV病毒的治疗情况提供更多的指导意见。

同时,寻找与ALDH2基因型相关的血清标志物,使其能代表体内ALDH2酶活性水平,并与预后相联系,这对该基因突变人群罹患肝脏疾病的诊断与治疗有一定的辅助作用,对现有技术进行创新和突破,不断提高实验室检测的准确性与精确性,同时联合多项指标进行动态监测,对推进HBV感染的诊疗发展具有重大意义。

参考文献

[1] Polaris Observatory C. Global prevalence, treatment, and prevention of hepatitis B virus infection in 2016: a modelling study [J]. Lancet Gastroenterol Hepatol, 2018, 3(6): 383-403.

[2] 牛广林,程昌盛,黄献球,等.慢性HBV感染相关性肝病患者RDW、RPR与肝损伤严重程度的关系[J].中国老年学杂志,2018,38(24):5970-5973.

[3] 欧启水,郭健慧.血清乙肝病毒颗粒的存在形式及其临床价值[J].临床检验杂志,2019,37(07):486-490.

[4] 王忆,李国春.不同ALDH2基因型老年冠心病患者发生2型糖尿病的临床研究[J].血管与腔内血管外科杂志,2019,5(4):321-323+360.

[5] Sasakabe T, Wakai K, Kawai S, et al. Modification of the Associations of Alcohol Intake With Serum Low-Density Lipoprotein Cholesterol and Triglycerides by ALDH2 and ADH1B Polymorphisms in Japanese Men [J]. J Epidemiol, 2018, 28(4): 185-193.

[6] Li M, Zhang P, Wei H J, et al. Hydrogen Sulfide Ameliorates Homocysteine-Induced Cognitive Dysfunction by Inhibition of Reactive Aldehydes Involving Upregulation of ALDH2 [J]. Int J Neuropsychopharmacol, 2017, 20(4): 305-315.

[7] 侯经远,谢运泉,赵平森,等.中国南方客家人群乙醛脱氢酶2基因多态性与急性心肌梗死的相关性研究[J].分子诊断与治疗杂志,2019,11(3):170-175.

[8] 张怡慧,王坤,刘庆妍.妊娠合并HBV感染对母婴结局的影响[J].传染病信息,2019,32(6):530-532.

[9] 王少渊,任旭,李世红,等.HBV相关ACLF患者免疫功能及IL-10和IL-32与预后的相关性[J].分子诊断与治疗杂志,2020,12(06):733-736.

[10] 汪静雯,孙桂鸿.自噬在乙肝病毒引起的疾病中的功能[J].科学通报,2019,64(30):3109-3122.

[11] Liu F, Liu Z R, Li T, et al. Varying 10-year off-treatment responses to nucleos(t)ide analogues in patients with chronic hepatitis B according to their pretreatment hepatitis B e antigen status [J]. J Dig Dis, 2018, 19(9): 561-571.

[12] 黄程勇,黄毅,陈雯.血清自身抗体检测对慢性HBV感染者的应用价值[J].实验与检验医学,2017,35(4):522-524.

[13] Dong H, Xiao J, Zhu R, et al. Serum sphingosine 1-phosphate in hepatocellular carcinoma patients is related to HBV infection [J]. J BUON, 2018, 23(6): 1711-1716.

[14] Li C, Zhu B, Lv S, et al. Prediction model of the progression of patients with acute deterioration of hepatitis B virus-related chronic liver disease to acute-on-chronic liver failure [J]. Medicine (Baltimore), 2018, 97(34): e11915.

[15] 邵爽,刘春燕,孙晶,等.乙醛脱氢酶2基因多态性与肝脏疾病[J].世界华人消化杂志,2017,25(33):2981-2986.

[16] 孙大鹏,周伟平.乙醛脱氢酶2与酒精性肝脏疾病的研究进展[J].腹部外科,2020,33(1):86-89.

[17] Hou G, Chen L, Liu G, et al. Aldehyde dehydrogenase-2 (ALDH2) opposes hepatocellular carcinoma progression by regulating AMP-activated protein kinase signaling in mice [J]. Hepatology, 2017, 65(5): 1628-1644.

[18] Zhao Y, Wang C. Glu504Lys Single Nucleotide Polymorphism of Aldehyde Dehydrogenase 2 Gene and the Risk of Human Diseases [J]. Biomed Res Int, 2015, 2015: 174050.

· 论 著 ·

BRAF^{V600E}突变对甲状腺乳头状癌 HMGB1 及 MMP-9 表达的影响

张冲^{1*} 古虎霞² 刘定荣¹ 卫惠杰¹ 周丹¹ 方静¹ 杨艳¹ 代晓璐¹

[摘要] 目的 探究 *BRAF*^{V600E} 突变对甲状腺乳头状癌(PTC)高迁移率族蛋白1(HMGB1)及基质金属蛋白酶-9(MMP-9)表达的影响。方法 选取2018年1月至2019年11月在本院行甲状腺全切除术或次全切除术的116例PTC患者及匹配癌组织标本作为PTC组,另择同时期体检正常的30例健康人作为对照组。检测PTC患者 *BRAF*^{V600E} 基因类型,免疫组化法及 Western blot 法检测PTC患者甲状腺癌组织中 HMGB1、MMP-9 表达情况,酶联免疫吸附法检测受试者血清 HMGB1、MMP-9 水平,并收集PTC患者临床资料。结果 116例PTC患者检出59例 *BRAF*^{V600E} 突变型,57例为 *BRAF*^{V600E} 野生型,PTC患者 *BRAF*^{V600E} 突变型为50.86%(59/116)。免疫组化法分析结果显示 *BRAF*^{V600E} 突变型 HMGB1、MMP-9 阳性表达率均显著高于 *BRAF*^{V600E} 野生型,差异有统计学意义($P<0.05$);Western blot 法检测结果显示 *BRAF*^{V600E} 突变型 HMGB1 表达量、MMP-9 表达量显著高于 *BRAF*^{V600E} 野生型,差异有统计学意义($P<0.05$)。PTC组 *BRAF*^{V600E} 突变型及 *BRAF*^{V600E} 野生型血清 HMGB1、MMP-9 水平均显著高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),PTC患者 *BRAF*^{V600E} 突变型与 *BRAF*^{V600E} 野生型在血清 HMGB1、MMP-9 水平上比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。 *BRAF*^{V600E} 突变型 TNM 分期Ⅲ~Ⅳ期、包膜浸润、多发病灶、淋巴结转移占比显著高于 *BRAF*^{V600E} 野生型,差异有统计学意义($P<0.05$)。二元 Logistic 结果显示,合并包膜浸润、多发病灶、组织 HMGB1 阳性、组织 MMP-9 阳性均是 *BRAF*^{V600E} 突变型的影响因素($P<0.05$)。结论 PTC患者 *BRAF*^{V600E} 突变型组织 HMGB1、MMP-9 阳性表达率显著高于 *BRAF*^{V600E} 野生型,且组织 HMGB1 阳性、MMP-9 阳性是 *BRAF*^{V600E} 突变型的影响因素。

[关键词] *BRAF*^{V600E}; 甲状腺乳头状癌; 高迁移率族蛋白1; 基质金属蛋白酶-9

Effect of *BRAF*^{V600E} mutation on the expression of HMGB1 and MMP-9 in papillary thyroid carcinoma

ZHANG Chong^{1*}, GU Huxia², LIU Dingrong¹, WEI Huijie¹, ZHOU Dan¹, FANG Jing¹, YANG Yan¹, DAI Xiaolu¹
(1. Department of Pathology, Fuling Central Hospital of Chongqing, Chongqing, China, 408099; 2. Network Information Department, Fuling Central Hospital of Chongqing, Chongqing, China, 408099)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the effect of *BRAF*^{V600E} mutation on the expression of HMGB1 and MMP-9 in papillary thyroid carcinoma (PTC). **Methods** A total of 116 PTC patients who underwent total or subtotal resection in our hospital from January 2018 to November 2019 and matched cancer tissue samples were selected as study objects, and another 30 healthy patients who underwent normal physical examination during the same period were selected as the control group. The *BRAF*^{V600E} gene types of PTC patients were detected, the expressions of HMGB1 and MMP-9 in thyroid tissues of PTC patients were detected by immunohistochemistry and Western blot, the serum levels of HMGB1 and MMP-9 were detected by ELISA, and the clinical data of PTC patients were collected. **Results** In 116 PTC patients, 59 cases were *BRAF*^{V600E} mutant and 57 cases were *BRAF*^{V600E} wild type, and 50.86% (59/116) were *BRAF*^{V600E} mutant in PTC patients. Immuno-

基金项目:重庆市自然科学基金博士后科学基金项目(cstc2019jcyj-bshX0123);重庆市博士后特别资助项目(XmT2018066)

作者单位:1. 重庆市涪陵中心医院病理科,重庆 408099

2. 重庆市涪陵中心医院网络信息科,重庆 408099

*通信作者:张冲, E-mail:chenggongdesilang@163.com

histochemical analysis showed that the HMGB1 and MMP-9 positive expression rate of $BRAF^{V600E}$ mutant were significantly higher than $BRAF^{V600E}$ wild type, the difference was statistically significant ($P<0.05$). Western blot results showed that the expression level of HMGB1 and MMP-9 of $BRAF^{V600E}$ mutant was significantly higher than that of the $BRAF^{V600E}$ wild type, the difference was statistically significant ($P<0.05$). The serum HMGB1 and mmp-9 levels of $BRAF^{V600E}$ mutant and $BRAF^{V600E}$ wild type in the PTC group were significantly higher than those in the control group, the difference was statistically significant ($P<0.05$), but there were no statistically significant differences in serum HMGB1 and MMP-9 levels between the $BRAF^{V600E}$ mutant and the $BRAF^{V600E}$ wild type in the PTC patients ($P>0.05$). The proportion of $BRAF^{V600E}$ mutation TNM stage III~IV, capsular invasion, multiple lesions, and lymph node metastasis of was significantly higher than that of $BRAF^{V600E}$ wild type, the difference was statistically significant ($P<0.05$). Binary Logistic results showed that combined envelop infiltration, multiple lesions, positive HMGB1 and MMP-9 in tissues were all risk factors of $BRAF^{V600E}$ mutation ($P<0.05$). **Conclusion** The positive expression rate of HMGB1 and MMP-9 in $BRAF^{V600E}$ mutant tissues of PTC patients was significantly higher than that of $BRAF^{V600E}$ mutant wild type, and HMGB1 and MMP-9 positive tissues were the influencing factors of $BRAF^{V600E}$ mutant.

[KEY WORDS] $BRAF^{V600E}$; PTC; HMGB1; MMP-9

尽管甲状腺乳头状癌(papillary thyroid carcinoma, PTC)疾病进展较慢,但因当前对PTC发生机制尚未完全了解,仍有部分患者治疗后病灶复发或远处转移,这也是PTC患者死亡的主要原因。研究证实^[1-2],高迁移率族蛋白1(high mobility group protein 1, HMGB1)、基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)均在PTC患者中异常表达,且可辅助PTC的诊断和预后,但其作用机制尚未清晰。HMGB1已被证实可通过丝裂素活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路影响肿瘤发生、发展。MMP-9也被认为与肿瘤侵袭、转移相关,既往研究报道^[3], MAPK可上调MMP-9的表达。 $BRAF^{V600E}$ 是MAPK通路的关键调节因子。结合分析,笔者认为 $BRAF^{V600E}$ 突变可能与HMGB1、MMP-9具有关联性,并选取PTC患者临床资料,进一步阐述其中关联。现将报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2018年1月至2019年11月在本院行甲状腺全切除术或次全切除术的116例PTC患者。纳入标准:①均经病理学检查证实为PTC^[3];②术前未进行化疗、放疗等抗肿瘤治疗;③临床资料完整,且具有癌组织标本、血清标本;④首次治疗者。排除标准:①合并其他肿瘤;②既往颈部手术史、放射性物质接触史;③合并桥本氏甲状腺炎、甲状腺功能亢进等甲状腺疾病。男52例、女64例,平均年龄(53.67 ± 4.80)岁。另择同时期体检正常的30例健康人作为对照组,男13例、女17例,平均年龄

(54.03 ± 4.85)岁。本研究严格遵守赫尔辛基宣言^[4]。

1.2 方法

$BRAF^{V600E}$ 基因检测:取连续切片,采用Takara组织/细胞DNA快速提取试剂盒提取总DNA,采用紫外分光光度计检测DNA纯度(OD260/OD280为1.6~1.8);构建PCR反应体系,进行PCR扩增,95℃变性15 s、55℃退火15 s、72℃延伸30 s、35个循环,72℃延伸7 min;产物跑电泳检查纯度后,对PCR产物进行测序。

组织HMGB1、MMP-9检测用免疫组化法:取切片,60℃烤片30 min,脱蜡、至水、修复,PBS冲洗,加3% H_2O_2 溶液,冲洗,滴加一抗(兔抗人HMGB1抗体、兔抗人MMP9抗体均购于ABC公司)、二抗(羊抗兔IgG购于北京中杉金桥有限公司),冲洗,滴加DAB显色剂(中杉金桥有限公司),复染、脱水,透明,中性树胶封片,以PBS代替一抗作为阴性对照组;由病理科医师盲法阅片^[5],高倍镜下随机5个视野依照阳性细胞占比分别记“0分”、“1分”、“2分”、“3分”,低倍镜下观察阳性细胞着色强度分别记“0分”、“1分”、“2分”、“3分”,以阳性细胞占比及着色乘积判定阳性等级,以积分 ≤ 3 分为阴性。**Western blot法:**取切片,超声裂解提取上清液,检测蛋白浓度后跑电泳,转膜、封闭、抗体孵育、显影,以管家基因甘油醛-3-磷酸脱氢酶作为内参。

采用酶联免疫吸附法检测血清中HMGB1、MMP-9水平, HMGB1试剂盒购自于上海振誉生物科技有限公司(规格96T), MMP-9试剂盒购自于武汉楚锐科药业科技有限公司(规格48T/96T),均由同一组检验人员严格按照说明书检测。

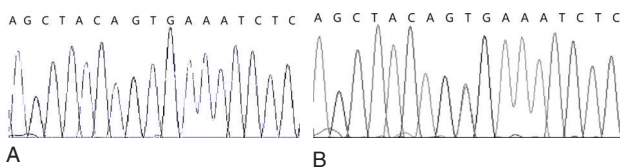
1.3 统计学处理

采用统计软件 SPSS 22.0 和 Graphpad Prism 软件处理数据;符合正态分布的计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析、独立样本 *t* 检验,不符合正态分布采用非参数检验的 Wilcoxon 秩和检验;计数资料用 *n*(%)表示,行 χ^2 检验;影响因素采用二元 Logistic 分析;以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同患者 *BRAF*^{V600E} 基因表达情况

116 例 PTC 患者检出 59 例 *BRAF*^{V600E} 突变型、57 例为 *BRAF*^{V600E} 野生型,PTC 患者 *BRAF*^{V600E} 突变型为 50.86%(59/116)。见图 1。



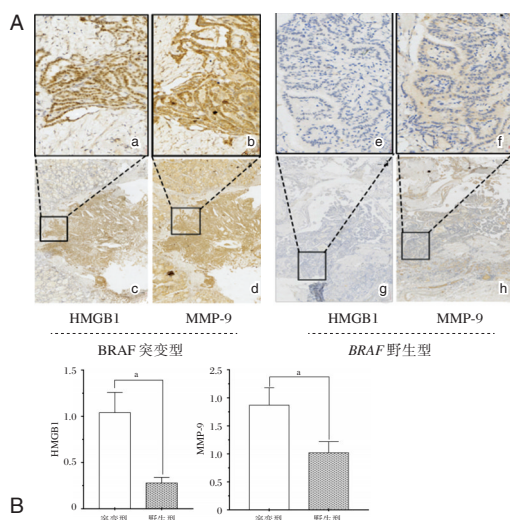
注:A为 *BRAF*^{V600E} 野生型;B为 *BRAF*^{V600E} 突变型。

图1 PTC患者组织 *BRAF*^{V600E} 基因测序图

Figure 1 Tissue *BRAF*^{V600E} of PTC patients

2.2 组织 HMGB1、MMP-9 表达

BRAF^{V600E} 突变型 HMGB1、MMP-9 阳性表达率均显著高于 *BRAF*^{V600E} 野生型,差异有统计学意义(*P*<0.05);Western blot 法检测结果显示,*BRAF*^{V600E} 突变型 HMGB1 表达量、MMP-9 表达量显著高于 *BRAF*^{V600E} 野生型,差异有统计学意义(*P*<0.05)。见图2、表1。



注:A为突变型、野生型组织 HMGB1、MMP-9 的免疫组化图(En-Vision 二步法,×400);B为 Western blot 检测 PTC 患者组织 HMGB1、MMP-9 的定量分析;**P*<0.05,差异有统计学意义。

图2 组织中 HMGB1、MMP-9 表达

Figure 2 Expression of HMGB1 and MMP-9 in tissues

表1 PTC患者组织 HMGB1、MMP-9 蛋白表达 [*n*(%)]

Table 1 Expression of HMGB1 and MMP-9 in tissues of PTC patients [*n*(%)]

分组	<i>n</i>	HMGB1		MMP-9	
		阴性	阳性	阴性	阳性
突变型	59	17(28.81)	42(71.19)	15(25.42)	44(74.58)
野生型	57	36(63.16)	21(36.84)	33(57.89)	24(42.11)
χ^2 值		13.781		12.602	
<i>P</i> 值		<0.001		<0.001	

2.3 血清 HMGB1、MMP-9 表达

3 组受试者血清 HMGB1、MMP-9 比较,差异有统计学意义(*P*<0.05)。PTC 组 *BRAF*^{V600E} 突变型及 *BRAF*^{V600E} 野生型血清 HMGB1、MMP-9 水平均显著高于对照组,差异有统计学意义(*P*<0.05),PTC 组 *BRAF*^{V600E} 突变型与 *BRAF*^{V600E} 野生型在血清 HMGB1、MMP-9 水平上比较,差异无统计学意义(*P*>0.05)。见表2。

表2 3组受试者血清 HMGB1、MMP-9 比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of serum HMGB1 and MMP-9 in the 3 groups ($\bar{x} \pm s$)

分组	<i>n</i>	HMGB1(pg/mL)	MMP-9(ng/L)
PTC 组 突变型	59	8.78±1.66	2.56±0.60
野生型	57	8.62±1.49	2.39±0.54
对照组	30	4.56±1.15	1.21±0.26
<i>F</i> 值		90.798	71.315
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001

2.4 PTC 患者临床特征

BRAF^{V600E} 突变型 TNM 分期Ⅲ~Ⅳ期、有包膜浸润、病灶多发、合并淋巴结转移占比显著高于 *BRAF*^{V600E} 野生型,差异有统计学意义(*P*<0.05)。见表3。

表3 PTC患者临床特征 [*n*(%),($\bar{x} \pm s$)]

Table 3 Clinical characteristics of PTC patients [*n*(%),($\bar{x} \pm s$)]

分组	突变型(<i>n</i> =59)	野生型(<i>n</i> =57)	<i>t</i> / χ^2 值	<i>P</i> 值
性别				
男	28(47.46)	24(42.11)	0.336	0.562
女	31(52.54)	33(57.89)		
年龄(岁)	52.71±6.20	54.60±5.01	1.802	0.074
肿瘤直径(cm)	1.71±0.33	1.64±0.30	1.194	0.235
TNM 分期				
I~II 期	18(30.51)	32(56.14)	7.767	<0.001
III~IV 期	41(69.49)	25(43.86)		
包膜浸润				
是	32(54.24)	6(10.53)	25.147	<0.001
否	27(45.76)	51(89.47)		
病灶类型				
单发	11(18.64)	21(36.84)	4.806	0.028
多发	48(81.36)	36(63.16)		
淋巴结转移				
是	13(22.03)	4(7.02)	5.227	0.022
否	46(77.97)	53(92.98)		

2.5 影响PTC患者 $BRAF^{V600E}$ 突变型的因素

以 $BRAF^{V600E}$ 基因类型作为因变量,以病理特征作为自变量,结果显示合并包膜浸润、多发病

灶、组织 HMGB1 阳性、组织 MMP-9 阳性均是 $BRAF^{V600E}$ 突变型的独立危险因素 ($P<0.05$)。见表4。

表4 影响PTC患者 $BRAF^{V600E}$ 突变型的因素

Table 4 Factors Affecting $BRAF^{V600E}$ Mutant Type in PTC Patients

类别	B 值	S.E 值	Wald 值	OR 值	95%CI	P 值
合并包膜浸润	2.362	0.561	17.724	10.615	3.534~31.883	<0.001
多发病灶	1.667	0.413	16.265	5.298	2.356~11.912	<0.001
组织 HMGB1 阳性	1.983	0.552	12.919	7.268	2.464~21.437	<0.001
组织 MMP-9 阳性	1.395	0.402	12.053	4.033	1.835~8.863	0.001

3 讨论

Reagh 等人^[6]的一项荟萃分析研究指出,结直肠癌患者 $BRAF^{V600E}$ 突变测试与免疫组织化学结果之间具有较高的一致性;余慧等人^[7]对黑色素瘤进行分析,结果显示 $BRAF^{V600E}$ 基因突变患者预后较差。可见, $BRAF^{V600E}$ 基因类型对于肿瘤的诊断及预后均有一定的指导意义。 $BRAF^{V600E}$ 基因类型在甲状腺癌患者中也有类似的效果。郭荣荣等人^[8]对甲状腺癌患者超声特征与 $BRAF^{V600E}$ 基因之间进行分析,结果显示,超声图像特征接触被膜、微钙化、血流丰富等都与 $BRAF^{V600E}$ 突变存在相关性;Qu 等人^[9]指出, $BRAF^{V600E}$ 突变是 PTC 患者中央淋巴结转移的独立因素,后者是导致患者术后原位复发及二次手术的主要原因。可以说, $BRAF^{V600E}$ 突变是 PTC 恶性程度以及复发和转移的重要相关因素。

当前认为, PI3K-Akt-mTOR、P53-PTEN、 β -catenin 以及 MAPK 信号通路参与 PTC 的发生、发展相关^[10-11],而 $BRAF^{V600E}$ 基因会通过 MAPK 信号通路而对细胞的生长、分化、增殖等进行调节作用参与到 PTC 中来。HMGB1 可经“主动”和“被动”释放,这也是本组案例中观察到 PTC 患者血清 HMGB1 水平显著高于对照组的原因。本组案例结果 HMGB1 阳性是 $BRAF^{V600E}$ 突变型的影响因素。然而, Western blot 法显示 $BRAF^{V600E}$ 突变型 HMGB1 表达量下调,结合 $BRAF^{V600E}$ 突变型是中央区淋巴结转移的独立因素。这提示,在 PTC 患者中,可能 $BRAF^{V600E}$ 突变下调 HMGB1 而增加 PTC 恶性发展。部分学者认为 PTC 患者组织 HMGB1 表达量下调与自噬功能降低有关^[12]。自噬是肿瘤发生初始阶段的应激方式,而在肿瘤进展后期由于肿瘤细胞线粒体功能障碍和代谢缺陷将导致自噬功能下降^[13]。对于组织 HMGB1 表达量下降的

具体机制需要后续工作不断探究。如前所述, $BRAF^{V600E}$ 突变是 CLNM 的独立因素。Logistic 分析结果进一步证实,组织 MMP-9 阳性是 $BRAF^{V600E}$ 突变型的影响因素。本研究结果发现血清中 HMGB1、MMP-9 与组织中 HMGB1、MMP-9 不等量表达,但血清 HMGB1、MMP-9 对于判定 PTC 患者 $BRAF^{V600E}$ 基因类型是否具有临床意义尚需要进一步观察。尽管本研究显示,组织 HMGB1、MMP-9 在 $BRAF^{V600E}$ 突变型、野生型中差异表达,但对于 $BRAF^{V600E}$ 基因通过哪种或哪几种信号通路以调控 HMGB1、MMP-9 的表达需深入研究。另外,本研究未能分析 $BRAF^{V600E}$ 基因类型对预后的影响,且未能收集甲状腺腺瘤、合并桥本氏甲状腺炎等患者临床资料行更全面的对比研究,这些都有待后续的研究。

综上所述, PTC 患者 $BRAF^{V600E}$ 突变型和野生型其组织 HMGB1、MMP-9 不等量表达,且组织 HMGB1 阳性、MMP-9 阳性是 $BRAF^{V600E}$ 突变型的影响因素。

参考文献

- [1] 韩璐荣, 贾永建. 甲状腺癌患者血清中 HMGB1 及 MMP-9 表达的临床意义[J]. 西北国防医学杂志, 2018, 39(10):675-678.
- [2] Wagner K, Abraham E, Tran B, et al. Lymphovascular invasion and risk of recurrence in papillary thyroid carcinoma[J]. ANZ J Surg, 2020, 90(9):1727-1732.
- [3] Roncevic J, Djoric I, Selemetjev S, et al. MMP-9-1562 C/T single nucleotide polymorphism associates with increased MMP-9 level and activity during papillary thyroid carcinoma progression[J]. Pathology, 2019, 51(1):55-61.
- [4] 赵迎盼, 陆芳, 瞿明杰, 等. 药物临床试验质量管理规范(修订稿)解读[J]. 中国新药杂志, 2015, 24(15):1747-1749+1785.
- [5] 龚龙, 易春华, 周明, 等. HMGB1 和 HIF1 α 在乳头状甲状腺癌中的表达及意义[J]. 中国现代医学杂志, 2019, 29(4):28-32.

(下转第 379 页)

乳腺癌患者组织中FOXA1、BRCA-1表达与临床病理参数的相关性

王增辉* 李昊楠 李润华 冯硕

【摘要】目的 研究乳腺癌患者组织中叉头框蛋白A1(FOXA1)、乳腺癌易感基因1(BRCA-1)表达与临床病理参数的相关性。**方法** 回顾性分析2018年3月至2019年5月于本院收治的97例乳腺癌患者的临床病理资料,采用免疫组织化学法检测FOXA1、BRCA-1的表达,采用Pearson法分析FOXA1、BRCA-1的表达与乳腺癌患者临床病理参数之间的相关性。**结果** BRCA-1阳性率35.05%,FOXA1阳性率61.86%。不同组织学分级、TNM分期、ER、PR、Ki67表达的乳腺癌患者组织中FOXA1的阳性例数比较差异有统计学意义($P<0.05$)。不同组织学分级、TNM分期、肿瘤直径、ER、PR、Ki67表达的乳腺癌患者组织中BRCA-1的阳性例数比较差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** FOXA1、BRCA-1表达与乳腺癌患者组织的临床病理参数具有较好的相关性,对于乳腺癌分级、分期以及预后具有重要的临床价值。

【关键词】 乳腺癌; FOXA1; BRCA-1; 临床病理参数

Correlation between the expression of FOXA1 and BRCA-1 in tissues and clinicopathological parameters in breast cancer patients

WANG Zenghui*, LI Haonan, LI Runhua, FENG Shuo

(Department of General Surgery, Union Medical College Hospital, Tangshan, Hebei, China, 063000)

【ABSTRACT】Objective To study the correlation between the expression of forkhead box protein A1 (FOXA1) and breast cancer susceptibility gene 1 (BRCA-1) and clinicopathological parameters in breast cancer tissues. **Methods** The clinicopathological data of 97 breast cancer patients who were admitted to the hospital from March 2018 to May 2019 were retrospectively analyzed. The expression of FOXA1 and BRCA-1 were detected by immunohistochemistry. The correlation between FOXA1, BRCA-1 and clinicopathological parameters in breast cancer patients was analyzed by Pearson method. **Results** The positive rates of BRCA-1 and FOXA1 were 35.05% and 61.86%, respectively. There were significant differences in the number of cases with FOXA1 positive among breast cancer patients with different histological grading, TNM staging, ER, PR and Ki67 expression ($P<0.05$). There were significant differences in the number of cases with BRCA-1 positive among breast cancer patients with different histological grading, TNM staging, tumor diameter, ER, PR and Ki67 expression ($P<0.05$). **Conclusion** The expression of FOXA1 and BRCA-1 has a good correlation with the clinicopathological parameters of breast cancer patients, and has important clinical value for breast cancer classification, staging and prognosis.

【KEY WORDS】 Breast cancer; FOXA1; BRCA-1; clinicopathological parameters

乳腺癌是发生于女性乳腺上皮组织的恶性肿瘤,如今已成为女性的头号杀手,发病率呈逐年上升趋势^[1]。近来有报道指出,作为一种可修复损伤

DNA的基因片段,乳腺癌易感基因1(Breast cancer1, BRCA-1)在调控细胞周期、修复DNA中起到关键作用^[2]。叉头框蛋白A1(Forkhead box protein

基金项目:河北省科技计划项目(20181213)

作者单位:唐山市协和医院普外一科,河北,唐山 063000

*通信作者:王增辉, E-mail: liao339542wang24@163.com

A1, FOXA1)是一组与内胚层相关的发育因子,较早有研究表明,FOXA1的表达与乳腺癌细胞系中的雌激素受体(Estrogen receptor α , ER)阳性具有一定相关性^[3]。FOXA1蛋白与BRCA-1可在体内相互作用调节p27Kip1的表达,而细胞周期依赖性激酶特异性抑制蛋白(p27 kinase inhibition protein1, p27Kip1)蛋白的低表达在各种肿瘤类型如乳腺癌、卵巢肿瘤、结肠癌的确诊、预后中具有一定的临床价值^[4]。目前联合FOXA1、BRCA-1对乳腺癌患者病理特征进行相关性研究比较少见。因此本文通过研究乳腺癌患者组织中FOXA1、BRCA-1表达与各项临床病理参数之间的相关性,为乳腺癌的防治、风险预测等提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 材料

收集2018年3月至2019年5月于本院收治的106例乳腺癌患者临床资料,包括患者的年龄、组织学分级、TNM分期、肿瘤直径大小、淋巴结转移以及肿瘤类型。纳入标准:①符合临床上乳腺癌的诊断标准^[5];②同意在本院接受治疗;③临床病理资料齐全。排除标准:①复发性乳腺癌患者;②患有心、肺、肾等器官衰竭;③患有其他恶性肿瘤。根据纳入排除标准,最终纳入97例患者作为本研究对象。

1.2 方法

所有患者行切除术的肿瘤组织标本均使用10%福尔马林固定,脱水,石蜡包裹,连续切片4 μ m,切片后常规染色,再行Envision两步法免疫组织化学染色:切片脱蜡、水化,高压修复后,使用3% H₂O₂灭活过氧化物酶,低温4℃ 24 h,再使用DAB染色。同时使用已知乳腺癌阳性切片作为阳性对照,使用磷酸缓冲盐溶液代替一抗作阴性对照。按照说明书操作染色,所有FOXA1、BRCA-1、ER、孕激素受体(Progesterone receptor, PR)、细胞增殖核抗原67(Ki67, Ki67)由本院病理科采用免疫组化法进行检测,鼠抗人FOXA1、BRCA-1、ER、PR、Ki67抗体均购自上海信裕生物科技有限公司。

1.3 结果判定

结果判定:由两位病理科医师双盲法进行确认,于光学显微镜(德国蔡司, NEOPHOT30)下随机选取5个视野进行观察,每个视野对200个肿瘤细胞计数。FOXA1于细胞核定位,采用半定量法判断着色^[6],0~3分评分,无着色=0分,着色细胞占

比<10%=1分,10%<着色细胞占比<20%=2分,20%<着色细胞占比<30%=3分,依此类推;另外按着色程度由浅、居中、强评分1~3分,两项积分的乘积为最后得分,4~30为FOXA1阳性,0~3之间为FOXA1阴性。BRCA-1蛋白在乳腺癌组织中多在细胞质中表达,部分于细胞核定位,细胞核阳性细胞数>10%为阳性,阳性细胞<10%为阴性。

ER、PR的阳性结果判定为阳性细胞数占肿瘤细胞>15%。Ki67定位于细胞核,有微弱胞质着色,阳性细胞数占肿瘤细胞>10%为Ki67阳性,阳性细胞数占肿瘤细胞<10%为Ki67阴性。组织学分级按照2012年WHO乳腺肿瘤分级标准^[7]分为I级、II级、III级、IV级;肿瘤TNM分期按照2003年修订的乳腺癌分期标准^[8]分为I期、II期、III期;淋巴结转移:根据相关文献^[9]对腋窝、内乳淋巴结转移进行淋巴结活检,经箱灯照射,进行淋巴结计数和常规病理检查,检测微小淋巴结判断病例淋巴结转移状态。

1.4 统计学方法

采用SPSS 20.0软件进行统计分析,计数资料用n(%)表示,行 χ^2 检验,采用Pearson法分析FOXA1、BRCA-1的表达与乳腺癌患者临床病理参数之间的相关性,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

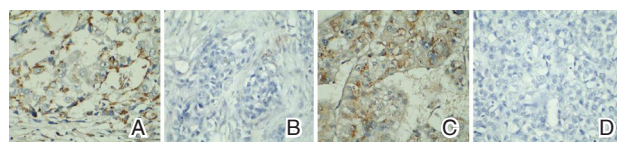
2 结果

2.1 免疫组化检测结果

BRCA-1阳性率最低,为35.05%;FOXA1阳性率最高,为61.86%。见表1、图1。

表1 免疫组化检测结果[n(%)]

标记物	阳性	阴性
ER	56(57.73)	41(42.27)
PR	40(41.24)	57(58.76)
Ki67	54(55.67)	43(44.33)
BRCA-1	34(35.05)	63(64.95)
FOXA1	60(61.86)	37(38.14)



注:A、B BRCA-1 阳性表达于细胞核或细胞质;C、D 为 FOXA1 阳性表达于细胞核。

图1 免疫组化染色结果(Envision 两步法, $\times 200$)

Figure 1 Results of immunohistochemical staining (Envision 两步法, $\times 200$)

2.2 不同临床病理参数乳腺癌患者的 FOXA1、BRCA-1 表达情况

不同组织学分级、TNM 分期、ER 表达、PR 表达、Ki67 表达的乳腺癌患者 FOXA1 阳性率比较差

异有统计学意义($P<0.05$);不同组织学分级、TNM 分期、肿瘤直径、ER 表达、PR 表达、Ki67 表达的乳腺癌患者 BRCA-1 阳性率比较差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 2。

表 2 乳腺癌患者各临床病理参数与 FOXA1、BRCA-1 表达的相关性 [$n(\%)$]

Table 2 Correlation between the expression of FOXA1 and BRCA-1 and clinicopathological parameters in breast cancer patients [$n(\%)$]

临床病理特征		例数($n=97$)	FOXA1		χ^2 值	P 值	BRCA-1		χ^2 值	P 值
			阳性($n=60$)	阴性($n=37$)			阳性($n=34$)	阴性($n=63$)		
年龄(岁)	< 45	58	37(61.67)	21(56.76)	0.230	0.632	21(61.76)	37(58.73)	0.085	0.771
	≥ 45	39	23(38.33)	16(43.24)			13(38.24)	26(41.27)		
组织学分级	I 级	25	10(16.67)	15(40.54)	10.729	0.013	4(11.76)	21(33.33)	9.603	0.022
	II 级	30	17(28.33)	13(35.14)			12(35.29)	18(28.57)		
	III 级	23	19(31.67)	4(10.81)			13(38.24)	10(15.87)		
	IV 级	19	14(23.33)	5(13.51)			5(14.71)	14(22.23)		
TNM 分期	I 期	29	12(20.00)	17(45.95)	9.090	0.011	6(17.65)	23(36.51)	6.510	0.039
	II 期	46	30(50.00)	16(43.24)			22(64.70)	24(38.10)		
	III 期	22	18(30.00)	4(10.81)			6(17.65)	16(25.39)		
肿瘤直径(cm)	<2	65	37(61.67)	28(75.68)	2.032	0.154	18(52.94)	47(74.60)	4.687	0.030
	≥ 2	32	23(38.33)	9(24.32)			16(47.06)	16(25.40)		
ER	阳性	56	40(66.67)	16(43.24)	5.146	0.023	14(41.18)	42(66.67)	5.880	0.015
	阴性	41	20(33.33)	21(56.76)			20(58.82)	21(33.33)		
PR	阳性	40	30(50.00)	10(27.03)	4.985	0.026	20(58.82)	20(31.75)	6.682	0.010
	阴性	57	30(50.00)	27(72.97)			14(41.18)	43(68.25)		
Ki67	阳性	54	39(65.00)	15(40.54)	5.548	0.018	11(32.35)	43(68.25)	11.533	0.001
	阴性	43	21(35.00)	22(59.46)			23(67.65)	20(31.75)		
淋巴结转移	无	38	21(35.00)	17(45.95)	1.151	0.283	15(44.12)	23(36.51)	0.537	0.464
	有	59	39(65.00)	20(54.05)			19(55.88)	40(63.49)		
肿瘤类型	鳞癌	34	24(40.00)	10(27.03)	3.393	0.335	9(26.47)	25(39.68)	1.922	0.589
	腺癌	32	20(33.33)	12(32.43)			12(35.29)	20(31.75)		
	浸润导管癌	23	13(21.67)	10(27.03)			10(29.41)	13(20.63)		
	浸润小叶癌	8	3(5.00)	5(13.51)			3(8.83)	5(7.94)		

3 讨论

FOXA1 蛋白是 FOX 家族的重要成员,能与靶基因染色体的启动子结合,促使靶基因转录,从而在组织器官发育、肿瘤发展等方面发挥关键作用^[10]。早有学者研究发现,FOXA1 在肿瘤组织中呈现高表达^[11]。但关于 FOXA1 在乳腺癌发展的具体作用,目前仍存在一些争议。部分报道指出 FOXA1 在乳腺癌早期起到促进作用^[12]。而有研究发现乳腺癌组织中 FOXA1 的表达与患者的无病生存期密切相关,FOXA1 表达可能预示着 ER 阳性乳腺癌患者的预后较好^[13]。BRCA1 最早由国外科学家发现^[14],BRCA1 基因分布于 17q21 染色体,可编码大量的氨基酸残基的 BRCA1 蛋白,同时也能对 DNA 损伤蛋白进行修复,在肿瘤抑制功能中发挥较好的作用。而通过检测 BRCA1 表达,有助于乳腺癌的早期发现、诊断与治疗^[15]。但 BRCA1 与乳腺癌发病机制的关系仍是目前尚未解决的问题。

有研究表明,40 岁以下的乳腺癌患者组织学分级差于年长患者,且不同年龄段乳腺癌发病率比较差异具有统计学意义^[16]。本研究结果发现临床病理分型较为复杂多样。闫振宇等人^[17]在研究中亦得出类似结论,提示乳腺癌临床病理特征具有多样性,同时需将镜检、免疫组织化学结果相结合,以便进行有效、及时的鉴别诊断。免疫组织化学检测是乳腺癌临床病理诊断和鉴别的重要手段另外有临床实践显示,FOXA1 在约 40% 的乳腺癌中表达,但在 ER 阳性的乳腺癌中阳性率可达 80%^[18]。本研究结果与文献报道数据有一定偏差,有可能是 ER、PR 阳性率较低(57.73%、41.24%)导致。另一方面,本研究结果发现 BRCA-1、FOXA1 的表达与乳腺癌患者的临床病理特征(如组织学分级、TNM 分期、ER 表达、PR 表达、Ki67 表达)具有较好的相关性。而组织学分级、TNM 分期等临床病理特征均为乳腺癌患者预后评估的有效指标,并且与 BRCA-1、FOXA1 表达的相关性良好,推测 BRCA-1、FOXA1 的表达可对乳腺癌患者预后的评估起到一定作用。

综上所述,FOXA1、BRCA-1的表达与乳腺癌患者临床病理特征具有良好的相关性,有望作为乳腺癌临床治疗与预后风险评估的新因素。

参考文献

- [1] Antonios K, Ioannis T, Athanasios S, et al. Changes in the incidence of breast cancer due to the use of radioactive materials for warfare or nuclear and environmental accidents over the last 60 years in Europe and Asia[J]. J BUON, 2019, 24(1):5-10.
- [2] Samuele L, Bellè F, Tiziana C, et al. Effect of BRCA1 missense variants on gene reversion in DNA double-strand break repair mutants and cell cycle-arrested cells of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Mutagenesis, 2020, 35(2):189-195.
- [3] Williamson EA, Wolf IJ, Bose S, et al. BRCA1 and FOXA1 proteins coregulate the expression of the cell cycle-dependent kinase inhibitor p27Kip1[J]. Oncogene, 2006, 25(9):1391-1399.
- [4] Kim NY, Kim JH, Pyo JS, et al. Clinicopathological Significance of Loss of p27Kip1 Expression in Papillary Thyroid Carcinoma[J]. Int J Biol Marker, 2018, 32(2):e255-259.
- [5] 中国抗癌协会乳腺癌专业委员会. 中国抗癌协会乳腺癌诊治指南与规范(2015版)[J]. 中国癌症杂志, 2015, 25(9):692-754.
- [6] Peng F, Zhang GL, Wang J, et al. Expression of BRCA-1 and TopoII in breast cancer and analysis of clinicopathological relationship[J]. Exp Lab Med, 2012, 30(6):552-554.
- [7] Lakhani SR, Ellis IO, Schnitt SJ, et al. WHO classification of tumours of the breast[M]. Lyon, France: IARC Press, 2012.
- [8] Escobar PF, Ma RJP, Ms LAR, et al. The 2003 revised TNM staging system for breast cancer: results of stage re-classification on survival and future comparisons among stage groups[J]. Ann Surg Oncol, 2007, 14(1):143-147.
- [9] 姜军. 乳腺癌淋巴结转移诊治进展[J]. 中华外科杂志, 2009, 47(7):497-499.
- [10] Berger A, Valérie LF, Masternak J, et al. Overexpression of transcription factor Foxa1 and target genes remediate therapeutic protein production bottlenecks in Chinese hamster ovary cells[J]. Biotechnol Bioeng, 2020, 117(4):1101-1116.
- [11] Xu XG, Dai XJ, Zhang J, et al. Overexpression of FOXA1 promotes apoptosis of human gastric cancer AGS cells may be related to its inhibition of EMT[J]. GAB, 2019, 38(10):417-421.
- [12] 黄秉一, 徐朝军, 宋岚. 原花青素促进三阴乳腺癌 MDA-MB-231 细胞凋亡的作用机制研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2017, 37(11):1196-1199.
- [13] Kawase M, Toyama T, Takahashi S, et al. FOXA1 expression after neoadjuvant chemotherapy is a prognostic marker in estrogen receptor-positive breast cancer[J]. Breast Cancer, 2015, 22(3):308-316.
- [14] Wenderlein JM. BRCA1- und -2- Mutationen - Zum erhöhten Brustkrebsrisiko durch die Pille bei BRCA1- und BRCA2-Mutation[J]. Geburtsh Frauenheilk, 2013, 73(8):765-768.
- [15] 陈崇, 温旺荣. BRCA1 基因与乳腺癌的诊断治疗[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2014, 6(3):145-151.
- [16] 曹希, 徐雅莉, 孙强. 年龄与三阴性乳腺癌患者预后的关系[J]. 中国普通外科杂志, 2020, 29(5):515-524.
- [17] 闫振宇, 曹学增, 买春阳, 等. 乳腺化生性癌的临床病理特征和免疫组织化学及鉴别诊断分析[J]. 重庆医学, 2017, 32(46):62-64.
- [18] 张继君, 陶丽丽, 赵夫娟, 等. FOXA1、GATA-3 与 ER 在乳腺癌中的表达及预后意义[J]. 暨南大学学报: 自然科学与医学版, 2019, 40(3):225-233.
- [6] Reagh J, Clarkson A, Bullock M, et al. Real world experience of BRAFV600E mutation specific immunohistochemistry in colorectal carcinoma[J]. Pathology, 2018, 50(3):342.
- [7] 余慧, 汪洁, 柳林, 等. 皮肤恶性黑色素瘤的临床特征及预后因素分析[J]. 实用癌症杂志, 2019, 34(5):802-804.
- [8] 郭荣荣, 郭江红, 兰慧娟, 等. 甲状腺癌超声特征与 BRAF V600E 基因突变相关性分析[J]. 肿瘤研究与临床, 2020, 32(9):622-627.
- [9] Qu HJ, Qu XY, Hu Z, et al. The synergic effect of BRAFV600E mutation and multifocality on central lymph node metastasis in unilateral papillary thyroid carcinoma[J]. Endocr J, 2018, 65(1):113.
- [10] 温琬玲, 谢建平, 林师宇, 等. 血清癌胚抗原, 甲状腺球蛋白及半乳凝集素-3 水平在甲状腺癌鉴别诊断中的价值[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2019, 11(1):58-62.
- [11] Thomas S, Ghiraldini FG, Saul C, et al. SIRT6 haploinsufficiency induces BRAFV600E melanoma cell resistance to MAPK inhibitors via IGF signalling[J]. Nat Commun, 2018, 9(1):3440.
- [12] 龚龙, 易春华, 周明, 等. HMGB1 和 HIF1a 在乳头状甲状腺癌中的表达及意义[J]. 中国现代医学杂志, 2019, 29(4):28-32.
- [13] 徐显昌, 周宁, 陈志刚. 甲状腺癌细针穿刺组织中 CEACAM1 表达量及其与肿瘤恶性程度的相关性[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(11):1544-1547+1551.

(上接第 375 页)

NLR、PLR 在高血脂症性急性胰腺炎诊断及病情评估中的价值

刘畅* 宋建梅 李晓阳

【摘要】目的 探究中性粒细胞与淋巴细胞比值(NLR)、血小板与淋巴细胞比值(PLR)在高血脂症性急性胰腺炎(HLAP)诊断及病情评估中的价值。**方法** 选取本院 132 例 HLAP 患者作为观察组,另选取同期 66 例胆源性、酒精性急性胰腺炎非 HLAP 患者作为对照组,66 例健康体检者作为健康组,比较 3 组 NLR、PLR、血脂指标[总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)]、炎症因子[C反应蛋白(CRP)、降钙素原(PCT)],分析 NLR、PLR 与血脂指标、炎症因子相关性,采用受试者工作特征(ROC)曲线评价 NLR、PLR 诊断价值,对比观察组不同病情程度患者 NLR、PLR 水平,分析 NLR、PLR 与 HLAP 病情程度的关系。**结果** 观察组 NLR、PLR、TC、TG、CRP、PCT 高于对照组、健康组,对照组高于健康组,差异有统计学意义($P<0.05$);Pearson 相关性分析,NLR、PLR 与 TC、TG、CRP、PCT 呈正相关($P<0.05$);ROC 曲线分析,NLR、PLR 联合诊断 AP 的 AUC 为 0.901,95%CI 为 0.858-0.934,敏感度为 80.30%,特异度为 92.42%,两者联合诊断 HLAP 的 AUC 为 0.846,95%CI 为 0.788-0.893,敏感度为 71.21%,特异度为 83.33%,均优于两者单独诊断,差异有统计学意义($P<0.05$);观察组重度患者 NLR、PLR 高于中度患者、轻度患者,中度患者高于轻度患者,差异有统计学意义($P<0.05$);Spearman 相关性分析,NLR、PLR 与 HLAP 病情程度呈正相关($P<0.05$)。**结论** NLR、PLR 联合检测在 HLAP 诊断与病情评估中具有较高临床价值。

【关键词】 高血脂症性急性胰腺炎;中性粒细胞与淋巴细胞比值;血小板与淋巴细胞比值

The value of NLR and PLR in diagnosis and evaluation of hyperlipidemia acute pancreatitis

LIU Chang*, SONG Jianmei, LI Xiaoyang

(Clinical Lab, Beijing Chao-Yang Hospital, Capital Medical University, Beijing, China, 100043)

【ABSTRACT】Objective To explore the value of neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR) and platelet-to-lymphocyte ratio (PLR) in the diagnosis and evaluation of hyperlipidemia acute pancreatitis (HLAP). **Methods** 132 HLAP patients from this Hospital were selected as the observation group, 66 non-HLAP patients with biliary and alcoholic acute pancreatitis during the same period were selected as the control group, and 66 healthy subjects were selected as the healthy group. The NLR, PLR, blood lipid indexes [total cholesterol (TC), triacylglycerol (TG)], inflammatory factors [C-reactive protein (CRP), procalcitonin (PCT)] in the three groups were compared. The correlation between NLR and PLR and blood lipid indexes and inflammatory factors were analyzed, and the receiver operating characteristic (ROC) curve was used to evaluate the diagnostic value of NLR and PLR. The NLR and PLR levels of patients with different disease levels in the observation group were compared, and the relationship between NLR, PLR and the disease level of HLAP was analyzed. **Results** The NLR, PLR, TC, TG, CRP and PCT in the observation group were higher than those in the control group and the healthy group, and the control group was higher than the healthy group, the difference was statistically significant ($P<0.05$). Pearson correlation analysis showed that NLR and PLR were positively correlated with TC, TG, CRP and PCT ($P<0.05$). The ROC curve analysis showed that the AUC of the

基金项目:北京市科委计划项目(Z161100000116053)

作者单位:首都医科大学附属北京朝阳医院检验科,北京 100043

*通信作者:刘畅, E-mail:chang02132685@163.com

combined diagnosis of AP by NLR and PLR was 0.901, 95%CI was 0.858 to 0.934, sensitivity was 80.30%, and specificity was 92.42%. The AUC of the two combined diagnosis of HLAP was 0.846, the 95%CI was 0.788-0.893, the sensitivity was 71.21%, and the specificity was 83.33%, which were better than the two independent diagnosis, the difference was statistically significant ($P<0.05$). The NLR and PLR of severe patients in the observation group were higher than those of moderate patients and mild patients, and the moderate patients were higher than the mild patients, the difference was statistically significant ($P<0.05$). Spearman correlation analysis showed that NLR, PLR and the severity of HLAP were positively correlated ($P<0.05$). **Conclusion** The combined detection of NLR and PLR has high clinical value in HLAP diagnosis and disease assessment.

[KEY WORDS] Hyperlipidemia acute pancreatitis; Neutrophil to lymphocyte ratio; Platelet to lymphocyte ratio

高血脂症是急性胰腺炎的独立危险因素,亦是复发性胰腺炎的高危因素。据统计,高血脂症性急性胰腺炎(Hyperlipidemic acute pancreatitis, HLAP)占有AP患者的6.17%左右,且更易进展为重症AP(SAP)^[1-2]。及早诊断、准确评估病情程度是防止HLAP病情恶化、改善预后的重要环节。中性粒细胞与淋巴细胞比值(Neutrophil to lymphocyte ratio, NLR)可反映机体炎症反应程度,有研究表明其与血脂异常密切相关^[3]。血小板与淋巴细胞比值(Platelet to lymphocyte ratio, PLR)能反应促炎、促血栓形成作用,关联AP发生发展过程^[4]。但关于两者与HLAP之间的关系仍有待验证。为此,本研究尝试探究NLR、PLR在HLAP诊断及病情评估中的应用价值。报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取北京朝阳医院2017年5月至2020年5月132例HLAP患者作为观察组,另选取同期66例非HLAP患者(38例胆源性AP,28例酒精性AP)作为对照组,66例健康体检者作为健康组。纳入标准:①观察组、对照组均为首次发病,经腹部超声、CT、

MRI检查显示AP影像学改变,血清淀粉酶和(或)脂肪酶活性>3倍正常上限值,且均符合《中国急性胰腺炎多学科(MDT)诊治共识意见(草案)》^[5]中AP相关诊断标准及病情程度判定标准;②观察组血清TG>11.3 mmol/L,证实为HLAP;③对照组无高血脂症,均属于胆源性或酒精性AP;④健康组体检各项指标均显示正常;⑤3组临床资料完整;⑥患者及家属均知情,签订知情承诺书。排除标准:①属于复发性、慢性AP者;②因其他原因(药物性、酒精性、胆源性)而致AP者;③合并自身免疫性疾病者;④伴有血液系统疾病者;⑤存在消化性溃疡者;⑥伴有恶性肿瘤者;⑦参与本研究前症接受降脂、激素治疗者。3组一般资料见表1。本研究经北京朝阳医院伦理委员会审批通过。

1.2 方法

于入院当日采集3组患者静脉血,采用贝克曼AU5800全自动生化分析仪及配套试剂检测总胆固醇(Total cholesterol, TC)、三酰甘油(Triacylglycerol, TG)水平,采用SYSMEX XE-5000全自动血细胞分析仪检测中性粒细胞、淋巴细胞、血小板,计算NLR、PLR;采用酶联免疫吸附法检测血清降钙素原(Procalcitonin, PCT)、C反应蛋白(C-reactive protein, CRP)。

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

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

资料	观察组($n=132$)	对照组($n=66$)	健康组($n=66$)	$t/F/\chi^2$ 值	P 值
年龄(岁)	42.27 $\pm$ 5.79	41.55 $\pm$ 5.24	43.02 $\pm$ 6.83	1.011	0.365
性别					
男	87(65.91)	41(62.12)	45(68.18)		
女	45(34.09)	25(37.88)	21(31.82)	0.553	0.758
体质量指数(kg/m ²)	25.62 $\pm$ 2.11	25.17 $\pm$ 2.03	24.95 $\pm$ 1.97	2.637	0.074
吸烟	36(27.27)	19(28.79)	15(22.73)	0.700	0.705
饮酒	76(57.58)	35(53.03)	33(50.00)	1.100	0.577
腹痛至入院时间(h)	18.71 $\pm$ 2.26	19.25 $\pm$ 2.08	—	1.627	0.105
基础疾病 糖尿病	10(7.58)	6(9.09)	—	0.136	0.712
脂肪肝	37(28.03)	15(22.73)	—	0.639	0.424
高血压	31(23.48)	13(19.70)	—	0.365	0.546
慢性阻塞性肺疾病	4(3.03)	1(1.52)	—	0.410	0.522

tive protein, CRP)水平,试剂盒购自德国罗氏公司,所有操作严格遵循试剂盒说明书。

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、行 χ^2 检验;相关性分析采用 Spearman/Pearson 相关系数模型;诊断价值采用受试者工作特征(ROC)曲线

分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3组 NLR、PLR、血脂指标、炎症因子比较

3组 NLR、PLR、TC、TG、CRP、PCT 比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。观察组 NLR、PLR、TC、TG、CRP、PCT 高于对照组、健康组;对照组高于健康组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 3组 NLR、PLR、血脂指标、炎症因子比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of NLR, PLR, blood lipid indexes and inflammatory factors in 3 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	NLR	PLR	TC (mmol/L)	TG (mmol/L)	CRP (mg/L)	PCT ($\mu\text{g/L}$)
观察组	132	7.53 $\pm$ 1.25 ^{bc}	151.72 $\pm$ 22.40 ^{bc}	10.57 $\pm$ 1.36 ^{bc}	15.03 $\pm$ 6.27 ^{bc}	51.37 $\pm$ 16.48 ^{bc}	2.26 $\pm$ 0.41 ^{bc}
对照组	66	4.41 $\pm$ 1.03 ^{ac}	130.53 $\pm$ 18.77 ^{ac}	9.14 $\pm$ 1.18 ^{ac}	6.16 $\pm$ 4.59 ^{ac}	24.55 $\pm$ 8.02 ^{ac}	1.52 $\pm$ 0.34 ^{ac}
健康组	66	2.62 $\pm$ 0.74 ^{ab}	108.32 $\pm$ 15.69 ^{ab}	4.47 $\pm$ 1.04 ^{ab}	1.63 $\pm$ 0.17 ^{ab}	3.74 $\pm$ 1.21 ^{ab}	0.37 $\pm$ 0.12 ^{ab}
<i>F</i> 值		493.604	106.157	535.865	177.309	346.261	675.695
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与观察组比较, $^aP < 0.05$;与对照组比较, $^bP < 0.05$;与健康组比较, $^cP < 0.05$

2.2 NLR、PLR 与血脂指标、炎症因子相关性

NLR ($r=0.492, 0.594, 0.636, 0.561$)、PLR ($r=0.577, 0.467, 0.544, 0.491$)与 TC、TG、CRP、PCT 呈正相关($P < 0.05$)。见图 1。

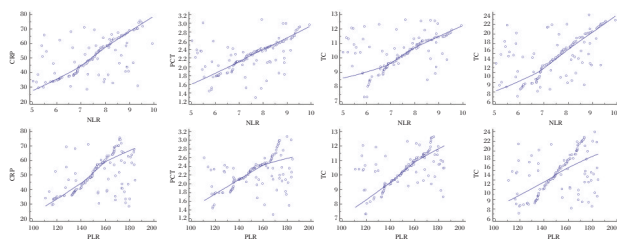
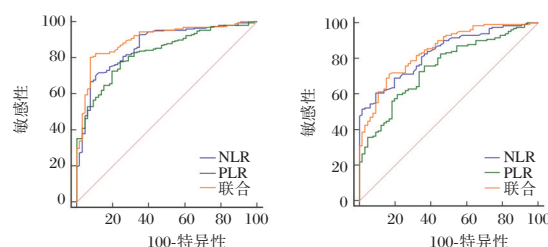


图 1 NLR、PLR 与血脂指标、炎症因子相关性

Figure 1 Correlation between NLR, PLR and blood lipid indexes and inflammatory factors

2.3 NLR、PLR 对 AP 及 HLAP 的诊断价值

联合诊断 AP 的 AUC 为 0.901, 95%CI 为 0.858~0.934, 敏感度为 80.30%, 特异度为 92.42%, 优于两者单独诊断, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 两者联合诊断 HLAP 的 AUC 为 0.846, 95%CI 为 0.788~0.893, 敏感度为 71.21%, 特异度为 83.33%, 优于两者单独诊断, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 见表 3、图 2。



注:左图为 NLR、PLR 对 AP 的诊断价值;右图为 NLR、PLR 对 HLAP 的诊断价值

图 2 NLR、PLR 对 AP 及 HLAP 的诊断价值

Figure 2 Diagnostic value of NLR and PLR for AP and HLAP

2.4 诊断流程图

以 NLR 为例,绘制诊断流程图,见图 3。

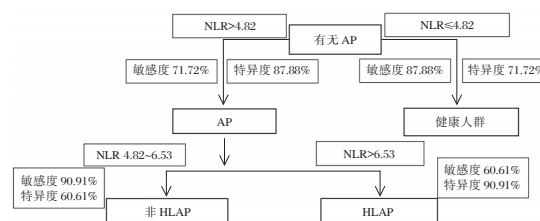


图 3 诊断流程图

Figure 3 Diagnostic flowchart

表 3 NLR、PLR 对 AP 及 HLAP 的诊断价值

Table 3 The diagnostic value of NLR and PLR for AP and HLAP

指标		AUC	95%CI	Z 统计	P 值	截断值	截断值敏感度(%)	截断值特异度(%)
诊断 AP	NLR	0.866	0.819~0.905	14.412	<0.001	>4.82	71.72	87.88
	PLR	0.828	0.777~0.872	12.359	<0.001	>125.68	77.78	75.76
	联合	0.901	0.858~0.934	18.749	<0.001	—	80.30	92.42
诊断 HLAP	NLR	0.833	0.773~0.882	11.880	<0.001	>6.53	60.61	90.91
	PLR	0.749	0.683~0.808	7.058	<0.001	>134.88	75.76	63.64
	联合	0.846	0.788~0.893	12.396	<0.001	—	71.21	83.33

2.5 观察组不同病情程度患者 NLR、PLR 水平

观察组不同病情程度患者 NLR、PLR 比较, 差异有统计学意义 ($P<0.05$); 观察组重度患者 NLR、PLR 高于中度患者、轻度患者, 中度患者高于轻度患者, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), 见表 4。

表 4 观察组不同病情程度患者 NLR、PLR 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Comparison of NLR and PLR levels of patients with different disease levels in the observation group ($\bar{x} \pm s$)			
组别	例数	NLR	PLR
重度患者	14	17.13 $\pm$ 3.11 ^{bc}	221.65 $\pm$ 41.76 ^{bc}
中度患者	36	7.92 $\pm$ 2.05 ^{ac}	155.89 $\pm$ 20.18 ^{ac}
轻度患者	82	5.72 $\pm$ 1.38 ^{ab}	137.95 $\pm$ 17.24 ^{ab}
F 值		236.257	89.496
P 值		<0.001	<0.001

注: 与重度患者比较, ^a $P<0.05$; 与中度患者比较, ^b $P<0.05$; 与轻度患者比较, ^c $P<0.05$

2.6 NLR、PLR 与 HLAP 病情程度的关系

NLR ($r=0.702$)、PLR ($r=0.679$) 与 HLAP 病情程度呈正相关 ($P<0.05$)。

3 讨论

近年来, 随着居民饮食习惯、生活方式改变, 高脂血症发病率逐渐升高, 成为继胆源性、酒精源性后 AP 的第三位病因^[6]。与其他病因所致 AP 相比, HLAP 具有病情更严重、多器官功能障碍风险更高、预后更差等特点^[7]。因此, 简便、准确、及早地诊断 HLAP、评估病情程度, 寻找可靠血液指标成为临床重要研究课题。

NLR 是一种能反映机体免疫状态与炎症反应的良好指标^[8]。Kokulu K 等^[9]报道中指出, NLR 在 AP 发病 48 h 内升高, 与 AP 发生密切相关。另有文献表明, NLR 水平可随机体炎症反应程度加重不断上升^[10]。本研究提示 NLR 可能通过调控血脂、炎症反应因子水平促进 HLAP 发生。分析原因, NLR 作为高脂血症的危险因素, 可经由促进血液内复合物沉积的途径加快高脂血症发生、加重高脂血症病情程度; 胰腺腺泡内的巨噬细胞、内皮细胞、淋巴细胞、中性粒细胞是引发炎症反应的主要细胞, 尤其是中性粒细胞大量表达会导致抗凋亡蛋白过多释放, 从而抑制炎症细胞凋亡^[11]。因此, 在 NLR 促进高脂血症、加速胰腺内炎症反应的双重作用下明显加快 HLAP 发生。本研究还显示, NLR 水平与 HLAP 病情程度显著相关, 能为临床准确评估病情程度提供更多依据。

临床证实, AP 发生发展过程中除有多种炎症细胞因子参与外, 血小板活化是病情进展的重要因素^[12]。而 PLR 是反映机体炎症反应、血小板活化、血栓形成的客观指标, 在组织损伤、炎症、氧化应激等病理状态下异常表达^[13]。本研究结果与陈雪等^[14]研究结果相符, 表明 PLR 可能有促进 HALP 发生作用。究其原因, PLR 异常升高会导致机体内血小板活性增加并大量聚集, 刺激炎症递质释放, 对胰腺腺泡产生细胞毒性作用, 诱发炎症反应。且有研究表明, 随着高脂血症、炎症反应程度增加, PLR 会持续升高, 是预测 HALP 患者发生心脑血管疾病的重要因子^[15]。本研究表明, PLR 与 HALP 患者血脂水平、炎症反应因子水平及病情程度显著相关, 故检测 PLR 水平变化可能成为临床诊断、评估病情的重要环节。

本研究初次尝试分析 NLR、PLR 联合检测在 AP 及 HALP 中的诊断价值, 发现两者联合诊断价值显著优于单独诊断, 为临床及早诊断 HALP 提供新途径。且与血脂预防性筛查相比, NLR、PLR 仅需经过简单血常规检测便可获取相关数据, 具有计算简便、可重复检测、费用低廉等优势, 适合临床推广。但本研究未详细探究 NLR、PLR 水平变化对 HALP 患者预后情况的影响, 需做进一步分析与探究。

综上可知, NLR、PLR 与 HALP 患者血脂、炎症反应密切相关, 联合检测在 HLAP 诊断与病情评估中具有较高临床价值。

参考文献

- [1] Cao X, Wang HM, Du H, et al. Early predictors of hyperlipidemic acute pancreatitis [J]. Exp Ther Med, 2018, 16(5): 4232-4238.
- [2] 赵志伶, 王芳, 孟超, 等. 血脂水平对高脂血症性急性胰腺炎严重性的影响 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2018, 25(4): 379-382.
- [3] 潘向东, 陈汴玲, 陈媛媛. 社区老年体检人群炎症指标检测及临床价值研究 [J]. 中国全科医学, 2019, 22(18): 2206-2210.
- [4] 冉桥生, 项贵明, 刘飞, 等. MPV、NLR、MLR 与急性胰腺炎的相关性研究 [J]. 检验医学与临床, 2020, 17(13): 1819-1821+1825.
- [5] 中国医师协会胰腺病学专业委员会. 中国急性胰腺炎多学科 (MDT) 诊治共识意见 (草案) [J]. 中华胰腺病杂志, 2015, 15(4): 217-224.
- [6] Xiang JX, Hu LS, Liu P, et al. Impact of cigarette smoking on recurrence of hyperlipidemic acute pancreatitis [J]. World J Gastroenterol, 2017, 23(47): 8387-8394.
- [7] Lu J, Xie Y, Du J, et al. Penta-therapy for severe acute hy-

(下转第 387 页)

妊娠期糖尿病患者孕晚期血清趋化素水平的意义

李宁^{1*} 尹倩²

[摘要] **目的** 探讨孕晚期妊娠期糖尿病(GDM)患者血清趋化素水平与糖脂代谢、微炎症状态的相关性。**方法** 选取2019年1月至2019年9月间在本院进行产检的孕晚期GDM孕妇40例作为GDM组,同期在本院进行产检及分娩的健康孕妇50例作为正常对照组。检测两组孕妇血清趋化素水平并根据GDM组中位数进一步分为高趋化素组、低趋化素组各20例。对比两组孕妇外周血糖代谢指标[空腹血糖(FPG)、糖化血红蛋白(HbA1C)、空腹胰岛素(FINS)]、脂质代谢指标[甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)]、炎症指标[肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、超敏C反应蛋白(hs-CRP)、白介素-6(IL-6)]水平的差异。分析孕晚期GDM孕妇血清趋化素水平与糖脂代谢、微炎症状态的相关性。**结果** GDM组孕妇的血清趋化素水平显著高于正常对照组孕妇,差异有统计学意义($P<0.05$)。GDM组孕妇外周血FPG、HbA1C、FINS的水平高于正常对照组孕妇;外周血中TG、TC、LDL-C的水平高于正常对照组,HDL-C的水平低于正常对照组;血清中TNF- α 、hs-CRP、IL-6的水平高于正常对照组孕妇,且随趋化素水平增加,GDM组孕妇中上述指标水平进一步变化,差异有统计学意义($P<0.05$);孕晚期GDM孕妇血清趋化素水平与FPG、HbA1C、FINS、TG、TC、LDL-C、TNF- α 、hs-CRP、IL-6呈正相关,与HDL-C呈负相关,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 孕晚期趋化素水平与GDM患者病情间存在一定相关关系,可能成为病情监测、治疗指导的重要指标之一。

[关键词] 妊娠期糖尿病;趋化素;糖脂代谢;微炎症

Significance of serum chemokine levels in patients with gestational diabetes mellitus in late pregnancy

LI Ning^{1*}, YIN Qian²

(1. Department of Obstetrics, Oilfield General Hospital, Puyang City, Henan Province, Puyang, Henan, China, 457000; 2. Department of Obstetrics, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong, China, 510515)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the correlation between serum chemokine level and glucolipid metabolism, microinflammatory status, maternal and infant outcomes in patients with third trimester gestational diabetes mellitus (GDM). **Methods** 40 cases of GDM patients during late pregnancy from January 2019 to September 2019 were selected as GDM group, 50 cases of healthy pregnant women who underwent prenatal examination and delivery in our hospital at the same time were treated as normal control group. Serum chemokine level of two groups were detected and GDM group was further divided into high chemokine group ($n=20$) and low chemokine group ($n=20$) according to chemokine median of GDM group. Levels of peripheral blood sugar metabolism indexes [fasting plasma glucose (FPG), glycosylated hemoglobin (HbA1C), fasting insulin (FINS)], lipid metabolism indexes [triglyceride (TG), total cholesterol (TC), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), high density lipoprotein cholesterol (HDL-C)], inflammation indexes [tumor necrosis factor- α (TNF- α), hypersensitive c-reactive protein (hs-CRP) and interleukin-6 (IL-6)] were compared between each group. Correlation between serum chemokine level and glucolipid metabolism, microinflammatory status in GDM women were analyzed. **Results** Serum chemokine level in GDM group was signifi-

基金项目:开封市科技发展项目(2003036)

作者单位:1. 河南省濮阳市油田总医院产科,河南,濮阳 457000

2. 南方医科大学南方医院产科,广东,广州 510515

*通信作者:李宁, E-mail: caomu10823lk@163.com

cantly higher than that in normal control group ($P<0.05$). Levels of FPG, HbA1C and FINS in peripheral blood of GDM group were higher than those of control group; levels of TG, TC and LDL-C in peripheral blood were higher than those in normal control group, while level of HDL-C was lower than that in normal control group; Serum levels of TNF- α , hs-CRP and IL-6 were higher than those of normal control group, levels of these indicators further changed as increasing of chemokine level in GDM group ($P<0.05$). Serum chemokine level of GDM women in late pregnancy were positively correlated with FPG, HbA1C, FINS, TG, TC, LDL-C, TNF- α , hs-CRP, IL-6, negatively correlated with HDL-C ($P<0.05$). **Conclusion** There is a certain correlation between chemokine level in late pregnancy GDM patients' condition, which may be one of the important indicators for condition monitoring and treatment guidance.

[KEY WORDS] Gestational diabetes mellitus; Chemerin; Glucolipid metabolism; Microinflammation

妊娠期糖尿病(Gestational diabetes mellitus, GDM)是临床常见的妊娠合并症,病情控制不佳可严重威胁母婴健康。胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)是GDM发生发展的重要机制,但导致IR出现的具体原因涉及较多因素,尚未有统一结论。趋化素(chemerin, Chem)是一种新型脂肪因子,有研究^[1-2]证实其是引起人体糖耐量异常、IR的独立危险因素,且在肥胖人群中表达量更高,动物实验^[3]证实肥胖大鼠胰岛素靶组织中趋化素表达异常增高。妊娠女性的脂肪含量较非孕时大幅增加,这一特殊状态下脂肪因子表达量可能发生一系列变化,但关于趋化素等与GDM具体病情的内在联系以及对母婴预后的早期预测价值等,相关研究开展不多。文中探讨孕晚期GDM患者血清中趋化素水平变化情况,进一步分析趋化素水平对GDM病情的评估及预测价值,旨在为日后GDM孕妇病情评估等寻找简便、可靠的新指标。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集2019年1月至2019年9月在本院产检的孕晚期GDM孕妇40例作为GDM组,纳入标准:①符合中华医学会妇产科学分会产科学组、中华医学会围产医学分会妊娠合并糖尿病协作组制定的《妊娠合并糖尿病诊治指南(2014)》^[4]中对GDM的定义;②入组时孕周 ≥ 28 周;③单胎;④既往无分娩史;⑤孕妇年龄 < 45 周岁;⑥本人签署知情同意书。排除标准:①合并其他妊娠合并症;②合并活动性感染;③合并脂肪肝等基础性脂质水平异常性疾病;④合并前置胎盘等危险妊娠情况。取同期在本院产检及分娩的健康孕妇50例作为正常对照组,各项检查指标水平均在正常范围内、首次分娩且本人签署知情同意书。本次研究获医院伦理委员会审核批准。GDM组、正常对照

组孕妇的基础资料分布如下:GDM组孕妇年龄(27.59 ± 5.17)周岁,孕前体质指数(23.74 ± 4.19) kg/m^2 ,孕次(2.18 ± 0.39)次,入组时孕周(31.90 ± 3.42)周;正常对照组孕妇年龄(27.64 ± 5.58)周岁,孕前体质指数(23.69 ± 4.32) kg/m^2 ,孕次(2.21 ± 0.48)次,入组时孕周(31.68 ± 4.31)周。两组基础资料的分布具有可比性比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。

1.2 血清趋化素水平检测

入组后留取GDM组、正常对照组孕妇的空腹外周静脉血5.0 mL,分离血清后采用酶联免疫吸附法检测趋化素水平。进一步根据GDM组患者的趋化素水平中位数将其分为高趋化素组、低趋化素组各20例。

1.3 糖脂代谢、微炎症指标水平检测

外周静脉血标本同1.2,采用OLYMPUS AU640全自动生化分析仪直接检测静脉血糖代谢指标[空腹血糖(FPG)、糖化血红蛋白(HbA1C)、空腹胰岛素(FINS)]、脂质代谢指标[甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)]水平,进一步分离血清后采用酶联免疫吸附法检测其中微炎症指标[肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、超敏C反应蛋白(hs-CRP)、白介素-6(IL-6)]的水平。

1.4 统计学方法

使用软件SPSS 20.0对数据进行计算分析;计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,均符合正态分布,两组间比较采用独立样本 t 检验;两种数据间的相关性分析采用Pearson检验; $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血清趋化素水平结果

GDM组孕妇的血清趋化素水平为(9.74 ± 1.20) ng/mL ,中位数为10.63 ng/mL 。正常对照组孕妇的血清趋化素水平为(8.01 ± 0.97) ng/mL 。

GDM组孕妇的血清趋化素水平显著高于正常对照组孕妇,差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.2 各组糖脂代谢指标比较

GDM组孕妇外周血糖代谢指标 FPG、

HbA1C、FINS 的水平均高于正常对照组孕妇;脂质代谢指标中 TG、TC、LDL-C 的水平高于正常对照组, HDL-C 的水平低于正常对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),见表1。

表1 各组孕妇的糖代谢指标及脂质代谢指标水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of glucose and lipid metabolism indexes of pregnant women in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	FPG (mmol/L)	HbA1C (%)	FINS (μU/mL)	TG (mmol/L)	TC (mmol/L)	LDL-C (mmol/L)	HDL-C (mmol/L)
GDM组	40	6.10±0.75	6.99±0.75	22.50±3.42	2.97±0.41	5.80±0.72	3.09±0.37	1.05±0.13
高趋化素组	20	6.95±0.84 ^a	7.34±0.85 ^a	26.71±4.25 ^a	3.28±0.45 ^a	6.41±0.78 ^a	3.74±0.48 ^a	1.01±0.14 ^a
低趋化素组	20	5.84±0.72	6.61±0.77	18.42±2.60	2.53±0.35	5.30±0.57	2.85±0.36	1.12±0.16
正常对照组	50	4.58±0.59	5.66±0.72	11.33±1.88	2.10±0.27	4.72±0.61	2.18±0.35	1.25±0.18
<i>t</i> 值		10.764	8.548	19.690	12.089	7.702	11.949	5.901
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注:与低趋化素组比较,^a $P<0.05$ 。

2.3 各组炎症指标比较

GDM组孕妇血清中 TNF-α、hs-CRP、IL-6 的水平高于正常对照组孕妇,其中高趋化素组孕妇以上各个炎症指标的水平高于低趋化素组孕妇差异有统计学意义($P<0.05$)。见表2。

表2 各组孕妇的血清炎症指标水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of serum inflammatory indexes of pregnant women in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	TNF-α(pg/mL)	hs-CRP(mg/L)	IL-6(pg/mL)
GDM组	40	7.81±0.84	2.83±0.36	6.37±0.81
高趋化素组	20	8.52±0.98 ^a	3.51±0.42 ^a	7.19±0.84 ^a
低趋化素组	20	7.04±0.76	2.07±0.24	5.66±0.73
正常对照组	50	5.93±0.71	1.27±0.20	4.18±0.52
<i>t</i> 值		11.505	26.047	15.540
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000

注:与低趋化素组比较,^a $P<0.05$ 。

2.4 相关性分析

孕晚期 GDM 孕妇血清趋化素水平与糖代谢指标 FPG、HbA1C、FINS 的水平呈正相关与脂质代谢指标 TG、TC、LDL-C 的水平呈正相关与 HDL-C 的水平呈负相关;与炎症指标 TNF-α、hs-CRP、IL-6 的水平呈正相关($P<0.05$)。见表3。

3 讨论

趋化素前体由内脏脂肪、肝脏组织分泌,当人体脂肪蓄积增加、BMI 值上升时其水平随之增加,故被认为是肥胖的生物学标志^[5]。

糖代谢异常是 GDM 的主要诊断标准,由胰岛素敏感性下降、胰岛素抵抗等多种因素所致,最终患者表现为 FPG、HbA1C、FINS 水平的明显增加,且与具体病情呈正相关^[6-7]。趋化素致糖代谢紊乱

表3 孕晚期 GDM 孕妇血清中趋化素水平与各项血液指标的相关性

Table 3 Correlation between serum chemokine level and various blood indexes of GDM pregnant women in the third trimester of pregnancy

参数	<i>r</i> 值	<i>P</i> 值
FPG	0.738	0.000
HbA1C	0.669	0.012
FINS	0.810	0.000
TG	0.754	0.000
TC	0.772	0.000
LDL-C	0.683	0.008
HDL-C	-0.661	0.013
TNF-α	0.597	0.017
hs-CRP	0.703	0.006
IL-6	0.722	0.001

的作用可能与其诱导外周组织胰岛素抵抗相关^[8]。肥胖人群存在明显脂质代谢异常,GDM 孕妇该代谢紊乱一般更为严重,本结果也说明这一点,GDM 组孕妇的 TG、TC、LDL-C 水平更高而 HDL-C 水平大幅降低,这与林青青^[9]的研究结论一致。趋化素对脂质代谢的上述负面作用可能是导致 GDM 发生发展的重要原因之一,如 Niklowitz P^[10]的研究中所述趋化素可加重肥胖人群的代谢综合征程度,推测与趋化素可能与脂代谢的紊乱有关,但具体机制仍有待今后更多的基础研究来证实。

脂肪组织可持续分泌低水平的炎症因子,这也是肥胖患者处于微炎症状态的重要原因,微炎症状态也是 GDM 孕妇的重要特征,具体以 TNF-α、hs-CRP、IL-6 等常见炎症因子水平的慢性升高为主要表现^[11]。持续存在的炎症反应可进一步增加 IR,故 GDM 与微炎症状态间相互影响并形成恶性循环^[12-13]。文中 GDM 孕妇血清中上述炎症因子的

水平较健康孕妇有明显增加,且GDM孕妇血清趋化素水平增加各个炎症因子的水平持续走高,说明趋化素水平与GDM孕妇的微炎症状态呈正相关,可能与趋化素通过核因子 κ B介导炎症反应发生、增加胰岛素抵抗的作用相关^[14-15]。

综上所述,可得出结论:GDM孕妇血清趋化素水平异常增高,且趋化素水平与患者糖脂代谢异常程度、微炎症程度均呈正相关。本次研究由于纳入病例数有限,可能使数据产生偏倚,且未对趋化素影响GDM病情的具体机制进行探索,有待后续大样本及基础研究的进一步开展明确。

参考文献

- [1] Al Doghaither HA, Alshaikh EM, Omar UM, et al. Insulin resistance and its correlation with chemerin and visfatin in Saudi patients with hyperthyroidism[J]. Int J Health Sci (Qassim), 2019, 13(5): 18-21.
- [2] Çelik MN, Ünlü Söğüt M. Probiotics Improve Chemerin Levels and Metabolic Syndrome Parameters in Obese Rats[J]. Balkan Med J, 2019, 36(5): 270-275.
- [3] 杨晶,敖娜,都健. 胰升糖素样肽1受体激动剂对高脂喂养肥胖大鼠胰岛素靶组织中趋化素表达的干预效应[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2016, 32(11): 946-951.
- [4] 中华医学会妇产科学分会产科学组, 中华医学会围产医学分会妊娠合并糖尿病协作组. 妊娠合并糖尿病诊治指南(2014)[J]. 中华妇产科杂志, 2014, 49(8): 561-569.
- [5] 俞善春,葛冰磊. 血清 Chemerin, CTRP3, RBP4 在肥胖 2 型糖尿病患者中的变化及意义[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(15): 1805-1808.
- [6] Yan Y, Liu Z, Liu D. Heterogeneity of glycometabolism in patients with gestational diabetes mellitus: Retrospective study of 1,683 pregnant women[J]. J Diabetes Investig, 2017, 8(4): 554-559.
- [7] Yan L, Feng J, Cheng F, et al. Circular RNA expression profiles in placental villi from women with gestational diabetes mellitus[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 498(4): 743-750.
- [8] 门英华,张焕灵,田雪辉. 血清超敏C-反应蛋白及趋化素与妊娠期糖尿病患者胰岛素抵抗的关系[J]. 包头医学院学报, 2018, 34(1): 53-54.
- [9] 林青青,曾白华. 不同血糖控制情况下妊娠期糖尿病患者的维生素D及血脂水平[J]. 牡丹江医学学报, 2019, 40(2): 70-72.
- [10] Niklowitz P, Rothermel J, Lass N, et al. Link between chemerin, central obesity, and parameters of the Metabolic Syndrome: findings from a longitudinal study in obese children participating in a lifestyle intervention [J]. Int J Obes (Lond), 2018, 42(10): 1743-1752.
- [11] 李香茶,余瑾,姚国明,等. 微炎症因子对终末期糖尿病肾病患者血液透析前后中医证候变化的影响[J]. 浙江中医杂志, 2019, 54(6): 402-403.
- [12] Wiebe N, Stenvinkel P, Tonelli M. Associations of Chronic Inflammation, Insulin Resistance, and Severe Obesity With Mortality, Myocardial Infarction, Cancer, and Chronic Pulmonary Disease[J]. JAMA Netw Open, 2019, 2(8).
- [13] 李茂香,李玉,吕媛媛,等. 血清 Chemerin、25(OH)D3、visfatin 水平检测对妊娠期糖尿病的诊断价值及与患者胰岛素抵抗的关联性[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2019, 11(6): 503-507.
- [14] 黄泽锋,谢鑫. Chemerin 通过核因子 κ B 介导的炎症反应诱导 C2C12 细胞产生胰岛素抵抗[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2015, 31(6): 725-729.
- [15] 张丽,赵伟雪. 妊娠期糖尿病孕妇加强血糖控制对妊娠结局的影响[J]. 中外女性健康研究, 2019, 9(2): 70-71.
- [16] perlipidemic pancreatitis [J]. Am J Emerg Med, 2018, 36(10): 1789-1795.
- [8] 陶珍,崔连奇,赵磊,等. NLR, 血清 CHE, Ang-1 与 ACI 患者病情变化的关系[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(5): 575-578+586.
- [9] Kokulu K, Günaydin YK, Akıllı NB, et al. Relationship between the neutrophil-to-lymphocyte ratio in acute pancreatitis and the severity and systemic complications of the disease [J]. Turk J Gastroenterol, 2018, 29(6): 684-691.
- [10] 吕魁. BISAP 评分系统、NLR 对急性胰腺炎预后的预测价值[J]. 肝胆外科杂志, 2018, 26(6): 43-46.
- [11] 朱杰伦,程建国,郭凯,等. 高三酰甘油血症性胰腺炎患者病情严重程度与血脂和炎症反应指标的关系[J]. 中华胰腺病杂志, 2020, 20(5): 383-386.
- [12] Kaplan M, Ates I, Oztas E, et al. A New Marker to Determine Prognosis of Acute Pancreatitis: PLR and NLR Combination [J]. J Med Biochem, 2018, 37(1): 21-30.
- [13] İlhan M, İlhan G, Gök AF, et al. Evaluation of neutrophil-lymphocyte ratio, platelet-lymphocyte ratio and red blood cell distribution width-platelet ratio as early predictor of acute pancreatitis in pregnancy [J]. J Matern Fetal Neonatal Med, 2016, 29(9): 1476-1480.
- [14] 陈雪,高峰,张杰. 中性粒细胞与淋巴细胞比值、血小板与淋巴细胞比值和红细胞分布宽度对急性高甘油三酯血症性胰腺炎严重程度的预判价值[J]. 中国临床医生杂志, 2018, 46(8): 898-901.
- [15] 张翌,刘琴,刘爱平,等. NLR 和 PLR 与高脂血症的相关性分析[J]. 检验医学, 2020, 35(8): 767-770.

(上接第 383 页)

MSI、PD-L1 在 NSCLC 患者中的表达及其与预后的相关性

张文静¹ 章春芝^{1*} 王贵刚¹ 容宇¹ 韩媛媛¹ 陈丽君²

[摘要] **目的** 探讨微卫星不稳定性(MSI)、程序性死亡配体-1(PD-L1)在非小细胞肺癌(NSCLC)患者中的表达水平及其预后相关性。**方法** 收集2010年6月至2014年12月在本院收集的86例NSCLC患者手术切除癌组织及对应距病灶5 cm以上癌旁正常组织。利用PCR技术检测172例样品中BAT-25、BAT-26、D2S123、D5S346、D17S250五个位点的MSI,判断MSI表达情况。采用免疫组化法检测PD-L1的水平。对MSI、PD-L1与临床病理因素的关系进行分析,所有患者根据病情给予手术切除联合抗PD-L1等相应治疗,对影响NSCLC患者5年生存率的独立因素进行分析,观察MSI、PD-L1表达对患者5年生存率的影响。**结果** 非小细胞癌组织中MSI表达率为63.95%,明显高于癌旁组织,差异有统计学意义($P<0.05$)。PD-L1表达率明显高于癌旁正常组织,差异有统计学意义($P<0.05$)。PD-L1表达与肿瘤分化程度、淋巴是否转移、TNM分期有关($P<0.05$);MSI状态与肿瘤分化程度、淋巴转移情况、TNM分期有关($P<0.05$)。MSS及MSI-L患者术后生存时间明显低于MSI-H患者,差异有统计学意义($P<0.05$)。PD-L1阳性患者术后生存时间明显低于阴性组,差异有统计学意义($P<0.05$)。Logistic回归分析显示PD-L1阳性($OR=3.888$)、淋巴转移($OR=3.823$)、TNM分期Ⅲ~Ⅳ期($OR=3.380$)为影响患者5年生存率独立危险因素,MSI-H阳性为NSCLC患者5年生存率的保护因素($OR=0.289$)($P<0.05$)。**结论** MSI和PD-L1的表达与NSCLC临床病理特征及预后密切相关,可作为NSCLC预后预测的重要指标。

[关键词] MSI; PD-L1; 非小细胞肺癌

Expression of MSI and PD-L1 in NSCLC patients and their correlation with prognosis

ZHANG Wenjing¹, ZHANG Chunzhi^{1*}, WANG Guigang¹, RONG Yu¹, HAN Yuanyuan¹, CHEN Lijun²

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

[ABSTRACT] **Objective** To explore the expression levels of microsatellite instability (MSI) and programmed death ligand 1 (PD-L1) in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC) and their correlation with prognosis. **Methods** The surgically resected cancer tissues and normal para-cancerous tissues (over 5 cm away from corresponding lesions) from 86 NSCLC patients confirmed by the Department of Pathology, this Hospital from June 2010 to December 2014 were collected. MSI values at BAT-25, BAT-26, D2S123, D5S346 and D17S250 loci from the 172 specimens was detected by PCR to determine the expression of MSI. The level of PD-L1 was detected by immunohistochemistry. The relationship between MSI, PD-L1 and clinicopathological factors was analyzed. All patients were treated with surgical resection combined with anti-PD-L1 and other corresponding treatments according to the condition. The independent influencing factors of 5-year survival rate were analyzed. The effects of MSI and PD-L1 on 5-year survival rate were observed. **Results** The expression rates of

基金项目:张家口市2020年市级科技计划(2021080D)

作者单位:1.河北北方学院附属第一医院胸心血管外科,河北,张家口 075000

2.河北北方学院附属第一医院急诊科,河北,张家口 075000

*通信作者:章春芝, E-mail: zhangcz999xwk@163.com

MSI and PD-L1 in NSCLC tissues, significantly higher than those in para-cancerous normal tissues ($P<0.05$). The expression of PD-L1 is related to the degree of tumor differentiation, lymph node metastasis and TNM staging ($P<0.05$). MSI status is related to the degree of tumor differentiation, lymph node metastasis and TNM staging ($P<0.05$). The postoperative survival time in patients with MSS and MSI-L was significantly shorter than that with MSI-H ($P<0.05$). The postoperative survival time in patients with PD-L1 positive was significantly shorter than that with PD-L1 negative ($P<0.05$). Logistic regression analysis showed that PD-L1 positive ($OR=3.888$), lymph node metastasis ($OR=3.823$) and TNM stage III-IV ($OR=3.380$) were independent risk factors that affect the 5-year survival rate, and MSI-H positive ($OR=0.289$) was a protective factor ($P<0.05$). **Conclusion** The expressions of MSI and PD-L1 are closely related to the clinicopathological characteristics and prognosis of NSCLC, and can be used as important indicators for predicting the prognosis of NSCLC.

[KEY WORDS] MSI; PD-L1; Non-small cell lung cancer

程序性死亡配体-1(Programmed death ligand-1, PD-L1)为负免疫共刺激分子,在肿瘤细胞表面表达量较高,与肿瘤细胞免疫逃逸相关,利用PD-L1阻滞机制可对晚期非小细胞肺癌(Non small cell lung cancer, NSCLC)患者进行有效治疗^[1]。作为免疫治疗选择的可靠预测性生物标志物,已有研究表明PD-L1表达水平与化疗效果密切相关^[2]。微卫星DNA广泛存在于人类基因组中,广泛用于基因定位分析。研究表明,微卫星不稳定性(Microsatellite instability, MSI)与肿瘤的发病密切相关^[3]。不同分期NSCLC患者MSI状态存在差异,检测MSI对于NSCLC患者病情及预后评估价值良好^[4]。1996年国际上拟定了一个以BAT-25、BAT-26、二核苷酸位点(D2S123、D5S346、D17S250)为肿瘤组织MSI检测的标志性位点,已有研究表明上述位点对NSCLC患者MSI的检测具有较高的敏感性及特异性^[5]。因此本研究对MSI、PD-L1表达水平及两者对NSCLC患者预后的影响进行探究。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集2010年6月至2014年12月在本院确诊86例NSCLC患者手术切除癌组织及对应距病灶5 cm以上癌旁正常组织。其中男性52例,女性34例;平均年龄(51.42 ± 4.24)岁;低分化27例,中高分化59例;按国际抗癌联盟(Union for International Cancer Control, UICC)第8版肺癌TNM分期标准进行分期^[6], I~II期69例, III~IV期例;鳞癌48例,腺癌38例。纳入标准:①按2008年美国国家综合癌症网络(National Comprehensive Cancer Network, NCCN)制定NSCLC诊断标准^[7],经病理学检查或细胞学检查确诊为NSCLC患者;②病史资

料完整者;③术前未进行放疗或化疗者。排除标准:①合并其他原发癌症患者;②中途退出患者;③自身免疫性疾病及传染病患者;④其他不明类型肺癌患者。本研究经本院医学伦理委员会批准,受试者签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 基因组的提取及目的基因的扩增

细胞总DNA的提取,采用GenoSton公司生产基因组试剂盒MG706901提取癌组织及癌旁正常组织细胞基因组。按表1设计引物,扩增试剂盒采用北京擎科兴业有限公司产(2XT5 Super PCR mix)按试剂盒上操作步骤扩增序列,完成后上样检测。

表1 MSI引物序列

Table 1 MSI primer sequences

引物名称	引物序列
BAT-25	F-TGACTACTTTTGACTTCAGCC R-AACCATTCAACATTTTAAACCC
BAT-26	F-TGACTACTTTTGACTTCAGCC R-AACCATTCAACATTTTAAACCC
D2S123	F-AAACAGGATGCCTGCCTTTA R-GGACTTTCCACCTATGGGAC
D5S346	F-CTTGACAATAGACAAATATG R-TCGAATGGAGATTGGCCTG
D17S250	F-CAGGCTGGTCTCAAACCTC R-GGAAGAATCAAATAGACAAT

1.2.2 PD-L1免疫组化

兔抗人PD-L1单克隆抗体(CD274)购自ThermoFisher公司,具体操作照试剂盒说明书进行。

1.2.3 结果判定

MSI判定标准^[8]:对比正常组织PCR扩增结果,条带正常为MSS,出现条带缺失判定为MSI,其中仅缺失1条为MSI-L,缺失两条及以上为MSI-H。PD-L1判读标准^[9]:显微镜视野下随机取10个视野,以每个视野中存在棕黄色颗粒细胞所占比例进

行判定, $\geq 50\%$ 为阳性, 否则为阴性。

1.3 随访

所有患者随访资料均完整无缺失, 随访时间5年, 每6月进行一次电话或门诊随访。以患者手术到随访截至日或死亡日之间时间计算患者生存期, 对两组无进展生存期进行比较。

1.4 统计学方法

所有数据采用 SPSS 16.0 统计软件进行处理。计数资料以 $n(\%)$ 表示, 采用 χ^2 检验; 生存曲线采用 Kaplan-Meier 绘制, 以 log-rank 检验; 通过多元 Logistic 回归进行多因素生存分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NSCLC 癌组织及癌旁组织中 MSI、PD-L1 表达情况

NSCLC 肺癌组织 MSI 阳性率高于癌旁组织, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。癌组织 PD-L1 阳性率相比癌旁组织明显升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表2、图1。

表2 NSCLC 癌组织及癌旁组织 MSI、PD-L1 表达情况比较 [$n(\%)$]

Table 2 Expression of MSI and PD-L1 in NSCLC and adjacent tissues [$n(\%)$]

组别	n	MSS	MSI		PD-L1	
			MSI-L	MSI-H	阳性	阴性
癌组织	86	31(36.05)	36(41.86)	19(22.09)	58(67.44)	28(32.56)
癌旁组织	86	83(96.51)	2(2.33)	1(1.16)	2(2.33)	84(97.67)
χ^2 值			70.340		80.267	
P 值			<0.001		<0.001	

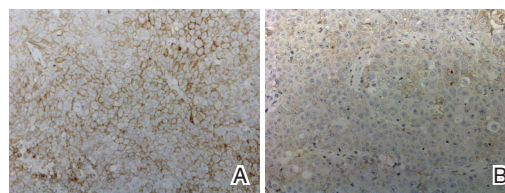
表3 MSI、PD-L1 与临床病理因素的关系 [$n(\%)$]

Table 3 Relationship between MSI, PD-L1 and clinicopathological factors [$n(\%)$]

因素		<i>n</i>	MSS	MSI-L	MSI-H	χ^2 值	<i>P</i> 值	PD-L1	χ^2 值	<i>P</i> 值
年龄	≥50	50	21(67.74)	19(52.78)	10(52.63)	1.837	0.441	33(56.90)	0.113	0.737
	<50	36	10(32.23)	17(47.22)	9(47.37)			25(43.10)		
性别	男	52	18(58.06)	21(58.33)	13(68.42)	0.646	0.724	38(65.52)	1.902	0.168
	女	34	13(41.94)	15(41.67)	6(31.58)			20(34.48)		
吸烟	是	41	17(54.84)	19(47.22)	5(26.32)	4.488	0.106	29(50.00)	0.386	0.534
	否	45	14(45.16)	17(52.78)	14(73.68)			29(50.00)		
分化程度	中/高	59	24(77.42)	19(52.78)	16(84.21)	7.453	0.027	44(75.86)	5.986	0.014
	低	27	7(22.58)	17(47.22)	3(15.79)			14(24.14)		
组织学分型	鳞癌	48	20(64.52)	21(58.33)	7(36.84)	3.818	0.143	34(58.62)	0.569	0.451
	腺癌	38	11(35.49)	15(41.67)	12(63.16)			24(41.38)		
淋巴转移	有	52	24(77.42)	20(55.56)	8(42.11)	6.770	0.031	30(51.72)	5.694	0.047
	无	34	7(22.58)	16(44.44)	11(57.89)			28(48.28)		
TNM 分期	I~II	69	20(64.52)	32(88.89)	17(73.91)	7.552	0.023	43(74.14)	4.172	0.041
	III~IV	17	11(35.48)	4(11.11)	6(26.09)			15(25.86)		

2.2 MSI、PD-L1 表达与临床病理因素的关系

MSI 各组及 PD-L1 在肿瘤分化程度、淋巴结转移情况以及 TNM 分期中的表达差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 在年龄、性别、吸烟史、组织学分型中差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表3。



注: A: PD-L1 阳性; B: PD-L1 阴性。

图1 NSCLC 患者癌组织 PD-L1 免疫组化结果 (Envision, $\times 400$)

Figure 1 Immunohistochemical results of PD-L1 in cancer tissues of NSCLC patients (Envision, $\times 400$)

2.3 MSI、PD-L1 表达与预后的关系

所有 86 例 NSCLC 患者未出现失访情况, 随访 86 例患者 5 年总生存率为 55.81%。MSS 阳性、MSI-L 阳性、MSI-H 阳性患者 5 年存活率分别为 36.67%、58.33%、84.24%, MSI-H 阳性患者总生存时间明显大于 MSI-L 阳性及 MSS 阳性, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); MSS 阳性及 MSI-L 阳性生存时间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。PD-L1 阳性患者术后 5 生存率为 44.83%, 低于 PD-L1 阴性组的 78.57%, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图2。

2.4 NSCLC 患者生存期相关因素单因素分析

淋巴结是否转移、TNM 分期、肿瘤分化程度、MSI 表达情况、PD-L1 表达情况均与患者 5 年生存率有关 ($P < 0.05$), 年龄、性别、吸烟史、肿瘤组织学分型与患者 5 年生存率无关 ($P > 0.05$)。见表4。

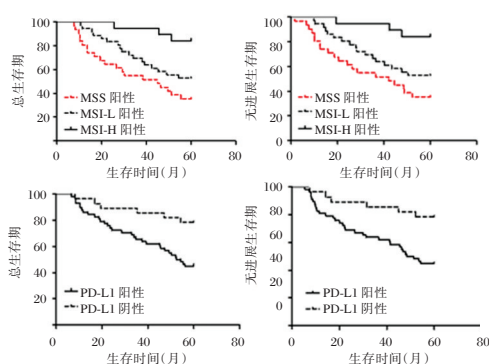


图2 不同MSI、PD-L1表达情况患者生存曲线比较

Figure 2 Comparison of survival curves among patients with different MSI and PD-L1 expression

表4 NSCLC患者生存期相关因素单因素分析[n(%)]

Table 4 Univariate analysis of survival related factors in NSCLC patients [n(%)]

因素	n	5年生存数(%)	χ^2 值	P值
年龄				
≥50	50	29(58.00)	0.621	0.328
<50	36	19(52.78)		
性别				
男	52	28(53.85)	0.511	0.475
女	34	20(58.82)		
吸烟史				
是	41	22(53.66)	0.096	0.758
否	45	26(57.78)		
分化程度				
中高	59	27(45.76)	4.329	0.037
低	27	21(77.78)		
组织学				
鳞癌	48	26(54.16)	0.269	0.604
腺癌	38	22(57.89)		
淋巴结转移				
有	52	23(44.23)	9.302	0.002
无	34	25(73.53)		
TNM分期				
I~II	69	46(66.67)	16.670	<0.001
III~IV	17	2(11.76)		
MSI表达				
MSI-H	19	16(84.21)	6.269	0.012
MSS+MSI-L	67	32(52.24)		
PD-L1表达				
阳性	58	26(44.83)	3.855	0.047
阴性	28	22(78.57)		

2.5 NSCLC生存相关因素Logistic回归分析

以5年生存率为应变量,以上述有统计学意义单因素为自变量赋值(MSI-H阳性=0, MSS+MSI-L阳性=1; PD-L1阳性=0, 阴性=1; 肿瘤分化程度低=0, 中高=1; 淋巴结转移=0, 未转移=1; TNM分期I~II=0, III~IV=1)。Logistic表明, PD-L1阳性、淋巴结转移、TNM分期III~IV期为影响患者5年生存率的独立危险因素, MSI-H阳性为保护因素($P<0.05$), 见表5。

表5 NSCLC生存相关因素多元Logistic回归分析

Table 5 Multivariate Logistic regression analysis of survival related factors of NSCLC

组别	B值	SE值	Wald值	OR值	95%CI	P值
MSI-H阳性	-1.241	0.540	5.281	0.289	0.100~0.833	0.022
PD-L1阳性	1.358	0.386	12.377	3.888	1.825~8.286	<0.001
淋巴结转移	1.341	0.476	7.937	3.823	1.504~9.718	0.005
TNM分期III~IV	1.218	0.556	4.799	3.380	1.137~10.052	0.029

3 讨论

目前常规治疗NSCLC的方式包括手术切除、放疗、化疗以及最新的免疫治疗。大多数NSCLC患者确诊时已属晚期,此时癌细胞已扩散,不适合进行手术治疗,只能采取化疗方式以缓解症状,但治愈率较低。

DNA错配修复(mis-match repair, MMR)是DNA错配修复系统中的重要部分,当机体出现MMR缺陷时, DNA错配修复功能丧失,导致基因中短片段重复序列发生突变即MSI。研究表明,当机体处于MSI状态时,致癌基因激活异常、抑癌基因失活,正常细胞基因突变不断累积,大量突变产生,细胞异常增殖导致肿瘤的产生^[10]。MSI状态可通过MSI位点进行检测,对比正常癌旁组织,结果显示一条及以上条带增加或缺失即为MSI阳性^[11]。黎琪等^[12]研究发现,结直肠癌患者癌组织样本中MSI阳性检出率为73.21%,远高于正常组织。Warth等^[13]研究表明, NSCLC患者癌组织MSI与PD-L1存在相关性。国外已有研究证实,利用上述位点对NSCLC中MSI检测具有良好的敏感性及其特异性^[14]。同时,本研究结果表明NSCLC患者淋巴结是否转移、肿瘤分化情况、TNM分期对MSI的表达存在一定的影响。同时MSI-H阳性表达患者生存期明显高于MSS、MSI-L阳性患者,且MSI-H阳性为NSCLC患者5年生存率的保护因素,表明MSI表达情况与患者预后相关,提示MSI-H可能成为NSCLC患者预后评估的良好指标。

PD-1为免疫抑制剂的一种,可与PD-L1相互作用调控机体免疫反应。肿瘤细胞表面PD-L1含量上升,大量的PD-L1加速与PD-1受体结合,导致效应T细胞增殖速度减慢并诱导细胞迅速凋亡,降低T细胞对癌细胞的免疫反应,癌细胞迅速增殖^[15]。吴涵等^[16]研究表明, NSCLC患者的PD-L1阳性表达率为62.2%,与本研究结果相似。本研究结果显示PD-L1表达与淋巴结是否转移、TNM分期以及肿瘤分化程度有关,与年龄、性别、是否吸烟、肿瘤组织学分类无关,与高峰等^[17]研究基本相似。本研究结果提示利用PD-L1作为NSCLC预后的预测指标具有良好的价值,临床对NSCLC患者PD-L1表达情况的检测可作为患者预后评估的重要依据。

综上所述, NSCLC患者MSI、PD-L1水平明显升高,其表达水平与病理特征密切相关; MSI、PD-L1阳性患者5年生存率显著低于阴性患者,其表达水平与患者预后存在明显相关性。(下转第395页)

脑脊液CK、A β 42、P-tau在阿尔茨海默病中的诊断价值

李丹 徐进 范晓飞 张怀亮*

【摘要】目的 探究脑脊液CK、A β 42、P-tau在阿尔茨海默病中的诊断价值。**方法** 选取2018年5月至2020年5月本院收治的40例阿尔茨海默病患者(AD)为研究对象,另选取40例轻度认知障碍患者(MCI),40例血管性痴呆患者(VD),40例健康体检人员为对照组。采用ELISA法测定四组脑脊液CK、A β 42、P-tau水平;以受试者工作特征曲线(ROC曲线)评估三者诊断AD的价值。**结果** 脑脊液CK、A β 42、P-tau水平比较,AD组、VD组、MCI组CK及P-tau水平均显著高于健康对照组($P<0.05$),AD组、VD组、MCI组A β 42均显著低于健康对照组差异均有统计学意义($P<0.05$)。AD组CK、P-tau水平显著高于VD组($P<0.05$),A β 42水平显著低于MCI组、VD组($P<0.05$);VD组CK、P-tau水平显著高于MCI组($P<0.05$)。ROC曲线分析结果显示,脑脊液CK、A β 42、P-tau水平分别取3.045 U/L、155.63 ng/L、182.32 ng/mL时诊断效能最高,AUC分别为0.816、0.690、0.790(95%CI: 0.709~0.923、0.572~0.808、0.678~0.902);三项联合诊断AD的AUC为0.887(95%CI: 0.816~0.958),敏感度为0.950、特异度为0.725。**结论** 脑脊液CK、A β 42、P-tau对阿尔茨海默病有一定诊断价值,三项联合诊断价值更高。

【关键词】 阿尔茨海默病;脑脊液CK;脑脊液A β 42;脑脊液P-tau;诊断价值

Diagnostic value of cerebrospinal fluid CK、A β 42、P-tau in Alzheimer's disease

LI Dan, XU Jin, FAN Xiaofei, ZHANG Huailiang*

(Department of Encephalopathy, The First Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou, Henan, China, 450000)

【ABSTRACT】Objective To explore the diagnostic value of cerebrospinal fluid CK、A β 42、P-tau in Alzheimer's disease. **Methods** 40 patients with Alzheimer's disease (AD) admitted to our hospital from May 2018 to May 2020 were selected as the research subjects, another 40 patients with mild cognitive impairment (MCI) and 40 patients with vascular dementia were selected (VD), 40 healthy medical examiners served as the control group. ELISA method was used to determine the levels of CK, A β 42, and P-tau in the four groups of cerebrospinal fluid. The receiver operating characteristic curve (ROC curve) was used to evaluate the value of the three in the diagnosis of AD. **Results** The levels of CK, A β 42 and p-Tau in cerebrospinal fluid in the AD, VD and MCI groups were significantly higher than those in the healthy control group ($P<0.05$), and the levels of A β 42 in AD, VD and MCI groups were significantly lower than those in the healthy control group ($P<0.05$). The levels of CK and p-Tau in the AD group were significantly higher than those in the VD group ($P<0.05$), and the level of A β 42 in the AD group was significantly lower than that in the MCI group and VD groups ($P<0.05$). The levels of CK and p-Tau in the VD group were significantly higher than those in the MCI group ($P<0.05$). ROC curve analysis showed that CK, A β 42 and p-tau levels in CSF were 3.045 U/L, 155.63 ng/L and 182.32 ng/mL, respectively. The AUC was 0.816, 0.690, 0.790 (95% CI: 0.709~0.923, 0.572~0.808, 0.678~0.902). The AUC of the three combined diagnosis for AD was 0.887 (95% CI: 0.816~0.958), the sensitivity was 0.950, and the specificity was 0.725. **Conclusion** Cerebrospinal fluid CK、A β 42、P-tau have certain diagnostic value for Alzheimer's disease, and the combined diagnostic value of the three is higher.

【KEY WORDS】 Alzheimer's disease; Cerebrospinal fluid; CK; A β 42; P-tau; Diagnostic value

基金项目:张怀亮全国名老中医药专家传承工作室建设项目(国中医药人教函[2018]134号)

作者单位:河南中医药大学第一附属医院脑病四科,河南,郑州450000

*通信作者:张怀亮, E-mail: zhl121@126.com

阿尔茨海默病(Alzheimer disease, AD)是常见的起病隐匿的神经系统退行性疾病,临床表现为记忆障碍、视空间障碍、执行功能障碍等全面性痴呆。既往探究表明^[1-2],AD是不可逆的进行性加重疾病,AD病理改变成熟阶段患者使用疾病修饰药物治疗无法逆转脑损伤。因此早期诊断AD患者利于药物治疗减缓疾病发展,改善生活质量。研究表明:脑脊液是最早反映AD病理变化的标志物,具有重要诊断、预测、鉴别作用^[3]。AD患者主要特征为脑内神经元丢失,老年斑大量出现与神经原纤维缠结, β 淀粉样蛋白(A β 42)是老年斑的主要组成部分,神经纤维缠结与P-tau蛋白异常表达相关^[4-5]。且相关研究提出脑脊液肌酸激酶(Creatine Kinase, CK)检测利于AD患者诊治^[6]。但临床有关脑脊液CK、A β 42、P-tau及三者联合对AD的诊断价值研究鲜有。基于此,本研究则探讨脑脊液CK、A β 42、P-tau及三项指标联合检测在AD中的诊断价值,以期临床诊断提供参考。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2018年5月至2020年5月本院收治的40例AD患者为研究对象,另选取40例轻度认知障碍期(mild cognitive impairment, MCI)患者为MCI组,40例血管性痴呆(vascular dementia, VD)患者为VD组,40例健康体检人员为对照组,其中AD组男性21例、女性19例,平均年龄(67.45 $\pm$ 6.54)岁,平均教育年限(8.14 $\pm$ 2.97)年;MCI组男性22例、女性18例,平均年龄(66.98 $\pm$ 6.76)岁,平均教育年限(8.54 $\pm$ 3.15)年;VD组男性21例、女性19例,平均年龄(66.89 $\pm$ 7.01)岁,平均教育年限(8.47 $\pm$ 3.07)年;对照组男性20例、女性20例,平均年龄(67.18 $\pm$ 7.15)岁,平均教育年限(8.29 $\pm$ 3.04)年。四组一般资料比较差异无统计学意义($P>0.05$),有可比性。

纳入标准:①AD、MCI诊断符合神经内科学会推荐诊断标准^[6];②VD患者缺血指数量表评分 ≥ 7 分,简易精神状态量表监测8~21分,伴有神经系统定位体征或脑卒中病史;③临床资料完整。排除标准:①MRI头部检查发现颅压脑积水、颅内占位、脑血管病影像改变患者。

1.2 方法

所有研究人员由有经验的腰穿操作者于L4/5间隙进行穿刺,不成功者再L3/4间隙穿刺,确定脑

脊液外观清亮后留取至pp管,进行常规生化涂片检查,红细胞阳性标本弃用,经4℃ 3 500 r/min离心15 min后,取上清液存于-80℃保存待检。

由同一组经验丰富操作医师采用ELISA法进行检测,按试剂盒步骤操作,分别进行加样、洗板,经318M全自动酶标仪(上海赫冠仪器有限公司)测定标准管水平与吸光度,根据校正曲线求得A β 42、P-tau取值,A β 42、P-tau试剂盒均购自上海晶抗生物工程有限公司。采用生化分析仪-INFORS(伊孚森生物技术(中国)有限公司)检测CK水平。

1.3 统计学方法

采用统计软件SPSS 22.0处理数据,计数资料用 n 表示;符合正态分布的计量资料用($\bar{x} \pm s$)表示,多组比较采用单因素方差分析,事后多重对比采用LSD- t 检验;相关性分析采用Spearman分析,诊断价值通过受试者工作特征曲线(ROC曲线)评估,曲线下面积(AUC)0.5~0.7时诊断准确性低,0.7~0.9时有一定准确性,>0.9准确性较高。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 4组脑脊液CK、A β 42、P-tau水平比较

4组受试者脑脊液CK水平VD组>AD组>MCI组>健康对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);A β 42水平AD组<VD组/MCI组<健康对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);P-tau水平AD组>VD组>MCI组>健康对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表1。

表1 4组脑脊液CK、A β 42、P-tau水平比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of CK, A β 42 and p-Tau levels in cerebrospinal fluid of the 4 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	CK(U/L)	A β 42(ng/L)	P-tau(ng/mL)
健康对照组	40	2.60 $\pm$ 0.80	190.94 $\pm$ 52.04	145.33 $\pm$ 35.89
MCI组	40	2.98 $\pm$ 0.77 ^a	170.86 $\pm$ 38.80 ^a	161.54 $\pm$ 22.49 ^a
VD组	40	9.29 $\pm$ 2.88 ^{ab}	164.81 $\pm$ 48.38 ^{ab}	178.75 $\pm$ 29.49 ^{ab}
AD组	40	3.42 $\pm$ 0.74 ^{abc}	153.47 $\pm$ 52.20 ^{abc}	186.93 $\pm$ 30.47 ^{abc}
F 值	—	158.863	4.250	15.286
P 值	—	0.000	0.006	0.000

注:^a示与健康对照组比较,^b是与MCI组比较,^c示与VD组比较,均 $P<0.05$ 。

2.2 脑脊液CK、A β 42、P-tau水平对AD的诊断价值

ROC曲线分析显示,脑脊液CK、A β 42、P-tau水平分别取3.045 U/L、155.63 ng/L、182.32 ng/mL时诊断效能最高,AUC分别为0.816、0.690、0.790,三项联合诊断AD的AUC为0.887,且敏感度为0.950。见图1、表2。

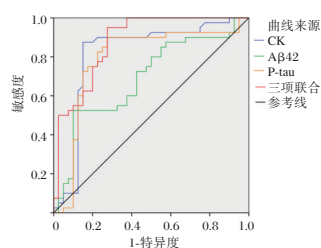


图1 各指标单独及联合诊断AD的ROC曲线

Figure 1 ROC curves of each indicator separately and jointly diagnosed AD

表2 脑脊液CK、Aβ42、P-tau水平的诊断效能

Table 2 Diagnostic efficacy of CK, Aβ42 and p-Tau levels in cerebrospinal fluid

指标	AUC	标准错误	截断值	敏感度(%)	特异度(%)	约登指数	P值
CK	0.816	0.054	3.045 U/L	0.800	0.850	0.650	0.000
Aβ42	0.690	0.060	155.63 ng/L	0.525	0.900	0.425	0.003
P-tau	0.790	0.057	182.32 ng/mL	0.850	0.725	0.575	0.000
三项联合	0.887	0.036	—	0.950	0.725	0.675	0.000

Aβ42、P-tau水平,采用ROC曲线评估三者及其联合检测对AD的诊断价值。

目前临床多用于诊断AD的生物标志物为蛋白类与核酸类,蛋白主要为Aβ与tau蛋白,核酸类主要为microRNA小分子,虽具有良好诊断效果,但检测周期较长^[9]。酶标志物诊断是多种疾病诊断方式,具有检测速度快,结果准确特点。CK是反应脑损伤情况的损伤标志物,在机体脑组织中以脑性同工酶形式存在,机体血脑屏障未发生损伤时,CK水平用于反应脑性同工酶活性^[6]。在本研究结果说明AD患者脑组织神经元细胞多存在损伤、凋亡及坏死情况,而VD患者多由脑区低灌注的脑血管疾病导致的严重认知功能障碍综合征,机体脑部神经元细胞损伤更严重。CK可通过反应机体脑组织神经元损伤程度诊断AD分期程度。

神经元细胞外沉积老年斑是AD主要病理变化特征之一。神经元通过两条特异性途径对前体蛋白进行加工^[10-11]:①β与γ分泌酶发挥协同作用从前体蛋白中切割产生Aβ42;γ分泌酶分裂Aβ₃₉₋₄₄间肽键产生39-43个氨基酸构成Aβ,不可溶性Aβ具有强神经毒性。②α与γ分泌酶进行水解后,α分泌酶因裂解位处于Aβ序列中不产生完整Aβ,主要通过非Aβ途径或结构性分泌加工前体蛋白^[12-13]。在本研究中,Aβ42水平AD组<VD组/MCI组<健康对照组。分析为:AD患者脑中存在Aβ42聚集形成老年斑于脑实质中,致使扩散至脑脊液中Aβ42蛋白水平减少。Aβ42水平变化能充

3 讨论

相关研究表明:全世界约有3500万以上的AD患者,且逐年增加,AD患者脑组织相关改变于出现临床症状前10~20年已然存在,且持续至病发^[6]。目前,临床针对确诊痴呆AD患者的有效治疗手段尚缺,但早期AD患者可通过物理治疗与药物干预延缓疾病进展,因此,早期有效诊断AD至关重要^[7-8]。本研究则通过ELISA检测脑脊液CK、

分反应脑组织神经元细胞外老年斑沉积情况,参与AD发展过程。

神经纤维缠结使AD主要病理变化另一特征。主要由tau蛋白过度磷酸化产生,位于轴突位置,主要作用为连接微管,调节轴突长度、和刚性及稳定性,与微管形成密切相关^[14-15]。既往研究表明,AD患者脑脊液tau蛋白水平显著升高。在本研究结果与上述具有一致性。分析为:AD患者脑中正常tau蛋白少,异常过度磷酸化tau蛋白增加,P-tau蛋白水平上升。AD患者P-tau水平升高,与微管蛋白结合力降低,致使微管稳定性丧失,破坏正常的微管系统,使神经元微管结构受累破坏,正常轴突转运受损,引起突触丢失神经元功能损伤,发生脑神经退行性病变。

同时,本研究三项联合诊断数据显示,CK、Aβ42、P-tau联合诊断AD的AUC为0.887,且诊断灵敏度95%,特异度72.5%,诊断准确性较高。因此,临床可加强对脑脊液三指标的监测,提高诊断效能,以利于患者接受及时治疗。

综上所述,脑脊液CK、Aβ42、P-tau对AD有较好诊断价值,三项联合诊断准确性更高,值得临床应用。本研究局限为未对AD患者进行定期随访及预后评估,研究脑脊液CK、Aβ42、P-tau指标在治疗效果及预后中的检测价值。

参考文献

- [1] DeCarli, Charles. Alzheimer Disease and Associated Disorders[J]. Alzheimer Dis Ass Dis, 2018, 21(4):269-270.

- [2] 李卓然,魏新华,江新青. 影像技术和分子检测技术在阿尔茨海默病诊断中的应用研究进展[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2019, 11(2): 146-151.
- [3] 贾建军, 张岩磊, 曾惟伊, 等. 脑脊液检测在阿尔茨海默病领域的应用现状[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2019, 21(11): 1192-1195.
- [4] 何晓燕, 杨丽娟, 李红燕. 血浆中 A β 及 Tau 蛋白水平检测在阿尔茨海默病诊断中的效果[J]. 中国急救医学, 2017, 37(2): 85-86.
- [5] 季娜, 郑欣宁, 张凤华, 等. 血液中 A β 1-42 和 P-tau-181 对阿尔茨海默病临床诊断的应用价值[J]. 医学与哲学, 2017, 38(22): 38-40, 48.
- [6] 刘辰庚, 孟双, 高原, 等. 脑脊液谷胱甘肽氧化酶在阿尔茨海默病中的诊断价值[J]. 医学研究杂志, 2019, 48(2): 53-56.
- [7] 孙云闯, 金海强, 孙永安, 等. 脑脊液相关标志物检测在阿尔茨海默病痴呆诊断中的应用[J]. 中国神经精神疾病杂志, 2018, 44(12): 722-726.
- [8] 常燕, 秦永德, 张奇洲, 等. 18F-AV-45 和 18F-FDG PET/CT 联合脑显像在阿尔茨海默病中的诊断价值[J]. 新疆医科大学学报, 2018, 41(4): 75-80.
- [9] 段贤, 孙启英, 李雯雯, 等. 外泌体 miRNA 在阿尔茨海默病诊治中的研究进展[J]. 中华老年医学杂志, 2020, 39(6): 717-721.
- [10] 李丹, 吕中伟. A β 和 Tau 蛋白分子影像探针诊断阿尔茨海默病的应用与思考[J]. 同济大学学报(医学版), 2019, 40(2): 133-138.
- [11] 王治国, 战莹, 武晓丹, 等. 血浆 β 淀粉样蛋白在阿尔茨海默病早期诊断中的临床价值[J]. 标记免疫分析与临床, 2017, 24(9): 976-978.
- [12] 周丽华, 徐武华. Tau 蛋白相关标志物对阿尔茨海默病的诊断价值[J]. 实用老年医学, 2017, 31(003): 285-287.
- [13] 李瑞力. P-tau 蛋白在颅脑损伤及相关神经退行性疾病中的研究进展[J]. 医学研究生学报, 2017, 30(8): 889-892.
- [14] 王治国, 战莹, 武晓丹, 等. 血浆和脑脊液 A β 42、tau 水平对阿尔茨海默病患者的早期诊断价值[J]. 检验医学与临床, 2018, 15(3): 314-316.
- [15] 于建平, 党小军. A β 1-42、Tau 和 P-tau 在 AD 与 VD 鉴别诊断中的应用价值[J]. 西南国防医药, 2018, 28(11): 105-106.

(上接第 391 页)

参考文献

- [1] Kloten V, Lampignano R, Krahn T, et al. Circulating Tumor Cell PD-L1 Expression as Biomarker for Therapeutic Efficacy of Immune Checkpoint Inhibition in NSCLC[J]. Cells, 2019, 8(8): 809.
- [2] Zeng T, Qin Q, Bian Z, et al. Clinical efficacy and safety of anti-PD-1/PD-L1 treatments in non-small cell lung cancer (NSCLC)[J]. Artificial Cells, Nanomed Biotechnol, 2019, 47(1): 4194-4201.
- [3] 中国临床肿瘤学会结直肠癌专业委员会, 中国抗癌协会大肠癌专业委员会遗传学组, 中国医师协会结直肠肿瘤专业委员会遗传专委会. 结直肠癌及其他相关实体瘤微卫星不稳定性检测中国专家共识[J]. 中华肿瘤杂志, 2019, 41(10): 734-741.
- [4] Xu Y, Chen L, Han Y, et al. The relation between MSI and the clinicopathologic factors of NSCLC[J]. Chin J Lung Cancer, 2000, 3(1): 27-30.
- [5] Chang L, Chang M, Chang H M, et al. Microsatellite Instability: A Predictive Biomarker for Cancer Immunotherapy[J]. Appl Immunohistochem Mol Morphol: AIMM, 2018, 26(2): e15-e21.
- [6] 波洛克, 孙燕, 汤钊猷. UICC 临床肿瘤学手册[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 142-168.
- [7] 石远凯. 美国国家癌症综合网非小细胞肺癌治疗指南 2008 年第二版介绍[J]. 中华肿瘤杂志, 2008, 30(5): 397-400.
- [8] 韩永, 徐燕杰, 石炳毅, 等. MSI 和 VEGF 在 NSCLC 组织中的表达及临床病理相关性研究[J]. 实用诊断与治疗杂志, 2007, 21(1): 8-11.
- [9] Al-Shibli K, Al-Saad S, Donnem T, et al. The prognostic value of intraepithelial and stromal innate immune system cells in non-small cell lung carcinoma [J]. Histopathology, 2009, 55(3): 301-312.
- [10] Yang G, Zheng RY, Jin ZS. Correlations between microsatellite instability and the biological behaviour of tumours [J]. J Cancer Res Clin oncol, 2019, 145(12): 2891-2899.
- [11] Shen C, Wang X, Tian L, et al. Microsatellite alteration in multiple primary lung cancer [J]. J Thorac Dis, 2014, 6(10): 1499-1505.
- [12] 黎琪, 张标, 牛丰南, 等. 合并结直肠癌双原癌患者的临床病理特征、MSI 及 K-ras 基因突变分析[J]. 中华医学杂志, 2020, 100(4): 301-306.
- [13] Warth A, Körner S, Penzel R, et al. Microsatellite instability in pulmonary adenocarcinomas: a comprehensive study of 480 cases [J]. Virchows Archiv, 2016, 468(3): 313-319.
- [14] Kim WS, Park C, Hong SK, et al. Microsatellite instability (MSI) in non-small cell lung cancer(NSCLC) is highly associated with transforming growth factor-beta type II receptor (TGF-beta RII) frameshift mutation [J]. Anti Cancer Res, 2000, 20(3a): 1499-1502.
- [15] Ji M, Liu Y, Li Q, et al. PD-1/PD-L1 expression in non-small-cell lung cancer and its correlation with EGFR/KRAS mutations[J]. Cancer Biol Therap, 2016, 17(4): 407-413.
- [16] 吴菡, 吴健, 石永利, 等. 非小细胞肺癌组织中 PD-1/PD-L1 的表达及临床意义[J]. 临床肿瘤学杂志, 2019, 24(3): 218-221.
- [17] 高峰, 钱文霞, 冯一中. 非小细胞肺癌中 TIM-3、PD-1、PD-L1 的表达与临床意义[J]. 海南医学, 2019, 30(2): 154-158.

外周血 miR-210 表达及血清 VEGF 含量与脑梗死再发的相关性

李颖颖* 高岚 王洪新

【摘要】目的 研究外周血 miR-210 表达及血清血管内皮生长因子(VEGF)含量与脑梗死再发的相关性。**方法** 选择2017年3月至2019年3月期间本院收治的急性脑梗死患者,随访发病后1年是否再发脑梗死并分为再发组和未再发组,比较两组外周血 miR-210 表达、血清 VEGF 含量及临床资料的差异,采用 ROC 曲线分析 miR-210 及 VEGF 对脑梗死再发的预测价值,采用 COX 回归模型分析脑梗死再发的影响因素。**结果** 与未再发组比较,再发组患者的外周血 miR-210 表达水平及血清 VEGF 含量明显降低,差异均有统计学意义($P<0.05$);经 ROC 曲线分析,外周血 miR-210 表达水平、血清 VEGF 含量对脑梗死再发具有预测价值($P<0.05$);经 COX 回归分析,外周血 miR-210 表达水平及血清 VEGF 含量是脑梗死再发的影响因素($P<0.05$)。**结论** 急性脑梗死患者外周血 miR-210 表达及血清 VEGF 含量降低与脑梗死再发有关。

【关键词】 急性脑梗死;再发;miR-210;VEGF

Correlation between the expression of miR-210 in peripheral blood, the content of VEGF in serum and recurrence of cerebral infarction

LI Yingying*, GAO Lan, WANG Hongxin

(Department of Laboratory Medicine, Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou, Henan, China, 450000)

【ABSTRACT】Objective To study the correlation between the expression of miR-210 in peripheral blood, the content of vascular endothelial growth factor (VEGF) in serum and the recurrence of cerebral infarction. **Methods** Patients with acute cerebral infarction admitted to our hospital from March 2017 to March 2019 were selected. They were divided into recurrent group and non recurrent group according to the recurrence of cerebral infarction one year after the onset. The differences of miR-210, VEGF and clinical data between the two groups were compared. ROC curve was used to analyze the predictive value of miR-210, VEGF on recurrence of cerebral infarction, and COX regression model was used to analyze the influencing factors of recurrent cerebral infarction. **Results** Compared with the non recurrence group, the expression of miR-210 in peripheral blood, the content of VEGF in serum were significantly lower ($P<0.05$); ROC curve analysis showed that the expression level of miR-210 in peripheral blood and the content of VEGF in serum had predictive value for the recurrence of cerebral infarction ($P<0.05$); COX regression analysis showed that the expression level of miR-210 in peripheral blood and the content of VEGF in serum were the influencing factors for the recurrence of cerebral infarction ($P<0.05$). **Conclusion** the decreased expression of miR-210 in peripheral blood and the content of VEGF in serum of patients with acute cerebral infarction are related to the recurrence of cerebral infarction.

【KEY WORDS】 Acute cerebral infarction; Recurrence; MiR-210; VEGF

基金项目:中国管理科学研究院教育科学研究所科技创新研究重点课题(KJCX7925)

作者单位:河南省人民医院检验科,河南,郑州 450000

*通信作者:李颖颖, E-mail: jian1980229zp@163.com

急性脑梗死是临床常见的心脑血管疾病,以颅内动脉血栓形成或血栓栓塞后神经功能缺血缺氧损害为特征,具有较高的致残率。近些年越来越多的研究认为脑梗死再发是影响脑梗死患者预后的重要因素,准确评估脑梗死病情及再发的风险具有积极临床意义^[1-2]。微小RNA(microRNA, miR)是一种具有广泛生物学作用的非编码小分子RNA,在急性脑梗死发病过程中参与炎症反应、细胞凋亡、血管新生等多个环节的调控。MiR-210在急性脑梗死的发病中起保护作用,有基础报道脑缺血缺氧后脑组织中增加miR-210表达,进而促进血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)生成和血管再生^[3];有临床报道,急性脑梗死患者外周血中miR-210的表达水平明显增加^[4]。但miR-210及VEGF与脑梗死再发是否具有相关性仍缺乏足够的临床证据。因此,本研究将以首次发生急性脑梗死的患者为对象,随访发病后1年内脑梗死再发的情况并分析外周血miR-210及血清VEGF与脑梗死再发的关系,旨在为发现急性脑梗死预后及再发新的评估标志物提供依据。

1 对象与方法

1.1 研究对象

选取2017年3月至2019年3月期间本院收治的124例急性脑梗死患者作为研究对象,纳入标准:①符合《中国急性缺血性脑卒中诊治指南2014》^[5]中的诊断标准;②首次发病且发病至入院时间<14 d;③临床资料完整;④可获取随访信息。排除标准:①合并脑出血;②既往有脑肿瘤、脑外伤病史。本研究经医院伦理委员会批准、患者均签署知情同意书。其中男性72例,女性52例,年龄49~73岁、平均(62.38±11.85)岁,发病至入院时间5 h~12 d、平均(2.47±0.52) d。1.2 外周血miR-210表达水平的检测。

1.2 外周血miR-210表达水平的检测

入院后采集肘静脉血3~5 mL,采用北京天根公司生产的试剂盒进行miRNA的提取及检测。首先,按照miRNA提取分离试剂盒的说明书进行操作,提取外周血中的miRNA;而后,按照miRNA cDNA第一链合成试剂盒进行操作,将外周血中miRNA反转录为cDNA;最后,按照miRNA荧光定量检测试剂盒配置荧光定量PCR

体系:cDNA 2 μL、反应预混液10 μL、上游引物(10 μmol/L) 0.6 μL、通用下游引物(10 μmol/L) 0.6 μL、去离子水6.8 μL,在PCR仪上进行扩增反应,扩增程序为:95℃预变性3 min后95℃ 5 s、60℃ 15 s,40个循环,根据循环曲线计算miR-210的表达量。

1.3 血清VEGF含量的检测

入院后采集空腹肘静脉血3~5 mL,静置后离心分离血清,采用酶联免疫吸附法试剂盒(上海西唐科技有限公司)检测VEGF的含量。

1.4 临床资料收集

根据患者的住院病历收集以下临床资料:年龄、性别、高血压史、糖尿病史、高脂血症史、冠心病史、入院时美国国立卫生院神经功能缺损(National Institute of Health stroke scale, NIHSS)评分、入院时改良RANKIN量表(modified RANKIN Scale, mRS)评分、空腹血糖(fasting blood glucose, FBG)、甘油三酯(triglyceride, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、低密度脂蛋白胆固醇(Low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(High density lipoprotein cholesterol, HDL-C)。

1.5 脑梗死再发的随访

采用电话回访、门诊复诊等方式进行随访,随访终点为再次出现新发脑梗死,新发脑梗死参照《中国急性缺血性脑卒中诊治指南2014》^[5]进行诊断,随访截止时间为本次脑梗死发生后1年。根据是否出现再发脑梗死分为再发组和未再发组。

1.6 统计学方法

采用SPSS 22.0软件及Prism 6.0软件进行统计学分析及制图,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示、组间比较采用 t 检验,计数资料以 $n(\%)$ 表示、组间比较采用 χ^2 检验,脑梗死再发的预测采用ROC曲线分析,脑梗死再发的影响因素采用COX回归分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 再发组与未再发组miR-210、VEGF的比较

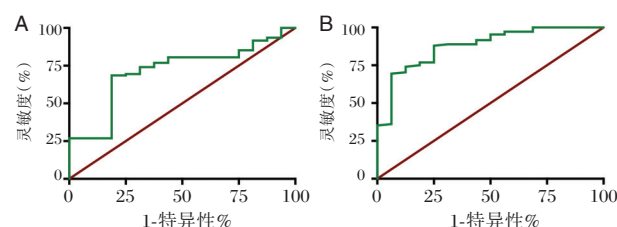
根据发病后1年是否出现再发脑梗死分为再发组16例,未再发组108例。与未再发组患者比较,再发组患者外周血miR-210的表达水平、血清VEGF的含量明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表1。

表1 再发组与未再发组 miR-210、VEGF 的比较 ($n, \bar{x} \pm s$)Table 1 Comparison of miR-210 and VEGF between recurrence group and non recurrence group ($n, \bar{x} \pm s$)

组别	n	miR-210	VEGF(ng/mL)
再发组	16	0.72±0.18	32.95±6.42
未再发组	108	1.00±0.29	45.49±9.39
t值		14.822	11.485
P值		<0.001	<0.001

2.2 miR-210、VEGF 预测脑梗死再发的 ROC 曲线分析

miR-210、VEGF 预测脑梗死再发的 ROC 曲线见图 1, 曲线下面积分别为 0.714 和 0.8779, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。



注: A: miR-210 预测脑梗死再发的 ROC 曲线; B: VEGF 预测脑梗死再发的 ROC 曲线。

图1 miR-210、VEGF 预测脑梗死再发的 ROC 曲线

Figure 1 ROC curve of miR-210 and VEGF in predicting recurrence of cerebral infarction

2.3 脑梗死再发影响因素的 COX 单因素回归分析

以脑梗死再发作为应变量, 以年龄、性别、高血压史、糖尿病史、高脂血症史、冠心病史、入院时 NIHSS 评分、入院时 mRS 评分、FBG、TG、TC、LDL-C、HDL-C、miR-210、VEGF 为自变量进行 COX 单因素回归分析, 结果显示: 高血压史、糖尿病史、FBG、TC、LDL-C、miR-210、VEGF 是脑梗死再发的影响因素 ($P<0.05$)。见表 2。

2.4 脑梗死再发影响因素的 COX 多因素回归分析

以脑梗死再发作为应变量, 以 COX 单因素回归分析中有统计学差异的高血压史、糖尿病史、FBG、TC、LDL-C、miR-210、VEGF 作为自变量, 进行 COX 多因素回归分析, 结果显示: 高血压史、FBG、miR-210、VEGF 是脑梗死再发的影响因素 ($P<0.05$)。见表 3。

3 讨论

急性脑梗死具有致残率高、复发率高的特点,

表2 脑梗死再发影响因素的 COX 单因素回归分析

Table 2 Cox regression analysis of influencing factors of cerebral infarction recurrence

变量	RR 值	95%CI	Wald/ χ^2 值	P 值
年龄	0.384	0.752-4.852	0.938	0.267
性别	0.291	0.472-6.687	0.575	0.716
高血压史	0.773	1.284-8.587	5.482	0.010
糖尿病史	0.692	1.132-7.598	4.272	0.021
高脂血症史	0.623	1.093-11.575	4.118	0.028
冠心病史	0.328	0.952-9.191	1.472	0.177
入院时 NIHSS 评分	0.118	0.575-6.585	0.981	0.225
入院时 mRS 评分	0.241	0.612-10.852	1.113	0.209
FBG	0.731	1.117-7.682	6.082	0.005
TG	0.418	0.918-9.198	1.898	0.097
TC	0.692	1.074-8.672	5.224	0.008
LDL-C	0.818	1.209-11.484	6.575	0.002
HDL-C	-0.293	0.384-3.858	1.272	0.184
miR-210	-0.412	0.738-0.919	4.584	0.017
VEGF	-0.674	0.713-0.939	6.952	0.002

表3 脑梗死再发影响因素的 COX 多因素回归分析

Table 3 Cox multivariate regression analysis on Influencing Factors of cerebral infarction recurrence

变量	RR 值	95%CI	Wald/ χ^2 值	P 值
高血压史	0.691	1.147-9.117	6.019	0.005
糖尿病史	0.382	0.837-13.922	2.018	0.089
FBG	0.705	1.204-6.342	5.272	0.017
TC	0.494	0.901-10.744	1.373	0.152
LDL-C	0.427	0.837-8.339	1.091	0.185
miR-210	-0.602	0.682-0.827	4.959	0.014
VEGF	-0.584	0.733-0.911	6.481	0.002

并且脑梗死复发会影响脑梗死患者预后、增加致残率。国内外关于脑梗死复发的流行病学调查显示, 首次发病的急性脑梗死患者 1 年内脑梗死再发的发生率约 10%~16%^[6-8]。本研究共纳入 124 例首次发病的急性脑梗死患者, 发病后 1 年内脑梗死再发 16 例, 再发发生率 12.90%, 与目前关于脑梗死再发发生率的报道基本一致。

在临床实践中, 早期评估脑梗死再发风险、筛查可能出现脑梗死再发的高危患者并进行干预, 有助于预防脑梗死再发、改善脑梗死预后。急性脑梗死发生后, 血管新生的激活有利于侧支循环的建立, 进而能够减轻神经功能损害^[9-10]。MiR-210 在血管新生过程中起调控作用, 在脑缺血缺氧过程中 miR-210 表达增加且对 VEGF 表达、血管新生具有促进作用^[3]。有研究在急性脑梗死大鼠中发现, 增加 miR-210 的表达能减轻大鼠神经功能损害、抑制神经元凋亡, 且这一作用与激活 VEGF 途径有关^[11-13]。以上结果表明 miR-210 靶向激活 VEGF 在脑缺血缺氧过程中发挥保护作用, 脑缺血

缺氧过程中 miR-210 及 VEGF 增多可能是机体自我保护的代偿机制。

虽然 miR-210 及 VEGF 在急性脑梗死发病中的作用已经受到了越来越多关注,但 miR-210 及 VEGF 与脑梗死再发的关系尚不清楚。急性脑梗死发生后侧支循环的建立不仅有利于减轻神经功能损害,还能实现远期获益、预防脑梗死再发。本研究在急性脑梗死患者中分析了 miR-210、VEGF 与脑梗死再发的关系,结果显示:再发脑梗死患者的外周血 miR-210 表达水平及血清 VEGF 含量明显低于未再发患者;经 ROC 曲线进行验证,外周血 miR-210 表达水平及血清 VEGF 含量对脑梗死再发具有预测价值。以上结果表明 miR-210、VEGF 与脑梗死再发有关。

近些年陆续有国内学者开始关注脑梗死再发的相关因素及预测标志物,程曼^[14]、李友凤^[15]、王伟英等^[16]的临床研究通过 COX 回归模型分析证实了高血糖、高血压、高血脂是脑梗死再发的相关因素,提示严格控制血糖、血脂、血压在脑梗死防治中的积极价值。本研究也在 COX 回归模型中分析了脑梗死再发的相关因素,除了发现与既往学者研究结果^[14-16]一致的高血压、空腹血糖是脑梗死再发的影响因素外,还发现 miR-210、VEGF 也是脑梗死再发的影响因素,由此进一步确认 miR-210、VEGF 降低与脑梗死再发有关。

综上所述,急性脑梗死患者外周血 miR-210 表达及血清 VEGF 含量降低与脑梗死再发有关,检测 miR-210、VEGF 对脑梗死再发具有预测价值。

参考文献

- [1] Moussaddy A, Demchuk AM, Hill MD. Thrombolytic therapies for ischemic stroke: Triumphs and future challenges[J]. *Neuropharmacology*, 2018, 134(Pt B): 272-279.
- [2] Sarkar S, Chakraborty D, Bhowmik A, et al. Cerebral ischemic stroke: cellular fate and therapeutic opportunities[J]. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2019, 1(24): 435-450.
- [3] 梁国安,姚桂飞,范海玲.脑缺血缺氧后新生鼠 miR-210 表达与脑血管再生的关系[J]. *华中科技大学学报(医学版)*, 2018, 47(4): 431-436.
- [4] 胡兆婷,郝梦薇,魏涛,等.血清 HIF-1 α 、miR-210 水平与急性脑梗死患者早期神经功能改善的关系[J]. *重庆医学*, 2020, 49(24): 4058-4061, 4065.
- [5] 中华医学会神经病学分会,中华医学会神经病学分会脑血管病学组.中国急性缺血性脑卒中诊治指南 2014[J]. *中华神经科杂志*, 2015, 48(4): 246-257.
- [6] Li R, Li Y, Li B, et al. Effectiveness comparisons of different Chinese herbal injection therapies for acute cerebral infarction: A protocol for systematic review and network meta-analysis[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2020, 99(32): e21584.
- [7] Qureshi AI, Qureshi MH, Lien LM, et al. One-Year Risk of Recurrent Stroke and Death Associated with Vertebrobasilar Artery Stenosis and Occlusion in a Cohort of 10,515 Patients[J]. *Cerebrovasc Dis*, 2019, 47(1-2): 40-47.
- [8] 董亚楠,李梦雨,刘斌,等.复发风险评估量表联合炎症标志物对脑梗死复发风险的预测[J]. *中华行为医学与脑科学杂志*, 2020, 29(6): 535-539.
- [9] Iwasawa E, Ishibashi S, Suzuki M, et al. Sphingosine-1-Phosphate Receptor 1 Activation Enhances Leptomeningeal Collateral Development and Improves Outcome after Stroke in Mice[J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2018, 27(5): 1237-1251.
- [10] Shi L, Cao HM, Li Y, et al. Electroacupuncture improves neurovascular unit reconstruction by promoting collateral circulation and angiogenesis[J]. *Neural Regen Res*, 2017, 12(12): 2000-2006.
- [11] Jiang YL, Liu WW, Wang Y, et al. MiR-210 suppresses neuronal apoptosis in rats with cerebral infarction through regulating VEGF-notch signaling pathway[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2021, 25(1): 2.
- [12] Meng ZY, Kang HL, Duan W, et al. MicroRNA-210 Promotes Accumulation of Neural Precursor Cells Around Ischemic Foci After Cerebral Ischemia by Regulating the SOCS1-STAT3-VEGF-C Pathway[J]. *J Am Heart Assoc*, 2018, 7(5): e005052.
- [13] Wang J, Zhang Y, Xu F. Function and mechanism of microRNA-210 in acute cerebral infarction[J]. *Exp Ther Med*, 2018, 15(2): 1263-1268.
- [14] 程曼,张瑜,姚源蓉.血脂变量与脑梗死复发及颅内血管狭窄程度的相关性[J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2016, 18(3): 243-246.
- [15] 李友凤,王春慧,孙文先,等.总胆固醇/高密度脂蛋白胆固醇比值对脑卒中复发的预测价值[J]. *中国实用神经疾病杂志*, 2020, 23(9): 771-775.
- [16] 王伟英,桑文文,焉双梅,等.急性缺血性脑卒中患者1年复发危险因素 Cox 回归分析[J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2016, 18(1): 46-50.

HBsAg 阴性慢性乙型肝炎患者 HBV MHR 外变异临床意义

顾超¹ 章晓鹰^{1*} 孙学华² 张珏¹ 高月求²

【摘要】目的 探讨 HBsAg 阴性慢性乙型肝炎患者乙型肝炎病毒 (HBV) 主要亲水区 (MHR) 外变异特征及临床意义。**方法** 选择本院 2019 年 3 月至 2019 年 12 月门诊或住院的慢性乙型肝炎患者 154 例, 分为非活动性 HBsAg 携带状态组 ($n=55$) 与 HBsAg 阴性慢性乙型肝炎组 ($n=99$)。使用基因测序法进行 MHR 外与 MHR 区基因序列分析, 并分析比较两组变异率及变异位点差异。**结果** 非活动性 HBsAg 携带组 MHR 外变异率为 45.45%, HBsAg 阴性慢性乙型肝炎组变异率明显提高至 70.71%, 两组具有统计学意义 ($P<0.05$), MHR 外变异主要集中于细胞毒 T 淋巴细胞+辅助性 T 淋巴细胞 (CTL+Th) 免疫表位区, 变异率 HBsAg 阴性慢性乙型肝炎组显著高于非活动性 HBsAg 携带组, 差异具有统计学意义 $P<0.05$, 而非免疫表位区变异率 HBsAg 阴性慢性乙型肝炎组虽高于非活动性 HBsAg 携带组, 但差异无统计学意义。此外, MHR 以及 MHR 区域内“a”决定簇变异率两组之间差异也无统计学意义。**结论** MHR 外以及 MHR 外 CTL+Th 免疫表位区变异为 HBsAg 阴性慢性乙型肝炎危险因素, 可增加发生 HBsAg 阴性慢性乙型肝炎的风险。

【关键词】 乙型肝炎病毒; MHR 外; HBsAg 阴性慢性乙型肝炎

Clinical relevance of outside the MHR mutations in HBsAg-negative chronic hepatitis B patients

GU Chao¹, ZHANG Xiaoying^{1*}, SUN Xuehua², ZHANG Jue¹, GAO Yueqiu²

(1. Department of Clinical Laboratory, Shanghai University of Traditional Chinese Medical attached Shu-guang Hospital, Shanghai, China, 201203; 2. Department of Hepatology, Shanghai University of Traditional Chinese Medical attached Shu-guang Hospital, Shanghai, China, 201203)

【ABSTRACT】Objective To investigate the characteristics of outside the major hydrophilic region (MHR) mutations of hepatitis B virus (HBV) in HBsAg-negative chronic hepatitis B patients and their clinical relevance. **Methods** A total of 154 patients who visited the outpatient service or were hospitalized in east Shu-Guang Hospital from March 2019 to December 2019 were enrolled in this study, they were divided into two groups, non-activation HBsAg carrier group (55 cases) and HBsAg negative chronic hepatitis B group (99 cases). DNA sequencing was performed to detect HBV outside the MHR and MHR mutations, compare the difference of mutation rate and mutation site between the two groups. **Results** Overall frequencies of outside the MHR mutations were 45.45% in the non-active HBsAg carrier group, markedly increased to 70.71% in the HBsAg negative chronic hepatitis B group, which was significantly different between the two groups ($P<0.01$). The most frequent viral variability preferentially concentrated cytotoxic T lymphocytes +T-helper cell epitopes (CTL + Th epitopes) located outside the MHR, significantly higher than that in the HBsAg negative hepatitis group relative to the non-activation HBsAg carriers group ($P<0.01$), whereas the variation rates of non-immune epitope regions in the HBsAg-negative chronic hepatitis B group were higher than that in the inactive HBsAg

作者单位: 1. 上海中医药大学附属曙光医院检验科, 上海 201203

2. 上海中医药大学附属曙光医院检肝内科, 上海 201203

*通信作者: 章晓鹰, E-mail: zhangxy_10@126.com

carrier group, but the difference was not statistically significant. In addition, there was no statistically significant difference between the two groups in MHR and the “a” determinant mutation rate in the MHR region. **Conclusion** The mutations of CTL+Th immune epitope regions outside MHR are risk factors for HBeAg-negative chronic hepatitis B, which can increase the risk of developing HBeAg-negative chronic hepatitis B.

[KEY WORDS] Hepatitis B virus; Outside the MHR; HBeAg negative chronic hepatitis B

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)e 抗原(HBeAg)为病毒复制标志,HBeAg 转阴代表了慢性感染的免疫控制,被称为是乙型肝炎病毒感染自然史中的里程碑^[1-2]。非活动性乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)携带者预示着较好的临床转归预后。然而部分非活动性 HBsAg 可产生 HBV 再复制,发展为 HBeAg 阴性慢性乙型肝炎^[3],治愈难,预后较差,与肝癌、肝硬化的发生具有较大关联^[2,4]。HBV 的感染史取决于病毒、宿主和环境之间的相互作用^[5]。HBV S 蛋白即为俗称的 HBsAg 或澳大利亚抗原,S 蛋白分为主要亲水区(major hydrophilic region, MHR)与 MHR 外两部分,由 226 个氨基酸组成。MHR 区为 B 细胞表位(“a”决定簇位于此区域),MHR 外区包含细胞毒 T 淋巴细胞(cytotoxic T lymphocytes, CTL)和辅助 T 细胞(T-helper, Th)免疫表位区(CTL+Th 免疫表位区)与非免疫表位区^[6-8],在刺激宿主相关的免疫功能中扮演重要角色^[9]。本实验前期研究发现:经历 HBeAg 血清学转换后,HBV S 蛋白的 MHR 外出现明显变异,且此区域变异在 HBeAg 阴性慢性乙型肝炎组达峰值^[10]。本研究进一步分析 HBeAg 阴性慢性乙型肝炎患者 HBV MHR 外免疫表位区与非免疫表位区变异特征,同时探讨变异临床意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选择 2019 年 3 月至 2019 年 12 月本院东院肝炎科门诊或住院慢性乙肝患者 154 例。依据 2019 版《慢性乙型肝炎防治指南》^[5],分为非活动性 HBsAg 携带状态组 55 例,其中男性 32 例,女性 23 例,平均年龄(38.80 ± 9.90)岁,B 基因型 34 例,C 基因型 21 例;HBeAg 阴性慢性乙型肝炎组 99 例,男性 57 例,女性 42 例,平均年龄(43.23 ± 10.56)岁,B 基因型 50 例,C 基因型 49 例。两组基因型与性别无关,差异无统计学意义($P > 0.05$)。本实验经本院伦理委员会审批通过,所有患者均知情并同意。

纳入标准:①非活动性 HBsAg 携带状态组:HBsAg 阳性、HBeAg 阴性、抗 HBeAb 阳性,HBV-

DNA $< 2\ 000$ IU/mL,丙氨酸氨基转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)与天门冬氨酸氨基转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)正常;②HBeAg 阴性慢性乙肝组:HBsAg 阳性、HBeAg 阴性、抗 HBeAb 阳性,ALT 持续或反复异常,HBV-DNA $> 2\ 000$ IU/mL。以上所有患者均有抗病毒药物治疗史。排除标准:排除合并其它病毒感染。

1.2 方法

1.2.1 试剂/仪器

DNA 提取试剂盒与 DNA 第一次纯化试剂盒(购自德国 QIAGEN 公司),DNA 第二次纯化试剂盒(购自美国 Applied Biosystems 公司),基因分析仪 3500DX(购自美国 Applied Biosystems 公司)。

1.2.2 HBV-DNA S 区基因测序

患者血浆(EDTA 抗凝管)200 μ L 用于核酸提取,按操作说明书进行操作。按 Genbank HBV-DNA (HBV genotype B DNA, complete genome, LC036263; HBV genotype C DNA, complete genome, AB644286)的 S 基因序列,利用 Primer Primer 5.0 设计引物(表 1)。二者均涵盖整、MHR 区域与 MHR 外区域。

表 1 HBV-DNA S 区引物序列
Table 1 Primer sequence of HBV-DNA S region

引物名称	序列(5'~3')	产物长度(bp)
HBV DNA B 型	F: cttatcgaagactggggaccctgtg R: ccataagtgtaaggagtagcc	758
HBV DNA C 型	F: ttctcgacgactggggaccctgcat R: ccataagtgtaaggagtagxx	756

HBV-DNA 核酸提取后分别进行 PCR 第一轮扩增与纯化,获得的 PCR 产物进行测序 PCR 扩增与纯化,纯化后的测序 PCR 产物直接加入 10 μ L 的去离子甲酰胺(Hi-Di Formamide),短时振荡溶解 DNA,95℃变性 5 min,迅速置于冰上或 4℃冷却 4 min,3500 DX 基因分析仪上样测序。利用 Primer Primer 5.0 将核苷酸序列翻译成氨基酸序列,BLAST 分析软件进行氨基酸序列比对。见表 2。

表2 PCR反应体系
Table 2 PCR reaction system

第一轮PCR反应体系	第一轮扩增条件	第二轮测序PCR反应体系	第二轮测序PCR扩增条件
5× PCR buffer 10 μL (含 Tris 盐酸 buffer, dNTP、Mg ²⁺)	50℃ UNG 酶(尿嘧啶糖苷酶) 反应防污染 2 min	BigDye 2 μL	96℃ 预变性 1 min
Taq 酶 3 μL	95℃ 预变性 15 min	BigDye Sequencing buffer 3 μL	96℃ 变性 10 s
F 与 R 引物各 1 μL (终浓度为 200 nmol/L)	95℃ 变性 30 s	F 或 R 引物 0.5 μL (终浓度为 250 nmol/L)	50℃ 退火 5 s
DNA 模板 10 μL (终浓度为 25~50 ng/μL)	55℃ 退火 30 s	DNA 模板 1 μL (终浓度为 25~50 ng/μL)	60℃ 延伸 4 min
蒸馏水 25 μL	72℃ 延伸 45 s	蒸馏水 13.5 μL	共 25 个循环
总体积 50 μL	共 40 个循环	总体积 20 μL	
	72℃ 终延伸 7 min		

1.3 统计学方法

利用 SPSS 16.0 统计软件,计数资料用 $n(\%)$ 表示,采用 χ^2 检验;非正态分布采用中位数(M)[四分位数(P_{25} ~ P_{75})]表示,两组间比较采用非参数 Mann-Whitney U 检验; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组 HBV MHR 与 MHR 外各区域变异比较

HBeAg 阴性慢性乙型肝炎组 MHR 外总体变异率显著高于非活动性 HBsAg 携带组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。MHR 外的变异差异主要来自 CTL+Th 免疫表位区,CTL+Th 免疫表位区的 HBeAg 阴性慢性乙型肝炎组变异率显著高于非活动性 HBsAg 携带组,差异有统计学意义($P < 0.01$)。此外,MHR 与其区域内的“a”决定簇变异率两组之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表3。

表3 两组 HBV MHR 与 MHR 外各区域变异比较 [$n(\%)$]

变异区域	非活动性 HBsAg 携带组 ($n=55$)	HBeAg 阴性慢性乙型肝炎组 ($n=99$)	χ^2 值	P 值
MHR	11 (20.00)	28 (28.28)	1.283	0.257
“a”决定簇	7 (12.73)	22 (22.22)	2.085	0.149
MHR 外	25 (45.45)	70 (70.71)	9.540	0.002
CTL+Th	16 (29.09)	54 (54.55)	9.240	0.002
非免疫表位	18 (32.73)	41 (41.41)	1.129	0.288

表4 两组 HBV MHR 与 MHR 外各区域变异热点位点比较 [$n(\%)$]

Table 4 Comparison of HBV MHR and MHR variation hot spots in different regions between the two groups [$n(\%)$]

热点变异位点	非活动性 HBsAg 携带组 ($n=55$)	HBeAg 阴性慢性乙型肝炎组 ($n=99$)	χ^2 值	P 值
MHR 与“a”决定簇	T/I126/T/S/A 4 (7.27)	16 (16.16)	2.472	0.116
CTL+Th	F220L 3 (5.45)	1 (1.01)	1.283	0.257
	L21S 2 (3.64)	9 (9.09)	0.870	0.351
非免疫表位	I68T/N 6 (10.91)	17 (17.17)	1.092	0.296

注: aa 100-169 为 MHR; aa124-147 为“a”决定簇; aa1-99 与 aa170-226 被称为 MHR 外, aa19-28, aa80-98, aa186-197, aa215-223 为 Th 表位; aa28-51, aa171-179, aa175-184, aa206-215 为 CTL 表位; 其它则为非免疫表位。

2.2 两组 HBV MHR 与 MHR 外各区域热点变异位点比较

MHR 与“a”决定簇热点变异位点为 T/I126/T/S/A, 此位点在 HBeAg 阴性慢性乙型肝炎组变异频次为 16.16%, 高于非活动性 HBsAg 携带组, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。MHR 外 CTL+Th 免疫表位区热点变异位点在非活动性 HBsAg 携带组是 F220L, 在 HBeAg 阴性慢性乙型肝炎组是 L21S; MHR 外非免疫表位区两组均为 I68T/N。HBeAg 阴性慢性乙型肝炎组 MHR 外总体变异频次为 17.17%, 高于非活动性 HBsAg 携带组, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表4。

3 讨论

非活动性 HBsAg 携带状态者约 20%~30% 会出现病毒再复制, 成为 HBeAg 阴性慢性乙型肝炎^[3]。非活动性 HBsAg 携带者通常血清中 HBV-DNA 低于检测限或接近检测限, 但低于检测限患者无法进行病毒 DNA 测序。因此, 本研究选取 HBV DNA < 2000 IU/mL 患者为非活动性 HBsAg 携带组观察对象。结果显示非活动性 HBsAg 携带者 MHR 外总体变异率明显低于 HBeAg 阴性慢性乙型肝炎患者, 其变异主要出现在 CTL+Th 免疫表位区, 并使 HBeAg 阴性慢性乙型肝炎发生概率

增加2倍以上。相关研究表明,CTL、Th细胞介导的细胞免疫相较B淋巴细胞介导的体液免疫,在病毒清除过程中具有更主导、更关键性作用^[11],如果CTL+Th免疫表位区出现变异可影响患者的细胞免疫功能^[7]。HBV变异可以自然产生,但大部分是由免疫压力所致^[12]。我们的前期研究也证实:MHR外变异主要出现在血清学转换后^[10],而血清学转化主要发生在免疫清除期^[13],由此推测:病毒在血清学转换过程中强大的免疫压力之下,HBV MHR外区以及与位于该区域的CTL+Th免疫表位区产生变异,导致细胞免疫逃逸,这可能是病毒再复制与感染持续的原因之一。国外研究报道多集中在对于HBV MHR区域研究,认为该区域变异与疫苗免疫逃逸以及抗体检测逃逸有关^[6],如T/I126/T/S/A与疫苗免疫逃逸有关^[14],并报道MHR变异与基因型、病毒持续感染以及抗病毒治疗有关^[15],而对于HBV S蛋白尤其是MHR外变异的研究非常少,目前未查见MHR外变异与乙肝复发相关性报道。本研究并未发现T/I126/T/S/A位点与病毒再复制有关,而其它热点变异位点如L21S、F220L与I68T/N尚未见相关报道,这可能是由于这些位点位于MHR外,而MHR外区域的相关研究报道较少。

综上所述,HBV S蛋白的MHR外区的CTL+Th免疫表位区及非免疫表位区变异可增加HBeAg阴性慢性乙型肝炎发生概率。但本研究所选的患者与血清病毒滴度低于检测限者相比,复发概率相对较高,这也是本实验缺陷之处,值得临床重视并做进一步研究。

参考文献

- [1] Wang SJ, Chen ZM, Wei M, et al. Specific determination of hepatitis B e antigen by antibodies targeting precore unique epitope facilitates clinical diagnosis and drug evaluation against hepatitis B virus infection [J]. Emerg Microb Infect, 2021, 10(1):37-50.
- [2] Wang J, Wu W, Yan X, et al. HBeAg Negativity Is Associated With More Advanced Liver Fibrosis in Patients With Chronic Hepatitis B: A Propensity Score - Matching Analysis [J]. J Clin Gastroenterol, 2020, 54(9):826-831.
- [3] Tseng TC, Kao JH. Treating Immune-tolerant Hepatitis B [J]. J Viral Hepat, 2015, 22(2):77-84.
- [4] 徐伯国,韩涛,向慧玲.慢性乙型病毒性肝炎相关性肝癌危险因素及预测因子研究进展[J].吉林医学,2021,42(2):478-481.
- [5] 中华医学会感染病学分会,中华医学会肝病学分会.慢性乙型肝炎防治指南(2019年版)[J].临床肝胆病杂志,2019,35(12):2648-2669.
- [6] Caligiuri P, Cerruti R, Icardi G, et al. Overview of hepatitis B virus mutations and their implications in the management of infection [J]. World J Gastroenterol, 2016, 22(1):145-154.
- [7] Khedive A, Norouzi M, Ramezani F, et al. Hepatitis B virus surface protein mutations clustered mainly in CTL immunopeptides in chronic carriers: results of an Iranian nationwide study [J]. J Viral Hepat, 2013, 20(7):494-501.
- [8] Ding F, Yu HG, Li YX, et al. Sequence analysis of the HBV S protein in Chinese patients with coexisting HBsAg and anti-HBs antibodies [J]. J Med Virol, 2015, 87(12):2067-2073.
- [9] Mirabelli C, Surdo M, Van Hemert F, et al. Specific mutations in the C-terminus domain of HBV surface antigen significantly correlate with low level of serum HBV-DNA in patients with chronic HBV infection [J]. J Infect, 2015, 70(3):288-298.
- [10] 章晓鹰,顾超,孙学华,等.慢性乙型肝炎患者乙型肝炎病毒S蛋白的基因序列分析[J].中华检验医学杂志,2019,42(7):564-568.
- [11] 魏艳艳. TIGIT在慢性HBV感染者T细胞中的表达和功能研究[D].南京:东南大学,2019.
- [12] Yu DM, Li XH, Zhang XX, et al. N-glycosylation mutations within hepatitis B virus surface major hydrophilic region contribute mostly to immune escape [J]. J Hepatol, 2014, 60(3):515-522.
- [13] 陈秀丽、张学东、戴二黑.血清HBeAg定量检测技术新进展[J].分子诊断与治疗杂志,2020,12(3):391-395.
- [14] 王洁. HBV/S区变异特征及其与乙肝疫苗免疫逃避的研究[D].苏州:苏州大学,2019.
- [15] Lazarevic I. Clinical implications of hepatitis b virus mutations: recent advances [J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(24):7653-7664.

钙蛋白酶-1 表达水平与结直肠癌患者病理特征及疾病进展风险的相关性

徐金平¹ 苏玲¹ 史盼成¹ 惠奕^{1*} 常剑²

[摘要] **目的** 探讨钙蛋白酶-1 表达水平与结直肠癌患者病理特征及疾病进展风险的相关性。**方法** 选取2017年2月至2018年9月就诊的107例结直肠癌手术患者,入院时收集患者临床病理资料及钙蛋白酶-1水平,所有患者均成功手术,随访1年截至末次随访时间2019年9月共有3名患者因不同原因失访,剩余104例患者均完成随访,其中36例患者出现疾病进展定义为进展组,68例未出现疾病进展定义为无进展组;对比分析两组患者临床资料,分析钙蛋白酶-1表达水平与结直肠癌病理特征;术后均根据患者肿瘤分期及部位等接受术后辅助治疗;采用多因素logistic回归分析结直肠癌患者疾病进展风险的独立预测因素;绘制工作特征曲线(ROC)评估钙蛋白酶-1表达水平对结直肠癌患者疾病进展风险的预测价值。**结果** 两组病理特征肿瘤部位、N分期、M分期、肿瘤分化程度等比较差异无统计学意义($P>0.05$);两组钙蛋白酶-1、淋巴转移、T分期比较,差异有统计学意义($P<0.05$),多因素分析显示T分期($OR=2713.809$)、淋巴转移($OR=118.177$)、钙蛋白酶-1($OR=23.749$)是结直肠癌患者疾病进展风险的独立预测因素,ROC曲线分析显示,钙蛋白酶-1结直肠癌患者疾病进展风险的AUC为0.716,高于T分期、淋巴转移($P<0.05$)。**结论** 钙蛋白酶-1在疾病进展患者中高表达,可作为预测结直肠癌患者疾病进展风险的标志物。

[关键词] 钙蛋白酶-1; 结直肠癌; 病理特征; 疾病进展

Correlation between the expression level of calpain-1 and the pathological characteristics and the risk of disease progression in patients with colorectal cancer

XU Jinping¹, SU Ling¹, SHI Pancheng¹, HUI Yi^{1*}, CHANG Jian²

[1. Department of Pathology, The People's Hospital of Suzhou New District (Suzhou Branch of Xinhua Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University), Suzhou, Jiangsu, China, 215129; 2. Department of General Surgery, Suzhou Kowloon Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Suzhou, China, 215000]

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the correlation between the expression of calpain-1 and the pathological characteristics and the risk of disease progression in patients with colorectal cancer. **Methods** A total of 107 colorectal cancer patients who had undergone surgery from February 2017 to September 2018 were selected. The clinicopathological data and calpain-1 levels of the patients were collected upon admission. all patients were successfully operated, followed up for 1 year as of the last follow-up time in September 2019. A total of 3 patients were lost for different reasons. The remaining 104 patients completed the follow-up, of which 36 patients with disease progression were defined as the progression group, and 68 patients with no disease progression were defined as the progression-free group. The clinical data of the two groups of patients were compared and the expression level of calpain-1 was analyzed. The pathological characteristics of colorectal cancer; postoperative adjuvant treatment was received according to the tumor stage and location of the patient; Multi-

基金项目: 苏州高新区医疗卫生科技计划项目(2019Z018)

作者单位: 1. 苏州高新区人民医院(上海交通大学附属新华医院苏州分院)病理科, 江苏, 苏州 215129

2. 上海交通大学医学院附属苏州九龙医院普外科, 江苏, 苏州 215000

*通信作者: 惠奕, E-mail: 714748164@qq.com

ivariate logistic regression was used to analyze independent predictors of disease progression risk in colorectal cancer patients; draw a working characteristic curve (ROC) to evaluate the predictive value of calpain-1 expression on the risk of disease progression in patients with colorectal cancer. **Results** There was no significant difference in pathological characteristics, tumor location, N staging, M staging, and tumor differentiation degree between the two groups ($P>0.05$); the comparison of calpain-1, lymphatic metastasis, and T staging between the two groups was statistically significant ($P<0.05$). Multivariate analysis showed that T stage ($OR=2713.809$), lymphatic metastasis ($OR=118.177$), calpain-1 ($OR=23.749$) are independent predictors of the risk of disease progression in patients with colorectal cancer. ROC curve analysis showed that the AUC of calpain-1 in colorectal cancer patients with disease progression risk was 0.716, which was higher than T stage and lymphatic metastasis ($P<0.05$). **Conclusion** Calpain-1 is highly expressed in patients with disease progression and can be used as a marker to predict the risk of disease progression in patients with colorectal cancer.

[KEY WORDS] Calpain-1; Colorectal cancer; Pathological features; Disease progression

结直肠癌是常见的胃肠道恶性肿瘤,其发病率和死亡率在消化道疾病中仅次于食管癌、胃癌和原发性肝癌^[1]。可以通过淋巴、血液循环及直接蔓延等途径转移。早发现、早诊断和手术根治是治疗的关键。有文献指出^[2]内镜下黏膜切除术或黏膜剥离术后患者5年生存率可达90%,但仍存在一定的疾病进展风险。钙蛋白酶-1是一组钙激活的非溶酶体中性半胱氨酸蛋白酶,已经证实,钙蛋白酶参与细胞增殖、分化、迁移等过程,并参与了癌发病机理和进展过程中。据报道^[3],钙蛋白酶-1与癌细胞的凋亡有关,此外,钙蛋白酶-1的上调可能促进了癌症的发展和转移。在大肠腺癌、卵巢癌、乳腺癌等肿瘤组织中钙蛋白酶-1被证实均处上调状态,在Wang^[4]的研究中指出钙蛋白酶-1是胃癌的预后标志物。此前有报道称钙蛋白酶在大肠腺癌中呈高表达^[5]。基于此,本研究探讨钙蛋白酶-1表达水平与结直肠癌患者病理特征及疾病进展风险的相关性。

1 资料和方法

1.1 临床资料

选取2017年2月至2018年9月就诊的107例结直肠癌手术患者,其中男性患者48例,女性患者56例;平均年龄(66.74 ± 8.69)岁;病程6~14个月,平均病程(10.74 ± 2.11)月。入院时收集患者临床病理资料及钙蛋白酶-1水平;术后均根据患者肿瘤分期及部位等接受术后辅助治疗,随访1年,截至末次随访时间2019年9月共有3名患者因不同原因失访,剩余104例患者均完成随访,其中36例患者出现疾病进展为进展组,其中术后死亡6例,术后复发16例,术后病理分期增加14例;68例未出现疾病进展定义为无进展组。

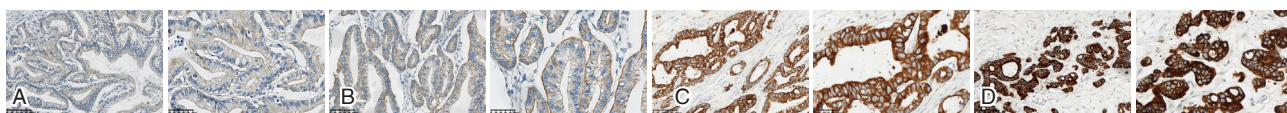
纳入标准:①符合结直肠癌诊断标准的患者,术后病理学检查确诊为结直肠癌^[6];②ASA^[7]等级I~II者;③临床资料完整;④签署知情同意书;④术前未进行新辅助治疗;⑤原发性结直肠癌。排除标准:①合并其他器官或组织肿瘤;②合并严重心血管系统疾病;③先天性肠道畸形者;④依从性差,不配合随访者。本实验经医院伦理委员批准。

1.2 方法

①所有入组患者均参照2018年版中华医学会与中国抗癌协会制定的《腹腔镜结直肠癌根治手术操作指南》^[8]的手术方案进行手术治疗,术后均根据患者肿瘤分期及部位等参照《中国结直肠癌诊疗规范(2017年版)》^[9]的治疗方案接受术后辅助治疗。②钙蛋白酶-1水平检测:利用免疫组织化学染色技术,经10%中性甲醛溶液固定,石蜡包埋以5 μm 切片。采用SP法,以PBS代替一抗为阴性对照。标本经二甲苯脱蜡、乙醇水化,完成后浸于乙二胺四乙酸中微波抗原修复;冷却至室温后充分水洗,采用PBS浸洗;滴加山羊血清封闭液;加入钙蛋白酶-1抗体于4℃孵育过夜;使用PBS冲洗,使用通用型SP 900生物标记素标记二抗;DAB显色后,苏木素复染,乙醇脱水,二甲苯透明,中性树脂封片镜检。评分标准^[10]:计数阳性细胞百分比,<25%为0分,25~50%为1分,50~75%为2分,>75%为3分。细胞着色轻度:无着色为0分,淡黄色为1分,棕黄色2分,棕褐色为2分。以阳性细胞百分比得分 $\times$ 着色强度得分为最终评分,0~3分为低表达,>3分为高表达。见图1。

1.3 观察指标

①于患者入院时收集患者临床资料,包括年龄、性别、BMI等。②利用免疫组织化学染色技术



注:A、B、C、D、分别为T1、T2、T3、T4期结肠癌组织。(×200, ×400)

图1 钙蛋白酶-1在不同分期结肠癌组织中的表达

Figure 1 Expression of calpain-1 in different stages of colon cancer

比较两组患者肿瘤细胞中钙蛋白酶-1表达水平。
②记录患者肿瘤部位、T分期、N分期、M分期、肿瘤分化程度、转移情况等。③疾病进展:将术后死亡、术后复发、病理分期增加等定义为疾病进展。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 20.0 统计软件对数据进行分析,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用独立样本 t 检验;计数资料采用 $n(\%)$ 表示,采用 χ^2 检验,等级资料使用秩和检验;采用 Logistic 回归方程分析影响结直肠癌患者疾病进展的独立预测因素,绘制工作特征曲线(ROC)评估钙蛋白酶-1对结直肠癌患者疾病进展的预测价值,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者临床资料比较

两组患者一般资料及肿瘤部位、N分期、M分期、肿瘤分化程度比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),钙蛋白酶-1、淋巴转移、T分期组间比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表1。

2.2 钙蛋白酶-1水平与结直肠癌患者疾病进展的关系

检测两组患者钙蛋白酶-1水平发现,在进展组患者中钙蛋白酶-1表达水平呈高表达(0.90 ± 0.12);无进展组表达水平呈低表达(0.81 ± 0.10),两组比较差异有统计学意义($t = 3.848$, $P < 0.05$),见图2。

2.3 结直肠癌患者疾病进展风险的预测因素分析

Logistic 多因素显示T分期、淋巴转移、钙蛋白酶-1是结直肠癌患者疾病进展风险的独立预测因素。见表2。

2.4 钙蛋白酶-1预测结直肠癌疾病进展风险的效能

钙蛋白酶-1预测结直肠癌疾病进展风险的AUC为0.716,高于T分期、淋巴转移。见图3、表3。

3 讨论

钙蛋白酶是保守半胱氨酸蛋白酶家族,涉及了几种基本的生理过程,包括信号传导、细胞骨架

表1 两组患者一般资料比较 [$n(\%)$, ($\bar{x} \pm s$)]

Table 1 Comparison of general information of the two groups of patients [$n(\%)$, ($\bar{x} \pm s$)]

因素	进展组 ($n=36$)	无进展组 ($n=68$)	Z/t/ χ^2 值	P值
年龄(岁)	65.96±8.54	67.30±8.66	0.758	0.451
性别(男/女)	19/17	29/39	0.972	0.324
肿瘤部位				
乙状结肠	16(44.44)	26(38.24)	0.542	0.588
直肠	13(36.11)	27(39.71)		
其他	7(19.44)	15(22.06)		
T分期				
T2	6(16.67)	22(32.35)	1.970	0.049
T3	20(55.56)	37(54.41)		
T4	10(27.78)	9(12.24)		
N分期				
N0	11(30.56)	18(26.47)	0.429	0.668
N1	12(33.33)	23(33.82)		
N2	13(36.11)	27(39.71)		
M分期				
M0	10(27.78)	29(42.65)	2.221	0.136
M1	26(72.22)	39(57.35)		
肿瘤分化程度				
低分化	13(36.11)	25(36.76)	0.254	0.799
中分化	16(44.44)	26(38.24)		
高分化	7(19.44)	17(25.00)		
钙蛋白酶-1表达	0.90±0.12	0.81±0.10	3.848	<0.001
淋巴转移				
是	26(72.22)	30(44.42)	7.481	0.006
否	10(27.78)	38(55.88)		
术后化疗方案				
5-FU/LV	10(27.78)	19(27.94)	0.937	0.349
卡培他滨	15(38.89)	17(25.00)		
FOLFOX	2(5.56)	7(10.29)		
FLOX	3(8.33)	9(13.24)		
CapeOx	6(16.67)	16(23.53)		

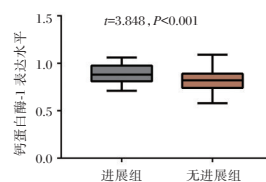


图2 钙蛋白酶-1与结直肠癌疾病进展的关系

Figure 2 The relationship between calpain-1 and the progression of colorectal cancer

重塑等。既往有研究显示^[11]钙蛋白酶与Caspase家族可共同致肿瘤细胞凋亡;在一些报道中指出^[12]在肾癌中钙蛋白酶-1的高表达提示患者预后不良;

表2 多因素 Logistic 分析结果

Table 2 Multi-factor Logistic analysis results

相关指标	β	<i>S.E</i>	<i>Wald</i>	<i>df</i>	<i>OR</i> 值	95% <i>CI</i>	<i>P</i> 值
T 分期(T2=0, T3=1, T4=2)	7.906	2.990	6.993	1.000	2713.809	7.741~9.514	0.008
淋巴转移(否=0, 是=1)	4.772	0.991	23.173	1.000	118.177	16.931~824.850	0.000
钙蛋白酶-1	3.168	0.630	25.262	1.000	23.749	6.906~81.673	0.000
常数	-13.174	3.110	17.943	1.000			

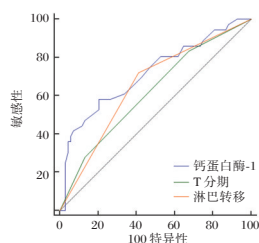


图3 钙蛋白酶-1预测结直肠癌疾病进展风险的ROC曲线

Figure 3 The ROC curve of calpain-1 for predicting the risk of colorectal cancer disease progression

表3 钙蛋白酶-1预测结直肠癌疾病进展风险的效能(%)

Table 3 The efficacy of calpain-1 in predicting the risk of colorectal cancer disease progression (%)

相关指标	AUC	<i>SE</i>	95% <i>CI</i>	特异度	敏感度
钙蛋白酶-1	0.716	0.055	0.620~0.800	82.33	71.26
T分期	0.617	0.052	0.517~0.711	74.55	56.90
淋巴转移	0.655	0.048	0.556~0.746	76.48	62.74

在黑色素瘤中钙蛋白酶-1参与了MAPK依赖性p27Kip1的调节^[13],基于这些研究,钙蛋白酶-1可能起肿瘤促进剂的作用。但关于钙蛋白酶-1在结直肠癌疾病进展中作用的报道较少。

钙蛋白酶-1基因位于染色体11q13,编码714个氨基酸。水解底物主要包括特定的蛋白和酶,如细胞骨架、肌原纤维蛋白和凋亡相关蛋白、信号调控激酶、转录因子等,其中肿瘤抑制蛋白P53、蛋白激酶C等均参与了多种肿瘤的形成过程。在乳腺癌、消化系统癌症等多种癌症中均发现钙蛋白酶家族成员高表达^[14];在肝癌、胰腺癌中高表达可致正常细胞癌变或导致癌细胞转移^[15]。目前临床上尚无确切证据证实钙蛋白酶-1可直接促进癌症发展,但大量研究表明^[16]钙蛋白酶-1可水解肌原纤维、细胞骨架等来参与细胞凋亡、迁移等生理病理活动中。细胞的凋亡和增生是维持机体正常的前提,细胞无限制增生是恶性肿瘤发生的重要因素,钙蛋白酶-1可通过水解I κ B α 促进由NF- κ B介导的细胞存活。

在已有的文献报道中均指出^[17]钙蛋白酶-1的表达水平与癌细胞的转移呈明显正相关,结直肠癌术后疾病进展与转移密切相关。结直肠癌发展至晚期时易出现淋巴转移,癌肿侵入肠壁肌层后淋巴

转移的机率增加,当癌肿浸润至肠壁深部淋巴管时,淋巴管内的癌细胞或瘤栓随淋巴液离开原发灶,形成新的癌灶向远处转移^[18]。上皮间质转化是肿瘤侵袭转移的重要机制,上皮间质转化可使不具备远处转移潜能的肿瘤细胞形成远处转移灶。上皮间质转化过程常伴E-cadherin的缺失或下调,E-cadherin可维持细胞骨架稳定,介导细胞间连接,表达缺失可致细胞间黏附力下降。钙蛋白酶-1还可活化基质金属蛋白酶,诱导细胞外基质重构和肿瘤细胞的迁移。钙蛋白酶-1可通过水解细胞骨架增加细胞迁移速度,通过结合整联蛋白相关粘着斑,水解粘着斑裸蛋白减弱细胞间粘附力,从而促进肿瘤侵袭转移,进而促进疾病进展。

综上所述,钙蛋白酶-1在疾病进展患者中高表达,可作为预测结直肠癌患者疾病进展风险的标志物。但其促进结直肠癌疾病进展的具体分子机制尚未明确,后期仍需通过RNA干扰技术等调控钙蛋白酶-1的表达,观察钙蛋白酶-1对结直肠癌细胞行为的影响,进一步研究钙蛋白酶-1在结直肠癌疾病进展机制中的作用。

参考文献

- [1] Thanikachalam K, Khan G. Colorectal Cancer and Nutrition [J]. *Nutrients*, 2019, 14, 11(1):164.
- [2] Xu C, Yu X, Zhu Y, et al. Overexpression of calpain-1 predicts poor outcome in patients with colorectal cancer and promotes tumor cell progression associated with downregulation of FLNA [J]. *Oncol Rep*, 2019, 41(6):3424-3434.
- [3] Patel SG, Ahnen DJ. Colorectal Cancer in the Young [J]. *Curr Gastroenterol Rep*, 2018, 220(4):15.
- [4] Wang K, Zhu TN, Zhao RJ. Filamin A regulates EGFR/ERK/Akt signaling and affects colorectal cancer cell growth and migration [J]. *Mol Med Rep*, 2019, 20(4):3671-3678.
- [5] Lin XY, Chen SZ. Calpain inhibitors ameliorate muscle wasting in a cachectic mouse model bearing CT26 colorectal adenocarcinoma [J]. *Oncol Rep*, 2017, 37(3):1601-1610.
- [6] Rex DK, Boland CR, et al. Colorectal Cancer Screening: Recommendations for Physicians and Patients From the U.S.

· 论 著 ·

miR-204-3p 靶向 CYP2E1 介导脂多糖诱导的肾小管上皮细胞损伤

朱志伟¹ 郑培明^{2*} 王荣²

【摘要】 目的 探讨 miR-204-3p 靶向细胞色素 P450 家族 2 亚家族 E 成员 1 (CYP2E1) 介导脂多糖 (LPS) 诱导的肾小管上皮细胞炎症反应及细胞凋亡的分子机制。方法 体外培养人肾小管上皮细胞 HK-2, qRT-PCR 与 Western blot 分别检测 miR-204-3p、CYP2E1 的表达量; 实验分组: Con 组、LPS 组、LPS+miR-NC 组、LPS+miR-204-3p 组、LPS+si-NC 组、LPS+si-CYP2E1 组、LPS+miR-204-3p+pcDNA 组、LPS+miR-204-3p+pcDNA-CYP2E1 组; ELISA 检测 IL-6、TNF- α 的水平; 流式细胞术检测细胞凋亡率; 双荧光素酶报告实验验证 miR-204-3p 与 CYP2E1 的靶向结合关系; Western blot 检测 Bcl-2、Bax 的表达量。结果 与 Con 组比较, LPS 组细胞中 miR-204-3p 的表达水平降低, CYP2E1 的表达量升高, IL-6、TNF- α 的水平升高, 凋亡率和 Bax 蛋白水平升高, Bcl-2 蛋白水平降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与 LPS+miR-NC 组比较, LPS+miR-204-3p 组 IL-6、TNF- α 水平降低, 凋亡率和 Bax 蛋白水平降低, Bcl-2 蛋白水平升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与 LPS+si-NC 组比较, LPS+si-CYP2E1 组 IL-6、TNF- α 的水平降低, 凋亡率和 Bax 蛋白水平降低, Bcl-2 蛋白水平升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 双荧光素酶报告实验证实 miR-204-3p 能够靶向结合 CYP2E1; 与 LPS+miR-204-3p+pcDNA 组比较, LPS+miR-204-3p+pcDNA-CYP2E1 组 IL-6、TNF- α 的水平升高, 凋亡率和 Bax 蛋白水平升高, Bcl-2 蛋白水平降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 miR-204-3p 过表达可靶向调控 CYP2E1 的表达从而抑制 LPS 诱导的肾小管上皮细胞炎症反应及细胞凋亡。

【关键词】 miR-204-3p; CYP2E1; 脂多糖; 肾小管上皮细胞

miR - 204 - 3p targets CYP2E1 to mediate lipopolysaccharide - induced renal tubular epithelial cell damage

ZHU Zhiwei¹, ZHENG Peiming^{2*}, WANG Rong²

(1. Department: Laboratory, Zhengzhou Key Laboratory of Infection and Immunization of Children, Henan Children's Hospital, Children's Hospital affiliated to Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan, China, 450000; 2. Department: Laboratory, Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou, Henan, China, 450000)

【ABSTRACT】 Objective To investigate the molecular mechanism of miR-204-3p targeting CYP2E1 expression mediating LPS-induced renal tubular epithelial cell inflammation and apoptosis. **Methods** Human renal tubular epithelial cells HK-2 were cultured in vitro, and the expressions of miR-204-3p and CYP2E1 were detected by qRT-PCR and Western blot. Experimental groupings: Con group, LPS group, LPS+miR-NC group, LPS+miR-204-3p group, LPS+si-NC group, LPS+si-CYP2E1 group, LPS+miR-204-3p+pcDNA group, LPS+miR-204-3p+pcDNA-CYP2E1 group. The levels of IL-6 and TNF- α were detected by ELISA. Flow cytometry was used to detect the apoptosis rate. The dual luciferase reporting experiment verified the targeted binding relationship between miR-204-3p and CYP2E1. Western blot was used to detect the expression of Bcl-2 and Bax. **Results** In the LPS group, the expression level of miR-204-3p was decreased, the expression

基金项目: 河南省医学科技攻关计划联合共建项目 (LHGJ20190961)

作者单位: 1. 郑州大学附属儿童医院/河南省儿童医院郑州儿童医院/郑州市儿童感染与免疫重点实验室检验科, 河南, 郑州 450000

2. 河南省人民医院检验科, 河南, 郑州 450000

*通信作者: 郑培明, E-mail: zpm8266@163.com

level of CYP2E1 was increased, the levels of IL-6 and TNF- α were increased, the rate of apoptosis and the level of Bax protein increased, and the level of Bcl-2 protein was decreased, compared with the Con group, the difference was statistically significant ($P<0.05$). The levels of IL-6 and TNF- α in the LPS+miR-204-3p group were decreased, the apoptosis rate and the level of Bax protein were decreased, and the level of Bcl-2 protein was increased, compared with the LPS+miR-NC group, the difference was statistically significant ($P<0.05$). The levels of IL-6 and TNF- α in the LPS+si-CYP2E1 group were decreased, the apoptosis rate and the level of Bax protein were decreased, and the level of Bcl-2 protein was increased, compared with the LPS+si-NC group, there were differences Statistically significant ($P<0.05$). The dual luciferase report experiment confirmed that miR-204-3p could target CYP2E1. In the LPS+miR-204-3p+pcDNA-CYP2E1 group, the levels of IL-6 and TNF- α were increased, the apoptosis rate and the level of Bax protein were increased, and the level of Bcl-2 protein was decreased, compared with the LPS+miR-204-3p+pcDNA group, the difference was statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** Overexpression of miR-204-3p can target the regulation of CYP2E1 expression and inhibit LPS-induced renal tubular epithelial cell inflammation and apoptosis.

[KEY WORDS] miR-204-3p; CYP2E1; Lipopolysaccharide; Renal tubular epithelial cells

脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)可加重肾小管上皮细胞炎症反应并可促进疾病发生及发展^[1]。研究表明 miR-204-3p 在心肌细胞缺氧/复氧损伤中表达下调, miR-204-3p 过表达可减轻缺氧/复氧诱导的心肌细胞损伤^[2]。生物信息学分析显示细胞色素 P450 家族 2 亚家族 E 成员 1 (Cytochrome P450 2E1, CYP2E1) 可能是 miR-204-3p 的靶基因, 研究表明 CYP2E1 在酒精性胰腺炎中表达上调并可参与该疾病发生过程^[3]。但 miR-204-3p 是否可通过靶向调控 CYP2E1 的表达而影响肾小管上皮细胞损伤尚未可知。因此, 本研究通过 LPS 诱导肾小管上皮细胞, 探讨 miR-204-3p 对肾小管上皮细胞炎症反应及细胞凋亡的影响, 分析其对 CYP2E1 的靶向调控作用, 为进一步揭示肾小管上皮细胞损伤的分子机制奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

人肾小管上皮细胞 HK-2 购自上海基尔顿生物; LPS 购自北京百奥莱博科技有限公司; Lipofectamine2000 购自美国 Thermo Fisher 公司; miR-204-3p mimics 及阴性对照 miR-NC、si-CYP2E1、si-NC、anti-miR-204-3p 购自广州锐博生物; pcDNA3.1 购自上海柯雷生物; Trizol 试剂购自美国 Invitrogen; 反转录试剂盒与实时荧光定量 PCR 试剂盒购自大连宝生物; IL-6、TNF- α 检测试剂盒购自南京建成生物; 细胞凋亡试剂盒购自美国 Sigma; 兔抗人 CYP2E1 抗体购自上海生工生物; 兔抗人 Bcl-2、Bax 抗体购自美国 CST 公司; 二抗购自美国 Abcam。

1.2 方法

1.2.1 实验分组

肾小管上皮细胞(2×10^5 个/mL)接种于 6 孔板 (150 μ L/孔), 加入含有 10 μ g/mL LPS 的培养液处理 24 h^[4], 记作 LPS 组。同时将未经处理的细胞作为 Con 组。分别将 miR-NC、miR-204-3p mimics、si-NC、si-CYP2E1、miR-204-3p mimics 与 pcDNA、miR-204-3p mimics 与 pcDNA-CYP2E1 转染至肾小管上皮细胞 48 h, 加入含有 10 μ g/mL LPS 的培养液处理 24 h, 分别记作 LPS+miR-NC 组、LPS+miR-204-3p 组、LPS+si-NC 组、LPS+si-CYP2E1 组、LPS+miR-204-3p+pcDNA 组、LPS+miR-204-3p+pcDNA-CYP2E1 组。

1.2.2 qRT-PCR 检测细胞中 miR-204-3p、CYP2E1 mRNA 的表达水平

收集各组肾小管上皮细胞, 采用 Trizol 法提取细胞中的总 RNA。参照反转录试剂盒将 RNA 合成 cDNA。以 cDNA 为模板进行 qRT-PCR 反应, 根据试剂盒说明书配置反应体系, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 miR-204-3p、CYP2E1 mRNA 的相对表达量。

1.2.3 酶联免疫吸附法(ELISA)检测 IL-6、TNF- α 的水平

收集各组肾小管上皮细胞培养上清液, 采用 ELISA 法检测 IL-6、TNF- α 的水平, 严格按照试剂盒说明书进行操作。

1.2.4 流式细胞术检测细胞凋亡率

收集各组肾小管上皮细胞, 预冷 PBS 洗涤, 加入 500 μ L Binding Buffer 悬浮细胞, 依次分别加入 5 μ L Annexin V-FITC 与 5 μ L PI, 充分混匀, 室温避光孵育 20 min, 应用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.2.5 双荧光素酶报告基因检测 miR-204-3p 的靶基因

构建野生型载体 WT-CYP2E1、突变型载体 MUT-CYP2E1, 分别将 miR-NC、miR-204-3p mimics 与 WT-CYP2E1、MUT-CYP2E1 共转染至肾小管上皮细胞, 转染 48 h 后加入双荧光素酶报告基因检测试剂盒相关试剂, 按说明书操作检测荧光素酶活性。

1.2.6 Western blot 检测 CYP2E1、Bcl-2、Bax 蛋白表达

RIPA 裂解液提取细胞总蛋白, 取 30 μ g 变性蛋白进行 SDS-PAGE, 转膜, 采用 5% 脱脂奶粉封闭 2 h, 孵育一抗稀释液 (1:1 000), 孵育二抗稀释液 (1:2 000), 滴加 ECL, 曝光, 显影, 应用 ImageJ 软件分析各条带灰度值。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 21.0 统计学软件分析数据; 计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示且均符合正态分布, 两组间比较采用独立样本 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析; 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-204-3p 和 CYP2E1 在脂多糖刺激的肾小管上皮细胞中的表达

LPS 组细胞中 miR-204-3p 的表达水平降低, CYP2E1 mRNA 及蛋白表达量显著升高, 与 Con 组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 1、表 1。

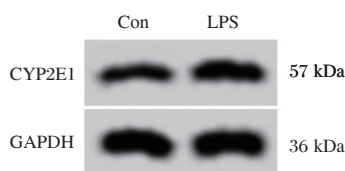


图 1 CYP2E1 蛋白表达

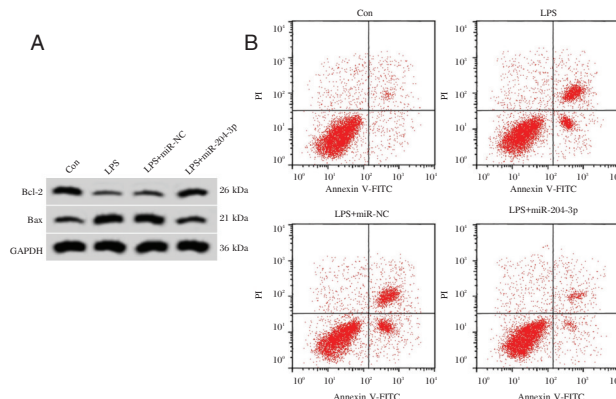
Figure 1 The expression of CYP2E1 protein

表 1 miR-204-3p 和 CYP2E1 在脂多糖刺激的肾小管上皮细胞中的表达 ($\bar{x} \pm s, n=9$)

分组	miR-204-3p	CYP2E1 mRNA	CYP2E1 蛋白
Con	1.01 $\pm$ 0.09	0.99 $\pm$ 0.08	0.42 $\pm$ 0.04
LPS	0.58 $\pm$ 0.05	3.01 $\pm$ 0.29	0.83 $\pm$ 0.07
<i>t</i> 值	12.530	20.144	15.256
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000

2.2 miR-204-3p 过表达对脂多糖诱导的肾小管上皮细胞炎症因子表达和凋亡的影响

与 Con 组比较, LPS 组 IL-6、TNF- α 水平、凋亡率及 Bax 蛋白水平升高, Bcl-2 蛋白水平降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与 LPS+miR-NC 组比较, LPS+miR-204-3p 组 IL-6、TNF- α 水平、凋亡率及 Bax 蛋白水平降低, Bcl-2 蛋白水平升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 2、表 2。



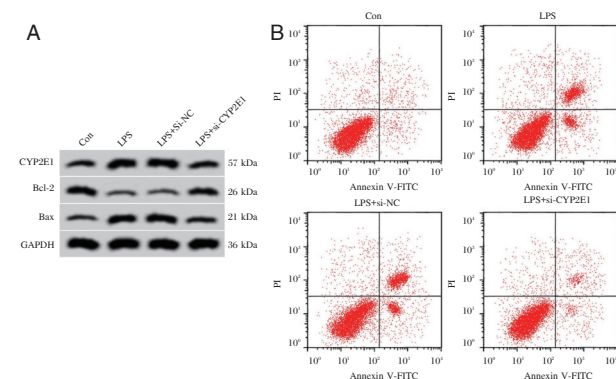
注: A 为凋亡相关蛋白表达; B 为细胞凋亡流式图。

图 2 miR-204-3p 过表达对脂多糖诱导的肾小管上皮细胞凋亡的影响

Figure 2 The effect of miR-204-3p overexpression on the apoptosis of renal tubular epithelial cells induced by lipopolysaccharide

2.3 抑制 CYP2E1 表达对脂多糖诱导的肾小管上皮细胞炎症因子表达和凋亡的影响

与 LPS+si-NC 组比较, LPS+si-CYP2E1 组 IL-6、TNF- α 水平、凋亡率及 Bax 蛋白水平降低, Bcl-2 蛋白水平显著升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 3、表 3。



注: A 为 CYP2E1 和凋亡相关蛋白表达; B 为细胞凋亡流式图。

图 3 抑制 CYP2E1 表达对脂多糖诱导的肾小管上皮细胞凋亡的影响

Figure 3 The effect of inhibiting CYP2E1 expression on the apoptosis of renal tubular epithelial cells induced by lipopolysaccharide

表2 miR-204-3p过表达对脂多糖诱导的肾小管上皮细胞炎症因子表达和凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n=9$)Table 2 The effect of miR-204-3p overexpression on the expression of inflammatory factors and apoptosis of renal tubular epithelial cells induced by lipopolysaccharide ($\bar{x} \pm s, n=9$)

分组	miR-204-3p	IL-6 (ng/mL)	TNF- α (ng/mL)	凋亡率 (%)	Bcl-2 蛋白	Bax 蛋白
Con	1.00 $\pm$ 0.05	3.45 $\pm$ 0.36	1.74 $\pm$ 0.17	6.58 $\pm$ 0.66	0.67 $\pm$ 0.06	0.30 $\pm$ 0.03
LPS	0.57 $\pm$ 0.05	15.24 $\pm$ 1.53	8.36 $\pm$ 0.83	27.32 $\pm$ 2.71	0.25 $\pm$ 0.03	0.78 $\pm$ 0.07
LPS+miR-NC	0.55 $\pm$ 0.06	16.22 $\pm$ 1.74	8.57 $\pm$ 0.81	29.65 $\pm$ 2.84	0.23 $\pm$ 0.03	0.79 $\pm$ 0.06
LPS+miR-204-3p	0.81 $\pm$ 0.07	6.21 $\pm$ 0.62	3.55 $\pm$ 0.36	11.02 $\pm$ 1.13	0.59 $\pm$ 0.05	0.38 $\pm$ 0.03
F 值	122.022	251.116	283.598	280.387	236.203	234.495
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

表3 抑制 CYP2E1 表达对脂多糖诱导的肾小管上皮细胞炎症因子表达和凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n=9$)Table 3 The effect of inhibiting CYP2E1 expression on the expression of inflammatory factors and apoptosis of renal tubular epithelial cells induced by lipopolysaccharide ($\bar{x} \pm s, n=9$)

分组	CYP2E1 蛋白	IL-6 (ng/mL)	TNF- α (ng/mL)	凋亡率 (%)	Bcl-2 蛋白	Bax 蛋白
Con	0.41 $\pm$ 0.04	3.65 $\pm$ 0.35	1.98 $\pm$ 0.19	7.02 $\pm$ 0.71	0.66 $\pm$ 0.06	0.31 $\pm$ 0.03
LPS	0.85 $\pm$ 0.07	16.34 $\pm$ 1.63	8.92 $\pm$ 0.88	28.41 $\pm$ 2.84	0.24 $\pm$ 0.03	0.76 $\pm$ 0.07
LPS+si-NC	0.87 $\pm$ 0.08	17.02 $\pm$ 1.69	9.01 $\pm$ 0.89	28.69 $\pm$ 2.88	0.22 $\pm$ 0.03	0.77 $\pm$ 0.07
LPS+si-CYP2E1	0.50 $\pm$ 0.05	8.32 $\pm$ 0.81	5.69 $\pm$ 0.54	13.58 $\pm$ 1.37	0.53 $\pm$ 0.05	0.42 $\pm$ 0.04
F 值	131.123	267.156	210.345	227.065	215.506	162.049
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

2.4 miR-204-3p 靶向调控 CYP2E1 的表达

TargetScan 预测显示 CYP2E1 的 3'UTR 中含有与 miR-204-3p 互补的核苷酸序列,见图4。双荧光素酶报告实验结果显示,miR-204-3p 过表达可降低 WT-CYP2E1 的荧光素酶活性显著降低,差异有统计学意义 ($P<0.05$),见表4。miR-204-3p 负向调控 CYP2E1 的表达,差异有统计学意义 ($P<0.05$)。见图5、表5。

WT-CYP2E1 3' UTR 5' uugaaaauaaauuuUCCCCAGa 3'
 miR-204-3p 3' ugcagggaacggAAGGGUCg 5'
 MUT-CYP2E1 3' UTR 5' uugaaaauaaauuuCGUAUCUa 3'

图4 CYP2E1 的 3'UTR 中含有与 miR-204-3p 互补的核苷酸序列

Figure 4 The 3'UTR of CYP2E1 contains a nucleotide sequence complementary to miR-204-3p

表4 双荧光素酶报告实验检测结果 ($\bar{x} \pm s, n=9$)Table 4 Dual luciferase report test results ($\bar{x} \pm s, n=9$)

分组	WT-CYP2E1	MUT-CYP2E1
miR-NC	1.03 $\pm$ 0.07	1.05 $\pm$ 0.06
miR-204-3p	0.61 $\pm$ 0.06	1.02 $\pm$ 0.08
t 值	13.667	0.900
P 值	0.000	0.381

3 讨论

miR-204-3p 通过调节乳酸脱氢酶介导的糖酵解而抑制膀胱癌细胞增殖^[5]。研究表明 miR-204-3p 通过靶向 Bradykinin B2 受体而减轻高糖诱导的 MPC5 足细胞凋亡^[6]。相关报道指出 miR-204-3p 可调控甲状腺乳头状癌细胞增殖、凋亡等生物学

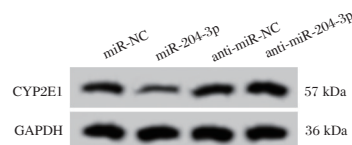


图5 CYP2E1 蛋白表达

Figure 5 The expression of CYP2E1 protein

表5 miR-204-3p 调控 CYP2E1 蛋白的表达 ($\bar{x} \pm s, n=9$)Table 5 miR-204-3p regulated the expression of CYP2E1 protein ($\bar{x} \pm s, n=9$)

分组	CYP2E1 蛋白
miR-NC	0.43 $\pm$ 0.04
miR-204-3p	0.21 $\pm$ 0.02
anti-miR-NC	0.42 $\pm$ 0.04
anti-miR-204-3p	0.86 $\pm$ 0.07
F 值	315.388
P 值	0.000

行为^[7]。本研究结果显示 LPS 诱导的肾小管上皮细胞中 miR-204-3p 的表达量降低。IL-6、TNF- α 水平升高可促进体内炎症反应的发生从而促使疾病进展^[8]。本研究结果显示 LPS 处理后 IL-6、TNF- α 水平升高,而 miR-204-3p 过表达可显著减低 IL-6、TNF- α 水平,提示 miR-204-3p 过表达可减轻 LPS 诱导的肾小管上皮细胞炎症损伤。本研究结果显示 LPS 处理后肾小管上皮细胞凋亡率升高,而 miR-204-3p 过表达可抑制细胞凋亡,提示 miR-204-3p 过表达可抑制 LPS 诱导的肾小管上皮细胞凋亡。

CYP2E1 在高糖诱导的小鼠心脏微血管内皮细胞损伤中表达增加,槲皮素通过抑制 CYP2E1 表达减轻高糖诱导的小鼠心脏微血管内皮细胞

损伤^[9]。CYP2E1在酒精性肝病大鼠模型的肝组织中表达增强,抑制CYP2E1可减轻脂质过氧化反应^[10]。本研究结果显示LPS诱导的肾小管上皮细胞中CYP2E1表达上调,进一步分析显示抑制CYP2E1表达后IL-6、TNF- α 水平降低,细胞凋亡率降低,提示抑制CYP2E1表达可抑制LPS诱导的肾小管上皮细胞炎症反应及细胞凋亡。本研究证实miR-204-3p能够靶向结合CYP2E1,CYP2E1过表达可减弱miR-204-3p过表达对LPS诱导的肾小管上皮细胞炎症因子表达及凋亡的作用。

综上所述,LPS诱导的肾小管上皮细胞中miR-204-3p表达下调,CYP2E1表达上调,miR-204-3p过表达可抑制LPS诱导的肾小管上皮细胞炎症反应及细胞凋亡,其作用机制可能与靶向调控CYP2E1的表达有关,可为急性肾损伤等肾脏疾病的诊断及治疗提供科学依据。

参考文献

- [1] 吴乙偶,郑世翔,陈星华,等.脂多糖通过MAPK信号通路诱导肾小管上皮细胞核因子 κ B抑制蛋白释放[J].医学研究杂志,2016,45(2):47-50.
- [2] Yu SY, Dong B, Fang ZF, et al. Knockdown of lncRNA AK139328 alleviates myocardial ischaemia/reperfusion injury in diabetic mice via modulating miR-204-3p and inhibiting autophagy[J]. J Cell Mol Med, 2018, 22(10): 4886-4898.
- [3] Usategui-Martín R, Carbonell C, Novo-Veleiro I, et al. Association between genetic variants in CYP2E1 and CTSC genes and susceptibility to alcoholic pancreatitis: A systematic review and meta-analysis [J]. Drug Alcohol Depend, 2020, 209(1): 107873-107883.
- [4] 刘明龙,刘天喜,安海倩,等.复肾颗粒对脂多糖诱导下人肾小管上皮细胞TRAF6表达的影响[J].中国中西医结合肾病杂志,2017,18(7): 578-581.
- [5] Guo J, Zhao P, Liu Z, et al. MiR-204-3p Inhibited the Proliferation of Bladder Cancer Cells via Modulating Lactate Dehydrogenase-Mediated Glycolysis [J]. Front Oncol, 2019, 9(1): 1242-1252.
- [6] Han X, Li Q, Wang C, et al. MicroRNA-204-3p Attenuates High Glucose-Induced MPC5 Podocytes Apoptosis by Targeting Bradykinin B2 Receptor [J]. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2019, 127(6): 387-395.
- [7] Li X, Zhong W, Xu Y, et al. Silencing of lncRNA LINC00514 inhibits the malignant behaviors of papillary thyroid cancer through miR-204-3p/CDC23 axis [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2019, 508(4): 1145-1148.
- [8] 李力.慢性阻塞性肺病患者血清PCT、CRP、IL-6、TNF- α 的表达水平及临床意义[J].实用临床医药杂志,2016,20(3): 40-42.
- [9] 陈莎,冯健,邱琛茗,等.槲皮素通过抑制CYP2E1减轻高糖诱导的小鼠心脏微血管内皮细胞损伤的研究[J].临床心血管病杂志,2018,34(7): 722-726.
- [10] 吴黎艳,陈芝芸,严茂祥,等.三七对酒精性肝病大鼠肝组织CYP2E1表达的影响[J].中华中医药杂志,2011,26(6): 1395-1398.
- [11] Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer [J]. Gastroenterology, 2017, 153(1): 307-323.
- [7] Memtsoudis SG, Cozowicz C, Bekeris J, et al. Anaesthetic care of patients undergoing primary hip and knee arthroplasty: consensus recommendations from the International Consensus on Anaesthesia-Related Outcomes after Surgery group (ICAROS) based on a systematic review and meta-analysis [J]. Br J Anaesth, 2019, 123(3): 269-287.
- [8] 中华医学会外科学分会腹腔镜与内镜外科学组,中国抗癌协会大肠癌专业委员会腹腔镜外科学组.腹腔镜结直肠癌根治手术操作指南(2008版)[J].中华胃肠外科杂志,2009,12(3): 310-312.
- [9] 中国结直肠癌诊疗规范(2017版)专家组.中国结直肠癌诊疗规范(2017版)主要更新概要[J].中华胃肠外科杂志,2018,21(1): 90-91.
- [10] McCartney CE, MacLeod JA, Greer PA, et al. An easy-to-use FRET protein substrate to detect calpain cleavage in vitro and in vivo [J]. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res, 2018, 1865(2): 221-230.
- [11] 乔卿均,郭晓,王洪民.钙蛋白酶-1在胶质瘤组织中的表达及其对U87细胞侵袭和迁移的影响[J].中国临床神经外科杂志,2020,25(4): 223-226.
- [12] Zhuang Q, Luo W, Zhang M, et al. Capn4 contributes to tumor invasion and metastasis in clear cell renal cell carcinoma cells via modulating talin-focal adhesion kinase signaling pathway [J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2018, 50(5): 465-472.
- [13] Hanouna G, Tang E, Perez J, et al. Preventing Calpain Externalization by Reducing ABCA1 Activity with Probenecid Limits Melanoma Angiogenesis and Development [J]. J Invest Dermatol, 2020, 140(2): 445-454.
- [14] Jeon KH, Yu HV, Kwon Y. Hyperactivated m-calpain affects acquisition of doxorubicin resistance in breast cancer cells [J]. Biochim Biophys Acta Gen Subj. 2018, 1862(5): 1126-1133.
- [15] Jiang Z, Bo L, Meng Y, et al. Overexpression of homeodomain-interacting protein kinase 2 (HIPK2) attenuates sepsis-mediated liver injury by restoring autophagy [J]. Cell Death Dis, 2018, 28, 9(9): 847.
- [16] Baudry M. Calpain-1 and Calpain-2 in the Brain: Dr. Jekyll and Mr. Hyde? [J]. Curr Neuropharmacol, 2019, 17(9): 823-829.
- [17] 王檬. CAPN1在结直肠癌中的表达及其对肠癌细胞增殖、迁移的影响[D]. 2016.
- [18] 刘书豪,郑龙波,李帅,等.直肠癌淋巴结转移的深度神经网络评判研究进展[J].中国实用外科杂志,2019,39(7): 739-740.

(上接第407页)

· 论 著 ·

测定血液病患者血浆 Venetoclax 浓度的 HPLC-MS/MS 方法

王磊¹ 代玉超² 李梦³ 刘红星^{1,3,4*}

[摘要] **目的** 建立测定血液病患者血浆 Venetoclax 浓度的 HPLC-MS/MS 法。**方法** 患者血浆经甲醇(含内标 Venetoclax-d₈)沉淀蛋白处理。色谱柱为 Ultimate[®]XB-C₁₈(4.6×50 mm, 5 μm), 柱温 60℃。流动相为含 0.1% 甲酸和 2 mmol·L⁻¹ 乙酸铵的水溶液和含 0.1% 甲酸的甲醇溶液, 流速 0.7 mL·min⁻¹, 梯度洗脱。Venetoclax 与 Venetoclax-d₈ 质谱检测方式均为电喷雾正离子模式, 多反应监测(MRM), 同时监测 Venetoclax m/z 868.5~321.7(定量离子), Venetoclax m/z 868.5~177.6(定性离子)及 Venetoclax-d₈ m/z 876.6~329.4(定量离子)。以 Venetoclax 和 Venetoclax-d₈ 峰面积比为定量依据, 计算血浆 Venetoclax 浓度。并对该方法进行性能评价。**结果** Venetoclax 在 10~2 000 ng·mL⁻¹ 范围内线性良好, 三批回归方程进行线性拟合后的标准曲线方程为 $Y=0.001\ 87\ X+0.003\ 15$, $r=0.996\ 7$; 携带污染、重复性、实验室内精密密度、回收率、基质效应和稳定性均符合性能验证要求。**结论** 所建立的 HPLC-MS/MS 方法可准确、灵敏、快速地检测血液病患者血浆 Venetoclax 浓度, 可应用于 Venetoclax 治疗药物监测及其体内药动力学分析。

[关键词] venetoclax; 治疗药物监测; 高效液相色谱-质谱联用; 方法学验证

HPLC-MS/MS method for the determination of plasma Venetoclax concentration in patients with hematological diseases

WANG Lei¹, DAI Yuchao², LI Meng³, LIU Hongxing^{1,3,4*}

(1. Department of Laboratory Medicine, Hebei Yanda Lu Daopei Hospital, Langfang, Hebei, China, 065201; 2. Donggang Women and children's healthcare hospital, Rizhao, Shandong, China, 276800; 3. Division of Pathology & Laboratory Medicine, Beijing Lu Daopei Hospital, Beijing, China, 100176; 4. Beijing Lu Daopei Institute of Hematology, Beijing, China, 100176)

[ABSTRACT] **Objective** To establish an HPLC-MS/MS method for the determination of plasma Venetoclax concentration in patients with hematological diseases. **Methods** The patient's plasma was treated with methanol (containing the internal standard Venetoclax-d₈) to precipitate protein. The chromatography column was Ultimate[®] XB-C₁₈ (4.6×50 mm, 5 μm), and the column temperature is 60℃. The mobile phase is an aqueous solution containing 0.1% formic acid and 2 mmol·L⁻¹ ammonium acetate and a methanol solution containing 0.1% formic acid, with a flow rate of 0.7 mL·min⁻¹, and gradient elution. Both Venetoclax and Venetoclax-d₈ mass spectrometry detection methods are electrospray positive ion mode, multiple reaction monitoring (MRM), and simultaneous monitoring of Venetoclax m/z 868.5~321.7 (quantitative ion), Venetoclax m/z 868.5~177.6 (qualitative ion) and Venetoclax-d₈ m/z 876.6~329.4 (quantitative ion). The peak area ratio of Venetoclax and Venetoclax-d₈ was used to calculate the plasma Venetoclax concentration. The performance of HPLC-MS/MS method for the determination of plasma Venetoclax concentration in patients with blood diseases was tested. **Results** Venetoclax has good linearity in the range of 10~2 000 ng·mL⁻¹. The standard curve equation after linear fitting of three batches of regression equations is $Y=0.001\ 87\ X+0.003\ 15$, $r=0.996\ 7$. Car-

基金项目:河北省医学科学研究基金(20200033)

作者单位:1. 河北燕达陆道培医院检验医学科, 河北, 廊坊 065201

2. 山东省日照市东港区妇幼保健院, 山东, 日照 276800

3. 北京陆道培医院病理和检验医学科, 北京 100176

4. 北京陆道培血液病研究院, 北京 100176

*通信作者:刘红星, E-mail:starliu@pku.edu.cn

rying pollution, repeatability, precision in the laboratory, recovery rate, matrix effect and stability all meet the performance verification requirements. **Conclusion** The established HPLC-MS/MS method can accurately, sensitively and rapidly detect the plasma Venetoclax concentration in patients with blood diseases, and can be applied to the monitoring of Venetoclax therapeutic drugs and their in vivo pharmacokinetic analysis.

[KEY WORDS] Venetoclax; TDM; HPLC-MS/MS; Validation of methodology

Venetoclax 是一种 BCL-2 通路抑制剂,用于慢性淋巴细胞白血病/小淋巴细胞淋巴瘤(chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma, CLL/SLL)和急性髓性白血病(acute myeloid leukemia, AML)患者的抗肿瘤治疗^[1]。体外研究表明 Venetoclax 主要由 CYP3A4 代谢,与酮康唑、泊沙康唑和利福平等有较强的药物相互作用,个体间血药浓度差异较大^[2-3]。通过检测患者 Venetoclax 血药浓度,并个体化地调整给药剂量,可减少不良反应和保障临床疗效^[4-5]。本研究拟建立一种液相色谱串联质谱(high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS)法测定血液病患者血浆 Venetoclax 浓度的方案,并应用于临床治疗药物监测,为 Venetoclax 的个体化用药剂量调整提供可靠依据。

1 材料与方法

1.1 一般资料

1.1.1 分析仪器

岛津 Nexera Xp 型高效液相色谱仪(日本岛津公司),API3200 MD 三重四级杆质谱仪(美国 AB SCIEX 公司),质谱仪采用电喷雾(ESI)离子源,分析软件为 Analyst® MD 1.6.3。

1.1.2 试剂

标准品: Venetoclax(批号:1-NWY-41-1, TORONTO RESEARCH CHEMICALS INC,加拿大);内标: Venetoclax-d₈(批号:02-Jun-17-01, Clearsynth, 印度)。甲醇(HPLC-Grade, fisher, 美国),乙腈(HPLC-Grade, fisher, 美国),DMSO(二甲基亚砜, Lot: WX-BC1590V, 西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司),甲酸(HPLC Grade, 北京迈瑞达科技有限公司);乙酸钠(HPLC Grade, 北京迈瑞达科技有限公司)。

1.1.3 基质及临床样本

空白血浆基质为新鲜小牛血清(北京百奥莱博科技有限公司)。收集本院 7 名服用 Venetoclax 的 CLL 患者的血液样本,均为 300 mg qd 服药,于服药 6 h 时抽血检测峰浓度。

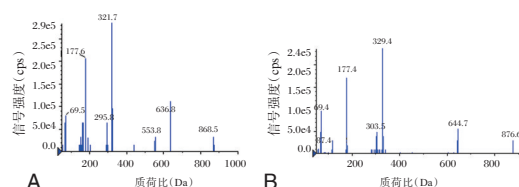
1.2 方法

1.2.1 色谱条件

采用月旭 Ultimate® XB-C₁₈ 液相色谱柱(4.6×50 mm, 5μm),柱温 60℃;流速:0.7 mL·min⁻¹;液相流动相为:A 相为含 2 mmol·L⁻¹ 乙酸铵+0.1%甲酸的水溶液;B 相为含 0.1%甲酸的甲醇溶液。样本进样量为 3 μL。洗脱方式为梯度洗脱,B 相浓度从(0.01~1.0)min 由 60%~95%,从(1.0~2.5)min 维持 95%浓度,从(2.5~2.6)min, B 相浓度由 95%~60%,维持 60%浓度到 3.5 min 结束。

1.2.2 质谱条件

选用电喷雾离子源(ESI+),以多离子反应监测方式(MRM)进行检测。其离子源参数为离子喷射电压:4 500 V,离子源温度:550℃,喷雾气:50 psi,辅助加热气:55 psi,气帘气:20 psi,碰撞气:Medium。同时监测 Venetoclax m/z 868.5~321.7 作为定量离子, Venetoclax m/z 868.5~177.6 作为定性离子;监测 Venetoclax-d₈ m/z 876.6~329.4 作为内标定量离子。见图 1、表 1。



注:A、B 为 Venetoclax、Venetoclax-d₈ 碎片离子质谱图。

图 1 Venetoclax 与 Venetoclax-d₈ 的二级质谱图

Figure 1 Secondary mass spectrometry of Venetoclax and Venetoclax-d₈

表 1 质谱条件

Table 1 Mass spectrometry conditions

药物	母离子(m/z)	子离子(m/z)	驻留时间(ms)	去簇电压(v)	碰撞电压(v)	出口电压(v)	射入电压(v)
Venetoclax	868.5	321.7	100	91	70	4	10
Venetoclax	868.5	177.6	100	91	63	4	10
Venetoclax-d ₈	876.6	329.4	100	91	70	4	10

1.2.3 溶液配制

1.2.3.1 储备液的配制 取 Venetoclax 标准品 5.000 mg, 用 DMSO 充分溶解, 配制成浓度为 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的储备液; 同样取 Venetoclax- d_8 标准品 1.000 mg, 选用 DMSO 与甲醇溶剂, 充分溶解, 配制成浓度为 $100 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 溶液, 分装, 备用。

1.2.3.2 标准品与内标溶液的配制 取 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 Venetoclax 储备液, 用有机溶液 (50% 乙腈 + 10% DMSO) 稀释成浓度为 0.1、0.5、1、2、5、10、20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 Venetoclax 标准品系列溶液。然后取配置好的 Venetoclax- d_8 储备液, 用甲醇稀释, 制得浓度为 $250 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ Venetoclax- d_8 内标溶液。

1.2.4 样品处理

将患者血液样本 $3\,500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取 $100 \text{ } \mu\text{L}$ 血浆上清, 加至 1.5 mL 离心管中, 加入 $100 \text{ } \mu\text{L}$ 含 0.1% 甲酸和 $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酸铵的水溶液, 再加入 $300 \text{ } \mu\text{L}$ 配制好的 Venetoclax- d_8 内标溶液, 涡旋 60 s, 充分混匀, $13\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min。吸取上清液于进样瓶中, 进样 $3 \text{ } \mu\text{L}$ 。

1.2.5 方法学验证^[6-9]

1.2.5.1 专属性考察 采用上述实验方法, 分别取空白血浆、加入 Venetoclax 及 Venetoclax- d_8 的空白血浆、给药后的患者血浆。按“1.2.4”项方法操作, 进行检测。

1.2.5.2 残留验证 在分析高浓度样品后, 立即测定空白样品来评价方法残留。

1.2.5.3 基质效应评价 分别添加 3 个浓度水平的标准溶液到空白血浆和水中, 按 1.2.4 项进行处理, 通过血浆存在下目标化合物 (内标) 的信号强度与水中目标化合物 (内标) 的信号强度来计算内标归一化的基质因子, 进而评价基质效应, 计算公式参照中国药典^[9]。

1.2.5.4 标准曲线绘制和定量限 取 $10 \text{ } \mu\text{L}$ 浓度为 0.1、0.5、1、2、5、10、20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 Venetoclax 标准品系列溶液, 分别加入 1.5 mL 离心管中, 再平行加入 $90 \text{ } \mu\text{L}$ 空白血浆, 然后按照 1.2.4 操作, 经 HPLC-MS/MS 分析, 以 Venetoclax 与内标 Venetoclax- d_8 峰面积之比 (Y) 作纵坐标, 以血浆 Venetoclax 浓度 X 为横坐标, 用加权 ($W=1/X^2$) 最小二乘法进行回归和线性拟合。

1.2.5.5 线性评价

通过评价 3 条标准曲线, 每天 1 条标准曲线, 计算线性回归的相关系数 r , 要求 $r \geq 0.99$ 。

1.2.5.6 精密度

制备高、中、低 (1 500, 300, 30

$\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) 3 种浓度的质量控制 (quality control, QC) 样品各 6 个, 按 1.2.4 项下进行处理, 连续测定 3 d, 根据 QC 样品测定浓度结果计算批内和批间精密度, 要求 $\text{CV} < 15\%$ 。

1.2.5.7 回收率 取空白血浆, 制备高、中、低 3 个质量浓度的质控血浆样品, 各 6 个, 按 1.2.4 项下进行处理, 测定得到分析物及内标峰面积数值比值 A_1 ; 同时取空白血浆, 经蛋白沉降处理得血浆上清, 然后制备高、中、低 3 个质量浓度的质控血浆上清样品, 各 6 个, 按 1.2.4 项下进行处理, 测定得到分析物及内标峰面积数值比值 A_2 , 以 A_1/A_2 比值计算提取回收率。

1.2.5.8 稳定性试验 配制 Venetoclax 低、中、高 3 个浓度 (30, 300, 1 500 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的血浆样品, 每个浓度 3 个样品, 考察其在室温放置 12 h、冰箱 4 度放置 12 h、进样板放置 12 h、反复冻融 3 次稳定性。

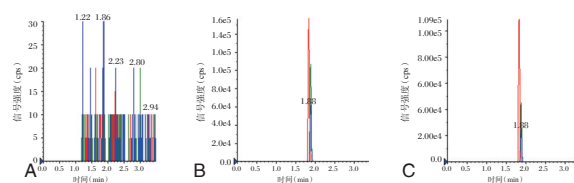
1.3 统计学处理

采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析。计量资料中正态分布数据采用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 非正态分布数据采用中位数 (四分位数间距) 进行描述; 计数资料采用 $n(\%)$ 表示, 结合方法学要求对性能验证实验数据进行相关性分析。

2 结果

2.1 专属性考察

Venetoclax 保留时间为 1.88 min, 内标 Venetoclax- d_8 保留时间为 1.83 min, 二者色谱行为一致; 空白血浆中内源性物质无出峰。见图 2。



注: A. 空白样本; B. 空白血浆+Venetoclax+Venetoclax- d_8 ; C. 患者血样+Venetoclax- d_8 。

图2 Venetoclax 和 Venetoclax- d_8 色谱图

Figure 2 Chromatogram of Venetoclax and Venetoclax- d_8

2.2 残留验证

Venetoclax 残留在 3% 左右, 小于分析物定量下限 20%, 内标残留为 0, 低于内标峰面积的 5%。见表 2。

2.3 基质效应评价

有或无血浆基质中不同加标浓度 Venetoclax 内标归一化基质因子在 0.93~1.00 之间, CV 在 4%~9% 之间, 小于 15%。见表 3。

表2 Venetoclax 残留实验评价结果

Table 2 Residual experiment evaluation results of Venetoclax

样品类型	Venetoclax			Venetoclax-d ₈		
	峰面积	最低点峰 面积	残留 (%)	峰面积	最低点峰 面积	残留 (%)
高浓度样品	143 000		—	35 800		—
空白 01	35.4	1 130	3.1	0	52 700	0
空白 02	0		0	0		0

表3 Venetoclax 基质效应考察评价结果

Table 3 Matrix effect evaluation results of Venetoclax

序号	信号强度比 (30 ng/mL)		信号强度比 (300 ng/mL)		信号强度比 (1 500 ng/mL)	
	血浆上 清加标	溶液 加标	血浆上 清加标	溶液 加标	血浆上 清加标	溶液 加标
1	0.06	0.06	0.60	0.68	3.01	3.23
2	0.07	0.06	0.68	0.73	2.86	3.33
3	0.07	0.07	0.66	0.70	3.11	3.30
4	0.06	0.07	0.67	0.72	3.14	3.35
5	0.07	0.07	0.66	0.72	3.04	3.34
6	0.07	0.07	0.72	0.73	3.27	3.30
均值	0.07	0.07	0.66	0.71	3.07	3.31
内标校正 基质因子	1.01		0.93		0.93	
CV(%)	8.97		3.71		4.63	

2.4 标准曲线的绘制和定量限

采用内标法进行定量分析,得到的直线方程为 $Y=0.002\ 01X+0.001\ 64$, $r=0.999\ 5$ 。表明 Venetoclax 在 $10\sim 2\ 000\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内线性关系良好,最低定量限为 $2\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.5 线性评价

Venetoclax 连续 3 个批次标准曲线方程分别为 $Y=0.001\ 89X+0.000\ 526$, $r=0.995$; $Y=0.002\ 01X+0.001\ 64$, $r=0.999\ 5$; $Y=0.001\ 75X+0.000\ 63$, $r=0.998\ 8$ 。表明每批标准曲线相关系数 $r\geq 0.990$, 三条线性数据整合通过统计学方法计算得到线性方程 $Y=0.001\ 87X+0.003\ 15$, $r=0.996\ 7$ 。

2.6 精密度

Venetoclax 批内 RSD 为 2.77%~6.10%, 批间 RSD 为 4.91%~5.23%, 二者均小于 15%, 结果精密度好, 数据较集中。见表 4。

2.7 回收率

Venetoclax 和 Venetoclax-d₈ 的面积比例系数数值进行计算, 得回收率在 101.68%~105.38% 之内, 位于 85%~115% 之间。见表 5。

2.8 稳定性试验

在以上考察的稳定性条件下, 对结果数据进行单因素方差分析, 其 Venetoclax 浓度数据 $0.92\%\leq\text{RSD}\leq 6.56\%<15\%$ 。见表 6。

表4 Venetoclax 精密度测定结果 ($n=6$)Table 4 Precision measurement results of Venetoclax ($n=6$)

序号		浓度 (ng/mL)		
		30	300	1500
第一批	批内平均值	35.12	347.33	1555.00
	批内 SD	1.50	9.71	53.94
	批内 RSD(%)	4.28	2.80	3.47
第二批	批内平均值	33.33	330.00	1531.67
	批内 SD	1.88	20.12	68.82
	批内 RSD(%)	5.63	6.10	4.49
第三批	批内平均值	34.25	323.50	1436.67
	批内 SD	1.79	12.77	39.83
	批内 RSD(%)	5.22	3.95	2.77
总体	批间平均值	34.23	333.61	1507.78
	批间 SD	1.79	17.38	74.09
	批间 RSD(%)	5.23	5.21	4.91

表5 Venetoclax 回收率测定结果 ($n=6$)Table 5 Recovery results of Venetoclax ($n=6$)

序号	A1/A2 (30 ng/mL)		A1/A (300 ng/mL)		A1/A2 (1 500 ng/mL)	
	血浆 加标	血浆上 清加标	血浆 加标	血浆上 清加标	血浆 加标	血浆上 清加标
1	0.06	0.07	0.63	0.62	2.88	2.90
2	0.07	0.06	0.65	0.68	3.10	2.88
3	0.07	0.07	0.67	0.62	2.81	2.85
4	0.07	0.06	0.66	0.63	2.98	2.76
5	0.06	0.06	0.66	0.63	3.04	2.74
6	0.07	0.07	0.68	0.66	2.88	2.68
平均值	0.07	0.07	0.66	0.64	2.95	2.80
SD	0.00	0.00	0.02	0.02	0.11	0.09
RSD(%)	4.15	4.44	2.67	3.76	3.74	3.18
回收率(%)	101.68		102.46		105.38	

表6 Venetoclax 稳定性实验结果 ($n=3, \bar{x}\pm s$)Table 6 Stability experiment results of Venetoclax ($n=3, \bar{x}\pm s$)

放置条件		浓度 (ng/mL)		
		30	300	1500
室温放置 12 h	测得浓度 (ng/mL)	36.37±0.72	330.33±3.06	1490.00±26.46
	RSD(%)	1.99	0.92	1.78
冰箱 4 度 放置 12 h	测得浓度 (ng/mL)	34.90±1.56	324.00±7.94	1526.67±51.32
	RSD(%)	4.48	2.45	3.36
进样板 放置 12 h	测得浓度 (ng/mL)	33.13±1.42	319.00±8.66	1416.67±92.92
	RSD(%)	4.27	2.71	6.56
冻融稳定性	测得浓度 (ng/mL)	33.57±1.76	321.33±7.51	1540.00±43.59
	RSD(%)	5.25	2.34	2.83

2.9 临床应用

应用上述建立的 HPLC-MS/MS 法对血浆 Venetoclax 浓度进行检测, 得到 7 例患者 Venetoclax 血药浓度结果分别为: 654、940、398、760、406、1110 和 1870 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, 可看出同一剂量下不同患者中, 其血药浓度差别较大, 但其平均值为 877 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, 与其药代动力学结论一致。

3 讨论

Venetoclax 与三唑类等药物联用时,其体内过程受三唑类药物影响较大,患者易出现恶心、腹泻,血小板减少等不良反应,应在 Venetoclax 相应治疗周期内减少 Venetoclax 剂量^[10]。临床建议实验室开展 Venetoclax 血药浓度检测,以便临床更好的调整 Venetoclax 给药剂量。血药浓度测定方法一般有色谱法,免疫法和 HPLC-MS/MS 法。目前关于 Venetoclax 血药浓度测定的文献较少,且其方法均为 HPLC-MS/MS 法。

Salem^[11] 和 Liu 等^[12] 于 2017 年建立了测定 Venetoclax 血药浓度的 HPLC-MS/MS 法,但他们报道的方法前处理过程复杂、耗时长,且重复性不好、效率低;流动相为乙腈/甲酸铵水溶液,色谱柱较长,分析时间长,且无合适的内标可选择。Inturi 等^[13] 于 2018 年报道的方法用同位素 Venetoclax-d8 作为内标,但分析时间较长(每个样品需 13 min);其采用挥发性太强且不安全的乙醚溶解 Venetoclax。本文采用二甲基亚砜溶解 Venetoclax,以克服 Venetoclax 本身溶解性差的难题。本文采用在血浆中加入 100 μL 含 0.1% 甲酸和 2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酸铵的水溶液作为前处理液,甲醇沉淀蛋白效果更好,回收率更高且样本检测更稳定。实验数据证明,本文建立的 Venetoclax 血药浓度检测方法专属性强、精密度好、准确度高、稳定性好、线性范围宽、无残留,同时具有前处理简单,耗时短,重复性好等特点,可用于临床常规血药浓度测定。

鉴于目前 Venetoclax 血药浓度监测在临床治疗药物监测中尚无相关指南或共识可供借鉴,故本实验建议临床可参考其药物代谢动力学参数来进行调整 Venetoclax 给药剂量^[1-5,10-17]。一般建议在低脂肪餐条件下,Venetoclax 400 mg qd 剂量,在服药后 6 h(峰值)左右抽血送检。Venetoclax 稳态 C_{max} 为 $2.1\pm 1.1\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,可作为临床调整剂量的依据。当 Venetoclax 与中强度 CYP3A 抑制剂及诱导剂和 P-gp 抑制剂联用,或患者服用的药物来源不清时,最好监测血药浓度。通过对 Venetoclax 整个治疗周期不同给药剂量下血药浓度结果回顾性分析,统计出相应的血药浓度有效范围,可为临床合理用药提供参考依据。

参考文献

[1] Salem AH, Agarwal SK, Dunbar M, et al. Pharmacokinetics of Venetoclax, a Novel BCL-2 Inhibitor, in Patients with Relapsed or Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia or Non-Hodgkin

Lymphoma[J]. J Clin Pharmacol, 2016, 57(4):484-492.

[2] Agarwal SK, Hu BB, David C, et al. Evaluation of Rifampin's Transporter Inhibitory and CYP3A Inductive Effects on the Pharmacokinetics of Venetoclax, a BCL-2 Inhibitor: Results of a Single-and Multiple-Dose Study[J]. J Clin Pharmacol, 2016, 56(11):1335-1343.

[3] Jones AK, Freise KJ, Agarwal SK, et al. Clinical Predictors of Venetoclax Pharmacokinetics in Chronic Lymphocytic Leukemia and Non-Hodgkin's Lymphoma Patients: a Pooled Population Pharmacokinetic Analysis[J]. AAPS J, 2016, 18(5):1192-1202.

[4] Stilgenbauer S, Eichhorst B, Schetelig J, et al. Venetoclax in relapsed or refractory chronic lymphocytic leukaemia with 17p deletion: a multicentre, open-label, phase 2 study[J]. Lancet Oncol, 2016, 17(6):768-778.

[5] Roberts AW, Davids MS, Pagel JM, et al. Targeting BCL2 with venetoclax in relapsed chronic lymphocytic leukemia[J]. N Engl J Med, 2016, 374(4):311-322.

[6] 中华医学会检验医学分会,卫生计生委临床检验中心.液相色谱-质谱临床应用建议[J].中华检验医学杂志, 2017, 40(10):770-779.

[7] 曹正,李水军,沈敏,等.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(03):189-196.

[8] 张相林,缪丽燕,陈文倩,等.治疗药物监测工作规范专家共识(2019版)[J].中国医院用药评价与分析, 2019, 19(8):897-898, 902.

[9] 国家药典委员会.中国药典(2015版)[M].北京:中国医药科技出版社, 2015.

[10] Agarwal SK, DiNardo CD, Potluri J, et al. Management of Venetoclax-Posaconazole Interaction in Acute Myeloid Leukemia Patients: Evaluation of Dose Adjustments[J]. Clin Ther, 2017, 39(2):359-367.

[11] Salem AH, Hu BB, Freise KJ, et al. Evaluation of the Pharmacokinetic Interaction between Venetoclax, a Selective BCL-2 Inhibitor, and Warfarin in Healthy Volunteers[J]. Clin Drug Investig, 2017, 37:303-309.

[12] Liu H, Melissa JM, Lao YB, et al. Metabolism and disposition of a novel B-cell lymphoma-2 inhibitor venetoclax in humans and characterization of its unusual metabolites[J]. Drug Metab Dispos, 2017, 45(3):294-305.

[13] Inturi S, Yejerla RK, Jujjuru SK, et al. Evaluation of Deuterium-Labeled Internal Standard for the Measurement of Venetoclax by HPLC-ESI-Tandem Mass Spectrometry[J]. J Young Pharma, 2018, 10(4):392-398.

[14] Rhodes J, Wan X, Souers A, et al. Nonclinical Evaluation of a Disproportionate Human Metabolite of Venetoclax[J]. Int J Toxicol, 2018, 37(1):101.

[15] Cheng TT, Salenm AH, Menon RM, et al. Pharmacokinetics of the BCL-2 Inhibitor Venetoclax in Healthy Chinese Subjects[J]. Clin Pharmacol Drug Devel, 2018, 7(4):435-440.

[16] Goodwin PM. Venetoclax Pro-Apoptotic Therapy Benefits Older Patients With AML[J]. Oncology Times, 2018, 40(4):47.

[17] Anna KW, Dariusz W, Aleksandra KM, et al. Venetoclax in the treatment of chronic lymphocytic leukemia[J]. Expert Opin Drug Metabol Toxicol, 2019, 15(5):353-366.

染色体 22q11.2 微缺失检测在先天性心脏病产前诊断中的应用

许育双¹ 刘思平¹ 宋兰林¹ 吴瑞枫¹ 袁毓雯² 贾蓓^{1*}

【摘要】目的 研究先天性心脏病胎儿中染色体 22q11.2 微缺失综合征的发生率,探讨在先天性心脏病胎儿中进行 22q11.2 微缺失产前诊断的必要性及可行性。**方法** 选择 2014 年 1 月到 2019 年 12 月在本院妇产科经胎儿超声检查诊断为先天性心脏畸形的 228 例胎儿,行绒毛取样、羊膜腔穿刺或脐血穿刺获取胎儿细胞。综合应用染色体核型分析、多重连接依赖探针扩增、荧光原位杂交及单核苷酸多态性微阵列芯片等多种检测技术,对胎儿进行细胞遗传学水平的检测。**结果** 228 例样本中发现染色体非整倍体 64 例,其中 21 三体 25 例、18 三体 30 例、13 三体 4 例、45,X 2 例、48,XXY,+18 1 例、染色体三倍体 2 例。对 164 例染色体核型未见异常者,行全基因组 SNP 微阵列芯片分析发现 9 例 22q11.2 微缺失,22q11.2 微缺失在先天性心脏病胎儿中的发生率为 5.49%。**结论** 胎儿先天性心脏缺陷与染色体 22q11.2 微缺失有关。在先天性心脏病胎儿中行 22q11.2 微缺失产前诊断是必要可行的,对于优生优育、明确胎儿预后及再发生风险评估有重要意义。

【关键词】 22q11.2 微缺失综合征;先天性心脏病;产前诊断

Prenatal Diagnosis for 22q11.2 Deletion Syndrome in Congenital Heart Diseases

XU Yushuang¹, LIU Siping¹, SONG Langlin¹, WU Ruifeng¹, QIU Yurong², JIA Bei^{1*}

(1. Department of Antenatal Diagnosis centre, Gynaecological, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong, China, 510515; 2. Department of Ultrasound, Gynaecological, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong, China, 510515)

【ABSTRACT】Objective To study the incidence of chromosome 22q11.2 deletion syndrome in fetuses with congenital heart defect. And to explore the necessity and feasibility of the prenatal diagnosis of chromosome 22q11.2 deletion in fetuses with congenital heart defect. **Methods** Chorionic villus sampling, amniocentesis and cordocentesis were used to 228 pregnant women tested as fetal congenital heart defects by prenatal ultrasound examination. Cytogenetic and molecular genetics methods were employed to detect potential mutations, including karyotyping, multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA), fluorescence in situ hybridization (FISH) and single nucleotide polymorphisms array (SNP array). **Results** There are 9 samples of chromosome 22q11.2 deletion were found in 228 patients with congenital heart disease, the ratio was 5.49%. **Conclusion** Fetal congenital heart disease is associated with chromosome 22q11.2 deletion. The prenatal diagnosis of chromosome 22q11.2 deletion in fetuses with congenital heart disease is necessary and feasible, and it is of great significance for eugenics, optimizing fetal prognosis and risk assessment of recurrence.

【KEY WORDS】 22q11.2 deletion syndrome; Congenital heart diseases; Prenatal diagnosis

基金项目:南方医科大学南方医院院长基金(2020B015);广东省自然科学基金项目(2017A030310098)

作者单位:1. 南方医科大学南方医院妇产科产前诊断中心,广东,广州 510515

2. 南方医科大学南方医院妇产科超声室,广东,广州 510515

注:许育双和刘思平为并列第一作者

*通信作者:贾蓓, E-mail: jiabei@smu.edu.cn

22q11.2 微缺失综合征 (22q11.2 deletion syndrome, 22q11.2DS) 是 22q11.21-22q11.23 区域缺失引起的一类临床症候群, 在新生活产婴儿中患病率约为 1:4 000, 男女患病率比较差异无统计学意义, 是人类最常见的微缺失综合征^[1]。22q11.2 微缺失综合征最常见的临床症状被概述为 CATCH22 (Cardiac defects, Abnormal facial features, Thymic hypoplasia, Cleft palate, and Hypocalcemia, Chromosome 22)^[2], 其表型极具多样性, 轻症者可表现正常, 重症者则可以出现累及全身各个组织和器官的症状, 表现为严重的机能障碍。其中最主要的表征为合并先天性心脏病, 约占 70%~80%, 而合并的先天性心脏病中动脉圆锥发育异常最为常见, 如法洛氏四联症 (17%~22%)、主动脉弓离断 (14%~15%)、室间隔缺损 (13%~14%) 等^[3]。此外, 在先天性心脏病的前瞻性研究中发现, 室间隔缺损、主动脉弓离断、法洛氏四联症中存在 22q11DS 的比例分别为 22.73%、9.09%、18.8%^[4]。本研究将对产前超声发现先天性心脏病的胎儿进行 22q11.2 微缺失的遗传学产前诊断, 并对其表型与基因型进行关联分析, 以期对遗传咨询、妊娠指导、出生后临床干预提供重要依据。

1 资料与方法

1.1 研究对象

2014 年 1 月至 2019 年 10 月在本院妇产科经胎儿超声检查诊断为先天性心脏畸形的胎儿 228 例。其中单纯性心脏病 162 例, 心脏复杂畸形 66 例; 平均孕周为 (23±4.80) 周; 平均 (29.48±5.50) 岁。

1.2 方法

对获得的胎儿细胞进行培养行染色体核型分析, 选择染色体核型正常的样本行全基因组单核苷酸多态性微阵列芯片 (single nucleotide polymorphism array, SNP-array) 分析, 对确诊为染色体 22q11.2 微缺失的胎儿样本, 进一步用荧光原位杂交 (fluorescence in situ hybridization, FISH) 和多重连接依赖探针扩增 (multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA) 技术对胎儿及其父母进行 22q11.2 微缺失验证。本研究已获得医院医学伦理委员会的批准同意, 所有入选孕妇及其家属签署了知情同意书。

1.2.1 染色体核型分析和基因组 DNA 的提取

实施绒毛取样、羊膜腔穿刺术或脐带血穿刺术, 采集胎儿的绒毛、羊水或脐血, 同时采集胎儿

父母外周静脉血。对胎儿样本常规行细胞培养, 后行 G 显带、核型分析。同时按照试剂盒操作说明, 使用基因组 DNA 提取试剂盒 (北京天根生化科技公司) 提取样本基因组 DNA。

1.2.2 SNP-array 分析

对核型未见异常的 DNA 标本, 采用全基因组 SNP 微阵列芯片技术 (Illumina HumanCytoSNP12 Beadchip/Illumina®OmniZhongHua - 8v1.3 Beadchip, 美国), 按照操作程序进行 DNA 提取、gDNA 变性、全基因组扩增过夜、DNA 片段化、DNA 片段醇沉淀重悬、芯片杂交过夜、单碱基延伸、芯片扫描、结果判读。以专用分子核型软件 (Karyostudio Software) 对数据进行拷贝数变异及基因分型分析, 按照说明书, 以 ≥50 个探针标记和 ≥100 Kb 分辨率检测人类基因组拷贝数变异及杂合性缺失。

1.2.3 FISH 检测

对结果为 22q11.2 微缺失的样本行 FISH 进行验证, 采用双色荧光探针试剂盒 (DiGeorge/VCSF Region Probe, Vysis, 美国), 其内含有 TUPLE1 探针 (22q11.2 区域, 红色) 和对照探针 ARSA (22q13.3 区域, 绿色) 进行检测。按照 FISH 操作程序进行制片、干燥、变性、杂交、洗涤、染色和镜检, 拍取荧光信号。

1.2.4 MLPA 检测

采用荷兰 MRC-Holland 公司的 22q11.2 微缺失检测试剂盒 (SALSA MLPA P250 Kit) 进行验证。按照试剂说明对提取的全基因组 DNA 进行变性、杂交、连接、PCR 扩增, 使用 Applied Biosystems 3500 型测序仪 (ABI, 美国) 对扩增产物进行电泳, 应用 MRC-Holland 公司提供的 Coffalyser.Net 软件进行数据分析, 计算该区域各基因位点的拷贝数。

1.2.5 统计学方法

采用 SPSS 17.0 软件进行数据分析, 计数资料以 $n(\%)$ 表示, 采用 χ^2 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

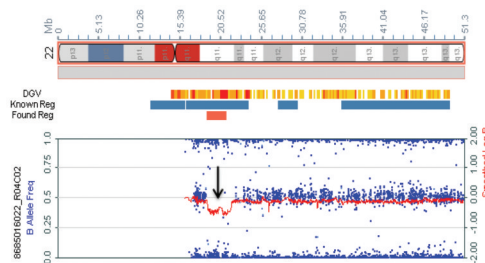
2.1 胎儿染色体核型分析结果

228 例样本中染色体非整倍体 64 例, 其中 21 三体 25 例、18 三体 30 例、13 三体 4 例、45, X 2 例、48, XXY, +18 1 例、染色体三倍体 2 例, 64 例染色体数目异常胎儿大部分病例合并心外多发畸形。

2.2 胎儿全基因组 SNP 微阵列芯片检测结果

在染色体非整倍体未见异常的 164 例样本

中,发现9例22q11.2微缺失(图1),检出率为5.49%(9/164)。其中,法洛氏四联症胎儿16例,检出3例,占比为18.75%(3/16),在先天性心脏病确诊中占比最高(表1);非法洛氏四联症先心病胎儿148例,检出6例,占4.05%(6/148)。法洛氏四联症胎儿确诊率(18.75%)高于非法洛氏四联症先心病胎儿确诊率(4.05%),差异有统计学意义($P<0.05$)。确诊22q11.2的9例胎儿中,7例为LCR A与LCR D之间的经典缺失,1例为包含TBX1基因的非经典缺失,1例为不包含TBX1基因的非经典缺失(图2);行父母全基因组SNP微阵列检测的2对,结果均未见异常,另7例父母未做相关基因检测。

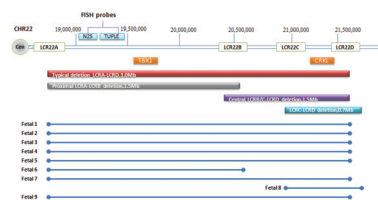


注:箭头指向的区域表示22q11.2微缺失区域。

图1 病例2诊断为22q11.2微缺失综合征的SNP-array结果
Figure 1 SNP-array analysis results analysis diagram of case 2 diagnosed with 22q11.2 microdeletion syndrome

表1 228例先心病胎儿染色体及22q11.2微缺失检测结果 [$n(\%)$]

超声表现	n	染色体核型异常例数	22q11 微缺失例数
法洛氏四联症	16	4(25.00)	3(18.75)
室间隔缺损	79	31(39.24)	2(2.53)
心内膜垫缺损	6	5(83.33)	0(0)
血管走行异常	38	2(5.26)	2(5.26)
心脏复杂畸形	66	17(25.76)	2(3.03)
其他	23	5(21.73)	0(0)



注:cen代表着丝粒所在的位置,淡蓝色填充框表示FISH探针所在的位置,红色填充框表示22q11经典缺失,灰色框表示近端缺失,紫色框表示中部缺失,蓝色框代表远端缺失。

图2 9例22q11.2缺失区域的分布图

Figure 2 22q11.2 deletion region distribution in 9 case

2.3 胎儿FISH和MLPA验证结果

9例22q11.2微缺失胎儿间期细胞,仅一条22号染色体见一红色荧光杂交信号(TUPLE探针)和一绿色荧光杂交信号(ARSA探针),另一条染色体仅见一绿色荧光杂交信号,表明22q11.2存在缺失。见图3~4。

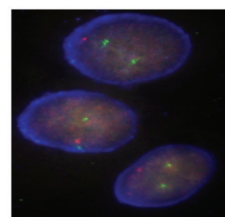
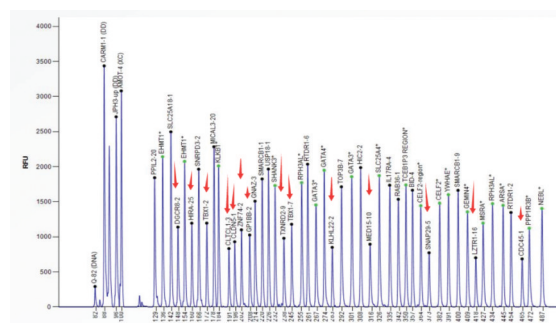


图3 病例2诊断为22q11.2微缺失综合征的FISH图像
($\times 1000$)

Figure 3 FISH image of of case 2 diagnosed with 22q11.2 microdeletion syndrome ($\times 1000$)



注:红色箭头指向的基因为22q11.2微缺失的部分基因位点。

图4 mlpa电泳结果图

Figure 4 Figure of MLPA electrophoresis results

2.4 妊娠结局

9例22q11微缺失胎儿和167例染色体异常胎儿均终止妊娠。继续妊娠的有:15例室间隔缺损、1例法洛氏四联症、23例血管走行异常、8例心脏复杂畸形、5例其他心脏病,均分娩后心胸科随诊,部分患儿适时手术,术后恢复良好。

3 讨论

在相关报道中,约75%~85%的染色体22q11.2微缺失综合征表现为伴有先天性心脏病^[5],先天性心脏病胎儿染色体22q11.2微缺失综合征的发生率为1.56%^[6]。本研究结果高于既往报道,可能与孕妇行胎儿超声检查的孕周有关。这也说明染色体22q11.2微缺失综合征是导致胎儿先天性心脏病的重要因素。染色体22q11.2微缺失综合征是22号染色体上

22q11.21~22q11.23 区域缺失导致,该区域的缺失是低拷贝重复序列(low copy repeats, LCR)非同源重组导致的^[7]。在基因型与表型关联研究中,最受关注的是缺失导致 TBX1 基因单倍剂量不足,影响了胚胎期心脏神经嵴细胞功能的正常表达,导致心脏发育异常^[8-9]。另外,该区域内 Hira 基因突变将影响心脏的环化以及神经嵴细胞的正确迁移,进而导致先天性心脏病^[10]。

在本研究中,病例8的缺失区域不包含 TBX1 和 Hira 基因但同样表现为复杂的心脏发育异常。检索 DECIPHER 数据库的病例发现,与本案例基因拷贝数变异(Copy number variations, CNV)大小有60%以上交叠的有8个病例(ID: 254238, 2366, 401245, 249397, 251228, 262483, 276696, 292353)。Lopez-Rivera 等^[11]分析了携带 22q11.2 缺失的14例患者,其中有12例合并有肾脏发育异常(肾发育不全或发育不良),2例合并其它泌尿系统异常;泌尿系统异常合并心脏发育异常的仅有1例。通过病例对照研究斑马鱼和小鼠模型, Lopez 推测 CRKL 基因的单倍型不足是 22q11.2 微缺失患者肾脏发育异常的遗传驱动因素。然而在本研究的9例携带 22q11.2 缺失的胎儿中,只有1例胎儿观察到肾脏的超声软指标异常,提示 CRKL 基因剂量不足导致的肾脏异常胎儿期表现可能不明显,导致心脏发育异常的证据尚不充分。22q11.2LCR C~D 缺失导致心脏发育异常可能是邻近基因效应,或区域内存在调控基因下调了主效应基因 TBX1 的编码功能。

染色体 22q11.2 微缺失患儿临床表征复杂多样,除了先心病外通常有免疫力低下、甲状旁腺发育不良、语言功能障碍异常等^[12]。患儿出生后需花费巨额的费用进行治疗,术后死亡率及并发症较未携带该缺失的患儿高^[13]。89.7%的患儿智力落后和学习困难,同时患儿成年后精神分裂症、冠心病发病风险也比正常人增高^[14-15]。上述症状通常随着年龄增长逐渐显现及加重,因此早期有效的诊断染色体 22q11.2 微缺失十分重要,这有利于对重症者进行早期干预,对降低出生缺陷具有重要意义。

综上所述,先天性心脏病与染色体 22q11.2 微缺失综合征之间关系密切。对于超声筛查提示先心病的患儿应警惕是否存在染色体 22q11.2 微缺失,建议在孕妇知情同意的情况下行侵入性产前检查,从分子水平上明确先心病的病因。利用

产前筛查和产前诊断技术,及早发现和干预先心病患儿,这对于探索先心病的治疗方案和提出针对性的预防措施具有重要意义。

参考文献

- [1] 罗世强,严提珍,唐宁,等.采用多重连接依赖式探针扩增技术对先天性心脏病患儿进行基因拷贝数变异分析[J].分子诊断与治疗杂志,2015,7(1):33-37.
- [2] Wilson DI, Burn J, Scambler P, et al. DiGeorge syndrome: part of CATCH 22[J]. J Med Genet, 1993,30(10):852-856.
- [3] Halder A, Jain M, Chaudhary I, et al. Prevalence of 22q11.2 microdeletion in 146 patients with cardiac malformation in a referral hospital of North India[J]. BMC Med Genet, 2010, 11(1):101.
- [4] 罗晓辉,胡蓉,周伟宁,等.22q11.2 微缺失综合征产前临床表型的分析[J].中华医学遗传学杂志,2020,37(1):92-94.
- [5] 杨月华,胡娅莉.22q11 微缺失综合征的产前诊断[J].中国产前诊断杂志(电子版),2009,1(1):28-34.
- [6] Schindewolf E, Khalek N, Johnson MP, et al. Expanding the fetal phenotype: Prenatal sonographic findings and perinatal outcomes in a cohort of patients with a confirmed 22q11.2 deletion syndrome[J]. Am J Med Genet A, 2018, 176(8): 1735-1741.
- [7] Michaelovsky E, Frisch A, Carmel M, et al. Genotype-phenotype correlation in 22q11.2 deletion syndrome[J]. BMC Med Genet, 13,1(2012-12-17), 2012, 13(1):122-122.
- [8] Campbell IM, Sheppard SE, Crowley TB, et al. What is new with 22q? An update from the 22q and You Center at the Children's Hospital of Philadelphia[J]. Am J Med Genet A, 2018, 176(10):2058-2069.
- [9] 路玥,刘乐乐,李亚丽. TBX1 基因影响 22q11.2 微缺失综合征表型的作用机制研究进展[J].医学研究生学报,2020,33(6):664-668.
- [10] 朱莹.22q11 缺失综合征的研究进展[J].国际儿科学杂志,2010,37(3):237-240.
- [11] Lopez-Rivera E, Liu YP, Verbitsky M, et al. Genetic Drivers of Kidney Defects in the DiGeorge Syndrome[J]. New Eng J Med, 2017,376(8):742-754.
- [12] Rayannavar A, Levitt KL, Crowley TB, et al. Association of hypocalcemia with congenital heart disease in 22q11.2 deletion syndrome[J]. Am J Med Genet A, 2018,176(10):2099-2103.
- [13] Goldmuntz, E, 22q11.2 deletion syndrome and congenital heart disease. American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics, 2020, 184(1): 64-72.
- [14] 龙娟,赵阳千惠,许一起,等.22q11 微缺失综合征患儿临床特征分析及其临床意义[J].世界最新医学信息文摘,2019,19(8):17-18.
- [15] Calcagni G, Unolt M, Digilio MC, et al. Congenital heart disease and genetic syndromes: new insights into molecular mechanisms[J]. Exp Rev Mol Diagn, 2017,17(9):861-870.

老年住院患者FIB、APTT水平变化与下肢DVT的关系

边春红 郭胜香 何逸林 于建 周博 王荣祺*

【摘要】目的 探讨老年住院患者纤维蛋白原(FIB)、活化部分凝血活酶时间(APTT)水平变化与下肢深静脉血栓形成(DVT)的关系。**方法** 选取本院108例老年住院患者,统计下肢DVT发生率及部位分布,将发生下肢DVT者作为研究组,未发生下肢DVT者作为对照组,对比两组临床资料及实验室指标,分析下肢DVT发生的影响因素,并探究FIB、APTT水平与APACHE II评分的相关性,分析FIB、APTT水平与APACHE II评分对下肢DVT的诊断价值。**结果** 108例老年住院患者下肢DVT发生率为13.89%,主要为左下肢,占53.33%,右下肢占33.33%,双下肢占13.33%;老年住院患者发生下肢DVT与年龄、住院时间、中心静脉置换类型、APACHE II评分、FIB、APTT水平显著相关($P<0.05$);发生下肢DVT的老年住院患者FIB、APTT水平均与APACHE II评分呈正相关($r=0.714, 0.635, P<0.05$);FIB、APTT、APACHE II评分联合诊断下肢DVT的曲线下面积(AUC)大于各指标单独诊断,为0.859。**结论** 老年住院患者FIB、APTT水平明显升高是下肢DVT发生的危险因素,且在诊断下肢DVT、评估患者病情方面具有一定价值。

【关键词】 老年;住院;下肢深静脉血栓形成;纤维蛋白原;活化部分凝血活酶时间

Relationship between the changes of FIB and APTT levels in elderly hospitalized patients and DVT of lower limbs

BIAN Chunhong, GUO Shengxiang, HE Yilin, YU Jian, ZHOU Bo, WANG Rongqi*

(Department of Clinical Laboratory, Haidian Hospital, Beijing, China, 100080)

【ABSTRACT】 Objective To investigate the relationship between fibrinogen (FIB) and activated partial thromboplastin time (APTT) levels in elderly hospitalized patients and deep vein thrombosis (DVT) of lower limbs. **Methods** 108 elderly inpatients in our hospital were selected, and the incidence and location distribution of DVT in lower limbs were counted. Patients with DVT of lower limbs were regarded as the study group, and those without DVT of lower limbs were regarded as the control group. The clinical data and laboratory indicators of the two groups were compared, and the factors affecting the occurrence of DVT in the lower limbs were analyzed. The correlation between FIB, APTT levels and APACHE II scores was explored, and the diagnostic value of FIB, APTT levels and APACHE II scores for DVT of lower limbs was analyzed. **Results** The incidence of DVT in the lower extremities of 108 elderly hospitalized patients was 13.89%, mainly the left lower extremity, accounting for 53.33%, the right lower extremity accounting for 33.33%, and both lower extremities accounting for 13.33%. The occurrence of DVT of lower limbs in elderly hospitalized patients was significantly correlated with age, length of stay, type of central venous replacement, APACHE II score, FIB and APTT levels ($P<0.05$). The FIB and APTT levels of elderly hospitalized patients with DVT of lower limbs were positively correlated with APACHE II score ($r=0.714, 0.635, P<0.05$). The area under the curve (AUC) of FIB, APTT, and APACHE II scores in the combined diagnosis of DVT of lower limbs was greater than that of each indicator alone, which was 0.859. **Conclusion** The significantly increased levels of FIB and APTT in elderly hospitalized patients are risk factors for DVT of lower limbs, and they have certain

基金项目:北京市医院管理局临床技术创新项目(XMLX201709)

作者单位:北京市海淀区医院检验科,北京100080

*通信作者:王荣祺, E-mail: wrqj@126.com

value in diagnosing lower limb DVT and evaluating the patient's condition.

[KEY WORDS] Elderly; Hospitalized; Deep vein thrombosis of lower limbs; Fibrinogen; Activated partial thromboplastin time

下肢深静脉血栓形成(Deep-vein thrombosis, DVT)为老年住院患者常见严重血管性疾病,可引起下肢静脉功能障碍、肺栓塞等并发症,严重影响患者生命安全,尽早给予诊断和治疗至关重要^[1]。下肢DVT的早期检测方法主要包括血管造影成像、超声等,其中血管造影成像属于有创检查,超声检查往往是在有明显临床症状体征或凝血功能异常时进行,临床应用均存在一定局限性。国内外大量研究^[2-3]证实,凝血功能在DVT发生发展中发挥重要作用。纤维蛋白原(Fibrinogen, FIB)是凝血因子中的一种,作为血凝块形成所必需的一种蛋白,其在凝血功能中扮演重要角色^[4]。活化部分凝血活酶时间(Activated partial thromboplastin time, APTT)是内源性凝血系统中一个较为敏感的筛选试验指标,是反映机体凝血功能状态的重要指标^[5]。基于此,本研究尝试探究老年住院患者FIB、APTT水平变化与下肢DVT的关系,旨在为下肢DVT的防治提供参考。报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2017年9月至2020年8月本院108例老年住院患者作为研究对象,男68例,女40例;平均(69.52±4.72)岁;体质量指数(Body mass index, BMI)为(19.5~27.6) kg/m²,平均(23.91±1.84) kg/m²。住院时间12~33 d,平均(27.49±2.75)d。纳入标准:①肢体健全;②年龄60~79岁;③无下肢DVT患病史;④无沟通交流障碍;⑤患者及家属知晓本研究,已签署同意书。排除标准:①严重感染性疾病患者;②常规服用华法林或使用低分子肝素者;③血液系统疾病患者;④下肢需要长期制动者;⑤其他疾病引起的下肢功能障碍者。

1.2 方法

下肢DVT判定方法^[6]:有明确的下肢肿胀和(或)疼痛,经彩色多普勒血流显像或静脉造影显示深静脉管腔阻塞或充盈缺损。并将发生下肢DVT者作为研究组,未发生下肢DVT者作为对照组。

FIB、APTT检测方法:所有患者均于进入住院病房后检测FIB、APTT水平,采集患者空腹外周静

脉血3 mL,抗凝处理后以1 500 G离心力离心15 min,采用沃芬ACL-TOP700全自动凝血分析仪及其配套试剂盒检测FIB、APTT水平(配套试剂盒的批号:1. APTT N0394780, 2. FIB N1181860),检测操作均由专业人员严格按照操作说明书完成。

以老年住院患者是否发生下肢DVT作为因变量(发生下肢DVT赋值为1,未发生下肢DVT赋值为0),将表1中差异有统计学意义因素作为自变量,纳入Logistic回归分析。

1.3 观察指标

①老年住院患者下肢DVT发生率及部位分布情况。②研究组和对照组临床资料及实验室指标,临床资料包括性别、年龄、BMI、住院时间、伴发疾病、中心静脉置管情况、急性生理和慢性健康状况评分系统Ⅱ(Acute physiology and chronic health evaluation Ⅱ, APACHE Ⅱ)评分^[7],实验室指标包括FIB、APTT水平。③分析下肢DVT发生的影响因素。④探究FIB、APTT水平与APACHE Ⅱ评分的相关性。⑤分析FIB、APTT水平与APACHE Ⅱ评分诊断下肢DVT的价值。

1.4 统计学方法

数据处理采用SPSS 22.0软件;计数资料以 n (%)描述,采用 χ^2 检验;计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 描述,两组间比较采用独立样本 t 检验;相关性分析采用Pearson相关系数模型;通过Logistic进行多因素回归分析;诊断效能分析采用受试者工作特征(Receiver operating characteristic, ROC)曲线,获取曲线下面积(Area under the curve, AUC)不同诊断方案间曲线下面积比较采用DeLong检验;联合诊断实施Logistic二元回归拟合,返回诊断概率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 老年住院患者下肢DVT发生率及部位分布

108例老年住院患者15例发生下肢DVT,发生率为13.89%(15/108),其中左下肢最为常见,共8例(53.33%);右下肢5例(33.33%);双下肢2例(13.33%)。

2.2 两组临床资料及实验室指标对比

研究组年龄>70岁占比、住院时间>28 d占比、中心静脉置管情况为普通置管占比、APACHE II评分、FIB、APTT水平均较对照组高,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表1。

表1 两组临床资料及实验室指标对比 [$n(\%)$, ($\bar{x}\pm s$)]

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

临床指标	研究组 ($n=15$)	对照组 ($n=93$)	$t/\chi^2/u$ 值	P 值
性别(男/女)	9/6	58/35	0.031	0.861
年龄				
60~70岁	6(40.00)	63(67.74)	4.309	0.038
>70岁	9(60.00)	30(32.26)		
BMI				
$\leq 23 \text{ kg/m}^2$	8(53.33)	49(52.69)	0.002	0.963
$> 23 \text{ kg/m}^2$	7(46.67)	44(47.31)		
住院时间				
$\leq 28 \text{ d}$	5(33.33)	69(74.19)	8.193	0.004
$> 28 \text{ d}$	10(66.67)	24(25.81)		
伴发疾病				
动脉硬化	6(40.00)	16(17.20)	2.852	0.091
高血压	6(40.00)	24(25.81)	0.686	0.408
糖尿病	3(20.00)	10(10.75)	0.353	0.553
恶性肿瘤	5(33.33)	15(16.13)	1.522	0.217
其他	6(40.00)	17(18.28)	2.455	0.117
中心静脉置管情况				
普通置管	6(40.00)	10(10.75)	6.591	0.010
PICC	3(20.00)	12(12.90)	0.112	0.737
静脉输液港	1(6.67)	10(10.75)	0.001	0.980
APACHE II评分(分)	24.37 $\pm$ 5.12	20.69 $\pm$ 4.57	2.847	0.005
FIB(g/L)	5.78 $\pm$ 1.62	4.12 $\pm$ 2.01	3.039	0.003
APTT(s)	55.31 $\pm$ 10.25	45.69 $\pm$ 9.41	3.630	<0.001

2.3 老年住院患者下肢DVT发生影响因素

年龄、住院时间、中心静脉置换类型、APACHE II评分、FIB、APTT水平均为老年住院患者下肢DVT发生的影响因素($P<0.05$)。见表2。

2.4 FIB、APTT水平与APACHE II评分相关性

老年住院下肢DVT患者FIB、APTT水平均与APACHE II评分呈正相关关系($r=0.714, 0.635, P<0.05$)。见图1。

2.5 FIB、APTT及APACHE II评分诊断老年住院患者下肢DVT的价值

FIB、APTT水平、APACHE II评分诊断老年住院患者下肢DVT的AUC均在0.7以上,具有良好诊断效能,各指标联合诊断的AUC为0.859,大于

表2 老年住院患者下肢DVT发生影响因素分析

Table 2 Analysis of influencing factors of DVT of lower limbs in elderly hospitalized patients

因素	β 值	S.E.值	Wald/ χ^2 值	OR值	95%CI	P 值
年龄	1.513	0.374	16.363	4.540	2.179~9.458	<0.05
住院时间	1.753	0.325	29.092	5.772	3.241~10.278	<0.05
中心静脉置管	1.635	0.319	26.268	5.129	2.569~10.241	<0.05
APACHE II评分	1.689	0.362	21.761	5.412	3.125~9.374	<0.05
FIB	1.712	0.358	22.881	5.543	2.987~10.285	<0.05
APTT	1.706	0.314	29.512	5.506	3.254~9.316	<0.05

注:自变量赋值,年龄60~70岁=1,>70岁=2;住院时间 $\leq 28 \text{ d}$ =1,>28 d=2;中心静脉置管为PICC/静脉输液港=1,普通置管=2;APACHE II评分、FIB、APTT水平以平均值为界, $\leq$ 平均值=1,>平均值=2

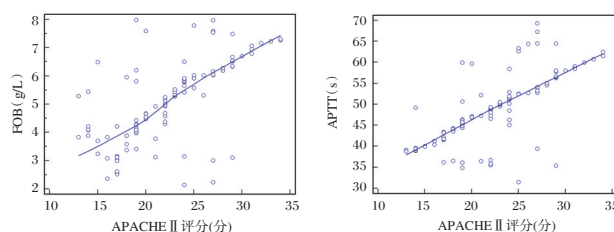


图1 FIB、APTT与APACHE II评分相关性

Figure 1 FIB, APTT and APACHE score correlation

任一指标单独诊断,联合诊断的最佳敏感度、特异度分别为84.37%、75.00%。见表3、图2。

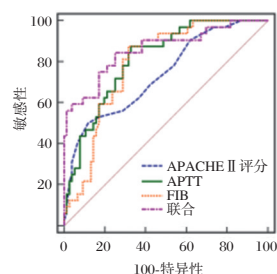


图2 FIB、APTT诊断老年住院患者下肢DVT的ROC

Figure 2 ROC of FIB and APTT in diagnosis of DVT of lower limbs in elderly hospitalized patients

3 讨论

近年来,我国人口老龄化逐渐增加,老年住院患者人数随之升高,老年住院患者活动量较少,且多患有其他基础疾病,部分患者长期卧床导致下肢血流

表3 FIB、APTT水平对老年住院患者下肢DVT的诊断价值分析

Table 3 Analysis of the diagnostic value of FIB and APTT levels in elderly hospitalized patients with DVT of lower limbs

指标	AUC	95%CI	Z统计	截断值	敏感度(%)	特异度(%)	P 值
APACHE II评分(分)	0.737	0.634~0.841	4.485	>25	50.00	88.16	<0.001
FIB(g/L)	0.790	0.705~0.875	6.681	>5.35	87.48	68.42	<0.001
APTT(s)	0.813	0.732~0.895	7.519	>49.43	87.50	67.11	<0.001
联合诊断	0.859	0.775~0.942	8.404	—	84.37	75.00	<0.001

注:“—”表示联合诊断无法获取截断值

减慢,易造成血液高凝状态而引起下肢DVT^[8]。本研究发现,老年住院患者存在一定下肢DVT发生率,低于郭爱霞^[9]报道的28.00%,本研究中下肢DVT患者患病部位主要为左下肢,与文献报道^[10]一致。可见下肢DVT在老年住院患者中具有较高发生率,尤以左下肢发生率较高,应给予足够重视。

本研究发现患者的年龄、住院时间、中心静脉置换类型、APACHE II评分、FIB、APTT水平为老年住院患者发生下肢DVT的危险因素。笔者认为,随着年龄的增加,患者血管老化加重,血液粘稠度增加,导致下肢血液循环障碍加重。因此下肢DVT发生风险随着老年住院患者年龄的增加而升高。而长期住院的患者活动量明显减少,导致下肢血流减慢,增加下肢DVT发生风险^[11]。与PICC、静脉输液港相比,普通置管需反复进行穿刺,可加重血管内皮损伤,刺激并激活凝血系统启动,间接影响下肢血液循环,增加下肢DVT发生率^[12]。APACHE II评分是反映患者疾病严重程度的量化指标,其分值越高表示患者病情程度越严重,而病情加重可增加凝血功能异常^[13]。因此APACHE II评分越高老年住院患者发生下肢DVT风险越大。FIB是由肝脏合成的凝血因子,和其他20多种凝血因子在需要时一起被释放到血液循环系统中,其水平升高可促进凝血功能障碍,缩短凝血时间,增加血栓形成风险,促进下肢DVT发生^[14]。APTT是反映内源性凝血是否正常的敏感性指标,其水平异常提示机体凝血功能发生障碍,从而导致下肢DVT发生^[15]。因此对于存在上述危险因素的老年住院患者,应积极评估下肢DVT发生风险,针对性开展早期预防措施,以降低下肢DVT发生风险。

本研究表明,发生下肢DVT的老年住院患者FIB、APTT水平均与APACHE II评分呈正相关。陈方榕^[16]通过对老年慢性心力衰竭合并重症肺炎患者的研究,发现患者凝血功能与APACHE II评分密切相关,支持本研究结果。基于以上结果,本研究进一步采用ROC曲线分析发现,FIB、APTT、APACHE II评分对诊断老年住院患者下肢DVT具有良好诊断效能,尤其是联合诊断的AUC达0.859,可为临床诊断老年住院患者下肢DVT提供更准确信息。因此FIB、APTT、APACHE II评分联合可为临床诊断提供更全面信息,从而改善诊断效能。

综上可知,FIB、APTT水平明显升高可增加老年住院患者下肢DVT发生风险,二者水平与患者病情严重程度呈正相关,且在诊断下肢DVT方面具有

一定价值,早期检测FIB、APTT水平可为老年住院患者下肢DVT的诊断、治疗提供重要数据参考。但本研究存在样本量较少的不足,研究结果可能存在一定偏倚,有待通过大样本研究进一步验证。

参考文献

- [1] 公茂峰,陈国平,顾建平,等.老年急性下肢深静脉血栓形成患者腔内综合治疗的研究[J].中华老年医学杂志,2019,38(10):1137-1141.
- [2] Guo X, Zhang F, Wu Y, et al. Coagulation Alteration and Deep Vein Thrombosis in Brain Tumor Patients During the Perioperative Period [J]. World Neurosurg, 2018, 114 (1): e982-e991.
- [3] Jackson BS, Pretorius E. Pathological Clotting and Deep Vein Thrombosis in Patients with HIV [J]. Semin Thromb Hemost, 2019, 45(2): 132-140.
- [4] Wang F, Huang L, Tang H, et al. Significance of glomerular fibrinogen deposition in children with Henoch-Schönlein purpura nephritis [J]. Ital J Pediatr, 2018, 44(1): 97.
- [5] 杨兵,冉新胜.凝血酶原时间和活化部分凝血活酶时间测定的应用研究[J].血栓与止血学,2020,26(1):102-103.
- [6] 李晓强,张福先,王深明.深静脉血栓形成的诊断和治疗指南(第三版)[J].中华普通外科杂志,2017,32(9):807-812.
- [7] Martos-Benítez FD, Cordero-Escobar I, Soto-García A, et al. APACHE II score for critically ill patients with a solid tumor: A reclassification study [J]. Rev Esp Anestesiol Reanim, 2018, 65(8): 447-455.
- [8] 刘芳,龚立超,杨亭,等.神经内科ICU老年患者下肢DVT的临床特点与护理[J].中华现代护理杂志,2019,25(25): 3195-3199.
- [9] 郭爱霞.空气波压力治疗仪联合集束化护理预防老年住院患者下肢深静脉血栓的效果[J].中西医结合护理(中英文),2017,3(9):152-154.
- [10] 何静,王军,杨涛.老年下肢深静脉血栓形成患者临床特征分析[J].临床误诊误治,2018,31(7):9-13.
- [11] 王勇飞.丹红注射液联合盐酸氟桂利嗪对下肢骨折术后长期卧床患者BPPV和DVT的防治作用[J].黑龙江医药科学,2020,43(1):109-110,112.
- [12] 童洁,林晓菲,孙文瑞,等.肿瘤科化疗患者深静脉置管术后深静脉血栓的临床特点及危险因素分析[J].全科医学临床与教育,2019,17(7):644-645,648.
- [13] 陈娟,梁子辉,田勇.急性重症创伤患者急性生理学与健康状况评分II及凝血指标对预后判断意义[J].创伤与急危重病医学,2018,6(6):378-380.
- [14] Cheng J, Fu Z, Zhu J, et al. The predictive value of plasminogen activator inhibitor-1, fibrinogen, and D-dimer for deep venous thrombosis following surgery for traumatic lower limb fracture [J]. Ann Palliat Med, 2020, 9(5): 3385-3392.
- [15] 贾利敏,赵翠,魏迪,等.膜性肾病患者Angpt14、CTLA-4及维生素D检测与凝血功能的相关性[J].分子诊断与治疗杂志,2020,12(3):362-365,375.
- [16] 陈方榕.老年慢性心力衰竭合并重症肺炎患者凝血功能变化及其临床意义[J].临床合理用药杂志,2019,12(18): 162-163.

肺部细菌感染与病毒感染 IL-33/ST2 信号通路活性变化及其鉴别诊断价值

胡金亮 王振 吴瑞红*

【摘要】目的 探究肺部细菌感染与病毒感染白细胞介素-33(IL-33)/基质裂解素2(ST2)信号通路活性变化及其鉴别诊断价值。**方法** 选取本院2018年3月至2020年6月126例肺部感染患者作为研究对象,分为细菌组(66例)、病毒组(60例),另选取同期健康体检者62例作为对照组。比较3组外周血单个核细胞(PBMC)中IL-33、可溶性ST2(sST2)mRNA、血清IL-33、sST2、炎症反应指标[C反应蛋白(CRP)、降钙素原(PCT)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)]水平,分析细菌组、病毒组上述指标与炎症反应相关性,评价上述指标对肺部感染及肺部细菌感染与病毒感染的鉴别诊断价值。**结果** 3组IL-33 mRNA、sST2 mRNA、血清IL-33、血清sST2水平比较结果:细菌组>病毒组>对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);3组CRP、PCT、TNF- α 比较结果:细菌组>病毒组>对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。细菌组、病毒组IL-33、sST2 mRNA、血清IL-33、sST2与血清CRP、PCT、TNF- α 呈正相关($P<0.05$);IL-33、sST2 mRNA、血清IL-33、sST2联合诊断肺部感染的AUC最大,为0.910,联合鉴别诊断肺部细菌感染与病毒感染的AUC最大,为0.860。**结论** IL-33 mRNA、sST2 mRNA、血清IL-33、sST2在肺部感染患者中呈高表达,与炎症因子水平呈正相关,上述指标联合检测对细菌感染、病毒感染具有良好鉴别诊断价值,可为临床诊治提供可靠参考依据。

【关键词】 肺部细菌感染;病毒感染;白细胞介素-33

Changes of IL-33/ST2 signal pathway activity in pulmonary bacterial infection and virus infection and its differential diagnosis value

HU Jinliang, WANG Zhen, WU Ruihong*

(The First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou, Henan, China, 450000)

【ABSTRACT】 Objective To explore the changes in the activity of interleukin-33 (IL-33)/stromal lysin 2 (ST2) signaling pathway and its differential diagnosis value in pulmonary bacterial infection and viral infection. **Methods** A total of 126 patients with lung infections in our hospital from March 2018 to June 2020 were selected as the research objects, and they were divided into the bacteria group (66 cases) and the virus group (60 cases). In addition, 62 patients with healthy physical examination during the same period were selected as the control group. The levels of IL-33, soluble ST2 (sST2) mRNA, serum IL-33, sST2, inflammatory response indicators [C-reactive protein (CRP), procalcitonin (PCT), and tumor necrosis factor- α (TNF- α)] in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in the three groups were compared. The correlation between the above indicators in the bacterial group and the viral group and inflammatory response was analyzed, and the value of the above indicators in differential diagnosis of pulmonary infection and pulmonary bacterial infection and viral infection was evaluated. **Results** The levels of IL-33, sST2 mRNA, serum IL-33, sST2, CRP, PCT and TNF- α in the bacterial group were higher than those in the virus group and the control group, and those in the virus group were higher than those in the control group ($P<0.05$). IL-33, sST2 mRNA, serum IL-33, sST2 in the

基金项目:河南省科技厅科技攻关项目(182102310927)

作者单位:河南中医药大学第一附属医院呼吸科,河南,郑州 450000

*通信作者:吴瑞红, E-mail: wrhwrh@yeah.net

bacterial group and the virus group were positively correlated with serum CRP, PCT and TNF- α ($P<0.05$). The AUC of IL-33, sST2 mRNA, serum IL-33, and sST2 was the largest in the combined diagnosis of pulmonary infection, 0.910. The AUC of combined diagnosis and differential diagnosis of pulmonary bacterial infection and viral infection was the largest, 0.860. **Conclusion** IL-33 mRNA, sST2 mRNA, serum IL-33, sST2 are highly expressed in patients with pulmonary infection, and are positively correlated with the level of inflammatory factors. The combined detection of the above indicators has a good differential diagnosis value for bacterial infection and viral infection and can provide a reliable reference for clinical diagnosis and treatment.

[KEY WORDS] Pulmonary bacterial infection; Viral infection; Interleukin-33

肺部感染指不同病原体或其他因素引起的肺部炎症,包括细菌、病毒、肺炎支原体等^[1]。据统计,肺部感染约影响全球7%的人口,每年约400万人因罹患肺部感染死亡,巨大疾病引起全球广泛关注^[2]。以往临床诊断鉴别肺部感染主要根据临床特征、痰标本及影像学检查等,但上述诊断鉴别方式耗时较长,不利于指导临床早期恰当选用治疗药物。既往研究指出,白细胞介素-33(IL-33)/基质裂解素2(ST2)信号通路可在多种感染性疾病中发挥多效性作用,其作用主要取决于感染阶段、病原体种类等^[3]。但目前IL-33/ST2信号通路活性变化在肺部感染患者具体作用尚不十分清楚,仍待进一步研究。本研究初次尝试分析肺部细菌感染与病毒感染IL-33/ST2信号通路活性变化及其鉴别诊断价值,以期对疾病诊疗提供新的思路,具体分析如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取本院2018年3月至2020年6月126例肺部感染患者作为研究对象,其中细菌感染患者66例作为细菌组,病毒感染患者60例作为病毒组,另选取同期健康体检者62例作为对照组。对照组男29例,女33例,平均年龄(43.65 ± 10.03)岁;细菌组男32例,女34例,平均年龄(44.56 ± 9.48)岁;病毒组男27例,女33例,平均年龄(43.09 ± 11.26)岁。3组性别、年龄比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

纳入标准:①符合《肺部感染性疾病支气管肺泡灌洗病原体检测中国专家共识(2017年版)》中肺部感染诊断标准^[4];②近1个月内未接受过免疫抑制剂或其他影响本研究结果药物;③临床资料完整。排除标准:①病毒性肺炎;②非典型病原体肺炎;③伴有肺部基础病,如支气管扩张、慢性支气管炎;④合并自身免疫系统疾病;⑤非感染性肺间质性疾病;⑥合并肺部肿瘤;⑦肺嗜酸性粒细胞

浸润症;⑧伴有结缔组织疾病;⑨合并肺心病或心律失常等。

1.2 炎症反应指标及IL-33、sST2检测方法

对照组于体检当天采集空腹外周静脉血3 mL,研究组于治疗前采集空腹外周静脉血3 mL,以半径8 cm、转速3 000 r/min,离心15 min,取上层血清,采用电化学发光法测定降钙素原(PCT)水平,试剂盒由北京百奥莱博科技有限公司提供;采用双抗体夹心ELISA法测定C反应蛋白(CRP)水平,试剂盒由南京北鱼生物科技有限公司提供;采用酶联免疫吸附试验测定肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、IL-33、sST2水平,试剂盒分别购自武汉博迪莱莎生物科技有限公司、上海哈灵生物科技有限公司、上海梵态生物科技有限公司。

1.3 IL-33mRNA、sST2mRNA 检测方法

采集所有研究对象静脉血5 mL,具体采集方法同上,留置于K2 EDTA抗凝管,采用Ficoll梯度离心法分离外周血单个核细胞(PBMC),利用Trizol方法进行RNA提取,RNA反转得到cDNA,进行PCR扩增,采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法对扩增结果行相对定量分析。

1.4 观察指标

①比较3组IL-33、sST2 mRNA、血清IL-33、sST2水平。②比较3组炎症反应指标(CRP、PCT、TNF- α)水平。③分析细菌组、病毒组IL-33、sST2 mRNA、血清IL-33、sST2与炎症反应相关性。④IL-33、sST2 mRNA、血清IL-33、sST2对肺部感染诊断价值。⑤IL-33、sST2 mRNA、血清IL-33、sST2对肺部细菌感染与病毒感染的鉴别诊断价值。

1.5 统计学分析

采用统计学软件SPSS 19.0处理数据,计数资料以 $n(\%)$ 描述,用 χ^2 检验;呈正态性分布的计量资料用($\bar{x}\pm s$)描述,两组间比较用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析;相关性分析采用Pearson相关系数模型;预测效能分析采用受试者工作特征(ROC)曲线,获取曲线下面积不同预测方案间

曲线下面积比较采用 DeLong 检验,联合诊断实施 Logistic 二元回归拟合,返回预测概率 $\text{logit}(p)$,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3组 *IL-33*、*sST2* mRNA、血清 *IL-33*、*sST2* 水平

3组 *IL-33* mRNA、*sST2* mRNA、血清 *IL-33*、血清 *sST2* 水平比较结果:细菌组>病毒组>对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表1。

表1 3组 *IL-33*、*sST2* mRNA、血清 *IL-33*、*sST2* 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of *IL-33*, *sST2* mRNA, serum *IL-33*, *sST2* levels in the 3 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	<i>IL-33</i> mRNA	<i>sST2</i> mRNA	血清 <i>IL-33</i> (ng/L)	血清 <i>sST2</i> (ng/mL)
细菌组	66	2.25±0.30	2.02±0.18	1230.76±404.87	21.79±6.02
病毒组	60	1.47±0.22	1.28±0.14	775.29±253.06	15.93±5.14
对照组	62	0.92±0.11	0.96±0.10	162.31±51.02	6.87±2.20
<i>F</i> 值		561.273	908.112	232.345	158.050
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

2.2 3组炎症反应指标水平

3组 CRP、PCT、TNF- α 比较结果:细菌组>病毒组>对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表2。

表2 3组炎症反应指标水平 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Levels of inflammatory response indicators in the 3 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	CRP (mg/L)	PCT ($\mu\text{g/mL}$)	TNF- α (pg/mL)
细菌组	66	142.65±45.80	15.74±3.46	85.49±26.12
病毒组	60	52.77±17.32	2.63±0.81	20.51±6.80
对照组	62	1.94±0.61	0.08±0.02	2.30±0.37
<i>F</i> 值		391.592	1028.933	483.559
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001

表3 细菌组、病毒组 *IL-33*、*sST2* mRNA、血清 *IL-33*、*sST2* 与炎症反应相关性

Table 3 Correlation between *IL-33*, *sST2* mRNA, serum *IL-33*, *sST2* and inflammatory response in bacterial group and virus group

组别	指标	<i>IL-33</i> mRNA		<i>sST2</i> mRNA		血清 <i>IL-33</i>		血清 <i>sST2</i>	
		<i>r</i> 值	<i>P</i> 值	<i>r</i> 值	<i>P</i> 值	<i>r</i> 值	<i>P</i> 值	<i>r</i> 值	<i>P</i> 值
细菌组	CRP	0.721	<0.001	0.689	<0.001	0.745	<0.001	0.718	<0.001
	PCT	0.704	<0.001	0.645	<0.001	0.751	<0.001	0.706	<0.001
	TNF- α	0.675	<0.001	0.597	<0.001	0.704	<0.001	0.663	<0.001
病毒组	CRP	0.643	<0.001	0.702	<0.001	0.692	<0.001	0.708	<0.001
	PCT	0.521	<0.001	0.558	<0.001	0.594	<0.001	0.627	<0.001
	TNF- α	0.614	<0.001	0.623	<0.001	0.615	<0.001	0.710	<0.001

表4 *IL-33*、*sST2* mRNA、血清 *IL-33*、*sST2* 对肺部感染诊断价值

Table 4 Diagnostic value of *IL-33*, *sST2* mRNA, serum *IL-33* and *sST2* for pulmonary infection

指标	AUC	95%CI	Z 统计	截断值	敏感度 (%)	特异度 (%)	<i>P</i> 值
<i>IL-33</i> mRNA	0.828	0.767~0.879	11.028	>1.46	73.81	88.71	<0.001
<i>sST2</i> mRNA	0.833	0.772~0.883	11.500	>1.32	73.81	79.03	<0.001
血清 <i>IL-33</i>	0.901	0.849~0.939	18.067	>634.65 ng/L	75.40	96.77	<0.001
血清 <i>sST2</i>	0.766	0.699~0.825	7.842	>13.82 ng/mL	62.70	80.65	<0.001
联合	0.910	0.859~0.946	20.498	—	74.60	98.39	<0.001

2.3 细菌组、病毒组 *IL-33*、*sST2* mRNA、血清 *IL-33*、*sST2* 与炎症反应相关性

Pearson 相关性分析,细菌组、病毒组 *IL-33*、*sST2* mRNA、血清 *IL-33*、*sST2* 与血清 CRP、PCT、TNF- α 呈正相关($P < 0.05$)。见表3。

2.4 *IL-33*、*sST2* mRNA、血清 *IL-33*、*sST2* 对肺部感染诊断价值

ROC 曲线分析,联合诊断的敏感度为 74.60%,特异度为 98.39%,AUC 面积为 0.910,比单一诊断值高($P < 0.05$)。见图1、表4。

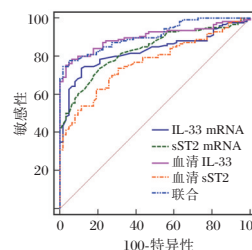


图1 *IL-33*、*sST2* mRNA、血清 *IL-33*、*sST2* 对肺部感染诊断价值

Figure 1 The diagnostic value of *IL-33*, *sST2* mRNA, serum *IL-33* and *sST2* in pulmonary infection

3 讨论

大量研究证实^[5-7]炎症反应在肺部感染发生、发展中发挥至关重要的作用。肺部感染患者在肺内和(或)肺外原因的作用下引起机体组织细胞炎症反应,进而诱发大量的 PCT、TNF- α 等炎性因子分泌,加重机体炎症反应^[8]。另一方面,氧自由基被大量释放,核因子- κ B 被激活,核因子- κ B 可增

加多种细胞因子及趋化因子基因表达,造成肺内中性粒细胞浸润,导致肺损伤发生,促进CRP、PCT、TNF- α 等炎性因子大量表达。故可见细菌性及病毒性肺部感染者CRP、PCT、TNF- α 水平呈高表达,且细菌性肺部感染者较为显著,同尤其等^[9]研究报道结果具有一致性。这一结果可能与细菌感染早期细菌内毒素大量释放,刺激肺泡细胞及巨噬细胞有关,致使血清CRP、PCT、TNF- α 水平显著升高。

IL-33属于IL-1家族,为炎症反应和免疫反应重要调节因子之一,于2005年证实其为ST2配体^[10-11]。有研究指出^[12],IL-33/sST2信号通路参与机体免疫反应和炎症反应调控,但其在肺部感染中的具体作用尚不清楚,本研究就此展开探讨。本研究数据显示,细菌性及病毒性肺部感染者IL-33、sST2 mRNA及血清IL-33、sST2水平呈高表达,与姜纯杰等^[13]研究结果相似。正常情况下,IL-33存在于细胞核中,发挥转录抑制作用,细胞受损时IL-33可分泌至细胞外,通过结合受体ST2传递信号,发挥免疫调节作用,IL-33通过促进适应性免疫应答、固有免疫应答参与炎症发生,在炎症早期即可产生,同时还可放大炎症反应。Qi等^[14]报道指出,应用TLR7激动剂与呼吸道合胞病毒感染的肺吞噬细胞、树突状细胞共同体外培养,可见细胞内IL-33 mRNA表达均增加。此外,受细菌性肺炎起病急、进展快及细菌性肺炎肺组织损伤等因素影响,细菌性肺部感染者IL-33、sST2 mRNA及血清IL-33、sST2水平较病毒性肺部感染者高。

细菌组、病毒组IL-33、sST2 mRNA、血清IL-33、sST2与血清CRP、PCT、TNF- α 呈正相关,对其具体机制进行探究,IL-33/sST2信号通路在病毒感染中可引起I/II型免疫反应,IL-33与跨膜型ST2结合可活化Th2细胞,激活核因子- κ B、有丝分裂激活蛋白激酶信号通路,促进炎症细胞因子分泌^[15]。IL-33/sST2信号通路在细菌感染中可促进中性粒细胞募集,提高杀菌活性,IL-33/sST2信号通路位于Toll样受体(TLRs)下游,能特异性识别不同细菌病原体,促进机体炎症反应,IL-33水平越高,机体炎症反应程度越严重,而ST2与机体炎症因子呈正相关,可能是由于机体代偿性分泌,进而负向调节IL-33/sST2介导的炎症反应,但具体作用机制尚需进一步研究证实。

综上所述,IL-33 mRNA、sST2 mRNA、血清IL-33、sST2对肺部感染及感染类型具有良好鉴别诊断价

值,IL-33/sST2信号通路有望成为临床治疗细菌感染、病毒感染新靶点。

参考文献

- [1] 王曦,苑群,黄莎,等.氧化应激失衡在慢性阻塞性肺疾病急性加重期中的作用及其机制研究[J].实用心脑血管病杂志,2020,28(12):64-70.
- [2] Curran CS, Bolig T, Torabi-Parizi P. Mechanisms and Targeted Therapies for *Pseudomonas aeruginosa* Lung Infection [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2018, 197(6): 708-727.
- [3] 陈家君,冯净净,揭志军. IL-33/sST2轴在呼吸道病毒感染免疫中的作用[J]. 国际呼吸杂志, 2016, 36(17): 1329-1333.
- [4] 中华医学会呼吸病学分会. 肺部感染性疾病支气管肺泡灌洗病原体检测中国专家共识(2017年版)[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2017, 40(8): 578-583.
- [5] 王月平,尹飞飞,赵国厚,等. IL-6、LDH、D-二聚体水平对恙虫病合并肺部感染患者的临床意义[J]. 热带医学杂志, 2020, 20(5): 687-691.
- [6] 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.
- [7] 王军锋. 血清IL-6、IL-8、IL-10、TNF- α 检测结果对预防儿童肺炎支原体肺炎的临床意义[J]. 华南预防医学, 2017, 43(1): 83-85.
- [8] 贾全林. 慢性阻塞性肺疾病患者血清PCT、IL-6、TNF- α 、CRP水平与肺功能的关系[J]. 中国实用医刊, 2018, 45(24): 23-26.
- [9] 尤其,黄支密,郭辉,等. 炎性指标与血常规对病毒和细菌性肺炎患者鉴别诊断及并发症预测中的作用[J]. 中华医院感染学杂志, 2018, 28(9): 1342-1344.
- [10] 隗世波,刘青云,钟群琼. IL-33/sST2信号通路在急性呼吸窘迫综合征患者中的表达变化及意义研究[J]. 临床急诊杂志, 2019, 20(4): 302-306.
- [11] Tsurikisawa N, Oshikata C, Watanabe M, et al. Innate immune response reflects disease activity in eosinophilic granulomatosis with polyangiitis[J]. Clin Exp Allergy, 2018, 48(10): 1305-1316.
- [12] Altara R, Ghali R, Mallat Z, et al. Conflicting vascular and metabolic impact of the IL-33/sST2 axis[J]. Cardiovasc Res, 2018, 114(12): 1578-1594.
- [13] 姜纯杰,关飞,雷家慧. IL-33/sST2信号通路在感染性疾病中的研究进展[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2018, 36(3): 308-314.
- [14] Qi F, Wang D, Liu J, et al. Respiratory macrophages and dendritic cells mediate respiratory syncytial virus-induced IL-33 production in TLR3- or TLR7-dependent manner[J]. Int Immunopharmacol, 2015, 29(2): 408-415.
- [15] Mehraj V, Jenabian MA, Ponte R, et al. The plasma levels of soluble ST2 as a marker of gut mucosal damage in early HIV infection[J]. AIDS, 2016, 30(10): 1617-1627.

一例HIV窗口期样本三种试管核酸检测结果分析

帅敏* 薛薇 黄超 邹晨 田智

【摘要】目的 通过对HIV窗口期样本三种类型真空采血管核酸检测结果的分析,探讨三种类型真空采血管样本对HIV窗口期样本核酸检测结果的影响。**方法** 分析一例2018年7月30日在马边县采集的无偿献血者三种类型真空采血管HIV窗口期样本的核酸检测结果。第一种是带分离胶抗凝真空采血管5℃低温离心20 min;第二种是带分离胶促凝真空采血管25℃常温离心10 min;第三种是抗凝真空采血管(无分离胶)25℃常温离心5 min。对3份样本进行核酸检测。后续完成该样本的病毒载量检测,由市CDC完成献血者追踪和重新采样进行HIV确认。**结果** 核酸检测结果是:第一种模式Ct值为32.4,第二种模式Ct值为32.69,第三种模式Ct值为32.76;病毒载量分析结果为 3.28×10^3 IU/mL;三个月后CDC重新采样确认为HIV阳性。**结论** 试管类型对HIV窗口期样本核酸检测结果影响较小,足量无溶血无脂血的三种类型试管的样本都可以用于核酸检测。

【关键词】 核酸检测; HIV; 窗口期; NAT

Analysis of NAT results of one HIV window period sample by three processing modes

SHUAI Min*, XUE Wei, HUANG Chao, ZOU Chen, TIAN Zhi

(Department of Clinical Laboratory, Leshan blood center, Leshan, Sichuan, China, 614000)

【ABSTRACT】Objective Objective to analyze the nucleic acid detection results of three types of vacuum blood collection in HIV window period samples, to investigate the effect of different treatment conditions of three types of vacuum blood collection samples on nucleic acid detection results of HIV window period samples. **Methods** To analysis of NAT results of HIV window samples processed in three different modes, three samples collected from a unpaid blood donor in Mabian County on July 30, 2018. The first mode is 5℃ cryogenic centrifugation 20-minute separation adhesive anticoagulant tube. The second mode is 25℃ normal temperature centrifugation 10-minute separation adhesive procoagulant tube. The third mode is 25℃ normal temperature centrifugation 5-minute anticoagulant tube (no separation adhesive). Three HIV window period samples to NAT simultaneous. After completing the Riral load test of the sample, completion of HIV confirmation experiment by CDC. **Results** The results of NAT 77 hours after sampling were as follows: The sample use first mode HIV RNA NAT result is 32.4, the second mode HIV RNA NAT result is 32.69, the third mode HIV RNA NAT result is 32.76. The HIV RNA viral load result is 3.28×10^3 IU/mL. three month later, CDC resample to completion of HIV confirmation expermentation is HIV positive. **Conclusion** Test tube type has little influence on NAT results of HIV window period sample, Sufficient and no hemolysis and fat free blood samples from all three types of test tubes can be used for nucleic acid detection.

【KEY WORDS】 NAT; HIV; Window period; NAT type

血液核酸扩增技术是一种高灵敏度的血液传染病检测技术,能显著缩短病毒感染检测“窗口期”,检出病毒变异及免疫静默的感染者,降低输血传播病毒的风险^[1]。自从血站实施核酸检测全

覆盖以来,不同试管类型、离心温度和离心时间对核酸检测结果的影响,尤其是对HIV核酸检测结果的影响尚不清楚。对HIV强阳性样本而言,无论如何处理核酸都能检测出来,讨论意义不大。只有

作者单位:乐山市中心血站检验科,四川,乐山 614000

*通信作者:帅敏, E-mail: 1253858683@qq.com

对 HIV 窗口期样本的核酸检测结果进行分析才能看出试管类型、离心温度和离心时间对 HIV 窗口期样本核酸检测结果的影响^[2]。目前这方面一直缺少相关实验数据的说明,这主要是由于 HIV 窗口期样本很难遇到。2018 年 8 月初,检验科检测出一例 HIV 窗口期样本(对拆分出的 HIV 反应性样本都按窗口期样本来对待,后期结果证明该样本为 HIV 窗口期样本),及时对同时留取的用三种类型真空采血管样本进行核酸检测,取得了相关检测数据,并及时完成对该样本的病毒载量检测。市疾控中心追踪三个月后再次采血进行 WB 确认实验,确认结果为 HIV 阳性^[3]。现将对该 HIV 窗口期样本的确认过程和三种不同处理模式的核酸检测结果进行回顾性分析,以探讨不同试管类型、离心温度和离心时间对 HIV 窗口期样本核酸检测结果的影响。

1 材料与方法

1.1 样本来源与处理

1.1.1 样本来源

2018年7月30日按操作规程采集的无偿献血者样本,留取三管样本,第一管为带分离胶促凝的酶免检测样本,第二管为带分离胶EDTA-K₂抗凝的核酸检测样本,第三管为EDTA-K₂抗凝的血型检测样本(无分离胶),每管都留取5 mL全血样本^[4]。

1.1.2 样本处理

采样后对三份样本进行离心。带分离胶促凝样本,离心参数 25℃,1 600 r/min,10 min;带分离胶 EDTA-K₂ 抗凝的核酸检测样本,离心参数 5℃,1 600 r/min,20 min;EDTA-K₂ 抗凝样本(无分离胶),离心参数 25℃,1 600 r/min,5 min^[5]。

1.2 仪器与试剂

KUBOT8420 常温离心机(日本,久保田商事株式会社)、ML-STAR8CH 全自动加样仪(瑞士,汉密尔顿)、FAME24/20 全自动酶联免疫分析仪(瑞士,汉密尔顿);DA3000、DA3500 核酸提取仪

(中山大学达安基因股份有限公司)、smart32 核酸提取仪(中山大学达安基因股份有限公司); AFD9600 PCR 扩增仪(杭州,安杰思)、ABI7500 PCR 扩增仪(美国,ABI公司)^[6]。

常规血清学检测试剂:索灵 HBsAg (批号 D557910 效期 20190205);新创 HBsAg (批号 2018045110 效期 20190426);Ortho 抗-HCV (批号 EXE285 效期 20181221);科华 抗-HCV (批号 201801021 效期 20190115);万泰 抗-TP (批号 N20180206 效期 20190131);新创 抗-TP (批号 2018017501 效期 20190102);万泰 HIV 检测试剂,批(号 I 20180205 效期 20190131);伯乐 HIV 检测试剂,(批号 7J0409 效期 20181121);科华 ALT 速率法试剂,(批号 20180112,效期 20190107);核酸检测试剂:中山大学达安股份有限公司,批号 2017003 效期,20181120;病毒载量检测试剂:中山大学达安股份有限公司,批号 2018004,效期 20190514 蛋白印迹检测试剂:MP Diagnostics HIV BIOT 2.2 人类免疫缺陷病毒(HIV1+2 型)抗体检测试剂盒(免疫印迹法),批号 AE8007,效期 20191101;检测膜批号 AB8C03049A,效期 20200301。

1.3 方法

对该献血者样本进行血清学检测、8 混样核酸检测,单样本拆分检测^[7]。确认该样本核酸检测结果为 HIV 阳性后,对同时留取的 3 种类型样本进行核酸单样本检测和 HIV 病毒载量检测。三个月后由 CDC 工作人员找到该献血者重新采集样本进行 WB 确认实验^[8]。

1.4 统计学分析

采用 SPSS Statistics17.0 进行统计学分析;对离心温度、离心时间与核酸检测结果进行双变量相关分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血清学检测结果

该样本 HBsAg、Anti-HCV、HIV-Ag/Ab、Anti-TP 血清学检测结果均为阴性,ALT 结果正常。见表 1。

表1 HIV窗口期样本血清学检测结果
Table 1 serological test results of HIV window period samples

[illegible]

2.2 核酸检测结果

确定该样本核酸检测拆分结果为反应性结果

后,第一时间马上对三种类型试管的样本进行核酸检测。见表2。

表2 HIV窗口期样本三种试管的核酸检测结果

Table 2 nucleic acid test results of three types test tubes of HIV window period samples

项目	试管2	试管2	试管2	试管1	试管3
混检/单检	8样本混检	单检	单检	单检	单检
有/无分离胶	有分离胶	有分离胶	有分离胶	有分离胶	无分离胶
抗凝/促凝	抗凝管	抗凝管	抗凝管	促凝管	抗凝管
第一次检测(Ct值)	34.07				
第二次检测(Ct值)		32.69			
第三次检测(Ct值)			32.40	32.69	32.76

2.3 蛋白质免疫印迹(WB)确认结果

病毒载量检测结果 HIV 阳性扩增,浓度为 3.28×10^3 IU/mL。市 CDC 三个月后找到该献血者再次采样进行 WB 确认实验, WB 确认结果为 HIV-1 抗体阳性,检出条带有 P24、gp41、P51、P66、gp120、gp160。见图1。

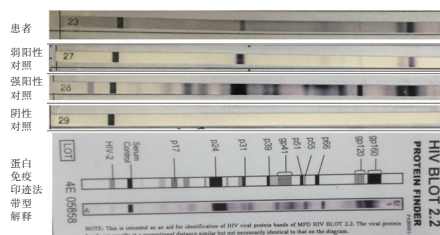


图1 WB 确认结果电泳图

Figure 1 Electrophoretogram of WB confirmation results

离心 5、10 和 20 min 的核酸检测结果比较,差异无统计学意义 ($P>0.05$)。离心温度 5℃ 和 25℃ 的核酸检测结果比较,差异无统计学意义 ($P>0.05$)。Ct 值的均值 $\bar{x}=32.62$, 标准差 $S=0.14$, 变异系数 $CV=0.44\%$, 极差为 0.36Ct 值。见表3。

表3 HIV窗口期样本三种类型试管不同处理条件核酸检测结果对比

Table 3 Comparison of nucleic acid detection results of three types of test tubes with different treatment conditions in HIV window period samples

试管类型	离心温度 (°C)	离心力 (r/min)	离心时间 (min)	保存温度 (°C)	核酸检测结果(Ct值)
抗凝管 (有分离胶)	5	1 600	20	2~8	32.4
促凝管 (有分离胶)	25	1 600	10	2~8	32.69
抗凝管 (无分离胶)	25	1 600	5	2~8	32.76
P 值	>0.05		>0.05		

3 讨论

通过对带分离胶抗凝、促凝和不带分离胶抗凝真空采血管 HIV 窗口期样本核酸检测结果的分析,了解三种类型真空采血管不同离心时间、不同离心温度对窗口期 HIV 样本核酸检测结果的影响。北京市血液中心的研究也表明“在不超过 30℃ 的采血环境中, NAT 标本的现场保存,只需要和采集的血液一样保存即可,并在 24 小时内离心处理,如此操作不会对 HBV、HCB、HIV-1 弱阳性标本 d2 的检测质量产生影响”^[2]。虽然北京血液中心的研究是在不同厂家生产的带分离胶抗凝真空采血管核酸检测结果之间进行,而本次的研究是在不同类型真空采血管核酸检测结果之间进行,但研究结果都表明用合适的条件处理核酸检测样本不会影响核酸检测的质量。

三种类型试管样本核酸检测 Ct 值的极差是 0.36, 足量、无溶血、无脂血的三种类型试管的样本都可以用于核酸检测。HIV RNA 的浓度在血浆和血清中差别很小;有无分离胶对 HIV 窗口期样本核酸检测结果影响很小,分离胶的主要作用是防止细胞破裂和溶血后对核酸检测的影响。足量无溶血的三种类型试管的样本都可以用于核酸检测,能够解决核酸检测 5 mL 试管样本量在遇到拆分无效时面临的样本量不足的问题。混样检测需要的样本量在 150~300 μ L 之间,拆分样本量在 960~1 600 μ L 之间,正常的混样和拆分样本量仅需 5 mL,个别拆分无效的样本可以用 5 mL 带分离胶的促凝试管样本进行拆分。这样就不仅减少献血者血液的采集量,还减少 8 mL 真空采血管成本的支出,也有利于实验室样本管理体系的标准化。以京津冀地区 2018 年 14 个采供血机构检测数据显示,核酸混样检测有效批中 (下转第 436 页)

• 论 著 •

铜仁市育龄妇女耳聋基因突变检测结果分析

龙丽* 田松娅 雷星 罗霞

【摘要】目的 分析铜仁市各族育龄妇女耳聋基因携带情况。**方法** 选取2019年8月至2020年10月在本院进行产前检查的育龄妇女1 723例为研究对象,采用广东凯普生物科技有限公司提供的耳聋基因检测杂交试剂盒对各族育龄女性进行遗传性耳聋4个基因 *GJB2*、*SLC26A4*、*GJB3*、线粒体12SrRNA的21个突变位点筛查。**结果** 本次研究共检出耳聋基因携带者3.6%(62/1723)。4种单基因的携带率分别为 *GJB2* 基因携带者2.15%(37/1723); *SLC26A4* 基因携带者0.99%(17/1723); mtDNA 基因携带者0.35%(6/1723); *GJB3* 基因携带者0.11%(2/1723)。不同民族之间耳聋基因携带率比较差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 在铜仁市各族育龄妇女中进行常见耳聋基因筛查,并在产前对她们进行耳聋知识遗传咨询,能够有效降低聋儿出生率。

【关键词】 *GJB2*; *SLC26A4*; *GJB3*; 线粒体12SrRNA

Detection of deafness gene mutation in childbearing age women in Tongren City

LONG Li, TIAN Songya, LEI Xing, LUO Xia

(Department of Laboratory Medicine, Tongren people's Hospital, Tongren, Guizhou, China, 554300)

【ABSTRACT】 Objective To analyze the deafness genes carried by women of childbearing age in Tongren City. **Methods** 1723 women of childbearing age who had prenatal examination in our hospital were selected as the research objects, from August 2019 to October 2020. 21 mutation sites of *GJB2*, *SLC26A4*, *GJB3* and mitochondrial 12SrRNA were screened by using the deafness gene detection hybridization kit provided by Guangdong Kaipu Biotechnology Co., Ltd. **Result** 62 cases (3.6%) of deafness gene carriers were detected in this study. The carrying rates of *GJB2* gene, mitochondrial 12SrRNA gene mutation, *GJB3* gene mutation and *SLC26A4* gene were 2.15%, 0.35%, 0.11% and 0.99%, respectively. There was no significant difference in the carrying rate of deafness gene among different ethnic groups, and there was no significant difference in the type of deafness mutation among different ethnic groups ($P>0.05$). **Conclusion** Carrying out common deafness genetic screening among women of childbearing age in Tongren City and conducting genetic counseling on deafness knowledge before delivery can effectively reduce the birth rate of deaf children.

【KEY WORDS】 *GJB2*; *SLC26A4*; *GJB3*; Mitochondrial 12SrRNA

重度听力损失是最常见的先天性疾病之一,在出生时约有1/1 000的新生儿出现^[1]。2006年第二次全国残疾人抽样调查结果显示:我国听力残疾者高达2 780万,占残疾人总数的33%,其中7岁以下的听力残疾儿童高达80万人,并以每年3.5万聋儿的速度增长,很大部分为先天性耳聋^[2]。这些患儿的出生给家庭及社会造成很大的不幸和沉重的负担。统计数据显示:约60%的耳聋属于遗传性耳

聋。正常群体中携带耳聋基因的比例高达5%~6%^[3],因此耳聋发病率一直居高不下。如何预知这些先天性耳聋患儿的出生,是在产前检查过程中需要解决的问题。遗传性耳聋基因 *GJB2*、*SLC26A4* 及线粒体基因(mtDNA12SrRNA)和 *GJB3* 的突变是导致大部分遗传性耳聋发生的主要突变基因。本次研究主要探讨铜仁市各族育龄妇女中4个常见遗传性耳聋基因的分布情况。

作者单位:铜仁市人民医院检验科,贵州,铜仁 554300

*通信作者:龙丽, E-mail:524847462@qq.com

1 对象与方法

1.1 研究对象

选取2019年8月至2020年10月在本医院进行产前检查的各族育龄妇女1 723例为研究对象,年龄17~47岁,平均年龄(28.30 ± 2.15)岁。其中汉族628例,400例苗族,469例土家族及226例侗族孕妇。所有研究对象均知情同意。

1.2 研究方法

1.2.1 血液标本采集

按照采血标准操作流程采取受检者外周血3~5 mL,加入乙二胺四乙酸二钠(EDTA)抗凝的采血管,4℃冰箱保存血样。

1.2.2 血液基因组DNA提取

DNA提取试剂盒使用广东凯普科技生物有限公司提供的离心柱提取试剂盒。具体步骤按照说明书进行。

1.2.3 PCR扩增

扩增试剂由广东凯普科技生物有限公司提供的扩增试剂盒,扩增程序为95℃ 15 min,97℃ 50 s、60℃ 60 s、72℃ 120 s共35个循环,72℃ 10 min。

1.2.4 扩增产物杂交

PCR产物95℃变性10 min,立即浸入冰水混合物中冰浴3 min。按要求放好配件,铺好杂交膜条,预杂交45℃ 2 min以上;开泵,排杂交液;杂交清洗3~4次;加入封阻液,封阻;加酶标液0.5 mL;溶液A清洗四次;加显色液0.5 mL,显色6 min;加杂交液0.8 mL,清洗3次;加蒸馏水清洗晾干。

1.2.5 结果判读

①空白对照:不出现蓝紫色斑点。②正常样本:在生物素点及所有正常探针处出现蓝紫色斑点。③阳性样本:正常探针及对应的突变探针位点都出现蓝紫色斑点,为该位点的杂合突变或杂合缺失;突变探针位点出现蓝紫色斑点,而对应的正常

探针位点没有出现蓝紫色斑点,为该位点的纯合突变或纯合缺失。④其它:若某个检测位点的正常探针和突变探针都未出现蓝紫色斑点,可能是该检测位点出现新的突变类型,建议做进一步的分析,如测序等。

1.3 统计学方法

使用SPSS 26.0统计软件进行数据分析。计数资料用 $n(\%)$ 的形式表示,用卡方检验或Fisher检验方法。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 1 723例育龄妇女中检测出常见耳聋基因突变位点结果分析

本次研究共检出耳聋基因携带者3.6%(62/1723)。见表1、图1、图2。

表1 1 723例孕妇耳聋基因突变位点分布情况

Table 1 Distribution of deafness gene mutation sites in 1 723 pregnant women

基因型	突变位点	<i>n</i>	携带率 (%)	构成比 (%)
GJB2 基因突变	c.235delC 杂合突变	28	1.620	45.16
	c.176del16 杂合突变	1	0.058	1.61
	c.235delC 纯合突变	1	0.058	1.61
	c.109G>A	1	0.058	1.61
	c.299delCT 杂合突变	6	0.350	9.70
GJB3 基因突变	合计	37	2.15	59.67
	c.547G>A 杂合突变	1	0.058	1.61
	c.538C>T 杂合突变	1	0.058	1.61
	合计	2	0.110	3.22
mtDNA 基因突变	m.1494C>T 均质突变	1	0.058	1.61
	m.1555A>G 均质突变	4	0.230	6.45
	m.1555A>G 异质突变	1	0.058	1.61
	合计	6	0.350	9.70
SLC26A4 基因突变	IVS7-2A>G 杂合突变	14	0.810	22.58
	c.1229C>T 杂合突变	1	0.058	1.61
	c.2168A>G 杂合突变	2	0.116	3.22
	合计	17	0.990	27.42

2.2 不同民族之间的携带率比较分析

不同民族之间的携带率比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表2、图3。

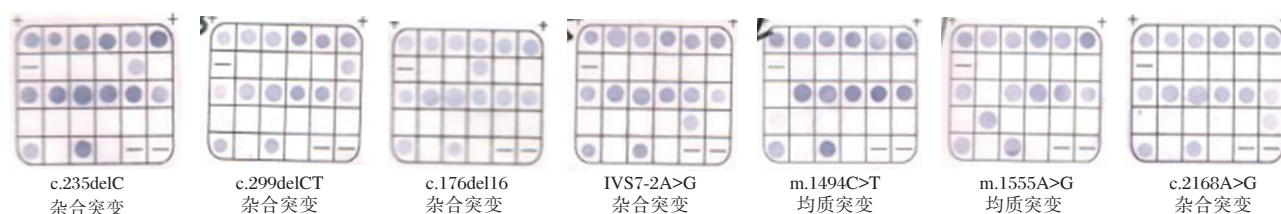


图1 常见耳聋基因突变位点

Figure 1 Common deafness gene mutation sites

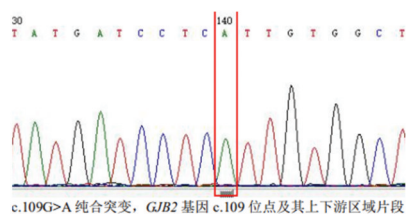


图2 耳聋少见基因突变位点测序结果

Figure 2 Sequencing results of rare deafness gene mutation sites

表2 不同民族之间的携带率比较结果 [n(%)]

Table 2 Comparison results of carrying rate among different nationalities [n(%)]

民族	n	携带者	χ^2 值	P值
侗族	226	3(1.33)	4.180	0.243
汉族	628	26(4.14)		
苗族	400	14(3.50)		
土家族	469	19(4.05)		

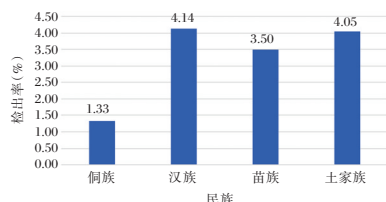


图3 不同民族之间的携带率比较柱状图

Figure 3 Bar chart of comparison of carrying rate among different nationalities

2.3 不同民族之间的突变类型比较分析

不同民族之间的主要耳聋基因突变类型比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表3。

表3 不同民族之间的常见突变类型比较 [n(%)]

Table 3 Comparison of common mutation types among different nationalities [n(%)]

民族	n	类型			χ^2 值	P值
		c.235delC 杂合突变	SLC26A4 >G 杂合突变	IVS7-1A 其他		
侗族	3	2(66.67)	0(0.00)	1(33.33)	7.586	0.230
汉族	26	8(30.77)	10(38.46)	8(30.77)		
苗族	14	8(57.14)	1(7.14)	5(35.71)		
土家族	19	11(57.89)	3(15.79)	5(26.32)		

3 讨论

耳聋依据是否伴有耳外组织的异常或病变可将其分为综合征性耳聋(SHL)和非综合征性耳聋(NSHL)^[4]。本次研究中耳聋基因的突变频率为3.6%,略低于张昊晴等的报道^[5]。GJB2基因编码的Cx26属于缝隙连接蛋白基因家族,与相邻细胞的缝连接蛋白组成一个完整的缝隙连接通道,这

些通道在信息传导和物质交换中起重要作用^[6]。GJB2基因突变方式复杂多变,目前已有140多种突变方式被报道^[7],其中显性突变9种,235delC是最常见的致病性突变^[8],纯合突变导致常染色体隐性遗传性耳聋,患者多为双耳重度耳聋,不仅纯合突变可以致聋,235delC和其他致病突变位于两条不同的染色体上形成双重杂合性突变时,也可以导致耳聋。本研究结果符合此前235delC为国内最常见基因突变的结论^[9]。

SLC26A4基因位于人类染色体7q31,含21个外显子,编码含有780个氨基酸的蛋白质Pendrin^[10]。Pendrin作为离子转运体,调节内淋巴液的离子平衡。SLC26A4基因IVS7-2A>G突变是中国大前庭导水管患者群的热点突变位点,15.23%的耳聋患者携带此突变,74.8%的大前庭导水管患者携带此突变^[11]。本次研究中SLC26A4的携带率为0.99%,其中IVS7-2A>G携带率为0.81%,是SLC26A4基因突变位点中最常见的类型。SLC26A4基因突变耳聋患儿出生时听力筛查一般表现为正常,易被忽视,携带者筛查是避免SLC26A4基因突变所致后天性遗传性耳聋出生缺陷发生的重要手段。

线粒体12SrRNA A1555G突变、C1494T突变等与氨基糖甙类药物导致的耳聋的发病密切相关^[12]。有此突变患者的线粒体12S核糖体的空间结构与氨基糖甙类药物作用的靶点更加相似,一旦接触氨基糖甙类药物就很容易与之结合,导致线粒体组织的破坏,最终引起药物性听力障碍的发生^[13]。本次研究中检测出突变位点为m.1494C>T和m.1555A>G,主要突变位点为m.1555A>G,共检出6例mtDNA耳聋基因携带者,mtDNA耳聋基因携带率为0.35%,低于此前储穆庭所作研究^[14]。本研究结果提示在育龄妇女中进行线粒体12SrRNA基因筛查,及时发现线粒体突变携带者,并对携带者及其所有母系家属进行宣教禁止使用氨基糖甙类药物,可以有效避免药物性耳聋的发生。

GJB3基因是1998年我国科学家夏家辉院士研究报道的第一个“本土基因”^[15],该基因538C>T位点的突变被认为与显性遗传高频听力下降有关。GJB3基因与GJB2基因虽然不在同一条染色体上,但都编码连接蛋白,在内耳离子平衡中发挥作用,按照双等位基因致聋的模式,有可能GJB2基因与GJB3基因共同导致耳聋患者的发病。如果GJB3基因c.538C>T杂合突变携带者与GJB2基因杂合

突变者婚配就可能导致下一代耳聋遗传病的发生。因此 GJB3 的突变频率在育龄妇女筛查中虽然不高,但其筛查也不能忽略。

此次在汉族,侗族,土家族,苗族育龄妇女中所做的研究与此前李琦,郭斌等^[16-17]所做研究结果有差别,这可能是由于本次研究所检测样本数量太少,抽样误差所致;也可能是不同地域和民族之间本身存在有差异。

我国是一个多民族大家庭,幅员广阔,各地区人群的遗传特点有很大的差异。因此,在不同地区和不同民族中,应结合当地耳聋基因的表现特征,制定出适合本地区的筛查策略及预防措施。同时由于基因检测技术的快速发展也积极推动了遗传性耳聋诊断的发展。在分子诊断技术的基础上结合地方实际情况建立适宜的遗传性耳聋基因筛查模式,才能实现降低遗传性耳聋出生缺陷的目标。

参考文献

- [1] 唐佳,曾钦龙,李秋丽,等. 广东江门地区 13725 例新生儿遗传性耳聋基因筛查结果分析[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2018, 10(4): 222-227.
- [2] 第二次残疾人抽样调查办公室. 全国第二次残疾人抽样调查主要数据手册[M]. 北京:北京华夏出版社, 2007: 2-38.
- [3] 戴朴. 重视中国聋人群中遗传性耳聋筛查和预防工作[J]. 中国听力语言康复科学杂志, 2008, 3(3): 10-10.
- [4] 李俎怡,何蓉. 339 例非综合征型耳聋患者致病基因突变分析[J]. 中华耳科学杂志, 2019, 17(6): 910-915.
- [5] 张昊晴,李彩云,侯帅,等. 郴州市 11055 名育龄女性常见

遗传性耳聋基因筛查结果分析[J]. 中华耳科学杂志 2020, 18(2): 342-347.

- [6] 刘慧茹,叶碧珍,魏转弟. GJB2 基因突变在长岛型掌跖角化病发病中的作用[J]. 安徽医药, 2020, 24(1): 118-123.
- [7] 崔庆佳,黄丽辉. GJB2 基因突变与听力损失的关系[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2013, 27(19): 1099-1102.
- [8] 王玮,段程颖,汪宪平,等. 耳聋基因 GJB2 的突变分析及其与临床相关性的研究[J]. 复旦学报:自然科学版, 2009, 48(1): 148-152.
- [9] 郭畅,蒋刘,黄莎莎,等. GJB2 235delC 纯合突变致聋患者的听力表型分析[J]. 中华耳科学杂志, 2018, 16(2): 165-170.
- [10] 许晖雁,袁永一,刘杰,等. SLC26A4 基因突变患者人工耳蜗植入效果分析[J]. 中华耳科学杂志, 2020, 18(2): 280-286.
- [11] 袁永一,王国建,黄德亮,等. 大前庭水管相关 SLC26A4 基因热点突变区域筛查方案探讨[J]. 中华耳科学杂志, 2010(3): 292-295.
- [12] 李琼,梁鹏飞,王淑娟,等. 183 个耳聋高危家庭孕前致聋基因变异分析及遗传咨询[J]. 中华耳科学杂志, 2020, 18(3): 481-488.
- [13] 赵辉. 母系遗传药物性聋与非综合征性聋的分子遗传机制与功能研究[D]. 中国人民解放军军医进修学院, 2005.
- [14] 储穆庭. 沈阳地区孕妇常见耳聋基因突变位点筛查及临床意义[J]. 临床军医杂志, 2019, 47(3): 294-296.
- [15] Xia JH, Liu CY, Tang BS, et al. Erratum: Mutations in the gene encoding gap junction protein β -3 associated with autosomal dominant hearing impairment [J]. Nat Genet, 1998, 20(4): 370-373.
- [16] 李琦,戴朴,黄德亮,等. SLC26A4 基因 IVS7-2A>G 突变在中国不同地区和民族重度感音聋患者中分布频率的观察[J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2007, 42(12): 893-897.
- [17] 郭斌,张英. 青海地区先天性汉、藏、回族聋儿常见耳聋基因突变情况[J]. 中国高原医学与生物学杂志, 2017, 38(2): 98-102.

(上接第 432 页)

pool 的无效率为 0.2% (244/123697pool)^[4],按 6 样本混样计算约 74 万份样本中只有 1 464 份样本需要重新检测,而这其中只有拆分无效的样本才需要用到第二份 5 mL 试管的样本。采用三种类型试管互备核酸检测和酶免检测的模式,可以节约大量采购 8 mL 真空采血管的成本。

由于 HIV 窗口期样本很难遇到,所以数据量较小,以上分析只是该例 HIV 窗口期样本的分析结果。

参考文献

- [1] 任芙蓉. 实施血液病毒核酸检测策略的相关问题探讨[J]. 中国输血杂志, 2010, 23(1): 1-3.
- [2] 姚凤兰,陈瑜,汪德海,等. 标本保存温度、时间和不同采血管对核酸检测结果的影响[J]. 中国输血杂志, 2012, 25(6): 530-533.

- [3] 彭亚柏,朱秀云,刘赛云,等. 不同基因型 HCV 感染患者重叠 HBV 或 HIV 感染的病毒学特征[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(7): 861-863+886.
- [4] 国家卫生健康委员会. 血站技术操作规程(2019 版). 国卫医函[2019]98 号[S]. 2019.
- [5] 韩卫,张慧贤,王艳彬,等. 京津冀血站血液检测前标本质量控制情况调查分析[J]. 中国输血杂志, 2018, 31(10): 1110-1113.
- [6] 戎国栋,赵鸿,吴蕾,等. 全自动核酸提取检测仪选择和评价方案的建立和应用[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2019, 11(3): 233-237.
- [7] 杜荣松,王湜,梁浩坚,等. 血液核酸检测试剂 UltrioPlus 与 Ultrio 检测结果分析及血液检测模式的探讨[J]. 中国输血杂志, 2018, 31(2): 137-140.
- [8] 李维,尹丹,毕蕾静,等. 献血者 HIV RNA 窗口期标本的追踪和随访[J]. 中国输血杂志, 2017, 30(6): 611-614.

· 论 著 ·

吸烟介导的COPD呼吸道微生态失调对Treg/Th17失衡的影响

王辉¹ 叶彩虹² 马焕丽¹ 孙俊生³ 陈斯亮¹ 张韶斌^{1*}

[摘要] 目的 探究吸烟介导的慢性阻塞性肺疾病(COPD)患者呼吸道微生态失调对调节性T细胞(Treg)/辅助性T细胞17(Th17)免疫失衡的影响。方法 选取本院30例COPD患者、30例肺功能正常者作为研究对象,根据吸烟、肺功能情况分为吸烟COPD组(15例)、吸烟肺功能正常组(15例)、不吸烟COPD组(15例)、不吸烟肺功能正常组(15例)。比较4组一般资料包括(性别、年龄、BMI)、外周血、BAL中Treg/Th17、中性粒细胞、单核细胞、血清与BAL上清中白介素-10(IL-10)、IL-35、IL-17、IL-6、IL-8水平,评价吸烟、肺微生态菌群、Treg/Th17免疫失衡之间相关性。结果 4组ACE指数、Chao指数、Shannon指数、外周血、BAL中Treg细胞、Treg/Th17比例及血清、BAL上清IL-35比较:吸烟COPD组<不吸烟COPD组<吸烟肺功能正常组<不吸烟肺功能正常组($P<0.05$),Simpson指数、Th17细胞、中性粒细胞、单核细胞及血清、BAL上清IL-17、IL-6、IL-8、IL-10比较:吸烟COPD组>不吸烟COPD组>吸烟肺功能正常组>不吸烟肺功能正常组,差异均有统计学意义($P<0.05$);吸烟与肺部菌群ACE指数、Chao指数、Shannon指数、外周血、肺泡灌洗液(BAL)中Treg细胞、Treg/Th17比例呈负相关,与Simpson指数、外周血、BAL中Th17细胞呈正相关($P<0.05$);肺部菌群ACE指数、Chao指数、Shannon指数与外周血、BAL中Treg细胞、Treg/Th17比例呈正相关,与Th17细胞呈负相关,Simpson指数与外周血、BAL中Treg细胞、Treg/Th17比例呈负相关,与Th17细胞呈正相关($P<0.05$)。结论 吸烟介导的COPD患者呼吸道微生态失调与Treg/Th17免疫失衡密切相关,吸烟-肺微生态失调-肺免疫紊乱-炎症浸润可能是COPD的发病机制。

[关键词] 吸烟;呼吸道微生态;调节性T细胞;辅助性T细胞

The effect of smoking-mediated respiratory microecological disorder on Treg/Th17 imbalance in COPDWANG Hui¹, YE Caihong², MA Huanli¹, SUN Junsheng³, CHEN Siliang¹, ZHANG Shaobin^{1*}

[1. Department of Clinical Laboratory, Longgang Central Hospital, Shenzhen, Guangdong, China, 518116;
2. Shenzhen Mental Health Center (Shenzhen Kang Ning Hospital), Shenzhen, Guangdong, China, 518116;
3. Department of Respiratory Medicine, Longgang Central Hospital, Shenzhen, Guangdong, China, 518116]

[ABSTRACT] **Objective** To explore the effects of smoking-mediated chronic obstructive pulmonary disease (COPD) patients with respiratory tract microecological dysfunction on T regulatory cell (Treg)/T helper cell 17 (Th17) immune imbalance. **Methods** From September 2018 to June 2020 in our hospital, 30 COPD patients and 30 patients with normal pulmonary function were selected as the research objects. According to smoking and pulmonary function, they were divided into smoking COPD group (15 cases), smoking normal pulmonary function group (15 cases), non-smoking COPD group (15 cases), non-smoking normal pulmonary function group (15 cases). **Results** The ACE index, Chao index, Shannon index, Treg cells, Treg/Th17 ratio in

基金项目:深圳市科技计划项目(JCYJ20180305125804992)

作者单位:1. 广东省深圳市龙岗中心医院检验科,广东,深圳 518116

2. 深圳市精神卫生中心(深圳市康宁医院)检验科,广东,深圳 518116

3. 广东省深圳市龙岗中心医院呼吸科,广东,深圳 518116

*通信作者:张韶斌, E-mail: 13923856280@139.com

peripheral blood and BAL, and IL-35 in the serum and BAL supernatant in the smoking COPD group <non-smoking COPD group <smoking normal pulmonary function group <non-smoking normal pulmonary function group. Simpson index, Th17 cells, neutrophils, monocytes, IL-17, IL-6, IL-8, IL-10 in serum and BAL supernatant of smoking COPD group>non-smoking COPD group >smoking normal pulmonary function group >non-smoking normal pulmonary function group ($P<0.05$). Smoking was negatively correlated with the ACE index, Chao index, Shannon index, Treg cells and Treg/Th17 ratio in peripheral blood and the alveolar lavage fluid (BAL), and positively correlated with Simpson index, and Th17 cells in peripheral blood and BAL ($P<0.05$). The ACE index, Chao index and Shannon index of the lung flora were positively correlated with Treg cells and Treg/Th17 ratio in peripheral blood and BAL, and negatively correlated with Th17 cells. Simpson index was negatively correlated with the of Treg cells and Treg/Th17 ratio in peripheral blood and BAL, and positively correlated with Th17 cells ($P<0.05$). **Conclusion** Smoking-mediated respiratory tract microecological disorders in COPD patients are closely related to Treg/Th17 immune imbalance. Smoking-pulmonary microecological disorders-pulmonary immune disorders-inflammatory infiltration may be the pathogenesis of COPD.

[KEY WORDS] Smoking; Respiratory Microecology; T regulatory cell; T helper cell 17

慢性阻塞性肺疾病(Chronic obstructive pulmonary disease, COPD)为临床最常见呼吸系统疾病之一,资料显示,烟草烟雾是COPD的原发病因,尤其在高收入和中等收入国家,烟草烟雾是最大危险因素^[1-2]。相关研究指出,吸烟可显著增加COPD的发病率^[3]。相关动物学研究发现,香烟烟雾暴露可能通过改变下呼吸道菌群组成引起宿主下呼吸道免疫反应改变,从而导致或促进肺部疾病的发生^[4]。且有报道显示吸烟可通过影响稳定期COPD患者T细胞17(T helper cell 17, Th17)与调节性T细胞(T regulatory cell, Treg)细胞表达加重炎症反应,最终影响患者病情及治疗^[5]。基于此,本研究尝试探究吸烟介导的COPD患者呼吸道微生态失调对Treg/Th17免疫失衡的影响。报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取本院2018年9月至2020年6月30例COPD患者、30例肺功能正常者作为研究对象,均符合COPD诊断标准^[6]。第1s用力呼气肺活量/用力肺活量>70%为肺功能正常。根据吸烟、肺功能情况分为4组,本研究采用的吸烟定义:截至目前至少吸100只香烟,且至少每月1次,目前并未戒断。

纳入标准:①自主行为能力良好;②无沟通交流障碍;③无支气管哮喘及其他肺部疾病;④无肺部创伤史和手术史;⑤研究对象均知晓本研究,已签署同意书。排除标准:①恶性肿瘤患者;②自身免疫性疾病患者;③近三个月使用抗生素、免疫

抑制剂和激素者;④高血压、糖尿病等慢性疾病患者;⑤近3个月内有手术史、骨折史、严重创伤及感染性疾病史者;⑥血液系统疾病患者。

1.2 方法

所有研究对象均戒烟12 h,抽取清晨空腹状态下静脉血5 mL,抗凝处理后4℃保存备用。由高年资经验丰富医师采集肺泡灌洗液(Bronchoalveolar lavage, BAL)50 mL,4℃保存备用。①肺微生态菌群多样性检测: BAL离心处理(500 g, 4℃, 离心10 min)后采用反复冻融法裂解细菌,采用Qiagen DNA提取试剂盒(离子交换法)提取DNA,然后由荧光聚合酶链式反应法进行鉴定,采用454焦磷酸法对细菌16sRNA进行测序,最后采用定量见解微生物生态学(Quantitative Insights into Microbial Ecology, QIIME)法^[7]对16sRNA进行数据分析(包括ACE指数、Chao指数、Shannon指数、Simpson指数, ACE指数、Chao指数)。②外周血及BLA中细胞及因子检测:取血清与BAL上清,采用酶联免疫吸附法检测白介素-10(Interleukin-10, IL-10)、IL-35、IL-17、IL-6、IL-8水平,试剂盒购自北京百奥莱博科技有限公司。

1.3 观察指标

①4组一般资料包括性别、年龄、体质指数(Body mass index, BMI)比较;②肺微生态菌群多样性;③外周血、BAL中Treg/Th17、中性粒细胞、单核细胞比较;④血清与BAL上清中白介素-10(IL-10)、IL-35、IL-17、IL-6、IL-8水平比较;⑤评价吸烟、肺微生态菌群、Treg/Th17免疫失衡之间相关性。

1.4 统计学方法

采用SPSS 22.0软件进行数据处理,计量资料

以 $(\bar{x} \pm s)$ 描述,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两组间比较采用SNK-q检验,两组间比较采用独立样本 t 检验,相关性分析采用Spearman相关系数模型,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 4组一般资料、肺微生物多样性比较

4组ACE指数、Chao指数、Shannon指数比较:吸烟COPD组<不吸烟COPD组<吸烟肺功能正常组<不吸烟肺功能正常组($P<0.05$),Simpson指数比

较:吸烟COPD组>不吸烟COPD组>吸烟肺功能正常组>不吸烟肺功能正常组($P<0.05$)。见表1。

2.2 4组PBMC、BAL中Treg/Th17、中性粒细胞、单核细胞比较

4组外周血、BAL中Treg细胞、Treg/Th17比例比较:吸烟COPD组<不吸烟COPD组<吸烟肺功能正常组<不吸烟肺功能正常组($P<0.05$),Th17细胞、中性粒细胞、单核细胞比较:吸烟COPD组>不吸烟COPD组>吸烟肺功能正常组>不吸烟肺功能正常组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表2。

表1 4组一般资料、肺微生物多样性比较 [$n, (\bar{x} \pm s)$]

Table 1 Comparison of the diversity of diversity in 4 groupss [$n, (\bar{x} \pm s)$]

项目	吸烟COPD组 ($n=15$)	不吸烟COPD组 ($n=15$)	吸烟肺功能正常组 ($n=15$)	不吸烟肺功能正常组 ($n=15$)	χ^2/F 值	P 值
性别(男/女)	12/3	11/4	10/5	9/6	1.587	0.662
年龄(岁)	62.15±5.42	61.48±6.75	59.96±5.51	60.62±6.68	0.369	0.776
BMI(kg/m ²)	25.12±1.58	24.91±1.49	24.75±1.42	24.18±1.60	1.048	0.379
ACE指数	312.45±20.27 ^{abc}	338.52±22.16 ^{bc}	396.73±28.81 ^{ac}	512.14±31.34 ^{ab}	174.107	<0.001
Chao指数	314.20±13.17 ^{abc}	329.34±20.05 ^{bc}	372.55±24.17 ^{ac}	508.39±31.68 ^{ab}	216.622	<0.001
Shannon指数	1.50±0.12 ^{abc}	1.89±0.23 ^{bc}	2.54±0.35 ^{ac}	4.13±0.41 ^{ab}	225.186	<0.001
Simpson指数	0.85±0.11 ^{abc}	0.72±0.12 ^{bc}	0.52±0.08 ^{ac}	0.30±0.05 ^{ab}	97.896	<0.001

注:与不吸烟COPD组比较,^a $P<0.05$;与吸烟肺功能正常比较,^b $P<0.05$;与不吸烟肺功能正常组比较,^c $P<0.05$ 。

表2 4组PBMC、BAL中Treg/Th17、中性粒细胞、单核细胞比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of Treg/Th17, neutrophils and monocytes in PBMC and BAL in 4 groups ($\bar{x} \pm s$)

项目	组别	n	Treg细胞 (%)	Th17细胞 (%)	Treg/Th17 比例	中性粒细胞 ($\times 10^9/L$)	单核细胞 ($\times 10^9/L$)
外周血	吸烟COPD组	15	1.21±0.22	6.82±0.83	0.18±0.04	3.84±0.38	1.76±0.31
	不吸烟COPD组	15	1.80±0.43	6.12±0.65	0.29±0.07	3.51±0.32	1.25±0.27
	吸烟肺功能正常组	15	2.76±0.51	2.57±0.40	1.07±0.13	2.63±0.29	0.84±0.22
	不吸烟肺功能正常组	15	3.40±0.67	1.22±0.21	2.79±0.26	2.06±0.25	0.53±0.16
	F 值		60.691	335.794	957.863	100.956	70.000
	P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
BAL	吸烟COPD组	15	1.32±0.25	6.91±0.89	0.19±0.05	4.26±0.57	1.93±0.25
	不吸烟COPD组	15	1.96±0.38	6.17±0.68	0.32±0.08	3.79±0.48	1.34±0.21
	吸烟肺功能正常组	15	2.93±0.52	2.63±0.42	1.11±0.14	2.95±0.39	0.88±0.17
	不吸烟肺功能正常组	15	3.72±0.70	1.28±0.23	2.91±0.27	2.28±0.31	0.59±0.14
	F 值		69.391	299.330	928.693	57.822	132.315
	P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

2.3 4组血清、BAL上清炎性因子比较

4组血清、BAL上清IL-17、IL-6、IL-8、IL-10比较:吸烟COPD组>不吸烟COPD组>吸烟肺功能正常组>不吸烟肺功能正常组($P<0.05$),血清、BAL上清IL-35比较:吸烟COPD组<不吸烟COPD组<吸烟肺功能正常组<不吸烟肺功能正常组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表3。

2.4 吸烟、肺微生物多样性、Treg/Th17免疫失衡相关性

Spearman相关性分析,吸烟与肺部菌群ACE指数、Chao指数、Shannon指数、外周血、BAL中

Treg细胞、Treg/Th17比例呈负相关,与Simpson指数、外周血、BAL中Th17细胞呈正相关($P<0.05$),肺部菌群ACE指数、Chao指数、Shannon指数与外周血、BAL中Treg细胞、Treg/Th17比例呈正相关,与Th17细胞呈负相关,Simpson指数与外周血、BAL中Treg细胞、Treg/Th17比例呈负相关,与Th17细胞呈正相关($P<0.05$)。见表4~5。

3 讨论

吸烟是目前临床公认COPD的主要危险因素

表3 4组血清、BAL上清炎性因子比较 ($\bar{x} \pm s$, pg/mL)Table 3 Comparison of inflammatory factors in serum and BAL supernatant of 4 groups ($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

项目	组别	n	IL-10	IL-35	IL-17	IL-6	IL-8
血清	吸烟 COPD 组	15	68.21±13.06	117.45±15.34	142.79±15.47	35.18±7.79	80.26±8.11
	不吸烟 COPD 组	15	57.49±10.64	138.04±22.51	95.03±10.31	19.29±5.05	74.13±6.04
	吸烟肺功能正常组	15	42.18±8.22	189.16±30.55	62.17±7.22	13.75±4.10	67.39±5.22
	不吸烟肺功能正常组	15	35.26±6.03	242.37±42.39	50.28±5.09	8.31±2.46	62.15±4.10
	F 值		34.236	54.001	242.680	74.031	25.548
	P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
BAL 上清	吸烟 COPD 组	15	72.14±15.12	121.24±16.48	161.52±18.55	38.49±8.03	85.31±10.25
	不吸烟 COPD 组	15	59.13±11.44	141.35±24.05	101.37±12.79	21.15±5.22	76.02±7.21
	吸烟肺功能正常组	15	45.07±9.02	194.26±28.79	65.09±8.14	14.82±3.61	69.10±5.69
	不吸烟肺功能正常组	15	36.19±6.27	248.70±44.01	52.26±5.63	9.67±3.79	63.45±4.31
	F 值		31.211	54.304	237.328	79.325	25.595
	P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

表4 吸烟与肺微生物菌群、Treg/Th17 免疫失衡相关性

Table 4 The correlation between smoking and lung microbiota, Treg/Th17 immune imbalance

项目		ACE 指数	Chao 指数	Shannon 指数	Simpson 指数	外周血			BAL		
						Th17 细胞	Treg 细胞	Treg/Th17 比例	Th17 细胞	Treg 细胞	Treg/Th17 比例
吸烟	<i>r</i> 值	-0.531	-0.547	-0.506	0.493	0.602	-0.578	-0.621	0.617	-0.591	-0.644
	<i>P</i> 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

表5 肺微生物菌群与 Treg/Th17 免疫失衡相关性

Table 5 Correlation between pulmonary microbiota and Treg/Th17 immune imbalance

指标		ACE 指数		Chao 指数		Shannon 指数		Simpson 指数	
		r 值	P 值	r 值	P 值	r 值	P 值	r 值	P 值
外周血	Th17 细胞	-0.591	<0.001	-0.602	<0.001	-0.584	<0.001	0.557	<0.001
	Treg 细胞	0.613	<0.001	0.606	<0.001	0.592	<0.001	-0.563	<0.001
	Treg/Th17 比例	0.647	<0.001	0.628	<0.001	0.609	<0.001	-0.599	<0.001
BAL	Th17 细胞	-0.603	<0.001	-0.614	<0.001	-0.598	<0.001	0.602	<0.001
	Treg 细胞	0.597	<0.001	0.611	<0.001	0.607	<0.001	-0.616	<0.001
	Treg/Th17 比例	0.629	<0.001	0.634	<0.001	0.647	<0.001	-0.620	<0.001

之一,但吸烟通过何种机制增加 COPD 发生风险,目前尚无定论。长期以来,受下呼吸道取样困难及传统微生物培养技术局限性的影响,临床普遍认为肺部是一个无菌的环境,随着支气管镜和 rRNA 细菌鉴定技术的发展,发现肺部实际存在多种多样微生物菌群。且随着研究的深入,逐渐发现肺部微生态可显著影响慢性呼吸疾病的发生发展及临床治疗效果^[8-9]。本研究结果提示肺微生态失调可能与 COPD 的发生有关。进一步通过相关性分析发现吸烟与肺微生物菌群多样性存在明显相关性,提示吸烟可影响 COPD 患者、肺功能正常人群肺部微生态菌群平衡。

近年来研究显示, Th17/Terg 失衡与 COPD 发病密切相关^[10-11]。在 COPD 中, Th17 细胞分泌高水平的 IL-17, 而 IL-17 不仅能诱导单核巨噬细胞以及中性粒细胞在肺部聚集和活化, 释放弹性蛋白酶以及金属蛋白酶等多种酶破坏肺组织, 导致气道的炎

症发生, 还可诱导气道上皮细胞和内皮细胞分泌多种趋化因子和炎症因子, 这些细胞因子可进一步促进 COPD 的发展^[12]。另外 IL-17 还可促进支气管上皮细胞分泌大量的气道粘液、加重气道重塑及气道高反应性^[13]。在炎症反应中, Treg 可诱导产生各种抑炎细胞因子, 同时还能通过细胞间接触发挥抑制 Th17 细胞免疫活性的作用, 避免过度的免疫炎症反应加重组织损伤^[14-15]。且本研究通过相关性分析发现 Treg/Th17 平衡状态与肺微生物菌群多样性密切相关, 提示 Treg/Th17 失衡可引起肺微生态失调。本研究结果提示吸烟可诱导 Th17 细胞增殖与活化并分泌高水平的 IL-17, 同时抑制 Treg 细胞增殖。基于此笔者认为长期吸烟可影响肺部微生态菌群平衡, 进而影响肺 T 淋巴细胞分化, 导致 Th17/Terg 失衡, 表现为 Th17 细胞增多, 分泌和活化大量的炎症因子和趋化因子, 而 Treg 细胞减少, 免疫调节力度不足, 最终炎症细胞及炎症因子在气道持续浸 (下转第 444 页)

• 论 著 •

血清 SAA、sTREM-1、PCT 联合检测在新生儿宫内感染性肺炎中的价值

胡冰* 周翔平 时英才 王翔

【摘要】目的 分析血清淀粉酶样蛋白 A(SAA)、可溶性髓系细胞触发受体 1(sTREM-1)、降钙素原(PCT)联合检测在新生儿宫内感染性肺炎早期诊断中的应用价值。**方法** 选取本院 118 例新生儿,其中无宫内感染高危因素+未发生感染 32 例(对照组),有宫内感染高危因素+未发生感染 40 例(A 组),有宫内感染高危因素+宫内感染性肺炎 46 例(B 组),检测各组脐血 SAA、sTREM-1、PCT 水平,以受试者工作特征(ROC)曲线分析 SAA、sTREM-1、PCT 联合检测诊断价值。**结果** B 组 SAA、sTREM-1、PCT 水平明显高于对照组与 A 组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。对照组与 A 组 SAA、sTREM-1、PCT 水平比较差异无统计学意义($P>0.05$)。ROC 曲线分析显示,SAA 诊断敏感度 71.2%,特异度 88.4%;sTREM-1 诊断敏感度 65.7%,特异度 84.2%;PCT 诊断敏感度 72.6%,特异度 90.3%;三者联合诊断敏感度 85.7%,特异度 94.5%。**结论** 宫内感染性肺炎新生儿脐血 SAA、sTREM-1 及 PCT 表达水平呈明显升高趋势,三者联合对新生儿宫内感染性肺炎具有较高早期诊断价值。

【关键词】 血清淀粉酶样蛋白 A;可溶性髓系细胞触发受体 1;降钙素原;宫内感染性肺炎

Value of combined detection of serum SAA, sTREM-1 and PCT in neonatal intrauterine infectious pneumonia

HU Bing*, ZHOU Xuping, SHI Yingcai, WANG Xiang

(Department of Pediatrics, Zhumadian Central Hospital, Zhumadian, Henan, China, 463000)

【ABSTRACT】Objective To analyze the application value of combined detection of serum amylase-like protein A (SAA), soluble triggering receptor expressed on myeloid cells 1 (sTREM-1) and procalcitonin (PCT) in the early diagnosis of neonatal intrauterine infectious pneumonia. **Methods** A total of 118 neonates in the hospital were enrolled, including 32 cases without high risk factors of intrauterine infection and without infection (control group), 40 cases with high risk factors of intrauterine infection and without infection (group A), and 46 cases with high risk factors of intrauterine infection and intrauterine infectious pneumonia (group B). The levels of cord blood SAA, sTREM-1 and PCT in each group were detected. The diagnostic value of combined detection of SAA, sTREM-1 and PCT was analyzed using the receiver operating characteristic (ROC) curves. **Results** The levels of SAA, sTREM-1 and PCT in group B were significantly higher than those in the control group and group A ($P<0.05$). There was no significant difference between the control group and the A group in the levels of SAA, sTREM-1 and PCT ($P>0.05$). ROC curve analysis showed that the diagnostic sensitivity and specificity of SAA, sTREM-1, PCT and the combination of the three were (71.2%, 88.4%), (65.7%, 84.2%), (72.6%, 90.3%) and (85.7%, 94.5%), respectively. **Conclusion** The expression levels of umbilical cord blood SAA, sTREM-1 and PCT in neonates with intrauterine pneumonia showed a significant increase, and the combination of the three has a high early diagnosis value for neonates with intrauterine pneumonia.

【KEY WORDS】 Serum amylase-like protein A; Soluble triggering receptor expressed on myeloid cells 1; Procalcitonin; Intrauterine infectious pneumonia

基金项目:河南省科技厅科技发展项目(172102310512)

作者单位:河南省驻马店市中心医院新生儿科,河南,驻马店 463000

*通信作者:胡冰, E-mail: mangliu6969817698@163.com

宫内感染性肺炎亦有先天性肺炎之称,属于新生儿常见病,是造成新生儿死亡主要疾病之一^[1]。调查显示,宫内感染性肺炎具有不典型临床症状,在新生儿中致死率高达5%~20%^[2]。因为产前药物等各种因素影响,导致产前血培养以及白细胞计数等诊断新生儿宫内感染的效果并不理想,常见宫内感染诊断指标如白介素6(Interleukin-6, IL-6)、C反应蛋白(C-reactive protein, CRP)等虽已经得到了广泛应用,但仍存在一定局限性。髓系细胞触发受体1(Triggering receptor expressed on myeloid cells 1, TREM-1)为当前研究较多且和人体炎症反应有关的一种新型炎症分子,炎症发生时可溶性 TREM-1(soluble Triggering Receptor Expressed Myeloid cells-1, sTREM-1)会进入血液内,可用于诊断炎症性疾病^[3]。有研究表明,与其他诊断指标相比,降钙素原(Procalcitonin, PCT)对感染性疾病诊断特异度与灵敏度均较高^[4]。近期又有报道指出,病毒或者细菌感染患者急性期血清淀粉酶样蛋白A(Serum amylase-like protein, SAA)水平呈明显升高趋势^[5]。目前,尚未见以上三种指标联合检测应用于新生儿宫内感染性肺炎诊断的研究报道。本文探究SAA、sTREM-1、PCT三者联合对新生儿宫内感染性肺炎早期诊断价值,为该疾病的预防和临床诊断提供参考依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取本院2018年1月至2019年8月期间118例新生儿,按照感染高危因素情况与感染结局进行分组。其中无宫内感染高危因素+未发生感染32例(对照组),有宫内感染高危因素+未发生感染40例(A组),有宫内感染高危因素+宫内感染性肺炎46例(B组)。新生儿家属均对本次研究知情,并且签署知情同意书。研究通过了本院伦理委员会审核。

感染高危因素判定:妊娠晚期孕妇外周血白细胞计数与CRP水平升高、发热、产生胎儿宫内窘迫、出生窒息、胎膜早破超过24 h、发生绒毛膜羊膜炎、羊水Ⅲ度粪染^[6]。宫内感染性肺炎判定:患儿具有皮肤发灰、呼吸暂停、呼吸频率超过60次/min、肺部湿性啰音或者呼吸功能不全等症状与体征,并于出生后24~72 h通过胸部X线片检查发现肺炎征象^[7]。

1.2 方法

胎盘娩出后,采取脐动脉穿刺方法采集脐带血5 mL, 3 000 r/min离心10 min,分离血清,置-70℃保存

待测。利用全自动生化分析仪(型号:COBAS INTEGRA, Roche公司),以酶联免疫法测定血清sTREM-1与PCT水平,相关试剂盒购自德国BRAHMS公司。利用全自动特定蛋白分析仪(型号:Ottoman-1000, 上海奥普生物医药有限公司)测定SAA水平。

1.3 统计学处理

使用SPSS 19.0软件处理各组数据资料,计数资料以 $n(\%)$ 表示,行 χ^2 检验;计量资料经正态分布检验,以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,多组比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用SNK检验法;采取受试者工作特征(ROC)曲线分析SAA、sTREM-1、PCT对疾病诊断价值。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3组新生儿一般资料比较

3组新生儿性别、孕周、体质量等比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表1。

表1 3组新生儿一般资料比较 [$n(\%)$, $(\bar{x} \pm s)$]

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

组别	n	性别		孕周 (周)	体质量 (kg)
		男	女		
对照组	32	18(56.25)	14(43.75)	38.52±1.45	2.33±0.38
A组	40	22(55.00)	18(45.00)	38.36±1.41	2.27±0.34
B组	46	25(54.35)	21(45.65)	38.15±1.47	2.26±0.35
χ^2/F 值		0.028		0.641	0.404
P值		0.986		0.529	0.669

2.2 3组SAA、sTREM-1、PCT水平比较

B组SAA、sTREM-1、PCT水平明显高于对照组与A组,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。对照组与A组SAA、sTREM-1、PCT水平比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表2。

表2 3组SAA、sTREM-1、PCT水平比较 ($n, \bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of SAA, sTREM-1 and PCT levels among the three groups ($n, \bar{x} \pm s$)

组别	n	SAA (ng/L)	sTREM-1 (ng/L)	PCT (ng/mL)
对照组	32	0.54±0.10	5.53±1.02	0.72±0.09
A组	40	0.51±0.08	5.49±0.96	0.70±0.11
B组	46	6.82±1.14 ^{ab}	12.85±1.87 ^{ab}	1.24±0.20 ^{ab}
F值		1083.791	385.733	180.601
P值		<0.001	<0.001	<0.001

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与A组比较,^b $P < 0.05$

2.3 SAA、sTREM-1、PCT三者联合诊断分析

SAA、sTREM-1、PCT三者联合诊断敏感度85.7%,特异度94.5%,比单一诊断值要高。见表3、图1。

表3 ROC曲线下面积

Table 3 Area under ROC curve

变量	面积	标准误	95%CI	敏感度	特异度	P值
SAA	0.872	0.054	0.762~0.979	71.2	88.4	<0.001
sTREM-1	0.743	0.061	0.614~0.870	65.7	84.2	<0.001
PCT	0.887	0.052	0.753~0.986	72.6	90.3	<0.001
三者联合	0.934	0.026	0.895~0.975	85.7	94.5	<0.001

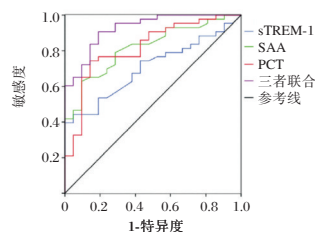


图1 SAA、sTREM-1、PCT联合诊断ROC曲线分析

Figure 1 ROC curve analysis of SAA, sTREM-1 and PCT

3 讨论

有研究表明,宫内感染属于新生儿肺部感染相关疾病发生主要病因,尽管临床根据妊娠晚期母体感染征象予以针对性抗感染治疗,但依然有部分新生儿由于肺部感染而产生呼吸急促以及缺氧等症状,严重者甚至死亡^[8-9]。故探寻脐血之中早期诊断效能较高标志物,对改善新生儿宫内感染性肺炎预后具有重要意义。

ASS是一种急性相蛋白,可以和高密度脂蛋白分子结合。当机体感染或者产生炎症应激反应时,ASS表达水平迅速升高,短时间内即能升至峰值,予以有效治疗后又能迅速下降并保持在一个稳定状态。正常新生儿一般ASS表达水平极低,当出现炎症或受到感染时,其水平明显升高。以往研究指出,ASS可用于新生儿感染性疾病诊断^[10]。亦有报道称,机体早期炎症或者轻微炎症诊断中,相较于CRP,ASS对炎症诊断敏感度更加高^[11]。本研究结果表明宫内感染性肺炎新生儿SAA水平呈现异常升高趋势,与该病的发生存在紧密联系。分析原因,正常情况下新生儿SAA难以检测到,当发生细菌或者病毒感染时,Toll样受体诱导相应趋化因子以及基质降解酶,同时G蛋白偶联受体发挥激活剂以及趋化剂作用,导致SAA大量产生和释放,SAA水平升高,特别是在急性加重期,能够升高至正常水平的1 000倍^[12-13]。Bouchon等^[14]首次发现TREM-1,主要表达于成熟单核细胞、中性粒细胞和巨噬细胞,并于炎症反应中发挥主导作用。sTREM-1属于TREM-1分泌亚型,当发生感染时,sTREM-1大量释放并且进入血液或体液,和许多

炎症疾病具有紧密联系,同时可反映炎症反映程度,有利于患者预后评估。以往研究指出,sTREM-1能够加剧炎症反应,造成“过度”炎症现象^[15]。本研究显示,B组sTREM-1表达水平显著高于其余两组,与上述研究观点相符,提示宫内感染性肺炎新生儿脐血sTREM-1表达有明显上调的变化。可能由于在感染早期,中性粒细胞sTREM-1会明显放大机体炎症反应信号,提高炎症因子水平;同时其也可对中性粒细胞逐渐往肺炎组织迁移产生促进作用。PCT属于急性反应糖蛋白,感染可导致人体促炎细胞因子分泌水平升高,如IL-6与肿瘤坏死因子- α (Tumor Necrosis Factor- α , TNF- α)等,该类炎症因子可以促进PCT合成,故PCT可用于早期感染诊断^[16-17]。相关研究表明,脐血PCT可对新生儿早期感染起到一定预测作用^[18]。本研究经ROC曲线发现,SAA、sTREM-1、PCT及联合诊断敏感度与特异度分别为71.2%、88.4%、65.7%、84.2%、72.6%、90.3%、85.7%、94.5%,证实这三项指标均对宫内感染性肺炎新生儿具有一定诊断价值,尤其是三者联合早期诊断效能更高。

综上,新生儿宫内感染性肺炎早期具有脐血SAA、sTREM-1、PCT水平异常升高变化,均可用于该病早期诊断,相较于单项指标检测,三者联合诊断灵敏度与特异度更高,可为临床早期诊断提供重要依据。

参考文献

- [1] Kushnareva MV, Keshishyan ES, Balashova ED. The etiology of neonatal pneumonia, complicated by bronchopulmonary dysplasia[J]. J Neonatal Perinatal Med, 2019, 12(4):429-436.
- [2] De Luca D. Neonatal ventilator-associated pneumonia: more questions than answers [J]. Minerva Anestesiol, 2018, 84(7):777-779.
- [3] Cao C, Gu J, Zhang J. Soluble triggering receptor expressed on myeloid cell-1 (sTREM-1): a potential biomarker for the diagnosis of infectious diseases [J]. Front Med, 2017, 11(2):169-177.
- [4] Chen CM, Chan KS, Chao HC, et al. Diagnostic performance of procalcitonin for bacteremia in patients with severe dengue infection in the intensive care unit [J]. J Infect, 2016, 73(1):93-95.
- [5] Jawor P, Stefaniak T, Mee JF. Immune and inflammatory biomarkers in cases of bovine perinatal mortality with and without infection in utero [J]. J Dairy Sci, 2017, 100(2):1408-1416.
- [6] 曹泽毅. 中华妇产科学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2014:673-679.
- [7] 邵肖梅, 叶鸿瑁, 丘小汕. 实用新生儿学(第四版)[M]. 北京:人民卫生出版社, 2011:653-655.

- [8] Silva ARAD, Silva TCD, Bom GJT, et al. Ventilator-associated pneumonia agents in Brazilian Neonatal Intensive Care Units-a systematic review [J]. *Braz J Infect Dis*, 2018, 22(4):338-344.
- [9] Sperandeo M, Rea G, Santantonio A, et al. Lung Ultrasonography in Diagnosis of Transient Tachypnea of the Newborn: Limitations and Pitfalls [J]. *Chest*, 2016, 150(4):977-978.
- [10] Wilson M, Abou-Elalla AA, Zakaria MT, et al. Serum Amyloid A Type 1 Gene Polymorphism in Egyptian Children with Familial Mediterranean Fever [J]. *Pathobiology*, 2016, 83(6):295-300.
- [11] Bryleva EY, Keaton SA, Grit J, et al. The acute-phase mediator serum amyloid A is associated with symptoms of depression and fatigue [J]. *Acta Psychiatr Scand*, 2017, 135(5):409-418.
- [12] 刘颖, 王俊平, 余冬玲, 等. 尿肠型脂肪酸结合蛋白诊断新生儿坏死性小肠结肠炎的临床价值 [J]. *广东医学*, 2018, 39(4):548-551.
- [13] 林国辉, 孙瑞琳, 王燕, 等. 淀粉样蛋白 A 和超敏 C-反应蛋白与血清降钙素原对原发性肺癌患者肺部感染的诊断效果 [J]. *中华医院感染学杂志*, 2020, 30(2):30-33.
- [14] Bouchon A, Dietrich J, Colonna M. Cutting edge: inflammatory responses can be triggered by TREM-1, a novel receptor expressed on neutrophils and monocytes [J]. *J Immunol*, 2000, 164(10):4991-4995.
- [15] 李志英, 周军. 联合检测血清 sTREM-1、IL-17、hs-CRP 在肺炎中的诊断价值 [J]. *中国老年学*, 2018, 38(17):4167-4169.
- [16] Arora R, Campbell JP, Simon G, et al. Does serum procalcitonin aid in the diagnosis of bloodstream infection regardless of whether patients exhibit the systemic inflammatory response syndrome? [J]. *Infection*, 2017, 45(3):291-298.
- [17] Rodríguez AH, Avilés-Jurado FX, Díaz E, et al. Procalcitonin (PCT) levels for ruling-out bacterial coinfection in ICU patients with influenza: A CHAID decision-tree analysis [J]. *J Infect*, 2016, 72(2):143-151.
- [18] Montaldo P, Rosso R, Santantonio A, et al. Presepsin for the detection of early-onset sepsis in preterm newborns [J]. *Pediatr Res*, 2017, 81(2):329-334.

(上接第 440 页)

润,促进气道重塑,加重肺功能受限,因此吸烟-肺微生态失调-肺免疫紊乱-炎症浸润是吸烟致 COPD 的发病机制。

综上可知,吸烟可介导呼吸道微生态失调,与 Treg/Th17 免疫失衡密切相关,致使 Naïve T 细胞分化失衡,可增加炎症因子和趋化因子,加重气道炎症浸润,最终促进 COPD 的发病。本研究为单中心研究,存在样本量较少的不足,研究结果可能存在一定偏倚,仍需通过多中心、大样本研究进一步验证。

参考文献

- [1] Robertson S, Pisinger CH, Løkke A, et al. Environmental tobacco smoke is a risk factor for the development of chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Ugeskr Laeger*, 2019, 181(8):V08180584.
- [2] 刁鑫, 兀威, 张进召. 吸烟对慢性阻塞性肺疾病患者 CD8⁺T 细胞的影响 [J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2018, 10(6):395-399.
- [3] Aghapour M, Raee P, Moghaddam SJ, et al. Airway Epithelial Barrier Dysfunction in Chronic Obstructive Pulmonary Disease: Role of Cigarette Smoke Exposure [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2018, 58(2):157-169.
- [4] 党如意, 赵晨阳, 樊兴, 等. 香烟烟雾暴露对正常小鼠下呼吸道菌群分布的影响 [J]. *山东医药*, 2018, 58(20):9-12.
- [5] 叶彩虹, 王辉, 陈斯亮, 等. 吸烟对稳定期 COPD 患者 Treg/Th17 细胞表达的影响及其与血清炎症因子的相关性分析 [J]. *中国实用医药*, 2020, 15(15):10-13.
- [6] 中华医学会, 中华医学会杂志社, 中华医学会全科医学分会, 等. 慢性阻塞性肺疾病基层诊疗指南(实践版·2018) [J]. *中华全科医师杂志*, 2018, 17(11):871-877.
- [7] 李强, 朱清亮, 张海龙, 等. 肝硬化患者经颈静脉肝内门体分流术前后肠道菌群特征分析 [J]. *临床肝胆病杂志*, 2020, 36(2):333-337.
- [8] 蓝英萍, 蒋玲, 宁小平. AECOPD 患者呼吸道病毒检测结果及危险因素 [J]. *热带医学杂志*, 2018, 18(5):681-684+688.
- [9] Liu C, Guo J. Research progress in pulmonary microecology of idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Chin J Tubercul Respir Dis*, 2018, 41(3):231-233.
- [10] 金松, 吴小军. 慢性阻塞性肺疾病患者外周血 Th17 和 Treg 细胞的表达及意义 [J]. *武汉大学学报(医学版)*, 2018, 39(6):961-965.
- [11] 姜敏, 徐丹, 田戈, 等. 慢性阻塞性肺疾病患者外周血中 Th17/Treg 和内皮微粒关系的研究 [J]. *国际呼吸杂志*, 2018, 38(2):109-113.
- [12] Zhou M, Jiao L, Liu Y. sFRP2 promotes airway inflammation and Th17/Treg imbalance in COPD via Wnt/ β -catenin pathway [J]. *Res Physiol Neurobiol*, 2019, 270(1):103282.
- [13] Ito JT, Cervilha DAB, Lourenço JD, et al. Th17/Treg imbalance in COPD progression: A temporal analysis using a CS-induced model [J]. *PLoS One*, 2019, 14(1):e0209351.
- [14] Silva LEF, Lourenço JD, Silva KR, et al. Th17/Treg imbalance in COPD development: suppressors of cytokine signaling and signal transducers and activators of transcription proteins [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1):15287.
- [15] Xu YQ, Lv W, Wu HJ, et al. Ginsenoside regulates Treg/Th17 cell ratio and inhibits inflammation to treat COPD [J]. *Pharmazie*, 2020, 75(11):590-594.

• 论 著 •

TPP、FM、CRP/HDL-C 与 LVEF 关系及预测桥内血栓形成价值

程军涛^{1*} 李芳² 高源¹

[摘要] 目的 探讨血栓前体蛋白(TPP)、纤维蛋白单体(FM)、C反应蛋白与高密度脂蛋白胆固醇比值(CRP/HDL-C)与冠脉搭桥术后左室射血分数(LVEF)关系及预测桥内血栓形成的价值。方法 选取本院收治的468例冠脉搭桥术患者,根据术后1个月内是否有桥内血栓形成分为观察组($n=31$,有桥内血栓)、对照组($n=437$,无桥内血栓),比较两组一般资料、TPP、FM、CRP/HDL-C、LVEF,分析TPP、FM、CRP/HDL-C与LVEF的相关性及各指标预测桥内血栓形成的效能。结果 术后1 d TPP、FM、CRP/HDL-C与术后1 d LVEF呈负相关,术后7 d TPP、FM、CRP/HDL-C与术后7 d LVEF呈负相关($P<0.05$); Logistic回归模型分析显示,糖尿病、HDL-C降低、术后1、7 d TPP、FM、CRP/HDL-C均与桥内血栓形成相关($P<0.05$);术后7 d TPP、FM、CRP/HDL-C预测桥内血栓形成的AUC均大于0.8,呈现出一定的预测价值。结论 TPP、FM、CRP/HDL-C异常是冠脉搭桥术后桥内血栓形成的独立危险因素,且术后不同时间其水平变化与心功能关系密切,具有一定预测价值,对指导临床完善术后治疗方案具有重要意义。

[关键词] 血栓前体蛋白;纤维蛋白单体;C反应蛋白;高密度脂蛋白胆固醇;左室射血分数

Relationship between TPP, FM, CRP/HDL-C and LVEF after coronary artery bypass grafting and its value in predicting intra-bridge thrombosis

CHENG Juntao^{1*}, LI Fang², GAO Yuan¹

(1. Department of Thoracic Surgery, Anyang People's Hospital of Henan Province, Anyang, Henan, China, 455000; 2. Department of Ultrasound, Anyang Fifth People's Hospital, Anyang, Henan, China, 455000)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the relationship between thrombus precursor protein (TPP), fibrin monomer (FM), C-reactive protein to high-density lipoprotein cholesterol ratio (CRP/HDL-C) and left ventricular ejection fraction (LVEF) after coronary artery bypass grafting and the value of predicting intra-bridge thrombosis. **Methods** A total of 468 patients undergoing coronary artery bypass graft surgery in our hospital were selected. According to whether there was intra-bridge thrombosis within 1 month after operation, they were divided into observation group ($n=31$, with intra-bridge thrombosis) and control group ($n=437$, without intra-bridge thrombosis). The general data, TPP, FM, CRP/HDL-C, LVEF of the two groups were compared, and the correlation between TPP, FM, CRP/HDL-C and LVEF and the effectiveness of each index in predicting intra-bridge thrombosis were analyzed. **Results** The differences between the two groups of TPP, FM, CRP/HDL-C, and LVEF at different time points and interactions were statistically significant ($P<0.05$). TPP, FM, CRP/HDL-C at 1 day after operation were negatively correlated with LVEF at 1 day after operation, and TPP, FM, CRP/HDL-C at 7 days after operation were negatively correlated with LVEF at 7 days after operation ($P<0.05$). Logistic regression analysis showed that diabetes, the reduction of HDL-C, TPP, FM, and CRP/HDL-C at 1 and 7 days after operation were all related to intra-bridge thrombosis ($P<0.05$).

基金项目:河南省高等学校重点科研项目(20A320033)

作者单位:1. 河南省安阳市人民医院胸心外科,河南,安阳 455000

2. 安阳市第五人民医院超声科,河南,安阳 455000

*通信作者:程军涛, E-mail:chengjuntao2021@163.com

The AUC of TPP, FM, CRP/HDL-C predicting intra-bridge thrombosis at 7 days after operation was greater than the corresponding index at 1 day after operation. The AUC of TPP, FM, and CRP/HDL-C predicting intra-bridge thrombosis were all greater than 0.8 at 7 days postoperatively, showing a certain predictive value.

Conclusion TPP, FM, CRP/HDL-C abnormalities are independent risk factors for intra-graft thrombosis after coronary artery bypass graft surgery, and their level changes at different times after surgery are closely related to cardiac function. They have certain predictive value and are of great significance for guiding clinical improvement of postoperative treatment plans.

[KEY WORDS] Thrombus precursor protein; Fibrin monomer; C-reactive protein; High density liprotein cholesterol; Left ventricular ejection fraction

目前冠脉搭桥术是临床治疗冠心病冠脉狭窄主要手段之一。但随冠脉搭桥术开展时间延长及病例积累,发现有一部分患者术后因桥血管狭窄闭塞再发生心肌缺血症状^[1-2]。侵入性冠状动脉造影是评价冠脉搭桥术后血管通畅性金标准,但其仅能对当前血管状态进行评估,无法提供预后病情转归参考信息。血栓前体蛋白(Thrombus precursor protein, TPP)已被证实是凝血活化特异性指标;纤维蛋白单体(Fibrin monomer, FM)是凝血酶作用下,纤维蛋白原释放纤维蛋白肽A,B形成的一种活性蛋白,其对预测血栓形成具有一定价值^[3];此外,C反应蛋白(C-reactive protein, CRP)所代表炎症反应及高密度脂蛋白胆固醇(High density liprotein cholesterol, HDL-C)异常表达亦与冠脉血管壁粥样硬化及血栓形成关系密切^[4]。上述指标可从细胞水平反应机体凝血状态,但其与冠脉搭桥术后左室射血分数(Left ventricular ejection fraction, LVEF)及预后预测价值如何鲜见报道,本研究首次对此探究,旨在为临床完善桥内血栓形成预测机制提供参考。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2014年1月至2019年12月本院收治的468例冠脉搭桥术患者,术后1个月内根据症状及冠脉造影诊断是否有桥内血栓形成分为观察组($n=31$,有桥内血栓)、对照组($n=437$,无桥内血栓)。纳入标准:明确冠心病心绞痛史^[5];药物治疗效果不佳,均采用冠脉搭桥术治疗;所有患者及家属知情并签署同意书。排除标准:伴血液系统疾病者;合并恶性肿瘤疾病者;有肝肾功能缺陷者;存在免疫系统疾病者;甲状腺功能异常者。

1.2 方法

①冠脉搭桥术^[6]:常规胸骨正中开胸入路,取左乳内动脉、大隐静脉或桡动脉进行冠脉搭桥术,

术中结合患者靶血管、心功能等情况选取常规体外循环冠脉搭桥术或非体外循环冠脉搭桥术,拔除动脉鞘管后1h予以低分子肝素0.4 mL(皮下注射),1次/d,连续给药3d;术后常规指导双联抗血小板治疗。②相关指标检测方法:术前、术后1、7d晨空腹,采用非抗凝真空管抽取肘静脉血2 mL,离心(半径10 cm,转速3 500 r/min,时间10 min),采集上层血清,采用上海臻科生物科技有限公司TPP酶联免疫试剂盒测TPP水平,采用北京百莱博科技有限公司FM免疫比浊法试剂盒测FM水平,基蛋生物科技股份有限公司CRP免疫透射比浊法试剂盒测CRP水平,上海复星长征医学科学有限公司HDL-C酶联免疫试剂盒测HDL-C水平;LVEF检测采用迈瑞DC-N2S型彩色多普勒超声检查。

1.3 统计学处理

采用统计学软件SPSS 19.0处理数据,计数资料以 $n(\%)$ 表示,采用 χ^2 检验,计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 描述,两组间比较采用独立样本 t 检验;Pearson、Logistic回归方程分析变量间关系;受试者工作特征曲线(ROC)分析预测效能。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组一般资料比较

观察组与对照组糖尿病、HDL-C降低分布比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表1。

2.2 两组TPP、FM、CRP/HDL-C、LVEF比较

两组TPP、FM、CRP/HDL-C、LVEF术前对比,差异无统计学意义($P > 0.05$);与术前相比,两组术后1、7d TPP、FM均显著降低,术后1d CRP/HDL-C、LVEF均显著升高,对照组术后7d TPP、FM、CRP/HDL-C低于术后1d,观察组术后7d TPP、FM、CRP/HDL-C则高于术后1d($P < 0.05$);观察组术后1、7d TPP、FM、CRP/HDL-C高于对照组,LVEF低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表2。

表1 两组临床资料对比 [$n(\%)$, ($\bar{x} \pm s$)]Table 1 Comparison of clinical data between the two groups [$n(\%)$, ($\bar{x} \pm s$)]

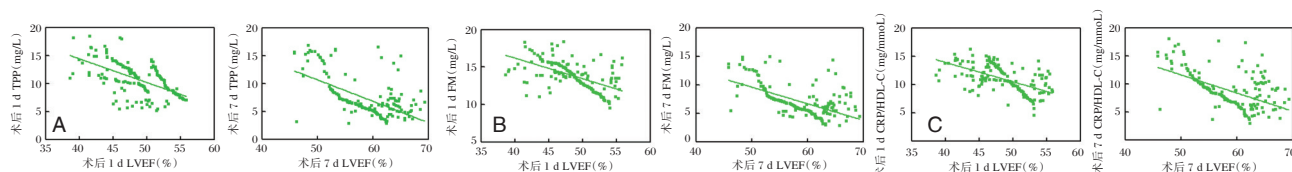
资料	观察组 ($n=31$)	对照组 ($n=437$)	t/χ^2 值	P 值
年龄(岁)	60.84±10.03	61.52±11.28	0.327	0.744
性别(男/女)	16/15	224/213	0.002	0.970
体质量指数(kg/m^2)	24.15±2.24	24.06±1.97	0.244	0.808
饮酒史	26(83.87)	371(84.90)	0.011	0.916
吸烟史	14(45.16)	192(43.94)	0.018	0.894
既往史				
糖尿病	9(29.03)	43(9.84)	8.940	0.003
高血压	4(12.90)	50(11.44)	0.002	0.964
总胆固醇升高	12(38.71)	175(40.05)	0.022	0.883
甘油三酯升高	10(32.26)	135(30.89)	0.025	0.874
低密度脂蛋白升高	8(25.81)	116(26.54)	0.008	0.928
HDL-C降低	6(19.35)	27(6.18)	5.789	0.016
冠脉搭桥术时机				
急诊	10(32.26)	134(30.66)	0.035	0.853
择期	21(67.74)	303(69.34)		
移植血管				
大隐静脉桥	23(74.19)	327(74.83)	0.006	0.937
左乳内动脉桥	9(29.03)	122(27.92)	0.018	0.894
桡动脉桥	5(16.13)	65(14.87)	0.005	0.943
冠脉病变数量				
单支	5(16.13)	65(14.87)	0.147	0.883
双支	12(38.71)	170(38.90)		
多支	14(45.16)	202(46.22)		

2.3 TPP、FM、CRP/HDL-C与LVEF的关系 采

Pearson相关性分析结果:术后1 d TPP($r=-0.585$, $P<0.001$)、FM($r=-0.578$, $P<0.001$)、CRP/HDL-C($r=-0.588$, $P<0.001$)与术后1 d LVEF呈负相关,术后7 d TPP($r=-0.594$, $P<0.001$)、FM($r=-0.577$, $P<0.001$)、CRP/HDL-C($r=-0.541$, $P<0.001$)与术后7 d LVEF呈负相关。见图1。

2.4 桥内血栓形成的Logistic回归方程多因素分析

非条件Logistic回归模型,以桥内血栓是否形成作为因变量,赋值0=无血栓,1=有血栓,纳入糖尿病、HDL-C降低、术后1、7 d TPP、FM、CRP/HDL-C作为自变量,将术后1、7 d TPP、FM、CRP/HDL-C连续变量,参考两组总均值分层,转化为二分类变量。结果显示,糖尿病、HDL-C降低、术后1、7 d TPP、FM、CRP/HDL-C均与桥内血栓形成相关($P<0.05$)。见表3。



注:A为TPP与LVEF的相关性;B为FM与LVEF的相关性;C为CRP/HDL-C与LVEF的相关性。

图1 相关指标与LVEF的关系

Figure 1 The relationship between related indicators and LVEF

表2 两组TPP、FM、CRP/HDL-C、LVEF术前对比结果($\bar{x} \pm s$)Table 2 Comparison of TPP, FM, CRP/HDL-C, LVEF between the two groups ($\bar{x} \pm s$)

指标	组别	例数	术前	术后1 d	术后7 d
TPP(mg/L)	观察组	31	18.16±5.05	13.14±3.06	14.05±2.77
	对照组	437	17.89±4.92	10.35±2.59	4.89±1.02
	t 值		0.295	5.723	40.684
	P 值		0.768	<0.001	<0.001
FM(mg/L)	观察组	31	19.86±4.19	10.14±2.50	11.84±2.13
	对照组	437	20.03±5.26	8.66±1.99	5.11±1.04
	t 值		0.176	3.929	31.708
	P 值		0.860	<0.001	<0.001
CRP/HDL-C(mg/mmol)	观察组	31	7.97±2.34	12.68±1.95	14.59±2.11
	对照组	437	8.05±2.57	10.45±2.06	6.81±2.24
	t 值		0.168	5.844	18.755
	P 值		0.866	<0.001	<0.001
LVEF(%)	观察组	31	44.62±5.17	46.22±4.98	55.05±5.14
	对照组	437	45.03±4.85	49.16±3.57	58.77±5.03
	t 值		0.453	4.273	3.973
	P 值		0.651	<0.001	<0.001

2.5 预测桥内血栓形成的价值

绘制ROC曲线,结果显示术后7 d TPP、FM、CRP/HDL-C预测桥内血栓形成的AUC大于对应指标术后1 d的AUC,且术后7 d TPP、FM、CRP/HDL-C预测桥内血栓形成的AUC。见表4。

3 讨论

近年受饮食、生活方式改变等诸多因素影响,冠心病发病人数显著增加^[7]。冠脉搭桥术是冠心病主要治疗手段之一,尽管能快速、直接改善心肌缺血缺氧状态,但并未有效消除冠脉狭窄诱发因素。

近年不断有研究指出,冠心病患者冠脉搭桥术后病情转归与不良生活习惯、血脂水平异常等因素有关^[8]。本研究除不良生活习惯、移植血管等因素外,HDL-C降低分布、TPP、FM、CRP/HDL-C、LVEF均有显著差异,客观证实桥内血栓形是多影响、多过程互相作用的结果有研究表明,在心肌损伤时,TPP峰值较同类标记物早2~4 h^[9]。本研究结果提示其可能参与桥内血栓形成的发生发展过程。FM是一种凝血活性蛋白,正常情况人外周血

表3 影响因素分析

Table 3 Logistic regression equation analysis of factors affecting intra-bridge thrombosis

影响因素	赋值	β	SE	Wald/ χ^2 值	OR值	95%CI	P值
糖尿病	无	1			1.000		
	有	2	0.272	0.085	10.205	1.312	1.156~1.489
HDL-C降低	否	1			1.000		
	是	2	0.362	0.096	14.216	1.436	1.365~1.511
术后1 d TPP	低于均值	1			1.000		
	高于均值	2	0.959	0.254	14.260	2.609	2.336~2.915
术后1 d FM	低于均值	1			1.000		
	高于均值	2	0.526	0.156	11.381	1.693	1.597~1.794
术后1 d CRP/HDL-C	低于均值	1			1.000		
	高于均值	2	0.443	0.134	10.906	1.557	1.268~1.911
术后7 d TPP	低于均值	1			1.000		
	高于均值	2	1.196	0.288	17.246	3.307	2.987~3.661
术后7 d FM	低于均值	1			1.000		
	高于均值	2	0.655	0.186	12.398	1.925	1.798~2.061
术后7 d CRP/HDL-C	低于均值	1			1.000		
	高于均值	2	0.697	0.206	11.432	2.007	1.710~2.355

表4 ROC分析结果

Table 4 ROC analysis results

指标	AUC	95%CI	cut-off值	敏感度(%)	特异度(%)	P值
术后1 d TPP	0.734	0.663~0.798	>12.33 mg/L	54.84	80.14	<0.001
FM	0.761	0.691~0.821	≤10.89 mg/L	67.74	73.29	<0.001
CRP/HDL-C	0.782	0.714~0.841	>11.62 mg/mmoL	80.65	69.18	<0.001
术后7 d TPP	0.848	0.786~0.897	>9.74 mg/L	74.19	88.36	<0.001
FM	0.833	0.770~0.885	>8.37 mg/L	70.97	80.82	<0.001
CRP/HDL-C	0.829	0.766~0.882	>11.22 mg/mmoL	80.65	79.45	<0.001

内几乎无FM存在,但凝血系统被激活后,在凝血酶作用下可迅速生成FM,且其水平变化与凝血活性强度呈正相关^[10]。本研究发现,术后两组血清FM水平均降低,可能与应用肝素及双联抗有关,但观察组术后7 d仍呈升高趋势,证实术后桥内血栓形成患者可能存在高凝持续状态,单纯双联抗辅助治疗难达预期效果。

血栓形成与机体凝血、炎症反应等多个病理生理过程有关,故,目前重在探寻综合性指标以提升评估效能^[11]。CRP是重要促炎因子,作为急性期炎症标志物反应性蛋白是心血管事件重要预测因子,亦是致冠脉管腔闭塞及桥内血栓形成的因子,并介导多种血栓形成相关因子表达,而HDL-C可通过抗感染、抗血栓、抗氧化、逆向转运胆固醇及血管内皮保护等多种机制发挥抗冠脉血管病变的作用。基于上述研究,本研究将CRP/HDL-C作为创新指标以综合评价冠脉搭桥术后患者外周血CRP、HDL-C水平变化,其在基层社区医院亦具有可操作性强、获取简便等特征,有助于提升临床医师对患者病情评估准确性,结果发现,术后对照组CRP/HDL-C表现一过性升高,而观察组呈持续升

高状态,分析主要是因HDL-C作为抗动脉粥样硬化脂蛋白,随细胞膜上胆固醇积蓄,其呈持续消耗性降低状态,而CRP作为炎症因子受血脂代谢异常氧化应激等因素激活机体炎症反应影响,水平持续升高,同时可加剧机体凝血活性,降低血液流动性,继而影响心肌血氧供给^[12]。术后7 d TPP、FM、CRP/HDL-C预测桥内血栓形成的AUC均大于0.800,有一定的预测价值。但本研究所选病例中有桥内血栓者样本量较少,术后7 d TPP、FM、CRP/HDL-C对冠脉搭桥术后桥内血栓形成的预测价值是否具有典型代表性,仍需继续探究。

综上所述,TPP、FM、CRP/HDL-C异常是冠脉搭桥术后桥内血栓形成的独立危险因素,且术后不同时间其水平变化与心功能关系密切,对桥内血栓形成具有一定预测价值。

参考文献

- [1] 刘飞,徐东,张科峰,等.颈动脉狭窄程度对冠脉搭桥术中大脑动脉血流变化的影响[J].热带医学杂志,2016,16(4):474-476+482.
- [2] 高峰,庄熙晶,高洋,等.非体外循环冠状动脉旁路移植术中不同方式获取大隐静脉的近中期临床 (下转第452页)

· 论 著 ·

基于可视化基因芯片技术指导幽门螺杆菌个体化治疗的临床研究

杨莉丽 邹傲 吴慧华 郭海 张芳婷 邹兵 王俊萍*

【摘要】目的 利用可视化基因芯片检测技术检测结果指导幽门螺杆菌“个体化”治疗,评价其优越性。**方法** 244例初诊幽门螺旋杆菌感染患者的胃黏膜组织,检测组织标本中幽门螺旋杆菌 *gyrA* 基因上喹诺酮耐药相关的 Asn87(N87K)、Asp91(D91G/Y/N)突变位点和 23S rRNA 基因上克拉霉素耐药相关的 A2142G、A2143G 突变位点,以及人 CYP2C19 上与 PPI 代谢相关的等位基因 2C19*2、2C19*3 突变位点。根据检测结果喹诺酮和克拉霉素的敏感性分为敏感及耐药;PPI 药物代谢活性分为强代谢型(EM)、中代谢型(IM)和弱代谢型(PM);结合检测结果给予幽门螺杆菌“个体化”三联根除治疗,并统计根除率。**结果** 244例中检出 63例对抗生素耐药,耐药率 25.80%(63/244),其中左氧氟沙星和克拉霉素耐药率 2.86%(7/244)和 20.49%(50/244),两者双重耐药率 2.45%(6/244)。244例中检出 CYP2C19 代谢类型有 242例(99.18%),其中 EM、IM、PM、分别占 40.08%(97/242)、58.26%(141/242)和 1.65%(4/242)。242例检测结果阳性患者根据检测结果给予幽门螺杆菌个体化的“三联”治疗,240例完成治疗,初次根除率达到 91.67%。EM、IM、PM 的根除率分别为 89.58%、92.86%和 100%,差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 可视化基因芯片技术能够同时提供准确的 CYP2C19 代谢类型和克拉霉素、左氧氟沙星耐药情况,指导临床用药,具有较好的临床应用价值。

【关键词】 幽门螺杆菌;可视化基因芯片技术;CYP2C19 基因多态性;耐药;个体化治疗

Clinical research on the guidance of individualized treatment of *Helicobacter pylori* based on visual gene chip technology

YANG Lili, ZOU Ao, WU Huihua, GUO Hai, ZHANG Fangting, ZOU Bing, WANG Junping*

(Department of Gastroenterology, Peking University Shenzhen Hospital, Shenzhen, Guangdong, China, 518036)

【ABSTRACT】Objective To use visual gene chip detection technology to guide the “individualized” treatment of *Helicobacter pylori* and to evaluate its superiority. **Methods** Gastric mucosal tissues were collected from 244 patients with initial diagnosis of *H. pylori* infection. The levofloxacin resistance related Asn87 and Asp91 mutations in *gyrA* gene, clarithromycin resistance related A2142G and A2143G mutations in 23S rRNA gene and PPI metabolism related allele CYP2C19*2 and CYP2C19*3 mutations in CYP2C19 gene were detected. According to the detection results, the sensitivity of levofloxacin and clarithromycin was divided into the sensitivity and resistance groups. The metabolic activities of PPI drugs were divided into three types: extended metabolizer (EM), intermediate metabolizer (IM) and poor metabolizer (PM). A 14-day bismuth quadruple therapy regimen guided by antibiotic resistance and CYP2C19 polymorphism testing was implemented for *H. pylori* eradication. Primary *H. pylori* eradication rate was assessed 4 weeks after the eradication therapy. **Results** Antibiotic resistance was identified in 63 (25.82%) patients, of whom, 50 (20.49%) were resistant to clarithromycin, 7 (2.86%) were resistant to levofloxacin only, and 6 (2.45%)

基金项目:深圳科技创新委员会立项项目(JCYJ20150403091443320)

作者单位:北京大学深圳医院消化内科,广东,深圳 518036

*通信作者:王俊萍, E-mail: wjp2006sz@aliyun.com

were dual resistant to clarithromycin and levofloxacin. The phenotype frequencies of EM, IM, and PM were 40.08%, 58.26%, and 1.65%, respectively. Of 242 patients receiving personalized quadruple therapy, 240 were compliant with the 14-day therapy. *H. pylori* eradication was achieved in 220 patients, resulting in an overall eradication rate of 91.67%. The eradication rates of EM, IM and PM were 89.58%, 92.86% and 100%, respectively, and the difference was not statistically significant ($P>0.05$). **Conclusions** Compared with traditional detection methods, visual gene chip technology can provide accurate metabolic type of CYP2C19 and clarithromycin and levofloxacin resistance at the same time, guide clinical medication, and has good clinical application value.

[KEY WORDS] *H. pylori*; Gene chip analysis; Polymorphism; Drug resistance; Personalized therapy

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H.pylori*)的发现是对上胃肠道疾病重新认识的里程碑,已经确认它与慢性活动性胃炎、消化性溃疡、胃癌以及胃黏膜相关淋巴组织(MALT)淋巴瘤的发病密切相关,WHO国际癌症机构确定的I类致癌因子^[1]。我国 *H.pylori* 感染率高达 50%^[2]。但是近年来 *H.pylori* 根除率愈来愈低^[3]。2012 年我国标准三联疗法 *H.pylori* 根除率只有 73.5%^[4]。主要原因 *H.pylori* 耐药率不断增长和质子泵抑制剂(proton pump inhibitor, PPI)在不同患者体内的代谢速度存在差别,最终影响 *H.pylori* 的根除效果^[5]。因此,克服上述原因、提高 *H.pylori* 的根除率是摆在临床医生面前的难题。本研究利用可视化基因芯片检测技术,在 *H.pylori* 初始治疗前进行左氧氟沙星、克拉霉素等抗生素耐药性及 CYP2C19 基因多态性的检测,根据测试结果给予患者“个体化”*H.pylori* 根除治疗,评价其优越性。

1 材料与方法

1.1 研究对象

选取 2015 年 5 月至 2017 年 5 月因上消化道症状于本院行胃镜检查患者 244 例,其中,男性 141 例,女性 103 例,年龄为 24~78 岁,男女的平均年龄分别为 (47.3 ± 12.79) 岁和 (51.2 ± 14.02) 岁。

入选标准:①¹³C 呼气试验和胃粘膜组织快速尿素酶染色均阳性确认 *H.pylori* 现症感染;②胃镜表现为慢性胃炎伴糜烂或消化道溃疡;③符合 2012 年中国专家共识意见中^[2]根除 *H.pylori* 的适应症,且均为初次根除治疗患者;④所有患者均无胃镜检查的禁忌症,无青霉素过敏史。排除标准:①入组前 1 月内曾服用可能影响研究结果的药物,如抗生素、铋剂、PPI、或 H₂ 受体阻滞剂者;②消化道出血;③消化道恶性肿瘤;④对本研究的所有药物有过敏史;⑤严重肝病、心脏病、呼吸系统疾病、

肾功能衰竭等严重疾病;⑥妊娠或哺乳期妇女;⑦精神病、严重神经官能症等。本研究通过北京大学深圳医院伦理委员会审批,遵循赫尔辛基宣言,所有受试者均签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 Hp 耐药性及 CYP2C19 基因型多态性检测

采用深圳市普瑞康生物技术有限公司提供的幽门螺杆菌感染个体化治疗检测试剂盒(基因芯片法)。按照说明书操作。

1.2.2 Hp 个体化治疗方案

主要依据第四次全国 *H.pylori* 感染处理共识报告推荐铋剂四联方案:PPI+铋剂+两种抗生素^[2],疗程 14 天。铋剂选用胶体果胶铋胶囊 200 mg/次, bid。抗生素依据左氧氟沙星和克拉霉素的耐药情况选择用药,方案有以下三种:方案 1:如果对左氧氟沙星和克拉霉素均耐药,则选用阿莫西林+呋喃唑酮;方案 2:如果对克拉霉素敏感,对左氧氟沙星耐药,则选用阿莫西林+克拉霉素;方案 3:如果对克拉霉素耐药,对左氧氟沙星敏感,则选用阿莫西林+左氧氟沙星。剂量分别为:阿莫西林 1.0g/次, bid;克拉霉素 0.5g/次, bid;左氧氟沙星 0.5g/次, qd;呋喃唑酮 0.1g/次, bid。PPI 根据人 CYP2C19 基因多态性选择用药,具体方案:1、强代谢型(EM 型)、中间代谢型(IM 型)选用雷贝拉唑 10 mg/次, bid;2、弱代谢型(PM 型)选用泮托拉唑 40 mg/次, bid。

1.2.3 根除成功标准

治疗 1、2 周及结束后 3 天电话随访,评价不良反应及依从性。治疗结束 4 周后进行¹³C 尿素呼气试验检测,若结果阴性,提示 Hp 根除成功。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 19.0 软件进行数据分析,计量资料采用 *t* 检验,以 $(\bar{x}\pm s)$ 表示,计数资料用 *n*(%)表示,采用 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 抗生素耐药检测结果

任意一个突变点显示阳性判定为耐药,不同基因组两个以上突变点显示阳性则判定双重或多重耐药。见表1。

表1 H.pylori 抗生素耐药检测结果 [n(%)]

Table 1 H.pylori antibiotic resistance test results [n(%)]

基因位点	左氧氟沙星耐药	克拉霉素耐药	双重耐药
Asn87	5(2.04)		
Asp91	2(0.82)		
A2142G		18(7.37)	
A2143G		32(13.12)	
Asn87、A2142G			2(0.82)
Asn87、A2143G			3(1.22)
Asn91、A2143G			1(0.41)
合计	7(2.86)	50(20.49)	6(2.45)

2.3 CYP2C19 基因多态性结果

CYP2C19基因型结果判断:CYP2C19*1/*1为EM型; CYP2C19*1/*2、CYP2C19*1/*3 为IM型; CYP2C19*2/*2、CYP2C19*2/*3和CYP2C19*3/*3为PM型。244例胃粘膜样本中检出CYP2C19的代谢基因型有242例(99.18%),未检出有2例(0.82%)。见表2。

表2 CYP2C19 基因多态性分布统计 [n(%)]

Table 2 Distribution statistics of CYP2C19 gene polymorphism [n(%)]

基因位点	强代谢型 EM	中代谢型 IM	弱代谢型 PM
2C19*1/*1	97		
2C19*1/*2		73	
2C19*1/*3		68	
2C19*2/*2			1
2C19*2/*3			2
2C19*3/*2			1
合计	97(40.08)	141(58.26)	4(1.65)

2.3 各代谢型 Hp 根除率比较

同时检测出代谢基因型及耐药情况的242例患者中240例完成治疗,2例因药物副作用未能坚持服药。各代谢型幽门杆菌根除率比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表3。

表3 各代谢型幽门杆菌根除率比较

Table 3 Comparison of eradication rate of H.pylori in different metabolic types

CYP2C19 分型	例数	根除例数	根除率(%)
强代谢型	96	86	89.58
中间代谢型	140	130	92.86
弱代谢型	4	4	100.00
χ^2 值			1.208
P 值			>0.05

3 讨论

全球约超过一半的人口存在 H.pylori 感染,近年来我国的感染率呈逐年上升的趋势^[6]。在这些感染者中约 15%~20%发生消化性溃疡,约 5%发生胃恶性肿瘤(胃癌、MALT 淋巴瘤)^[7]。目前,由于抗生素耐药性的产生以及 CYP2C19 的基因多态性导致 Hp 根除率越来越低,根治越来越困难。国内的几项大样本研究也显示标准三联疗法根除率远低于 80%的最低要求。

近年来我国 H.pylori 对左氧氟沙星和克拉霉素的耐药率不断攀升^[8]。韩一凡等^[9]研究显示, H.pylori 对克拉霉素和左氧氟沙星的耐药率分别为 20.8%和 8.9%;且耐药率逐年上升。本研究显示, H.pylori 对克拉霉素为 22.95%,与国内外的平均水平相近。根据我国第五次幽门螺杆菌感染处理共识报告,当克拉霉素耐药率>15%,选用含克拉霉素三联治疗方案前应进行药物敏感试验^[10]。故在广东深圳地区, H.pylori 根除方案若选用克拉霉素,建议行该药物耐药性检测。本研究中,左氧氟沙星的耐药率仅为 5.33%,明显低于国内外学者的报告,故推荐左氧氟沙星作为本地区根除 H.pylori 治疗方案的首选药物。

H.pylori 根除方案均含有 PPI^[11]。PPI 在根除 H.pylori 治疗中的主要作用是减少胃酸对胃黏膜损害,并能通过各种机制增强胃内抗生素的抑菌和杀菌能力^[12]。PPI 经肝脏 CYP450 酶的 CYP2C19、CYP3A4 代谢,其中 CYP2C19 起主导作用。CYP2C19 存在多种突变等位基因,其中 CYP2C19*2 和 CYP2C19*3 是功能缺失等位基因,均能造成 CYP2C19 酶活性的降低或完全丧失,根据 CYP2C19 基因多态性分为:EM、IM 和 PM 三种表型,其药物代谢能力表现为 EM>IM>PM, PM 型体内药物的代谢能力最弱,体内药物浓度高。在亚洲人群中, CYP2C19 基因型主要为 EM 型及 IM 型这两种表型, PM 型的比例较少^[13]。本研究结果与上述研究结论一致。不同的 PPI 受 CYP2C19 影响作用程度不同。奥美拉唑、泮托拉唑和兰索拉唑主要经 CYP2C19 代谢,故这三种药受 CYP2C19 基因多态性影响较大,在根除 H.pylori 治疗效果会存在明显的个体差异。因此,在 EM 型和 IM 型患者中不建议这三种药用于 H.pylori 根除治疗。雷贝拉唑具有酶代谢和非酶代谢两条途径,但主要是经非酶

代谢,故其受 CYP2C19 基因多态性影响较小^[14]。对于 EM 型和 IM 型,笔者选用受 CYP2C19 基因多态性影响较小的雷贝拉唑,而 PM 型药物代谢慢,血药浓度高,则选用泮托拉唑进行 H.pylori 根除治疗。

本研究结果显示 CYP2C19 基因多态性的测定选用合适的 PPI,减少 PPI 在根除 H.pylori 治疗中存在的个体差异,能明显提高 H.pylori 根除效果。本研究结果提示个体化 H.pylori 根除治疗可能是未来最有效而持久的治疗方法。

基因芯片技术是近年可同时进行基因多位点的多态性分型检测的新技术,具有信息量大、灵敏度高、平行快速检测等特点。李云振^[15]已提出基因检测技术是未来 H.pylori 抗生素耐药性检测的发展方向。姚雪等^[16]建立了一种可同时检测幽门螺杆菌喹诺酮和克拉霉素耐药和 CYP2C19 基因多态性的基因芯片,试验证明其具有较高的特异性和敏感性,结果准确且易判读。本研究采用了此技术指导临床进行 H.pylori 个体化治疗,取得了满意的治疗效果,值得临床推广。

参考文献

- [1] Hosseini E, Poursina F, de Wiele TV, et al. Helicobacter pylori in Iran: a systematic review on the association of genotypes and gastroduodenal diseases [J]. J Res Med Sci, 2012, 17(3):280-292.
- [2] 刘文忠, 谢勇, 成红, 等. 第四次全国幽门螺旋杆菌感染处理共识报告[J]. 中华消化杂志, 2012, 32(10):655-661.
- [3] 王雪, 李异玲, 吕晓辉. 我国幽门螺杆菌感染的现状分析[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2017, 26(6):640-643.
- [4] Xue Y, Feng H, Zhou LY, et al. Analysis of related factors of H.Pylori eradication therapy efficiency [J]. Chin J Pract Int Med, 2012, 14(4):333.
- [5] Strom CM, Goos D, Crossley B, et al. Testing for variants in CYP2C19: population frequencies and testing experience in a clinical laboratory [J]. Genet Med, 2012, 14(1):95-100.
- [6] Nagy P, Johansson S, Molloy-Bland M. Systematic review of time trends in the prevalence of Helicobacter pylori infection in China and the USA [J]. Gut Pathog, 2016, 8:8.
- [7] Sugano K. Screening of gastric cancer in Asia [J]. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2015, 29(6):895-905.
- [8] Zhang YX, Zhou LY, Song ZQ, et al. Primary antibiotic resistance of Helicobacter pylori strains isolated from patients with dyspeptic symptoms in Beijing: a prospective serial study [J]. World J Gastroenterol, 2015, 21(9):2786-2792.
- [9] 韩一凡, 于新娟, 王莉莉, 等. 中国幽门螺杆菌耐药情况研究[J]. 胃肠病学及肝病学杂志, 2017, 26(6):664-668.
- [10] Graham DY, Laine L. The Toronto Helicobacter pylori Consensus in Context [J]. Gastroenterology, 2016, 151(1):9-12.
- [11] Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain CA, et al. Management of Helicobacter pylori infection - the Maastricht V/Florence Consensus Report [J]. Gut, 2017, 66(1):6-30.
- [12] Gisbert JP. Potent gastric acid inhibition in Helicobacter pylori eradication [J]. Drugs, 2005, 65(Suppl 1):83-96.
- [13] Kuo CH, Lu CY, Shih HY, et al. CYP2C19 polymorphism influences Helicobacter pylori eradication [J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(43):16029-36.
- [14] Gardiner SJ, Begg EJ. Pharmacogenetics, drug-metabolizing enzymes, and clinical practice [J]. Pharmacol Rev, 2006, 58(3):521-90.
- [15] 李云振, 葛安国, 王庆波, 等. 幽门螺杆菌抗生素耐药性基因检测: 下一步? [J]. 分子诊断与治疗杂志, 2015, 7(2):132-139.
- [16] 姚雪, 刘琪琦, 赵青, 等. 应用可视化基因芯片技术检测幽门螺杆菌感染个体化药物治疗相关基因[J]. 中国生物工程杂志, 2013, 33(4):92.

(上接第 448 页)

- [1] 效果[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2019, 21(10):1050-1053.
- [3] 张辉, 庄万强, 唐毅, 等. 纤维蛋白单体和 D-二聚体联合检测在老年髋部骨折患者术后深静脉血栓形成中的预测价值[J]. 疑难病杂志, 2019, 18(8):827-830.
- [4] 林立龙, 马煜盛, 林子祥, 等. 高密度脂蛋白颗粒、C 反应蛋白在冠心病合并 2 型糖尿病患者中的临床意义[J]. 实用医学杂志, 2019, 35(12):1920-1925.
- [5] 蒋跃斌, 王培利, 付长庚, 等. 冠状动脉血运重建术后心绞痛中西医结合诊疗指南[J]. 中国中西医结合杂志, 2020, 40(11):1298-1307.
- [6] 程军涛, 李芳. 不同冠脉搭桥术对冠心病患者肾功能及心功能的影响[J]. 临床心身疾病杂志, 2018, 24(6):48-52.
- [7] 刘宇红, 马腾, 袁芳琪, 等. 邢台市干部职工冠状动脉粥样硬化性心脏病及危险因素的调查研究[J]. 华南预防医学, 2020, 46(3):290-293.
- [8] 李丽, 赵强, 盖鲁粤, 等. 冠状动脉旁路移植术后移植血管的转归及影响因素分析[J]. 中国循环杂志, 2017, 32(2):128-131.
- [9] 叶静. ACS 患者 TpP, sCD163 水平变化与冠脉病变严重程度相关性分析[J]. 医学临床研究, 2019, 36(11):2254-2256.
- [10] Rivera-Caravaca JM, Roldán V, Romera M, et al. Soluble Fibrin Monomer Complex and Prediction of Cardiovascular Events in Atrial Fibrillation: The Observational Murcia Atrial Fibrillation Project [J]. J Gen Intern Med, 2018, 33(6):847-854.
- [11] Gupta N, Zhao YY, Evans CE. The stimulation of thrombosis by hypoxia [J]. Thromb Res, 2019, 181(1):77-83.
- [12] 陈传良. 动脉粥样硬化患者检测 Lp(a), hs-CRP, D-Dimer 的临床意义[J]. 中国实验诊断学, 2018, 22(7):1168-1169.

· 论 著 ·

血清 GDF-15、sST2 与慢性心力衰竭患者心功能的相关性分析及对预后的评估

段洪强^{1*} 闫鹏¹ 祁娜²

[摘要] **目的** 探索血清生长分化因子-15(GDF-15)、可溶性生长刺激表达基因 2 蛋白(sST2)与慢性心力衰竭患者心功能的相关性及对预后的评估价值。**方法** 选取 2017 年 5 月至 2020 年 5 月本院收治的 CHF 患者 146 例为研究组。另选取同期体检的健康人 52 例为对照组,观察两组在血清 GDF-15、sST2 与心功能的差异,并进行相关性分析,随访研究组预后情况,分析血清 GDF-15、sST2 对预后评估的价值。**结果** IV 级 CHF 患者血清 GDF-15、sST2 水平、LAD、LVEDD>Ⅲ级>Ⅱ级>对照组($P<0.05$),LVEF IV 级<Ⅲ级<Ⅱ级<对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);血清 GDF-15、sST2 与 LAD、LVEDD 存在显著正相关($P<0.05$),与 LVEF 呈显著负相关($P<0.05$),ROC 曲线分析显示,血清 GDF-15、sST2 水平对 CHF 患者预后不良的预测的 AUC 为 0.946、0.954,两项联合预测 AUC 为 0.965。**结论** 慢性心力衰竭患者血清 GDF-15、sST2 水平随心衰程度加重而升高,具有较高预后预测价值,且联合预测准确性更好。

[关键词] 慢性心力衰竭; GDF-15; sST2; 心功能; 预后

Correlation between serum GDF-15、sST2 and cardiac function in patients with chronic heart failure and evaluation of prognosis

DUAN Hongqiang^{1*}, YAN Peng¹, QI Na²

(1. The First Affiliated Hospital of Henan University of Science and Technology, Department of Cardiovascular Medicine, Luoyang, Henan, China, 471000; 2. Department of Endocrinology, The First Affiliated Hospital of Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan, China, 471000)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the correlation between serum GDF-15、sST2 and cardiac function in patients with chronic heart failure (CHF) and evaluate the prognosis. **Methods** A retrospective study of 146 patients with CHF admitted to our hospital from May 2017 to May 2020 was conducted. In addition, 52 healthy people in the control group who underwent physical examination during the same period were selected to observe the difference between the two groups in serum GDF-15, sST2 and cardiac function, and perform correlation analysis. The prognostic status of the study group was followed up, and the prognostic value of serum GDF-15 and sST2 was analyzed. **Results** Serum GDF-15、sST2 levels, LAD、LVEDD > grade III > grade II > the control group (LAD、LVEDD>0.05), LVEF IV < III < II < the control group, the difference was statistically significant ($P<0.05$). There was a significant positive correlation between serum GDF-15、sST2 and LAD、LVEDD ($P<0.05$), and significant negative correlation with LVEF ($P<0.05$). ROC curve analysis shows that the AUC of serum GDF-15、sST2 levels to predict poor prognosis in CHF patients was 0.946 and 0.954, the combination of the two was 0.965. **Conclusion** The serum GDF-15、sST2 levels in patients with chronic heart failure increase with the degree of heart failure, which has a higher prognostic value, and the combined prediction accuracy is better.

[KEY WORDS] Chronic heart failure; GDF-15; SST2; Cardiac function; Prognosis

基金项目:洛阳市医疗卫生科研专项(2001029A)

作者单位:1. 河南科技大学第一附属医院心血管内科,河南,洛阳 471000

2. 河南科技大学第一附属医院内分泌科,河南,洛阳 471000

*通信作者:段洪强, E-mail: dhq831204@163.com

心力衰竭是指因心肌病、血流动力学负荷过重引发的心肌损伤,使心肌功能、结构发生改变,导致心室泵血充盈功能减弱,从而引发心力衰竭。慢性心力衰竭(chronic heart failure, CHF)是心力衰竭的持续存在状态,预后差,具有较高病死率。早期发现评估病情是临床针对治疗的重要手段,目前,临床诊治CHF主要依据为脑钠肽标志物联合心动图检查,但心动图易受医生水平与患者依从性影响,脑钠肽临床诊断特异性不佳,因此,临床需寻找敏感性、特异性更好的标志物辅助CHF病情评估与预后判断^[1]。有研究表明:生长分化因子-15(growth differentiation factor -15, GDF-15)是转化因子 β 家族的一员,参与心血管疾病发病过程,对心及细胞结构及凋亡程序具有调节作用;可溶性生长刺激表达基因2蛋白(soluble growth STimulation expressed gene 2, sST2)是白细胞介素1受体/Toll样受体超家族的成员,在CHF病理机制过程发挥重要作用,其分泌量于心肌细胞负荷改变时升高^[2-3]。目前,临床有关血清GDF-15、sST2与CHF患者心功能、预后研究尚缺,基于此,本研究旨在血清GDF-15、sST2与慢性心力衰竭患者心功能的相关性分析及对预后的评估价值。现报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2017年5月至2020年5月本院收治的CHF患者146例为研究组,男性85例、女性61例,平均年龄(57.22 ± 10.13)岁,基础疾病:冠心病40例、扩张性心肌35例、酒精性心肌病39例、高血压心脏病32例。心脏功能分级:Ⅱ级58例、Ⅲ级51例、Ⅳ级37例。另选取同期体检的健康人52例为对照组。男性33例、女性19例,平均年龄(56.54 ± 10.08)岁。两组一般资料比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。所有研究患者及家属均知情且签署同意书,本研究符合《赫尔辛基宣言》中的伦理审查标准。

纳入标准:①经病理诊断确诊为慢性心力衰竭患者。排除标准:①临床资料不全患者;②合并感染性疾病患者;③合并肝肾障碍及其他恶性肿瘤患者;④免疫功能障碍患者;⑤妊娠期哺乳期妇女。

1.2 方法

血清GDF-15、sST2检测:采用酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测血清GDF-15、sST2水平,检测操作严格按照试剂盒说明进行,试剂盒供自上海恒科生物科技有限公司。

心功能指标:采用彩色多普勒超声仪,频率为2.0~4.0 MHz检测左心房内径(left atrial diameter, LAD)、左心室舒张期末内径(left ventricular end diastolic diameter, LVEDD)、左心室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)、检测过程由两名医师共同进行,测试3次,取平均值。

随访:通过复查与电话联系方式对所有心力衰竭患者进行6个月的随访,记录不良事件发生情况:心力衰竭加重再入院或心血管疾病死亡。

以血清GDF-15、sST2水平回归系数得出两项联合的数值计算公式为:两项联合=GDF-15+(-10.238)/(-0.016)*sST2,统计分析得出联合数据。

1.3 观察指标

①心功能分级采用NYHA评级法^[4]:Ⅰ级、Ⅱ级、Ⅲ级、Ⅳ级。②观察对比两组受检人员血清GDF-15、sST2、心功能指标差异。

1.4 统计学处理

采用统计软件SPSS22.0进行处理。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 t 检验,多组间比较用方差分析。相关性分析采用Spearman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,曲线下面积(AUC) $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组受检人员血清GDF-15、sST2水平比较

研究组患者血清GDF-15、sST2水平显著高于对照组,且Ⅳ级>Ⅲ级>Ⅱ级>对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表1。

表1 各组受检人员血清GDF-15、sST2水平比较($\bar{x} \pm s$)

项目	<i>n</i>	GDF-15(pg/mL)	sST2(ng/mL)
研究组	146	1349.19±137.25	1.19±0.35
Ⅱ级	58	831.45±126.23	0.51±0.16
Ⅲ级	51	1152.7±137.92	0.85±0.21
Ⅳ级	37	1623.31±130.18	2.37±0.32
对照组	52	528.83±142.2	0.37±0.11
<i>F</i> 值	—	277.848	238.977
<i>P</i> 值	—	0.000	0.000

2.2 各组受检人员心功能指标比较

各组LAD、LVEDD水平比较:且Ⅳ级>Ⅲ级>Ⅱ级>对照组;LVEF显著低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表2。

表2 各组受检人员心功能指标比较 ($\bar{x} \pm s$)Table 2 Comparison of cardiac function indexes between each groups ($\bar{x} \pm s$)

项目	n	LAD(mm)	LVEDD(mm)	LVEF(%)
研究组	146	46.21±7.51	66.13±10.73	46.72±11.88
Ⅱ级	58	44.61±6.85	56.14±5.86	54.36±5.75
Ⅲ级	51	45.85±7.35	60.01±6.23	48.39±6.07
Ⅳ级	37	46.87±7.55	65.10±5.91	44.57±5.98
对照组	52	31.81±4.72	47.71±4.41	60.56±6.02
F值	—	0.669	15.690	13.846
P值	—	0.614	0.000	0.000

2.3 CHF患者血清GDF-15、sST2与心功能的相关性

Spearman 相关性结果显示:血清 GDF-15、sST2 与 LAD、LVEDD 存在显著正相关,与 LVEF 呈显著负相关($P<0.05$)。见表3。

表3 慢性心力衰竭患者血清GDF-15、sST2与心功能的相关性

Table 3 Correlation between serum GDF-15, sST2 and cardiac function in patients with chronic heart failure

变量		LAD	LVEDD	LVEF
GDF-15	r值	0.665	0.813	-0.571
	P值	0.000	0.000	0.000
sST2	r值	0.598	0.777	-0.488
	P值	0.000	0.000	0.000

2.4 慢性心力衰竭患者随访结局

通过6个月随访,146例CHF患者中,预后不良患者48(32.88%)例,包括死亡6例,再入院42例,其中Ⅱ级患者8例、Ⅲ级患者17例、Ⅳ级患者23例。

两组患者在年龄、性别、基础疾病上比较,差异无统计学意义($P>0.05$),但预后不良组患者血清GDF-15、sST2水平显著高于预后良好组,差异有

统计学意义($P<0.05$)。见表4。

2.5 慢性心力衰竭患者预后 Logistic 回归分析

以“预后不良”为因变量(赋值:0=是,1=否),以“血清GDF-15、sST2水平”为自变量,纳入 Logistic 回归分析。多因素 Logistic 回归分析显示,血清GDF-15、sST2水平均为CHF患者预后不良的相关影响因素($P<0.05$),见表5。

表5 慢性心力衰竭患者预后 Logistic 回归分析

Table 5 Logistic regression analysis of prognosis of patients with chronic heart failure

相关因素	B	S.E.	Wald	自由度	Exp(B)	95%CI	P值
GDF-15	-0.016	0.003	39.964	1	0.984	0.979~0.989	0.000
sST2	-10.238	1.729	35.041	1	0.000	0.000~0.001	0.000

2.6 血清GDF-15、sST2水平及两项联合对慢性心力衰竭患者预后不良预测价值

ROC 曲线分析显示,两项联合预测 AUC 为 0.965,敏感度、特异度为 89.6%、93.90%,均比单一预测值高($P<0.05$)。见图1、表6。

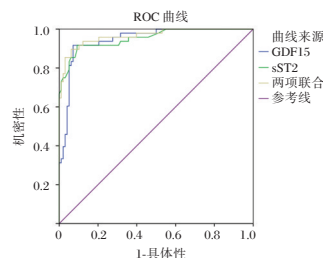


图1 血清GDF-15、sST2水平及两项联合对CHF患者预后不良预测ROC曲线

Figure 1 Curve of predicting poor prognosis of CHF patients with serum GDF-15, sST2 level and ROC combination

表4 预后不良组与预后良好组一般资料比较 [$n(\%)$, ($\bar{x} \pm s$)]Table 4 Comparison of General Data of Prognostic Group and Prognostic Group [$n(\%)$, ($\bar{x} \pm s$)]

相关因素	预后不良组($n=48$)	预后良好组($n=98$)	χ^2/t 值	P值
年龄(岁)	56.83±4.53	58.85±8.55	1.217	0.225
性别(男/女)	25(52.08)/23(47.92)	60(61.22)/38(38.78)	1.107	0.293
基础疾病				
冠心病	12(25.00)	28(28.57)		
扩张性心肌	13(27.08)	22(22.45)		
酒精性心肌	11(22.92)	28(28.57)	0.515	0.473
高血压心脏病	12(25.00)	20(20.41)		
GDF-15(pg/mL)	1531.54±126.31	1223.34±130.28	13.562	0.000
sST2(ng/mL)	1.81±0.25	1.24±0.22	14.054	0.000

表6 血清GDF-15、sST2水平及两项联合对CHF患者预后不良预测价值

Table 6 Prognostic value of serum GDF-15, sST2 level and two combinations in CHF patients

预测项目	AUC	S.E.	P值	95%CI	cut-off值	敏感度(%)	特异度(%)	约登指数
GDF-15	0.946	0.019	0.000	0.909~0.982	1397.895	91.7	92.9	0.846
sST2	0.954	0.018	0.000	0.917~0.990	1.48	91.7	90.8	0.825
两项联合	0.965	0.015	0.000	0.935~0.995	2442.4269	89.6	93.9	0.835

3 讨论

CHF是心血管疾病的最终阶段,对心脏可产生不可逆转的损伤,威胁患者身心健康与生命安全^[5]。主要表现为外周血流分布异常、心室功能不全及神经内分泌激活异常,且其具有进展性特征,处于稳定阶段亦会病情加重^[6]。因此,早期诊断评估CHF病情有利于制定治疗方案,改善患者预后。GDF-15是于1997年首次提出的一种应激反应蛋白,表达具有组织特异性,其于生理状态下在多数其他组织中呈微表达(如心脏组织),但其在缺血、心肌再灌注损伤、心脏高压负荷、氧化应激及心力衰竭等病例情况下表达增加。既往研究表明:GDF-15是心脏保护因子,与心血管疾病诊断、病情分级及预后判断相关密切^[7]。分泌性血清蛋白sST2与跨膜型血清蛋白ST2L是ST2的基因编码,ST2L参与构成受体复合(白介素IL-33),且IL-33/ST2L信号通路具有抗心肌纤维化与心肌细胞肥大功能,sST2是一种诱骗受体,可通过中和IL-33阻断信号通路,减弱心脏保护效应^[8]。本研究结果提示CHF患者血清GDF-15、sST2含量更高,心功能不佳,且随着心功能损伤增加,血清GDF-15、sST2含量、LAD、LVEDD升高,LVEF降低。分析原因可能为^[9-10]:CHF患者病情加重后,心室压力与机械应力增加,CHF患者存在不同程度心室重建与功能异常,使心肌细胞缺血程度加重。因此,与正常人比较CHF患者心室功能不全,LAD、LVEDD上升、LVEF降低,且随着NYHA分级增加,病情加重,数值变化更大。且本研究显示:血清GDF-15、sST2水平与心功能存在一定相关性,分析原因可能为^[11-12]:CHF患者心功能受损使心肌细胞凋亡,血清GDF-15具有抑制细胞凋亡作用,当患者心脏负荷压力增加发生损伤时,对心功能相应产生阻碍;sST2介导CHF病例进展,sST2大量分泌可阻断IL-33/ST2L心肌保护效果,引发心肌重建、心室功能障碍,使病情加重,继而心功能损伤加重。

介于血清GDF-15、sST2水平异常高表达与心功能及病情程度相关密切,本研究通过做ROC曲线分析显示,血清GDF-15、sST2水平对CHF患者预后不良的预测具有较高价值。且联合预测价值准确性更佳。研究表明:CHF患者伴随心功能恶化,预后不良,血清GDF-15、sST2水平与CHF患者心室重建与病情程度相关密切,可作为预后评

估生物标志物,指导临床治疗,且多指标联合预测价值更好,与本研究结论一致^[13-14]。

综上所述,慢性心力衰竭患者血清GDF-15、sST2呈现高表达,与心功能呈负相关,具有较高预后预测价值,且联合预测准确性更好,可作为心脏标志物,为临床治疗CHF提供指导。

参考文献

- [1] Jirak P, Fejzic D, Paar V, et al. Influences of Ivabradine treatment on serum levels of cardiac biomarkers sST2, GDF-15, suPAR and H-FABP in patients with chronic heart failure [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2018, 39(7):1189-1196.
- [2] 王飞, 霍志成, 卢翠碧, 等. sST2对不同类型慢性心力衰竭预后的预测价值[J]. *心脑血管病防治*, 2019, 19(6):561-563.
- [3] 张建起, 梅金平, 石蕊, 等. 血清生长分化因子15与慢性心力衰竭患者的相关性研究[J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2017, 19(006):573-576.
- [4] 朱小刚, 韩凌, 陈欣, 等. 左室射血分数保留的心力衰竭患者心功能评价的相关因素分析[J]. *临床和实验医学杂志*, 2017, 16(19):1918-1922.
- [5] Bajaj NS, Patel N, Prabhu SD, et al. Effect of NT-proBNP-Guided Therapy on All-Cause Mortality in Chronic Heart Failure With Reduced Ejection Fraction [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2018, 71(8):951-952.
- [6] 李新艳, 黄嘉文. 慢性心力衰竭中医证型与可溶性ST2、NYHA分级的相关性分析[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2018, 16(5):598-600.
- [7] 吕海珍, 吕云, 周荣, 等. 血清HCY、sST2和NT-proBNP联合检测对慢性心力衰竭诊断及心功能评价的价值[J]. *中国实验诊断学*, 2019, 23(6):1002-1006.
- [8] 彩玲, 张华钊, 孙淑红. 血清NT-proBNP、D-二聚体、ST2水平与COPD合并呼吸衰竭患者预后的相关性分析[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2020, 12(2):229-233.
- [9] 秀艳, 赵晓辉, 王立波, 等. 慢性心力衰竭患者血清sST2与和肽素水平变化及相关性分析[J]. *心血管康复医学杂志*, 2017, 26(1):49-51.
- [10] 丁才智, 李剑峰, 任力, 等. 血清肝细胞生长因子、生长分化因子-15在慢性心力衰竭患者的表达及其意义[J]. *山东医药*, 2019, 59(22):12-15.
- [11] 许卓帆, 郑韶欣, 叶贤区, 等. 慢性心力衰竭患者血清sST2、Galectin-3水平变化及临床意义[J]. *中国循证心血管医学杂志*, 2020, 12(1):47-49+53.
- [12] 曾显明, 董喜梅, 冯辉. 伊伐布雷定治疗慢性心力衰竭的疗效及其对患者血清GDF-15、sST2水平的影响[J]. *海南医学*, 2019, 30(21):2740-2743.
- [13] 郭影, 胡泽平, 圣波, 等. 肝细胞生长因子、生长分化因子-15对慢性心力衰竭的诊断和预后价值[J]. *安徽医科大学学报*, 2018, 53(11):1775-1780.
- [14] 祝建宙, 陈小玲, 徐迅科. 血清sST2在慢性心力衰竭心功能分级及预后评估中的价值[J]. *现代仪器与医疗*, 2019, 25(6):42-45.

· 论 著 ·

¹⁸F-FDG PETCT联合血清SCC-Ag对宫颈鳞癌腹膜后淋巴结转移的诊断价值

韩超¹ 王朝栋² 赵宝琼¹ 康雯雯¹ 柴丽娟¹ 何飞^{3*}

[摘要] 目的 研究¹⁸氟-脱氧葡萄糖正电子发射型计算机断层扫描(¹⁸F-FDG PET-CT)联合血清鳞状细胞癌抗原(SCC-Ag)对宫颈鳞癌患者腹膜后淋巴结转移的诊断价值。方法 选取2018年9月至2020年10月医院收治的106例宫颈鳞癌患者的临床资料,根据术后病理结果,分为转移组($n=23$)、未转移组($n=83$),比较各组术前血清SCC-Ag水平及¹⁸F-FDG PET-CT检查情况,以受试者工作曲线(ROC)评价¹⁸F-FDG PET-CT和SCC-Ag对腹膜后淋巴结转移的诊断效能。结果 转移组宫颈鳞癌患者术前血清SCC-Ag水平、¹⁸F-FDG PET-CT检查最大标准化摄取值(SUVmax)均显著高于未转移组,差异有统计学意义($P<0.05$)。以术前血清SCC-Ag $>3.61\text{ }\mu\text{g/L}$ 为截断点,此时ROC曲线下面积(AUC)为0.806,诊断出36例宫颈鳞癌患者腹膜转移、70例宫颈鳞癌未合并腹膜转移,血清SCC-Ag评估的准确率、敏感性、特异性分别为74.53%、69.57%、75.90%。取术前¹⁸F-FDG PET-CT检查SUVmax >12.08 为截断点,此时ROC曲线AUC为0.729,诊断出41例宫颈鳞癌患者腹膜转移、65例宫颈鳞癌未合并腹膜转移,¹⁸F-FDG PET-CT评估的准确率、敏感性、特异性为73.58%、78.26%、72.29%。术前血清SCC-Ag和SUVmax串联评估宫颈鳞癌患者腹膜转移的准确率、敏感性、特异性为82.08%、82.61%、81.93%。结论 以术前¹⁸F-FDG PET-CT检查SUVmax >12.08 、血清SCC-Ag $>3.61\text{ }\mu\text{g/L}$ 诊断宫颈鳞癌患者合并腹膜后转移的效能最好,二者联合可提升诊断准确性。

[关键词] 正电子发射型计算机断层扫描; 宫颈鳞癌; 鳞状细胞癌抗原; 腹膜后淋巴结转移

Diagnostic value of ¹⁸F-FDG PETCT combined with serum SCC-Ag for retroperitoneal lymph node metastasis of cervical squamous cell carcinoma

HAN Chao¹, WANG Chaodong², ZHAO Baoqiong¹, KANG Wenwen¹, CHAI Lijuan¹, HE Fei^{3*}

(1. Department of Radiology, General Hospital of Pingmei Shenma Medical Group, Pingdingshan, Henan, China, 467000; 2. Department of Nuclear Medicine, General Hospital of Pingmei Shenma Medical Group, Pingdingshan, Henan, China, 467000; 3. Department of Gynaecology and Obstetrics, General Hospital of Pingmei Shenma Medical Group, Pingdingshan, Henan, China, 467000)

[ABSTRACT] **Objective** To study the diagnostic value of ¹⁸F-fluorodeoxyglucose positron emission computed tomography (¹⁸F-FDG PET-CT) combined with serum squamous cell carcinoma antigen (SCC-Ag) for retroperitoneal lymph node metastasis in patients with cervical squamous cell carcinoma (CSCC). **Methods** The clinical data of 106 CSCC patients who were admitted to the hospital from September 2018 to October 2020 were retrospectively analyzed. According to postoperative pathological results, they were divided into metastasis group ($n=23$) and non-metastasis group ($n=83$). The preoperative level of serum SCC-Ag and ¹⁸F-FDG PET-CT examination in each group were compared. The diagnostic efficiency of ¹⁸F-FDG PET-CT and SCC-Ag for retroperitoneal lymph node metastasis was evaluated by receiver operator characteristic (ROC) curves. **Results** The preoperative level of serum SCC-Ag and the maximum standardized uptake value (SUV-

基金项目:河南省卫计委科技公关项目(182102310041)

作者单位:1. 平煤神马医疗集团总医院放射科,河南,平顶山 467000

2. 平煤神马医疗集团总医院核医学科,河南,平顶山 467000

3. 平煤神马医疗集团总医院妇产科,河南,平顶山 467000

*通信作者:何飞, E-mail: coolmanhan@163.com

max) in metastasis group were significantly higher than those in non-metastasis group ($P < 0.05$). Taking preoperative serum SCC-Ag $> 3.61 \mu\text{g/L}$ as the cut-off value, the area under the ROC curve (AUC) was 0.806. 36 cases of cervical squamous cell carcinoma patients with peritoneal metastasis and 70 cases of cervical squamous cell carcinoma without peritoneal metastasis were diagnosed. The accuracy, sensitivity and specificity of SCC-Ag assessment were 74.53%, 69.57% and 75.90%, respectively. Taking preoperative SUVmax > 12.08 as the cut-off value, the AUC was 0.729. 41 cases of cervical squamous cell carcinoma with peritoneal metastasis and 65 cases of cervical squamous cell carcinoma without peritoneal metastasis were diagnosed. The accuracy, sensitivity and specificity of ^{18}F -FDG PET-CT assessment were 73.58%, 78.26% and 72.29%. The accuracy, sensitivity and specificity of preoperative serum SCC-Ag combined with SUVmax (tandem way) for evaluating peritoneal metastasis were 82.08%, 82.61% and 81.93%. **Conclusion** Preoperative ^{18}F -FDG PET-CT examination with SUVmax > 12.08 and serum SCC-Ag $> 3.61 \mu\text{g/L}$ is the best in diagnosing patients with cervical squamous cell carcinoma with retroperitoneal metastasis. The combination of the two can improve the diagnostic accuracy.

[KEY WORDS] Positron emission tomography/computed tomography; Cervical squamous cell carcinoma; Squamous cell carcinoma antigen; Retroperitoneal lymph node metastasis

宫颈癌(Cervical carcinoma, CC)作为全球范围内常见的女性恶性肿瘤,其发病率呈升高趋势,以宫颈鳞癌(Cervical squamous cell carcinoma, CSCC)最为常见,其次为腺癌^[1-3]。CC患者的5年生存率仅半数左右,局部复发和远处转移是致死的主要原因,其中早期CC合并淋巴结转移往往预示着预后较差^[4]。目前,国际妇产科联盟(International Federation of Gynecology and Obstetrics, FIGO)制定的CC分期标准在临床广泛使用,而FIGO标准并不涵盖淋巴结转移等预后相关的因素,导致其对CC预后评估的准确性较差^[5]。为进一步准确地评估CSCC预后情况、制定个体化诊疗方案,本研究将 ^{18}F -脱氧葡萄糖正电子发射型计算机断层扫描(^{18}F -fluorodeoxyglucose positron emission computed tomography, ^{18}F -FDG PET-CT)联合血清鳞状细胞癌抗原(Serum squamous cell carcinoma antigen, SCC-Ag)应用于CSCC患者腹膜后淋巴结转移的诊断中,现报告如下。

1 资料和方法

1.1 一般资料

分析2018年9月至2020年10月医院收治的106例宫颈鳞癌患者的临床资料,均为女性,平均年龄(50.17 ± 6.13)岁,国际妇产科协会(Federation International of Gynecology and Obstetrics, FIGO)分期^[6]: I期10例、II期59例、III期37例,手术方式:开腹式广泛性子宫切除术28例、腹腔镜下广泛性子宫切除术78例。纳入标准:经术后病理学检查,观察到癌组织明显浸润至间质,肉眼观表现为内生浸润型、溃疡状或外生乳头状、菜花状,镜下观

癌细胞多为角型、大细胞型和小细胞型,确诊为宫颈鳞癌患者^[7],FIGO分期为I期~III期,术前行 ^{18}F -FDG PET-CT扫描及血样采集。排除标准:合并其它恶性肿瘤,合并先天免疫性疾病,合并皮肤病;临床病理及影像学检查资料不完整;FIGO分期 $\geq$ IV期。本研究经医院医学伦理委员会批准通过,所有受试者均签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 实验室检测方法

收集入组宫颈鳞癌患者行子宫切除术前静脉血5 mL,取2 mL置于枸橼酸钠抗凝管,分离血清,利用全自动荧光酶标分析仪(美国雅培公司)经微粒子酶免疫法血清SCC-Ag水平(试剂盒购于南京诺唯赞医疗科技有限公司)。

1.2.2 影像学检测方法

行子宫切除术前进行 ^{18}F -FDG PET-CT扫描。扫描前,患者需保持空腹6 h,血糖 $< 7 \text{ mmol/L}$,休息15 min,静脉注射 $220\text{--}330 \text{ MBq}$ ($6\text{--}9 \text{ mCi}$) ^{18}F -FDG药物(GE TeacerLab FxFN药物合成模块制作)50~60 min后,利用PET/CT(美国GE医疗系统)进行扫描成像。基线扫描:采用PET/CT全身模式,第2、3次扫描采取第7脊椎到腹部的局部模式,扫描速度每床位1.5 min,长度14.5 cm,层厚3.75 cm。图像基于有序子集期望值最大化迭代算法,经标准化衰减校正后进行重建,利用GE Xeleris工作站分析放疗前后 ^{18}F -FDG PET-CT图像,直接勾选感兴趣区(Region of interest, ROI),计算病灶最大标准化摄取值(Standardized uptake value, SUVmax)、代谢/增殖活性的大体肿瘤体积(Gross tumor volume, GTV)。

1.2.3 手术方法

FIGO 分期为 I 期的患者行腹腔镜下广泛性子宫切除术+盆腔淋巴结切除(或)腹主动脉旁淋巴结切除(或取样);FIGO 分期为 II 期、III 期的患者均行腹腔镜(或开腹)广泛性子宫切除术+盆腔淋巴结切除+腹主动脉旁淋巴结切除(或取样)。根据术后病理学检查结果,确诊宫颈鳞癌患者是否合并腹膜后淋巴结转移,将 106 例患者分为转移组($n=23$)、未结转移组($n=83$)。

1.3 观察指标

①2 组血清 SCC-Ag 和 ^{18}F -FDG PET-CT 检查参数比较。②血清 SCC-Ag 和 ^{18}F -FDG PET-CT 检查参数对宫颈鳞癌腹膜转移的诊断价值。③血清 SCC-Ag 和 ^{18}F -FDG PET-CT 检查 SUVmax 与病理结果对照。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 23.0 软件中进行统计分析,正态分布的计量资料采用($\bar{x} \pm s$)表示,行 t 检验,非正态分布数据经自然对数转换呈正态分布后进行分析,诊断效能的评估采用受试者工作曲线(ROC),以曲线下面积(AUC)评价 ^{18}F -FDG PET-CT、血清 SCC-Ag 对宫颈鳞癌患者合并腹膜后转移的诊断价值,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组血清 SCC-Ag 和 ^{18}F -FDG PET-CT 检查参数比较

转移组宫颈鳞癌患者术前血清 SCC-Ag 水平、 ^{18}F -FDG PET-CT 检查 SUVmax 均显著高于未转移组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 两组血清 SCC-Ag 和 ^{18}F -FDG PET-CT 检查参数比较 ($n, \bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of serum SCC Ag and ^{18}F -FDG PET-CT parameters between the 2 groups ($n, \bar{x} \pm s$)

类型	n	SCC-Ag ($\mu\text{g/L}$)	SUVmax	GTV
转移组	23	3.87 ± 0.55	12.58 ± 1.68	18.97 ± 3.72
未转移组	83	3.22 ± 0.61	11.41 ± 1.42	18.09 ± 3.56
t 值		4.614	3.358	1.039
P 值		< 0.001	0.001	0.301

表 2 血清 SCC-Ag 和 ^{18}F -FDG PET-CT 检查 SUVmax 与病理结果对照 [$n(\%)$]

Table 2 Comparison of SUVmax and pathological results between serum SCC Ag and ^{18}F -FDG PET-CT [$n(\%)$]

病理结果	血清 SCC-Ag ($\mu\text{g/L}$)		^{18}F -FDG PET-CT SUVmax		联合	
	> 3.61	≤ 3.61	> 12.08	≤ 12.08	转移	未转移
转移组	16 (44.44)	7 (10.00)	18 (43.90)	5 (7.69)	19 (55.88)	4 (5.56)
未转移组	20 (55.56)	63 (90.00)	23 (56.10)	60 (92.31)	15 (44.12)	68 (94.44)
合计	36	70	41	65	34	72

2.2 血清 SCC-Ag 和 ^{18}F -FDG PET-CT 检查参数对宫颈鳞癌腹膜后淋巴结转移的诊断价值

ROC 曲线分析显示,取术前 ^{18}F -FDG PET-CT 检查 SUVmax > 12.08 为截断点,预测宫颈鳞癌腹膜后淋巴结转移的 AUC 为 0.729。取术前血清 SCC-Ag $> 3.61 \mu\text{g/L}$ 为截断点,预测宫颈鳞癌腹膜后淋巴结转移的 AUC 为 0.806。见图 1。

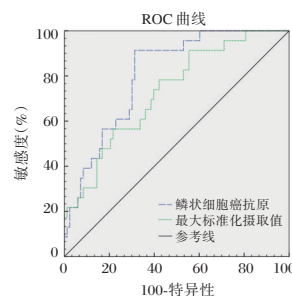


图 1 血清 SCC-Ag 和 ^{18}F -FDG PET-CT 检查参数评估宫颈鳞癌腹膜后淋巴结转移的 ROC 曲线

Figure 1 ROC curves of serum SCC Ag and ^{18}F -FDG PET-CT in evaluating retroperitoneal lymph node metastasis of cervical squamous cell carcinoma

2.3 血清 SCC-Ag 和 ^{18}F -FDG PET-CT 检查 SUVmax 与病理结果

血清 SCC-Ag 和 ^{18}F -FDG PET-CT 检查 SUVmax 与病理结果。见表 2。

2.4 血清 SCC-Ag 和 ^{18}F -FDG PET-CT 对宫颈鳞癌腹膜后淋巴结转移的诊断效能

将上述单指标及串联诊断结果与病理结果进行比较,二者联合评估的准确率、敏感性、特异性更高。见表 3。

表 3 血清 SCC-Ag 和 ^{18}F -FDG PET-CT 对宫颈鳞癌腹膜后淋巴结转移的诊断效能 (%)

Table 3 Diagnostic efficiency of serum SCC Ag and ^{18}F -FDG PET-CT for retroperitoneal lymph node metastasis of cervical squamous cell carcinoma (%)

检查方法	准确度	敏感性	特异性	阳性预测值	阴性预测值
血清 SCC-Ag	74.53	69.57	75.90	44.44	90.00
^{18}F -FDG PET-CT	73.58	78.26	72.29	43.90	92.31
联合	82.08	82.61	81.93	55.88	94.44

3 讨论

CC进展速度较缓,早发现、及时治疗有助改善患者预后生存情况。导致CC患者5年率生存不理想的原因包括肿瘤大小、浸润深度、宫旁转移,淋巴结转移及远处转移,其中腹膜后淋巴结转移是影响CC患者预后的独立危险因素^[8-9]。但目前还没有一种廉价、普适、无创的方法能在术前准确判断腹膜后淋巴结转移。因此,针对早期、有广泛子宫全切术指征的CC患者而言,术前确定淋巴结是否转移,不仅有助手术方式、范围的确定,还能避免不必要的淋巴结清扫,提升术后生活质量。

¹⁸F-FDG PET-CT检查是一种新型分子影像技术,通过静脉注射显像剂¹⁸F-FDG,在细胞己糖激酶作用下将¹⁸F-FDG磷酸化,生成不能被代谢的6-¹⁸F-FDG,滞留在细胞内数小时,肿瘤细胞对FDG的摄取高于正常细胞,因此,可通过观察¹⁸F-FDG PET-CT图像中¹⁸F-FDG的分布情况来判断原发肿瘤位置及转移情况,指导临床治疗^[10]。目前,大量研究证实了¹⁸F-FDG PET-CT在多种实体肿瘤的临床管理中具有很大的应用价值,如Du等^[11]发现高分化鳞状细胞癌与低分化鳞状细胞癌、鳞状细胞癌与非鳞状细胞癌之间的SUVmax差异有统计学意义。又有研究指出,¹⁸F-FDG PET-CT检查中的SUVmax、GTV等半定量参数用于反映各种恶性肿瘤的侵袭程度、肿瘤大小、病理亚型、葡萄糖转运蛋白水平,有助于治疗方案的选择及指导个体化治疗^[12]。受限于研究样本、检查方案和所用设备等方面的差异,目前关于宫颈癌原发灶、腹膜后淋巴结转移诊断的SUVmax、GTV截止值尚未出台统一标准。本研究分析转移组宫颈鳞癌患者术前¹⁸F-FDG PET-CT检查SUVmax均显著高于未转移组,但两组GTV比较未见显著差异。考虑原因为合并腹膜后淋巴结转移的CSCC患者的肿瘤增殖速率、分级、恶性程度较高,导致肿瘤组织对亚型葡萄糖的代谢速率增加,SUVmax显著升高;而GTV主要与肿瘤大小有关,与是否合并腹膜外淋巴结转移相关性较低。

SCC-Ag是存在于血清中的鳞癌细胞特异性分泌物,与淋巴结转移密切相关,研究认为SCC-Ag临界值为3~4 μg/L^[13]。但该指标水平受肿瘤

大小、鳞癌分型等多种因素影响,一般不单独作为淋巴结转移的判断标准^[14]。本研究中,与非转移组CSCC患者相比,转移组患者术前血清SCC-Ag水平显著上升,与上述报道基本一致。Li等^[15]报道,宫颈鳞癌患者SCC-Ag>3.5 μg/L时对腹膜后淋巴结转移的诊断价值最大。本研究参考ROC曲线发现二者串联诊断CSCC合并腹膜后淋巴结转移的准确率、敏感性、特异性均高于单独诊断。由于本文是回顾性研究,在病例选取上有一定的偏倚,有待进行多中心的前瞻性研究,继续验证SCC-Ag、¹⁸F-FDG PET-CT在CSCC合并腹膜后淋巴结转移中的预测价值。

综上所述,术前血清SCC-Ag、¹⁸F-FDG PET-CT检查的SUVmax水平在合并腹膜后淋巴结转移的CSCC患者体内显著提升,联合术前SUVmax>12.08、SCC-Ag>3.61 μg/L诊断CSCC患者合并腹膜后淋巴结转移的价值较高。

参考文献

- [1] 李改玲,任芳,冯巍.中晚期子宫鳞癌同步放化疗前后血清E-cadherin、VEGF、nm23-H1变化及预测价值[J].分子诊断与治疗杂志,2020,12(2):185-189.
- [2] Nicolai N, Tarabelloni N, Gasperoni F, et al. Laparoscopic retroperitoneal lymph node dissection for clinical stage I non-seminomatous germ cell tumors of the testis: safety and efficacy analyses at a high volume center[J]. J Urol, 2018, 199(3):741-747.
- [3] Yasumatsu R, Nakano T, Hashimoto K, et al. The clinical value of serum squamous cell carcinoma antigens 1 and 2 in head and neck squamous cell carcinoma[J]. Auris Nasus Larynx, 2019, 46(1):135-140.
- [4] Lakshmaiah KC, Thanky AH, Lokanatha D, et al. Epidemiology and outcomes with platinum-based chemotherapy in recurrent or metastatic carcinoma cervix in a developing country: experience from a tertiary oncology centre in southern India[J]. Gulf J Oncolog, 2017, 1(25):20-26.
- [5] Yin Y, Campbell SP, Markowski MC, et al. Inconsistent detection of sites of metastatic non-clear cell renal cell carcinoma with psma-targeted [¹⁸F]DCFPyL PET/CT[J]. Mol Imaging Biol, 2019, 21(3):567-573.
- [6] Pecorelli S. Revised FIGO staging for carcinoma of the vulva, cervix, and endometrium[J]. Int J Gynaecol Obstet, 2009, 105(2):103-104.
- [7] Carroll PR, Parsons JK, Andriole G, et al. NCCN clinical practice guidelines prostate cancer early detection, Version 2.2015[J]. J Natl Compr Canc Netw, 2015, 13(12):1534-1561.

(下转第465页)

· 论 著 ·

NSE、TTF-1 及 Ki-67 与小细胞肺癌患者预后、化疗反应的关系

王仪胜* 张章 秦岭 孙玲玲

[摘要] **目的** 探讨神经元特异性烯醇化(NSE)、甲状腺转录因子-1(TTF-1)及 Ki-67 在小细胞肺癌组织中的表达水平,并分析三者与小细胞肺癌患者预后及化疗反应的关系。**方法** 选取 2015 年 8 月至 2018 年 8 月本院收治的 90 例小细胞肺癌患者,观察血清 NSE、癌组织中 Ki-67、TTF-1 表达情况,探讨三者与预后的关系,分析三个指标表达情况对化疗反应率的影响。**结果** 小细胞肺癌组织中 Ki-67 及 TTF-1 阳性率、NSE 表达异常增高率 78.89%、76.67%、75.56%。90 例小细胞肺癌患者 2 年生存率为 24.44% (22/90), TTF-1 (阳性)与 NSE (高表达)、Ki-67 (阳性)表达的小细胞肺癌患者死亡率更高。临床分期(广泛期)、有淋巴结转移、TTF-1 表达(阳性)、NSE (高表达)及 Ki-67 表达(阳性)为影响小细胞肺癌患者预后生存的独立危险因素($P<0.05$)。NSE 正常表达一线化疗疾病控制率(DCR)、客观反应率(ORR)均低于 NSE 异常增高患者,差异有统计学意义($P<0.05$); TTF-1 阳性及 Ki-67 阳性患者一线化疗 DCR、ORR 均高于 TTF-1 及 Ki-67 阴性表达的患者,差异有统计学意义($P<0.05$)。NSE (异常增高)、TTF-1 (阳性表达)及 Ki-67 (阳性表达)的患者 PFS、OS 均显著短于 NSE (正常表达)、TTF-1 (阴性表达)、Ki-67 (阴性表达)者,差异具有统计学意义($P<0.05$)。**结论** TTF-1、NSE 及 Ki-67 对小细胞肺癌的发生及化疗反应起重要作用,在临床工作中可通过联合检查三者的表达情况,从而选择有效的个体化治疗方案,以延长患者生存期。

[关键词] 小细胞肺癌; NSE; TTF-1; Ki-67

Relationship between NSE, TTF-1, Ki-67 and the prognosis and chemotherapy response in patients with small cell lung cancer

WANG Yisheng*, ZHANG Zhang, QIN Ling, SUN Lingling

(Department of Oncology, Wuhu Hospital of East China Normal University, Wuhu, Anhui, China, 241000)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the expression of neuron specific enolization (NSE), Thyroid transcription factor-1 (TTF-1) and Ki-67 in small cell lung cancer and to analyze the relationship between three indicators and the prognosis and chemotherapy response in patients with small cell lung cancer. **Methods** The 90 patients with small cell carcinoma admitted to our hospital from August 2015 to August 2018 were selected to observe the expression of serum NSE and Ki-67 and TTF-1 in cancer tissues and explore the correlation with the prognosis. The influence of the expression of three indicators on the response rate for chemotherapy was also analyzed. **Results** The positive rates of Ki-67 and TTF-1 and the abnormal increasing rate of NSE expression in small cell lung cancer tissues were 78.89%, 76.67%, and 75.56%, respectively ($P<0.05$). The 2-year survival rate of 90 patients with small cell lung cancer was 24.44% (22/90), and the mortality of patients with TTF-1 (positive), NSE (high expression) and Ki-67 (positive) expression was higher. Clinical stage (extensive stage), lymph node metastasis, TTF-1 expression (positive), NSE (high expression) and Ki-67 expression (positive) were independent risk factors affecting the prognosis survival of patients with small cell lung cancer ($P<0.05$). The DCR and ORR of the first-line chemotherapy of patients with nor-

基金项目:安徽省自然科学基金项目(1708085MH213)

作者单位:华东师范大学附属芜湖医院肿瘤科,安徽,芜湖 241000

*通信作者:王仪胜, E-mail: wys623928652@163.com

mal expression of NSE were lower than those of patients with abnormal increased NSE ($P<0.05$). The DCR and ORR of patients with positive TTF-1 and Ki-67 were higher than those with negative expression of TTF-1 and Ki-67 ($P<0.05$). PFS and OS of patients with NSE (abnormal increase), TTF-1 (positive expression) and Ki-67 (positive expression) were significantly shorter than those of patients with NSE (normal expression), TTF-1 (negative expression), Ki-67 (negative expression) ($P<0.05$). **Conclusion** TTF-1, NSE and Ki-67 play an important role in the occurrence of small cell lung cancer and chemotherapy response. In clinical work, the expression of the three can be combined to select effective individualized treatment plans to prolong patient survival.

[KEY WORDS] Small cell lung cancer; NSE; TTF-1; Ki-67

小细胞肺癌属于恶性程度极高的神经内分泌肿瘤,其在所有肺癌中的发生率为15%,肿瘤增长速度快,且易发生远处转移,严重危害患者生命健康^[1]。提高肺癌的早期诊断率是改善患者预后,延长生存期的关键。研究显示,有60%~80%的小细胞肺癌患者血清神经元特异性烯醇化 (Neuron specific enolization, NSE) 存在高表达^[2]。甲状腺转录因子-1 (thyroid transcription factor-1, TTF-1) 是肺及甲状腺来源肿瘤的重要标记物,近年来被广大临床医师所认可^[3]。Ki-67是一种核蛋白,有学者报道 Ki-67 是判断肿瘤良恶程度及侵袭力的重要标志之一^[4],但其与 TTF-1、NSE 之间的关系研究国内报道较少。本研究旨在探讨 TTF-1、NSE 及 Ki-67 在小细胞肺癌中的表达情况,并探讨其潜在预后价值,现研究报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

对2017年8月至2020年8月本院收治的110例小细胞癌患者的临床资料进行整理、分析。纳入标准:①均经组织病理学和免疫组化确诊为小细胞癌^[5];②至少连续接受过2周期以上的含铂两药方案一线化疗,方案包括依托泊苷联合顺铂/卡铂、伊立替康联合卡铂/顺铂。排除标准:①合并其他恶性肿瘤及重要器官严重疾病者;②因精神障碍无法配合治疗者。

最终纳入90例患者,共90份小细胞癌标本。其中男48例,女42例;平均年龄(60.51 ± 3.57)岁;根据美国退伍军人管理局肺癌研究组 (Veterans Administration Lung Cancer Study Group, VALG) 分期标准^[6],可分为广泛期53例,局限期37例。

1.2 方法

1.2.1 NSE 检测方法

纳入研究的对象均在入院后第二天清晨空腹抽取静脉血3 mL, 3 500 r/min 离心 10 min, 分离血

清及血浆,样本置于-20℃下保存待检。采用酶联免疫吸附法检测 NSE 水平。相关试剂盒采购于北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2.2 TTF-1 及 Ki-67 检测方法

采用 S-P 免疫组化染色,将小细胞肺癌标本经常规石蜡切片、脱水,在显微镜下观察 TTF-1、Ki-67。检测过程严格按照说明进行,检测完成后由2名以上高级职称病理科医师阅片。TTF-1 鼠抗人单克隆抗体、Ki-67 鼠抗人单克隆抗体均购自杭州百通生物技术有限公司。

1.3 结果判定

NSE 正常范围值: $\leq 12.5 \mu\text{g/L}$, $> 12.5 \mu\text{g/L}$ 视为异常增高^[7]。

TTF-1、Ki-67 阳性判断标准^[8]:肿瘤细胞胞质或细胞核中出现棕黄色或棕褐色颗粒。染色强度评分:0分(无色)、1分(淡黄色)、2分(棕黄色)、3分(棕褐色);阳性细胞所占百分比小于26%为1分,阳性细胞所占百分比26%~50%为2分,阳性细胞所占百分比51%~75%为3分,阳性细胞壁大于75%为4分。根据两者相乘结果进行评判:小于3分(-)、3分(+)、4分(++)、5分(+++)。阳性率=阳性例数/总例数 $\times 100\%$ 。

1.4 观察指标

主要观察指标为一线化疗客观反应率(objective response rate, ORR)、疾病控制率(disease control rate, DCR)、无进展生存期(progression free survival, PFS)、总生存期(overall survival, OS)。根据实体瘤疗效评价标准(Response Evaluation Criteria in Solid Tumor, RECIST) 1.1 版^[9]评价疗效,分为完全缓解(complete response, CR)、部分缓解(partial response, PR)、稳定(stable disease, SD)、进展(progressive disease, PD)。OS指从确诊至患者死亡或者末次随访时间。PFS指一线治疗开始至疾病进展或者患者死亡的时间。ORR=(CR+PR)病例数/总病例数。DCR=(CR+PR+SD)病例数/总病例数。

1.5 随访

以病例查询、电话或门诊复查的方式对患者进行随访(截止时间2020年8月)。

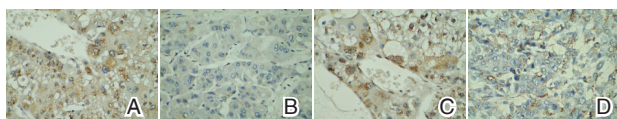
1.6 统计学方法

采用SPSS 22.0软件进行统计分析。计数资料以 $n(\%)$ 表示,采用 χ^2 检验;计量资料采用 $(\bar{x} \pm s)$ 描述,行 t 检验。采用Pearson直线相关分析NSE、TTF-1、Ki-67之间的相关性;采用多元Logistic回归分析影响小细胞肺癌患者2年预后生存的相关危险因素。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NSE、TTF-1、Ki-67在小细胞肺癌组织中的表达

小细胞肺癌组织中NSE异常增高率为75.56%(68/90)、正常表达率为24.44%,TTF-1阳性率为76.67%(69/90)、阴性率为23.33%(21/90),Ki-67阳性率为78.89%(71/90)、阴性率为21.11%(19/90)。见图1。



注:A:TTF-1阳性表达;B:TTF-1阴性表达;C:Ki-67阳性表达;D:Ki-67阴性表达。

图1 免疫组化染色图(SP,×500)

Figure 1 immunohistochemical staining (SP,×500)

2.2 随访结果

对90例小细胞肺癌随访2年,平均随访时间 (1.25 ± 0.25) 年,回访率100%。随访结果显示:90例小细胞肺癌患者2年生存率为24.44%(22/90),NSE(高表达)与TTF-1(阳性)、Ki-67(阳性)的小细胞肺癌患者死亡率更高($P < 0.05$)。见表1。

表1 小细胞肺癌患者不同NSE与TTF-1、Ki-67表达的预后情况 $[n(\%)]$

Table Prognosis of different NSE, TTF-1 and Ki-67 expression in patients with small cell lung cancer $[n(\%)]$

指标	不同表达	n	生存(n=68)	死亡(n=22)	χ^2 值	P值
TTF-1	阳性	69	64(94.12)	5(22.73)	47.357	<0.001
	阴性	21	4(5.88)	17(77.27)		
Ki-67	阳性	71	64(94.12)	7(31.82)	38.737	<0.001
	阴性	19	4(5.88)	15(67.18)		
NSE	高表达	68	60(88.24)	8(36.36)	24.216	<0.001
	低表达	22	8(11.76)	14(63.64)		

2.3 影响小细胞肺癌患者预后的单多因素分析

临床分期(广泛期)、有淋巴结转移、NSE(异常增高)、TTF-1表达(阳性)及Ki-67表达(阳性)为影响小细胞肺癌患者预后生存的独立危险因素($P < 0.05$)。见表2。

2.4 不同NSE、TTF-1及Ki-67表达状态与化疗反应的关系

NSE正常表达一线化疗DCR、ORR均低于NSE异常增高患者,差异有统计学意义($P < 0.05$),TTF-1阳性及Ki-67阳性患者一线化疗DCR、ORR均高于TTF-1及Ki-67阴性表达的患者,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表3。

2.5 远期疗效

NSE(异常增高)、TTF-1(阳性表达)及Ki-67(阳性表达)的患者PFS、OS均显著短于NSE(正常表达)、TTF-1(阴性表达)、Ki-67(阴性表达)者,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表4。

3 讨论

铂类联合第三代化疗药物的化疗方案治疗小细胞肺癌已取得较好的治疗疗效,在一定程度上延长患者的生存期,但肺癌患者的5年生存率仍然仅有

表2 影响小细胞肺癌患者预后的单多因素分析

Table 2 Univariate analysis of prognostic factors in patients with small cell lung 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(≥ 65 岁 vs < 65 岁)	1.524	0.524~1.534	0.660	—	—	—
性别(男 vs 女)	1.487	0.546~1.547	0.714	—	—	—
临床分期(广泛期 vs 局限期)	1.662	1.517~1.943	0.021	1.258	1.467~1.339	<0.001
淋巴结转移(是 vs 否)	1.578	1.385~1.756	0.017	1.368	1.231~1.992	<0.001
分化程度(高分化 vs 中-低分化)	1.624	1.527~1.857	0.008	1.236	1.347~1.887	0.245
肿瘤直径(≥ 3 cm vs < 3 cm)	1.547	1.427~1.997	0.024	1.335	1.321~1.875	<0.001
血管侵犯(有 vs 无)	1.568	1.358~1.887	0.013	1.225	1.354~1.884	0.018
NSE(异常增高 vs 正常表达)	1.475	1.342~1.568	0.004	1.647	1.247~1.654	<0.001
TTF-1(阳性表达 vs 阴性表达)	1.354	1.235~1.456	0.019	1.354	1.372~1.698	0.025
Ki-67(阳性表达 vs 阴性表达)	1.524	1.458~1.687	0.012	1.221	1.247~1.657	<0.001

表3 不同NSE、TTF-1及Ki-67表达状态与化疗反应的关系[n(%)]

Table 3 the relationship between the expression of NSE, TTF-1 and Ki-67 and chemotherapy response [n(%)]

项目	NSE		χ^2 值	P值	TTF-1		χ^2 值	P值	Ki-67		χ^2 值	P值
	正常表达 (n=22)	异常增高 (n=68)			阴性 (n=21)	阳性 (n=69)			阴性 (n=19)	阳性 (n=71)		
CR	1(4.55)	15(22.06)	-	-	2(9.52)	5(7.35)	-	-	1(5.26)	12(16.90)	-	-
PR	12(54.55)	8(11.76)	-	-	5(9.52)	4(5.88)	-	-	9(47.67)	4(5.63)	-	-
SD	6(27.27)	15(22.06)	-	-	8(30.10)	21(30.88)	-	-	6(31.58)	17(23.94)	-	-
PD	3(13.64)	30(44.12)	-	-	6(28.57)	39(57.35)	-	-	3(15.79)	38(53.52)	-	-
DCR	19/22(86.36)	38/68(55.88)	6.650	0.010	15/21(71.43)	30/69(44.12)	5.031	0.025	16/19(84.21)	33/71(46.48)	8.604	0.003
ORR	13/22(59.09)	23/68(33.82)	4.422	0.035	7/21(33.33)	9/69(13.24)	4.534	0.033	10/19(66.67)	16/71(22.54)	6.609	0.010

表4 两组患者远期疗效比较情况($\bar{x} \pm s$)Table 4 Comparison of long-term efficacy between 2 groups ($\bar{x} \pm s$)

不同指标	组别		PFS(月)	OS(月)
NSE	异常增高	68	7.24±2.77	11.50±5.28
	正常表达	22	10.05±3.20	14.41±6.65
	t值		3.980	2.105
	P值		<0.001	0.038
TTF-1	阳性	69	7.54±3.15	11.88±5.69
	阴性	21	10.55±4.53	14.93±7.14
	t值		3.439	2.025
	P值		<0.001	0.046
Ki-67	阳性	71	8.65±3.68	12.38±5.24
	阴性	19	10.69±4.21	15.43±7.34
	t值		2.082	2.060
	P值		0.040	0.042

15%^[10]。随着广大学者对生物分子学的不断深入研究,发现可通过寻找特异性肿瘤标志物,了解小细胞肺癌的生物学行为,并有效评估患者预后^[11]。

NSE在神经元以及内分泌组织中分布,是脱羧基化细胞系列的肿瘤标志物,对恶性肿瘤、脑损伤等疾病敏感性高。较多文献报道小细胞肺癌是一种恶性程度高,且能分泌NSE的神经内分泌性肿瘤,NSE在肺癌组织中的表达量较高,约为正常组织的3~35倍^[12]。本研究进一步证实上述结论,可见NSE对小细胞肺癌的检测敏感度、特异度高。TTF-1分子量为38 LD,是由371个氨基酸组成的核转录蛋白。既往学者研究报道,TTF-1与许多肺部疾病之间有着密切联系,且发现TTF-1在肺组织及甲状腺组织癌变过程中呈高表达状态,影响多种基因调控,因此认为TTF-1可能是肺癌、甲状腺癌等恶性肿瘤的一个驱动核心^[13]。本研究中,TTF-1与在小细胞肺癌组织的阳性表达率在70%以上,与既往文献报道结果一致^[14]。Ki-67属于非组蛋白,位于细胞核内,对蛋白酶高度敏感,标记增殖性细胞核,可敏感地反映恶性肿瘤的增

殖率及侵袭力,较多学者认为Ki-67对肿瘤的诊断、预后评估有重要指导意义^[15]。研究结果显示,Ki-67为影响小细胞肺癌患者预后死亡的独立危险因素。提示可在根治术后或放疗后,检测Ki-67在小细胞肺癌患者中的表达情况来判断疗效,评估患者预后,以指导治疗。

化疗会引起严重的副作用,降低患者的生活质量,确定预测化疗反应的标志物对减轻患者化疗副作用、保障生活质量意义重大。本研究结果提示NSE、TTF-1及Ki-67可作为预测化疗反应的标志物,这与国外学者报道结果一致^[16]。本研究结果说明NSE、TTF-1及Ki-67表达水平与小细胞肺癌患者预后密切相关。Duschek S等^[17]学者研究报道,不同TTF-1表达的患者PFS及OS比较差异无统计学意义。这与本研究结果存在差异,可能为免疫组化染色中使用的阳性标准有所不同所致。同时本研究纳入样本量较小,可能导致研究结果出现一定偏倚,后续将扩大样本量进行深入研究。

综上所述,TTF-1、NSE及Ki-67对小细胞肺癌的发生、发展起重要作用,可通过联合检查三者的表达情况,选择有效的个体化治疗方案,以延长小细胞肺癌患者的生存期。

参考文献

- [1] 高映浩,侯恩存,甘川.非小细胞肺癌EGFR-TKI获得性耐药后治疗策略的研究进展[J].现代肿瘤医学,2018,26(14):151-155.
- [2] 唐正中,胡宗涛,王崇,等.局部晚期非小细胞肺癌三维适形放射治疗致放射性肺损伤相关因素探讨[J].安徽医药,2018,22(6):1116-1119.
- [3] Griesing S, Kajino T, Tai MC, et al. TTF-1-regulated miR-532-5p targets KRAS and MKL2 oncogenes and induces apoptosis in lung adenocarcinoma cells[J]. Cancer Sci, 2017, 108(7):1394-1404.

- [4] Zhu T, Li C, Zhang X, et al. GLP-1 Analogue Liraglutide Enhances SP-A Expression in LPS-Induced Acute Lung Injury through the TTF-1 Signaling Pathway [J]. *Med Inflamm*, 2018, 15(22):1-14.
- [5] Violaine Y, Arnaud P, Fran Ois C, et al. PD-L1 expression in pleomorphic, spindle cell and giant cell carcinoma of the lung is related to TTF-1, p40 expression and might indicate a worse prognosis [J]. *Plos One*, 2017, 12(7):18-25
- [6] 郭小琦, 刘宏涛, 梁英平. 小细胞肺癌组织中 MIP-3 α 和 CCR6 表达与术后复发转移及预后的关系 [J]. *医学分子生物学杂志*, 2019, 16(6):575-581.
- [7] 王珊, 高岚, 余婧. 护理记录表在肺癌患者术后呼吸道专科护理中的应用 [J]. *保健医学研究与实践*, 2018, 15(6):63-64.
- [8] 张洪彬, 张满娥, 黄文滨, 等. RASSF1A 基因甲基化和 SCC 联合检测在非小细胞肺癌转移监测中的应用 [J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2018, 13(15):64-69.
- [9] Zhai YR, Hui Z, Men Y, et al. TTF-1 Expression is Correlated with Necessity of Postoperative Radiotherapy in Stage II-IA-N2 Lung Adenocarcinoma [J]. *Int J Rad Oncol Biol Phys*, 2019, 105(1):540-541.
- [10] Gao X, Zheng P, Kasani S, et al. Paper-Based Surface-Enhanced Raman Scattering Lateral Flow Strip for Detection of Neuron-Specific Enolase in Blood Plasma [J]. *Analyt Chem*, 2017, 15(22):10104.
- [11] Cha YS, Kim HH, Do H, et al. Serum neuron-specific enolase as an early predictor of delayed neuropsychiatric sequelae in patients with acute carbon monoxide poisoning [J]. *Hum Exp Toxicol*, 2017, 37(3):240-246.
- [12] Luo G, Hu Y, Zhang Z, et al. Clinicopathologic significance and prognostic value of Ki-67 expression in patients with gastric cancer: a meta-analysis [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(30):50273-50283.
- [13] Sachsenberg N, Perelson AS, Yerly S, et al. Turnover of CD4+ and CD8+ T Lymphocytes in HIV-1 Infection as Measured by Ki-67 Antigen [J]. *J Exp Med*, 2018, 26(8):1295-1300.
- [14] Ciavattini A, Sopracordevole F, Di Giuseppe J, et al. Cervical intraepithelial neoplasia in pregnancy: Interference of pregnancy status with p16 and Ki-67 protein expression [J]. *Oncol Lett*, 2017, 13(1):301-306.
- [15] Hughes AJ, French M, Ah-Weng A, et al. Diffuse and Strong TTF-1 Positivity in a Combined Merkel Cell Carcinoma [J]. *Am J Dermatopathol*, 2020, 42(3):229-231.
- [16] Wang B, Feng N, Shi X, et al. Analysis of Correlation between TTF-1 and Sensitivity to First-line Chemotherapy and Prognosis in Patients with Small Cell Lung Cancer [J]. *Zhongguo Fei Ai Za zhi*, 2020, 23(7):547-553.
- [17] Duschek S, Friemel J, Fontecedro AC, et al. Immunohistochemical biomarker expression in gastro-entero-pancreatic neuroendocrine tumors at ENETS Centre of Excellence, University Hospital Zurich, Switzerland [J]. *J Clin Oncol*, 2020, 38(15):1567-1573.

(上接第 460 页)

- [8] Luo D, Liu Y, Lin S, et al. Oncogenic Ras/squamous cell carcinoma antigen signaling pathway activation promotes invasiveness and lymph node metastases in papillary thyroid carcinoma [J]. *Oncol Rep*, 2019, 41(2):1253-1263.
- [9] Komiyama S, Nishijima Y, Kondo H, et al. Multicenter clinicopathological study of high-grade serous carcinoma presenting as primary peritoneal carcinoma [J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2018, 28(4):657-665.
- [10] Franchi M, Garzon S, Zorzato PC, et al. PET-CT scan in the preoperative workup of early stage intermediate- and high-risk endometrial cancer [J]. *Minim Invasive Ther Allied Technol*, 2020, 29(4):232-239.
- [11] Du S, Sun H, Gao S, et al. Metabolic parameters with different thresholds for evaluating tumor recurrence and their correlations with hematological parameters in locally advanced squamous cell cervical carcinoma: an observational ^{18}F -FDG PET/CT study [J]. *Quant Imaging Med Surg*, 2019, 9(3):440-452.
- [12] Samołyk-Kogaczewska N, Sierko E, Zuzda K, et al. PET/MRI-guided GTV delineation during radiotherapy planning in patients with squamous cell carcinoma of the tongue [J]. *Strahlenther Onkol*, 2019, 195(9):780-791.
- [13] Kim H, Park W, Cho WK. Who can benefit from a lymph node boost in definitive chemoradiotherapy for node-positive cervical cancer: an evaluation of nodal failure in patients without nodal boost [J]. *J Radiat Res*, 2020, 61(3):479-486.
- [14] Choi KH, Yu M, Jeong S, et al. Can serial evaluation of serum SCC-Ag-level predict tumor recurrence and patient survival in squamous-cell carcinoma of uterine cervix treated with definitive chemoradiotherapy? A multi-institutional analysis [J]. *Int J Clin Oncol*, 2020, 25(7):1405-1411.
- [15] Li X, Zhou J, Huang K, et al. The predictive value of serum squamous cell carcinoma antigen in patients with cervical cancer who receive neoadjuvant chemotherapy followed by radical surgery: a single-institute study [J]. *PLoS One*. 2015, 10(4):e0122361.

TSGF、GGT联合、VEGF检测对原发性肝癌TACE疗效的预测价值

周永祥* 首峰 张景俊 叶世富

[摘要] **目的** 研究肿瘤特异性生长因子(TSGF)、 γ -谷氨酰转肽酶(GGT)联合血管内皮生长因子(VEGF)检测对原发性肝癌(PHC)患者经动脉灌注化疗栓塞治疗(TACE)疗效的预测价值。**方法** 收集66例2016年5月至2018年5月于本院行TACE治疗的PHC患者的肿瘤组织,根据随访期间内复发情况分为未复发组($n=41$)及复发组($n=25$)。比较PHC患者行TACE治疗前及治疗1个月后TSGF、GGT、VEGF水平变化;记录所有PHC患者在随访时间内复发情况,采用多元Logistic回归分析影响PHC患者TACE治疗后复发的危险因素,采用ROC曲线分析TSGF、GGT、VEGF及三者联合检测对PHC患者TACE疗效的预测价值。**结果** 治疗后TSGF、GGT、VEGF水平均低于治疗前,差异有统计学意义($P<0.05$)。复发组肝功能Child-Pugh分级B级、术前甲胎蛋白 >20 ng/mL、肿瘤直径 >3 cm、肿瘤位置第二肝门旁及多发性肿瘤者较未复发组多,复发组TSGF、GGT、VEGF水平较未复发组高,差异有统计学意义($P<0.05$)。经Logistic回归分析发现:术前甲胎蛋白、TSGF、GGT、VEGF水平为影响PHC患者TACE治疗后复发的独立危险因素($P<0.05$)。TSGF、GGT、VEGF及三者联合曲线下面积以三者联合最高。**结论** TSGF、GGT及VEGF水平为影响PHC患者TACE治疗后复发的独立危险因素,联合三者检测可增加对PHC患者TACE治疗疗效的预测价值。

[关键词] TSGF; GGT; VEGF; 经动脉灌注化疗栓塞治疗

Predictive value of TSGF and GGT combined with VEGF detection in the efficacy of transcatheter arterial chemoembolization in patients with primary hepatocellular carcinoma

ZHOU Yongxiang*, SHOU Feng, ZHANG Jingjun, YE Shifu

(Department of Oncology, Jianyang People's Hospital, Jianyang, Sichuan, China, 641400)

[ABSTRACT] **Objective** To study the predictive value of tumor specific growth factor (TSGF), γ -glutamyl transpeptidase (GGT) combined with vascular endothelial growth factor (VEGF) detection for the efficacy of transcatheter arterial chemoembolization (TACE) in patients with primary hepatocellular carcinoma (PHC). **Methods** The tumor tissues from 66 patients with PHC treated with TACE in our hospital from May 2016 to May 2018 were collected. According to the recurrence during the follow-up period, they were divided into the non-recurrence group ($n=41$) and the recurrence group ($n=25$). The changes of TSGF, GGT, and VEGF levels before TACE treatment and 1 month after treatment in PHC patients were compared. The recurrence of all PHC patients was recorded during the follow-up period. The multivariate logistic regression analysis was used to analyze the risk factors of recurrence after TACE treatment in PHC patients. The ROC curve was used to analyze the predictive value of TSGF, GGT, VEGF and the combined detection of the three on the TACE efficacy in PHC patients. **Results** The levels of TSGF, GGT and VEGF after treatment were lower than those before treatment ($P<0.05$). There are more patients with liver function at Child-Pugh grade B, pre-operative alpha-fetoprotein >20 ng/mL, tumor diameter >3 cm, tumor location next to the second hepatic portal and multiple tumors in the recurrence group than in the non-recurrence group. The levels of TSGF, GGT and

基金项目:四川省医学科研青年创新课题(Q16015)

作者单位:简阳市人民医院肿瘤科,四川,简阳 641400

*通信作者:周永祥, E-mail: pin110347932054769@163.com

VEGF in the recurrence group were higher than those in the non-recurrence group ($P<0.05$). Logistic regression analysis showed that the preoperative levels of alpha-fetoprotein, TSGF, GGT, and VEGF were independent risk factors that affect the recurrence of PHC patients after TACE treatment ($P<0.05$). The area under the combined curve was the highest. **Conclusion** The levels of TSGF, GGT and VEGF are independent risk factors that affect the recurrence of PHC patients after TACE treatment. The combined detection of the three can increase the predictive value of the efficacy of TACE treatment in PHC patients.

[KEY WORDS] TSGF; GGT; VEGF; Transarterial infusion Chemoembolization therapy

原发性肝癌(primary hepatocellular carcinoma, PHC)即原发于肝脏的上皮性恶性肿瘤,肝细胞癌最为多见,少数为胆管细胞癌及混合型^[1]。由于该病早期起病隐匿,发现时往往多数已到达晚期,手术治疗疗效不佳^[2]。经肝动脉灌注化疗栓塞术(transcatheter arterial chemoembolization, TACE)已成为治疗原发性肝癌的主要非手术方法,疗效确切,但术后转移仍是目前需要解决的问题^[3]。肿瘤特异性生长因子(tumor specific growth factor, TSGF)是在恶性肿瘤形成和生长时,促进肿瘤及周围毛细血管增殖并释放到外周血液中的因子^[4]。 γ -谷氨酰转肽酶(γ -glutamyl transpeptidase, GGT)是一种广泛分布于哺乳动物组织中的质膜结合糖蛋白,在肝脏广泛分布于肝细胞毛细胆管一侧和整个胆管系统。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)作为迄今所发现的最重要的促血管生成因子,具有促进血管新生的作用^[5]。本研究就TSGF、GGT联合VEGF检测对PHC患者TACE治疗疗效的预测价值进行研究,为临床评估VEGF患者的预后提供帮助。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集69例2016年5月至2018年5月于本院行TACE治疗的PHC患者的肿瘤组织,纳入标准:①病理、影像学和血清甲胎蛋白检查满足《原发性肝癌诊疗规范》中相关诊断标准^[6];②所有均未接受过放疗和化疗;③所有患者均有完整详细的临床资料以及治疗记录;排除标准:①合并血液疾病者;②存在除PHC以外其他原发性恶性肿瘤者;③合并风湿免疫及结缔组织病变者;④肿瘤全身广泛转移,估计患者生存期 <3 个月;⑤肿瘤体积占全肝体积 $\geq 70\%$ 。最终66例患者满足本研究纳入排除标准。其中男46例,女30例,平均年龄(48.45 ± 5.84)岁。根据随访期间内复发情况分为未复发组($n=41$)及复发组($n=25$),两组一般资料比较差异无

统计学意义($P>0.05$),具有可比性。本研究经医院伦理委员会批准。

1.2 实验方法

1.2.1 VEGF、TSGF检测^[7]

采用酶联免疫吸附法检测,VEGF和TSGF酶联免疫试剂盒购自上海尤他生物技术有限公司严格按照试剂盒使用说明书进行操作。

1.2.2 GGT检测

抽取入组对象清晨空腹静脉血3 mL,离心(3500 r/min ,半径15 cm,15 min)取上清置于 -20°C 冷藏设备中备用。采用美国贝克曼库尔特公司生产的LX-20全自动生化分析仪进行检测,试剂购自美国贝克曼库尔特公司,严格按照试剂盒使用说明书进行操作。

1.3 随访方法^[8]

所有病例主要是住院或门诊复查,小部分采用电话方式随访观察。随访截止于确定肿瘤复发日或到2020年5月31日。

1.4 统计学方法

采用SPSS 18.0软件进行统计分析,计数资料以 $n(\%)$ 表示,采用 χ^2 检验,计量资料采用 $(\bar{x} \pm s)$ 描述,行 t 检验;采用多元Logistic回归分析影响PHC患者TACE治疗后复发的危险因素,采用ROC曲线分析TSGF、GGT、VEGF及三者联合检测对PHC患者TACE疗效的预测价值;以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TACE治疗前后TSGF、GGT、VEGF水平比较

治疗后TSGF、GGT、VEGF水平均低于治疗前,差异有统计学意义($P<0.05$),见表1。

2.2 影响PHC患者TACE治疗后复发的单因素分析

复发组与未复发组性别、年龄、肝硬化史、肝炎史及手术史比较差异无统计学意义($P>0.05$),复发组肝功能Child-Pugh分级B级、术前甲胎蛋白 $>20\text{ ng/mL}$ 、肿瘤直径 $>3\text{ cm}$ 、肿瘤位置第二肝门旁

表1 TACE治疗前后TSGF、GGT、VEGF水平比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of TSGF, GGT and VEGF levels before and after TACE treatment ($\bar{x} \pm s$)

时间	<i>n</i>	TSGF (U/mL)	GGT (U/L)	VEGF (pg/mL)
治疗前	66	185.56±37.98	159.86±27.83	379.86±96.31
治疗1个月后	66	127.45±27.83	115.47±24.51	243.18±97.75
<i>t</i> 值	—	10.759	10.435	8.683
<i>P</i> 值	—	<0.001	<0.001	<0.001

及多发性肿瘤者较未复发组多,复发组TSGF、GGT、VEGF水平较未复发组高,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表2。

2.3 影响PHC患者TACE治疗后复发的多因素分析

经Logistic回归分析发现:术前甲胎蛋白、TSGF、GGT、VEGF水平为影响PHC患者TACE治疗后复发的独立危险因素($P<0.05$)。见表3。

2.4 TSGF、GGT、VEGF及三者联合检测对PHC患者TACE疗效的预测价值

ROC曲线结果显示,TSGF、GGT、VEGF及三者联合曲线下面积分别为0.800、0.725、0.656、0.883,各指标曲线下面积以三者联合最大,见表4及图1。

表4 TSGF、GGT、VEGF及三者联合对PHC患者TACE疗效的预测价值(%)

Table 4 Predictive value of TSGF, GGT, VEGF and their combination on TACE efficacy in PHC patients (%)

预测指标	最佳临界值	灵敏度	特异度	AUC	95%CI
TSGF	1.895	0.745	0.895	0.800	0.643~0.958
GGT	1.781	0.719	0.884	0.725	0.549~0.901
VEGF	1.594	0.778	0.837	0.656	0.431~0.880
三者联合检测	1.947	0.807	0.985	0.883	0.770~0.995
预测指数模型	1.764	0.749	0.785	0.794	0.752~0.789

表2 影响PHC患者TACE治疗后复发的单因素分析 [$n(\%)$]

Table 2 Univariate analysis of recurrence in PHC patients after TACE [$n(\%)$]

因素		组别		χ^2/t 值	<i>P</i> 值
		未复发组(<i>n</i> =41)	复发组(<i>n</i> =25)		
性别	男	31(75.61)	15(60.00)	1.792	0.181
	女	10(24.39)	10(40.00)		
年龄(岁)		49.71±5.74	49.85±5.63	17.627	<0.001
肝功能Child-Pugh分级	A级	30(73.17)	5(20.00)	17.627	<0.001
	B级	11(26.83)	20(80.00)		
肝硬化	有	21(51.22)	12(48.00)	0.064	0.800
	无	20(48.78)	13(52.00)		
肝炎史	有	16(39.02)	14(56.00)	1.805	0.179
	无	25(60.98)	11(44.00)		
术前甲胎蛋白(ng/mL)	≤20	29(70.73)	4(16.00)	18.609	<0.001
	>20	12(29.27)	21(84.00)		
肿瘤直径(cm)	≤3	26(63.41)	5(20.00)	11.752	0.001
	>3	15(36.59)	20(80.00)		
肿瘤位置	第一肝门旁	17(41.46)	21(84.00)	11.54	0.001
	第二肝门旁	24(58.54)	4(16.00)		
肿瘤数目	单发	23(56.10)	20(80.00)	3.908	0.048
	多发	18(43.90)	5(20.00)		
手术史	有	26(63.41)	13(52.00)	0.837	0.360
	无	15(36.59)	12(48.00)		
TSGF(U/mL)		130.89±24.58	189.71±25.63	9.280	<0.001
GGT(U/L)		101.39±21.36	131.59±20.77	5.630	<0.001
VEGF(pg/mL)		240.49±75.71	301.91±74.96	3.209	0.002

表3 影响PHC患者TACE治疗后复发的多因素分析

Table 3 Analysis of multiple factors influencing recurrence of PHC patients after TACE

因素	回归系数	标准误差	Wald/ χ^2 值	OR	95%CI	<i>P</i> 值
复发组肝功能Child-Pugh分级:A级vsB级	0.898	0.745	4.595	2.455	0.570~10.572	0.094
术前甲胎蛋白:>20 ng/mL vs ≤20 ng/mL	0.941	0.124	4.541	2.563	2.010~3.268	0.015
肿瘤直径:>3 cm vs ≤3 cm	0.966	0.843	4.754	2.627	0.503~13.712	0.054
肿瘤位置:第二肝门旁 vs 第一肝门旁	0.895	0.961	4.456	2.447	0.372~16.096	0.063
肿瘤数目:单发 vs 多发	0.841	0.758	7.253	2.319	0.525~10.244	0.077
TSGF水平正常 vs 异常	0.869	0.135	5.094	2.385	1.830~3.107	0.001
GGT水平正常 vs 异常	0.997	0.174	4.294	2.710	1.927~3.812	0.002
VEGF水平正常 vs 异常	1.045	0.198	5.561	2.843	1.929~4.192	0.005

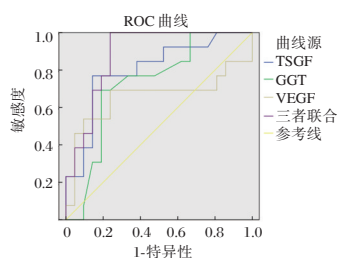


图1 TSGF、GGT、VEGF及三者联合对PHC患者TACE疗效的预测价值ROC曲线分析

Figure 1 ROC curve analysis of predictive value of TSGF, GGT, VEGF and their combination in PHC patients with TACE

3 讨论

TACE是采用介入方法将导管经血管送达肿瘤供血动脉,注入药物进行治疗的一种方法^[9]。相比于传统化疗方法,经肝动脉治疗局部化疗药物浓度高,可避免全身大剂量用药及首过效应,降低化疗副作用^[10]。临床实践表明,TACE治疗可缓解PHC患者的病情,减轻痛苦延长患者的生命,提高其生活质量,目前已成为国内外公认较为成熟的不可切除肝癌首选治疗方法^[11]。相关学者指出,转移复发已成为进一步延长HCC患者生存,改善预后的主要障碍,故寻求有效指标对疗效进行评估有重要意义^[12]。

TSGF的受体呈跨膜分布,结构分为突出在细胞外能识别特异的生长因子与之结合的区域、连接区、面向细胞内部具有酪氨酸蛋白激酶活性的结构区^[13]。研究发现,在恶性肿瘤形成早期,TS-GF可明显升高。肝癌介入治疗的理论基础为阻断肿瘤的供血血管,从而减少肿瘤血供。而肿瘤的复发和肝内转移则是由于肿瘤组织再次获得肝动脉及外周门静脉的供血,产生新的肿瘤血管,滋养肿瘤组织而成^[14]。因此,TSGF作为肿瘤血管生长的指标,可以评价TACE治疗的疗效,其变化可能能够反映肝癌的复发及转移。

GGT是 γ -谷氨酰循环中的关键酶,常见于具有分泌和吸收功能的上皮细胞膜上。血清中的GGT主要由肝细胞线粒体产生,局限于细胞浆及肝内胆管上皮中,从胆管排泄。本研究结果提示GGT在PHC复发转移的检测具有重要意义,可用于发现TACE治疗后的亚临床复发和转移。

VEGF是目前已知作用最强、专属性最高的促血管生长因子,其对内皮细胞的增生有强烈的刺激作用,可增加血管通透性,加速肿瘤血管内皮细

胞的增殖和迁移,进而促进肿瘤血管形成^[15]。本研究结果说明其机制可能是TACE治疗后肿瘤血管被栓塞,在无血供的条件下,瘤体终止生长,进入休眠期,肿瘤细胞生长被抑制,故分泌VEGF明显下降。其原因可能是VEGF可以特异性地与肿瘤细胞表面的血管内皮细胞生长因子受体(Vascular Endothelial Growth Factor Receptor, VEGFR)相互作用,激活VEGF-VEGFR-NF κ B信号通路,进一步下调抑制细胞迁移的靶基因,促进肿瘤细胞的迁移。

值得注意的是,肝癌转移复发转移作为一个多步骤、多因素参与并且相互作用的复杂过程,仅用单一指标无法进行准确预测。本研究经ROC曲线分析显示,各指标曲线下面积以TSGF、GGT及VEGF三者联合最大,这提示临床需同时参考多项具有预后价值的生物学指标,进而提高预测价值。

综上所述,TSGF、GGT及VEGF水平为影响PHC患者TACE治疗后复发的独立危险因素,联合三者检测可增加对PHC患者TACE治疗疗效的预测价值。

参考文献

- [1] 段松,杨杰斌,石丹,等. EP-CAM、N-CAM1及C-KIT与原发肝癌分级、转移及患者预后的关系[J]. 医学分子生物学杂志, 2018, 24(5):338-343.
- [2] 于晓双,石娜,毛中鹏,等. 经动脉化疗栓塞联合射频消融法治疗对较大原发性肝癌疗效分析[J]. 解放军医药杂志, 2019, 31(5):30-34.
- [3] Ling CQ, Fan J, Lin HS, et al. Clinical practice guidelines for the treatment of primary liver cancer with integrative traditional Chinese and Western medicine [J]. J Integr Med, 16(4):236-248.
- [4] Sun JM, Yang YL, Wang JG, et al. Evaluation of short- and long-term efficacy of bevacizumab combined with TACE in the treatment of primary liver cancer [J]. Pract Pharm Clin Remed, 2018, 35(57):1741-1745.
- [5] Wang G, Bi C. Correlations of pri-Let-7 gene polymorphisms with the recurrence and metastasis of primary liver cancer after transcatheter arterial chemoembolization [J]. Pathol Res Pract, 2018, 214(5):667-672.
- [6] 文天夫. 原发性肝癌诊疗规范(2017年版)解读[J]. 中国普外基础与临床杂志, 2018, 25(1):32-34.
- [7] Mahoney ER, Dumitrescu L, Moore AM, et al. Brain expression of the vascular endothelial growth factor gene family in cognitive aging and alzheimer's disease [J]. Molecular Psychiatry, 2021, 26(3):888-896.
- [8] 王新亭,张传雷,陈晓琦,等. 华蟾素治疗原发性肝癌癌性疼痛的效果观察[J]. 保健医学研究与实践, 2018, 15(6):36-39.

(下转第473页)

Hcy、NSE 及 IL-8 水平变化与脑卒中患者神经功能恢复的关系研究

彭远艳 邱呈兵 周敏 杨红叶 向雪莉*

[摘要] **目的** 分析半胱氨酸(Hcy)、神经元特异性烯醇化酶(NSE)及白介素-8(IL-8)水平变化与脑卒中患者神经功能恢复的关系。**方法** 选取2017年4月至2019年4月本科室收治的116例缺血性脑卒中急性期后康复患者作为研究组,根据急性期神经功能缺损程度,以及稳定期Brunnstrom分期和ADL指数另分为三个亚组:轻度依赖组46例,中度依赖组40例,重度依赖组30例。同时纳入同期本院健康体检正常者108例作为对照组。比较研究组与对照组Hcy、NSE及IL-8水平差异及Hcy、NSE及IL-8水平在神经功能缺损评分中的表达情况。绘制散点图,采用Pearson相关分析分别观察脑卒中患者Hcy、NSE及IL-8水平与神经功能评分的关系。**结果** 研究组患者Hcy、NSE、IL-8水平显著高于对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$);不同神经缺损患者血清Hcy、NSE、IL-8水平:重度依赖组>中度依赖组>轻度依赖组,差异有统计学意义($P<0.05$);脑卒中患者Hcy、NSE及IL-8与NIHSS评分呈正相关,与Brunnstrom分期和ADL指数呈负相关($P<0.05$)。**结论** Hcy、NSE及IL-8水平对脑卒中患者神经功能及康复指标具有重要意义,临床工作者可通过加强监测这三项指标,评估疾病进展与预后情况。

[关键词] 脑卒中;神经功能;Hcy;NSE;IL-8

Relationship between the changes of Hcy, NSE and IL-8 levels and the recovery of neurological function in stroke patients

PENG Yuanyan, QIU Chengbing, ZHOU Min, YANG Hongye, XIANG Xueli*

(Department of Rehabilitation Medicine, People's Hospital of Banan District, Chongqing, China, 400055)

[ABSTRACT] **Objective** To analyze the relationship between the changes of Hcy, NSE and IL-8 levels and the recovery of neurological function in stroke patients. **Methods** A total of 116 stroke patients recovered from acute ischemic stroke in this department from April 2017 to April 2019 were selected as the study group. According to the degree of neurological deficit in the acute phase, the Brunnstrom staging and ADL index in the stable phase, they were divided into three subgroup: 46 cases in the mildly dependent group; 40 cases in the moderately dependent group; and 30 cases in the severely dependent group. At the same time, 108 patients with normal physical examination in this hospital were included as the control group. The differences in the levels of Hcy, NSE and IL-8 between the study group and the control group and the expression of Hcy, NSE and IL-8 levels in the neurological deficit score were compared. A scatter plot was drawn, and Pearson correlation analysis was used to observe the relationship between Hcy, NSE and IL-8 levels and neurological scores in stroke patients. **Results** The levels of Hcy, NSE and IL-8 in the study group were significantly higher than those in the control group and the difference was statistically significant ($P<0.05$). Serum Hcy, NSE, IL-8 levels in patients with different neurological deficits: severely dependent group > moderately dependent group > lightly dependent group and the difference was statistically significant ($P<0.05$). The levels of Hcy,

基金项目:重庆市卫生计生委医学科研项目(2017MSXM169)

作者单位:重庆市巴南区人民医院康复医学科,重庆400055

*通信作者:向雪莉, E-mail:417315830@qq.com

NSE and IL-8 in patients with coronary stroke were positively correlated with NIHSS score, and negatively correlated with Brunnstrom staging and ADL index ($P<0.05$). **Conclusion** The serum levels of Hcy, NSE and IL-8 are of great significance to the neurological function and rehabilitation indicators of stroke patients. Clinicians can strengthen the monitoring of these three indicators to assess disease progression and prognosis.

[KEY WORDS] Stroke; Neurological function; Hcy; NSE; IL-8

脑卒中是由于脑部血管突然破裂或因血循环堵塞导致血液不能流入大脑而引起脑组织损伤的一组疾病,以神经功能损伤为主要临床表现,具有极高的发病率、死亡率及致残率^[1]。因此,如何逆转脑卒中区域神经功能损伤,促进功能恢复是目前研究热点。近年来,大量临床发现,脑卒中患者疾病的发生、发展与细胞因子密切相关^[2]。血清同型半胱氨酸(Homocysteine, Hcy)是一种含硫氨基酸,参与内皮细胞增生、凋亡,促进炎性因子产生,导致机体出现慢性炎症^[3]。神经元特异性烯醇化酶(Neuron-specific enolase, NSE)作为机体糖酵解的关键酶,在脑组织或神经细胞损伤等疾病中呈高表达状态^[4]。此外,相关研究发现,白介素-8(Interleukin-8, IL-8)可趋化嗜中性细胞及嗜碱性粒细胞及T细胞,加强免疫反应^[5]。本研究选取116例脑卒中患者作为研究对象,分析Hcy、NSE及IL-8水平变化与脑卒中患者神经功能恢复的关系,现报告如下。

1 对象与方法

1.1 一般资料

选择2017年4月至2019年4月本科室收治的116例缺血性脑卒中急性期后康复患者设为研究组,其中男66例,女50例平均年龄(66.79 ± 6.93)岁。根据急性期神经功能缺损程度^[6]、稳定期Brunnstrom分期^[7]和日常生活能力(activities of daily living, ADL)指数^[7]另分为三个亚组:轻度依赖组46例,其中男26例,女20例,年平均年龄(65.71 ± 6.12)岁;中度依赖组40例,其中男23例,女17例,平均年龄(65.53 ± 6.32)岁;重度依赖组30例,其中男17例,女13例,平均年龄(65.12 ± 6.17)岁。同时纳入同期本院接受健康体检结果正常者作为对照组,共108例,其中男56例,女52例,平均年龄(66.13 ± 6.06)岁。各组间一般资料比较差异无统计学意义,具有可比性($P>0.05$)。

纳入标准:①符合中国急性缺血性脑卒中诊治指南(2018版)^[6]诊断标准。②临床资料完整;③研究组患者均为缺血性脑卒中急性期后康复患者。排

除标准:①合并肝肾等重要器官损害者。②合并严重感染、高血压、糖尿病、血液系统疾病及恶性肿瘤者。③临床及随访资料不完整或缺乏准确性者。

1.2 观察指标

Hcy、NSE、IL-8检测:采用酶联免疫吸附测定Hcy、NSE的水平,试剂盒选择上海鑫乐生物科技有限公司;IL-8采用放免分析法测定,试剂盒由美国Phoenix Pharmaceuticals Inc提供。操作过程严格按照说明书进行。

1.3 神经功能缺损评分

神经功能缺损评分均由本科室主任对患者情况进行评判。根据美国国立卫生研究院卒中量表(Stroke scale at the national institutes of health, NIHSS)^[6]进行评价,包括:语言、凝视、意识水平、语言、构音障碍、忽视等方面,总分以42分为最高得分,分数越接近42分表示症状越严重。神经功能轻度缺损: ≤ 15 分,神经功能中度缺损: $\geq 16\sim\leq 30$ 分,神经功能重度缺损: ≥ 31 分。

Brunnstrom分期^[7]: I期、II期为轻度; III期、IV期为中度; V期、VI期为重度。

ADL评分^[7]:最高得分100分, >60 分为良,生活基本自理; $\leq 59\sim\geq 40$ 分为中度功能障碍,生活需要帮助; ≤ 39 以下为重度功能障碍,生活依赖明显。

综合三者评分,当患者在任意指标检测出现一项重度时,即为重度依赖组;当患者三项评分均为轻度时,均为轻度依赖组;其余均为中度依赖组。

1.4 统计学处理

采用SPSS 22.0软件进行数据统计分析,计数资料以 $n(\%)$ 表示,行 χ^2 检验;定量资料以正态性分布,使用 $(\bar{x}\pm s)$ 表示,组间比较采用 t 检验,多组间比较采用 F 检验,相关性采用Pearson相关分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组Hcy、NSE、IL-8水平比较

研究组患者Hcy、NSE、IL-8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Hcy、NSE、IL-8水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of Hcy, NSE and IL-8 levels between 2 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Hcy ($\mu\text{mol/L}$)	NSE (ng/mL)	IL-8 ($\mu\text{g/L}$)
研究组	116	39.66 $\pm$ 4.51	32.43 $\pm$ 4.21	2.76 $\pm$ 0.78
对照组	108	18.42 $\pm$ 3.52	14.71 $\pm$ 5.31	0.05 $\pm$ 0.03
t值	-	39.094	27.770	36.076
P值	-	<0.001	<0.001	<0.001

2.2 不同神经缺损患者Hcy、NSE、IL-8水平比较

不同神经缺损患者Hcy、NSE、IL-8水平:重度依赖组>中度依赖组>轻度依赖组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表2。

表2 不同神经缺损患者Hcy、NSE、IL-8水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of Hcy, NSE and IL-8 levels in patients with different nerve defects ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Hcy ($\mu\text{mol/L}$)	NSE (ng/mL)	IL-8 ($\mu\text{g/L}$)
轻度依赖组	46	23.46 $\pm$ 3.72	17.64 $\pm$ 3.51	1.37 $\pm$ 0.84
中度依赖组	40	31.53 $\pm$ 3.46	26.83 $\pm$ 3.98	2.32 $\pm$ 0.52
重度依赖组	30	41.08 $\pm$ 3.09	34.12 $\pm$ 2.51	3.81 $\pm$ 0.73
F值	-	234.43	213.53	105.77
P值	-	<0.001	<0.001	<0.001

2.3 脑卒中患者Hcy、NSE、IL-8、与NIHSS评分、Brunnstrom分期、ADL评分相关性分析

脑卒中患者Hcy与NIHSS评分呈正相关($r=0.972, P<0.001$),与Brunnstrom分期($r=-0.903, P<0.007$)和ADL指数呈负相关($-0.897, P<0.009$)。NSE与NIHSS评分呈正相关($r=0.956, P<0.001$),与Brunnstrom分期($r=-0.992, P<0.005$)和ADL指数呈负相关($-0.806, P<0.001$)。IL-8与NIHSS评分呈正相关($r=0.978, P<0.001$),与Brunnstrom分期($r=-0.872, P<0.009$)和ADL指数呈负相关($-0.943, P<0.006$)。见图1。

3 讨论

近年来,脑卒中的发病率在全球范围内呈逐年上升趋势,防治心脑血管意外已成为世界关注的公共卫生问题,积极评估病情、制定合理治疗及康复方案对改善脑卒中患者预后具有重要意义。

Hcy是一种人体内的含硫氨基酸,为蛋氨酸和半胱氨酸代谢过程中重要中间产物。Hcy具有几点作用:①可引起内皮细胞损伤,尤以合并高血压时更易受损,并且破坏血管壁弹力层和胶原纤维。②直接诱导血管平滑肌细胞增殖。③促进血栓调节因子的表达,促进血小板黏附和聚集。

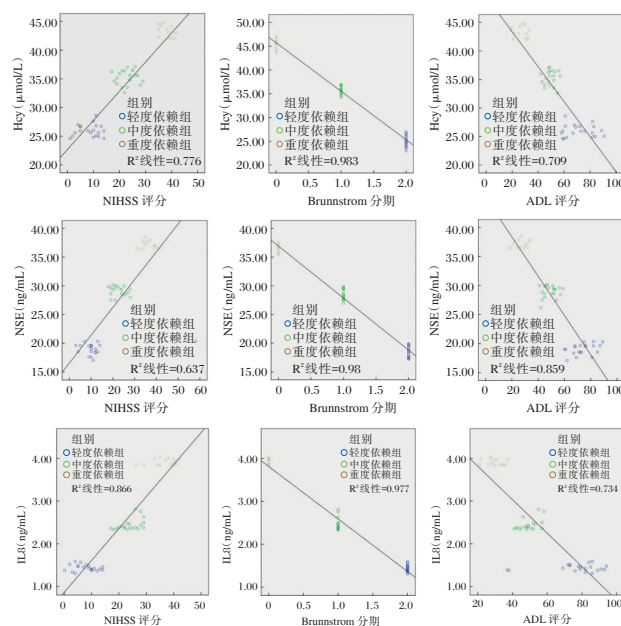


图1 脑卒中患者Hcy、NSE、IL-8与NIHSS评分、Brunnstrom分期、ADL评分的关系

Figure 1 the relationship between Hcy, NSE, IL-8, and NIHSS score, Brunnstrom stage and ADL score in stroke patients

④促进脂质沉积与动脉壁泡沫细胞增加,还可改变动脉壁糖蛋白分子纤维化架构,促进斑块钙化。⑤干扰谷胱甘肽合成,对机体造成危害。⑥影响体内转甲基化反应,导致细胞发育及分化^[9]。而NSE是神经元和神经内分泌细胞所特有的一种酸性蛋白酶,广泛存在于生物组织细胞内,性质稳定,在血清和脊髓中含量偏低;一旦神经细胞受损,NSE可通过血脑屏障进入血液及脑脊髓,是临床了解神经元损伤程度的有效指标^[10]。近年来,研究发现趋化因子的可溶性小分子多肽物质在脑卒中后的炎症反应中起着重要作用^[11]。IL-8是最早命名的趋化因子,是由多种细胞产生的小分子量多肽,可趋化和激活中性粒细胞,并参与中性粒细胞与内皮细胞粘附过程的调节,加重组织损伤。

相关研究表明,Hcy可让3/4的高血压患者脑卒中死亡风险增加12倍,且Hcy与脑卒中患者的进展密切相关^[12]。Qin等^[13]在动物实验中研究发现,脑组织后脑脊液NSE水平明显上升,并且与脑梗死的范围呈正相关。而研究发现,IL-8在脑缺血再灌注早期明显升高,早期应用抗IL-8抗体治疗可明显减轻再灌注6h后的脑水肿和12h后的脑梗塞范围^[14]。本研究结果说明Hcy、NSE及IL-8可有效得对脑卒中患者的神经功能损害程度进行评价,有助于指导临床,可行性高。

此外, Nasserinejad 等^[15]对脑卒中患者进行Brunnstrom分期训练发现,早期进行功能干预能更有效恢复神经功能障碍,促进患者生活及运动功能的早期恢复。而相关外国文献研究显示,IL-8促进中性粒细胞与内皮细胞粘附和跨膜移行,引起小胶质细胞移位及肌纤维蛋白骨架的重组,对中枢神经系统损伤部位的小胶质细胞移位及聚集有重要作用^[16]。

综上所述,Hcy、NSE及IL-8水平对脑卒中患者神经功能及康复指标具有重要意义,临床工作者可通过监测这三项指标,评估疾病进展及预后。此外,本研究中不足之处在于纳入样本量较少,研究结果难免存在偏倚,后续将扩大样本量继续深入研究。

参考文献

- [1] Meretoja A, Keshtkaran M, Tatlisumak T, et al. Endovascular therapy for ischemic stroke[J]. *Neurology*, 2017, 88(22): 2123-2127.
- [2] Koh SH, Park HH. Neurogenesis in Stroke Recovery [J]. *Translat Stroke Res*, 2017, 8(1):3-13.
- [3] Wang C, Yu H, Wang X, et al. Effect of IL-8, IL-2 and IL-15 Gene Expression in Different Tissues of Jinghai Yellow Chicken Infected by Eimeria Tenella [J]. *J Phys: Confer Series*, 2020, 16(5):172-174.
- [4] 庞国勋, 靳会欣, 刘洪涛. 脑卒中患者 MTHFR 基因多态性与同型半胱氨酸水平的关系研究[J]. *解放军医药杂志*, 2018, 30(12):104-106.
- [5] 中华医学会神经病学分会, 中华医学会神经病学分会脑血管病学组. 中国急性缺血性脑卒中诊治指南 2018 [J]. *中华神经科杂志*, 2018, 51(9):666-682.
- [6] 冯义伶, 穆海玉, 曲雅静. 人脑胶质瘤细胞中 β -catenin/Tcf-4 转录对 AKT2 基因表达的调控及其生物学行为影响[J]. *医学分子生物学杂志*, 2018, 15(6): 551-554.
- [7] Teh WL, Abdin E, Vaingankar JA, et al. Prevalence of stroke, risk factors, disability and care needs in older adults in Singapore: results from the WiSE study [J]. *BMJ Open*, 2018, 8(3):20285-20289.
- [8] Maeda H, Imada K, Ishida K, et al. Relationship of Quadriceps Muscle Thickness with Motor Paralysis and Muscle Echo Intensity in Post-Stroke Patients [J]. *Europ Neurol*, 2019, 81(1-2): 56-62.
- [9] De Morco M, Gerdtz E, Mancusi C, et al. Influence of Left Ventricular Stroke Volume on Incident Heart Failure in a Population With Preserved Ejection Fraction (from the Strong Heart Study) [J]. *Am J Cardiol*, 2017, 119(7):1047-1052.
- [10] 薛颖, 吕通政. 针灸联合补阳还五汤加减治疗脑卒中后痉挛性瘫痪的临床疗效[J]. *保健医学研究与实践*, 2019, 16(6): 53-56.
- [11] Hui L, Yitong Z, Jihui X. Study on the Relationship between Serum IL-1 β IL-6 IL-8 and the Pain of Patient with Acute Gouty Arthritis [J]. *Heb Med*, 2019, 10(5):208-211.
- [12] HE FY, Yin, Li DY, et al. Relationship between DNA Methylation of Key Enzyme Genes in Homocysteine Metabolism and Atherothrombotic Stroke [J]. *Neur Injury Funct Reconstr*, 2019, 15(6): 462-465.
- [13] Qin X, Wei H, Yali W. Relationship between serum IL-4, IL-8, TNF- α , T lymphocyte subset and prognosis of patients with psoriasis vulgaris [J]. *Heb Med J*, 2019, 29(8):552-556.
- [14] Dingjiong S. Guidance of Brunnstrom Staging Theory on Acupuncture Treatment for Post-Stroke Hemiplegia [J]. *J Clin Acupunct Moxibustion*, 2019, 19(7):347-349.
- [15] Nasserinejad M, Shojae S, Ghobakhlou M, et al. The effects of IL-8, IL-6, and IL-1 on the risk of celiac disease: a Bayesian regression analysis [J]. *Gastroenterol Hepatol From Bed Bench*, 2019, 25(10):173-177.
- [16] Nagpal A, Choy FC, Howell S, et al. Safety and effectiveness of stem cell therapies in early-phase clinical trials in stroke: a systematic review and meta-analysis [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2017, 8(1):191-193.
- [9] Tavartkiladze L, Tavartkiladze A, Sordia T, et al. Chrono-therapeutic regimen with liposomal cisplatin for systemic treatment of primary liver cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2019, 37(15): e15678-e15678.
- [10] Maurizio V, Federico C, Arturo C, et al. Isolated Pelvic Perfusion for the Treatment of Unresectable Primary or Recurrent Rectal Cancer [J]. *Tumori J*, 2018, 37(19):5417-5420.
- [11] Jingjing M, Jianmin J. The Diagnosis Value of AFP-L3, Fer, TSGF Combined Detection on Primary Liver Cancer [J]. *Pract J Cancer*, 2019, 63(74):1744-1747.
- [12] Ako S, Nakamura S, Nouse K, et al. Transcatheter Arterial Chemoembolization to Reduce Size of Hepatocellular Carcinoma before Radiofrequency Ablation [J]. *Acta Med Okayama*, 2018, 72(1):47-52.
- [13] Sainamthip P, Kongphanich C, Prasongsuk N, et al. Dexamethasone prophylaxis of postembolization syndrome after transcatheter arterial chemoembolization: a randomized, double-blind, placebo-controlled study [J]. *J Hepatol*, 2020, 73(32):906-908.
- [14] Lazuardi F, Valencia J, Zheng S. Adjuvant transcatheter arterial chemoembolization after radical resection of hepatocellular carcinoma patients with tumor size less than 5cm: a retrospective study [J]. *Scandin J Gastroenterol*, 2019, 54(5):617-622.
- [15] Toshikazu Y, Harukazu T, Taro K, et al. Effects of Local Administration of Vascular Endothelial Growth Factor on Mechanical Characteristics of the Semitendinosus Tendon Graft after Anterior Cruciate Ligament Reconstruction in Sheep [J]. *The Am J Sports Med*, 2017, 34(12):1918.

(上接第 469 页)

胸腔镜手术对非小细胞肺癌患者SAA、IL-2R及T淋巴细胞的影响

梁建伟 孙滕 张昊*

【摘要】 目的 分析胸腔镜手术对非小细胞肺癌(NSCLC)患者血清淀粉样蛋白A(SAA)、白细胞介素-2受体(IL-2R)及T淋巴细胞的影响。**方法** 分析本院2019年2月至2020年1月收治的200例NSCLC患者的临床资料。根据不同的治疗方法分为胸腔镜组($n=106$,全胸腔镜手术)和传统组($n=94$,外侧开胸术),对比两组治疗前后免疫功能和创伤指标变化情况,比较两组安全性。**结果** 两组治疗 $CD4^+$ 、 $CD4^+/CD8^+$ 水平升高, $CD8^+$ 水平下降,并于治疗1w后达到峰值(最低值);胸腔镜组治疗后 $CD4^+$ 、 $CD4^+/CD8^+$ 高于传统组, $CD8^+$ 水平明显低于传统组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。两组治疗12h后CRP、IL-6、IL-2R、SAA水平升高,治疗1w后各指标降低;同时,胸腔镜组治疗后各时间点CRP、IL-6、IL-2R、SAA水平均低于传统组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。胸腔镜组术后并发症总发生率(2.83%)较传统组(10.64%)低,差异具有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 对于NSCLC患者采用全胸腔镜手术治疗创伤较小、安全性高,对机体免疫功能损害较为轻微,具有较高的应用价值。

【关键词】 胸腔镜手术;非小细胞肺癌;SAA;IL-2R;T淋巴细胞

The effect of thoracoscopic surgery on SAA, IL-2R and T lymphocytes in patients with non-small cell lung cancer

LIANG Jianwei, SUN Teng, ZHANG Hao*

(Department of Thoracic Surgery, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University, Xuzhou, Jiangsu, China, 221002)

【ABSTRACT】 Objective To analyze the effect of thoracoscopic surgery on serum amyloid A (SAA), interleukin-2 receptor (IL-2R) and T lymphocytes in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC). **Methods** The clinical data of 200 NSCLC patients admitted to our hospital from February 2019 to January 2020 were analyzed. According to different treatment methods, they were divided into the thoracoscopy group ($n=106$, full thoracoscopy surgery) and the traditional group ($n=94$, lateral thoracotomy). The immune function and trauma indicator changes between the two groups before and after treatment were compared, and the safety between the two groups was compared. **Results** The levels of $CD4^+$, $CD4^+/CD8^+$ in the two groups increased, and the level of $CD8^+$ decreased, and reached the peak (the lowest value) after one-week treatment. At the same time, the $CD4^+$ and $CD4^+/CD8^+$ levels in the thoracoscopy group were higher than those in the traditional group, and the $CD8^+$ level was significantly lower than that in the traditional group, and difference was statistically significant ($P<0.05$). The levels of CRP, IL-6, IL-2R, and SAA increased after treatment for 12h in the two groups, and each indicator decreased after treatment for 1 week. At the same time, the levels of CRP, IL-6, IL-2R, and SAA in the thoracoscopy group were lower than those in the traditional group at various time points after treatment, and the difference is statistically significant ($P<0.05$). The total incidence of postoperative complications in the thoracoscopy group (2.83%) was lower than that in the traditional

基金项目:江苏省卫生健康科研基金资助(WJ2019G135)

作者单位:徐州医科大学附属医院胸外科,江苏,徐州 221002

*通信作者:张昊, E-mail: haozhang_xz@163.com

group (10.64%) ($P<0.05$). **Conclusion** For NSCLC patients, the full thoracoscopic surgery is less traumatic, safe, and has less damage to the immune function of the body, which has high application value.

[KEY WORDS] Thoracoscopic surgery; Non-small cell lung cancer; SAA; IL-2R; T lymphocytes

非小细胞肺癌(Non small cell lung cancer, NSCLC)是起源于支气管粘膜或腺体的恶性肿瘤疾病,包括腺癌、大细胞癌及鳞状细胞癌等类型^[1]。研究指出,NSCLC的抑制性比较强,其倍增时间较短,恶性程度非常高^[2]。目前临床治疗NSCLC以手术为主,传统的手术多以大切口为主,对患者造成的创伤较大,手术风险和难度也随之提升^[3]。随着胸腔镜技术的发展与成熟,其逐步应用于NSCLC的临床治疗中,且广受好评。临床实践显示,胸腔镜手术治疗NSCLC具有创伤小、恢复快及安全性高等优势,关于其对患者创伤指标、免疫功能及生活质量也有良好的影响^[4]。本研究就胸腔镜手术对NSCLC患者血清淀粉样蛋白A(serum amyloid A, SAA)、白细胞介素-2受体(interleukin-2 receptor, IL-2R)及T淋巴细胞等的影响进行分析,以期临床治疗提供新的思路,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

分析本院2019年2月至2020年1月收治的200例NSCLC患者的临床资料。遵循医嘱要求根据不同的治疗方法分为胸腔镜组 and 传统组。胸腔镜组106例,男性60例,女性46例,平均年龄为(57.45±9.70)岁;病理类型:腺癌71例,鳞癌35例。传统组94例,男性53例,女性41例,平均年龄为(57.40±9.75)岁;病理类型:腺癌59例,鳞癌35例。本研究已获得本院医学伦理协会批准。

纳入标准:①均符合世界卫生组织非小细胞肺癌诊断标准^[5],肿瘤直径<5 cm;②肺门处最大淋巴结直径<1 cm;③临床资料无丢失或缺损,所有研究对象均签署知情同意书;④血液系统功能正常。排除标准:①合并冠心病、高血压、糖尿病史者;②合并意识障碍、神经功能异常者;③合并肝、肾功能异常者;④合并免疫系统、血液系统及精神系统等疾病者;⑤入组前有肺部手术史或放化疗史者;⑥无手术禁忌者。

1.2 治疗方法

传统组采取外侧开胸手术:患者取健侧卧位,全麻下行双腔气管插管,术中健侧单肺通气。于第4肋间或第4肋间外前侧或第5肋间下叶后外

侧作一20~25 cm切口,切开肋间肌,剪断肋骨,使用肋骨撑开器撑开肋间10~20 cm,将肺叶切除,采用切割缝合器缝合术中血管及支气管,肺动静脉采用丝线双重结扎,术毕逐层关闭手术切口。

胸腔镜组采取全胸腔镜手术:患者卧位及麻醉方式同传统组,术中健侧单肺通气。于腋中线第7~8肋间作一长为1.0 cm的切口,置入胸腔镜,将其作为观察孔。于腋前线第4肋间下叶或第3肋间中叶或上叶作一3 cm长的切口,作为主操作孔;于腋后线第7~8肋间或第9肋间作一1.0 cm长的切口,作为副操作孔。在胸腔镜直视下于操作孔置入乳突钩,将皮肤及皮下肌肉组织牵开。依据单向式肺叶切除理念进行操作,按由浅入深、由表到里的顺序,始终朝同一方向推进切除肺叶,整个手术过程不需反复翻动肺叶。采用腔镜直线切割缝合器对术中血管、支气管进行缝合,并对肺裂进行处理,术毕逐层关闭手术切口。同时,两组术中均行系统性肺门纵膈淋巴结清扫术+解剖性肺叶切除。

1.3 观察指标

1.3.1 T淋巴细胞

包括CD4+、CD8+、CD4+/CD8+,抽取所有患者术前、术后2 d及术后1 w空腹静脉血3 mL,置入抗凝管、离心(3 000 r/min, 10 min)取上清液,置于-80℃保存备用。取上述样品恢复至常温后,调整样品浓度至 2×10^6 /mL,予以加入100 μL已经混匀的全血并漩涡混匀放置于避光处15 min,将BD溶血素1.5 mL溶入流式管并于避光处孵育10 min直至完全透亮,再加入PBS予以洗涤一次并进行离心(1 000 r/min, 5 min),将上清液摒弃后再次加入PBS洗涤2次,洗涤完成后加入600 μL的1%固定液,上机待检。应用FACSCalibur型号(美国Becton Dickinson公司)的流式细胞仪进行检测,严格按照试剂说明操作。

1.3.2 创伤指标

包括C反应蛋白(C-reactive protein, CRP)和白细胞介素-6(interleukin6, IL-6)、SAA、IL-2R,抽取所有患者术前、术后12 h及术后72 h空腹静脉血5 mL,离心(3 500 r/min, 5 min, $r=8$ cm)后取分离血清,通过酶联免疫吸附法(Enzyme Linked Im-

mune Sorbent Assay, ELISA)法测定两组 CRP、IL-6、SAA、IL-2R 浓度,由北京美康生物技术研究有限责任公司提供检测所用的试剂,根据 ELISA 试剂盒说明书操作。

1.3.3 安全性

比较两组患者术后肺不张、肺炎、脓胸、切口感染、心律失常等并发症发生情况。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析,计量资料采用 $(\bar{x} \pm s)$ 描述,两组间采用 t 检验,多组间采用方差分析;计数资料采用 $n(\%)$ 表示,采用 χ^2 检验;以

$P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者治疗前后免疫功能比较

两组治疗前 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ 、 $CD4^+/CD8^+$ 水平比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。两组治疗 2 d 后 $CD4^+$ 、 $CD4^+/CD8^+$ 水平升高, $CD8^+$ 水平下降,并于治疗 1 w 后达到峰值(最低值);同时,胸腔镜组治疗后任一时间点 $CD4^+$ 、 $CD4^+/CD8^+$ 高于传统组, $CD8^+$ 水平明显低于传统组,差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 两组治疗前后 T 淋巴细胞水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of T lymphocyte levels between the two groups before and after treatment ($\bar{x} \pm s$)

组别		CD4 ⁺ (个/ μ L)			CD8 ⁺ (个/ μ L)			CD4 ⁺ /CD8 ⁺ (%)		
		治疗前	治疗 2 d 后	治疗 1 w 后	治疗前	治疗 2 d 后	治疗 1 w 后	治疗前	治疗 2 d 后	治疗 1 w 后
胸腔镜组	106	20.41 $\pm$ 3.42	39.84 $\pm$ 4.15	43.75 $\pm$ 4.85	41.09 $\pm$ 3.25	52.79 $\pm$ 3.69	60.74 $\pm$ 4.15	1.58 $\pm$ 0.61	2.15 $\pm$ 0.65	3.05 $\pm$ 0.71
传统组	94	20.49 $\pm$ 3.43	32.98 $\pm$ 4.21	37.54 $\pm$ 4.96	41.15 $\pm$ 3.29	47.59 $\pm$ 3.45	54.51 $\pm$ 4.09	1.53 $\pm$ 0.54	1.86 $\pm$ 0.61	2.38 $\pm$ 0.59
t 值		0.165	11.589	8.942	0.130	10.254	10.668	0.610	3.241	7.205
P 值		0.869	<0.001	<0.001	0.897	<0.001	<0.001	0.542	0.001	<0.001

2.2 两组患者创伤指标比较

两组治疗前 CRP、IL-6、IL-2R、SAA 水平比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。两组治疗 12 h 后 CRP、IL-6、IL-2R、SAA 水平升高,治疗 1 w 后各指标降低;同时,胸腔镜组治疗后各时间点 CRP、IL-6、IL-2R、SAA 水平均低于传统组,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。

2.3 安全性

胸腔镜组术后并发症总发生率较传统组低,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 3。

3 讨论

手术切除病灶是治疗早期 NSCLC 的有效方案,可显著改善患者预后。近年来,胸腔镜手术在

表 3 不同方法治疗的中央型肺癌两组术后并发症比较 [$n(\%)$]

Table 3 Comparison of postoperative complications of 2 groups of central lung cancer treated with different methods [$n(\%)$]

组别	n	肺不张	肺炎	切口感染	脓胸	心律失常
胸腔镜组	106	1(0.94)	1(0.94)	0(0.00)	0(0.00)	1(0.94)
传统组	94	1(1.06)	2(2.13)	4(4.26)	1(1.06)	2(2.13)
χ^2 值				4.998		
P 值				0.025		

不断发展,在治疗 NSCLC 中的应用日益广泛^[6]。从技术层面上分析,胸腔镜手术是通过 2~3 个操作孔,在电视影像监视辅助下完成过去由传统开胸进行的操作手术^[7]。胸腔镜手术本质与传统手术的原理相同,但改变了传统的手术入路、分离步

表 2 两组治疗前后 CRP、IL-6、IL-2R、SAA 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of CRP, IL-6, IL-2R and SAA levels between the two groups before and after treatment ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>		CRP(mg/L)	IL-6 (pg/mL)	IL-2R (U/mL)	SAA (mg/L)
胸腔镜组	106	治疗前	12.26±2.34	31.59±10.59	317.95±125.39	28.36±9.36
		治疗 12 h	72.26±21.92	85.21±32.89	413.81±135.74	439.63±152.39
		治疗 72 h	43.59±14.37	40.38±27.85	324.83±110.96	174.29±52.33
		<i>F</i> 值	413.58	133.53	19.78	530.73
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	
传统组	94	治疗前	12.31±2.35	31.53±10.58	318.83±125.41	28.41±9.38
		治疗 12 h	95.41±22.59	95.25±32.86	498.78±136.59	520.47±156.98
		治疗 72 h	62.17±15.02 ^d	53.47±28.41	397.56±113.51	208.85±53.68
		<i>F</i> 值	665.38	147.83	48.55	632.84
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	

骤、结扎与缝合方式以及手术过程中的观察方式。由于在 NSCLC 的治疗中,无需将肋骨撑开,因此胸腔镜手术具有较少的出血量、较轻的疼痛程度及较快的恢复速度等优势,易于患者接受^[8]。同时,胸腔镜技术中运用微小的医用摄像头将胸腔内的情况进行放大,使得手术视野更清晰、灵活,有助于操作者有效观察到病变细微结构,判断手术切除范围,故该术式安全性优于传统开胸手术。在国外,Meghnem 等^[9]研究报道了大量胸腔镜的手术经验,且证实了胸腔镜的可行性及安全性,受到大量临床外科医生的青睐。

由于外科手术是对人体特殊的创伤方式,可引起机体急性期反应及免疫功能改变^[10]。其中,B 细胞为体液免疫效应细胞,当其受到刺激后,可产生 IL-6、IL-2R、CRP、SAA 等炎性细胞因子。有学者比较了常规开胸手术与胸腔镜手术治疗肺癌的急性期反应,结果表明常规开胸手术患者血浆中细胞因子 IL-6、IL-2R、CRP 等指标均高于胸腔镜手术组^[11]。这与本研究结果一致,提示胸腔镜手术对机体创伤应激较小,有利于患者术后恢复。

研究认为,对 NSCLC 患者使用胸腔镜手术治疗的影响主要集中在细胞炎性因子、免疫细胞功能等方面,而在机体的免疫功能中,T 淋巴细胞占有极为重要的地位^[12]。外周血 T 细胞亚群又分 CD4+ 辅助/诱导性 T 细胞和 CD8+ 抑制性/细胞毒 T 细胞,其中 CD4+ 细胞可协助 B 细胞分泌抗体和调节其他 T 细胞的免疫应答,而 CD8+ 细胞则常表现细胞毒活性,是主要的细胞毒效应细胞^[13]。研究显示,普通开胸手术的巨大创伤严重削弱了免疫力,而胸腔镜手术创伤小,对机体免疫功能影响较小^[14]。这与本研究结果相似,提示胸腔镜治疗可减少机体免疫功能的损害,促进 T 淋巴细胞免疫功能恢复^[15]。此外,本研究结果显示胸腔镜组患者术后仍存在肺炎、肺不张及心律失常等并发症,因此术者还需具备丰富的胸腔镜下肺叶切除术经验及胸腔镜下缝合及打结技术,以降低并发症及风险发生。

综上所述,对于 NSCLC 患者,采用全胸腔镜手术治疗创伤较小、安全性高,可有效改善患者创伤指标,且对机体免疫功能损害较为轻微,具有较高的应用价值。

参考文献

[1] 骆雯,张匠.三维适形放疗对非小细胞肺癌患者肺功能的

影响[J].保健医学研究与实践,2014,11(6):37-39.

- [2] Comte D, Karampetsou MP, Kis-Toth K, et al. Brief Report: CD4+ T Cells From Patients With Systemic Lupus Erythematosus Respond Poorly to Exogenous Interleukin-2 [J]. *Arthritis Rheumatol*, 2017, 69(4):808-813.
- [3] Kim S, Lee S, Jung M, et al. The vitamin D analogue paricalcitol attenuates hepatic ischemia/reperfusion injury through down-regulation of Toll-like receptor 4 signaling in rats [J]. *Arch Med Res*, 2017, 13(2):459-469.
- [4] 杨雪梅,罗晓琴,胡赵,等.七氟醚预处理对肺癌胸腔镜手术中单肺通气氧化应激反应及炎性反应的影响[J].解放军医药杂志,2018,30(1):105-108.
- [5] Comte D, Karampetsou MP, Kis-Toth K, et al. CD4+ T cells from SLE patients respond poorly to exogenous IL-2 [J]. *other*, 2017, 69(4):808-813.
- [6] Tanzilia MF, Cahyadi A, Hermaningsih Y, et al. CD4+ T-cell, CD8+T-cell, CD4+/CD8+ ratio, and apoptosis as a response to induction phase chemotherapy in pediatric acute lymphoblastic leukemia [J]. *Paediatrica Indonesiana*, 2017, 57(3):3147-3149.
- [7] Julia U, Christoph S, Minh-Thu N, et al. Antigen delivery to dendritic cells shapes human CD4+ and CD8+ T cell memory responses to *Staphylococcus aureus* [J]. *Plos Pathogens*, 2017, 13(5):6387-6390.
- [8] Antonia SJ, Villegas A, Daniel D, et al. Durvalumab after Chemoradiotherapy in Stage III Non-Small-Cell Lung Cancer. [J]. *N Engl J Med*, 2017, 377(20):1919.
- [9] Meghnem D, Sébastien M, Frutoso M, et al. Cutting Edge: Differential Fine-Tuning of IL-2- and IL-15- Dependent Functions by targeting their Common IL-2/15Rβ/γc Receptor [J]. *J Immunol*, 2017, 198(12):4563-4566.
- [10] Masters GA, Sarah T, Azzoli CG, et al. Systemic Therapy for Stage IV Non-Small-Cell Lung Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Update. [J]. *J Oncol Pract*, 2017, 33(30):832-837.
- [11] Su Z, Dias-Santagata D, Duke MK, et al. A platform for rapid detection of multiple oncogenic mutations with relevance to targeted therapy in non-small-cell lung cancer [J]. *J Mol Diagn*, 2018, 56(1):74-84.
- [12] Edward BG, Katherine BW, Cliff M, et al. Healthcare resource utilization in advanced non-small-cell lung cancer: post hoc analysis of the randomized phase 3 REVEL study [J]. *Support Care Cancer*, 2021, 29(1):117-125.
- [13] Forde C, Gregory R, Scott JA, et al. Antibiotic use in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) patients receiving immune checkpoint inhibitors across the Northern Ireland Cancer Network [J]. *Lung Cancer*, 2020, 139(32):54.
- [14] Kalli F, Cioni M, Parodi A, et al. Increased frequency of interleukin and reduced frequency of interferon and IL reducing CD4+ and CD8+ cells in scleromyxedema [J]. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 2020, 34(5):1092-1097.
- [15] Capetti AF, Orofino GC, Paladini L, et al. Does simplification to dolutegravir-based dual regimens impact on the CD4+/CD8+ T-cell ratio? [J]. *Aids*, 2018, 32(8):1083-1084.

胃癌患者 CyPJ、ERp29 及 CSN5 的表达其与预后生存的关系研究

杨敬端* 何明 吴品

【摘要】目的 分析胃癌患者亲环素 J(CyPJ)、内质网蛋白质 29(ERp29)及 CSN5 的表达其与预后生存的关系。**方法** 纳入 2015 年 6 月至 2017 年 6 月本院收治的 115 例胃癌患者肿瘤组织(癌组织组)及肿瘤旁的正常胃粘膜组织(癌旁正常组织组)。比较 CyPJ、ERp29 及 CSN5 在不同组织中的表达;分析 CyPJ、ERp29 及 CSN5 与胃癌患者各病理参数的相关性,以 Kaplan-Meier 生存分析 CyPJ、ERp29 及 CSN5 表达对胃癌患者预后生存的影响;采用多元 Logistic 回归分析影响胃癌患者预后生存的危险因素。**结果** 胃癌组织组 CyPJ、CSN5 阳性表达率显著高于癌旁正常组织,ERp29 较癌旁正常组织阳性表达率低,差异均有统计学意义($P<0.05$);年龄、性别、浆膜浸润与胃癌患者 CyPJ、ERp29 及 CSN5 表达无相关($P>0.05$)。临床分期、浸润深度、淋巴结转移与患者 CyPJ、CSN5 表达呈正相关,组织分化程度与 CyPJ、CSN5 表达呈负相关($P<0.05$)。ERp29 与组织分化程度呈正相关,与临床分期、浸润深度、淋巴结转移呈负相关($P<0.05$)。截至随访结束,115 例胃癌患者生存 79 例,死亡 36 例,死亡率为 31.30%;生存分析显示 CyPJ 及 CSN5(表达阴性)、ERp29(表达阳性)者生存期较长,Keplan-meier 生存曲线明显不同($P<0.05$)。组织中低分化、TNM 分期:Ⅲ+Ⅳ期、淋巴结转移、ERp29 阴性表达、CyPJ 及 CSN5 阳性表达为影响胃癌患者预后生存的独立危险因素($P<0.05$)。**结论** CyPJ、ERp29 及 CSN5 在胃癌组织中呈异常表达状态;其表达水平与患者的肿瘤临床病理特征及预后有关。

【关键词】 胃癌; CyPJ; ERp29; CSN5

Study on the relationship between the expressions of CyPJ, ERp29 and CSN5 in patients with gastric cancer and prognostic survival

YANG Jingduan*, HE Ming, WU Pin

(Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanyang Medical College, Nanyang, Henan, China, 473000)

【ABSTRACT】Objective To analyze the relationship between the expression of CyPJ, ERp29 and CSN5 in patients with gastric cancer and the prognosis and survival. **Method** The data of 115 patients with gastric cancer admitted to our hospital from June 2015 to June 2017 were retrospectively analyzed, and tumor tissue (cancer tissue group) and normal gastric mucosal tissue adjacent to the tumor (paracancerous normal tissue group) were collected. The expressions of CyPJ, ERp29 and CSN5 in different tissues were compared. The correlation between CyPJ, ERp29 and CSN5 and the pathological parameters of patients with gastric cancer was analyzed. Kaplan-Meier survival analysis was used to analyze the effect of CyPJ, ERp29 and CSN5 expression on the prognosis survival of patients with gastric cancer and multivariate Logistic regression was used to analyze the risk factors affecting the prognosis and survival. **Result** The positive expression rates of CyPJ and CSN5 in the gastric cancer tissue group were significantly higher than those in the paracancerous normal tissue group, and the positive expression rate of ERp29 was lower than that in the paracancerous normal tissue group. The dif-

基金项目:河南省医学科技攻关计划项目(201504713)

作者单位:南阳医学高等专科学校第一附属医院消化内科,河南,南阳 473000

*通信作者:杨敬端, E-mail: tang60975ding009@163.com

ference was statistically significant ($P<0.05$). There was no significant correlation between age, gender, serosal-infiltration and the expression of CyPJ, ERp29 and CSN5 in gastric cancer patients ($P>0.05$), but the clinical stage, depth of invasion, and lymph node metastasis were positively correlated with the expression of CyPJ and CSN5, and the degree of tissue differentiation was negatively correlated with the expression of CyPJ and CSN5. ERp29 was positively correlated with the degree of tissue differentiation, and negatively correlated with clinical stage, depth of invasion, and lymph node metastasis ($P<0.05$). At the end of the follow-up, 79 patients with gastric cancer survived, 36 died, and the mortality rate was 31.30%. Survival analysis showed that patients with CyPJ, CSN5 (expression negative) and ERp29 (expression positive) had longer survival times, and Kaplan-meier survival curves were significantly different ($P<0.05$). Moderate to low differentiation of tissues, TNM staging: stage III+IV, lymph node metastasis, negative expression of ERp29, positive expression of CyPJ and CSN5 were independent risk factors affecting the prognosis and survival of patients with gastric cancer ($P<0.05$). **Conclusion** CyPJ, ERp29 and CSN5 are abnormally expressed in gastric cancer tissues. Their expression levels are related to the clinicopathological characteristics and prognosis of the tumor.

[KEY WORDS] Gastric cancer; CyPJ; ERp29; CSN

胃癌是我国常见肿瘤之一,近年来发病率日益增高。据统计,我国每年新发胃癌患者达40万人,死亡人数达30万人,严重威胁患者生命安危^[1]。尽管近年来胃癌的诊疗取得了显著进步,但在多数发展中国家胃癌的发病率及致死率仍在不断升高^[2]。故及时明确胃癌病情进展采取治疗措施具有重要意义。研究发现内质网蛋白质29(Endoplasmic reticulum protein 29, ERp29)在新生蛋白质空间结构的正确折叠及恢复中起着重要作用,与肿瘤发生密切相关^[3]。而COP9信号转移体(COP9 signalosome complex, CSN)是一种多亚基蛋白复合体,通过调控泛素蛋白酶体的降解过程而参与肿瘤的发生发展,在CSN亚单位中CSN5是CSN第5个亚单位,也是其活化中心,与多种肿瘤的进展密切相关^[4]。此外,亲环素J(Cyclophilins J, CyPJ)是一类低分子量多功能蛋白,可参与蛋白质合成、修复、免疫抑制、诱导细胞凋亡及调节细胞增殖等作用,是目前临床研究恶性肿瘤的新靶点^[5]。因此,本研究将分析胃癌患者CyPJ、ERp29及CSN5的表达及临床意义。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取本院2015年6月至2017年6月收治的115例胃癌患者作为研究对象。男性患者59例,女性患者56例,平均年龄(59.31 ± 6.65)岁。收集肿瘤组织及肿瘤旁的正常胃粘膜组织,分别作为癌组织组。纳入标准:①均经病理检查证实且符合日本胃癌学会第72届会议胃癌的标准治疗指导方

案^[6];②术前未接受化疗、放疗等辅助治疗;③本研究患者临床资料均完整;④无其它恶性疾病;⑤受试者签署知情同意书。排除标准:①合并肝、肾、心脏脏器严重疾病者;②合并严重神经功能、认知功能障碍者;③依从性差者。本研究经医院医学伦理委员会批准通过。

1.2 CyPJ、ERp29及CSN5水平检测方法

1.2.1 仪器与试剂

SP试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司)、免疫组织化学二抗试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司)、磷酸盐缓冲液(PBS)(北京赛默飞世尔生物化学制品有限公司)、兔抗人CyPJ抗体(英国Abcam公司)、兔抗人ERp29抗体(美国Abcam公司)、兔抗人CSN5抗体(美国Santa Cruz公司)。

1.2.2 检测方法

采集所有研究对象胃癌组织及癌旁组织,使用生理盐水清洗表面后保存在10%甲醛溶液中并置于 -80°C 恒温箱,分为三份。

CyPJ、ERp29及CSN5水平的检测采用免疫组织化学方法进行:链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶联结法(Streptomyces avidin peroxidase conjugation, SP)^[7],石蜡切片标本厚 $2\mu\text{m}$,烘烤 60°C ,二甲苯脱蜡,浸泡3次。3次离子水中浸泡抗原修复切片,磷酸盐缓冲液(PBST)洗3次。内源性过氧化物酶阻断剂滴加,室温孵育15 min,冲洗。一抗滴加,室温孵育1 h,冲洗。辣根酶标羊抗小鼠/兔IgG聚合物滴加,室温孵育30 min。对照组采用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)代替一抗;滴加山羊抗兔二抗(eBioscience)室温孵育30

min。二氨基联苯胺显色,苏木精复染,梯度酒精脱水,树胶封片。

1.2.3 结果判断

判断 CyPJ、ERp29 及 CSN5 蛋白范围的标准^[8]:每张切片在镜下分别以低倍镜及高倍镜进行观察,对每张切片上中下及里外中9个位置进行观察,最后对2位专家判断结果进行比对(差异较大时,需重新同时共同读片确定)。

采用 Volm 双评分法^[8]进行判定,在染色均匀的肿瘤区,选取5个高倍镜视野($\times 400$):按阳性细胞百分率(A值)评分^[7]: $<25\%$ 为1分, $25\% \sim 50\%$ 为2分, $>50\%$ 为3分;按染色强度(B值)评分:不着色为0分,浅棕黄色为1分,棕黄色为2分,棕褐色为3分。综合染色阳性细胞数与染色强度判断结果:阴性(-):0分,弱阳性(+):1~2分,中度阳性(++):3~4分,强阳性(+++):5~6分;两种计分的乘积为每例的加权分数,加权分数为0为阴性,其余均为阳性。

1.2.4 随访

所有患者治疗结束后通过电话、微信、到院复诊等方式进行随访3年,随访截止日期为2020年6月30日。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件分析,计数资料以 $n(\%)$ 表示,行 χ^2 检验;计量资料采用 $(\bar{x} \pm s)$ 描述,行 t 检验;予以 Kaplan-Meier 生存分析 CyPJ、ERp29 及 CSN5 表达对胃癌患者预后生存的影响;采用 Logistic 回归分析影响胃癌患者预后生存的危险因素,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

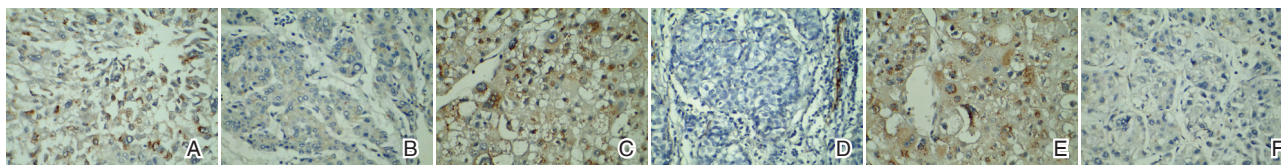
2.1 两组 CyPJ、ERp29 及 CSN5 的表达情况比较

胃癌组织组 CyPJ、CSN5 阳性表达率显著高于癌旁正常组织组,ERp29 阳性表达率显著低于癌旁正常组织组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表1、图1。

表1 两组 CyPJ、ERp29 及 CSN5 的表达情况比较 [$n(\%)$]

Table 1 Comparison of the expression of CYPJ, ERp29 and CSN5 between 2 groups [$n(\%)$]

组别	n	CyPJ		ERp29		CSN5	
		阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性
癌旁正常组织组	115	18(15.65)	97(84.34)	94(81.73)	21(18.26)	7(6.08)	108(93.91)
癌组织组	115	103(89.56)	12(10.43)	31(21.69)	84(73.04)	102(88.70)	13(11.30)
χ^2 值	-	125.995		69.552		157.385	
P 值	-	<0.001		<0.001		<0.001	



注:A、B 为 CyPJ 阳性、阴性表达; C、D 为 ERp29 阳性、阴性表达; E、F 为 CSN5 阳性、阴性表达。

图1 胃癌组织 CyPJ、ERp29、CSN5 免疫组化染色图 (SP, $\times 500$)

Figure 1 immunohistochemical staining of CYPJ, ERp29 and CSN5 in gastric cancer tissue (SP, $\times 500$)

2.2 CyPJ、ERp29 及 CSN5 与胃癌患者不同病理参数的关系

年龄、性别、浆膜浸润与胃癌患者 CyPJ、ERp29 及 CSN5 表达无相关($P > 0.05$)。临床分期、浸润深度、淋巴结转移与患者 CyPJ、CSN5 表达呈正相关,组织分化程度与 CyPJ、CSN5 表达呈负相关($P < 0.05$)。ERp29 与组织分化程度呈正相关,与临床分期、浸润深度、淋巴结转移呈负相关($P < 0.05$)。见表2。

2.3 115 例胃癌患者预后情况

截至随访结束,115 例胃癌患者生存 79 例,死

亡 36 例,死亡率为 31.30%。

CyPJ 表达阴性及表达阳性中位生存时间分别为 (42.75 ± 1.82) 个月、 (30.35 ± 1.01) 个月;ERp29 表达阴性及表达阳性中位生存时间分别为 (30.79 ± 1.08) 个月、 (39.76 ± 2.15) 个月;CSN5 表达阴性及表达阳性中位生存时间分别为 (43.01 ± 2.08) 个月、 (33.04 ± 1.04) 个月。生存分析显示 CyPJ 及 CSN5 (表达阴性)、ERp29 (表达阳性) 者生存期较长,Keplian-meier 生存曲线明显不同($P < 0.05$)。见图2。

表2 CyPJ、ERp29、CSN5与胃癌患者不同病理参数的关系 [n(%)]

Table 2 Relationship between CYPJ, ERp29 and different pathological parameters in patients with gastric cancer [n(%)]

病理参数		例数 (n=115)	CyPJ		χ^2 值	P 值	ERp29		χ^2 值	P 值	CSN5		χ^2 值	P 值
			阳性 (n=103)	阴性 (n=12)			阳性 (n=31)	阴性 (n=84)			阳性 (n=102)	阴性 (n=13)		
性别	男	59	53(51.45)	6(50.00)	0.009	0.924	15(48.38)	44(52.38)	0.145	0.704	51(50.00)	8(61.53)	0.614	0.433
	女	56	50(48.54)	6(50.00)			16(51.61)	40(47.61)			51(50.00)	5(41.66)		
年龄(岁)	<60	61	54(52.42)	7(58.33)	0.151	0.698	19(61.29)	42(50.00)	1.159	0.282	54(52.94)	7(53.84)	0.004	0.951
	≥60	54	49(47.57)	5(41.66)			12(38.70)	42(50.00)			48(47.05)	6(46.15)		
组织分化	高分化	65	55(53.39)	10(83.33)	3.919	0.048	26(83.87)	39(46.42)	12.918	<0.001	54(52.94)	11(84.61)	4.707	0.030
	中低分化	50	48(46.60)	2(16.66)			5(16.12)	45(53.57)			48(47.05)	2(15.38)		
淋巴结转移	无	57	46(44.67)	11(91.66)	9.500	0.002	24(77.41)	33(39.28)	13.172	<0.001	47(46.07)	10(76.92)	4.388	0.036
	有	58	57(55.33)	1(8.33)			7(22.58)	51(60.71)			55(53.92)	3(23.07)		
TNM 分期	I + II	51	41(39.80)	10(83.33)	8.251	0.004	25(80.64)	26(30.95)	22.656	<0.001	40(39.21)	11(84.61)	9.629	0.002
	III+IV	64	62(60.19)	2(16.66)			6(19.35)	58(69.04)			62(60.78)	2(15.38)		
浆膜浸润	是	55	50(48.54)	5(41.66)	0.204	0.652	15(48.38)	40(47.61)	0.005	0.942	50(49.01)	5(38.46)	0.515	0.473
	否	60	53(51.45)	7(58.33)			16(45.71)	44(52.38)			52(50.98)	8(61.53)		
浸润深度	T1~T2	49	39(37.86)	10(83.33)	9.087	0.003	27(87.09)	22(26.19)	33.269	<0.001	39(38.23)	10(76.92)	7.057	0.008
	T3~T4	66	64(62.13)	2(16.66)			4(12.90)	62(73.81)			63(61.76)	3(23.07)		

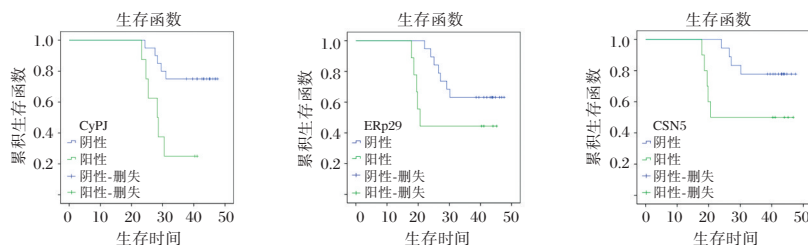


图2 CyPJ、ERp29、CSN5蛋白生存曲线图

Figure 2 protein survival curve of CYPJ, ERp29 and CSN5

2.4 影响胃癌患者预后生存的单因素和多因素分析

组织中低分化、TNM分期: III+IV期、淋巴结转移、ERp29阴性表达、CyPJ及CSN5阳性表达为影响胃癌患者预后生存的独立危险因素($P<0.05$)。见表3。

3 讨论

近年来我国胃癌发病率逐年上升,尽管目前胃癌的外科手术已取得长足的进步,但术后复发转移及死亡的风险仍较高^[9]。本研究显示,115例胃癌患

者死亡率为31.30%,基本与既往研究相似,故寻求有效治疗靶点对降低胃癌患者死亡率有重要意义。

CyPJ是亲环素家族成员之一,一方面可协助合成蛋白质,保护蛋白质正确合成;另一方面具有核酸酶活性,参与细胞凋亡进程^[10]。目前大量研究证实CyPJ和乳腺癌、肝癌、神经胶质瘤、甲状腺癌等多种肿瘤发生密切相关^[11]。ERp29是新发现的分子量为29 KDa的内质网蛋白质,其位于内质网腔,定位于12q24.13基因,协助新合成蛋白质分泌、转运、折叠蛋白恢复正确空间构象。相关研究

表3 影响胃癌患者预后生存的单因素和多因素分析

Table 3 univariate and multivariate analysis of prognostic factors in patients with gastric 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
浸润深度(T1~T2 vs T3~T4)	1.181	0.617~2.260	0.608	—	—	—
分化程度(中低分化 vs 高分化)	1.962	1.535~2.506	0.016	2.125	1.605~2.813	<0.001
TNM分期(III+IV期 vs I+II期)	2.330	1.781~3.048	0.009	2.572	1.865~3.548	<0.001
淋巴结转移(有 vs 无)	1.960	1.595~2.048	0.013	2.330	1.778~3.054	<0.001
CyPJ表达(阳性 vs 阴性)	2.155	1.720~2.700	0.045	2.444	1.772~3.371	<0.001
ERp29表达(阴性 vs 阳性)	2.565	1.984~3.316	0.033	2.401	1.775~3.247	<0.001
CSN5表达(阳性 vs 阴性)	2.325	1.816~2.977	0.021	2.565	1.896~3.468	<0.001

表示,内质网会因为体内未折叠或错误折叠蛋白质增多而发生未折叠蛋白质反应,这时未折叠蛋白质反应发出的信号调节会限制 mRNA 的翻译速度,使其表达水平下降,引发肿瘤^[12]。Tang W 等学者^[13]对乳腺癌研究发现,ERp29 通过对 p38 的信号通路进行负调控,抑制乳腺癌细胞的生长和生存。CSN5 是一种金属蛋白酶复合物,其参与多种细胞的凋亡及增殖。相关研究表明,肿瘤的进展与泛素蛋白酶体密切相关,而 CSN5 参与泛素蛋白酶体降解、催化,故认为 CSN5 肿瘤关系密切^[14]。本研究结果说明 CyPJ、CSN5、ERp29 在胃癌患者中恶变程度、侵袭转移中占有重要作用。

同时,为明确影响胃癌患者预后影响的危险因素,本研究对胃癌患者进行为期 3 年随访发现,患者死亡率为 31.30%。相关研究发现,CyPJ 与胃癌细胞增殖和凋亡、细胞周期调节、信号传导有关蛋白相互作用,在肿瘤发生发展过程发挥作用,其水平与胃癌患者两年生存率密切相关^[14]。而相关国外研究也显示,ERp29 表达水平可作为胃癌患者疾病程度与预后的生物学标志^[15]。本研究予以 Logistic 回归分析中显示,组织中低分化、TNM 分期:Ⅲ+Ⅳ期、淋巴结转移、ERp29 阴性表达、CyPJ 及 CSN5 阳性表达为影响胃癌患者预后生存的独立危险因素,与上述研究一致,有力证明了 CyPJ、CSN5、ERp29 与胃癌患者关系密切,进一步提示 CyPJ、CSN5、ERp29 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。但本研究由于纳入的样本量有限,研究结果有待于通过进一步扩大样本量或多中心合作研究予以进一步证实。

综上所述,CyPJ、ERp29 及 CSN5 在胃癌组织中呈异常表达状态,其表达水平与患者的肿瘤临床病理特征及预后有关。

参考文献

- [1] 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.
- [2] Seo HS, Hyeon J, Song IH, et al. Relationship between neuropilin-1 expression and prognosis, according to gastric cancer histology[J]. J Mol Histol, 2020, 31(9):594-597.
- [3] Chai H, Sun C, Liu J, et al. The Relationship Between ZEB1-AS1 Expression and the Prognosis of Patients With Advanced Gastric Cancer Receiving Chemotherapy[J]. Technol Cancer Res Treat, 2019, 18(5):381-383.
- [4] Watt J, Maguire DG, Reid CN, et al. Thrombomodulin Expression in Bladder Cancer Tissue and Its Association with Prognosis and Patient Survival[J]. Open Access J Urol, 2020, 12(2):299-304.
- [5] 唐伟,徐弘.胃癌的标准治疗指导方案:日本胃癌学会第72届会议简介[J].国际肿瘤学杂志,2000,27(3):174-177.
- [6] Sarra S, Blandine T, Matthieu W, et al. Relationship between obesity and severe COVID-19 outcomes in patients with type 2 diabetes: results from the CORONADO study[J]. Diabet, Obesity Metab, 2020, 23(9):473-476.
- [7] Yang AN, Wen-Chao Z, Nian-Xin X, et al. The Relationship of the Expression of miR-375 in the Serum and the Prognosis of Primary Liver Cancer Patients[J]. Label Immun Clin Med, 2019, 13(2):546-548.
- [8] Chen JH, Gu HL, Yuan JZ, et al. The expression of miR-21 and PTEN to evaluate the radiosensitivity and prognosis in patients with esophageal cancer[J]. J Mod Oncol, 2019, 20(4):567-569.
- [9] Junjie GU, Yajuan S, Zhao S, et al. The relationship between PD-L1 expression and clinicopathological features and prognosis in esophageal cancer patients: a Meta-analysis[J]. Oncol Progr, 2019, 12(6):409-413.
- [10] Zhang C, Zhang CD, Ma MH, et al. Three-microRNA signature identified by bioinformatics analysis predicts prognosis of gastric cancer patients[J]. World J Gastroenterol, 2018, 11(2):194-197.
- [11] 徐飞鹏,王妃凤,黄哲,等.内质网蛋白 29 和 Jagged1 在胃癌组织中的表达及其临床意义[J].中华实验外科杂志,2019,36(003):436-438.
- [12] Hu YR, Wang SL. Relationship between expression of MT1E, CA153 and clinical characteristics and prognosis of breast cancer patients[J]. Oncol Progr, 2019, 18(3):574-576.
- [13] Tang W, Liu X, Qiu L, et al. Influence of hypoxia-related genetic polymorphisms on the prognosis of patients with metastatic gastric cancer treated with EOF[J]. Oncol Lett, 2018, 15(1):1334-1342.
- [14] Lan Z, Limin C, Qian FU. Analysis of the Relationship between the Expression of miRNA-23a and the Prognosis of Advanced Breast Cancer after Total Resection[J]. Pract J Cancer, 2019, 22(13):692-695.
- [15] Zhong JY, Yang CQ, Liao ZP, et al. Relationship between Expression Levels of ERCC1 and BRCA1 and Therapeutic Effects of 5-fluorouracil in Patients with Esophageal Cancer[J]. Genom Appl Biol, 2019, 26(11):706-709.

· 论 著 ·

不同剂量美托洛尔对心力衰竭患者 NT-proBNP、GDF-15 及 Cys-C 的影响

朱洪新^{1*} 王涛¹ 王皓¹ 霍建凤²

[摘要] 目的 分析不同剂量美托洛尔对心力衰竭患者 N 末端脑钠肽前体(NT-proBNP)、血清分化生长因子-15(GDF-15)及半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C(Cys-c)等的影响。方法 选取 2018 年 9 月至 2019 年 9 月本院收治的 95 例心力衰竭患者,根据目标剂量(即靶剂量或最大耐受剂量)分为 A 组(高剂量组:琥珀酸美托洛尔缓释片 >95 mg/d, $n=50$)和 B 组(低剂量组:琥珀酸美托洛尔缓释片 ≤ 95 mg/d, $n=45$)。比较两组临床疗效,对比治疗前后 NT-proBNP、GDF-15 及 Cys-C 水平、心功能[左心室舒张末期内径(LVEDD),左心室射血分数(LVEF)和左心室收缩末期内径(LVSED)]、血管内皮功能及不良反应发生情况。结果 A 组总有效率高于 B 组,差异有统计学意义($P<0.05$)。A 组治疗后任一时间点 LgNT-proBNP、GDF-15 及 Cys-C 水平均低于 B 组,差异有统计学意义($P<0.05$)。经治疗后, A 组 LVEDD、LVSED 水平低于 B 组, LVEF 高于 B 组,差异有统计学意义($P<0.05$)。经治疗后, A 组肱动脉充血后血管内径、肱动脉反应性充血后血管内径变化率、肱动脉、NO 水平高于 B 组, ET-1 水平低于 B 组,差异有统计学意义($P<0.05$)。两组并发症发生率比较差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 美托洛尔逐日加量治疗心力衰竭能可明显调节血管内皮功能,改善心功能,降低 NT-proBNP、GDF-15 及 Cys-C 水平,抑制心肌重塑且安全性高。

[关键词] 不同剂量;美托洛尔;心力衰竭;NT-proBNP;GDF-15;Cys-C

Effects of different doses of metoprolol on NT-proBNP, GDF-15 and Cys-C in patients with heart failure

ZHU Hongxin^{1*}, WANG Tao¹, WANG Hao¹, HUO Jianfeng²

(1. Department of Cardiology, the Second Hospital of Qinhuangdao, Qinhuangdao, Hebei, China, 066600;

2. Department of Respiratory, the Second Hospital of Qinhuangdao, Qinhuangdao, Hebei, China, 066600)

[ABSTRACT] **Objective** To analyze the effects of different doses of metoprolol on N-terminal pro-brain natriuretic peptide (NT-proBNP), serum growth differentiation factor-15 (GDF-15) and cystatin-C (Cys-c) in patients with heart failure. **Method** 95 patients with heart failure admitted to our hospital from September 2018 to September 2019 were selected and divided into group A (high-dose group: metoprolol succinate sustained-release tablets > 95 mg/d, $n=50$) and group B (low-dose group: metoprolol succinate sustained-release tablets ≤ 95 mg/d, $n=45$) according to the target dose (target dose or maximum tolerated dose). The clinical effects of the two groups were compared, and the levels of NT-proBNP, GDF-15 and Cys-C before and after treatment, and cardiac function [left ventricular end diastolic diameter (LVEDD), left ventricular ejection fraction (LVEF) and left ventricular systolic end diameter (LVSED)], vascular endothelial function and occurrence of adverse reactions between the two groups were compared. **Results** The total effective rate of group A was higher than that of group B ($P<0.05$). LgNT-proBNP, GDF-15 and Cys-C levels at any time point after treatment in group A were lower than those in group B ($P<0.05$). After treatment, the levels of

基金项目:秦皇岛市科学技术研究与发展计划任务书(201805A121)

作者单位:1. 秦皇岛市第二医院心内科, 河北, 秦皇岛 066600

2. 秦皇岛市第二医院呼吸科, 河北, 秦皇岛 066600

*通信作者:朱洪新, E-mail:zhifanghua1739@163.com

LVEDD and LVSED in group A were lower than those in group B, and LVEF was higher than that in group B ($P<0.05$). After treatment, the internal diameter of blood vessel after brachial artery congestion, the change rate of internal diameter after brachial artery reactive hyperemia, brachial artery, and NO level in group A were higher than those in group B, and the level of ET-1 was lower than that in group B ($P<0.05$). There was no difference in the incidence of complications between the two groups ($P>0.05$). **Conclusion** Daily increase of metoprolol in the treatment of heart failure can significantly regulate vascular endothelial function, improve heart function, reduce NT-proBNP, GDF-15 and Cys-C levels, inhibit myocardial remodeling and have high safety.

[KEY WORDS] Different doses; Metoprolol; Heart failure; NT-proBNP; GDF-15; Cys-C

心力衰竭是在各种致病因素下,心泵功能减弱,以至不能满足机体组织代谢需要的全身病理过程或综合征^[1]。目前,心力衰竭的治疗关键为阻断神经内分泌系统,抑制心肌重塑^[2-3]。美托洛尔为临床应用较频繁的 β 受体阻滞剂,可通过选择性抑制心脏 β_1 受体达到控制患者症状的目的^[4]。但该药存在个体差异性,合理使用能抑制过度激活的交感神经系统,控制心率^[5]。本研究通过对比不同剂量美托洛尔对心力衰竭患者N末端脑钠肽前体(N-terminal pro-brain natriuretic peptide, NT-proBNP)、血清分化生长因子-15(growth differentiation factor-15, GDF-15)及半胱氨酸蛋白酶抑制剂C(cystatin-C, Cys-c)等的影响,以期为临床治疗方案的制定提供参考。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取2018年9月至2019年9月本院收治的95例心力衰竭患者,纳入标准:①符合心力衰竭的诊疗标准^[6];②患者发病时间不超过24 h;③临床资料完整且自愿签署知情同意书。排除标准:①合并支气管哮喘等病症不能使用有 β 受体阻滞剂的患者;②合并自身免疫性疾病或恶性肿瘤者;③无法配合研究者;④对本研究所用药物过敏者。

所有患者根据目标剂量分为:A组50例,男26例,女24例,平均年龄(61.25 ± 6.53)岁。B组45例,男24例,女21例,平均年龄(61.29 ± 6.58)岁。两组一般资料比较差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。本研究已通过本院医学伦理委员会批准。

1.2 方法

2组患者均行常规治疗,在此基础上,加用琥珀酸美托洛尔缓释片(瑞典 AstraZeneca AB, B14200011191, 47.5 mg/片),从11.875 mg(1/4片)开始服用,1次/d,每2~4 w增加一倍剂量,达到最大耐受量或靶剂量(190 mg/d)后维持治疗。A组

琥珀酸美托洛尔缓释片剂量 >95 mg/d, B组琥珀酸美托洛尔缓释片剂量 ≤ 95 mg/d。

最大耐受剂量确定标准^[7]:①清晨静息心率55~60次/min,不宜低于55次/min,当心率 <50 次/min时减1/2~1个前次调整剂量;②加量后患者收缩压 <12.00 kPa时减1/2~1个前次调整剂量;③加量后心功能恶化1级或以上,经调整心衰基础治疗仍不能改善者时减1/2~1个前次调整剂量;④琥珀酸美托洛尔维持用药过程中若出现心率 <50 次/min则逐渐减量,若出现心衰加重则调整基础治疗。

1.3 观察指标

①NT-proBNP:使用美国罗氏公司 Co-bas6000 E601全自动免疫发光分析仪检测。并将NT-proBNP转化为符合正态分布的血浆N末端脑钠肽前体的对数值lgNT-proBNP。②GDF-15:采用双抗体夹心酶联免疫吸附实验法检测,试剂盒购自上海蓝基生物有限公司。③Cys-C:采用免疫比浊法进行检测,试剂盒由宁波美康生物科技有限公司提供。④心功能:采用心脏超声多普勒检测患者左心室舒张末期内径(left ventricular end diastolic diameter, LVEDD),左心室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)和左心室收缩末期内径(left ventricular systolic end diameter, LVSED)。⑤血管内皮功能:采用Bv-520T超声多普勒血流检测仪检测所有受试者反应性充血状态下肱动脉血管内径及内径变化率、血流量。同时检测内皮素-1(endothelin-1 acetatecas, ET-1)及一氧化氮(nitric oxide, NO)水平。ET-1采用双抗夹心酶联免疫吸附法测定,NO采用硝酸还原酶法进行检测。⑥不良反应。

1.4 临床疗效^[8]

原心力衰竭症状及体征完全消失,心功能达到1级或改善2级以上为显效;症状和体征明显缓解,心功能改善1级,但未达到2级为有效;患者心功能改善未达到1级,或加重为无效。

1.5 统计方法

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

2 结果

2.1 两组临床疗效比较

治疗1年后无脱失病例,所有患者均获得完整随访。A组总有效率高于B组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表1。

表1 两组临床疗效比较 [$n(\%)$]

Table 1 Comparison of clinical efficacy between 2 groups [$n(\%)$]

组别	n	显效	有效	无效	总有效
A组	50	37(74.00)	11(22.00)	2(4.00)	48(96.00)
B组	45	30(66.67)	6(13.33)	9(20.00)	36(80.00)
χ^2 值	-	5.922			
P 值	-	0.015			

2.2 两组IgNT-proBNP比较

两组治疗前LgNT-proBNP水平比较差异无统计学意义($P > 0.05$),治疗后A组治疗后任一时间点LgNT-proBNP水平均低于B组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表2。

表2 两组IgNT-proBNP值比较 ($\bar{x} \pm s$, ng/L)

Table 2 Comparison of lgnt proBNP values between the two groups ($\bar{x} \pm s$, ng/L)

组别	n	治疗前	治疗3月后	治疗1年后
A组	50	3.63±1.52	2.01±1.08	1.13±0.54
B组	45	3.69±1.54	2.74±1.24	1.87±0.63
t 值	-	0.191	3.067	6.163
P 值	-	0.849	0.003	< 0.001

2.3 两组GDF-15比较

两组治疗前GDF-15水平比较差异无统计学意义($P > 0.05$),治疗后A组治疗后任一时间点GDF-15水平均低于B组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表3。

表3 两组治疗前后GDF-15值比较 ($n, \bar{x} \pm s$, ng/L)

Table 3 Comparison of GDF-15 values between the two groups before and after treatment ($n, \bar{x} \pm s$, ng/L)

组别	n	治疗前	治疗3月后	治疗1年后
A组	50	1351.26±135.41	952.15±114.74	786.39±87.65
B组	45	1356.42±135.36	1115.24±123.56	913.52±88.36
t 值	-	0.186	6.670	7.032
P 值	-	0.853	< 0.001	< 0.001

2.4 两组Cys-C比较

两组治疗前Cys-C水平比较差异无统计学意义($P > 0.05$),治疗后A组治疗后任一时间点Cys-C水平均低于B组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表4。

表4 两组Cys-C水平比较 ($n, \bar{x} \pm s$, ng/L)

Table 4 Comparison of Cys-C levels between the two groups ($n, \bar{x} \pm s$, ng/L)

组别	n	治疗前	治疗3月后	治疗1年后
A组	50	2.34±1.13	1.25±0.55	0.63±0.12
B组	45	2.37±1.16	1.64±0.63	1.15±0.23
t 值	-	0.128	3.221	14.013
P 值	-	0.899	0.002	< 0.001

2.5 两组心功能比较

两组治疗前LVEDD、LVEF和LVSED比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。经治疗后,A组LVEDD、LVSED水平低于B组,LVEF高于B组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表5。

2.6 两组血管内皮功能比较

两组治疗前,血管内皮功能指标水平比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。经治疗后,A组肱动脉充血后血管内径、肱动脉反应性充血后血管内径变化率、肱动脉、NO水平高于B组,ET-1水平低于B组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表6。

2.7 两组不良反应比较

A组出现1例眩晕,B组出现1例恶心呕吐,两组并发症发生率比较差异无统计学意义($\chi^2 = 0.001, P = 0.972$)。

表5 两组心功能比较 ($n, \bar{x} \pm s$)

Table 5 Comparison of cardiac function between the two groups ($n, \bar{x} \pm s$)

组别	n	LVEDD(mm)		LVSED(mm)		LVEF(%)	
		治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
A组	50	52.21±7.32	40.15±5.89	46.35±7.41	30.47±6.16	40.39±5.66	58.96±12.21
B组	45	52.28±7.38	45.63±5.26	46.52±7.35	37.56±6.52	40.52±5.63	51.89±12.13
t 值	-	0.046	4.762	0.112	5.449	0.112	2.827
P 值	-	0.963	< 0.001	0.911	< 0.001	0.911	0.006

表6 两组血管内皮功能指标比较 ($\bar{x} \pm s$)Table 6 Comparison of vascular endothelial function indexes between the two groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	肱动脉充血后 血管内径(mm)		肱动脉反应性充血后 血管内径变化率(%)		肱动脉(mL/min)		NO(ng/L)		ET-1(μ mol/L)	
		治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
A组	50	6.31 $\pm$ 1.52	9.47 $\pm$ 1.58	6.87 $\pm$ 1.45	20.53 $\pm$ 1.85	113.56 $\pm$ 22.74	185.24 $\pm$ 23.85	75.26 $\pm$ 12.26	94.36 $\pm$ 13.58	101.26 $\pm$ 15.35	63.59 $\pm$ 10.53
B组	45	6.25 $\pm$ 1.51	8.35 $\pm$ 1.52	6.89 $\pm$ 1.49	15.87 $\pm$ 1.74	113.85 $\pm$ 22.76	164.02 $\pm$ 23.52	75.35 $\pm$ 12.29	85.14 $\pm$ 13.41	101.37 $\pm$ 15.31	78.26 $\pm$ 10.87
t值	-	0.193	3.512	0.066	12.608	0.062	4.358	0.036	3.324	0.035	6.677
P值	-	0.848	0.001	0.947	<0.001	0.951	<0.001	0.972	<0.001	0.972	<0.001

3 讨论

心力衰竭是各种心脏病发展到严重阶段的一种临床症状群,临床主要表现为肺淤血和(或)腔静脉淤血症候群,其预后严重,已成为威胁我国民众生命健康的重要问题。近年来研究发现,神经内分泌细胞因子系统的长期、慢性激活促进心肌重塑,加重心肌损伤和心功能恶化是该病发生发展的基本机制^[9]。目前,心力衰竭的治疗策略不断转变,临床治疗目标也不仅局限于改善症状、提高生活质量,更重要的是针对心肌重塑的机制,防止和延缓心肌重塑的发展,从而降低该病病残和病死率^[10]。

β -受体阻滞剂能选择性地与 β 肾上腺素受体结合,从而拮抗神经递质和儿茶酚胺对 β 受体的激动作用^[11]。 β -受体阻滞剂可在心血管疾病中的恶性循环链中起到重要阻断作用,从而阻止和逆转心室重构,发挥改善内源性心肌功能的“生物学效应”,减少致死性心律失常和心源性猝死的危险,从而降低心力衰竭的发生率和病死率^[12]。我国慢性心力衰竭诊断治疗指南也指出所有慢性收缩性心衰, NYHA II~III级且病情稳定患者除存在禁忌症或不能耐受的情况,均需长期应用 β -受体阻滞剂^[13]。但受到不良反应、个体差异、患者依从性等多方面的影响,目前该类药物倾向于低剂量应用。据相关研究显示,长期低剂量应用 β -受体阻滞剂的临床疗效并不理想,难以使患者最大程度获益^[14]。

当心室容量负荷和压力负荷增高时,心肌细胞受拉后心室反应性合成N末端脑钠肽前体,并迅速裂解为proBNP,然后再裂解为NT-proBNP和BNP,因此NT-proBNP是心血管疾病尤其是心力衰竭诊断和评估的生物标志物^[15]。此外,GDF-15及Cys-C均可在一定程度上反映患者的心力衰竭程度,因此本研究选择此三指标作为疗效评价指标之一。美托洛尔具有较高的亲脂性,以 β 肾上

腺素能受体阻断为主,能够通过阻断 β 抑制肾素的释放,实现减缓心率的作用,且可以促使收缩压同步降低,继而降低氧耗量,缓解心肌缺血症状。本研究结果表明高剂量美托洛尔有利于抑制心肌重塑。提示临床在应用美托洛尔治疗心力衰竭时,可从小剂量开始,逐渐加大使用剂量,最终结合患者的实际情况及其它病史,挑选合适剂量长期维持服用,进而达到减轻临床症状、改善生活质量和降低死亡率及再住院率的目的。

综上所述,美托洛尔逐日加量治疗心力衰竭能可明显调节血管内皮功能,改善心功能,降低NT-proBNP、GDF-15及Cys-C指标水平,抑制心肌重塑,安全性高。

参考文献

- [1] 盖郁博,李春媛. 芪苈强心胶囊联合美托洛尔对慢性心力衰竭患者的疗效及血浆脑钠肽和高敏肌钙蛋白T的影响[J]. 解放军医药杂志, 2016, 28(11):92-92.
- [2] 钟慧,郑文琦. 美托洛尔联合莫雷西嗪治疗冠心病心律失常的临床效果[J]. 保健医学研究与实践, 2017, 14(5):54-56.
- [3] Lindholm D, James SK, Maria B, et al. Biomarkers and Coronary Lesions Predict Outcomes after Revascularization in Non - ST - Elevation Acute Coronary Syndrome [J]. Clin Chem, 2017, 63(2):573-584.
- [4] Jenab Y, Pourjafari M, Sotoudeh M, et al. Comparing the effect of cardiac biomarkers on the outcome of normotensive patients with acute pulmonary embolism [J]. Monaldi Arch Chest Dis, 2017, 87(1):767.
- [5] Unoki T, Suzuki M, Matsuda M, et al. 5195Growth differentiation factor-15 and mortality in suspected or known coronary heart disease patients with diabetes: a subanalysis of the ANOX study[J]. Eur Heart J, 2019, 34(32):5644-5648.
- [6] Szlachetka WA, Pana TA, Tiamkao S, et al. Impact of Diabetes on Complications, Long Term Mortality and Recurrence in 608,890 Hospitalised Patients with Stroke[J]. Global heart, 2020, 56(2):741-742.
- [7] Meloux A, Rochette L, Maza M, et al. P4550Growth differentiation factor 15 as an integrative biomarker of heart failure (下转第490页)

· 论 著 ·

糖尿病酮症酸中毒患者PCT、CRP、乳酸水平与感染关系

康孟杰* 王薇 韩朝霞 刘晓曼

【摘要】目的 探讨糖尿病酮症酸中毒(DKA)患者降钙素原(PCT)、C-反应蛋白(CRP)及乳酸水平变化与感染关系。**方法** 选择2017年1月至2020年7月本院收治的92例DKA患者设为研究组,根据是否合并感染另分两个亚组:将DKA合并感染者设为A组($n=54$),将DKA未合并感染者设为B组($n=38$),同时纳入98例同期本院接受健康体检结果正常者设为对照组。比较各组PCT、CRP及乳酸水平,绘制ROC曲线分析PCT、CRP、乳酸水平对DKA患者发生感染的预测价值。**结果** 研究组患者PCT、CRP、乳酸水平显著高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。A组患者WBC、PCT、CRP、乳酸水平明显高于B组,差异有统计学意义($P<0.05$)。PCT、CRP、乳酸水平升高与DKA合并感染密切相关($P<0.05$)。PCT、CRP、乳酸水平及三者联合曲线下面积分别为0.738、0.855、0.829、0.950,各指标曲线下面积以联合检测最高。**结论** PCT、CRP、乳酸水平与DKA合并感染关系密切,监测三者水平变化程度对评估感染病情严重程度具有重要意义。

【关键词】 PCT; CRP; 乳酸; 糖尿病酮症酸中毒

Study on relationship between PCT, CRP, lactic acid levels and infection in patients with diabetic ketoacidosis

KANG Mengjie*, WANG Wei, HAN Zhaoxia, LIU Xiaoman

(Department of Emergency, Beijing Shijitan Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing, China, 100038)

【ABSTRACT】 Objective To explore the relationship between the changes in the levels of procalcitonin (PCT), C-reactive protein (CRP) and lactic acid and the infection in patients with diabetic ketoacidosis (DKA). **Methods** 92 patients with DKA admitted to this hospital from January 2017 to July 2020 were selected as the study group. Then according to whether the patients were infected or not, they were divided into two subgroups. The patients with DKA combined with infection were set as group A ($n=54$), and DKA patients without infection were set as group B ($n=38$). At the same time, 98 cases who went to the hospital for a check-up and had normal results were selected as the control group. The levels of PCT, CRP and lactic acid in three groups were compared. The ROC curve was drawn to analyze the predictive value of PCT, CRP, and lactate levels in the occurrence of infection in DKA patients. **Results** The levels of PCT, CRP, and lactic acid in the study group were significantly higher than those in the control group, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). The levels of WBC, PCT, CRP, and lactic acid in group A were significantly higher than those in group B, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). Increased levels of PCT, CRP, and lactic acid are closely related to DKA co-infection ($P<0.05$). PCT, CRP, lactic acid levels and the area under the three combined curves were 0.738, 0.855, 0.829, 0.950, respectively, and the area under the three combined curve was the highest. **Conclusion** PCT, CRP, lactic acid levels are closely related to DKA co-infection, and monitoring the level of changes in the three is of great significance to assess the severity of infection.

【KEY WORDS】 PCT; CRP; Lactic acid; Diabetic ketoacidosis

基金项目:北京市自然科学基金项目(7182112)

作者单位:首都医科大学附属北京世纪坛医院急诊科,北京 100038

*通信作者:康孟杰, E-mail: kangmengjie3092@bjsjth.cn

糖尿病酮症酸中毒(Diabetic Ketoacidosis, DKA)是最常见的一种糖尿病急性并发症,糖尿病患者各种诱因作用下,胰岛素严重不足,升糖激素升高,引起糖、蛋白质、脂肪以及水、电解质、酸碱平衡失调,最终导致高血糖、高血酮、酮尿、脱水、电解质紊乱,并伴有代谢性酸中毒的临床综合征^[1]。大量研究发现,DKA患者死亡率高,其中感染是诱发糖尿病患者出现DKA或者DKA症状加重的重要危险因素^[2]。因此,如何及时纠正DKA患者生理功能,改善患者预后是目前研究热点。近年来,相关学者发现,DKA患者疾病的发生、发展与实验室指标密切相关^[3]。降钙素原(Procalcitonin, PCT)作为临床用于诊断细菌感染的敏感指标,广泛应用于临床,在多种感染性疾病中呈高表达状态^[4]。C-反应蛋白(C-reactive protein, CRP)作为急性期反应蛋白,可参与全身或局部炎症反应,是预测DKA感染严重程度的有效炎症指标^[5]。而相关研究发现,乳酸水平参与机体多种病理进程,且其水平变化与组织器官严重程度密切相关^[6]。本研究将分析DKA患者PCT、CRP、乳酸水平与感染关系,报告如下。

1 对象与方法

1.1 一般资料

选取2017年1月至2020年7月本院收治的92例DKA患者设为研究组,其中男58例,女34例,平均年龄(56.79±6.93)岁。根据是否合并感染另分两个亚组:将DKA合并感染者设为A组,将DKA未合并感染者设为B组,其中A组患者54例,男37例,女17例,平均年龄(56.71±6.12)岁;B组患者38例,男21例,女17例,平均年龄(55.53±6.32)岁。

纳入标准:①符合中国2型糖尿病防治指南(2017年版)^[7]诊断标准。②临床资料完整;③A组患者存在发热、白细胞升高等感染特征。排除标准:①合并肝肾等重要器官损害者。②合并继发性糖尿病、妊娠期糖尿病、甲状腺疾病及恶性肿瘤者;③临床及随访资料不完整或缺乏准确性者。

同时纳入同期本院接受健康体检结果正常者,共98例为对照组。男52例,女46例,平均年龄(56.13±6.06)岁。各组间一般资料比较差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。所有研究对象均签署知情同意书,本研究已获得院伦理委员会批准。

1.2 检测方法

PCT、CRP及乳酸:使用酶联免疫吸附法检查血

清中CRP水平,试剂盒购自欣博盛生物科技有限公司;PCT使用德国罗氏公司提供的E601电化学发光自动免疫分析仪测定;乳酸测定采用氧化酶法测定。同时进行血液酮体、肝肾功能[谷丙转氨酶(Alanine aminotransferase, ALT)和谷草转氨酶(Aspartate aminotransferase, AST)、血肌酐(Serum creatinine, Scr)和血尿素氮(Blood urea nitrogen, BUN)]、血常规白细胞计数(White blood cell count, WBC)、中性粒细胞百分比的常规检测,所有操作均按试剂或仪器所配套说明书进行,由专业人员操作。

1.3 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,采用 t 检验;计数资料以 $n(\%)$ 表示,采用 χ^2 检验。采用多元Logistic回归分析影响DKA患者发生感染的危险因素,绘制ROC曲线分析PCT、CRP、乳酸水平对DKA患者发生感染的预测价值。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组PCT、CRP、乳酸水平比较

研究组患者PCT、CRP、乳酸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PCT、CRP、乳酸水平比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of PCT, CRP and lactic acid levels between the 2 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	PCT(ng/mL)	乳酸(mmol/L)	CRP(ng/mL)
研究组	92	5.93±1.32	10.67±3.01	13.64±6.83
对照组	98	1.43±0.63	3.89±0.51	4.17±1.29
<i>t</i> 值	—	30.277	21.968	13.474
<i>P</i> 值	—	<0.001	<0.001	<0.001

2.2 分析影响DKA患者发生感染的单因素

A、B组患者WBC、PCT、CRP、乳酸水平等水平比较,差异有统计学意义($P<0.05$),两组酮体、ALT、AST、Scr、BUN、中性粒细胞等水平比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表2。

2.3 影响DKA患者发生感染的多因素分析

PCT、CRP、乳酸水平升高与DKA合并感染密切相关($P<0.05$)。见表3。

2.4 PCT、CRP、乳酸水平对DKA患者发生感染的预测价值

经绘制ROC曲线分析结果:PCT、CRP、乳酸水平及三者联合曲线下面积分别为0.738、0.855、0.829、0.950,各指标曲线下面积以联合检测最大,联合检测的预测价值最佳。见表4、图1。

表2 影响DKA患者发生感染的单因素分析

Table 2 single factor analysis of infection in DKA patients

因素	A组(n=54)	B组(n=38)	t值	P值
酮体(mmol/L)	6.98±1.23	6.68±1.93	0.910	0.365
ALT(U/L)	81.27±22.73	80.58±23.63	0.141	0.888
AST(U/L)	64.83±12.93	67.37±11.35	0.974	0.332
Scr(umol/L)	114.79±38.04	115.03±39.46	0.029	0.976
BUN(ng/L)	136.68±15.38	139.35±16.03	0.805	0.422
WBC($\times 10^9/L$)	14.93±3.03	10.03±2.05	8.664	<0.001
中性粒细胞(%)	86.24±5.93	85.38±6.92	0.639	0.524
PCT(ng/mL)	6.03±1.22	2.01±0.06	20.261	<0.001
CRP(mg/L)	14.04±6.43	5.02±0.44	8.619	<0.001
乳酸(mmol/L)	12.93±0.75	3.24±1.16	48.661	<0.001

表3 影响DKA患者发生感染的多因素分析

Table 3 Analysis of multiple factors influencing DKA infection

影响因素	回归系数	标准误	Wald/ χ^2 值	P值	OR(95%CI)
PCT(pg/mL)(正常 vs 异常升高)	1.884	0.450	10.254	<0.001	6.579(2.724~15.894)
CRP(mg/L)(正常 vs 异常升高)	1.758	0.358	9.854	<0.001	5.801(3.287~10.237)
乳酸(mmol/L)(正常 vs 异常升高)	1.874	0.421	9.724	<0.001	5.641(2.632~12.091)
WBC($\times 10^9/L$)(正常 vs 异常升高)	0.566	0.389	1.315	0.251	1.760(0.820~3.770)

表4 PCT、CRP、乳酸水平对DKA患者发生感染的预测价值(%)

Table 4 predictive value of PCT, CRP and lactic acid levels in DKA patients with infection (%)

预测指标	最佳临界值	灵敏度	特异度	AUC	95%CI
PCT	26.13	0.621	0.624	0.738	0.578~0.898
CRP	25.34	0.713	0.721	0.855	0.737~0.974
乳酸	26.48	0.746	0.752	0.829	0.691~0.968
三者联合检测	27.62	0.894	0.898	0.950	0.000~1.000

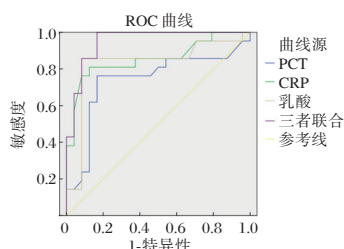


图1 PCT、CRP、乳酸水平对DKA患者发生感染的预测价值

Figure 1 the predictive value of PCT, CRP and lactic acid levels in DKA patients with infection

放,增加黏附及吞噬细胞反应,溶解细胞;另一方面,单核细胞可使淋巴细胞增生、活化,增强淋巴细胞生长的同时使T淋巴细胞一同增长,对吞噬细胞加强了吞噬作用^[9-10]。相关学者研究表明,CRP在各种组织损伤、急性炎症、手术创伤、放射性损伤、心肌梗塞等疾病发作后,可在数小时内快速上升,并有成倍增长趋势,当病变好转后,又迅速降至正常^[11]。PCT是一种无激素活性降钙素前体,正常情况下主要存在于甲状腺、肺部、神经内分泌细胞中,

3 讨论

DKA作为糖尿病患者常见的严重急性并发症,由胰岛素分泌异常、脏器功能紊乱等多种发病因素导致。感染作为DKA重要合并症之一,会加重患者病情,威胁患者生命安危^[8],故及时明确诊断并进行预后改善是目前临床上的研究热点。

CRP于1930年发现,是一种能与肺炎球菌C多糖体反应形成复合物的急性时相反应蛋白,一方面可通过经典途径激活、消耗补体,促使炎性介质释

可裂解成降钙素,一旦细菌感染,PCT水平浓度可快速上升,且其升高程度与感染呈正相关^[12]。相关研究表明,PCT水平变化与细菌感染密切相关,在感染严重时会迅速升高,而感染控制后会明显下降,其不受机体免疫抑制状态的影响^[13]。Ibrahim等^[14]研究发现,PCT对感染诊断具有特异性高、灵敏性好等优势。相关研究发现,组织发生缺血缺氧性损害时,组织细胞会产生大量的乳酸释放至血液中,因而乳酸被认为是能够对机体的氧供和血液灌注等情况进行检测的早期生化指标^[15]。本研究发现DKA合并感染者PCT、CRP及乳酸水平显著高于正常人群及未合并感染的患者,说明PCT、CRP及乳酸水平与DKA患者发生感染密切有着密切联系。

同时,本研究进行了Logistic回归分析,结果显示PCT、CRP、乳酸水平升高与DKA合并感染密切相关。这与既往学者研究PCT、CRP水平结果相似^[16],考虑与DKA患者体内缺血缺氧性刺激导致患者血象以及脏器功能发生异常改变,引发体内炎症标志物升高有关,进一步提示PCT、CRP及乳酸水平在DKA患者发生感染中意义深重。另本研究通过ROC曲线分析进一步提示联合检测三指标可作为预测患者感染的有效手段。

综上所述,PCT、CRP及乳酸水平在DKA患者中显著上升,且其水平变化与患者发生感染关系密切,临床上检测三者水平对监测患者感染情况具有重要意义。

参考文献

- [1] 刘鲁豫、刘爱霞、王露露、张习禄. 胰岛素泵治疗对糖尿病酮症酸中毒并发高脂血症性胰腺炎患者血淀粉酶恢复正常时间的影响[J]. 临床和实验医学杂志, 2020, 19(23):69-72.
 - [2] Iqbal QZ, Mishiyev D, Zia Z, et al. Euglycemic Diabetic Ketoacidosis With Sodium- Glucose Cotransporter-2 Inhibitor Use Post- Bariatric Surgery: A Brief Review of the Literature [J]. Cureus, 2020, 12(10):e10878.
 - [3] Peters AL, Mcguire DK, Danne T, et al. Diabetic Ketoacidosis and Related Events With Sotagliflozin Added to Insulin in Adults With Type 1 Diabetes: A Pooled Analysis of the inTandem 1 and 2 Studies[J]. Diabetes care, 2020, 43(11):2713-2720.
 - [4] Asarani NAM, Paddison J, Walker R, et al. New, onset type 1 diabetes complicated by diabetic ketoacidosis and severe sepsis requiring extracorporeal membrane oxygenation and kidney replacement therapy [J]. J Diabet Metabol Disorders, 2021, 9(4):1-5.
 - [5] Meyer EJ, Mignone E, Hade A, et al. Periprocedural Euglycemic Diabetic Ketoacidosis Associated With Sodium- Glucose Cotransporter 2 Inhibitor Therapy During Colonoscopy [J]. Diabetes Care, 2020, 43(11):e181-e184.
 - [6] Sheung N, Beechar A, Belalcázar LM. Nonsevere Diabetic Ketoacidosis and Adrenal Insufficiency: Exploring the Impact of Glucocorticoid Replacement on Metabolic Outcomes and ICU Length of Stay[J]. Critic Care Exp, 2020, 2(11):e0260.
 - [7] 中华医学会糖尿病学分会. 中国2型糖尿病防治指南(2017年版)[J]. 中国实用内科杂志, 2018, 38(4):292-344.
 - [8] 刘悦, 高旭灵, 李倩, 等. 坎地沙坦酯联合依那普利对早期糖尿病肾病患者血清炎症因子水平及24h尿微量白蛋白排泄率的影响[J]. 保健医学研究与实践, 2017, 6(14):58-61.
 - [9] Ning C, Pediatrics DO. Effect of meropenem on serum PCT, CRP and PLT levels in neonatal severe bacterial infection[J]. J Med Forum, 2019, 31(9):298-301.
 - [10] Amelie M, Magalie D, Liliane T, et al. Uncommon Association Between Diabetic Ketoacidosis, Thyrotoxicosis, Cutaneous Abscess and Acute Pericarditis in an Immunocompetent Patient: A Single Case Report and Literature Review [J]. Curr Diabet Rev, 2020, 22(7):371-373.
 - [11] Kim J H, Cho KU, Kim MS, et al. A case of diabetic ketoacidosis with posterior cerebral artery territory ischemic stroke mimicking uncal herniation [J]. Pediatr Emergency Med J, 2020, 17(8):224-227.
 - [12] Chirayath SR, Bhavani N, Vinayan KP, et al. Rare neurological complications associated with critically ill pediatric diabetic ketoacidosis—a report of two cases[J]. Int J Diabet Develop Countr, 2021, 13(7):205-209.
 - [13] 马鸿伟, 谷君, 胡利梅, 等. 硫辛酸诱发以酮症酸中毒为表现的胰岛素自身免疫综合征一例[J]. 中国糖尿病杂志, 2020, 28(6):467-469.
 - [14] Ibrahim R, Salih M, Elmokdad C, et al. Diabetic Ketoacidosis, Very Severe Hypertriglyceridemia, and Pseudohyponatremia Successfully Managed With Insulin Infusion [J]. Cureus, 2020, 12(7):408-412.
 - [15] Chaudhary H, Kumar S, Chigurupati NL, et al. Tacrolimus-induced Diabetic Ketoacidosis in a Polymyositis Patient Precipitated by Fluconazole: A Case Report and Review of the Literature[J]. Am J Med Case Rep, 2020, 26(8):76-78.
 - [16] Porntharukchareon T, Tontivuthikul B, Sintawichai N, et al. Pembrolizumab- and ipilimumab-induced diabetic ketoacidosis and isolated adrenocorticotrophic hormone deficiency: a case report[J]. J Med Case Rep, 2020, 14(1):171.
-
- (上接第486页)
- in patients with acute myocardial infarction[J]. Eur Heart J, 2019, 40(31):6515-6518.
 - [8] Muh AB, Eelko H, Jens HJ. B, et al. The burden and management of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6)-mediated drug-drug interaction (DDI): co-medication of metoprolol and paroxetine or fluoxetine in the elderly [J]. Pharmacoepidemiol Drug Saf, 2017, 36(17):3589-3593.
 - [9] Camilla H, Erik M, Cecilia L, et al. Inflammatory Biomarkers Predict Heart Failure Severity and Prognosis in Patients With Heart Failure With Preserved Ejection Fraction CLINICAL PERSPECTIVE [J]. Circ Cardiovasc Genet, 2017, 35(14):2525-2529.
 - [10] Fritz AS, Keller T, Kribs A, et al. Reference values for N-terminal Pro-brain natriuretic peptide in premature infants during their first weeks of life[J]. Eur J Pediatr, 2021, 180(4):1193-1201.
 - [11] Edwards KD, Tighe MP. How to use N-terminal pro-brain natriuretic peptide (NT-proBNP) in assessing disease severity in bronchiolitis [J]. Arch Dis Childhood Educ Pract Edit, 2020, 105(5):282-288.
 - [12] Khan S, Concina VA, Schneider D, et al. Role of NT-proBNP in the prediction of moderate to severe Bronchopulmonary Dysplasia in preterm infants [J]. Pediatr Pulmonol, 2020, 55(2):376-382.
 - [13] Tromp J, Khan MA, Klip IT, et al. Biomarker Profiles in Heart Failure Patients With Preserved and Reduced Ejection Fraction[J]. J Am Heart Assoc, 2017, 6(4):e003989.
 - [14] Tatu AL, Nwabudike LC. Metoprolol-Associated Onset of Psoriatic Arthropathy[J]. Am J Ther, 2017, 24(3):e370-e371.
 - [15] García-Prieto J, Villena-Gutiérrez R, Gómez M, et al. Neurophil stunning by metoprolol reduces infarct size [J]. Nat Commun, 2017, 8:14777-14780.

· 论 著 ·

ICAM-1、HSP70 及 PAF 水平变化与脊髓损伤患者病情及预后的关系

谢海洋 王冶 蒋成 张映波*

【摘要】目的 研究细胞间粘附分子-1(ICAM-1)、热休克蛋白 70(HSP70)及血小板活化因子(PAF)水平变化与脊髓损伤患者病情、预后的关系。**方法** 选取2016年6月至2018年6月于本院接受诊治的84例脊髓损伤(SCI)患者临床资料作为研究组,根据ASIA分级标准将SCI患者分为:脊髓完全损伤者(A组=43),脊髓不完全损伤者(B组=24),脊髓震荡者(C组=17)。并选取同期进行健康检查的96例正常人群作为对照组。比较ICAM-1、HSP70及PAF水平在各组间的情况,记录所有患者在随访时间内预后情况,采用多元Logistic回归分析影响脊髓损伤患者预后不良的危险因素。**结果** 研究组患者ICAM-1、HSP70及PAF水平明显高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);ICAM-1、HSP70及PAF水平显示:A组>B组>C组,差异有统计学意义($P<0.05$);84例患者经两年随访后显示,57例患者预后良好,27例患者预后不良,预后不良率为32.14%。经多元Logistic回归显示,患者受伤至手术时间、外伤类型、ICAM-1、HSP70及PAF水平为SCI患者预后不良的独立危险因素($P<0.05$)。**结论** ICAM-1、HSP70及PAF在SCI患者中明显升高,且与患者预后关系密切,可作为预测SCI患者预后的分子标志物 and 治疗的潜在的靶点。

【关键词】 ICAM-1; HSP70; PAF; 脊髓损伤

Relationship between the changes of ICAM-1, HSP70 and PAF levels and the condition and prognosis of patients with spinal cord injury

XIE Haiyang, WANG Ye, JIANG Cheng, ZHANG Yingbo*

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

【ABSTRACT】 Objective To study the relationship between the changes of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), heat shock protein 70 (HSP70) and platelet activating factor (PAF) levels and the condition and prognosis of patients with spinal cord injury. **Methods** The clinical data of 84 patients with spinal cord injury (SCI) who were diagnosed and treated in our hospital from June 2016 to June 2018 were selected as the research group. According to the ASIA grading standard, the SCI patients were divided into: patients with complete spinal cord injury (Group A, $n=43$) and incomplete spinal cord injuries (Group B, $n=24$), patients with spinal cord concussion (Group C, $n=17$). And 96 healthy persons who underwent health check in the same period was selected as the control group. The levels of ICAM-1, HSP70, and PAF among the groups were compared, and the prognosis of all patients during the follow-up period was recorded. Multivariate Logistic regression was used to analyze the risk factors that affect the poor prognosis of patients with spinal cord injury. **Results** The levels of ICAM-1, HSP70 and PAF in the study group were significantly higher than those in the control group, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). The levels of ICAM-1, HSP70 and PAF are as follows: Group A>Group B>Group C, and the difference was statistically significant ($P<$

基金项目:白求恩专项:脊柱病理性骨折椎体强化治疗专项科研基金项目(BK-JP2020001);川北医学院附属医院院级科研项目(2020JC029)

作者单位:川北医学院附属医院骨科,四川,南充 637000

*通信作者:张映波, E-mail: zhangyingbo333@163.com

0.05)。After two years of follow-up, 84 patients showed that 57 patients had a good prognosis, 27 patients had a poor prognosis, and the poor prognosis rate was 32.14%. Multivariate Logistic regression showed that the time from injury to operation, type of injury, ICAM-1, HSP70 and PAF levels were independent risk factors for poor prognosis in patients with SCI ($P<0.05$). **Conclusion** The levels of ICAM-1, HSP70 and PAF are significantly increased in SCI patients, and are closely related to the prognosis of patients, and can be used as molecular markers in predicting the prognosis of SCI patients and potential targets for treatment.

[KEY WORDS] ICAM-1; HSP70; PAF; Spinal cord injury

脊髓损伤(Spinal cord injury, SCI)是因脊柱骨各种致病因素(外伤、炎症、肿瘤等)引起脊髓的结构与功能的损害,造成损害平面以下的脊髓神经功能(运动、感觉、括约肌及自主神经功能)的障碍,具有极高的致残率,严重威胁患者的身体健康^[1]。相关研究表明,SCI尽早干预患者预后较好,故寻找有效的分子标记物用来评价SCI患者预后具有重要意义^[2]。细胞间粘附分子-1(Intercellular adhesion molecular-1, ICAM-1)可调节细胞与细胞、细胞与细胞外基质,起到粘附作用,同时,还参与机体免疫应答,对T细胞调节、激活增殖及细胞毒性等具有重要作用^[3]。相关研究发现,血小板活化因子(platelet activating factor, PAF)是炎症的自体有效递质,在各种创伤性炎症反应中具有极强的致炎作用^[4]。近年来,研究发现热休克蛋白70(Heat shock protein 70, HSP70)在SCI患者呈高浓度状态,然而其表达与SCI患者各项临床指标及预后的关系尚不明确^[5]。本研究就ICAM-1、HSP70及PAF水平变化与SCI患者病情、预后的关系进行研究,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2016年6月至2018年6月于本院接受诊治的84例SCI患者临床资料设为研究组,其中男45例,女39例,平均年龄(34.21 ± 6.37)岁。根据美国脊髓损伤协会(American Spinal Cord Injury Asso-

ciation, ASIA)分级标准^[6]将SCI患者分为:脊髓完全损伤者(A组=43),脊髓不完全损伤者(B组=24),脊髓震荡者(C组=17)。纳入标准:①所有患者符合脊髓损伤神经学分类国际标准(ASIA 2011版)^[6];②研究组患者均在受伤后48小时入院诊治;③均为继发性SCI;④临床资料完整且真实;排除标准:①合并多发性损伤及受伤后严重感染者;②严重精神疾患或痴呆等无法配合本研究;③存在重要脏器或内分泌、血液系统病变者。选取同期进行健康检查的正常人群作为对照组,共96例,其中男61例,女35例,平均年龄(34.72 ± 6.51)岁。各组性别、年龄等一般资料比较差异无统计学意义,具有可比性($P>0.05$)。见表1。本研究通过医院伦理委员会批准,受试者已签署知情同意书。

1.2 研究方法

收集所有患者临床资料,比较ICAM-1、HSP70及PAF水平在SCI患者的变化情况。记录所有患者在随访时间内预后情况,根据预后情况分为预后良好组及预后不良组,采用多元Logistic回归分析影响SCI患者预后不良的危险因素。

1.3 观察指标

取所有患者清晨空腹静脉全血5 mL,采用未加抗凝剂的标准采样管进行采集,离心($3\ 000\ r/min$, 10 min)取血清后分别存放在聚丙烯EP管中,在 -80°C 冰柜中待检。采用酶联免疫吸附法检测HSP70,试剂盒选取武汉华美生物有限公司。予以美国Beckman Coulter公司的流式细胞仪,测定

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

Table 1 Comparison of general data of group A, B, C [$n(\%)$, ($\bar{x}\pm s$)]

组别		性别 (男/女)	年龄 (岁)	受伤原因				损伤部位				受伤时间 (h)
				交通事故	坠落伤	暴力伤	其他	颈椎	胸椎	胸椎合并 颈椎	腰椎	
A组	43	20/23	34.52±5.75	14(32.55)	13(30.23)	12(27.90)	4(9.30)	17(39.53)	10(23.25)	6(13.95)	10(23.25)	9.48±1.02
B组	24	15/9	34.38±5.73	10(41.66)	7(29.16)	5(20.83)	2(8.33)	10(41.66)	7(29.16)	4(16.66)	3(12.50)	9.46±1.05
C组	17	10/7	34.57±5.71	8(47.05)	5(29.41)	3(17.64)	1(5.88)	8(47.05)	6(35.29)	1(5.88)	2(11.76)	9.50±1.03
F/χ^2 值		1.819	0.010			1.626				3.224		0.010
P 值		0.403	0.993			0.951				0.780		0.992

ICAM-1水平。予以反向高效液相色谱法检测PAF水平。所有操作均按照试剂盒上操作步骤进行。

1.4 随访方法

本研究随访从患者治疗开始,为期2年,截止于2020年6月。患者的随访时间分布在2~24个月,平均随访时间为(15.71±5.93)个月。对患者随访的方式主要采用电话随访、微信随访及患者来院复查为主。采用日本骨科学会(Japanese Orthopedic Association, JOA)^[7]颈脊髓功能评定标准评定疗效,根据 Hirabayashi^[8]公式计算治疗后末次随访时JOA评分改善率,患者经治疗后改善率在25%以下者为预后差,其余情况均视为预后好。

1.5 统计学方法

采用SPSS 22.0软件进行统计分析,计数资料以 $n(\%)$ 表示, χ^2 检验;计量资料采用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,组间比较行 t 检验,多组间比较行 F 检验;采用多元Logistic回归分析影响SCI患者预后不良的危险因素,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组ICAM-1、HSP70及PAF水平

研究组患者ICAM-1、HSP70及PAF水平明显高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表2。

2.2 对比A、B、C三组患者ICAM-1、HSP70及PAF水平

ICAM-1、HSP70及PAF水平显示:A组>B组>C组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表3。

表2 两组ICAM-1、HSP70及PAF水平比较($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of ICAM-1, HSP70 and PAF levels between 2 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	ICAM-1 (ng/mL)	HSP70 (ng/mL)	PAF (pg/mL)
对照组	96	1.30±0.42	13.42±2.05	120.34±20.16
研究组	84	5.81±1.56	67.13±6.21	271.34±31.45
t 值	-	27.230	79.937	38.811
P 值	-	<0.001	<0.001	<0.001

表3 A、B、C组患者ICAM-1、HSP70及PAF水平比较($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of ICAM-1, HSP70 and PAF levels among groups A, B and C ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	ICAM-1 (ng/mL)	HSP70 (ng/mL)	PAF (pg/mL)
A组	43	6.21±1.16	69.42±3.92	294.12±8.67
B组	24	4.12±1.12	44.33±5.13	234.11±15.67
C组	17	2.34±0.84	21.33±3.11	172.31±13.42
F 值	-	83.55	876.86	665.11
P 值	-	<0.001	<0.001	<0.001

2.3 SCI患者预后情况

84例患者经两年随访后显示,57例患者预后良好,预后良好率为67.85%,27例患者预后不良,预后不良率为32.14%,根据预后情况分为预后良好组及预后不良组。

2.4 影响SCI患者预后不良的因素分析

2组年龄、性别、SCI节段等占比比较差异无统计学意义($P > 0.05$),2组受伤至手术时间、外伤类型、ASIA分级、激素药物使用、ICAM-1、HSP70及PAF水平等比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表4。

表4 影响SCI患者预后不良的因素分析 [$n(\%)$, ($\bar{x} \pm s$)]

Table 4 Analysis of factors affecting poor prognosis of patients with SCI [$n(\%)$, ($\bar{x} \pm s$)]

因素		预后良好($n=57$)	预后不良($n=27$)	χ^2/t 值	P 值
性别	男	32(56.14)	13(48.14)	0.471	0.493
	女	25(43.85)	14(51.85)		
受伤至手术时间(h)	<24	43(75.43)	6(22.22)	21.347	<0.001
	≥24	14(24.56)	21(77.77)		
年龄(岁)	<60	36(63.15)	17(62.96)	0.000	0.986
	≥60	21(36.84)	10(37.03)		
外伤类型	高能量损伤	19(33.33)	23(85.18)	19.704	<0.001
	低能量损伤	38(66.66)	4(14.81)		
激素药物使用	有	46(80.70)	5(18.51)	29.702	<0.001
	无	11(19.29)	22(81.48)		
ASIA分级	B级	19(33.33)	10(37.03)	8.352	0.015
	C级	21(36.84)	8(29.62)		
	D级	17(29.82)	9(33.33)		
SCI节段	颈段	23(40.35)	11(40.74)	4.792	0.091
	胸段	25(43.85)	11(40.74)		
	胸腰段	9(15.78)	5(18.51)		
ICAM-1 (ng/mL)		1.53±0.19	5.46±1.91	15.476	<0.001
HSP70 (ng/mL)		11.58±3.89	69.51±3.83	64.054	<0.001
PAF (pg/mL)		132.08±8.42	291.63±11.16	72.839	<0.001

2.5 影响SCI患者预后不良的多因素分析

多因素分析结果显示,患者受伤至手术时间、

外伤类型、ICAM-1、HSP70及PAF水平为SCI患者预后不良的独立危险因素($P<0.05$)。见表5。

表 5 影响SCI患者预后不良的多因素分析

Table 5 multivariate analysis of poor prognosis in patients with SCI

影响因素	回归系数	标准误	Wald χ^2 值	OR	95%CI	P值
ASIA 分级(B级 vs C+D级)	0.794	0.895	4.596	2.21	0.38~12.78	0.292
外伤类型(高能量损伤 vs 低能量损伤)	0.869	0.161	4.596	2.38	1.74~3.26	<0.001
受伤至手术时间(<24 vs ≥ 24)	0.893	0.325	4.523	2.44	1.29~4.62	<0.001
激素药物使用(有 vs 无)	0.506	0.316	4.694	1.658	0.89~3.08	0.382
ICAM-1(正常 vs 异常)	0.712	0.314	4.489	2.03	1.10~3.77	<0.001
HSP70(正常 vs 异常)	0.912	0.274	4.671	2.48	1.45~4.25	<0.001
PAF(正常 vs 异常)	0.876	0.157	4.526	2.40	1.76~3.26	<0.001

3 讨论

SCI是一种极其严重的创伤,可触发受损脊髓炎症因子的释放,加重脊髓受损,治疗不及时可威胁患者生命安危^[9]。故寻求与SCI病情进展有关的分子标志物,对于SCI诊治和预后尤为重要。

ICAM-1是中免疫球蛋白超家族一员,可介导炎症细胞黏附参与机体免疫应答,还可作为抗原协同刺激分子激活限制性及细胞毒性T细胞。研究表发现,ICAM-1在内皮、角化、成纤维及上皮细胞等作用下,其表达水平可迅速升高^[10]。Clark等^[11]研究发现,急性SCI时ICAM-1可激活神经内分泌系统引起巨噬及淋巴细胞释放细胞因子,使其表达水平较正常人群明显上升。同时,Nakade等^[12]研究表示,ICAM-1水平与急性SCI免疫活性程度密切相关,可作为判断SCI预后的标志物。本研究将SCI患者根据ASIA分级进行分组检测,发现与上述研究一致,提示ICAM-1与SCI患者的疾病进展具有密切关系。另对患者进行随访预后调查显示,ICAM-1异常为影响SCI患者预后不良的独立危险因素,说明ICAM-1与SCI患者病情进展及预后关系密切,提示其可作为SCI患者一个潜在的预后分子生物学标志物。

相关临床研究发现,HSP70参与SCI病理过程,当脊髓受到损伤时,脊髓组织中星形胶质细胞、小胶质细胞及神经元等均会产生HSP70,HSP70通过一氧化氮介导产生细胞毒性,减少氧自由基。White A R^[13]研究表示,HSP70可促进超氧化物歧化酶修复,加快氧自由基的清除,利于机体抗氧化功能恢复,减轻脊髓继发损害。类似的,Yanrui等^[14]通过研究发现SCI患者HSP70水平与脊髓损伤患者的严重程度存在正相关,脊髓损伤越

严重血清中HSP70含量越高,推测HSP70在SCI进展中发挥重要作用。本研究结果提示HSP70在SCI的发生发展中发挥着免疫评估的作用。

PAF是目前为止发现的体内最强血小板聚集剂,一方面,可使血小板发生聚集和释放反应,激活中性粒细胞聚集、释放氧自由基等物质,增加血管壁通透性,促使肿瘤坏死因子产生;另一方面,在脊髓损伤的炎症过程和继发损伤中发挥毒性作用。Zhang等^[15]等研究发现,当脊髓损伤后可刺激PAF释放,改变PAF数量及受体活性,并与受体特异性结合,加重脊髓损伤。本研究结果说明PAF与SCI的发展关系密切,可将其作为预测SCI患者病情活动及预后的有效指标。

综上,ICAM-1、HSP70及PAF在SCI患者中明显升高,且与患者预后关系密切,可作为预测SCI患者预后的分子标志物 and 治疗的潜在的靶点。由于本研究纳入样本量较少,实验结果难免存在偏倚,后续将扩大样本量进一步研究,以获得更为准确的实验结果。

参考文献

- [1] Xue H, Yanjun G, Shijiao Z. The relationship between serum levels of pentraxin 3, high sensitivity c-reactive protein and the severity, prognosis of patients with acute cerebral infarction[J]. Stroke Nerv Dis, 2019, 23(11):331-335.
- [2] Oka S, Ono K, Nohgawa M. Relationship between p53 expression and prognosis of myelodysplastic syndrome treated with azacitidine[J]. J Hematopathol, 2020, 8(1):92-94.
- [3] Feng QJ, Liu N, Song SP, et al. Relationship between β -defensin-1 gene polymorphism and susceptibility and prognosis of acute respiratory distress syndrome[J]. Medicine, 2019, 21(6):332-336.

(上接第499页)

• 论 著 •

sdLDL-C、IMA 及 UACR 与急性缺血性脑卒中病情及预后的关系

李崇祯

【摘要】目的 探讨小而密低密度脂蛋白胆固醇(sdLDL-C)、缺血修饰蛋白(IMA)及尿微量清蛋白与尿肌酐比值(UACR)与急性缺血性脑卒中病情、预后的关系。**方法** 选取2017年12月至2019年12月本院收治的120例急性缺血性脑卒中患者设为观察组,其中美国国立卫生研究院卒中量表(NIHSS)评分>5分55例,NIHSS评分≤5分65例,另选取同时期于本院体检的128例健康体检者作为对照组。对比不同人群sdLDL-C、IMA、UACR水平,并分析NIHSS评分与sdLDL-C、IMA、UACR之间的相关性,采用Logistic回归分析影响急性缺血性脑卒中患者预后生存的相关危险因素。**结果** 观察组sdLDL-C、IMA、UACR水平均显著高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。NIHSS评分>5分的急性缺血性脑卒中患者sdLDL-C、IMA、UACR水平均显著高于NIHSS评分≤5分的急性缺血性脑卒中患者,差异均有统计学意义($P<0.05$)。急性缺血性脑卒中者NIHSS评分与sdLDL-C、IMA、UACR呈正相关($P<0.05$)。sdLDL-C(高表达)、IMA(高表达)、UACR(高表达)的患者死亡率明显更高($P<0.05$)。logistic回归分析结果显示:sdLDL-C(高表达)、IMA(高表达)、UACR(高表达)为影响急性缺血性脑卒中患者预后的独立危险因素($P<0.05$)。**结论** sdLDL-C、IMA、UACR与急性缺血性脑卒中患者病情发展关系密切,临床可加强三者联合检测,以评估急性缺血性脑卒中患者病情进展及预后。

【关键词】 sdLDL-C; IMA; UACR; 急性缺血性脑卒中

The relationship between sdLDL-C, IMA and UACR and the disease severity and prognosis of acute ischemic stroke

LI Chongyi

(Department of Geriatrics, Pingmei Shenma Medical Group General Hospital, Pingdingshan, Henan, China, 467000)

【ABSTRACT】 Objective To explore the relationship between small and dense low-density lipoprotein cholesterol (sdLDL-C), ischemia-modifying protein (IMA), urinary microalbumin to urinary creatinine ratio (UACR) and the condition and prognosis of acute ischemic stroke. **Methods** 120 patients with acute ischemic stroke who were admitted to this hospital from December 2017 to December 2019 were selected as the observation group. Among them, there were 55 cases whose National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS) scores were >5, and there were 65 cases whose NIHSS scores were ≤ 5. 128 healthy people who received physical examination in this hospital during the same period were selected as the control group. The levels of sdLDL-C, IMA, UACR in different groups were compared, and the correlation between NIHSS score and the expressions of sdLDL-C, IMA and UACR was analyzed. Logistic regression was used to analyze the related risk factors that affect the prognosis survival of patients with acute ischemic stroke. **Results** The levels

基金项目:河南省卫计委科技公关项目(172102310013)

作者单位:平煤神马医疗集团总医院老年病科,河南,平顶山 467000

通信作者:李崇祯, E-mail:zhou46126song178@163.com

of sdLDL-C, IMA and UACR in the observation group were significantly higher than those in the control group, the difference was statistically significant ($P<0.05$). The levels of sdLDL-C, IMA and UACR in patients with NIHSS score >5 were significantly higher than those in patients with NIHSS score ≤ 5 , and the difference was statistically significant ($P<0.05$). The NIHSS score of patients with acute ischemic stroke was positively correlated with levels of sdLDL-C, IMA and UACR ($P<0.05$). The mortality of patients with sdLDL-C (high expression), IMA (high expression) and UACR (high expression) was significantly higher ($P<0.05$). Logistic regression analysis showed that sdLDL-C (high expression), IMA (high expression) and UACR (high expression) were the independent risk factors affecting the prognosis of patients with acute ischemic stroke ($P<0.05$). **Conclusion** The levels of sdLDL-C, IMA, UACR are closely related to the disease development of patients with acute ischemic stroke. The combined detection of the three can be strengthened clinically to evaluate the disease progression and prognosis of patients with acute ischemic stroke.

[KEY WORDS] sdLDL-C; IMA; UACR; Acute ischemic stroke

急性缺血性脑卒中是临床上常见的一种脑血管疾病,该病具有较高的发病率及极高的致死率及致残率,是人类主要的致残、致死性疾病,严重威胁患者的生命健康安全^[1]。对急性缺血性脑卒中及时诊断、及时制定针对性的治疗方案,对提高患者治疗效果,降低致残率、致死率至关重要。既往研究指出,小而密低密度脂蛋白胆固醇(Small and dense low density lipoprotein cholesterol, sdLDL-C)具有较强的致动脉硬化作用^[2]。缺血修饰蛋白(Ischemia modified albumin, IMA)是人血清清蛋白流经缺血组织时所产生的,是一种较为理想的缺血标志物^[3]。微量清蛋白与尿肌酐比值(Ratio of urinary albumin to urinary creatinine, UACR)通常被认为反映了肾血管内皮受损及肾小动脉硬化的程度^[4],但对于其在脑卒中发病中的作用等方面鲜有报道。本研究将通过探讨sdLDL-C、IMA及UACR与急性缺血性脑卒中病情、预后的关系,为临床评估急性缺血性脑卒中病情进展及预后提供参考依据。报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2017年12月至2019年12月本院收治的120例急性缺血性脑卒中患者设为观察组,入院时美国国立卫生研究院卒中量表(Stroke scale at the national institutes of health, NIHSS)评分^[5] >5 分55例,入院时NIHSS评分 ≤ 5 分65例。另选取同时期于本院接受健康体检的128例患者作为对照组。两组一般资料比较差异无统计学意义($P<0.05$),具有可比性。见表1。

表1 2组患者基线资料比较 [$n(\%)$, ($\bar{x} \pm s$)]

Table 1 Comparison of baseline data between 2 groups

[$n(\%)$, ($\bar{x} \pm s$)]					
组别	n	性别 (男/女)	平均年龄 (岁)	平均体重 (kg)	身体质量指数 (kg/m^2)
观察组	120	68/52	58.32 $\pm$ 2.49	52.75 $\pm$ 2.28	22.19 $\pm$ 0.32
对照组	128	68/60	58.45 $\pm$ 2.54	52.68 $\pm$ 2.25	22.14 $\pm$ 0.25
χ^2 值		0.314	0.407	0.243	1.376
P 值		0.575	0.685	0.808	0.170

纳入标准:①均经CT、MRI检查确诊为急性缺血性脑卒中^[6],且为初次确诊的患者;②年龄80岁以下;③未合并其他恶性肿瘤;④纳入研究前一个月内,未使用过血小板抑制剂及抗凝剂及影响sdLDL-C、IMA及UACR水平的药物者。排除标准:①临床资料不全者;②精神障碍者、语言障碍、阿尔兹海默症者;③遗传性或获得性出血体质者。

1.2 方法

1.2.1 sdLDL-C、IMA及生化指标检测方法

急性缺血性脑卒中患者在入院后采静脉血5 mL,对照组为健康者体检时直接采血5 mL。所有标本采集后,形成血凝块后,均2 000 r/min离心20 min分离血清,保存于 -80°C 冰箱中集中检测。使用酶联免疫吸附法测定sdLDL-C、IMA水平,所用试剂盒为美国RnD公司生产的原装产品,样本检测时按试剂盒说明进行。sdLDL-C的参考范围为0.30~0.80 mmol/L^[7];IMA的参考范围为 <64.8 U/mL, IMA ≥ 64.8 U/mL则为升高^[8]。

1.2.2 UACR检测方法

急性缺血性脑卒中患者在入院后第二日清晨8:00,对照组为健康体检当日清晨8:00留取尿标

本,采用免疫比浊法测定尿微量白蛋白(Urine microalbumin, mALB)、尿肌酐(Urine creatinine, Cr),微量白蛋白浓度与肌酐浓度比值(UACR)。仪器采用日立 7020 全自动生化分析仪,UACR 的参考范围为 30~300 mg/g^[9]。

1.3 观察指标

由本院神经内科 2 名工作经验丰富分医师采用 NIHSS 对急性缺血性脑卒中患者入院时病情严重程度进行评估。该量表包括:语言、凝视、意识水平、语言、构音障碍、忽视等方面,总分以 42 分为最高得分,分数越接近 42 分表示症状越严重。神经功能轻度缺损:≤15 分,神经功能中度缺损:≥16~≤30 分,神经功能重度缺损:≥31 分^[6]。以门诊复查及电话随访的方式对 120 例患者进行为期 1 年的随访,了解预后情况。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析,计数资料以 $n(\%)$ 表示,采用 χ^2 检验,计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,行 t 检验;采用 Pearson 直线相关分析 NIHSS 评分与急性缺血性脑卒中患者 sdLDL-C、IMA、UACR 水平的相关性;采用多元 Logistic 回归分析影响急性缺血性脑卒中患者预后生存的相关危险因素; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组 sdLDL-C、IMA、UACR 水平比较

观察组 sdLDL-C、IMA、UACR 水平均显著高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 两组 sdLDL-C、IMA、UACR 表达情况($\bar{x} \pm s$)
Table 2 expression of sdldl-c, IMA and UACR in 2 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	sdLDL-C (mmol/L)	IMA (U/mL)	UACR (mg/g)
观察组	120	1.05±0.45	95.25±4.10	15.24±3.15
对照组	128	0.61±0.32	78.35±3.14	9.45±2.25
<i>t</i> 值	—	8.916	36.577	16.736
<i>P</i> 值	—	<0.001	<0.001	<0.001

2.2 不同 NIHSS 评分急性缺血性脑卒中患者 sdLDL-C、IMA、UACR 水平比较

NIHSS 评分>5 分的急性缺血性脑卒中患者 sdLDL-C、IMA、UACR 水平均显著高于 NIHSS 评分≤5 分的急性缺血性脑卒中患者,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 不同 NIHSS 评分急性缺血性脑卒中患者
sdLDL-C、IMA、UACR 水平比较($\bar{x} \pm s$)
Table 3 levels of sdldl-c, IMA and UACR in patients with
acute ischemic stroke with different NIHSS scores ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	sdLDL-C (mmol/L)	IMA (U/mL)	UACR (mg/g)
NIHSS 评分>5 分	55	1.22±0.50	103.25±4.30	17.29±3.38
NIHSS 评分≤5 分	65	0.82±0.39	98.37±4.11	14.45±3.03
<i>t</i> 值	—	4.920	6.345	4.852
<i>P</i> 值	—	<0.001	<0.001	<0.001

2.3 sdLDL-C、IMA、UACR 与急性缺血性脑卒中 NIHSS 评分的关系

急性缺血性脑卒中患者 NIHSS 评分与 sdLDL-C、IMA、UACR 呈正相关($P < 0.05$)。见表 4。

表 4 sdLDL-C、IMA、UACR 与急性缺血性脑卒中病情进展的关系
Table 4 Relationship between sdldl-c, IMA, UACR and
progression of acute ischemic stroke

组别	sdLDL-C		IMA		UACR	
	<i>r</i> 值	<i>P</i> 值	<i>r</i> 值	<i>P</i> 值	<i>r</i> 值	<i>P</i> 值
NIHSS 评分>5 分	0.972	<0.001	0.828	0.019	0.814	0.007
NIHSS 评分≤5 分	0.854	0.024	0.954	0.023	0.917	0.015

2.4 急性缺血性脑卒中患者 1 年预后

随访结果显示:120 例急性缺血性脑卒中患者有 16 例(13.33%)在 1 年内死亡,生存率为 86.67%。sdLDL-C(高表达)、IMA(高表达)、UACR(高表达)的患者死亡率明显更高($P < 0.05$)。见表 5。

2.5 影响急性缺血性脑卒中患者预后的相关因素研究

sdLDL-C(高表达)、IMA(高表达)、UACR(高表达)为影响急性缺血性脑卒中患者预后的独立危险因素($P < 0.05$)。见表 6。

表 5 急性缺血性脑卒中患者 1 年预后 [$n(\%)$]
Table 5 one year prognosis of patients with acute ischemic stroke [$n(\%)$]

预后状态	<i>n</i>	sdLDL-C		IMA		UACR	
		高表达	低表达	高表达	低表达	高表达	低表达
生存	104	50(48.08)	54(51.92)	46(44.23)	58(55.77)	53(50.96)	51(49.04)
死亡	16	13(81.25)	3(18.75)	12(75.00)	4(25.00)	14(87.50)	2(12.50)
χ^2 值		6.119		5.257		4.157104	
<i>P</i> 值		0.013		0.022		0.041	

表6 影响急性缺血性脑卒中患者预后的相关因素研究

Table 6 Related factors influencing prognosis of patients with acute ischemic stroke

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(≥65岁 vs <65)	1.524	0.524~1.534	0.660	—	—	—
性别(男 vs 女)	1.487	0.546~1.547	0.714	—	—	—
高血压(有 vs 无)	1.578	1.385~1.756	0.030	1.368	0.231~1.992	0.881
糖尿病(有 vs 无)	1.624	1.527~1.857	0.022	1.236	1.347~1.887	0.245
sdLDL-C(高表达 vs 低表达)	1.354	1.235~1.456	0.019	1.354	1.372~1.698	0.025
IMA(高表达 vs 低表达)	1.475	1.342~1.568	0.004	1.647	1.247~1.654	<0.001
UACR(高表达 vs 低表达)	1.524	1.458~1.687	0.012	1.221	1.247~1.657	<0.001

3 讨论

脑动脉血管壁增厚、硬化、官腔狭窄/闭塞等会导致脑中局部的血流量急剧减少(或阻断),此时脑组织处于一种急剧缺氧的状态,会出现一系列症状及体征,即为急性缺血性脑卒中^[7]。目前,临床评估急性缺血性脑卒中病情发展程度主要包括临床症状、血清学指标及影像学检查等,其中血清学指标具有简单快捷、准确性高等优势,成为指导临床诊治的重要手段。

sdLDL-C是致动脉粥样硬化最为主要的脂蛋白,具有颗粒小、唾液酸含量低,易氧化、血浆清除率低的特点,易进入血管壁中形成泡沫细胞^[8]。已有较多研究证实sdLDL-C与脑梗死的发病密切相关^[9]。Ali等^[10]学者研究指出,血清内sdLDL-C呈高表达状态的人群患心脑血管疾病的风险远高于sdLDL-C呈低水平的人群。本研究多因素Logistic回归分析结果提示sdLDL-C参与了急性缺血性脑卒中的发生及发展,与患者预后密切相关。IMA是一种钴结合蛋白,为诊断缺血性疾病的重要指标之一,是首个获得美国食品和药物管理局(Food and Drug Administration, FDA)批准的心肌缺血诊断生化标志物^[11]。Venema等^[12]研究报道,急性缺血性脑卒中患者血清中IMA水平明显升高,IMA是急性缺血性脑卒中患者预后死亡的独立预测因素,对心血管事件的发生有较好的预测价值。本研究结果进一步证实上述观点。分析急性缺血性脑卒中血清IMA升高的原因:人血清白蛋白流经缺血组织,而患者局部脑动脉因缺血(或再灌注)会产生大量自由基,导致人血清白蛋白氨基酸序列遭到破坏,从而形成IMA,引起IMA升高^[13-14]。Majersik等^[15]学者报道,UACR是冠心病患者冠状动脉重度硬化的独立预测因子,且与冠脉病变指数及狭窄程度成正

相关,因此认为UACR高表达会促进脑动脉硬化。本研究中,NIHSS评分>5分的患者UACR水平更高,这一研究结果提示UACR水平呈高表达的患者神经功能缺损较重,且患者预后较差,这与既往学者报道结果一致^[16]。

NIHSS评分为临床常用的评估患者神经功能受损程度的量表,该量表评分越高,越高代表患者神经功能受损越严重^[17]。本研究显示,sdLDL-C、IMA、UACR水平越高,急性缺血性脑卒中患者NIHSS评分越高,可见三者可反映急性缺血性脑卒中患者病情严重程度,与患者预后密切相关。

综上所述,sdLDL-C、IMA、UACR与急性缺血性脑卒中患者病情发展关系密切,是影响急性缺血性脑卒中患者预后死亡的独立危险因素。医务工作者加强三者检测,可以了解急性缺血性脑卒中患者病情进展情况,从而选择有效的个体化治疗方案,以改善患者预后。后续笔者将扩大样本量,进一步分析sdLDL-C、IMA及UACR对急性缺血性脑卒中患者预后的预测价值,以获得更有价值的研究结果服务于临床。

参考文献

- [1] 梅照军,陈伟,钱宇,等.血栓成分与脑卒中病因的关系及其对预后的影响[J].中华神经医学杂志,2021,20(1):35-39.
- [2] Furie KL, Jayaraman MV. 2018 Guidelines for the Early Management of Patients With Acute Ischemic Stroke [J]. Stroke, 2018, 15(22):118-121.
- [3] Powers WJ, Rabinstein AA, Ackerson T, et al. 2018 Guidelines for the Early Management of Patients With Acute Ischemic Stroke: A Guideline for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association [J]. J Vasc Surg, 2018, 67(6):193-196.
- [4] Goyal N, Tsivgoulis G, Frei D, et al. A multicenter study of the safety and effectiveness of mechanical thrombectomy for patients with acute ischemic stroke not meeting top-tier evidence criteria[J]. J Neurointerv Surg, 2017, 19(22):12-15.

- [5] Dugue R, Nath M, Dugue A, et al. Roles of Pro- and Anti-inflammatory Cytokines in Traumatic Brain Injury and Acute Ischemic Stroke[M]. *Mechan Neuroinflamm*, 2017,22(26):64-66.
- [6] 沈世强, 苏庆杰, 龙发青. 血清 IMA, NSE, PRDX1 水平与急性缺血性脑卒中分型及预后的关系[J]. *脑与神经疾病杂志*, 2020, 28(10):49-53.
- [7] 张梅, 张长庚, 姜玉荣, 等. sdLDL-C, IMA, 25-OH-VD 与急性缺血性脑卒中的相关性研究[J]. *中国免疫学杂志*, 2020, 36(16):93-97.
- [8] Pasban E, Panahpour H, Vahdati A. Early oxygen therapy does not protect the brain from vasogenic edema following acute ischemic stroke in adult male rats[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):32-35.
- [9] 王凯, 魏秀娥, 荣良群, 等. 伴脑微出血的急性缺血性脑卒中患者预后不良的影响因素分析[J]. *中华神经医学杂志*, 2018, 17(11):1104-1110.
- [10] Ali LK, Weng JK, Starkman S, et al. Heads Up! A Novel Provocative Maneuver to Guide Acute Ischemic Stroke Management[J]. *Interv Neurol*, 2017, 6(1-2):8-15.
- [11] Tateishi Y, Kanamoto T, Nakaoka K, et al. A Stroke Code and cooperation between doctors and nurses could reduce door-to-needle time for acute ischemic stroke[J]. *Nosotchu*, 2017, 25(14):65-66.
- [12] Venema E, Boodt N, Berkhemer OA, et al. Workflow and factors associated with delay in the delivery of intra-arterial treatment for acute ischemic stroke in the MR CLEAN trial[J]. *J Neurointerv Surg*, 2017, 10(5):424-428.
- [13] Balling M, Nordestgaard BG, Langsted A, et al. Small Dense Low-Density Lipoprotein Cholesterol Predicts Atherosclerotic Cardiovascular Disease in the Copenhagen General Population Study[J]. *J Am Coll. Cardiol*, 2020, 75(22):2873-2875.
- [14] Bentes C, Peralta AR, Viana P, et al. Quantitative EEG and functional outcome following acute ischemic stroke[J]. *Clin Neurophysiol*, 2018, 129(8):1680-1685.
- [15] Majersik JJ, Morgenstern LB. Informed consent in acute ischemic stroke: It's on us[J]. *Neurology*, 2018, 90(5):203-204.
- [16] Sinning D, Landmesser U. Low-density Lipoprotein-Cholesterol Lowering Strategies for Prevention of Atherosclerotic Cardiovascular Disease: Focus on siRNA Treatment Targeting PCSK9 (Inclisiran) [J]. *Curr Cardiol Rep*, 2020, 22(12):176.
- [17] Steglich - Arnholm XH, Kondziella XD, Wagner XA, et al. Mechanical Thrombectomy with the Embolus Retriever with Interlinked Cages in Acute Ischemic Stroke: ERIC, the New Boy in the Class[J]. *AJNR Am J Neuroradiol*, 2017, 38(7):1356-1361.

(上接第 494 页)

- [4] Huang D, Weaver F, Obremskey WT, et al. Treatment of lower extremity fractures in chronic spinal cord injury: a systematic review of the literature[J]. *PMR*, 2020, 15(8):362-365.
- [5] ArchanjoAB, Assis ALEMD, Oliveira MMD, et al. Elemental characterization of oral cavity squamous cell carcinoma and its relationship with smoking, prognosis and survival[J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1):204-207.
- [6] 王方永, 李建军. 脊髓损伤神经学分类国际标准(ASIA 2011 版)最新修订及标准解读[J]. *中国康复理论与实践*, 2012, 17(8):797-800.
- [7] Liu X, Liu M, Turner R, et al. Dried plum mitigates spinal cord injury-induced bone loss in mice[J]. *JOR Spine*, 2020, 3(4):e1113.
- [8] Yang Z, Lin Y, Yuan J, et al. Relationship between serum LP-PLA2, MIP-1A and MIF levels and prognosis in patients with coronary heart disease [J]. *Acta Medica Mediterranea*, 2019, 35(1):285-289.
- [9] 万登峰, 汪盛玉, 黄涛, 等. 针灸治疗脊髓损伤神经源性膀胱有效性的 Meta 分析[J]. *保健医学研究与实践*, 2018, 15(5):41-46.
- [10] 曹在民, 张雪松. 脊柱外伤磁共振影像表现及损伤检出率研究[J]. *解放军医药杂志*, 2017, 29(11):104-106.
- [11] Clark K, Goldstein RL, Hart JE, et al. Correction: Plasma vitamin D, past chest illness, and risk of future chest illness in chronic spinal cord injury (SCI): a longitudinal observational study[J]. *Spinal Cord*, 2020, 58(4):492-495.
- [12] Nakade T, Adachi H, Murata M, et al. Relationship Between Exercise Oscillatory Ventilation Loop and Prognosis of Heart Failure[J]. *Circ J*, 2019, 83(8):351-354.
- [13] White AR, Holmes GM. Investigating neurogenic bowel in experimental spinal cord injury: Where to begin? [J]. *Neural Regen Res*, 2019, 14(2):222.
- [14] Hu YR, Wang SL. Relationship between expression of MT1E, CA153 and clinical characteristics and prognosis of breast cancer patients[J]. *Oncology Progress*, 2019, 21(11):302-305.
- [15] Zhang S, Cao J, Zhang X, et al. Relationship between serum cystatin C and prognosis of nondiabetic peritoneal dialysis patients[J]. *Ther Apher Dial*, 2020, 24(6):703-708.

GDF-15、HDL-C 及 cTnI 检测联合 CRUSADE 评分在 NSTEMI-ACS 预后评估中的应用

柴博兰¹ 刘晶晶¹ 王晓伟² 王丽显^{1*}

[摘要] 目的 探讨生长分化因子-15(GDF-15)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)及肌钙蛋白 I(cTnI)检测联合出血风险(CRUSADE)评分评估非 ST 段抬高的急性冠状动脉综合征(NSTEMI-ACS)预后的预测价值。方法 选取 2015 年 1 月至 2018 年 1 月本院住院部治疗的 102 例 NSTEMI-ACS 患者设为观察组,根据 CRUSADE 评分分为低危组($n=34$)、中危组($n=36$)、高危组($n=32$),选取同期 110 例体检的健康者为对照组。对比各组 GDF-15、HDL-C 及 cTnI 水平及不同预后的患者 CRUSADE 评分。随访 3 年,比较 3 组心肌梗死事件发生率、出血事件发生率及预后生存率,分析 GDF-15、HDL-C 及 cTnI 水平联合 CRUSADE 评分对 NSTEMI-ACS 患者预后死亡的预测价值。结果 GDF-15、cTnI 水平:对照组<低危组<中危组<高危组,HDL-C 水平:对照组>低危组>中危组>高危组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。高危组 GDF-15 及 cTnI 水平显著高于中危组及低危组,HDL-C 水平明显低于中危组及低危组,差异有统计学意义($P<0.05$),3 组 GDF-15、HDL-C 及 cTnI 水平比较差异具有统计学意义($P<0.05$)。高危组心肌梗死事件发生率、出血事件发生率均显著高于中危组及低危组,差异有统计学意义($P<0.05$)。GDF-15 及 cTnI 高表达、HDL-C 低表达、CRUSADE 评分 ≥ 41 分的患者死亡率更高($P<0.05$)。GDF-15、HDL-C、cTnI 水平、CRUSADE 评分及四者联合检测 ROC 曲线下面积分别为:0.839、0.803、0.876、0.938、0.978,各指标曲线下面积以联合检测最大。结论 NSTEMI-ACS 患者 GDF-15、HDL-C、cTnI 水平呈异常表达状态,三者检测联合 CRUSADE 评分评估 NSTEMI-ACS 患者预后死亡的价值较高。

[关键词] GDF-15; HDL-C; cTnI; 非 ST 段抬高; ACS

The application of GDF-15, HDL-C and cTnI detection combined with CRUSADE score in the prognosis assessment of NSTEMI-ACS

CHAI Bolan¹, LIU Jingjing¹, WANG Xiaowei², WANG Lixian^{1*}

(1. Department of General Medical, the First Central Hospital of Baoding, Baoding, Hebei, China, 071028;

2. Department of Cardiology, The first central hospital of Baoding, Baoding, Hebei, China, 071028)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the value of growth differentiation factor -15 (GDF-15), high density lipoprotein cholesterol (HDL-C) and troponin I (cTnI) combined with crusade bleeding risk score (CRUSADE) in predicting the prognosis of non-ST-elevation acute coronary syndrome (ACS). **Methods** 102 patients with non-ST-segment elevation ACS treated in this inpatient department from January 2015 to January 2018 were selected as the observation group [According to the CRUSADE score, they were divided into low-risk group ($n=34$), intermediate-risk group ($n=36$), and high-risk group ($n=32$)]. 110 healthy people who received physical examinations during the same period were selected as the control group. The levels of GDF-15, HDL-C and cTnI in the three groups and the CRUSADE score of patients with different prognosis were compared. The patients were followed up for 3 years to compare the incidence of myocardial ischemia

基金项目:保定市科技计划项目(18ZF327)

作者单位:1. 保定市第一中心医院全科医疗一科,河北,保定 071028

2. 保定市第一中心医院心血管内五科,河北,保定 071028

*通信作者:王丽显, E-mail: 251146759@qq.com

events, bleeding events and prognostic survival rates among the three groups. The predictive value of GDF-15, HDL-C and cTnI levels combined with CRUSADE score for the prognostic death of patients with non-ST-segment elevation ACS was analyzed. **Results** The GDF-15 and cTnI levels in the control group were significantly lower than those in the low-risk, intermediate, and high-risk groups, and the HDL-C level was significantly higher than that in the low-risk, intermediate, and high-risk groups ($P<0.05$). The levels of GDF-15 and cTnI in the high-risk group were significantly higher than those in the intermediate-risk and low-risk groups, and the level of HDL-C was significantly lower than that in the medium-risk and low-risk groups. The differences in the levels of GDF-15, HDL-C and cTnI among the three groups were statistically significant ($P<0.05$). The incidences of myocardial ischemia and bleeding events in the high-risk group were significantly higher than those in the intermediate-risk group and the low-risk group ($P<0.05$). The patients with high GDF-15 and cTnI expression, low HDL-C expression, and CRUSADE score ≥ 41 had a higher mortality rate ($P<0.05$). The area under the ROC curve of GDF-15, HDL-C, cTnI level, CRUSADE score and four combined detection were 0.839, 0.803, 0.876, 0.938, 0.978, respectively. The area under the curve of combined detection was the largest. **Conclusion** The levels of GDF-15, HDL-C, and cTnI in patients with non-ST-segment elevation ACS are abnormally expressed. The three tests combined with the CRUSADE score have a higher value in assessing the prognosis of death in NSTEMI-ACS patients.

[KEY WORDS] GDF-15; HDL-C; cTnI; Non-ST-segment elevation; ACS

急性冠状动脉综合征 (Acute coronary syndrome, ACS) 患者在经过经皮冠状动脉介入 (Percutaneous coronary intervention, PCI) 治疗后, 可在一定程度上提高患者生存率, 但大多数的患者预后不容乐观^[1]。近年来, 有研究指出, 生化指标与心血管疾病的的发生有着显著相关性^[2]。生长分化因子-15 (Growth differentiation factor-15, GDF-15) 在心血管疾病中发挥保护作用已有较多学者报道^[3]。相关研究显示, 高密度脂蛋白胆固醇 (High density lipoprotein cholesterol, HDL-C) 水平降低是冠心病发生的独立危险因素, 与患者预后联系密切^[4]。肌钙蛋白 I (Troponin I, cTnI) 参与了动脉粥样硬化形成、进展的过程, 而其与 ACS 患者预后与出血风险 (Crusade bleeding risk, CRUSADE) 评分的关系的相关性鲜有报道。为进一步探讨 ACS 患者血清 GDF-15、HDL-C 及 cTnI 水平检测联合 CRUSADE 评分评估非 ST 段抬高的 ACS (Non ST segment elevation acute coronary syndrome, NSTEMI-ACS) 患者预后的预测价值, 本文选取本院将 NSTEMI-ACS 患者作为研究对象进行研究, 报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2015 年 1 月至 2018 年 1 月本院住院部治疗的 102 例 NSTEMI-ACS 患者设为观察组。纳入标准: ①均符合中华医学会心血管病学分会制定的诊断

NSTEMI-ACS 的相关诊断标准^[5]; ②年龄在 80 岁以下; ③均在入院后 1 周内实施 PCI 术。排除标准: ①合并血液系统疾病、感染、恶性肿瘤、严重肝肾功能不全者; ②纳入研究前 3 个月内服用过影响 GDF-15、HDL-C 及 cTnI 水平的药物者; ③随访过程中失访者。

根据 CRUSADE 评分^[6]分为 3 组: 低危组 34 例 (CRUSADE 评分: 1~30 分), 中危组 36 例 (CRUSADE 评分: 31~40 分), 高危组 32 例 (CRUSADE 评分: ≥ 41 分)。选取同期在本院体检的 110 例健康者设为对照组。两组基线资料比较差异无统计学意义 ($P>0.05$), 见表 1。本研究经医院伦理委员会批准通过, 所有受试者均签署知情同意书。

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

Table 1 Comparison of baseline data between the 2 groups

[$n(\%)$, ($\bar{x} \pm s$)]					
组别	n	性别		平均年龄 (岁)	平均体重 (kg)
		男	女		
观察组	102	59(57.84)	43(42.16)	55.41 $\pm$ 3.31	63.54 $\pm$ 1.23
对照组	110	55(50.00)	55(50.00)	55.48 $\pm$ 3.39	63.62 $\pm$ 1.31
t 值	-	1.310		0.152	0.457
P 值	-	0.252		0.879	0.648

1.2 方法

1.2.1 GDF-15、HDL-C 水平检测

对照组于体检当日、观察组于入院 48 h 内测定血清 GDF-15 水平, 以枸橼酸盐抗凝血标本, 存储于 -70°C 的冰箱冷冻待测。以羊抗人 GDF-15Ig 多克隆抗体 [安迪生物科技 (上海) 有限公司] 对血标本

GDF-15进行免疫放射学测定。采用酶联免疫吸附法检测HDL-C,试剂盒购自贝克曼库尔特商务(中国)有限公司,具体操作步骤参见试剂盒说明书。

1.2.2 cTnI水平检测

两组均取静脉血2 mL,通过顺磁性微粒化学发光免疫定量法测定cTnI,试剂盒购自贝克曼库尔特商务(中国)有限公司,操作步骤参见试剂盒说明书。

1.3 冠状动脉造影

采用标准Judkins法对所有患者行选择性冠状动脉影。造影结果由两名心内科副主任医师目测并以计算机定量分析法测定冠状动脉狭窄程度。冠脉造影结果显示左冠状动脉主干、左前降支(含主要对角支)、回旋支(含主要边缘支)或右冠脉(含后降支或左室后侧支)中至少1支血管官腔内径减少 $\geq 50\%$ 者定义为冠状动脉狭窄^[7]。

1.4 观察指标

1.4.1 GDF-15、HDL-C、cTnI水平检测

GDF-15参考范围^[8]:110~260 ng/L,GDF-15测值 >260 ng/L则视为异常升高;HDL-C参考范围^[9]:1.04 mmol/L(40 mg/dL),HDL-C测值 <1.04 mmol/L则视为异常降低;cTnI参考范围^[10]:0.03~0.50 $\mu\text{g/L}$,cTnI测值 >0.50 $\mu\text{g/L}$ 则视为异常升高。

1.4.2 随访

对观察组患者随访3年(随访方式:电话随访或门诊复查),随访截止时间2021年1月,比较低危组、中危组、高危组心肌缺血事件发生率、出血事件发生率及预后生存率。

1.5 统计学方法

采用SPSS 22.0软件进行统计分析。计数资料用 $n(\%)$ 表示,采用 χ^2 检验;计量资料采用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,组间比较行 t 检验,多组间比较行 F 检验。ROC曲线分析GDF-15、HDL-C及cTnI水平联合CRUSADE评分对NSTE-ACS患者预后死亡预测价值。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组GDF-15、HDL-C及cTnI水平对比

对照组GDF-15、cTnI水平明显低于低危、中危、高危组,HDL-C水平明显高于低危、中危、高危组差异均有统计学意义($P<0.05$)。高危组GDF-15及cTnI水平显著高于中危组及低危组,HDL-C水平明显低于中危组及低危组,4组GDF-15、HDL-C及cTnI水平比较差异有统计学意义($P<0.05$)。见表2。

表2 4组GDF-15、HDL-C及cTnI水平对比($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of GDF-15, HDL-C and cTnI levels in 4 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	GDF-15(ng/L)	HDL-C(mg/dL)	cTnI($\mu\text{g/L}$)
低危组	34	228.65 $\pm$ 80.36	41.65 $\pm$ 5.42	0.39 $\pm$ 0.02
中危组	36	279.68 $\pm$ 95.64	35.34 $\pm$ 5.04	0.43 $\pm$ 0.07
高危组	32	320.65 $\pm$ 110.25	29.65 $\pm$ 4.76	0.47 $\pm$ 0.13
对照组	110	133.65 $\pm$ 56.32	50.65 $\pm$ 8.54	0.19 $\pm$ 0.05
<i>F</i> 值	—	63.230	92.960	209.76
<i>P</i> 值	—	<0.001	<0.001	<0.001

2.2 心肌缺血事件发生率、出血事件发生率比较

高危组心肌缺血事件发生率、出血事件发生率均显著高于中危组及低危组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表3。

表3 3组患者心肌缺血事件发生率、出血事件发生率比较 [$n(\%)$]

Table 3 Comparison of incidence of myocardial ischemia events and bleeding events among 3 groups [$n(\%)$]

组别	<i>n</i>	心肌缺血事件		出血事件	
		发生	未发生	发生	未发生
低危组	34	2(5.88)	32(94.12)	1(2.94)	33(97.06)
中危组	36	15(41.67)	21(58.33)	14(38.89)	22(61.11)
高危组	32	30(93.75)	2(6.25)	29(90.63)	3(9.38)
χ^2 值	—	4.919		5.223	
<i>P</i> 值	—	0.027		0.022	

2.3 不同GDF-15、HDL-C、cTnI表达及不同CRUSADE评分患者的预后情况

102例患者3年死亡率为19.61(20/102)。GDF-15及cTnI高表达、HDL-C低表达、CRUSADE评分 ≥ 41 分的患者死亡率更高($P<0.05$)。见表4。

表4 不同GDF-15、HDL-C、cTnI表达及不同CRUSADE评分患者的预后情况 [$n(\%)$]

Table 4 Prognosis of patients with different GDF-15, HDL-C, cTnI expression and CRUSADE score [$n(\%)$]

不同指标	<i>n</i>	生存 (<i>n</i> =82)	死亡 (<i>n</i> =20)	χ^2 值	<i>P</i> 值
GDF-15					
高表达	65	47(57.32)	18(90.00)	7.430	0.006
正常表达	37	35(42.68)	2(10.00)		
HDL-C					
低表达	55	40(48.78)	15(75.00)	4.449	0.035
正常表达	47	42(51.22)	5(25.00)		
cTnI					
高表达	59	43(52.44)	16(80.00)	5.009	0.025
正常表达	43	39(47.56)	4(20.00)		
CRUSADE					
1~30分	34	32(39.02)	2(10.00)	28.228	<0.001
31~40分	36	29(35.37)	7(35.00)		
≥ 41 分	32	21(25.61)	11(55.00)		

2.4 GDF-15、HDL-C及cTnI水平联合CRUSADE评分对NSTE-ACS患者预后死亡预测价值

GDF-15、HDL-C、cTnI水平、CRUSADE评分

及四者联合检测 RCC 曲线下面积分别为:0.839、0.803、0.876、0.938、0.978,各指标曲线下面积以联合检测最大。见表5、图1。

表5 GDF-15、HDL-C及cTnI水平联合CRUSADE评分对NSTE-ACS患者预后死亡预测价值

Table 5 the predictive value of GDF-15, HDL-C and cTnI levels combined with CRUSADE score for prognosis and death in patients with non ST segment elevation ACS

预测指标	最佳临界值	灵敏度 (%)	特异度 (%)	AUC	95%CI
GDF-15	25.78	0.814	0.915	0.839	0.708~0.969
HDL-C	25.65	0.897	0.924	0.803	0.668~0.938
cTnI	25.89	0.885	0.920	0.876	0.779~0.973
CRUSADE 评分	25.55	0.954	0.967	0.938	0.863~1.000
四组者联合检测	26.81	0.979	0.988	0.978	0.000~1.000
预测指数模型	1.711	0.875	0.889	0.945	0.7548~0.995

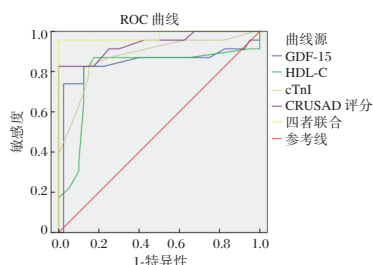


图1 GDF-15、HDL-C及cTnI水平联合CRUSADE评分对NSTE-ACS患者预后死亡预测价值

Figure 1 predictive value of GDF-15, HDL-C and cTnI levels combined with CRUSADE score for prognosis and death in patients with non ST segment elevation ACS

3 讨论

加强风险评估,权衡 NSTE-ACS 患者心肌出血风险,筛选高危患者,指导选择合适的抗栓方案,具有重要的临床意义。

GDF-15 为超家族蛋白,是机体重要的调节因子,已有较多文献证实其参与了器官及组织生长、增殖等过程^[11]。本研究中,高危组患者 GDF-15 水平明显高于中危组及低危组,这一研究结果与 Chung 等学者^[12]报道结果一致。分析高危组患者 GDF-15 水平升高的原因:GDF-15 是一种心肌保护因子,可抑制巨噬细胞激活及炎症反应,保护离体和体内心肌细胞,避免缺血再灌注性损伤,其在机体处于各种应激状态下或者发生病理改变时呈高表达状态。Sharma 等学者^[13]研究证实,抑制血清 GDF-15 的抗炎机制,可导致心脏破裂风险增加,正常范围的血清 GDF-15 水平的 NSTE-ACS 患者预后较好,血清 GDF-15 水平越高,NSTE-ACS 患者预

后死亡的风险越高,这一研究结果与本研究结果一致。

cTnI 是临床用于检测心肌损伤的标志物。本研究中高危组患者 cTnI 水平明显高于中危组及低危组,同时 NSTE-ACS 患者均存在不同程度的心肌损伤,而高危组患者心肌损伤最为严重,这一研究结果与国外文献报道结果一致^[14]。NSTE-ACS 患者 cTnI 水平升高的机制尚不完善,据统计 cTnI 呈高表达状态的 NSTE-ACS 患者预后不良时间的发生率会异常增高^[15],可见 cTnI 可作为预测 ACS 患者预后死亡的重要指标。本研究中 HDL-C 呈低表达的 NSTE-ACS 患者死亡率更高,这与既往文献报道结果一致。

CRUSADE 评分已广泛用于 NSTE-ACS 患者早期危险分层、评估预后中,该评分具有操作简便和时效性强的优点,对指导临床治疗有重要意义^[16]。本研究结果显示,GDF-15、HDL-C、cTnI 水平与患者的长、短期预后密切相关,并通过检测 GDF-15、HDL-C、cTnI 水平联合 CRUSADE 评分预测 NSTE-ACS 患者预后死亡的预测价值,发现各指标 RCC 曲线进一步证实 GDF-15、HDL-C、cTnI 水平联合 CRUSADE 评分可作为评估 NSTE-ACS 患者预后死亡的重要指标。同时联合评分检测还可以提高早期整体危险分层,快速分辨出高危组和低危组,提高单一指标预测效能。

综上所述,NSTE-ACS 患者 GDF-15、HDL-C、cTnI 水平呈异常表达状态,GDF-15、HDL-C、cTnI 检测联合 CRUSADE 评分评估 NSTE-ACS 患者预后死亡的价值较高。本研究后续将完善研究方法,准确反映、全面评估该类患者的短期预后,以获得更有价值的研究结果服务临床。

参考文献

- [1] 邢红宇,卢瑞丽,梁宁,等. 遗传性轻度认知功能障碍与 MTHFR C677T 基因多态性及血浆同型半胱氨酸水平研究[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2019, 11(1):28-33.
- [2] Dragnea M, Cassioli M. Book review: Mihai Dragnea, Mission and Crusade in the Wendish Territory, 12th Century[J]. Transylv Rev Adm Sci, 2020, 19(2):152-154
- [3] Verheyde H, Bonello L, Pilat I, et al. Evaluation of the management of acute coronary syndrome without ST-segment elevation: Impact of the invasive strategy delay, a monocentre study[J]. Arch Cardiovasc Dis, 2019, 11(2):184-188.

甲状腺癌靶向治疗进展

李浩 聂荣成 张詮*

[摘 要] 甲状腺癌是头颈部常见的恶性肿瘤,也是内分泌系统中最常见的恶性肿瘤,其病理类型较多,不同类型的肿瘤在临床表现及治疗方法等方面差异较大。甲状腺癌的治疗主要采取以手术为主的综合治疗,但仍存在局限性。近年来,在晚期甲状腺癌的治疗中,靶向治疗逐渐发展,在延长患者的生存时间,改善患者的生存质量等方面发挥着重要作用。本文回顾目前靶向治疗在甲状腺癌治疗中的应用并对其进行概述,以加深临床工作者们对甲状腺癌靶向治疗的认识,推动靶向治疗在临床治疗中的合理应用。

[关键词] 分化型甲状腺癌;甲状腺髓样癌;未分化甲状腺癌;靶向治疗;治疗效果

Commentary on the progress of targeted therapy for thyroid cancer

LI Hao, NIE Rongcheng, ZHANG Quan*

(Author's Affiliation: Department of Head and Neck, the Cancer Center of Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong, China, 510060)

[ABSTRACT] Thyroid cancer is a common malignant tumor in the head and neck and the most common malignant tumor in the endocrine system. There are many types of pathology, and different types of tumors differ greatly in clinical manifestations and treatment methods. The treatment of thyroid cancer mainly adopts comprehensive treatment based on surgery, but its limitations still exist. Recent years, in the treatment of advanced thyroid cancer, targeted therapy has gradually developed, which plays an important role in extending the survival time of patients and improving the quality of life of patients. This article reviews the current application of targeted therapy in the treatment of thyroid cancer to outline it, to deepen clinicians' understanding of targeted therapy and promote the rational application of targeted therapy in clinical treatment.

[KEY WORDS] Differentiated thyroid cancer; Medullary thyroid cancer; Undifferentiated thyroid cancer; Targeted therapy; Treatment efficacy

甲状腺癌是头颈部常见的恶性肿瘤,也是内分泌系统最常见的恶性肿瘤,其病理类型较多,不同类型肿瘤在临床表现及治疗方法等方面差异较大。各地区甲状腺癌的发病率各有不同,在近年呈现显著上升趋势,但死亡率未见明显增长。常见病理类型包括甲状腺乳头状癌(Papillary thyroid cancer, PTC)、甲状腺滤泡状癌(Follicular thyroid cancer, FTC)、甲状腺髓样癌(Medullary thyroid cancer, MTC)、和未分化甲状腺癌(Anaplastic thy-

roid cancer, ATC),其中FTC和MTC合称为分化型甲状腺癌(Differentiated thyroid cancer, DTC),预后相对较好,占甲状腺癌的绝大部分。大多数DTC患者的治疗都是基于手术,辅以放射性碘和内分泌治疗^[1]。对转移性难治性的甲状腺癌患者来说,治疗的方法十分局限。全身性化疗对晚期转移性甲状腺癌效果有限,反应率不到25%^[1]。因此,探寻晚期转移性甲状腺癌的新型治疗方法对于甲状腺癌患者有着重要的作用。

课题项目:广东省科技计划项目(2016A020215090)

作者单位:中山大学肿瘤防治中心头颈科,广东,广州510060

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

1 甲状腺癌与细胞信号传导通路及相关基因突变

1.1 受体酪氨酸激酶(RTK)通路

该通路中与甲状腺癌相关的基因包括 *ALK*、*NTRK*、*RET* 等。*ALK* 可发生突变及基因重排,其突变体促进 MAPK、PI3K 和 JAK / STAT 下游途径的激活,主要在 PDTC 和 ATC 中发现,可促进疾病进展、增加肿瘤侵袭性^[2]。*NTRK* 基因编码原肌球蛋白相关激酶家族,在 PTC 中,*NTRK* 通过 PI3K、MAPK 和 PLC γ 途径激活下游信号,控制细胞周期的进程^[2]。*RET* 基因重排与 PTC、MTC 密切相关,这些重排与某些通路具有共同的下游传导途径,可致 *RET* 组成性激活和对 MAPK 和 PI3K 途径的不恰当刺激^[2-3]。

1.2 磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)通路

PI3K 通路中与甲状腺癌相关突变基因包括 *AKT*、*PIK3CA*、*PTEN*、*RAS* 等。*AKT* 突变抑制甲状腺细胞凋亡,*AKT* 中 *PIK3CA* 突变提示晚期甲状腺肿瘤^[4]。*PIK3CA* 可表现出激活性突变或拷贝数增加,增加 *PIK3CA* 蛋白的表达。*PIK3CA* 突变在 ATC 中常见(18%),在 FTC(1%)和 PTC(2%)中出现较少^[2]。抑癌基因 *PTEN* 的失活导致 PI3K 通路的组成性激活,促进肿瘤细胞的增殖和蛋白质合成^[2]。*RAS* 蛋白是 PI3K 和 MAPK 通路的共同效应器,*RAS* 基因点突变主要发生在 FTC 中,其他类型中也少量出现。

1.3 丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)通路

MAPK 通路的变化是甲状腺癌的常见改变,尤其 PTC 中(40%~80%),主要涉及 *BRAF* 基因的改变,导致细胞分化丧失,抑制了细胞凋亡。*BRAF* 中最常见的改变是 *V600E* 基因的取代,在一半左右的 PTC 出现^[2]。

1.4 其他与甲状腺癌相关的通路

有 WNT 通路^[4]、TP53 通路、mTOR 通路等^[5],相关的分子学改变有 β -catenin、EIF1AX^[2]、PPAR γ 、TERT、PD-1 与 PD-L1^[6]、Ki-67^[6]。

2 甲状腺癌与血管生成

肿瘤细胞的生长转移依赖血管生成,血管生成也可为肿瘤细胞提供养分,促进远处转移^[1]。在已确定的促血管生成因子中,血管内皮生长因子是一种十分关键的生长因子,与内皮细胞中的 2 种

受体酪氨酸激酶受体结合,导致 MAPK 信号转导通路的激活^[1]。阻断该生长因子及其受体可能通过抑制肿瘤新生血管的生成抑制肿瘤生长,目前已用于多种肿瘤的治疗。

3 放射性碘难治性分化型甲状腺癌的靶向治疗

3.1 索拉菲尼(Sorafenib)

索拉菲尼是针对 VEGFR 2 和 3, *RET* 和 *BRAF* 的口服小分子酪氨酸激酶抑制剂^[1],在各种类型肿瘤中证实其具有一致的安全性^[7]。DECISION 实验是一项针对该类肿瘤的大型 3 期随机对照的临床试验,与安慰剂相比,索拉菲尼明显改善了无进展生存期(反应率:0.59;95%CI:0.45~0.76; $P=0.0001$;中位 PFS 分别为 10.8 与 5.8 个月)^[8]。索拉菲尼仍存在一些不良事件,包括:手足皮肤反应,高血压,腹泻,低钙血症以及血清 TSH 升高等^[7]。

索拉菲尼还可与其他药物联用治疗甲状腺癌。一项二期临床实验证实了索拉菲尼联合哺乳动物雷帕霉素(mTOR)抑制剂特西罗莫司(Temsirolimus)在 RR-DTC 患者的治疗中是一种有效组合,尤其是与单药索拉菲尼的历史数据相比未接受过治疗的患者,但该方案仍需进一步研究^[7]。

3.2 仑伐替尼(Lenvatinib)

仑伐替尼是口服 TKI 中十分具有代表性的一种药物,靶点为 VEGFR1-3, FGFR1-4, PDGFR α , *RET* 和 *KIT*^[8]。与索拉菲尼相比,FGFR 途径提供了 VEGFR 途径的细胞内替代方法^[8]。在 SELECT 的初步分析中,与安慰剂相比,仑伐替尼被证明可显著延长无进展生存期(PFS)(18.3 vs 3.6 个月;HR:0.21; 99%CI:0.14~0.31; $P<0.001$)^[8]。最常见的副作用是体重减轻,高血压,蛋白尿,腹泻,疲劳,脱水和关节痛^[9]。值得注意的是,有 2 例患者在接受治疗后,出现了严重不良事件,导致其死亡(1 例动脉出血和 1 例心脏骤停)^[9]。

3.3 卡博替尼(Cabozantinib)

卡博替尼是一种口服多激酶抑制剂,靶点为 VEGFR 和 MET。有试验证实卡博替尼在该类患者的治疗者中表现出显著持久的客观反应活性,这些患者在接受 VEGFR 靶向治疗之前,都出现了疾病的进展^[10]。该实验招募了 25 个病人,中位年

龄为64岁,64%的患者为男性。21例患者以前仅接受一种靶向 VEGFR 的疗法(索拉菲尼,帕唑帕尼或西地尼单抗),四名患者接受了此类疗法中的两种。在这项实验中,卡博替尼的起始剂量为60 mg/d 口服,若患者无反应,则升至80 mg/d^[11]。患者每8周根据 RECIST v1.1 标准进行肿瘤评估。在25例患者中,有10例(40%)有部分反应,13例(52%)有疾病处于稳定状态,而2例(8%)出现无法评估的疾病。中位无进展生存期和总生存期分别为12.7个月和34.7个月^[11]。与治疗相关的不良事件最常见的是疲劳,体重减轻,腹泻,掌红斑感觉异常综合征和高血压^[11]。在这项实验中,卡波替尼与严重的不良事件相关,如出血,深静脉血栓形成,左心室收缩功能障碍和颌骨坏死^[11]。因此,卡博替尼作为一种针对晚期 RR-DTC 治疗靶向药物,还需要进一步研究。但总而言之,卡波替尼是在经历过以 VEGFR 为靶点的治疗后出现疾病进展的 RR-DTC 的有效挽救疗法^[11]。

3.4 舒尼替尼(sunitinib)

舒尼替尼是一种口服的多靶点 TKI,靶点包括 PDGFR、VEGFR1、2 和 3、C-KIT 等^[1]。一项开放性的多中心 II 期临床试验(NCT00510640)报导了有关舒尼替尼在治疗 RR-DTC 和 MDTC 患者中的有关数据^[12]。起始剂量为舒尼替尼 50 mg/d 口服给药4周,然后休息2周^[12]。出现的副作用包括:虚弱或疲劳(83.1%),粘膜炎(64.8%),手足综合征(53.5%),皮肤毒性(47.9%),心脏毒性等^[12]。舒尼替尼在 RR-DTC 或 DMTC 人群中作用活跃,但如果使用舒尼替尼,由于它所带来的副作用,应考虑其他方案和剂量以提高耐受性^[12]。

3.5 维拉菲尼(Vemurafenib)

维拉菲尼是一种被批准用于 BRAF 阳性黑色素瘤的 BRAF 激酶抑制剂,在一项 I 期试验中显示了3名 BRAF V600E 阳性乳头状甲状腺癌患者的临床获益。全球10个学术中心和医院进行了一项开放性,非随机的2期临床试验,研究对象是18岁或18岁以上经组织学证实复发或转移性乳头状甲状腺癌对放射性碘难治且 BRAF V600E 突变呈阳性的患者,患者每天两次口服维拉菲尼 960 mg。维拉菲尼对从未接受过多激酶抑制剂治疗的进展性、BRAF V600E 阳性的放射性碘难治的 PTC 患者具有明显的抗肿瘤活性^[13]。

3.6 其他的多靶点抑制剂

有阿帕替尼(apatinib),帕唑帕尼(pazopanib),贝沙罗丁(bexarotene),多维替尼(dovitinib)等,均尚处于研究之中,且疗效未定^[14-17]。

4 甲状腺髓样癌的靶向治疗

4.1 卡博替尼(Cabozantinib)

卡博替尼是一种口服 TKI,其靶点包括 RET, MET 和 VEGFR 2^[1]。在晚期 MTC 试验中,使用卡博替尼治疗的进行性 MTC 患者与安慰剂治疗的患者相比,无进展生存期明显增长,客观反应率也有大幅度的提高。卡博替尼的无进展生存期中位数为11.2个月,而安慰剂组仅为4.0个月(HR:0.28; $P<0.001$)^[18]。安慰剂治疗的患者没有一例达到客观肿瘤反应的标准,而卡博替尼治疗的患者中有28%达到($P<0.001$)^[18]。卡博替尼组中常报告的严重不良事件为肺炎、肺栓塞、低钙血症、粘膜炎、脱水、吞咽困难、高血压和肺脓肿^[19]。其他不良事件还包括:手足综合征、腹泻、食欲减退、恶心、疲惫、体重减轻、吞咽困难等^[18]。

4.2 范德他尼(Vandetanib)

范德他尼也是一种多激酶抑制剂,靶点为 VEGF 受体2和3,RET,以及 EGFR,已证实其可有效抑制某些发生 RET / PTC3 突变的 PTC 的进展,以及某些散发性的与 MEN2B 相关的 MTC 中的 M918T RET 突变^[1]。在一项 III 期临床试验中,与安慰剂相比,口服范德他尼显著提高了无进展生存期(PFS)和客观缓解率(ORR)^[20]。常见的不良事件有腹泻,血中促甲状腺激素升高,皮疹,低钙血症,高血压和疲劳^[21]。

范德他尼还可与硼替佐米联用,可能用于治疗成人甲状腺髓样癌^[22]。尽管该实验确定了该组合的 II 期推荐剂量,并且在17例患者中观察到了活性,但该实验由于样本太少、治疗周期长等原因,而无法广泛应用^[22]。

4.3 达拉菲尼联合曲美替尼

在一项开放性的 II 期临床试验中,伴有 BRAF V600E 突变的 MTC 患者每天接受两次的达拉菲尼 150 mg 的治疗,同时每天两次接受曲美替尼 2 mg 治疗,直至出现不可接受的毒性,疾病进展或死亡。在16例 BRAF V600E 突变型 ATC 患者(中位随访时间为47周;范围为4至120周)中,已确认的总体缓解率为69%(95%CI:41%~89%)。

常见的不良反应为疲劳,发热和恶心。达拉菲尼联合曲美替尼是第一个被证明对 BRAF V600E 突变的间变性甲状腺癌具有强大临床活性并且耐受性良好的方案^[23]。

5 未分化甲状腺癌(ATC)的靶向治疗

ATC 在甲状腺癌中恶性程度最高,中位生存期约5个月,常规的甲状腺癌疗法对其效果欠佳。有实验证明利用紫杉醇对 ATC 进行化疗,具有一定疗效且安全可行^[17]。该研究的不足之处在于样本量较小,还需联合多中心合作扩大样本量^[17]。研究表明,具有 BRAF V600E 和 p53 突变的小鼠模型易发展为低分化甲状腺癌。在人类, BRAF V600E 基因的突变通常出现在 20% 至 50% 的 ATC 患者中,使用 BRAF 抑制剂达拉菲尼结合有丝分裂原激活的细胞外蛋白激酶抑制剂曲美替尼的联合靶向治疗已显示出巨大的前景,在最近获得了 FDA 的批准。

其他在 ATC 的靶向治疗中有关的药物有奈韦拉平(nevirapine)^[24]、帕唑帕尼(Pazopanib)^[25]、伊马替尼(Imatinib)^[25]。

6 总结

对于甲状腺癌的靶向治疗而言,关键在于找准靶点,随后基于靶点及作用机制应用靶向药物,其中酪氨酸激酶抑制剂在甲状腺癌患者的治疗中效果十分显著,显示出了巨大的潜力。尽管靶向药物种类多且具体作用机制各异,但目前被美国 FDA 批准的,能够用于手术治疗或放射性碘治疗无效且处于进展期的难治性 DTC 的靶向药物仍然只有索拉菲尼和仑伐替尼两种,而用于甲状腺髓样癌的靶向药物只有卡博替尼和范德他尼。因此在未来对于甲状腺癌的临床靶向治疗中,还需进一步对靶向药物进行大量广泛的临床试验,对其进行不断的探索。

参考文献

- [1] Sherman SI. Targeted therapy of thyroid cancer[J]. *Biochem Pharmacol*, 2010,80(5):592-601.
- [2] Tirrò E, Martorana F, Romano C, et al. Molecular Alterations in Thyroid Cancer: From Bench to Clinical Practice[J]. *Genes (Basel)*, 2019,13,10(9):709.
- [3] Santoro M, Moccia M, Federico G, et al. RET Gene Fusions in Malignancies of the Thyroid and Other Tissues[J]. *Genes*

(Basel), 2020,15,11(4):424.

- [4] Zhang ZJ, Xiao Q, Li XY. MicroRNA-574-5p directly targets FOXN3 to mediate thyroid cancer progression via Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. *Pathol Res Pract*, 2020, 216(6):152939.
- [5] Amjad E., Solmaz A, Babak S. Asnaashari and B. Sokouti, Induction of mTOR signaling pathway in the progression of papillary thyroid cancer[J]. *Meta Gene*, 2020, 24: 100704.
- [6] 马宇彤, 付鹏. PD-L1, Ki-67 和 BRAF V600 E 基因突变与甲状腺癌关系的研究进展[J]. *医学综述*, 2019, 25(21): 4233-4240.
- [7] Sherman EJ, Dunn LA, Ho AL, et al. Phase 2 study evaluating the combination of sorafenib and temsirolimus in the treatment of radioactive iodine-refractory thyroid cancer [J]. *Cancer*, 2017, 123(21):4114-4121.
- [8] Gianoukakis AG, Dutcus CE, Batty N, et al. Prolonged duration of response in lenvatinib responders with thyroid cancer [J]. *Endocr Relat Cancer*, 2018, 25(6):699-704.
- [9] Costa R, Carneiro BA, Chandra S, et al. Spotlight on lenvatinib in the treatment of thyroid cancer: patient selection and perspectives[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2016, 10:873-884.
- [10] Miles DR, Lacy SA, Wada DR, et al, Nguyen LT. Assessment of cabozantinib treatment on QT interval in a phase 3 study in medullary thyroid cancer: evaluation of indirect QT effects mediated through treatment-induced changes in serum electrolytes[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2017, 80(2): 295-306.
- [11] Cabanillas ME, de Souza JA, Geyer S, et al. Cabozantinib As Salvage Therapy for Patients With Tyrosine Kinase Inhibitor-Refractory Differentiated Thyroid Cancer: Results of a Multicenter Phase II International Thyroid Oncology Group Trial[J]. *J Clin Oncol*, 2017, 35(29):3315-3321.
- [12] Ravaud A, de la Fouchardière C, Caron P, et al. A multicenter phase II study of sunitinib in patients with locally advanced or metastatic differentiated, anaplastic or medullary thyroid carcinomas: mature data from the THYSU study[J]. *Eur J Cancer*, 2017, 76:110-117.
- [13] Brose MS, Cabanillas ME, Cohen EE, et al. Vemurafenib in patients with BRAF(V600E)-positive metastatic or unresectable papillary thyroid cancer refractory to radioactive iodine: a non-randomised, multicentre, open-label, phase 2 trial[J]. *Lancet Oncol*, 2016, 17(9):1272-1282.
- [14] Zhang X, Wang C, Lin Y. Pilot Dose Comparison of Apatinib in Chinese Patients With Progressive Radioiodine-Refractory Differentiated Thyroid Cancer [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2018, 103(10):3640-3646.
- [15] Chow LQ, Santana-Davila R, Pantel A, et al. A phase I study of pazopanib in combination with escalating doses of 131I in patients with well-differentiated thyroid carcinoma borderline refractory to radioiodine [J]. *PLoS One*, 2017, 12(6):e0178325.

- [16] Lim SM, Chung WY, Nam KH, et al. An open label, multi-center, phase II study of dovitinib in advanced thyroid cancer [J]. *Eur J Cancer*, 2015, 51(12):1588-1595.
- [17] Klopper J, Kane M, Jimeno A, et al. A Phase II Trial of Bexarotene for Advanced Differentiated Thyroid Cancer [J]. *Thyroid*, 2015, 25(5):563-564.
- [18] Sherman SI, Clary DO, Elisei R, et al. Correlative analyses of RET and RAS mutations in a phase 3 trial of cabozantinib in patients with progressive, metastatic medullary thyroid cancer [J]. *Cancer*, 2016, 122(24):3856-3864.
- [19] Schlumberger M, Elisei R, Müller S, et al. Overall survival analysis of EXAM, a phase III trial of cabozantinib in patients with radiographically progressive medullary thyroid carcinoma [J]. *Ann Oncol*, 2017, 28(11):2813-2819.
- [20] Uchino K, Komoda M, Tomomatsu J, et al. SAFETY AND TOLERABILITY OF VANDETANIB IN JAPANESE PATIENTS WITH MEDULLARY THYROID CANCER: A PHASE I/II OPEN - LABEL STUDY [J]. *Endocr Pract*, 2017, 23(2):149-156.
- [21] Hu MI, Elisei R, Dedecjus M, et al. Safety and efficacy of two starting doses of vandetanib in advanced medullary thyroid cancer [J]. *Endocr Relat Cancer*, 2019, 26(2):241-250.
- [22] Del Rivero J, Edgerly M, Ward J, et al. Phase I/II Trial of Vandetanib and Bortezomib in Adults with Locally Advanced or Metastatic Medullary Thyroid Cancer [J]. *Oncologist*, 2019, 24(1):16-e14.
- [23] Subbiah V, Kreitman RJ, Wainberg ZA, et al. Dabrafenib and Trametinib Treatment in Patients With Locally Advanced or Metastatic BRAF V600-Mutant Anaplastic Thyroid Cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2018, 36(1):7-13.
- [24] Shang H, Zhao J, Yao J, et al. Nevirapine inhibits migration and invasion in dedifferentiated thyroid cancer cells [J]. *Thorac Cancer*, 2019, 10(12):2243-2252.
- [25] Ljubas J, Ovesen T, Rusan M. A Systematic Review of Phase II Targeted Therapy Clinical Trials in Anaplastic Thyroid Cancer [J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11(7):943.

(上接第 503 页)

- [4] Capodanno D, Angiolillo DJ. Pre-Treatment With Oral P2Y₁₂ Inhibitors in Acute Coronary Syndromes Without ST-Segment Elevation: The Saga Continues [J]. *J. Am. Coll. Cardiol*, 2019, 73(8):915-918.
- [5] Stojkovic S, Wadowski PP, Haider P, et al. Circulating MicroRNAs and Monocyte - Platelet Aggregate Formation in Acute Coronary Syndrome [J]. *Thromb Haemost*, 2021, 17(12):33-37.
- [6] 江宜乐, 荣媛媛, 邢明青, 等. 冠状动脉粥样硬化性心脏病患者血浆 Elabela 水平变化及其与冠状动脉狭窄程度的关系 [J]. *中国临床医生杂志*, 2020, 8(5):57-60.
- [7] Ghazali H, Gammoudi M, Yahmadi A, et al. Acute coronary syndrome without persistent ST segment elevation in the emergency department: Epidemiology, clinical features and prognosis [J]. *Tunis Med*, 2017, 95(12):229.
- [8] Menozzi A, De Servi S, Rossini R, et al. Patients with non-ST segment elevation acute coronary syndromes managed without coronary revascularization: A population needing treatment improvement [J]. *Int J Cardiol*, 2017, 24(5):35-39.
- [9] 李雅超, 杨彦立, 安蕾, 等. 不同性别尿酸水平与冠心病及冠状动脉狭窄程度的关系 [J]. *中国医药导报*, 2020, 17(11):134-137.
- [10] Daniel FB, Degano IR, Fernandez RG, et al. Benefit of primary percutaneous coronary interventions in the elderly with ST segment elevation myocardial infarction [J]. *Open Heart*, 2020, 7(2):1169-1175.
- [11] 林朴卿, 齐悦, 张良珍, 等. 血浆 CPP, PTX3 水平对稳定性冠心病患者冠状动脉狭窄的诊断价值 [J]. *山东医药*, 2020, 60(10):27-31.
- [12] Chung HK, Ryu D, Kim KS, et al. Growth differentiation factor 15 is a myomitokine governing systemic energy homeostasis [J]. *J Cell Biol*, 2017, 216(1):149-165.
- [13] Sharma A, Stevens SR, Lucas J, et al. Utility of Growth Differentiation Factor-15, A Marker of Oxidative Stress and Inflammation, in Chronic Heart Failure: Insights From the HF-ACTION Study [J]. *Jacc Heart Fail*, 2017, 5(10):724-734.
- [14] Pocock SJ, Shaper AG, Phillips AN. Concentrations of high density lipoprotein cholesterol, triglycerides, and total cholesterol in ischaemic heart disease [J]. *BMJ (Clin res)*, 1989, 298(6679):998-1002.
- [15] Brinton EA, Eisenberg S, Breslow JL. Increased apo A-I and apo A-II fractional catabolic rate in patients with low high density lipoprotein-cholesterol levels with or without hypertriglyceridemia [J]. *J Clin Invest*, 2018, 27(2):536-540.
- [16] Neumann JT, Srensen NA, Ojeda F, et al. Immediate Rule-Out of Acute Myocardial Infarction Using Electrocardiogram and Baseline High-Sensitivity Troponin I [J]. *Clin Chem*, 2017, 63(1):394-402.

暨南大学肿瘤诊疗研究中心

暨南大学肿瘤诊疗研究中心位于广东省广州市天河区黄埔大道西613号,2020年经暨南大学批准依托暨南大学附属第一医院成立。中心充分发挥暨南大学综合性大学科研力量和附属医院临床资源,推动暨南大学肿瘤学临床诊疗技术的研究和发展,促进肿瘤学相关学科交叉融合,加快肿瘤学临床诊疗技术、基础机制研究等科技成果转化。中心联合暨南大学附属医院肿瘤专科及肿瘤专科医院开展多中心临床研究、加强学科交流、开展多学科讨论。强化暨南大学肿瘤学的临床研究及诊疗技术转化等内涵建设,切实提升暨南大学肿瘤学的学术水平和影响力,服务广东省高水平医院和学校“双一流”建设。

中心支撑学科肿瘤学专业系广东省最强推荐学科、肿瘤学博士点、博士后合作基地,2109年全国医院科技量值榜100强,广东省医学会肿瘤放射治疗专委会第三届主委单位,广东省医教会肿瘤诊疗技术转化专委会第一届主委单位。中心现有高级职称22人,博士生导师10人,硕士生导师21人。成员涵盖头颈、胸腹部、妇科、前列腺恶性肿瘤等临床学科,涵盖基础医学、生命科学、药学、化学材料学、转化医学等中青年骨干、杰出青年科学家、长江学者等,在基础医学、临床医学研究及技术转化中充满活力。依托单位肿瘤诊治相关设备总价值超过1亿元,拥有大批高端的诊疗设施:包括PET/CT-3.0T MR多模式诊断及评估系统、320排640层动态容积CT、数字一体化介入复合手术室、国际标准层流手术间、直线加速器和伽玛刀、靶向冷冻治疗系统、粒子植入等肿瘤靶向治疗装置、全自动信息化临床检验流水线、智能药房等。

中心针对恶性肿瘤诊疗中的重大临床问题,通过与学校生命科学、材料科学、药学以及学校附属医院肿瘤学科专业人才紧密合作,研究探讨肿瘤临床治疗中发现的一些有效疗法的特殊科学机制,开发肿瘤临床诊治中急需的方法和技术,促进研究成果交叉融合,实现成果快速转化为临床诊疗新技术,产出一批可临床应用的创新成果,提升学校肿瘤综合诊疗研究的综合实力,促进现有肿瘤临床诊疗研究机制创新。通过中心学术委员会联合学校各大附属医院肿瘤学及相关学科进行多中心临床研究。中心已在肝癌、宫颈癌、前列腺癌以及难治、复杂的肿瘤诊断、治疗上已形成一套综合诊疗方法,在华南地区具有良好的声誉和影响力。未来,依托该研究中心打造高水平的广东省新型研发机构。

中心骨干承担国家重大研发计划2项,国家自然科学基金等国家级项目17项,省部级项目11项,横向项目多项,发表高水平论文150余篇,授权专利10余项,完成专利转化3项。获2020年抗癌协会科技奖二等奖、教育部发明奖二等奖及中国产学研合作创新奖。



杂志简介：

《分子诊断与治疗杂志》于 2009 年 5 月创刊，是由中山大学主管，《中国家庭医生》杂志社有限公司主办，中山大学达安基因股份有限公司承办的面向国内外公开发行的分子医学权威性刊物，也是我国第一份以分子诊断与治疗学科为主要内容的分子医学专业学术期刊。本刊以传播分子医学理念、报道分子医学前沿、倡导分子医学创新、促进分子医学进步为办刊宗旨。主要刊登我国医学分子诊断和分子治疗相关领域中的基础理论研究、临床实践和技术方法的最新研究成果以及国内分子医学新技术、新理论和新进展等方面的文章。目前有编委及审稿专家 80 余人。在编委会和审稿专家及编辑部的共同努力下，于 2016 年被收录为“中国科技核心期刊”（中国科技论文统计源期刊）。

目前有“述评”、“论著”、“综述”、“前沿进展”、“专家笔谈”、“讲座”、“动态”和“专栏”等栏目。涵盖基因诊断、免疫诊断、核酸分子诊断、蛋白分子诊断、信号分子诊断、分子影像诊断、诊断仪器应用、基因治疗、核酸分子治疗、蛋白分子治疗等内容。

