



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

# 分子诊断与治疗杂志

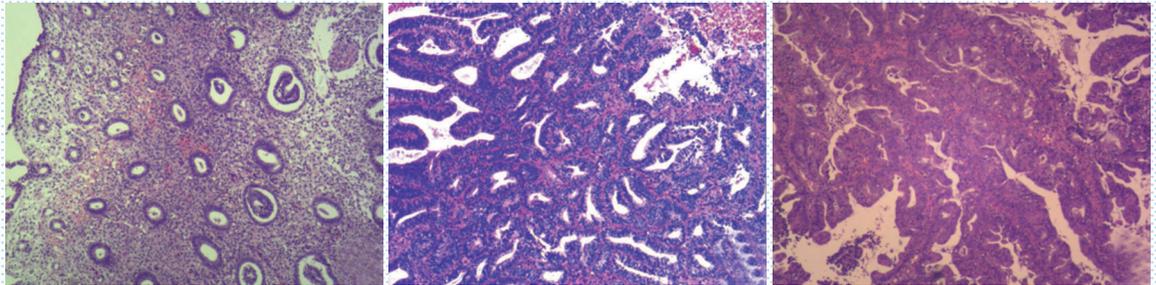
FENZI ZHENDUAN YU ZHILIAO ZAZHI

2020年5月 第12卷 第5期 总第69期

JOURNAL OF

MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Volume 12 Number 5 May 2020



图(P580) 不同子宫内膜组织的 HE 染色 (×40)

Figure(P580) HE staining in different endometrial tissues (×40)

中山大学 主管

中国科技核心期刊 (中国科技论文统计源期刊)

中国核心期刊 (遴选) 数据库收录期刊

中国期刊全文数据库全文必录期刊

中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊

中文生物医学期刊文献数据库 CMCC 收录期刊

中国生物医学期刊引文数据库 CMCI 收录期刊

中国学术期刊影响因子年报统计源期刊

ISSN 1674-6929



9 771674 692204

05>



## 夏明



夏明，1977年6月出生，2008年7月毕业于山东大学，获耳鼻咽喉科学博士学位。2017年5月美国西南医学中心免疫系访学1年。2018年12月评为山东省泰山学者青年专家。

现任山东省立医院耳鼻咽喉头颈外科研究员、山东大学博士生导师，国家卫健委耳鼻咽喉头颈科学重点实验室副主任。社会学术兼职：山东省医师协会睡眠协会副主任委员，中华中西医结合学会耳鼻咽喉-头颈外科分会青年委员，山东省健康管理

学会耳鼻咽喉健康管理分会委员。担任BBRC, Inflammation, Sci Rep, Plos One等期刊的审稿人。

夏明教授长期从事鼻黏膜炎症疾病的教学及研究，在慢性鼻-鼻窦炎、变应性鼻炎的主动靶向纳米药物递送系统的研究方面形成一定的特色和创新优势。主持国家自然科学基金，山东省泰山学者青年专家计划，山东省重点研发计划，山东省中青年科学家资助项目，共6项。获山东省科技进步奖二等奖意向，三等奖一项。共发表SCI论文20余篇，其中SCI收录10余篇(Journal of Controlled Release, Int J Pharm, BBRC, Sci Rep, Inflammation等)，总IF=76.7，他引167次。申请发明专利2项，副主编专著一部，培养及协助培养博士后1名，博士4名，硕士6名。

# 分子诊断与治疗杂志

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

月刊 2020年5月 第12卷 第5期 总第69期 Bimonthly Volume 12 Number 5 May 2020

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

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

地址 广州市天河区天河北路179号祥龙大厦11楼(510620)  
电话 (020) 32290789-206, 32290789-201  
电子邮箱 jmdt@vip.163.com

刊号 ISSN 1674-6929  
CN 44-1656/R

邮发代号 46-283  
发行单位 广东省报刊发行局  
发行范围 国内外公开发行  
广告发布登记通知书 440100190057  
印刷 天意有福科技股份有限公司  
出版日期 2020年5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  
**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  
**Editing** China Family Doctors Magazine Publisher Co., Ltd.

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

**E-mail** jmdt@vip.163.com

**CSSN** ISSN 1674-6929  
CN 44-1656/R

**Printing** TianYi Yofus Technology Co., Ltd.  
**Publish Date** 2020.5.18  
**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。

中国科学院技术信息研究所

Institute of Scientific and Technical Information of China

北京复兴路 15 号 100038

www.istic.ac.cn

2019年11月



# 分子诊断与治疗杂志

月刊 2020年5月 第12卷 第5期

## 目次

### 述评

GNA13在多种恶性肿瘤中的研究进展 ..... 朱伟力 马继伟 周赫 等(547)

### COVID-19 专栏

不同核酸提取试剂盒在新型冠状病毒核酸检测中的比较研究 ..... 马雯 张伟宏 马璞龙 等(552)

1例新冠肺炎合并常见呼吸道病原体共感染病例研究 ..... 黄永杰 李晓童 王桂珍 等(557)

儿童新型冠状病毒肺炎1例临床检验结果启示 ..... 王仁峰 孙鹏 郝贵亮 等(561)

### 论著

利用荧光PCR-毛细管电泳法评价微卫星不稳定性检测国家参考品  
..... 张文新 黄传峰 孙楠 等(565)

Prader-Willi综合征及Angelman综合征的遗传学分析方案及广东的临床实践  
..... 汪安石 刘畅 王继成 等(570)

NLR、血清CHE、Ang-1与ACI患者病情变化的关系 ..... 陶珍 崔连奇 赵磊 等(575)

LA16c-313D11.11与miR-205-5p在子宫内膜癌中的表达及意义 ..... 韩雪松 丁雪 赵鹏 等(579)

结核感染致胸壁肿物的病原检测方法的比较研究 ..... 曾定科 赵健(583)

益赛普联合柳氮磺吡啶治疗强直性脊柱炎疗效及miR-29a、miR-146a的变化  
..... 张诺 郭明蔚 陈桂武 等(587)

高血压合并心功能不全对患者CyP、GDF-15、IL-18水平影响研究  
..... 刘晓雨 贾国伟 孙荣国 等(592)

miR-182-5p调节细胞自噬促进胃癌细胞的增殖、迁移和侵袭 ..... 相绿竹 王晔 陈文 等(596)

miR-148a-3p靶向DLL4基因影响婴幼儿血管瘤内皮细胞增殖和凋亡 ..... 李海燕 李凡(601)

滑膜组织Galectin-3、BMP-2蛋白在骨关节炎患者中的表达及临床价值  
..... 赵丽莉 高宇 梁湏 等(606)

大株红景天注射液治疗冠心病合并心力衰竭疗效及对患者血清HCY、Gal-3、NT-proBNP  
水平的影响 ..... 张志亮 张鑫 高卫芳 等(611)

血清EGFL7、MTA1表达与鼻咽癌患者临床特征及预后的关系 ..... 冯睡 尹金淑 谢洪 等(616)

RDW、CHE及TEG参数与重症肺炎机械通气治疗患者病情的关系  
..... 卢仁辉 刘培杰 杜莎莎 等(621)

FeNO联合血清ECP、IgE检测对支气管哮喘的临床诊断价值 ..... 买智涛 姜明明 万善志(625)

PCT、sICAM-1、sVCAM-1在慢性肾小球肾炎合并细菌感染中的应用价值  
..... 廖荣叶 孙守萍 曹志(629)

# 分子诊断与治疗杂志

月刊 2020年5月 第12卷 第5期

## 目次

溶栓治疗肺血栓栓塞症疗效及对凝血功能及NF- $\kappa$ B、ET-1的影响	郎哲 何志红 毕文森 等(634)
FGF18与骨性关节炎患者血清炎症细胞因子、脂肪细胞因子及骨关节严重程度的相关性	胡彦彬 王振东 赵强 等(639)
NLR、PLR在甲状腺良恶性结节及自身免疫性甲状腺炎诊断中的应用价值	洪文斌 胡竑韡(643)
miR-223和miR-192在重症肺炎患儿血清中的表达意义	孙卉芳 孙永发 王丹凤(647)
吞咽造影定量分析对卒中后吞咽障碍及功能的评估价值	贺媛 代欣 梁雅慧 等(651)
miR-93-5p对心脏成纤维细胞纤维化的影响	张伟峰 雷素扬 赵俊涛(656)
BAP1、Ki-67表达与老年肺腺癌患者肿瘤侵袭及预后的关系	安晓颖 李晓霞 陈宁 等(661)
ICAM-1含量对体外循环心脏手术后急性肾损伤的预测价值	李翠玲 张红 韩小虎(666)
新生儿先天性甲状腺功能低下症筛查结果及流行病学特征分析	许静 王惠珍 简亚娟(670)
PLGF、IL-6与妊娠期高血压病情程度及母婴结局的相关性	程惠 周曙光(674)
HCY与2型糖尿病合并冠心病患者心率变异性及心律失常的相关性研究	刘松年 伍星 荆凌华(678)
AGR、补体C3、C4在SLE合并脑血管病中检测价值	罗寰 阮海玲 陈苗苗 等(683)
<b>综 述</b>	
瞬时感受器电位香草酸受体1抑制剂在神经病理性疼痛中的研究进展	盛树悦 田映红 张兴梅(688)
<b>专家风采</b>	
夏明	(封二)
<b>实验室巡礼</b>	
山东省立医院病理科	(封三)

# JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Monthly Volume 12 Number 5 May 2020

---

## CONTENTS

### COMMENTS

- Progress of research into the role of GNA13 in various malignant tumors  
*ZHU Weili, MA Jiwei, ZHOU He, DENG Chang, XI Yue, XIA Ming, ZHAO Miaoqing* ..... (547)

### COVID-19 Column

- Comparative performance of nucleic acid extraction kits for the detection of 2019 novel coronavirus  
*MA Wen, ZHANG Weihong, MA Yinglong, XI Jing, JIN Zheyu, PIAO Wenhua* ..... (552)
- A case study of Corona Virus Disease 19 with common respiratory pathogen co-infection  
*HUANG Yongjie, LI Xiaotong, WANG Guizhen, GUO Feifei, MA Xuehan* ..... (557)
- An insight into a case of childhood COVID-19: clinical features and laboratory detection  
*WANG Renfeng, SUN Peng, HAO Guiliang, WEN Rong, LI Junxin, LI Wenjie* ..... (561)

### ORIGINAL ARTICLES

- Evaluation of the national reference materials for microsatellite instability using fluorescence PCR-capillary electrophoresis  
*ZHANG Wenxin, HUANG Chuanfeng, SUN Nan, GAO Fei, YU Ting, QU Shoufang, HUANG Jie* ..... (565)
- Genetic analysis program and application of Prader-Willi syndrome and Angelman syndrome  
*WANG Anshi, LIU Chang, WANG Jicheng, HUANG Yanlin, ZHANG Yan, DING Hongke, LIU Ling, YANG Jie, WU Jing, YIN Aihua* ..... (570)
- Association of NLR value, serum levels of CHE and Ang-1 with the onset, severity and prognosis in patients with acute cerebral infarction  
*TAO Zhen, CUI Lianqi, ZHAO Lei, CHENG Ming, TANG Jigang, GUO Hongwei* ..... (575)
- Expression and Significance of LncRNA-LA16c-313D11.11 and miR-205-5p in Endometrial Carcinoma  
*HAN Xuesong, DING Xue, ZHAO Peng, YU Hui, XIN Weijuan* ..... (579)
- Value of GeneXpert Mtb/RIF in clinical diagnosis and treatment of patients with chest wall tuberculosis  
*ZENG Dinghe, ZHAO Jian* ..... (583)
- Effect of Yisaipu combined with sulfasalazine on ankylosing spondylitis and the changes of miR-29a and miR-146a  
*ZHANG Nuo, GUO Mingwei, CHEN Guiwu, LI Gang* ..... (587)
- Effect of hypertension with cardiac insufficiency on the levels of CyP, GDF-15, IL-18  
*LIU Xiaoyu, JIA Guowei, SUN Rongguo, ZHAO Ming, ZHANG Wei* ..... (592)
- miR-182-5p promotes proliferation, migration and invasion of gastric cancer cells by regulating autophagy  
*XIANG Luzhu, WANG Ye, CHEN Wen, ZHAO Qi, PENG Rui, MU Xiaofeng* ..... (596)
- miR-148a-3p inhibits proliferation and promotes apoptosis of infantile hemangioma endothelial cells by targeting *DLL4*  
*LI Haiyan, LI Fan* ..... (601)
- Expression of galectin-3 and BMP-2 in synovial tissues in patients with osteoarthritis and their clinical application  
*ZHAO Lili, GAO Yu, LIANG Yun, LUO Yi* ..... (606)
- Efficacy of Sofren injection in the treatment of coronary heart disease with heart failure and its effects on the serum levels of HCY, Gal-3 and NT-proBNP  
*ZHANG Zhiliang, ZHANG Xin, GAO Weifang, YUAN Yu* ..... (611)
- Correlation of serum EGFL7 and MTA1 with clinical characteristics and prognosis of patients with nasopharyngeal carcinoma  
*FENG Shui, YIN Jinshu, XIE Hong, JI Wei, LIU Aizhu, PENG Hong* ..... (616)

# JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Monthly Volume 12 Number 5 May 2020

---

## CONTENTS

- Relationship between RDW, CHE and TEG parameters and condition of patients with severe pneumonia treated with mechanical ventilation  
*LU Renhui, LIU Peijie, DU Shasha, GONG Yashu* ..... (621)
- Clinical value of FeNO combined with serum ECP and IgE in the diagnosis of bronchial asthma  
*MAI Zhitao, JIANG Mingming, WAN Shanzhi* ..... (625)
- Application Value of PCT, sICAM-1 and sVCAM-1 in chronic glomerulonephritis complicated with bacterial infection  
*LIAO Rongye, SUN Shouping, CAO Zhi* ..... (629)
- Effect of thrombolytic therapy on pulmonary thromboembolism and on coagulation function, NF- $\kappa$ B and ET-1  
*LANG Zhe, HE Zhihong, BI Wenmiao, LIANG Shaoqing, LIU Hongjuan* ..... (634)
- Correlation between FGF18 and serum inflammatory cytokines, adipokines and bone and joint severity in patients with osteoarthritis  
*HU Yanbin, WANG Zhendong, ZHAO Qiang, TANG Wei, PAN Wei, LI Lei* ..... (639)
- Value of NLR and PLR in diagnosis of benign and malignant thyroid nodules and autoimmune thyroiditis  
*HONG Wenbin, HU Hongwei* ..... (643)
- Significance of miR-223 and miR-192 expression in serum of children with severe pneumonia  
*SUN Huifang, SUN Yongfa, WANG Danfeng* ..... (647)
- The value of quantitative analysis of swallowing angiography in the evaluation of dysphagia and function after stroke  
*HE Yuan, DAI Xin, LIANG Yahui, WEI Bing* ..... (651)
- Effects of miR-93-5p on fibrosis of cardiac fibroblasts  
*ZHANG Weifeng, LEI Suyang, ZHAO Juntao* ..... (656)
- Relationship between BAP1, Ki-67 expression and tumor invasion and prognosis in elderly patients with lung adenocarcinoma  
*AN Xiaoying, LI Xiaoxia, CHEN Ning, DI Hongqin, ZHU Guiyun, ZHANG Yankun* ..... (661)
- The predictive value of serum intercellular adhesion molecule-1 level on acute renal injury after cardiopulmonary bypass  
*LI Cuiling, ZHANG Hong, HAN Xiaohu* ..... (666)
- Analysis of screening results and epidemiological characteristics of neonatal congenital hypothyroidism  
*XU Jing, WANG Huizhen, JIAN Yajuan* ..... (670)
- Correlation between PLGF, IL-6 and the degree of hypertension in pregnancy of maternal and infant outcomes  
*CHENG Hui, ZHOU Shuguang* ..... (674)
- Correlation between serum homocysteine and heart rate variability and arrhythmia in patients with type 2 diabetes and coronary heart disease  
*LIU Songnian, WU Xing, JING Linghua* ..... (678)
- Diagnostic value of serum albumin-to-globulin ratio, complement C3 and C4 levels in cerebrovascular disease in patients with systemic lupus erythematosus  
*LUO Huan, RUAN Hailing, CHEN Miaomiao, REN Zhanfen* ..... (683)

## REVIEWS

- Progress of research into the role of transient Receptor Potential Vanilloid 1 inhibitors in neuropathic pain  
*SHENG Shuyue, TIAN Yinghong, ZHANG Xingmei* ..... (688)

## GNA13在多种恶性肿瘤中的研究进展

朱伟力<sup>1</sup> 马继伟<sup>1,2</sup> 周赫<sup>2</sup> 邓畅<sup>2</sup> 奚悦<sup>2</sup> 夏明<sup>3</sup> 赵苗青<sup>1,2\*</sup>

**[摘要]** G $\alpha$ 13亚家族是G蛋白家族中重要的一员,由鸟嘌呤核苷酸结合蛋白 $\alpha$ 亚基13(GNA13)基因所编码。GNA13基因参与重要的信号通路,在很多生理过程中承担着重要的角色,参与调节肿瘤的增殖,浸润,转移和迁移。GNA13在人类许多肿瘤中的表达都显著上调,其功能表达和临床意义都十分复杂而且不尽相同,因此更多的研究者开始关注GNA13基因所参与的生物学行为。

**[关键词]** G蛋白; G蛋白偶联受体; 信号通路; GNA13; 恶性肿瘤

### Progress of research into the role of GNA13 in various malignant tumors

ZHU Weili<sup>1</sup>, MA Jiwei<sup>1,2</sup>, ZHOU He<sup>2</sup>, DENG Chang<sup>2</sup>, XI Yue<sup>2</sup>, XIA Ming<sup>3</sup>, ZHAO Miaoqing<sup>1,2\*</sup>

(1. Department of Pathology, Shandong Provincial Hospital Affiliated to Shandong University, Jinan, Shandong, China, 250021; 2. Department of Pathology, Shandong Provincial Hospital Affiliated to Shandong First Medical University, Jinan, Shandong, China, 250021; 3. Department of Otolaryngology, Shandong Provincial Hospital Affiliated to Shandong First Medical University, Jinan, Shandong, China, 250021)

**[ABSTRACT]** The G $\alpha$ 13 subfamily is an important member of the G protein family, which is encoded by the guanine nucleotide binding protein  $\alpha$  13 (GNA13). The GNA13 gene participates in important signaling pathways and plays an important role in many physiological processes, such as regulating tumor proliferation, invasion, metastasis, and migration. The expression of GNA13 in many human tumors is significantly upregulated. However, the molecular function and clinical significance remain unclear. Therefore, many researchers have focused on the biological functions involving the GNA13 gene. In this review, the authors summarize the progress and current status of GNA13 gene research in malignant tumors.

**[KEY WORDS]** G protein; G protein coupled receptors; Signaling pathways; GNA13; Malignant tumor

近年来,随着分子诊断技术在临床中的广泛应用,其对于肿瘤的早期诊断以及预后治疗有着极其重要的临床意义。G蛋白偶联受体(G protein-coupled receptors, GPCRs)是已知的体内最大的蛋白质超家族,而G $\alpha$ 13亚家族中的鸟嘌呤核苷酸结合蛋白 $\alpha$ 亚基13(Guanine nucleotide binding protein alpha 13, GNA13)被认为与癌基因转化和

肿瘤细胞生长密切相关。有学者发现GNA13在人类的许多恶性肿瘤中表达上调,特别是在侵袭性强的乳腺癌和前列腺癌中;而且,GNA13的上调会促进这些恶性肿瘤细胞的侵袭和转移<sup>[1]</sup>。因此,本文以GNA13在肿瘤细胞中的信号转导机制为思路,总结其在恶性肿瘤中的作用机制及生物学特性。

基金项目:国家自然科学基金(81672093);国家自然科学基金(81770979)

作者单位:1. 山东大学附属省立医院病理科,山东,济南 250021

2. 山东第一医科大学附属省立医院病理科,山东,济南 250021

3. 山东第一医科大学附属省立医院耳鼻喉科,山东,济南 250021

\*通信作者:赵苗青, E-mail: zhaomqs@163.com

## 1 G蛋白及G蛋白偶联受体的结构及其功能

G蛋白是一类信号转导蛋白,又称为GTP结合蛋白,种类大约有40余种,可将外界信号传递至细胞内,进而激活下游的各种信号通路<sup>[1]</sup>。GPCRs是一大类膜蛋白受体的简称,又称为七次跨膜受体<sup>[2]</sup>。GPCRs被配体激活以后,通过G蛋白将细胞信号传导至下游效应子,进而调控细胞的生长代谢和改变细胞骨架结构等活动<sup>[3]</sup>。被激动剂(激素、神经递质和生长因子等)激活后的GPCRs可以充当鸟嘌呤核苷酸交换因子(Guanine nucleotide exchange factors, GEF),进而催化GDP交换G $\alpha$ 亚基上的GTP。与GTP结合后,G $\alpha$ 与G $\beta\gamma$ 分离的同时激活下游效应子,包括腺苷酸环化酶、磷脂酶C和Rho鸟嘌呤核苷酸交换因子(Guanine nucleotide exchange factors for Rho, RhoGEFs)等,进而开启不同的信号转导通路<sup>[3]</sup>。G $\alpha$ (12/13)家族通路通过含有G蛋白信号调节因子同源结构域的RhoGEFs将信号传递给Rho蛋白,从而调节细胞生长、基因转录和细胞骨架肌动蛋白的重排等<sup>[4]</sup>(见图1)。

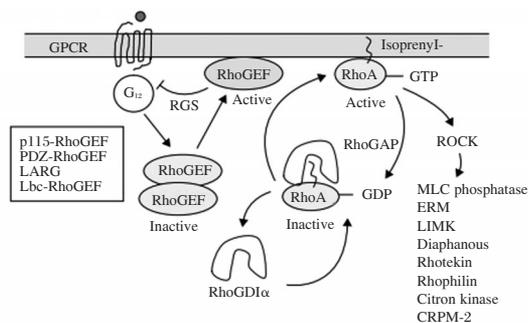


图1 G $\alpha$ (12/13)家族通路示意图<sup>[10]</sup>

Figure 1 Schematic diagram of G $\alpha$ (12/13) family pathway

## 2 GNA13的发现及功能研究

1991年Strathmann和Simon在克隆小鼠中发现了G<sub>12</sub>亚家族中的G $\alpha$ 12和G $\alpha$ 13,它们的分子量约为44kDa。G $\alpha$ 12和G $\alpha$ 13分别是由鸟嘌呤核苷酸结合蛋白 $\alpha$ 亚基12(Guanine nucleotide binding protein alpha 12, GNA12)和GNA13编码<sup>[5]</sup>。在人类中,GNA12位于7号染色体上,GNA13位于17号染色体上。GNA12与GNA13几乎在所有组织中都有表达,但是它们的表达都是十分保守的,并参与多种生理和发育过程<sup>[12]</sup>。研究表明,血管紧

张素II,血栓烷A<sub>2</sub>,1-磷酸鸟苷-磷酸和溶血磷脂酸等都可以与GNA12/GNA13耦联。同时,GNA12和GNA13组成的G<sub>12</sub>亚家族增强了与细胞分裂、增殖、迁移侵袭和肿瘤发生等许多病理生理活动<sup>[6]</sup>。

目前已经发现了很多与GNA12/GNA13直接或间接相互作用的蛋白,其中包括RhoGEFs蛋白家族所介导的信号转导通路,其调控着细胞增殖分化及肿瘤性转化<sup>[7]</sup>。由于该蛋白家族存在G蛋白信号调节因子结构域,因此GNA12和GNA13可以通过该结构域与RhoGEFs结合,将其从细胞质募集到胞膜上,并激活RhoGEFs,从而发挥鸟嘌呤核苷酸交换因子的功能,以此来促使GTP与RhoA结合,进而引起细胞的形态改变以及收缩和迁移<sup>[8]</sup>。现已从RhoGEFs亚家族中鉴定出3种蛋白,包括p115-RhoGEFs、PDZ-RhoGEFs和白血病相关的RhoGEFs(Leukaemia Associated RhoGEFs, LARG)<sup>[9]</sup>。研究表明,GNA13(非GNA12)可以直接刺激LARG和p115-RhoGEFs的GEF活性<sup>[10]</sup>。在体外的实验发现,GNA13能够激活p115-RhoGEFs或非磷酸化的LARG,而GNA12通常激活酪氨酸磷酸化的LARG,因此,p115-RhoGEFs和LARG是GNA12/GNA13的GTP酶激活蛋白,且它们是GNA12/GNA13所特有的,而PDZ-RhoGEFs不具有此功能<sup>[11]</sup>。实验表明,GNA12/GNA13通过与RhoGEFs的相互作用诱导RhoA的活性。同时,P115-RhoGEFs或LARG的RH结构域表现出GNA12和GNA13的特异性GTPase活化蛋白活性。因此,RH-RhoGEFs在单个分子的范围内既起到了GTPase活化蛋白的作用,又起到了GNA12或GNA13的效应作用<sup>[12]</sup>。

Offermanns等<sup>[13]</sup>发现GNA12/GNA13的功能十分重要。因为GNA12敲除的小鼠表现正常,而GNA13敲除的小鼠在胚胎第9.5天由于其血管系统发育不正常而死亡。GNA12和GNA13同时敲除的小鼠也在胚胎第8.5天死亡。而只携带一个完整GNA13等位基因的GNA12敲除的小鼠也会在子宫中死亡。GNA13除了在胚胎循环系统中的作用外,其在人体各种病理过程中也成为了关键因素,例如,卵巢经历激素调节的变化,表现为卵巢卵泡生长并伴有卵巢的扩张。GNA13介导的信号通路还涉及到例如VEGFR-2表达、涉及小GTPase RhoA和转录因子NF- $\kappa$ B的激活<sup>[14]</sup>。

在分子诊断中也显示出 GNA13 的意义, Kim 等<sup>[15]</sup>发现在乳腺癌, GNA12 和 GNA13 诱导基质金属蛋白酶(MMP)-2 上调, 导致 MCF10A 细胞产生侵袭和迁移表型。通过观察人的乳腺组织样本, 证明了 G<sub>12</sub> 蛋白家族和 MMP-2 的表达水平与癌症的诊断密切相关( $P < 0.005$ )。Cheng 等<sup>[16]</sup>发现, 从正常口腔粘膜标本(NOM)到口腔上皮异常增生(OED)到口腔鳞状细胞癌(OSCC), GNA12 的表达逐步升高, 这表明 GNA12 的过表达可能是口腔癌发生的早期表现, 并且可能在口腔癌的进展中起关键作用, 而 GNA13 或许也有同样的作用。因此 GNA12/GNA13 可能将为某些癌症提供临床诊断证据或成为新型肿瘤标志物。

### 3 GNA13 与多种恶性肿瘤的关系

在发现 G<sub>12</sub> 家族后不久, GNA12 和 GNA13 都被证明具有诱导成纤维细胞致癌转化的能力<sup>[24]</sup>。因此, GNA13 与各种恶性肿瘤之间的生物学关系成为了研究者关注的焦点问题。

#### 3.1 GNA13 与乳腺癌

Rasheed 等<sup>[17]</sup>发现在乳腺癌中, GNA13 能与 GPCRs 相互作用促进下游信号分子的传导, 从而造成恶性肿瘤的侵袭和迁移。乳腺癌细胞是依赖于 GNA13 的表达来实现细胞侵袭, GNA13 参与导致乳腺癌发展的转录后基因表达机制是通过微小 RNA(microRNA, miRNA)来调控的。miRNA 与目的基因的 mRNA 紧密联系, 同时抑制其蛋白的表达, miRNA 与编码序列或目标基因 3'-UTR 的结合可致使 mRNA 降解过程或蛋白翻译过程受到影响, 最终抑制靶基因产生蛋白质。与前列腺癌细胞不同, 乳腺癌细胞中 GNA13 的表达主要是通过 miR-31 而不是通过 miR-182 和 miR-200a 调控的。同时研究证明 miR-31 直接与 GNA13 的 mRNA 结合, 并且这种结合会影响 GNA13 表达和乳腺癌细胞侵袭。Vrba 等<sup>[18]</sup>发现, miRNA 表达失调能够显著表现出来, 其中 miRNA 可以充当“致癌 miR”或“肿瘤抑制 miR”, 而这一过程其可以通过靶细胞中潜在的癌基因来实现。miR-31 在肿瘤进展中丢失, 并促进乳腺癌和其他癌症的迁移。因此, 确定乳腺癌和其他癌症中 GNA13 调控的特定机制可能会导致针对这些癌症的基于 miRNA 的治疗策略的发展。此外, miR-31 的缺失和 GNA13 的获得可能是评估乳腺癌和其他癌症的可行生物标志物。

#### 3.2 GNA13 与前列腺癌

Lim 等<sup>[19]</sup>发现单独阻断 GNA13 会显著影响前列腺癌的癌细胞侵袭和转移。GNA13 通过 Rho GTPases 发挥作用, 以驱动 NF- $\kappa$ B 转录来诱导前列腺癌细胞中 CXCL5 的表达。在转移性前列腺癌细胞中, 发现患者体内的 CXCL5 水平显著提高, 并通过促进血管生成来诱导肿瘤细胞的增殖、迁移和转移, 这是由于 GNA13 通过诱导内皮细胞中的 VEGFR-2 或诱导细胞促进血管生成的 CXCL1、CXCL2 和 CXCL4 来诱导肿瘤细胞血管的生成, 进而影响肿瘤的生长。当前列腺癌细胞中 GNA13 表达沉默后, 促血管生成基因会大量丢失。Rasheed 等<sup>[17]</sup>发现在前列腺癌中, 仅野生型 GNA13 的丢失就可能显著降低前列腺癌细胞在体外的浸润和转移的机会。使用特定的 miRNA 抑制剂抑制 LnCAP 细胞中的 miR-182 和 miR-141/200a 可提高 GNA13 的表达并增强对这些细胞的侵袭。这些数据证明 GNA13 是前列腺癌细胞侵袭的重要介质。由于 GNA13 可以充当前列腺癌细胞以及多种肿瘤细胞的致癌 GPCRs 信号的共同介体, 因此确定其失调机制可能会使新型 miRNA 成为未来抑制癌症侵袭和转移的方法。因此, 建立以 GNA13 为目标的检测方法对于早期诊断前列腺癌具有重要作用, 同时以 miR-182 等分子为靶标进行靶向治疗的意义重大。

#### 3.3 GNA13 与肝癌

Xu 等<sup>[20]</sup>通过探讨 246 例肝癌患者 GNA13 表达与临床病理特征的关系发现 GNA13 在肝癌组织中的显著上调与多种临床病理学参数相关, 包括肿瘤多重性( $P=0.004$ )、TNM 分期( $P=0.002$ )和 BCLC 分期( $P=0.010$ ), GNA13 表达是整体生存( $P=0.014$ )和无瘤生存( $P=0.005$ )的独立预后因素。为了确定 GNA13 对肝癌细胞增殖和侵袭的影响, 其建立了稳定表达 GNA13 的肝癌细胞 HepG2 和 SMMC-7721。与对照组相比, GNA13 的过表达在体外促进 HepG2 和 SMMC-7721 细胞的细胞增殖; 侵袭试验证明, 在 HepG2 和 SMMC-7721 细胞中过表达 GNA13 会使细胞侵袭能力显著提高。通过免疫组化对肝癌细胞样本评估 GNA13 蛋白的表达情况发现 GNA13 蛋白主要在肝癌的细胞质中检测到, 正常肝组织主要表现为 GNA13 阴性表达。因此, GNA13 是肝癌致瘤过程中较为关键的一个影响因素, 可以作为肝癌患者

的预后生物标志物,特别是在行根治性肝切除术后的患者中,其中GNA13的高表达提示肝癌患者的预后较差。

### 3.4 GNA13与胃癌

Zhang等<sup>[21]</sup>发现GNA13的上调可以促进胃癌(Gastric cancer, GC)细胞的致瘤性和增殖。在GC组织和细胞中,GNA13表达水平显著提高,并且与侵袭性的GC进展程度和患者生存不良密切相关。当GNA13的表达水平增高时,其通过促进小鼠的细胞增殖速率、集落形成和肿瘤形成,从而增加了GC细胞在体外和体内的增殖和致瘤性。相比之下,敲除GNA13基因能够有效地抑制GC细胞在体外和体内的增殖和致瘤性。GNA13在GC中发挥作用的分子机制包括通过上调c-Myc,激活AKT信号通路和ERK信号通路,同时抑制FOXO1的活性。通过上调细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK)来促使G1/S细胞周期发生转变,进而调节细胞周期蛋白D1和CDK抑制剂(p21Cip1和p27Kip1)的下调。因此,以p21Cip1和p27Kip1等作为靶标可以对GC的早期诊断或预后进展的监测起到重要指导作用。

### 3.5 GNA13与头颈部鳞癌

Rasheed等<sup>[22]</sup>发现在头颈部鳞癌(Head and neck squamous cell carcinoma, NHSCC)中,GNA13是耐药性和预后不良的生物标志物,而且GNA13在体外和体内都可调节HNSCC细胞的发生和呈现肿瘤起始样(Tumor initiating cells, TICs)表型,其通过NF $\kappa$ B和MAPK信号通路促进TICs表型和耐药性。为了确定表达高水平GNA13的肿瘤的侵袭性是否与较差的治疗反应有关,用顺铂,5-氟尿嘧啶(5-FU),紫杉醇,阿霉素或 $\gamma$ 电离辐射(IR)处理细胞,与低表达GNA13的细胞相比,高表达GNA13的细胞系对所有治疗方式均具有抗性。低表达GNA13的细胞中能够使得其对一些药物(例如铂类药物)的敏感性升高2~3倍。高表达GNA13的细胞更早地开始促进肿瘤发生和发展,其只需5000个细胞即可导致裸鼠成瘤。使用小分子抑制剂阻断GNA13的表达或某些下游通路的表达,可以消除GNA13诱导的TICs表型,使癌细胞能接受标准的细胞毒性治疗。这些数据表明,GNA13对于HNSCC细胞中与TICs表型相关的所有性质都是必要的。因此,GNA13作为NHSCC进展的潜在预后生物标志物,干扰GNA13诱导的信

号传导就为阻断TICs和降低HNSCC耐药性提供了新的方法,因此阻断GNA13诱导的MAPK/AP-1或NF $\kappa$ B信号通路,确实是一种针对TICs诱导的肿瘤生长和治疗NHSCC耐药性的策略。

### 3.6 GNA13与淋巴瘤

生发中心B细胞(Germinal center B cell, GCB)来源的弥漫性大B细胞淋巴瘤(Diffuse large B cell lymphoma, GCB-DLBCL)是一种常见的恶性肿瘤。Muppidi等<sup>[23]</sup>发现GNA12和GNA13在GCB细胞中均被上调,其中以GNA13上调更为显著。研究显示在GCB-DLBCL活检样本中频繁出现GNA13编码突变,GNA13缺陷足以在肠系膜淋巴结(mLNs)中赋予GCB细胞生长优势,而在淋巴集结(PPs)中则具有较小的优势。GNA13突变和BCL2重排以及可能激活的突变经常在GCB-DLBCL中同时发生。合并GNA13缺陷和BCL2过表达的小鼠中的GCB细胞显示出更高的离体存活率。人类P2RY8导致了对小鼠PPs和mLNs中GCB细胞生长的抑制作用,类似于S1PR2过表达的作用,而这种抑制作用要求P2RY8与GNA13相偶联,因为如果细胞缺少GNA13则无法看到此生理现象。通过以上实验发现人体内的P2RY8可以通过GNA13依赖性途径来抑制GCB细胞的生长并促进B细胞在GC位置定位。Morin等发现健康人体内的GCB由于受一些生理因素的影响,只能存在于生发中心内部,无法进入到循环系统之中,而缺乏GNA13时,会使得GCB进入血液循环。经测序研究发现,GNA13和S1PR2突变则主要见于GCB来源的GCB-DLBCL。总之,GCB中的GNA13的丢失会造成抗细胞凋亡,同时体细胞会受到其诱导影响,发生高频突变从而产生淋巴瘤<sup>[24-25]</sup>。因此,通过检测P2RY8的变化水平可以对GCB-DLBCL的发生起到一定的诊断价值。

### 3.7 GNA13与肺癌

Grzelinski等<sup>[26]</sup>发现在小细胞肺癌(Small cell lung cancer, SCLC)细胞中,各种自分泌刺激导致GNA12/GNA13的激活。在体外实验中,GNA12/GNA13双重敲除完全消除了小鼠的H69致瘤性,调节SCLC细胞增殖的GPCRs与GNA12/GNA13偶联,导致Gq/11磷脂酶C-Ras-细胞外信号调节激酶1/2和GNA12/GNA13-Rho信号传导途径的各自激活。在其他肿瘤中,GNA12/GNA13激活可促进侵袭性而不影响细胞增殖,而GNA13的高表达在

SCLC中发挥增殖作用。GNA13的下调会明显抑制体内外的增殖,体内数据还显示了GNA12和GNA13耗竭的累加效应,两种蛋白质的双重靶向作用能导致肿瘤生长的完全消除,这一开创性发现进一步支持了完整的GNA12/GNA13信号传导是SCLC中肿瘤生长的先决条件的概念。

### 3.8 GNA13与胰腺癌

Gardner等<sup>[27]</sup>近期的研究表明,肿瘤微环境在胰腺癌等一些疾病的进展中的发挥着重要的作用,例如GNA13在溶血磷脂酸刺激引起的胰腺癌细胞侵袭性迁移中就产生了重要影响,从而影响着胰腺癌疾病的进展。研究证明LPA特异性刺激胰腺癌细胞的迁移但不刺激其增殖,LPA刺激的胰腺癌细胞的侵袭性迁移受到竞争抑制性基因GNA13表达的抑制,并且shRNA介导的GNA13沉默也证明了LPA刺激的胰腺癌细胞迁移的类似抑制作用。GNA13是参与LPA介导的胰腺癌迁移的 $\alpha$ 亚基,即敲除GNA13会导致细胞迁移受到抑制,这为胰腺癌的早期诊断提供了新的思路。

## 4 展望

GNA13在人体中的作用机制众多且独特,已被证明是癌细胞增殖、侵袭、迁移和转移的重要调节剂<sup>[14, 28]</sup>。虽然GNA13的高表达与常见肿瘤进展密切相关,并且GNA13所参与最重要的信号通路之一就是RhoGEFs家族所介导的,但仍需进一步研究以充分阐明GNA13参与肿瘤转移和进展的确切机制。相信通过深入研究GNA13对细胞的增殖分裂、细胞骨架的重排、细胞的迁移与侵袭等生理病理活动产生的影响,阐明其发挥作用的分子机制,未来有望使其成为一个新的治疗靶点。

### 参考文献

- [1] Teo CR, Casey PJ, Rasheed SA, et al. The GNA13-RhoA signaling axis suppresses expression of tumor protective Kallikreins [J]. *Cell Signal*, 2016, 28(10): 1479-1488.
- [2] Audebrand A, Desaubry L, Nebigil CG. Targeting GPCRs Against Cardiotoxicity Induced by Anticancer Treatments [J]. *Front Cardiovasc med*, 2019, 6:194.
- [3] Stewart A, Fisher RA. Introduction: G Protein-coupled Receptors and RGS Proteins [J]. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2015, 133:1-11.
- [4] Sanchez-Fernandez G, Cabezudo S, Garcia-Hoz C, et al. Galphaq signalling: the new and the old [J]. *Cell signal*, 2014, 26(5): 833-848.
- [5] Strathmann MP, Simon MI. G alpha 12 and G alpha 13 subunits define a fourth class of G protein alpha subunits [J]. *P Natl Acad Sci USA*, 1991, 88(13): 5582-5586.
- [6] Udayappan UK, Casey PJ. c-Jun Contributes to Transcriptional Control of GNA12 Expression in Prostate Cancer Cells [J]. *Molecules*, 2017, 22(4).
- [7] Xiang B, Yang J, Zhang J, et al. The role of genes affected by human evolution marker GNA13 in schizophrenia [J]. *Prog Neuro-psychoph*, 2020, 98:109764.
- [8] Kelly P, Casey PJ, Meigs TE. Biologic functions of the G12 subfamily of heterotrimeric g proteins: growth, migration, and metastasis [J]. *Biochemistry*, 2007, 46(23): 6677-6687.
- [9] Chen Z, Gutowski S, Sternweis PC. Crystal structures of the PH domains from Lbc family of RhoGEFs bound to activated RhoA GTPase [J]. *Data Brief*, 2018, 17:356-362.
- [10] Lowery RG, Kumar M. High-Throughput Assay for RhoGEFs Based on the Transcreeper- GDP Assay [J]. *Methods Mol Biol*, 2018, 1821:165-175.
- [11] Yamada T, Ohoka Y, Kogo M, et al. Physical and functional interactions of the lysophosphatidic acid receptors with PDZ domain-containing Rho guanine nucleotide exchange factors (RhoGEFs) [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(19): 19358-19363.
- [12] Carter AM, Gutowski S, Sternweis PC. Regulated localization is sufficient for hormonal control of regulator of G protein signaling homology Rho guanine nucleotide exchange factors (RH-RhoGEFs) [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(28): 19737-19746.
- [13] Offermanns S. In vivo functions of heterotrimeric G-proteins: studies in Galpha-deficient mice [J]. *Oncogene*, 2001, 20(13): 1635-1642.
- [14] Zhang Z, Tan X, Luo J, et al. GNA13 promotes tumor growth and angiogenesis by upregulating CXC chemokines via the NF-kappaB signaling pathway in colorectal cancer cells [J]. *Cancer med*, 2018, 7(11): 5611-5620.
- [15] Kim ES, Jeong JB, Kim S, et al. The G12 family proteins upregulate matrix metalloproteinase-2 via p53 leading to human breast cell invasion [J]. *Breast cancer res Tr*, 2010, 124(1): 49-61.
- [16] Cheng SJ, Liu YC, Cheng SL, et al. Expression of Galpha12 predicts progression and prognosis of oral squamous cell carcinomas in Taiwan [J]. *official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*, 2013, 42(7): 565-569.
- [17] Rasheed SA, Teo CR, Beillard EJ, et al. MicroRNA-31 controls G protein alpha-13 (GNA13) expression and cell invasion in breast cancer cells [J]. *Mol cancer*, 2015, 14:67.
- [18] Vrba L, Munoz-Rodriguez J L, Stampfer M R, et al. miRNA gene promoters are frequent targets of aberrant DNA methylation in human breast cancer [J]. *PLoS one*, 2013, 8(1): e54398.

(下转第564页)

## 不同核酸提取试剂盒在新型冠状病毒核酸检测中的比较研究

马雯<sup>1</sup> 张伟宏<sup>2</sup> 马瑛龙<sup>3</sup> 蒯静<sup>4</sup> 金哲宇<sup>1,5</sup> 朴文华<sup>1\*</sup>

**[摘要]** **目的** 比较不同新型冠状病毒核酸提取试剂盒的提取效果及扩增结果,为相关实验室选择核酸提取试剂提供参考依据。**方法** 收集6种新型冠状病毒核酸提取试剂盒的基本情况,选取20例疑似新型冠状病毒肺炎患者的咽拭子作为标本,使用各试剂平行提取总RNA并倍比稀释,RT-qPCR扩增后综合比较核酸浓度、核酸纯度及扩增结果等数据。**结果** 各试剂盒提取核酸浓度和纯度的差异明显,其中F试剂盒提取的核酸品质最好。扩增后6种试剂盒均可检出4例阳性标本;分析扩增结果,不同提取试剂盒所提取的核酸在扩增后IC基因、N基因、ORF1ab基因的Ct值及 $\Delta Rn$ 差异明显。对提取核酸进行稀释并扩增,结果显示F试剂盒提取核酸检测出的阳性样本最多,其次为C试剂盒。**结论** 核酸提取试剂可显著影响新型冠状病毒核酸检测的结果,所选的6种试剂盒中F试剂盒性能最好,各家实验室应根据情况选择适合的核酸提取试剂盒。

**[关键词]** 新型冠状病毒;核酸提取试剂盒;性能比较

### Comparative performance of nucleic acid extraction kits for the detection of 2019 novel coronavirus

MA Wen<sup>1</sup>, ZHANG Weihong<sup>2</sup>, MA Yinglong<sup>3</sup>, XI Jing<sup>4</sup>, JIN Zheyu<sup>1,5</sup>, PIAO Wenhua<sup>1\*</sup>

(1. Clinical Laboratory of People's Hospital of Ningxia Hui Autonomous Region (the First Affiliated Hospital of Northwest University for Nationalities), Yinchuan, Ningxia, China, 750001; 2. Yinchuan City Center for Disease Control and Prevention, Yinchuan, Ningxia, China, 750001; 3. Ningxia Fourth People's Hospital, Yinchuan, Ningxia, China, 750021; 4. Ningxia KingMed Diagnostics Group Co. Ltd, Yinchuan, Ningxia, China, 750002; 5. Orthopedics Department of the First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou, Jiangsu, China, 215006)

**[ABSTRACT]** **Objective** To compare and analyze the detection capability of nucleic acid extraction (NAE) kits for the 2019 novel coronavirus (SARS - COV - 2) and to provide a reference for relevant laboratories to select nucleic acid extraction reagents. **Methods** 6 different NAE kits for the detection of SARS - COV - 2 were compared in this study. 20 nasopharyngeal swabs were collected from 20 patients suspected of having coronavirus pneumonia 2019. Total RNA was extracted from the 20 pharyngeal swabs

基金项目:宁夏回族自治区重点研发计划科技支撑“新型冠状病毒感染的肺炎疫情防控”专项(2020BEG03023)

作者单位:1. 宁夏回族自治区人民医院(西北民族大学第一附属医院)临床医学检验诊断中心,宁夏,银川 750001  
2. 银川市疾病预防控制中心,宁夏,银川 750001  
3. 宁夏回族自治区第四人民医院检验科,宁夏,银川 750021  
4. 宁夏金城医学检验所,宁夏,银川 750002  
5. 苏州大学附属第一医院骨科,江苏,苏州 215006

\*通信作者:朴文华, E-mail: wenhuapiao@163.com

using 6 different NAE kits in preparation for RT-qPCR analysis. The comprehensive comparison was carried out based on the nucleic acid concentration, nucleic acid purity, and amplification results. **Results** There were significant differences in the concentration and purity of nucleic acids extracted by each kit. The highest quality nucleic acids were extracted using kit F. After amplification, 4 positive specimens could be detected by all 6 kits. However, the Ct values and  $\Delta R_n$  were significantly different based on the amplification data of the IC gene, N gene and *ORF1ab*. The extracted nucleic acid was diluted and amplified, and the results indicated that kit F detected the highest number of positive samples for nucleic acid extraction, followed by kit C. **Conclusion** NAE reagents have a significant impact on the SARS-CoV-2 nucleic acid detection results. Kit F had the best performance, followed by kit C. Therefore, different laboratories should pay attention to selecting NAE kits suitable for their research.

[KEY WORDS] SARS-CoV-2; Nucleic acid extraction kit; Performance Comparison

新型冠状病毒(2019 Novel Coronavirus, 2019-nCoV)引起的肺炎广泛传播,并在全球蔓延。国际病毒分类协会将其命名为严重急性呼吸综合征冠状病毒2(Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2, SARS-CoV-2),随后世界卫生组织公布其基因组序列,并将该病毒导致的疾病命名为COVID-19(Corona Virus Disease 2019)<sup>[1-2]</sup>。国家卫生健康委多次印发新型冠状病毒肺炎诊疗方案,始终将逆转录实时荧光定量聚合酶链式反应(Reverse Transcription Quantitative Real-time Polymerase Chain Reaction, RT-qPCR)检测新型冠状病毒的核酸作为确诊及治疗监测的重要指标<sup>[3]</sup>。现已注册的新冠病毒核酸检测试剂多以开放阅读框架1ab(Open Reading Frame 1ab, ORF1ab)基因、核衣壳蛋白(Nucleocapsid, N)基因及包膜蛋白(Envelope, E)基因为检测对象,同时携带内源性内标(Internal Control, IC)基因,实现对新型冠状病毒的核酸检测<sup>[4]</sup>。有医院发现新冠核酸检测结果存在假阴性较高,与临床症状不相符,不同厂家检测试剂盒结果不一致等问题<sup>[5-6]</sup>。影响新冠病毒核酸检测结果的因素很多,尽管多数实验室都在关注检测试剂的性能,但实际上,核酸纯度及浓度在RT-qPCR检测过程中也十分重要,因此基于目前所出现的问题,本实验室通过收集6种新型冠状病毒核酸提取试剂盒的基本情况,比较其核酸提取效果及RT-qPCR扩增结果等参数,综合分析试剂盒的性能,为使用者合理选择试剂提供参考依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 标本来源

收集2020年2月15日至2020年2月29日就诊本院发热门诊的20例疑似新型冠状病毒感

染者的鼻咽部拭子作为标本,按照规定转运至分子生物学实验室立即检测,检测前置于65℃水浴灭活20 min。

### 1.2 实验方法

使用RT-qPCR扩增新型冠状病毒核酸。所有检测严格按照《医疗机构临床基因扩增检验实验室管理办法》(国卫办医政发[2010]194号)<sup>[7]</sup>、《国家卫生健康委办公厅关于印发新型冠状病毒实验室生物安全指南(第二版)的通知》(国卫办科教函[2020]70号)<sup>[8]</sup>及《新型冠状病毒感染的肺炎实验室检测技术指南(第四版)》(国卫办疾控函[2020]109号)<sup>[9]</sup>相关文件进行实验操作和生物安全防护。

### 1.3 仪器与试剂

核酸提取使用杭州奥盛K30型干浴仪高温干浴,离心使用安徽嘉文JW-2018H高速冷冻离心机;提取的核酸使用NanoDrop One微紫外/可见分光光度计测量核酸浓度、核酸纯度,检测前使用各试剂盒中提供的洗脱液作空白对照;新型冠状病毒基因扩增使用ABI 7500实时荧光定量PCR仪,检测试剂使用中山大学达安基因提供的新型冠状病毒2019-nCoV核酸检测试剂盒(批号:2020017),设置荧光检测通道及反应程序,按照说明书要求,当N基因、*ORF1ab*基因及IC基因的扩增通道出现明显的S型曲线,且Ct值均 $\leq 40$ ,可判定为阳性结果。

选择已获得国家药监局批准的可用于新型冠状病毒核酸提取纯化的试剂盒,并对试剂盒随机编号为A(中山大学达安基因股份有限公司,批号为2020003)、B(圣湘生物科技股份有限公司,批号为2020002)、C(上海之江生物科技股份有限公司,批号为P20200101)、D(上海科华生物工程

股份有限公司,批号为20026530)、E(江苏硕世生物科技股份有限公司,批号为20200110)、F(罗氏诊断有限公司,批号为43556600)。

4个阳性标本提取的核酸使用各公司试剂盒内提供的洗脱液按照1:400,1:800,1:1600,1:3200的稀释度倍比稀释,立即进行RT-qPCR扩增。

#### 1.4 统计学处理

数据分析使用SPSS 22.0软件。计量资料用

( $\bar{x} \pm s$ )表示组间数据比较采用单因素方差分析,数据使用多元方差分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。图表使用GraphPad Prism 8.0.2软件绘制。

## 2 结果

### 2.1 核酸提取试剂盒的基本情况

6种新冠病毒核酸提取试剂盒的基本情况见表1。

表1 核酸提取试剂盒基本情况表

Table 1 Baseline data of 2019-nCoV extraction kits

试剂盒	核酸提取方法	加样体积( $\mu\text{L}$ )	提取中是否高温裂解	是否加内标	洗脱体积( $\mu\text{L}$ )	手工提取时长(min)	参考价格(元/人次)	产地
A	手工-膜吸附柱法	200	是(72°C 10 min)	否	50	~70	20	国产
B	手工-磁珠法	200	是(72°C 10 min)	否	50	~35	15	国产
C	手工-磁珠柱法	140	否	是	50	~60	25	国产
D	手工-磁珠法	200	否	否	50	~40	17	国产
E	手工-膜吸附柱法	200	否	否	50	~40	20	国产
F	手工-膜吸附柱法	200	否	否	50	~35	37	进口

### 2.2 核酸浓度及纯度的比较

不同试剂盒所提取的核酸在浓度方面比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),结果为A>F>D>B>E>C。核酸纯度中最高检测值为A试剂盒,剩下依次为E、D、F、C、B,6种试剂盒之间比较,差异有统计学意义( $P < 0.001$ )。见表2。

表2 核酸浓度及纯度的比较( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Comparison of total RNA concentration and purity ( $\bar{x} \pm s$ )

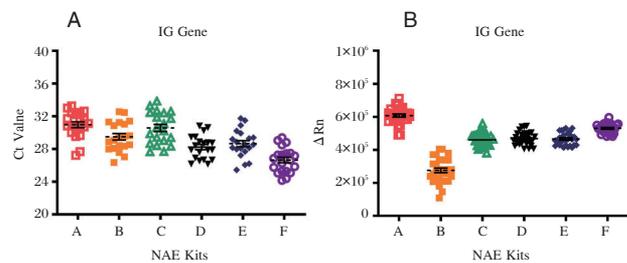
试剂盒	<i>n</i>	核酸浓度( $\text{ng}/\mu\text{L}$ )	核酸纯度
A	20	75.499 $\pm$ 13.565	2.802 $\pm$ 0.244
B	20	6.827 $\pm$ 1.925	1.815 $\pm$ 0.108
C	20	2.252 $\pm$ 0.965	1.826 $\pm$ 0.446
D	20	15.912 $\pm$ 3.038	2.347 $\pm$ 0.405
E	20	6.548 $\pm$ 2.151	2.705 $\pm$ 0.414
F	20	46.666 $\pm$ 13.404	1.978 $\pm$ 0.214
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001

### 2.3 扩增结果分析

RT-qPCR扩增结果显示,6种试剂盒所提核酸均能检出4份标本的*N*基因、*ORF1ab*基因及IC基因( $\text{Ct值} \leq 40$ ),可判定为阳性。其他16份标本只有IC基因可检出,判定为阴性。

分析扩增后IC基因的Ct值及 $\Delta\text{Rn}$ 值。F试剂盒提取的总RNA扩增后的Ct值最小,其次为D

试剂、E试剂、B试剂、C试剂和A试剂(见图1A),差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。扩增后得到的荧光曲线中,A试剂的 $\Delta\text{Rn}$ 值最高,其次为F试剂、E试剂、D试剂、C试剂、B试剂(见图1B),差异有统计学差异( $P < 0.05$ )。



注:6种试剂提取核酸扩增后IC基因Ct值为F:26.649 $\pm$ 1.545<D:28.227 $\pm$ 1.443<E:28.651 $\pm$ 1.705<B:29.486 $\pm$ 1.784<C:30.567 $\pm$ 1.960<A:30.971 $\pm$ 1.618。6种试剂提取核酸扩增后IC基因 $\Delta\text{Rn}$ 值为A:603140.103 $\pm$ 44458.157>F:528902.720 $\pm$ 28441.486>E:469635.854 $\pm$ 36200.701>D:467692.854 $\pm$ 41803.066>C:460925.196 $\pm$ 46741.227>B:261449.096 $\pm$ 78549.924。

图1 IC基因Ct值及 $\Delta\text{Rn}$ 值的比较

Figure 1 Comparison of Ct value and  $\Delta\text{Rn}$  of IC gene

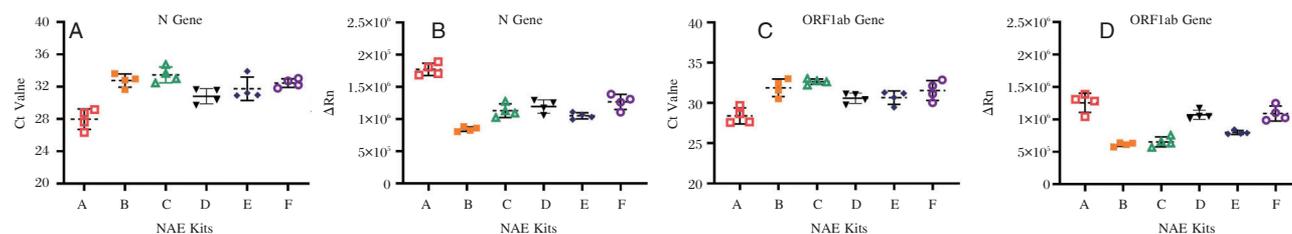
分析4个阳性标本*N*基因及*ORF1ab*基因的扩增数据。不同试剂提取的核酸扩增后,*N*基因中的Ct值A<D<E<F<B<C(如图2A),差异有统计

学意义( $P<0.05$ )。N基因的 $\Delta Rn$ 值中,A试剂最高,其次为F试剂、D试剂、C试剂、E试剂及B试剂(如图2B),差异有统计学意义( $P<0.05$ )。ORF1ab基因Ct值与 $\Delta Rn$ 值的比较中,如图2C、2D,呈现出与N基因相同的趋势,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。

### 2.4 核酸稀释后扩增结果的比对

对4个阳性标本稀释后再扩增。F试剂提取的核酸在1:3200稀释时可将4个阳性标本的IC基因、N基因、ORF1ab基因均检出。C试剂提取的核酸在1:1600稀释时可以检出3个IC基因,3个

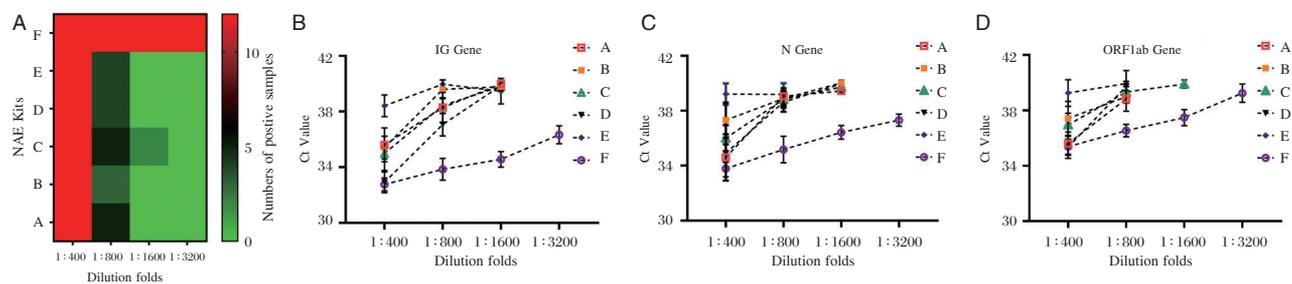
N基因及1个ORF1ab基因。其他几种试剂盒在1:1600稀释时均有未检出的基因。统计各试剂所提核酸经稀释后检出的阳性样本数目,如图3A。4个阳性样本在不同的稀释后,3次重复实验中,F试剂可检出各稀释度下所有的阳性样本,在1:1600的稀释时C试剂检出2个阳性样本,其他几种试剂均未检出阳性样本,差异有统计学意义( $P=0.002<0.05$ ,  $F=12.82$ )。分析不同稀释度扩增后3个基因的Ct值,见如图3B、3C、3D,F试剂的提取效率最好,扩增曲线的Ct值在1:800、1:1600和1:3200的稀释度时,均低于其他几种试剂。



注:4个阳性标本扩增后,N基因Ct值A:27.970±1.265<D:30.812±0.945<E:31.746±1.448<F:32.437±0.532<B:32.757±0.816<C:33.461±0.984。N基因 $\Delta Rn$ 值A:1771748±95808>F:1266743±117865>D:1195059±103446>C:1130163±105426>E:1050928±48741>B:843747±35217。ORF1ab基因Ct值A:28.391±1.003<D:30.590±0.6423<E:30.658±0.8389<F:31.538±1.233<B:31.883±1.087<C:32.646±0.3357。ORF1ab基因 $\Delta Rn$ 值A:1254835±148228>F:1090017±115978>D:1069955±70665>C:652659±77384>E:797210±31480>B:612881±29678。

图2 N基因和ORF1ab基因Ct值及 $\Delta Rn$ 值的比较

Figure 2 Comparison of Ct value and  $\Delta Rn$  of N gene and ORF1ab gene



注:A.各稀释度下不同提取试剂对疑似阳性样本检出数目的比较;B.阳性标本IC基因Ct值的比较;C.阳性标本N基因Ct值的比较;D.阳性标本ORF1ab基因Ct值的比较。

图3 核酸稀释后扩增结果的比对

Figure 3 Comparison of amplification results of diluted extraction products

## 3 讨论

RT-qPCR因其灵敏度高、特异性强、操作简单且耗时短<sup>[10]</sup>,成为新型冠状病毒核酸检测的主要方法。但使用RT-qPCR检测新冠病毒出现假阴性率高、检测结果与临床症状不吻合等报道,备受关

注<sup>[5-6]</sup>。在影响新冠病毒核酸检测结果的众多因素中,高质量、高纯度核酸是检测成功的必备条件。本次所选核酸提取试剂盒均为手工提取,包括膜吸附柱法、磁珠柱法和磁珠法。膜吸附柱法耗时长,但稳定性好,重复性高。磁珠法操作方便,用时少,价格低廉<sup>[11]</sup>,二者相比各有所长。对提取出

的总RNA分析发现,F试剂盒提取出的核酸品质最高。C试剂盒提取出的核酸纯度虽符合要求,但浓度偏低,分析可能与其标本起始量过低相关。试剂盒A提取的核酸虽然浓度高,但其核酸纯度不理想。质量较好的RNA纯度A260/A280比值应在1.8~2.0之间,比值小于1.8时,提示溶液中可能存在蛋白质或酚类的污染;大于2.0时,或因RNA或已水解成单核苷酸导致,另一方面现有核酸提取试剂多使用异硫氰酸胍,其残留也会增加A260/A280的比值。

Ct值为荧光信号达到阈值时所需的循环数,它与起始模板的浓度负相关,可以代表PCR的扩增效率。 $\Delta Rn$ 值是荧光PCR在扣除背景信号后的荧光值,能反映扩增产物的数量。Ct值与 $\Delta Rn$ 值的差异显示不同核酸提取试剂盒对新冠病毒核酸检测结果会产生影响。按比例对阳性标本的核酸进行稀释,并进行扩增分析,F试剂检出阳性样本数量最多,其次为C试剂,6种试剂盒相比差异明显。由此可见,核酸的浓度及纯度对新型冠状病毒核酸检测的结果有直接且显著的影响。

在新冠肺炎核酸检测方面各家实验室对试剂盒的评价不一致<sup>[12-13]</sup>,一方面可能是各试剂盒上市仓促,质量和性能有待优化,另一方面也与实验室条件、操作人员检测经验、操作水平相关。本实验通过检测20例标本结果比对认为,市售的6种核酸提取试剂盒中,F试剂盒在提取效果及阳性标本的检出率方面均优于其他5种试剂盒,但其成本较高,常规实验室可能无法使用。其他5种试剂成本接近,因此各实验室可根据实验目的,样本量多少以及实验室经费等情况,选择适合的新冠病毒核酸提取试剂盒。

## 参考文献

- [1] 赵颂涛,毛青. 新型冠状病毒肺炎的临床特征与病原体检测[J/OL]. 检验医学与临床, 1-8. [2020-04-06]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1167.r.20200306.1710.004.html>.
- [2] World Health Organization. Clinical Management of severe acute respiratory infection when novel coronavirus (2019-nCoV) infection is suspected interim guidance [S]. <http://WHO/nCoV/Clinical/2020.2>.
- [3] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 关于印发新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第七版):国卫办医函(2020)184号[S]北京:中华人民共和国国家卫生健康委员会, 2020.
- [4] Michael J, Loeffelholz, Yi-Wei Tang. Laboratory diagnosis of emerging human coronavirus infections - the state of the art [J]. *Emerg microbes infect*, 2020, 9(1): 747-756.
- [5] 张瑞, 李金明. 如何减少新型冠状病毒核酸检测的假阴性[J]. 中华医学杂志, 2020, 100(11): 801-804.
- [6] 莫茜, 秦炜, 傅启华, 等. 正确认识新冠病毒核酸检测的影响因素[J/OL]. 中华检验医学杂志, 2020, 43(2020-02-08). <http://rs.yiigle.com/yufabiao/1180120.htm>. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1009-8158.2020.0002.
- [7] 中华人民共和国卫生部办公厅. 医疗机构临床基因扩增检验实验室管理办法[EB/OL]. (2010-12-06) [2020-03-10]. <http://www.nhc.gov.cn/xxgk/pages/viewdocument.jsp?dispatchDate=&staticUrl=/zwgkzt/wsbyjsj/201012/49981.shtml>.
- [8] 中华人民共和国卫生健康委办公厅. 新型冠状病毒实验室生物安全指南(第二版)[EB/OL]. (2020-01-23) [2020-03-10]. <http://www.nhc.gov.cn/qjjys/s7948/202001/0909555408d842a58828611dde2e6a26.shtml>.
- [9] 中华人民共和国国家卫生健康委员会办公厅. 新型冠状病毒感染的肺炎实验室检测技术指南(第四版)[EB/OL]. (2020-02-07) [2020-03-10] <http://www.nhc.gov.cn/jkj/s3577/202002/573340613ab243b3a7f61df260551dd4.shtml>.
- [10] Zhu N, Zhang D, Wang W, et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019 [J]. *The New England journal of medicine*, 2020, 382(8): 727-733.
- [11] 李金明. 实时荧光PCR技术(第2版)[M]. 北京: 科学出版社, 2016: 72-77.
- [12] 沈利华, 黄菲, 陈祥, 等. 三种国产严重急性呼吸综合征冠状病毒2(SARS-CoV-2)核酸检测试剂盒临床诊断效能评估[J]. 浙江大学学报(医学版), 2020; 1-10. [2020-04-06]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/33.1248.r.20200318.1412.004.html>.
- [13] 郭元元, 王昆, 张宇, 等. 6种国产新型冠状病毒核酸检测试剂检测性能比较与分析[J/OL]. 重庆医学, 1-10 [2020-04-06]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.r.20200212.0900.006.html>.

# 1 例新冠肺炎合并常见呼吸道病原体共感染病例研究

黄永杰 李晓童\* 王桂珍 郭飞飞 马雪涵

**[摘要]** **目的** 了解新冠疫情期间郑州市呼吸道症状人群中新型冠状病毒(后称新冠病毒, SARS-CoV-2)与常见呼吸道病原体共感染发生比率。分析新冠病毒合并常见呼吸道病原体感染的临床特征,为新冠疫情中发生的多种病原体合并感染的鉴别诊断与治疗应对提供依据。**方法** 2020年1月24日至2月29日期间,对614例呼吸道感染症状患者分别进行新冠病毒核酸检测,同时进行嗜肺军团杆菌、呼吸道腺病毒、呼吸道合胞病毒、人偏肺病毒、鼻病毒、肺炎支原体、甲型流感病毒、乙型流感病毒等常见呼吸道病原体的检测。对检测发现的共感染患者病史及治疗等临床资料进行详细回顾分析。**结果** 614例样本中总共检出新冠病毒核酸阳性标本11例(占比1.79%),其他常见呼吸道病原体阳性标本118例(占比19.57%)。在11份新冠病毒核酸阳性标本中发现1例新冠病毒共感染嗜肺军团杆菌(占比9.09%)。该病例为一有密切接触史孕妇,在住院治疗过程中未出现重症表现,经合理治疗预后良好,出院隔离后未复发。**结论** 郑州市呼吸道症状患者中大部分为其它呼吸道病原体感染,少部分为新型冠状病毒感染,存在共感染病例。因此,应该对呼吸道疾病病原体的多重快速检测从而及时发现共感染病例,以利于设计正确的感染控制和临床治疗方案。

**[关键词]** 新型冠状病毒;共感染;筛查策略

## A case study of Corona Virus Disease 19 with common respiratory pathogen co-infection

HUANG Yongjie, LI Xiaotong\*, WANG Guizhen, GUO Feifei, MA Xuehan

(Department of Clinical Laboratory, Zhengzhou Central Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan, China, 450007)

**[ABSTRACT]** **Objective** To determine the proportion of SARS-CoV-2 co-infected with common respiratory pathogens in Zhengzhou City among the population with respiratory symptoms during the SARS-CoV-2 pandemic. To provide evidence for the differential diagnosis and treatment of multi-pathogen co-infection in the event of the SARS-CoV-2 pandemic. **Methods** From January 24, 2020 to February 29, 2020, 614 patients suspected of having SARS-CoV-2 were screened (nucleic acid test) for SARS-CoV-2 and legionella pneumophila, respiratory adenovirus, respiratory syncytial virus, human metapneumovirus (hMPV), rhinovirus, mycoplasma pneumoniae, influenza A virus, influenza B virus and other common respiratory pathogens. The clinical characteristics including the case history and treatment of co-infected patients confirmed in the test were reviewed in detail. **Results** A total of 11 of 614 samples were positive for SARS-CoV-2 nucleic acid (1.79%), and 118 samples were positive for other common respiratory pathogens (19.57%). Among the 11 SARS-CoV-2, one was found to be co-infected with legionella pneumophila (9.09%). This case was a pregnant woman with a close contact history with confirmed COVID-19 patients. There were no severe symptoms during hospitalization. The prognosis was good after reasonable treatment, and there was no recurrence after discharge. **Conclusion** Most of the patients with respiratory symptoms in Zhengzhou are infected with other respiratory pathogens, and a few are infected with SARS-CoV-2. There are

基金项目:郑州市临床检验中心生物样本库的建设与应用(172102310205)

作者单位:郑州大学附属郑州中心医院检验科,河南,郑州 450007

\*通信作者:李晓童, E-mail:593912741@qq.com

cases of co-infection. Therefore, multiple rapid detection of pathogens of respiratory diseases should be carried out to detect co-infection cases in time to facilitate the design of correct infection control and clinical treatment programs.

[KEY WORDS] SARS-CoV-2; Pathogen co-infection; Screening strategy

2019年12月起,湖北省武汉市爆发不明原因肺炎疫情,1月7日,经检测确定本次疫情由一种新型冠状病毒引起<sup>[1]</sup>,2月21日世界卫生组织将其命名为“SRAS-CoV-2”。新冠肺炎疫情短时间内即在全国各省市爆发,并逐步在日本、韩国、意大利、伊朗和美国等其他国家也发现大量病例<sup>[2-6]</sup>。据国家卫健委最新统计资料显示,全国截止2020年3月10日24时,国内累计报告确诊病例80 778例,累计死亡病例3 158例。SRAS-CoV-2的传染性和致死率较高,国家卫健委统计发现湖北省的病死率为3.1%,但除湖北省外全国其它省份的病死率仅为0.16%。前期数据显示死亡患者主要为老年人和有慢性基础疾病者<sup>[7]</sup>,多重病原体感染是否影响该病的进程及重症死亡尚不清楚。国家卫健委在新型冠状病毒肺炎诊疗方案第6版和最新第7版中均增加了应尽可能采取多重PCR核酸检测做好疑似病例新冠病毒与流感病毒、腺病毒、呼吸道合胞病毒等其他常见呼吸道病原体的鉴别诊断内容<sup>[11]</sup>。在新冠疫情中新冠病毒与常见呼吸道病原体共感染病例的比例以及共感染对病症转归发展的影响尚缺乏系统的研究。因此,对临床样本进行多种病原体的共感染检测研究具有重要意义。本研究对具有呼吸道症状患者的病原检测结果进行统计分析,以明确此类人群中新冠病毒与常见呼吸道病原体共感染发生比率,以期对新型冠状病毒疾病的鉴别诊断提供依据。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选取本院2020年1月24日至2月29日接诊的发热且有呼吸道症状的患者614例,男性303例,女性311例,年龄(4~96)岁。所有患者均进行了新型冠状病毒核酸检测后被分为两组,其中新型冠状病毒核酸阳性患者11(1.79%),新型冠状病毒核酸阴性患者603(98.2%)。对两组患者均采用间接免疫荧光法对患者进行九项呼吸道感染病原体(嗜肺军团菌、肺炎支原体、Q热立克次体、肺炎衣原体、腺病毒、呼吸道合胞病毒、甲型流感病毒、

乙型流感病毒和副流感病毒)IgM抗体检测,以及采用实时荧光PCR方法进行八项呼吸道病原体(嗜肺军团菌、呼吸道腺病毒、呼吸道合胞病毒、人偏肺病毒、鼻病毒、肺炎支原体、甲型流感病毒、乙型流感病毒)核酸检测。

### 1.2 试剂与仪器

新型冠状病毒2019-nCoV核酸检测试剂盒购自中山大学达安基因股份有限公司(批号:2020023);郑州安图生物工程股份有限公司提供的九项呼吸道感染病原体IgM抗体检测试剂盒(批号:19N446);中山大学达安基因股份有限公司提供的嗜肺军团菌(批号:20190925)、呼吸道腺病毒(批号:20200109)、呼吸道合胞病毒(批号:2020001)、人偏肺病毒(批号:20190603)、鼻病毒(批号:20191218)、肺炎支原体(批号:20191101)、甲型流感病毒(批号:2019012)、乙型流感病毒(批号:2019010)核酸检测试剂盒。仪器:美国应用生物系统公司生产的ABI7500实时荧光定量PCR仪器;中山大学达安基因股份有限公司提供的Smart32全自动核酸提取仪;德国欧蒙之星公司生产的荧光显微镜。

### 1.3 检测方法

#### 1.3.1 新型冠状病毒核酸检测

采集所有患者口腔咽拭子置于56℃恒温金属浴中灭活30分钟<sup>[11]</sup>后进行病毒核酸检测。试剂盒说明书对所有标本进行核酸提取及荧光PCR检测。荧光PCR判定标准为阴性对照FAM、ROX、HEX三个通道均无Ct值或Ct值>40,阳性对照三个通道Ct值均≤35。同一份标本中新型冠状病毒2个靶标(ORF1ab、N)实时荧光RT-PCR检测结果均为阳性,则判定为阳性病例。如果出现单个靶标阳性的检测结果,则需要重新采样检测,若仍为单靶标阳性,则判定为阳性。同种类型标本两次采样检测中均出现单个靶标阳性的检测结果,可判定为阳性。(FAM和/或ROX通道检测到典型的S型扩增曲线,且Ct≤40的样本,报告为2019-nCoV病毒阳性。FAM和ROX通道均未检测到典型的S型扩增曲线(No Ct),或Ct>40,HEX通道有扩增曲线且Ct≤40的样本,报告为2019-nCoV病毒阴性)。

### 1.3.2 非新冠病毒呼吸道病原体核酸检测

采集所有患者的口腔咽拭子标本。严格按照试剂盒说明书对标本进行处理和核酸提取。在ABI7500 荧光定量PCR 仪上进行核酸检测。每次试验均设置阴阳性质控品,按照说明书要求进行结果判定。

### 1.4 统计分析

用Excel 表格建立数据库,对临床检测资料进行描述性统计分析。采用SPSS 20.0 软件进行数据处理,计数资料用 $n(\%)$ 表示,两样本间率的比较采用卡方检验, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

### 1.5 临床回顾

对发现的共感染病例临床资料包括发病与诊断治疗过程进行系统回顾分析。

## 2 结果

### 2.1 病原体感染谱分析

614 例标本中检出 129 例阳性(21.01%),其中新型冠状病毒核酸阳性 11 例(占阳性比率 8.53%),其他常见呼吸道病原体核酸阳性 118 例(占阳性比率 91.47%),差异具有统计学意义( $\chi^2=6.72, P<0.05$ )。在 11 例新型冠状病毒阳性样本中单靶标阳性标本为 1 例(占比 0.16%),其余 10 例为双靶标阳性(占比 1.63%),差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。在 118 例其他呼吸道病原体阳性样本中主要为甲流(10.59%)和乙流(5.37%),见表 1。

表 1 新型冠状病毒核酸标本鉴别诊断情况

Table 1 Differential diagnosis of novel coronavirus nucleic acid specimens

病原体类别	阳性数	百分比(%)
嗜肺军团菌	1	0.16
呼吸道腺病毒	2	0.33
呼吸道合胞病毒	1	0.16
人偏肺病毒	3	0.49
鼻病毒	7	1.14
肺炎支原体	6	0.98
甲流	65	10.59
乙流	33	5.37

### 2.2 共感染病例统计

11 例新冠病毒阳性患者中检出 1 例新冠病毒与嗜肺军团菌共感染(占比 9.09%),其新冠病毒核酸检测阳性且嗜肺军团菌血清 IgM 抗体阳性,且核酸检测阳性(阳性判断标准:扩增曲线在检测通

道有对数生长期,且 Ct 值 $\leq 38$ );118 例常见呼吸道病原体感染阳性标本中检出鼻病毒合并偏肺病毒共感染 1 例(占比 0.85%),见表 2。

表 2 病原体共感染情况 [ $n(\%)$ ]  
Table 2 Pathogen co-infection [ $n(\%)$ ]

	混合感染类型	阳性率
新冠病毒阳性(11)	新型冠状病毒+嗜肺军团菌	1(9.09)
其它呼吸道病原体阳性(118)	人偏肺病毒+鼻病毒	1(0.85)

### 2.3 共感染病例临床特征

检测发现的新冠病毒与嗜肺军团菌共感染病例为一孕期 16 周的孕妇,发病初始症状为发热胸闷等常见呼吸道感染症状,流调显示患者有密切接触史,且家里有确诊病例,入院检查排除了流感病毒等常见呼吸道病原体感染,证实为新冠病毒感染阳性,且患者嗜肺军团菌血清 IgM 抗体呈阳性,表明患者同时感染新冠病毒与嗜肺军团菌。患者在住院诊断治疗过程中血液生化与免疫检测指标与新冠病毒单感染患者相比无明显异常,病症发展期间未出现呼吸困难等重症表现,临床给予了合理对症治疗,预后良好,出院后隔离 20 天未见复发。

## 3 讨论

这次新冠病毒疫情发生与流行正处于冬春之际,是季节性流感的多发高发季节,另外一些常见呼吸道病原体如鼻病毒、腺病毒、呼吸道合胞病毒等也容易混杂在当前的新型冠状病毒肺炎疫情中,既干扰了疫情的防控,也威胁着大众的健康安全。之前国内研究显示,在门诊患者的感染中,呼吸道感染居各类感染之首<sup>[8]</sup>,其中 90% 的急性上呼吸道疾病和大部分的下呼吸道疾病,是由细菌以外的病原体引起<sup>[9]</sup>。因此,无论从公共卫生的角度出发,还是基于此次新冠肺炎疫情防控的角度,对多种呼吸道病原体的鉴别诊断都是十分必要的。

本文检测研究中发现了一例新冠病毒合并嗜肺军团菌共感染病例,对其临床病史、症状、治疗等情况进行了详细回顾分析。患者新冠病毒核酸检测阳性且嗜肺军团菌血清 IgM 抗体检测阳性,证实患者同时感染两种病原体,检测诊断结果对患者的正

确临床用药治疗提供了很好的指导依据,患者在住院过程中未出现呼吸困难等重症表现,并获得了良好的治疗效果,表明共感染病原体对病症发展转归及治疗预后未产生明显影响。这也是目前对新冠病毒同时合并常见呼吸道病原体感染的详尽病例报告,有助于指导临床应对病毒共感染的病患。嗜肺军团菌也是一种常见的临床肺炎致病菌,为革兰氏阴性杆菌,可导致军团病,最早在美国退伍军人会议爆发的肺炎疫情中发现,该病菌会引起人体重症肺炎症状,俗称“空调肺”。嗜肺军团菌在城市的供水管道、蓄水池、冷却塔和空调系统中广泛存在,患者为16周孕妇疫情期间活动受限且目前正处冬季供暖季,推测其感染军团菌可能因长期处于室内密闭环境,空气流通性差而导致诱发感染。此次新冠疫情中发现的该共感染患者并未有特殊临床表现,但新冠病毒合并细菌感染是否影响临床治疗预后和潜在导致重症尚待更多病例样本的深入研究。

这些非新冠病毒感染患者中也发现了1例人偏肺病毒与鼻病毒共感染情况,表明可能在临床呼吸道疾病中存在广泛的病原体共感染情况,如果不充分检测鉴别则无法准确指导临床治疗。广州市疾控中心原主任王鸣指出在抗击新型冠状病毒肺炎疫情时应警惕季节性流感的叠加效应<sup>[10]</sup>。限于样本检测来源及数量的影响,本研究尽管尚未发现新冠病毒同时合并流感病毒等其他病毒感染,但仍不应忽视其潜在的危害作用。建议扩大样本检测范围及提高病毒多重检测技术手段。

日前已有专家提出:新冠病毒将长期存在人群。鉴别诊断与多重筛查检测已成必然,新冠病毒同常见呼吸道病毒的鉴别诊断除了能对新冠肺炎进行确诊,还能有效排除疑似病例,有助于临床诊断和决策,降低医患风险和负担;少部分患者出现新冠病毒与非新冠病毒合并感染,此类患者需要对病原体进行对因治疗,并避免患者发生交叉感染。新冠肺炎诊疗指南<sup>[11]</sup>也强调:新型冠状病毒肺炎主要与流感病毒、腺病毒、呼吸道合胞病毒等其他已知病毒性肺炎及肺炎支原体感染鉴别,尤其是对疑似病例要尽可能采取多重PCR核酸检测等方法,对常见呼吸道病原体进行检测。

因此,在临床中尤其在日常呼吸道感染患者中开展多重呼吸道病原体鉴别诊断技术是非常必要的。同时,在此次新冠疫情中,也发现核酸检测技术是诊断呼吸道病原体的金标准,其在临床呼吸道鉴别诊断中的应用场景也将越来越受到医学界重视。

## 参考文献

- [1] Xu X, Chen P, Wang J, et al. Evolution of the novel coronavirus from the ongoing Wuhan outbreak and modeling of its spike protein for risk of human transmission. *Sci China Life Sci.* 2020, 63, 457-460. <https://doi.org/10.1007/s11427-020-1637-1635>.
- [2] WHO. Novel coronavirus - Thailand (ex-China). Jan 14, 2020. <http://www.who.int/csr/don/14-january-2020-novel-coronavirusthailand/en/>
- [3] WHO. Novel coronavirus-Republic of Korea (ex-China). Jan 21, 2020. <http://www.who.int/csr/don/21-january-2020-novel-coronavirus-republic-of-korea-ex-china/en/> (accessed Jan 23, 2020)
- [4] WHO. Novel coronavirus-Japan (ex-China). Jan 17, 2020. <http://www.who.int/csr/don/17-january-2020-novel-coronavirus-japan-ex-china/en/> (accessed Jan 19, 2020)
- [5] Lan T, Phan, Thuong V Nguyen, Quang C Luong, Thinh V. Nguyen, Hieu T. Nguyen, B.Sc Importation and Human-to-Human Transmission of a Novel Coronavirus in Vietnam. *N Engl J Med.* online January 28, 2020.
- [6] CDC. First travel-related case of 2019 novel coronavirus detected in United States. Jan 21, 2020. <https://www.cdc.gov/media/>
- [7] 史河水,韩小雨,樊艳青,等.新型冠状病毒(2019-nCoV)感染的肺炎临床特征及影像学表现[J/OL]. *临床放射学杂志*: 1-8 [2020-02-26]. <https://doi.org/10.13437/j.cnki.jcr.20200206.002>.
- [8] 陈刚,张樱,赵强,等.门诊发热患者秋冬季呼吸道感染病原学分布与快速诊断[J]. *中华医院感染学杂志*, 2015, 25(19): 4381-4383.
- [9] Magnus L, Sigvard O, Johan W, et al. Access to a polymerase chain reaction assay method targeting 13 respiratory viruses can reduce antibiotics: a randomised, controlled trial [J]. *BMC Medicine*, 2011, 9(1): 44-44.
- [10] 李铁钢.王鸣在抗击新型冠状病毒肺炎疫情同时警惕季节性流感的叠加效应[J]. *中华预防医学杂志*, 2020, 54(2): E002-E002. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-9624.2020.04.001
- [11] 国家卫生健康委办公厅.新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第七版). [2020-03-4] <http://www.nhc.gov.cn/yzygj/s7653p/202003/46c9294a7dfe4cef80dc7f5912eb1989/files/ce3e6945832a438eaae415350a8ce964.pdf>

## • COVID-19 专栏 •

## 儿童新型冠状病毒肺炎 1 例临床检验结果启示

王仁峰 孙鹏 郝贵亮 温荣 李俊新 李文杰\*

**[摘要]** **目的** 探讨儿童新型冠状病毒肺炎(COVID-19)临床检验结果趋势,为儿童 COVID-19 诊治提供参考。**方法** 分析本院 1 例儿童 COVID-19 患者临床资料、血常规、多样本病毒核酸检测及呼吸道病原体结果等,探讨患儿临床检验结果变化。**结果** 患儿男,1 岁 5 月,因有 COVID-19 患者接触史,行新型冠状病毒核酸检测呈阳性,肺部 CT 显示双肺纹理清晰,左肺上叶透光度不均匀减低,右肺下叶见条片状密度增高影,边界清,确诊为 COVID-19。患儿发病初期,白细胞及淋巴细胞在相对正常水平,随后淋巴细胞水平有较明显升高,C 反应蛋白无升高,甲型流感病毒、乙型流感病毒、肺炎支原体 IgM 阳性反应,提示呼吸道病原体合并感染。实时荧光定量 PCR(RT-PCR)结果显示,患儿鼻拭子、咽拭子、肛拭子及粪便中均有检出新型冠状病毒,且在肛拭子和粪便中检出病毒核酸持续时间更长,而在其他样本中则为阴性(血液、尿液等)。**结论** 淋巴细胞水平与病毒核酸结果可能存在一定相关性,通过其联合检测对儿童 COVID-19 诊疗效果观察具有重要意义;出院患者应妥善处理粪便等分泌物,其病毒核酸持续阳性时间较长。

**[关键词]** 新型冠状病毒;新型冠状病毒肺炎;淋巴细胞;核酸检测

### An insight into a case of childhood COVID-19: clinical features and laboratory detection

WANG Renfeng, SUN Peng, HAO Guiliang, WEN Rong, LI Junxin, LI Wenjie\*  
(Qingdao Women and Children's Hospital, Qingdao, Shangdong, China, 266000)

**[ABSTRACT]** **Objective** To explore the trend of clinical results from a case of childhood corona virus disease 2019 (COVID-19), and to provide a reference for the diagnosis and treatment of COVID-19 in children. **Methods** The clinical data, blood routine test results, multi-sample viral nucleic acid and respiratory pathogen detection results of a child COVID-19 patient in our hospital were analyzed to discuss the changes of clinical test results in children. **Results** The male patient, 1 year and 5 months old, was tested positive for new coronavirus nucleic acid due to a history of exposure to COVID-19 patients. Lung CT showed that the texture of the two lungs was clear, the permeability of the left upper lobe decreased unevenly, and the strip density of the right lower lobe increased with a clear border, and the diagnosis was COVID-19. The number of white blood cells and lymphocytes were at relatively normal range in the early stage of the disease, and then the lymphocytes were significantly increased. The C-reactive protein results were normal. Influenza A virus, influenza B virus, and Chlamydia pneumoniae IgM were positive, suggesting respiratory pathogen co-infection. The real-time fluorescent quantitative PCR (RT-qPCR) results showed that the new coronavirus (SARS-CoV-2) nucleic acid was positive in nasal swabs, pharyngeal swabs, anal swabs and feces. The detection of viral nucleic acid in anal swabs and feces lasts longer. However, the detection of viral nucleic acid is negative in other samples such as blood and urine. **Conclusion** There may be a certain correlation between the number of lymphocytes and the results of viral nucleic acid detection, and its joint detection is important for the observation of the diagnosis and treatment of COVID-19 in children. Discharged patients should properly dispose of feces and other secretions, since the viral nucleic acids continue to be positive for a long time.

**[KEY WORDS]** Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2; Corona virus disease 2019 (COVID-19); Lymphocyte; Nucleic acid detection

作者单位:青岛市妇女儿童医院检验科,山东,青岛 266000

\*通信作者:李文杰, E-mail: wenjie6656@126.com

2019年12月武汉市陆续发现了多例新型冠状病毒肺炎患者,随后研究显示其为一种新型冠状病毒(Coronavirus, CoV),于2020年1月7日被世界卫生组织(World Health Organization, WHO)临时命名为2019新型冠状病毒(2019-nCoV)<sup>[1]</sup>。该病毒随后被重命名为严重急性呼吸系统综合症冠状病毒2(SARS-CoV-2),其引起的疾病被称为2019冠状病毒病(COVID-19)。SARS-CoV-2主要经飞沫和接触传播,在相对密闭的环境中长时间暴露于高浓度气溶胶的情况下存在经气溶胶传播的可能<sup>[2]</sup>,2020年1月20日我国将新型冠状病毒感染的肺炎纳入法定乙类传染病,并采取甲类传染病的预防、控制措施<sup>[3]</sup>。COVID-19自湖北省武汉市暴发以来,已蔓延至全国大部分省市<sup>[4]</sup>。根据《新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第七版)》,发病早期外周血白细胞总数正常或降低,淋巴细胞计数减少,病情严重时淋巴细胞数进行性减少,多数患者C反应蛋白(CRP)和红细胞沉降率升高,降钙素原正常。因疫情爆发初期感染者以中老年人和合并基础疾病患者为主,未见儿童患者,专家们曾一度认为儿童对病毒不易感<sup>[5]</sup>,但随后不同地区出现多例儿童感染报道。2020年2月2日国家卫生健康委员会发布了“关于做好儿童和孕产妇新型冠状病毒感染的肺炎疫情防控工作的通知”<sup>[6]</sup>,明确指出,儿童和孕产妇是SARS-CoV-2的易感人群。由于儿童感染数量不多,其临床特点及检验数据报道相对较少,因此本文对本院1例新冠肺炎儿童患者检验结果进行梳理总结,以期为一线防疫工作提供素材。

## 1 材料与方 法

### 1.1 临床资料

患儿男,1岁5月,患儿因与COVID-19确诊病例密切接触,于2月4日取咽拭子进行新型冠状病毒核酸检测呈阳性,以“新型冠状病毒感染”收入即墨市人民医院住院治疗。肺部CT(图1)显示双肺纹理清晰,左肺上叶透光度不均匀减低,右肺下叶见条片状密度增高影,边界清,专家会诊后确诊为COVID-19,于2月12日转入本院治疗。患儿自起病以来无发热、寒战、抽搐,无咳嗽、喘息、憋气、气促及呼吸困难,无面色发绀,无恶心、呕吐、腹痛及腹泻,精神可,饮食、睡眠尚可,大、小便正常。本研究遵守国际协调理事会临床试验规范和赫尔辛基宣言,通过了青岛市妇女儿童医院临床研究伦理委员会的批准。



图1 患儿SARS-CoV-2感染后肺部CT图像  
Figure 1 The CT image of lungs in the child with SARS-CoV-2 infection

### 1.2 试剂与仪器

核酸提取试剂盒及新型冠状病毒(2019-CoV)ORF1ab/N基因双重核酸检测试剂盒均来自中山大学达安基因股份公司,核酸检测仪为美国Thermo Fisher公司7500型实时荧光PCR仪。Sysmex XN-1000全血细胞分析仪购自日本希森美康公司,全自动CRP分析仪购自上海奥普生物医药有限公司,呼吸道病原体谱抗体IgM检测试剂盒(间接免疫荧光法)购自欧蒙医学实验诊断股份公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 标本采集

受检者标本由专业医护人员采集,及时转运至实验室检测。核酸标本检测前置于56℃灭活30 min。采集患儿静脉血2 mL于EDTA-K2抗凝管进行血常规及C反应蛋白检测;采集静脉血2 mL,置于含分离胶的黄头真空采血管内,静置待血液凝固,3 500×g离心5 min,取血清进行呼吸道病原体谱检测。

#### 1.3.2 样本检测

所有操作均按照仪器及试剂说明书进行。核酸检测采用实时荧光定量PCR(RT-PCR)技术,针对2019-nCoV基因组中开放读码框1ab(open reading frame 1ab, ORF1ab)和核壳蛋白(nucleocapsid protein, N)进行检测。如果检测样本在FAM和VIC通道Ct值≤40,且有明显的扩增曲线,可判定样本为2019新型冠状病毒阳性;如果样本仅在FAM或VIC单通道Ct值≤40,另一通道无扩增曲线,结果需复检,复检结果一致可判定样本2019新型冠状病毒阳性,复检结果阴性可判定为未检测到2019新型冠状病毒;如果样本FAM和VIC通道无扩增曲线或Ct值>40,且Cy5通道有扩增

曲线,可判定样本未检测到2019新型冠状病毒。

### 1.4 统计学分析

采用SPSS 19.0 进行数据处理。进行描述性分析。

## 2 结果

### 2.1 患儿血常规、C反应蛋白、呼吸道病原体谱结果

患儿入院以来血常规、CRP 检测结果见表1。血常规结果显示,患儿发病初期,白细胞及淋巴细胞在相对正常水平,随后淋巴细胞水平有较明显升高,CRP 结果正常。患儿住院期间分别于2月13日、25日进行呼吸道病原体(包括呼吸道合胞病毒、腺病毒、甲型流感病毒、乙型流感病毒、副流感病毒、肺炎支原体、肺炎衣原体、嗜肺军团菌)检测,两次检测均呈现甲型流感病毒、乙型流感病毒、肺炎支原体 IgM 阳性反应,提示呼吸道病原体合并感染见表1。

表1 患儿 SARS-CoV-2 感染后临床检验结果

Table 1 Clinical results of children with SARS-CoV-2 infection

项目	日期							
	2.4	2.8	2.12	2.16	2.24	2.28	2.13	2.25
WBC(*10 <sup>9</sup> /L)	6.80	6.00	7.26	7.30	13.04	6.32		
N(*10 <sup>9</sup> /L)	1.70	0.85	1.21	1.39	4.88	1.47		
L(*10 <sup>9</sup> /L)	4.40	4.60	5.43	5.21	6.70	4.25		
N%	25.0	14.1	46.7	19.0	37.4	23.3		
L%	64.6	76.6	74.8	71.4	51.4	67.2		
CRP(mg/L)	<0.8	<0.8	<0.8	<0.8	<0.8	<0.8		
IVA							阳性	阳性
IVB							阳性	阳性
MP							阳性	阳性

注:WBC 白细胞;N 中性粒细胞;L 淋巴细胞;N%中性粒细胞百分比;L%淋巴细胞百分比;IVA,甲型流感病毒;IVB,乙型流感病毒;MP 肺炎支原体。

### 2.2 多样本核酸检测结果

患儿入院以来多次新型冠状病毒核酸检测结果见图2。通过实时荧光定量PCR对患儿多样本进行新型冠状病毒核酸检测(图2),结果显示,患儿鼻咽拭子、咽拭子、肛拭子及粪便新型冠状病毒核酸检测均呈阳性,且在肛拭子和粪便中检出病毒核酸持续时间更长,而在其他样本中则为阴性(血液、尿液等)。

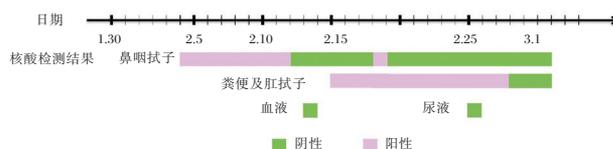


图2 入院后 SARS-CoV-2 核酸检测结果

Figure 2 The results of SARS-CoV-2 nucleic acid detection after admission

## 3 讨论

COVID-19 疫情在中国持续向好,国外还处于爆发大流行上升阶段,及时、正确了解新型冠状病毒相关特征是诊断及治疗的重要环节,也是疫情防控工作中的重要环节。SARS-CoV-2 是继  $\alpha$ -冠状病毒属的 HCoV-229E、HCoV-NL63,  $\beta$ -冠状病毒属的 HCoV-HKU1、MERS-CoV、SARS-CoV 之后的第七个可以感染人类的冠状病毒<sup>[7-8]</sup>。数据研究表明,SARS-CoV-2 的传播能力与 SARS 冠状病毒相似,其繁殖数(reproduction number,  $R_0$ )分别为 1.4~5.5, 2.0~5.0<sup>[9-10]</sup>。由于免疫系统不成熟,儿童是该疾病的易感人群。尽管目前儿童确诊病例数占比相对较小,但随着更多地区开展病原学检测,儿童感染病例数有增加的趋势,应予以高度重视。但现阶段相关研究报道较少,因此准确掌握检验结果动态变化对儿童病例的诊疗具有重要意义。

本文报道的确诊病例无明显发热及明显呼吸道症状,均因与确诊患者密切接触而入院就诊,通过核酸检测确诊。通过多次对患儿多样本核酸检测发现,除在鼻咽拭子中发现 SARS-CoV-2 的存在,在其大便及肛拭子也检测到病毒核酸,且持续时间较长,特别是当鼻咽拭子转阴后,大便核酸阳性仍可持续 1 周以上,在其他体液中(血液、眼泪)未检测到病毒核酸。根据《新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第七版)》<sup>[2]</sup>,新冠肺炎患者出院应连续两次呼吸道标本核酸检测阴性(采样时间至少间隔 24 h),但此时患者大便病毒核酸可能依然呈阳性,存在潜在传染风险。因此患者出院后建议妥善处理其大便等分泌物,同时进行相应隔离措施,以防再次出现感染情况。进一步分析发现患儿发病初期鼻咽拭子核酸检测呈阳性,此时淋巴细胞计数处于相对正常水平;随后鼻咽拭子持续转阴,患儿淋巴细胞水平逐步升高,并维持在较高水平,直至 2 月 18 日鼻咽拭子再次阳性,其之后的血常规结果显示白细胞及淋巴细胞均有明显升高;2 月 28 日粪

便病毒核酸转阴后,淋巴细胞计数又恢复相对正常水平。上述结果分析显示,淋巴细胞水平与病毒核酸结果存在一定相关性,通过其联合检测对儿童 COVID-19 诊疗效果观察具有重要意义。另外,呼吸道病原体谱检测发现,患儿甲型流感病毒、乙型流感病毒、肺炎支原体 IgM 抗体持续阳性,是否 SARS-CoV-2 对已感染呼吸道病原体的患者更加易感,或易与呼吸道病原体合并感染有待进一步的探讨,这为以后的研究及诊疗提供了新的方向。

由于只有 1 例儿童确诊病例的检测结果显示,存在一定局限性,希望能给临床抗疫一线提供一定的参考,期待更多的临床研究报道,为更好的诊疗、控制疫情提供基础。

### 参考文献

- [1] Huang C, Wang Y, Li X, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan China. *Lancet* (2020), 10.1016/s0140-6736(20)30183-5 [Epub ahead of print].
- [2] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 新型冠状病毒感染的肺炎诊疗方案(试行第七版)[S/OL]. (2020-03-04) [2020-03-04]. <http://www.nhc.gov.cn/xcs/zhengcwj/202003/46c9294a7dfe4cef80dc7f5912eb1989.shtml>.
- [3] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 新型冠状病毒感染的肺炎纳入法定传染病管理[EB/OL]. (2020-01-20) [2020-02-05]. <http://www.nhc.gov.cn/jkj/s7916/202001/44a3b8245e8049d2837a4f27529cd386.shtml>.
- [4] 庄英杰,陈竹,李进,等. 26 例新型冠状病毒肺炎确诊病例临床和流行病学特征[J/OL]. *中华医院感染学杂志*: 1-4 [2020-03-12]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3456.r.20200219.1312.006.html>.
- [5] 赵瑞红,沈晓敏,徐凯进,等. 儿童感染 2019 新型冠状病毒 1 例[J/OL]. *浙江医学*: 1-5 [2020-03-12]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/33.1109.R.20200218.1956.002.html>.
- [6] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 关于做好儿童和孕产妇新型冠状病毒感染的肺炎疫情防控工作的通知[EB/OL]. (2020-02-02) [2020-02-02]. <http://www.nhc.gov.cn/fys/s7902/202002/de2d62a5711c41ef9b2c4b6f4d1f2136.shtml>.
- [7] Hui DS. Epidemic and emerging coronaviruses (severe acute respiratory syndrome and Middle East respiratory syndrome) [J]. *Clin Chest Med*, 2017, 38: 71-86.
- [8] Song Z, Xu Y, Bao L, et al. From SARS to MERS, thrusting coronaviruses into the spotlight [J]. *Viruses* 2019, 11: E59.
- [9] Maryam BF. What dentists need to know about COVID-19. *Oral Oncol* 2020; [https://doi: 10.1016/j.oraloncology.2020.104741](https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2020.104741) [Epub ahead of print].
- [10] Chen JL. Pathogenicity and transmissibility of 2019-nCoV—A quick overview and comparison with other emerging viruses. *Microbes Infect* 2020; [https://doi: 10.1016/j.micinf.2020.01.004](https://doi.org/10.1016/j.micinf.2020.01.004) [Epub ahead of print].
- [19] Lim W K, Chai X, Ghosh S, et al. Galpha-13 induces CXC motif chemokine ligand 5 expression in prostate cancer cells by transactivating NF-kappaB [J]. *J Biol Chem*, 2019, 294(48): 18192-18206.
- [20] Xu Y, Rong J, Duan S, et al. High expression of GNA13 is associated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma [J]. *Sci Rep*, 2016, 6(35948).
- [21] Zhang J X, Yun M, Xu Y, et al. GNA13 as a prognostic factor and mediator of gastric cancer progression [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(4): 4414-4427.
- [22] Rasheed SAK, Leong HS, Lakshmanan M, et al. GNA13 expression promotes drug resistance and tumor-initiating phenotypes in squamous cell cancers [J]. *Oncogene*, 2018, 37(10): 1340-1353.
- [23] Muppidi JR, Schmitz R, Green JA, et al. Loss of signalling via Galpha13 in germinal centre B-cell-derived lymphoma [J]. *Nature*, 2014, 516(7530): 254-258.
- [24] Morin R D, Mungall K, Pleasance E, et al. Mutational and structural analysis of diffuse large B-cell lymphoma using whole-genome sequencing [J]. *Blood*, 2013, 122(7): 1256-1265.
- [25] Shimono J, Miyoshi H, Yoshida N, et al. Analysis of GNA13 Protein in Follicular Lymphoma and its Association With Poor Prognosis [J]. *Am J Surg Pathol*, 2018, 42(11): 1466-1471.
- [26] Grzelinski M, Pinkenburg O, Buch T, et al. Critical role of G(alpha)12 and G(alpha)13 for human small cell lung cancer cell proliferation in vitro and tumor growth in vivo [J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(5): 1402-1415.
- [27] Gardner JA, Ha JH, Jayaraman M, et al. The gep proto-oncogene Galpha13 mediates lysophosphatidic acid-mediated migration of pancreatic cancer cells [J]. *Pancreas*, 2013, 42(5): 819-828.
- [28] Muhammad S, Tang Q, Wei L, et al. miRNA-30d serves a critical function in colorectal cancer initiation, progression and invasion via directly targeting the GNA13 gene [J]. *Exp Ther Med*, 2019, 17(1): 260-272.

(上接第 551 页)

· 论 著 ·

## 利用荧光PCR-毛细管电泳法评价微卫星不稳定性检测国家参考品

张文新 黄传峰 孙楠 高飞 于婷 孙晶 曲守方\* 黄杰\*

**[摘要]** 目的 利用荧光PCR-毛细管电泳法评价微卫星不稳定性(MSI)检测国家参考品,验证国家参考品用于相关试剂盒性能评价及临床实验室质量评价的适用性。方法 采用3家不同公司的微卫星不稳定性检测试剂盒(荧光PCR-毛细管电泳法)对国家参考品进行阳性参考品符合率、阴性参考品符合率和检测限项目的检测。结果 对国家参考品中的62例样本进行检测,其中阳性参考品的结果均为微卫星高度不稳定,阴性参考品的结果均为微卫星稳定, LOD1及LOD3的20%、10%检测限参考品均检出微卫星高度不稳定,但其5%检测限参考品有1家公司未检出相应的微卫星高度不稳定状态。LOD4、LOD5、LOD6及LOD7检测限参考品检测结果均为微卫星稳定或微卫星低度不稳定。结论 微卫星不稳定性检测国家参考品,适用于荧光PCR-毛细管电泳法试剂盒的性能评价及临床实验室的质量评价。

**[关键词]** 微卫星不稳定性; 国家参考品; 荧光PCR-毛细管电泳法

### Evaluation of the national reference materials for microsatellite instability using fluorescence PCR-capillary electrophoresis

ZHANG Wenxin, HUANG Chuanfeng, SUN Nan, GAO Fei, YU Ting, QU Shoufang\*, HUANG Jie\*  
(National Institutes for Food and Drug Control, Beijing, China, 100050)

**[ABSTRACT]** Objective To verify the applicability of performance evaluation of relevant kits and quality evaluation of clinical laboratories, the national reference materials for microsatellite instability (MSI) were evaluated by fluorescence PCR capillary electrophoresis. Methods The national reference materials were detected by microsatellite instability detection kit (fluorescence PCR-capillary electrophoresis) from three different companies to determine the coincident rate of positive and negative reference, and the limit of detection. Results In 62 cases of testing samples, the results of positive references were all microsatellite instability-high (MSI-H). The results of negative reference were all microsatellite stability (MSS). The results of LOD1 and LOD3 references with tumor concentration 20% and 10% for the limit of detection were MSI-H, but the corresponding MSI-H status was not detected by only one company for LOD1 and LOD3 references with tumor concentration 5%. LOD4, LOD5, LOD6 and LOD7 references for the limit of detection were all MSS or microsatellite instability-low (MSI-L). Conclusion The national reference materials for microsatellite instability testing are suitable for evaluation of the performance of kits and the quality of clinical laboratories based on the method of fluorescence PCR-capillary electrophoresis.

**[KEY WORDS]** Microsatellite instability; National reference material; Fluorescence PCR-capillary electrophoresis

基金项目:生殖健康及重大出生缺陷防控研究(2016YFC1000300)

作者单位:中国食品药品检定研究院,北京 100050

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

注:张文新和黄传峰共为第一作者

微卫星(microsatellite, MS)是细胞基因组中以少数几个核苷酸(多为1~6个)为单位短串联重复的DNA序列。微卫星不稳定性(microsatellite instability, MSI)是DNA复制时DNA错配修复(mismatch repair, MMR)功能缺陷,使微卫星重复序列的错误未得到纠正而引起微卫星序列长度发生变化的现象<sup>[1]</sup>。微卫星不稳定性可以分为3类:微卫星高度不稳定(microsatellite instability-high, MSI-H)、微卫星低度不稳定(microsatellite instability-low, MSI-L)及微卫星稳定(microsatellite stability, MSS)<sup>[2]</sup>。微卫星不稳定与多种肿瘤的发生、发展密切相关,常见于胃癌、结直肠癌、子宫内膜癌等肿瘤<sup>[3-5]</sup>。研究报道MSI-H型胃癌拥有独特的分子基因表型以及临床病理特征,比MSI-L以及MSS型的预后好<sup>[6]</sup>。因此分析肿瘤组织的微卫星不稳定状态,可以指导肿瘤个体化治疗,具有重要临床意义。

目前临床上主要采用两种方法检测MSI和MMR,多重荧光聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)毛细管电泳法直接检测MSI,或免疫组织化学法(immunohistochemistry, IHC)检测MMR蛋白的表达,主要包括MLH1、PMS2、MSH2、MSH6等MMR蛋白<sup>[7-8]</sup>。随着检测技术发展,高通量测序(next generation sequencing, NGS)技术也应用于肿瘤组织的MSI检测<sup>[9]</sup>。目前国内已有公司申请MSI检测试剂盒(荧光PCR-毛细管电泳法)的注册。亟需建立统一的国家参考品,用于评估MSI检测试剂盒的性能。本研究利用荧光PCR-毛细管电泳法检测微卫星不稳定性检测国家参考品,验证微卫星不稳定性检测国家参考品用于相关试剂盒性能评价及临床实验室质量评价的适用性。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究对象

微卫星不稳定性(MSI)检测国家参考品,批号:360028-201901,中国食品药品检定研究院提供。

### 1.2 试剂

微卫星不稳定性(MSI)检测试剂盒(荧光PCR-毛细管电泳法),上海普洛麦格生物产品有限公司提供。结直肠癌微卫星不稳定状态检测试剂盒(荧光PCR-毛细管电泳法),北京阅微基因技术有限公司提供。微卫星不稳定性(MSI)检测试剂盒

(荧光PCR毛细管电泳法),广州达瑞生物技术股份有限公司提供。对试剂盒厂家进行随机编号,分别为公司A,公司B,公司C。

### 1.3 仪器

3500 Dx基因分析仪和Veriti™ Dx 96-well PCR仪,上海普洛麦格生物产品有限公司提供。3500xL Dx基因分析仪和Veriti™ Dx 96-well PCR仪,北京阅微基因技术有限公司提供。3500 Dx基因分析仪和ABI PCR 2720仪,广州达瑞生物技术股份有限公司提供。

### 1.4 方法

各实验室按照各自的方法以及试剂盒说明书进行操作。

#### 1.4.1 PCR扩增

将PCR反应液、酶混合液、引物混合液、无核酸酶水置于室温解冻至完全溶解。配制除模板以外的反应体系,各组分加入后,涡旋振荡后,分装到0.2 mL PCR管中。依次向已分装扩增体系的各管中加入1 μL或者0.5 μL待检样本、MSI阳性对照、阴性对照(无核酸酶水)。将各反应管放置于PCR仪的反应槽内,运行PCR程序。

#### 1.4.2 基因分析仪检测扩增片段

PCR反应结束之后,制备毛细管电泳检测样品。以基因分析仪进行毛细管电泳检测。使用POP7胶。选择“Fragment”电泳方法,参考基因分析仪的使用说明书。检测数据使用GeneMapper®分析软件进行数据分析。

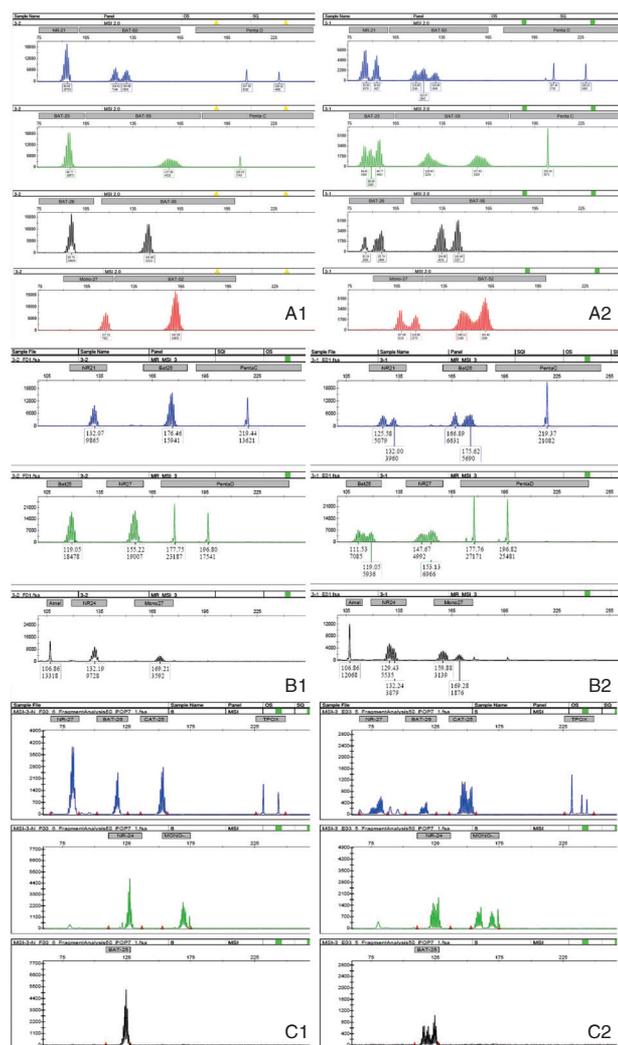
#### 1.4.3 结果判定

统计试剂盒微卫星检测位点,对样本的微卫星不稳定性状态进行判定:≥2个微卫星位点不稳定,判断为MSI-H;1个微卫星位点不稳定,判断为MSI-L;没有微卫星位点不稳定,则判断为MSS。

## 2 结果

### 2.1 阳性参考品结果

对国家参考品中的16对阳性参考品共32例样本进行检测,3家试剂盒的结果显示均为微卫星高度不稳定。以国家阳性参考品MSI-3及其对应的配对参考品MSI-3-对照的检测结果为例,A公司选择的8个位点均为微卫星不定位点,B公司选择的6个位点均为微卫星不定位点,C公司选择的6个位点也均为微卫星不定位点,均检出相应的微卫星不稳定性状态。见图1。



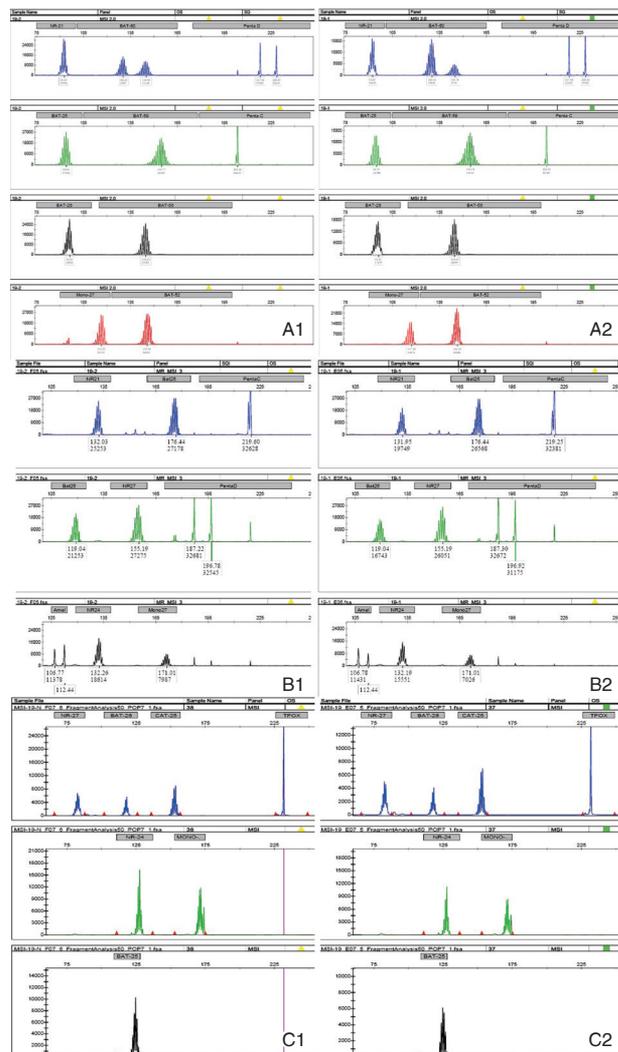
注: A1、A2为A公司检测结果, B1、B2为B公司检测结果; C1、C2为C公司检测结果; 其中A1、B1、C1为国家阳性参考品的配对样本MSI-3-对照的检测结果; A2、B2、C2为国家阳性参考品样本MSI-3的检测结果。

图1 国家阳性参考品MSI-3及其配对参考品MSI-3-对照的检测结果

Figure 1 The results of national positive reference MSI-3 and its matched reference MSI-3-control

## 2.2 阴性参考品结果

对国家参考品中的3对阴性参考品共6例样本进行检测, 3家试剂盒的结果显示均为微卫星稳定(MSS)。以国家阴性参考品MSI-19及其对应的配对参考品MSI-19-对照的检测结果为例, A公司选择的8个位点中都没有微卫星不定位点, B公司选择的6个位点中都没有微卫星不定位点, C公司选择的6个位点中也都没有微卫星不定位点, 均检出相应的微卫星不稳定性状



注: A1、A2为A公司检测结果, B1、B2为B公司检测结果, C1、C2为C公司检测结果; 其中A1、B1、C1为国家阴性参考品的配对样本MSI-19-对照的检测结果; A2、B2、C2为国家阴性参考品样本MSI-19的检测结果。

图2 国家阴性参考品MSI-19及其配对参考品MSI-19-对照的检测结果

Figure 2 The results of national negative reference MSI-19 and its matched reference MSI-19-control

态。见图2。

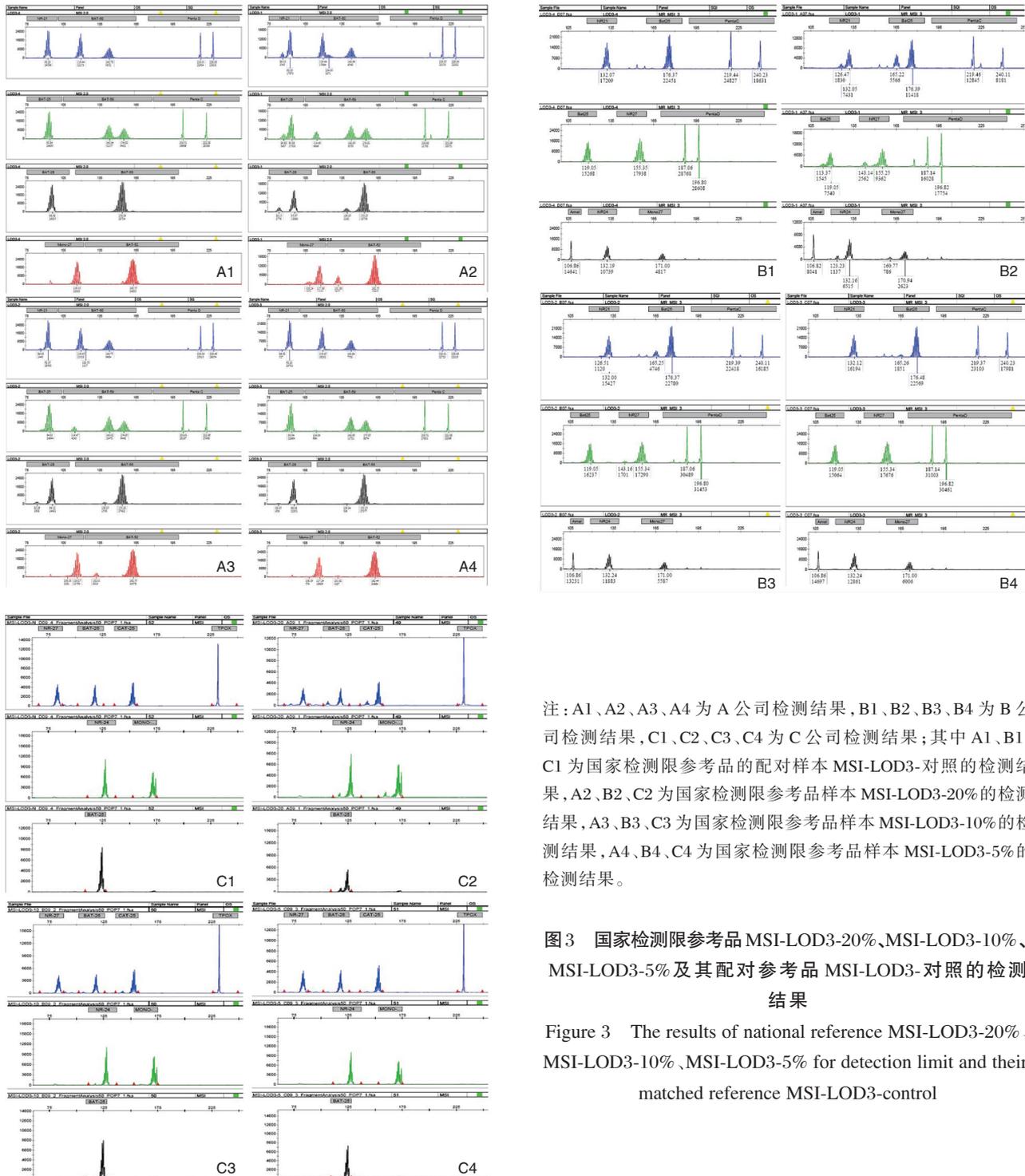
## 2.3 检测限参考品结果

对国家参考品中的6组检测限参考品共24例样本进行检测, 3家试剂盒的结果显示, 对20%和10%肿瘤DNA含量的检测限参考品均能正确检出相应的微卫星不稳定性状态, 而有1家试剂盒对5%肿瘤DNA含量的检测限参考品未能正确检出相应的微卫星不稳定性状态。

以国家检测限参考品MSI-LOD3-20%、MSI-

LOD3-10%、MSI-LOD3-5%及其对应的配对参考品 MSI-LOD3-对照的检测结果为例,A公司 MSI-LOD3-20%及 MSI-LOD3-10%的8个位点都为微卫星不定位点,B公司 MSI-LOD3-20%及 MSI-LOD3-10%的6个位点中分别有6个和3个微卫星不定位点,C公司 MSI-LOD3-20%及 MSI-LOD3-10%的6个位点中分别有6个和5个

微卫星不定位点,都检出相应的微卫星不稳定性状态。同时A公司 MSI-LOD3-5%的8个位点中有7个微卫星不定位点,C公司 MSI-LOD3-5%的6个位点中有3个微卫星不定位点;但B公司 MSI-LOD3-5%的6个位点中仅有1个位点为微卫星不定位点,未检出相应的微卫星不稳定性状态。见图3。



注:A1、A2、A3、A4为A公司检测结果,B1、B2、B3、B4为B公司检测结果,C1、C2、C3、C4为C公司检测结果;其中A1、B1、C1为国家检测限参考品的配对样本 MSI-LOD3-对照的检测结果,A2、B2、C2为国家检测限参考品样本 MSI-LOD3-20%的检测结果,A3、B3、C3为国家检测限参考品样本 MSI-LOD3-10%的检测结果,A4、B4、C4为国家检测限参考品样本 MSI-LOD3-5%的检测结果。

图3 国家检测限参考品 MSI-LOD3-20%、MSI-LOD3-10%、MSI-LOD3-5%及其配对参考品 MSI-LOD3-对照的检测结果

Figure 3 The results of national reference MSI-LOD3-20%、MSI-LOD3-10%、MSI-LOD3-5% for detection limit and their matched reference MSI-LOD3-control

### 3 讨论

MSI是一种遗传性改变,与肿瘤的发生密切相关。MSI检测已被美国国立综合癌症网络(National Comprehensive Cancer Network, NCCN)结直肠癌临床实践指南及中国临床肿瘤学会(Chinese Society of Clinical Oncology, CSCO)结直肠癌诊疗指南推荐用于所有结直肠癌患者<sup>[10-11]</sup>。2016年,欧洲临床肿瘤协会(European Society for Medical Oncology, ESMO)转移性结直肠癌共识提出,MSI检测对转移性结直肠癌患者免疫检查点抑制剂治疗具有重要的预测价值。2017年美国食品药品监督管理局(FDA)批准了默沙东公司的帕博利珠单抗注射液(Keytruda),用于治疗携带MMR功能缺陷(deficient mismatch repair, dMMR)和微卫星高度不稳定性(MSI-H)的晚期(转移性)实体瘤患者。MSI作为晚期(转移性)实体瘤特别是结直肠癌患者免疫治疗疗效的预测生物标志物,其检测具有重要的临床意义。

MSI检测的常用方法是多重荧光PCR毛细管电泳法,它的原理是选择美国国家癌症研究所(National Cancer Institute, NCI)推荐的微卫星(MS)位点<sup>[12-13]</sup>,进行PCR扩增及毛细管电泳,比较肿瘤组织与正常对照组织的结果,确定MSI状态。为了标准化MSI的检测,1998年NCI推荐Bethesda指南,推荐2个单核苷酸重复位点BAT-25和BAT-26和3个双核苷酸重复位点D2S123、D5S346和D17S250。2002年NCI进行修订,推荐5个单核苷酸重复位点BAT-25、BAT-26、NR21、NR24和NR27。Bacher等人提出Promega分析系统,以Mono-27取代NR27,并增加Penta C和Penta D用于识别样本,进一步提高了MSI检测的敏感性。我国CSCO结直肠癌诊疗指南(2018年版)建议采用NCI推荐的BAT-25、BAT-26、D2S123、D5S346和D17S250位点进行MSI检测。

目前国家药品监督管理局尚未批准微卫星不稳定性检测试剂盒(荧光PCR-毛细管电泳法)。至今MSI检测技术仍没有较为统一的标准,肿瘤MSI检测位点不仅仅包括以上推荐位点。为了提高MSI检测的敏感性和特异性,不同厂家的试剂盒开发并选择了不同的检测位点。为了更好评价上市前的微卫星不稳定性检测试剂盒(荧光PCR-毛细管电泳法)性能,建立标准化的统一的国家参

考品是非常有必要的。本院建立的微卫星不稳定性检测国家参考品,来源于FFPE肿瘤组织或者细胞系以及相应的配对样本,包括了微卫星高度不稳定、微卫星低度不稳定及微卫星稳定三种状态,其中微卫星高度不稳定参考品涵盖了不同的微卫星不定位点,能够有效的评价试剂盒的性能。为了评价试剂盒的检测敏感性,还根据目前临床实际应用的检测水平,设置不同肿瘤DNA含量的样本,包括20%、10%、5%三种梯度。

3家不同公司的微卫星不稳定性检测试剂盒(荧光PCR-毛细管电泳法)对国家参考品62例样本的结果显示,阳性参考品的结果均为微卫星高度不稳定,阴性参考品的结果均为微卫星稳定,20%和10%肿瘤DNA含量检测限参考品的结果均符合国家参考品的标示结果,而有1家试剂盒对5%肿瘤DNA含量的检测限参考品未检出相应的MSI状态。国家阳性参考品和阴性参考品的检测结果表明虽然3家公司所选择的微卫星不稳定性位点有所差异,但是对同一份样本的微卫星不稳定性状态的结果判定是一致的,均检出相应的微卫星不稳定性状态,结果准确。从国家检测限参考品的检测结果,发现有的试剂盒对于5%肿瘤DNA含量的检测限参考品不能检测出相应的微卫星不稳定性状态。在临床实际检测中MSI检测限一般规定为20%。如果提高试剂盒检测的敏感性,可能会降低检测的特异性。根据临床实际应用,微卫星不稳定性(MSI)检测国家参考品要求试剂盒对20%和10%肿瘤DNA含量的检测限参考品应检出相应的微卫星不稳定性状态;对5%肿瘤DNA含量的检测限参考品可检出或未检出相应的微卫星不稳定性状态。3家公司的微卫星不稳定性检测试剂盒(荧光PCR-毛细管电泳法)的检测结果显示均符合国家参考品的阳性参考品符合率、阴性参考品符合率和检测限的要求。本实验室建立的国家参考品,可满足微卫星不稳定性检测的要求,适用于荧光PCR-毛细管电泳法试剂盒的性能评价及临床实验室的质量评价。

### 参考文献

- [1] FUJIYOSHI K, YAMAMOTO G, TAKENOYA T, et al. Metastatic pattern of stage IV colorectal cancer with high-frequency microsatellite instability as a prognostic factor[J]. *Anticancer Res*, 2017, 37(1):239-247.

(下转第574页)

## Prader-Willi 综合征及 Angelman 综合征的遗传学分析 方案及广东的临床实践

汪安石<sup>1</sup> 刘畅<sup>1</sup> 王继成<sup>1</sup> 黄演林<sup>1</sup> 张彦<sup>1</sup> 丁红珂<sup>1</sup> 刘玲<sup>1</sup> 杨杰<sup>2</sup> 吴菁<sup>1</sup> 尹爱华<sup>1\*</sup>

**[摘要]** **目的** 建立 Prader-Willi 综合征(PWS)及 Angelman 综合征(AS)的遗传学分析方案,应用于广东地区的临床诊疗实践。**方法** 该方案以甲基化特异性 PCR 作为初筛方法,对 1 038 例样本进行检测,并以 STR 家系连锁分析法对 39 例 PWS 及 15 例 AS 阳性病例进行分子致病机制探究。以 UBE3A 序列分析作为 AS 分子诊断的补充,对 4 例 AS 疑似病例进行检测。通过染色体微阵列分析进一步明确 21 个确诊病例的染色体断裂位点,并对 59 例具有类似临床表现的病例进行鉴别诊断。**结果** 应用该遗传分析方案,在广东地区确诊了 39 例 PWS 患儿及 15 例 AS 患儿。以 STR 连锁分析法进行分子致病机制探究,发现 32 例为缺失型 PWS、7 例母源单亲二倍体型 PWS、14 例为缺失型 AS、1 例父源单亲二倍体型 AS。序列分析未检出 UBE3A 基因突变型 AS。染色体微阵列分析进一步明确了染色体断裂位点,并另外检出 6 例与 PWS/AS 具有表型重叠的染色体微缺失/微重复综合征。**结论** 本研究建立了一种 PWS 及 AS 的遗传学分析方案,将 PWS 及 AS 患者的确诊年龄显著降低,并确定分子缺陷类型,及早开展干预治疗,有助于改善患儿预后。

**[关键词]** Prader-Willi 综合征; Angelman 综合征; 分子诊断

### Genetic analysis program and application of Prader - Willi syndrome and Angelman syndrome

WANG Anshi<sup>1</sup>, LIU Chang<sup>1</sup>, WANG Jicheng<sup>1</sup>, HUANG Yanlin<sup>1</sup>, ZHANG Yan<sup>1</sup>, DING Hongke<sup>1</sup>, LIU Ling<sup>1</sup>, YANG Jie<sup>2</sup>, WU Jing<sup>1</sup>, YIN Aihua<sup>1\*</sup>

(1. Medical Genetic Center, Guangdong Women and Children Hospital, Guangzhou, Guangdong, China, 511400; 2. Neonatal Department, Guangdong Women and Children Hospital, Guangzhou, Guangdong, China, 511400)

**[ABSTRACT]** **Objective** To establish a genetic analysis program for Prader-Willi syndrome (PWS) and Angelman syndrome (AS), and to apply to clinical diagnosis and treatment practice in Guangdong. **Methods** In this program, methylation-specific PCR was used as the initial screening method, and the molecular pathogenic mechanism of PWS and AS positive cases was explored by STR pedigree linkage analysis. UBE3A sequence analysis was used as a supplement to AS molecular diagnosis. The chromosomal microarray analysis was employed to identify chromosomal breakpoints in confirmed cases, and to detect other chromosomal abnormalities in undiagnosed cases. **Results** Using this genetic analysis protocol, 39 children with PWS and 15 children with AS were diagnosed in Guangdong. Using the STR linkage analysis method to investigate the molecular pathogenic mechanism, it was found that 32 cases were deletion-type PWS, 7 cases of maternal haploid diploid type PWS, 14 cases were deletion-type AS, and 1 case of paternal haploid diploid type AS. Sequence analysis did not detect the mutant AS of UBE3A gene. Chromosome microarray analysis

基金项目:广东省医学科学技术研究基金项目(A2019358)

作者单位:1. 广东省妇幼保健院医学遗传中心,广东,广州 511400

2. 广东省妇幼保健院新生儿科,广东,广州 511400

\*通信作者:尹爱华, E-mail: yinaihua0131@163.com

further clarified the location of chromosome breaks, and additionally detected 6 cases of chromosomal microdeletion/microduplication syndrome with phenotype overlap with PWS/AS. Conclusion In this study, a genetic analysis program for PWS and AS was established to significantly reduce the age of diagnosis of PWS and AS patients, and to determine the types of molecular defects, as well as early intervention to help improve the prognosis of children.

[KEY WORDS] Prader-Willi Syndrome; Angelman Syndrome; Genetic Analysis

Prader-Willi 综合征 (Prader-Willi syndrome, PWS, OMIM 176270) 及 Angelman 综合征 (Angelman syndrome, AS, OMIM 105830) 是一对由基因组印记异常所致的疾病。Prader-Willi 综合征为父源染色体 15q11.2-q13 区域印记基因的功能缺陷所致, Angelman 综合征是由母源染色体 15q11.2-13 上编码泛素蛋白连接酶 E3 的 *UBE3A* 基因缺失或表达异常所致。二者共同的分子病理基础包括: 染色体 15q11.2-q13 片段缺失、单亲二倍体 (uniparental disomy, UPD)、印记中心 (imprinting centre, IC) 缺陷及突变等<sup>[1-4]</sup>。PWS 与 AS 在国外不同人群中报道的发病率间于 1/15 000~1/25 000<sup>[1]</sup>, 我国尚缺乏系统的流行病学研究数据<sup>[2]</sup>。

PWS 和 AS 的遗传学分析方案的制定取决于多因素, 包括医保政策、转诊模式、实验室配置、实验技术的检测效力与检测成本等。目前诊断 PWS 和 AS 最敏感的唯一方法是使用分子遗传学技术分析 15q11-q13 区域内的甲基化模式, 通过分析母源性/父源性甲基化印迹来检测缺失、UPD 和印迹缺陷。本研究设计了一套适合广东地区实际情况的 PWS 及 AS 的遗传学分析方案, 并将其应用于广东地区的临床实践。

## 1 材料与方法

### 1.1 一般资料

回顾性分析 2013 年 7 月至 2017 年 12 月经广东省妇幼保健院医学遗传中心确诊的 39 例 Prader-Willi 综合征患儿及 15 例 Angelman 综合征患儿的

临床表现及遗传学特征。39 例 PWS 患儿中男 24 例、女 15 例 (男女比例 1.6:1), 确诊年龄间于 8 天至 6 岁, 新生儿期 ( $\leq 28$  d) 确诊 26 例 (平均年龄 5.75 天、标准偏差 6.72)、婴儿期 (29 d 至 1 岁) 确诊 10 例、幼儿期 (1 岁至 3 岁) 确诊 1 例、学龄 (前) 期至青春期 ( $>3$  岁) 确诊患儿 2 例。39 例 PWS 患儿主要临床表现为婴幼儿期肌张力低下、哭声微弱、反应差、喂养困难、性腺发育不良及皮肤色素减退、婴儿期后精神运动发育迟缓、认知行为异常、食欲旺盛、肥胖症、身材矮小 (各年龄段的临床表现如表 1 所示)。15 例 AS 患儿中男 10 例、女 5 例 (男女比例 2:1), 确诊年龄间于 9 d 至 4 岁, 新生儿期确诊 5 例 (平均年龄 16.1 d、标准偏差 9.08)、婴儿期 4 例、幼儿期 5 例、 $>3$  岁患儿 1 例。15 例 AS 患儿主要表现为新生儿期喂养困难、婴儿期后出现明显发育延迟、运动或平衡障碍、爆发性大笑、肌张力低下、异常特征性 EEG (各年龄段的临床表现如表 2 所示)。收集患儿临床资料, 包括母孕期情况、患儿体貌特征、肌力和肌张力、神经系统发育情况、性腺发育情况、平衡能力、特征性行为、语言发育情况、辅助检查结果等。该研究经广东省妇幼保健院伦理委员会审核通过。病例采集获受检者父母知情同意。

### 1.2 遗传学分析策略

本研究根据国家医保政策、广东省遗传代谢性疾病基本情况、本单位妇幼代谢性疾病实验室配置等, 综合考虑各项实验技术的检测效力与检测成本, 设计了一套适合广东地区实际情况的 PWS 及 AS 的遗传学分析方案 (图 1)。

表 1 Prader-Willi 综合征患儿各阶段临床表现 [n(%)]

Table 1 Clinical manifestations in children at different ages with Prader-Willi syndrome [n(%)]

	n	喂养困难	发育迟缓	智能障碍	语言障碍	运动平衡障碍	头围增长落后	特征性行为	癫痫发作	特征性脑电图
新生儿期 ( $\leq 28$ d)	5	4(80)	1(20)	0	0	0	0	0	0	0
婴儿期 (29 d 至 1 岁)	4	1(25)	2(50)	2(50)	1(25)	4(100)	2(50)	2(50)	1(25)	1(25)
幼儿期 (1 岁至 3 岁)	5	0	5(100)	5(100)	5(100)	4(80)	3(60)	4(80)	2(40)	3(60)
学龄 (前) 期至青春期 ( $>3$ 岁)	1	0	1(100)	1(100)	1(100)	1(100)	0	1(100)	1(100)	1(100)

表2 Angelman综合征患儿各阶段临床表现 [n(%)]

Table 2 Clinical manifestations in children at different ages with Angelman syndrome [n(%)]

	n	肌张力低下	喂养困难	哭声微弱	智能障碍	肥胖	身材矮小	性腺发育不良	特殊面容	皮肤色素减退
新生儿期(≤28天)	26	26(100)	26(100)	26(100)	0	0	0	14(53.8)	6(23.1)	4(15.4)
婴儿期(29天至1岁)	10	9(90)	9(90)	8(80)	9(90)	1(10)	1(10)	3(30)	8(80)	4(40)
幼儿期(1岁至3岁)	1	1(100)	1(100)	0	1(100)	0	0	0	0	0
学龄(前)期至青春期(>3岁)	2	0	0	0	2(100)	2(100)	2(100)	1(50)	2(100)	0

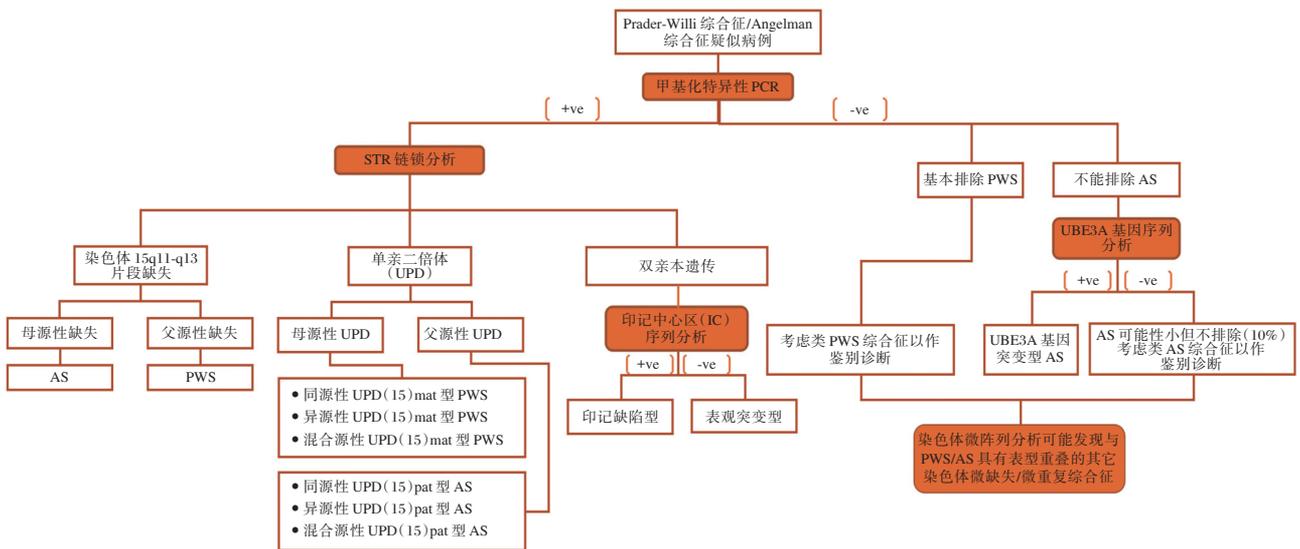


图1 Prader-Willi 综合征及 Angelman 综合征的遗传学分析策略

Figure 1 Genetic analysis strategy of Prader-Willi syndrome and Angelman syndrome

### 1.3 甲基化特异性 PCR

将基因组 DNA 用 CpGenome Turbo Bisulfite Modification Kit (Millipore, CA, USA) 进行亚硫酸盐修饰,以正常人为阴性对照、明确诊断患者为阳性对照、未修饰基因组 DNA 为系统对照,应用 M(母源)、P(父源)两对引物同时对修饰后产物进行 PCR 扩增,扩增产物以琼脂糖凝胶电泳分离。引物序列及 PCR 反应条件参见文献<sup>[5]</sup>。检测结果呈如下几种情况:正常对照同时显示 M(174 bp)、P(100 bp)两条带;PWS 阳性对照均仅显示 M 带;AS 阳性对照均仅显示 P 带;未经修饰的系统对照不显示任何条带。

### 1.4 微卫星 STR 连锁分析

根据 UCSC Genome Bioinformatics 提供的遗传信息及常见的断裂热点,选择了 15q11-13 关键区内的 7 个位点 D15S11、D15S646、D15S817、D15S128、D15S1513、GABRB3、D15S822 及 2 个区外位点 D15S659、FES,用于患儿核心家系的 STR

连锁分析,以明确患儿的分子缺陷类型。引物序列及 PCR 反应条件参见文献<sup>[6]</sup>。

### 1.5 UBE3A 基因序列分析

对于疑似 AS 而甲基化特异性 PCR 检测阴性的病例,进行 UBE3A 编码区及临近内含子区序列分析。引物序列及 PCR 反应条件参见文献<sup>[7]</sup>。

### 1.6 染色体微阵列分析

对于需要进一步明确染色体断裂位点的病例或具有类 PWS/类 AS 临床表现而上述检测未能诊断的病例,通过染色体微阵列技术进一步分析。检测数据与 OMIM、DECIPHER、DGV 及 PubMed 等数据库信息比对。

## 2 结果

### 2.1 甲基化特异性 PCR

39 例患儿的检测结果仅显示 M 带,提示为 PWS;15 例仅显示 P 带,提示为 AS。

## 2.2 微卫星 STR 连锁分析

32例患儿在15q11-13区域内只有母源染色体来源片段,缺乏父源染色体来源片段,而在15q11-13区域外均有父母双方来源的染色体片段,提示分子病理类型为缺失型PWS。7例患儿有双拷贝母源染色体来源片段,缺乏父源染色体来源片段,提示为母源单亲二倍体所致PWS。14例患儿在

15q11-13区域内只有父源染色体来源片段,缺乏母源染色体来源片段,而在15q11-13区域外均有父母双方来源的染色体片段,提示分子病理类型为缺失型AS。1例患儿有双拷贝父源染色体来源片段,缺乏母源染色体来源片段,提示为父源单亲二倍体所致AS(表3)。

表3 Prader-Willi综合征及 Angelman综合征患儿的分子病理类型 [n(%)]

Table 3 The pattern of underlying genetic mechanisms in our cohort [n(%)]

总病例数 (n=54)	缺失型	单亲二倍体型	印记中心缺陷型	UBE3A 基因突变型	机制不明
PWS 病例 (n=39)	32(82.1)	7(17.9)	0(0)	-	0
AS 病例 (n=15)	14(93.3)	1(6.7)	0(0)	0	0

## 2.3 UBE3A 基因序列分析

4例临床高度怀疑AS而甲基化特异性PCR检测为阴性的病例行UBE3A编码区及临近内含子区序列分析,未检出UBE3A基因突变型AS。

## 2.4 染色体微阵列分析

21个PWS/AS病例行染色体微阵列分析,并进一步明确染色体断裂位点与缺失区域。59例具类PWS/类AS临床表现而上述检测未能诊断的病例行染色体微阵列分析,检出4例与PWS/AS具有一定程度表型重叠的染色体微缺失/微重复综合征,分别是1p36微缺失综合征1例、22q13.3微缺失综合征1例、Mowat-Wilson综合征1例以及Miller-Dieker综合征1例。

## 3 讨论

本研究根据广东地区遗传代谢性疾病诊断的具体情况,设计了一套遗传分析策略。以甲基化特异性PCR作为首选筛查方法<sup>[6,8-9]</sup>。用基于多重荧光标记PCR的STR连锁分析法对阳性病例进行分子致病机制探究<sup>[6-8,10]</sup>。对于临床高度怀疑AS而甲基化特异性PCR检测阴性的病例,进行UBE3A编码区及临近内含子区序列分析<sup>[8]</sup>。而对于具有类PWS/类AS临床表现而上述检测未能诊断的病例,进行染色体微阵列分析可能发现具有表型重叠的其它染色体微缺失/微重复综合征<sup>[11]</sup>。本方案在PWS/AS的甲基化研究中选择了甲基化特异性PCR法,而非可通过半定量方式同时检测15q11q13内拷贝数变化及DNA甲基化状态的MS-MLPA法,主要出于检测成本考量。甲基化特异

性PCR检测敏感性高、成本低,较适合本地区临床实践。此外,本研究选择基于多重荧光标记PCR的STR连锁分析法而非SNP-array法进行致病机制研究,主要从检测成本、检测时间、检测效力等角度考虑。基于多重荧光标记PCR的STR连锁分析法是一种经济、快捷的分析方法,检测成本约为30元/核心家系,检测分析时间约为5小时,且检测结果直观、易于判读。SNP-array法检测成本较高,检测时间较长,且仅能检出缺失型及同源性单亲二倍体型,而对于异源性及混合源性单亲二倍体型则需补充双亲SNP-array检测结果一同分析,更增加了检测成本。

将这一PWS/AS遗传学分析方案应用于广东地区的临床诊疗实践,共诊断PWS患儿36例、AS患儿14例。PWS及AS呈现随年龄而异的时序化临床症候群、早期临床表现与多种神经系疾病存在重叠性,因而早期临床诊断存在一定困难。以往的研究中<sup>[6,12-14]</sup>,PWS患者确诊的年龄中位数间于0.8至19.8岁,AS患者确诊的年龄中位数间于0.9至6.2岁,延误了最佳诊疗时机,对患者的预后及生存质量造成不良影响。本研究在广东地区的临床实践中,将PWS及AS患者的确诊年龄中位数降至18d及27d。系统分析PWS及AS的临床和遗传学特征,于早期明确疾病诊断并确定分子缺陷类型<sup>[15-16]</sup>,及早开展干预治疗,有助于改善患儿预后<sup>[17-18]</sup>。

## 参考文献

- [1] Buiting K. Prader-Willi syndrome and Angelman syndrome. Am J Med Genet C Semin Med Genet, 2010,154C(3):365-376.

- [2] 中华医学会儿科学分会内分泌遗传代谢学组,《中华儿科杂志》编辑委员会. 中国 Prader-Willi 综合征诊治专家共识(2015)[J]. 中华儿科杂志, 2015, 53(6):419-424.
- [3] Dagli A, Buiting K, Williams CA. Molecular and clinical aspects of Angelman syndrome [J]. *Mol Syndromol*, 2012, 2(3-5): 100-112.
- [4] 刘依竞, 肖农. Angelman 综合征发病机制、分型及治疗进展[J]. 临床儿科杂志, 2015, 33(7):668-672.
- [5] 刘立军, 白晋丽, 瞿宇晋, 等. Angelman 综合征的遗传学诊断[J]. 中华医学遗传学杂志, 2009, 5:495-498.
- [6] Zhang K, Liu S, Feng B, et al. Clinical Application of an Innovative Multiplex-Fluorescent-Labeled STRs Assay for Prader-Willi Syndrome and Angelman Syndrome [J]. *PLoS One*, 2016, 11(2): e0147824.
- [7] 徐慧慧, 季星, 徐燕, 等. 两例携带 UBE3A 新突变的 Angelman 综合征患者的临床表型及遗传学分析[J]. 中华医学遗传学杂志, 2017, 34(6):826-830.
- [8] Beygo J, Buiting K, Ramsden SC, et al. Update of the EMQN/ACGS best practice guidelines for molecular analysis of Prader-Willi and Angelman syndromes. *Eur J Hum Genet*, 2019, 27(9): 1326-1340.
- [9] Teng YN, Tsai WH, Wu CJ, et al. Referral diagnosis of Prader-Willi syndrome and Angelman syndrome based on methylation-specific polymerase chain reaction. *J Formos Med Assoc*, 2002, 101: 488-494.
- [10] Smith A, Hung D. The dilemma of diagnostic testing for Prader-Willi syndrome. *Transl Pediatr*, 2017, 6(1):46-56.
- [11] Liu W, Zhang R, Wei J, et al. Rapid Diagnosis of Imprinting Disorders Involving Copy Number Variation and Uniparental Disomy Using Genome-Wide SNP Microarrays. *Cytogenet Genome Res*, 2015, 146(1):9-18.
- [12] Faundes V, María LS, Aliaga S, et al. Molecular classes in 209 patients with Prader-Willi or Angelman syndromes: lessons for genetic counseling. *Am J Med Genet A*, 2015, 167A(1):261-263.
- [13] Luk HM, Lo IF. Angelman syndrome in Hong Kong Chinese: A 20 years' experience. *Eur J Med Genet*, 2016, 59(6-7):315-319.
- [14] Lo IF, Luk HM, Tong TM, et al. Prader-Willi syndrome: 16-year experience in Hong Kong. *J Genet Genomics*, 2012; 39(4):191-194.
- [15] Ehrhart F, Janssen KJM, Coort SL, et al. Prader-Willi syndrome and Angelman syndrome: Visualisation of the molecular pathways for two chromosomal disorders. *World J Biol Psychiatry*, 2018;1:1-13.
- [16] Ge MM, Gao YY, Wu BB, et al. Relationship between phenotype and genotype of 102 Chinese newborns with Prader-Willi syndrome. *Mol Biol Rep*, 2019, 3.
- [17] Butler MG, Miller JL, Forster JL. Prader-Willi Syndrome - Clinical Genetics, Diagnosis and Treatment Approaches: An Update. *Curr Pediatr Rev*, 2019, 16.
- [18] Grieco JC, Romero B, Flood E, et al. A Conceptual Model of Angelman Syndrome and Review of Relevant Clinical Outcomes Assessments (COAs). *Patient*, 2019, 12(1):97-112.

(上接第 569 页)

- [2] Gelsomino F, Barbolini M, Spallanzani A, et al. The evolving role of microsatellite instability in colorectal cancer: A review[J]. *Cancer Treat Rev*, 2016, 51: 19-26.
- [3] 麻婧, 钱美睿, 李建辉, 等. 微卫星不稳定型胃癌及微卫星稳定型胃癌的免疫分型及预后分析[J]. 西安交通大学学报(医学版), 2019, 40(6):927-932.
- [4] 柴华, 金翔宇, 金霞云, 等. 微卫星不稳定、HER2 与结直肠癌恶性程度相关[J]. 基础医学与临床, 2019, 39(2):218-221.
- [5] 戴一博, 王婧元, 赵路阳, 等. 子宫内膜癌 DNA 错配修复基因异常的相关研究进展[J]. 中华妇产科杂志, 2019, 54(12):869-872.
- [6] 缪小兵, 吴雅珣, 蔡南南, 等. 214 例胃癌微卫星不稳定状态分析[J]. 临床与实验病理学杂志, 2018, 34(11):1208-1212.
- [7] 杨雄华, 陆玉霞, 王丽萍, 等. MMR 蛋白免疫组化和微卫星不稳定性检测在 Lynch 综合征筛查中的研究[J]. 诊断病理学杂志, 2018, 25(8):571-575.
- [8] 王丽, 毛海燕, 童建东, 等. 错配修复/微卫星不稳定性对晚期结直肠癌化疗敏感性及其预后的影响[J]. 中国医药导报, 2019, 16(8): 108-111+127+129.
- [9] 赵丹, 尚秋明, 韩鑫胤, 等. 单肿瘤组织微卫星不稳定性检测方法[J]. 计算机系统应用, 2019, 28(9):50-57.
- [10] 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.
- [11] Diagnosis And Treatment Guidelines For Colorectal Cancer Working Group CSOCOC. Chinese Society of Clinical Oncology (CSCO) diagnosis and treatment guidelines for colorectal cancer 2018 (English version) [J]. *Chin J Cancer Res*, 2019, 31(1):117-134.
- [12] Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, et al. A national cancer institute workshop on microsatellite instability for cancer detection and familial predisposition: Development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer [J]. *Cancer Research*, 1998, 58(22): 5248-5257.
- [13] Umar A, Boland CR, Terdiman JP, et al. Revised Bethesda guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability [J]. *Journal of the National Cancer Institute*, 2004, 96(4): 261-268.

## NLR、血清CHE、Ang-1与ACI患者病情变化的关系

陶珍<sup>1</sup> 崔连奇<sup>1</sup> 赵磊<sup>1</sup> 程明<sup>2</sup> 唐吉刚<sup>2</sup> 郭洪伟<sup>2\*</sup>

**[摘要]** 目的 探讨急性脑梗死(ACI)患者外周血中性粒细胞/淋巴细胞比值(NLR)、血清胆碱酯酶(CHE)、血管生成素-1(Ang-1)与患者病情程度的关系。方法 选取本院2016年1月至2018年3月收治的ACI患者108例作为ACI组、60例健康体检志愿者作为对照组,检测对比两组的NLR、血清CHE、Ang-1水平,按照美国国立卫生研究院卒中量表(NIHSS)评分、患者脑梗死病灶大小进行分组分析。结果 ACI组患者的NLR高于对照组( $P<0.05$ ),ACI组患者的血清CHE、Ang-1水平低于对照组( $P<0.05$ );大面积梗死病灶的ACI患者的NLR高于中小面积患者( $P<0.05$ ),大面积梗死病灶ACI患者的血清CHE、Ang-1水平低于中小面积患者( $P<0.05$ );重型患者的NLR高于轻型、中型患者( $P<0.05$ ),重型患者的血清CHE、Ang-1水平低于轻型及中型患者( $P<0.05$ );中型患者的NLR高于轻型患者( $P<0.05$ ),中型患者的血清CHE、Ang-1水平低于轻型患者( $P<0.05$ );ACI患者的NLR与NIHSS评分呈显著的正相关关系( $P<0.05$ ),血清CHE、Ang-1水平与NIHSS评分呈显著的负相关关系( $P<0.05$ )。结论 ACI患者NLR、血清CHE、Ang-1水平变化与其梗死病灶大小及神经功能缺损程度具有密切的关系,其对患者病情评估及治疗具有一定的指导价值。

**[关键词]** 急性脑梗死;中性粒细胞/淋巴细胞比值;胆碱酯酶;血管生成素-1

### Association of NLR value, serum levels of CHE and Ang-1 with the onset, severity and prognosis in patients with acute cerebral infarction

TAO Zhen<sup>1</sup>, CUI Lianqi<sup>1</sup>, ZHAO Lei<sup>1</sup>, CHENG Ming<sup>2</sup>, TANG Jigang<sup>2</sup>, GUO Hongwei<sup>2\*</sup>

(1. Department of Neurology, Navy 971 hospital, Qingdao, Shandong, China, 266071; 2. Department of Neurology, 960 Hospital of the joint service support force of the people's Liberation Army, Jinan, Shandong, China, 250031)

**[ABSTRACT]** **Objective** To investigate the relationship between severity of acute cerebral infarction (ACI) and peripheral blood neutrophil to lymphocyte ratio (NLR), serum cholinesterase (CHE), angiopoietin-1 (Ang-1). **Methods** 108 patients with ACI admitted to our hospital (January 2016 to March 2018) were selected as the ACI group and 60 healthy volunteers as the control group. The serum levels of NLR, CHE and Ang-1 were measured and compared between the two groups. The patients were grouped according to National Institutes of Health Stroke Scal (NIHSS) score and the size of cerebral infarction lesions. **Results** The NLR value in the ACI group was higher than that in the control group ( $P<0.05$ ). The serum levels of CHE and Ang-1 in the ACI group were lower than those in the control group ( $P<0.05$ ). The NLR value in ACI patients with large-area infarct lesions was higher than that with small and medium-sized patients ( $P<0.05$ ). The serum levels of CHE and Ang-1 in ACI patients with large-area infarct lesions were lower than those with small- and medium-sized patients ( $P<0.05$ ). The value of NLR in severe patients was higher than that in light and medium-sized patients ( $P<0.05$ ). The serum levels of CHE and Ang-1 in severe patients were lower than those in light

基金项目:全军“十二五”重点项目(BWS11J062)

作者单位:1. 海军第971医院神经内科,山东,青岛266071

2. 中国人民解放军联勤保障部队第960医院神经内科,山东,济南250031

\*通信作者:郭洪伟, E-mail: doctsnge@163.com

and medium-sized patients ( $P<0.05$ ). The value of NLR in medium-sized patients was higher than that in light patients ( $P<0.05$ ), and the serum levels of CHE and Ang-1 in medium-sized patients were lower than those in light patients ( $P<0.05$ ). There was a significant positive correlation between the NLR values and NIHSS scores in ACI patients ( $P<0.05$ ), and a significant negative correlation between the serum levels of CHE and Ang-1 and NIHSS scores ( $P<0.05$ ). **Conclusion** The changes of NLR value, serum CHE and Ang-1 levels in ACI patients are closely related to the size of infarct lesions and the degree of neurological impairment. It has a certain guiding value for the evaluation and treatment of patients' condition.

**[KEY WORDS]** Acute cerebral infarction; Neutrophil to lymphocyte ratio (NLR); Cholinesterase; Angiopoietin-1

流行病学研究表明,急性脑梗死(acute cerebral infarct, ACI)的发病率可超过586/10万人<sup>[1]</sup>。在合并有基础性高血脂症的群体中,ACI的发病率可进一步的上升<sup>[2]</sup>。临床上对于ACI的病情评估具有重要的意义,其能够在指导ACI患者的诊疗及临床预后随访方面发挥作用。外周血中性粒细胞/淋巴细胞比值(neutrophil-to-lymphocyte ratio, NLR)的上升,能够增强炎症反应的激活程度,加剧下游中性粒细胞的激活,最终诱使脑组织的损伤<sup>[3]</sup>;血清胆碱酯酶(cholinesterase, CHE)的表达,能够中和氧化自由基,降低神经元细胞的损伤程度,进而保护脑组织,降低远期并发症的发生率<sup>[4]</sup>;血管生成素-1(Angiopoietin-1, Ang-1)是血管内皮生长因子家族成员,其能够通过诱导新生血管内皮细胞的增生,提高新生血管的形成速度,进而促进神经元细胞的损伤修复过程<sup>[5]</sup>。为了为临床ACI患者的诊疗提供理论方面的血清参考,本次研究选取2016年1月至2018年3月本院收治的ACI患者108例,探讨了NLR、血清CHE、Ang-1的表达及其与ACI患者的病情关系。

## 1 资料与方法

### 1.1 临床资料

选取本院2016年1月至2018年3月收治的ACI患者108例作为ACI组,60例健康体检志愿者作为对照组。ACI组年龄57~80岁,平均 $68.3\pm 8.2$ 岁,男性患者68例、女性患者40例;其中大面积梗死病灶患者38例(直径 $\geq 4$  cm)、中小面积梗死病灶患者70例( $< 4$  cm);依据美国国立卫生研究院卒中量表(National institutes of health stroke scale, NIHSS)<sup>[6]</sup>分组:轻型38例(评分 $< 4$ 分)、中型46例(评分4~15分)、重型24例(评分 $\geq 15$ 分)。对照组年龄53~79岁,平均 $(66.9\pm 7.0)$ 岁,男性患者32例、女性患者28例。两组研究对象的年龄、性别比较,

差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

入选标准:①ACI患者的诊断标准参考中华医学会制定的标准<sup>[7]</sup>;②患者入院后经CT、MRI检查确诊病情;③首发脑血管疾病患者;④患者起病后48 h内入院接受相关检查及治疗;⑤本研究符合《赫尔辛基宣言》对临床人体试验的相关规定并经过本医学伦理委员会批准。排除标准:①颅内肿瘤等占位性病变;②出血性脑卒中;③颅脑外伤病史按照;④精神疾病病史、认知功能障碍患者;⑤伴有其他系统的重大疾病。

### 1.2 检测方法

采用一次性静脉血采集器进行肘部静脉血采集,采集4 mL静脉血后自然放置,其中2 mL取上清液体进行检测。采用免疫发光仪(美国贝克曼库尔特有限公司生产,型号:UniCel DxI 800)及配套试剂(美国贝克曼库尔特有限公司,规格:2 $\times$ 250测试,)进行CHE检测;采用酶标仪(北京华安麦克生物技术有限公司,型号:HFA4500)检测血清Ang-1水平。另外2 mL静脉血后自然放置后,采用全自动血液系统分析仪器(日本希森美康株式会社,型号:sysmex/XN1000)检测患者中性粒细胞及淋巴细胞水平,并计算NLR值。

### 1.3 NIHSS评分标准

NIHSS评分标准<sup>[6]</sup>,总分0~42分,评分越高,患者的神经缺损功能月严重;0~1分(正常);1~4分(轻度);5~15分(中度);15~20分(中重度);21~42分(重度)。

### 1.4 统计学方法

采用SPSS 21.0统计软件数据进行处理,采用 $(\bar{x}\pm s)$ 表示符合正态分布的计量资料,多组样本均数比较进行方差分析,组间比较采用 $t$ 检验;应用 $\chi^2$ 检验分析计数资料;相关性分析采用Pearson线性相关分析法; $P<0.05$ 差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 ACI组和对照组的NLR、血清CHE、Ang-1水平比较

ACI组患者的NLR高于对照组( $P<0.05$ ), ACI组患者的血清CHE、Ang-1水平低于对照组( $P<0.05$ )。见表1。

表1 两组NLR、血清CHE、Ang-1水平比较( $\bar{x}\pm s$ )  
Table 1 Comparison of NLR value, serum CHE and Ang-1 levels in ACI of 2 groups ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	<i>n</i>	NLR	CHE(U/L)	Ang-1(ng/mL)
ACI组	108	2.89±0.63	7103.6±802.8	1.02±0.30
对照组	60	1.86±0.44	8104.8±955.2	1.55±0.34
<i>t</i> 值		11.227	-7.230	-10.456
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000

### 2.2 不同梗死病灶大小的ACI患者NLR、血清CHE、Ang-1水平比较

大面积梗死病灶的ACI患者的NLR高于中小面积患者( $P<0.05$ ), 大面积梗死病灶ACI患者的血清CHE、Ang-1水平低于中小面积患者( $P<0.05$ )。见表2。

表2 不同梗死病灶大小的ACI患者NLR、血清CHE、Ang-1水平比较( $\bar{x}\pm s$ )  
Table 2 Comparison of NLR value, serum CHE and Ang-1 levels in ACI patients with different infarct size ( $\bar{x}\pm s$ )

病灶体积	<i>n</i>	NLR	CHE(U/L)	Ang-1(ng/mL)
大面积	38	3.30±0.61	6560.4±668.2	0.88±0.24
中小面积	70	2.63±0.58	7469.2±783.5	1.11±0.28
<i>t</i> 值		5.630	-6.052	-4.280
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000

### 2.3 不同神经功能缺损程度的ACI患者NLR、血清CHE、Ang-1水平比较

重型患者的NLR高于轻型、中型患者( $P<0.05$ ), 重型患者的血清CHE、Ang-1水平低于轻型及中型患者( $P<0.05$ ); 中型患者的NLR高于轻型患者( $P<0.05$ ), 中型患者的血清CHE、Ang-1水平低于轻型患者( $P<0.05$ )。见表3。

### 2.4 ACI患者NLR、血清CHE、Ang-1水平与NIHSS评分的关系

采用线性简单相关分析, 结果显示ACI患者的NLR与NIHSS评分呈显著的正相关关系( $P<$

表3 不同神经功能缺损程度的ACI患者NLR、血清CHE、Ang-1水平比较( $\bar{x}\pm s$ )

Table 3 Comparison of NLR value, serum CHE and Ang-1 levels in ACI patients with different degrees of neurological deficit ( $\bar{x}\pm s$ )

病情程度	<i>n</i>	NLR	CHE(U/L)	Ang-1(ng/mL)
轻型	38	2.50±0.44	7402.6±775.4	1.26±0.27
中型	46	2.81±0.57	7155.7±793.6	0.95±0.26
重型	24	3.39±0.52	6108.4±552.7	0.77±0.18
<i>F</i> 值		18.856	15.449	21.025
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000

0.05), 血清CHE、Ang-1水平与NIHSS评分呈显著的负相关关系( $P<0.05$ )。见表4。

表4 相关性分析

Table 4 Correlation analysis

指标	NIHSS评分	
	$r^2$ 值	<i>P</i> 值
NLR	0.518	0.000
CHE	-0.663	0.000
Ang-1	-0.570	0.000

## 3 讨论

高血压或者长期的其他基础性疾病, 均能够促进ACI的发生, 在合并有动脉粥样硬化的群体中, ACI的发病率或者致残率均可进一步的上升<sup>[8]</sup>。临床观察发现, ACI患者远期脑功能障碍的风险可超过15%以上, 同时患者病情进展速度较快, 远期临床结局的恶化风险较高<sup>[9]</sup>。现阶段主要通过神经特异性烯醇化酶进而评估ACI患者的病情, 其虽然能够评估神经元细胞的损害程度, 但部分研究认为, 依靠神经特异性烯醇化酶评估ACI患者病情的灵敏度不足45%, 其评估患者病情的吻合程度较低<sup>[10]</sup>。本研究对ACI患者血清中NLR、血清CHE、Ang-1分析研究, 揭示ACI患者病情进展原理, 为临床上ACI的诊疗提供新的参考性血清学指标。

NLR是反应患者体内中性粒细胞及淋巴细胞相对活跃状态的指标, 中性粒细胞的激活或者炎症反应的加剧, 均能够促进NLR的上升, 加剧神经元细胞膜完整性的破坏。基础方面的研究显示, NLR的上升还能够加剧下游肿瘤坏死因子 $\alpha$ 的激活, 最终促进脑组织的损伤和病情加剧; 血清CHE不仅能够参与到消化系统疾病的病情进展过程中,

同时在炎症反应、自身免疫性损伤过程中同样可现在波动。CHE 的下降失去了其对于神经元细胞膜氧化应激的保护作用,导致神经鞘膜脂酶的过度消耗<sup>[11]</sup>;Ang-1 是血管内皮相关因子,其能够通过诱导损伤的毛细血管的修复,最终提高脑组织的血流灌注水平,提高损伤脑组织的血氧水平<sup>[12]</sup>。部分研究者分析了 NLR 的表达与 ACI 的关系,认为在 ACI 患者中,NLR 可明显上升<sup>[13]</sup>,但对于血清 CHE、Ang-1 的表达及其与 ACI 患者病情程度关系的分析不足。

本次研究结果提示了 NLR、血清 CHE、Ang-1 的异常表达均能够影响到 ACI 的病情进展过程中。这主要与 NLR、CHE、Ang-1 的下列几个方面的因素有关<sup>[14-15]</sup>:①NLR 的上升,能够提高下游炎症性信号通路 NF-KB 的激活程度,最终促进脑组织的损害和神经元细胞的凋亡;②血清 CHE 的表达下降主要由于神经元细胞损伤导致的过度 CHE 的消耗有关,而 Ang-1 的下降则失去了其对于损伤部分脑组织的新生血管的修复作用,导致脑组织持续性血流灌注不足,促进了脑组织的缺血性坏死。袁婷婷等<sup>[15]</sup>研究者也发现,在 ACI 患者中,NLR 可平均上升 45%~65%左右,同时在合并有认知功能或者空间定向能力障碍的患者中,NLR 的上升更为显著<sup>[16]</sup>。在梗死面积较大的患者中,NLR 可进一步的上升,而血清 CHE、Ang-1 可进一步的下降,提示了相关指标与梗死面积同样具有一定的关联,这主要由于梗死面积越大,体内的炎症反应的激活越为明显,NLR 越高,而血清 CHE 的下降则主要由于梗死范围增加,促进了神经胆碱酯酶的灭活和消耗。在神经功能缺损较为严重的患者中,NLR 可进一步的上升,而血清 CHE、Ang-1 可进一步的下降,提示了相关指标与神经功能缺损同样密切相关,这主要由于 NLR、血清 CHE、Ang-1 的改变,能够影响到神经元突触传递的完整性,导致神经鞘膜跳跃式传递的异常,最终导致神经功能缺损的加重。相关关系分析也发现,NLR、血清 CHE、Ang-1 与 NIHSS 评分均具有密切的相关关系,临床上可以通过检测 NLR、血清 CHE、Ang-1,进而评估 ACI 患者的病情<sup>[17-19]</sup>。

综上所述,在 ACI 患者中,NLR 明显上升,而血清 CHE、Ang-1 明显下降,NLR、血清 CHE、Ang-1 的表达与梗死范围、神经功能缺损程度密切相关。本次研究的局限性在于未能探讨 NLR、血清 CHE、Ang-1 的诊断学价值。

## 参考文献

- [1] Staff TPO. Correction: Incidence and Predictors of Angiographic Vasospasm, Symptomatic Vasospasm and Cerebral Infarction in Chinese Patients with Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage[J]. Plos One, 2017, 12(2):81-83.
- [2] Mijiti M, Mijiti P, Axier A, et al. Incidence and Predictors of Angiographic Vasospasm, Symptomatic Vasospasm and Cerebral Infarction in Chinese Patients with Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage[J]. Plos One, 2016, 11(12):657-658.
- [3] 赵佳,李克娇,李美荣.低频电脉冲刺激结合针刺治疗对急性脑梗死后痉挛型构音障碍的临床观察[J].热带医学杂志, 2015, 1(10):1366-1369.
- [4] 朱志刚,汪顺利.血清胆碱酯酶活性对脑梗死后血管性痴呆的早期预测作用[J].中国实验诊断学, 2018, 22(7):1119-1122.
- [5] 刘凯,姜云霞,邓文帅,等.血管生成素-1 基因修饰的骨髓间充质干细胞移植对脑梗死大鼠行为学的影响[J].山东医药, 2015, 55(40):4-7.
- [6] 巫嘉陵.四个脑卒中量表的信度与效度研究[D].天津医科大学, 2007:1-63.
- [7] 蒲传强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刘鸣.中国急性缺血性脑卒中诊治指南 2014[J].中华神经科杂志, 2015, 42(4):246-257.
- [8] Bae HW, Kim HD, Choi SW, et al. Acute Cerebral Infarction as a Rare Thrombotic Event in Myelodysplastic Syndrome: A Case Report[J]. Ann Rehabil Med, 2016, 40(6):1144-1145.
- [9] Li W, Jin C, Vaidya A, et al. Blood Pressure Trajectories and the Risk of Intracerebral Hemorrhage and Cerebral Infarction[J]. Hypertension, 2017, 70(3):508-514.
- [10] 景增秀.缺血性脑卒中患者血清中 S100B、半乳糖凝集素-3 和神经元特异性烯醇化酶的表达及意义[J].中国老年学杂志, 2016, 36(3):623-625.
- [11] 李春瑶,司味鑫,赵越,等.血清胆碱酯酶水平与急性脑梗死病情严重程度及预后的相关性[J].中国医科大学学报, 2016, 45(5):417-421.
- [12] 闫薪如,冯娟.血清血管生成素 1 水平与急性脑梗死发病、病情严重程度及 90 d 预后的关系[J].临床神经病学杂志, 2016, 29(2):113-116.
- [13] 姜红,黄文凤,陈玉珍,等.早期中性粒细胞与淋巴细胞比值对急性脑梗死面积的预测价值[J].中华老年心脑血管病杂志, 2015, 17(08):847-850.
- [14] 李春,赵高峰,何谦益,等.中性粒细胞-淋巴细胞比值与急性脑梗死的相关性分析[J].中国实用神经疾病杂志, 2018, 21(1):21-25.
- [15] 刘艳丽.血浆 Hcy、D-D、CD62E+微颗粒水平与 ACI 患者病情的关系[J].实验与检验医学, 2018, 36(6):911-913.
- [16] 袁婷婷,王萌,赵昕,等.中性粒细胞/淋巴细胞比值和 hs-CRP 与急性脑梗死的相关性[J].中国神经免疫学和神经病学杂志, 2016, 23(3):207-209.

(下转第 586 页)

## LA16c-313D11.11 与 miR-205-5p 在子宫内膜癌中的表达及意义

韩雪松<sup>1</sup> 丁雪<sup>2</sup> 赵鹏<sup>3</sup> 于辉<sup>4</sup> 辛卫娟<sup>2\*</sup>

**[摘要]** 目的 检测 LA16c-313D11.11 及 miR-205-5p 在正常子宫内膜、子宫内膜非典型增生(EAH)和子宫内膜癌(EC)组织中的表达情况及意义。方法 采用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 技术分析 LA16c-313D11.11 及 miR-205-5p 在 60 例子宫内膜癌组织, 20 例子宫内膜非典型增生组织和 20 例正常子宫内膜组织中的表达。结果 LA16c-313D11.11 在子宫内膜癌中表达明显降低, 而 miR-205-5p 在子宫内膜癌中表达明显升高。LA16c-313D11.11 和 miR-205-5p 的表达与子宫内膜癌 FIGO 分期及淋巴结转移明显相关 ( $P < 0.05$ )。LA16c-313D11.11 与 miR-205-5p 在子宫内膜癌中呈负性相关 ( $P < 0.05$ )。结论 子宫内膜癌中 LA16c-313D11.11 可能通过内源竞争抑制 miR-205-5p 的表达来发挥作用, 也许是诊断和治疗子宫内膜癌及判定其预后的一个新的标志物。

**[关键词]** 子宫内膜癌; LA16c-313D11.11; miR-205-5p

### Expression and Significance of LncRNA-LA16c-313D11.11 and miR-205-5p in Endometrial Carcinoma

HAN Xuesong<sup>1</sup>, DING Xue<sup>2</sup>, ZHAO Peng<sup>3</sup>, YU Hui<sup>4</sup>, XIN Weijuan<sup>2\*</sup>

(1. Obstetrics, the first affiliated hospital of Kunming medical university, Kunming, Yunnan, China, 650032; 2. Department of obstetrics and gynecology, Fudan university, Shanghai, China, 200090; 3. Department of cardiology, Dezhou people's hospital, Dezhou, Shandong, China, 253001; 4. School of medicine and nursing, Dezhou university, Dezhou, Shandong, China, 253001)

**[ABSTRACT]** Objective To analyze the expression and significance of LA16c-313D11.11 and miR-205-5p in normal endometrium, endometrial atypical hyperplasia (EAH) and endometrial carcinoma (EC) tissues, and to explore its clinical application. Methods Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was performed to analyze expressions of LA16c-313D11.11 and miR-205-5p in 60 EC tissues, 20 atypical EAH tissues and 20 normal endometrium tissues. Results The expression of LA16c-313D11.11 was significantly reduced in endometrial cancer, while the expression of miR-205-5p was significantly increased in endometrial cancer. The expressions of LA16c-313D11.11 and miR-205-5p were significantly correlated with FIGO stage of endometrial cancer and lymph node metastasis ( $P < 0.05$ ). LA16c-313D11.11 and miR-205-5p were negatively correlated in endometrial cancer ( $P < 0.05$ ). Conclusion In endometrial cancer, LA16c-313D11.11 may play a role by inhibiting the expression of miR-205-5p through endogenous competition. LA16c-313D11.11 could be a new marker for the diagnosis and treatment of endometrial cancer and its prognosis.

**[KEY WORD]** Endometrial cancer; LA16c-313D11.11; MiR-205-5p

基金项目:上海市自然科学基金(16ZR1404100)

作者单位:1. 昆明医科大学第一附属医院妇产科, 云南, 昆明 650032

2. 复旦大学附属妇产科医院妇科, 上海 200090

3. 德州市人民医院心内科, 山东, 德州 253001

4. 德州学院医药及护理学院, 山东, 德州 253001

\*通信作者:辛卫娟, E-mail: xinwj80@126.com

子宫内膜癌是发生于子宫内膜的一组上皮性恶性肿瘤,是女性生殖系统常见的肿瘤,随着女性生活饮食行为习惯的改变,每年的新发病例呈迅猛上升趋势,在我国已成为仅次于宫颈癌的导致死亡的常见妇科恶性肿瘤<sup>[1]</sup>。子宫内膜癌的发病原因迄今尚不明确,许多研究证明其涉及除雌孕激素外的许多其他分子通路及机制<sup>[2]</sup>。近年来大量国内外研究指出子宫内膜癌的发生和发展与非编码RNA密切相关<sup>[3-5]</sup>。研究表明 MicroRNA (miRNA) 是 mRNA 编码蛋白质的调节因子,对基因表达、细胞分化、凋亡乃至个体发育产生重要影响,其中 miR-205-5p 在子宫内膜癌的发生发展中发挥了重要的调控作用,有文献报道 LncRNA (Long non-coding RNAs, LncRNAs) 对 miRNA 有内源竞争抑制作用<sup>[6]</sup>。本实验前期研究在含有 miR-205-5p 结合位点的 LncRNA 中筛选出在子宫内膜癌组织中表达下调的 LncRNA-LA16C-313D11.11,并证实其与 miR-205-5P 具有竞争抑制作用<sup>[7]</sup>。但其在子宫内膜癌中的具体作用尚未可知,本研究旨在明确 LA16c-313D11.11 和 miR-205-5p 在子宫内膜癌中的表达及意义。

## 1 资料与方法

### 1.1 临床资料

选取 2013 年 1 月至 2016 年 2 月在复旦大学附属妇产科医院进行手术的子宫内膜癌手术标本 60 例。患者年龄 26~76 岁,中位年龄 55 岁。收集同期子宫内膜非典型增生组织 20 例(患者年龄 37~53 岁,中位年龄 47 岁)和正常子宫内膜组织 20 例(患者年龄 49~61 岁,中位年龄 49 岁)作为对照组,正常子宫内膜组织来源于因子宫良性疾病(如子宫脱垂或子宫肌瘤等)行子宫切除术后证实子宫内膜组织正常者。3 组年龄有可比性。纳入标准:患者术前均未行化疗、放疗或激素治疗且均签署

知情同意书。排除标准:患者术前曾接受激素或放化疗治疗且未签署知情同意书者。

### 1.2 方法

实时荧光定量 qRT-PCR 检测 LA16c-313D11.11 和 miR-205-5p 表达情况按照 Trizol (Invitrogen, USA) 试剂盒说明书进行细胞总 RNA 提取,紫外分光光度计测定 RNA 浓度和纯度。反转录使用 Prime Script<sup>TM</sup> RT 试剂盒 (Takara, Japan),按说明书操作。采用 Primer5.0 软件设计引物。LA16c-313D11.11 引物:上游 5'-TGAAGGAGGTTATTGACGCA;下游:5'-GAGGGGAAA-CAGTCCAGAGT。miR-205-5p 引物:上游:5'-TCCACCGGAGTCTGTCTCAT;下游:5'-GCTGT-CAACGATACGCTACG。GAPDH 引物:上游:5'-AGAAGGCTGGGGCTCATTTG - 3;下游:5'-AGGGGCCATCCACAGTCTTC -3'。采用 SYBR Premix ExTaq<sup>TM</sup> 试剂盒 (Takara, Japan) 和 Rotor-Gene3000 系统进行实时荧光定量 PCR 反应及测定。每个反应设 3 个复孔。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS 19.0 软件进行数据处理,计数资料用  $n(\%)$  表示,行  $\chi^2$  检验,计量资料用  $(\bar{x} \pm s)$  表示,两组间用独立样本  $t$  检验,多组间采用单因素方差分析方差差不齐者采用非参数检验,相关性分析用等级资料 Spearman 秩相关,以  $r=0$  作为判断相关性的标准。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 3 组病理检查结果

2.1 LA16c-313D11.11 和 miR-205-5p 在不同子宫内膜组织中的表达情况。见图 1。

LA16c-313D11.11 在正常组织、EAH 组织及子宫内膜癌组织中的表达结果为 EC 组最低,其次为 EAH 组,最高是正常组,3 组间比较差异有统计学

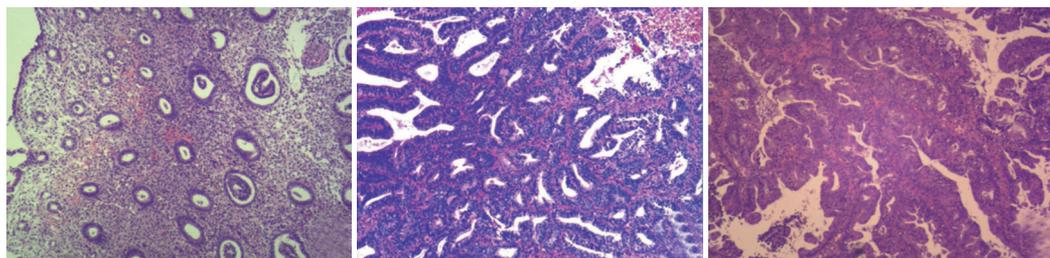


图 1 不同子宫内膜组织的 HE 染色( $\times 40$ )

Figure 1 HE staining in different endometrial tissues ( $\times 40$ )

意义( $P<0.05$ )。miR-205-5p的表达在正常组织、EAH组织及子宫内膜癌组织中表达结果为EC组最高,其次是EAH组,最低是正常组,3组间比较差异有统计学意义( $P<0.05$ )。见图2。

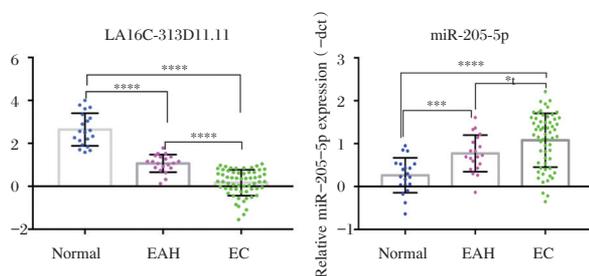


图2 LA16c-313D11.11/miR-205-5p在不同子宫内膜组织中的表达情况

Figure 2 Expression levels of LA16c-313D11.11/miR-205-5p in different endometrial tissues

## 2.2 LA16c-313D11.11和miR-205-5p的表达与子宫内膜癌临床病理参数的关系

以中位值作为截断,将表达量大于等于中位值的LA16c-313D11.11定义为高表达组,表达量小于中位值定义为低表达组。发现LA16c-313D11.11低表达与FIGO晚期及淋巴结转移有显著相关( $P<0.05$ )。结果表明,低表达LA16c-313D11.11与更具侵袭性的子宫内膜癌表型相关,miR-205-5p的表达也与FIGO分期及淋巴结转移相关( $P<0.05$ )。见表1。

## 2.3 LA16c-313D11.11与miR-205-5p表达的相关性

在正常子宫内膜组织和EAH中LA16c-313D11.11和miR-205-5p的表达,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。在EC组中Spearman相关分析呈现负性相关( $P<0.05, r_s = -0.305$ )。见表2。

表1 LA16c-313D11.11/miR-205-5p表达与肿瘤临床病理指标的关系 [n(%)]

Table 1 Association of LA16c-313D11.11 and miR205-5p expression with the clinicopathological characteristics of patients with EC [n(%)]

临床病理特征	n	LA16c-313D11.11		$\chi^2$ 值	P值	miR-205-5p		$\chi^2$ 值	P值
		低表达	高表达			低表达	高表达		
年龄(岁)				0.220	0.639			1.909	0.167
<50	16	8(13.3)	8(13.3)			9(15.0)	7(11.7)		
≥55	44	19(31.7)	25(41.7)			16(26.6)	28(46.7)		
组织学类型				1.414	0.493			5.377	0.071
内膜样腺癌	45	21(35)	24(40)			21(35)	24(40)		
浆液性腺癌	10	5(8.3)	5(8.3)			1(1.7)	9(15)		
透明细胞癌	5	1(1.7)	4(6.7)			3(5)	2(3.3)		
月经状况				0.303	0.582			0.137	0.711
绝经前	20	10(16.7)	10(16.7)			9(15)	11(18.4)		
绝经后	40	17(28.3)	23(38.3)			16(26.6)	24(40)		
FIGO分期				3.937	0.047			4.716	0.030
I~II期	47	18(30)	29(48.3)			23(38.3)	24(40)		
III~IV期	13	9(15)	4(6.7)			2(3.3)	11(18.4)		
组织学分级				0.077	0.962			2.039	0.352
G1	30	14(23.3)	16(26.6)			16(26.7)	14(23.3)		
G2	8	4(6.7)	4(6.7)			2(3.3)	6(10)		
G3	7	3(5)	4(6.7)			3(5)	4(6.7)		
肌层浸润				0.003	0.955			2.041	0.153
≤1/2	42	19(31.7)	23(38.3)			20(33.3)	22(36.7)		
>1/2	18	8(13.3)	10(16.7)			5(8.3)	13(21.7)		
淋巴转移					0.047				0.030
转移	13	9(15)	23(38.3)			2(3.3)	11(18.4)		
未转移	47	18(30)	10(16.7)			23(38.3)	24(40)		

## 3 讨论

miRNA是内源性的大小在20~25 nt的一类非编码RNA,在细胞核内转录成70~100 nt的双链发

夹状前体RNA并经过Dicer酶和Drosha酶的分步切割,进入RISC复合体中,通过与靶mRNA的3'端非编码区(3'-UTR)不完全配对结合,在转录后水平抑制靶mRNA表达或介导靶mRNA降解。

表2 LA16c-313D11.11与miR-205-5p在不同子宫内膜组织中表达的相关性

Table 2 correlation between LA16c-313D11.11 and miR-205-5p expression in different endometrial tissues

组别	r值	P值
Normal(n=20)	-0.090	0.704
EAH(n=20)	-0.374	0.104
EC(n=60)	-0.305 <sup>a</sup>	0.037 <sup>a</sup>

注:<sup>a</sup>P<0.05。

miRNA最早于1993年在线虫身上发现<sup>[8]</sup>,后续研究阐明其参与生命过程中一系列的重要进程,包括发育、造血、器官形成、凋亡、细胞增殖,甚至肿瘤发生<sup>[9-11]</sup>。Daikoku等<sup>[10]</sup>在小鼠子宫内存在所有的多细胞生物中,同时具有一定的保守性,提示其在多种生物反应过程中膜癌标本中发现miR-199a、miR-101a下调。Todd等<sup>[12]</sup>在对正常子宫内膜、不典型增生内膜及子宫内膜癌的研究中,发现了13个差异表达显著的miRNA,其中下调的miRNA 5个(1et-7i, miR-221, miR-193, miR-152, miR-30c),上调的miRNA 8个(miR-185, miR-106a, miR-181a, miR-210, miR-423, miR-103, miR-107, let-7c)。Lofte YJ等<sup>[13]</sup>研究发现在子宫内膜癌细胞株AN3CA和KLE中miR-19b、miR-20a、miR-21、miR-26a高表达。Lee H等<sup>[14]</sup>在对正常子宫内膜、异常增生子宫内膜及子宫内膜癌组织的研究中发现miR-182、miR-183、miR-200a、miR-200c和miR-205在子宫内膜癌中高表达。Karaayvaz M等<sup>[15]</sup>对正常子宫内膜组织和子宫内膜癌组织中的miR-200c和miR-205-5p的表达水平进行检测,结果发现miR-205-5p不仅可以作为子宫内膜癌诊断的一个有效标志物,而且能预测子宫内膜癌患者的临床预后。

LncRNA是一类长度介于200 nt~100 kb之间的非编码RNA,位于细胞核和细胞质中,在真核细胞中普遍被转录。越来越多的证据表明,LncRNA与癌症的发生存在密切的关系<sup>[16]</sup>。LncRNA差异表达于正常组织与其相应不典型增生的组织及肿瘤中,而且特异性LncRNA可作为肿瘤的预测因子<sup>[17]</sup>。Gibb等<sup>[18]</sup>从人类正常组织到人类癌组织描写LncRNA转录谱,在癌症中存在异常的LncRNA表达谱。应激介导长链非编码转录体5(long stress-induced non-coding transcript-5, LSINCT5)是一个在细胞核集中分布,大小为2.6 kb的多聚腺苷酸,相对于正常的组织,LSINCT5在乳腺癌和卵巢癌细胞系

及肿瘤组织中存在过量表达,敲除LSINCT5能明显抑制癌细胞增殖并伴随多种基因的表达下调,推测LSINCT5可能是通过调节下游的靶基因,促进癌细胞增殖,发挥致癌作用<sup>[19]</sup>。Gloss等<sup>[20]</sup>研究发现了一个潜在的卵巢癌的表现遗传标志物LOC134466,研究显示该LncRNA在II型浆液性卵巢癌CpG岛存在高达81%甲基化(81/100),而其它不同类型卵巢癌仅为7.7%(1/13),因此认为该标志物对II型浆液性卵巢癌诊断具有潜在价值。LncRNA-MALAT1通过调节基因表达影响宫颈癌细胞生长和细胞转移<sup>[21]</sup>。Akrami等<sup>[22]</sup>研究发现在浆液性卵巢腺癌中位于1号染色体上的LncRNA-OVAL转录激活,同样的现象发生在包括子宫内膜癌在内的其他16种癌症中。这说明体细胞LncRNA可以特别针对人类基因组扩增,发挥作用参与肿瘤的发生或发展。

综上所述,本研究阐明了LA16c-313D11.11对子宫内膜癌增殖侵袭的影响,以及在子宫内膜癌中LA16c-313D11.11可能通过内源竞争抑制miR-205-5p发挥作用,这将为子宫内膜癌的治疗提供更有效的思路。后续研究我们将进一步明确其作用机制,从而对子宫内膜癌的诊断和治疗提供新的依据。

## 参考文献

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. [J]. CA Cancer J Clin, 2019, 69(1): 7-34.
- [2] 舒新红, 范红莉, 李小燕. 子宫内膜癌患者肿瘤组织和血清中SOX1和VIM启动子的甲基化检测及其临床意义[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2018, 10(5): 301-306.
- [3] Yang X, Wang CC, Lee WYW, et al. Long non-coding RNA HAND2-AS1 inhibits invasion and metastasis in endometrioid endometrial carcinoma through inactivating neuromedin U. [J]. Cancer Lett, 2018, 413: 23-34.
- [4] Li Z, Wei D, Yang C, et al. Overexpression of long noncoding RNA, NEAT1 promotes cell proliferation, invasion and migration in endometrial endometrioid adenocarcinoma [J]. Biomed Pharmacother, 2016, 84: 244-251.
- [5] Peng L, Yuan XQ, Liu ZY, et al. High lncRNA H19 expression as prognostic indicator: data mining in female cancers and polling analysis in non-female cancers [J]. Oncotarget, 1655-1667.
- [6] Zhou M, Wang X, Shi H, et al. Characterization of long non-coding RNA-associated ceRNA network to reveal potential prognostic lncRNA biomarkers in human ovarian cancer [J]. Oncotarget, 2016, 7(11): 12598.

(下转第591页)

## 结核感染致胸壁肿物的病原检测方法的比较研究

曾定科<sup>1</sup> 赵健<sup>2\*</sup>

**【摘要】**目的 探讨 GeneXpert Mtb/RIF 在结核感染致胸壁肿物诊断中的价值。方法 回顾 2017 至 2018 年广州市胸科医院因“胸壁肿物”，临床考虑结核感染引起，行胸壁病灶清除手术，同时在手术中留取病灶或脓液行 GeneXpert Mtb/RIF、r-干扰素释放试验(IGRAs)、结核菌培养、结核菌涂片检验及病理检查的患者，总共 69 例。计算 4 种检测方法的灵敏度、特异度，阳性预测值、阴性预测值，一致率，分析比较四种方法对于“胸壁结核”诊断的意义。结果 69 例患者中有 9 例经病理确定为非结核感染，60 例病理示结核，确诊为结核感染。以病理诊断结核为金标准，GeneXpert Mtb/RIF、IGRAs、结核菌培养、结核菌涂片的灵敏度分别为 90.0%、88.3%、31.7%、18.3%，特异度分别为 100%、88.9%、66.7%、88.9%，GeneXpert Mtb/RIF 的灵敏度明显高于结核菌涂片及结核菌培养，差异有统计学意义( $P<0.05$ )，与 IGRAs 的灵敏度对比，两者相近，差异无统计学意义( $P>0.05$ )。结论 胸壁肿物最常见病因为结核感染，在结核感染所致的胸壁肿物患者中，可选用耗时短的 GeneXpert Mtb/RIF 方法检测，可及时作可靠诊断，对指导治疗有很大参考意义。

**【关键词】** 胸壁肿物；GeneXpert Mtb/RIF；灵敏度；诊疗

### Value of genexpert mtb/rif in clinical diagnosis and treatment of patients with chest wall tuberculosis

ZENG Dingke<sup>1</sup>, ZHAO Jian<sup>2\*</sup>

(1. Chest Surgery of Affiliated Oncology Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong, China, 510095; 2. Chest Surgery of Guangzhou chest hospital, Guangzhou, Guangdong, China, 510095)

**【ABSTRACT】** Objective To explore the value of GeneXpert Mtb/RIF in the diagnosis of “chest wall tuberculosis” in clinical practice. Methods Patients with “chest wall tumor” were retrospectively observed at Guangzhou Chest Hospital from 2017 to 2018. Clinical considerations are due to tuberculosis infection. Chest wall lesion was removed by surgery. During the operation, 69 patients were enrolled in the study. Lesions and pus were collected for GeneXpert Mtb / RIF, r - interferon release test (IGRAs), tuberculosis culture, tuberculosis smear test and pathological examination. The sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value, and agreement rate of the four detection methods were calculated. The significance of four methods for the diagnosis of “chest wall tuberculosis” was evaluated. Results Nine of the 69 patients were confirmed to be non-tuberculosis infection by pathology, and 60 cases were diagnosed as tuberculosis by pathology. Taking the pathological diagnosis of tuberculosis as the gold standard, the sensitivity of GeneXpert Mtb / RIF, IGRAs, tuberculosis culture, and tuberculosis smear were 90.0%, 88.3%, 31.7%, and 18.3%, and the specificity was 100%, 88.9%, 66.7% and 88.9%, respectively. The sensitivity of GeneXpert Mtb / RIF was significantly higher than that of tuberculosis smear and tuberculosis culture, the difference was statistically significant ( $P<0.05$ ). Interestingly, GeneXpert Mtb / RIF has a similar sensitivity with IGRAs ( $P>0.05$ ). However, due to the short detection time of GeneXpertMtb / RIF method, the result comes out within 2

作者单位：1. 广州医科大学附属肿瘤医院胸外科，广东，广州 510095

2. 广州市胸科医院胸外科，广东，广州 510095

\*通信作者：赵健，Email: zj-hjh@163.com

hours, which is very helpful for the rapid diagnosis of disease and the detection of RFP resistance.

**Conclusion** GeneXpertMtb/RIF has a good specificity and sensitivity in the diagnosis of chest wall tuberculosis. Another advantage of GeneXpertMtb/RIF is simple and fast. Hence, itF has an important clinical application value in the diagnosis and treatment of chest wall tuberculosis.

[KEY WORDS] Chest wall tuberculosis; GeneXpert Mtb/RIF; Sensitivity; Diagnosis and treatment

胸壁肿物是指胸壁组织病变,致胸壁皮肤隆起的一种表现,属胸壁疾病的范畴。而结核感染致的胸壁肿物最为常见,严重危害人类的健康。结核感染引起的疾患,统称为结核病,是由结核分枝杆菌感染引起的慢性传染病,潜伏期多在4~8周之间。结核菌可能侵入人体全身各种器官,其中80%发生在肺部,其他部位,除毛发,指甲外,均可发生结核菌继发感染,如颈淋巴、肠道、骨骼、胸膜,胸壁等。结核病的主要传染方式为呼吸道传染。传染源主要是痰菌阳性(涂片及培养阳性)的患者。随着环境污染及人类免疫缺陷病毒的传播,结核病发病率并未得到有效控制。临床上除少数发病急促外,如干酪性肺炎,结核病发病过程多呈慢病改变。常有午后潮热,乏力、消瘦等结核中毒症状,多伴咳嗽、咳痰等呼吸系统表现。结核病分为肺结核与肺外结核,肺外结核以淋巴结结核最为常见占肺外结核的20%~50%,占有结核病的4.0%~5.1%<sup>[1-2]</sup>,是肺外结核中最为常见的疾患之一。而结核感染所致胸壁肿物,指的是继发于肺或胸膜结核感染的肋骨、胸骨、胸壁软组织结核病变,其作为肺外结核的另一种表现,虽然较为少见,但其复发率较高,除结核药物化疗外,多需手术干预,影响着人类的健康和生活,本文以胸壁肿物为疾病背景,结合临床与检验展开研究。

目前,结核病的确诊主要有赖于病原学(结核菌涂片与培养)或病理学检查<sup>[3-4]</sup>。而病理以及结核菌培养检查时间长,结核菌涂片检查时间虽短但,敏感性不高<sup>[5-6]</sup>。因此,临床迫切需要寻找一种快速、准确的检测手段。近年来兴起的GeneXpert Mtb/RIF法,运用GeneXpert检测系统,是一种PCR检测手段,可在体外对结核分枝杆菌进行检测,以及提供针对利福平的耐药性检测。它的准确性高:可检测低含菌量,低浓度的标本,更灵敏;检测快速:最快可在2小时内出结果;检测利福平是否耐药:能尽早检测并提示利福平耐药情况,使耐药病人得以及时治疗;适用标本类型多样:可在

痰液、尿液、脓液、病灶、脑脊液、支气管液、胸腹水、胃液及淋巴组织等中检出<sup>[7]</sup>。本文回顾分析了本院在“结核所感染致胸壁肿物”患者中GeneXpert MTB/RIF的应用情况,探讨该试验对于“结核感染致胸壁肿物”患者的诊断与治疗的作用。

## 1 资料与方法

### 1.1 临床资料

本研究对象为2017年1月1日~2018年12月31日在广州市胸科医院因“胸壁肿物”,临床考虑结核感染引起,故行胸壁病灶清除手术,同时在手术中留取病灶或脓液行GeneXpert Mtb/RIF、r-干扰素释放试验(IGRAs)、结核菌培养、结核菌涂片检验及病理检查的患者,总共69例。其中有9例经病例确定为非结核感染(分别为非结核分枝杆菌感染4例,郎格汗斯细胞组织细胞增多症、肌肉血管瘤、慢性炎症、神经纤维瘤、软骨肉瘤各1例),60例病理示结核,确定为结核感染。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 GeneXpert法

取脓液或病灶样本1 mL,置入处理管中,然后加入处理液,盖好瓶盖于涡旋振荡器上振荡15~30 s后,平静状态下放置15 min,待标本充分液化后,取2 mL处理后的标本置于反应盒中,然后将反应盒置于GeneXpert MTB/RIF检测系统中自动检测。待反应结束后,时间大约为2 h,检测结果可直接在检测系统窗口下观察。

#### 1.2.2 结核菌涂片(液基夹层杯法)

标本先经离心浓缩集菌后涂片,用蜡笔将涂面局部隔开,滴加石炭酸复红染液(称取碱性复红4 g,溶于95%酒精100 mL中成饱和液。再取饱和液10 mL与5%石炭酸溶液90 mL混匀即成),酒精灯上加热至出现蒸气。切勿沸腾,亦不可使染液干涸。如有干涸的趋势,应及时补加染液。持续染色5~8 min,待冷后流水漂去多余的染液。用3%盐酸酒精清(取浓盐酸3 mL,95%酒97 mL混合)脱色,脱至涂面无色为止,约1~3 min,自来水

冲洗。加亚甲基蓝溶液,染色30 s,水洗干燥后,通过显微镜检查。结果判定按照中国防痨协会基础专业委员会制订的实验室检查规程进行<sup>[8]</sup>。

### 1.2.3 结核分枝杆菌培养(液体法)

标本材料经前期酸碱处理后接种于液体培养基内,35℃培养约2周,观察培养基表面生长菌膜。

### 1.2.4 IGRAs法

用BD.CPT管提取液收集外周血单个核细胞,结核特异性抗原(ESAT-6/CFP-10)刺激结核特异性的T淋巴细胞使其分泌 $\gamma$ -干扰素,效应T淋巴细胞分泌的 $\gamma$ -干扰素与模板预包被的抗 $\gamma$ -干扰素抗体结合并固定在细胞周围,过夜孵育,加入酶标二抗,加入底物底物工作液,计算

斑点数<sup>[9]</sup>。

### 1.3 统计学分析

根据SPSS 20.0统计软件计数资料用 $n(\%)$ 表示,使用配对,使用配检验公式法 $\chi^2 = \frac{(b-c)^2}{b+c}$ , $V$ (即自由度)=1计算GeneXpert Mtb/RIF、IGRAs、结核菌涂片、结核菌培养在灵敏性上是否存在差别, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

4种检测法的灵敏度、一致率从高到低排序为GeneXpert Mtb/RIF、IGRAs、结核菌培养、结核菌涂片。见表1。

表1 以病理诊断为标准4种方法检测的诊断效能 $[n(\%)]$

Table 1 Diagnostic efficacy of 4 methods based on pathological diagnosis  $[n(\%)]$

检测方法		病理诊断		灵敏度 (%)	特异度 (%)	阳性预测值 (%)	阴性预测值 (%)	一致率 (%)
		结核( $n=60$ )	非结核( $n=9$ )					
涂片法	阳性	11(18.33)	1(11.11)	18.3	88.9	91.7	14.0	27.5
	阴性	49(81.67)	8(88.89)					
培养法	阳性	19(31.67)	3(33.33)	31.7	66.7	86.4	12.8	36.2
	阴性	41(68.33)	6(66.67)					
IGRAsfa	阳性	53(88.33)	1(11.11)	88.3	88.9	98.1	53.3	88.4
	阴性	7(11.67)	8(88.89)					
GeneXpert	阳性	54(90.00)	0(0.00)	90.0	100.0	100.0	60.0	91.3
	阴性	6(10.00)	9(100.00)					

注:4种检测方法的在60例病理确诊为“胸壁结核”患者中阳性率对比, GeneXpert法优于结核菌涂片法,差异有统计学意义( $\chi^2=43.0$ ,  $P<0.05$ ), GeneXpert法优于结核菌培养法,差异有统计学意义( $\chi^2=35.0$ ,  $P<0.05$ ), GeneXpert法于IGRAs近似,差异无统计学意义( $\chi^2=0.2$ ,  $P>0.05$ )。

## 3 讨论

胸壁肿物作为胸壁疾病的种类之一,最常见的病因为结核感染所致,与本研究结果一致。我国作为结核病高发的国家,虽然已采取一系列措施遏制结核病,但其仍是危害公共卫生安全的全球问题之一,仍有较高的发病率和致残致死率。当前结核病疫情虽然出现缓慢下降的趋势,但由于耐多药结核病的增多,人类免疫缺陷病毒和结合菌的双重感染和移民及流动人口中结核病难以控制<sup>[10-11]</sup>,结核病仍未得到有效控制,严重危害着人类的身体健康。因此,作为临床一线工作者,快速而准确的检验检查方法显得尤为重要,需不断的探索与研究。

目前结核病诊断的金标准仍是病原学(即结核菌涂片及结核菌培养)或病理学诊断,但是,传统的涂片方法,耗时较短,但阳性率低,而培养方法培养周期长,不能在短时间内得到结果,难以为患者达到早期快速诊断和治疗的目的<sup>[5-6]</sup>;至于病理检查,由于非结核分枝杆菌感染的发现越来越多,其病理检查结果有时候极为相似,其金标准的地位也有所动摇。本研究收集经手术取病理确定为“胸壁结核”,且标本分别进行GeneXpert Mtb/RIF、结核菌涂片,结核菌培养的患者,评价4种检测技术对诊断“胸壁结核”应用价值。结果显示, GeneXpert Mtb/RIF的灵敏性明显高于结核菌涂片及培养,在肺结核与肺外结核都有重要的诊断及应用价值<sup>[12-15]</sup>,本实验研究也证实了这一点。其次,

GeneXpert Mtb/RIF 所提供的利福平耐药检测在结核治疗方面有重要指导意义<sup>[16-17]</sup>,本次研究的60例“胸壁结核”患者中,有4例患者 GeneXpert Mtb/RIF 检测出利福平耐药,而这4例患者结核菌培养均阳性,药敏提示均对利福平耐药,从中可以看出其有着非常高的一致性,可为临床医师制定结核化疗方案提供预警。另外,本研究的另一种检测方法,IGRAs 已作为结核病诊断指南的标准之一<sup>[18]</sup>,但其出结果时间较长,一般需两天后出结果,广州市胸科医院医院,是华南地区最大的结核专科医院,有国家重点专科实验室,但目前情况,IGRAs 也只能一周做两次,而 GeneXpert Mtb/RIF 检测方法在敏感性方面与其旗鼓相当,且 GeneXpert 法出结果时间短,最快2小时出就有结果,且能提供利福平敏感试验,在快速诊断方面有更大的优势。

综上所述, GeneXpert Mtb/RIF 在“结核感染致胸壁肿物”患者中具有良好的敏感性与特异性,对诊断这类患者具有重要临床应用价值。并且能够在短时间内(2 h 左右)得以诊断,能够有效缩短患者的诊断时间,提高诊断效率,优于抗酸杆菌涂片和结核菌培养传统诊断方法,同时其所提供的利福平耐药检测与结核菌培养药敏结果有着非常高的一致性,可以对结核病早期化疗方案制定提供依据,值得临床推广应用。

### 参考文献

- [1] 全国第五次结核病流行病学抽样调查技术指导组,全国第五次结核病流行病学抽样调查办公室. 2010年全国第五次结核病流行病学抽样调查报告[J]. 中国防痨杂志, 2012, 34(8):4858)杂志.
- [2] 曾定科,金韵, GeneXpert Mtb/RIF 在颈淋巴结结核脓肿诊断中的作用[J]. 国际医药卫生导报, 2019, 25(10):1580-1582.
- [3] 林晓,抗酸染色与荧光定量 PCR 检测在石蜡组织结核病理诊断中的比较[J]. 临床与实验病理学杂志, 2019, 35(3): 3569 理学杂.
- [4] 王霄,文强,岳健博,等. GeneXpert Mtb/RIF、抗酸染色及培

养在浅表淋巴结结核诊断中的比较研究[J]. 临床医学研究, 2016(3):2756(3).

- [5] 郑强,李朝金,苟莉,等. 多种肺结核临床实验室诊断方法的比较分析[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(21):2941-2942.
- [6] 张玉平,丁显平,张丽媛,等. T-SPOT、TB、痰涂片和 TB 涂片和显检测在肺结核诊断中的比较研究[J]. 成都医学院学报, 2013, 8(1):491.
- [7] 林永通,麦世康,等. GeneXpert Mtb/RIF 检测技术在结核病诊断中的应用评价[J]. 中国热带医学, 2018, (1):93-98.
- [8] 中国防痨协会基础专业委员会. 结核病诊断规程[M]. 北京:中国教育文化出.
- [9] Elisa Nemes Deborah Abrahams, Thomas J Scriba. Diagnostic Accuracy of Early Secretory Antigenic Target-6-Free Interferon-gamma Release Assay Compared to QuantiFERON-TB Gold In-tube[J]. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America, 2019, 69(10):1724-1730.
- [10] 任成山,林辉. 结核病的流行特征与耐药药的窘迫及其策略[J],中华肺部疾病杂志,2019, 12(3):269-274.
- [11] 黄家运,李小媛,黎舒,等. 2013-2017年南宁市登记肺结核患者 HIV 感染情况[J],职业与健康, 2019, 35(8):1063-1066.
- [12] 张青,薛冰茹,李克诚. GeneXpert13&dbid=系统对肺结核的诊断价值[J],检验医学, 2016, 31(7):599-602.
- [13] 赵冰,欧喜超,夏辉,等. Xpert Mtb/RIF 检测技术在结核病诊断中的应用评价[J]. 中国防痨杂志, 2014, 36(6):462-466.
- [14] 侯婷婷,侯惺,李远. GeneXpertmed.wanf 在检测脊柱结核患者中的诊断价值[J]. 检验医学与临床, 2018, 15(21):3268-3270.
- [15] Chen ZF, Lao HL, Li XH. Experimental study of GeneXpert system in the diagnosis of extra-pulmonary tuberculosis [J]. Chinese journal of tuberculosis and respiratory diseases, 2016, 39(7):529-533.
- [16] 陈子芳,周广信. GeneXpertwanfangd 在结核病诊断及利福平耐药检测中的应用[J]. 国际流行病学传染病学杂志, 2017, 44(6):420-424.
- [17] 董伟杰,秦世炳. 表型药物敏感性试验与 GeneXpert 与 http: 在耐药脊柱结核诊断中的作用[J]. 中国防痨杂志, 2019, 41(4):389-393.
- [18] 周林,刘二勇. 结核病诊断标准解读[J]. 寄生虫病与感染性疾病, 2019, 17(1):7-9.

(上接第 578 页)

- [17] 陈派强,王学忠,董海波,等. ACI 患者血清 NSE、S100b、HMGB1 及 FKN 水平的变化及与脑水肿程度、NIHSS 评分的关系[J]. 实验与检验医学, 2018, 36(6):930-932, 969.
- [18] 翟萌萌,王建平,余列,等. 中性粒细胞与淋巴细胞比值对

急性脑梗死患者预后的预测价值[J]. 中国脑血管病杂志, 2017, 14(2):82-86.

- [19] 李邦林,贾汉伟,李靖,等. 缺血性脑卒中患者单个核细胞 TLR3、IRF-3、IFN- $\gamma$ mRNA 表达及临床意义[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(2):207-211.

## 益赛普联合柳氮磺吡啶治疗强直性脊柱炎疗效及 miR-29a、miR-146a 的变化

张诺<sup>1\*</sup> 郭明蔚<sup>1</sup> 陈桂武<sup>2</sup> 李刚<sup>2</sup>

**[摘要]** 目的 探讨益赛普联合柳氮磺吡啶治疗强直性脊柱炎(AS)疗效及对外周血单个核细胞(PBMCs)中 miR-29a、miR-146a 表达的影响。方法 选取本院 AS 患者 123 例进行前瞻性随机对照研究,以随机数字表将患者分为对照 A 组( $n=41$ )、对照 B 组( $n=41$ )、观察组( $n=41$ )。对照 A 组给予益赛普,对照 B 组给予柳氮磺吡啶,观察组给予益赛普联合柳氮磺吡啶,均治疗 12 周。比较 3 组疗效与治疗前、治疗 4、8、12 周后症状与病情改善情况[脊柱痛、晨僵时间、AS 活动指数(BASDAI)评分]、血清炎症因子指标[C 反应蛋白(CRP)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、基质金属蛋白酶-3(MMP-3)]、PBMCs 中 miR-29a、miR-146a 水平。结果 经治疗,临床疗效改善率比较结果显示,观察组最高,其次是对照 A 组,最低是对照 B 组,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),而无效率则是对照 B 组最高,其次是对照 A 组,最低是观察组,差异有统计学意义( $P<0.05$ );治疗 4、8、12 周后脊柱痛、晨僵时间、BASDAI 评分、血清 CRP、TNF- $\alpha$ 、MMP-3 及 PBMCs 中 miR-29a、miR-146a 水平比较结果为:观察组最低,其次是对照 A 组,最高是对照 B 组,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。结论 应用益赛普联合柳氮磺吡啶治疗 AS 患者可减轻机体炎症反应,降低 PBMCs 中 miR-29a、miR-146a 水平,改善临床症状、病情,疗效显著。

**[关键词]** 益赛普;柳氮磺吡啶;强直性脊柱炎;miR-29a;miR-146a

### Effect of Yisaipu combined with sulfasalazine on ankylosing spondylitis and the changes of miR-29a and miR-146a

ZHANG Nuo<sup>1\*</sup>, GUO Mingwei<sup>1</sup>, CHEN Guiwu<sup>2</sup>, LI Gang<sup>2</sup>

(1. Rheumatology Dept, Bozhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Bozhou, Anhui, China, 236800;  
2. Geriatrics Dept, Bozhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Bozhou, Anhui, China, 236800)

**[ABSTRACT]** Objective To investigate the efficacy of Yisaipu combined with sulfasalazine in the treatment of ankylosing spondylitis (AS) and To observe the effects of miR-29a and miR-146a expression in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). Methods 123 patients with AS in our hospital were selected for prospective randomized controlled study, the patients were divided into control group A ( $n=41$ ), control group B ( $n=41$ ), and the observation group ( $n=41$ ) by random number table. The control group A was given Yisaipu, the control group B was given sulfasalazine, and the observation group was given Yisaipu plus sulfasalazine, all groups were treated for 12 weeks. The efficacy, and improvement of symptoms and conditions [spine pain, morning stiffness, AS activity index (BASDAI) score], serum inflammatory factor indicators [C reactive protein (CRP), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), matrix metalloproteinase-3 (MMP-3)], miR-29a, miR-146a levels in PBMCs before treatment, 4 weeks, 8 weeks, and 12 weeks after treatment in the three groups were compared. Results After treatment, the comparison of clinical efficacy improvement rate

基金项目:安徽中医药大学科研基金项目(亳州市华佗中医院专项基金)(2017lckyhtyy03)

作者单位:1.亳州市中医院风湿科,安徽,亳州 236800

2.亳州市中医院老年病科,安徽,亳州 236800

\*通信作者:张诺, E-mail: zss20399153@163.com

showed that the observation group had the highest, followed by the control group A, and the lowest was the control group B, the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). The inefficiency was the highest in the control group B, followed by the control group A, and the lowest was the observation group ( $P < 0.05$ ). after 4 weeks, 8 weeks, and 12 weeks of treatment, the levels of miR-29a and miR-146a in spinal pain, morning stiffness time, BASDAI score, serum CRP, TNF- $\alpha$ , MMP-3 and PBMCs were as follows: the observation group was the lowest, followed by the control group A, and the highest was the control group B ( $P < 0.05$ ).  
**Conclusion** Application of Yisaipu combined with sulfasalazine in the treatment of AS patients can reduce the body's inflammatory response, reduce the levels of miR-29a and miR-146a in PBMCs, improve clinical symptoms and conditions, and have a significant effect.

[KEY WORDS] Yisaipu; Sulfasalazine; Ankylosing spondylitis; miR-29a; miR-146a

强直性脊柱炎(Ankylosing spondylitis, AS)属一种以脊柱慢性炎症为主要特征的慢性风湿性疾病,药物治疗为AS主要治疗手段,治疗关键在于减轻炎症,缓解临床症状,避免畸形,维持正常姿势与最佳功能位置<sup>[1]</sup>。柳氮磺吡啶属治疗AS传统药物,虽具有一定疗效,但作用有限,且副作用较大<sup>[2]</sup>。益赛普属肿瘤坏死因子- $\alpha$ (Tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )拮抗类药物,能抑制TNF- $\alpha$ 表达,阻断其引起的炎症反应,减轻患者病情<sup>[3]</sup>。此外,近期研究发现,miR-29a、miR-146a等miRNAs于自身免疫功能及多种炎症调节过程中具有重要作用,可参与风湿性疾病发生、进展<sup>[4-5]</sup>。但关于益赛普联合柳氮磺吡啶治疗对AS患者疾病治疗效果及外周血单个核细胞(Peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)中miR-29a、miR-146a表达影响如何尚不明确,本研究通过前瞻性研究对其进行分析。如下报道。

## 1 资料与方法

### 1.1 研究对象

选取本院2016年8月至2019年8月AS患者123例进行前瞻性随机对照研究,以随机数字表将患者分为对照A组( $n=41$ )、对照B组( $n=41$ )、观察组( $n=41$ )。本研究经医院伦理委员会批准。

纳入标准:①符合《强直性脊柱炎的诊断与治疗骨科专家共识》中AS临床诊断标准<sup>[6]</sup>;②初诊患者;③入组前2个月未应用改善病情药物;④疾病处在活动期;⑤患者知晓本研究,自愿签订知情同意书。排除标准:①合并心、肾、肝等脏器功能严重障碍;②合并脑血管疾病、血液系统疾病、恶性肿瘤;③伴有结核感染;④合并精神、认知功能障碍;⑤依从性差,无法配合完成治疗;⑥对研究应用药物过敏。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 治疗方法

①对照A组给予益赛普(三生国健药业(上海)股份有限公司,国药准字S20050059)治疗:25 mg 益赛普加入1 mL生理盐水,在三角肌下缘采取皮下注射,起始剂量2次/周,待患者病情缓解后逐渐降低应用剂量,9~12周减量到25 mg/周,若出现减量后病情反复,可回调剂量。②对照B组给予柳氮磺吡啶(上海信谊天平药业有限公司,国药准字H31020557)治疗:1.0 g/次,2次/d,口服。③观察组给予益赛普联合柳氮磺吡啶:益赛普应用剂量与方法同对照A组,柳氮磺吡啶应用剂量与方法同对照B组。3组均治疗12周。

#### 1.3.2 检测方法

①血清炎症因子检测:采集患者清晨空腹静脉血样5 mL,取3 mL血样以离心机离心10 min(转速:2 500 r/min 离心半径:10 cm),提取血清,低温冻存待检;以免疫比浊法测定血清C反应蛋白(C-reactive protein, CRP)水平,双抗夹心酶联免疫吸附法测定血清TNF- $\alpha$ 、基质金属蛋白酶-3(Matrix metalloproteinase-3, MMP-3)水平,检测试剂盒均购于武汉默沙克生物科技有限公司,有关操作严格按试剂盒说明书执行。②PBMCs中miR-29a、miR-146a检测:取2 mL血样以Ficoll分离液分离出PBMCs,按Trizol试剂盒说明书提取PBMCs中Small RNA,放置到无RNA酶水内保存;设计及合成引物,引物合成与测序均由生工生物工程上海(股份)有限公司完成;合成cDNA,应用美国ABI公司提供的7300荧光定量PCR仪以实时荧光定量PCR法测定PBMCs中miR-29a、miR-146a水平,每个标本测定3个复孔,以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算血清miR-29a、miR-146a相对表达量。

#### 1.4 疗效评价

治疗12周依据国际AS评价工作组(Assessment of Spondyloarthritis International Society, ASAS)标准<sup>[7]</sup>评价疗效,以达到AS疗效评价标准20%改善(ASAS20)归为改善,未达到为无效,ASAS20定义:与治疗前相比,总体评价(Patient global assessment, PGA)、脊柱炎症、夜间痛与脊柱痛视觉模拟评分量表(Visual analogue scale, VAS)分值、Bath强直性脊柱炎功能指数(Bath ankylosing spondylitis functional index, BASFI)4项指标中 $\geq 3$ 项改善在20%及以上,且VAS分值降低 $\geq 1$ 分。改善率=改善例数/总例数 $\times 100\%$ 。

#### 1.5 观察指标

3组治疗12周后疗效。3组治疗前、治疗4、8、12周后症状与病情改善情况[脊柱痛、晨僵时间、AS活动指数(BASDAI)评分],脊柱痛应用VAS量表评价,总分10分,分值越高疼痛程度越高,AS活动

指数包括关节疲倦、肿胀、疼痛程度等维度,总分10分,分值越高病情越严重<sup>[8]</sup>。3组治疗前、治疗4、8、12周后血清炎症因子指标(CRP、TNF- $\alpha$ 、MMP-3)水平。④3组治疗前、治疗4、8、12周后PBMCs中miR-29a、miR-146a水平。

#### 1.6 统计学方法

采用SPSS 22.0软件分析数据,计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, $t$ 检验,多组间比较采用单因素方差分析;计数资料用 $n(\%)$ 表示,行 $\chi^2$ 检验;等级资料应用Ridit分析, $Z$ 检验; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 3组基本资料的比较

3组年龄、体质量、病程、性别、吸烟与饮酒人数比例、病变部位、CT分期等一般资料相比,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。见表1。

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

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

资料	观察组( $n=41$ )	对照A组( $n=41$ )	对照B组( $n=41$ )	$F/Z/\chi^2$ 值	$P$ 值
年龄(岁)	30.82 $\pm$ 4.13	31.42 $\pm$ 4.56	30.49 $\pm$ 5.07	0.430	0.651
体质量(kg)	61.94 $\pm$ 6.42	62.76 $\pm$ 7.14	62.27 $\pm$ 6.56	0.155	0.857
病程(年)	2.85 $\pm$ 0.64	3.02 $\pm$ 0.49	2.93 $\pm$ 0.56	0.624	0.400
性别(男/女,例)	25/16	23/18	24/17	0.201	0.904
吸烟	8(19.51)	9(21.95)	11(26.83)	0.647	0.724
饮酒	13(31.71)	11(26.83)	13(31.71)	0.309	0.857
病变部位					
双侧	14(34.15)	13(31.71)	16(39.02)		
单侧	27(65.85)	28(68.29)	25(60.98)	0.501	0.779
CT分期					
IV期	4(9.76)	5(12.20)	3(7.32)		
III期	20(48.78)	21(51.22)	24(58.54)	0.253	0.969
II期	17(41.46)	15(36.59)	14(34.15)		

### 2.2 临床疗效

41例治疗12周后临床疗效改善率比较结果显示,观察组最高39(95.12%),其次是对照A组32(78.05%),最低是对照B组25(60.98%),而无效率则是对照B组最高16(39.02%),其次是对照A组9(21.95%),最低是观察组2(4.88%),差异有统计学意义( $\chi^2=13.95$ ,  $P < 0.05$ )。

### 2.3 症状与病情改善情况、炎症因子、miR-29a、miR-146a水平

3组治疗前脊柱痛、晨僵时间、BASDAI评分、血清CRP、TNF- $\alpha$ 、MMP-3及PBMCs中miR-29a、miR-146a水平相比,差异无统计学意义( $P > 0.05$ );

治疗4周、8周、12周后脊柱痛、晨僵时间、BASDAI评分、血清CRP、TNF- $\alpha$ 、MMP-3及PBMCs中miR-29a、miR-146a水平比较结果为:观察组 $<$ 对照A组 $<$ 对照B组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表3。

## 3 讨论

AS可造成反复腰背疼痛、四肢关节肿痛,病情严重者甚至会出现受累关节功能丧失、脊柱畸形等,累及全身多种系统。柳氮磺吡啶可于肠道中降解成5-氨基水杨酸,发挥抗炎、免疫抑制效果,缓解因各类炎症造成的临床症状,减轻病情<sup>[9]</sup>。但单纯应用柳氮磺吡啶治疗对部分患者疗效不佳。

表3 3组症状与病情改善情况、炎症因子、miR-29a、miR-146a水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )Table 3 Comparison of symptoms and improvement of condition, inflammatory factors, miR-29a, miR-146a levels in 3 groups ( $\bar{x} \pm s$ )

时间	组别	n	症状与病情改善情况			炎症因子				
			脊柱痛 (分)	晨僵时间 (min)	BASDAI 评分(分)	CRP (mg/L)	TNF- $\alpha$ ( $\mu$ g/mL)	MMP-3 (pg/mL)	miR-29a	miR-146a
治疗前	观察组	41	6.03 $\pm$ 1.24	48.23 $\pm$ 14.57	6.05 $\pm$ 1.34	31.55 $\pm$ 6.28	411.38 $\pm$ 54.26	110.58 $\pm$ 12.15	0.80 $\pm$ 0.20	2.21 $\pm$ 0.34
	对照A组	41	5.97 $\pm$ 1.31	47.64 $\pm$ 16.03	6.11 $\pm$ 1.28	30.46 $\pm$ 5.71	412.53 $\pm$ 57.29	112.06 $\pm$ 14.03	0.78 $\pm$ 0.17	2.23 $\pm$ 0.31
	对照B组	41	5.92 $\pm$ 1.16	47.17 $\pm$ 15.22	5.98 $\pm$ 1.41	30.72 $\pm$ 6.03	410.77 $\pm$ 56.07	111.62 $\pm$ 11.88	0.81 $\pm$ 0.22	2.18 $\pm$ 0.28
	F值		0.081	0.050	0.096	0.368	0.011	0.146	0.245	0.269
	P值		0.922	0.952	0.909	0.693	0.990	0.864	0.783	0.765
治疗 4周后	观察组	41	3.04 $\pm$ 1.01	21.34 $\pm$ 5.63	3.56 $\pm$ 0.81	20.12 $\pm$ 4.07	354.20 $\pm$ 27.10	91.26 $\pm$ 8.02	0.56 $\pm$ 0.10	1.51 $\pm$ 0.17
	对照A组	41	4.22 $\pm$ 1.10	28.79 $\pm$ 7.02	4.33 $\pm$ 0.86	24.33 $\pm$ 4.25	382.26 $\pm$ 30.02	98.17 $\pm$ 8.43	0.68 $\pm$ 0.11	1.87 $\pm$ 0.20
	对照B组	41	5.17 $\pm$ 1.24	40.06 $\pm$ 10.21	5.02 $\pm$ 0.93	28.14 $\pm$ 4.81	405.31 $\pm$ 31.17	106.69 $\pm$ 10.14	0.76 $\pm$ 0.13	2.06 $\pm$ 0.22
	F值		37.172	58.987	29.024	34.269	30.908	30.846	31.959	81.825
	P值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
治疗 8周后	观察组	41	2.63 $\pm$ 0.41	16.57 $\pm$ 4.45	3.07 $\pm$ 0.42	15.13 $\pm$ 3.49	334.52 $\pm$ 24.06	85.33 $\pm$ 6.61	0.43 $\pm$ 0.11	1.02 $\pm$ 0.24
	对照A组	41	3.08 $\pm$ 0.45	22.18 $\pm$ 6.09	3.74 $\pm$ 0.50	19.34 $\pm$ 3.61	362.29 $\pm$ 25.11	92.20 $\pm$ 8.34	0.54 $\pm$ 0.12	1.40 $\pm$ 0.31
	对照B组	41	3.61 $\pm$ 0.53	29.10 $\pm$ 7.23	4.39 $\pm$ 0.67	23.39 $\pm$ 4.12	387.30 $\pm$ 28.19	101.38 $\pm$ 9.57	0.67 $\pm$ 0.13	1.85 $\pm$ 0.36
	F值		45.430	44.386	61.217	49.738	42.783	38.939	40.906	74.952
	P值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
治疗 12周后	观察组	41	1.84 $\pm$ 0.32	12.48 $\pm$ 3.11	2.37 $\pm$ 0.35	12.31 $\pm$ 3.16	315.04 $\pm$ 30.44	78.30 $\pm$ 9.17	0.30 $\pm$ 0.10	0.78 $\pm$ 0.23
	对照A组	41	2.97 $\pm$ 0.36	17.15 $\pm$ 4.06	2.88 $\pm$ 0.41	15.42 $\pm$ 3.50	334.27 $\pm$ 32.38	85.19 $\pm$ 10.22	0.42 $\pm$ 0.12	1.02 $\pm$ 0.25
	对照B组	41	3.38 $\pm$ 0.41	23.60 $\pm$ 4.79	3.42 $\pm$ 0.44	19.93 $\pm$ 4.08	368.19 $\pm$ 40.14	96.21 $\pm$ 11.36	0.61 $\pm$ 0.17	1.44 $\pm$ 0.30
	F值		195.552	78.103	70.035	46.437	24.839	31.609	56.385	66.830
	P值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

临床研究指出, TNF- $\alpha$  于免疫调节、炎症反应等方面起着重要作用, 可刺激滑膜与软骨成纤维细胞生成前列腺素 E、胶原酶等, 加速骨吸收及骨质破坏, 阻止骨胶原生成, 引起局部炎症, 参与 AS 发病与病程进展过程<sup>[10]</sup>。可见抗 TNF- $\alpha$  生成成为治疗 AS 重要靶点。益赛普属典型 TNF- $\alpha$  拮抗剂, 田军伟等<sup>[11]</sup> 研究报道, 应用益赛普治疗 AS 患者可显著改善患者临床症状与关节功能, 提升疗效。本研究发现, 应用益赛普联合柳氮磺吡啶治疗后患者临床症状与病情改善, 疗效提升, 与上述研究相符。推究其原因因为益赛普主要由 TNF- $\alpha$  受体 p75 胞外段和人 IgG1 Fc 段相融合而形成, 能不可逆地竞争性结合血浆与细胞表面 TNF- $\alpha$ , 抑制 TNF- $\alpha$  生物学活性, 减轻机体炎症, 缓解 AS 病情<sup>[12]</sup>。将益赛普、柳氮磺吡啶结合应用可由不同途径减轻机体炎症, 缓解病情, 进而增强治疗效果。同时, CRP 属促炎性细胞因子, 可参与免疫调节, 诱导炎症反应, 与 TNF- $\alpha$  一同参与 AS 炎症反应发生、进展过程; MMP-3 为 MMPs 家族中一员, 可起到降解细胞外基质与基质重塑作用, 且

与骨破坏、关节软骨病、炎性关节炎等疾病等有关, 表达与 TNF- $\alpha$ 、CRP 水平呈正相关, 属判定 AS 病情的重要指标物<sup>[13]</sup>。本研究中, 应用益赛普联合柳氮磺吡啶治疗后血清 CRP、TNF- $\alpha$ 、MMP-3 水平显著改善, 亦证实联合治疗可减轻机体炎症反应, 抑制病情进展。

近期研究报道, miR-29a 可直接靶向调控 Dickkopf-1 的 3'UTR 区域, 加速 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路激活, 提高成骨细胞碱性磷酸酶、骨钙素等有关因子表达; miR-146a 能阻止白细胞介素-1 受体有关激酶 1 与 TNF 受体有关因子 6 表达, 加速破骨细胞生成, 促进骨质破坏, 2 者表达与 AS 疾病活动性密切相关<sup>[14-15]</sup>。本研究中, 应用益赛普联合柳氮磺吡啶治疗后 PBMCs 中 miR-29a、miR-146a 水平明显降低。原因可能与应用益赛普联合柳氮磺吡啶治疗后机体炎症减轻, 骨质破坏减弱, 病情缓解等有关, 但具体机制仍有待将来进一步探讨。

综上, 联合应用益赛普与柳氮磺吡啶治疗 AS 患者能缓解机体炎症反应, 下调 PBMCs 中 miR-29a、miR-146a 表达, 减轻临床症状、病情, 提高疗效。

## 参考文献

- [1] 罗绮雯,陈国强,张红卫,等. 依那西普注射剂联合雷公藤多苷片治疗强直性脊柱炎的临床研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2019, 35(15): 1578-1580.
- [2] 龚俊,马菊. 玉龙散外敷联合西药治疗强直性脊柱炎的临床分析[J]. 颈腰痛杂志, 2019, 40(3): 391-393.
- [3] 符维广,李浩鹏. 重组人II型肿瘤坏死因子受体-抗体融合蛋白治疗强直性脊柱炎的临床效果[J]. 中国医药导报, 2017, 14(6): 112-115.
- [4] Huang J, Song G, Yin Z, et al. MiR-29a and Messenger RNA Expression of Bone Turnover Markers in Canonical Wnt Pathway in Patients with Ankylosing Spondylitis [J]. Clin Lab, 2017, 63(5): 955-960.
- [5] 吴系美,李博,余若男,等. 英夫利昔单抗治疗强直性脊柱炎的疗效及对 miR-146a 表达的影响[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2018, 32(7): 701-703.
- [6] 沈彬,裴福兴,邱贵兴. 强直性脊柱炎的诊断与治疗骨科专家共识[J]. 中华骨科杂志, 2012, 32(9): 895-898.
- [7] 马华,孙飞,张亚美,等. 戈利木单抗治疗 25 例活动性强直性脊柱炎的疗效与安全性[J]. 中华内科杂志, 2017, 56(12): 935-939.
- [8] 李欣玲,吴金玉,蒋君艳,等. 健脾除痹汤联合沙利度胺治疗强直性脊柱炎的临床研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2018, 38(6): 706-710.
- [9] 李力,徐照,赵晶晶,等. 补肾祛瘀方辨证治疗强直性脊柱炎的临床疗效及对炎症因子的影响[J]. 四川中医, 2018, 36(6): 141-144.
- [10] 冷燕奎,王强,金斌,等. 不同肿瘤坏死因子- $\alpha$  拮抗剂治疗强直性脊柱炎的早期疗效及对炎症指标的影响[J]. 中国临床药理学杂志, 2019, 28(5): 333-336.
- [11] 田军伟,张晟,张洁,等. 探讨益赛普治疗强直性脊柱炎的疗效观察及安全性评价[J]. 临床与病理杂志, 2016, 36(1): 50-54.
- [12] 周进,付林,周珍,等. 重组人II型肿瘤坏死因子受体-抗体融合蛋白递减联合沙利度胺递增治疗方案干预活动性强直性脊柱炎的1年评价[J]. 中国组织工程研究, 2019, 23(35): 5664-5669.
- [13] 刘辉,王雪峰,李俊. 针灸推拿结合柳氮磺吡啶肠溶片治疗强直性脊柱炎临床研究[J]. 国际中医中药杂志, 2019, 41(9): 936-940.
- [14] Zhang F, Cao K, Du G, et al. miR-29a promotes osteoblast proliferation by downregulating DKK-1 expression and activating Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway [J]. Adv Clin Exp Med, 2019, 28(10): 1293-1300.
- [15] 姜芳,许敏,郑锡铭. 强直性脊柱炎患者外周血 miR-146a、miR-155、miR-181a、miR-223 的表达分析[J]. 实验与检验医学, 2018, 36(5): 766-769, 772.
- [7] Xin W, Liu X, Ding J, et al. Long non-coding RNA derived miR-205-5p modulates human endometrial cancer by targeting PTEN [J]. Am J Transl Res, 2015, 7(11): 2433.
- [9] Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans* [J]. Science, 2001, 294: 858-862.
- [9] Ambros V. The functions of animal microRNAs. Nature 2004, 431: 350-355.
- [10] 许文丽,邢秀月,徐川微. 血清 miR-155 水平联合 HE4、CA125 对子宫内膜癌的诊断价值[J]. 热带医学杂志, 2019, 19(9): 1142-1145.
- [11] Xi, JJ. MicroRNAs in Cancer [J]. Cancer Treat Res, 2013, 158: 119-37.
- [12] Todd B, Yin X, Ardeshir H, et al. MicroRNAs and their target messenger RNAs associated with endometrial carcinogenesis [J]. Gynecol Oncol, 2008, 110(2): 206-215.
- [13] Loffe YJ, Chiappinelli KB, Mutch DG, et al. Phosphatase and tensin homolog (PTEN) pseudogene expression in endometrial cancer: a conserved regulatory mechanism important in tumorigenesis? [J]. Gynecol Oncol, 2012, 124(2): 340-346.
- [14] Lee H, Choi HJ, Kang CS, et al. Expression of miRNAs and PTEN in endometrial specimens ranging from histologically normal to hyperplasia and endometrial adenocarcinoma. [J]. Mod Pathol, 2012, 25(11): 1508-1515.
- [15] Karaayvaz M, Zhang C, Liang S, et al. Prognostic significance of miR-205 in endometrial cancer [J]. PLoS One, 2012, 7(4): e35158.
- [16] 杨璐,郭春风,何艳. LncRNA AFAP1-AS1 在子宫内膜癌中的表达及临床病理参数与预后的关系[J]. 热带医学杂志, 2019, 19(12): 1463-1467.
- [17] Ling H, Vincent K, Pichler M, et al. Junk DNA and the long non-coding RNA twist in cancer genetics [J]. Oncogene, 2015, 34(39): 5003-5011. doi:10.1038/ncr.2014.456
- [18] Gibb E A, Vucic E A, Enfield K S, et al. Human cancer long non-coding RNA transcriptomes [J]. PLoS One, 2011, 6(10): e25915.
- [19] Silva JM, Boczek NJ, Berres MW, et al. LSINCT5 is over expressed in breast and ovarian cancer and affects cellular proliferation. [J]. RNA Biol, 2011, 8(3): 496-505.
- [20] Gloss BS, Patterson KI, Barton CA, et al. Integrative genome-wide expression and promoter DNA methylation profiling identifies a potential novel panel of ovarian cancer epigenetic biomarkers. [J]. Cancer Lett, 2012, 318(1): 76-85.
- [21] Sun R, Qin C, Jiang B, et al. Down-regulation of MALAT1 inhibits cervical cancer cell invasion and metastasis by inhibition of epithelial-mesenchymal transition [J]. Mol Biosyst, 2016, 12(3): 952-962.
22. Akrami R1, Jacobsen A, Hoell J, et al. Comprehensive analysis of long non-coding RNAs in ovarian cancer reveals global patterns and targeted DNA amplification [J]. PLoS One, 2013, 12, 8(11): e80306.

(上接第 582 页)

## 高血压合并心功能不全对患者 CyP、GDF-15、IL-18 水平影响研究

刘晓雨 贾国伟 孙荣国 赵明 张巍\*

**【摘要】** 目的 探究高血压合并心功能不全对患者环孢素 A 结合蛋白(CyP)、生长分化因子-15(GDF-15)、白细胞介素-18(IL-18)水平影响及检测各指标表达的临床意义。方法 选取本院 2016 年 12 月至 2019 年 12 月收治的原发性高血压患者 90 例,依照患者伴心功能不全程度分为高血压无心功能不全组(A=36)、高血压伴轻度心功能不全组(心功能 I、II 级,B=32)、高血压伴中重度心功能不全组(心功能为 III、IV 级,C=22),另选择同期于本院体检的健康志愿者 30 例作为对照组。心脏超声检测各组心功能,酶联免疫吸附法(ELISA)检测各组血清因子水平,Spearman 检验分析 CyP、GDF-15、IL-18 与高血压合并心功能不全患者左室射血分数(LVEF)的相关性。结果 B、C 两组患者左室舒张末期内径(LVEDD)、左室收缩末期内径(LVESD)、左房内径(LAD)、室间隔厚度(IVS)较 A 组和对照组显著增大,LVEF 显著降低,差异具有统计学意义( $P<0.05$ );A 组和对照组 LVEDD、LVESD、LAD、IVS、LVEF 比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。A、B、C 组患者肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、IL-1 $\beta$ 、总抗氧化能力(T-AOC)、B 型脑钠肽(BNP)、IL-6、CyP-A、CyP-B、GDF-15、IL-18 水平均显著较对照组显著升高,且 A、B、C 三组随着患者心功能不全程度加重各指标水平逐渐升高,差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。高血压合并心功能不全患者 CyP-A、CyP-B、GDF-15、IL-18 与 LVEF 存在显著负相关性( $P<0.05$ )。结论 高血压合并心功能不全患者机体炎症因子、CyP、GDF-15、IL-18 水平明显升高,并与心功能障碍程度存在明显关系,临床上应注意观测 CyP、GDF-15、IL-18 水平变化,以预防和降低高血压患者心功能损伤的发生。

**【关键词】** 原发性高血压;心功能不全;环孢素 A 结合蛋白;生长分化因子-15;白细胞介素-18

### Effect of hypertension with cardiac insufficiency on the levels of CyP, GDF-15, IL-18

LIU Xiaoyu, JIA Guowei, SUN Rongguo, ZHAO Ming, ZHANG Wei\*

(Department of Cardiology, Cangzhou Central Hospital, Yunhe District, Cangzhou, Hebei, China, 061000)

**【ABSTRACT】** Objective To investigate the effect of hypertension combined with cardiac insufficiency on the levels of cyclosporin A binding protein (CyP), growth differentiation factor-15 (GDF-15), interleukin-18 (IL-18) and the clinical significance of the expression of various indicators. Methods Ninety patients with primary hypertension treated in our hospital from December 2016 to December 2019 were selected. According to the degree of heart failure, the patients were divided into hypertension without cardiac insufficiency group (group A,  $n=36$ ), hypertension with mild cardiac dysfunction group (group B, cardiac function I, II,  $n=32$ ), and hypertension with moderate to severe cardiac dysfunction group (group C, cardiac function III, IV,  $n=22$ ). Another thirty healthy volunteers who underwent physical examination in our hospital during the same period were recruited as the control group. Cardiac ultrasound was used to detect the heart function of patients in all group. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect serum

基金项目:河北省科学技术厅项目(20181761)

作者单位:河北省沧州市运河区沧州市中心医院心内科,河北,沧州 061000

\*通信作者:张巍, E-mail: jizhixianshang@163.com

levels of factors. The correlation between CyP, GDF-15, IL-18 and left ventricular ejection fraction (LVEF) in patients with hypertension complicated with cardiac insufficiency were analyzed using Spearman rank correlation. **Results** The left ventricular end-diastolic diameter (LVEDD), left ventricular end-systolic diameter (LVESD), left atrial inner diameter (LAD), and ventricular septal thickness (IVS) of the two groups of patients in B and C were significantly larger than those of the group A and the control group, and LVEF was significantly reduced ( $P<0.05$ ). There was no significant difference in the LVEDD, LVESD, LAD, IVS, and LVEF between the group A and the control group ( $P>0.05$ ). The levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), IL-1 $\beta$ , total antioxidant capacity (T-AOC), B-type brain natriuretic peptide (BNP), IL-6, CyP-A, CyP-B, GDF-15, and IL-18 in patients in the groups A, B, and C were significantly higher than those in the control group, and the levels of various indicators gradually increased with the increase of patients with cardiac insufficiency, and the differences were statistically significant ( $P<0.05$ ). There was a significant negative correlation between CyP-A, CyP-B, GDF-15, IL-18 and LVEF in patients with hypertension and cardiac insufficiency ( $P<0.05$ ). **Conclusion** The levels of inflammatory factors, CyP, GDF-15, and IL-18 in patients with hypertension and cardiac insufficiency are significantly increased, and have a significant relationship with the degree of cardiac dysfunction. Clinically, it is necessary to monitor the changes of CyP, GDF-15, and IL-18 to prevent and reduce the occurrence of cardiac function impairment in patients with hypertension.

[KEY WORDS] Essential hypertension; Cardiac insufficiency; Cyclosporin A binding protein; Growth differentiation factor-15; Interleukin-18

高血压是临床上十分常见的心血管系统疾病,该病呈慢性进展,随着疾病加重可导致心脏功能和结构的改变,导致左心室肥厚、动脉粥样硬化及心力衰竭等。研究表明<sup>[1]</sup>,随着高血压患者年龄增加、血压升高及病情进展,导致心力衰竭的风险明显上升,严重危害了患者的生存质量。高血压导致心功能不全的机制复杂,与细胞因子活化、神经内分泌激活及氧化应激反应等多种因素有关。环孢素A结合蛋白(又称亲环素, cylophilin, CyP)在介导细胞免疫抑制、调节蛋白质运输、诱导炎性细胞聚集等方面具有重要作用<sup>[2]</sup>。CyP参与了血管损伤等生理病理过程,促进了动脉粥样硬化的发生<sup>[3]</sup>。生长分化因子-15(Growth differentiation factor 15, GDF-15)属于应激反应蛋白,在心脏压负荷过重、缺血再灌注损伤等病理状态下在心肌细胞中表现为高表达<sup>[4]</sup>。白细胞介素-18(interleukin-18, IL-18)是重要的促炎性因子,其与心血管疾病的发生发展密切相关。因此,本研究就高血压合并心功能不全对患者CyP、GDF-15、IL-18水平的影响进行了研究,具体如下。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选取本院2016年12月至2019年12月收治的原发性高血压患者90例。依照患者伴心功能不全

程度分为高血压无心功能不全组(A组,  $n=36$ )、高血压伴轻度心功能不全组(B组, 心功能 I、II级,  $n=32$ )、高血压伴中重度心功能不全组(C组, 心功能为 III、IV级,  $n=22$ ),其中A组男21例,女15例,年龄39~77岁,平均(62.3 $\pm$ 3.7)岁;B组男18例,女14例,年龄42~79岁,平均(61.3 $\pm$ 3.5)岁;C组男13例,女9例,年龄44~76岁,平均(62.4 $\pm$ 3.3)岁。另选择同期于我院进行体检的健康志愿者30例作为对照组,男16例,女14例,年龄36~79岁,平均(60.5 $\pm$ 3.8)岁。

纳入标准:①均符合原发性高血压(2~3级)的诊断标准<sup>[5]</sup>,静息状态下不同日测量3次舒张压 $\geq 90$  mmHg或收缩压 $\geq 140$  mmHg;②所有患者均对本研究内容知情同意并签署知情同意书;③均临床资料完整,能够配合完成此研究。排除标准:①继发性高血压患者;②合并缺血性心脏病、心包积液、心肌梗死等心脏病患者;③合并严重肝肾功能不全、恶性肿瘤、急慢性感染及血液系统疾病患者。高血压性心功能不全符合《内科学》的相关诊断标准<sup>[6]</sup>,并依据NYHA分级标准评估心功能分级<sup>[7]</sup>。4组研究对象在性别、年龄上比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ ),具有可比性。本研究经医院伦理委员会批准。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 心脏超声检测心功能

所有患者采用ViViD3型彩色多普勒超声(美

国GE公司)测定左室舒张末期内径(Left ventricular end diastolic diameter, LVEDD)、左室收缩末期内径(Left ventricular end systolic diameter, LVESD)、左房内径(Left atrial inner diameter, LAD)、室间隔厚度(Interventricular septal thickness, IVS)及左室射血分数(Left ventricular ejection fraction, LVEF)。均采用美国超声心动图学会推荐测定方法,探头频率1.5~2.5 MHz,所有患者测定均由同一专业医师操作完成。

### 1.2.2 血清因子测定

所有研究对象均于清晨空腹抽取5 mL 静脉血,3 000 r/min离心10 min分离血清,-20℃保存待测。采用酶联免疫吸附法(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测各组血清肿瘤坏死因子- $\alpha$ (Tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、IL-1 $\beta$ 、总抗氧化能力(Total antioxidant capacity, T-AOC)、B型脑钠肽(B-type natriuretic peptide, BNP)、IL-6、CyP-A、CyP-B、GDF-15、IL-18水平,

采用CB-372型全自动酶标仪(TRACE公司)测定,室温490 nm处读取OD值,通过标准曲线计算各血清细胞因子浓度,试剂盒购自上海生工生物公司。严格依照试剂盒及仪器说明书执行各项操作。

### 1.3 统计学分析

采用SPSS 20.0软件进行数据分析,计量资料以( $\bar{x} \pm s$ )表示,两组间比较采用 $t$ 检验,多组间比较采用单因素方差分析;Spearman检验分析CyP、GDF-15、IL-18与高血压合并心功能不全患者LVEF的相关性。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 4组心功能检测结果比较

4组间LVEDD、LVESD、LAD、IVS水平比较:对照组<A组<B组<C组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );LVEF(%)水平比较:C组<B组<A组<对照组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表1。

表1 4组心功能检测结果比较( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Comparison of cardiac function test results in the 4 groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	<i>n</i>	LVEDD(mm)	LVESD(mm)	LAD(mm)	IVS(mm)	LVEF(%)
对照组	30	45.2±4.9	22.2±2.9	27.7±3.5	8.8±1.9	55.8±5.1
A组	36	45.8±5.6	23.0±2.4	27.1±3.3	9.1±1.6	54.3±5.7
B组	32	51.3±6.9 <sup>ab</sup>	29.3±3.4 <sup>ab</sup>	32.5±5.0 <sup>ab</sup>	10.2±1.4 <sup>ab</sup>	48.6±4.4 <sup>ab</sup>
C组	22	55.8±6.4 <sup>abc</sup>	38.3±4.3 <sup>abc</sup>	36.8±4.6 <sup>abc</sup>	11.4±1.6 <sup>abc</sup>	38.2±5.2 <sup>abc</sup>
<i>F</i> 值		6.769	15.208	8.107	56.036	12.194
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注:与对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与A组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与B组比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$ 。

### 2.2 4组炎症及氧化应激因子水平比较

4组间TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 、BNP水平比较:对照组<A组<B组<C组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );T-AOC水平比较:C组<B组<A组<对照组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表2。

### 2.3 4组CyP、GDF-15、IL-18水平比较

4组间CyP-A、CyP-B、GDF-15水平比较:对照组<A组<B组<C组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );IL-18水平比较:C组<B组<A组<对照组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表3。

表2 4组炎症及氧化应激因子水平比较( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Comparison of inflammation and oxidative stress factor levels in the 4 groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	<i>n</i>	TNF- $\alpha$ (ng/L)	IL-6(pg/mL)	IL-1 $\beta$ (ng/L)	BNP(pg/mL)	T-AOC(IU/L)
对照组	30	2.2±0.6	61.9±14.4	497.6±87.2	53.6±6.1	21.9±5.6
A组	36	4.6±1.2 <sup>a</sup>	80.8±25.9 <sup>a</sup>	602.4±91.1 <sup>a</sup>	92.4±8.3 <sup>a</sup>	17.0±4.8 <sup>a</sup>
B组	32	5.8±2.8 <sup>ab</sup>	94.7±26.3 <sup>ab</sup>	790.3±89.6 <sup>ab</sup>	136.4±10.2 <sup>ab</sup>	11.5±4.5 <sup>ab</sup>
C组	22	11.7±4.4 <sup>abc</sup>	109.6±28.0 <sup>abc</sup>	829.7±93.2 <sup>abc</sup>	310.8±16.6 <sup>abc</sup>	7.4±1.3 <sup>abc</sup>
<i>F</i> 值		10.059	7.313	13.180	39.322	13.688
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注:与对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与A组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与B组比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$ 。

表3 4组CyP、GDF-15、IL-18水平比较( $\bar{x} \pm s$ )  
Table 3 Comparison of CyP, GDF-15, and IL-18 levels in the 4 groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	CyP-A (ng/L)	CyP-B (ng/L)	GDF-15 (ng/L)	IL-18 (pg/mL)
对照组	30	7.5±1.2	135.3±9.3	223.6±13.5	215.3±15.4
A组	36	9.9±2.4 <sup>a</sup>	168.7±11.1 <sup>a</sup>	310.1±15.2 <sup>a</sup>	303.5±16.7 <sup>a</sup>
B组	32	11.8±2.6 <sup>ab</sup>	189.5±12.8 <sup>ab</sup>	377.6±21.8 <sup>ab</sup>	399.8±20.4 <sup>ab</sup>
C组	22	13.8±3.0 <sup>abc</sup>	201.2±12.4 <sup>abc</sup>	572.8±25.6 <sup>abc</sup>	642.3±27.7 <sup>abc</sup>
F值		8.775	10.210	16.892	18.300
P值		0.000	0.000	0.000	0.000

注:与对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与A组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与B组比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$ 。

### 3 讨论

高血压可导致患者左心室负荷过大,心肌细胞受到肾素-血管紧张素-醛固酮系统(Renin-angiotensin-aldosterone system, RAAS)过度激活的影响,导致相关蛋白合成明显增加,引发间质胶原增加及心肌细胞肥大,从而导致心脏收缩期和舒张末压张力上升,心排量降低,左心室功能受损<sup>[8]</sup>。在高血压疾病进展中,炎症反应发挥重要作用<sup>[10]</sup>。TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 等均可由单核巨噬细胞产生,这些细胞因子异常激增可导致机体一系列的炎症反应及病理改变。研究表明<sup>[9]</sup>,炎症因子可导致心肌细胞,血管平滑肌细胞及血管内皮细胞一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)活性及表达增加,局部NO增多,NO介导并降低儿茶酚胺的正性肌力作用,从而导致心肌细胞凋亡,促进心室重构。BNP为心源性神经激素,其血清水平高低与心室壁张力、心室负荷存在密切关系,BNP是判断左心室收缩功能不全的敏感指标。T-AOC反应了机体总抗氧化能力,其反映了局部炎症因子水平及氧化应激水平。本研究结果证实,炎症细胞因子过度激活促进了高血压患者心功能障碍的发生发展。

CyP-A、CyP-B为CyP家族中较为重要的两种,研究表明CyP-A、CyP-B与机体细胞炎症因子及血管细胞因子存在密切关联<sup>[10]</sup>。机体存在血管受损及氧化应激状态时,可导致CyP-A、CyP-B水平升高。CyP-A、CyP-B升高进一步促进炎症因子聚集于病变部位,引发机体抗氧化能力降低,促进内皮细胞增殖并导致TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 等指标异常<sup>[11]</sup>。研究显示<sup>[12]</sup>,在心肌缺血、心肌压力负荷过大及炎症反应等情况下,心脏及血清中GDF-15浓度迅速升高。GDF-15可抑制细胞凋亡和心肌重

塑,是心血管重要的保护因子。但研究还发现<sup>[13]</sup>,GDF-15在抗心肌细胞肥大的同时,也可促进心肌成纤维细胞增殖及胶原沉积。IL-18可与其受体结合在机体免疫调节、抗感染、抗肿瘤等过程中发挥重要作用。研究指出<sup>[14]</sup>,IL-18可促进血管平滑肌细胞增殖、迁徙,引发血管重塑,促进高血压及其并发症的进展。近年来研究表明<sup>[15]</sup>,IL-18与心血管疾病发生发展相关。

本研究中结果提示CyP-A、CyP-B、GDF-15、IL-18对于反应高血压合并心功能不全患者疾病程度具有明显价值。高血压合并心功能不全患者心血管不良事件的发生风险明显增大,患者发生心力衰竭导致的猝死率是正常人群的5倍<sup>[16]</sup>。通过相关指标检测可提供高血压患者心功能状态诊断的准确性和全面性,为患者的预防、危险分层和预后评估提供重要依据。

综上所述,高血压合并心功能不全患者机体炎症因子、CyP、GDF-15、IL-18水平明显升高,并与心功能障碍程度存在明显关系,临床上应注意观测CyP、GDF-15、IL-18水平变化,以预防和降低高血压患者心功能损伤的发生。

### 参考文献

- [1] 宋秀玲,王晔. 高血压的预防与控制[J]. 华南预防医学, 2015, 41(3): 287-290.
- [2] 潘广杰,李松森,陈艳,等. 血清前蛋白转化酶枯草溶菌素9、亲环素A与冠心病影响因素及冠状动脉病变的关系[J]. 中国老年学杂志, 2018, 38(16): 3862-3864.
- [3] Vuković Dejanović V, Bogavac-Stanojević N, Kotur Steviljević J, et al. Circulating levels of inflammatory parameters pentraxin-3, cyclophilin and heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in patients with ST-elevation myocardial infarction [J]. Scand J clin lab invest, 2020, 80(1): 66-72.

(下转第620页)

## miR-182-5p 调节细胞自噬促进胃癌细胞的增殖、迁移和侵袭

相绿竹<sup>1</sup> 王晔<sup>2</sup> 陈文<sup>2</sup> 赵琦<sup>1</sup> 彭瑞<sup>1</sup> 牟晓峰<sup>2\*</sup>

**[摘要]** 目的 探讨 miR-182-5p 调节细胞自噬对胃癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响。方法 实时定量聚合酶链式反应检测胃癌与癌旁组织、正常胃上皮细胞 GES-1 与胃癌细胞株 BGC-823 中 miR-182-5p 的表达。细胞荧光和免疫印迹实验检测细胞自噬。细胞计数试剂盒 8(CCK-8)实验、划痕实验和侵袭实验分别检测细胞增殖、迁移和侵袭。结果 与癌旁组织和 GES-1 相比,胃癌组织和 BGC-823 细胞株中 miR-182-5p 的表达显著增加( $P<0.05$ );相比于对照组,特殊化学修饰的微小 RNA 激动剂组自噬水平增强,微管相关蛋白 1 轻链 3B(LC3B)II/I 和 Beclin1 表达增加、脂质体 1(SQSTM1 或 P62)表达减少,特殊化学修饰的微小 RNA 拮抗剂组结果相反( $P<0.05$ );过量表达 miR-182-5p 后,细胞增殖、迁移和侵袭能力增强,抑制 miR-182-5p 表达后,细胞增殖、迁移和侵袭能力减弱( $P<0.05$ )。结论 miR-182-5p 可能是通过增强自噬作用促进胃癌细胞的增殖、迁移和侵袭,miR-182-5p 可作为胃癌的潜在治疗靶点。

**[关键词]** miR-182-5p; 胃癌; 自噬; 增殖; 迁移; 侵袭

### miR-182-5p promotes proliferation, migration and invasion of gastric cancer cells by regulating autophagy

XIANG Lvzhu<sup>1</sup>, WANG Ye<sup>2</sup>, CHEN Wen<sup>2</sup>, ZHAO Qi<sup>1</sup>, PENG Rui<sup>1</sup>, MU Xiaofeng<sup>2\*</sup>

(1. Department of Medicine, Qingdao University, Qingdao, Shandong, China, 266021; 2. Clinical Laboratory, Qingdao Central Hospital, Qingdao, Shandong, China, 266042)

**[ABSTRACT]** Objective To investigate the effects of miR-182-5p on the proliferation, migration and invasion of gastric cancer cells by regulating autophagy. Methods Real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) was used to detect the expression of miR-182-5p in gastric cancer and paracancerous tissues, normal gastric epithelial cells GES-1 and gastric cancer cells BGC-823. Autophagy was detected by cytofluorescence and western blot. CCK-8 assay, scratch assay and Transwell assay were used to detect the effects of miR-182-5p on proliferation, migration and invasion, respectively. Results Compared with paracancerous tissues and GES-1 cells, the expression of miR-182-5p was significantly increased in gastric cancer tissues and BGC-823 cells ( $P<0.05$ ); Compared with the control group, the level of autophagy was increased, the expression of LC3B II/I and Beclin1 were increased, the expression of P62 was decreased in miR-182-5p agomir cells, and the level of autophagy was decreased in miR-182-5p antagomir group ( $P<0.05$ ); the proliferation, migration and invasion of BGC-823 cells were increased after overexpression of miR-182-5p in BGC-823 cells, the proliferation, migration and invasion of BGC-823 cells were decreased by inhibiting the expression of miR-182-5p ( $P<0.05$ ). Conclusion miR-182-5p may promotes proliferation, migration and invasion of gastric cancer cells by enhancing the level of autophagy, and it might be a potential therapeutic target for gastric cancer.

**[KEY WORDS]** miR-182-5p; gastric cancer; autophagy; proliferation; migration; invasion

基金项目:国家自然科学基金项目(81670822,81370990);青岛市医疗卫生重点学科建设项目(青卫科教学[2017]9号)

作者单位:1. 青岛大学医学部, 山东, 青岛 266021

2. 青岛市中心医院检验科, 山东, 青岛 266042

\*通信作者:牟晓峰, E-mail: muxiaofeng2005@126.com

胃癌是常见的消化道恶性肿瘤,其发病率在我国消化道恶性肿瘤中居首位,2015年中国胃癌的患病人数为679 100,其中死亡人数为498 000<sup>[1]</sup>。早期胃癌多无明显症状,大约有80%的胃癌患者在确诊时已属中晚期或发生转移,长期生存率仍然比较低<sup>[2]</sup>。因此进一步探讨胃癌的发病机制,寻找胃癌的分子治疗靶点具有重要的临床意义。已有研究表明 miR-182-5p 参与肺癌<sup>[3]</sup>、肝癌<sup>[4]</sup>以及乳腺癌<sup>[5]</sup>等肿瘤的发生发展,但 miR-182-5p 在胃癌中的作用存在争议<sup>[6-7]</sup>。自噬在胃癌的发生发展过程中具有双重要作用,这可能与胃癌的分子类型、分期以及涉及的通路有关<sup>[8-9]</sup>。生物信息学分析表明 miR-182-5p 可直接或间接作用于自噬通路的关键基因来调控胃癌细胞自噬,但胃癌中的 miR-182-5p 的表达、自噬水平以及两者对细胞增殖、迁移和侵袭的影响尚不明确。因此本研究通过探讨 miR-182-5p 调节自噬对胃癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响,为寻找胃癌的分子治疗靶点提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 组织标本和细胞培养

收集的16对胃癌和相应癌旁组织标本(距癌组织2 cm,经本医院病理医师鉴定癌旁组织无癌变),均来自青岛市中心医院2015年至2018年手术后取得,肿瘤淋巴结转移分期(Tumor, Node, Metastasis, TNM)为T2N0M0Ib期。患者年龄47~74岁,中位年龄63岁。患者参与前均签署知情同意书,标本收集符合本院伦理委员会的要求。人胃癌细胞株BGC-823和正常胃上皮细胞GES-1购自湖南丰晖生物科技有限公司,细胞系均用含有10%胎牛血清和1%青霉素-链霉素的1640培养基,于37℃、5%的CO<sub>2</sub>培养箱中培养。特殊化学修饰的微小RNA激动剂(miR-182-5p agomir)可增加 miR-182-5p 的表达,特殊化学修饰的微小RNA拮抗剂(miR-182-5p antagomir)可降低 miR-182-5p 的表达,分别以特殊化学修饰的微小RNA激动剂无模板对照物(miR-182-5p agomir no template control, miR-182-5p agomir NTC)和特殊化学修饰的微小RNA拮抗剂无模板对照物(miR-182-5p antagomir no template control, miR-182-5p antagomir NTC)为对照,分为 miR-182-5p agomir NTC 组与 miR-182-5p agomir 组、miR-182-5p antagomir NTC 组与 miR-182-5p antagomir 组。

### 1.2 主要仪器和试剂

实时定量聚合酶链式反应仪器购自美国 Applied Biosystem 公司,免疫印迹装置购自美国 Bio-Rad 公司,显微镜购自德国 Carl Zeiss 公司。miR-182-5p agomir 与 miR-182-5p agomir NTC、miR-182-5p antagomir 与 miR-182-5p antagomir NTC 购自广州锐博生物科技有限公司;Master Mix 试剂购自美国 Applied Biosystem 公司;抗体购自英国 Abcam 公司[抗脂质体1(Sequestosome1, SQSTM1 或 P62)抗体的货号 ab56416,抗 Beclin1 抗体的货号 ab207612,抗微管相关蛋白1轻链3B(microtubule associated protein 1 light chain 3 beta, LC3B)抗体的货号 ab51520];腺病毒-荧光标签蛋白-微管相关蛋白1轻链3B购自中国上海汉恒生物科技有限公司。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 实时定量聚合酶链式反应检测 miR-182-5p 的表达

Trizol 法提取总 RNA 后,反转录为 cDNA。以 cDNA 为模板,用特异性引物(has-miR-182-5p-F: GGG TTT GGC AAT GGT AGA ACT CA, has-miR-182-5p-R: CCA GTG CAG GGT CCG AGG T)进行扩增,以 U6(U6-F: CTC GCT TCG GCA GCA CA, U6-R: AAC GTT CAC GAA TTT GCG T)为内参。体系如下:模板 4.6 μL,引物 0.4 μL, Master Mix 5.0 μL。反应程序为 95℃ 3 min, 95℃ 15 s, 60℃ 1 min, 执行 40 个循环。

#### 1.3.2 细胞荧光检测自噬水平

以 2×10<sup>4</sup> 个/孔的细胞密度种于已放置爬片的 48 孔板中,培养 12 h 后进行干预,同时每组均加 HBAD-GFP-LC3B 病毒。继续培养 4 h 后,更换培养基,并补加干预物质,48 h 后,预冷甲醇固定、4, 6-联脒-2-苯基吲哚染色,封片后于显微镜下拍照统计。

#### 1.3.3 免疫印迹法检测蛋白的表达

细胞样品提取总蛋白,并测定浓度。进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,冰上转聚偏二氟乙烯膜(polyvinylidene fluoride, PVDF),室温封闭 1 h 后,加入一抗(抗 Beclin1 抗体、1:5 000,抗 P62 抗体、1:1 000,抗 LC3B 抗体、1:3 000)4℃过夜孵育,用含 0.05%吐温-20 的缓冲盐溶液(Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH7.5)洗膜后,加入二抗(1:3 000)室温孵育 1 h,洗膜后显影成像。

### 1.3.4 CCK-8 (cell counting kit 8, CCK-8) 法检测细胞增殖

以  $8 \times 10^3$  个/孔的细胞密度种于 96 孔板中, 12 h 后进行干预, 培养 1、2、3、4 d。每孔加入 10  $\mu$ L CCK-8 试剂后, 孵育 2 h, 用酶标仪检测各孔的光密度值。

### 1.3.5 划痕实验检测细胞迁移

以  $6 \times 10^5$  个/孔的细胞密度种于 6 孔板中, 12 h 后进行划痕, 磷酸盐缓冲液 (0.01 M, pH 7.5) 清洗 3 次后, 于显微镜下拍照。每孔加入无血清培养基并进行干预, 继续培养 72 h 后, 于显微镜下拍照并计算细胞迁移率。

### 1.3.6 侵袭实验检测细胞侵袭

提前将 Transwell 小室 (一种有通透性的支架或膜滤器) 的上室用基质胶涂覆, 然后将无血清培养基重悬的细胞悬液, 以  $2 \times 10^4$  个/小室的密度接种于上室, 下室中加入 500  $\mu$ L 含有 10% 胎牛血清的培养基, 培养 12 h 后进行干预。48 h 后, 4% 多聚甲醛固定 15 min、0.1% 结晶紫染色 5 min, 磷酸盐缓冲液淋洗后, 于显微镜下拍照并统计。

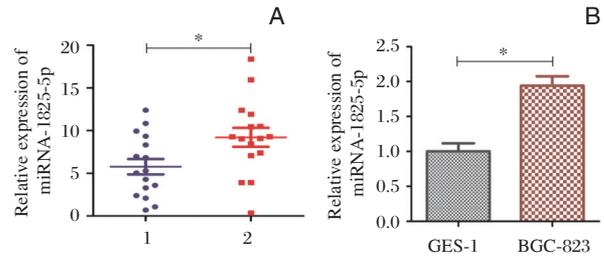
## 1.4 统计学方法

统计学处理采用 Graph Pad Prism 5 软件自带的统计学分析模块进行。计数资料以 % 表示计量资料的表达用 ( $\bar{x} \pm s$ ) 的形式表示。正态分布资料两组之间的比较采用 *t* 检验,  $P < 0.05$  认为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 miR-182-5p 在胃癌组织和 BGC-823 细胞株中表达升高

相比于癌旁组织, 胃癌组织中 miR-182-5p 的表达上调, 差异有统计学意义 ( $t=2.421, P < 0.05$ ) (图 1A); 同样, BGC-823 细胞中 miR-182-5p 的表达显著高于正常胃上皮细胞 GES-1, 差异有统计学意义 ( $t=6.757, P < 0.05$ ) (图 1B)。



注: A. miR-182-5p 在 16 对胃癌/癌旁组织中的相对表达量; B. miR-182-5p 在胃癌 BGC-823 细胞中的相对表达量。1 为 adjacent tissue; 2 为 tumor tissue; \* $P < 0.05$  表示与对照组相比, 差异有统计学意义。

图 1 miR-182-5p 在胃癌组织和胃癌细胞中的相对表达量  
Figure 1 Relative expression of miR-182-5p in gastric cancer tissues and cells

### 2.2 miR-182-5p 增强胃癌细胞株 BGC-823 的自噬水平

相比于对照组, miR-182-5p agomir 组自噬细胞百分比增加, 自噬相关蛋白 Beclin1 增加、P62 减少、LC3B-II/I 增加, 整体自噬水平增强, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ) (表 1, 图 2A, 图 2B), 而 miR-182-5p antagomir 组整体自噬水平减弱, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 2, 图 2C, 图 2D。

### 2.3 miR-182-5p 促进胃癌细胞株 BGC-823 的增殖

相比于对照组, miR-182-5p agomir 组细胞增殖能力增强, 而 miR-182-5p antagomir 组细胞增殖能力降低, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见图 3。

### 2.4 miR-182-5p 促进胃癌细胞株 BGC-823 的迁移

相比于对照组, miR-182-5p agomir 组划痕面积明显减小 (划痕闭合百分比 %  $65.67 \pm 7.77$  vs  $45.33 \pm 11.93$ ), 细胞迁移能力明显增强, 而 miR-182-5p antagomir 组细胞迁移能力减弱 (划痕闭合百分比 %  $25.67 \pm 5.89$  vs  $44.33 \pm 9.29$ ), 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见图 4。

表 1 miR-182-5p 过表达对胃癌细胞 BGC-823 自噬水平的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 The effects of miR-182-5p overexpression on autophagy in BGC-823 cells ( $\bar{x} \pm s$ )

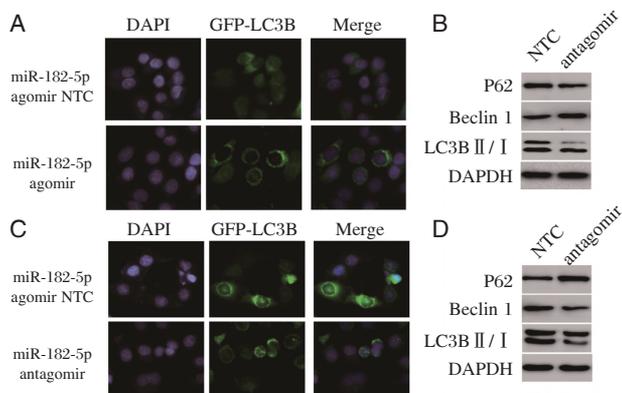
分组	自噬细胞百分比	Beclin1	P62	LC3B-II/I
agomir NTC	36.670 $\pm$ 10.020	1.059 $\pm$ 0.181	1.053 $\pm$ 0.189	1.080 $\pm$ 0.252
agomir	48.330 $\pm$ 7.506 <sup>a</sup>	1.395 $\pm$ 0.172 <sup>a</sup>	0.665 $\pm$ 0.115 <sup>a</sup>	2.340 $\pm$ 0.396 <sup>a</sup>
<i>t</i> 值	8.030	8.382	5.878	15.130
<i>P</i> 值	0.015	0.014	0.027	0.004

注: 与 agomir NTC 组比较, <sup>a</sup>  $P < 0.05$ 。

表2 miR-182-5p低表达对胃癌细胞BGC-823自噬水平的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 The effects of low expression of miR-182-5p on autophagy in BGC-823 cells ( $\bar{x} \pm s$ )

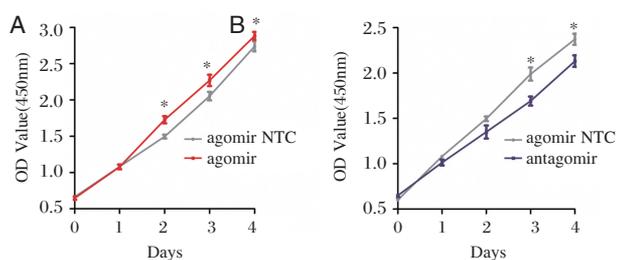
分组	自噬细胞百分比	Beclin1	P62	LC3B- II / I
antagomir NTC	37.000±11.140	1.023±0.156	1.017±0.355	1.085±0.258
antagomir	28.330±9.504	0.671±0.132	1.557±0.221	0.503±0.166
<i>t</i> 值	7.211	16.87	4.356	5.916
<i>P</i> 值	0.019	0.004	0.049	0.027



注: A. miR-182-5p agomir组及其对照组的细胞免疫荧光实验图( $\times 200$ ); B. miR-182-5p agomir组及其对照组的自噬相关蛋白实验图; C. miR-182-5p antagomir组及其对照组的细胞免疫荧光实验图( $\times 200$ ); D. miR-182-5p antagomir组及其对照组的自噬相关蛋白实验图。 $*P < 0.05$ 表示与对照组相比,差异有统计学意义。

图2 miR-182-5p对BGC-823细胞自噬的影响

Figure 2 The effects of miR-182-5p on autophagy in BGC-823 cells



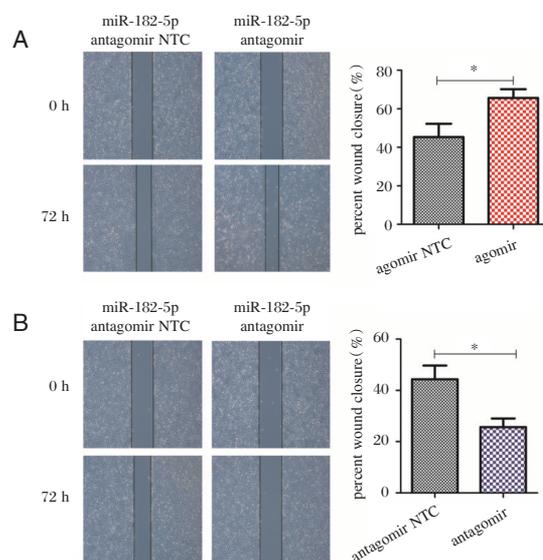
注: A. miR-182-5p agomir组及其对照组的细胞增殖情况; B. miR-182-5p antagomir组及其对照组的细胞增殖情况。 $*P < 0.05$ 表示与对照组相比,差异有统计学意义。

图3 miR-182-5p对BGC-823细胞增殖能力的影响

Figure 3 The effects of miR-182-5p on the proliferation of BGC-823 cells

## 2.5 miR-182-5p促进胃癌细胞株BGC-823的侵袭

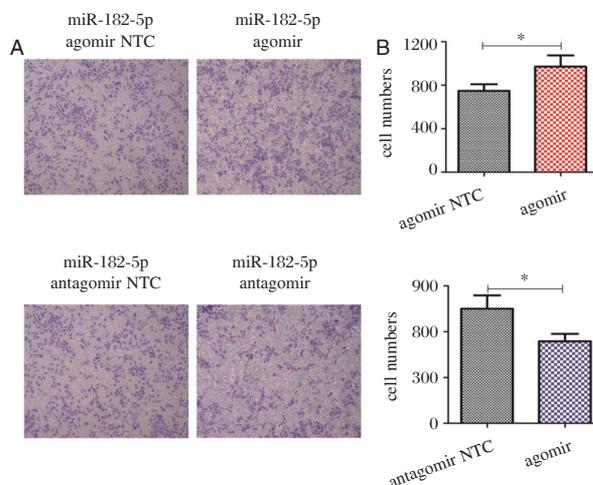
miR-182-5p agomir组通过基质胶的细胞数多于其对照组( $970.0 \pm 180.0$  vs  $747.0 \pm 106.7$ ), miR-182-5p antagomir组通过基质胶的细胞数少于其对照组( $537.0 \pm 84.5$  vs  $750.3 \pm 152.5$ )个,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。见图5。



注: A. miR-182-5p agomir组及其对照组的细胞迁移实验图; B. miR-182-5p antagomir组及其对照组的细胞迁移实验图

图4 miR-182-5p对BGC-823细胞迁移能力的影响( $\times 40$ )

Figure 4 The effects of miR-182-5p on the migration of BGC-823 cells ( $\times 40$ )



注: A. miR-182-5p agomir组及其对照组的细胞侵袭; B. miR-182-5p antagomir组及其对照组的细胞侵袭实验图

图5 miR-182-5p对BGC-823细胞侵袭能力的影响( $\times 40$ )

Figure 5 The effects of miR-182-5p on the invasion of BGC-823 cells ( $\times 40$ )

### 3 讨论

微小核糖核酸(microRNA, miRNA)主要参与转录水平基因表达的调控,在肿瘤发生和转移中发挥重要作用。miR-182-5p在胃癌的发生发展中的作用还存在争议,有研究发现与健康人群相比,胃癌患者血清中miR-182-5p的表达升高,可以作为潜在的生物标志物<sup>[6]</sup>;Ramadan等<sup>[10]</sup>人也发现胃癌患者的外周血和组织中miR-182-5p的表达升高,且与患者较短的生存期和不良预后相关;有研究发现胃癌细胞HCG-27中miR-182-5p表达上调,且miR-182-5p可通过下调Ras相关蛋白Rab-27A(Ras-related protein Rab-27A, RAB27A)促进胃癌细胞的增殖和迁移<sup>[11]</sup>,这提示miR-182-5p可促进胃癌的发生发展。然而,有研究发现miR-182-5p在胃癌组织中显著低表达,过表达miR-182-5p可抑制胃癌细胞的增殖以及集落形成,同时发现胃癌细胞中癌基因ANUB1[即锌指,AN1型结构域4(zinc finger, AN1-type domain 4, ZFAND4)]与miR-182-5p形成负反馈环路,共同调节胃癌的进展<sup>[7]</sup>。存在以上差异可能是由于研究者所研究的细胞来源和类型不同所致,也可能与miR-182-5p和其上下游复杂的调控网络之间相互作用有关。本研究发现在16对胃癌组织和胃癌细胞BGC-823中miR-182-5p表达升高,且下调miR-182-5p的表达时,胃癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力减弱,支持了miR-182-5p作为促癌分子的假设,为进一步的机制研究提供了新的实验依据。

miRNA可以直接或间接作用于自噬通路的关键基因,调控细胞自噬,进而影响肿瘤的发生发展。最近的研究发现,miR-423-3p通过调节与B淋巴细胞瘤-2蛋白相互作用介导细胞死亡的调节分子(B-cell lymphoma-2 interactig mediator of cell death, Bim)的表达能够激活具有促癌作用的自噬过程,促进肿瘤发展<sup>[12]</sup>,Fan H等<sup>[13]</sup>人也发现miR-let-7a在胃癌细胞中通过靶向雷帕霉素不敏感的mTOR分子伴侣(Rapamycin-insensitive companion of mTOR, Rictor)调节自噬过程,促进胃癌的发生发展,这提示降低miR-423-3p和miR-let-7a的表达可以降低胃癌细胞自噬水平,从而达到抑制肿瘤生长的目的。当然也有研究发现miR-1265可以通过降低钙结合蛋白39(calcium binding protein 39, CAB39)的表达,进而调节一磷酸腺苷激活蛋白激

酶-哺乳动物雷帕霉素靶点(Adenosine Mono Phosphate-activated protein kinase-mammalian target of rapamycin, AMPK-mTOR)信号传导途径来抑制胃癌细胞自噬,进而抑制胃癌细胞的增殖,促进胃癌细胞的凋亡,为胃癌的治疗提供潜在的治疗靶点<sup>[14]</sup>。miRNA对自噬的调控存在的这些差异可能与miRNA分子的不同、所研究的胃癌分期不同以及信号通路的不同有关,需要明确miRNA在自噬过程和肿瘤生长转移中的作用,从而更好地为治疗提供理论依据。本研究发现miR-182-5p表达上调时,细胞自噬水平增强,提示胃癌细胞可通过自噬过程进行自我更新,进一步促进胃癌的发生发展。

本研究将miR-182-5p与细胞自噬相结合,不仅丰富了miRNA的研究内容,也为自噬的研究提供了不同的途径。根据TargetScan等数据库预测可知,B淋巴细胞瘤-2基因(B-cell lymphoma-2, BCL-2)是miR-182-5p的靶基因之一,其负调控Bcl-1的表达,增强细胞自噬水平,但miR-182-5p对自噬调控的具体分子机制仍需进一步研究。总的来说,本研究发现miR-182-5p可能通过增强细胞自噬水平,促进胃癌细胞的增殖、迁移和侵袭,这提示miR-182-5p可作为胃癌治疗的一个潜在靶点,进一步为胃癌的治疗提供一定的参考。

### 参考文献

- [1] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132.
- [2] Song Z, Wu Y, Yang J, et al. Progress in the treatment of advanced gastric cancer[J]. Tumour Biol, 2017, 39(7): 1-7.
- [3] Luo J, Shi K, Yin SY, et al. Clinical value of miR-182-5p in lung squamous cell carcinoma: a study combining data from TCGA, GEO, and RT-qPCR validation[J]. World J Surg Oncol, 2018, 16(1): 76-92.
- [4] Cao MQ, You AB, Zhu XD, et al. miR-182-5p promotes hepatocellular carcinoma progression by repressing FOXO3a[J]. J Hematol Oncol, 2018, 11(1): 12-24.
- [5] Sharifi M, Moridnia A. Apoptosis-inducing and antiproliferative effect by inhibition of miR-182-5p through the regulation of CASP9 expression in human breast cancer[J]. Cancer Gene Ther, 2017, 24(2): 75-82.
- [6] Mohamed WA, Schaal MF. The expression profiling of circulating miR-204, miR-182, and lncRNA H19 as novel potential biomarkers for the progression of peptic ulcer to gastric cancer[J]. J Cell Biochem, 2019, 120(8): 13464-13477.

(下转第638页)

· 论 著 ·

## miR-148a-3p 靶向 *DLL4* 基因影响婴幼儿血管瘤内皮细胞增殖和凋亡

李海燕\* 李凡

**[摘要]** 目的 探讨 miR-148a-3p 靶向 Delta 样配体 4 (DLL4) 对婴幼儿血管瘤内皮细胞增殖和凋亡的影响。方法 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR)、蛋白质印记 (Western blot) 检测 miR-148a-3p、DLL4 在血管瘤组织、正常皮肤组织中的表达。将血管瘤内皮细胞分为 miR-NC、miR-148a-3p、si-NC、si-DLL4、miR-148a-3p+pcDNA、miR-148a-3p+pcDNA-DLL4 组。采用四甲基偶氮唑盐 (MTT) 法、流式细胞术检测细胞活力和凋亡。双荧光素酶报告实验和 Western blot 确定 miR-148a-3p 和 DLL4 的调控关系。结果 与正常皮肤组织比较, 血管瘤组织中 miR-148a-3p 表达降低, DLL4 表达增加, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。过表达 miR-148a-3p 或抑制 DLL4 后, 血管瘤内皮细胞活力降低, 凋亡率增加, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。与过表达 miR-148a-3p 比较, 过表达 DLL4 可逆转 miR-148a-3p 对血管瘤内皮细胞增殖、凋亡的影响, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。miR-148a-3p 靶向负调控 DLL4 表达。结论 本研究表明 miR-148a-3p 通过靶向 DLL4 可抑制血管瘤内皮细胞增殖, 促进细胞凋亡, 是婴幼儿血管瘤的潜在治疗靶点。

**[关键词]** miR-148a-3p; Delta 样配体 4; 婴幼儿血管瘤; 细胞增殖; 凋亡

## miR - 148a - 3p inhibits proliferation and promotes apoptosis of infantile hemangioma endothelial cells by targeting *DLL4*

LI Haiyan\*, LI Fan

(Newborn department of anyang maternal and child health hospital, Anyang, Henan, China, 455000)

**[ABSTRACT]** Objective To investigate the effects of miR-148a-3p on the proliferation and apoptosis of infantile hemangioma endothelial cells by targeting Delta-like ligand 4 (DLL4). Methods The expressions of miR-148a-3p and DLL4 in hemangiomas and normal skin were detected by real-time quantitative PCR (RT-qPCR) and Western blot. Hemangioma endothelial cells were divided into miR-NC, miR-148a-3p, si-NC, si-DLL4, miR-148a-3p + pcDNA, miR-148a-3p + pcDNA-DLL4 groups. Methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) method and flow cytometry were utilized to detect cell viability and apoptosis. Results Compared with the normal skin tissue, the expression of miR-148a-3p was decreased in hemangiomas, while the expression of DLL4 was increased, the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). Over-expression of miR-148a- and down-regulation of DLL4, hemangioma endothelial cell viability was decreased, and the apoptosis rate was increased, the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). Compared with the over-expression of miR-148a-3p, over-expression of DLL4 reversed the effects of miR-148a-3p on hemangioma endothelial cell proliferation and apoptosis, the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). miR-148a-3p negatively regulates DLL4 expression. Conclusion miR-148a-3p inhibits the proliferation and promotes apoptosis of hemangioma endothelial cells by targeting DLL4, suggesting a potential therapeutic target for infantile hemangiomas.

**[KEY WORDS]** MiR-148a-3p; Delta-like ligand 4; Hemangioma in infants and young children; Cell proliferation; Apoptosis

基金项目: 河南省卫健委资助项目 (20180722x)

作者单位: 安阳市妇幼保健院新生儿科, 河南, 安阳 455000

\*通信作者: 李海燕, E-mail: lihaiyan44@163.com

婴幼儿血管瘤(*Infant hemangioma, IH*)是一类以血管内皮细胞增殖为特征的胚胎性良性肿瘤,约占先天性皮肤血管病变的80%,多见于早产儿和低出生体重儿<sup>[1]</sup>。虽然是一种良性肿瘤,但由于多生长于面部,往往影响患者身心健康,严重时也会导致面部畸形,甚至危及生命<sup>[2]</sup>。然而,目前缺乏理想的治疗方法。微小RNA(*microRNA, miRNA*)是一类约为22个核苷酸的非编码RNA,其通过与靶mRNA特异性结合抑制翻译或促进降解参与细胞增殖、凋亡等多种过程,是肿瘤的潜在治疗靶点<sup>[3-4]</sup>。miR-148a-3p是近年发现的抑癌基因,非小细胞肺癌组织中miR-148a-3p表达降低,过表达miR-148a-3p可降低癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力<sup>[5]</sup>。过表达miR-148a-3p还可抑制食管癌细胞增殖,诱导细胞凋亡<sup>[6]</sup>。生物信息学分析显示,(*Delta-like ligand 4, DLL4*)是miR-148a-3p的潜在靶基因。DLL4已被证实在DLL4在增生期IH组织中高表达并促进IH内皮细胞的增殖<sup>[7]</sup>。然而,miR-148a-3p是否靶向DLL4参与IH进展尚未可知。本研究以DLL4为切入点,探讨miR-148a-3p对IH内皮细胞增殖和凋亡的影响及其潜在机制,以期对IH临床治疗提供有效靶点。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

收集2016年1月至2019年3月于本院确诊的120例增殖期IH组织标本。其中男孩52例,女孩68例,年龄中位数为7个月。所有样本均经我院病理科分析证实。所有患者及家属均已签署知情同意书,并获得我院伦理委员会批准。

M199培养液购于上海钰博生物;SYBR Green Master Mix购于大连Takara公司;miR-148a-3p模拟物、抑制物、DLL4过表达质粒及其相应对照由上海生工公司提供;四甲基偶氮唑蓝(*methyl thiazolyl tetrazolium, MTT*)、膜联蛋白-异硫氰酸荧光素/碘化丙啶(*Annexin V-FITC/PI*)细胞凋亡检测试剂盒购于上海碧云天公司;兔源DLL4抗体、细胞周期素D1(*CyclinD1*)抗体、P21抗体、B细胞淋巴瘤-2(*B cell lymphoma -2, Bcl-2*)抗体、Bcl相关X蛋白(*Bcl-associated X protein, Bax*)抗体、磷酸甘油醛脱氢酶(*glyceraldehyde phosphate dehydrogenase, GAPDH*)抗体,山羊抗兔IgG二抗购于上海赛信通公司。

### 1.2 细胞培养

参照侯团结等<sup>[8]</sup>的方法分离血管瘤内皮细胞。采用M199培养液于37℃,5% CO<sub>2</sub>,饱和湿度的培养箱中培养血管瘤内皮细胞,每隔1天换液一次,30 d后长成单层细胞,铺满瓶底后进行消化和传代。

### 1.3 RT-qPCR 检测

TRIzol试剂提取血管瘤组织、正常皮肤组织、各组细胞总RNA,逆转录为cDNA,利用SYBR Green Master Mix试剂配制PCR反应体系,2<sup>-ΔΔCt</sup>法分析miR-148a-3p(内参为U6)、*DLL4* mRNA(内参为GAPDH)表达水平。

### 1.4 细胞转染

接种血管瘤内皮细胞至96孔板,当细胞汇合度达到80%时,利用lipofectamine 2000分别转染miR-148a-3p mimics、miR-NC、si-NC、si-DLL4、miR-148a-3p mimics+pcDNA、miR-148a-3p mimics+pcDNA-DLL4至血管瘤内皮细胞,转染48 h检测转染效果后进行下一步实验。

### 1.5 MTT法检测细胞活力

取3×10<sup>3</sup>个细胞接种到96孔板,24、48、72 h时每孔加入20 μL的MTT试剂,37℃孵育4 h后,吸出培养基,每孔加入150 μL的二甲基亚砷,震荡溶解后酶标仪检测490 nm处各孔的吸光度值。

### 1.6 流式细胞术检测细胞凋亡

预冷的磷酸盐缓冲液洗涤细胞2次,并悬浮于100 μL的1×结合缓冲液中。分别加入5 μL的Annexin V-FITC、PI染色,流式细胞仪检测细胞凋亡率。

### 1.7 Western blot 检测蛋白表达

提取细胞蛋白后进行蛋白定量。取适量蛋白样品,按照聚丙烯酰胺凝胶;转膜;膜的封闭;一抗孵育;二抗孵育;化学发光显色;灰度值分析步骤进行。

### 1.8 双荧光素酶报告实验

含有miR-148a-3p结合位点序列或突变序列的3'-UTR-DLL4的野生型或突变型(WT或MUT-DLL4)荧光素酶报告载体由上海吉玛制药技术有限公司提供。WT/MUT-DLL4分别与miR-148a-3p mimics或miR-NC转染血管瘤内皮细胞,48 h时检测各组细胞荧光素酶活性。

### 1.9 统计学分析

采用SPSS 20.0进行数据统计分析。计数资料

用  $n$  表示, 计量资料用  $(\bar{x} \pm s)$  表示。两组间比较采用  $t$  检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 进一步两两比较采用 SNK- $q$  检验。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 miR-148a-3p 和 DLL4 在血管瘤组织中的表达

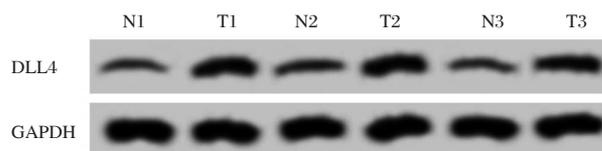
血管瘤组织中 miR-148a-3p 的表达较正常皮肤组织降低, *DLL4* mRNA 和 DLL4 蛋白的表达较正常组织增加, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见图 1 和表 1。

### 2.2 miR-148a-3p 过表达对血管瘤内皮细胞增殖和凋亡的影响

与 miR-NC 组比较, miR-148a-3p 组血管瘤内皮细胞 miR-148a-3p 表达显著升高, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。过表达 miR-148a-3p 后血管瘤内皮细胞 24~72 h 细胞活力、CyclinD1 和 Bcl-2 蛋白表达显著降低, 凋亡率、p21 和 Bax 蛋白表达增加, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 2。

### 2.3 抑制 DLL4 表达对血管瘤内皮细胞增殖和凋亡的影响

与 si-NC 组比较, si-DLL4 组血管瘤内皮细胞



注: N 为正常皮肤组织; T 为血管瘤组织

图 1 DLL4 蛋白表达

Figure 1 DLL4 protein expression

表 1 miR-148a-3p 和 DLL4 在血管瘤组织中的表达 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Expression of miR-148a-3p and DLL4 in hemangioma tissue ( $\bar{x} \pm s$ )

分组	$n$	miR-148a 3p	<i>DLL4</i> mRNA	DLL4 蛋白
正常皮肤组织组	120	1.00±0.07	1.00±0.08	0.21±0.02
血管瘤组织组	120	0.52±0.05	3.25±0.31	0.59±0.05
$t$ 值	-	61.125	76.986	77.299
$P$ 值	-	0.000	0.000	0.000

DLL4 蛋白表达显著降低, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。抑制 DLL4 表达后血管瘤内皮细胞 24~72 h 细胞活力、CyclinD1 和 Bcl-2 蛋白表达显著降低, 凋亡率、p21 和 Bax 蛋白表达增加, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 3。

表 2 miR-148a-3p 过表达对血管瘤内皮细胞增殖和凋亡的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Effects of overexpressing miR-148a-3p on proliferation and apoptosis of hemangioendothelial cells ( $\bar{x} \pm s$ )

分组	miR-148a-3p	OD 值 (490 nm)			凋亡率 (%)	CyclinD1 蛋白	p21 蛋白	Bcl-2 蛋白	Bax 蛋白
		24 h	48 h	72 h					
miR-NC 组	1.00±0.08	0.37±0.03	0.72±0.07	1.12±0.09	8.36±0.83	0.68±0.06	0.18±0.02	0.77±0.07	0.27±0.03
miR-148a-3p 组	2.93±0.28	0.32±0.03	0.43±0.04	0.62±0.06	22.14±2.21	0.22±0.02	0.57±0.05	0.30±0.03	0.62±0.06
$t$ 值	19.883	3.536	10.791	13.868	17.512	21.820	21.726	18.514	15.652
$P$ 值	0.000	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

表 3 抑制 DLL4 表达对血管瘤内皮细胞增殖和凋亡的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 3 Effect of inhibiting DLL4 on proliferation and apoptosis of hemangioendothelial cells ( $\bar{x} \pm s$ )

分组	DLL4 蛋白	OD 值 (490 nm)			凋亡率 (%)	CyclinD1 蛋白	p21 蛋白	Bcl-2 蛋白	Bax 蛋白
		24 h	48 h	72 h					
si-NC 组	0.63±0.06	0.39±0.03	0.75±0.07	1.14±0.09	7.56±0.71	0.69±0.06	0.19±0.02	0.79±0.07	0.24±0.03
si-DLL4 组	0.25±0.03	0.37±0.03	0.51±0.05	0.69±0.06	19.47±1.56	0.28±0.03	0.54±0.05	0.36±0.03	0.60±0.06
$t$ 值	16.994	1.414	8.370	12.481	20.846	18.336	19.498	16.939	16.100
$P$ 值	0.000	0.176	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

### 2.4 miR-148a-3p 靶向调控 DLL4 的表达

TargetScan 在线预测显示, miR-148a-3p 与 DLL4 的 3'-UTR 区域存在互补核苷酸序列, 见图 2。双荧光素酶报告实验显示, 与转染 miR-NC 比

较, 转染 miR-148a-3p mimics 可降低 WT-DLL4 的荧光素酶活性, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 而对 MUT-DLL4 的荧光素酶活性无显著影响, 见表 4。Western blot 检测显示, miR-148a-3p 组血管瘤内皮

细胞 DLL4 蛋白表达较 miR-NC 组降低; anti-miR-148a-3p 组血管瘤内皮细胞 DLL4 蛋白表达较 anti-miR-NC 组升高, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见表 5 和图 3。

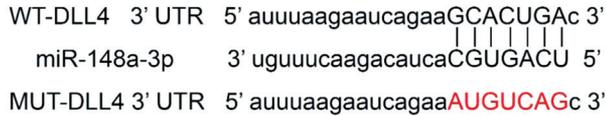


图 2 DLL4 的 3'UTR 中含有与 miR-148a-3p 互补的核苷酸序列

Figure 2 3'UTR of DLL4 contains a complementary nucleotide sequence to miR-148a-3p

表 4 双荧光素酶报告实验 ( $\bar{x} \pm s$ )

分组	WT-DLL4	MUT-DLL4
miR-NC 组	1.02±0.06	1.04±0.08
miR-148a-3p 组	0.49±0.04	1.01±0.07
<i>t</i> 值	22.049	0.847
<i>P</i> 值	0.000	0.410

### 2.5 DLL4 过表达逆转 miR-148a-3p 对血管瘤内皮细胞增殖和凋亡的作用

与 miR-NC 组比较, miR-148a-3p 组血管瘤内皮细胞 24~72 h 细胞活力、DLL4、CyclinD1 和 Bcl-2 蛋白表达显著降低, 凋亡率、p21 和 Bax 蛋白表达增加; 与 miR-148a-3p+pcDNA 组比较, miR-148a-3p+pcDNA-DLL4 组血管瘤内皮细胞 24~72 h 细胞活力、DLL4、CyclinD1 和 Bcl-2 蛋白表达显著增加, 凋亡率、p21 和 Bax 蛋白表达降低 ( $P < 0.05$ )。见表 6。

表 6 DLL4 过表达逆转了 miR-148a-3p 对血管瘤内皮细胞增殖和凋亡的作用 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 6 Overexpressing DLL4 reverses the effects of miR-148a-3p on proliferation and apoptosis of hemangioendothelial cell ( $\bar{x} \pm s$ )

分组	DLL4 蛋白	OD 值 (490 nm)			凋亡率 (%)	CyclinD1 蛋白	p21 蛋白	Bcl-2 蛋白	Bax 蛋白
		24 h	48 h	72 h					
miR-NC 组	0.62±0.06	0.38±0.03	0.73±0.07	1.13±0.09	6.59±0.63	0.67±0.06	0.17±0.02	0.78±0.07	0.26±0.03
miR-148a-3p 组	0.24±0.03 <sup>a</sup>	0.31±0.03 <sup>a</sup>	0.44±0.04 <sup>a</sup>	0.65±0.06 <sup>a</sup>	21.45±2.18 <sup>a</sup>	0.23±0.02 <sup>a</sup>	0.58±0.05 <sup>a</sup>	0.31±0.03 <sup>a</sup>	0.64±0.06 <sup>a</sup>
miR-148a-3p+pcDNA 组	0.23±0.03	0.30±0.03	0.41±0.03	0.60±0.05	23.64±2.33	0.22±0.02	0.59±0.06	0.29±0.03	0.66±0.06
miR-148a-3p+pcDNA-DLL4 组	0.53±0.05 <sup>b</sup>	0.37±0.03 <sup>b</sup>	0.64±0.05 <sup>b</sup>	0.98±0.08 <sup>b</sup>	11.05±1.18 <sup>b</sup>	0.56±0.05 <sup>b</sup>	0.28±0.03 <sup>b</sup>	0.67±0.06 <sup>b</sup>	0.37±0.03 <sup>b</sup>
<i>F</i> 值	181.823	16.667	87.394	114.990	201.212	275.130	220.054	217.718	157.967
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

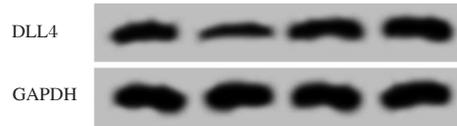
注: 与 miR-NC 组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与 miR-148a-3p+pcDNA 组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ 。

表 5 miR-148a-3p 调控 DLL4 蛋白的表达 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 5 miR-148a-3p regulates DLL4 protein expression ( $\bar{x} \pm s$ )

分组	DLL4 蛋白
miR-NC 组	0.60±0.06
miR-148a-3p 组	0.25±0.02 <sup>a</sup>
anti-miR-NC 组	0.58±0.05
anti-miR-148a-3p 组	0.87±0.08 <sup>b</sup>
<i>F</i> 值	179.814
<i>P</i> 值	0.000

注: 与 miR-NC 组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与 anti-miR-NC 组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$



注: 1. miR-NC; 2. miR-148a-3p; 3. anti-miR-NC; 4. anti-miR-148a-3p。

图 3 DLL4 蛋白表达

Figure 3 DLL4 protein expression

### 3 讨论

近年来多项研究揭示了 miRNA 在血管瘤进展中的重要作用。例如, miR-424 的表观遗传沉默可促进血管瘤内皮细胞生长, 抑制细胞凋亡<sup>[9]</sup>。上调 miR-206 可降低血管瘤内皮细胞的增殖和侵袭能力, 增加细胞凋亡<sup>[10]</sup>。下调 miR-130a 可显著抑制血管瘤的生长和血管生成<sup>[11]</sup>。本研究发现 IH 组织中 miR-148a-3p 表达低于正常皮肤组织, 于是推测 miR-148a-3p 表达异常与 IH 进展有关。功能获得实验显示, miR-148a-3p 的恢复可显著抑制血管瘤内皮细胞的增殖并诱导凋亡。进一步分

析细胞增殖和凋亡调控因子表达发现,过表达 miR-143 显著诱导 p21 和 Bax 的表达,并降低 CyclinD1 和 Bcl-2 表达。p21 蛋白是一种内源性细胞周期蛋白依赖性激酶(Cyclin-dependent kinases, CDK)抑制剂,其通过抑制 cyclin/CDK 复合物的活性阻止 G1/S 相变<sup>[12]</sup>。Bax 和 Bcl-2 细胞凋亡的关键调控因子,Bax 表达增加和 Bcl-2 表达降低可促进线粒体膜孔的开放,促进细胞色素 c 的释放,促进线粒体介导的细胞凋亡。与本研究结论类似,miR-148a-3p 在宫颈癌<sup>[13]</sup>、食管癌<sup>[14]</sup>、口腔癌<sup>[15]</sup>中亦呈低表达,上调其表达可抑制肿瘤的恶性进展。以上结果表明,miR-148a-3p 在 IH 生长中起抑制作用。

为了更深入地了解 miR-148a-3p 抑制 IH 内皮细胞生长的机制,本研究通过生物信息学预测发现 DLL4 是 miR-148a-3p 的潜在靶基因。DLL4 是 Notch 受体的配体之一,其主要表达与内皮细胞,在调节肿瘤血管生成中起着关键作用。研究显示 DLL4 促进肾细胞癌生长、侵袭及血管生成进而促进肿瘤的血行转移<sup>[16]</sup>。沉默 DLL4 可抑制乳腺癌细胞增殖并诱导凋亡<sup>[17]</sup>。本研究发现 IH 组织中 DLL4 表达增加,与前人<sup>[7]</sup>研究结果吻合。功能缺失实验显示,抑制 DLL4 抑制血管瘤内皮细胞的增殖并诱导凋亡,诱导 p21 和 Bax 的表达,抑制 CyclinD1 和 Bcl-2 表达。同时本研究发现 DLL4 是 miR-148a-3p 的靶基因,过表达 miR-148a-3p 可抑制 DLL4 表达,而抑制 miR-148a-3p 则促进 DLL4 表达。此外,恢复实验显示过表达 DLL4 可减弱 miR-148a-3p 介导的血管瘤内皮细胞增殖抑制和凋亡促进作用。表明 miR-148a-3p 靶向 DLL4 是其抑制 IH 生长的重要机制。

总之,本研究表明血管瘤组织中 miR-148a-3p 表达下调,过表达 miR-148a-3p 通过靶向 DLL4 抑制血管瘤内皮细胞增殖和诱导凋亡,这一发现为 IH 的治疗提供了潜在靶点。

## 参考文献

- [1] Smith CJF, Friedlander SF, Guma M, et al. Infantile Hemangiomas: An Updated Review on Risk Factors, Pathogenesis, and Treatment[J]. Birth Defects Res, 2017, 109(11): 809-815.
- [2] Mackey WS. Infantile Hemangioma with a Focus on Airway Hemangioma[J]. ORL Head Neck Nurs, 2016, 34(2): 18-23.
- [3] 韩俊,赵静,张立群.丙泊酚调控 miR-133a/SOX4 表达对结肠直肠癌 HCT116 细胞增殖凋亡的影响[J].分子诊断与治疗杂志,2019,11(3):238-244.
- [4] 钟文,肖烈钢,易瑶,等.miR-4295 在鼻咽癌细胞增殖中的作用[J].热带医学杂志,2019,19(11):1343-1347.
- [5] Xie Q, Yu Z, Lu Y, et al. microRNA-148a-3p inhibited the proliferation and epithelial-mesenchymal transition progression of non-small-cell lung cancer via modulating Ras/MAPK/Erk signaling[J]. J Cell Physiol, 2019, 234(8): 12786-12799.
- [6] Wang Y, Hu Y, Guo J, et al. miR-148a-3p Suppresses the Proliferation and Invasion of Esophageal Cancer by Targeting DNMT1[J]. Genet Test Mol Biomarkers, 2019, 23(2): 98-104.
- [7] 罗亚楠,黄远红,冯雷,等.VEGF 和 DLL4 在婴幼儿血管瘤组织中的表达及相关性[J].中国皮肤性病科学杂志,2016,30(3):225-227+232.
- [8] 侯亚结,刘漪沧,李平松,等.肿瘤抑素对婴幼儿血管瘤内皮细胞增殖活力与细胞周期的影响[J].实用临床医药杂志,2013,17(7):8-11.
- [9] Fei Z, Qiu M, Qi X, et al. MicroRNA-424 suppresses the proliferation of hemangioma-derived endothelial cells by targeting VEGFR-2[J]. Mol Med Rep, 2018, 18(4): 4065-4071.
- [10] 徐建国,杨超,邢新,等.上调 miR-206 对婴幼儿血管瘤内皮细胞生长状态和侵袭能力的影响[J].中国美容整形外科杂志,2016,27(4):238-241.
- [11] Gao F, Wang FG, Liu RR, et al. Epigenetic silencing of miR-130a ameliorates hemangioma by targeting tissue factor pathway inhibitor 2 through FAK/PI3K/Rac1/mdm2 signaling[J]. Int J Oncol, 2017, 50(5): 1821-1831.
- [12] Liu YW, Xia R, Lu K, et al. LincRNAFEZF1-AS1 represses p21 expression to promote gastric cancer proliferation through LSD1-Mediated H3K4me2 demethylation[J]. Mol Cancer, 2017, 16(1): 39-49.
- [13] Li H, Hong J, Wijayakulathilaka WSMA. Long non-coding RNA SNHG4 promotes cervical cancer progression through regulating c-Met via targeting miR-148a-3p[J]. Cell Cycle, 2019, 18(23): 3313-3324.
- [14] Tang Y, Yang P, Zhu Y, et al. LncRNA TUG1 contributes to ESCC progression via regulating miR-148a-3p/MCL-1/Wnt/ $\beta$ -catenin axis in vitro[J]. Thorac Cancer, 2020, 11(1): 82-94.
- [15] Jeong C, Ma J, Lai W. RALBP1 regulates oral cancer cells via Akt and is a novel target of miR-148a-3p and miR-148b-3p[J]. J Oral Pathol Med, 2019, 48(10): 919-928.
- [16] 黄庆波.血管内皮特异性因子 DLL4 在肾细胞癌肿瘤生长、侵袭、血管生成及血行转移中的作用[D].中国人民解放军医学院,2015.
- [17] 王群,余明华,王耕,等.RNAi 沉默 DLL4 基因对人乳腺癌细胞株 MCF-7 增殖与凋亡的影响[J].现代肿瘤医学,2012,20(12):2476-2479.

## 滑膜组织 Galectin-3、BMP-2 蛋白在骨关节炎患者中的表达及临床价值

赵丽莉<sup>1\*</sup> 高宇<sup>1</sup> 梁湏<sup>2</sup> 罗毅<sup>1</sup>

**[摘要]** 目的 探究滑膜组织半乳糖凝集素 3(Galectin-3)、骨形成蛋白-2(BMP-2)在骨关节炎(OA)患者中的表达及临床价值。方法 选取本院2017年6月至2019年8月收治的OA患者126例作为观察组,另选取同期因膝关节韧带损伤或半月板损伤行关节镜诊治患者124例作为对照组。采用免疫组化染色法检测两组滑膜组织 Galectin-3、BMP-2,采用 Logistic 分析两者与 OA 发病的关系,对比不同病情程度患者滑膜组织 Galectin-3、BMP-2、关节液炎症标记物[白介素-6(IL-6)、白介素-8(IL-8)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )]水平,采用 Pearson 分析滑膜组织 Galectin-3、BMP-2 与关节液炎症标记物相关性。结果 观察组滑膜组织 Galectin-3、BMP-2 阳性表达率高于对照组,差异有统计学意义( $P<0.05$ );滑膜组织 Galectin-3、BMP-2 与 OA 发病显著相关,差异有统计学意义( $P<0.05$ );滑膜组织 Galectin-3、BMP-2 阳性表达率随病情程度增加呈升高趋势;关节液 IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$  水平随病情程度增加呈升高趋势,差异有统计学意义( $P<0.05$ );滑膜组织 Galectin-3 与关节液 IL-6( $r=0.515$ )、IL-8( $r=0.635$ )、TNF- $\alpha$ ( $r=0.620$ )呈正相关,滑膜组织 BMP-2 与关节液 IL-6( $r=0.602$ )、IL-8( $r=0.499$ )、TNF- $\alpha$ ( $r=0.634$ )呈正相关,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。结论 滑膜组织 Galectin-3、BMP-2 在 OA 患者中呈高表达,与 OA 的发病和病情显著相关,并与关节液炎症因子表达呈正相关,提示检测滑膜组织 Galectin-3、BMP-2 可辅助 OA 及其严重程度诊断和预后的判断。

**[关键词]** 滑膜组织;半乳糖凝集素 3; BMP-2 蛋白;骨关节炎;炎症因子

### Expression of Galectin - 3 and BMP - 2 in synovial tissues in patients with osteoarthritis and their clinical application

ZHAO Lili<sup>1\*</sup>, GAO Yu<sup>1</sup>, LIANG Yun<sup>2</sup>, LUO Yi<sup>1</sup>

(1. Second Department of bone, The first hospital of zhangjiakou, Zhangjiakou, Hebei, China, 075000;

2. Laboratory Department, The first hospital of zhangjiakou, Zhangjiakou, Hebei, China, 075000)

**[ABSTRACT]** Objective To investigate the expression and clinical application of galectin-3 and bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) in synovial tissues in patients with osteoarthritis (OA). Methods A total of 126 OA patients admitted in our hospital from June 2017 to August 2019 were enrolled as the observation group, another 124 patients who underwent arthroscopy for knee ligament injury or meniscus injury during the same period were selected as the control group. Immunohistochemical staining was used to detect Galectin-3 and BMP-2 in the synovial tissues of the two groups. Logistic analysis was used to analyze the relationship between the two and the incidence of OA. The levels of Galectin-3, BMP-2 and joint fluid inflammation markers [interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )] in synovial tissues were measured and compared. The Pearson was used to analyze the correlation between synovial tissue Galectin-3,

基金项目:张家口市科技指导性计划项目(1521034D)

作者单位:1. 河北省张家口市第一医院医院骨二科,河北,张家口 075000

2. 河北省张家口市第一医院医院检验科,河北,张家口 075000

\*通信作者:赵丽莉, E-mail: lijinhong1509@163.com

**BMP-2 and synovial inflammation markers. Results** The positive expression rate of Galectin-3 and BMP-2 in the synovial tissue of the observation group was higher than that of the control group ( $P<0.05$ ). Galectin-3 and BMP-2 in synovial tissues were significantly related to the incidence of OA ( $P<0.05$ ). The positive expression rates of Galectin-3 and BMP-2 in synovial tissues increased with the increase of disease severity ( $P<0.05$ ). The levels of IL-6, IL-8 and TNF- $\alpha$  in synovial fluid increased with the increase of disease severity ( $P<0.05$ ). Galectin-3 of synovial tissue is positively correlated with IL-6 ( $r=0.515$ ), IL-8 ( $r=0.635$ ), and TNF- $\alpha$  ( $r=0.620$ ) in synovial fluid. BMP-2 in synovial tissue was positively correlated with IL-6 ( $r=0.602$ ), IL-8 ( $r=0.499$ ) and TNF- $\alpha$  ( $r=0.634$ ) in synovial fluid ( $P<0.05$ ). **Conclusion** Galectin-3 and BMP-2 in synovial tissues are highly expressed in patients with OA, which is related to the pathogenesis of OA. Interestingly, both of Galectin-3 and BMP-2 are positively correlated with the expression of inflammatory factors in synovial fluid, suggesting that the detection of synovial tissue Galectin-3, BMP-2 could be assist in the diagnosis and prognosis of OA.

[KEY WORDS] Synovial tissue; Galectin-3; BMP-2 protein; Osteoarthritis; Inflammatory factors

骨关节炎(Osteoarthritis, OA)是一种滑膜关节退行性疾病,在病程中滑膜组织可通过分泌致炎因子,造成软骨下骨硬化、关节软骨丢失、疼痛等,影响关节正常功能,致残率较高,严重降低患者生活质量,因此加强对OA的研究具有重要意义<sup>[1]</sup>。半乳糖凝集素3(Galectin-3)可调控细胞生长、凋亡等,在人工椎间盘病变患者标本中可检测到阳性表达,与椎间盘退变有关,并具有体外诱导炎症因子表达的功能,故推测其可能与OA有关<sup>[2]</sup>。骨形成蛋白-2(Bone morphogenetic protein-2, BMP-2)能促进成骨细胞分化,加速前十字韧带重建后的骨愈合,但在OA中的研究较少<sup>[3]</sup>。本研究探究滑膜组织 Galectin-3、BMP-2 在 OA 患者中的表达及临床价值,报告如下。

## 1 资料和方法

### 1.1 主要试剂

兔抗人 Galectin-3 单克隆一抗、生物素化的二抗(美国 Santa Cruz 公司);兔抗人 BMP-2 单克隆一抗、生物素化的二抗(北京百奥莱博科技有限公司);DAB 显色剂(上海信裕生物科技有限公司)。

### 1.2 一般资料

选取本院 2017 年 6 月至 2019 年 8 月收治的 OA 患者 126 例作为观察组,另选取同期因膝关节韧带损伤或半月板损伤行关节镜诊治术患者 124 例作为对照组。两组性别、年龄、体质指数、患病侧、饮酒史、吸烟史、合并疾病等资料比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ ),但有可比性。

纳入标准:①OA 组均符合 OA 诊断标准<sup>[4]</sup>;②临床资料完整;③无认知、精神障碍;④单侧病变者;⑤所有患者及家属均已签署知情同意书。

表 1 两组临床资料对比 [ $n(\%)$ , ( $\bar{x}\pm s$ )]

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

资料	观察组 ( $n=126$ )	对照组 ( $n=124$ )	$t/\chi^2$ 值	$P$ 值
年龄(岁)	55.49 $\pm$ 4.10	55.18 $\pm$ 4.42	0.575	0.566
性别(男/女)	66/60	59/65	0.576	0.448
体质指数 ( $\text{kg}/\text{m}^2$ )	22.25 $\pm$ 1.79	22.31 $\pm$ 1.73	0.269	0.788
患病侧				
左侧	58(46.03)	63(50.81)	0.571	0.450
右侧	68(53.97)	61(49.19)		
饮酒史	57(45.24)	52(41.94)	0.277	0.599
吸烟史	51(40.48)	56(45.16)	0.560	0.454
合并疾病				
高脂血症	20(15.87)	16(12.90)	0.447	0.504
糖尿病	9(7.14)	11(8.87)	0.254	0.615
心脏病	5(3.97)	3(2.42)	0.113	0.737
高血压	6(4.76)	4(3.23)	0.088	0.767

排除标准:①合并系统性红斑狼疮者;②伴有血液系统疾病者;③存在恶性肿瘤者;④合并严重凝血功能障碍者;⑤伴有急性感染类疾病者。根据 WOMAC 骨关节炎指数<sup>[5]</sup>评估判断病情程度研究经本院伦理委员会同意批准。

### 1.4 方法

#### 1.4.1 滑膜组织 Galectin-3、BMP-2 表达

采用免疫组化染色法检测,滑膜组织标本固定,脱水,包埋,连续切片,60 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中烤片过夜,脱腊至水。3%双氧水冲洗载玻片,PBS液冲洗3次 $\times$ 5 min,复合酶37 $^{\circ}\text{C}$ 修复标本10 min,按照1:100比例滴加兔抗人 Galectin-3、BMP-2 单克隆一抗,37 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒孵育1.5 h,室温下复温0.5 h,PBS冲洗3次 $\times$ 5 min。滴加生物素化的二抗,室温静置

0.5 h, PBS 洗 3 次×5 min。滴加 DAB 显色剂显色 5 min, 苏木精复染, 脱水透明, 中性树胶封片。显微镜下观察, 细胞膜、细胞核或细胞质有棕色颗粒附着为阳性, 仅有片状、黄染或无颗粒附着为阴性, 通过 Image-Pro Plus6.0 软件分析, 200 倍镜下随机选取 5 个视野, 滑膜组织 Galectin-3、BMP-2 阳性表达率为滑膜组织阳性染色面积占视野下组织总面积的平均光密度。

### 1.3.2 关节液炎症标记物检测

严格无菌操作, 抽取患膝关节液 1 mL, 3 000 r/min 离心 10 min 采用酶联免疫吸附法检测上清白介素-6(Interleukin-6, IL-6)、白介素-8(Interleukin-8, IL-8)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (Tumor necrosis factor, TNF- $\alpha$ )表达, IL-6 试剂盒购于艾美捷科技有限公司, IL-8 购于武汉赛培生物科技有限公司, TNF- $\alpha$  购于齐一生物科技(上海)有限公司。

### 1.4 观察指标

①比较两组滑膜组织 Galectin-3、BMP-2 水平/浓度的差异。②分析滑膜组织 Galectin-3、BMP-2 与 OA 诊断的关系。③比较不同 OA 严重程度患者滑膜组织 Galectin-3、BMP-2 表达。④比较不同 OA 严重程度患者关节液炎症标记物(IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$ )水平。⑤分析滑膜组织 Galectin-3、BMP-2 与关节液炎症标记物相关性。

### 1.5 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件进行数据处理, 计数资料用  $n(\%)$  表示、 $\chi^2$  检验, 计量资料以  $(\bar{x} \pm s)$  表示, 多组间比较以单因素方差分析, 两两比较以 LSD-t 检验, 采用 Logistic 分析滑膜组织 Galectin-3、BMP-2 与 OA 发病的关系, 采用 Pearson 分析滑膜组织 Galectin-3、BMP-2 与关节液炎症标记物相关性。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 两组滑膜组织 Galectin-3、BMP-2 阳性表达率比较

观察组滑膜组织 Galectin-3、BMP-2 阳性表达率高于对照组, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 见表 2、图 1。

### 2.2 滑膜组织 Galectin-3、BMP-2 与 OA 发病的关系

Logistic 回归分析显示, 滑膜组织 Galectin-3、BMP-2 与 OA 诊断显著相关, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 见表 3。

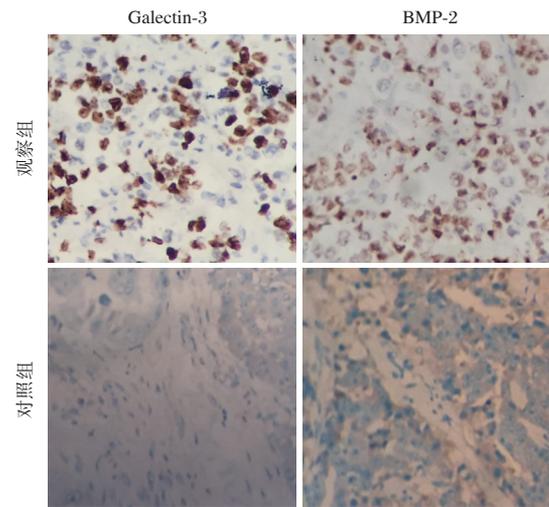


图 1 两组滑膜组织 Galectin-3、BMP-2 ( $\times 400$ )

Figure 1 Galectin-3 and BMP-2 of 2 groups of synovial tissue ( $\times 400$ )

表 2 两组滑膜组织 Galectin-3、BMP-2 比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Comparison of Galectin-3 and BMP-2 in 2 groups of synovial tissues ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	Galectin-3(%)	BMP-2(%)
观察组	126	42.47±6.78	28.63±5.26
对照组	124	5.82±1.39	8.72±2.14
t 值		58.985	39.086
P 值		<0.001	<0.001

表 3 滑膜组织 Galectin-3、BMP-2 与 OA 发病的关系

Table 3 Relationship between galectin-3, BMP-2 and the incidence of OA in synovial tissue

变量	$\beta$ 值	S.E. 值	Wald/ $\chi^2$ 值	P 值	OR 值	95%CI
Galectin-3	1.901	0.517	13.526	<0.001	6.695	3.441~13.028
BMP-2	1.720	0.463	13.800	<0.001	5.584	2.695~11.572

### 2.3 不同 OA 严重程度患者滑膜组织 Galectin-3、BMP-2 的比较

滑膜组织 Galectin-3、BMP-2 阳性表达率随病情程度增加呈升高趋势, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 见表 4。

### 2.4 不同 OA 严重程度患者关节液炎症标记物

关节液 IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$  水平随病情程度增加呈升高趋势, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 见表 5。

### 2.5 滑膜组织 Galectin-3、BMP-2 与关节液炎症标记物相关性

Pearson 相关性分析, 滑膜组织 Galectin-3 与关

表4 不同病情程度患者滑膜组织 Galectin-3、BMP-2 比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 4 Comparison of Galectin-3 and BMP-2 in synovial tissues of patients with different levels of disease ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	Galectin-3(%)	BMP-2(%)
轻度患者	38	31.77±5.83	20.05±4.16
中度患者	56	42.08±6.29	27.44±5.27
重度患者	32	55.86±7.10	40.90±6.74
F值		124.278	132.326
P值		<0.001	<0.001

表5 不同病情程度患者关节液炎症标记物比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 5 Comparison of synovial inflammation markers in patients with different disease levels ( $\bar{x} \pm s$ )

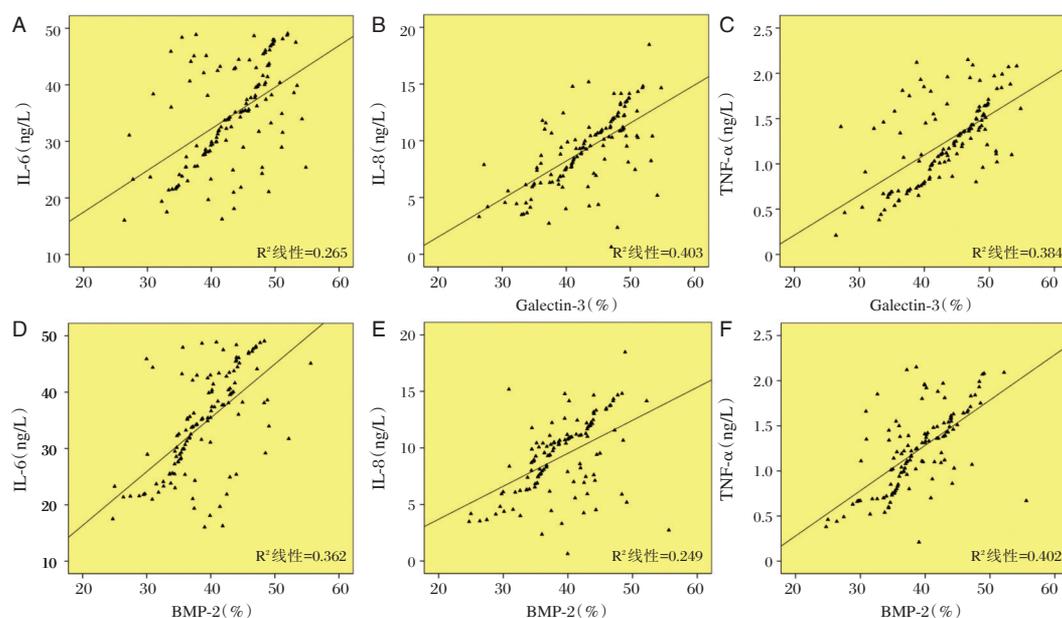
组别	n	IL-6(ng/L)	IL-8(ng/L)	TNF-α(ng/L)
轻度患者	38	13.15±3.82	6.01±1.80	0.52±0.20
中度患者	56	35.94±10.20	9.53±3.04	1.23±0.57
重度患者	32	61.08±16.33	14.29±4.11	2.14±0.68
F值		169.027	63.706	83.291
P值		<0.001	<0.001	<0.001

节液 IL-6 ( $r=0.515$ )、IL-8 ( $r=0.635$ )、TNF-α ( $r=0.620$ )呈正相关,滑膜组织 BMP-2 与关节液 IL-6 ( $r=0.602$ )、IL-8 ( $r=0.499$ )、TNF-α ( $r=0.634$ )呈正相关,差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ),见图2。

### 3 讨论

目前普遍认为,OA 是一种由滑膜、软骨、骨等参与的炎症性疾病,其炎症通路是由 IL-6、IL-8、TNF-α 等多种细胞因子参与的,各炎症因子水平被证实与 OA 患者病情有关,能持续刺激滑膜、软骨等,造成组织损伤,并诱导成纤维细胞、基质金属蛋白酶分泌,导致滑膜增生、边缘骨赘形成、关节间隙变窄等,从而诱发 OA<sup>[6-7]</sup>。

Galectin-3 是半乳糖凝集素家族中一个结构独特的成员,在多种组织中均有表达<sup>[8]</sup>。抑制 Galectin-3 表达能明显下调基质金属蛋白酶3表达,抑制核因子-κB 信号通路,减轻脂多糖诱导的软骨细胞炎症损伤,呈现出软骨保护特性<sup>[9]</sup>。本研究显示,OA 患者滑膜组织 Galectin-3 表达高于因膝关节韧带损伤或半月板损伤行关节镜诊治术患者,与 OA 诊断显著相关,并随病情严重程度增加呈升高趋势。分析其原因,Galectin-3 可刺激成纤维细胞生长,被激活的成纤维细胞可附着于骨组织和软骨,逐渐破坏关节结构,并介导细胞黏附、白细胞趋化,参与炎症反应、组织纤维化,造成关节损伤,故在 OA 中高表达,与 OA 发病及患者病情有关<sup>[10-11]</sup>。Weinmann 等<sup>[12]</sup>报道显示,Galectin-3 可诱导人骨关节炎中的 IL-6、TNF-α 等,是 OA 进展的分子开关,



注: A. Galectin-3 与 IL-6 相关性; B. Galectin-3 与 IL-8 相关性; C. Galectin-3 与 TNF-α 相关性; D. BMP-2 与 IL-6 相关性; E. BMP-2 与 IL-8 相关性; F. BMP-2 与 TNF-α 相关性。

图2 滑膜组织 Galectin-3、BMP-2 与关节液炎症标记物相关性

Figure 2 correlation between synovial galectin-3, BMP-2 and inflammatory markers of synovial fluid

支持本研究中滑膜组织 Galectin-3 与关节液 IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$  呈正相关的观点,佐证了 Galectin-3 能通过炎症因子参与 OA 的发病。可见从基因水平靶向 Galectin-3,沉默或抑制 Galectin-3 表达,可能有助于改善 OA 的炎症反应情况,缓解或控制 OA 病情,但这一结论仍需更多研究的论证。

BMP-2 是驱动成骨细胞分化和活性的必不可少的生长因子,对骨形成至关重要<sup>[13]</sup>。本研究显示,OA 患者滑膜组织 BMP-2 表达高于因膝关节韧带损伤或半月板损伤行关节镜诊治术患者,与 OA 发病显著相关,与 Weidner 等<sup>[14]</sup>报道相似,可能是由于 OA 滑膜组织的炎症反应刺激及退行性变化,导致 BMP-2 升高,进而参与关节软骨的修复。且本研究还发现,滑膜组织 BMP-2 阳性表达率随病情程度增加呈升高趋势,表明 BMP-2 与 OA 患者病情有关,推测病情越严重,软骨破坏可能更明显,机体为修复软骨产生适应性或应激性变化更大,分泌更多的 BMP-2,以发挥修复作用<sup>[15]</sup>。同时滑膜组织 BMP-2 与 IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$  呈正相关,这一现象是由于 OA 局部的激烈炎症反应可能通过细胞因子网络系统启动了滑膜组织的成骨性能,从而使 BMP-2 与促炎因子呈现出正相关变化<sup>[16]</sup>。而根据以往报道,IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$  均与 OA 临床症状严重程度、关节功能显著相关,佐证了 Galectin-3、BMP-2 与 OA 发病和病情有关<sup>[17]</sup>。提示治疗 OA 时,不仅应重视关节炎症反应的控制,亦应从软骨修复等角度干预,双管齐下,可能有助于提高临床治疗效果。

综上所述,滑膜组织 Galectin-3、BMP-2 在 OA 患者中呈高表达,与 OA 的发病和病情严重程度显著相关,并与关节液炎症因子表达呈正相关,提示检测滑膜组织 Galectin-3、BMP-2 可辅助 OA 及其严重程度的诊断和预后的判断。

### 参考文献

- [1] Jiang L, Xu K, Li J, et al. Nesfatin-1 suppresses interleukin-1 $\beta$ -induced inflammation, apoptosis, and cartilage matrix destruction in chondrocytes and ameliorates osteoarthritis in rats [J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(2):1760-1777.
- [2] Elshamly M, Kinslechner K, Grohs JG, et al. Galectins -1 and -3 in Human Intervertebral Disc Degeneration: Non-Uniform Distribution Profiles and Activation of Disease Markers Involving NF- $\kappa$ B by Galectin-1 [J]. *J Orthop Res*, 2019, 37(10):2204-2216.
- [3] Crispim JF, Fu SC, Lee YW, et al. Bioactive Tape With BMP-2 Binding Peptides Captures Endogenous Growth Factors and Accelerates Healing After Anterior Cruciate Ligament Reconstruction [J]. *Am J Sports Med*, 2018, 46(12):2905-2914.
- [4] 中华医学会骨科学分会. 骨关节炎诊治指南(2007年版) [J]. *中华骨科杂志*, 2007, 27(10):793-796.
- [5] 羊鹏飞,高鹏,李跃军,等. 骨关节炎患者滑膜组织中基质金属蛋白酶3和半乳糖凝集素3的表达及相关性[J]. *中国组织工程研究*, 2019, 23(23):3616-3622.
- [6] Laavola M, Leppänen T, Hämäläinen M, et al. IL-6 in Osteoarthritis: Effects of Pine Stilbenoids [J]. *Molecules*, 2018, 24(1):E109.
- [7] Latourte A, Cherifi C, Maillet J, et al. Systemic inhibition of IL-6/Stat3 signalling protects against experimental osteoarthritis [J]. *Ann Rheum Dis*, 2017, 76(4):748-755.
- [8] Salamanna F, Giavaresi G, Parrilli A, et al. Effects of intra-articular hyaluronic acid associated to Chitlac (arty-duo®) in a rat knee osteoarthritis model [J]. *J Orthop Res*, 2019, 37(4):867-876.
- [9] Wang JS, Xiao WW, Zhong YS, et al. Galectin-3 deficiency protects lipopolysaccharide-induced chondrocytes injury via regulation of TLR4 and PPAR- $\gamma$ -mediated NF- $\kappa$ B signaling pathway [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(6):10195-10204.
- [10] 谭敏枝,刘俊. 独活寄生汤对膝骨关节炎模型大鼠 Wnt/catenin 信号通路的作用研究 [J]. *湖北中医药大学学报*, 2019, 21(5):8-12.
- [11] 范少鹏. 慢病毒介导 BMP-2 过表达质粒转染骨髓间充质干细胞联合丝素蛋白支架向成骨细胞转化的实验研究 [J]. *中国骨伤*, 2019, 32(9):853-860.
- [12] Weinmann D, Kenn M, Schmidt S, et al. Galectin-8 induces functional disease markers in human osteoarthritis and cooperates with galectins-1 and -3 [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2018, 75(22):4187-4205.
- [13] Shirakura M, Kram V, Robinson J, et al. Extracellular Matrix Mediates BMP-2 in a Model of Temporomandibular Joint Osteoarthritis [J]. *Cells Tissues Organs*, 2017, 204(2):84-92.
- [14] Weidner H, Yuan Gao V, Dibert D, et al. CK2.3, a Mimetic Peptide of the BMP Type I Receptor, Increases Activity in Osteoblasts over BMP2 [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(23):E5877.
- [15] Legendre F, Ollitrault D, Gomez-Leduc T, et al. [J]. Enhanced chondrogenesis of bone marrow-derived stem cells by using a combinatory cell therapy strategy with BMP-2/TGF- $\beta$  1, hypoxia, and COL1A1/Htra1 siRNAs, *Sci Rep*, 2017, 7(1):3406.
- [16] Rakic R, Bourdon B, Hervieu M, et al. RNA Interference and BMP-2 Stimulation Allows Equine Chondrocytes Redifferentiation in 3D-Hypoxia Cell Culture Model: Application for Matrix-Induced Autologous Chondrocyte Implantation [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(9):E1842.
- [17] Ruan G, Xu J, Wang K, et al. Associations between serum IL-8 and knee symptoms, joint structures, and cartilage or bone biomarkers in patients with knee osteoarthritis [J]. *Clin Rheumatol*, 2019, 38(12):3609-3617.

· 论 著 ·

## 大株红景天注射液治疗冠心病合并心力衰竭疗效及对患者血清HCY、Gal-3、NT-proBNP水平的影响

张志亮<sup>1</sup> 张鑫<sup>1</sup> 高卫芳<sup>1</sup> 袁宇<sup>2\*</sup>

**[摘要]** **目的** 探讨大株红景天注射液治疗冠心病合并心力衰竭的临床疗效。**方法** 将104例冠心病合并心力衰竭患者随机分为观察组和对照组各52例。对照组患者予以前列地尔治疗,观察组患者在此基础上予以大株红景天注射液治疗。比较两组患者临床疗效,观察治疗前后心功能[左室射血分数(LVEF)、左室舒张末内径(LVEDD)、左室收缩末内径(LVESD)、心排血量(CO)]、心衰标志物[N-末端脑钠肽前体(NT-proBNP)]、内皮功能[内皮素(ET)、一氧化氮(NO)]、氧化应激[丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)]以及血清同型半胱氨酸(HCY)、半乳凝集素-3(Gal-3)水平的变化情况。**结果** 观察组患者治疗总有效率高于对照组( $P<0.05$ );治疗20 d后,两组患者LVEF、CO均较治疗前升高,且观察组高于对照组,LVEDD、LVESD均较治疗前降低,且观察组低于对照组( $P<0.05$ );治疗20 d后,两组患者血清NT-proBNP、ET、MDA、HCY、Gal-3水平均较治疗前降低,且观察组低于对照组( $P<0.05$ ),NO、SOD、CAT水平较治疗前升高,且观察组高于对照组( $P<0.05$ )。**结论** 大株红景天注射液治疗冠心病合并心力衰竭效果显著,可明显改善心功能和内皮功能,减轻心肌损伤,提高抗氧化应激能力,促进疾病转归。

**[关键词]** 冠心病;心力衰竭;大株红景天注射液;同型半胱氨酸;半乳凝集素-3

### Efficacy of Sofren injection in the treatment of coronary heart disease with heart failure and its effects on the serum levels of HCY, Gal-3 and NT-proBNP

ZHANG Zhiliang<sup>1</sup>, ZHANG Xin<sup>1</sup>, GAO Weifang<sup>1</sup>, YUAN Yu<sup>2\*</sup>

(1. Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical College, Xinxiang, Henan, China, 453100; 2. CCU, The First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical College, Xinxiang, Henan, China, 453100)

**[ABSTRACT]** **Objective** To explore the clinical efficacy of Sofren injection in the treatment of coronary heart disease with heart failure. **Methods** 104 patients with coronary heart disease and heart failure were randomly divided into the observation group and the control group, with 52 cases in each group. Patients in the control group were treated with alprostadiol while patients in the observation group were treated with Sofren injection plus alprostadiol. The clinical efficacy of the two groups was compared, and the cardiac function [left ventricular ejection fraction (LVEF), left ventricular end-diastolic diameter (LVEDD), left ventricular end-systolic diameter (LVESD), cardiac output (CO)], heart failure marker [N-terminal pro-brain natriuretic peptide (NT-proBNP)], endothelial function [endothelin (ET), nitric oxide (NO)], oxidative stress [malonaldehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT)] and serum homocysteine (HCY) and galectin-3 (Gal-3) were observed before and after treatment. **Results** The total effective rate of treatment in

基金项目:2018年河南省医学科技攻关计划项目(2018020972)

作者单位:1. 新乡医学院第一附属医院药剂科,河南,新乡 453100

2. 新乡医学院第一附属医院CCU,河南,新乡 453100

\*通信作者:袁宇, E-mail: s40y240uookk6@sina.com

the observation group was higher than that in the control group ( $P<0.05$ ). After 20d of treatment, the LVEF and CO in the two groups were increased compared with those before treatment, and the two indexes in the observation group were higher than those in the control group, and the LVEDD and LVESD were decreased compared with those before treatment, and the two indexes in the observation group were lower than those in the control group ( $P<0.05$ ). After 20d of treatment, the serum levels of NT-proBNP, ET, MDA, HCY and Gal-3 in the two groups were decreased compared with those before treatment, and the levels in the observation group were lower than those in the control group ( $P<0.05$ ), and the levels of NO, SOD and CAT were increased compared with those before treatment, and the levels in the observation group were higher than those in the control group ( $P<0.05$ ). **Conclusion** Sofren injection has a significant effect on coronary heart disease with heart failure. It can significantly improve cardiac function and endothelial function, reduce myocardial damage, improve anti-oxidative stress ability, and promote disease outcome.

[KEY WORDS] Coronary heart disease; Heart failure; Sofren injection; Homocysteine; Galectin-3

冠心病是临床常见的心血管疾病,若病情持续进展,心肌会因供血供氧不足而发生坏死,心肌收缩、舒张功能被影响,严重者可造成心排出量减少,导致心力衰竭(下文简称心衰)的发生,严重威胁患者生命健康<sup>[1]</sup>。冠心病患者发生心衰的几率远远高于正常人群,及时有效地进行抗冠状动脉硬化和抗心衰治疗尤为重要。目前临床对冠心病合并心衰的治疗仍以药物治疗为主,主要目的在于改善心脏血流动力学,减少心肌耗氧,从而减缓心衰进展,提高生存率<sup>[2]</sup>。前列地尔是治疗冠心病心衰的常用药物,其具有扩张血管、抑制血小板聚集的作用,往往与其他抗心衰药物联用<sup>[3]</sup>。大株红景天注射液通过抗缺血、扩张冠状动脉血管、降低

心脏负荷等作用改善心衰症状,主治心血瘀阻型冠心病<sup>[4]</sup>。本研究旨在探讨大株红景天注射液治疗冠心病合并心衰的临床效果,为该疾病的治疗方案选择提供科学依据,现报道如下。

## 1 资料和方法

### 1.1 一般资料

选择2017年10月至2019年8月在本院收治的104例冠心病合并心衰患者为研究对象。根据随机分组原则,将患者分为观察组和对照组各52例。两组患者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。本研究经本院医学伦理委员会批准,患者及家属签署知情同意书。

表1 两组患者一般资料比较( $\bar{x}\pm s$ )

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

组别	<i>n</i>	性别(男/女)	年龄(岁)	NYHA 分级(Ⅱ级/Ⅲ级)	冠心病病程(年)
观察组	52	30/22	55.34±8.41	24/28	8.15±2.07
对照组	52	27/25	56.97±9.05	27/25	8.84±2.11
$\chi^2/t$ 值		0.349	0.951	0.346	1.683
<i>P</i> 值		0.554	0.344	0.556	0.095

注:NYHA 为美国纽约心脏病学会(New York Heart Association)。

入组标准:①符合《中国心力衰竭诊断和治疗指南2014》中相关诊断标准<sup>[5]</sup>;②患者伴有心脏结构改变和典型心衰症状,且经超声心动图检查证实;③无药物禁忌症或过敏史;④依从性良好能配合完成治疗。排除标准:①近期有急性心肌梗死发作史、手术或创伤者;②其他疾病或因素引起的心衰者;③合并严重脏器疾病、血液系统疾病、免疫系统疾病或恶性肿瘤者;④合并严重感染者;⑤合并心肌炎、心包炎、心脏瓣膜病者;⑥合并精神性疾病

不能配合治疗者。

### 1.2 治疗方法

两组患者根据实际病情予以基础治疗:吸氧、强心剂、利尿剂、控制血压和血糖、扩血管,消除心衰诱因,应用抗血小板及他汀类药物进行冠心病二级预防,纠正贫血、电解质紊乱、心律失常,预防和控制感染。对照组患者予以前列地尔注射液(生产企业:哈药集团生物工程有限公司,规格:1 mL:5  $\mu$ g,批准文号:国药准字H20084565)1~

2 mL+10 mL生理盐水静脉注射,1次/d。观察组患者在对照组基础上予以大株红景天注射液(生产企业:通化玉圣药业有限公司,规格:5 mL,批准文号:国药准字Z20060362)10 mL+250 mL生理盐水静脉滴注,1次/d。两组患者均以10 d为一个疗程,治疗2个疗程后观察疗效。

### 1.3 评价指标

①疗效评价标准<sup>[6]</sup>总有效率=(显效+有效)/总例数。②心功能:分别于治疗前、治疗20 d后采取超声心动图测定患者心功能各项指标,包括左室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)、左室舒张末内径(left ventricular end-diastolic diameter, LVEDD)、左室收缩末内径(left ventricular end-systolic diameter, LVESD)、心排血量(cardiac output, CO)。③心衰标志物:分别于治疗前、治疗20 d后采集患者清晨肘静脉血3 mL,常规离心分离血清待检,用酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测N-末端脑钠肽前体(N-terminal pro-brain natriuretic peptide, NT-proBNP)水平,试剂盒来自上海江莱生物科技有限公司。④内皮功能:同上取血清,用放射免疫法检测内皮素(endothelin, ET),试剂盒来自上海信帆生物科技有限公司;用硝酸还原酶法检测一氧化氮(nitric oxide, NO),试剂盒来自上海恪敏生物科技有限公司。⑤氧化应激水平:同上取血清,用硫代巴比妥酸显色法检测丙二醛(malonaldehyde, MDA),黄嘌呤氧化酶法检测超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD),可见光法测定过氧化氢酶(catalase, CAT),试剂盒来自南京建成生物工程研究所。⑥血清因子:同上取血清,用双抗体夹心法检测同型半胱氨酸(homocysteine, HCY),试剂盒来自上海研谨生物科技有限公司;用ELISA检测半

乳凝集素-3(galectin-3, Gal-3),试剂盒来自美国BG medicine公司。

### 1.4 统计学处理

采用SPSS2.1.0软件进行统计分析。计数资料以 $n(\%)$ 表示,组间比较采用 $\chi^2$ 检验;计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,两组间比较采用独立样本 $t$ 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 两组患者临床疗效比较

观察组患者治疗总有效率高高于对照组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表2。

表2 两组患者临床疗效比较 [ $n(\%)$ ]

Table 2 Comparison of clinical efficacy between 2 groups [ $n(\%)$ ]

组别	$n$	显效	有效	无效	总有效
观察组	52	27(51.92)	22(42.31)	3(5.77)	49(94.23)
对照组	52	16(30.77)	25(48.08)	11(21.15)	41(78.85)
$\chi^2$ 值			5.283		
$P$ 值			0.022		

### 2.2 两组患者治疗前后心功能比较

治疗20 d后,两组患者LVEF、CO均较治疗前升高,且观察组高于对照组,LVEDD、LVESD均较治疗前降低,且观察组低于对照组( $P < 0.05$ ),见表3。

### 2.3 两组患者治疗前后心衰标志物、内皮功能比较

治疗20 d后,两组患者血清NT-proBNP、ET水平均较治疗前降低,且观察组低于对照组,NO水平较治疗前升高,且观察组高于对照组( $P < 0.05$ ),见表4。

表3 两组患者治疗前后心功能比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 3 Comparison of cardiac function before and after treatment between the 2 groups ( $\bar{x} \pm s$ )

指标	时间	观察组( $n=52$ )	对照组( $n=52$ )	$t$ 值	$P$ 值
LVEF(%)	治疗前	40.12±7.24	39.23±7.05	0.635	0.527
	治疗后	49.62±8.08 <sup>a</sup>	44.37±7.39 <sup>a</sup>	3.457	0.001
LVEDD(mm)	治疗前	64.10±6.84	63.27±7.12	0.606	0.546
	治疗后	54.48±6.04 <sup>a</sup>	59.32±6.45 <sup>a</sup>	3.950	<0.001
LVESD(mm)	治疗前	45.71±6.37	45.08±6.51	0.499	0.619
	治疗后	36.27±5.35 <sup>a</sup>	40.13±5.98 <sup>a</sup>	3.469	0.001
CO(L/min)	治疗前	5.09±1.01	5.02±0.95	0.364	0.717
	治疗后	5.96±1.02 <sup>a</sup>	5.48±0.97 <sup>a</sup>	2.459	0.016

注:与同组治疗前比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ 。

表4 两组患者治疗前后心衰标志物、内皮功能比较 ( $\bar{x} \pm s$ )Table 4 Comparison of heart failure marker and endothelial function between the 2 groups before and after treatment ( $\bar{x} \pm s$ )

项目	NT-proBNP(mg/L)		ET(ng/L)		NO( $\mu$ mol/L)	
	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
观察组	1.87 $\pm$ 0.33	0.76 $\pm$ 0.20 <sup>a</sup>	124.32 $\pm$ 24.15	70.12 $\pm$ 15.41 <sup>a</sup>	66.47 $\pm$ 12.54	96.12 $\pm$ 18.74 <sup>a</sup>
对照组	1.80 $\pm$ 0.35	1.27 $\pm$ 0.28 <sup>a</sup>	120.48 $\pm$ 26.24	95.34 $\pm$ 19.17 <sup>a</sup>	68.29 $\pm$ 11.47	80.12 $\pm$ 15.36 <sup>a</sup>
<i>t</i> 值	1.049	10.688	0.776	7.394	0.772	4.762
<i>P</i> 值	0.296	<0.001	0.439	<0.001	0.442	<0.001

注:与同组治疗前比较,<sup>a</sup>*P*<0.05。

#### 2.4 两组患者治疗前后氧化应激水平比较

治疗20 d后,两组患者血清MDA水平均较治疗前降低,且观察组低于对照组,SOD、CAT水平均较治疗前升高,且观察组高于对照组(*P*<0.05),见表5。

表5 两组患者治疗前后氧化应激水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )Table 5 Comparison of oxidative stress levels between the two groups before and after treatment ( $\bar{x} \pm s$ )

指标	时间	观察组 ( <i>n</i> =52)	对照组 ( <i>n</i> =52)	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
MDA (nmol/mL)	治疗前	8.02 $\pm$ 1.31	7.91 $\pm$ 1.25	0.438	0.662
	治疗后	5.28 $\pm$ 0.86 <sup>a</sup>	6.35 $\pm$ 1.02 <sup>a</sup>	5.783	<0.001
SOD (U/mL)	治疗前	32.37 $\pm$ 5.23	33.19 $\pm$ 5.84	0.754	0.452
	治疗后	52.17 $\pm$ 8.95 <sup>a</sup>	43.26 $\pm$ 7.85 <sup>a</sup>	5.397	<0.001
CAT (U/mL)	治疗前	5.16 $\pm$ 0.97	5.37 $\pm$ 1.05	1.059	0.292
	治疗后	7.97 $\pm$ 1.33 <sup>a</sup>	6.69 $\pm$ 1.21 <sup>a</sup>	5.133	<0.001

注:与同组治疗前比较,<sup>a</sup>*P*<0.05。

#### 2.5 两组患者治疗前后血清HCY、Gal-3水平比较

治疗20 d后,两组患者血清HCY、Gal-3水平均较治疗前降低,且观察组低于对照组(*P*<0.05),见表6。

表6 两组患者治疗前后血清HCY、Gal-3水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )Table 6 Comparison of levels of serum HCY and Gal-3 between the two groups before and after treatment ( $\bar{x} \pm s$ )

指标	时间	观察组 ( <i>n</i> =52)	对照组 ( <i>n</i> =52)	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
HCY ( $\mu$ mol/mL)	治疗前	19.35 $\pm$ 2.54	19.84 $\pm$ 2.63	0.966	0.336
	治疗后	15.13 $\pm$ 2.04 <sup>a</sup>	17.27 $\pm$ 2.12 <sup>a</sup>	5.245	<0.001
Gal-3 ( $\mu$ g/L)	治疗前	12.34 $\pm$ 2.17	11.87 $\pm$ 2.24	1.087	0.280
	治疗后	4.16 $\pm$ 1.02 <sup>a</sup>	6.39 $\pm$ 1.31 <sup>a</sup>	9.686	<0.001

注:与同组治疗前比较,<sup>a</sup>*P*<0.05。

### 3 讨论

心衰是心脏疾病发展的终末阶段,冠心病是心衰的主要病因,冠心病合并心衰对心脏结构和功能的损伤程度更为严重,增加了治疗难度。多种药物联用扩张冠状动脉血管、增加心肌血氧供应和能量代谢是治疗冠心病合并心衰的主要手段。前列地尔治疗冠心病心衰的有效成分为前列腺素E<sub>1</sub>(PGE<sub>1</sub>),作为花生四烯酸的衍生物可增强心肌收缩力,提高心排出量;可扩张冠状动脉及外周血管,改善血管内皮功能,减轻心脏前后负荷;可抑制血小板聚集,改善微循环;可降低血脂、抑制血管平滑肌增生,减轻动脉粥样硬化<sup>[7]</sup>。

中医学将冠心病归属于“胸痹”、“真心痛”的范畴,心气不足、心阳不振易引起寒凝气滞,气血运行不畅则淤血阻碍心脉,故以温通心阳、活血化瘀为治则<sup>[8]</sup>。大株红景天注射液的有效成分从中药大株红景天中提取,有活血化瘀、通脉止痛、补气等功效,适宜于冠心病的治疗<sup>[9]</sup>。现代药理研究表明,大株红景天注射液可扩张冠脉血管、调节心脏血管顺应性、降低心脏后负荷和心肌耗氧量,也具有清除自由基、减少炎症因子的药理活性,因此被广泛应用于心血管疾病的临床治疗<sup>[10]</sup>。本研究结果说明冠心病患者加用大株红景天注射液治疗后临床症状改善更佳。冠心病合并心衰患者往往因心肌损伤而伴有心功能损伤,超声心动图表现为LVEF、CO降低,LVEDD、LVESD升高。本研究结果证实大株红景天注射液对冠心病合并心衰患者的心功能改善效果良好。

既往研究表明<sup>[11]</sup>,血管内皮功能紊乱是冠心病的病理基础之一,参与冠状动脉粥样硬化的始动环节,其中NO有舒张血管的作用,是重要的信息分子和效应分子,而ET在体内含量增加可导致

血管内皮功能失衡。NT-proBNP 作为临床常用的心衰标志物,广泛应用于心衰诊断、病情评估、治疗指导和预后判断<sup>[12]</sup>。李晓霞等学者<sup>[13]</sup>认为,心衰患者心脏负荷过重导致左心室舒张期末内径增大、左心室射血分数降低,血管内皮细胞分泌大量缩血管因子,增加血管平滑肌张力,可引起血压升高,因此改善血管内皮功能也有利于缓解心衰症状。氧化应激在心衰的病理过程中起到关键作用,患者体内自由基产生过多,氧化程度超出氧化物清除,氧化系统和抗氧化系统失衡会导致组织损伤,因此治疗心衰时应加强抗氧化应激治疗,有助于心功能改善<sup>[14]</sup>。本研究表明大株红景天注射液具有较强的抗氧化应激功能,同时也具有一定的抗衰老作用。

相关文献报道称<sup>[15]</sup>,HCY 作为机体内蛋氨酸代谢过程中的一种中间产物,属于冠心病的危险因素,能反映冠脉病变支数和病变程度,其在血清中浓度随病情加重而增加。Gal-3 是一种炎症信号分子,在体内参与细胞活化、免疫反应、黏附、生长与凋亡等多种生物活动,尤其在心肌纤维化、重塑过程中发挥关键性作用<sup>[16]</sup>。有研究表明, Gal-3 参与冠心病的病理过程,可激活动脉粥样硬化斑块内炎症细胞和巨噬细胞,促进单核细胞进入血管壁,抑制平滑肌细胞核基质糖蛋白间黏附,最终导致动脉粥样硬化形成<sup>[17]</sup>。本研究检测结果说明冠心病得到有效控制,而观察组变化更为显著,表明大株红景天注射液可有效抑制动脉粥样硬化的发生发展,促进疾病转归。

综上所述,大株红景天注射液治疗冠心病合并心衰效果显著,可明显改善心功能和内皮功能,减轻心肌损伤,提高抗氧化应激能力,促进疾病转归,适宜在临床推广。

## 参考文献

- [1] Rashid M, Kwok CS, Gale CP. Impact of co-morbid burden on mortality in patients with coronary heart disease, heart failure, and cerebrovascular accident a systematic review and meta-analysis [J]. *European Heart Journal Quality of Care & Clinical Outcomes*, 2017, 3(1):20-36.
- [2] 彭丁,王韶屏,赵东晖,等.高尿酸血症与血运重建术后冠心病心力衰竭患者预后的关系[J].*中华医学杂志*, 2018, 98(17):1337-1341.
- [3] 赖晓菁,康峰,张秀菊,等.大株红景天联合前列地尔治疗冠心病心力衰竭的临床研究[J].*中西医结合心脑血管病杂志*, 2019, 17(9):1308-1311.
- [4] 戚猛.大株红景天注射液配合西药治疗慢性充血性心力衰竭的效果分析[J].*中国急救医学*, 2016, 36(Suppl.1):153-154.
- [5] 中华医学会心血管病学分会,中华心血管病杂志编辑委员会.中国心力衰竭诊断和治疗指南2014[J].*中华心血管病杂志*, 2014, 42(2):98-122.
- [6] 金慧,李猛.前列地尔联合大株红景天注射液治疗冠心病心力衰竭疗效观察[J].*现代中西医结合杂志*, 2016, 25(31):3518-3519, 3531.
- [7] 李雅,贾辛未,刘胜辉,等.益气复脉注射液联合阿伐他汀治疗冠心病慢性心力衰竭疗效及对sCD40、sCD146、PAPP-A的影响[J].*中华中医药学刊*, 2019, 37(5):1225-1228.
- [8] 齐洪娜,关玉龙,张玮,等.大株红景天注射液联合美托洛尔对慢性心力衰竭患者氧化应激及心功能的影响[J].*中国心血管病研究*, 2016, 14(1):59-63.
- [9] 宁小康,王文丽,武向阳,等.大株红景天注射液联合重组人脑利钠肽治疗充血性心力衰竭的临床研究[J].*现代药物与临床*, 2017, 32(12):2339-2343.
- [10] 岑运光,李伟,张旭日,等.银杏叶注射液对老年高血压冠心病患者内皮素及冠脉血流的影响[J].*中华中医药学刊*, 2018, 36(11):2754-2756.
- [11] 韩莉莎,王琼,李丹,等.普伐他汀联合美托洛尔对糖尿病合并冠心病患者心功能、糖脂代谢等相关指标的影响[J].*分子诊断与治疗杂志*, 2019, 11(3):224-228.
- [12] 李晓霞,董彬,连亚军,等.通心络胶囊联合芪苈强心胶囊对慢性充血性心力衰竭心功能及血管内皮功能的影响[J].*中华中医药学刊*, 2018, 36(7):1753-1755.
- [13] 栾博,栾梅,邱雅慧.葛根素激活Nrf2通路减轻心力衰竭大鼠氧化应激损伤的研究[J].*现代预防医学*, 2019, 46(10):1852-1856.
- [14] 张韶斌,陈斯亮,罗莞超,等.脑卒中患者血清可溶性CD14、同型半胱氨酸和7项血脂结果分析[J].*分子诊断与治疗杂志*, 2017, 9(2):100-103.
- [15] 温晓玲,谢建平,林师宇,等.血清癌胚抗原、甲状腺球蛋白及半乳糖凝集素-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.
- [16] 徐向勇.血浆半乳糖凝集素3和N末端B型钠尿肽在冠心病合并心力衰竭患者中的表达及临床意义[J].*海南医学*, 2017, 28(7):1098-1100.

## 血清EGFL7、MTA1表达与鼻咽癌患者临床特征及预后的关系

冯睡 尹金淑 谢洪 姬巍 刘艾竹 彭洪\*

**【摘要】**目的 探究鼻咽癌患者血清表皮生长因子样结构域7(EGFL7)、肿瘤转移性相关基因1(MTA1)蛋白表达及与临床特征及预后的相关性。**方法** 选取本院2014年1月至2016年1月收治的鼻咽癌患者病毒组织60例,其中转移患者22例作为转移组,未转移患者38例作为未转移组,以同期20例正常鼻咽部组织作为对照组,对比3组血清EGFL7、MTA1蛋白水平、微血管密度(MVD)、淋巴管密度(LVD)水平,比较不同临床特征患者EGFL7、MTA1水平,Spearman相关性分析血清EGFL7、MTA1蛋白与MVD、LVD相关性,Kaplan-meier生存函数分析EGFL7、MTA1与患者预后的关系。**结果** 3组血清EGFL7、MTA1蛋白及MVD、LVD水平比较结果:鼻咽癌患者转移组>鼻咽癌患者未转移组>对照组,差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。不同性别、年龄、EB病毒相关抗体阴阳性血清EGFL7、MTA1蛋白水平比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ );不同TNM肿瘤分期、有无淋巴结转移、浸润深度、分化程度患者血清EGFL7、MTA1蛋白水平比较差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。相关性分析结果显示,EGFL7及MTA蛋白分别与MVD、LVD存在显著正相关性( $P<0.05$ )。以鼻咽癌患者血清EGFL7、MTA1平均值为中位数,分为低EGFL7组、高EGFL7组及低MTA1组、高MTA1组,Kaplan-meier生存函数结果显示,低EGFL7组的中位生存时间(MST)高于高EGFL7组的中位生存时间,差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。低MTA1组MST高于高MTA1组的MST,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。**结论** 血清EGFL7、MTA1表达水平与鼻咽癌患者临床分期及淋巴结转移存在密切关系,血清EGFL7、MTA1高表达鼻咽癌患者预后较差。

**【关键词】** 鼻咽癌;表皮生长因子样结构域7;肿瘤转移性相关基因1;临床特征;预后

### Correlation of serum EGFL7 and MTA1 with clinical characteristics and prognosis of patients with nasopharyngeal carcinoma

FENG Shui, YIN Jinshu, XIE Hong, JI Wei, LIU Aizhu, PENG Hong\*

(Department of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, Beijing Shijitan Hospital, Capital Medical University, Beijing, China, 100038)

**【ABSTRACT】** Objective To investigate the expression of epidermal growth factor-like domain 7 (EGFL7) and tumor metastasis-associated gene 1 (MTA1) protein in patients with nasopharyngeal carcinoma and to evaluate the correlation with clinical characteristics and prognosis. **Methods** 60 cases of nasopharyngeal carcinoma patients admitted in our hospital from January 2014 to January 2016 were selected, including 22 metastatic patients as the metastatic group, 38 non-metastatic patients as the non-metastatic group. 20 normal healthy controls were selected as the control group. The serum levels of EGFL7 and MTA1, microvessel density (MVD) and lymphatic vessel density (LVD) levels were measured and compared among the three groups. Spearman correlation analysis was used to analyze the correlation between serum EGFL7, MTA1 and

基金项目:北京市科学技术委员会自然类基金项目(Z161100000516006)

作者单位:首都医科大学附属北京世纪坛医院耳鼻咽喉头颈外科,北京 100038

\*通信作者:彭洪, E-mail: penghongent@sina.com

MVD, LVD. Kaplan-meier survival function was used to analyze the relationship between EGFL7, MTA1 and patient prognosis. **Results** Comparison of the serum levels of EGFL7 and MTA1 and MVD or LVD levels in the three groups: Metastatic group of patients with nasopharyngeal cancer > non-metastatic group of patients with nasopharyngeal cancer > Control group, the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). There was no significant difference in the levels of EGFL7 and MTA1 protein in different genders, ages, and EB virus-related antibody negative positive serum ( $P > 0.05$ ). There were statistically significant differences in serum EGFL7 and MTA1 protein levels among patients with different TNM tumor stages, presence or absence of lymph node metastasis, depth of invasion, and degree of differentiation ( $P < 0.05$ ). Correlation analysis showed that EGFL7 and MTA1 had a significant positive correlation with MVD and LVD, respectively ( $P < 0.05$ ). Based on the median values of serum EGFL7 and MTA1 in patients with nasopharyngeal carcinoma, they were divided into low EGFL7 group, high EGFL7 group, low MTA1 group, and high MTA1 group. Kaplan-meier survival function results showed that the MST with the low EGFL7 group was higher than that of the MST with the high EGFL7 group. The difference between the two groups was statistically significant ( $P < 0.05$ ). The MST in the low MTA1 group was higher than that of the MST in the high MTA1 group, the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The serum levels of EGFL7 and MTA1 are closely related to clinical stage and lymph node metastasis of patients with nasopharyngeal carcinoma. Patients with high serum levels of EGFL7 and MTA1 have poor prognosis.

[KEY WORDS] Nasopharyngeal carcinoma; Epidermal growth factor-like domain 7; Tumor metastasis-related gene 1; Clinical characteristics; Prognosis

鼻咽癌为发生于鼻咽腔侧壁和顶部的一种高发性恶性肿瘤,其发病率在耳鼻咽喉各类恶性肿瘤中居于首位。鼻咽癌的发生发展与饮食习惯、遗传易感性、环境、理化因素、EB病毒感染等因素有关,并且是一个多步骤、多基因参与的复杂过程<sup>[1]</sup>。鼻咽癌侵袭转移是患者预后不佳乃至死亡的主要因素,多数转移为颈部淋巴结转移。表皮生长因子样结构域7(epidermal growth factor-like domain 7, EGFL7)表达于血管内皮系统,在生理或病理性血管管腔形成、功能维持等过程中发挥重要作用,近年来研究发现EGFL7在一些肿瘤细胞中也有表达<sup>[2-3]</sup>。肿瘤转移相关基因(metastasis-associated gene 1, MTA1)为近年来研究较多的与肿瘤浸润转移相关的基因,其在多种肿瘤细胞系中表达,并与肿瘤的侵袭转移关系密切<sup>[4-5]</sup>。针对鼻咽癌缺乏特异性、敏感性高的标志物的情况,本研究对鼻咽癌患者血清EGFL7、MTA1表达情况和与患者临床特征及预后的进行了探究,以为鼻咽癌患者的临床诊疗及预后评估提供有效指示指标。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选取本院2014年1月至2016年1月收治的鼻咽癌患者病理组织60例,其中男37例,女23例,平

均(52.6±3.7)岁,病理分期:Ⅰ期4例,Ⅱ期17例,Ⅲ期28例,Ⅳ期11例;淋巴结转移:无38例,有22例;浸润深度:T<sub>1-2</sub>26例,T<sub>3-4</sub>34例;分化程度:低11例,中29例,高20例;EB病毒相关抗体阴性24例,阳性36例。根据鼻咽癌患者是否存在淋巴结转移,分为转移组和未转移组,并以同期20例正常鼻咽部组织作为对照组,其中男12例,女8例,平均(51.5±4.4)岁。

纳入标准:①均经病理学检查确诊;②均为首次确诊,未接受放疗或其他抗肿瘤治疗;③卡氏功能评分(Karnofsky, KPS)≥70分。排除标准:①肝肾等重要脏器严重功能障碍者;②合并其他恶性肿瘤病史;所有患者及家属均已签署知情同意书;本研究上报院伦理委员会并获得批准。③神经病变、认知障碍者;④临床资料缺失者。3组研究对象在性别、年龄上比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),具有可比性。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 临床资料收集

所有患者入院后统计年龄、性别、疾病史、病理分期、淋巴结转移、浸润深度、EB病毒相关抗体等临床资料。预后统计:所有患者随访3~6年,直至患者任何原因导致死亡或随访日期结束,观察患者预后生存情况,并计算中位生存时间(median survival time, MST)。

### 1.2.2 血清EGFL7、MTA1蛋白表达检测

所有研究对象均入院后收集5 mL空腹静脉血,采用酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)及北京普朗酶标仪测定血清EGFL7、MTA1蛋白表达,450 nm波长测定吸光度值。试剂盒购自Abcam公司,严格依照试剂盒说明书执行各项操作。

### 1.2.3 微血管密度(MVD)、淋巴管密度(LVD)水平测定

取鼻咽部组织行免疫组化染色测定MVD及LVD,于200倍显微镜下随机选取5个视野进行计数血管数和淋巴管数,取平均值作为MVD、LVD的最终结果。

### 1.3 统计学分析

采用SPSS 19.0软件进行数据分析,计数资料用 $n$ 表示,行 $\chi^2$ 检验。计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,两两比较采用 $t$ 检验,多组间比较采用单因素方差分

析;Spearman 检验分析血清EGFL7、MTA1蛋白与MVD、LVD相关性;Kaplan-meier生存函数分析EGFL7、MTA1与患者预后的关系。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 3组EGFL7、MTA1、MVD、LVD水平比较

3组血清EGFL7、MTA1、MVD、LVD比较:对照组<未转移组<转移组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表1。

### 2.2 血清EGFL7、MTA1表达与鼻咽癌患者临床特征的关系

不同性别、年龄、EB病毒相关抗体阴阳性血清EGFL7、MTA1蛋白水平比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ );不同TNM肿瘤分期、有无淋巴结转移、浸润深度、分化程度患者血清EGFL7、MTA1蛋白水平比较差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表2。

表1 各组EGFL7、MTA1、MVD、LVD水平比较 $(\bar{x} \pm s)$

Table 1 Comparison of EGFL7, MTA1, MVD, and LVD levels in each group $(\bar{x} \pm s)$

组别	$n$	EGFL7 (ng/mL)	MTA1 (pg/mL)	MVD	LVD
对照组	20	44.8±5.8	28.3±3.9	17.5±5.8	2.4±1.2
未转移组	38	178.6±15.7 <sup>a</sup>	145.5±11.6 <sup>a</sup>	59.2±8.7 <sup>a</sup>	4.4±1.5 <sup>a</sup>
转移组	22	273.2±25.1 <sup>ab</sup>	213.5±19.3 <sup>ab</sup>	82.2±8.6 <sup>ab</sup>	12.8±3.7 <sup>ab</sup>
$F$ 值		61.379	60.758	39.454	12.448
$P$ 值		0.000	0.000	0.000	0.000

注:与对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与未转移组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ 。

表2 血清EGFL7、MTA1表达与鼻咽癌患者临床特征的关系 $[n(\%), (\bar{x} \pm s)]$

Table 2 Relationship between serum EGFL7 and MTA1 expression and clinical characteristics of patients with nasopharyngeal carcinoma $[n(\%), (\bar{x} \pm s)]$

临床特征		$n=60$	EGFL7 (ng/mL)	MTA1 (pg/mL)	$t_1$ 值	$P_1$ 值	$t_2$ 值	$P_2$ 值
性别	男	37(61.67)	235.6±18.8	179.3±16.4	0.493	0.624	0.259	0.797
	女	23(38.33)	237.9±15.3	178.2±15.3				
年龄	>45	45(75.00)	235.9±17.5	177.6±18.4	0.449	0.655	0.344	0.732
	≤45	15(25.00)	238.2±16.2	179.5±19.0				
EB病毒相关抗体	阳性	36(60.00)	239.6±19.7	181.5±22.8	0.655	0.515	0.761	0.450
	阴性	24(40.00)	236.4±16.6	177.4±16.2				
TNM分期	I~II	22(36.67)	144.5±15.4	103.2±14.9	26.308	0.000	23.570	0.000
	III~IV	38(63.33)	270.3±19.1	213.2±18.7				
淋巴结转移	无	38(63.33)	178.6±15.7	145.5±11.6	15.962	0.000	15.029	0.000
	有	22(36.67)	273.2±25.1	213.5±19.3				
浸润深度	T1~2	26(43.33)	185.7±16.6	162.7±15.4	17.899	0.000	12.275	0.000
	T3~4	34(56.67)	272.2±19.9	218.2±18.7				
分化程度	低	11(18.33)	120.6±14.1	114.5±13.3	25.017	0.000	20.215	0.000
	中高	49(81.67)	282.3±20.3	219.5±16.0				

注: $t_1$ 、 $P_1$ 为EGFL7统计学分析值, $t_2$ 、 $P_2$ 为MTA1统计学分析值。

### 2.3 血清 EGFL7、MTA1 表达与 MVD、LVD 的相关性

相关性分析结果显示,EGFL7 及 MTA1 蛋白分别与 MVD、LVD 存在显著正相关性,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。见表3。

表3 血清 EGFL7、MTA1 表达与 MVD、LVD 的相关性  
Table 3 Correlation of serum EGFL7 and MTA1 expression with MVD and LVD

项目	MVD		LVD	
	r 值	P 值	r 值	P 值
EGFL7	0.296	0.022	0.324	0.012
MTA1	0.365	0.001	0.304	0.018

### 2.4 血清 EGFL7、MTA1 表达与鼻咽癌患者预后的关系

以鼻咽癌患者血清 EGFL7、MTA1 平均值为中位数,分为低 EGFL7 组、高 EGFL7 组及低 MTA1 组、高 MTA1 组,Kaplan-meier 生存函数结果显示,低 EGFL7 组的 MST 为高于高 EGFL7 组的 MST,差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。低 MTA1 组 MST 高于高 MTA1 组的 MST,差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。见图1。

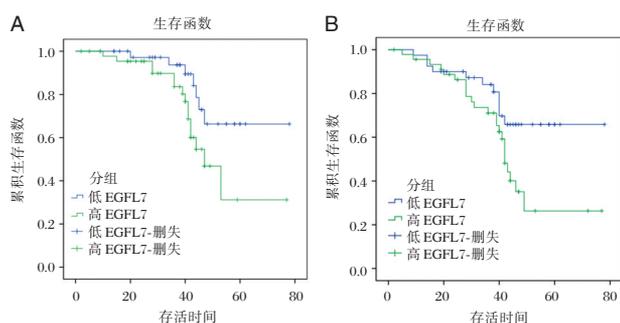


图1 Kaplan-meier 生存曲线

Figure 1 Kaplan-meier survival curve for patients

## 3 讨论

鼻咽癌为上皮源性恶性肿瘤,主要为黏膜上皮鳞状上皮化生基础上形成的癌变,病变区域存在丰富的淋巴组织。肿瘤细胞早期汲取营养主要途径为被动扩散,随着肿瘤生长,血液运输营养物质占据主导地位<sup>[6]</sup>。因此,新生血管的形成是肿瘤细胞增殖、浸润及转移的必要条件。EGFL7 为新发现的一种分泌型蛋白,其主要包含两个进化中高度保守的表皮生长因子样结构域,研究证实<sup>[7]</sup>

EGFL7 在胚胎血管发育中发挥重要作用。近年来研究表明<sup>[8-9]</sup>,EGFL7 可增强内皮细胞和成纤维细胞的运动迁移能力,其在成熟组织中表达极低,但在肿瘤等增殖性组织中存在高表达。本研究中,鼻咽癌患者血清 EGFL7 水平明显升高,且在存在淋巴结转移的鼻咽癌患者中 EGFL7 水平更高。提示,EGFL7 表达水平升高与鼻咽癌疾病进展及淋巴结转移存在密切关系。另有研究指出<sup>[10]</sup>,EGFL7 可通过活化 FAK 信号通路促进肿瘤细胞的侵袭和转移,抑制 EGFL7 可降低肿瘤细胞的迁移运动。

MTA1 基因为肿瘤转移有关基因家族的一员,在正常组织中 MTA1 表达水平极低,但在多种癌组织中呈高表达,并与恶性肿瘤的组织浸润、侵袭转移关系密切<sup>[11]</sup>。本研究结果提示,MTA1 在鼻咽癌细胞侵袭、转移过程中具有关键作用。本研究结果显示,不同 TNM 肿瘤分期、有无淋巴结转移、浸润深度、分化程度患者血清 EGFL7、MTA1 蛋白水平血清 EGFL7、MTA1 存在显著差异,且随着肿瘤进展,血清 EGFL7、MTA1 蛋白水平随之升高。本研究中,血清 EGFL7、MTA1 与患者 MVD、LVD 存在正相关性。提示,血清 EGFL7、MTA1 对鼻咽癌患者血管、淋巴结具有双重作用。侵袭转移是恶性肿瘤细胞的主要生物学特征之一,也是影响患者预后的主要影响因素。肿瘤内皮细胞分泌的 EGFL7 蛋白从原发灶渗入血流,导致血清 EGFL7 水平升高,EGFL7 蛋白从血液中捕获肿瘤细胞并促进其侵袭新的组织器官,从而导致转移性病灶的形成。同时,EGFL7 蛋白本身可刺激肿瘤细胞的运动迁移能力,参与了肿瘤原发灶向周围正常组织的侵袭转移<sup>[12-13]</sup>。MTA1 蛋白含有 1 个锌指 DNA 结合域及许多 SPXX 域,这些结构参与了细胞生长、分化的信号传导途径的调控,因此 MTA1 蛋白水平升高促进了肿瘤的分化,促进其恶性程度增加和侵袭转移<sup>[14-15]</sup>。

综上所述,血清 EGFL7、MTA1 表达水平与鼻咽癌患者临床分期及淋巴结转移存在密切关系,血清 EGFL7、MTA1 高表达鼻咽癌患者预后较差。

### 参考文献

- [1] 潘莉莉,黄华艺.表皮生长因子受体与鼻咽癌的关系[J].分子诊断与治疗杂志,2017,9(2):121-126.

- [2] Hu MH, Ma CY, Wang XM, et al. MicroRNA-126 inhibits tumor proliferation and angiogenesis of hepatocellular carcinoma by down-regulating EGFL7 expression [J]. *Oncotarget*, 2014, 7(41):66922-66934.
- [3] Usuba R, Pauty J, Soncin F, et al. EGFL7 regulates sprouting angiogenesis and endothelial integrity in a human blood vessel model[J]. *Biomaterials*, 2019, 197(1):305-316.
- [4] Ishikawa M, Osaki M, Yamagishi M, et al. Correlation of two distinct metastasis - associated proteins, MTA1 and S100A4, in angiogenesis for promoting tumor growth [J]. *Oncogene*, 2019, 38(24):4715-4728.
- [5] 马建宏,曹开源,徐霖,等. 前列腺癌细胞转移相关基因的筛选[J]. *热带医学杂志*, 2015, 15(11):1455-1459.
- [6] 雷林,尚庆刚,刘维耿,等. 2001-2015年深圳市鼻咽癌流行现状和时间趋势[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2019, 26(20):1499-1503.
- [7] Richter A, Alexdottir MS, Magnus SH, et al. EGFL7 Mediates BMP9 - Induced Sprouting Angiogenesis of Endothelial Cells Derived from Human Embryonic Stem Cells [J]. *Stem Cell Reports*, 2019, 12(6):1250-1259.
- [8] Campagnolo L, Telesca C, Massimiani M, et al. Different expression of VEGF and EGFL7 in human hepatocellular carcinoma[J]. *Dig Liver Di*, 2015, 48(1):76-80.
- [9] Jinju O, Hae PS, Sung LT, et al. High expression of epidermal growth factor-like domain 7 is correlated with poor differentiation and poor prognosis in patients with epithelial ovarian cancer [J]. *J Gynecol oncol*, 2014, 25(4):334.
- [10] Mammola CL, Vetuschi A, Pannarale L, et al. Epidermal growth factor-like domain multiple 7 (EGFL7): Expression and possible effect on biliary epithelium growth in cholangiocarcinoma[J]. *Eur J Histochem*, 2018, 62(4):2971.
- [11] Lu B, Lian R, Wu Z, et al. MTA1 promotes viability and motility in nasopharyngeal carcinoma by modulating IQGAP1 expression[J]. *J Cell biochem*, 2018, 119(5):3864-3872.
- [12] 令狐颖,胡德峰,岳凤娟,等. 血清 EGFL7 蛋白与 EB 病毒标志物在鼻咽癌诊断中的价值[J]. *吉林医学*, 2020, 41(1):31-33.
- [13] 赵燕恋,卢永田,杨继红,等. 鼻咽癌 EGFL7 的表达与肿瘤侵袭转移的关系[J]. *山东大学耳鼻喉眼学报*, 2015, 29(6):31-35.
- [14] Chen WH, Cai MY, Zhang JX, et al. FMNL1 mediates nasopharyngeal carcinoma cell aggressiveness by epigenetically up-regulating MTA1[J]. *Oncogene*, 2018, 37(48):6243-6258.
- [15] Wang G, Wang S, Li C. MiR-183 overexpression inhibits tumorigenesis and enhances DDP-induced cytotoxicity by targeting MTA1 in nasopharyngeal carcinoma [J]. *Tumour biol*, 2017, 39(6):1010428317703825.

(上接第 595 页)

- [4] Qiao X, Liu J, Hua R, et al. GDF-15 in plasma and circulating mononuclear cells and NT-proBNP for diagnosis of chronic heart failure and predicting cardiovascular disease events [J]. *Journal of Southern Medical University*, 2019, 39(11):1273-1279.
- [5] 中国高血压防治指南修订委员会. 中国高血压防治指南 2010[J]. *中华心血管病杂志*, 2011, 39(7):579-616.
- [6] 叶任高,陆再英. 内科学[M]. 6版. 北京:人民卫生出版社, 2004:161
- [7] Gerhard N. New York Heart Association classification (NYHA) [J]. *Dictionary of Pharmaceutical Medicine*, 2009:121.
- [8] 黄红,李燕,周燕,等. 老年高血压患者血管紧张素转换酶和醛固酮合酶基因多态性与肾素血管紧张素醛固酮的关系[J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2020, 22(1):15-19.
- [9] 孙敏英,利耀辉,刘览,吴雪霁,等. 神经前体细胞表达发育调控样蛋白 4 基因多态性与广州市居民原发性高血压及其危险因素关联研究[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2017, 9(3):154-159.
- [10] Tsuda T, Imanishi M, Oogoshi M, et al. Rho-associated protein kinase and cyclophilin a are involved in inorganic phosphate-induced calcification signaling in vascular smooth muscle cells[J]. *J Pharmacol sci*, 2020, 142(3):109-115.
- [11] 王诗奇,周丽,邹武松. 血清单核细胞趋化蛋白 1、亲环素 A 与糖尿病合并高血压患者冠状动脉 Gensini 积分的相关性[J]. *中华高血压杂志*, 2019, 27(6):571-574.
- [12] Nakajima T, Shibasaki I, Sawaguchi T, et al. Growth Differentiation Factor - 15 (GDF - 15) is a Biomarker of Muscle Wasting and Renal Dysfunction in Preoperative Cardiovascular Surgery Patients[J]. *J Clin med*, 2019, 8(10):1576.
- [13] 唐春平,姚蓓蓓,桂鸣. 妊娠期高血压大鼠血浆中 GDF-15 表达水平的测定[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2014, 34(10):1313-1316.
- [14] Alexander MR, Norlander AE, Elijevich F, et al. Human monocyte transcriptional profiling identifies IL-18 receptor accessory protein and lactoferrin as novel immune targets in hypertension [J]. *British J Pharmacol*, 2019, 176(12):2015-2027.
- [15] Dawood A, Alkafrawy N, Saleh S, et al. The relationship between IL-18 and atherosclerotic cardiovascular risk in Egyptian lean women with polycystic ovary syndrome [J]. *Gynecol endocrinol*, 2018, 34(4):294-297.
- [16] 贾圣英,谢莲娜,姜春玲,等. H 型高血压合并急性心肌梗死患者临床资料及预后分析[J]. *中国介入心脏病学杂志*, 2019, 27(6):328-333.

· 论 著 ·

## RDW、CHE及TEG参数与重症肺炎机械通气治疗患者病情的关系

卢仁辉\* 刘培杰 杜莎莎 巩雅舒

**[摘要]** 目的 探讨红细胞分布宽度(RDW)、胆碱酯酶(CHE)、血栓弹力图(TEG)参数的变化与重症肺炎机械通气治疗患者病情变化的相关性。方法 选取本院2017年1月至2019年10月确诊的机械通气治疗的重症肺炎患者87例,按照患者的预后情况分为存活组49例、死亡组38例,对比两组患者的一般资料、机械通气治疗第1天的RDW、CHE、TEG参数差异,并分析机械通气治疗第1天患者的RDW、CHE、TEG参数与患者急性生理功能与慢性健康(APACHE II)评分的关系。结果 两组患者的年龄、性别差异无统计学意义( $P>0.05$ ),存活组患者的APACHE II评分、机械通气时间、ICU住院时间均显著的低于死亡组( $P<0.05$ );存活组患者的RDW、CHE测定值均显著的高于死亡组,差异具有统计学意义( $P<0.05$ );存活组患者的MA值、 $\alpha$ 角测定值均显著的高于死亡组,差异具有统计学意义( $P<0.05$ ),存活组患者的K值、R值测定值均显著的低于死亡组,差异具有统计学意义( $P<0.05$ );存活组患者的RDW、CHE、MA值、 $\alpha$ 角测定值与APACHE II评分呈显著的负相关关系( $P<0.05$ ),存活组患者的K值、R值测定值与APACHE II评分呈显著的正相关关系( $P<0.05$ )。结论 重症肺炎机械通气治疗患者病情越重,TEG参数及RDW、CHE恶化越明显,相关指标与患者病情程度及预后具有显著的相关性。

**[关键词]** 红细胞分布宽度;胆碱酯酶;血栓弹力图;重症肺炎;机械通气

### Relationship between RDW, CHE and TEG parameters and condition of patients with severe pneumonia treated with mechanical ventilation

LU Renhui\*, LIU Peijie, DU Shasha, GONG Yashu

(Department of respiratory and critical care medicine, the Fifth Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan, China, 450052)

**[ABSTRACT]** Objective To investigate the relationship between the changes of erythrocyte distribution width (RDW), cholinesterase (CHE) and thromboelastogram (TEG) parameters and the change of condition of patients with severe pneumonia with mechanical ventilation. Methods 87 patients with severe pneumonia diagnosed in our hospital from January 2017 to October 2019 who were treated with mechanical ventilation were selected. According to the prognosis of the patients, they were divided into 49 cases in the survival group and 38 cases in the death group. The general data of the two groups were compared. The differences of RDW, CHE, and TEG parameters on the first day of mechanical ventilation treatment were compared. The relationship between RDW, CHE, and TEG parameters and acute physical function and chronic health (APACHE II) scores on the first day of mechanical ventilation treatment was analyzed. Results The age and gender differences between the survival group and the death group were not statistically significant ( $P>0.005$ ). The APACHE II score, mechanical ventilation time, and ICU hospitalization time

基金项目:河南省医学科技攻关计划项目(201806248)

作者单位:郑州大学第五附属医院呼吸与危重症医学科,河南,郑州 450052

\*通信作者:卢仁辉, E-mail: liuskunhb@163.com

were significantly lower in the survival group than those in the death group ( $P<0.05$ ). The RDW and CHE values in the survivors were significantly higher than those in the death group ( $P<0.05$ ). The MA and  $\alpha$ -angles in the survival group were significantly higher than those in the death group ( $P<0.05$ ). The values of K and R in the survival group were significantly lower than those in the death group ( $P<0.05$ ). The RDW, CHE, MA values and  $\alpha$ -angle measured values of the survival group were significantly negatively correlated with the APACHE II score ( $P<0.05$ ). The K and R value of the patients in the survival group were significantly positively correlated with the APACHE II score ( $P<0.05$ ). **Conclusion** The more severe the patients with severe pneumonia mechanical ventilation treatment, the more obvious the deterioration of TEG parameters and RDW and CHE. The relevant indicators have a significant correlation with the patient's condition and prognosis.

**[KEY WORDS]** Erythrocyte distribution width; Cholinesterase; Thromboelastogram; Severe pneumonia; Mechanical ventilation

肺炎的严重性取决于局部炎症程度、肺部炎症的播散和全身炎症反应程度,如肺炎患者出现严重低氧血症或急性呼吸衰竭需要通气支持,或者出现低血压、休克等循环衰竭表现和其他器官功能障碍可认定为重症肺炎<sup>[1-2]</sup>。通过寻找可靠而有效的病情评估指标,能够在重症肺炎的病情评估或者诊疗过程中发挥作用,其能够为抗感染治疗或者激素治疗提供可靠的参考节点。红细胞分布宽度(Red Cell Distribution Width, RDW)是反应红细胞膜形态和异质性的指标,在感染性疾病或者自身免疫性疾病中,致病因子的损伤可导致红细胞膜完整性的破坏,进而造成红细胞形态的异常,导致RDW的下降<sup>[3-4]</sup>;胆碱酯酶(Cholinesterase Che, CHE)作为一种氨基水解酶,在感染性疾病或缺氧缺血性疾病中,由于肝脏上皮细胞的损伤和功能代偿的障碍,导致其分泌CHE的能力明显的下降,从而造成CHE水平的下降<sup>[5]</sup>;血栓弹力图(Thrombelastography, TEG)能够通过评估患者凝血功能随着时间改变的情况,进而评估患者的凝血功能状态<sup>[6]</sup>。探讨了RDW、CHE及TEG参数表达情况,报道如下。

## 1 资料与方法

### 1.1 临床资料

选取本院2017年1月至2019年10月确诊的实施机械通气治疗的重症肺炎患者87例,按照患者的预后情况分为存活组49例、死亡组38例。存活组年龄平均(66.5±9.0)岁,男29例、女20例。死亡组年龄平均(68.0±11.3)岁,男24例、女14例。存活组和死亡组年龄、性别比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ ),均衡可比。

纳入标准:①重症肺炎诊断参考美国传染病学会/美国胸科协会2007年制定的重症肺炎诊断

标准<sup>[4]</sup>;②患者在本院重症监护室实施机械通气治疗;③经胸部X线、CT检查可见双肺野受累,呼吸频率 $>30$ 次/min,动脉血氧饱和度( $\text{PaO}_2<60$  mmHg);④入住ICU后24 h内检测相关指标;④研究方案获得本院伦理委员会审核后实施。排除标准:①恶性肿瘤;②近6个月内具有脑血管病史;③甲状腺功能疾病患者;④长期使用糖皮质激素、免疫抑制剂;⑤伴有类风湿性疾病、结缔组织疾病的患者;⑥骨髓移植;⑦肝肾功能衰竭。

### 1.2 RDW、CHE检测方法

采用外周静脉血3~5 mL,用EDTA-K2抗凝管混匀标本,30 min内进行检测。采用北京迈瑞医疗公司生产的BC-5300全自动五分类血液分析仪和公司原装配套试剂测定RDW值;采用贝克曼库尔特UniCel DxI 800全自动化学发光免疫分析仪进行CHE的检测,EasyBlot ECL化学发光显色试剂盒购自北京百奥莱博科技有限公司。

### 1.3 TEG指标检测

主要包括凝血形成时间(clotting time, K)、凝固角(angle,  $\alpha$ )、凝血反应时间(reaction time, R)血栓最大幅度(maximum amplitude, MA)。

血栓弹力图检测:取1 mL血液标本与TEG试剂混匀,并加入20  $\mu\text{L}$ 氯化钙混合,预热机器至37℃正常状态后开始检测。检测仪器为血栓弹性描记仪(美国Hemoscope公司,型号5000)。

### 1.4 统计学方法

采用SPSS 19.0软件进行数据统计分析,计量资料采用( $\bar{x}\pm s$ )表示,两组对比分析应用 $t$ 检验;计数资料用 $n(\%)$ 表示,行 $\chi^2$ 检验;各项指标的相关性分析应用Pearson线性相关分析法; $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 两组患者的一般资料比较

存活组和死亡组患者的年龄、性别比较,差

异无统计学意义( $P>0.05$ ),存活组患者的APACHE II评分、机械通气时间、ICU住院时间均显著的低于死亡组,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。见表1。

表1 两组患者的一般资料比较( $\bar{x}\pm s$ )

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

组别	<i>n</i>	年龄(岁)	男/女	APACHE II评分(分)	机械通气时间(d)	ICU住院时间(d)
存活组	49	66.5±9.0	29/20	18.4±4.9	7.6±2.2	13.5±1.9
死亡组	38	68.0±11.3	24/14	25.7±5.3	10.8±2.7	16.0±2.2
<i>t</i> 值		-0.689	0.142	-6.651	-6.091	5.680
<i>P</i> 值		0.492	0.706	0.000	0.000	0.000

### 2.2 两组患者的RDW、CHE测定值比较

存活组患者的RDW、CHE测定值均显著的高于死亡组,差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。见表2。

表2 两组患者的RDW、CHE测定值比较( $\bar{x}\pm s$ )

Table 2 Comparison of RDW and CHE measurements between 2 groups of patients ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	<i>n</i>	RDW(%)	CHE(kU/L)
存活组	49	16.83±2.11	4.83±1.22
死亡组	38	13.29±1.95	3.29±0.94
<i>t</i> 值		8.020	6.437
<i>P</i> 值		0.000	0.000

### 2.3 两组患者的TEG参数测定值比较

存活组患者的MA值、 $\alpha$ 角测定值均显著的高于死亡组,差异具有统计学意义( $P<0.05$ ),存活组患者的K值、R值测定值均显著的低于死亡组,差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。见表3。

表3 两组患者的TEG参数测定值比较( $\bar{x}\pm s$ )

Table 3 Comparison of TEG parameter measurements between 85 groups of patients ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	<i>n</i>	K值 (min)	R值 (min)	MA值 (mm)	$\alpha$ 角 (°)
存活组	49	2.28±0.63	6.38±1.52	59.28±5.52	61.10±5.59
死亡组	38	3.19±0.74	8.96±2.29	48.55±4.80	55.41±5.20
<i>t</i> 值		-6.190	-6.302	9.512	4.853
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000	0.000

### 2.4 相关性分析

存活组患者的RDW、CHE、MA值、 $\alpha$ 角测定值与APACHE II评分呈显著的负相关关系,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),存活组患者的K值、R值

测定值与APACHE II评分呈显著的正相关关系差异有统计学意义( $P<0.05$ )。见表4。

表4 相关性分析结果

Table 4 Correlation analysis results

指标	APACHE II评分	
	<i>r</i> 值	<i>P</i> 值
K值	0.595	0.000
R值	0.628	0.000
MA值	-0.557	0.000
$\alpha$ 角	-0.641	0.000
RDW	-0.728	0.000
CHE	-0.633	0.000

## 3 讨论

机械辅助性通气治疗能够有效改善重症肺炎患者的临床症状和患者的临床转归<sup>[7-8]</sup>。但临床上缺乏对于重症肺炎机械通气治疗过程中可靠的评估性指标,虽然肺部CT检查能够评估重症肺炎患者的病情,反映肺部实质性病情情况,但一项囊括了109例样本量的临床随访观察研究发现,依靠胸部CT检查评估重症肺炎患者机械通气治疗结局的一致性率不足45%,其对于重症肺炎患者的临床转归的预测灵敏度不足40%<sup>[9]</sup>。通过研究重症肺炎患者RDW、CHE及TEG参数的表达,能够为重症肺炎病情的演变提供参考,同时为重症肺炎病情的评估提供依据。

RDW是评估红细胞膜完整性和异质性的指标,在炎症反应或者氧化应激性障碍发生的过程中,不同病理性因素均能够导致红细胞成熟障碍,红细胞的体积或者宽度均明显的下降<sup>[10]</sup>。同时在重症感染性疾病中,由于炎症效应因子的破坏,骨

髓中未成熟的红细胞大量释放入血,导致红细胞平均宽度的减小<sup>[11]</sup>;CHE在人体内主要以多种同工酶的形式存在,在重症肺炎患者中,缺氧缺血的条件导致肝脏血流灌注不足,肝脏对于CHE的合成明显的减少<sup>[12]</sup>;TEG参数R指标及K指标能够反应凝血因子的浓度,MA能够反应活化血小板的数量, $\alpha$ 角代表了血栓形成的速度。

本研究提示了存活组患者的病情程度较轻,病理生理性评分较小、需要机械辅助维持通气的时间较短。并提示了RDW、CHE的表达上升与重症肺炎患者临床预后的关系。探讨其内在的基础原因<sup>[13]</sup>:①RDW较高的肺炎患者细胞再生能力良好,细胞体积大小之间差异明显;②CHE较高的患者,其肝脏的缺氧缺血性程度较轻,对于CHE的代偿合成能力较高,避免了肝脏缺氧缺血性损伤导致的多器官功能障碍和病死的发生。肖成钦等<sup>[14]</sup>研究者也认为,在需要进行机械通气的重症肺炎患者中,存活组患者的CHE表达浓度可上升20%以上,特别是在远期并发症发生率较低或者无菌血症及脓毒血症的患者中,CHE的表达上升更为明显。对于TEG参数的分析研究可见,存活组患者的MA值、 $\alpha$ 角测定值明显上升,而K值、R值显著的低于死亡组,差异较为明显,提示了存活组重症肺炎患者,其血小板的功能的稳定性较高,凝血因子或者纤维蛋白原的激活程度较低。但部分研究者认为,在重症肺炎患者中,MA值并无明显的改变,认为只有在合并有败血症或者基础性凝血功能障碍的患者中,MA值才明显的上升<sup>[15-16]</sup>。其原因仍然未得到解释,结论仍然需要进一步证实。

综上所述,在需要进行机械通气的重症肺炎患者中,存活组患者的RDW、CHE明显上升,TEG参数MA值、 $\alpha$ 角明显上升,而K值、R值明显的下降,同时RDW、CHE及TEG参数与APACHE II评分密切相关。

### 参考文献

[1] Chisti M J, Duke T, Salam M A, et al. Impact of Diarrhea on the Clinical Presentation and Outcome of Severe Pneumonia in Bangladeshi Children [J]. *Pediatric Infec Dis J*, 2016, 35

(10): 1161-1162.

- [2] Kim H, Choi S M, Lee J, et al. Respiratory virus of severe pneumonia in South Korea: Prevalence and clinical implications [J]. *PloS One*, 2018, 13(6): 902-904.
- [3] 戴本军,柴小青,翁云龙,等. 红细胞分布宽度对社区获得性肺炎病情严重程度及预后的评估价值 [J]. *中国临床保健杂志*, 2017, 20(6): 685-688.
- [4] 郭天柱,麦岚. 降钙素原变化率在重症肺炎中的诊断价值 [J]. *深圳中西医结合杂志*, 2019, 29(7): 23-25
- [5] 莫新,吴志刚,吴伟博,等. 重症肺炎患者早期血清胆碱酯酶含量的变化及其相关性探讨 [J]. *热带医学杂志*, 2018, 17(6): 723-726+754.
- [6] 何茜,穆琼,郝晟赞,等. 老年社区获得性肺炎呼吸衰竭患者凝血功能的变化及其临床意义研究 [J]. *中华医院感染学杂志*, 2018, 28(2): 188-191.
- [7] Tuti T, Agweyu A, Mwaniki P, et al. An exploration of mortality risk factors in non-severe pneumonia in children using clinical data from Kenya [J]. *BMC Medicine*, 2017, 15(1): 56-58.
- [8] Bassat Q, Lanaspá M, Machevo S, et al. Hypoxaemia in Mozambican children <5 years of age admitted to hospital with clinical severe pneumonia: clinical features and performance of predictor models [J]. *Trop Med Inte Health*, 2016, 21(9): 1147-1156.
- [9] 李晓燕,邢丽华,高景. 重症肺炎患者血清胆碱酯酶、降钙素原、D-二聚体与预后 [J]. *中国实用医刊*, 2016, 11(24): 23-26.
- [10] 刘月,刘晓民,马雨霞,等. 红细胞分布宽度与社区获得性肺炎严重程度及预后的关系 [J]. *中华肺部疾病杂志(电子版)*, 2016, 9(4): 434-435.
- [11] 廖笑玲,吴亮. 儿童重症肺炎支原体肺炎红细胞分布宽度与心肌损害的相关性分析 [J]. *中国全科医学*, 2017, 20(S1): 11-14.
- [12] 黄敏. 血清胆碱酯酶检测在肺心病急性加重患者中的意义及与预后相关性 [J]. *医学理论与实践*, 2019, 32(10): 1579-1580.
- [13] 马征,牟丽娜,朱保月,等. 老年细菌性肺炎患者血清胆碱酯酶及免疫、炎症因子的改变及临床意义 [J]. *中国老年学杂志*, 2017, 37(7): 1686-1687.
- [14] 肖成钦,梁勇,王聪,等. 血清胆碱酯酶水平对老年重症肺炎患者生存状况的影响 [J]. *中国老年学杂志*, 2017, 37(6): 1445-1447.
- [15] 吴德,郑慧贞,张锦清,等. 广东省2006年社区获得性肺炎监测结果分析 [J]. *华南预防医学*, 2018(2): 28-30.
- [16] 孙春荣,黄琳娜,崔晓阳,等. 老年重症肺炎患者血清hs-CRP水平变化及临床意义 [J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2018, 10(5): 347-351.

· 论 著 ·

## FeNO联合血清ECP、IgE检测对支气管哮喘的临床诊断价值

买智涛\* 姜明明 万善志

**[摘要]** **目的** 探讨呼出气一氧化氮(FeNO)、血清嗜酸性粒细胞阳离子蛋白(ECP)、免疫球蛋白E(IgE)单项及联合检测对支气管哮喘的诊断效能,以及各指标与肺功能的关系。**方法** 选取2016年6月至2018年6月在本院接受治疗的138例疑似支气管哮喘患者为研究对象,对比分析最终诊断为支气管哮喘及非支气管哮喘(如慢性支气管炎等)患者的基线资料、FeNO、血清ECP、IgE水平及肺功能的差异,同时分析FeNO、血清ECP、IgE水平与肺功能的关系,并绘制FeNO、血清ECP、IgE单独及联合检测鉴别诊断支气管哮喘的ROC曲线。**结果** 138例疑似支气管哮喘患者中,最终诊断为支气管哮喘者67例;非支气管哮喘者71例,其中23例为慢性咳嗽,14例为慢性支气管炎,18例为过敏性鼻炎,其他为16例。支气管哮喘组患者FeNO、血清ECP、IgE水平均明显高于非支气管哮喘组( $P<0.05$ ),而FEV1%、PEF%水平明显低于非支气管哮喘组( $P<0.05$ )。FeNO、血清ECP、IgE水平与FEV1%、PEF%指标均呈显著负相关( $P<0.05$ )。ROC曲线结果示,3指标联合检测诊断支气管哮喘的AUC为0.847,高于各指标的单项检测(0.834、0.780、0.730),且检测敏感度为0.731,显著高于各指标单项检测(0.642、0.597、0.493)。**结论** 支气管哮喘患者存在FeNO、血清ECP、IgE的显著升高,且与机体FEV1%、PEF%等肺功能指标呈显著的线性负相关。对于疑似支气管哮喘患者,早期进行FeNO、血清ECP、IgE检测有利于支气管哮喘的鉴别诊断,而联合检测对支气管哮喘具有更高的敏感度,对支气管哮喘的早期筛查更具价值。

**[关键词]** 呼出气一氧化氮;嗜酸性粒细胞阳离子蛋白;免疫球蛋白E;支气管哮喘;诊断

### Clinical value of FeNO combined with serum ECP and IgE in the diagnosis of bronchial asthma

MAI Zhitao\*, JIANG Mingming, WAN Shanzhi

(Respiratory medicine department one, Cangzhou central hospital, Cangzhou, Hebei, China, 061001)

**[ABSTRACT]** **Objective** To investigate the diagnostic efficacy of FeNO, serum ECP and IgE for bronchial asthma, and the relationship between these indexes and lung function. **Methods** 138 patients suspected of having bronchial asthma who were treated in our hospital from June 2016 to June 2018 were enrolled as research objects. The differences in baseline data, FeNO, serum ECP, IgE, and pulmonary function between patients with bronchial asthma and non-bronchial asthma (e.g. chronic bronchitis) were compared. The relationship between FeNO, serum ECP and IgE levels and lung function was also analyzed. The ROC curve of FeNO, serum ECP, IgE was calculated for the diagnosis of bronchial asthma. **Results** Among 138 patients suspected of having bronchial asthma, 67 cases were diagnosed as bronchial asthma. Among the 71 cases of non-bronchial asthma, 23 cases had chronic cough, 14 cases had chronic bronchitis, 18 cases were allergic rhinitis, and the others were 16 cases. The levels of FeNO, serum ECP and IgE in the bronchial asthma group were significantly higher than those in the non-bronchial asthma group ( $P<0.05$ ). The

基金项目:沧州市科技计划项目(1832131440)

作者单位:沧州市中心医院呼吸内一科,河北,沧州061001

\*通信作者:买智涛, E-mail: manghytdf@163.com

levels of FEV1% and PEF% in the bronchial asthma group were significantly lower than those in non-bronchial asthma group ( $P<0.05$ ). FeNO, serum ECP, IgE levels were negatively correlated with FEV1% and PEF% ( $P<0.05$ ). The results of the ROC curve showed that the AUC of the combined detection of three indicators for the diagnosis of bronchial asthma was 0.847, it was higher than that of the single detection of each indicator (0.834, 0.780, 0.730) with the sensitivity of 0.731, significantly higher than that of the single detection of each indicator (0.642, 0.597, 0.493). **Conclusion** In patients with bronchial hypertension, there is a significant increase in FeNO, serum ECP, and IgE, and negatively correlated with lung function indexes such as FEV1% and PEF%. For patients suspected of having bronchial asthma, FeNO, serum ECP and IgE detection in early stage is beneficial to the differential diagnosis of bronchial asthma, Notably, the combined detection has a higher sensitivity to bronchial asthma and more valuable for early screening of bronchial asthma.

**[KEY WORDS]** Exhaled nitric oxide; Eosinophilic cationic protein; Immunoglobulin E; Bronchial asthma; Diagnosis

支气管哮喘属于一种以气道炎症及高反应性为病理基础的疾病,中性粒细胞、肥大细胞、嗜酸粒细胞等多种细胞共同参与气道炎症反应的发生,而气道炎症反应是导致哮喘气道高反应发生的重要因素<sup>[1]</sup>。目前对支气管哮喘的诊断主要以临床症状、体征结合肺功能检测(支气管激发或舒张试验)为主,但其诊断的特异性较低,同时对患者配合情况要求较高。因此,寻求一种简单、快速、安全且对支气管哮喘诊断效能更高的检测手段是十分必要的。呼出气一氧化氮(Fractional exhaled nitric oxide, FeNO)是临床上用来监测气道炎症的非创伤性手段,特别是在诊断哮喘的过程中发挥着非常重要的作用<sup>[2]</sup>。嗜酸性粒细胞阳离子蛋白(Eosinophilic cationic protein, ECP)在哮喘发病过程中发挥重要作用,而血清免疫球蛋白E(Immunoglobulin E, IgE)高水平是哮喘诊断的重要指标。因此,FeNO、血清ECP、IgE检测可能对气道炎症反应的定量评价具有重要价值<sup>[3]</sup>。而基于FeNO、血清ECP、IgE与支气管哮喘的紧密联系,近年来,本院对收治的疑似支气管哮喘患者均进行FeNO、血清ECP、IgE水平及肺功能检测,并以患者临床症状体征以及支气管激发或舒张试验结果作为诊断支气管哮喘的金标准,探讨FeNO、血清ECP、IgE对支气管哮喘的临床诊断价值,以及各指标与肺功能的关系,为支气管哮喘的诊断提供依据,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月在本院接受治疗的138例疑似支气管哮喘患者为研究对象,纳入标准:①研究对象均符合知情同意原则,并已经过

院伦理委员会审批;②无明确哮喘病史;③存在呼吸困难、胸闷、喘息等症状,且经X线等辅助检查并无异常;④发病24 h内无支气管舒张剂、 $\beta_2$ 受体激动剂使用史,48 h内无抗组胺类药物使用史。排除标准:①1个月内有呼吸道感染病史或者变态反应相关表现,以及激素及抗感染药物使用史者;②无法配合完成FeNO检测及支气管激发或舒张试验者;③气胸、心律失常无法进行支气管激发或舒张试验者;④相关检查前1 h内进食过富含氮类的食物。其中男76例,女62例,年龄21~65岁,平均(43.32±14.66)岁,体重指数20~29 Kg/m<sup>2</sup>,平均(24.67±4.74)Kg/m<sup>2</sup>,有吸烟史者40例,占31.16%。

### 1.2 检测指标及方法

#### 1.2.1 FeNO检测

所有患者均采用一氧化氮测定仪(NIXO,由瑞典Aerocrine AB公司提供)对FeNO进行检测。测试前1 h内均无剧烈运动,测定前将气体标本收集方法通过视频让所有人观看,后进行检测,检测时嘱患者静坐,首先尽可能呼出肺内所有气体,然后用嘴包紧口含器并全力吸气5 s,再缓慢呼出肺内气体,持续约10 s,在测定时将流速维持在50 mL/s,90 s后对FeNO数据进行读取,重复检测3次,并计算3次的平均值。进行此操作时严格按照说明书进行。

#### 1.2.2 血清ECP及总IgE检测

于入院次日清晨抽取4 mL空腹静脉血,常规离心、冷冻保存待<sup>[4-5]</sup>。应用变态反应检测仪(瑞典Phadia公司,型号:UniCapSystem,)对血清ECP水平进行检测,应用全自动生化仪(日本株式会社日立高新技术公司,型号:日立7160)ELISA法检测血清总IgE水平,并均严格依照试剂盒说明书中的操作步骤进行。

### 1.2.3 肺功能检测

应用多功能肺功能检测仪(比利时麦迪公司,型号:Medisoft)对所有患者第1 s用力呼气容积(FEV1)占预测值百分比(FEV1%)以及最大呼气流量(PEF)占预计值百分比(PEF%)进行检查,以FEV1%、PEF%指标对肺功能进行评价<sup>[6]</sup>。

### 1.3 观察指标

记录患者支气管哮喘及非支气管哮喘疾病发生情况,并对哮喘严重程度进行评价,分析两组患者一般资料、FeNO、血清ECP、IgE水平及FEV1%、PEF%的差异,以及FeNO、血清ECP、IgE水平与肺功能的关系。

### 1.4 统计学方法

应用SPSS 18.0统计软件进行处理,计数资料用 $n(\%)$ 表示,组间比较采用 $\chi^2$ 检验,计量资料用 $(\bar{x}\pm s)$ 表示,采用 $t$ 检验,应用ROC曲线对FeNO、血清ECP、IgE单项及联合检测支气管哮喘的诊断效能进行分析,两连续变量相关性分析采用Pearson相关分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 患者基线资料比较

两组患者性别、年龄、体重指数、吸烟史差异均无统计学意义( $P>0.05$ ),见表1。

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

Table 1 Baseline data were compared between the 2 groups [ $n(\%)$ ,  $(\bar{x}\pm s)$ ]

分组	$n$	年龄(岁)	性别		体重指数(Kg/m <sup>2</sup> )	吸烟史	
			男	女		有	无
支气管哮喘组	67(48.55)	44.58±14.77	38(56.72)	29(43.28)	25.21±5.04	22(32.84)	45(67.16)
非支气管哮喘组	71(51.45)	42.13±14.61	38(53.52)	33(46.48)	24.16±4.21	18(25.35)	53(74.65)
$\chi^2$ 值		0.979		0.142	1.331		0.938
$P$ 值		0.329		0.706	0.185		0.333

### 2.2 两组患者 FeNO、血清 ECP、IgE 及肺功能指标比较

支气管哮喘组患者 FeNO、血清 ECP、IgE 水平

均明显高于非支气管哮喘组,而 FEV1% 及 PEF% 水平则显著低于非支气管哮喘组,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。见表2。

表2 两组患者 FeNO、血清 ECP、IgE 及肺功能指标比较 ( $\bar{x}\pm s$ )

Table 2 Comparison of FeNO, serum ECP, IgE and pulmonary function indicators between the 2 groups ( $\bar{x}\pm s$ )

分组	$n$	FeNO(ppb)	ECP( $\mu$ g/L)	IgE(IU/mL)	FEV1%	PEF%
支气管哮喘组	67	65.09±30.84	38.09±21.37	325.93±165.94	85.73±19.61	78.57±19.43
非支气管哮喘组	71	31.64±13.70	17.58±8.31	183.70±96.23	95.78±12.15	87.83±11.73
$t$ 值		8.312	7.510	6.202	3.640	3.414
$P$ 值		0.000	0.000	0.000	0.000	0.001

### 2.3 FeNO、血清 ECP、IgE 与肺功能的关系

经 Pearson 相关分析,结果显示,FeNO、血清 ECP、IgE 与 FEV1% 呈负相关( $r=-0.448$ ,  $P=0.000$ ;  $r=-0.398$ ,  $P=0.000$ ;  $r=-0.283$ ,  $P=0.001$ ),与 PEF% 也成负相关( $r=-0.326$ ,  $P=0.000$ ;  $r=-0.283$ ,  $P=0.001$ ;  $r=-0.225$ ,  $P=0.008$ )。见图1。

### 2.4 FeNO、血清 ECP、IgE 单项及联合检测诊断支气管哮喘的 ROC 曲线及效能参数

通过绘制 ROC 曲线确定 FeNO、血清 ECP、IgE 诊断支气管哮喘的最佳临界值,同时应用 SPSS 18.0 的 Binary Logistic 和 ROC Curve 计算三个指标观察值预测概率 PRE,以预测概率 PRE 为

检验变量,绘制联合检测诊断支气管哮喘的 ROC 曲线,明确各指标诊断支气管哮喘的敏感度、特异度及 AUC,见表3。

## 3 讨论

哮喘是世界上的一类大疾病,全球每年均有3亿人发病。我国每年发生支气管哮喘的患者大约有3000万,发病率在1%~4%之间,近几年该病的发生率呈直线上升趋势<sup>[7]</sup>。支气管哮喘患者通常在清晨及夜间时病情较为严重,可能还会出现可逆性气流受限,但大部分患者可以自行缓解。支气管哮喘的发生与支气管痉挛、气道高反应性密

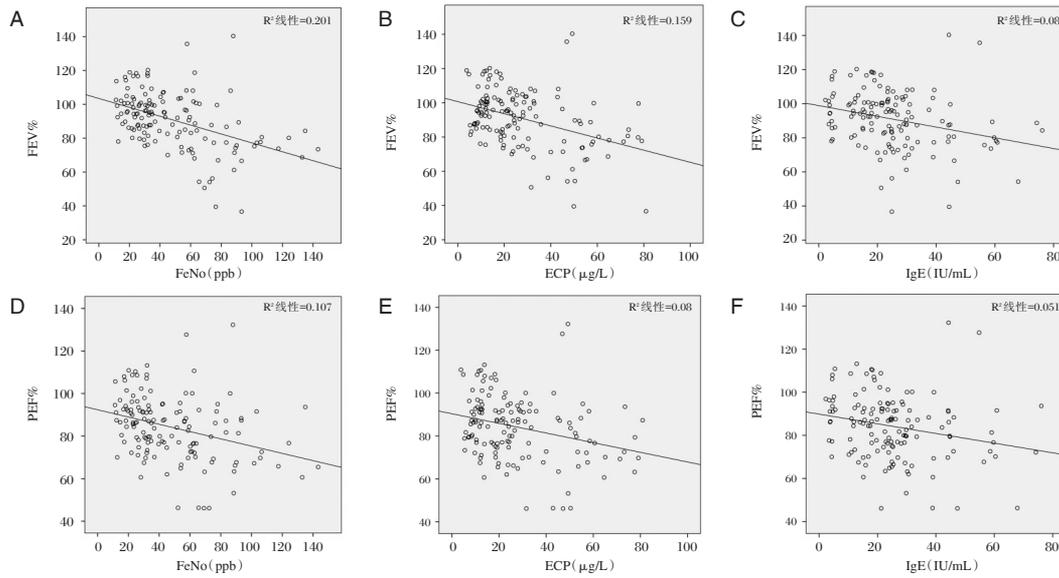


图1 FeNO、血清ECP、IgE与FEV1%、PEF%的相关性

Figure 1 Correlation of FeNO, serum ECP and IgE with fev1% and PEF%

表3 各指标单独及联合检测诊断支气管哮喘的效能参数  
Table 3 Efficacy parameters of each index for the detection and diagnosis of bronchial asthma independently and jointly

指标	临界值	敏感度	特异度	AUC(95%CI)
FeNO(ppb)	57.335	0.642	0.958	0.834(0.766~0.902)
ECP(µg/L)	28.300	0.597	0.887	0.780(0.702~0.858)
IgE(IU/mL)	291.195	0.493	0.859	0.730(0.647~0.813)
PRE	0.541	0.731	0.845	0.847(0.781~0.913)

切相关,该病的本质为气道炎性反应。以往临床上对支气管哮喘的诊断和监测主要是根据患者的症状、肺功能以及生命体征等,肺功能是当前临床上常用的评估哮喘治疗效果的重要指标,但是有学者研究发现<sup>[8]</sup>,气道炎性反应与肺功能的关联性并不大,而是与其他因素相关。支气管内膜活检与支气管肺泡灌洗液是临床上评估气道炎性反应的最佳手段,但是由于以上操作费用较高、对患者造成的创伤较大、患者耐受程度较低等原因很难被患者接受。因此,寻求更加高效、灵敏、无创的检测方法对支气管哮喘进行诊断是临床研究的重点。

由于支气管哮喘存在反复发作、很难根治的特点,临床上单纯对患者的肺功能进行检测,诊断结果并不可靠。随着诊断技术的进步,人们发现支气管哮喘患者在发病期间,均存在不同程度的炎性反应,对患者炎性指标水平进行检测,可为支气管哮喘病情评估提供一定的依据。FeNO主要由呼吸道上皮细胞产生,与气道炎症关系密切,其

检测操作简单,且对患者造成的创伤较小,不仅可对气道炎症反应进行评估,而且还可对患者是否对激素治疗药物存在过敏反应进行准确评估,同时还能对疾病的良恶性进行较为准确的鉴别。FeNO检测可以反映支气管哮喘患者气道炎性反应程度,已逐渐成为哮喘临床诊断的重要指标<sup>[9]</sup>。IgE属于一种变态反应介质,其细胞活性较强,能与人体内的嗜碱粒细胞及肥大细胞等结合。有学者研究发现,很多哮喘基因与高水平的IgE存在紧密联系,IgE基因与气道高反应基因相似,与气道高反应的发生密切相关<sup>[10]</sup>。还有相关研究发现,支气管哮喘的严重程度与IgE的水平成正比<sup>[11]</sup>。嗜酸性粒细胞可以和IgE相互结合生成ECP,标志着嗜酸细胞的激活,可反映气道炎症的活动性,并可导致气道上皮坏死并诱发气道高反应性<sup>[12-14]</sup>。本研究结果提示FeNO、血清ECP、IgE水平有助于对呼吸道疾病患者肺功能进行评价,同时可能有助于支气管哮喘的鉴别诊断。而进一步通过绘制ROC曲线分析各指标鉴别诊断支气管哮喘的效能参数,结果显示,FeNO、血清ECP、IgE单独及联合检测诊断支气管哮喘的特异度均较高,而联合检测的敏感度明显高于各单项检测,提示联合检测更有利于支气管哮喘的早期筛查。

综上所述,支气管哮喘患者存在FeNO、血清ECP、IgE的显著升高,且与机体FEV1%、PEF%等肺功能指标呈显著的线性负相关,(下转第633页)

· 论 著 ·

## PCT、sICAM-1、sVCAM-1在慢性肾小球肾炎合并细菌感染中的应用价值

廖荣叶<sup>1</sup> 孙守萍<sup>2</sup> 曹志<sup>1\*</sup>

**[摘要]** **目的** 探讨慢性肾小球肾炎合并细菌感染患者降钙素原(PCT)、可溶性细胞间黏附分子-1(sICAM-1)、可溶性血管细胞黏附分子-1(sVCAM-1)的水平及意义。**方法** 选取2017年1月至2018年12月在本院治疗的慢性肾小球肾炎患者105例(慢性肾炎组),其中合并细菌感染患者42例,未合并细菌感染患者63例,同时选取健康自愿者100例作为对照组,比较两组血清PCT、sICAM-1、sVCAM-1水平差异及是否合并细菌感染的肾小球肾炎患者血清PCT、sICAM-1、sVCAM-1水平差异,并绘制ROC曲线,比较PCT、sICAM-1、sVCAM-1单独检测及联合检测对肾小球肾炎合并细菌感染的诊断效能。**结果** 慢性肾小球肾炎组PCT、sICAM-1、sVCAM-1水平明显高于对照组,差异有统计学意义( $P<0.05$ );慢性肾小球肾炎合并细菌感染患者PCT、sICAM-1、sVCAM-1水平明显高于未合并细菌感染者,差异有统计学意义( $P<0.05$ );慢性肾小球肾炎合并细菌感染患者中,革兰阴性菌感染患者27例,革兰阳性菌感染患者15例;慢性肾小球肾炎合并革兰阴性菌与革兰阳性菌感染患者PCTs、ICAM-1、sVCAM-1水平比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。ROC曲线显示,PCT、sICAM-1、sVCAM-1单独诊断慢性肾小球合并细菌感染的AUC值为0.886、0.816及0.752,联合检测诊断慢性肾小球肾炎合并细菌感染的AUC值为0.922,PCT、sICAM-1、sVCAM-1联合检测的诊断效能最高。**结论** 慢性肾小球肾炎患者PCT、sICAM-1、sVCAM-1水平升高,尤其合并细菌感染者明显升高,但与细菌病原体类型无明显关系,PCT、sICAM-1、sVCAM-1联合检测对慢性肾小球肾炎合并细菌感染具有较好的诊断价值。

**[关键词]** 慢性肾炎; 细菌感染; 降钙素原; 可溶性细胞间黏附分子-1; 可溶性血管细胞黏附分子-1

### Application Value of PCT、sICAM - 1 and sVCAM - 1 in chronic glomerulonephritis complicated with bacterial infection

LIAO Rongye<sup>1</sup>, SUN Shouping<sup>2</sup>, CAO Zhi<sup>1\*</sup>

(1. Department of traditional Chinese medicine, the third people's Hospital of Xinyang, Xinyang, Henan, China, 464000; 2. Department of Endocrinology, the third people's Hospital of Xinyang, Xinyang, Henan, China, 464000)

**[ABSTRACT]** **Objective** To investigate the levels and significance of procalcitonin (PCT), soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1) and soluble vascular cell adhesion molecule-1 (sVCAM-1) in chronic glomerulonephritis patients complicated with bacterial infection. **Methods** 105 patients with chronic glomerulonephritis (chronic nephritis group) who were treated in our hospital from January 2017 to December 2018 were selected, including 42 patients with bacterial infection and 63 patients without bacterial infection, and 100 healthy volunteers were selected as control group, levels of PCT, sICAM-1 and sVCAM-1 were detected. Difference of serum PCT, sICAM-1 and sVCAM-1 were compared in these two groups and in glomerulo-

基金项目:河南省医学科技攻关计划项目(2018063123)

作者单位:1.信阳市第三人民医院中医科,河南,信阳46400

2.信阳市第三人民医院内分泌科,河南,信阳464000

\*通信作者:曹志, E-mail:caozhilong2008@163.com

nephritis patients with or without bacterial infection and patients with different bacterial infection, ROC curve were drawn for estimate diagnostic efficacy of PCT, sICAM-1 and sVCAM-1 on glomerulonephritis patients with bacterial infection. **Results** The levels of PCT, sICAM-1 and sVCAM-1 in chronic nephritis group which were significantly higher than those in control group ( $P<0.05$ ); The levels of PCT, sICAM-1 and sVCAM-1 in patients with chronic nephritis complicated with bacterial infection were which were significantly higher than those without bacterial infection ( $P<0.05$ ); Among the patients with chronic nephritis complicated with bacterial infection, 27 were Gram-negative bacterial infection and 15 were Gram-positive bacterial infection; There were no significant difference in PCT sICAM-1 and sVCAM-1 levels between patients with chronic nephritis complicated with Gram-negative bacteria and Gram-positive bacteria ( $P>0.05$ ). ROC curve showed that the AUC value of PCT, sICAM-1, sVCAM-1 and PCT + sICAM-1 + sVCAM-1 was 0.886, 0.816, 0.752 and 0.922 respectively. The AUC value of joint detection was the highest. **Conclusion** The serum levels of PCT, sICAM-1 and sVCAM-1 are elevated in patients with chronic nephritis, especially in those with bacterial infection, but there is no significant relationship with the types of bacterial pathogens, combined detection of PCT, sICAM-1 and sVCAM-1 has a better diagnostic value in chronic glomerulonephritis with bacterial infection.

[KEY WORDS] Chronic nephritis; Bacterial infection; Procalcitonin; Soluble intercellular adhesion molecule-1; Soluble vascular cell adhesion molecule-1

慢性肾小球肾炎是由原发性肾小球疾病缓慢发展而来的慢性肾病<sup>[1-2]</sup>。慢性肾小球肾炎早期缺乏特异性的临床表现,早期诊断较为困难,多进展为慢性的肾功能损害,发生水肿、血尿等临床症状,同时伴有肾功能不全,如血尿素氮及血肌酐升高等。慢性肾小球肾炎属免疫性疾病<sup>[3-4]</sup>,但发病多有前驱感染史,细菌感染导致的免疫反应可能诱发肾小球肾炎的发生,同时慢性肾小球肾炎患者的免疫力异常,发生细菌感染的风险增加,一旦发生细菌感染,可能诱发肾小球肾炎的急剧进展,诱发肾功能衰竭的发生,也是影响慢性肾小球肾炎患者预后的主要风险因素之一<sup>[5-6]</sup>。因此对于感染的早期诊断及治疗,对于改善慢性肾小球肾炎的预后具有积极的意义。降钙素原(procalcitonin, PCT)是临床上常用的细菌感染的诊断指标,在感染早期既可明显升高,而且与感染的严重程度相关<sup>[7]</sup>。细胞粘附因子是在细胞与细胞间、细胞与细胞外基质间起粘附作用的膜表面蛋白。其中可溶性细胞间黏附分子-1(Soluble intercellular adhesion molecule-1, sICAM-1)、可溶性血管细胞黏附分子-1(Soluble vascular cell adhesion molecule-1, sVCAM)是免疫球蛋白超家族成员,由外周巨噬细胞释放,能够趋化白细胞、淋巴细胞等炎症细胞具有趋化作用,其表达水平能够收到肿瘤坏死因子,白细胞介素等炎性介质的诱导,在发生炎症、细菌及病毒感染时均能明显升高,在感染性疾病

中 sICAM-1、sVCAM 的表达水平明显升高,并且与疾病的严重程度具有相关性<sup>[8-9]</sup>,对病情评估具有重要的价值。目前慢性肾小球肾炎合并细菌感染尚缺乏有效的血清学诊断指标,为进一步提高慢性肾小球肾炎合并细菌感染的早期诊断效果,本文就 sICAM-1、sVCAM 在慢性肾小球肾炎合并细菌感染中的变化及其诊断价值进行研究,现报告如下。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选取2017年1月至2018年12月在本院治疗的慢性肾小球肾炎患者105例(慢性肾炎组),慢性肾小球肾炎患者合并细菌感染者42例(感染组),其中泌尿道感染29例,呼吸道感染13例,未合并细菌感染患者63例(未感染组)。同时选取本院健康管理中心健康体检者100例作为对照组。

纳入标准:①符合《内科学》(第7版)中慢性肾小球肾炎诊断标准<sup>[8]</sup>,且经细菌培养证实是否合并细菌感染;②年龄 $\geq 18$ 岁;③患者及家属知情同意。排除标准:①继发性肾小球疾病、特发性高钙尿症、遗传性肾脏病、运动员肾炎等其他肾脏疾病;②合并有恶性肿瘤、心肝等其他脏器功能障碍、糖尿病及免疫系统疾病、甲状腺疾病等;③妊娠期或哺乳期妇女。慢性肾炎组和对照组一般资料比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ ),见表1。

表1 慢性肾炎组和对照组一般资料比较 ( $\bar{x} \pm s$ )Table 1 Comparison of general data between chronic nephritis group and control group ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	<i>n</i>	男/女	年龄 (岁)	体重指数 (kg/m <sup>2</sup> )
对照组	100	65/35	54.56±8.84	22.03±2.64
慢性肾炎组				
感染	42	27/15	54.86±9.26	21.64±2.79
未感染	63	37/26	55.27±9.41	22.23±3.36
<i>F/χ<sup>2</sup></i> 值		0.519	0.142	0.319
<i>P</i> 值		0.342	0.826	0.226

## 1.2 指标检测

### 1.2.1 标本采集

研究对象入组后采集空腹静脉血,低温离心机离心(在3 000 r/min),分离血清,-20℃低温保存,分批检测。

### 1.2.2 PCT、sICAM-1、sVCAM-1检测

血清PCT、sICAM-1、sVCAM-1检测采用ELISA法,所需试剂盒均由罗氏公司提供,检测仪器为MULTISKAN SKY酶标仪,由赛默飞世尔公司提供,检测波长450 nm,操作过程严格依照试剂盒说明书进行。

### 1.3 统计学处理

采用SPSS 19.0软件进行统计分析,计量资料采用( $\bar{x} \pm s$ )表示,正态分布资料两独立样本比较使用独立样本*t*检验,计数资料比较采用 $\chi^2$ 检验,*P*<0.05为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 两组PCT、sICAM-1、sVCAM-1水平比较

慢性肾炎组PCT、sICAM-1、sVCAM-1水平明显高于对照组,差异有统计学意义(*P*<0.05)。见表2。

表2 两组PCT、sICAM-1、sVCAM-1水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )Table 3 Comparison of PCT, sICAM-1 and sVCAM-1 levels between the 2 groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	<i>n</i>	PC T(μg/L)	sICAM-1 (ng/mL)	sVCAM-1 (ng/mL)
对照组	100	0.12±0.03	102.12±42.23	154.31±71.03
慢性肾炎组	105	1.68±0.42	310.55±97.87	440.84±104.51
<i>t</i> 值		-37.049	-19.626	-22.847
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000

### 2.2 慢性肾炎组是否合并细菌感染患者PCT、sICAM-1、sVCAM-1水平比较

慢性肾炎合并细菌感染患者PCT、sICAM-1、sVCAM-1水平,明显高于未合并细菌感染者,差异有统计学意义(*P*<0.05)。见表3。

表3 两组PCT、sICAM-1、sVCAM-1水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )Table 3 Comparison of PCT, sICAM-1 and sVCAM-1 levels between the 2 groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	<i>n</i>	PCT (μg/L)	sICAM-1 (ng/mL)	sVCAM-1 (ng/mL)
感染组	42	2.01±0.33	384.65±84.10	470.03±91.03
未感染组	63	1.46±0.30	261.16±90.11	420.41±80.72
<i>t</i> 值		8.841	7.063	2.931
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.004

### 2.3 慢性肾炎合并不同细菌感染患者PCT、sICAM-1、sVCAM-1水平比较

慢性肾炎合并细菌感染患者中,革兰阴性菌感染患者27例(肺炎克雷伯菌感染14例,大肠埃希菌感染10例,铜绿假单胞菌感染3例),革兰阳性菌感染患者15例(金黄色葡萄球菌感染8例,凝固酶阴性葡萄球菌感染5例,肠球菌属感染2例)。慢性肾炎合并革兰阴性菌和革兰阳性菌感染患者PCT、sICAM-1、sVCAM-1水平比较差异无统计学意义(*P*>0.05)。见表4。

表4 慢性肾炎合并不同细菌感染患者PCT、sICAM-1、sVCAM-1水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )Table 4 Comparison of PCT, sICAM-1 and sVCAM-1 levels in patients with chronic nephritis and different bacterial infections ( $\bar{x} \pm s$ )

细菌	<i>n</i>	PCT (μg/L)	sICAM-1 (ng/mL)	sVCAM-1 (ng/mL)
革兰阴性	27	2.03±0.30	385.10±82.09	472.22±97.15
革兰阳性	15	1.97±0.29	383.84±91.80	466.09±89.80
<i>t</i> 值		0.628	0.046	0.201
<i>P</i> 值		0.533	0.964	0.842

### 2.4 PCT、sICAM-1、sVCAM-1对慢性肾小球肾炎合并细菌感染的诊断效能

ROC曲线显示PCT、sICAM-1、sVCAM-1联合检测的诊断效能最高。见表5,图1。

表5 PCT、sICAM-1、sVCAM-1对慢性肾小球肾炎合并细菌感染的诊断效能

Table 5 Diagnostic efficacy of PCT, sICAM-1 and sVCAM-1 in chronic glomerulonephritis with bacterial infection

指标	AUC	灵敏度(%)	特异度(%)
PCT	0.886	91.4	90.2
sICAM-1	0.816	87.6	84.9
sVCAM-1	0.752	65.3	72.4
三者联合	0.922	94.2	95.2

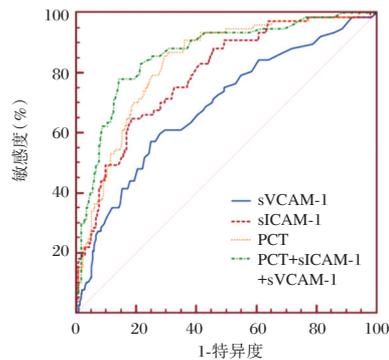


图1 PCT、sICAM-1、sVCAM-1诊断慢性肾小球肾炎合并细菌感染ROC曲线

Figure 1 ROC curve of diagnosis of chronic glomerulonephritis with bacterial infection by PCT, sICAM-1 and sVCAM-1

### 3 讨论

慢性肾小球肾炎是常见的慢性肾病,其发病与免疫、环境、生活等多种因素有关,甚至有遗传因素的参与<sup>[9]</sup>,如基因突变或遗传因素可能会影响慢性肾炎的发病。有研究报道<sup>[10]</sup>在外界因素的影响下,急性肾小球肾炎可发展为慢性肾小球肾炎,但大多数病因并不明确。慢性肾小球肾炎如果持续进展会发生肾功能衰竭,对患者的生活质量造成明显的影响。细菌感染在急、慢性肾小球的发病及进展中具有重要的作用,慢性肾小球肾炎时由于肾小球的结构破坏,尿量减少,尿液中蛋白等含量增加,尿路粘膜及机体的整体免疫功能下降,容易引起细菌在尿路的定植及发生感染。细菌感染过程能够导致肾脏结构及功能损害,甚至引发肾脏及肾盂脓肿,而且由于患者的免疫力低下,感染往往不易控制。

细菌感染是慢性肾炎的主要感染病原菌,有研究报道<sup>[11]</sup>慢性肾炎合并感染的患者感染菌群主要是革兰阴性菌。但早期感染症状并不明显,只有达到重度感染程度,如合并泌尿系统感染,某些

灵敏度和特异性较高的血清学指标在感染发作几小时后其水平就会出现显著性的变化,因此可用于了解慢性肾炎患者细菌感染情况及评估预后,对临床治疗方案的确定具有重要的指导意义。PCT是正常生理条件下含量微弱的无活性的降钙素前肽物质,细菌感染发作(除细菌感染外的其他疾病如病毒感染、自身免疫性疾病、过敏等均不会引起,具有特异性)短期内血清PCT急剧上升。因此,PCT水平的变化可作为细菌感染指征。本研究发现,慢性肾炎合并细菌感染患者较非感染患者,血清PCT显著上升,与既往研究报道一致<sup>[12]</sup>。sICAM-1、sVCAM是在生理状态下存在于血液或其它体液中的细胞粘附因子,均属于免疫球蛋白超基因家族中的一员。sICAM-1主要表达于血管内皮细胞表面,可作为局部炎症反应的血清学指标,有较多的研究报道<sup>[13]</sup>过sICAM-1已广泛应用于心血管、恶性肿瘤的临床诊断中。呼吸道感染、颅内感染、脓毒血症、全身炎症反应时sICAM-1显著升高,经抗炎治疗后其水平显著下降,说明sICAM-1可作为感染反应的辅助诊断指标,其主要通过介导白细胞迁移至炎症部位促进炎症级联反应的发生和发展。sVCAM-1以主动分泌或酶切方式产生并释放入血进行血液循环,在诱导白细胞粘附、迁移过程中起着重要作用。故sICAM-1、sVCAM可与PCT同时作为感染状态的血清学反应指标。本研究结果显示,慢性肾小球肾炎合并细菌感染患者sICAM-1、sVCAM水平均显著上升,与以往研究报道一致<sup>[14-15]</sup>。本研究的创新处,进一步分析sICAM-1、sVCAM、PCT水平改变与细菌类型的关系,但并未得出上述血清学指标与细菌病原体类型有关。在进一步的研究中发现,sICAM-1、sVCAM、PCT对慢性肾小球肾炎合并细菌感染均具有较好的诊断效能。实验结果提示sICAM-1、sVCAM、PCT联合检测对慢性肾小球肾炎合并细菌感染具有较好的临床效果。

综上所述,慢性肾炎患者PCT、sICAM-1、sVCAM水平升高,尤其合并细菌感染患者明显升高,但与细菌病原体类型无明显关系。本研究通过对比分析慢性肾炎合并感染与非感染患者血清PCT、sICAM-1、sVCAM水平差异,确定上述指标在慢性疾病感染中的诊断价值。且分析其与细菌病原体类型的关系,为临床治疗方案的确定提供科学依据,具有重要的临床指导意义。

## 参考文献

- [1] Wang YP. Effect of Shendi granule on T cell subsets and podocyte marker protein in chronic glomerulonephritis patients with Pi-Shen deficiency syndrome [J]. China Medical Abstracts (Internal Medicine), 2018, 35(1):10-16.
- [2] Lubas A, Kade G, Ryczek R, et al. Ultrasonic evaluation of renal cortex arterial area enables differentiation between hypertensive and glomerulonephritis-related chronic kidney disease [J]. Int Urol Nephrol, 2017, 49(9):1-9.
- [3] 回学军, 孙冬, 李志彪. 慢性肾小球肾炎与细胞因子含量表达的相关性[J]. 中国老年学杂志, 2017, 37(7):1737-1738.
- [4] 沈二霞, SHENErxia. Toll样受体与疾病[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2009, 1(4):269-272.
- [5] Bolz S, Totzeck A, Amann K, et al. CIDP, myasthenia gravis, and membranous glomerulonephritis - three autoimmune disorders in one patient: a case report [J]. BMC Neurol, 2018, 18(1):113-117.
- [6] Rodríguez-Guez A, Reyes L F, Monclou J, et al. Relationship between acute kidney injury and serum procalcitonin (PCT) concentration in critically ill patients with influenza infection [J]. Med Intensiva, 2018;S0210569117303637.
- [7] 杨阳, 杨雁. COPD 缓解期患者血清 PCT、IL-6、hs-CRP 水平对急性加重的预测作用[J]. 广东医学, 2017, 38(10):1531-1533.
- [8] 毛卫华, 林丽, 夏素芳, 等. 中西医结合治疗慢性肾炎的临床疗效观察[D]. 2012.
- [9] 黄东华, 何红涛, 檀银川. 肾络通汤对慢性肾小球肾炎患者 TGF-β1, MMP-9 和 TIMP-1 因子的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 11(15):196-201.
- [10] 雷莉, 胡大军, 柳永兵. miR-21 和 miR-145 在狼疮性肾炎患者中的表达及与疾病活动的相关性[J]. 热带医学杂志, 2019, 19(12):1489-1493.
- [11] 王玉红, 李盼, 彭睿. 急性肾小球肾炎合并尿路感染患儿病原学及实验室指标的研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2017, 11(19):4530-4533.
- [12] 李东风, 吴文, 蔡雪珍, 等. 降钙素受体基因多态性与广州地区绝经后妇女骨密度关系研究[J]. 华南预防医学, 2005, 27(6):9-13.
- [13] 陈四清, 谢文英, 尚立芝, 等. 二陈汤加味对慢性阻塞性肺疾病急性加重期老年患者免疫功能及 CCL18, CC16, IL-8 和 sICAM-1 的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 25(10):179-185.
- [14] 范月娟, 周磊, 冒鹏飞, 等. 乌司他丁联合血塞通注射液治疗老年急性胰腺炎的疗效及对血清 IL-2, TNF-α 及 sICAM-1 水平的影响[J]. 中国老年学杂志, 2017, 37(9):55-61.
- [15] 曲华, 郭明, 柴华, 等. 冠心丹参滴丸对慢性稳定型心绞痛血瘀证患者血瘀证计分及血清相关黏附因子水平的影响[J]. 中医杂志, 2017, 58(5):394-397.

(上接第 628 页)

对疑似支气管哮喘患者早期进行 FeNO、血清 ECP、IgE 检测有利于支气管哮喘的鉴别诊断, 而联合检测对支气管哮喘具有更高的敏感度, 对支气管哮喘的早期筛查更具价值。

## 参考文献

- [1] 张雪, 费霞, 鲍鲁红, 等. 支气管哮喘患者呼出气一氧化氮与小气道功能的相关性及其影响因素[J]. 上海医学, 2017, 68(2):25-30.
- [2] 邸沂遥, 关继涛, 阎锡新. 生活环境中主要空气污染物浓度与哮喘患者肺功能、呼出气一氧化氮和血清 IgE 水平的关系[J]. 山东医药, 2017, 57(11):84-87.
- [3] 李颖. 过敏性哮喘患儿呼出气一氧化氮变化及与血清过敏原特异性 IgE 的相关性[J]. 山东医药, 2017, 36(35):72-74.
- [4] 李瑞敏, 徐伟涵, 金建敏, 等. 哮喘-慢性阻塞性肺疾病重叠综合征临床诊断的初步探讨[J]. 中国呼吸与危重监护杂志, 2018, 17(6):25-28.
- [5] 汪龙辉. 喘息患儿外周血 TARC、IgE 及 EOS 计数水平变化及其意义[J]. 中国地方病防治杂志, 2017, 89(6):99-100.
- [6] Queiroz GA, Costa RS, Alcantaraneves NM, et al. IL33 and IL1RL1 variants are associated with asthma and atopy in a Brazilian population[J]. Int J Immunogenet, 2017, 44(2):51-61.
- [7] Hasegawa T, Uga H, Mori A, et al. Increased serum IL-17A and Th2 cytokine levels in patients with severe uncontrolled asthma[J]. Eur Cytokine Netw, 2017, 28(1):8-18.
- [8] 李丽蕊, 崔紫阳, 王昊辰, 等. 酮替芬对变应性鼻炎-哮喘综合征呼出气一氧化氮的影响[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2017, 66(21):62-64.
- [9] 陈凤佳, 严英硕, 周燕斌. 呼出气一氧化氮监测对支气管哮喘的诊断及治疗评估价值研究[J]. 中国全科医学, 2014, 17(29):3430-3434.
- [10] 郝芳丽. 血清中 ECP、IgE 的表达水平及 FEV1 的检测对支气管哮喘患儿的诊断意义[J]. 中国实验诊断学, 2012, 16(1):79-80.
- [11] 何雄平, 龚国林, 王樟娟. 支气管哮喘患者血清 TNF-α、IL-8 和 IgE 水平的相关性分析[J]. 放射免疫学杂志, 2012, 25(3):322-324.
- [12] 陈希, 郭梓君, 郑佩燕, 等. 哮喘并过敏性鼻炎儿童血清总 IgE、外周血嗜酸性粒细胞、过敏原致敏程度与呼出气一氧化氮间的关系[J]. 实用医学杂志, 2017, 69(15):83-87.
- [13] 王玲, 魏研荣, 王丽霞, 等. 乌鲁木齐地区维吾尔族 ORM-DL3 基因单核苷酸多态位点与哮喘易感性的研究[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2019, 11(1):11-16.
- [14] 林广民. 血清 MIF、ECP、DF-sIgE 及 EOS 检测对预防儿童哮喘的临床意义[J]. 华南预防医学, 2018, 44(06):581-583.

## 溶栓治疗肺血栓栓塞症疗效及对凝血功能及NF- $\kappa$ B、ET-1的影响

郎哲<sup>1</sup> 何志红<sup>2\*</sup> 毕文森<sup>3</sup> 梁少卿<sup>2</sup> 刘红娟<sup>2</sup>

**[摘要]** **目的** 探究溶栓治疗肺血栓栓塞症(PTE)患者疗效及对凝血功能及核因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)、内皮素1(ET-1)的影响。**方法** 前瞻性选取本院2017年1月至2019年6月收治的PTE患者122例作为研究对象,按照随机数字表法分组,各61例。对照组给予抗凝治疗,观察组在对照组基础上给予溶栓治疗。比较两组治疗效果、治疗前后肺氧合功能[平均肺动脉压(MPAP)、动脉血氧分压(PaO<sub>2</sub>)、血氧饱和度(SaO<sub>2</sub>)]、凝血功能[D-二聚体(D-D)、组织型纤溶酶原激活物(t-PA)、纤溶酶原激活物抑制物-1(PAI-1)]、NF- $\kappa$ B、ET-1及不良事件发生情况。**结果** 观察组总有效率93.44%(57/61)高于对照组77.05%(47/61),差异有统计学意义( $P < 0.05$ );治疗7 d、14 d后观察组MPAP低于对照组,PaO<sub>2</sub>、SaO<sub>2</sub>高于对照组,D-D、PAI-1、t-PA、NF- $\kappa$ B、ET-1低于对照组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );随访6个月,观察组不良事件发生率6.89%低于对照组21.43%( $P < 0.05$ )。**结论** 溶栓治疗PTE患者疗效显著,可明显改善肺氧合功能与凝血功能,可能与抑制NF- $\kappa$ B、ET-1表达有关。

**[关键词]** 肺血栓栓塞症;溶栓治疗;凝血功能;核因子- $\kappa$ B;内皮素1

### Effect of thrombolytic therapy on pulmonary thromboembolism and on coagulation function, NF- $\kappa$ B and ET-1

LANG Zhe<sup>1</sup>, HE Zhihong<sup>2\*</sup>, BI Wenmiao<sup>3</sup>, LIANG Shaoqing<sup>2</sup>, LIU Hongjuan<sup>2</sup>

(1. Department of emergency medicine, shijiazhuang first hospital, Shijiazhuang, Hebei, China, 050000;  
2. Department 1 of critical care medicine, shijiazhuang first hospital, Shijiazhuang, Hebei, China, 050000;  
3. Department of respiratory medicine, shijiazhuang no.1 hospital, Shijiazhuang, Hebei, China, 050000)

**[ABSTRACT]** **Objective** To investigate the efficacy of thrombolytic therapy in patients with pulmonary thromboembolism (PTE) and its effect on coagulation function and nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) and endothelin 1 (ET-1). **Methods** A total of 122 patients with PTE admitted to our hospital from January 2017 to June 2019 were enrolled as the research object, and they were grouped according to the random number table method, 61 cases each. The control group was given anticoagulant therapy, and the observation group was given thrombolytic therapy plus anticoagulant therapy. The treatment effect, pulmonary oxygenation function [mean pulmonary arterial pressure (MPAP), partial arterial oxygen pressure (PaO<sub>2</sub>), blood oxygen saturation (SaO<sub>2</sub>)], coagulation function [D-dimer (D-D), tissue-type plasminogen activator (t-PA), plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1)], NF- $\kappa$ B, ET-1 before and after treatment and the occurrence of adverse events between two groups were compared. **Results** The total effective rate in the observation group was 93.44% (57/61) higher than that in the control group (77.05%, 47/61), and the difference was statistically

基金项目:石家庄市科学技术研究与发展指导计划项目(171461313)

作者单位:1. 石家庄市第一医院急诊医学科,河北,石家庄 050000

2. 石家庄市第一医院重症医学一科,河北,石家庄 050000

3. 石家庄市第一医院呼吸内二科,河北,石家庄 050000

\*通信作者:何志红, E-mail: sunnyandday11@126.com

significant ( $P < 0.05$ ). After 7 days and 14 days of treatment, MPAP in the observation group was lower than that in the control group, and PaO<sub>2</sub> and SaO<sub>2</sub> were higher than that in the control group. D-D, PAI-1, t-PA, NF- $\kappa$ B, and ET-1 were lower than that in the control group, the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). After 6 months of follow-up, the incidence of adverse events in the observation group was 6.89% lower than that in the control group (21.43%) ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Thrombolytic therapy has a significant effect on patients with PTE. It can significantly improve pulmonary oxygenation and coagulation, which may be related to the inhibition of NF- $\kappa$ B and ET-1 expression.

[KEY WORDS] Pulmonary thromboembolism; Thrombolytic therapy; Coagulation function; Nuclear factor- $\kappa$ B; Endothelin 1

肺血栓栓塞症(Pulmonary thromboembolism, PTE)是临床较为严重的肺血管疾病,数据统计显示,PTE急性期未经治疗死亡率高达25%~70%左右,仅次于肿瘤和心肌梗死<sup>[1-2]</sup>。故及时诊治至关重要。抗凝治疗是临床救治PTE患者的常规方法,但受多种因素影响,且安全范围狭窄<sup>[3]</sup>。溶栓治疗则可迅速溶解血栓,改善肺动脉血流,加快肺组织再灌注,有利于改善预后<sup>[4]</sup>。而既往有动物实验显示核因子- $\kappa$ B(Nuclear factor  $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B)、内皮素1(Endothelin 1, ET-1)在肺血栓栓塞症中具有重要作用,但在临床诊治中缺乏相关循证依据。为此,本研究在探讨溶栓治疗肺血栓栓塞症患者疗效基础上,初次尝试分析其对NF- $\kappa$ B、ET-1的影响,旨在为临床提供数据支持。现报告如下。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选取本院2017年1月至2019年6月收治的PTE患者122例作为研究对象,按照1:1原则采用电脑生成随机数字表,根据随机数字表分为观察组、对照组,各61例。两组一般资料相比,差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),有可比性,见表1。且本研究经医院伦理委员会审批通过。

纳入标准:①均经CT肺动脉造影检查、动脉血气分析、心脏彩超等检查,确诊为PTE,且符合《急性肺栓塞诊断与治疗中国专家共识(2015)》<sup>[5]</sup>中的危险度分层为中高危组的PTE相关诊断标准;病程 $< 14$  d;②均具备溶栓指征,无抗凝治疗、溶栓治疗禁忌证,愿意接受抗凝或溶栓治疗;③临床资料完整,患者及家属均知情,签订知情承诺书。排除标准:①伴有出血性脑卒中病史者;②存在可疑主动脉夹层瘤者;③伴有活动性消化道溃疡、严重肝肾功损害者;④合并自身

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

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

资料	观察组 ( $n=61$ )	对照组 ( $n=61$ )	$t/\chi^2$ 值	$P$ 值
年龄(岁)	58.77 $\pm$ 6.05	59.63 $\pm$ 6.81	0.737	0.462
病程(d)	4.63 $\pm$ 1.49	4.42 $\pm$ 1.22	0.852	0.396
性别(例)				
男	20(32.79)	22(36.07)	0.145	0.703
女	41(67.21)	39(63.93)		
体质量指数(kg/m <sup>2</sup> )	22.33 $\pm$ 1.01	22.51 $\pm$ 1.20	0.896	0.372
栓塞面积				
大面积栓塞	17(27.87)	19(31.15)	0.158	0.691
次大面积栓塞	44(72.13)	42(68.85)		
基础病史				
高血压史	10(16.39)	9(14.75)	0.062	0.803
糖尿病史	8(13.11)	10(16.39)	0.261	0.610

免疫性疾病者;⑤存在恶性肿瘤疾病者;⑥参与本研究前1个月内服用抗凝药物者。

### 1.2 方法

两组均给予常规对症治疗,包括纠正低氧血症、控制水电解质平衡、调节酸碱紊乱、扩张血管等治疗措施,并监测心电图、凝血功能。

#### 1.2.1 对照组

给予抗凝治疗,于常规处理后,皮下注射低分子肝素(河北常山生化药业有限公司,国药准字H20063910,规格:0.41 mL:4100 Axa单位),每次100 IU $\cdot$ kg<sup>-1</sup>,2次 $\cdot$ d<sup>-1</sup>。根据患者实际情况完成低分子肝素注射24~72 h后给予华法林(Orion Corporation,批准文号H20171095,规格:3 mg),口服,初始剂量3 mg $\cdot$ d<sup>-1</sup>。第3天测定国际标准比值(INR),待INR稳定在2.5时,停止使用低分子肝素,单独给予华法林,并根据INR调整华法林使用剂量。

### 1.2.2 观察组

采取溶栓治疗,于常规处理后,给予阿替普酶(Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG,批准文号S20160055,规格:50 mg/支),50 mg经微量泵以50 mL/h匀速输注。溶栓完成后每2~4 h检测一次活化部分凝血酶时间(APTT),待APTT降至正常水平1.5~2倍时,再给予抗凝治疗,方法与剂量同对照组。华法林至少应持续服用至出院后3个月。

### 1.2.3 检测方法

①凝血功能指标,采集外周血3 mL,置入抗凝管,采用酶联免疫吸附双抗体夹心法检测血浆组织型纤溶酶原激活物(t-PA)、纤溶酶原激活物抑制物-1(PAI-1)水平,放射比浊法检测血浆D-二聚体(D-D)水平,试剂盒及CA-1500全自动血凝仪购自罗氏公司;②NF- $\kappa$ B检测方法,采用免疫细胞化学法检测NF- $\kappa$ Bp65,试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司。采用显微镜观察,于高倍镜下随机选取5~10个视野,计算细胞染色的阳性率,取平均值;③血清指标,采集外周血2 mL,离心处理,3 000 r/min,10 min,取上清液,待检。采用酶联免疫吸附法检测血清ET-1水平,试剂盒购自上海酶联生物科技有限公司。所有操作步骤符合

规范。

### 1.3 疗效标准

参考《急性肺栓塞诊断与治疗中国专家共识(2015)》<sup>[5]</sup>中的疗效标准于治疗14 d后评估疗效,分为显效、好转、无效、恶化。总有效率=显效率+好转率。

### 1.4 观察指标

①治疗效果;②两组治疗前、治疗7、14 d后MPAP、PaO<sub>2</sub>、SaO<sub>2</sub>;③两组治疗前、治疗7、14 d后D-D、t-PA、PAI-1;④两组治疗前、治疗7、14 d后NF- $\kappa$ B、ET-1;⑤两组不良事件发生情况,主要包括复发、出血性事件及死亡,其中复发判定标准为肺动脉CTA检查显示存在肺血栓栓塞征象,且伴有胸痛、呼吸困难等症状。

### 1.5 统计学处理

采用SPSS 22.0软件进行数据处理。计量资料以( $\bar{x} \pm s$ )表示, $t$ 检验,计数资料以 $n(\%)$ 表示, $\chi^2$ 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 治疗效果

观察组总有效率93.44%高于对照组77.05%( $P < 0.05$ ),见表2。

表2 两组治疗效果比较 [ $n(\%)$ ]

Table 2 Comparison of treatment effect between the 2 groups [ $n(\%)$ ]

组别	$n$	显效	好转	无效	恶化	总有效率
观察组	61	36(59.02)	21(34.43)	3(4.92)	1(1.64)	57(93.44)
对照组	61	28(45.90)	19(31.15)	10(16.39)	4(6.56)	47(77.05)
$\chi^2$ 值						6.517
$P$ 值						0.011

### 2.2 肺氧合及凝血功能、NF- $\kappa$ B、ET-1水平比较

治疗7、14 d后观察组MPAP水平、D-D、PAI-1、t-PA、NF- $\kappa$ B、ET-1水平低于对照组,PaO<sub>2</sub>、SaO<sub>2</sub>高于对照组( $P < 0.05$ ),见表3。

### 2.3 不良事件发生情况

随访6个月,观察组脱落3例,对照组脱落5例。观察组复发3例,出血性事件1例,无死亡,不良事件发生率为6.89%(5/58),对照组复发7例,出血性事件3例,死亡2例,不良事件发生率为21.43%(12/56),差异有统计学意义( $\chi^2=4.987$ , $P=0.026$ )。

## 3 讨论

目前,PTE已成为我国常见的血管疾病类型,临床相关统计证实,急性PTE是导致患者猝死的重要原因之一,防治形势极为严峻<sup>[6]</sup>。临床治疗PTE的关键在于早治疗,充分改善肺组织栓塞部位循环,促使栓塞血管通畅,强化肺部氧合功能<sup>[7]</sup>。抗凝治疗应用于PTE患者可有效缓解栓塞程度,改善血液循环,减轻病情程度。但单纯抗凝治疗不能达到快速溶解、清除血栓的目的,从而无法及时纠正临床症状及生理改变,可能增加复发率及

表3 两组肺氧合及凝血功能, NF- $\kappa$ B、ET-1水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )Table 3 Comparison of lung function and coagulation function, NF- $\kappa$ B and ET-1 levels between the 2 groups ( $\bar{x} \pm s$ )

时间	组别	<i>n</i>	治疗前	治疗7 d后	治疗14 d后
MPAP(mmHg)	观察组	61	61.17±4.20	50.16±3.52	46.23±3.04
	对照组	61	60.83±3.91	55.49±4.06	50.36±3.27
	<i>t</i> 值		0.463	7.747	7.225
	<i>P</i> 值		0.645	<0.001	<0.001
PaO <sub>2</sub> (mmHg)	观察组	61	70.82±4.19	84.26±5.21	90.22±6.04
	对照组	61	71.18±4.03	78.34±4.77	84.23±5.31
	<i>t</i> 值		0.484	6.546	5.817
	<i>P</i> 值		0.630	<0.001	<0.001
SaO <sub>2</sub> (%)	观察组	61	90.03±1.22	96.30±1.53	98.10±1.17
	对照组	61	90.26±1.41	93.92±1.44	96.02±1.30
	<i>t</i> 值		0.963	8.847	9.289
	<i>P</i> 值		0.337	<0.001	<0.001
D-D(mg/L)	观察组	61	1.32±0.12	0.94±0.07	0.86±0.05
	对照组	61	1.30±0.13	1.12±0.09	0.92±0.06
	<i>t</i> 值		0.883	12.330	6.000
	<i>P</i> 值		0.379	<0.001	<0.001
PAI-1(μg/L)	观察组	61	78.44±5.01	62.25±4.16	52.08±3.29
	对照组	61	78.06±4.85	66.33±4.70	58.11±4.03
	<i>t</i> 值		0.426	5.077	9.053
	<i>P</i> 值		0.671	<0.001	<0.001
t-PA(μg/L)	观察组	61	14.07±2.13	9.87±1.37	8.14±1.25
	对照组	61	13.98±1.96	11.14±1.42	9.46±1.32
	<i>t</i> 值		0.243	5.027	5.671
	<i>P</i> 值		0.809	<0.001	<0.001
NF- $\kappa$ B(%)	观察组	61	36.02±2.71	30.42±1.37	26.08±1.14
	对照组	61	35.88±2.59	32.23±1.61	28.72±2.20
	<i>t</i> 值		0.292	6.687	8.321
	<i>P</i> 值		0.771	<0.001	<0.001
ET-1(ng/L)	观察组	61	212.15±20.57	160.36±18.17	127.80±15.36
	对照组	61	210.67±23.51	184.25±21.33	151.37±20.09
	<i>t</i> 值		0.370	6.659	7.279
	<i>P</i> 值		0.712	<0.001	<0.001

死亡风险<sup>[8]</sup>。有文献报道称,静脉药物溶栓联合抗凝治疗有利于改善肺氧合功能,减少猝死<sup>[9]</sup>。本研究结果证实,溶栓治疗PTE患者疗效显著,可明显改善肺氧合功能与凝血功能。溶栓治疗不仅能于短时间内溶解血栓,还可减少栓子来源,加速肺动脉血流通畅,有利于及时降低肺动脉阻力,减轻右心负荷<sup>[10]</sup>。溶栓治疗主要作用机制是可将纤维蛋白原转化为纤维蛋白溶酶,加速纤溶酶原激活,从而促进纤维蛋白原降解,最终实现溶解清除血块、血栓的效果<sup>[11]</sup>。

NF- $\kappa$ B是一种蛋白因子,能特异性结合免疫球蛋白 $\kappa$ 轻链基因上的增强子 $\kappa$ B序列,转录、调

节多种炎症分子、炎性细胞,还能参与相关靶基因表达,在血管疾病中发挥重要作用<sup>[12]</sup>。低氧血症是PTE最常见的病理生理改变现象。急性与慢性缺氧均可增加ET-1基因表达,促使ET-1大量合成、释放进入血液。研究发现,ET-1是较强的血管收缩因子,在缺氧状态下强化收缩血管功能,过多表达可加重栓塞程度<sup>[13]</sup>。另有文献指出,NF- $\kappa$ B在ET-1转录过程中具有关键作用<sup>[14]</sup>。在此基础上,本研究初次分析溶栓治疗对PTE患者NF- $\kappa$ B、ET-1的影响,结果证实溶栓治疗可抑制NF- $\kappa$ B、ET-1表达。主要是由于溶栓治疗具有溶解血栓、解除栓塞,调节血管舒张功能,改善血液循环,促

进肺组织再灌注等功效,有利于强化肺氧合功能,从而纠正低氧血症,减弱NF- $\kappa$ B转录作用,抑制ET-1表达。且随访6个月发现,溶栓治疗PTE可明显减少不良事件,为预后改善创造良好条件。但本研究属于单中心研究,可能造成数据偏移,需作进一步分析与探究。此外,溶栓治疗应用于PTE患者治疗时应注意:①低危患者无需溶栓治疗;②中危患者因溶栓治疗存在一定程度出血风险,但单纯抗凝治疗又无法有效清除栓塞,故应在全面评估中危患者出血风险后考虑是否可以实施溶栓治疗,以在确保治疗安全性前提下保障疗效。

综上可知,溶栓治疗中高危组PTE患者疗效显著,可明显改善肺氧合功能与凝血功能,可能与抑制NF- $\kappa$ B、ET-1表达有关。

### 参考文献

- [1] Choe HJ, Suh KJ, Lee JY, et al. Acute pulmonary thromboembolism caused by factor V Leiden mutation in South Korea: A case report[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2019, 98(28): e16318.
- [2] 杜鹏,冯小荣. 华法林联合血府逐瘀片在肺血栓栓塞症抗凝治疗中的临床观察[J]. *甘肃医药*, 2015, 34(4): 45-46.
- [3] 孟晶晶,李雅敏,卢霞,等. 肺通气/灌注SPECT显像动态评价肺血栓栓塞症抗凝疗效及其影响因素分析[J]. *中华核医学与分子影像杂志*, 2018, 38(12): 782-785.
- [4] 米玉红,陆艳辉,王海云,等. 中危急性肺栓塞患者补救性溶栓治疗时机初探及理念更新[J]. *中华急诊医学杂志*, 2019, 28(8): 921-926.
- [5] 中华医学会心血管病学分会肺血管病学组. 急性肺栓塞诊断与治疗中国专家共识(2015)[J]. *中华心血管病杂志*, 2016, 44(3): 197-211.
- [6] Tatsuro Ibe, Hiroshi Wada, Kenichi Sakakura, et al. Residual pulmonary hypertension is associated with clinical outcomes in patients with acute pulmonary thromboembolism [J]. *Heart Vessels*, 2019, 34(11): 1866-1873.
- [7] Cecilia Becattini, Michela Giustozzi, Pau Cerdà, et al. Risk of recurrent venous thromboembolism after acute pulmonary embolism: Role of residual pulmonary obstruction and persistent right ventricular dysfunction. A meta-analysis[J]. *J Thromb Haemost*, 2019, 17(8): 1217-1228.
- [8] 胡梦玮,张思泉. 中药联合华法林治疗急性次大面积肺栓塞的临床疗效[J]. *中华中医药学刊*, 2019, 37(8): 2029-2032.
- [9] 朱良华,方长太,白兆青,等. 溶栓与抗凝对中危肺血栓栓塞患者的影响[J]. *安徽医药*, 2015, 19(1): 166-168.
- [10] 王爱丽,王金祥,李晓辉,等. 中高危及急性肺血栓栓塞症患者溶栓联合抗凝与单纯抗凝治疗的近期疗效比较[J]. *心肺血管病杂志*, 2016, 35(7): 524-528.
- [11] 袁武锋,蒋雷,郑素洁. 尿激酶溶栓治疗对下肢深静脉血栓合并急性肺栓塞患者凝血功能、D-二聚体、N-末端脑钠肽前体的影响[J]. *中华全科医学*, 2017, 15(12): 2068-2070.
- [12] 孙丹,邓靖宇,何生. 17 $\beta$ -雌二醇抑制NF- $\kappa$ Bp65表达对CCl<sub>4</sub>诱导大鼠肝纤维化中肝细胞损伤的意义[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2010, 2(2): 40-46.
- [13] Chesarahmia Dojo Soeandy, Faraz Salmasi, Maya Latif, et al. Endothelin-1-mediated cerebral ischemia in mice: early cellular events and the role of caspase-3[J]. *Apoptosis*, 2019, 24(7-8): 578-595.
- [14] Ichiro Yajima, Mayuko Y Kumasaka, Machiko Iida, et al. Arsenic-mediated hyperpigmentation in skin via NF- $\kappa$ B/ endothelin-1 signaling in an originally developed hairless mouse model[J]. *Arch Toxicol*, 2017, 91(11): 3507-3516.

(上接第600页)

- [7] Tang L, Chen F, Pang EJ, et al. MicroRNA-182 inhibits proliferation through targeting oncogenic ANUBL1 in gastric cancer[J]. *Oncol Rep*, 2015, 33(4): 1707-1716.
- [8] Dower CM, Wills CA. Mechanisms and context underlying the role of autophagy in cancer metastasis [J]. *Autophagy*, 2018, 14(7): 1110-1128.
- [9] Levy JMM, Towers CG, Thorburn A. Targeting autophagy in cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2017, 17(9): 528-542.
- [10] Ramadan B, Wang X, Wang R, et al. Relationship between miR-21 and miR-182 levels in peripheral blood and gastric cancer tissue[J]. *Oncol Lett*, 2017, 14(2): 1427-1432.
- [11] Li Y, Chen S, Shan Z, et al. miR-182-5p improves the viability, mitosis, migration, and invasion ability of human gastric cancer cells by down-regulating RAB27A [J]. *Biosci Rep*, 2017, 37(3): 1-9.
- [12] Kong P, Zhu X, Geng Q, et al. The microRNA-423-3p-Bim axis promotes cancer progression and activates oncogenic autophagy in gastric cancer[J]. *Mol Ther*, 2017, 25(4): 1027-1037.
- [13] Fan H, Jiang M, Li B, et al. MicroRNA-let-7a regulates cell autophagy by targeting Rictor in gastric cancer cell lines MGC-803 and SGC-7901 [J]. *Oncol Rep*, 2018, 39(3): 1207-1214.
- [14] Xu Z, Li Z, Wang W, et al. MIR-1265 regulates cellular proliferation and apoptosis by targeting calcium binding protein 39 in gastric cancer and, thereby, impairing oncogenic autophagy[J]. *Cancer Lett*, 2019, 449(1): 226-236.

· 论 著 ·

## FGF18与骨性关节炎患者血清炎症细胞因子、脂肪细胞因子及骨关节严重程度的相关性

胡彦彬<sup>1</sup> 王振东<sup>1</sup> 赵强<sup>1</sup> 汤玮<sup>1</sup> 潘伟<sup>1</sup> 李雷<sup>2\*</sup>

**[摘要]** 目的 探究成纤维细胞生长因子18(FGF18)与骨性关节炎(OA)患者血清炎症细胞因子、脂肪细胞因子及骨关节严重程度的相关性。方法 选取于本院进行诊断和治疗的120例OA患者,根据Kellgren-Lawrence(K-L)分级至少2级,并分为KL2组( $n=53$ )、KL3组( $n=39$ )、KL4组( $n=28$ ),并选取同期健康志愿者30例作为对照组,对比各组血清FGF18、炎症细胞因子[肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、IL-6、IL-17、IL-23]、脂肪细胞因子[瘦素(Leptin)、脂联素(APN)、内脂素(visfatin)]水平,Spearman相关性分析各指标间的相关性。结果 OA患者各组FGF18水平显著低于对照组,且K-L分级越高,FGF18水平越低,各组比较差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。OA患者相比于对照组炎症细胞因子TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-17、IL-23水平均显著升高,且K-L分级各组各指标比较差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。与对照组比较,OA患者Leptin、visfatin水平显著升高,APN水平显著降低,且K-L分级各组各指标比较差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。相关性分析结果显示,FGF18与K-L分级、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-17、IL-23、Leptin、visfatin存在显著负相关性,与APN存在显著正相关性( $P<0.05$ )。结论 随着OA患者骨关节疾病严重程度增加,FGF18水平随之降低,这可能与OA患者血清炎症细胞因子和脂肪细胞因子异常表达有关,检测相关指标对于OA患者病情评估及治疗具有重要意义。

**[关键词]** 骨性关节炎;成纤维细胞生长因子18;炎症细胞因子;脂肪细胞因子

### Correlation between FGF18 and serum inflammatory cytokines, adipokines and bone and joint severity in patients with osteoarthritis

HU Yanbin<sup>1</sup>, WANG Zhendong<sup>1</sup>, ZHAO Qiang<sup>1</sup>, TANG Wei<sup>1</sup>, PAN Wei<sup>1</sup>, LI Lei<sup>2\*</sup>

(1. Department of Orthopedics, Lanshan District People's Hospital, Rizhao, Shandong, China, 276807;

2. Department of Emergency, Lanshan District People's Hospital, Rizhao, Shandong, China, 276807)

**[ABSTRACT]** **Objective** To investigate the correlation between fibroblast growth factor 18 (FGF18) and serum inflammatory cytokines, adipocytokines and bone and joint severity in patients with osteoarthritis (OA). **Methods** 120 OA patients who were diagnosed and treated in our hospital were classified according to Kellgren-Lawrence (KL) at least level 2 and were divided into the KL2 group ( $n=53$ ), the KL3 group ( $n=39$ ), and the KL4 group ( $n=28$ ), and 30 healthy volunteers in the same period were selected as the control group, and serum FGF18, inflammatory cytokines [tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-6, IL-17, IL-23], adipocytokines [Leptin, adiponectin (APN), visfatin] levels were measured and compared in each group. Spearman correlation analysis was used to analyze the correlation of each index. **Results** The serum levels of FGF18 in each group of OA patients were significantly lower than those in the control group, and the higher the KL grade, the lower the FGF18 level ( $P<0.05$ ). Compared with the control

基金项目:日照市卫生计划项目(2017B056)

作者单位:1. 山东省日照市岚山区人民医院骨科,山东,日照 296807

2. 山东省日照市岚山区人民医院急诊科,山东,日照 296807

\*通信作者:李雷, E-mail: 13706331945@163.com

group, the serum levels of inflammatory cytokines TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17, and IL-23 were significantly increased in patients with OA, and the indicators of each group in the KL classification were significantly different ( $P<0.05$ ). Compared with the control group, the levels of Leptin and visfatin in OA patients were significantly increased, and the serum levels of APN were significantly reduced, and the K-L classification had significant differences in each index ( $P<0.05$ ). Correlation analysis showed that FGF18 has a significant negative correlation with KL grade, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17, IL-23, Leptin, and visfatin, and a significant positive correlation with APN ( $P<0.05$ ). Conclusion As the severity of osteoarthritis in OA patients increases, the level of FGF18 decreases that could be related to the abnormal expression of serum inflammatory cytokines and adipocytokines in OA patients. The detection of relevant indicators in serum is of great significance for the evaluation and treatment of OA patients.

[KEY WORDS] Osteoarthritis; Fibroblast growth factor 18; Inflammatory cytokines; Adipokines

骨性关节炎(osteoarthritis, OA)又被称为增生性骨关节炎或退行性关节病,患者的主要病理表现为新骨的形成及软骨退行性病变,进而导致关节软骨变性、破坏,引发关节疼痛、肿胀、骨质增生和关节积液等症。OA严重的甚至可导致残疾等严重不良事件,被认为是导致人群伤残的重要原因之一,严重威胁了患者的生活质量<sup>[1]</sup>。细胞因子学说认为炎性细胞因子在骨关节炎的发生发展中发挥重要作用<sup>[2]</sup>。并有研究证实<sup>[3]</sup>,肥胖、高血压、血脂异常等代谢紊乱是骨性关节炎发生的重要危险因素。通过炎症细胞因子和脂肪细胞因子检测可了解OA患者疾病进展情况。成纤维细胞生长因子-18(fibroblast growth factor-18, FGF18)为FGF家族中具有代表性的因子,在软骨形成、骨骼发育及关节软骨修复中具有重要作用<sup>[4]</sup>。目前,对于FGF18在OA中检测及与OA骨关节严重程度的关系研究较少,本研究对FGF18与骨性关节炎患者血清炎症细胞因子、脂肪细胞因子及骨关节严重程度的相关性进行了探究,以指导OA患者的病情评估及治疗,具体如下。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选取2018年6月至2019年6月本院收治的120例OA患者,根据Kellgren-Lawrence(K-L)分级至少2级,并分为KL2组( $n=53$ )、KL3组( $n=39$ )、KL4组( $n=28$ )。其中,KL2级男31例,女22例,年龄39~80岁,平均年龄( $58.8\pm 4.2$ )岁,病程6个月~9年,平均( $2.5\pm 0.6$ )年;KL3级男23例,女16例,年龄41~79岁,平均年龄( $59.4\pm 4.1$ )岁,病程3个月~10年,平均( $2.5\pm 0.7$ )年;KL4级男16例,女12例,年龄42~76岁,平均年龄( $58.1\pm 4.5$ )

岁,病程6个月~10年,平均( $2.7\pm 0.7$ )年。另选取同期于我院体检的健康志愿者30例作为对照组,其中男18例,女12例,年龄45~82岁,平均( $59.7\pm 4.6$ )岁。

纳入标准:①符合OA的相关诊断标准<sup>[5]</sup>;②对病变关节行X光线检查并依据Kellgren-Lawrence(K-L)分级为2~4级;③均对本研究内容知情同意并签署知情同意书;④依从性好,能够配合完成此研究。排除标准:①合并感染、类风湿性关节炎、创伤及骨肿瘤等骨关节疾病者;②肝肾等脏器存在器质性病变者;③存在骨关节手术史者;④近期有糖皮质激素等药物治疗者。排除关节外伤史、合并急慢性疾病者。4组研究对象在性别、年龄上比较差异无统计学意义( $P>0.05$ ),具有可比性。本研究获得院伦理委员会批准。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 Kellgren-Lawrence(K-L)分级方法<sup>[6]</sup>

所有研究对象均行X射线检查并行K-L分级。K-L分级0~4级,分级越高,病变越严重。

#### 1.2.2 血清因子检测

所有研究对象均入院后抽取5 mL空腹静脉血,3 500 r/min离心10 min收集血清,-80℃保存待测。采用酶联免疫吸附法(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)测定FGF18及炎症细胞因子[肿瘤坏死因子- $\alpha$ (Tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-1 $\beta$ (Interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、IL-6、IL-17、IL-23]、脂肪细胞因子[瘦素(Leptin, LP)、脂联素(Adiponectin, APN)、内脂素(visfatin)]水平,FGF18及炎症细胞因子试剂盒购自南京建成生物医学工程公司,脂肪细胞因子试剂盒购自深圳晶美生物工程有限公司。检测方法依照试剂盒说明书进行。

### 1.3 统计学分析

采用 SPSS 20.0 软件进行数据分析,计数资料以 % 表示,组间比较采用  $\chi^2$  检验;计量资料以  $(\bar{x} \pm s)$  表示,两两比较采用 LSD-t 检验,多组间比较采用单因素方差分析;Spearman 相关性分析各指标的相关性。 $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组患者临床一般资料比较

对照组健康志愿者、KL2 组、KL3 组及 KL4 组 OA 患者性别、年龄比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ );K-L 分级各组 OA 患者病程比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见表 1。

表 1 各组患者临床一般资料比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Comparison of general clinical data of patients in each group ( $\bar{x} \pm s$ )

项目	对照组(n=30)	KL2组(n=53)	KL3组(n=39)	KL4组(n=28)	F 值	P 值
性别(男/女)	18/12	31/22	23/16	16/12	0.051	0.997
年龄(岁)	59.7±4.6	58.8±4.2	59.4±4.1	58.1±4.5	1.225	0.224
病程(年)	-	2.5±0.6	2.5±0.7	2.7±0.7	1.469	0.146

### 2.2 各组 FGF18、炎症细胞因子及脂肪细胞因子水平比较

KL2 组、KL3 组及 KL4 组间 FGF18、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-17、IL-23、Leptin、visfatin 及 APN 水平比较差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),OA 患者 K-L

分级各组 FGF18、APN 水平均显著低于对照组, TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-17、IL-23、Leptin、visfatin 水平显著高于对照组,差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),见表 2。

表 2 各组 FGF18、炎症细胞因子及脂肪细胞因子水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Comparison of levels of FGF18, inflammatory cytokines and adipokines in each group ( $\bar{x} \pm s$ )

项目	对照组(n=30)	KL2组(n=53)	KL3组(n=39)	KL4组(n=28)	F 值	P 值
FGF18 (ng/L)	33.5±4.6	27.2±3.7 <sup>a</sup>	22.1±3.1 <sup>ab</sup>	16.7±2.4 <sup>abc</sup>	8.577	0.000
TNF- $\alpha$ (mg/L)	0.3±0.1	0.6±0.2 <sup>a</sup>	0.8±0.2 <sup>ab</sup>	1.1±0.4 <sup>abc</sup>	10.991	0.000
IL-1 $\beta$ (ng/L)	22.3±2.5	36.7±4.4 <sup>a</sup>	45.8±3.9 <sup>ab</sup>	55.7±5.4 <sup>abc</sup>	14.006	0.000
IL-6 (ng/L)	3.5±1.2	13.8±2.0 <sup>a</sup>	25.2±3.1 <sup>ab</sup>	33.3±4.2 <sup>abc</sup>	23.605	0.000
IL-17 (ng/mL)	0.6±0.2	1.1±0.3 <sup>a</sup>	1.8±0.4 <sup>ab</sup>	2.2±0.9 <sup>abc</sup>	11.250	0.000
IL-23 (ng/mL)	5.0±1.8	16.3±2.2 <sup>a</sup>	22.5±2.9 <sup>ab</sup>	29.4±3.6 <sup>abc</sup>	15.386	0.000
Leptin ( $\mu$ g/L)	5.2±1.3	9.6±1.9 <sup>a</sup>	11.8±2.1 <sup>ab</sup>	14.6±2.4 <sup>abc</sup>	9.500	0.000
APN (mg/L)	19.7±2.8	14.2±2.4 <sup>a</sup>	10.3±2.5 <sup>ab</sup>	8.1±1.6 <sup>abc</sup>	10.099	0.000
visfatin ( $\mu$ g/L)	6.6±1.8	11.3±2.0 <sup>a</sup>	15.5±1.6 <sup>ab</sup>	18.7±2.5 <sup>abc</sup>	11.378	0.000

注:与对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 KL2 组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与 KL3 组比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$ 。

### 2.3 FGF18 与 K-L 分级、炎症细胞因子及脂肪细胞因子的相关性

Spearman 相关性分析结果显示,FGF18 与 K-L 分级存在显著负相关性 ( $P < 0.05$ )。FGF18 与 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-17、IL-23、Leptin、visfatin 存在显著负相关性,与 APN 存在显著正相关性 ( $P < 0.05$ ),见表 3。

## 3 讨论

研究指出<sup>[7]</sup>,单核细胞及炎症介质参与了 OA 的病理进展。TNF- $\alpha$  为淋巴细胞分泌的炎症前体细胞因子,能够促进损伤部位白细胞聚集和释放

炎性介质,在炎症、感染及免疫应答体系中起到重要作用。IL-1 $\beta$  为就是细胞产生的具有广泛生物学效应的炎症因子,研究认为 IL-1 $\beta$  为 OA 发病的重要因素<sup>[8]</sup>。IL-6 为 T 淋巴细胞产生的急性反应蛋白,其参与了诱导炎症反应发生、调节细胞生长分化及免疫功能等多种生理病理进程。研究指出,IL-6 可在 IL-23 及 TGF- $\beta$  的作用下诱导 Th17 细胞产生 IL-17,从而影响 OA 疾病的发展<sup>[9]</sup>。本研究中,OA 患者随着 K-L 分级增加,炎症细胞因子水平随之升高。提示,炎症细胞因子水平升高伴随着 OA 疾病的进展的整个过程,促进了疾病的加重。

表3 FGF18与K-L分级、炎症细胞因子及脂肪细胞因子的相关性

Table 3 Correlation between FGF18 and K-L classification, inflammatory cytokines and adipokines

项目	r 值	P 值
K-L 分级	-0.298	0.001
TNF- $\alpha$	-0.259	0.004
IL-1 $\beta$	-0.282	0.002
IL-6	-0.277	0.002
IL-17	-0.291	0.001
IL-23	-0.270	0.003
Leptin	-0.306	0.001
APN	0.264	0.004
visfatin	-0.311	0.001

脂肪细胞因子为脂肪细胞产生及分泌的一种特殊蛋白质,对于调控炎症和免疫应答、调节器官功能等具有重要作用。Leptin 在脂肪代谢中发挥着关键作用,除了脂代谢之外其还参与了感染、炎症反应及免疫反应等病理生理过程。研究指出<sup>[10]</sup>, Leptin 可以诱导 MMPs 及炎症介质的高表达参与 OA 患者软骨降解及反应过程。APN 被认为与肥胖、糖尿病、胰岛素抵抗相关,研究指出其可能参与了 OA 的发病过程,APN 作为前炎症因子在后期软骨基质降解中发挥重要作用<sup>[11]</sup>。但也有研究显示,APN 可减轻诱导性关节炎模型局部炎症反应和软骨破坏,发挥抗炎作用<sup>[12]</sup>。Visfatin 是关节炎发展中的促炎因子,促进了细胞外基质的破坏和降解。本研究中结果提示,Leptin、visfatin 升高促进了 OA 的进展,而随着 OA 进展,APN 水平逐渐降低,这可能与其 APN 的抑制炎症发展有关。

本研究结果提示 FGF18 与 OA 患者疾病严重程度存在显著关系。一些研究显示,FGF18 能够促进软骨细胞增殖和基质产生<sup>[13-15]</sup>。FGF18 可增强机体胰岛素敏感性、减少胰岛素抵抗,促进血脂、血糖代谢。OA 的发病过程伴随着软骨细胞凋亡、软骨 ECM 合成、降解失衡等改变<sup>[16]</sup>,这与炎症细胞因子及脂肪因子的作用有关。FGF18 可以对于骨和软骨的发育起到正向调节作用,这可能与其对炎症细胞因子和脂肪细胞因子的抑制作用有关。因此,FGF18 对于抑制 OA 疾病进展,促进病情转归具有重要价值。综上所述,随着 OA 患者骨关节疾病严重程度增加,FGF18 水平随之降低,这与 OA 患者血清炎症细胞因子和脂肪细胞因子异常表达有关,检测相关指标对于 OA 患者病情评估及治疗具有重要意义。

## 参考文献

- [1] 郑晓芬. 骨关节炎发病机制和治疗的最新进展[J]. 中国组织工程研究, 2017, 21(20):3255-3262.
- [2] 李盛华,周明旺,陈娴,等. 代谢性骨性关节炎分子机制研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志, 2016, 22(2):233-237.
- [3] Ruscitti P, Di Benedetto P, Berardicurti O, et al. Adipocytokines in Rheumatoid Arthritis: The Hidden Link between Inflammation and Cardiometabolic Comorbidities [J]. J immunol res, 2018, 1(2018):8410182.
- [4] Hagan AS, Boylan M, Smith C, et al. Generation and validation of novel conditional flox and inducible Cre alleles targeting fibroblast growth factor 18 (Fgf18) [J]. Dev Dyn, 2019, 248(9):882-893.
- [5] 孙瑛. 实用关节炎诊断与治疗学[M]. 北京:北京大学医学出版社, 2002:319-339.
- [6] Kellgren JH, Lawrence JS. Radiological assessment of osteoarthritis [J]. Ann Rheum Dis, 1957, 16(4):494-502.
- [7] 孔颖,王国栋,孟纯阳. 膝关节骨性关节炎血清炎症因子与血管生成因子的关系[J]. 中国矫形外科杂志, 2019, 27(10):916-920.
- [8] Yui N, Kobayashi H, Terauchi K, et al. The role of atp-activated protein kinase (AMPK) in the chondrocyte energy balance and IL-1 $\beta$ -induced production of MMP-13 in osteoarthritis (OA) [J]. Osteoar Cartilage, 2016, 24(1):154-155.
- [9] 桂珍,张淑平,陈小洁. IL-6 抑制剂在全身型幼年特发性关节炎治疗中的应用进展[J]. 现代免疫学, 2020, 40(2):174-177.
- [10] Kroon FPB, Veenbrink AI, de Mutsert R, et al. The role of leptin and adiponectin as mediators in the relationship between adiposity and hand and knee osteoarthritis [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2019, 27(12):1761-1767.
- [11] Choi HM, Doss HM, Kim KS. Multifaceted Physiological Roles of Adiponectin in Inflammation and Diseases [J]. Int J mol sci, 2020, 21(4):1219.
- [12] 黄帮君,顾玉梅. 类风湿关节炎患者血清中 C 反应蛋白、脂联素水平与患者病情严重程度及患者关节功能的关系 [J]. 国际检验医学杂志, 2017, 38(14):1940-1941+1944.
- [13] Nummenmaa E, Hämäläinen M, Moilanen T, et al. Effects of FGF-2 and FGF receptor antagonists on MMP enzymes, aggrecan, and type II collagen in primary human OA chondrocytes [J]. Scand J Rheumatol, 2015, 44(4):321-330.
- [14] Zhou Y, Shu B, Xie R, et al. Deletion of Axin1 in condylar chondrocytes leads to osteoarthritis-like phenotype in temporomandibular joint via activation of  $\beta$ -catenin and FGF signaling [J]. J Cell Physiol, 2019, 234(2):1720-1729.
- [15] Bradley EW, Carpio LR, Newton AC, et al. Deletion of the PH-domain and Leucine-rich Repeat Protein Phosphatase 1 (Phlpp1) Increases Fibroblast Growth Factor (Fgf) 18 Expression and Promotes Chondrocyte Proliferation [J]. J Biol Chem, 2015, 290(26):16272-16280.
- [16] 陶凤华,蒋婷,向威. 初级纤毛参与成纤维细胞生长因子 18 介导的软骨细胞增殖和表型调控的机制研究 [J]. 骨科, 2020, 11(1):67-73.

· 论 著 ·

## NLR、PLR在甲状腺良恶性结节及自身免疫性甲状腺炎诊断中的应用价值

洪文斌 胡兹韡\*

**【摘要】** 目的 探究外周血中性粒细胞和淋巴细胞比值(NLR)、血小板和淋巴细胞比值(PLR)在甲状腺良恶性结节及自身免疫性甲状腺炎(AT)诊断中的应用价值。方法 选取本院2014年10月至2019年10月收治的287例甲状腺疾病患者,其中分化型甲状腺癌(DTC)患者66例,结节性甲状腺肿(NG)患者104例,AT患者117例;另选择同期于本院体检的健康志愿者260例;对比各组临床各指标差异,受试者工作特征曲线分析NLR、PLR在DTC/NG、AT中的诊断价值。结果 DTC、NG、AT患者及健康组性别、年龄、白细胞计数(WBC)、三碘甲状腺原氨酸(TT3)比较差异无统计学意义( $P>0.05$ );4组游离甲状腺原氨酸(FT3)、游离甲状腺素(FT4)、甲状腺素(TT4)、促甲状腺激素(TSH)、NLR、PLR比较差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。相关性分析结果显示,NLR、PLR分别与TSH存在显著负相关性( $P<0.05$ )。ROC曲线结果显示,NLR、PLR诊断NG的截断值为1.9,曲线下面积(AUC)为0.875,敏感度为0.850,特异度为0.842,PLR诊断NG的截断值为138.7,AUC为0.775,敏感度为0.786,特异度为0.777,两者联合诊断的AUC为0.895,敏感度为0.911,特异度为0.893。NLR诊断DTC的截断值为1.6,AUC为0.825,敏感度为0.813,特异度为0.806;PLR诊断DTC的截断值为134.7,AUC为0.767,敏感度为0.744,特异度为0.731;两者联合诊断的AUC为0.896,敏感度为0.887,特异度为0.879。NLR诊断AT的截断值为1.8,AUC为0.848,敏感度为0.857,特异度为0.836;PLR诊断AT的截断值为152.5,AUC为0.856,敏感度为0.862,特异度为0.843;两者联合诊断的AUC为0.916,敏感度为0.932,特异度为0.918。结论 NLR、PLR能作为NG、DTC及AT的有效预测指标,两者联合对NG、DTC及AT的诊断具有较好的应用价值。

**【关键词】** 甲状腺肿瘤;自身免疫性甲状腺炎;中性粒细胞和淋巴细胞比值;血小板和淋巴细胞比值

### Value of NLR and PLR in diagnosis of benign and malignant thyroid nodules and autoimmune thyroiditis

HONG Wenbin, HU Hongwei\*

(Department of Surgery, Zhabei Central Hospital, Jing'an District, Shanghai, China, 200070)

**【ABSTRACT】** Objective To explore the application of neutrophil and lymphocyte ratio (NLR), platelet and lymphocyte ratio (PLR) in peripheral blood in the diagnosis of benign and malignant thyroid nodules and autoimmune thyroiditis (AT). Methods 287 patients with thyroid disease admitted to our hospital from October 2014 to October 2019 were enrolled, including 66 patients with differentiated thyroid cancer (DTC), 104 patients with nodular goiter (NG), and 117 patients with AT. In addition, 260 healthy volunteers who were examined in our hospital during the same period were recruited. The clinical characteristics of each group were compared. The receiver operating characteristic curve (ROC) was used to evaluate the diagnostic value of NLR and PLR in DTC/NG and AT. Results There were no significant differences in gender, age, white blood cells (WBC), and triiodothyronine (TT3) among patients with DTC,

基金项目:上海市教育科技基金(HGF-20165021458)

作者单位:上海市静安区闸北中心医院外科,上海200070

\*通信作者:胡兹韡, E-mail: jiaqin97502583@163.com

NG, and AT and the healthy groups ( $P>0.05$ ). There were significant differences in free thyroxine (FT3), free thyroxine (FT4), thyroxine (TT4), thyroid stimulating hormone (TSH), NLR and PLR among the 4 groups ( $P<0.05$ ). Correlation analysis showed that there was a significant negative correlation between NLR, PLR and TSH ( $P<0.05$ ). The ROC cutoff value of NLR and PLR for NG diagnosis is 1.9 with the AUC of 0.875 the sensitivity of 0.850 and the specificity of 0.842. The ROC cutoff value of PLR for NG diagnosis NG is 138.7 with the AUC of 0.775 (sensitivity of 0.786 specificity of 0.777). The combined AUC is 0.895, the sensitivity is 0.911, and the specificity is 0.893. The ROC cutoff value of NLR for DTC diagnosis is 1.6 and the AUC is 0.825 with the sensitivity of 0.813 and the specificity of 0.806. The ROC cutoff value of PLR for DTC diagnosis is 134.7, the AUC is 0.767 (sensitivity: 0.744 and specificity: 0.731). The combined AUC is 0.896, the sensitivity is 0.887, and the specificity is 0.879. The ROC cut-off value of NLR for AT diagnosis is 1.8, the AUC is 0.848, the sensitivity is 0.857, and the specificity is 0.836. the ROC value of PLR for AT diagnosis is 152.5, the AUC is 0.856, the sensitivity is 0.862, and the specificity is 0.843. The combined AUC is 0.916, the sensitivity is 0.932, and the specificity is 0.918. **Conclusion** NLR and PLR can be used as effective predictors for NG, DTC and AT. The combination of the two has a better application value for the diagnosis of TC and AT.

**[KEY WORDS]** Thyroid tumor; Autoimmune Thyroiditis; Neutrophil and lymphocyte ratio; Platelet and lymphocyte ratio

甲状腺疾病包括甲状腺良恶性肿瘤、甲状腺机能亢进、甲状腺机能减退、自身免疫性甲状腺炎等。导致甲状腺疾病发病的因素有很多,其中年龄、碘摄入量、遗传、环境、免疫及内分泌功能紊乱等都与甲状腺疾病的发生有关<sup>[1]</sup>。结节性甲状腺肿(nodular goiter, NG)患者病情反复,部分存在甲状腺退行性病变,严重的甚至可发展为甲状腺恶性肿瘤。甲状腺恶性肿瘤为较常见的恶性肿瘤,以女性最常见,分化型甲状腺癌(Differentiated thyroid cancer, DTC)是甲状腺恶性肿瘤的主要类型,严重危害了患者预后。自身免疫性甲状腺炎(Autoimmune thyroiditis, AT)的发生发展与炎症、免疫紊乱等存在密切关系<sup>[2]</sup>。临床上各类甲状腺疾病初期表现为全身非特异性症状,容易被忽视或误诊而延误治疗。甲状腺疾病患者普遍存在甲状腺激素水平异常,检测其水平有助于了解甲状腺疾病患者病情发展情况,但对于各类甲状腺疾病的区分仍需准确度和灵敏度更高的特异性标志物。炎症在DTC、AT等甲状腺疾病的发生发展中起到至关重要的作用,炎症微环境与病变细胞的复杂相互作用导致了疾病的发展并对患者预后产生极大影响<sup>[3-4]</sup>。中性粒细胞和淋巴细胞比值(neutrophil-to-lymphocyte ratio, NLR)、血小板和淋巴细胞比值(platelet-to-lymphocyte ratio, PLR)为机体免疫活动的标志物,能够反映患者机体的免疫和炎症状态,与多种恶性肿瘤的预后关系密切。相关性

分析结果提示,NLR、PLR异常升高与甲状腺疾病甲状腺激素分泌紊乱存在密切关系<sup>[5]</sup>。因此,本研究对NLR、PLR在甲状腺良恶性结节及自身免疫性甲状腺炎诊断中的应用价值进行了分析,以期对甲状腺疾病患者的临床诊治提供有效指示指标。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选取本院2014年10月至2019年10月收治的287例甲状腺疾病患者,其中分化型甲状腺癌(DTC)患者66例,结节性甲状腺肿(NG)患者104例;另选择同期于本院接受体检的健康志愿者260例作为健康组,均身体健康,无肝肾等脏器功能障碍、无甲状腺疾病史、无慢性进展性疾病。

纳入标准:①均符合中华医学会内分泌学分会中《中国甲状腺疾病诊治指南》<sup>[6]</sup>中的诊断标准,并经临床病理学诊断确诊;②患者均对本研究内容知情签署知情同意书;③近期无抗甲状腺药物治疗、手术视力、碘131治疗;④均为初次确诊,临床资料完善。排除标准:①合并肝肾功能障碍、感染性疾病、血液性疾病、免疫系统障碍者;②合并其他部位恶性肿瘤者;③精神异常无法配合完成研究者;④合并其他类型甲状腺疾病患者。各组研究对象在性别、年龄上比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ ),具可比性。本研究获得院伦理委员会批准。

### 1.2 方法

统计所有研究对象的性别、年龄等临床资料,并收集入院时空腹静脉血,采用XE5000血常规分析仪(Sysmex公司,批号:03200525)检测记录白细胞计数(WBC)、淋巴细胞计数、中性粒细胞计数和血小板计数,计算NLR和PLR。采用E602全自动电发光免疫分析仪(罗氏公司,批号:3402843)测定三碘甲状腺原氨酸(TT3)、甲状腺素(TT4)、甲状腺原氨酸(FT3)、游离甲状腺素(FT4)、促甲状腺激素(TSH),试剂盒均由仪器公司配套提供。

### 1.3 统计学分析

采用SPSS 20.0进行数据分析,计数资料  $n$

(%)表示,组间比较采用 $\chi^2$ 检验;计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析;各指标相关性采用Spearman相关分析;受试者工作特征曲线(ROC)评估NLR、PLR在NG、DTC、AT中的诊断价值。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组临床资料比较

DTC、NG、AT组患者及健康组年龄、WBC、TT3、TT4。比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ );4组性别、FT3、FT4、TSH、NLR、PLR比较差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表1。

表1 各组临床资料比较( $\bar{x} \pm s$ )

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

项目	DTC组(n=66)	NG组(n=104)	AT组(n=117)	健康组(n=260)	F/ $\chi^2$ 值	P值
性别(男/女)	24/42	37/67	35/82	141/119	25.008	0.000
年龄(岁)	43.3±3.6	42.9±4.1	44.1±3.9	43.5±3.3	0.203	0.840
WBC( $\times 10^9/L$ )	6.3±1.2	6.5±1.5	6.8±1.7	6.7±1.5	0.993	0.326
TT3(ng/dL)	99.5±15.6	102.4±13.6	98.8±19.2	97.4±16.5	0.480	0.633
TT4( $\mu g/dL$ )	16.8±2.8	11.6±1.9	15.5±2.3	8.2±1.7	13.518	0.000
FT3(pg/L)	3.1±0.4	3.2±0.6	3.1±0.4	4.7±0.7	11.135	0.000
FT4(ng/L)	0.82±0.14	0.86±0.17	0.83±0.11	0.96±0.10	4.553	0.000
TSH(mIU/L)	1.2±0.3	1.6±0.3	1.1±0.2	2.1±0.5	8.665	0.000
NLR	1.9±0.4	1.5±0.2	2.5±0.3	1.3±0.2	7.395	0.000
PLR	123.4±13.0	113.7±10.1	174.5±15.5	110.5±9.3	4.516	0.000

### 2.2 相关性分析

相关性分析结果显示,NLR、PRL与TSH存在显著负相关性( $P < 0.05$ ),与其他临床指标无显著相关性,见表2。

表2 NLR、PLR与临床各指标的相关性分析

Table 2 Correlation analysis of NLR, PLR and clinical indicators

指标	NLR		PLR	
	r值	P值	r值	P值
WBC	0.105	0.076	0.059	0.319
TT3	0.082	0.166	0.088	0.137
TT4	0.062	0.295	0.074	0.211
FT3	0.094	0.112	0.112	0.058
FT4	0.108	0.068	0.097	0.101
TSH	-0.231	0.001	-0.186	0.002

### 2.3 NLR、PLR诊断NG的诊断价值

NLR、PLR对于NG的诊断具有良好价值,联合检测可以提高诊断的敏感度和特异度,提升诊断准确性。见表3。

表3 NLR、PLR对NG的诊断价值

Table 3 Diagnostic value of NLR and PLR for NG

指标	截断值	AUC	95%CI	敏感度	特异度	约登指数	P值
NLR	1.9	0.875	0.813~0.938	0.850	0.842	0.692	0.000
PLR	138.7	0.775	0.693~0.858	0.786	0.777	0.563	0.000
联合		0.895	0.841~0.950	0.911	0.893	0.804	0.000

### 2.4 NLR、PLR诊断DTC的诊断价值

NLR、PLR对于DTC的诊断具有良好价值,联合检测可以提高诊断的敏感度和特异度,提升诊断准确性。见表4。

表4 NLR、PLR对DTC的诊断价值

Table 4 Diagnostic value of NLR and PLR for DTC

指标	截断值	AUC	95%CI	敏感度	特异度	约登指数	P值
NLR	1.6	0.825	0.770~0.880	0.813	0.806	0.619	0.000
PLR	134.7	0.767	0.703~0.830	0.744	0.731	0.475	0.000
联合	-	0.896	0.856~0.935	0.887	0.879	0.766	0.000

## 2.5 NLR、PLR 诊断 AT 的诊断价值

NLR、PLR 对于 AT 的诊断具有良好价值,联合检测可以提高诊断的敏感度和特异度,提升诊断准确性。见表 5。

表 5 NLR、PLR 对 AT 的诊断价值

Table 5 Diagnostic value of NLR and PLR for AT

指标	截断值	AUC	95%CI	敏感度	特异度	约登指数	P 值
NLR	1.8	0.848	0.786~0.910	0.857	0.836	0.693	0.000
PLR	152.5	0.856	0.785~0.927	0.862	0.843	0.705	0.000
联合	-	0.916	0.872~0.959	0.932	0.918	0.850	0.000

## 3 讨论

甲状腺疾病在初期往往无典型症状,容易造成漏诊、误诊而延误治疗,并且不同甲状腺疾病的治疗方法差别较大。甲状腺疾病的鉴别方法包括超声、CT、ECT、MR 等手段,但对于良恶性结节的诊断具有一定局限性。超声引导穿刺活检可以明确绝大部分的甲状腺良恶性结节,但对于样本量不足或小结节无法提供明确诊断,加上穿刺活检的有创性而不能普及,这都给甲状腺良恶性结节及其他甲状腺疾病的诊断带来了难题<sup>[7]</sup>。因此,寻找确切有效的指示性标志物对于甲状腺疾病的诊疗具有重要价值。

肿瘤微环境主要为肿瘤细胞、间质细胞、炎性细胞和正常组织细胞等组成,细胞因子和信号通路在其中发挥调控作用从而影响肿瘤的发生发展<sup>[8]</sup>。研究证实<sup>[9]</sup>,炎症与多种肿瘤患者预后存在密切相关性。炎症细胞浸润是肿瘤发生发展的重要因素,炎症细胞可分泌肿瘤生长刺激因子,从而促进肿瘤细胞的增殖、分化和转移。淋巴细胞通过细胞免疫发挥机体抗肿瘤作用,其主要包括 NK 细胞和 T 淋巴细胞。研究表明在肿瘤患者中普遍存在淋巴细胞减少和中性粒细胞增多等情况<sup>[10]</sup>。血小板可分泌 VEGF 诱导内皮细胞增殖迁移,增加组织血管通透性,促进肿瘤的转移侵袭。血小板还可以促进血小板源性生长因子(PDGF)、粒细胞集落因子、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子等释放和活化,刺激肿瘤分化和增殖<sup>[11]</sup>。

甲状腺的功能的发育与激素密切关系,促甲状腺激素及其受体异常可导致甲状腺激素的合成分泌异常,垂体前叶功能代偿增加促甲状腺激素分泌,进而导致甲状腺肿大。本研究中相关性分析结果显示 NLR、PLR 参与了 DTC、NG、AT 患者

疾病发展过程,并对患者甲状腺激素分泌产生影响。这是由于中性粒细胞可以调节上皮细胞、肥大细胞、巨噬细胞的细胞功能,并在机体炎症反应中发挥重要作用,淋巴细胞的减少影响了患者的机体免疫状态,促进了炎症反应的发展;血小板则可通过释放多种细胞因子,调节有关细胞功能。AT 又被称作桥本甲状腺炎或慢性淋巴细胞甲状腺炎,其本身为器官特异性自身免疫性疾病,在 AT 患者中存在自身反应性 T 淋巴细胞耐受抵抗力或抑制性 T 淋巴细胞数量、质量异常<sup>[12]</sup>。

随着炎症的发展,机体血小板和中性粒细胞随之升高,淋巴细胞明显减少,导致 NLR、PLR 也随之升高。研究表明<sup>[13]</sup>,在 AT 患者中存在 T 淋巴细胞介导的细胞免疫应答异常,Th1/Th2 细胞平衡向 Th2 偏离,Th2 相应细胞因子分泌增多。本研究中 ROC 曲线结果显示,NLR、PLR 联合检测对于 DTC、NG 及 AT 的诊断均具有较高的敏感度和特异度。并且 NLR、PLR 结果容易获得,具有简单易得、经济适用的特点,可作为 DTC 及 AT 一种低成本、简便、无创、可重复的诊断预测指标。NLR、PLR 为基于淋巴细胞、血小板和中性粒细胞测得的,而很多药物或患者疾病状态如慢性感染、使用免疫抑制剂、肝肾功能不全等均会对淋巴细胞、血小板和中性粒细胞水平造成影响,因此应用 NLR、PLR 诊断时应注意排除干扰因素的影响。

综上所述,NLR、PLR 升高对于 NG、DTC 及 AT 的有效预测指标,两者联合对 NG、DTC 及 AT 的诊断具有较好的应用价值,值得临床推广。

## 参考文献

- [1] 滕卫平. 甲状腺疾病诊治现代进展[J]. 中国实用内科杂志, 2019, 39(4): 311-315.
- [2] 何珂, 陆西宛, 朱丽华, 等. 桥本氏甲状腺炎患者外周免疫调节细胞比例异常[J]. 中国免疫学杂志, 2019, 35(20): 2513-2516.
- [3] Ferrari SM, Fallahi P, Galdiero MR, et al. Immune and Inflammatory Cells in Thyroid Cancer Microenvironment [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(18): 4413.
- [4] Ari A, Gunver F. Comparison of neutrophil-lymphocyte ratio and platelet-lymphocyte ratio in patients with thyroiditis and papillary tumors[J]. J Int Med Res, 2019, 47(5): 2077-2083.
- [5] 宋杨梅, 樊勇, 艾比拜·玉素甫, 等. 甲状腺癌术前中性粒细胞与淋巴细胞比值和血小板与淋巴细胞比值与临床病理特征及预后关系研究[J]. 中国全科医学, 2015, 18(15): 1748-1752.

(下转第 655 页)

## miR-223和miR-192在重症肺炎患儿血清中的表达意义

孙卉芳\* 孙永法 王丹凤

**[摘要]** 目的 探讨微小RNA-223(miR-223)与微小RNA-192(miR-192)在重症肺炎患儿中的表达及其临床意义。方法 选取120例肺炎患儿为研究组,根据儿童肺炎诊断标准将研究组分为轻度感染组、中度感染组与重度感染组,同时选取同期健康体检儿童120例为对照组。实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测血清miR-223、miR-192的表达水平;采用免疫比浊法检测血清载脂蛋白E(ApoE)与C-反应蛋白(CRP)水平;化学发光法检测血清降钙素原(PCT)水平;Pearson法分析重症肺炎患儿血清miR-223、miR-192相关性及其两者表达与ApoE、CRP、PCT水平的相关性;受试者工作特征(ROC)曲线分析血清miR-223、miR-192对重症肺炎的诊断价值。结果 与对照组相比,研究组血清miR-223的表达水平显著升高,血清miR-192的表达水平显著降低,差异有统计学意义( $P<0.05$ );与轻度感染组相比,中度感染组与重度感染组血清miR-223的表达水平显著升高,血清miR-192的表达水平显著降低,差异有统计学意义( $P<0.05$ );与对照组相比,研究组血清ApoE、CRP、PCT水平显著升高,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。Pearson相关性分析结果显示,重症肺炎患儿血清中miR-223和miR-192表达呈负相关( $r=-0.226, P<0.001$ )。重症肺炎患儿血清中miR-223表达与ApoE、CRP、PCT呈正相关( $P<0.001$ ),miR-192表达与ApoE、CRP、PCT呈负相关( $P<0.001$ )。血清中miR-223诊断重症肺炎时的敏感度为84.00%,特异度为74.00%,AUC面积为0.862;miR-192诊断重症肺炎时的敏感度为88.00%,特异度为72.00%,AUC面积为0.868。结论 重症肺炎患儿血清miR-223表达水平升高,miR-192的表达水平降低,且与肺炎严重程度有关,并可能作为早期诊断重症肺炎的分子标志物。

**[关键词]** miR-223; miR-192; 重症肺炎; ApoE; CRP; PCT

### Significance of miR - 223 and miR - 192 expression in serum of children with severe pneumonia

SUN Huifang\*, SUN Yongfa, WANG Danfeng

(Department of Pediatrics, Luoyang Central Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Luoyang, Henan, China, 471000)

**[ABSTRACT]** Objective To investigate the expression and clinical significance of microRNA-223 (miR-223) and microRNA-192 (miR-192) in children with severe pneumonia. Methods 120 children with pneumonia were selected as the research group, and the research components were divided into mild infection group, moderate infection group and severe infection group according to the diagnostic criteria of childhood pneumonia. At the same time, 120 children with healthy physical examination during the same period were selected as the control group. Real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to detect the serum levels of miR-223 and miR-192. Immunoturbidimetry was used to detect serum apolipoprotein E (ApoE) and C-reactive protein (CRP) levels. Chemiluminescence method was used to detect serum pro-

基金项目:河南省医学科技攻关计划项目(201806215)

作者单位:郑州大学附属洛阳中心医院儿科住院部,河南,洛阳471000)

\*通信作者:孙卉芳, E-mail: sanliyuw@163.com

calcitonin (PCT) level. Pearson method was used to analyze the correlation between serum miR-223 and miR-192 in children with severe pneumonia and the correlation between their expression and ApoE, CRP, and PCT levels. The diagnostic characteristics of serum miR-223 and miR-192 were analyzed by ROC curve. **Results** Compared with the control group, the serum level of miR-223 in the study group was significantly increased ( $P<0.05$ ), but miR-192 decreased ( $P<0.05$ ). Compared with the mild infection group, the serum level of miR-223 in the moderate infection and the severe infection group was significantly increased, and miR-192 reduced ( $P<0.05$ ). Compared with the control group, the serum ApoE, CRP, and PCT levels in the study group increased significantly ( $P<0.05$ ). Pearson correlation analysis showed that miR-223 and miR-192 expressions in children with severe pneumonia were negatively correlated ( $r=-0.226$ ,  $P<0.001$ ). The expression of miR-223 in serum of children with severe pneumonia was positively correlated with ApoE, CRP, and PCT ( $P<0.001$ ), and the expression of miR-192 was negatively correlated with ApoE, CRP, and PCT ( $P<0.001$ ). The sensitivity of miR-223 in the diagnosis of severe pneumonia was 78.00%, the specificity was 90.00%, and the AUC area was 0.893. The sensitivity of miR-192 in the diagnosis of pneumonia was 80.00%, the specificity was 80.00%, and the AUC area was 0.902. **Conclusion** In children with severe pneumonia, the serum level of miR-223 increases and miR-192 decreases, which is related to the severity of pneumonia and can be used as a molecular marker for early diagnosis of severe pneumonia.

[KEY WORDS] MiR-223; miR-192; Severe pneumonia; ApoE; CRP; PCT

肺炎是儿童时期尤其是婴幼儿时期最为常见的呼吸道感染性疾病。临床根据病情严重程度,将肺炎分为轻症肺炎和重症肺炎,前者症状轻、无并发症、预后好;后者起病急、变化快、病情重、并发症多,常可危及儿童生命,是导致5岁以下儿童死亡的主要原因<sup>[1-2]</sup>。在肺炎患儿中,有8%~14%属于重症肺炎。儿童重症肺炎具有发病快、并发症多,常累及全身、典型表现常被掩盖或被忽略等特点,如果抢救时间仓促极易导致诊治不当,会使病情进展恶化,甚至死亡。因此,对儿童重症肺炎的诊断和正确治疗是儿科的重大课题<sup>[3-4]</sup>。微小RNA (microRNA, miRNA) 是一类小分子非编码的基因表达调控因子,介导转录后的基因沉默,它是一类高度保守、长度很短的内源性非编码单链RNA,约20~24 nt。他们参与了许多生物过程,包括新陈代谢、细胞周期、细胞凋亡和疾病控制,在心血管、呼吸、神经和造血系统等多个系统内都发挥作用,还报道了miRNA参与红细胞生成和血管生成。大量研究表明miRNA与肺的生长发育、肺炎、肺癌以及肺纤维化等肺部疾病的发生发展及转归有着密切的联系<sup>[5-6]</sup>。本实验旨在研究miR-223与miR-192在重症肺炎患儿中的表达及其临床意义。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选取2017年1月至2019年1月本院收治的120

例肺炎患儿为研究组,男性66例,女性54例,平均(3.56±1.20)岁。同时选取同期健康体检儿童120例为对照组,其中男性60例,女性60例,平均(3.85±1.33)岁。根据重症肺炎诊断标准将研究组患儿分为轻度感染组、中度感染组与重度感染组,各40例<sup>[7]</sup>。本研究经本院伦理委员会批准,所有患儿家属知情且签署同意书。经影像学检查显示患儿具有片状浸润阴影、间质性肺炎等炎性改变,自身有一定的免疫性疾病。排除标准:既往窒息病史者;先天性心脏病、支气管发育不良等先天性疾病者;合并吸入性肺炎、败血症等感染性疾病者;意识障碍等;家族性疾病患儿。对照组与研究组患儿性别、年龄等资料比较差异无统计学意义( $P>0.05$ ),具有可比性。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 样本采集

抽取各组患儿清晨空腹静脉血5 mL,4℃条件下经3 000 r/min离心15 min,吸取上清至EP管内,置于-80℃超低温冰箱保存。

#### 1.2.2 实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测miR-223、miR-192的表达水平

采用Trizol(美国Invitrogen公司)法血清中的总RNA,应用紫外分光光度计测定RNA浓度。根据反转录试剂盒(美国Thermo Fisher公司)说明书操作将总RNA反转录合成cDNA。引物均由上海生工生物工程股份有限公司合成。以cDNA为模板进行qRT-PCR反应,反应体系:SYBR Green

Master Mix 10  $\mu\text{L}$ , 正反向引物 0.8  $\mu\text{L}$ , cDNA 1  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 补足体系至 20  $\mu\text{L}$ ; 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min, 95 $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 30 s, 共循环 40 次。miR-223、miR-192 以 U6 为内参, 采用 2<sup>- $\Delta\Delta\text{Ct}$</sup>  法计算相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 引物序列  
Table 1 Primer sequences

基因名称	引物序列
miR-223	正向引物 5'-GGGGGTGTCAGTGTCAAAT-3' 反向引物 5'-CAGTGCAGGGTCCGAGGTAT-3'
miR-192	正向引物 5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCC- GAGGTATTC-3' 反向引物 5'-GCACTGGATACGACGGCTGT-3'
U6	正向引物 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3' 反向引物 5'-AACGCTTCAGGAATTTGCGT-3'

### 1.2.3 检测血清 ApoE、CRP、PCT 水平

采用免疫比浊法检测血清载脂蛋白 E (ApoE, apolipoprotein E) 与 C-反应蛋白 (CRP, C-reactive protein) 的水平, 检测仪器日立 HITACHI7180 与配套试剂购自东莞市毅万光源有限公司; 采用化学发光法检测血清降钙素原 (PCT, procalcitonin) 的

水平, mini-VIDAS 免疫分析仪及其配套试剂购自法国生物梅里埃股份有限公司。

### 1.3 统计学处理

采用 SPSS 22.0 软件进行数据分析, 符合正态分布的计量资料以 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 两组间比较采用独立样本  $t$  检验; 多组间比较采用单因素方差分析, 计数资料采用  $n(\%)$  表示, 行  $\chi^2$  检验; 采用 Pearson 法分析重症肺炎患儿血清 miR-223、miR-192 相关性及其两者表达与 ApoE、CRP、PCT 水平的相关性; 受试者工作特征 (ROC, receiver operating characteristic) 曲线分析血清 miR-223、miR-192 对重症肺炎的诊断价值。以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 两组血清 miR-223 与 miR-192 的表达水平和 ApoE、CRP、PCT 水平比较

与对照组相比, 研究组血清 miR-223 的表达水平显著升高, 血清 miR-192 的表达水平显著降低, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 与对照组相比, 研究组血清 ApoE、CRP、PCT 水平显著升高, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见表 2。

表 2 两组血清 miR-223、miR-192 的表达水平和 ApoE、CRP、PCT 水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Comparison of the expression levels of serum miR-223 and miR-192 and the levels of ApoE, CRP and PCT between the 2 groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	$n$	miR-223	miR-192	ApoE (mg/dL)	CRP (mg/L)	PCT (ng/mL)
对照组	120	1.68 $\pm$ 0.30	0.90 $\pm$ 0.25	2.33 $\pm$ 0.47	5.21 $\pm$ 1.89	0.15 $\pm$ 0.03
研究组	120	2.27 $\pm$ 0.38	0.45 $\pm$ 0.30	5.98 $\pm$ 0.96	10.35 $\pm$ 2.67	0.37 $\pm$ 0.10
$t$ 值		27.391	20.651	13.951	13.695	15.632
$P$ 值		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

### 2.2 不同感染程度患儿血清 miR-223 与 miR-192 的表达水平比较

与轻度感染组相比, 中度感染组与重度感染组血清 miR-223 的表达水平显著升高 ( $P < 0.05$ ), 血清 miR-192 的表达水平显著降低 ( $P < 0.05$ ), 见表 3。

### 2.3 重症肺炎患儿血清 miR-223 与 miR-192 相关性

Pearson 相关性分析结果显示, 重症肺炎患儿血清中 miR-223 与 miR-192 表达呈负相关 ( $r = -0.226, P < 0.001$ )。见图 1。

### 2.4 重症肺炎患儿血清 miR-223 与 miR-192 与 ApoE、CRP、PCT 的相关性分析

采用 Pearson 法结果显示 miR-223 与 ApoE、

表 3 不同感染程度血清 miR-223 与 miR-192 的表达水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 3 Expression levels of serum miR-223 and miR-192 at different infection levels ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	$n$	miR-223	miR-192
轻度感染组	40	1.91 $\pm$ 0.32	0.85 $\pm$ 0.29
中度感染组	40	3.21 $\pm$ 0.56 <sup>a</sup>	0.45 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup>
重度感染组	40	3.69 $\pm$ 0.45 <sup>a</sup>	0.40 $\pm$ 0.25 <sup>a</sup>
$F$ 值		25.669	30.587
$P$ 值		0.000	0.000

注: 与轻度感染组相比, <sup>a</sup> $P < 0.05$ 。

CRP、PCT 呈正相关 ( $P < 0.05$ ), miR-192 与 ApoE、CRP、PCT 呈负相关 ( $P < 0.05$ ), 见表 4。

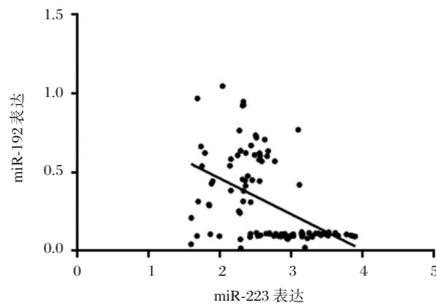


图1 miR-223与miR-192相关性

Figure 1 The correlation between miR-223 and miR-192

表4 肺炎患儿血清miR-223、miR-192与ApoE、CRP、PCT的相关性分析

Table 4 Correlation analysis of serum miR-223, miR-192 and ApoE, CRP, PCT in children with pneumonia

指标	miR-223		miR-192	
	r值	P值	r值	P值
ApoE	0.444	0.001	-0.485	0.001
CRP	0.407	0.000	-0.411	0.001
PCT	0.497	0.000	-0.460	0.001

表5 血清miR-223与miR-192对重症肺炎的诊断价值

Table 5 Diagnostic value of serum miR-223 and miR-192 in severe pneumonia

指标	特异度(%)	敏感度(%)	AUC	95%CI	Z统计	尤登指数	标准误	P值
miR-223	84.00	74.00	0.862	0.779~0.923	10.116	0.5800	0.0358	<0.0001
miR-192	88.00	72.00	0.868	0.786~0.928	10.610	0.6000	0.0347	<0.0001

—<sup>[8-9]</sup>。医院获得性肺炎是重症患儿高死亡率的重要原因之一,其死亡率大约在33%~50%<sup>[10]</sup>,其主要病原菌是铜绿假单胞菌、鲍曼不动杆菌、肺炎链球菌和金黄色葡萄球菌,如若推迟抗感染治疗时间,死亡率将增加至60%<sup>[11-12]</sup>。

miRNA在细胞分化,生物发育及疾病发生发展过程中发挥巨大作用,越来越多的引起研究人员的关注。随着对于miRNA作用机理的进一步的深入研究,以及利用最新的技术miRNA芯片等高通量的技术手段对于miRNA和疾病之间的关系进行研究,将会使人们对于高等真核生物基因表达调控的网络理解提高到一个新的水平。颜保松等<sup>[13]</sup>研究表明,miR-223可作为肺结核潜在的有诊断价值的标记物。柳新胜等<sup>[14]</sup>研究表明,miR-192可以评估相关性肺炎患儿病情严重程度。

综上所述,重症肺炎患儿血清miR-223表达水平升高,miR-192的表达水平降低,且与肺炎严重程度有关,并可能作为早期诊断重症肺炎的分

## 2.5 血清miR-223与miR-192对重症肺炎的诊断价值

ROC分析血清miR-223、miR-192以及两个基因联合对重症肺炎的诊断价值。miR-223、miR-192诊断重症肺炎时的敏感度、特异度、AUC面积、Z值、尤登指数、标准误等,见表5。

## 3 讨论

重症肺炎是一种呼吸系统急危重疾病,发展迅速、病情凶险,应快速采取针对性措施进行综合治疗以改善患儿预后。重症肺炎表现为肺部症状呼吸衰竭,还有全身中毒症状,其他脏器功能不全甚至衰竭,即常见的脓毒血症。脓毒症的感染灶分布于全身各处,临床常见于肺部、腹膜、胆道系统、泌尿生殖系及脑膜炎等,皮肤脓肿也可引起脓毒症,常常表现为全身炎症反应综合征。重症肺炎可导致脓毒症的发生,而脓毒症也最常累及肺部,是引起呼吸衰竭最常见的原因,两者互相影响。脓毒症也是重症肺炎患儿的主要死亡原因之

子标志物,临床中对重症肺炎患儿应给予早期有效诊断,并进行适当的治疗,可有效提高临床疗效。

## 参考文献

- [1] Harris M, Clark J, Coote N, et al. British Thoracic Society guideline for the management of community acquired pneumonia in Childhood: up-date 2011[J]. Thorax, 2011, 66(2): 1-23.
- [2] Bradley JS, Byington CL, Shah SS, et al. The management of community-acquired pneumonia in infants and children older than 3 months of age: clinical practice guidelines by the Pediatric Infectious Diseases Society and the Infectious Diseases Society of America[J]. Clin Infect Dis, 2011, 53(1): 25-76.
- [3] Levine OS, O'Brien KL, Deloria-Knoll M, et al. The Pneumonia Etiology Research for Child Health Project: a 21st century childhood pneumonia etiology study[J]. Clin Infect Dis, 2012, 54(2): 93-101.
- [4] Mauad T, Hajjar LA, Callegari GD, et al. Lung pathology in fatal novel human influenza A (H1N1) infection [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2010, 181(1): 72-79.

(下转第665页)

· 论 著 ·

## 吞咽造影定量分析对卒中后吞咽障碍及功能的评估价值

贺媛<sup>1\*</sup> 代欣<sup>1</sup> 梁雅慧<sup>2</sup> 魏冰<sup>1</sup>

**[摘要]** 目的 探究吞咽造影(VFSS)定量分析在针刺联合经颅磁刺激(TMS)治疗脑卒中后吞咽障碍患者疗效及吞咽功能评估中的应用价值。方法 选取2017年1月至2019年1月收治的脑卒中后吞咽障碍114例患者作为研究对象,均采用针刺联合TMS治疗。治疗前后进行VFSS检查评估吞咽功能,对比治疗前后、不同疗效患者VFSS评分、吞咽通过时间、环咽肌开放程度。结果 114例患者,经针刺联合TMS治疗后,总有效率为90.35%(103/114)。治疗1个月后吞咽通过时间短于治疗前( $P<0.05$ );治疗1个月后患者吞咽稀钡、浓钡、糊钡、包钡时VFSS评分高于治疗前,环咽肌开放程度大于治疗前( $P<0.05$ );有效患者治疗1个月后吞咽通过时间短于治疗前及无效患者( $P<0.05$ );治疗1个月后,有效患者吞咽稀钡、浓钡、糊钡、包钡时VFSS评分高于治疗前及无效患者,环咽肌开放程度大于治疗前及无效患者( $P<0.05$ )。结论 VFSS定量分析可有效评估针刺联合TMS治疗脑卒中后吞咽障碍患者疗效及吞咽功能,为临床诊治提供相关参考依据。

**[关键词]** 脑卒中后吞咽障碍; 针刺; TMS; 吞咽造影; 吞咽功能

### The value of quantitative analysis of swallowing angiography in the evaluation of dysphagia and function after stroke

HE Yuan<sup>1\*</sup>, DAI Xin<sup>1</sup>, LIANG Yahui<sup>2</sup>, WEI Bing<sup>1</sup>

(1. Department of speech rehabilitation, Beijing rehabilitation hospital affiliated to capital medical university, Beijing, China, 100144; 2. Department of traditional Chinese medicine, Beijing rehabilitation hospital affiliated to capital medical university, Beijing, China, 100144)

**[ABSTRACT]** Objective To explore the value of quantitative analysis of video fluoroscopic swallowing angiography (VFSS) in the evaluation of the efficacy and swallowing function of acupuncture combined with transcranial magnetic stimulation (TMS) in patients with dysphagia after stroke. Methods A total of 114 patients with dysphagia after stroke who were treated from January 2017 to January 2019 were selected as the research subjects, and all were treated with acupuncture combined with TMS. VFSS examination was performed before and after treatment to assess swallowing function, and VFSS scores, swallowing passage time, and the degree of cyclopharyngeal muscle opening were compared between patients with different curative effects before and after treatment. Results In 114 patients, the total effective rate after acupuncture combined with TMS was 90.35% (103/114). After 1 month of treatment, the swallowing time was shorter than before the treatment ( $P<0.05$ ). The VFSS scores of the patients when swallowing barium, concentrated barium, barium paste, and barium bagging were higher than before the treatment, and the degree of opening of the cyclo-

基金项目:北京市科研基金项目(2015-YJJ-GGL-003)

作者单位:1.首都医科大学附属北京康复医院言语康复科,北京 100144

2.首都医科大学附属北京康复医院中医科,北京 100144

\*通信作者:贺媛, E-mail: smile3028@163.com

pharyngeal muscle was greater than before the treatment ( $P<0.05$ ). After 1 month of treatment, the effective passage time of swallowing patients was shorter than that before treatment and ineffective patients ( $P<0.05$ ). The VFSS scores of effective patients when swallowing thin barium, concentrated barium, barium paste, and barium bagging were higher than those before treatment and ineffective patients, and the degree of openness of the cyclopharyngeal muscle was greater than before treatment and ineffective patients ( $P<0.05$ ). Conclusion Quantitative analysis of VFSS can effectively evaluate the efficacy and swallowing function of acupuncture combined with TMS in the treatment of patients with dysphagia after stroke, and provide relevant reference for clinical diagnosis and treatment.

[KEY WORDS] Post-stroke dysphagia; Acupuncture; TMS; Video fluoroscopic swallowing study; Swallowing function

吞咽障碍是脑卒中后常见后遗症,流行病学统计表明,其在脑卒中后急性期发生率为46.3%左右,恢复期则高达56.9%,严重影响生活质量及预后改善<sup>[1]</sup>。针刺作为中医主要疗法之一,在脑卒中康复医学中应用较为广泛,且具有良好疗效<sup>[2]</sup>。经颅磁刺激(Transcranial magnetic stimulation, TMS)是一种利用时变磁场产生感应电场,改善脑内代谢和神经活动的治疗方法<sup>[3]</sup>。因此,针刺联合TMS成为临床重要研究方向。吞咽造影(Video fluoroscopic swallowing study, VFSS)检查可清晰显示吞咽器官解剖结构,能实时观察食物在口腔、咽部、食管内运转情况,是临床评估吞咽功能的主要依据<sup>[4]</sup>。但该检查方法多为主观性指标,缺乏客观性量化参数。基于此,本研究尝试对VFSS检查进行定量分析,探讨其在评估脑卒中后吞咽障碍患者疗效及吞咽功能中的应用价值,旨在为临床诊治提供数据支持。报告如下。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选取2017年1月至2019年1月收治的脑卒中后吞咽障碍114例患者作为研究对象,其中男性73例,女性41例,年龄48~74岁,平均年龄( $57.66\pm 4.27$ )岁,脑卒中部位:脑干30例,大脑60例,小脑24例。本研究经医院伦理委员会审批通过。

纳入标准:均经MRI或CT检查证实为脑卒中;均符合脑卒中后吞咽障碍诊断标准<sup>[5]</sup>:①吞咽困难,伴有声音障碍、语言模糊、饮水呛咳;②病理性脑干反射(角膜下颌反射、掌颌反射、吸吮反射等)阳性;③咽反射减弱,软腭反射消失;④情感障碍,表情呆滞或强哭强笑;⑤无舌肌萎缩及纤颤,具备①项及②~⑤项中任意两项,即可确诊;临床资料完整;患者及家属均知情,自愿签订知情承诺书。排

除标准:①伴有心肺肾等重要脏器严重功能异常者;②存在食道、咽部、口腔器质性病变者;③合并头颈部结构性病变者;④其他原因而致吞咽障碍者;⑤无法配合VFSS检查者;⑥存在钡过敏史者;⑦伴有恶性肿瘤疾病者;⑧临床资料缺失者;出现严重沟通障碍、认知障碍者、⑨伴有精神类疾病者。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 治疗方法

均给予针刺联合TMS治疗,针刺方法:患者取仰卧位,于咽喉部取穴:阿呛穴、吞咽穴、治呛穴、提咽穴,于颈项部取穴:翳明穴、夹脊穴,1次·d<sup>-1</sup>,15d为1个疗程,持续治疗2个疗程。TMS方法:采用YRD CCY-IA型磁场治疗仪进行TMS治疗,10min·次<sup>-1</sup>,6次·周<sup>-1</sup>,持续治疗4周。

#### 1.2.2 VFSS检查方法

造影机采用GMM公司的OPERA型数字化多功能胃肠机,患者于正位、侧位分别依次吞食不同性状的钡剂食团,分别为:稀液态钡、浓液态钡(为增加黏稠度,加少量牛奶)、糊状钡(以米粉调制稠钡)、包钡(馒头或面包中加钡)。分别观察4种食团在通过口腔、咽部及食道时的情况。

#### 1.2.3 VFSS定量分析方法

①VFSS评分:主要包括口腔期、咽期、误咽程度三部分内容,口腔期为0~2分;咽期为0~3分;误咽程度为0~4分,总分为三者之和,共9分,分数越高,则提示吞咽功能越好。②吞咽通过时间:当吞咽动作开始后,5mL的浓液态钡自舌根与下颌骨相交点至环咽肌开放到最大幅度所持续的时间;③环咽肌开放幅度:取侧位C<sub>4</sub>~C<sub>6</sub>水平环咽肌开放最大时前后径的连线。以上定量分析均由专业且经验丰富的专业医师按照双盲法进行评估。

### 1.3 疗效评价标准<sup>[6]</sup>

参考洼田饮水试验评估疗效<sup>[6]</sup>。总有效率=治愈率+显效率+好转率。

### 1.4 观察指标

①疗效。②治疗前后吞咽通过时间。③不同疗效患者吞咽通过时间。④治疗前后VFSS评分、环咽肌开放程度。⑤不同疗效患者VFSS评分、环咽肌开放程度,其中疗效分为有效、无效,有效包括治愈、显效、好转。

### 1.5 统计学处理

采用SPSS 22.0软件进行数据分析,计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, $t$ 检验,计数资料以 $n(\%)$ 表示, $\chi^2$ 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 疗效

114例患者,治疗1个月后,治愈30例,显效61例,好转12例,无效11例,总有效率为90.35%(103/114)。

### 2.2 治疗前后吞咽通过时间

治疗1个月后吞咽通过时间短于治疗前,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表1。

表1 治疗前后吞咽通过时间比较 $(\bar{x} \pm s)$

Table 1 Comparison of swallowing time before and after treatment  $(\bar{x} \pm s)$

组别	<i>n</i>	吞咽通过时间(s)
治疗前	114	0.30±0.06
治疗1个月后	114	0.12±0.03
<i>t</i> 值		28.650
<i>P</i> 值		<0.001

表3 治疗前后VFSS评分比较 $(\bar{x} \pm s)$

Table 3 Comparison of VFSS scores before and after treatment  $(\bar{x} \pm s)$

项目	组别	<i>n</i>	稀钡	浓钡	糊钡	包钡
VFSS评分 (分)	治疗前	114	3.16±1.02	3.05±1.01	2.39±0.71	1.38±0.30
	治疗1个月后	114	7.52±1.26	7.14±1.18	4.27±1.03	1.75±0.32
	<i>t</i> 值		28.716	28.115	16.046	9.006
	<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
环咽肌开放 程度(cm)	治疗前	114	0.20±0.06	0.17±0.04	0.12±0.03	0.03±0.01
	治疗1个月后	114	0.75±0.12	0.72±0.10	0.70±0.09	0.69±0.07
	<i>t</i> 值		43.770	54.524	65.277	99.658
	<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

## 3 讨论

脑卒中后吞咽障碍可诱发电解质失衡、营养

### 2.3 不同疗效患者吞咽通过时间

治疗1个月后,有效患者吞咽通过时间短于治疗前及无效患者,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表2。

表2 不同疗效患者吞咽通过时间比较 $(\bar{x} \pm s)$

Table 2 Comparison of swallowing passage time of patients with different therapeutic effects  $(\bar{x} \pm s)$

时间	组别	<i>n</i>	吞咽通过时间(s)
治疗前	有效患者	103	0.30±0.05
	无效患者	11	0.31±0.06
	<i>t</i> 值		0.619
	<i>P</i> 值		0.538
治疗1个月后	有效患者	103	0.10±0.01
	无效患者	11	0.31±0.04
	<i>t</i> 值		43.285
	<i>P</i> 值		<0.001

### 2.4 治疗前后VFSS评分、环咽肌开放程度

治疗1个月后患者吞咽稀钡、浓钡、糊钡、包钡时VFSS评分高于治疗前,环咽肌开放程度大于治疗前,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表3。

### 2.5 不同疗效患者VFSS评分

### 2.6 不同疗效患者环咽肌开放程度比较

治疗1个月后,有效患者吞咽稀钡、浓钡、糊钡、包钡时VFSS评分及环咽肌开放程度大于治疗前及无效患者,差异无统计学意义( $P < 0.05$ ),见表4。

### 2.7 典型病例分析

王XX,男,年龄57岁,确诊为脑卒中后吞咽障碍。治疗前后环咽肌开放程度。见图1。

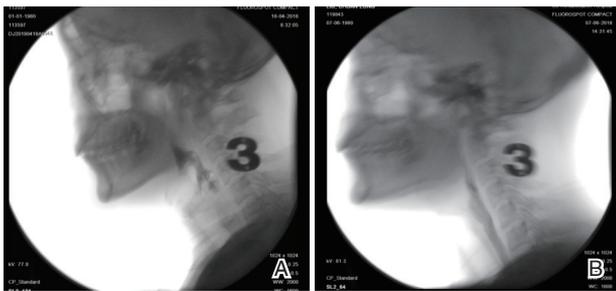
不良、吸入性肺炎等并发症,增加预后不良风险<sup>[7]</sup>。因此,临床应给予重视,及时采取有效措施治疗,并采取可靠检查方法评估吞咽功能好转情

表4 不同疗效患者VFSS评分比较( $\bar{x} \pm s$ )Table 4 Comparison of VFSS scores of patients with different therapeutic effects ( $\bar{x} \pm s$ )

项目	组别	n	稀钡(分)	浓钡(分)	糊钡(分)	包钡(分)
治疗前	有效患者	103	3.17±1.04	3.03±1.00	2.37±0.74	1.37±0.45
	无效患者	11	3.07±1.01	3.24±1.07	2.58±0.80	1.47±0.48
	t值		0.304	0.658	0.888	0.696
	P值		0.762	0.512	0.377	0.488
治疗1个月后	有效患者	103	7.95±1.31	7.56±1.26	4.47±1.05	1.79±0.42
	无效患者	11	3.46±1.10	3.25±1.03	2.41±0.73	1.40±0.31
	t值		10.951	10.947	6.333	2.989
	P值		<0.001	<0.001	<0.001	0.003

表5 不同疗效患者环咽肌开放程度比较( $\bar{x} \pm s$ )Table 5 Comparison of the opening degree of cyclopharyngeal muscles in patients with different therapeutic effects ( $\bar{x} \pm s$ )

项目	组别	n	稀钡	浓钡	糊钡	包钡
治疗前	有效患者	103	0.20±0.05	0.17±0.05	0.12±0.04	0.03±0.01
	无效患者	11	0.19±0.04	0.18±0.04	0.13±0.03	0.04±0.01
	t值		0.641	1.585	0.804	3.153
	P值		0.523	0.115	0.423	0.002
治疗1个月后	有效患者	103	0.81±0.22	0.78±0.20	0.76±0.18	0.76±0.16
	无效患者	11	0.20±0.06	0.19±0.06	0.14±0.04	0.03±0.01
	t值		9.126	9.703	11.351	15.069
	P值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001



注:A为治疗前环咽肌开放程度;B为治疗后环咽肌开放程度。

图1 治疗前后环咽肌开放程度

Figure 1 The degree of opening of thepharyngeal muscle before treatment

况,为促进预后改善提供有效信息。

针刺阿呛穴、咽喉穴、治呛穴、提咽穴等咽喉部阿呛组穴位具有醒脑开窍、通经活络之效。研究表明,针刺阿呛组穴应用于脑卒中后吞咽障碍患者有利于调节神经反应,改善咽缩肌、提咽肌功能,增加食团压力,促使环咽肌松弛,还能封闭会厌谷,改善甲状舌骨肌功能,强化甲状软骨上下移动控制能力,从而协助完成吞咽动作,减少误吸及食物滞留<sup>[8]</sup>。而针刺位于颈部的夹脊穴及翳明穴具有改善颈内动脉、椎基底动脉血液循环作用,可加快受损部位脑血管血液微循环,促进脑神经重塑,改善吞

咽功能<sup>[9]</sup>。Choi GS等<sup>[10]</sup>报道显示,TMS在脑卒中相关后遗症治疗中具有良好效果。TMS主要是通过刺激大脑皮层,利用时变磁场产生感应电场,使神经纤维、神经元去极化,以达到改变相应皮层神经细胞动作电位的目的,能明显改善舌骨、食管相关肌肉群功能,加速吞咽功能恢复<sup>[11]</sup>。因此,针刺联合TMS可通过不同机制、途径、靶点发挥协同增效作用,最终取得较为可靠的疗效。

VFSS检查被认为是评价吞咽功能的“金标准”,可全方位观察患者口腔期、咽期、食道期吞咽情况,且实际操作简便,应用较为广泛<sup>[12]</sup>。近年来,VFSS定量分析技术逐渐受到临床关注。有学者选取口腔运送时间、软腭上抬时间、喉前庭闭合时间、舌骨位移时间、咽肌收缩率等多个参数进行量化分析,有利于更加全面评估吞咽障碍患者治疗前后吞咽功能改善情况<sup>[13]</sup>。但上述参数较多,加之需采用专业软件进行定量分析,对临床工作的开展造成不便。而大量临床实践证实,脑卒中后吞咽障碍主要表现为口腔运动缓慢、咽期启动迟缓、环咽肌开放障碍等症状<sup>[14]</sup>。且温泽迎等<sup>[15]</sup>观点认为,吞咽通过时间、环咽肌开放幅度可作为VFSS常规定量分析参数。在此基础上,本研究发

现,治疗后患者吞咽功能得到明显改善,VFSS评分、吞咽通过时间、环咽肌开放程度作为量化参数评估针刺联合TMS治疗脑卒中后吞咽障碍患者吞咽功能具有可靠价值。此外,本研究结果还说明VFSS定量分析在评估疗效方面也具有良好价值。但本研究属于单中心研究,选取样本量较少,可能造成数据偏移,需作进一步分析与探究。

综上所述,VFSS定量分析可有效评估针刺联合TMS治疗脑卒中后吞咽障碍患者疗效及吞咽功能,有助于为临床诊治提供相关参考依据。

### 参考文献

- [1] Ji-Su Park, Duk-Hyun An, Dong-Hwan Oh, et al. Effect of chin tuck against resistance exercise on patients with dysphagia following stroke: A randomized pilot study[J]. *NeuroRehabilitation*, 2018, 42(2): 191-197.
- [2] 赵佳,李克娇,李美荣. 低频电脉冲刺激结合针刺治疗对急性脑梗死后痉挛型构音障碍的临床观察[J]. *热带医学杂志*, 2015, 15(10): 1366-1369.
- [3] 欧阳瑶,朱其秀,阎文静,等. 高频重复经颅磁刺激对单侧大脑半球卒中后患者吞咽障碍的影响[J]. *中华物理医学与康复杂志*, 2019, 41(4): 261-265.
- [4] Julie Layly, Franck Marmouset, Guillaume Chassagnon, et al. Can We Reduce Frame Rate to 15 Images per Second in Pediatric Videofluoroscopic Swallow Studies[J]. *Dysphagia*, 2019, 34(200-205): 1-5.
- [5] 卒中患者吞咽障碍和营养管理中国专家组. 卒中患者吞咽障碍和营养管理的中国专家共识(2013版)[J]. *中国卒中杂志*, 2013, 8(12): 973-983.
- [6] 王玉龙. 康复功能评定学[M]. 3版. 北京: 人民卫生出版社, 2018: 513.
- [7] Yvonne Teuschl, Michaela Trapl, Paulina Ratajczak, et al. Systematic dysphagia screening and dietary modifications to reduce stroke-associated pneumonia rates in a stroke-unit[J]. *Plos One*, 2018, 13(2): e0192142.
- [8] 温泽迎,张海宇,冯博,等. 基于视频透视吞咽功能研究评价针刺阿仑组穴联合康复训练治疗脑卒中后吞咽障碍的疗效分析[J]. *安徽中医药大学学报*, 2019, 38(3): 54-57.
- [9] 卢建丽,韩振萍,马将,等. 醒脑开窍针刺法联合功能训练治疗脑卒中后吞咽困难的疗效及对日常生活能力的影响[J]. *针灸临床杂志*, 2019, 35(9): 23-26.
- [10] Choi GS, Kwak SG, Lee HD, et al. Effect of high-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation on chronic central pain after mild traumatic brain injury: A pilot study[J]. *J Rehabil Med*, 2018, 50(3): 246-252.
- [11] 江航,陈勃娇,余浩,等. 经颅磁刺激在脑卒中后康复中的应用进展[J]. *临床与病理杂志*, 2018, 38(6): 1344-1350.
- [12] 窦祖林,兰月,于帆,等. 吞咽造影数字化分析在脑干卒中后吞咽障碍患者疗效评估中的应用[J]. *中国康复医学杂志*, 2013, 28(9): 799-805.
- [13] Yue L, Xu GQ, Zu LD, et al. The Correlation Between Manometric and Videofluoroscopic Measurements of the Swallowing Function in Brainstem Stroke Patients With Dysphagia[J]. *J Clin Gastroenterol*, 2015, 49(1): 24-30.
- [14] Sonja Suntrup-Krueger, Jens Minnerup, Paul Muhle, et al. The Effect of Improved Dysphagia Care on Outcome in Patients with Acute Stroke: Trends from 8-Year Data of a Large Stroke Register[J]. *Cerebrovasc Dis*, 2018, 45(3-4): 101-108.
- [15] 温泽迎,张海宇. 荧光吞咽造影定量分析在针刺联合康复训练治疗脑卒中后吞咽障碍疗效观察中的应用研究[J]. *中国临床医学影像杂志*, 2019, 30(8): 533-536.

(上接第646页)

- [6] 滕卫平,曾正陪. 中国甲状腺疾病诊治指南[M]. 中华医学会内分泌学分会, 2008, 4: 53.
- [7] 袁静萍,阎红琳,高利昆,等. 甲状腺疾病快速取材及诊断的规范化管理[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2018, 34(2): 221-223.
- [8] Silva TH, Peres WAF, Rosa KSDC, et al. Advanced Stage of Disease and Systemic Inflammation as Factors Associated With Referral of Patients With Colorectal Cancer to a Palliative Care Unit[J]. *Am J Hosp Palliat Care*, 2020, 1(2010): 1049909120902789.
- [9] 温琥玲,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.
- [10] Kutluturk F, Gul SS, Sahin S, et al. Comparison of Mean Platelet Volume, Platelet Count, Neutrophil/Lymphocyte Ratio and Platelet/Lymphocyte Ratio in the Euthyroid, Overt Hypothyroid and Subclinical Hyperthyroid Phases of Papillary Thyroid Carcinoma[J]. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 2019, 19(6): 859-865.
- [11] Bulent G, Fatih K, Gulname F, et al. The effect of Hashimoto's thyroiditis on platelets in terms of the their number, size, and distribution[J]. *Dicle Med J*, 2019, 46(2): 277-281.
- [12] 张腾,胡厚洋,柏庆花,等. 慢性淋巴细胞性甲状腺炎对分化型甲状腺癌放射性碘清甲治疗效果的影响[J]. *中国癌症杂志*, 2018, 28(6): 419-423.
- [13] 吴文波,张凤梅. 补硒对自身免疫性甲状腺炎患者甲状腺抗体及T淋巴细胞亚群的影响[J]. *山东医药*, 2017, 57(13): 78-80.

## miR-93-5p对心脏成纤维细胞纤维化的影响

张伟峰\* 雷素扬 赵俊涛

**[摘要]** **目的** miR-93-5p是心肌梗死中新发现的差异微小RNA(miRNA),探索其在心脏成纤维细胞中的功能机制。**方法** 用差速贴壁法分离心肌梗死小鼠心脏成纤维细胞和心肌细胞;脂质体法将miR-NC组(转染miR-NC)、miR-93-5p mimic组(转染miR-93-5p mimic)、inhibitor-NC组(转染inhibitor-NC)、miR-93-5p inhibitor组(转染miR-93-5p inhibitor)、pcDNA组(转染pcDNA)、pcDNA-弗林蛋白酶(Furin)组(转染pcDNA-Furin)、si-NC组(转染si-NC)、si-Furin组(转染si-Furin)、miR-93-5p mimic+pcDNA组载体(共转染miR-93-5p mimic和pcDNA)、miR-93-5p mimic+pcDNA-Furin组(共转染miR-93-5p mimic和pcDNA-Furin)转染至分离的成纤维细胞。实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(qRT-PCR)、免疫印迹(Western blot)检测细胞中miR-93-5p、Furin、胶原蛋白I(Collagen I)、胶原蛋白III(Collagen III)、成纤维细胞基质金属蛋白酶抑制物-2蛋白(TIM P2)、纤维连接蛋白(Fibronectin)的表达;双荧光素酶报告基因检测实验检测细胞的荧光活性。**结果** 心肌梗死小鼠心脏成纤维细胞与心肌细胞相比,miR-93-5p、Furin的表达均显著升高( $P<0.05$ )。过表达miR-93-5p、敲减Furin能明显抑制成纤维细胞中Collagen I、Collagen III、TIM P2、Fibronectin的表达,而抑制miR-93-5p、过表达Furin则具有相反的作用。miR-93-5p直接抑制野生型Furin细胞的荧光素酶活性,并且过表达Furin还可部分逆转miR-93-5p对心脏成纤维细胞的纤维化调控。**结论** miR-93-5p可抑制心肌梗死心脏成纤维细胞的纤维化,其机制与靶向Furin有关。

**[关键词]** miR-93-5p; Furin; 心肌梗死; 成纤维细胞纤维化

### Effects of miR-93-5p on fibrosis of cardiac fibroblasts

ZHANG Weifeng\*, LEI Suyang, ZHAO Juntao

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

**[ABSTRACT]** **Objective** To explore the molecular function of miR-93-5p in cardiac fibroblasts. **Methods** The cardiac fibroblasts and cardiomyocytes of myocardial infarction mice were isolated by differential adherence method. The miR-NC group (transfected miR-NC), miR-93-5p mimic group (transfected miR-93-5p mimic), inhibitor-NC group (transfected inhibitor-NC), miR-93-5p inhibitor group (transfected miR-93-5p inhibitor), pcDNA group (transfected pcDNA), pcDNA-Furin group (transfected pcDNA-Furin), si-NC group (transfected si-NC), si-Furin group (transfected si-Furin), miR-93-5p mimic + pcDNA group vector (co-transfected miR-93-5p mimic and pcDNA), miR-93-5p mimic + pcDNA-Furin group (co-transfected miR-93-5p mimic and pcDNA-Furin) were transfected into isolated fibroblasts. qRT-PCR and Western blot were used to detect the expression of miR-93-5p, Furin, Collagen I, Collagen III, TIMP2, and Fibronectin in the cells. Dual luciferase reporter assay was used to detect the fluorescence activity of the cells. **Results** The expression of miR-93-5p and Furin was significantly higher in cardiac fibroblasts than in cardiomyocytes ( $P<0.05$ ). Overexpression of miR-93-5p and knockdown of Furin significantly inhibited the expression of Collagen I, Collagen III, TIMP2, and Fibronectin in cardiac fibroblasts, while inhibition of miR-93-5p and overex-

基金项目:河南省医学科技攻关计划项目(2018063215)

作者单位:郑州市第七人民医院心外科,河南,郑州 450000

\*通信作者:张伟峰, E-mail:15838034977@163.com

pression of Furin had opposite effects. miR-93-5p directly inhibits the luciferase activity of wild-type Furin cells, and overexpression of Furin can also partially reverse the fibrosis of cardiac fibroblasts by miR-93-5p.

**Conclusions** miR-93-5p can inhibit fibrosis of cardiac fibroblasts in myocardial infarction, and its mechanism is related to targeting Furin.

[KEY WORDS] miR-93-5p; Furin; Myocardial infarction; Fibroblast fibrosis

心肌梗死(myocardial infarction, MI)是一种危害人类健康的重要心血管疾病,被称为发达国家的“头号杀手”<sup>[1]</sup>。随着发展中国家的经济发展,这种疾病也呈现逐年升高的趋势。尽管近年来在治疗方面取得了进展,但心肌梗死患者随后发生缺血和死亡的风险仍在增加。因此,开发一种新的高效治疗方案具有重要意义。miRNA,一种长度仅在18~22个核苷酸的内源性,高度保守的微小分子,其通过沉默靶基因的转录和翻译过程在人类多种疾病中发挥调控作用<sup>[2-3]</sup>。且miRNA也参与了机体多个器官如心脏、肺脏、肾脏、肝脏、皮肤的纤维化过程<sup>[4]</sup>。miR-93-5p是近2年在心肌梗死中新发现的失调miRNA之一<sup>[5]</sup>,其在心肌梗死中的功能及机制尚未十分清楚。弗林蛋白酶(Furin)是一种高度特异性的丝氨酸内切蛋白酶,属于前蛋白转化酶(proprotein convertases, PC)家族,其在心脏的发育、生长及结构重塑中具有重要作用<sup>[6-7]</sup>。我们推测miR-93-5p与Furin在心肌梗死过程中的成纤维细胞纤维化中具有联系。本研究旨在探讨miR-93-5p调控心脏成纤维细胞纤维化的功能机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

心肌梗死模型小鼠购自上海百致生物医药科技有限公司;杜氏培养基(dulbecco's modified eagle medium, DMEM)购自Gibco公司;pcDNA3.1-EGFP载体购自上海振誉生物科技有限公司;pmir-GLO载体购自上海钰博生物科技有限公司;实时荧光定量逆转录聚合酶链免疫反应(Real-time fluorescent quantitative reverse transcription polymerase chain immune reaction, qRT-PCR)试剂盒和反转录试剂盒均购自日本TaKaRa;双荧光素酶报告基因检测试剂盒购自Promega;电化学发光(electronics components laboratory, ECL)试剂盒购自北京普利莱基因技术有限公司。实验中涉及的引物及序列均有上海吉玛公司合成。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞的分离、培养和处理

使用开胸法无菌摘取小鼠心脏,去除结缔组织,用胰酶消化,收集细胞悬液。用新鲜含有10%胎牛血清的DMEM培养基培养,再使用差速贴壁法将细胞在培养箱中培养2 h。其中贴壁细胞为心肌成纤维细胞,未贴壁的细胞为心肌细胞。将细胞常规培养至3~4代后用于后续实验。将心肌成纤维细胞标记为CF组,心肌细胞标记为CM组。使用脂质体对CF细胞进行处理,具体的处理方法为:取3~4倍的质粒或DNA量的脂质体进行转染,miR-NC组(转染miR-NC)、miR-93-5p mimic组(转染miR-93-5p mimic)、inhibitor-NC组(转染inhibitor-NC)、miR-93-5p inhibitor组(转染miR-93-5p inhibitor)、pcDNA组(转染pcDNA)、pcDNA-Furin组(转染pcDNA-Furin)、si-NC组(转染si-NC)、si-Furin组(转染si-Furin)、miR-93-5p mimic+pcDNA组载体(共转染miR-93-5p mimic和pcDNA)、miR-93-5p mimic+pcDNA-Furin组(共转染miR-93-5p mimic和pcDNA-Furin),将其转染8 h后,弃去培养基,用新培养基再培养48 h,用qRT-PCR验证转染是否成功,将转染成功的细胞用于后续试验。若转染不理想,需要调整转染条件,更换质粒,进行重新转染,直至转染成功,才可用于后续实验。

#### 1.2.2 qRT-PCR检测细胞中miR-93-5p、Furin的表达

详细步骤参考文献<sup>[6]</sup>,miR-93-5p、Furin以U6、GAPDH为内参, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算miR-93-5p、Furin的相对表达。引物信息(5'-3'):miR-93-5p,上游引物GCCATGTAAACATCTCGGACTG,下游引物CAATGCGTGTGGTGGAGGAG;U6,上游引物GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT,下游引物CGCTTCAGAATTTGCGTGTTCAT;Furin上游引物CCAGAGCGCCCTTTGAAA,下游引物CCAGTCGCAAGATAAAAAATACTTTG;GAPDH,上游引物GAAGGTGAAGGTCGGAGTCAACG,下游引

物 TGCCATGGGTGGAATCATATTGG; PCR 条件: 95℃ 15 min, 94℃ 15 s, 55℃ 30 s, 70℃ 30 s, 共 40 个循环。

### 1.2.3 Western blot 检测细胞中 Furin、Collagen I、Collagen III、TIMP2、Fibronectin 的蛋白表达

用 0.25 % 胰酶消化、收集细胞, 用蛋白裂解液充分将其裂解。然后进行总蛋白的提取, 定量和变性。用变性后的蛋白上清液进行蛋白电泳上样, 结束后将蛋白从胶上转移至 PVDF 膜。然后将膜进行倍比稀释的相应一抗 (1:500~1 500) 溶液中孵育过夜 (4℃)。取出膜, 将其浸入相应倍稀释的二抗 (1:1 000) 溶液中孵育 2 h (37℃)。最后, 用 ECL 显色液进行显影、曝光, 将图片用 Quantity One 4.62 软件进行分析, 用目的条带灰度值与内参条带灰度值的比值表示蛋白的表达。

### 1.2.4 双荧光素酶报告基因检测实验检测细胞的荧光活性

构建包含 miR-93-5p 结合位点的 Furin 野生型和突变型荧光素酶表达载体 WT-Furin、MUT-Furin, 将其分别与 miR-NC、miR-506-3p 共转染至 CF 细胞, 转染 48 h, 按照双荧光素酶报告基因试剂盒说明检测荧光素酶活性。

### 1.2.5 统计学处理

用 SPSS 20.0 软件进行数据分析, 计量资料以 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 两组比较采用独立样本 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析,  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 miR-93-5p、Furin 在心肌成纤维细胞中的差异表达

运用 qRT-PCR 和 Western blot 检测 CM、CF 细胞中 miR-93-5p、Furin 的表达情况。与 CM 组相比, CF 组细胞中 miR-93-5p mRNA 表达显著升高, Furin 的 mRNA 和蛋白表达均显著升高 ( $P < 0.05$ )。见表 1。

表 1 miR-93-5p、Furin 在心肌成纤维细胞中的差异表达 ( $\bar{x} \pm s$ )  
Table 1 Differential expression of mir-93-5p and furin in cardiac fibroblasts ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	miR-93-5p mRNA	Furin mRNA	Furin 蛋白
CM 组	1.01±0.06	1.00±0.08	0.99±0.07
CF 组	1.28±0.11	2.54±0.15	1.53±0.11
<i>t</i> 值	6.464	27.176	12.424
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000

### 2.2 miR-93-5p 对成纤维细胞纤维化的影响

与 miR-NC 组相比, miR-93-5p mimic 组心肌成纤维细胞中 miR-93-5p mRNA 表达显著升高, Collagen I、Collagen III、TIMP2、Fibronectin 的蛋白表达均显著降低; 与 inhibitor-NC 组相比, miR-93-5p inhibitor 组心肌成纤维细胞中 miR-93-5p mRNA 表达显著降低, Collagen I、Collagen III、TIMP2、Fibronectin 的蛋白表达均显著升高 ( $P < 0.05$ )。见表 2。

表 2 miR-93-5p 调控成纤维细胞纤维化相关蛋白的表达 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 miR-93-5p regulates the expression of fibrosis related proteins in fibroblasts ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	miR-93-5p mRNA	蛋白			
		Collagen I	Collagen III	TIMP2	Fibronectin
miR-NC 组	1.02±0.07	0.99±0.08	1.02±0.08	1.01±0.09	1.00±0.08
miR-93-5p mimic 组	2.94±0.16 <sup>a</sup>	0.67±0.05 <sup>a</sup>	0.77±0.06 <sup>a</sup>	0.52±0.04 <sup>a</sup>	0.42±0.03 <sup>a</sup>
inhibitor-NC 组	0.97±0.06	0.96±0.07	0.98±0.07	0.96±0.05	0.99±0.08
miR-93-5p inhibitor 组	0.20±0.12 <sup>b</sup>	1.68±0.14 <sup>b</sup>	1.37±0.12 <sup>b</sup>	1.67±0.13 <sup>b</sup>	1.71±0.13 <sup>b</sup>
<i>F</i> 值	681.816	197.784	76.054	278.185	320.894
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注: 与 miR-NC 组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与 inhibitor-NC 组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ 。

### 2.3 miR-93-5p 靶向 Furin

通过 Stabase 2 软件预测到 Furin 可能是 miR-93-5p 的靶基因 (图 1A); 双荧光素酶实验结果见表 3, miR-93-5p mimic 组相较于 miR-NC 组可显著降低 Furin-WT 细胞的荧光素酶活性, miR-93-5p inhib-

itor 组相较于 inhibitor-NC 组可显著升高 Furin-WT 细胞的荧光素酶活性; Western blot 检测显示, miR-93-5p mimic 组相较于 miR-NC 组 Furin 蛋白表达显著降低, miR-93-5p inhibitor 组相较于 inhibitor-NC 组 Furin 蛋白表达显著升高 ( $P < 0.05$ ), 见表 3 和图 1B。



图1 miR-93-5p 靶向调控 Furin  
Figure 1 miR-93-5p targeting furin

### 2.4 Furin 对成纤维细胞纤维化的影响

与 pcDNA 组相比, pcDNA-Furin 组细胞中 Furin mRNA 和蛋白表达均显著升高, Collagen I、Collagen III、TIMP2、Fibronectin 的蛋白表达均显著升高; 与 si-NC 组相比, si-Furin 组细胞中 Furin mRNA 和蛋白表达均显著降低, Collagen I、Colla-

表3 miR-93-5p 靶向 Furin ( $\bar{x} \pm s$ )  
Table 3 miR-93-5p targeting furin ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	荧光活性		Furin 蛋白
	Furin-WT	Furin-MUT	
miR-NC 组	0.99±0.08	1.00±0.06	1.00±0.08
miR-93-5p mimic 组	0.27±0.02 <sup>a</sup>	0.98±0.09 <sup>a</sup>	0.68±0.06 <sup>a</sup>
inhibitor-NC 组	0.99±0.06	0.97±0.08	0.97±0.07
miR-93-5p inhibitor 组	1.77±0.12 <sup>b</sup>	1.02±0.10 <sup>b</sup>	1.49±0.12 <sup>b</sup>
F 值	517.655	0.629	138.634
P 值	0.000	0.601	0.000

注: 与 miR-NC 组比较, <sup>a</sup>P<0.05; 与 inhibitor-NC 组比较, <sup>b</sup>P<0.05。

gen III、TIMP2、Fibronectin 的蛋白表达均显著降低 (P<0.05)。见表4。

表4 Furin 对成纤维细胞纤维化的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )  
Table 4 Effect of furin on fibroblast fibrosis ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	Furin mRNA	蛋白				
		Furin	Collagen I	Collagen III	TIMP2	Fibronectin
pcDNA 组	1.00±0.05	1.02±0.09	1.01±0.08	1.00±0.08	1.02±0.09	0.97±0.09
pcDNA-Furin 组	1.95±0.12 <sup>a</sup>	1.64±0.09 <sup>a</sup>	1.82±0.15 <sup>a</sup>	1.49±0.13 <sup>a</sup>	1.55±0.12 <sup>a</sup>	1.44±0.12 <sup>a</sup>
si-NC 组	0.99±0.06	0.96±0.07	0.99±0.09	0.99±0.08	1.01±0.07	0.99±0.08
si-Furin 组	0.32±0.03 <sup>b</sup>	0.72±0.06 <sup>b</sup>	0.67±0.06 <sup>b</sup>	0.70±0.06 <sup>b</sup>	0.68±0.05 <sup>b</sup>	0.52±0.04 <sup>b</sup>
F 值	755.943	224.016	213.243	116.072	155.919	166.583
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注: 与 pcDNA 组比较, <sup>a</sup>P<0.05; 与 si-NC 组比较, <sup>b</sup>P<0.05。

### 2.5 Furin 回复 miR-93-5p 对成纤维细胞纤维化的调控作用

与 miR-93-5p mimic+pcDNA 组相比, miR-93-

5p mimic+pcDNA-Furin 组细胞中 miR-93-5p mRNA 表达显著降低, Collagen I、Collagen III、TIMP2、Fibronectin 的蛋白表达均显著升高 (P<0.05)。见表5。

表5 Furin 回复 miR-93-5p 对成纤维细胞纤维化的调控作用 ( $\bar{x} \pm s$ )  
Table 5 Regulatory effect of furin on fibroblast fibrosis by recovering miR-93-5p ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	miR-93-5p mRNA	蛋白			
		Collagen I	Collagen III	TIMP2	Fibronectin
miR-93-5p mimic 组	1.02±0.08	0.99±0.08	1.00±0.08	0.98±0.08	1.01±0.08
miR-93-5p mimic+pcDNA 组	0.99±0.09	1.02±0.09	0.98±0.09	1.00±0.07	0.97±0.08
miR-93-5p mimic+pcDNA-Furin 组	0.76±0.06 <sup>a</sup>	1.23±0.10 <sup>a</sup>	1.31±0.11 <sup>a</sup>	1.43±0.09 <sup>a</sup>	1.52±0.10 <sup>a</sup>
F 值	30.182	18.844	34.748	89.953	111.355
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注: 与 miR-93-5p+pcDNA 组比较, <sup>a</sup>P<0.05。

## 3 讨论

miRNAs 在心肌梗死的发生、发展过程中起着关键的作用<sup>[8]</sup>, 但是 miR-93-5p 在心肌梗死中的功能仍有待进一步开发。Liu 等<sup>[9]</sup>在研究中发现, 包

含 miR-93-5p 的脂肪间充质干细胞 (adipose-derived stromal cells, ADSC) 外泌体能够显著的增强单纯使用 ADSC 对急性心肌梗死大鼠的心肌治疗作用, 并且这种机制与 miR-93-5p 可分别通过靶向自噬相关基因 (recombinant autophagy related protein

7, Atg7)和Toll样受体4(toll like receptor, TLR4)来抑制缺氧诱导的自噬和炎性细胞因子的分泌相关。Li等<sup>[10]</sup>报道, miR-93在冠状动脉疾病(coronary artery disease, CAD)患者血液中升高,但其可抑制心肌细胞凋亡,保护心肌细胞免受缺血再灌注的损伤,但在抑制miR-93的小鼠模型中,能够加速心脏重塑的恶化。Zhong等<sup>[11]</sup>在急性心肌梗死组织的差异miRNA分析中报道,miR-93-5p的表达异常升高。

Furin是一种分泌型前蛋白转化酶,可通过在一个或多个内部位点进行有限的蛋白水解,将前体蛋白激活为生物活性形式<sup>[12]</sup>。其参与多种蛋白质前体的成熟,包括生长因子、跨膜受体、内分泌激素和粘附分子<sup>[13]</sup>。Furin的多种潜在底物与心脏分化和发育的不同方面有关,例如,骨形态发生蛋白4抗体(bone morphogenetic protein 4, Bmp4)对于流出道(outflow tract, OFT)和房室(atrioventricular, AV)分隔是必需的,并受Furin影响<sup>[14]</sup>。此外,携带突变的小鼠破坏了proBmp4对Bmp4的有序分裂,表现出发育异常,包括心血管缺陷<sup>[15]</sup>。王珏等<sup>[16]</sup>报道,在心脏成纤维细胞中,Furin作为miR-24的靶标,参与小鼠心脏成纤维细胞的胶原合成、增殖、迁移过程。本实验发现,Furin在大鼠心脏成纤维细胞中表达上调,并且下调Furin能够抑制心脏成纤维细胞中纤维化相关蛋白Collagen I、Collagen III、TIMP2、Fibronectin的表达,而上调Furin则具有相反的作用。这些实验结果均与上述前人的研究结果相吻合。miR-93-5p和Furin在心肌梗死成纤维细胞中的表达虽都为上调,但是二者发挥的功能是相反的,这可能与机体在疾病发展的不同阶段具有不同的生理病理学特性有联系,发生这种作用的机制可能还与其他因素(miRNA的调控网络)相关,这有待进一步的深入研究。

综上所述,miR-93-5p具有抑制心脏成纤维细胞纤维化的作用,其机制与靶向抑制Furin有关,为心肌梗死的治疗提供新靶点。

## 参考文献

- [1] Li M, Yuan Y, Guo K, et al. Value of galectin-3 in acute myocardial infarction[J]. *Am J Cardiovasc Drugs*, 2019, 30(11): 1-10.
- [2] Rupaimoole R, Slack FJ. MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2017, 16(3): 203-222.
- [3] Bu D, Su Z, Meng M, et al. Integrative analysis of expression profiles of microRNAs and mRNAs in treatment of acute myocardial infarction with compound longmaining decoction[J]. *Med Sci Monit*, 2019, 25(11): 9028-9041.
- [4] 张媛. 微小RNA与器官纤维化研究进展[J]. *热带医学杂志*, 2011, 11(8): 992-995.
- [5] Dupays L, Towers N, Wood S, et al. Furin, a transcriptional target of NKX2-5, has an essential role in heart development and function[J]. *PLoS One*, 2019, 14(3): e0212992.
- [6] Chen Z, Lu S, Xu M, et al. Role of miR-24, furin, and transforming growth factor- $\beta$ 1 signal pathway in fibrosis after cardiac infarction[J]. *Med Sci Monit*, 2017, 23(1): 65-70.
- [7] Tachida Y, Suda K, Nagase H, et al. Secreted factors from adipose tissue-derived mesenchymal stem cells suppress oxygen/glucose deprivation-induced cardiomyocyte cell death via furin/PCSK-like enzyme activity[J]. *Biochem Biophys Res*, 2016, 7(7): 266-272.
- [8] 王静, 卢忠心. microRNAs与心肌梗死[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2014, 6(5): 348-351.
- [9] Liu J, Jiang M, Deng S, et al. miR-93-5p-containing exosomes treatment attenuates acute myocardial infarction-induced myocardial damage[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2018, 11(6): 103-115.
- [10] Li K, Lin T, Chen L, et al. MicroRNA-93 elevation after myocardial infarction is cardiac protective[J]. *Med Hypotheses*, 2017, 106(9): 23-25.
- [11] Zhong Z, Wu H, Zhong W, et al. Expression profiling and bioinformatics analysis of circulating microRNAs in patients with acute myocardial infarction[J]. *J Clin Lab Anal*, 2019, 12(11): e23099.
- [12] 张友义, 刘伟娜, 赵慧娜, 等. Furin的生物学功能[J]. *生命的化学*, 2019, 39(2): 147-153.
- [13] Bessonard S, Mesnard D, Constam DB. PC7 and the related proteases Furin and Pace4 regulate E-cadherin function during blastocyst formation[J]. *J Cell Biol*, 2015, 210(7): 1185-1197.
- [14] Chang HM, Cheng JC, Klausen C, et al. Recombinant BMP4 and BMP7 increase activin A production by up-regulating inhibin  $\beta$ A subunit and furin expression in human granulosa-lutein cells[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2015, 100(3): 375-386.
- [15] Ide S, Finer G, Maezawa Y, et al. Transcription factor 21 is required for branching morphogenesis and regulates the gdnf-axis in kidney development[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2018, 29(12): 2795-2808.
- [16] 王珏. MicroRNA-24调控心肌梗死后纤维化过程的实验研究[D]. 北京协和医学院, 北京, 2012.

· 论 著 ·

## BAP1、Ki-67表达与老年肺腺癌患者肿瘤侵袭及预后的关系

安晓颖<sup>1</sup> 李晓霞<sup>1</sup> 陈宁<sup>1</sup> 邱红芹<sup>1</sup> 朱桂云<sup>1</sup> 张彦坤<sup>2\*</sup>

**【摘要】目的** 探究乳腺癌1号基因相关蛋白1(BAP1)、Ki-67表达与老年肺腺癌(LAC)患者肿瘤侵袭及预后的关系。**方法** 选取本院2018年1月至2019年2月296例老年LAC患者作为研究组,另选取同期292例良性肺部肿瘤患者作为对照组。检测对比两组BAP1、Ki-67表达情况,探究BAP1、Ki-67与老年LAC发生及肿瘤侵袭的关系,并对研究组不同预后患者BAP1、Ki-67表达情况,采用卡普兰-迈耶(KM)曲线进行生存分析。**结果** 研究组BAP1阳性表达率低于对照组,Ki-67阳性表达率高于对照组( $P<0.05$ );老年LAC发生与BAP1、Ki-67表达情况密切相关( $P<0.05$ );BAP1及Ki-67均与老年LAC患者TNM分期、淋巴结转移、胸膜侵犯显著相关,且Ki-67与患者分化程度显著相关( $P<0.05$ );随访1年,研究组死亡者BAP1阳性表达率低于生存者,Ki-67阳性表达率高于生存者( $P<0.05$ );BAP1阳性表达者1年生存率高于阴性表达者,Ki-67阳性表达1年生存率低于阴性表达者( $P<0.05$ )。**结论** 老年LAC患者BAP1阳性表达率显著降低,Ki-67阳性表达率异常升高,与LAC的发生及肿瘤侵袭存在密切相关性,且在预测患者1年生存率方面具有一定价值,可为临床评估肿瘤侵袭及预后提供循证支持。

**【关键词】** 肺腺癌;乳腺癌1号基因相关蛋白1;Ki-67;肿瘤侵袭;生存分析

### Relationship between BAP1、Ki - 67 expression and tumor invasion and prognosis in elderly patients with lung adenocarcinoma

AN Xiaoying<sup>1</sup>, LI Xiaoxia<sup>1</sup>, CHEN Ning<sup>1</sup>, DI Hongqin<sup>1</sup>, ZHU Guiyun<sup>1</sup>, ZHANG Yankun<sup>2\*</sup>

(1. Laboratory of molecular biology, hebei provincial chest hospital, Shijiazhuang, Hebei, China, 050041;

2. Department of ophthalmology, hebei provincial chest hospital, Shijiazhuang, Hebei, China, 050041)

**【ABSTRACT】Objective** To explore the relationship between breast cancer gene 1-associated protein-1 (BAP1) and Ki - 67 expression and tumor invasion and prognosis in elderly patients with lung adenocarcinoma (LAC). **Methods** 296 elderly patients with LAC from January 2018 to February 2019 were enrolled as the study group, and 292 patients with benign lung tumors during the same period were recruited as the control group. The expression of BAP1 and Ki - 67 were measured and compared in two groups. The relationship between BAP1, Ki-67 and the occurrence of LAC and tumor invasion in the elderly was analyzed. the expressions of BAP1 and Ki-67 in patients with different prognosis in the study group were compared, and Kaplan-Meier (KM) curves were used for survival analysis. **Results** The positive expression rate of BAP1 in the study group was lower than that in the control group, and the positive expression rate of Ki-67 was higher than that in the control group ( $P<0.05$ ). The occurrence of LAC in the elderly is closely related to the expression of BAP1 and Ki-67 ( $P<0.05$ ). Both BAP1 and Ki-67 were significantly associated with TNM stage,

基金项目:河北省2018年度医学科学研究重点课题计划(20180678)

作者单位:1.河北省胸科医院分子生物学实验室,河北,石家庄050041

2.河北省胸科医院眼科,河北,石家庄050041

\*通信作者:张彦坤, E-mail:928246030@qq.com

lymph node metastasis, and pleural invasion in elderly LAC patients, and Ki-67 was significantly associated with the degree of patient differentiation ( $P < 0.05$ ). After 1 year of follow-up, the death rate of *BAP1* in the study group was lower than that of survivors, and the positive rate of Ki-67 was higher than that of survivors ( $P < 0.05$ ). The one-year survival rate of *BAP1* positive expression was higher than that of negative expression, and the one-year survival rate of Ki-67 positive expression was lower than that of negative expression ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The expression rate of *BAP1* in elderly LAC patients is significantly reduced, and the rate of Ki-67 expression is increased, which is closely related to the occurrence of LAC and tumor invasion. It has certain value in predicting the one-year survival rate of patients, and can provide evidence-based support for clinical evaluation of tumor invasion and prognosis.

[KEY WORDS] Lung adenocarcinoma; Breast cancer gene 1-associated protein-1; Ki-67; Tumor invasion; Survival analysis

肺腺癌(Lung adenocarcinoma, LAC)是一种非小细胞肺癌,多起源于支气管粘膜上皮,多发于老年群体,且发病率随着人口老龄化增加逐渐升高<sup>[1]</sup>。LAC的早期诊断对患者预后改善具有重要意义,但患者发病早期缺乏典型症状,其诊断及治疗仍缺乏较为准确的评估标准<sup>[2]</sup>。近年来研究发现, Ki67是一种细胞增殖状态的重要标记物,在多种恶性肿瘤患者体内呈异常高表达,有助于恶性肿瘤的早期诊断和病情评估<sup>[3-4]</sup>。此外,乳腺癌1号基因相关蛋白1(Breast cancer gene 1-associated protein-1, *BAP1*)属于直接与遗传性乳腺癌有关的抑制基因。研究指出,*BAP1*基因的突变有数百种之多,与人体其他多种癌症都有密切关系<sup>[5-6]</sup>。但关于两者在肺腺癌诊断中的价值鲜有报道。基于此,本研究尝试分析*BAP1*、Ki-67表达与老年LAC患者肿瘤侵袭及预后的关系,旨在为临床诊断LAC提供参考。报告如下。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选取本院2018年1月至2019年2月296例老年LAC患者作为研究组,其中男114例,女182例;年龄60~82岁,平均(67.45±3.72)岁;体质量46~80 kg,平均(63.57±8.21)kg;居住地:187例城市,109例农村。另选取同期292例良性肺部肿瘤患者作为对照组,其中男105例,女187例;年龄60~80岁,平均(66.63±3.31)岁;体质量48~83 kg,平均(64.85±8.42)kg;居住地:179例城市,113例农村。对比两组年龄、性别、体质量、居住地,差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),具可比性。

纳入标准:①符合LAC诊断标准<sup>[7]</sup>,并经术后病理诊断确诊;②年龄≥60岁;③检测前未接

受相关治疗;④无沟通交流障碍;⑤均行手术治疗;⑥患者及家属知晓本研究,已签署同意书。排除标准:①合并其他恶性肿瘤者;②血液系统疾病患者;③严重感染性疾病患者;④心脑肝肾功能严重障碍者;⑤传染性疾病患者;⑥精神疾病患者。

### 1.2 方法

取所有研究对象术后肺组织标本,由专业检测师采用免疫组织化学法测定*BAP1*、Ki-67阳性表达率,具体操作:常规行固定、脱水、石蜡包埋处理,4~6 μm连续切片后脱蜡、脱水、抗原修复,羊血清封闭10 min后滴入一抗,于4℃下保存、过夜,采用聚丁二酸丁二醇酯缓冲液代替一抗作为阴性对照,PBS缓冲液洗涤3次后加入二抗,常温下静置10 min,再次以PBS缓冲液洗涤3次,加入二氨基联苯胺显色液显色,采用苏木素复染后封片。高倍显微镜下观察,每张切片随机选取5~10个高倍视野,每个视野计数100个瘤细胞,计数阳性细胞百分比。按着色细胞百分比分级,<10%为阴性(-),≥10%为阳(+).

### 1.3 观察指标

①两组*BAP1*、Ki-67表达情况。②探究*BAP1*、Ki-67与老年LAC发生的关系。③探究*BAP1*、Ki-67与老年LAC患者肿瘤侵袭的关系。④随访1年,统计研究组预后情况,对比不同预后患者*BAP1*、Ki-67表达情况。⑤采用卡普兰-迈耶曲线分析不同*BAP1*、Ki-67表达情况老年LAC患者的生存情况。

### 1.4 统计学方法

数据处理采用SPSS 22.0软件,计数资料以 $n$ (%)表示、采用 $\chi^2$ 检验,采用KM曲线分析生存情况, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 两组 BAP1、Ki-67 表达情况

研究组 BAP1 阳性表达率低于对照组, Ki-67 阳性表达率高于对照组 ( $P < 0.05$ ), 见表 1。

表 1 两组 BAP1、Ki-67 表达情况比较 [ $n(\%)$ ]

Table 1 Comparison of BAP1、Ki-67 expression between the two groups [ $n(\%)$ ]

组别	<i>n</i>	BAP1 阳性表达率	Ki-67 阳性表达率
研究组	296	85(28.72)	133(44.93)
对照组	292	260(89.04)	56(19.18)
$\chi^2$ 值		220.607	44.701
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001

### 2.2 BAP1、Ki-67 与老年 LAC 发生的关系

Logistic 回归分析发现, BAP1、Ki-67 与老年 LAC 发生显著相关 ( $P < 0.05$ ), 见表 2。

### 2.3 BAP1 与肿瘤侵袭相关性

BAP1、Ki-67 与老年 LAC 患者年龄、性别、肿瘤直径、大体类型、分化程度无明显相关性 ( $P > 0.05$ ); BAP1 与老年 LAC 患者 TNM 分期、淋巴结转移、胸膜侵犯显著相关 ( $P < 0.05$ ), 见表 3。

### 2.4 研究组不同预后患者 BAP1、Ki-67 阳性表达率

随访 1 年, 失访 8 例(其中 BAP1 阳性表达者 3 例, Ki-67 阳性表达者 2 例)。根据预后情况分为生存者、死亡者。死亡者 BAP1 阳性表达率较生存

表 2 BAP1、Ki-67 与老年 LAC 发生的关系

Table 2 Relationship between BAP1、Ki-67 and LAC in old age

变量	$\beta$ 值	S.E 值	Wald/ $\chi^2$ 值	OR 值	95%CI	<i>P</i> 值
BAP1	-0.704	0.220	10.251	0.494	0.271~0.902	<0.001
Ki-67	1.725	0.476	13.129	5.611	3.146~10.008	<0.001

表 3 BAP1、Ki-67 与肿瘤侵袭相关性 [ $n(\%)$ ]

Table 3 Correlation between BAP1 and tumor invasion [ $n(\%)$ ]

资料	<i>n</i>	BAP1		$\chi^2$ 值	<i>r</i> 值	<i>P</i> 值	Ki-67		$\chi^2$ 值	<i>r</i> 值	<i>P</i> 值
		阳性 ( <i>n</i> =85)	阴性 ( <i>n</i> =211)				阳性 ( <i>n</i> =133)	阴性 ( <i>n</i> =163)			
年龄(岁)											
>70	96	24(25.00)	72(75.00)	0.709	-0.057	0.400	42(43.75)	54(56.25)	0.025	-0.017	0.874
≤70	200	61(30.50)	139(69.50)				91(45.50)	109(54.50)			
性别											
女	182	52(28.57)	130(71.43)	0.004	-0.004	0.950	80(43.96)	102(56.04)	0.094	-0.025	0.759
男	114	33(28.95)	81(71.05)				53(46.49)	61(53.51)			
肿瘤直径(cm)											
≥3	198	56(28.28)	142(71.72)	0.009	-0.014	0.922	89(44.95)	109(55.05)	0.0134	0.001	0.907
<3	98	29(29.59)	69(70.41)				44(44.90)	54(55.10)			
大体类型											
中央型	216	61(28.24)	155(71.76)	0.023	-0.017	0.879	97(44.91)	119(55.09)	0.014	-0.001	0.907
周围型	80	24(30.00)	56(70.00)				36(45.00)	44(55.00)			
分化程度											
低分化	47	16(34.04)	31(65.96)	0.496	0.051	0.481	35(74.47)	12(25.53)	18.305	0.258	<0.001
中高分化	249	69(27.71)	180(72.29)				98(39.36)	151(60.64)			
TNM 分期											
Ⅲ~Ⅳ期	143	24(16.78)	119(83.22)	18.134	-0.255	<0.001	105(73.43)	38(26.57)	88.566	0.554	<0.001
I~II 期	153	61(39.87)	92(60.13)				28(18.30)	125(81.70)			
淋巴结转移											
有	177	30(16.95)	147(83.05)	41.901	-0.317	<0.001	120(67.80)	57(32.20)	90.735	0.561	<0.001
无	119	55(46.22)	64(53.78)				13(10.92)	106(89.08)			
胸膜侵犯											
有	116	21(18.10)	95(81.90)	6.044	-0.188	0.014	92(79.31)	24(20.69)	88.843	0.555	<0.001
无	180	64(35.56)	116(64.44)				41(22.78)	139(77.22)			

者低,死亡者 Ki-67 阳性表达率高于生存者( $P < 0.05$ ),见表 5。

表 5 研究组不同预后患者 BAP1、Ki-67 阳性表达率比较 [n(%)]

组别	n	BAP1 阳性	Ki-67 阳性表达率
生存者	175	67(38.29)	35(20.00)
死亡者	113	15(13.27)	96(84.96)
$\chi^2$ 值		21.091	116.835
P 值		<0.001	<0.001

## 2.5 生存分析

KM 曲线分析, BAP1 阳性表达者 1 年生存率较阴性表达者高, Ki-67 阳性表达 1 年生存率较阴性表达者低( $\chi^2_1=21.580, P_1 < 0.001; \chi^2_2=134.200, P_2 < 0.001$ ), 见图 1。

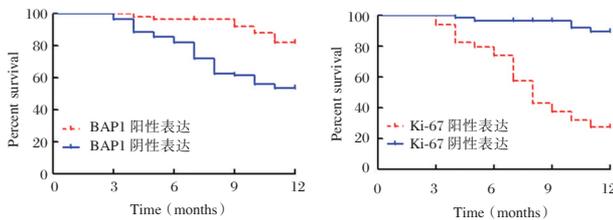


图 1 生存曲线

Figure 1 survivorship curve

## 3 讨论

肺癌为临床最常见恶性肿瘤之一, 5 年生存率极低, 2018 年的统计数据为 18%, 是癌症患者致死的主要病因<sup>[8]</sup>。LAC 的发生率约占肺原发肿瘤的 40%, 早期隐匿性更强, 具有高度浸润和破坏性生长特征, 且易侵犯血管和淋巴管壁, 多数患者确诊时已出现血行及淋巴转移, 预后极差<sup>[9]</sup>。因此, 越来越多的研究致力于探求 LAC 的早期诊断指标。

近期研究指出, BAP1 可影响肿瘤细胞周期与增殖能力, 其基因突变和缺失被认为参与肿瘤的发生发展<sup>[10]</sup>。BAP1 属于泛素羧基末端水解酶家族成员, 具有去泛素化酶活性, 定位于细胞核内, 可与乳腺癌 1 号基因相互作用, 发挥抑制肿瘤细胞增殖、侵袭及迁移能力的作用<sup>[11]</sup>。马晶晶等<sup>[12]</sup>通过对 41 例成年慢性粒-单核细胞白血病患者

研究发现, 其 BAP1 阳性表达率仅为 31.70%。Kim SH 等<sup>[13]</sup>针对局限性肾细胞癌的研究也发现 BAP1 阳性表达率显著降低。此次针对老年 LAC 患者的研究得出了与上述文献报道相近的结果, 且发现 BAP1 与老年 LAC 患者 TNM 分期、淋巴结转移、胸膜侵犯显著相关, 提示 BAP1 在多种恶性肿瘤及老年 LAC 体内呈异常低表达状态, 且参与肿瘤的增殖、侵袭及迁移。BAP1 能够去除底物蛋白质的泛素化修饰, 使底物逃逸“泛素-蛋白酶体”降解途径, 增强其稳定性, 或影响底物的功能活性, 从而调控相关信号传导; 同时能调控细胞转录、表观遗传、DNA 损伤修复等; 而 BAP1 表达缺失则使上述作用减弱, 最终引起肿瘤发生、进展<sup>[14]</sup>。此外, 有学者认为, 细胞核相关抗原 Ki-67 的检测可指导非小细胞肺癌患者术后是否需要进一步开展辅助治疗<sup>[15]</sup>。Ki-67 是一种与增殖细胞相关的核蛋白质, 由 MKI-67 基因编码, 与核糖体 RNA 转录有关。Ki-67 失活可导致核糖体 RNA 合成受限, 其可以作为反映细胞增殖的标记物, 同时可用于判断肿瘤恶性程度及侵袭力<sup>[16]</sup>。Yuan X 等<sup>[17]</sup>研究指出, Ki-67 存在于细胞周期 G<sub>0</sub> 期以外的所有阶段(细胞增殖的 G<sub>1</sub>、S、G<sub>2</sub> 和 M 期), 具有半衰期短的特性, 脱离细胞周期后会被迅速降解, 在反映肿瘤细胞增殖率方面的可靠性较高。已有大量研究证实 Ki-67 与多种恶性肿瘤的发生发展、肿瘤恶性生物学行为及预后有关<sup>[18]</sup>。本研究进一步通过随访研究发现通过检测 BAP1 及 Ki-67 的阳性表达情况, 可能用于老年 LAC 患者预后评估, 有可能成为老年 LAC 患者治疗的新靶点。

综上可知, BAP1 阳性表达率降低及 Ki-67 阳性表达率升高均参与老年 LAC 的发生发展, 且与 LAC 肿瘤侵袭存在密切相关性, 早期检测有助于老年 LAC 的诊断和预后评估; 它们作为肿瘤的潜在标志物, 将会成为推动老年 LAC 研究进展的新动力。

## 参考文献

- [1] Glatzel - Plucinska N, Piotrowska A, Grzegorzolka J, et al. SATB1 Level Correlates with Ki-67 Expression and Is a Positive Prognostic Factor in Non-small Cell Lung Carcinoma[J]. Anticancer Res, 2018, 38(2): 723-736.
- [2] 崔胜金, 曹朝鹏, 郭伟权, 等. 非小细胞肺癌早期诊断的潜在生物标志物: 血浆 miRNA-23a 和 miRNA-451[J]. 南方医科大学学报, 2019, 39(6): 705-711.

- [3] 单彬彬, 乔楠, 李媛, 等. 血小板与淋巴细胞比值、Ki67对肺癌化疗患者相关指标的影响[J]. 中国医师杂志, 2018, 20(9):1401-1403.
- [4] 王东昌, 赵云霞, 赵志芳, 等. 氢气干预抑制非小细胞肺癌生长的作用及其机制研究[J]. 国际呼吸杂志, 2018, 38(8):561-565.
- [5] Arenzana TL, Lianoglou S, Seki A, et al. Tumor suppressor BAP1 is essential for thymic development and proliferative responses of T lymphocytes [J]. *Sci Immunol*, 2018, 3(22): eaal, 1953.
- [6] Ge Y Z, Xu L W, Zhou C C, et al. A BAP1 Mutation-specific MicroRNA Signature Predicts Clinical Outcomes in Clear Cell Renal Cell Carcinoma Patients with Wild-type BAP1 [J]. *J Cancer*, 2017, 8(13):2643-2652.
- [7] Pedersen JH, Rzyman W, Veronesi G, et al. European Society of Thoracic Surgeons. Recommendations from the European Society of Thoracic Surgeons (ESTS) regarding computed tomography screening for lung cancer in Europe [J]. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2017, 51(3):411-420.
- [8] Siegel R L, Miller K D, Jemal A. Cancer statistics, 2018 [J]. *Ca A Cancer J Clin*, 2018, 68(1):7-30.
- [9] 杜凤华, 闵旭红, 梅晓冬. 肺腺癌靶向治疗药物的应用及耐药机制[J]. 临床肺科杂志, 2018, 23(1):168-172.
- [10] 韩丽敏, 魏丽荣, 杜玉珍. 骨代谢标志物 tPINP 和  $\beta$ -CTx 及 BAP 在肺癌骨转移中的临床应用[J]. 中华检验医学杂志, 2017, 40(11):860-864.
- [11] Kento Misumi, Akimasa Hayashi, Junji Shibahara, et al. Intrahepatic cholangiocarcinoma frequently shows loss of BAP1 and PBRM1 expression, and demonstrates specific clinicopathological and genetic characteristics with BAP1 loss [J]. *Histopathology*, 2017, 70(5):766-774.
- [12] 马晶晶, 林之光, 马燕, 等. BAP1 及 TET2 蛋白在慢性粒-单核细胞白血病患者骨髓中的表达及其意义[J]. 白血病·淋巴瘤, 2019, 28(1):25-29.
- [13] Kim S H, Park W S, Park E Y, et al. The prognostic value of BAP1, PBRM1, pS6, PTEN, TGase2, PD-L1, CA9, PSMA, and Ki-67 tissue markers in localized renal cell carcinoma: A retrospective study of tissue microarrays using immunohistochemistry [J]. *PLoS One*, 2017, 12(6):e0179610.
- [14] 李则, 任尊, 涂鸿鹄, 等. BAP1 及其抑癌作用研究新进展[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2017, 27(5):689-693.
- [15] 刘明东, 余宗阳, 赵忠全, 等. PD-L1、Ki67 预测非小细胞肺癌术后进展的研究[J]. 现代肿瘤医学, 2017, 25(6):885-889.
- [16] 楚广民, 张建波, 孙森森. RNA 干扰沉默 SOX9 对肾细胞癌 786-O 细胞体外增殖、凋亡及裸鼠成瘤能力的影响[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2018, 10(3):174-179, 195.
- [17] Yuan X, Liu D, Wang Y, et al. Significance of nuclear magnetic resonance combined with Ki-67 and VEGF detection in the diagnosis and prognosis evaluation of brain glioma [J]. *J Buon*, 2018, 23(2):410-415.
- [18] 熊焕文, 夏国际, 吴冠楠. 晚期肺癌患者 Ki-67 表达水平与临床疗效的关系[J]. 医学研究生学报, 2018, 31(12):55-58.

(上接第 650 页)

- [5] Lee RC, Ambros V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Science*, 2011, 294(5543):862-864.
- [6] Zhang GL, Li YX, Zheng SQ, et al. Suppression of hepatitis B virus replication by microRNA-199a-3p and microRNA-210 [J]. *Antiviral Res*, 2010, 88(2):169-175.
- [7] 王卫平. 儿科学[M]. 第8版. 北京:人民卫生出版社, 2013.
- [8] Manaseki-Holland S, Qader G, Isaq Masher M, et al. Effects of vitamin D supplementation to children diagnosed with pneumonia in Kabul: a randomised controlled trial [J]. *Trop Med Int Health*, 2010, 15(4):1148-1155.
- [9] Snijders D, Daniels JM, de Graaff CS, et al. Efficacy of corticosteroids in community-acquired pneumonia: a randomized double-blinded clinical trial [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2010, 181(9):975-982.
- [10] Theodoratou E, Al-Jilalawi S, Woodward F, et al. The effect of case management on childhood pneumonia mortality in developing countries [J]. *Int J Epidemiol*, 2010, 39(1):155-171.
- [11] 涂海健, 陈淑娟, 林群英, 等. 耐碳青霉烯类抗生素肺炎克雷伯菌耐药基因检测及分析[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2016, 8(4):246-251.
- [12] Sligl WI, Hoang H, Eurich DT, et al. Macrolide use in the treatment of critically ill patients with pneumonia: Incidence, correlates, timing and outcomes [J]. *Can J Infect Dis Med Microbiol*, 2013, 24(4):107-112.
- [13] Berkley JA, Munywoki P, Ngama M, et al. Viral etiology of severe pneumonia among Kenyan infant and Children [J]. *JAMA*, 2010, 303(13):2051-2057.
- [14] 颜保松, 王静, 罗杰, 等. miR-101、miR-223 和 miR-424 在肺结核诊断中的价值[J]. 重庆医学, 2016, 45(14):1902-1905.
- [15] 柳新胜, 艾芬. 血清 miRNA-192 评估呼吸机相关性肺炎患者病情严重程度及结局转归的临床价值[J]. 中国医药导报, 2016, 39(4):59-61+98.

## ICAM-1 含量对体外循环心脏手术后急性肾损伤的预测价值

李翠玲<sup>1</sup> 张红<sup>2</sup> 韩小虎<sup>2\*</sup>

**[摘要]** 目的 研究血清细胞间黏附分子-1(ICAM-1)含量对体外循环(CPB)心脏手术后急性肾损伤(AKI)的预测价值。方法 选择2018年1月-2019年6月期间在本院接受CPB心脏手术的114例患者,根据术后48h内是否发生AKI分为AKI组和非AKI组,比较两组手术前及术后2、4、8、12、24、36、48h的血清ICAM-1及血肌酐(SCr)含量,采用Logistic回归模型分析AKI的影响因素,采用ROC曲线分析ICAM-1对AKI的预测价值。结果 AKI组术后2h血清ICAM-1含量明显升高、术后24hSCr含量明显升高( $P<0.05$ ),非AKI组术后2~48h的血清ICAM-1及SCr含量无明显变化( $P>0.05$ );与非AKI组比较,AKI组的体外循环转机时间、主动脉阻断时间明显延长,术中出血量明显增加,使用右美托咪定的比例明显减少( $P<0.05$ );logistics回归分析显示,术后2h血清ICAM-1含量、体外循环转机时间、主动脉阻断时间、使用右美托咪定是AKI的影响因素;ROC曲线分析显示,术后2h血清ICAM-1含量对AKI具有预测价值,最佳截点为472.4 ng/mL。结论 CPB心脏手术后AKI患者术后2h出现血清ICAM-1升高,是AKI的影响因素且对AKI具有预测价值。

**[关键词]** 体外循环;急性肾损伤;细胞间黏附分子-1;影响因素;预测

### The predictive value of serum ICAM - 1 level on acute renal injury after cardiopulmonary bypass

LI Cuiling<sup>1</sup>, ZHANG Hong<sup>2</sup>, HAN Xiaohu<sup>2</sup>

(1. Department of Critical Care Medicine, Shenzhen Hospital of Southern Medical University, Shenzhen, Guangdong, China, 518100. 2. Department of Cardiac Surgery, Hainan Hospital, Hainan Medical College, Hainan Provincial People's Hospital, Haikou, Hainan, China, 570311)

**[ABSTRACT]** Objective To study the predictive value of serum intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) level on acute renal injury (AKI) after cardiopulmonary bypass (CPB). Method The 114 cases of patients who received CPB heart surgery in our hospital from January 2018 to June 2019 were divided into AKI group and non AKI group according to whether AKI occurred within 48 hours after operation. The serum ICAM-1 and serum creatinine (SCR) content before surgery and 2, 4, 8, 12, 24, 36 and 48 hours after surgery were compared between the two groups. The influencing factors of AKI were analyzed by logistic regression model, and the predicted value of ICAM-1 to AKI was analyzed by ROC curve Value. Result In AKI group, the serum ICAM-1 contents significantly increased from 2 h after surgery, and the SCr contents significantly increased from 24 h after surgery ( $P<0.05$ ), but there was no significant change in the serum ICAM and SCR level in non AKI group after surgery ( $P>0.05$ ); compared with the non AKI group, the time of cardiopulmonary bypass and aortic occlusion in AKI group significantly prolonged, the volume of intraoperative bleeding significantly increased, and the proportion of using dexmedetomidine significantly reduced ( $P<0.05$ ); lo-

作者单位:1.南方医科大学深圳医院重症医学科,广东,深圳518100

2.海南省人民医院海南医学院附属海南医院心脏外科,海南,海口570311

\*通信作者:韩小虎, E-mail:neichuiyong4@163.com

gistic regression analysis showed that serum ICAM-1 content at 2 h after surgery, cardiopulmonary bypass time, aortic occlusion time and dexmedetomidine were the influencing factors of AKI; ROC curve analysis showed that serum ICAM-1 content at 2 hours after surgery had predictive value for AKI, and the best cut-off point was 472.4 ng/mL. Conclusion the increase of serum ICAM-1 in patients with AKI after CPB heart surgery starts from 2 hours after surgery. The increase of serum ICAM-1 at 2 hours after surgery is the influencing factor of AKI and has predictive value for AKI.

[KEY WORDS] Cardiopulmonary bypass; Acute renal injury; Intercellular adhesion molecule-1; Influencing factors; Prediction

体外循环(Cardiopulmonary bypass, CPB)是完成心脏直视下手术必备的辅助技术, CPB会造成非生理性血流灌注, 进而通过激活炎症反应、氧化应激等途径引起术后急性肾损伤(acute kidney injury, AKI), 不及时处理会发展为急性肾衰竭并增加患者的死亡率<sup>[1-3]</sup>。因此, 早期诊断AKI或早期发现可能发生AKI的高危患者具有确实的临床意义。细胞间黏附分子-1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)是在炎症反应级联放大激活过程中起到促进炎症细胞黏附作用的分子, CPB术后AKI相关的动物实验表明, CPB致AKI大鼠肾组织中ICAM-1的表达显著上调, 使用促红细胞生成素抑制ICAM-1的表达能够减轻AKI<sup>[4]</sup>; 脓毒症AKI相关的临床研究表明, 血清ICAM-1升高对脓毒症患者发生AKI具有预测价值<sup>[5]</sup>, 但ICAM-1对CPB手术后AKI的预测价值尚未见报道。因此, 本研究将具体分析血清ICAM-1对CPB心脏手术后AKI的预测价值, 旨在为临床上早期筛查可能发生术后AKI的CPB心脏手术患者提供依据。

## 1 对象与方法

### 1.1 研究对象

选择2018年1月至2019年6月期间在本院接受CPB心脏手术的患者114例, 根据术后48 h内是否发生AKI分为AKI组(48例)和非AKI组(66例), 入组标准: ①符合CPB心脏手术指征; ②临床资料完整; ③术前及术后2、4、8、12、24、36、48 h时均留取血清标本; ④取得知情同意。排除标准: ①术前合并肾功能异常; ②术前或术后使用过肾毒性药物; ③二次CPB心脏手术。共纳入114例患者, 根据术后48 h内是否发生AKI分为AKI组和非AKI组。AKI组共48例, 非AKI组共66例。本研究获得医院伦理委员会批准。

## 1.2 研究方法

### 1.2.1 术后AKI的诊断标准

术后48 h内出现肾功能损害, 包括SCr含量较术前升高 $\geq 26.5 \mu\text{mol/L}$ 或Scr比术前升高 $\geq 50\%$ , 和/或尿量 $< 0.5 \text{ mL/kg} \cdot \text{h}$ 持续6小时以上。

### 1.2.2 血清ICAM-1含量的检测

取术前及术后2、4、8、12、24、36、48 h时的血清标本, 采用酶联免疫吸附试剂盒检测ICAM-1含量, 均按照试剂盒说明书进行操作。

### 1.2.3 AKI影响因素的收集

根据CPB心脏手术患者的病史资料收集以下信息: 性别、年龄、体质指数(BMI)、高血压史、糖尿病史、高脂血症史及术前血红蛋白(Hb)、血肌酐(SCr)、左心室射血分数(LVEF)、术中体外循环转机时间及主动脉阻断时间、术中出血量、使用右美托咪定情况。Hb采用血常规仪检测, SCr采用全自动生化分析仪检测, LVEF采用心脏多普勒超声检测。

## 1.3 统计学方法

采用SPSS 21.0软件进行数据分析, 计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示、两组间比较采用 $t$ 检验, 计数资料以 $n(\%)$ 表示、两组间比较采用卡方检验, AKI的相关因素采用Logistic回归分析、ICAM-1预测AKI采用ROC曲线分析,  $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 两组临床特征比较

两组性别、年龄、BMI、高血压、糖尿病、高脂血症及术前Hb、SCr、LVEF的比较, 无统计学差异( $P > 0.05$ ); 两组比较差异体外循环转机时间、主动脉阻断时间明显延长, 术中出血量明显增加, 使用右美托咪定的比例明显减少, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表1。

表1 AKI组与非AKI组临床特征的比较  
[ $n(\%)$ , ( $\bar{x}\pm s$ )]

Table 1 Comparison of clinical characteristics between AKI group and non AKI group [ $n(\%)$ , ( $\bar{x}\pm s$ )]

临床特征	AKI组 ( $n=48$ )	非AKI组 ( $n=66$ )	$\chi^2/t$ 值	$P$ 值
男性	26(54.17)	39(59.09)	0.275	0.600
年龄(岁)	50.11±10.39	48.68±9.45	0.765	0.446
BMI( $\text{kg}/\text{m}^2$ )	24.11±8.18	23.31±7.62	0.537	0.593
高血压	11(22.92)	14(21.21)	0.061	0.804
糖尿病	6(12.50)	12(18.18)	0.675	0.411
高脂血症	8(16.67)	13(19.70)	0.170	0.680
Hb( $\text{g}/\text{L}$ )	129.49±32.82	140.11±36.58	1.597	0.113
SCr( $\mu\text{mol}/\text{L}$ )	78.49±13.28	73.57±13.85	1.825	0.071
LVEF(%)	59.59±9.92	62.61±10.24	1.575	0.118
体外循环转机 时间(min)	127.68±24.91	95.51±14.58	8.657	0.000
主动脉阻断 时间(min)	108.12±19.47	87.71±12.34	6.840	0.000
术中出血量 (mL)	158.78±22.58	115.62±27.19	8.972	0.000
使用右美托 咪定	9(18.75)	32(48.48)	10.669	0.001

表2 AKI组与非AKI组围手术期ICAM-1、SCr的比较  
Table 2 Comparison of perioperative ICAM-1 and SCr  
between AKI group and non-AKI group

临床特征	AKI组 ( $n=48$ )	非AKI组 ( $n=66$ )	$t$ 值	$P$ 值
ICAM-1( $\text{ng}/\text{mL}$ )				
术前	421.94±69.94	413.67±97.45	0.422	0.674
术后2 h	542.49±113.99	430.12±89.39	5.889	0.000
术后4 h	603.14±104.25	426.68±101.24	9.174	0.000
术后8 h	713.58±131.52	441.23±123.12	11.244	0.000
术后12 h	993.41±152.34	436.58±109.47	22.878	0.000
术后24 h	925.65±142.37	427.68±110.34	21.035	0.000
术后36 h	901.34±150.25	422.31±103.51	20.185	0.000
术后48 h	856.74±127.34	419.39±93.58	17.958	0.000
SCr( $\mu\text{mol}/\text{L}$ )				
术前	78.49±16.28	72.57±17.85	1.803	0.074
术后2 h	80.12±14.12	76.12±12.31	1.610	0.110
术后4 h	81.28±17.61	73.43±10.29	2.470	0.015
术后8 h	82.12±14.41	70.12±13.42	4.575	0.000
术后12 h	84.12±20.12	76.24±11.23	2.675	0.008
术后24 h	153.51±26.52	79.12±14.41	19.241	0.000
术后36 h	137.68±22.12	77.34±12.35	17.128	0.000
术后48 h	130.28±21.29	80.19±13.17	15.572	0.000

## 2.2 两组围手术期ICAM-1、SCr的比较

AKI组患者手术后2 h开始的血清ICAM-1含量均明显高于手术前( $P<0.05$ ),手术后2~12 h的SCr含量与手术前比较差异无统计学差异( $P>0.05$ )、手术后24 h开始的SCr含量均明显高于手术前( $P<0.05$ );非AKI组手术前后ICAM-1、SCr含量比较差异无统计学差异( $P>0.05$ )。见表2。

## 2.3 CPB术后AKI影响因素的logistics回归分析

以CPB术后是否发生AKI为应变量,以手术后ICAM-1含量及2.1中有统计学差异的因素体外循环转机时间、主动脉阻断时间、术中出血量、使用右美托咪定为自变量,进行logistics回归分析可知:手术后2 h血清ICAM-1含量、体外循环转机时间、主动脉阻断时间、使用右美托咪定是CPB术后发生AKI的影响因素( $P<0.05$ )。见表3。

## 2.4 ICAM-1预测CPB术后AKI影响因素的ROC曲线分析

绘制ICAM-1预测CPB术后AKI影响因素的ROC曲线,曲线下面积为0.84(95%CI:0.77-0.91、 $P<0.05$ );根据约登指数最大值确定ICAM-1预测CPB术后AKI的最佳截点为472.4 ng/mL,该最佳截点预测CPB术后AKI的灵敏度和特异性分别为77.61%和79.59%。见图1。

表3 CPB术后AKI影响因素的logistics回归分析

Table 3 Logistic regression analysis of influencing factors of AKI after CPB

因素	$B$ 值	OR值	95%CI	Wald/ $\chi^2$ 值	$P$ 值
术后2 h ICAM <sup>-1</sup>	0.47	1.271	1.093-2.091	6.812	0.009
术后4 h ICAM <sup>-1</sup>	0.50	1.182	0.913-1.883	1.129	0.126
术后8 h ICAM <sup>-1</sup>	0.35	1.301	0.834-2.252	0.902	0.165
术后12 h ICAM <sup>-1</sup>	0.41	1.085	0.786-1.758	0.742	0.225
术后24 h ICAM <sup>-1</sup>	0.28	1.091	0.813-2.147	0.883	0.184
术后36 h ICAM <sup>-1</sup>	0.19	1.037	0.844-2.224	0.823	0.192
术后48 h ICAM <sup>-1</sup>	0.30	1.114	0.795-1.993	0.745	0.204
体外循环转机时间	0.51	1.392	1.132-2.218	7.686	0.002
主动脉阻断时间	0.39	1.148	1.035-2.113	4.855	0.018
术中出血量	0.49	1.032	0.726-2.241	0.624	0.291
使用右美托咪定	-0.39	0.838	0.569-0.932	5.221	0.014

## 3 讨论

心脏直视手术需要建立CPB CPB能够替代心肺功能并保证手术的顺利实施,但是CPB形成的是非生理性循环状态,一方面产生非搏动性灌注、引起肾小球灌注压降低,另一方面激活炎症反应并引起全身炎症反应、损害脏器功能<sup>[6-8]</sup>。此外,CPB过程中闭合滚压泵和氧合器的涡流造成红细胞破

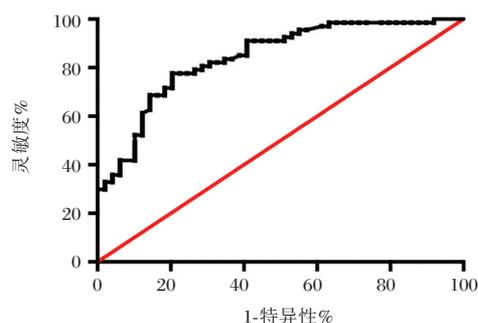


图1 ICAM-1预测CPB术后AKI的ROC曲线

Figure 1 ROC curve of ICAM-1 in predicting AKI after CPB

坏,会加重手术过程中的肾脏缺血缺氧,增加肾损伤的发生风险<sup>[9]</sup>。以上原因会造成CPB手术后AKI的发生,近些年越来越多的临床学者开始关注CPB致AKI的危害,手术后发生AKI对患者预后及生命安全均产生不利影响,增加多器官功能障碍的发生率及病死率,需要进行积极防治<sup>[10-11]</sup>。

SCr是临床上评价肾功能、诊断术后AKI的标志物,但SCr评价肾功能损害的敏感性较差,无法在AKI发生的早期进行评价和预测。本研究结果中,与国内金媛<sup>[12]</sup>的研究中SCr的变化趋势吻合,表明SCr用于AKI早期预测的价值有限。

炎症反应是与CPB术后AKI密切相关的病理环节,有研究报道CPB致AKI患者血清中HMGB1、IL-6等炎症标志物的含量明显升高<sup>[15]</sup>。ICAM-1是介导炎症细胞黏附的分子,能够促进炎症反应的级联放大激活,对脓毒症患者AKI具有预测价值<sup>[5]</sup>。CPB相关的动物实验表明,CPB后AKI大鼠肾组织中ICAM-1的表达明显增多<sup>[4]</sup>。本研究在既往其他研究的基础上分析了CPB心脏手术前后血清ICAM-1的变化,AKI患者从术后2h开始出现血清ICAM-1含量的升高,ICAM-1在CPB心脏手术后的变化较SCr更早出现,提示ICAM-1较SCr能更有效预测CPB心脏手术后AKI。

CPB术后AKI的发生与CPB造成的非生理性灌注有关,Moreira R<sup>[16]</sup>及Yang YQ<sup>[17]</sup>关于CPB术后AKI危险因素的分析证实,体外循环转机时间、使用右美托咪定等与CPB术后AKI有关。本研究结果表明CPB的使用会造成AKI的发生且右美托咪定能够起到保护作用、预防术后AKI的发生。此外,本研究还观察到术后2h时血清ICAM-1增多与AKI发生有关,进一步通过ROC曲线验证术后2h时血清ICAM-1与AKI的关系可知:术后2h时

血清ICAM-1能够预测CPB心脏手术后AKI、预测的最佳截点为472.4 ng/mL。

综上所述,CPB心脏手术后AKI患者从术后2h开始出现血清ICAM-1升高,是AKI的影响因素且对AKI具有预测价值,通过ICAM-1的监测来预测发生AKI的高危CPB心脏手术患者并进行防治。

## 参考文献

- [1] Krawczeski CD. Cardiopulmonary Bypass and AKI: AKI Is Bad, So Let's Get Beyond the Diagnosis[J]. *Front Pediatr*, 2019, 26(7): 492.
- [2] Karamaz A, Arslantas MK, Aksu U, et al. Evaluation of acute kidney injury with oxidative stress biomarkers and Renal Resistive Index after cardiac surgery[J]. *Acta Chir Belg*, 2019, 13: 1-9.
- [3] Hendrix RHJ, Ganushchak YM, Weerwind PW. Oxygen delivery, oxygen consumption and decreased kidney function after cardiopulmonary bypass[J]. *PLoS One*, 2019, 14(11): e0225541.
- [4] 黄海嵘,王高明,刘小龙,等. 促红细胞生成素抑制大鼠体外循环术致急性肾损伤时NF- $\kappa$ B P65和ICAM-1表达[J]. *基础医学与临床*, 2013, 33(4): 391-395.
- [5] 王伟. 血清细胞黏附分子对重症脓毒症患者急性肾损伤的预测价值[J]. *中国医师进修杂志*, 2019, 42(11): 989-993.
- [6] Wang X, Zhu Y, Chen W, et al. The impact of mild renal dysfunction on isolated cardiopulmonary coronary artery bypass grafting: a retrospective propensity score matching analysis[J]. *J Cardiothorac Surg*, 2019, 14(1): 191.
- [7] Sriperumbuduri S, Clark E, Hiremath S. New Insights Into Mechanisms of Acute Kidney Injury in Heart Disease [J]. *Can J Cardiol*, 2019, 35(9): 1158-1169.
- [8] Kany WH, Wu X. Pre-, Intra-, and Post-Operative Factors for Kidney Injury of Patients Underwent Cardiac Surgery: A Retrospective Cohort Study [J]. *Med Sci Monit*, 2019, 6(25): 5841-5849.
- [9] Svenmarker S, Hannuksela M, Haney M. A retrospective analysis of the mixed venous oxygen saturation as the target for systemic blood flow control during cardiopulmonary bypass[J]. *Perfusion*, 2018, 33(6): 453-462.
- [10] Arellano DL. Acute Kidney Injury Following Cardiothoracic Surgery [J]. *Crit Care Nurs Clin North Am*, 2019, 31(3): 407-417.
- [11] McGuinness SP, Parke RL, Drummond K, et al. A Multi-center, Randomized, Controlled Phase IIb Trial of Avoidance of Hyperoxemia during Cardiopulmonary Bypass [J]. *Anesthesiology*, 2016, 125(3): 465-473.
- [12] 金媛,于波,刘锦屏. 血红素氧合酶-1对体外循环心脏手术后急性肾损伤的早期诊断价值[J]. *中华临床医师杂志(电子版)*, 2016, 10(22): 3473-3475. (下转第682页)

## 新生儿先天性甲状腺功能低下症筛查结果及流行病学特征分析

许静\* 王惠珍 简亚娟

**[摘要]** **目的** 探究本地区新生儿先天性甲状腺功能低下症(CH)发病的流行病学特征,并分析其危险因素。**方法** 选取2016年1月至2019年12月本地区新生儿作为调查对象,统计新生儿CH患病率及其流行病学特征,并随机选取102例健康新生儿作为对照组,调查发现的CH患儿与对照组个体特征,采用多元Logistic回归模型分析新生儿CH发病的危险因素。**结果** 本地区2016至2019年共有264 000例新生儿接受新生儿疾病筛查,检出新生儿CH共102例,CH患病率为0.04%;其中男性占比41.18%,女性占比58.82%,确诊CH患儿在不同季节检出率不同,8月份开始检出率逐渐上升,在11~12月份检出率最高,2月份有一个小高峰;居住地为农村占比59.80%,CH患儿父亲、母亲文化程度均以初中及以下为主,分别占比45.10%、43.14%;CH患儿父亲、母亲年龄分布均以25~35岁为主,分别占比60.78%、50.98%;新生儿CH发病的危险因素包括性别为女性、出生体重<2500 g、分娩孕周<37周、母亲年龄>30岁、农村居住、有甲状腺疾病家族史、母亲孕期患病、母亲孕期食用海产品、母亲孕期情绪变化( $P<0.05$ )。**结论** 新生儿疾病筛查是发现CH的有效方法,本地区新生儿CH患病率不低,女性患病率略高于男性,新生儿CH发病的影响因素较多,临床应全面开展新生儿疾病筛查,同时加强孕前新生儿CH相关健康宣教,以进一步降低新生儿CH患病率。

**[关键词]** 先天性甲状腺功能低下症;新生儿疾病筛查;促甲状腺素;游离甲状腺素;危险因素

### Analysis of screening results and epidemiological characteristics of neonatal congenital hypothyroidism

XU Jing\*, WANG Huizhen, JIAN Yajuan

(Newborn disease screening center, qinghai maternal and child health hospital, Xining, Qinghai, China, 810000)

**[ABSTRACT]** **Objective** To explore the epidemiological characteristics of neonatal congenital hypothyroids (CH) in this area and analyze the risk factors. **Methods** The neonates in this area were selected from January 2016 to December 2019 as the survey object, and the prevalence and epidemiological characteristics of CH in neonates were counted, and randomly selected 102 healthy newborns as the control group. The individual characteristics of CH children and control groups found in the investigation were analyzed using multiple logistic regression models to analyze the risk factors of neonatal CH. **Results** A total of 264,000 newborns were screened for neonatal diseases from 2016 to 2019 in this region, and a total of 102 newborns were detected with a CH prevalence rate of 0.04%. Among them, males accounted for 41.18% and females accounted for 58.82%, the detection rate of children diagnosed with CH in different seasons was different, the detection rate gradually increased in August, with the highest detection rate in November to December, and a small peak in February. The proportion of living in rural areas was 59.80%, the education of

基金项目:青海省(应用)基础研究计划项目(2014-ZJ-213)

作者单位:青海省妇幼保健院新生儿疾病筛查中心,青海,西宁810000

\*通信作者:许静, E-mail: wrd0888@163.com

fathers and mothers of children with CH was mainly junior high school and below, accounting for 45.10% and 43.14%, respectively. The age distribution of fathers and mothers of children with CH were mainly 25 to 35 years old, accounting for 60.78% and 50.98%, respectively. The risk factors for neonatal CH included female gender, birth weight <2500 g, gestational age <37 weeks, mother age >30 years, rural residence, family history of thyroid disease, mother's illness during pregnancy, mother's consumption of seafood during pregnancy, and mother's emotional changes during pregnancy ( $P<0.05$ ). **Conclusion** Screening for neonatal diseases is an effective method for detecting CH. The prevalence of CH in newborns is not low in this region, and the prevalence of CH is slightly higher in women than in men. There are many factors affecting the incidence of CH in newborns. clinical screening of neonatal diseases should be carried out comprehensively, and CH-related health education for newborns before pregnancy should be strengthened to further reduce the prevalence of CH in newborns.

[KEY WORDS] Congenital hypothyroidism; Screening of neonatal diseases; Thyrotropin; Free thyroid hormone; Risk factors

先天性甲状腺功能低下症 (Congenital hypothyroidism, CH) 是因甲状腺激素产生不足或其受体缺陷所致,被认为是一种智残性疾病,可导致患儿身材矮小、智力低下,患病早期无明显症状表现,一旦发生症状,是不可逆的<sup>[1-2]</sup>。相关调查显示,CH 如能在患病 2 个月内检出,并给予有效治疗,可达到患儿智力发育基本正常的效果,患儿不良预后随着检出及治疗时间延长而增加<sup>[3]</sup>。早期诊断及治疗能很大程度降低疾病对患儿生长及智力发育的不可逆障碍。我国于上世纪 80 年代开始推行新生儿疾病筛查,通过早筛查、早诊断,让患儿尽早接受相关治疗,并开展定期随访治疗,可有效改善 CH 患儿预后<sup>[5]</sup>。此次调查通过统计 2016 年 1 月至 2019 年 12 月本地区新生儿先天性甲状腺功能低下症筛查结果,并对其流行病学特征及发病危险因素进行分析,旨在为临床制定新生儿 CH 预防措施提供参考依据。报告如下。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选取 2016 年 1 月至 2019 年 12 月本地区新生儿作为调查对象,共纳入 264 000 例新生儿,其中女 125 381 例,男 138 619 例,孕周 35~42 周,平均  $(38.16 \pm 1.57)$  周;出生体质量  $(2.3 \sim 5.4)$  kg,平均  $(3.68 \pm 0.68)$  kg;出生 10 min 阿氏评分 5~10 分,平均  $(8.62 \pm 0.67)$  分。新生儿家属均知晓本研究,已签署知情同意书。并采用 1:1 配对原则随机选取 102 例健康新生儿作为对照组,入组标准:出生 10 min 阿氏评分  $\geq 8$  分;无先天性疾病;心率、血压及呼吸频率均正常;无低体重、喂养不耐受、黄疸、体温异常。

### 1.2 方法

严格按照 2010 年卫生部《新生儿疾病筛查技术规范》<sup>[4]</sup>中相关要求,于新生儿出生 72 h 后采用滤纸干血片采集足跟血,采用贝克曼库尔特公司生产的 DX800 免疫发光仪器,由专业检测师以酶免疫荧光法测定促甲状腺素 (Thyroid-stimulating hormone, TSH) 浓度,若 TSH 切值  $\geq 9.05$  uIU/mL,电话召回进行电化学发光法测定 TSH、游离甲状腺素 (Free thyroxine, FT4) 值,参照新生儿 CH 相关诊断标准进行诊断<sup>[6]</sup>。确诊 CH 病例填写自制《新生儿疾病筛查登记表》,内容包括出生时间、确诊时间、性别、出生体质量、居住地、父母文化程度和年龄、母亲孕期的情况、分娩孕周、甲状腺疾病家族史等资料。填写自制《新生儿疾病筛查登记表》。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件进行数据处理,计数资料以  $n(\%)$  表示,采用  $\chi^2$  检验,以 Logistic 多元回归模型分析新生儿 CH 发病的危险因素, $P<0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 2016~2019 年新生儿 CH 筛查情况

共有 264 000 新生儿接受新生儿疾病筛查,102 例新生儿 CH,患病率 0.04%。不同年份新生儿 CH 患病率,比较差异无统计学意义。见表 1。

### 2.2 确诊病例时间分布情况

102 例 CH 患儿在不同季节检出率不同,2 月份有一个小高峰,5、6、7 月份检出率最低,8 月份开始患儿检出率逐渐上升,在 11~12 月份检出率最高,见图 1。

表1 2016~2019年新生儿CH筛查情况  
Table 1 CH neonatal screening 2016~2019

年份	总例数	CH患病例数
2016	57 904	18(0.03)
2017	64 933	24(0.04)
2018	69 173	27(0.04)
2019	71 990	33(0.05)
$\chi^2$ 值		1.872
P值		0.599

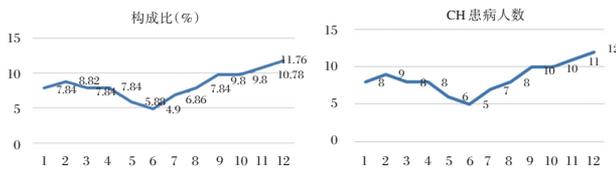


图1 2016~2019年新生儿CH患儿1~12月分布情况  
Figure 1 Distribution of children with neonatal CH in 2016~2019 in December

### 2.3 CH患儿性别及居住地分布

102例CH患儿中,农村发病率高于城市( $\chi^2=7.843, P=0.005$ );女发病率高于男( $\chi^2=6.353, P=0.012$ ),男:女=1:1.43。见图2。

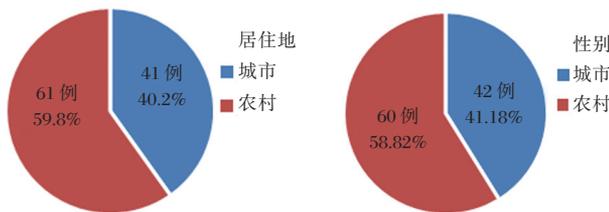


图2 CH患儿性别及居住地分布  
Figure 2 Distribution of CH children by sex and place of residence

### 2.4 CH患儿父母文化程度及年龄

102例CH患儿中,父母文化程度及年龄分布,见表2。

### 2.5 新生儿CH发病危险因素

单因素分析可知,两组在性别、出生体重<2500 g、分娩孕周<37周、母亲年龄>30岁、居住地、甲状腺疾病家族史、母亲孕期患病、母亲孕期食用海产品、母亲孕期情绪变化方面相比,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),见表3;多元Logistic回归分析可知,性别为女性、出生体重<2500 g、分娩孕周<37周、母亲年龄>30岁、农村居住、有甲状腺疾病家族史、母亲孕期患病、母亲孕期食用海产品、母亲孕

表2 CH患儿父母文化程度及年龄分布 [n(%)]  
Table 2 Education and Age Distribution of CH Parents [n(%)]

项目	父亲患病人数	母亲患病人数
文化程度		
初中及以下	46(45.10)	44(43.14)
高中或中专	20(19.61)	19(18.63)
大专及以上	36(35.29)	39(38.24)
$\chi^2$ 值	15.177	15.441
P值	<0.001	<0.001
年龄		
<25岁	26(25.49)	41(40.20)
25~35岁	62(60.78)	52(50.98)
>35岁	14(13.73)	9(8.82)
$\chi^2$ 值	55.059	44.029
P值	<0.001	<0.001

表3 新生儿CH发病单因素分析

Table 3 Single factor analysis of CH in neonates

资料	CH (n=102)	对照组 (n=102)	$\chi^2$ 值	r值	P值
性别					
男	38(41.30)	54(58.70)	4.455	-0.158	0.035
女	64(57.14)	48(42.86)			
出生体重			17.654	0.294	<0.001
<2 500 g	67(65.69)	37(36.27)			
>2 500 g	35(34.31)	65(63.73)			
分娩孕周			8.749	0.207	0.003
<37周	56(54.90)	35(34.31)			
>37周	46(45.10)	67(65.69)			
分娩年龄			14.406	-0.266	<0.001
>30岁	42(41.18)	69(67.65)			
<30岁	60(58.82)	33(32.35)			
居住地			2.391	-0.108	0.122
城市	41(40.20)	52(50.98)			
农村	61(59.80)	50(49.02)			
甲状腺疾病			22.594	0.333	<0.001
有家族史	29(28.43)	4(3.92)			
无家族史	73(71.57)	98(96.08)			
母亲孕期			27.437	0.367	<0.001
有患病	62(60.78)	25(24.51)			
无患病	40(39.22)	77(75.49)			
母亲孕期			40.840	0.447	<0.001
有食海产品	82(80.39)	37(36.27)			
无食海产品	20(19.61)	65(63.73)			
母亲孕期			5.022	0.157	0.025
有情绪变化	58(56.86)	42(41.18)			
无情绪变化	44(43.14)	60(58.82)			

期情绪变化为新生儿CH发病危险因素( $P<0.05$ ),见表4。

表4 新生儿CH发病影响因素多元Logistic回归分析

Table 4 Multivariate Logistic regression analysis of factors affecting the incidence of CH in neonates

因素	$\beta$ 值	S.E. 值	Wald / $\chi^2$ 值	OR 值	95%CI	P 值
性别为女性	1.248	0.357	12.211	3.482	1.798~6.742	<0.001
出生体重<2500 g	1.142	0.319	12.820	3.134	1.695~5.793	<0.001
分娩孕周<37周	1.717	0.574	8.948	5.568	3.147~9.852	<0.001
母亲年龄>30岁	1.561	0.474	10.852	4.766	2.794~8.129	<0.001
农村居住	1.654	0.526	9.890	5.229	3.125~8.749	<0.001
有甲状腺疾病家族史	1.493	0.416	12.888	4.452	2.137~9.276	<0.001
母亲孕期患病	1.734	0.581	8.912	5.666	3.168~10.134	<0.001
母亲孕期食用海产品	2.097	0.672	9.738	8.142	5.267~12.587	<0.001
母亲孕期情绪变化	1.666	0.528	9.956	5.291	2.984~9.381	<0.001

### 3 讨论

提高出生人口素质是当今社会重点关注的问题,新生儿疾病筛查是在新生儿期通过血液成分检测,对某些危害严重的先天性代谢病及内分泌病进行的专项检查<sup>[7]</sup>。2016年,我国全国范围内新生儿疾病筛查覆盖率高达96.10%,且随着医疗水平的提高而逐渐升高,由筛查初期检测单一先天性疾病,发展至今能检出50多种疾病<sup>[8-9]</sup>。

在众多先天性疾病中,CH是引起婴幼儿智力发育障碍的主要疾病之一<sup>[10]</sup>。本地区CH患病率为0.04%,高于海南省的2.58/万<sup>[11]</sup>,低于安徽省芜湖市5.40/万<sup>[12]</sup>,在国内处于中等水平。相关研究指出,新生儿CH发病是基因及环境双重作用所致<sup>[13]</sup>。杨丽涓等<sup>[14]</sup>开展的一项调查发现,四川片区2015年~2016年新生儿CH发病7月份最高,12月份最低。而日本大阪地区1989年~2002年新生儿CH患病率以10~12月最高,荷兰1980年~1984年新生儿CH患病率以7~10月最高<sup>[15]</sup>。此次调查发现,新生儿CH女性与男性比例为1.43:1,与莫李媚等<sup>[16]</sup>报道的三亚地区新生儿CH女性与男性比例(3/4)存在一定差异,提示在不同地区,新生儿CH女性与男性比例不同,其原因可能在于各地区饮食习惯、环境、医疗状况等因素不同。农村关于新生儿CH健康宣教工作开展尚不到位,尤其是文化水平较低的农村居住者,针对新生儿CH健康知识掌握情况较差,对相关预防措施了解程度较低,导致CH发生风险增加。

CH发病的危险因素较多,加强孕龄期女性的健康教育,提高其预防新生儿CH认知程度具有重要意义。研究显示,胚胎期甲状腺分化、移行、发育

异常及TSH抵抗等导致的甲状腺发育异常者约占85%,甲状腺素合成异常者约占15%<sup>[17]</sup>。而碘作为人体必需的微量元素,是参与合成甲状腺素基本原料,人体内碘的含量对甲状腺疾病的发生具有重要作用<sup>[18]</sup>。陈桂霞等<sup>[19]</sup>报道指出,发现母孕期碘摄入量过少和过量均对新生儿先天性甲状腺功能减低症有不利的影响,母孕期适宜的碘摄入有利于减少先天性甲状腺功能减低症的发生。母亲孕期患病、情绪变化幅度较大,均可能导致内分泌发生异常,从而影响胎儿正常发育,不仅增加新生儿CH发生风险,同时易引起胎儿发育不良、宫内窘迫、早产等。因此孕期控制情绪、保持良好身体状况,有助于降低新生儿CH发生风险。此外,当新生儿CH确诊后部分家属因缺乏对该疾病的正确认知,表现出紧张、焦虑、恐慌等情绪,医护人员应积极开展针对性健康教育,提高家属健康认知水平,指导家属积极配合对患儿开展治疗,尽最大可能降低CH对患儿体格、智力发育的影响,以改善患儿预后。

### 参考文献

- [1] 杨梅,杨应松,钟林,等. 江门市新生儿先天性甲状腺功能低下症TSH筛查切值的建立[J]. 热带医学杂志, 2018, 18(4): 535-538.
- [2] Metz J, Kesper MS, Uetz B, et al. Transient Pseudohypoadosteronism - an Important Differential Diagnosis to Congenital Adrenal Hyperplasia[J]. Klin Padiatr, 2018, 230(4): 229-230.
- [3] Kizys MML, Louzada RA, Mitne-Neto M, et al. DUOX2 Mutations Are Associated With Congenital Hypothyroidism With Ectopic Thyroid Gland[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2017, 102(11): 4060-4071.
- [4] 王慧琴,唐红,吴卫东. 新疆南疆地区2013年-2015年新生儿疾病筛查血片质量情况分析[J]. 中国优生与遗传杂志, 2016, 24(10): 83-84, 62.

(下转第687页)

## PLGF、IL-6与妊娠期高血压病情程度及母婴结局的相关性

程惠<sup>1\*</sup> 周曙光<sup>2</sup>

**[摘要]** 目的 探究胎盘生长因子(PLGF)、白介素6(IL-6)与妊娠期高血压病情程度及母婴结局的相关性。方法 选取2017年1月至2020年2月本院收治的110例妊娠期高血压疾病患者作为研究组,包含50例妊娠期高血压、30例轻度子痫前期、30例重度子痫前期,选取同期85例正常孕妇作为对照组。比较两组PLGF、IL-6水平,并比较研究组不同病情程度患者PLGF、IL-6水平,随访统计两组母婴结局,比较研究组不同PLGF、IL-6水平患者的母婴结局,采用Spearman分析PLGF、IL-6水平与病情程度、母婴结局相关性。结果 研究组PLGF水平低于对照组,IL-6水平高于对照组( $P<0.05$ );研究组不同病情程度IL-6水平对比,重度子痫前期>轻度子痫前期>妊娠期高血压,PLGF水平对比,重度子痫前期<轻度子痫前期<妊娠期高血压( $P<0.05$ );研究组不良母婴结局发生率(23.64%)高于对照组(3.53%,  $P<0.05$ );研究组IL-6高表达患者不良母婴结局发生率较低表达患者高,PLGF低表达患者不良母婴结局发生率较高表达患者高,差异无统计学意义( $P>0.05$ );妊娠期高血压疾病患者IL-6水平与病情程度、母婴结局间存在正相关关系,PLGF水平与病情程度、母婴结局间存在负相关关系( $P<0.05$ )。结论 妊娠期高血压疾病患者IL-6水平异常升高,PLGF表达降低,与病情程度、母婴结局间存在密切关系,参与妊娠期高血压疾病的发生和病情进展,同时增加不良妊娠结局发生风险。

**[关键词]** 妊娠期高血压;胎盘生长因子;白介素6;病情程度;母婴结局;子痫前期

### Correlation between PLGF、IL-6 and the degree of hypertension in pregnancy of maternal and infant outcomes

CHENG Hui<sup>1\*</sup>, ZHOU Shuguang<sup>2</sup>

(1. Department of obstetrics and gynecology, the fourth affiliated hospital of anhui medical university, Hefei, Anhui, China, 230012; 2. Department of gynecology, anhui maternal and child health hospital, Hefei, Anhui, China, 230061)

**[ABSTRACT]** Objective To investigate the correlation between placental growth factor (PLGF), interleukin 6 (IL-6) and the degree of hypertension during pregnancy and the outcomes of mothers and infants. Methods 110 patients with hypertension during pregnancy who were admitted to our hospital from January 2017 to February 2020 were selected as the study group, including 50 cases of hypertension during pregnancy, 30 cases of mild preeclampsia, 30 cases of severe preeclampsia, 85 normal pregnant women were selected as the control group during the same period. The levels of PLGF and IL-6 between the two groups, and in patients with different degrees of illness in the study group were measured and compared. The maternal and infant outcomes of the two groups were followed up and compared, the mother and infant outcomes of patients with different PLGF and IL-6 levels in the study group were analyzed. Spearman was used to analyze the correlation of PLGF and IL-6 levels with the degree of illness and maternal and infant outcomes. Results PLGF levels in

基金项目:合肥市卫生健康委应用医学研究项目([2019]172号-14)

作者单位:1.安徽医科大学第四附属医院妇产科,安徽,合肥230012

2.安徽省妇幼保健院妇科,安徽,合肥230061

\*通信作者:程惠, E-mail: chenghuihui153@163.com

the study group were lower than those in the control group, and IL-6 levels were higher than those in the control group ( $P<0.05$ ); comparison of IL-6 levels in the study group with different degrees of illness, severe preeclampsia > mild preeclampsia > hypertension in pregnancy, compared with PLGF levels, severe preeclampsia < mild preeclampsia < hypertension in pregnancy ( $P<0.05$ ). The incidence of adverse maternal and child outcomes in the study group (23.64%) was higher than that in the control group (3.53%,  $P<0.05$ ); the incidence of adverse maternal and infant outcomes in patients with high IL-6 expression in the study group was higher in patients with lower expressions, and the incidence of adverse maternal and infant outcomes in patients with low expression of PLGF was higher, but the difference was not statistically significant ( $P>0.05$ ). There was a positive correlation between IL-6 levels and the degree of illness and maternal and infant outcomes in patients with hypertension during pregnancy, and a negative correlation between the level of PLGF and the degree of illness and maternal and infant outcomes ( $P<0.05$ ). **Conclusion** The levels of IL-6 in patients with hypertension during pregnancy are abnormally elevated, and the expression of PLGF is reduced, which is closely related to the degree of disease and maternal and child outcomes. IL-6 and PLGF are involved in the occurrence and progression of hypertension during pregnancy and increases the risk of adverse pregnancy outcomes.

[KEY WORDS] Hypertension during pregnancy; Placental growth factor; Interleukin 6; Degree of illness; Mother-infant outcome; Preeclampsia

妊娠期高血压疾病是发生在妊娠期的一种特有、常见性疾病,其发病率占全部妊娠女性的5%~10%,所造成的孕产妇死亡约占妊娠相关的死亡总数的10~16%,是导致孕产妇死亡第二大原因<sup>[1]</sup>。目前,关于妊娠期高血压疾病的发病机制尚未完全阐述,近年来临床普遍认为与妊娠期胎盘血管重铸障碍及母-胎免疫耐受失衡有关,其产生主要原因为滋养细胞分化和功能异常<sup>[2]</sup>。相关报道指出,胎盘生长因子(Placenta growth factor, PLGF)是胎盘中的一种重要细胞因子,具有调节滋养细胞功能的作用,其表达异常可能参与妊娠期高血压的发生发展<sup>[3]</sup>。此外,白介素6(Interleukin-6, IL-6)等促炎性细胞因子在妊娠组织中经自分泌或旁分泌作用能调节局部子宫活动,参与妊娠期诸多生理及病理过程<sup>[4-5]</sup>。基于此,本研究尝试对PLGF、白介素6与妊娠期高血压病情程度及母婴结局的相关性进行探究,旨在为临床工作提供一定理论依据。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选取2017年1月至2020年2月本院收治的110例妊娠36~39周妊娠期高血压疾病患者作为研究组,孕周36~39周,平均(37.99±0.50),年龄20~33岁,平均(27.11±2.94)包含50例妊娠期高血压、30例轻度子痫前期、30例重度子痫前期,选取同期85例相同孕周正常孕妇作为对照组。

纳入标准:①研究组疾病诊断、病情评估均参照《妊娠期高血压疾病诊治指南(2015)》<sup>[6]</sup>;②对

照组均为正常、健康妊娠孕妇;③认知功能良好,无沟通交流障碍;④均为自然受孕、单胎妊娠;⑤均于我院进行分娩;⑥研究对象及家属均知晓本研究。排除标准:①血液系统疾病患者;②高龄产妇;③感染性疾病患者;④严重心脑血管功能障碍患者;⑤传染性疾病患者;⑥合并子宫肌瘤患者;⑦孕前即有慢性高血压、慢性肾炎及冠心病等慢性病患者;⑧不能配合完成研究者。

### 1.2 方法

采集所有研究对象分娩前1~3 d空腹静脉血,3 500 rpm离心处理10 min,取血清,用酶联免疫吸附试验检测血清PLGF、IL-6水平,试剂盒购自南京碧云天科技公司。

血清PLGF、IL-6表达水平:根据本研究测得血清PLGF、IL-6水平的平均值分为高表达和低表达,PLGF平均值为41.82 pg/mL,IL-6平均值为23.32 pg/mL,大于平均值者为高表达,小于平均值者为低表达。

### 1.3 观察指标

①两组PLGF、IL-6表达水平。②研究组不同病情程度患者PLGF、IL-6表达水平。③两组不良母婴结局发生率。④研究组不同PLGF、IL-6表达水平患者不良母婴结局发生率。⑤PLGF、IL-6表达水平与病情程度、母婴结局的相关性。

### 1.4 统计学方法

采用SPSS 22.0软件进行数据处理,计量资料以( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用 $t$ 检验,多组间比较以单因素方差进行分析,计数资料以 $n(\%)$ 表示,采用 $\chi^2$ 检验,



表5 研究组不同PLGF、IL-6水平患者母婴结局 [n(%)]

Table 5 Maternal and child outcomes at different PLGF、IL-6 levels in the study group [n(%)]

指标	n	产后出血	胎儿宫内窘迫	低出生体重	新生儿窒息	羊水过少	总发生率
PLGF	低表达	61	5(8.20)	4(6.56)	4(6.56)	1(1.64)	17(27.87)
	高表达	49	4(8.16)	1(2.04)	1(2.04)	1(2.04)	9(18.37)
	$\chi^2$ 值						1.359
	P值						0.244
IL-6	高表达	59	4(6.78)	3(5.08)	3(5.08)	2(3.39)	16(27.12)
	低表达	51	5(9.80)	2(3.92)	2(3.92)	0(0.00)	10(19.61)
	$\chi^2$ 值						0.855
	P值						0.355

毛内血管减少、已生成的血管阻力过大等现象,从而减少胎盘血流总灌注量,促进疾病进展,且影响胎儿正常发育<sup>[10]</sup>。

炎症介质和免疫调节因子在血管内皮损伤中同样具有重要作用,相关报道指出,子痫前期患者血清中含有“细胞毒性因子”,是引起妊娠期高血压疾病血管内皮细胞功能障碍的主要因素<sup>[11]</sup>。IL-6具有刺激血小板源性生长因子产生的作用,从而增加血管内皮细胞粘附分子合成、释放,加重对血管内皮细胞结构损坏,引起并促进血管内皮损伤,促使血液高凝及血管收缩,最终形成妊娠期高血压疾病<sup>[12-13]</sup>。李园<sup>[14]</sup>研究发现,妊娠期高血压患者血清IL-6水平明显升高,可促进血管收缩和子宫胎盘灌注受损,与本研究结果相近,提示血清IL-6表达水平升高能促进妊娠期高血压疾病发生发展。

临床大量研究显示,不良妊娠结局不仅影响妇女的健康,也会影响新生儿的健康,因此早期预防和预测尤为重要<sup>[15]</sup>。本研究结果提示血清IL-6及PLGF表达水平异常可能增加不良妊娠结局发生风险。

综上所述,血清IL-6及PLGF表达水平异常参与妊娠期高血压疾病的发生发展,且增加不良母婴结局发生风险,积极探索血清IL-6及PLGF表达情况将有助于阐明妊娠期高血压疾病发病机理,为本病的预防和治疗提供新思路。

## 参考文献

[1] Ayansina D, Black C, Hall SJ, et al. Long term effects of gestational hypertension and pre-eclampsia on kidney function: Record linkage study[J]. *Pregnancy Hypertens*, 2016, 6(4): 344-349.

[2] 李笑天, 张晓磊. 妊娠期高血压疾病再认识及其防治策略[J]. *上海医学*, 2019, 42(6): 344-346.

[3] 黄作香, 张小莎, 周刚. 黄芪甲苷对妊娠期高血压模型大

鼠胎盘组织中HIF-1 $\alpha$ 、sFLT-1和PLGF表达水平的影响[J]. *临床和实验医学杂志*, 2019, 18(16): 1684-1688.

- [4] 霍琰, 刘素新, 李红艳, 等. Vaspin、IL-6在妊娠期糖尿病患者胎盘组织中的表达[J]. *中国计划生育和妇产科*, 2018, 10(11): 79-83.
- [5] 胡际东, 温丽, 郭珍, 等. 血清miR-181b及miR-210在妊娠期高血压疾病中表达及与炎性细胞因子的相关性[J]. *中华实用诊断与治疗杂志*, 2019, 33(3): 241-244.
- [6] 中华医学会妇产科学分会妊娠期高血压疾病学组, 中华医学会妇产科学分会. 妊娠期高血压疾病诊治指南(2015)[J]. *中华妇产科杂志*, 2015, 50(10): 721-728.
- [7] Shen PJ, Li J, Cai ML, et al. Application of Serum  $\beta$ -HCG, PLGF Combined with VEGF in Diagnosis of Tubal Pregnancy[J]. *Prog Modern Bio*, 2017, 17(14): 2678-2680.
- [8] 赵影庭, 卢海英, 刘玮. 血清PLGF、sFlt-1和sEng水平与妊娠期高血压和子痫前期的严重程度及其不良结局关系[J]. *中国妇幼保健*, 2019, 34(12): 2714-2716.
- [9] Chen YF, Huang Y, Yang HL, et al. The valuable of PAPP-A, PLGF and sFlt-1 in predict the risk of hypertensive disorders in pregnancy[J]. *J Clin Expe Med*, 2015, 14(3): 176-180.
- [10] James-Todd T, Cohen A, Wenger J, et al. Time-specific placental growth factor (PlGF) across pregnancy and infant birth weight in women with preexisting diabetes[J]. *Hypertens Pregnancy*, 2016, 35(3): 436-446.
- [11] Hu YJ, Li XQ, Jiang SF, et al. The Expression and Significance of the von Willebrand Factor in Normal Pregnancy and Hypertensive Disorders Complicating Pregnancy[J]. *Chin J Thromb Hemost*, 2018, 24(3): 402-404, 406.
- [12] 葛娟, 尹粟. PCT、白细胞参数、IL-6和IL-10在早期鉴别上叶肺炎与上叶肺结核中的作用[J]. *中国热带医学*, 2018, 18(6): 617-618, 630.
- [13] 沈茹, 李艳君, 林丽佳. 系统性红斑狼疮患儿外周血IL-6、IL-10、IL-17水平变化及其在单个核细胞中的表达研究[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2017, 9(6): 371-375.
- [14] 李园. 血清标志物TNF- $\alpha$ 及IL-6水平与妊娠期高血压的相关性研究[D]. 山东大学, 2017.
- [15] 王结珍, 梁培松, 王伟佳, 等. 孕早期血清F- $\beta$ HCG, PAPP-A水平及BMI值的变化与不良妊娠结局的相关性[J]. *现代检验医学杂志*, 2019, 34(4): 151-153.

## HCY与2型糖尿病合并冠心病患者心率变异性及心律失常的相关性研究

刘松年\* 伍星 荆凌华

**[摘要]** 目的 探讨血清同型半胱氨酸(HCY)与2型糖尿病合并冠心病患者心率变异性及心律失常的相关性研究。方法 选取2016年9月至2019年9月在本院治疗的2型糖尿病合并冠心病患者120例和健康对照组60例。采用循环酶法检测研究对象血清HCY水平,并根据120名2型糖尿病合并冠心病患者血清HCY表达水平的中位数,表达量高于中位数的作为血清HCY高表达组,共60例;低于中位数的作为低表达组,共60例。比较3组心率变异性(HRV)的变化及其时域参数和心律失常的发生率。结果 2型糖尿病合并冠心病组血清HCY检测水平高于健康对照组、2型糖尿病无冠心病组;比较2型糖尿病合并冠心病患者中心律失常发生率,血清HCY高表达组高于低表达组,且血清HCY高表达组心率变异性以及HRV时域参数SDNN、SDANN、rMSSD、PNN50都小于低表达组,差异均有统计学意义( $P<0.05$ );其中,血清HCY高表达组心律失常发生率高于低表达组,心率变异性以及HRV时域参数SDNN、SDANN、rMSSD、PNN50小于低表达组,差异均有统计学意义( $P<0.05$ );入院治疗15天后,2型糖尿病合并冠心病患者HRV时域参数SDNN、SDANN、rMSSD、PNN50均明显回升,血清HCY水平明显下降差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。结论 2型糖尿病合并冠心病患者心率变异性降低,时域指标以SDANN降低最为显著,血清HCY水平与2型糖尿病合并冠心病患者心率变异性及心律失常紧密相关,血清中HCY表达水平对该类患者发生心律失常的风险具有一定的预估价值。

**[关键词]** 血清同型半胱氨酸; 2型糖尿病; 冠心病; 心律失常; 心率变异性

### Correlation between serum HCY and heart rate variability and arrhythmia in patients with type 2 diabetes and coronary heart disease

LIU Songnian\*, WU Xing, JING Linghua

(Department of Clinical Medicine, Henan University of Science and Technology, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan, China, 471000)

**[ABSTRACT]** Objective To investigate the correlation between serum homocysteine (HCY) and heart rate variability and arrhythmia in patients with type 2 diabetes mellitus (T2DM) and coronary heart disease (CHD). Methods From September 2016 to September 2019, 120 patients with T2DM and CHD and 60 healthy controls were selected. The serum level of HCY was measured using circulating enzyme method. Based on the level of HCY in patients, those 120 patients were divided into two groups: ① highly expressed group (The level of HCY > the median: 60 cases). ② lowly expressed group (the level of HCY < the median: 60 cases). The changes of heart rate variability (HRV), time domain parameters and the incidence of arrhythmia were compared among the three groups. Results The serum level of HCY in patients with T2DM and CHD was higher than that in the healthy control group and the group of T2DM without CHD. The incidence of arrhythmia in patients with T2DM with CHD was higher in the highly expressed HCY group than that in the

基金项目:洛阳市教育科技基金(LGF-20165021468)

作者单位:河南科技大学临床医学院 河南科技大学第一附属医院 急诊科,河南,洛阳 471000

\*通信作者:刘松年, E-mail: lazhong997570@163.com

lowly expressed HCY group. The heart rate variability and HRV time domain parameters of SDNN, SDANN, rMSSD, and PNN50 in the HCY highly expressed group were lower than those in the HCY lowly expressed group ( $P<0.05$ ). The incidence of arrhythmia was higher in the serum HCY highly expressed group than that in the lowly expressed group. The heart rate variability and HRV time domain parameters of SDNN, SDANN, rMSSD, PNN50 were lower than in the lowly expressed group ( $P<0.05$ ). Fifteen days after admission, the HRV time domain parameters of SDNN, SDANN, rMSSD, and PNN50 in patients with type 2 diabetes and coronary heart disease increased significantly, and the serum level of HCY decreased significantly ( $P<0.05$ ).  
**Conclusions** The HRV in patients with T2DM and CHD decreased, and the time domain index is the most significant reduction in SDANN. The serum level of HCY is closely related to HRV and arrhythmia in patients with T2DM and CHD. Hence, the serum level of HCY has a certain predictive value for the risk of arrhythmia in such patients.

**[KEY WORDS]** Serum homocysteine; Type 2 diabetes; Coronary heart disease; Arrhythmia; Heart rate variability

2型糖尿病和冠心病是两种常见疾病,就并发症方面考虑,2型糖尿病患者会易得冠心病这种并发症<sup>[1-2]</sup>。临床研究提示,2型糖尿病合并冠心病患者的预后很差,因此2型糖尿病合并冠心病患者应尽早治疗干预。心率变异性(heart rate variability, HRV)反映了心脏自主神经系统活性,并能评估心脏迷走神经、交感神经和它们的平衡性,能帮助判断心血管疾病的进展、预后<sup>[3-4]</sup>。近期研究表明,血清同型半胱氨酸(homocysteine, HCY)与冠心病发展有很大关系<sup>[5]</sup>,但对于血清HCY与此类并发症的心率变异性及心律失常的相关性研究在国内鲜少。本实验以2型糖尿病合并冠心病患者为研究对象,根据血清HCY表达水平为心率变异性提供参考依据,探讨血清HCY与2型糖尿病合并冠心病患者及心律失常发生率的关系,为HCY在临床上应用于评估2型糖尿病患者合并冠心病患者发生心律失常提供循证证据。

## 1 资料和方法

### 1.1 一般资料收集

选取2016年9月至2019年9月在本院治疗的2型糖尿病合并冠心病患者84例,这些患者均符合2型糖尿病诊断标准<sup>[6]</sup>,并经冠状动脉造影诊断为冠心病,男49例,女35例,平均年龄( $66.2\pm 8.1$ );另选2型糖尿病无冠心病组53例;再选同期在本院行健康体检检查者62例为对照组,男37例,女25例,平均年龄( $66.5\pm 5.8$ )岁。3组对象年龄、性别、血脂、平均心率及合并其他疾病等基线资料比较,差异无统计学意义( $P<0.05$ ),具可比性。

纳入标准:①符合2型糖尿病和冠心病的诊断

标准<sup>[6]</sup>;②患者自愿同意调查研究,并签署知情同意书。排除标准:①完全性左束支传导阻滞、高度房室传导阻滞、预激综合征、房颤、病窦综合症等心律失常;②经超声心动图排除各种心肌病、心脏瓣膜病、肺源性心脏病、风湿性心脏病等;③心力衰竭、肝肾功能不全、严重电解质紊乱、甲状腺功能亢进、脑梗死等影响植物神经功能的疾病;④既往服用过抗心律失常等影响植物神经功能的药物。

### 1.2 诊断方法

2型糖尿病符合1999年世界卫生组织(World Health Organization, WHO)诊断标准<sup>[6]</sup>:①糖尿病症状+任意时间血浆葡萄糖水平 $\geq 11.1$  mmol/L;②空腹血糖(fasting plasma glucose, FPG)水平 $\geq 7.0$  mmol/L;③OGTT实验中,餐后2h血糖水平 $\geq 11.1$  mmol/L。冠心病诊断标准<sup>[7]</sup>。

### 1.4 方法

收集人口学特征(年龄、性别)、既往病史(是否患糖尿病、冠心病):所有患者均在入院后的第2天清晨、治疗第15天后各抽取肘静脉血5 mL,放入含有抗凝剂ENTANA-2的抗凝管中,以12 000 r/min, 5 min进行离心混匀,收集上层血清。收集的血清利用免疫荧光的方法快速测定血清HCY含量。使用MAC5000型数字化12导联同步动态心电图(12-lead synchronous dynamic electrocardiogram, DCG)及自带分析系统,监测24 h心电信号,记录时间大于23 h,自动计算平均心率及HRV时域指标:ASDNN、SDNN、SDANN和rMSSD(各项HRV时域指标对应的英文简写,见表1)。采用同一人分析心率变异性、判读各种心律失常类型。心律失常的排除标准<sup>[7]</sup>。

表1 HRV时域指标的英文简写

HRV时域指标	英文简写
24 h内5 min节段正常心动周期标准差的平均值	ASDNN
24h内全部正常心动周期的标准差	SDNN
24 h内5min节段平均正常心动周期的标准差	SDANN
相邻正常心动周期差值的均方根	rMSSD

1.5 统计学方法

应用SPSS 21.0软件进行统计分析,正态分布、方差齐性的计量资料以( $\bar{x} \pm s$ )表示,使用t检验用于两组间对比,使用单因素方差分析进行多组间比较;计数资料用以n(%)表示,采用 $\chi^2$ 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组患者血清HCY表达水平比较

2型糖尿病合并冠心病组血清HCY检测水平高于健康对照组、2型糖尿病无冠心病组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表2、图1。

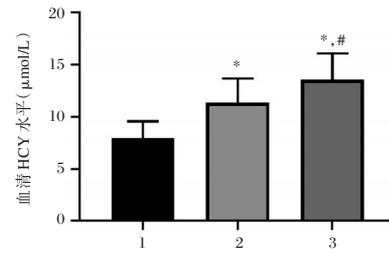
表2 各组患者的血清HCY检测结果比较( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Comparison of serum HCY detection results in each group ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	血清HCY水平( $\mu\text{mol/L}$ )
健康对照组	120	7.81 $\pm$ 1.11
2型糖尿病无冠心病组	60	11.29 $\pm$ 1.32
2型糖尿病合并冠心病组	60	13.71 $\pm$ 1.50
F值		35.18
P值		<0.001

2.2 各组患者HRV时域参数比较

利用同步动态心电图计算平均心率及HRV时域指标,发现血清HCY高表达组与低表达组HRV时域参数SDNN、SDANN、rMSSD、PNN50



注:与健康组比较,\* $P < 0.05$ ;与2型糖尿病无冠心病组比较,# $P < 0.05$ 。1为健康对照组;2为2型糖尿病无冠心病组;3为2型糖尿病合并冠心病组。

图1 3组研究对象血清HCY检测结果比较

Figure 1 Comparison of serum HCY detection results in 3 groups

均低于对照组( $P < 0.05$ );血清HCY高表达组HRV时域参数SDNN、SDANN、rMSSD、PNN50均低于低表达组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表3。

2.3 各组患者HRV变化和心律失常率比较

血清HCY高表达组与低表达组HRV失常率、心律失常发生率均高于健康对照组;血清HCY高表达组HRV失常率、心律失常发生率都高于低表达组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表4。

2.4 24 h内全部心动周期标准差(SDNN)与血清HCY表达水平的相关性

进一步对2型糖尿病合并冠心病患者SDNN与HCY表达水平进行分析发现,SDNN与HCY的表达呈显著负相关( $r = -0.350$ ,  $P < 0.05$ ),见图2。

2.5 2型糖尿病合并冠心病患者治疗后各项指标变化

入院治疗15天后,2型糖尿病合并冠心病患者HRV时域参数SDNN、SDANN、rMSSD、PNN50均明显回升,血清HCY水平明显下降( $P < 0.05$ )。见表5。

表3 各组患者的HRV时域参数比较( $\bar{x} \pm s$ , ms)

Table 3 Comparison of HRV time domain parameters in each group ( $\bar{x} \pm s$ , ms)

组别	n	SDNN	SDANN	rMSSD	PNN50
健康对照组	60	145.12 $\pm$ 10.05	146.33 $\pm$ 15.21	39.21 $\pm$ 1.26	9.21 $\pm$ 1.03
血清HCY高表达组	60	98.22 $\pm$ 13.21	106.52 $\pm$ 12.83	31.52 $\pm$ 1.21	3.06 $\pm$ 0.82
血清HCY低表达组	60	120.62 $\pm$ 12.05	129.05 $\pm$ 15.13	35.34 $\pm$ 1.02	5.11 $\pm$ 0.18
F值		75.3	58.2	19.2	11.5
P值		<0.001	<0.001	<0.01	<0.01

表4 各组患者的HRV变化及心律失常发生率比较

Table 4 Comparison of HRV change and incidence of arrhythmia in each group

组别	n	HRV失常(%)	心律失常(%)
健康对照组	60	0	0
血清HCY高表达组	60	43.2	55.6
血清HCY低表达组	60	20.8	22.3
F值		17.6	29.8
P值		<0.001	<0.001

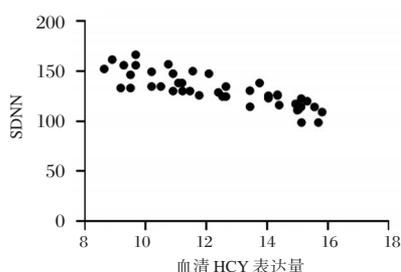


图2 2型糖尿病合并冠心病患者SDNN与血清中HCY表达的相关性分析

Figure 2 correlation analysis of SDNN and HCY expression in serum in patients with type 2 diabetes mellitus and coronary heart disease

### 3 讨论

近年来的研究表明,2型糖尿病、冠心病发病率明显升高,患者同患两种疾病的比例也在明显增加<sup>[8-9]</sup>。研究表明,2型糖尿病与冠心病尽管是两个不同系统的疾病,但发病的生理基础却相似,都表现为胰岛素抵抗、高胰岛素血症<sup>[10]</sup>。其机理是高胰岛素血症会让血管内皮组织的炎症因子聚集现象加剧,使得冠状动脉产生粥样硬化;胰岛素抵抗的机理是血脂代谢异常,免疫炎症反应增强,引起冠状动脉产生病变斑块<sup>[11-12]</sup>。

冠心病合并心律失常的病情相对来说比较严重,临床治疗难度很大,甚至造成患者死亡<sup>[13]</sup>。因此,对危重的2型糖尿病合并冠心病患者应重点关注血清HCY水平,并提倡预防性服用抗心律失常的药物,这将极大降低该类患者心律失常引起的心脏性猝死的死亡率。

血清同型半胱氨酸(HCY)是一种人体浓度较低的含硫氨基酸,是能参与到蛋氨酸代谢过程,与B族维生素和辅酶Q10都有关联<sup>[14-15]</sup>。研究表明,HCY水平与2型糖尿病患者合并血管并发症有很大相关

表5 2型糖尿病合并冠心病患者治疗后各项指标比较( $\bar{x} \pm s$ )Table 5 Comparison of indexes in patients with T2DM with CHD after treatment ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	SDNN (ms)	SDANN (ms)	rMSSD (ms)	PNN50 (ms)	血清HCY水平( $\mu\text{mol/L}$ )
入院时	93.82±11.31	101.43±11.26	30.51±1.00	2.92±0.73	12.26±1.11
治疗15天后	134.21±10.20	141.52±13.25	36.77±1.10	8.11±1.10	6.13±1.23
t值	9.21	8.19	5.53	5.88	13.09
P值	<0.001	<0.001	<0.01	<0.01	<0.001

性,血清高HCY水平会增加2型糖尿病患者血管并发症发生风险<sup>[16]</sup>。近年来的多项研究也表明高同型半胱氨酸血症是发生冠心病的独立危险因素,而2型糖尿病是和冠心病同等具有危险性的疾病,所以如果2型糖尿病合并发生高同型半胱氨酸血症可加重冠状动脉的病变,进而引起心率变异性、心律失常发生率急剧改变,甚至造成心脏性猝死。HRV时域参数SDNN、SDANN、rMSSD、PNN50可推断心率变异性,对预测心律失常有重要临床价值。血清中HCY水平可以通过氧化应激、离子通道、心肌细胞间联系等因素调控心律失常发生发展。从本文研究可以看到,SDNN与HCY的表达呈显著负相关,这可以反映HCY或许能作为有效的联用因素判断心律失常发生的可能性大小。因此

在临床实践中,对于具有患冠心病高风险的2型糖尿病患者应当补充叶酸以降低血清HCY水平,并向病人提倡多吃富含叶酸的食物,但同时也要严格控制饮食。当前,二甲双胍成为治疗糖尿病一线治疗药物,口服二甲双胍更要补充叶酸已成为治疗共识,叶酸可使血清HCY水平有效降低,从而预防心血管疾病<sup>[17]</sup>。但叶酸的用量仍是依据常用经验,这会给治疗方案带来一定的缺陷。因此,探讨血清HCY水平与心律失常的相关性,将为血清HCY水平作为用药参考指标提供扎实的临床基础。

总而言之,2型糖尿病合并冠心病患者发生心律失常的风险及比例较高,与血清HCY水平的升高相关,血清HCY表达水平是判断2型糖尿病合

并冠心病患者是否伴有心律失常和识别高危人群准确而敏感的指标,根据血清 HCY 水平变化加强早期诊断和治疗,可以改善病情和预后,降低心律失常发生的风险。

### 参考文献

- [1] Wu J, Xun PC, Tang QY, et al. Circulating magnesium levels and incidence of coronary heart diseases, hypertension, and type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of prospective cohort studies[J]. *Nutr J*, 2017, 16(1):60.
- [2] 凌克,李华,冯明,等.老年2型糖尿病合并冠心病患者心率变异性与心律失常的关系[J]. *河南医学研究*, 2018, 27(9):1553-1556.
- [3] 王伯乐,王焕霞,徐金义,等.血清同型半胱氨酸与2型糖尿病患者冠状动脉病变 SYNTAX 评分的相关性研究[J]. *中国临床新医学*, 2018, 11(03):221-223.
- [4] 金晓萍,马玉玲. CRP、血脂及 NT-proBNP 与高血压合并 OSAHS 患者血压及心率变异性的关系[J]. *热带医学杂志*, 2017, 17(12):1643-1647.
- [5] Miao JJ, Hendryx M, Manson JE, et al. Personality traits and the risk of coronary heart disease or stroke in women with diabetes - an epidemiological study based on the Women's Health Initiative [J]. *Menopause (New York, N.Y.)*, 2019, 26(10).
- [6] Peterli R, Wolnerhanssen, Bettina K, et al. Effect of Laparoscopic Sleeve Gastrectomy vs Laparoscopic Roux-en-Y Gastric Bypass on Weight Loss in Patients With Morbid Obesity The SM-BOSS Randomized Clinical Trial [J]. *JAMA: the Journal of the American Medical Association*, 2018, 319(3):255-265.
- [7] Litsa K. La, Ahmad SC, Dan S, et al. Systematic Review for the 2017? AHA/ACC/HRS Guideline for Management of Patients With Ventricular Arrhythmias and the Prevention of Sudden Cardiac Death[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2018, 72(14):1653-1676.
- [8] 黄娟,胡维,熊丹.血清 LDL 与 2 型糖尿病周围神经病变的相关性研究[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2018, 10(05):352-355+360.
- [9] 路劲松.利拉鲁肽对 2 型糖尿病合并冠心病患者血清炎症因子与同型半胱氨酸的影响研究[J]. *中国医药指南*, 2019, 17(21):16-17.
- [10] Hoseini A, Namazi G, Farrokhian A, et al. The effects of resveratrol on metabolic status in patients with type 2 diabetes mellitus and coronary heart disease [J]. *Food function*, 2019, 10(9):6042-6051.
- [11] Shishi X, Charles AS, Ruth L C. 2436-PUB: Predicting Risk for New-Onset Type 2 Diabetes in Chinese People with Coronary Heart Disease and Impaired Glucose Tolerance[J]. *Diabetes*, 2019, 68.
- [12] David AJ, Jack B, Heather AR, et al. Adiposity-Mortality Relationships in Type 2 Diabetes, Coronary Heart Disease, and Cancer Subgroups in the UK Biobank, and Their Modification by Smoking [J]. *Diabetes Care*, 2018, 41(9):1878-1886.
- [13] Z Matloch, H Kratochvílová, A Cinkajzlová, et al. Changes in Omentin Levels and Its mRNA Expression in Epicardial Adipose Tissue in Patients Undergoing Elective Cardiac Surgery: the Influence of Type 2 Diabetes and Coronary Heart Disease[J]. *Physiological Research*, 2018, 67(6):881-890.
- [14] 徐珊,王长义,张春惠,等.普通高血压、伴高同型半胱氨酸血症高血压患者和健康人群的高尿酸血症患病率比较[J]. *华南预防医学*, 2014, 40(6):563-565.
- [15] Mao Luo, Gang Wang, Chunrong Xu, et al. Circulating miR-30c as a predictive biomarker of type 2 diabetes mellitus with coronary heart disease by regulating PAI-1/VN interactions[J]. *Life Sci*, 2019, 239:117092.
- [16] 段雯.观察同型半胱氨酸对 2 型糖尿病合并冠心病患者冠状动脉病变的影响[J]. *实用糖尿病杂志*, 2018, 14(5):54.
- [17] Connor A E, Derek K, Pradeep N. Genetic Variation at the Sulfonylurea Receptor, Type 2 Diabetes, and Coronary Heart Disease[J]. *Diabetes*, 2017, 66(8):2310-2315.

(上接第 669 页)

- [13] 葛熙,朱易华,赵梓.体外循环二尖瓣置换术后急性肾损伤患者检测血清 HMGB1 和尿 KIM-1 的临床价值[J]. *交通医学*, 2019, 33(4):365-368.
- [14] 陈葶,陈茂杰,吴岭,等.心脏手术患者术后 IL-18、胱抑素 C 水平与急性肾损伤的关系研究[J]. *中国临床研究*, 2016, 29(1):49-51.
- [15] Karabağ Y, Çağdaş M, Rencuzogullari I, et al. The C-Reactive Protein to Albumin Ratio Predicts Acute Kidney Injury in Patients With ST-Segment Elevation Myocardial Infarction Undergoing Primary Percutaneous Coronary Intervention [J]. *Heart Lung Circ*, 2019, 28(11):1638-1645.
- [16] Moreira R, Jacinto T, Neves P, et al. Predictors of Acute Kidney Injury Associated with Cardiopulmonary Bypass [J]. *Rev Port Cir Cardiorac Vasc*, 2019, 26(2):109-115.
- [17] Yang YQ, Yuan LY, Chen S, et al. Risk factors for acute kidney injury after pediatric congenital heart surgery [J]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2019, 99(22):1717-1721.

· 论 著 ·

## AGR、补体C3、C4在SLE合并脑血管病中检测价值

罗寰\* 阮海玲 陈苗苗 任占芬

**[摘要]** **目的** 探究白球蛋白比值(AGR)、补体C3、C4在系统性红斑狼疮(SLE)合并脑血管病中的检测价值。**方法** 选取本院2018年1月至2019年10月SLE合并脑血管疾病患者136例作为研究组,单纯SLE患者136例作为对照组。比较两组血清AGR、补体C3、C4水平,评价上述指标对SLE合并脑血管病的诊断价值,并对研究组不同疗效患者血清AGR、补体C3、C4水平,分析上述指标与SLE合并脑血管病患者疗效的关系,随访28 d,采用卡普兰-迈耶曲线分析SLE合并脑血管疾病患者生存情况。**结果** 研究组血清AGR、补体C3、C4水平低于对照组( $P<0.05$ );血清AGR、补体C3、C4联合诊断SLE合并脑血管病的曲线下面积(AUC)为0.862,大于各指标单独诊断的AUC,联合诊断的截断值诊断敏感度为74.26%,特异度为86.76%;SLE合并脑血管病患者疗效与血清AGR、补体C3、C4表达水平显著相关( $P<0.05$ );研究组血清AGR、补体C3、C4高表达患者生存率高于低表达患者( $P<0.05$ )。**结论** 血清AGR、补体C3、C4表达水平异常降低可增加SLE患者并发脑血管疾病风险,降低生存率,且与患者疗效显著相关,可辅助临床诊断SLE合并脑血管疾病,具有较高应用价值。

**[关键词]** 系统性红斑狼疮;脑血管病;白球蛋白比值;补体C3;补体C4;诊断

### Diagnostic value of serum albumin-to-globulin ratio, complement C3 and C4 levels in cerebrovascular disease in patients with systemic lupus erythematosus

LUO Huan\*, RUAN Hailing, CHEN Miaomiao, REN Zhanfen

(Department of rheumatology, the first affiliated hospital of hebei north university, Zhangjiakou, Hebei China, 075000)

**[ABSTRACT]** **Objective** To explore the detection value of albumin-to-globulin ratio (AGR), C3 and C4 in cerebrovascular disease in patients with systemic lupus erythematosus (SLE). **Methods** 136 cerebrovascular disease patients with SLE from January 2018 to October 2019 were selected as the study group, and 136 patients with SLE only were used as the control group. The serum AGR, complement C3, C4 levels of the two groups were measured and compared. The diagnostic value was evaluated. The relationship between the serum level of AGR or C3/C4 and the efficacy of cerebrovascular disease in patients with SLE was analyzed. Followed up for 28 days, Kaplan-Meier curve was used to analyze the survival of cerebrovascular disease patients with SLE. **Results** The levels of serum AGR, complement C3 and C4 in the study group were lower than those in the control group ( $P<0.05$ ). The area under the curve (AUC) of the combined diagnosis of serum AGR, complement C3, C4 and SLE combined with cerebrovascular disease was 0.862, which was greater than the AUC of AGR, complement C3 and C4 alone. The cutoff value of the combined diagnosis was 74.26% in sensitivity and 86.76% in specificity. The efficacy of SLE patients with cerebrovascular disease was significantly correlated with the serum levels of AGR, complement C3 and C4 ( $P<0.05$ ). The survival rate of patients with high levels of serum AGR, complement C3 and C4 in the study group was higher than those of

基金项目:张家口市科技攻关计划项目(1521086D)

作者单位:河北北方学院附属第一医院风湿免疫科,河北,张家口 075000

\*通信作者:罗寰, E-mail:luohuan.ggg@163.com

patients with low levels ( $P<0.05$ ). **Conclusion** Down-regulation of serum levels of AGR, complement C3 and C4 can increase the risk of cerebrovascular disease in SLE patients and reducing the survival rate. Therefore, it can assist clinical diagnosis of cerebrovascular disease in patients with SLE patients SLE.

**[KEY WORDS]** Systemic lupus erythematosus; Cerebrovascular disease; Complement C3; Complement C4; Diagnosis

系统性红斑狼疮(Systemic lupus erythematosus, SLE)为临床常见弥漫性结缔组织疾病,病理表现以血管壁的炎症为主,可造成血管壁增厚,管腔狭窄,使局部组织器官缺血,从而导致全身各个器官、系统的受累,若累及中枢神经系统,则可能引发脑血管疾病<sup>[1-2]</sup>。传统的脑血管疾病危险因素包括年龄、高血压、高血脂症、肥胖、高同型半胱氨酸血症等<sup>[3]</sup>。近年来临床研究发现脑血管疾病的发病率呈现年轻化,用传统的高危因素不能完全解释,而一些非传统危险因素如自身抗体、免疫复合物、内皮功能障碍、系统性炎症反应等,可能在弥漫性结缔组织疾病早发动脉粥样硬化的发病机制中发挥促进作用<sup>[4-5]</sup>。深入研究这些非传统危险因素在SLE患者早发动脉粥样硬化的发病机制,将有助于防治SLE患者的脑血管疾病,以降低其死亡率。基于此,本研究初次尝试探究白球蛋白比值(Albumin to globulin ratio, AGR)、补体C3、C4在SLE合并脑血管病中的检测价值,旨在为临床治疗本病提供数据支持。报告如下。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选取本院2018年1月至2019年10月SLE合并脑血管病患者136例作为研究组,女116例,男20例,年龄( $32.11\pm 6.05$ )岁,SLE病程( $3.51\pm 1.25$ )年,体质量( $59.72\pm 7.35$ )kg,合并症:冠心病7例,高血压10例,糖尿病5例;户籍地:城市86例,农村50例。单纯SLE患者136例作为对照组,女120例,男16例,年龄( $30.92\pm 5.95$ )岁,SLE病程( $3.26\pm 1.12$ )年,体质量( $58.66\pm 7.32$ )kg,合并症:冠心病5例,高血压6例,糖尿病3例;户籍地:城市80例,农村56例。

入选标准:①均符合SLE诊断标准<sup>[6]</sup>;②研究组均结合临床表现、头颅CT或磁共振检查确诊存在脑血管疾病;③无消化系统疾病;④对本研究药物无过敏;⑤无凝血功能障碍;⑥患者及家属知晓本研究,已签署同意书。排除标注:①急性脑血管

疾病患者;②恶性肿瘤患者;③严重心肺肝功能障碍者;④肾衰竭患者;⑤合并乙肝、肺结核等传染性疾病者;⑥妊娠或哺乳期女性;⑦合并其他免疫性疾病者。

### 1.2 方法

指标检测方法:采集所有研究对象入组12 h内静脉血5 mL,以3 500 r/min转速离心处理5 min,取血清置于 $-70^{\circ}\text{C}$ 冷藏室内备用,采用Senlo8008型全自动生化分析仪(珠海森龙生物科技有限公司生产),以溴甲酚绿法检测血清白蛋白(Albumin, ALB)、球蛋白(Globin, GLB)水平,以免疫速率散射比浊法进行检测血清补体C3、C4水平,试剂盒均购自上海信帆生物科技有限公司,计算血清AGR(ALB/GLB)。

研究组治疗方法:均给予激素联合人免疫球蛋白:静脉滴注甲基泼尼松龙(浙江仙琚制药股份有限公司 国药准字H33021520)1 g/d,静脉滴注人免疫球蛋白(四川远大蜀阳药业股份有限公司,批号20120102)50 g/d,均冲击治疗3 d,3 d后改为口服,40 mg/d;患者病情稳定后静脉滴注环磷酰胺(江苏恒瑞医药股份有限公司,国药准字H32026196),400 mg/d,每2周给药1次。

疗效评估方法<sup>[7]</sup>:治疗28 d后评估,显效:经治疗,中枢神经系统表现完全消失,随访期间无复发;有效:中枢神经系统表现明显减轻,但未完全消失;无效:中枢神经系统表现无明显减轻,甚至加重。

### 1.3 观察指标

①两组血清AGR、补体C3、C4水平。②探究血清AGR、补体C3、C4对SLE合并脑血管病的诊断价值。③比较研究组不同疗效患者血清AGR、补体C3、C4水平。④探究血清AGR、补体C3、C4与SLE合并脑血管病患者疗效的关系。⑤随访28 d,采用卡普兰-迈耶曲线分析SLE合并脑血管病患者生存情况。

### 1.4 统计学方法

采用SPSS 22.0软件进行数据处理,计量资料

以( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用  $t$  检验,单因素方差分析,计数资料以  $n(\%)$ 表示,采用  $\chi^2$  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,采用卡普兰-迈耶曲线分析生存情况,Log-Rank 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 两组基本资料比较

两组性别、年龄、SLE 病程、体质量、合并症、户籍地等比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。见表 1。

表 1 两组一般资料比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

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

项目	研究组 ( $n=136$ )	对照组 ( $n=136$ )	$t/\chi^2$ 值	$P$ 值
性别(女/男)	116/20	120/16	0.512	0.474
年龄(岁)	32.11±6.05	30.92±5.95	1.635	0.103
SLE 病程(年)	3.51±1.25	3.26±1.12	1.737	0.084
体质量(kg)	59.72±7.35	58.66±7.32	1.192	0.234
合并症(例)				
冠心病	7(5.15)	5(3.68)	0.349	0.555
高血压	10(7.35)	6(4.41)	1.063	0.303
糖尿病	5(3.68)	3(2.21)	0.129	0.720
户籍地(例)				
城市	86(63.24)	80(58.82)	0.557	0.456
农村	50(36.76)	56(41.18)		

### 2.2 两组血清 AGR、补体 C3、C4 水平

研究组血清 AGR、补体 C3、C4 水平较对照组低( $P < 0.05$ )，见表 2。

表 2 两组血清 AGR、补体 C3、C4 水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Serum AGR、complement C3、C4 levels were compared between the 2 groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	$n$	AGR	补体 C3(g/L)	补体 C4(g/L)
研究组	136	0.92±0.20	0.45±0.13	0.16±0.04
对照组	136	1.16±0.25	0.96±0.32	0.32±0.10
$t$ 值		8.742	17.220	17.325
$P$ 值		<0.001	<0.001	<0.001

### 2.3 血清 AGR、补体 C3、C4 对 SLE 合并脑血管病诊断价值

血清 AGR、补体 CD、C4 对 SLE 合并脑血管病的诊断价值,见表 3。

表 3 血清 AGR、补体 C3、C4 对 SLE 病诊断价值

Table 3 The diagnostic value of serum AGR, complement C3 and C4 in SLE

项目	AUC	95%CI	截断值	敏感度 (%)	特异度 (%)	$P$ 值
AGR	0.767	0.712~0.816	≤1.01	69.12	75.00	0.01
补体 C3	0.806	0.754~0.852	≤0.80	90.44	62.50	0.01
补体 C4	0.795	0.743~0.842	≤0.25	75.74	69.12	0.01

### 2.4 血清 AGR、补体 C3、C4 联合诊断 SLE 合并脑血管病的价值

血清 AGR、补体 C3、C4 联合诊断 SLE 合并脑血管病的 AUC 为 0.862,95%CI 为 0.815~0.901,Z 统计=16.163,  $P < 0.05$ ,截断值诊断敏感度为 74.26%,特异度为 86.76%,见图 1。

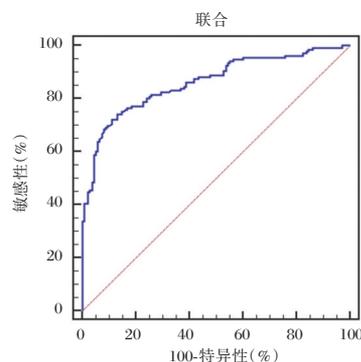


图 1 血清 AGR、补体 C3、C4 联合诊断 SLE 合并脑血管病 ROC

Figure 1 Serum AGR、complement C3、C4 combined diagnosis SLE cerebral vascular disease

### 2.5 不同疗效患者血清 AGR、补体 C3、C4 水平

不同疗效患者血清 AGR、补体 C3、C4 水平相比,显效患者血清 AGR、补体 C3、C4 水平>好转患者>无效患者,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )，见表 4。

表 4 不同疗效患者血清 AGR、补体 C3、C4 水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 4 The level of serum AGR、complement C3、C4 in different patients ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	$n$	AGR	补体 C3 (g/L)	补体 C4 (g/L)
显效患者	77	1.06±0.23	0.55±0.12	0.20±0.06
好转患者	34	0.87±0.20	0.44±0.10	0.14±0.04
无效患者	25	0.56±0.17	0.25±0.07	0.06±0.02
$F$ 值		53.277	74.713	76.540
$P$ 值		<0.001	<0.001	<0.001

### 2.6 血清 AGR、补体 C3、C4 水平与疗效的关系

以 SLE 合并脑血管病疗效作因变量,将血清 AGR、补体 C3、C4 作为自变量,纳入 Logistic 回归分析显示,血清 AGR、补体 C3、C4 水平与 SLE 合并脑血管病患者疗效显著相关( $P<0.05$ ),见表 5。

表 5 血清 AGR、补体 C3、C4 水平与疗效的关系

Table 5 Relationship between serum AGR、complement C3、C4 level and efficacy

变量	$\beta$ 值	S.E 值	Wald/ $\chi^2$ 值	OR 值	95%CI 值	P 值
AGR	-0.501	0.176	8.108	0.606	0.402~0.913	<0.001
补体 C3	-0.675	0.211	10.228	0.509	0.271~0.957	<0.001
补体 C4	-0.622	0.183	11.555	0.537	0.326~0.884	<0.001

### 2.7 生存分析

根据研究组血清 AGR、补体 C3、C4 水平均数分为高表达患者、低表达患者。随访 28 d,血清 AGR、补体 C3、C4 高表达患者生存率高于低表达患者( $\chi^2=6.351、8.377、4.796、P=0.012、0.004、0.029$ ),见图 2。

## 3 讨论

目前,SLE 合并脑血管病的发病机制尚未明确,SLE 的主要病理表现为炎症反应及血管异常<sup>[8]</sup>。既往大量研究显示,SLE 患者疾病活动时,机体大量消耗补体 C3、C4,出现低补体血症<sup>[9]</sup>。且新修订的 SLE 的诊断标准加入补体 C3、C4 检测,提示补体

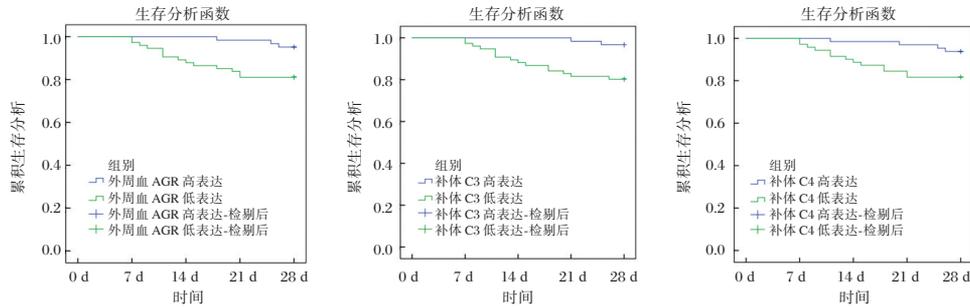


图 2 生存曲线  
Figure 2 survival curve

C3、C4 参与 SLE 的发生和疾病进展。SLE 患者体内存在多种相关自身抗体,在补体 C3、C4 介导作用下,这些抗体与对应抗原结合形成免疫复合物,并附着于血管壁,从而刺激血管炎症发生发展<sup>[10]</sup>。当免疫复合物沉积在脑血管时,可引起脑血管炎,且主要以脑血管阻塞为主要表现,最终导致脑细胞缺血缺氧,形成脑血管疾病<sup>[11]</sup>。结果提示血清补体 C3、C4 的低表达增加 SLE 患者并发脑血管疾病风险。且本研究发现血清补体 C3、C4 在诊断 SLE 方面具有一定价值,但存在诊断敏感度较低的不足。

SLE 可引起多系统损害,且伴有多种自身抗体,肝脏是最易受累脏器。国外学者 Sule SD 等<sup>[13]</sup>报道指出 ALB 水平降低与狼疮患者肾脏疾病有关。GLB 具有免疫作用,当免疫系统遇到外来的病原体时会根据病原体的不同产生不同数量的 GLB,如果病原体比较难以消灭,免疫系统会刺激淋巴细胞产生更多的 GLB,直到入侵物被球蛋白消灭为止<sup>[14]</sup>。SLE 同样会刺激机体免疫系统大量释放 GLB,同时会大量消耗 ALB,导致二者比值 AGR 降低。低蛋白

血症也是 SLE 合并脑血管病发病机制的一种假说,但 AGR 与 SLE 合并脑血管病的研究较少。本研究发现,SLE 合并脑血管病患者的血清 AGR 低于单纯 SLE 患者,与 SLE 患者并发脑血管病也有密切联系。范君<sup>[15]</sup>通过多因素回归分析模型发现,血清 AGR 下降是 SLE 合并脑血管病的危险因素之一。证实了本研究结果的正确性。SLE 引起患者肝功能受损,进而导致 ALB 合成、分泌减少,而疾病持续刺激机体释放 GLB,表现为血清 AGR 下降,ALB 抗氧化、抗炎作用降低,增加脑血管发生风险。

有调查显示,50%~75%的 SLE 患者病情累及中枢神经系统,也是 SLE 最严重的并发症之一,其临床表现复杂多样,且患者病情多危重,诊断和治疗均具有一定困难<sup>[16]</sup>。及时检出并给予有效治疗,对改善患者预后至关重要。本研究发现,血清 AGR、补体 C3、C4 联合诊断 SLE 合并脑血管病的 AUC 高于各指标单一诊断,诊断敏感度、特异度均得到一定改善,可辅助临床诊断 SLE 合并脑血管疾病,积极开展对应治疗。

综上可知, SLE合并脑血管病患者的血清AGR及补体C3、C4均呈现异常低表达状态,检测上述指标可辅助临床诊断SLE合并脑血管疾病,在评估患者治疗效果及判断预后方面具有较大发展潜力。

### 参考文献

- [1] 范君,罗寰,任占芬,等. 系统性红斑狼疮合并脑血管病临床研究进展[J]. 河北北方学院学报(自然科学版), 2019, 35(2):39-41.
- [2] 沈茹,李艳君,林丽佳. 系统性红斑狼疮患儿外周血IL-6、IL-10、IL-17水平变化及其在单个核细胞中的表达研究[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2017, 9(6):371-375.
- [3] 曹毅,何佳桐,岳妍,等. 原发性高血压人群同型半胱氨酸与脑血管功能积分的相关性研究[J]. 中华健康管理学杂志, 2018, 12(6):514-518.
- [4] Leblanc-Trudeau C, Masetto A, Bocti C. Progressive Multifocal Leukoencephalopathy Associated with Belimumab in a Patient with Systemic Lupus Erythematosus[J]. J Rheumatol, 2015, 42(3):551-552.
- [5] 彭晓燕,谢梦姝. 系统性红斑狼疮合并李斯特菌脑膜炎并发重度脑积水1例[J]. 临床神经病学杂志, 2019, 32(4):257, 277.
- [6] Gordon C, Amissah-Arthur MB, Gayed M, et al. The British Society for Rheumatology guideline for the management of systemic lupus erythematosus in adults [J]. Rheumatology (Oxford), 2018, 57(1):e1-e45.
- [7] 陈京雁. 系统性红斑狼疮性脑病40例临床观察[J]. 心脑血管病防治, 2015, 15(3):250-251.
- [8] Jiang XL, Cheng Z, Zhang LJ, et al. Arterial spin labeling analysis of the cerebral blood flow in systemic lupus erythematosus patients[J]. J Med Postgrad, 2016, 29(5):495-499.
- [9] 张树君. 自身抗体与血清补体C3、C4水平联合检测诊断系统性红斑狼疮的敏感度及特异性[J]. 中国实用医刊, 2018, 45(2):11-15.
- [10] Zhang XL, Xu SQ, Cai J, et al. Correlation study between complement C3 level and degree of disease activity in patients with systemic lupus erythematosus [J]. Chin J Gen Pract, 2016, 15(5):375-378.
- [12] 戴莉萍,黄帆,孔卫红,等. 细胞因子与狼疮合并妊娠的临床特征的相关性分析[J]. 中国热带医学, 2016, 16(6):597-600.
- [13] Sule SD, Moodabail DG, Burnham J, et al. Predictors of kidney disease in a cohort of pediatric patients with lupus [J]. Lupus, 2015, 24(8):862-868.
- [14] 朱吉,王磊,陈戈,等. 健脾调肝方联合激素治疗自身免疫性肝炎的疗效及对肝功能的影响[J]. 世界中医药, 2019, 14(5):1282-1285.
- [15] 范君. 系统性红斑狼疮合并脑血管病的临床分析[D]. 河北北方学院, 2018.
- [16] 王信,王健,郭文静,等. 系统性红斑狼疮合并视神经脊髓炎1例并文献复习[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2019, 40(14):1771-1773.
- [5] 王慧琴,王瑶,吴卫东. 新疆南疆地区229336例血片样本新生儿疾病筛查结果分析[J]. 中国优生与遗传杂志, 2019, 27(2):176-177.
- [6] Japanese Society for Pediatric Endocrinology. Guidelines for Mass Screening of Congenital Hypothyroidism (2014 revision)[J]. Clinl Pediatr Endocrinol, 2015, 24(3):107-133.
- [7] 江石丰,郑雪婷,张惠英,等. 国内围产儿出生缺陷影响因素的meta分析[J]. 华南预防医学, 2019, 45(3):233-236.
- [8] 林彩娟,范歆,玉晋武,等. 不同促甲状腺激素切值的确定对广西新生儿先天性甲状腺功能减低症筛查的影响[J]. 中华地方病学杂志, 2019, 38(9):706-709.
- [9] Upadhye DS, Jain DL, Trivedi YL, et al. Neonatal Screening and the Clinical Outcome in Children with Sickle Cell Disease in Central India[J]. Plos One, 2016, 11(1):e0147081.
- [10] Sarica MA, Dalkran T, Menzilioğlu MS, et al. Ultrasound Elastography in Pediatric Congenital Hypothyroid Patients [J]. Pediatr Endocrinol Rev, 2016, 14(1):48-53.
- [11] 黄慈丹,王洁,赵振东,等. 海南省新生儿先天性甲状腺功能减低症流行病学特征及促甲状腺激素筛查截断值的设定[J]. 山东医药, 2019, 59(14):66-68.
- [12] 段晓萍. 芜湖县2014~2016年新生儿苯丙酮尿症和先天性甲状腺功能低下症筛查结果分析[J]. 安徽预防医学杂志, 2019, 24(1):25-28.
- [13] Kim MR, Park HW, Chung S. A baby with congenital hypothyroidism born to a hypothyroid mother who expressed undiagnosed thyroid stimulation blocking antibody [J]. Ann Pediatr Endocrinol Metab, 2016, 21(3):161-163.
- [14] 杨丽涓,欧明才,张钰,等. 四川片区先天性甲状腺功能减低症发病率季节性分析[J]. 四川医学, 2018, 39(9):61-64.
- [15] 阎亚琼. 山西省先天性甲状腺功能减低症流行病学特征及治疗效果分析[D]. 山西医科大学, 2016.
- [16] 莫李媚,赵玉梅,陈爱华. 三亚地区新生儿先天性甲状腺功能低下症筛查结果分析[J]. 中国优生与遗传杂志, 2019, 27(2):180-181, 253.
- [17] 成利花,蔡成. 新生儿先天性甲状腺功能减退症的诊治进展[J]. 中国优生与遗传杂志, 2019, 27(11):1286-1288, 1293.
- [18] 温璇玲,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.
- [19] 陈桂霞,张微. 母孕期碘摄入量与新生儿先天性甲状腺功能减低症[J]. 国际儿科学杂志, 2017, 44(12):849-853.

(上接第673页)

## 瞬时感受器电位香草酸受体1抑制剂在神经病理性疼痛中的研究进展

盛树悦<sup>1</sup> 田映红<sup>2</sup> 张兴梅<sup>3\*</sup>

**[摘要]** 神经病理性疼痛(NPP)是当今社会中十分常见的一种症状,引起神经病理性疼痛的具体机制还不清楚,且尚未出现能够有效治疗神经病理性疼痛的药物。近年来研究者发现瞬时感受器电位(TRP)通道参与细胞内多种反应,其中瞬时感受器电位香草酸受体1(TRPV1)与神经病理性疼痛关系最为密切,可能是治疗神经病理性疼痛的重要靶点之一。文章综述了神经病理性疼痛的概况与TRP通道家族的组成与功能,重点阐述了TRPV1抑制剂作为靶向药物在神经病理性疼痛中的研究进展,旨在为神经病理性疼痛的药物治疗提供新的研究方向。

**[关键词]** 神经病理性疼痛;瞬时感受器电位香草酸受体1;抑制剂

### Progress of research into the role of transient Receptor Potential Vanilloid 1 inhibitors in neuropathic pain

SHENG Shuyue<sup>1</sup>, TIAN Yinghong<sup>2</sup>, ZHANG Xingmei<sup>3\*</sup>

(1. The First Affiliated Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong, China, 510515; 2. Experimental teaching management center, School of Basic Medical Science, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong, China, 510515; 3. Department of Neurobiology, School of Basic Medical Science, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong, China, 510515)

**[ABSTRACT]** Neuropathic pain (NPP) is a common symptom in the world. The mechanism of neuropathic pain is still unclear, and there is no drug that can effectively treat NPP. In recent years, researchers have discovered that transient receptor potential (TRP) channels are involved in a variety of intracellular responses. Transient receptor potential vanilloid receptor 1 (TRPV1) is closely related to NPP. It may be one of the important targets for the treatment of NPP. This article summarizes the overview of neuropathic pain and the composition and function of the TRP channel family and focuses on the progress of research into the role of TRPV1 inhibitors as targeted drugs in neuropathic pain, providing a new strategy for the drug therapy of NPP.

**[KEY WORDS]** Neuropathic pain; Transient Receptor Potential Vanilloid 1; Inhibitor

神经病理性疼痛(neuropathic pain, NPP)是指由躯体感觉系统的损害或疾病导致的疼痛<sup>[1]</sup>,常见症状是机械性异常性疼痛和痛觉过敏,还包括糖尿病性神经病变、化疗后引起的神

经病变、带状疱疹后神经痛、脊髓损伤和幻肢痛等<sup>[2]</sup>。

引起神经病理性疼痛的具体机制尚不清楚,目前的研究结果提示包括外周机制和中枢机

基金项目:国家自然科学基金(81771484);广东省自然科学基金(2018A030313835)

作者单位:1. 南方医科大学第一临床医学院,广东,广州 510515

2. 南方医科大学基础医学院实验教学管理中心,广东,广州 510515

3. 南方医科大学基础医学院神经生物学教研室,广东,广州 510515

\*通信作者:张兴梅, E-mail:zxmr@hotmai.com

制<sup>[3]</sup>。外周机制包括外周敏化、交感神经高兴奋性相关疼痛。外周敏化由炎症因子如降钙素基因相关肽和P物质等引起,也可由离子通道表达的变化如Na<sup>+</sup>通道在脊髓背根神经节和损伤的轴突的神经末梢周围表达增加、Ca<sup>2+</sup>在背根神经节周围表达增加而引起<sup>[3]</sup>。中枢机制包括脊髓机制和脊髓上中枢机制。脊髓机制中最重要的影响因素是时间和空间的突触可塑性,即神经元对伤害性刺激随着时间和空间的增加而增强。细胞水平的机制涉及到离子通道,如Na<sup>+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、K<sup>+</sup>,离子型和代谢型受体,例如谷氨酸受体GABA受体、血清素受体、肾上腺素能受体、神经激肽和香草素受体;多种炎症因子;神经生长因子等<sup>[3]</sup>。

近年来多项研究提示瞬时感受器电位(transient receptor potential, TRP)与神经病理性疼痛相关,尤其是TRP家族中TRPV1(transient receptor potential vanilloid 1)最为相关,虽然具体作用机制尚不明确,但在动物实验中观察到,在神经病理性疼痛模型中TRPV1表达增加<sup>[4]</sup>,并且在药理学研究中发现TRPV1能下调多种疼痛刺激物质的产生<sup>[5]</sup>。

## 1 瞬时感受器电位

瞬时感受器电位(transient receptor potential, TRP)通道是在分析果蝇的视觉突变体时发现的,与野生型果蝇中的持续受体电位相反,该突变体显示出对光的短暂响应<sup>[6]</sup>。TRP通道分为七个亚群:TRPC, TRPV, TRPM, TRPP, TRPML, TRPA和TRPN(后者仅在鱼,苍蝇和蠕虫中表达)<sup>[7]</sup>。TRP通道由包括6个跨膜 $\alpha$ 螺旋结构构成,在最后2个跨膜片段之间形成跨膜孔道区,N端和C端都位于胞质中。不同TRP亚群的氨基酸数量和序列不同。在TRPC、TRPM、TRPA和TRPV亚家族中发现了一段由6个氨基酸构成的保守序列,位于羧基末端,称为TRP盒(TRP box)。有几项研究均表明TRP盒对TRP通道的通道门控有重要作用<sup>[8]</sup>。TRP通道涉及人体内多种感觉功能,它们的最佳功能一般都建立在热敏感上<sup>[9]</sup>。TRP通道的突变会引起多种疾病,如肾病(TRPC6)、自发性疼痛综合征(TRPA1)、低镁血症(TRPM6)、夜盲症(TRPM1)和复杂的肌肉骨骼和神经疾病(TRPV4)<sup>[5]</sup>。

TRPV1(transient receptor potential vanilloid 1)又称辣椒素受体,是一种非选择性阳离子通道,位于细胞膜上和许多细胞器膜上,对Ca<sup>2+</sup>有高度选择

性,对其他阳离子也有一定的选择透过性,如Mg<sup>2+</sup>。TRPV1可以被多种内源性或外源性物质激活,内源性调节因子包括花生四烯乙醇胺、2-花生四烯酸酰甘油和溶血磷脂酸,外源性激动剂包括多种节肢动物的毒素。对该受体有效的刺激有温度(>42℃)、辣椒素、PH值(细胞外PH降低)。树脂毒素(resiniferatoxin, RTX)也是TRPV1的有效激动剂,它可以在低于辣椒素的浓度下激活通道,但其作用产生较慢。目前尚未明确TRPV1在神经病理性疼痛中具体的作用机制,有研究者表明可能的机制是当有效伤害刺激激活TRP通道,导致大量Ca<sup>2+</sup>穿过胞膜内流,导致膜去极化,进而可能触发电压门控离子通道依赖性动作电位<sup>[10]</sup>,引起痛觉向神经中枢传递。在对照实验中,野生型小鼠和TRPV1基因敲除小鼠在急性损伤和慢性神经病中神经性机械痛觉过敏没有统计学差异<sup>[10]</sup>。但是在药理学研究中,TRPV1离子通道抑制剂被证实能够减少伤害性刺激物质的表达,表明TRPV1拮抗剂可能作为疼痛的一个新作用靶点。

TRPV1在中枢神经系统和周围神经系统均有表达,主要表达在背根神经节和三叉神经上<sup>[11]</sup>。此外,还分布于支配膀胱的神经纤维,肺部和耳蜗以及上呼吸道<sup>[12]</sup>。

## 2 TRPV1抑制剂治疗神经病理性疼痛的研究进展

目前国内外治疗神经病理性疼痛的药物较局限,一线推荐用药为抗癫痫药(如普瑞巴林、加巴喷丁)、三环类抗抑郁药、选择性5-羟色胺和去甲肾上腺素再摄取抑制剂,同时可以辅助局部用药如利多卡因贴剂<sup>[13]</sup>。

### 2.1 辣椒平(capsazepine)

1994年,辣椒平第一个被证实是辣椒素的竞争性拮抗剂,在体内和体外实验中均有活性<sup>[14]</sup>。辣椒平能够竞争TRPV1上的辣椒素结合位点,阻断辣椒素诱导的大鼠背根神经节上的离子通道激活。虽然辣椒平在实验室研究中作用显著,但是目前还未将其应用于临床,主要是存在以下几个局限性:首先是因为实验用的动物基本都是啮齿动物,啮齿动物的代谢稳定性差,药代动力学不稳定<sup>[15]</sup>。另一个原因是辣椒平的选择性不高,除了拮抗TRPV1,还抑制烟碱型乙酰胆碱受体、电压门控Ca<sup>2+</sup>通道和TRPM8,引起相应的副作用,如肌无力等。

## 2.2 AS1928370

(R)-N-(1-甲基-2-氧代-1,2,3,4-四氢-7-喹啉基)-2-[(2-甲基吡咯烷-1-基)甲基]联苯-4-甲酰胺(AS1928370)是一种新型 TRPV1 拮抗剂,能够与 TRPV1 受体上的树脂毒素结合位点结合并抑制辣椒素介导的内向电流<sup>[16]</sup>。

在小鼠 L5/L6 脊神经结扎模型中,研究人员采用了口服和鞘内注射 AS1928370 以研究其镇痛作用。在药代动力学研究中,AS1928370 显示出良好的口服生物利用度以及高效的脑和脊髓渗透性。实验结果显示,口服 AS1928370 能显著改善机械异常性疼痛;鞘内注射 AS1928370 能上调脊神经结扎小鼠模型的机械疼痛阈值<sup>[17]</sup>。对实验大鼠进行旋转仪测试 AS1928370 相关副作用,发现服用 AS1928370 对此没有显著影响。相比较现今治疗神经病理性疼痛的一线药物(如加巴喷丁)常常会引起中枢系统副作用,如嗜睡和头晕,AS1928370 在治疗剂量下产生中枢副作用可能性较小<sup>[16]</sup>,由此可见,AS1928370 在神经病理性疼痛治疗中有潜在研究价值。

## 2.3 二烯酰胺(dimeramide)

由日本富士研究所研究出的 5,5-二苯基戊二烯酰胺,是一系列能够靶向拮抗体外和体内 TRPV1 的化合物<sup>[18]</sup>。为了达到更好药代动力学目标,作者运用化学合成等技术研究了多种在该化合物 5 号位上有取代基的替代物,结果显示比起其他取代化合物,在 5 号位上用苯环加烷氧基取代的替代物(2E,4Z)-N-[(3R)-3-hydroxy-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydro-5-quinolyl]-5-(4-isopropoxyphenyl)-5-(4-trifluoromethylphenyl)-2,4-pentadienamide((R)-36b)通过血脑屏障的能力显著提高。体内实验证实该化合物能够有效抑制由辣椒素诱导的 Ca<sup>2+</sup>通道开放作用,并且能够以剂量依赖的方式逆转大鼠的机械性异常性疼痛,并且能够在坐骨神经损伤诱导的神经病理性疼痛模型中显著逆转热痛觉过敏<sup>[18]</sup>。综上所述,5,5-二苯基戊二烯酰胺化合物有望成为靶向治疗神经病理性疼痛的新型止痛药物。

## 2.4 $\alpha$ -菠菜甾醇( $\alpha$ -spinasterol)

$\alpha$ -菠菜甾醇是 TRPV1 的拮抗剂,具有抗炎、抗氧化和抗伤害感受的作用。同时它也是一种环氧化酶(cyclooxygenase, COX)抑制剂。在神经病理性疼痛的产生机制中,COX 反应的终产物前列腺素 E2(PGE2)可以作为内源性物质激活 TRPV1。所以

$\alpha$ -菠菜甾醇不仅通过抑制 COX 减少 PGE2 的产生,还能拮抗 TRPV1,能够作为镇痛药的新靶点<sup>[19]</sup>。

在小鼠实验中,口服  $\alpha$ -菠菜甾醇减少了术后疼痛,并减少损伤组织中的细胞浸润<sup>[20]</sup>。 $\alpha$ -菠菜甾醇还可减少部分坐骨神经结扎引起的机械异常性疼痛和紫杉醇化疗诱导的机械和寒冷异常性疼痛。此外,还观察到  $\alpha$ -菠菜甾醇在不改变动物体温的情况下能够显著抑制 COX-1 和 COX-2 的活性。 $\alpha$ -菠菜甾醇是一种有效且安全的 TRPV1 拮抗剂和 COX 抑制剂,在术后疼痛和神经病理性疼痛模型中具有镇痛作用,是一种开发新型镇痛药的模板化合物<sup>[20]</sup>。

## 2.7 SZV 1287 ([3-(4,5-diphenyl-1,3-oxazol-2-yl) propanal oxime])

SZV 1287[3-(4,5-二苯基-1,3-恶唑-2-基)丙醛肟]([3-(4,5-diphenyl-1,3-oxazol-2-yl) propanal oxime])是一种新型氨苄西林敏感的胺氧化酶(semicarbazide-sensitive amine oxidase, SSAO)抑制剂,具有拮抗 TRPV1 的作用。SSAO 分解伯胺(如甲胺,氨基丙酮)生成相应的醛、氨和过氧化氢<sup>[21]</sup>,如甲醛、甲基乙二醛、过氧化氢,可作用于 TRPV1 受体并使之活性降低。体内实验证实,在由坐骨神经结扎造成的创伤性神经病理性疼痛的小鼠模型中,SZV1287 显著抑制了由 TRPV1 活化诱导的急性化学感受性痛觉过敏。在野生型小鼠和 TRPV1 基因敲除小鼠的对照实验中,野生型坐骨神经结扎的小鼠在 SZV1287 给药 7 天后,有半数小鼠神经性痛阈显著降低,而在基因敲除小鼠中未观察到该现象。上述研究结果说明 SZV1287 不仅通过抑制 SSAO 减少组织激活物的产生,同时也可抑制 TRPV1 的作用,使之成为新型镇痛药的热门研究对象<sup>[22]</sup>。

## 2.8 针对 TRPV1 的小分子 RNA

小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 是长度在 20~50 个核苷酸的 RNA 链,通过 RNA 干扰,与宿主细胞的 mRNA 互补结合并使之降解,从而抑制宿主基因的表达。在动物试验中,研究者通过单侧坐骨神经慢性压迫损伤(CCI: Chronic constriction injury)构建出神经病理性疼痛大鼠模型,与对照组对比,CCI 诱导的大鼠模型对机械刺激和热刺激的敏感性均明显升高。并通过蛋白质检测发现 TRPV1 蛋白在前扣带回皮质、背角和背根节的表达明显增强。给实验组神经病理性疼痛

模型大鼠鞘内注射靶向 TRPV1 的 siRNA 载体, 结果表明, 实验组大鼠的冷刺激诱导的痛觉明显减少, 对照组结果无明显改变。同时, 研究者同时检测了脊髓背角中细胞外信号调节激(Extracellular signal-regulated kinases, ERK)、钙调素依赖性激酶(CaM-dependent kinases, CaMKs)水平。先前已经有证据证实 ERK 磷酸化后在神经元可塑性和痛觉加工过程中起着重要的作用, 而 CaMKs 参与 ERK 激活<sup>[4]</sup>, 从而参与疼痛产生的过程。在 CCI 大鼠模型中, CaMKII、ERK 磷酸化作用两者均升高, 通过 TRPV1 siRNA 下调脊髓 TRPV1 蛋白的表达后, 脊髓 TRPV1 和 CaMKII 的表达减低, ERK 的磷酸化作用也减少, 提示 TRPV1 siRNA 介导的止痛作用可能与下调 CaMKII 表达和减少 ERK 的磷酸化有关: TRPV1 siRNA 可降低脊髓 TRPV1 和 CaMKII 的表达, 减少 ERK 的磷酸化, 从而产生镇痛作用<sup>[23]</sup>。

短发夹 RNA(short-hairpin RNA, shRNA) 是设计为能够形成发夹结构的非编码小 RNA 分子, 可通过 RNA 干扰来抑制基因的表达。Hirai 等<sup>[24]</sup>将编码 TRPV1 的 siRNA 与腺病毒相关血清型 9(adenovirus serotype 9, AAV9) 编码的 shRNA 进行重组, 得到靶向 TRPV1 的 AAV9 载体(AAV9-shTRPV1), 将其向神经选择性神经损伤(spared nerve injury, SNI) 模型小鼠鞘内给药来研究 TRPV1 在神经病理性疼痛中的作用以及 shRNA 的镇痛作用。实验结果显示治疗后给予实验组和对照组 SNI 小鼠机械性、寒冷和温度刺激时, AAV9-shTRPV1 处理组在治疗后第 10 天至第 28 天对 50℃ 温度刺激的痛觉潜伏期显著增加, 其他两种刺激两组无显著差别。在注射 4 周后, AAV9-shTRPV1 处理组小鼠的 DRG 中的 TRPV1 表达水平降低约 55%, 在脊髓中降低约 95%。该研究结果既证实 TRPV1 在神经病理性疼痛中起着关键作用, 也表明 AAV9-shTRPV1 的热镇痛作用, 在实验过程中未观察到明显副作用。

除了靶向 TRPV1 的 siRNA、shRNA 有较明显的镇痛作用, 也有研究证明靶向长链非编码 RNA(long noncoding RNAs, lncRNA) 的 siRNA 可以通过 TRPV1 途径产生镇痛的作用<sup>[25]</sup>。Lnc RNAs 是 RNA 聚合酶 II 转录的副产物, 目前对 lnc RNA 的研究还不清楚, 可能在细胞内许多重要调控过程中发挥作用。Lnc RNA BC168687 是 lnc RNAs 分子之一, 具体作用还不清楚, 但有 Liu 等<sup>[25]</sup>通过实

验发现在糖尿病性神经性疼痛(Diabetic neuropathic pain, DNP) 的大鼠 DRG 中, lnc RNA BC168687 的表达水平明显增高。Liu 等<sup>[26]</sup>通过动物实验发现, lnc RNA BC168687 siRNA 能够明显提高 DNP 大鼠的机械刺激缩足阈值(mechanical withdrawal thresholds, MWT) 和延长热刺激缩足潜伏期(thermal withdrawal latencies, TWL), 能够抑制大鼠 DRG 中 TRPV1 mRNA 的表达, 同时也明显降低大鼠 DRG 中 TRPV1 受体。

## 2.8 锌(zinc)

锌是一种过渡金属, 在临床上常作为抗炎剂被使用。已有临床实验结果表明口服硫酸锌能明显降低青少年女性原发性痛经<sup>[27]</sup>。锌存在于脊髓和 DRG 神经元中, 通过动物实验发现, 减少脊髓 DRG 中的锌, 会使小鼠的神经性疼痛明显增加<sup>[28]</sup>。化学疗法诱导的周围神经病变(chemotherapy-induced peripheral neuropathy, CIPN) 是癌症化疗后常见的剂量依赖性不良反应, 且缺乏有效的治疗。

## 3 结论与展望

神经病理性疼痛是指由躯体感觉系统的损害或疾病导致的疼痛, 主要症状是异常自发性疼痛、痛觉过敏和痛觉过敏等。目前用于神经病理性疼痛治疗的药物有限, 作用局限, 很多患者为此忍受痛苦进而影响生活质量。研究出靶向神经病理性疼痛的药物迫在眉睫。

TRPV1 是一种非选择性阳离子通道, 可以被多种内源性或外源性物质激活。该通道的激活与炎症和疼痛相关, 尽管 TRPV1 参与疼痛产生的具体机制尚未阐明, 有实验证据表明 TRPV1 通过激活钙调素依赖性激酶, 引起细胞中细胞外信号调节激磷酸化作用增强, 进而参与神经病理性疼痛发生和维持的过程。但是这些发现也不排除其他信号分子参与这一过程。一系列 TRPV1 抑制剂如 2-(3-氟-4-甲基磺酰基氨基苯基)丙酰胺、二烯酰胺、 $\alpha$ -菠菜甾醇、SZV 1287、针对 TRPV1 的小分子 RNA(包括 siRNA、shRNA、lncRNA)、zinc 在细胞水平和动物模型上显示出较好的神经病理性疼痛治疗的作用。然而真正进入临床阶段的药物还是很少。因为现有研究结果证实 TRPV1 抑制剂也有局限性, 主要在于两个副作用: 意外烧伤和高温。许多 TRPV1 抑制剂因为引起患者高热而被终止临床试验, 有研究者建议通过服用普通退热药如

对乙酰氨基酚来控制体温,但更有效的方法应该是我们医学工作者通过化学修饰来减少这些化合物产生的高温的副作用。这说明通过进一步优化 TRPV1 抑制剂的效能、物理性质、化学结构,对于 TRPV1 抑制剂用于靶向治疗神经病理性疼痛在不久的将来成为有潜力的治疗剂具有重大意义。

### 参考文献

- [1] Jensen TS, Baron R, Haanpaa M, et al. A new definition of neuropathic pain[J]. *PAIN*, 2011, 152:2204-2205.
- [2] Aghazadeh TM, Baraldi PG, Baraldi S, et al. Medicinal Chemistry, Pharmacology, and Clinical Implications of TRPV1 Receptor Antagonists. *Med Res Rev*, 2017, 37:936-983.
- [3] Cohen SP, Mao J. Neuropathic pain: mechanisms and their clinical implications[J]. *BMJ*, 2014, 348:f7656.
- [4] Leo M, Schmitt LI, Erkel M, et al. Cisplatin-induced neuropathic pain is mediated by upregulation of N-type voltage-gated calcium channels in dorsal root ganglion neurons[J]. *Exp Neurol*, 2017, 288:62-74.
- [5] Carnevale V, Rohacs T. TRPV1: A Target for Rational Drug Design[J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2016, 9(3):52.
- [6] Montell C, Rubén GM. Molecular characterization of the *Drosophila* trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction[J]. *Neuron*, 1989, 2:1313.
- [7] Li M, Yu Y, Yang J. Structural biology of TRP channels[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2011, 704:1.
- [8] Valente P, Garcia-Sanz N, Gomis A, et al. Identification of molecular determinants of channel gating in the transient receptor potential box of vanilloid receptor I[J]. *Faseb J*, 2008, 22:3298-3309.
- [9] Vriens J, Nilius B, Voets T. Peripheral thermosensation in mammals[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2014, 15:573-589.
- [10] Bolcskei K, Helyes Z, Szabo A, et al. Investigation of the role of TRPV1 receptors in acute and chronic nociceptive processes using gene-deficient mice. *Pain*, 2005, 117:368.
- [11] Carnevale V, Rohacs T. TRPV1: A Target for Rational Drug Design[J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2016, 9(3):52.
- [12] TLR E. *Neurobiology of TRP Channels*. 2nd edition[M]. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis, 2017.
- [13] 张静泽, 王宇飞, 武剑. 神经病理性疼痛药物治疗史[J]. *临床药物治疗杂志*, 2017:70-75.
- [14] Walpole CS, Bevan S, Bovermann G, et al. The discovery of capsazepine, the first competitive antagonist of the sensory neuron excitants capsaicin and resiniferatoxin [J]. *J Med Chem*, 1994, 37:1942-1954.
- [15] Vriens J, Appendino G, Nilius B. Pharmacology of vanilloid transient receptor potential cation channels [J]. *Mol Pharmacol*, 2009, 75:1262.
- [16] Watabiki T, Kiso T, Kuramochi T, et al. Amelioration of neuropathic pain by novel transient receptor potential vanilloid 1 antagonist AS1928370 in rats without hyperthermic effect [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2011, 336:743-750.
- [17] Watabiki T, Kiso T, Tsukamoto M, et al. Intrathecal administration of AS1928370, a transient receptor potential vanilloid 1 antagonist, attenuates mechanical allodynia in a mouse model of neuropathic pain [J]. *Biol Pharm Bull*, 2011, 34:1105-1108.
- [18] Saku O, Ishida H, Atsumi E, et al. Discovery of novel 5, 5-diarylpentadienamides as orally available transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) antagonists [J]. *J Med Chem*, 2012, 55:3436-3451.
- [19] Marwaha L, Bansal Y, Singh R, et al. TRP channels: potential drug target for neuropathic pain [J]. *Inflamm Ophthalmol*, 2016, 24:305-317.
- [20] Brusco I, Camponogara C, Carvalho FB, et al. alpha-Spinasterol: a COX inhibitor and a transient receptor potential vanilloid 1 antagonist presents an antinociceptive effect in clinically relevant models of pain in mice [J]. *Br J Pharmacol*, 2017, 174:4246-4247.
- [21] Payrits M, Saghy E, Matyus P, et al. A novel 3-(4, 5-diphenyl-1, 3-oxazol-2-yl)propanal oxime compound is a potent Transient Receptor Potential Ankyrin 1 and Vanilloid 1 (TRPA1 and V1) receptor antagonist [J]. *Neuroscience*, 2016, 324:151.
- [22] Horvath A, Tekus V, Bencze N, et al. Analgesic effects of the novel semicarbazide-sensitive amine oxidase inhibitor SZV 1287 in mouse pain models with neuropathic mechanisms: Involvement of transient receptor potential vanilloid 1 and ankyrin 1 receptors. *Rharmacol Res*, 2018, 131:231-243.
- [23] Guo SH, Lin JP, Huang LE, et al. Silencing of spinal Trpv1 attenuates neuropathic pain in rats by inhibiting CAMKII expression and ERK2 phosphorylation [J]. *Sci Rep*, 2019, 9:2769.
- [24] Hirai T, Enomoto M, Kaburagi H, et al. Intrathecal AAV serotype 9-mediated delivery of shRNA against TRPV1 attenuates thermal hyperalgesia in a mouse model of peripheral nerve injury [J]. *Mol Ther*, 2014, 22:409-419.
- [25] Liu CL, Tao J, Wu H, et al. Effects of LncRNA BC168687 siRNA on Diabetic Neuropathic Pain Mediated by P2X7 Receptor on SGCs in DRG of Rats [J]. *Biomed Res Int*, 2017, 2017:7831251.
- [26] Liu CL, Li C, Deng Z, et al. Long Non-coding RNA BC168687 is Involved in TRPV1-mediated Diabetic Neuropathic Pain in Rats. *Neuroscience*, 2018, 374:214-222.
- [27] Zekavat OR, Karimi MY, Amanat A, et al. A randomised controlled trial of oral zinc sulphate for primary dysmenorrhoea in adolescent females. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*, 2015, 55:369-373.
- [28] Luo J, Bavencoffe A, Yang P, et al. Zinc Inhibits TRPV1 to Alleviate Chemotherapy-Induced Neuropathic Pain [J]. *J Neurosci*, 2018, 38:474.

## 山东省立医院病理科

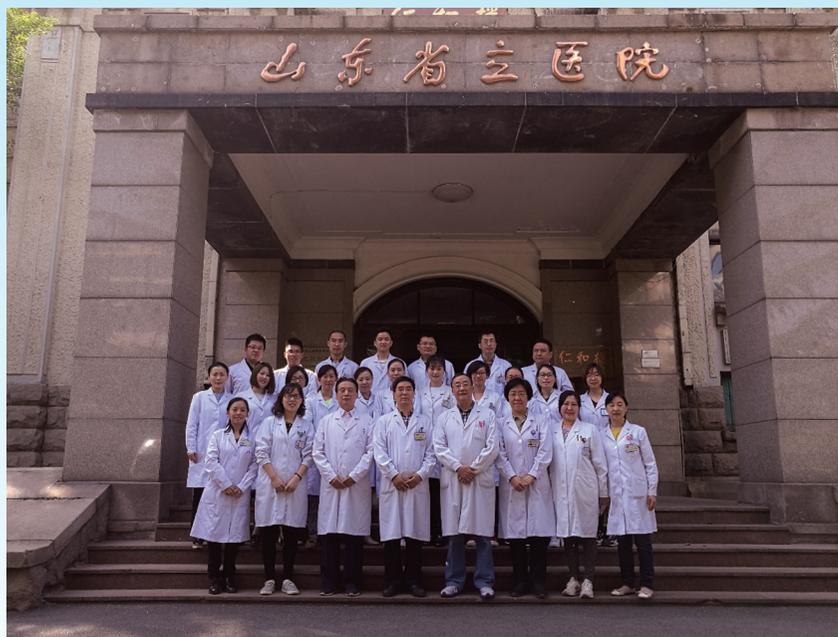
山东省立医院病理科始建于1957年,经过半个多世纪的积淀和不断的发展,已成为集病理诊断、教学、科研为一体的大型病理诊断机构。科室仪器设备先进,技术力量雄厚,开展常规石蜡切片、快速冷冻切片、特殊染色、免疫组织化学、FISH、分子病理检测等病理技术项目,年外检病例达40 000余例,年会诊量4 000多例,病理技术和病理诊断水平在省内名列前茅。科室人员结构合理,力量雄厚,现有工作人员48名,其中主任医师5人,副主任医师5人,主治医师8人,副主任技师1人,其中博士13人,硕士4人。

科室是卫生部认证的肿瘤病理省级远程会诊中心试点单位。“十二五”期间共参与远程会诊1 000余例,专家远程讲课80课时。病理远程会诊及授课,有助于实现病理学资源、知名病理专家资源、病理学科技成果信息资源共享,对提高县、市级医院病理诊断水平,降低病人医疗费用开支有重要的作用,有助于解决老百姓“看病难、看病贵”的问题。

科室是国家卫生计生委批准的第一批住院医师规范化培训基地。招生对象是拟从事临床医疗工作的高等医学院校医学类专业本科及以上学历毕业生,或已从事临床医疗工作并取得执业医师资格证书,需要接受培训的人员。招生对象的身份有单位委派人员、面向社会招收人员和专业学位研究生三类。学员在科室将直接参与一线实践工作并通过参加各层次讲座和学术活动,理论结合实践,以期经过三年的系统培训能够掌握正确的临床工作方法,能够处理医院病理科日常业务,解决病理实践中遇到的一般问题,培养对科学研究和亚专业发展的兴趣。住院医师在接受规范化培训过程中将参加本院培训基地组织的考核,待培训结束时参加全省统一的结业考核,考核合格者将获得全国统一的《住院医师规范化培训合格证书》。目前在科室已经完成规范化培训的病理专业学员9名,目前在培学员12名,包括外院3人。

近10年来,科室坚持每年承办一项国家级继续医学教育项目,对促进下级医院病理科理论水平和诊断水平具有重要作用。科室还常年担任基层医院病理科医生的进修培训工作,先后培训省内外病理医师60余人。

病理科在HE染色、免疫组化、ARMS法PCR、病理诊断等项目室内质量控制管理方面进行了积极地探索,建立并不断完善各项质量控制方案,促进质量管理的持续改进,更好地为病理诊断提供技术保障。



尤其科室开展了荧光原位杂交技术(FISH)技术检测乳腺癌和胃癌的HER-2基因扩增、鼻咽癌和淋巴瘤的EB病毒感染,肺癌、结肠癌EGFR、ALK、KRAS等基因突变,为这些肿瘤的临床诊断和靶向治疗提供了分子学依据,收到良好的社会效益。此外,科室积极参加国内病理室间质控活动,检测等指标质控成绩优良。这标志着本院病理科技术人员和诊断医师在乳腺癌、胃癌HER-2免疫组化染色水平和评分准确性及EGFR突变检测的准确性方面均达到国家标准。

### 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。

